

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik III
Direktor: Professor Dr. med. W. Hiddemann
Klinikum der Universität München

**Die T-Zellantwort gegen humane Herpesviren:
Zusammensetzung, Funktion und therapeutische Nutzung**

Habilitationsschrift
zum Erwerb der Lehrbefähigung
im Fach Experimentelle Innere Medizin
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Andreas Moosmann

2017

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung in Kürze	4
2. Einführung	5
3. Fragestellung	9
4. Die CMV-spezifische T-Zellantwort	11
Charakterisierung mit Hilfe des mini-EBV-Systems (Wiesner et al., 2005)	14
Identifizierung einer privilegierten CD8-T-Zellantwort (Ameres et al., 2013)	16
Vielfältige Rolle der CMV-Immunevasine (Ameres et al., 2014)	19
Analyse der CD4-T-Zellantwort (Ameres et al., 2015)	20
Anwendung auf CMV-seronegative Spender mittels TCR-Transfer (Schub et al., 2009)	22
5. EBV-spezifische Immunität, Immunmodulation und Immuntherapie	25
EBV-spezifische T-Zelltherapie bei PTLD-Patienten (Moosmann et al., 2010)	25
Angeborene Immunstimuli als Kofaktoren der EBV-Transformation (Iskra et al., 2010)	28
Ein CD8-T-Zell-Immunevasin der latenten Phase von EBV (Rancan et al., 2015)	30
6. Die T-Zellantwort gegen HHV-6	32
Identifikation von HHV-6-spezifischen CD8-T-Zellen (Martin et al., 2012)	32
7. Techniken und Werkzeuge zur T-Zellanalyse	35
CD40-aktivierte B-Zellen proliferieren unbegrenzt (Wiesner et al., 2008)	35
CD40-aktivierte B-Zellen als potente Stimulatoren seltener T-Zellen (Zentz et al., 2007)	37

8. Referenzen	39
9. Verzeichnis eigener wissenschaftlicher Veröffentlichungen	52
Danksagung	55

1. Zusammenfassung in Kürze

Bestimmte Viren verursachen schwerwiegende Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten, etwa nach allogener Stammzelltransplantation. Dazu gehören das Cytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das humane Herpesvirus 6 (HHV-6). Ursächlich für solche Erkrankungen ist eine beeinträchtigte virus-spezifische Immunität. Der therapeutische Transfer virusspezifischer T-Zellen kann hier Abhilfe schaffen. Gleichwohl ist eine solche T-Zelltherapie bislang den meisten Patienten, die von ihr profitieren könnten, nicht zugänglich. Neben organisatorischen und logistischen Problemen liegt dies auch am unvollkommenen Wissensstand über Aufbau und Funktion der T-Zellantwort. Es ist zu wenig darüber bekannt, welche T-Zellen im Menschen protektiv, welche epiphänomenal und welche möglicherweise toxisch sind, und kontrollierte T-Zelltherapiestudien mit präziser Analyse der darauffolgenden T-Zellrekonstitution liegen nicht vor.

Das vorliegende Projekt untersuchte daher die virusspezifische T-Zellantwort gegen CMV, EBV und HHV-6. Methoden der Aktivierung und Kultivierung antigenspezifischer T-Zellen wurden weiterentwickelt. Das Potential verschiedener Typen autologer aktivierter B-Zellen zu diesem Zweck wurde demonstriert. Diese Methoden vereinfachten die Analyse des virusspezifischen T-Zellrepertoires, die Identifikation von spezifischen T-Zellen gegen neue Antigene und Epitope, und die Etablierung einer Vielzahl von T-Zellklonen als präzise analytische Werkzeuge. Auf diese Weise konnte erstmals der Einfluss viraler immunevasiver Mechanismen von CMV auf die CD8-T-Zellerkennung infizierter Zellen vieler Spezifitäten vergleichend untersucht werden. Dies führte zur Identifikation privilegierter und daher für die antivirale Protektion wahrscheinlich besonders bedeutsamer Epitope. Analog gelang die erstmalige Identifikation eines EBV-Immunevasins, das auch in Tumorzellen exprimiert ist, und die Aufklärung seines Wirkmechanismus. Analysen der T-Zellantwort gegen HHV-6 führten zur erstmaligen Identifikation von HHV-6-spezifischen CD8-T-Zellen und eines Tests, der ihre virusspezifische Funktion nachwies.

Das Projekt widmete sich zudem der klinischen Verwirklichung und Verbesserung der virusspezifischen T-Zelltherapie. Erstmals wurde gezeigt, dass EBV-spezifische T-Zellen aus peripherem Blut von Spendern direkt isoliert und Patienten mit maligner EBV-assoziiertes Posttransplantationserkrankung verabreicht werden können. Nach dieser Therapie wurden mehrere bis dato anhaltende Spontanremissionen beobachtet. Unsere verschiedenen Vorarbeiten dienten als Grundlage für eine aktuelle randomisierte und kontrollierte klinische Studie, bei der nun der prophylaktische Einsatz CMV- und EBV-spezifischer T-Zellen multipler Epitopspezifität bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation klinisch getestet wird.

2. Einführung

Einige Mitglieder der Familie der humanen Herpesviren sind in der Bevölkerung besonders weit verbreitet (Virgin et al., 2009). Zu diesen gehören das Epstein-Barr-Virus (EBV), das Cytomegalievirus (CMV) und das humane Herpesvirus 6 (HHV-6). Nach der Primärinfektion werden sie wie alle Herpesviren nicht aus dem Körper eliminiert, sondern persistieren lebenslang (Gordon et al., 2017; Thorley-Lawson et al., 2013). Die Viren dieser Gruppe sind in den meisten Fällen unschädlich, solange sie unter kontinuierlicher Überwachung durch eine virusspezifische Immunantwort stehen; in Abwesenheit einer solchen Immunantwort können sie jedoch schwere Erkrankungen verursachen. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist die kongenitale CMV-Infektion: mindestens eines von tausend Neugeborenen erleidet dauerhafte sensorische oder neurologische Beeinträchtigungen infolge einer pränatalen CMV-Infektion (Dollard et al., 2007). Das Risiko hierfür ist bei einer Primärinfektion der Mutter während der Schwangerschaft besonders hoch (Kenneson und Cannon, 2007). EBV und HHV-6 werden dagegen pränatal in der Regel nicht übertragen, jedoch gibt es auch hier typische Syndrome einer symptomatischen Primärinfektion, nämlich das von HHV-6B verursachte Dreitagefieber im 6. bis 15. Lebensmonat, und die meist von EBV verursachte infektiöse Mononukleose im Jugend- und Erwachsenenalter. Eine Sonderrolle unter den herpesviral verursachten Erkrankungen spielen EBV-assoziierte Krebserkrankungen wie Nasopharynxkarzinom und Morbus Hodgkin (ein Teil der Fälle ist EBV-assoziiert), die bei Patienten mit ansonsten intakter Immunantwort auftreten (Mesri et al., 2014).

Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation sind aus anderen Gründen von herpesviralen Erkrankungen besonders bedroht. Seit mehr als zwei Jahrzehnten ist im wesentlichen klar, dass die Gefahr solcher Erkrankungen mit einer mangelhaften oder fehlenden virusspezifischen T-Zellantwort einhergeht (Reusser et al., 1991). Dies ist häufig eine Folge der Verwendung von Methoden zur T-Zelldepletion zur Vermeidung der graft-versus-host-Erkrankung (Landgren et al., 2009). Folgerichtig bietet sich der Transfer von virusspezifischen T-Zellen, gewinnbar aus dem Blut der immunkompetenten Spender der vorausgegangenen Stammzelltransplantation, als ursächliche Präventions- und Therapiemaßnahme an. Für CMV und EBV gibt es hierfür bereits vielfältige, fast immer positiv beurteilte klinische Erfahrungen seit den 1990er Jahren (Riddell et al., 1992; Rooney et al., 1995). Dennoch erwies es sich als unerwartet schwierig, über die Ebene von Pilotstudien hinauszugelangen, und daher sind bis heute keine Resultate von randomisierten, kontrollierten Studien zur virusspezifischen T-Zelltherapie veröffentlicht. Mögliche Gründe hierfür sind die zunehmende Vielfalt konkurrierender Ansätze zur Auswahl und Herstellung virusspezifischer T-Zellen, Probleme der Infrastruktur und Finanzierung, und nicht zuletzt die Schwierigkeit, vorherzusagen, für welche Bestandteile des komplexen und von Spender zu Spender sehr unterschiedlich zusammengesetzten virusspezifischen

T-Zell-Repertoires die größte klinische Wirksamkeit erwartet werden kann. Die letzte Frage ist noch weitgehend offen; dies begründet die Notwendigkeit intensiverer Forschungen zu Funktion, Zusammensetzung und Zielstrukturen virusspezifischer T-Zellen gegen EBV, CMV und HHV-6B. Hierzu gehört insbesondere die Identifikation viraler Proteine, die als Quelle für Peptide dienen, die von MHC-Molekülen gegenüber T-Zellen präsentiert werden; solche Proteine werden als T-Zell-Antigene bezeichnet. Ebenso wichtig ist die genaue Ermittlung der präsentierten Peptide selbst; sofern nachgewiesen wurde, dass ihre Präsentation durch natürliche Mechanismen der Antigenprozessierung zustandekommen kann und daher eine Präsentation im Rahmen einer natürlichen Virusinfektion wahrscheinlich ist, werden diese Peptide als T-Zell-Epitope bezeichnet.

Das CMV-Genom enthält über 200, die Genome von EBV und HHV-6 je rund 100 potentiell proteinkodierende Gene. Schon deshalb war zu erwarten, dass die spezifische T-Zellantwort gesunder Spender sich gegen eine Vielzahl von Epitopen dieser Viren richtet. Etwa um die Zeit, als nachgewiesen wurde, dass MHC-Moleküle Peptide aus Antigenen von Infektionserregern präsentieren (Townsend et al., 1986; Rötzschke et al., 1990), wurden auch erste T-Zellantigene aus CMV und EBV ermittelt (Borysiewicz et al., 1988; Burrows et al., 1990), und die präzise Beschreibung erster T-Zell-Epitope aus Antigenen dieser Viren folgte kurz danach (Gavin et al., 1993; Burrows et al., 1992). Seitdem gehören CMV und EBV zu den meistuntersuchten Modellen der T-Zellimmunität beim Menschen, und der Wissensstand über ihr Antigen- und Epitopspektrum ist stark angewachsen (Hislop et al., 2007b; Khan, 2007).

Die Hypothese einer wichtigen, wahrscheinlich dominierenden Rolle CMV- und EBV-spezifischer T-Zellen bei der lebenslangen Unterbindung einer schädlichen Manifestation der Infektion wurde durch vielfältige funktionelle in-vitro-Analysen untermauert, im Verein mit den oben genannten klinischen Anwendungen solcher T-Zellen. Die speziellere Frage, welche T-Zellen gegen welche Antigene und Epitope protektiv sind und welche nur epiphänomenal, ist jedoch bis dato nicht befriedigend beantwortet, und insbesondere für CMV scheinen sich die klinischen Resultate zu widersprechen (Bunde et al., 2005; Cobbold et al., 2005). Erschwert wird die Beantwortung dieser Frage dadurch, dass beide Viren eine Vielfalt immunmodulatorischer Moleküle (Immunevasine) exprimieren (Smith et al., 2013) und so immunevasive Mechanismen auslösen, deren Einfluss auf die T-Zellerkennung von der Infektionsphase, dem Infektionsmodus und dem jeweiligen Antigen, Epitop und MHC-Molekül abhängen kann (Jochum et al., 2012; Ameres et al., 2013). Eine weitere Komplikation besteht darin, dass Epitope in unterschiedlichen CMV- und EBV-Stämmen Polymorphismen aufweisen, was sich stark auf die Erkennbarkeit der Infektion durch spezifische T-Zellen auswirken kann (Smith et al., 2014; Apolloni et al., 1992). Zudem ist meist nicht bekannt, welche Virusvarianten bei gesunden oder erkrankten Personen vorliegen. Tiermodelle für CMV können grundsätzlich wichtige

Hinweise zu Beschaffenheit und Spezifität protektiver T-Zellantworten geben (Reddehase et al., 1987). Jedoch muss bei der Beurteilung berücksichtigt werden, dass die evolutionäre Distanz zwischen murinem und humanem CMV recht groß ist, so sind beispielsweise die MHC-I-modulierenden Proteine beider Viren keine Homologe (Reddehase 2002). Was EBV betrifft, ist die Eignung des murinen γ -Herpesvirus MHV-68 als EBV-Modell fraglich, weswegen in jüngerer Zeit mit humanen hämatopoetischen Stammzellen rekonstituierte immundefiziente Mäuse als Modell bevorzugt werden (Strowig et al., 2009). Studien an nichthumanen Primaten können zu aufschlussreichen Erkenntnissen führen, so etwa zur Rolle der viralen Immunevasine bei der CMV-Superinfektion (Hansen et al., 2010), aber ihr Einsatz stößt auf ethische und logistische Grenzen. Zur Beantwortung der Frage nach protektiven und somit optimal klinisch wirksamen T-Zellen gegen CMV und EBV wird daher der Einsatz einer präziseren und umfassenderen T-Zellanalytik und Virusanalytik beim Menschen notwendig sein, im Verein mit randomisierten, kontrollierten Studien zum adoptiven T-Zelltransfer.

Forschungen zur Zusammensetzung der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort sind dagegen jüngeren Datums. HHV-6 wurde 1986 entdeckt (Salahuddin et al., 1986), und etwas später wurde erkannt, dass HHV-6 in zwei Typen vorkommt (Schirmer et al., 1991), die mittlerweile aufgrund von wesentlichen Unterschieden in Genetik, Tropismus, Verbreitung und Krankheitsassoziation als unterschiedliche Viruspezies anerkannt sind (Adams et al., 2012). Es ist jedoch weiterhin bisweilen sinnvoll, HHV-6A und -6B unter der Bezeichnung HHV-6 zusammenzufassen, wenn gemeinsame Eigenschaften beider Spezies gemeint sind oder nicht bekannt ist, welche der beiden Spezies vorliegt. Die Antikörper- und DNA-Diagnostik kann nämlich oft nicht zwischen den beiden Spezies unterscheiden (De Bolle et al., 2005).

HHV-6B ist sehr weit in der Bevölkerung verbreitet und verursacht neben der häufigen Kinderkrankheit Dreitagefieber (Yamanishi et al., 1988) auch die große Mehrzahl von Reaktivierungen und assoziierten Erkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation (Zerr et al., 2012). Die Verbreitungsweite und Krankheitsassoziation von HHV-6A ist dagegen noch wenig geklärt (Hill und Zerr, 2014). Erste Forschungen zur HHV-6-spezifischen T-Zellimmunität (Yakushijin et al., 1991) zeigten die Anwesenheit von CD4-T-Zellen bei gesunden Virusträgern. Die ersten Zielantigene und Epitope der CD4-T-Zellantwort (Nastke et al., 2012) und CD8-T-Zellantwort (Martin et al., 2012) wurden jedoch erst viel später ermittelt. Dementsprechend wurden HHV-6-spezifische T-Zellen erst in jüngster Zeit in klinische Anwendungen der adoptiven T-Zelltherapie eingeschlossen (Papadopoulou et al., 2014). Ein weiterer Grund für die verzögerte Erforschung HHV-6-spezifischer T-Zellen liegt in den geringen Anteilen solcher T-Zellen im Blut von Virusträgern (Becerra et al., 2014).

Die beobachtete Intensität von Immunantworten gegen CMV, EBV und HHV-6 ist nämlich sehr unterschiedlich. CMV-spezifische und in zweiter Linie EBV-spezifische T-Zellantworten zählen zu den stärksten, die man beim Menschen findet. Im Mittel etwa 10% aller T-Zellen von Virusträgern erweisen sich in umfassenden funktionellen Analysen ex vivo als CMV-spezifisch (Sylwester et al., 2005). Dieser Anteil gilt sowohl für CD4- als auch CD8-T-Zellen und wurde für die Summe aller Antworten gegen CMV-Proteine ermittelt. Vermutlich unterschätzen diese Analysen den tatsächlichen Anteil spezifischer T-Zellen sogar, da sie nur ex vivo zytokinsezernierende T-Zellen messen (Tan et al., 1999). Für EBV liegen vergleichbar umfassende Analysen, die alle EBV-Antigene abdecken, nicht vor. Schätzungen gehen von deutlich geringeren kumulativen Häufigkeiten EBV-spezifischer T-Zellen aus (Hislop et al., 2007b). Dennoch können CD8-T-Zellantworten gegen bestimmte immundominante EBV-Epitope bei Trägern des entsprechenden MHC-Allotyps im Median 2% aller CD8-T-Zellen ausmachen (Tan et al., 1999; Koning et al., 2013). Für HHV-6 und andere humane Herpesviren weisen publizierte Analysen auf eine im Vergleich zu CMV und EBV nochmals weit geringere Häufigkeit spezifischer T-Zellen hin (Becerra et al., 2014; Smith et al., 2013). Deshalb waren entsprechende T-Zellantworten bislang weit schwieriger zu untersuchen.

Die gegenwärtigen humanen Herpesviruspezies sind in Koevolution mit dem modernen Menschen entstanden. Man kann daher vermuten, dass spezifische Elemente des menschlichen Immunsystems – etwa das Repertoire an MHC-Molekülen und NK-Zellrezeptoren – und humane Herpesviren unter starkem wechselseitigem Anpassungsdruck ihre heutigen Ausprägungen erreichten. Das Studium von Immunantworten gegen humane Herpesviren gestattet daher zum einen grundsätzliche Einblicke in die Immunität des Menschen, zum anderen liefert es neue Ansätze einer spezifischen immunologischen Therapie der durch sie verursachten Erkrankungen, insbesondere bei immunsupprimierten Patienten und nach Transplantationen.

3. Fragestellung

Die Arbeiten, die in dieser Habilitationsschrift dargestellt werden, befassen sich im Schwerpunkt mit der Analyse antigenspezifischer T-Zellen, mit ihrer antiviralen Funktion im Kontext viraler Gegenmaßnahmen, und mit der Entwicklung spezifischer T-Zelltherapien gegen die drei genannten Viren. Ausgangspunkt war zunächst eine neue Technik zur Expansion und Analyse von spezifischen T-Zellantworten auf der Basis eines EBV-Vektors, das mini-EBV-System, das noch im Rahmen der Promotionsarbeit des Verfassers entwickelt wurde (Moosmann et al., 2002). Die vertiefte Analyse dieses Systems am Beispiel eines CMV-Antigens zeigte, dass mini-EBV-transformierte B-Zellen sowohl auf MHC Klasse I als auch Klasse II fremde Antigene präsentieren können, und dass dieses System die Identifikation neuer Virusspezifitäten ermöglicht (Wiesner et al., 2005). Im Zusammenhang damit stellte sich die zunächst technische Frage nach einer Optimierung der EBV-Transformation von B-Zellen, was zu einer Suche nach möglichen Modulatoren dieses Prozesses und der Immunogenität der transformierten Zellen führte. Verschiedene potentielle Modulatoren wurden untersucht, und eine synergistische Kooperation zwischen EBV und Agonisten des *toll-like receptor 9* (TLR9) wurde identifiziert (Iskra et al., 2010). Daraus ergibt sich die interessante, noch nicht bewiesene Hypothese, dass TLR9-Aktivierung, sei es durch EBV-DNA oder örtlich vorhandene DNA anderer Pathogene, auch beim Verlauf der natürlichen EBV-Infektion eine Rolle spielt. Als Modulator der Immunogenität erwies sich das virale Protein LMP2A, das für die EBV-Transformation nur eine geringe Rolle spielt, dessen Fehlen jedoch zu einer verstärkten Erkennung von EBV- und Fremdantigenen auf transformierten Zellen durch CD8-T-Zellen führt (Rancan et al., 2015). Bei diesen Arbeiten wurden meist auch CD40-aktivierte B-Zellen parallel verwendet, zunächst als nichtinfizierte Negativkontrolle. Es erwies sich jedoch bald, dass CD40-aktivierte B-Zellen sich zur Expansion und Analyse antigenspezifischer T-Zellen ebenfalls gut eignen, auch bei T-Zell-Spezies sehr geringer Häufigkeit (Zentz et al., 2007). Ein Charakteristikum dieses Systems besteht in der konditionalen Immortalisierung der B-Zellen durch exogene CD40-Signale (Wiesner et al., 2008). Die mini-EBV- und die CD40-B-Zell-Methode konnten mittlerweile an viele Forschungsgruppen als immunologisches Arbeitsmittel weitergegeben werden, das es ermöglicht, unlimitierte Mengen autologer antigenpräsentierender Zellen auch aus sehr limitiertem Probenmaterial herzustellen.

Weiterführende Arbeiten widmeten sich der CMV-spezifischen CD8-T-Zellantwort. Zunächst wurde gezeigt, dass der Transfer von T-Zellrezeptor(TCR)-Genen genutzt werden kann, um artifizielle CMV-spezifische T-Zellen aus Spendern ohne entsprechende Immunität zu generieren (Schub et al., 2009). Dann wurde die antivirale Funktion einer großen Serie unterschiedlicher CMV-spezifischer T-Zellen gegenüber infizierten Zellen im Kontext viraler immunmodulatorischer Moleküle untersucht. Diese Arbeiten demonstrierten einen überraschenden Grad der

Anpassung viraler Immunmodulatoren an die MHC-Diversität des Menschen. Auch vom klinischen Standpunkt aus besonders interessant war die Identifikation von CD8-T-Zellen einer neuen Spezifität, die aufgrund ihrer MHC-Restriktion der viralen Immunmodulation weitgehend widerstehen und daher *in vitro* eine privilegierte antivirale Funktion ausüben (Ameres et al., 2013 und 2014). Die Identifikation einer Vielzahl neuer Epitope im CMV-Antigen IE-1 führte zu der Schlußfolgerung, dass dieses Protein auch auf der Ebene der CD4-T-Zellantwort universell immunologisch sichtbar und somit potentiell therapeutisch nutzbar ist (Ameres et al., 2015).

Die Analysen der spezifischen T-Zellantwort wurden auf das mit CMV verwandte HHV-6B ausgeweitet, das ebenfalls als wichtiges Pathogen bei Immunsupprimierten gilt, über dessen Immunkontrolle jedoch bis dahin sehr wenig bekannt war. So gelang die erstmalige Identifikation von HHV-6B-spezifischen CD8-T-Zellen. Diese wurden aus dem Blut von gesunden Virusträgern isoliert, ihre Antigen- und Epitopspezifität wurde ermittelt, und ihre Funktionalität gegenüber HHV-6B-infizierten Zellen wurde gezeigt (Martin et al., 2012). Dieser Befund ist auch deshalb von besonderem Interesse, weil HHV-6B aufgrund seiner Entdeckungsgeschichte und seines T-Zelltropismus früher oft unter dem Blickwinkel eines mutmaßlich "immunsuppressiven" Virus gesehen wurde, vorwiegend weil es die Funktion der von ihm infizierten T-Zellen hemmt (Lusso et al., 2006). Unsere Arbeiten sowie neuere klinische Entwicklungen (Papadopoulou et al., 2014) legen jedoch nahe, dass die bisher für CMV und EBV entwickelten Prinzipien einer T-Zelltherapie auch auf HHV-6B anwendbar sind, wenngleich die geringere Häufigkeit von HHV-6B-spezifischen T-Zellen berücksichtigt werden muss.

In Kooperation mit Wissenschaftlern und Herstellungsexperten des Klinikums der LMU und des Helmholtz-Zentrums München konnten diese Erfahrungen für die Entwicklung von Methoden der Isolation von virusspezifischen T-Zellen für eine immuntherapeutische Anwendung genutzt werden. Die erste der in diesem Rahmen entwickelten Techniken wurde bereits erfolgreich in Heilversuchen zur Therapie lebensbedrohlicher EBV-assoziiierter Lymphoproliferationen bei Transplantierten angewandt (Moosmann et al., 2010). Eine Weiterentwicklung dieser Methode wird zur Zeit in einer Phase I/IIa-Studie zum prophylaktischen Transfer CMV/EBV-spezifischer T-Zellen klinisch evaluiert (MULTIVIR-01; Gerbitz et al., unpubliziert). Somit schlagen die in dieser Habilitationsarbeit dargestellten Arbeiten eine Brücke von grundlegenden Untersuchungen zur antiviralen T-Zellantwort bis hin zur klinisch angewandten Immuntherapie.

4. Die CMV-spezifische T-Zellantwort

Für CMV wie alle Herpesviren gilt, daß sie ihren Träger lebenslang infizieren und aus dem Körper nicht vollständig eliminiert werden können, und daher die Möglichkeit einer Erkrankung des Patienten und/oder einer Weitergabe des Virus dauerhaft bestehen bleibt. Unter Kontrolle gehalten wird die virale Replikation und die daraus resultierende Verbreitung innerhalb des Körpers sowie eine mögliche Weitergabe an andere durch den Aufbau und die Erhaltung einer diversifizierten virusspezifischen Immunantwort, zu deren Komponenten Antikörper, CD4-positive Helfer-T-Zellen sowie CD8-positive zytotoxische T-Zellen gehören (Crough und Khanna, 2009). Daneben können auch $\gamma\delta$ -T-Zellen vom V δ 2-negativen Typ (Pitard et al., 2008) und die NKG2C-positive Subpopulation von NK-Zellen (Gumá et al., 2004) in gewissem Sinn der CMV-spezifischen Immunität zugerechnet werden, da sie in Virusträgern spezifisch expandiert sind und Merkmale von Gedächtniszellen aufweisen (Lopez-Vergès et al., 2011). Die virusspezifische Immunantwort drängt in der Regel die Infektion in für das jeweilige Virus typische Organe oder Zellarten zurück, in denen das Virus eine latente Infektion aufrechterhält, die durch ein reduziertes Programm viraler Genexpression und durch die Abwesenheit von Symptomen im Virusträger charakterisiert ist und lediglich sporadisch durch Phasen asymptomatischer Reaktivierung unterbrochen wird (Boeckh und Geballe, 2011). Im Falle von CMV ist der Latenzort nicht eindeutig bestimmt, wahrscheinlichste Kandidaten sind Zellen der myeloiden Linie in verschiedenen Differenzierungsstadien (Reeves und Sinclair, 2008). Wird die virusspezifische Immunität des Trägers beeinträchtigt, kann diese Latenz massiv durchbrochen werden, und es entsteht die Gefahr einer symptomatischen Reaktivierung und Erkrankung.

Ein typischer Fall einer solchen Störung des antiviralen Immunschutzes liegt vor bei Patienten nach Erhalt einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HZT). Nach einer solchen sind patienteneigene T-Zellen eliminiert oder stark reduziert, als Folge der vorausgehenden Behandlung und Konditionierung des Patienten und des Angriffs von Immunzellen des Spenders gegen Blutzellen des Patienten. Die entstehende Schutzlücke gegenüber persistierenden Infektionen während der ersten Monate nach Transplantation, bis zum Aufbau eines neuen Lymphozyten-Repertoires aus Stammzellen des Patienten, muß nun schnell geschlossen werden. Dies wird im Idealfall durch vom Spender stammende, auf den Patienten im Zuge der Transplantation mit übertragene Immunzellen geleistet. Ob solche Immunzellen in hinreichender Qualität und Quantität vom Spender in den Patienten gelangen, um die Herpesviren des Patienten zu kontrollieren, hängt von diversen Faktoren ab. Dazu gehören der Virusträger-Status und der dadurch bedingte spezifische Immunstatus des Spenders, die MHC-Übereinstimmung von Spender und Patient, die Quelle und Aufbereitung der zu transplantierenden Stammzellen (insbesondere ob eine T-Zelldepletion durchgeführt wurde) und die Konditionierung

des Patienten. Eine CMV-Infektion stammt in der Regel vom Patienten selbst, die Übertragung vom Spender ist relativ unwahrscheinlich (Gratama et al., 2001). Daher ist es von Vorteil, wenn bei einem CMV-positiven Patienten auch der Spender CMV-positiv ist (Grob et al., 1987; Ljungman et al., 2003), wahrscheinlich weil so auch CMV-spezifische Memory-T-Zellen zusammen mit dem Transplantat den Patienten erreichen können. Unabhängig von der Methode der Bestimmung CMV-spezifischer T-Zellen ist deren Anwesenheit im Patienten mit einem Schutz vor CMV-Erkrankung (Reusser et al., 1991; Gratama et al., 2001; Cwynarski et al., 2001) und verbessertem Gesamtüberleben (Boeckh et al., 2003) assoziiert. Bei Empfängern von T-zelldepletierten Transplantaten kommt teilweise auch CMV-spezifischen T-Zellen, die vom Patienten stammen, eine Schutzfunktion zu (Chalandon et al., 2006).

Sowohl beim Monitoring CMV-spezifischer T-Zellen wie bei der adoptiven T-Zelltherapie stellt sich zunächst die Frage nach der Zusammensetzung CMV-spezifischer T-Zellen und ihrer Antigen-spezifität. Das erste CMV-Protein, das als T-Zellantigen identifiziert wurde, war das immediate-early-1-Protein, IE-1, für das zunächst CD8-T-Zellen als auch kurze Zeit später CD4-T-Zellantworten beschrieben wurden (Borysiewicz et al., 1988; Alp et al., 1991). Es war daher unerwartet, dass Riddell und Kollegen feststellten, dass sie in Kultursystemen mit CMV-infizierten autologen Fibroblasten vorwiegend T-Zellen erhielten, die gegen CMV-Strukturproteine, nicht jedoch gegen IE-1 gerichtet waren (Riddell et al., 1991), und später in genaueren Analysen feststellten, dass IE-1-spezifische T-Zellen zwar im Repertoire gesunder Spender existieren, jedoch CMV-infizierte Zellen nicht erkennen (Manley et al., 2004). Auf T-Zellklone gegen CMV-Strukturproteine gründete die gleiche Arbeitsgruppe auch ihr therapeutisches Protokoll zum adoptiven T-Zelltransfer nach HZT (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Als dominierendes Antigen innerhalb dieser T-Zellantwort gegen Strukturproteine wurde das Tegumentprotein pp65 identifiziert (Wills et al., 1996), die in ähnlich hohen Anteilen im CD8-T-Zellrepertoire vorkommen wie T-Zellantworten gegen IE-1 (Kern et al., 1999). Auch CD4-T-Zellen gegen pp65 wurden identifiziert (Khattab et al., 1997). Eine neue Überraschung brachten Befunde, die zeigten, dass ein Schutz vor CMV-Erkrankung besser mit IE-1-spezifischen als mit pp65-spezifischen T-Zellen korrelierte, sowohl nach solider Organtransplantation (Bunde et al., 2005) als auch nach allogener Stammzelltransplantation (Sacre et al., 2008). Demgegenüber waren in anderen Analysen pp65-spezifische T-Zellen mit einer Protektion vor CMV-Reaktivierung oder Erkrankung assoziiert (Gratama et al., 2001; Cwynarski et al., 2001), ohne dass ein Vergleich mit IE-1 vorgenommen wurde. Ebenso wurde in verschiedenen klinischen Studien eine Korrelation zwischen dem Transfer von pp65-spezifischen T-Zellen und Reduktion oder Prävention der Virusreaktivierung festgestellt (Walter et al., 1995; Einsele et al., 2002; Feuchtinger et al., 2010; weitere siehe unten). Da es sich jedoch jeweils um nicht kontrollierte, kleinere klinische Studien handelte und eine systematische Analyse der Koexpansion von T-Zellen gegen andere CMV-Antigene in den betreffenden

Patienten nicht vorgenommen wurde, bleibt die Frage einstweilen noch offen, welche CMV-Antigenspezifität am ehesten zu einem T-Zell-Schutz führt. Es wäre sogar möglich, dass unterschiedliche Epitope aus dem gleichen Antigen unterschiedliche Protektivität vermitteln. Unsere Arbeiten (Ameres et al., 2013; Ameres et al., 2014) liefern darauf Hinweise, die weiter unten diskutiert werden.

Neben pp65 und IE-1 wurde die CMV-spezifische T-Zellimmunität gegen eine Reihe weiterer Antigene untersucht. Khanna und Kollegen führten eine großangelegte Analyse mittels Stimulation mit aufgrund von HLA-Bindemotiven vorhergesagten Peptidepitopen durch und identifizierten eine Reihe von Epitopen in diesen beiden und elf weiteren Antigenen, jedoch schienen ihre Analysen zugleich die prominente Rolle von pp65 und IE-1 zu bestätigen (Elkington et al., 2003). Auch mit Vakzinia-Vektoren gegen sechs CMV-Antigene wurde die T-Zellantwort gesunder Spender getestet (Khan et al., 2005); es wurde gegen alle diese Antigene in einem Teil der Spender eine CD8-T-Zellimmunität detektiert, jedoch erwiesen sich wiederum Antworten gegen pp65 und IE-1 am verbreitetsten und in den meisten Spendern auch am stärksten. Besonderen Eindruck machte eine Studie, die mit hohem Aufwand die CD8- und CD4-T-Zellantwort von 33 gesunden Spendern mittels Peptidbibliotheken über alle 213 annotierten CMV-Proteine bzw. offene Leseraster analysierte (Sylwester et al., 2005). Dies ist nach wie vor die umfassendste bisher durchgeführte Analyse der T-Zellantwort gegen ein humanes Herpesvirus oder ein großes humanpathogenes Virus überhaupt, auf der auch die in der Einleitung diskutierte Schätzung basiert, dass im Median etwa jeweils 10% der CD8- und CD4-T-Zellen gesunder Virusträger CMV-spezifisch sind. CD8-T-Zellen wurden in mindestens einem Spender gegen 107 der 213 getesteten Antigene detektiert. Dies zeigt klar, dass sich die CMV-spezifische T-Zellantwort gegen verschiedenste Antigene richten kann. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass gegen lediglich drei Antigene (UL48, pp65, IE-1) in mehr als 50% der Spender eine T-Zellantwort gemessen wurde, und T-Zellantworten gegen UL48 waren deutlich schwächer ausgeprägt als solche gegen die beiden anderen Antigene (Sylwester et al., 2016). Daher scheint nach gegenwärtigem Stand eine Schwerpunktsetzung auf pp65 und IE-1 sowie einzelne weitere Antigene wie pp50 und gB (Khan et al., 2005) für Anwendungen in T-Zellmonitoring und Immuntherapie gerechtfertigt, bei denen eine größere Zahl von Antigenen zu hohem Aufwand verursachen würde.

Seit der ersten Studie zur antigenspezifischen adoptiven T-Zelltherapie (ATT) zur Therapie oder Prophylaxe der CMV-Erkrankung nach HZT (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995) sind fortlaufend neue Ansätze mit dem gleichen Ziel entwickelt worden, die sich unterschiedlicher Methoden der T-Zellherstellung bedienen. Die weitere Entwicklung zielte nicht in erster Linie darauf ab, angesichts des komplexen CMV-Antigenrepertoires eine möglichst umfassende T-Zellantwort zu etablieren, sondern die Veränderung der Protokolle verlief in Richtung einer möglichst einfachen und schnellen Herstellung monoantigen- oder monoepitopspezifischer T-Zellen. In allen

Fällen wurden bislang CMV-spezifische T-Zellen nur aus seropositiven Spendern für die Klinik hergestellt und eingesetzt. Riddell et al. (1992) generierten noch aufwendig bei jedem Patienten antigenspezifische T-Zellklone durch Stimulation mit autologen CMV-infizierten Fibroblasten. Peggs et al (2001, 2003) generierten autologe dendritische Zellen und beluden sie mit CMV-Antigen zur T-Zellstimulation, ein immer noch aufwendiges Verfahren; Einsele et al (2002) benötigten lediglich mehrfach mit Antigen stimulierte mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC), was eine Vereinfachung darstellt. Spätere Studien isolierten antigenspezifische T-Zellen direkt, entweder mittels Peptid/MHC-Multimerfärbung (Cobbold et al., 2005; Neuenhahn et al., 2017) oder mittels Interferon- γ -Oberflächenfärbung, Antigenstimulation und magnetischer Isolation ("secretion assay", "cytokine capture assay"; Feuchtinger et al., 2010). Die Multimerfärbung hat den Vorteil, sehr reine und in ihrer Spezifität bekannte T-Zellen zu isolieren, allerdings sind meist nur monospezifische T-Zellen verfügbar; bei der Interferon- γ -Sekretionsmethode lassen sich im Prinzip auch komplexe Antigengemische verwenden, allerdings wurde bisher meist nur pp65 eingesetzt. In allen diesen Studien gab es nach T-Zelltransfer eine Reduktionen der Viruslast und vermutlich eine Vermeidung von CMV-Reaktivierungen oder Erkrankungen, auch wenn mangels Kontrollgruppen hierzu keine sicheren Aussagen gemacht werden können. Mit Spannung erwartet werden die Ergebnisse zweier bereits abgeschlossener (Boeckh et al., 2015), größerer und kontrollierter Studien zum prophylaktischen bzw. präemptiven Einsatz CMV-spezifischer T-Zellen nach HZT.

Charakterisierung mit Hilfe des mini-EBV-Systems

Diese Überlegungen illustrieren die Dringlichkeit, die CMV-spezifische Immunantwort genauer zu charakterisieren, um umfassenderes Immunmonitoring zu ermöglichen und der Immuntherapie neue Zielantigene zu erschließen, aber auch zum Verständnis des humanen Pathogens CMV beizutragen als eines solchen, das die menschliche Immunantwort besonders stark prägt. Die erste Arbeit des Verfassers, die hier diskutiert werden soll, machte sich die Verwendung von pp65-exprimierenden mini-LCLs zur Analyse von CMV-spezifischen CD4- und CD8-T-Zellantworten zum Ziel (**Wiesner et al., 2005**). Sie basierte auf Vorarbeiten (Moosmann et al., 2002), die noch zur Promotionszeit des Verfassers gehörten. Diese Vorarbeiten etablierten das mini-EBV-System als Vektor zur Expression von Fremdanthigenen in B-Zellen, mit dem Ziel der Herstellung stabil proliferierender antigenpräsentierender B-Zelllinien, die jeweils autolog leicht und in unbegrenzter Menge verfügbar sind. Das mini-EBV, das von Hammerschmidt und Kollegen entwickelt wurde, enthält rund die Hälfte des EBV-Genoms (Kempkes et al., 1995), darunter die Gene für alle neun Proteine der latenten Phase, die in EBV-transformierten B-Zellen üblicherweise exprimiert sind (Thorley-Lawson, 2001). Durch Transformation mit EBV hergestellte humane B-Zelllinien werden üblicherweise als lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) bezeichnet, dies ist das

einfachste traditionelle System, um aus geringen Mengen peripherem Blut eines gegebenen Spenders eine stabile autologe Zelllinie herzustellen. Solche Zelllinien, in denen die EBV-Genexpression dem Latenzprogramm III folgt (Rowe et al., 1992), haben einen aktivierten B-Zellphänotyp mit hoher Expression von MHC-Molekülen der Klasse I und II (MHC-I, MHC-II) und T-zell-kostimulatorischen Molekülen (Wiesner et al., 2008). LCLs werden also als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) aufgefasst und expandieren sehr effektiv EBV-spezifische T-Zellen in vitro. Diese ist auch die Grundlage des ersten therapeutischen Ansatzes zur EBV-T-Zelltherapie (Rooney et al., 2005, siehe unten) und der Grund für die Hypothese, dass EBV-spezifische CD8-T-Zellantworten durch primäre Aktivierung an infizierten B-Zellen zustandekommen (Rickinson et al., 2014).

Mit Hilfe einer komplementierenden Verpackungszelllinie (Delecluse et al., 1999) können infektiöse mini-EBV-Virionen leicht hergestellt werden, und diese transformieren primäre humane B-Zellen sehr effektiv (Moosmann et al., 2002). Wir wählten pp65 als Modellantigen und zeigten, dass die transformierten B-Zelllinien, genannt mini-LCLs, nicht nur CD8-T-Zellen (Moosmann et al., 2002), sondern auch CD4-T-Zellen effektiv antigenspezifisch expandieren, mithin das intrazellulär exprimierte CMV-Antigen auf MHC-I und MHC-II präsentieren. Aus den entstehenden CMV-spezifischen T-Zelllinien konnten durch direkte Einzelzellklonierung CMV-spezifische CD8- und CD4-T-Zellklone hergestellt werden, deren Epitopspezifität analysiert wurde und zur Identifikation neuer CD8- und CD4-Epitope führte (Wiesner et al., 2005). Die effektive Präsentation intrazellulär exprimierter Proteine auf MHC-II von EBV-transformierten B-Zellen war kurz zuvor bereits für ein bakterielles Modellprotein demonstriert worden (Nimmerjahn et al., 2003). Dies war nicht unbedingt erwartet worden, da EBV-transformierte B-Zellen die in ihnen exprimierten EBV-Antigene nur suboptimal gegenüber CD4-T-Zellen präsentieren (Long et al., 2005), was aber vorwiegend an der limitierten Expressionshöhe der EBV-Latenzproteine liegen könnte. Wie sich zeigte, war dies für die Expansion von pp65-spezifischen CD4-T-Zellen vermutlich von Vorteil, da eine kompetitive Expansion EBV-spezifischer CD4-T-Zellen nicht auftrat.

Unsere genannte Arbeit (Wiesner et al., 2005) etablierte das mini-LCL-System als effizientes Werkzeug zur Analyse von CD8- und CD4-T-Zellen, das bis heute ein grundlegendes Werkzeug unserer Arbeitsgruppe ist und in Kooperationsprojekten zum Beispiel auch bei der Analyse zelltherapeutischer Ansätze gegen Tumorantigene bereits Verwendung fand (Kruschinski et al., 2008). Zugleich vermehrte unsere betreffende Arbeit insbesondere den Wissensstand über pp65-spezifische CD4-T-Zellen. Die pp65-spezifische CD4-T-Zellantwort war zuvor Gegenstand nur weniger näherer Untersuchungen gewesen. Khattab et al. (1997) hatten zwei, und Li Pira et al. (2004) hatten zwölf Subsequenzen in pp65 identifiziert, die von CD4-T-Zellen erkannt wurden. Jedoch waren ihre MHC-Klasse-II-Restriktionen nur korrelativ ermittelt

worden und daher mit Unsicherheit behaftet. Unsere Arbeit identifizierte vier pp65-Epitope, die von CD4-T-Zellklonen erkannt wurden, ermittelte experimentell ihre MHC-Restriktion, und wies vorläufig zugleich bereits auf die Abwesenheit von Alloreaktivitäten bei T-Zellen dieser Spezifität nach. Auch dies ist ein wichtiger Aspekt, insbesondere weil CD4-T-Zellen gegen ein immundominantes Epitop aus dem Glycoprotein B eine HLA-Alloreaktivität aufweisen (Elkington und Khanna, 2005). Ein Teil unserer CD4-Epitope aus pp65 wurde in den Peptidmix eingeschlossen, der in der aktuellen MULTIVIR-01-Studie (Gerbitz et al., unpubliziert) zur Anreicherung CMV-spezifischer T-Zellen verwendet wird. Es bleibt nun abzuwarten, ob entsprechende T-Zellen in Patienten nach ATT rekonstituiert werden können.

Identifizierung einer privilegierten CD8-T-Zellantwort

In analoger Weise lieferte das mini-EBV-System den technischen Ansatzpunkt zu Analysen der T-Zellantwort gegen das zweite immundominante T-Zellantigen von CMV, nämlich IE-1. Ein mini-EBV mit dem IE-1-Gen wurde konstruiert, und IE-1-exprimierende mini-LCLs wurden hergestellt; dabei fanden wir, dass diese vergleichbar gut zu generieren waren wie pp65-mini-LCLs oder Wildtyp-LCLs. Die IE-1-mini-LCLs wurden dann zur Expansion spezifischer T-Zellen im autologen System verwendet. Die T-Zellkulturen wurden einzelzellkloniert; die große Mehrzahl der resultierenden Klone war IE-1-spezifisch. Die Epitopspezifität und HLA-Restriktion verschiedener CD8-T-Zellklone (Ameres et al., 2013, 2014) und CD4-T-Zellklone (Ameres et al., 2015) wurde mit Hilfe einer Peptidbibliothek, die die IE-1-Sequenz abdeckte, und einer Reihe von HLA-typisierten IE-1-mini-LCLs ermittelt; die HLA-Restriktion wurde mit Hilfe rekombinanter HLA-Moleküle verifiziert. Es ergaben sich zunächst zwei überraschende Befunde (**Ameres et al., 2013**): ein großer Teil der IE-1-spezifischen CD8-T-Zellen war bei Trägern des Allels HLA-C*07:02 durch dieses restringiert und erkannte ein bislang in dieser Form unbekanntes Epitop der Sequenz CRVLCCYVL (kurz CRV); und die T-Zellklone dieser Spezifität erkannten infizierte Fibroblasten sehr effektiv, was im Gegensatz zur früheren Literatur stand (Manley et al., 2004). Das Peptid CRV war allerdings bereits zuvor als T-Zellepitop beschrieben worden (Kern et al., 1999); die HLA-Restriktion war allerdings fehlerhaft als HLA-B*07:02 ermittelt worden, da nur niedrigauflösende HLA-Typisierungen zur Verfügung standen und nicht berücksichtigt wurde, dass dieses HLA-B-Allel und das zuvor genannte HLA-C-Allel als Elemente des selben Haplotyps fast stets miteinander assoziiert sind (Schmidt et al., 2009). So erklärte sich retrospektiv, warum auch in der nachfolgenden Literatur Reaktivitäten gegen dieses Peptid immer wieder konstatiert wurden, aber nur schlecht analysierbar waren, zum Beispiel weil keine Peptid-HLA-Multimere hergestellt werden konnten (Khan et al., 2007).

Ein besonderes Interesse an diesem T-Zellepitop CRV erwies sich aus zwei Gründen als gerechtfertigt: erstens aufgrund der besonders hohen Häufigkeiten solcher T-Zellen im peripheren Blut, was dieses Epitop als das bei Spendern des passenden HLA-Typs "immundominanteste" erscheinen ließ (Ameres et al., 2013), und zweitens aufgrund der unerwartet guten Erkennung des Epitops auf CMV-infizierten Zellen. Wir testeten nämlich die Funktion entsprechender CD8-T-Zellklone gegenüber CMV-infizierten Fibroblasten. Wir stellten fest, dass IE-1-spezifischen CD8-T-Zellklone infizierte Fibroblasten sehr effektiv erkannten (was durch Messung der Interferon- γ -Sekretion ermittelt wurde) und zytotoxisch angriffen (Ameres et al., 2013). Dies stand im Gegensatz zur Literatur (Manley et al., 2004), laut der die viralen Immunevasine die Erkennung von IE-1 durch CD8-T-Zellen verhindern sollen. Dies wurde von Manley et al. daraus gefolgert, dass CD8-T-Zellen verschiedener Epitopspezifitäten (die jedoch nur teilweise identifiziert worden waren) keine Fibroblasten erkannten, die mit dem Wildtyp-CMV (AD169) infiziert waren; jedoch wurde eine Erkennung von Fibroblasten festgestellt, die mit einem CMV des Stamms RV789 infiziert waren. Diesem Stamm fehlt die Genomregion, in der die Gene für die vier wichtigsten CMV-T-Zell-Evasine US2, US3, US6, und US11 codiert sind. US2 und US11 interagieren mit MHC-I im endoplasmatischen Retikulum (ER) und lenken die MHC-I-Moleküle ins Zytoplasma zurück, wo sie abgebaut werden (Wiertz et al., 1996a, 1996b); US3 interagiert mit dem Peptidbeladungskomplex im ER und bremst den Export von MHC-I-Ketten (Ahn et al., 1996; Jones et al., 1996); und US6 inhibiert den Proteinkomplex TAP (transporter associated with antigen processing), der Peptide vom Zytoplasma ins ER transportiert (Hengel et al., 1997; Lehner et al., 1997).

Plachter und Kollegen hatten kurz zuvor ein Sortiment von Varianten des CMV-Stamms AD169 konstruiert hatten, die jeweils nur eines der vier immunmodulatorischen CMV-Proteine exprimieren, während die Gene der drei anderen Proteine deletiert wurden (Besold et al., 2009; Hesse et al., 2013), sowie ein Konstrukt mit allen vier Deletionen. Mit Hilfe dieser CMV-Konstrukte konnten wir nun erstmals im Detail die individuelle Rolle der vier CMV-Immunevasine bei der CD8-T-Zellerkennung im Kontext eines CMV-Infektionsmodell untersuchen (Ameres et al., 2013, 2014). Zunächst wurden CRV-spezifische CD8-T-Zellen in einem direkten Vergleich mit spezifischen CD8-T-Zellen gegen fünf andere IE-1-Epitope unterschiedlicher HLA-Restriktionen im Fibroblastenmodell getestet. Der Vergleich zeigte, dass ausschließlich CRV von den infizierten Zellen in Anwesenheit der vier Immunevasine von T-Zellen noch effektiv erkannt wurde, während T-Zellen der fünf anderen Spezifitäten in ihrer Erkennung vollständig gehindert waren. Dies war gänzlich auf die Funktion der vier Immunevasine zurückzuführen, da in ihrer Abwesenheit die T-Zellklone aller Spezifitäten die infizierten Zellen gleichermaßen erkannten. Somit verhinderten die vier Immunevasine die Präsentation der entsprechenden Peptide durch MHC auf der Oberfläche der infizierten Zellen. Einzelne Immunevasine hatten nur einen jeweils geringen Effekt auf die Präsentation von CRV; zur nahezu

vollständigen Verhinderung der Präsentation des HLA-A*02:01-restringierten IE-1-Epitops VLEETSVML (VLE) war dagegen bereits eines der Immunevasine US2 oder US11 ausreichend. US2 und US11 interagieren direkt mit Regionen der schweren Kette von MHC-I, die von der mit dem Peptid und der T-Zelle wechselwirkenden Region räumlich entfernt sind (Story et al., 1999; Barel et al., 2003a, 2003b). Dies führte zu der Hypothese, dass die Inhibition der T-Zellerkennung durch US2 und US11 unabhängig vom präsentierten Peptid war und somit ein für das jeweilige MHC-I-Molekül spezifischer Effekt vorlag. Diese Hypothese wurde mit Hilfe chimärer Moleküle aus den MHC-I-Molekülen HLA-A*02:01 und HLA-C*07:02 getestet, in denen der mit US2 und US11 interagierende Teil des jeweiligen Moleküls (bestehend aus α 3-Domäne, Membrananker und zytoplasmatischem Anteil) mit dem des anderen Moleküls vertauscht wurde. Es ergab sich ein erstaunlich klarer Effekt: in Abwesenheit der CMV-Immunevasine waren beide chimären Moleküle voll funktionsfähig und vermittelten die Erkennung durch spezifische T-Zellen; in Anwesenheit von US2 oder US11 wurde die Verhinderung ausschließlich durch den vertauschten Anteil des MHC-I-Moleküls gesteuert. Regulation durch US2 und US11 sind also von der T-Zellerkennung der MHC-Peptid-Kontaktfläche räumlich getrennt und funktionell separierbar. Daraus folgt, dass HLA-C*07:02 ein in der CMV-Infektion privilegierter Allotyp ist.

Es stellte sich die Frage nach den Gründen dieser Privilegierung. Im Gegensatz zu HLA-A*02:01 und vielen HLA-A- und HLA-B-Molekülen sind HLA-C-Moleküle generell Inhibitoren der Funktion von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Verschiedene NK-Zell-Subpopulationen exprimieren eine unterschiedliche Auswahl inhibitorischer Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, und die jeweilige NK-Zelle wird von HLA-C-Molekülen gehemmt, die zu ihren Rezeptoren passen (Parham, 2005; Anfossi et al., 2006). Die betreffende Klasse inhibitorischer Rezeptoren wird als KIR bezeichnet (killer-cell immunoglobulin-like receptors). Die wichtigsten inhibitorischen Rezeptoren für HLA-C-Moleküle der Gruppe 1, zu denen HLA-C*07:02 gehört, sind KIR2DL2 und KIR2DL3, die Genprodukte zweier funktionsanaloger Allele des gleichen KIR-Gens. Es wurde die Hypothese getestet, dass bei der zellulären CMV-Infektion die Expression von HLA-C*07:02 privilegiert aufrechterhalten wird, damit die Erkennung von NK-Zellen durch CMV-infizierte Zellen verhindert werden kann. Hierzu isolierten wir aus peripherem Blut eines Normalspenders CD3-negative KIR2DL2/3-positive NK-Zellen und etablierten daraus polyklonale und monoklonale NK-Zell-Kulturen. Diese NK-Zellen waren nicht in der Lage, CMV-infizierte Fibroblasten funktionell zu erkennen; falls HLA oder KIR2DL2/3 mittels Antikörpern blockiert wurde, konnte jedoch ein zytotoxischer Angriff der NK-Zellen auf die infizierten Zellen induziert werden. Dies ist ein erster Beleg für die genannte Hypothese: die immunevasiven Funktionen von CMV haben sich dergestalt entwickelt, dass sowohl die MHC-restringierte T-Zellerkennung als auch die NK-Zell-Kontrolle soweit als möglich unterbunden werden; dies erfordert, dass die Expression bestimmter MHC-Moleküle,

darunter HLA-C*07:02, nicht vollständig unterbunden wird. Letzteres wiederum eröffnet dem Immunsystem die Möglichkeit, immundominante und potentiell protektive HLA-C*07:02-restringierte T-Zellantworten auszubilden. Es bleibt nachzuweisen, dass die betreffende Epitopspezifität (CRV/HLA-C*07:02) in gesunden Virusträgern oder immunsupprimierten Personen tatsächlich eine protektive Funktion ausübt.

Vielfältige Rolle der CMV-Immunevasine

Die Untersuchung des Einflusses der vier zentralen CMV-Immunevasine US2, US3, US6, und US11 und ihrer Interferenz mit der CD8-T-Zellantwort gegen infizierte Zellen war Gegenstand einer weiteren vertiefenden Arbeit (**Ameres et al., 2014**). In dieser wurden im Detail die Auswirkungen der Expression jedes einzelnen der vier CMV-Immunevasine auf die Erkennung CMV-infizierter T-Zellen durch CD8-T-Zellen untersucht.

Herangezogen für diese Untersuchung wurden CD8-T-Zell-Klone gegen insgesamt acht Epitope mit sieben unterschiedlichen HLA-Restriktionen aus IE-1, und vergleichend CD8-T-Zell-Klone gegen vier Epitope mit drei unterschiedlichen HLA-Restriktionen aus pp65. Insgesamt erfasst wurden drei HLA-A-, vier HLA-B- und zwei HLA-C-Restriktionen. Untersucht wurde für jeden T-Zellklon die Erkennung von infizierten HLA-kompatiblen Fibroblasten, die entweder mit Interferon- γ vorbehandelt waren (um eine inflammatorische Umgebung zu simulieren) oder nicht, und die mit einem von sechs Viren infiziert waren (CMV-Wildtyp AD169, CMV ohne Immunevasine, CMVs mit Expression je eines der Moleküle US2, US3, US6, oder US11) oder nicht infiziert waren. Jeder Test wurde an vier Zeitpunkten durchgeführt (Tag 1, 2, 3 und 4 nach Infektion). Hieraus ergaben sich $12 \times 2 \times 7 \times 4 = 672$ unterschiedliche T-Zell-Reaktionsansätze.

Das Ergebnis dieser umfangreichen Analyse war ein sehr umfassender Überblick über den Einfluss der CD8-T-Zell-Immunevasine von CMV auf die Funktion von T-Zellen unterschiedlicher Spezifität und HLA-Restriktion. Unter nichtinflammatorischen Bedingungen war nur US6, der TAP-Inhibitor, in der Lage, die T-Zellerkennung zu allen Zeitpunkten weitgehend zu unterdrücken. Unter inflammatorischen Bedingungen konnten einzelne Immunevasine nur bestimmte T-Zell-Spezifitäten stark unterdrücken; besonders deutlich war dies bei US2 und US11 im Kontext von HLA-A*02:01 sowie bei US2 im Kontext von HLA-A*68:01. Da nur die beiden Immunevasine US2 und US11 direkt mit dem HLA-Molekül interagieren, liegt es nahe, hier anzunehmen, dass die Evolution die Herausbildung von CMV-Immunevasinen gefördert hat, die bevorzugt mit einem besonders häufigen HLA-Molekül der menschlichen Population interagieren, nämlich A*02:01. Dagegen war bei den anderen T-Zellspezifitäten keines der vier Immunevasine zur überwiegenden Unterdrückung der funktionellen T-

Zellerkennung in der Lage, sondern eine Kooperation mehrerer Immunevasine war nötig, um eine Unterdrückung der T-Zellerkennung zu erreichen. Für HLA-B-Restriktionen, darunter HLA-B*08:01 und B*40:01, hatte kein einzelnes der Immunevasine nennenswerte Auswirkungen auf die T-Zellerkennung, ihre Koexpression jedoch einen sehr weitgehenden, so dass man von einem multiplikativen oder synergistischen Effekt sprechen muss. Die beiden getesteten HLA-C-Restriktionen verhielten sich sehr unterschiedlich. Die T-Zellerkennung vermittelt durch HLA-C*06:02 war sehr empfindlich gegenüber der Koexpression der vier Immunevasine, nicht jedoch, wie oben schon gezeigt (Ameres et al., 2013), die durch HLA-C*07:02 restringierte T-Zellerkennung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigen, dass die Immunevasine von CMV teils überlappende, teils komplementäre und teils kooperative Funktionen wahrnehmen. Dies erscheint angesichts der hochgradigen Diversität des menschlichen MHC-I-Repertoires als eine plausible evolutionäre Strategie des Virus. Die besondere Stellung von HLA-C*07:02 innerhalb der bisher untersuchten CMV-Antigenspezifitäten trat klar hervor, während andere HLA-Allotypen wie HLA-A*02:01 als Präsentatoren viraler Antigene bereits von einem einzigen viralen Immunevasin stark unterdrückt wurden. Die allgemeine Hypothese, dass CMV solche HLA-Allotypen von einer Unterdrückung verschont, die für eine Regulierung antiviraler NK-Zellen vom Virus "benötigt" werden, fand teilweise Bestätigung, indem gezeigt wurde, dass diejenigen HLA-A-Allotypen, die als NK-Regulatoren nicht in Frage kommen, vom Virus stärker unterdrückt wurden als andere HLA-Allotypen. Jedoch zeigt das Gegenbeispiel von HLA-C*06:02, dass nicht alle HLA-C-Moleküle während der viralen Infektion in gleichem Maße als Antigenpräsentatoren aufrechterhalten werden.

Es wird daher notwendig sein, insbesondere die HLA-C-restringierte T-Zellerkennung gegen CMV noch näher in den Blick zu nehmen, weitere Epitope zu identifizieren und deren biologisches Verhalten zu untersuchen. Insbesondere ist die Frage von vertieftem Interesse, ob HLA-C*07:02 möglicherweise mit besonderer Protektion gegen CMV-Erkrankungen assoziiert ist. Bislang ist dazu noch nichts bekannt.

Analyse der CD4-T-Zellantwort

CD4-T-Zellen gegen IE-1 gehörten zu den ersten CMV-spezifischen T-Zellantworten, deren Existenz nachgewiesen wurde (Alp et al., 1991), und sie spielen in der Summe eine quantitativ bedeutende Rolle innerhalb der gesamten T-Zellantwort gegen CMV (Sylwester et al., 2005). Im Gegensatz dazu war die epitopspezifische Analyse der gegen IE-1 gerichteten CD4-T-Zellantwort lange schwierig, und breiter angelegte Untersuchungen in dieser Richtung führten nicht zu einer genaueren Beschreibung dieser T-Zellen; dies scheiterte wohl insbesondere an der vergleichsweise geringen

Häufigkeit solcher T-Zellen im peripheren Blut (Slezak et al., 2007). Erst in jüngerer Zeit wurden CD4-T-Zellen gegen einige IE-1-Epitope mit Hilfe von Peptid-MHC-Multimeren im peripheren Blut näher charakterisiert (Braendstrup et al., 2014).

Wir verwandten daher das mini-EBV-System in Kombination mit Einzelzellklonierung und funktioneller Analyse der T-Zellklone für eine nähere Charakterisierung der Zusammensetzung und Funktion der IE-1-spezifischen CD4-T-Zellantwort (**Ameres et al., 2015**). Hierfür wurden wie oben beschrieben periphere Blutzellen mit autologen IE-1-mini-LCLs wiederholt stimuliert, um polyklonale E-1-spezifische T-Zelllinien zu erhalten. Da diese im Mittel nur 3% CD4-T-Zellen enthielten, war eine Anreicherung der CD4-T-Zellen vor der Einzelzellklonierung notwendig. Aus den so angereicherten Fraktionen konnten mit hoher Ausbeute IE-1-spezifische CD4-T-Zellklone gewonnen werden. Deren Epitopspezifität und HLA-Restriktion wurde mit Hilfe einer vollständigen 15mer-Peptidbibliothek ermittelt, die die IE-1-Sequenz vollständig abdeckte.

Auf diese Weise konnte aus dem Material von 7 CMV-positiven Spendern etwa 27 (mindestens 21) unterschiedliche IE-1-Sequenzen als Zielepitope der CD4-Antwort ermittelt werden. Die exakte Anzahl der Epitope war nicht zweifelsfrei zu bestimmen, da zum Teil überlappende Sequenzen erkannt wurden, und nicht für jeden T-Zellklon das Minimalepitop ermittelt werden konnte. Die CD4-T-Zellen erkannten IE-1-Epitope, die durch jede Klasse von MHC Klasse II (HLA-DR, HLA-DQ oder HLA-DP) restringiert waren. HLA-DQ- und DP-restringierte CMV-spezifische T-Zellen waren zuvor noch nicht beschrieben worden. In vielen Fällen gelang auch die exakte Ermittlung der HLA-Restriktion. Zu den ermittelten HLA-Restriktionen gehörten HLA-DRB1*1301, DRB1*1501, DRB5*0101, DRB3*0101, DRB3*02 und DQB1*02, womit viele in der Bevölkerung besonders häufigen HLA-Allotypen erfasst werden konnten. Obwohl die 7 untersuchten Spender sehr unterschiedlichen HLA-Typs waren, wies jeder von ihnen IE-1-spezifische CD4-T-Zellen auf (3–7 unterschiedliche Spezifitäten, im Median 5).

Daher ist davon auszugehen, dass die Anwesenheit von IE-1-spezifischen T-Zellen ein universelles Merkmal von CMV-positiven Spendern ist, und nicht nur wie bisher beschrieben in rund einem Drittel der Spender vorkommt (Sylwester et al., 2005). Somit ist die Targetierung von IE-1 als Zielantigen in Immuntherapie- und Vakzinierungsansätzen sinnvoll, insbesondere weil IE-1 nach viraler Reaktivierung Teil der ersten Welle der viralen Genexpression ist und IE-1-spezifische T-Zellen daher eine Reaktivierung unterbinden könnten, bevor neues Virus entsteht. Aktuelle Arbeiten unserer Gruppe untersuchen daher die Funktion dieser T-Zellen näher, insbesondere mit Hilfe des Ansatzes der Transduktion von T-Zellrezeptoren.

Anwendung auf CMV-seronegative Spender mittels TCR-Transfer

Eine wesentliche Einschränkung der T-Zelltherapie gegen CMV am Menschen besteht derzeit darin, dass bei Verwendung üblicher Präparationsmethoden die CMV-spezifischen T-Zellen nur aus CMV-positiven Spendern in praktikabler Weise zugänglich sind. Demgegenüber sind CMV-positive Empfänger einer Transplantation, die von einem CMV-negativen Spender herrührt, von CMV-Reaktivierungen besonders betroffen (Grob et al., 1987; Ljungman et al., 2003) und daher einer virusspezifischen T-Zelltherapie besonders bedürftig. Es konnten zwar mittels eines komplexen Protokolls (unter Verwendung autologer dendritischer Zellen, autologer LCLs, und eines adenoviralen Vektors) aus Nabelschnurblut T-Zellkulturen hergestellt werden, die virale Peptide erkannten (Hanley et al., 2009), und solche T-Zellen wurden in zwei Fällen bereits klinisch eingesetzt (Hanley et al., 2015), mit gewissen Hinweisen auf eine mögliche antivirale Funktion in vivo. Die T-Zellen erkannten jedoch "atypische Epitope" (Hanley et al., 2009), nicht jedoch solche Epitope, gegen die T-Zellen bei CMV-Positiven üblicherweise gerichtet sind. Es bleibt offen, ob solche atypischen Epitope im Kontext der viralen Infektion überhaupt präsentiert werden.

Daher hielten wir es für letztlich aussichtsreicher, auf eine Redirektion der Spezifität von T-Zellen seronegativer Spender gegen wohlcharakterisierte CMV-Epitope zu setzen. Zu diesem Zweck analysierten wir die kodierende Sequenz des T-Zellrezeptors (TCR) von vier CMV-pp65-spezifischen, MHC-I-restringierten CD8-T-Zellklonen dreier Epitopspezifitäten, klonierten die TCRs in retrovirale Vektoren, und transduzierten damit aktivierte primäre T-Zellen aus CMV-seronegativen Spendern (**Schub et al., 2009**). Für besonders wichtig im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Immuntherapie hielten wir ferner die Untersuchung, ob die Reaktivität der TCR-transgenen T-Zellen durch nachfolgende Stimulation mit Antigen positiv oder negativ beeinflusst wurde; derartige Experimente waren zum Zeitpunkt unserer Untersuchungen mit TCR-transduzierten T-Zellen, gleich welcher Spezifität, noch nicht systematisch durchgeführt worden. Wir verwendeten daher das mini-LCL-System zur spezifischen Expansion TCR-transduzierter T-Zellen, und untersuchten die resultierende antigenspezifische Proliferation und etwaige funktionelle Veränderungen.

Alle vier TCRs konnten in primären T-Zellen zur Expression gebracht werden, was auch durch Peptid-MHC-Multimerfärbung nachgewiesen wurde, und alle vier TCRs statteten die transduzierten T-Zellen mit einer spezifischen Reaktivität gegen pp65 aus, so dass diese das Antigen pp65 im Kontext der endogenen Prozessierung erkannten und dagegen mit Zytokinsekretion und Zytolyse reagierten. Drei der vier TCRs erwiesen sich als CD8-unabhängig, dergestalt dass ihre Expression auch in CD8-negativen, CD4-positiven T-Zellen festgestellt werden konnte. Die antigenspezifische Stimulation in vitro führte bei allen vier Spezifitäten zu einem Anstieg der

multimer-positiven T-Zellen. Zudem erhöhte sich nach Stimulation die Zytokinsekretion je multimer-positiver T-Zelle, wenn sie mit spezifischem Antigen konfrontiert wurde.

Diese Analyse zeigte demnach, dass CMV-spezifische T-Zellen mit robuster Funktion mittels TCR-Transfer aus Material von CMV-seronegativen Spendern erzeugt werden können. Eine Anwendung für die Immuntherapie im Transplantationsbereich bietet sich mithin für diesen Ansatz an. Die adoptive Immuntherapie mit TCR-transgenen T-Zellen ist bisher vor allem bei Krebserkrankungen klinisch erprobt worden, beginnend mit dem malignen Melanom und dem Antigen MART-1 (Morgan et al., 2006) und später ausgedehnt auf TCRs gegen die Tumorantigene MAGE-A3 (Morgan et al., 2013), NY-ESO-1 (Robbins et al., 2015; Rapoport et al., 2015) und weitere Tumorantigene (Karpanen et al., 2015). In der ersten Studie wurde noch eine geringe Rate des Ansprechens der Tumorerkrankung beobachtet (Morgan et al., 2006). Durch Verwendung eines TCRs mit erhöhter Affinität gegen das Antigen, der aus einem transgenen Maus-System gewonnen und zusätzlich affinitätsoptimiert wurde, konnte die Ansprechrate gesteigert werden, aber es wurden auch starke neurologische Nebenwirkungen verursacht, die auf eine Expression von MAGE-A12 in Nervengewebe zurückgeführt werden konnten (Morgan et al., 2013). Demgegenüber war ein affinitätsoptimierter TCR gegen das Tumorantigen NY-ESO-1 offenbar nicht toxisch gegenüber Normalgewebe, wohl wegen der spezifischen Expression des Antigens im Tumor (abgesehen von Keimzellen), und objektive Ansprechraten von über 50% konnten damit beim malignen Melanom und multiplen Myelom erreicht werden (Robbins et al., 2015; Rapoport et al., 2015).

Bei der virusspezifischen TCR-transgenen T-Zelltherapie herrscht im Vergleich mit diesen tumorantigen-spezifischen Therapien noch ein gewisser Entwicklungsrückstand. Experimente zum funktionellen Gentransfer CMV-spezifischer TCRs, in allen Fällen gegen das Antigen pp65, waren bereits vor unserer Arbeit beschrieben worden (van der Veken et al., 2006; van Lent et al., 2007; Heemskerk et al., 2007). Der mit unserer Arbeit erreichte Fortschritt bestand darin, dass zusätzliche Spezifitäten mit zusätzlichen HLA-Restriktionen erfolgreich verwendet wurden; dass ein vereinfachtes Herstellungsprotokoll präsentiert wurde, bei dem dank effizienter retroviraler Transduktion auf eine aufwendige Sortierung der transduzierten T-Zellen verzichtet werden konnte, und eine CMV-spezifische Funktion direkt in den transduzierten T-Zellkulturen nachgewiesen werden konnte; und dass gezeigt werden konnte, dass die TCR-transduzierten T-Zellen global in der Lage waren, nach Antigenstimulation spezifisch zu expandieren und ihre Funktion dabei sogar noch zu steigern.

Leider hat bislang die CMV-spezifische TCR-transgene Therapie noch keine weite klinische Verbreitung erfahren. Eine erste klinische Studie zur Machbarkeit und

Verträglichkeit TCR-transgener CMV-spezifischer T-Zellen für Empfänger einer HZT von HLA-identen, CMV-negativen Geschwistern wurde in London um das Jahr 2011 begonnen; sie wurde jedoch nach Behandlung von zwei Patienten unterbrochen, um den Genvektor neu zu produzieren (Gilham et al., 2015). Inzwischen wurde die Studie vermutlich wieder aufgenommen. Insbesondere um Empfängern einer HZT von CMV-negativen Spendern einen ausreichenden Immunschutz gegen CMV zu verleihen, wäre es sehr wünschenswert, wenn auf diesem Gebiet weitere klinische Studien initiiert würden. Ein interessanter Ansatz hierfür wäre der Transfer von T-Zellen mit einer Spezifität gegen das von uns identifizierte, oben beschriebene "privilegierte" Epitop CRV, das durch HLA-C*07:02 restringiert ist.

5. EBV-spezifische Immunität, Immunmodulation und Immuntherapie

EBV-spezifische T-Zelltherapie bei PTLD-Patienten

Die durch EBV verursachte lymphoproliferative Erkrankung nach Transplantation (post-transplant lymphoproliferative disease, PTLD) gehört zu den lebensbedrohlichen durch Viren erzeugten Komplikationen nach allogener hämatopoetischer Zelltransplantation (allo-HZT) oder solider Organtransplantation (Gottschalk et al., 2005). PTLD entsteht durch Transformation normaler B-Zellen durch EBV-Infektion, wodurch in den B-Zellen das transformierende EBV-Latenzprogramm etabliert wird, auch Latenz III oder das "Wachstumsprogramm" genannt (Gottschalk et al., 2005; Rowe et al., 1992; Thorley-Lawson und Gross, 2004). Zu den Risikofaktoren für PTLD nach allo-HZT gehören die Verwendung eines T-zelldepletierten Stammzelltransplantats, der Einsatz T-zell-spezifischer Antikörper wie Antithymozytenglobulin (ATG), und ein geringer Grad der HLA-Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger (Gottschalk et al., 2005; Landgren et al., 2009). Da bei der HZT aufgrund verbesserter Protokolle zunehmend auf eine T-Zelldepletion oder den Einsatz T-zell-eliminierender Antikörper verzichtet werden kann, selbst bei Vorliegen von HLA-Inkompatibilitäten (Tischer et al., 2015), liegt die Inzidenz der PTLD mittlerweile bei unter 0.2% bei den HZT-Patienten; sie steigt aber bei Anwesenheit von Risikofaktoren stark an (Landgren et al., 2009). Alle genannten Risikofaktoren weisen auf eine wichtige Rolle von T-Zellen bei der Verhinderung der PTLD hin. Daher ist eine Reduktion der Immunsuppression, falls mit dem sonstigen Zustand des Patienten vereinbar, eine der ersten möglichen Therapiemaßnahmen (Heslop, 2009). Als weitere Therapiemaßnahme bietet sich der anti-CD20-Antikörper Rituximab an, der zur präemptiven Unterdrückung einer EBV-Reaktivierung oder einer Behandlung der PTLD viel verwendet wird. Die Ansprechrate dieser Therapie liegt bei 50-100%; durch den anti-CD20-Antikörper werden sowohl PTLD-Zellen als auch gesunde B-Zellen für mehrere Monate eliminiert, was die Gefahr von Sekundärinfektionen nach sich ziehen kann (Heslop et al., 2009). Eine aktuelle Studie (Trappe et al., 2016) empfiehlt eine Stratifizierung der Patienten entsprechend dem initialen Ansprechen auf Rituximab und gegebenenfalls Ergänzung durch eine Chemotherapie.

Die adoptive Immuntherapie mit EBV-spezifischen T-Zellen des Spenders bietet die Chance, eine Kontrolle der EBV-Erkrankung ohne schädliche Nebenwirkungen durch Wiederherstellung des "natürlichen" Immunschutzes zu erreichen. Frühe Studien nutzten zur PTLD-Therapie einen T-Zell-Transfer in Form einer einfachen Transfusion von Spenderlymphozyten (Papadopoulos et al., 1994). Diese Maßnahme war zwar gegen PTLD effektiv, führte aber zu einer hohen Inzidenz der Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD). Daher wurde bereits früh eine EBV-spezifische T-Zelltherapie für Prophylaxe und Therapie der EBV-PTLD entwickelt (Rooney et al., 1995; 1998). Als Zielantigene einer protektiven T-Zellantwort kommen insbesondere die neun EBV-

Proteine der Latenz III in Frage, die bei PTLD nach allo-HZT üblicherweise in den transformierten B-Zellen exprimiert sind (Gottschalk et al., 2005). In EBV-positiven gesunden Spendern sind solche T-Zellen in aller Regel in bedeutenden Häufigkeiten vorhanden und in ihrer Antigen- und Epitopspezifität zumindest teilweise bekannt (Tan et al., 1999; Hislop et al., 2007b). Durch in-vitro-Transformation von Spender-B-Zellen mit EBV kann leicht eine Zelllinie (genannt lymphoblastoide Zelllinie, LCL) hergestellt werden, die in ihren biologischen Eigenschaften und ihrer Expression von EBV-Antigenen einer PTLD weitgehend entspricht und in vitro sehr effektiv die Proliferation und Anreicherung EBV-spezifischer T-Zellen fördert (Rooney et al., 1998). Daher war diese LCL-Stimulationsmethode für längere Zeit in klinischem Gebrauch, und von der Houston-Gruppe wurden mit solchermaßen generierten EBV-spezifischen T-Zellen weit über hundert Patienten behandelt (Heslop et al., 2010). Obwohl die LCL-Stimulationsmethode in diesen vielfachen Anwendungen klinisch sicher und wirksam erschien, ist sie gleichwohl technisch aufwendig, und insbesondere ihr prophylaktischer Einsatz ist durch die lange Herstellungszeit der T-Zellen von bis zu 12 Wochen sehr erschwert. Daher entwickelten wir eine beschleunigte Herstellung von EBV-spezifischen T-Zellen, und diese wurden therapeutisch an Patienten mit akuter, anderweitig inkurabler PTLD verabreicht (**Moosmann et al., 2010**).

Bei der Gestaltung unseres Herstellungsprotokolls gingen wir von der Voraussetzung aus, dass in Fällen manifester, auf Rituximab nicht schnell reagierender PTLD nur kurze Zeit bleibt, um mit weiteren Therapieoptionen einzugreifen. Als schnelle Isolationsmethode bot sich die immunmagnetische Separation (magnet-assisted cell sorting, MACS) nach spezifischer Stimulation und Oberflächeneinfang von IFN- γ an (IFN- γ secretion assay, oder IFN- γ capture). Mit dieser Methode hergestellte Adenovirus-spezifische T-Zellen waren bereits zuvor klinisch eingesetzt worden (Feuchtinger et al., 2006; 2008). Für EBV stand jedoch eine schnelle T-Zell-Isolationsmethode bis dahin nicht zur Verfügung. Ein geeigneter CliniMACS-Automat der Firma Miltenyi war im Hause verfügbar. Als Antigen für die Stimulation entschieden wir uns für eine eigene Zusammenstellung definierter Peptidepitope, da dieses Vorgehen die beste Abdeckung spezifischer T-Zellen aus unterschiedlichen EBV-Antigenen zu versprechen schien. Wir wählten ein Sortiment von 23 Peptiden aus, die teils in der Literatur präzise charakterisiert worden waren, teils in eigenen Vorarbeiten als geeignet erwiesen waren, und die im Gesamtmix zur T-Zellstimulation eingesetzt wurden. Die Peptide stammten aus den fünf Latenzantigenen, die die stärkste T-Zellantwort hervorzurufen pflegen (EBNA1, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, LMP2; Hislop et al., 2007b) sowie einer Auswahl immundominanter Antigene des lytischen Zyklus von EBV. Im Verlauf des Jahres 2007 traten an der Stammzelltransplantationseinheit des Klinikums Großhadern sechs Fälle von PTLD auf, die nicht unmittelbar auf eine Reduktion der Immunsuppression und eine Rituximab-Behandlung ansprachen. Die meisten dieser Patienten hatten zuvor eine kombinierte T-zellhaltige/T-zelldepletierte HLA-haploidente Transplantation erhalten, unter

Einschluss eines CD6-Depletionsschrittes (Tischer et al., 2015), und waren in ihrer T-Zellrekonstitution demgemäß sehr eingeschränkt. Da die HLA-haploidenten Familienspender gut verfügbar waren, konnten bei den sechs PTLD-Fällen EBV-spezifische T-Zellen hergestellt und den Patienten transfundiert werden. Am besten konnte der Verlauf der Immunrekonstitution bei den Patienten 1 und 2 verfolgt werden, da beide Spender mehrere HLA-Allotypen aufwiesen, insbesondere HLA-A*02:01, die zu immundominanten Peptidepitopen im verwendeten Peptidmix passten und für die zudem MHC-Peptid-Multimere verfügbar waren. Bei beiden Patienten ergab sich in ähnlicher zeitlicher Abfolge nach Transfer der EBV-spezifischen T-Zellen ein sehr starker Anstieg der EBV-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut, der jeweils etwa zwei Wochen nach T-Zelltransfer ein Maximum erreichte; zu diesem Zeitpunkt lag der Anteil der EBV-spezifischen CD8-T-Zellen jeweils bei über 20% der peripheren Blutlymphozyten. Zugleich kam es zu einer Vollremission der PTLD; eine solche wurde ebenso bei Patient 3 beobachtet, bei dem die nachweisbare EBV-spezifische T-Zellrekonstitution geringer war. Bei Patient 4, 5, und 6 fand der T-Zelltransfer leider erst zu einem Zeitpunkt statt, als die PTLD bereits weit fortgeschritten war, eine intensivmedizinische Behandlung eingeleitet war und ein Multiorganversagen befürchtet werden musste; diese drei Patienten verstarben. Patient 1 und 2 sind heute, etwa zehn Jahre nach der beschriebenen Behandlung, wohlauf. Der Nachweis einer Kausalität zwischen der T-Zelltransfusion und der Elimination der EBV-Erkrankung kann ohne Kontrollgruppe und insbesondere bei einer so kleinen Patientengruppe sicherlich nicht geführt werden, eine kausale Beziehung erscheint aber immerhin möglich und auch vom zeitlichen Verlauf her plausibel.

Im Jahr 2017 stellt sich die Situation der EBV-spezifischen T-Zelltherapie wie folgt dar. Der therapeutische Einsatz EBV-spezifischer T-Zellen bei Problemen der Reaktivierung oder bei PTLD ist zwar noch weit davon entfernt, klinischer Standard zu sein, und klinische Forschungen finden nach wie vor auf der Ebene von vorwiegend nicht kontrollierten und randomisierten kleineren Studien statt. Jedoch steht nun ein größeres Repertoire an vereinfachten und beschleunigten Methoden zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zellen zur Verfügung. Eine gewisse Überraschung war, dass die im Gebiet weiterhin führende Gruppe in Houston um Cliona Rooney, Helen Heslop und Kollegen in einem neueren Protokoll dazu übergegangen ist, Peptidgemische in Kurzzeit-Stimulationsprotokollen zur Anreicherung EBV-spezifischer T-Zellen zu verwenden, insbesondere im Rahmen eines multivirusspezifischen Ansatzes (Papadopoulou et al., 2014). Möglicherweise hat unsere Arbeit zu dieser Entscheidung mit beigetragen. Auch die Gruppe von Tobias Feuchtinger verwendete die IFN- γ -Sekretionsmethode, in Verbindung mit Stimulation mit einem Peptidmix, in diesem Falle für EBNA1, zur Herstellung EBV-spezifischer T-Zellen zur Therapie von PTLD (Icheva et al., 2013). Nach wie vor sind die Resultate bei der Behandlung von PTLD mittels EBV-spezifischer T-Zellen in der Regel gut, und Toxizitäten der T-Zelltherapie werden in der Regel nicht beobachtet, außer in Fällen einer bereits stark

fortgeschrittenen oder disseminierten EBV-Erkrankung (Khanna et al., 1999; Heslop et al., 2010), wo es zum Zytokinsturm und Tumorlysesyndrom kommen kann. Die Erweiterung auf Peptide aus einer größeren Zahl von EBV-Antigenen dürfte ein möglicher Weg sein, die Erfolgsrate noch weiter zu steigern. Unser eigener Ansatz wird in einer aktuell laufenden Studie (MULTIVIR-01, unpubliziert) zur kombinierten prophylaktischen Infusion von EBV/CMV-spezifischen T-Zellen nach allo-HZT in modifizierter Form vertieft klinisch exploriert. Bei dieser von Armin Gerbitz (Erlangen und Berlin) geleiteten Studie werden je 17 Peptide aus EBV und CMV zur 10-tägigen Expansion von virusspezifischen T-Zellen verwendet. Vorläufige Zwischenergebnisse weisen darauf hin, dass auch in dieser Patientenkohorte nach T-Zelltransfer ein Rückgang der viralen Reaktivierung beobachtet wird. Diese Studie verspricht besonders informativ zu werden, da sie randomisiert und kontrolliert angelegt wurde. Zudem ist auch eine besonders effektive Wirkung gegen eine Reaktivierung von CMV und EBV im Rahmen dieser Studie möglich, da sie von uns neu identifizierte, möglicherweise besonders effektive T-Zell-Epitope gegen die CMV-Antigene IE-1 und pp65 (Wiesner et al., 2005; Ameres et al., 2013; 2015) sowie von unseren Kooperationspartnern neu identifizierte EBV-Epitope gegen Antigene des lytischen Zyklus (Adhikary et al., 2006; Milosevic et al., 2006) mit einschließt.

Angeborene Immunstimuli als Kofaktoren der EBV-Transformation

Der EBV-getriebenen malignen Transformation von B-Zellen bei der PTLD entspricht die Transformation von B-Zellen *in vitro*, bei der lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) entstehen. Die PTLD ist somit eine maligne Erkrankung, die in einem autologen Modell leicht *in vitro* nachgestellt werden kann. Auch *in vivo* bei gesunden Virusträgern findet man in sekundären lymphoiden Organen B-Zellen, in denen das transformierende Genexpressions-Programm (das Latenz-III-Programm) von EBV angeschaltet ist (Joseph et al., 2000), ebenso bei Patienten mit infektiöser Mononukleose (Kurth et al., 2000). Solcherart infizierte B-Zellen gelten als Zwischenstufe bei der Etablierung der EBV-Latenz (Thorley-Lawson und Gross, 2004), und ihre Proliferation mag zur Vermehrung des Virus beitragen. Nach dem Drei-Signale-Modell (Ruprecht und Lanzavecchia, 2006) müssen für die volle Aktivierung und Proliferationsinduktion von B-Zellen drei Typen von Rezeptoren stimuliert werden: der B-Zellrezeptor (Signal 1), der Rezeptor CD40 (Signal 2) und Mustererkennungs-Rezeptoren der angeborenen Immunität (Signal 3), zum Beispiel TLRs (toll-like receptors). Im Zuge der natürlichen B-Zellregulation werden diese Signale nur transient gegeben. Demgegenüber exprimiert EBV in den infizierten B-Zellen Moleküle, die Signal 1 und 2 konstitutiv nachahmen, nämlich die "latent Membranproteine" LMP2A und LMP1 (Thorley-Lawson und Gross, 2004). Die mögliche Herkunft eines potentiellen dritten Signals bei der EBV-Transformation, das auch *in vivo* eine Rolle spielen könnte, ist unklar; zu den vielen Möglichkeiten zählt die Erkennung viraler RNA durch TLR3 (Iwakiri et al., 2009)

oder den nukleären Rezeptor RIG-I (Ablasser et al., 2009). Humane B-Zellen exprimieren mehrere TLRs, besonders hoch jedoch TLR9 (Hornung et al., 2002), und die Stimulation dieses Rezeptors mit unmethylierter CpG-DNA führt allein bereits zu einer B-Zellaktivierung (Hartmann et al., 2000), die auch die Fähigkeit der B-Zellen zur Stimulation von T-Zellen verstärkt (Wagner et al., 2004). Daher bestand ein mehrfaches Interesse daran, zu untersuchen, wie TLR-Agonisten die Infektion von B-Zellen mit EBV beeinflussen: zum besseren Verständnis der EBV-Pathogenese, und um die technische Nutzung von EBV-Vektorsystemen für immunologische Analysen auf zwei Ebenen zu verbessern, nämlich der Generierungseffizienz von B-Zelllinien und der Optimierung ihrer stimulatorischen Potenz gegenüber T-Zellen.

Wir untersuchten daher den Einfluss verschiedener TLR-Agonisten auf die Transformation humaner peripherer B-Zellen in vitro (**Iskra et al., 2010**). Zu den getesteten TLR-Agonisten gehörten solche für die TLRs 2, 4, 7 und 9. Im Einklang mit der hohen Expression von TLR9 in B-Zellen und der früher beschriebenen prominenten Rolle von TLR9 bei der B-Zellaktivierung wurde ein besonders starker Effekt eines TLR9-Agonisten (CpG-DNA-Oligo ODN2006, Hartmann et al., 2000) auf die EBV-Transformation von B-Zellen festgestellt. In Anwesenheit des TLR9-Agonisten stieg die Ausbeute an lymphoblastoiden, EBV-transformierten B-Zellen nach sieben Tagen Infektion auf das 3–5fache. Bei einer Präaktivierung von B-Zellen mit CpG-DNA vor der EBV-Infektion konnten sogar noch weit höhere Steigerungen beobachtet werden, ebenso wenn tonsilläre anstelle von peripheren B-Zellen herangezogen wurden. Auch Agonisten von TLR2 und TLR7 unterstützen die EBV-vermittelte B-Zelltransformation, wenn auch in geringerem Maße. Gereinigte *S. aureus*-Bakterien hatten einen ähnlich EBV-unterstützenden Effekt wie CpG-DNA.

Unsere Ergebnisse führten uns zu der Hypothese, dass mikrobielle Koinfektionen, etwa bakterielle Infektionen im tonsillären Bereich, zu einer Verstärkung der EBV-vermittelten B-Zellaktivierung im Menschen beitragen könnten, etwa bei infektiöser Mononukleose. Nach wie vor ist nämlich nicht bekannt, worauf die gesteigerte Empfindlichkeit älterer Personen gegenüber einer primären EBV-Infektion beruht, die zu dem oft belastenden und bisweilen protrahierten Krankheitsbild der infektiösen Mononukleose (IM) führt (Tattevin et al., 2006; Luzuriaga und Sullivan, 2010; Vouloumanou et al., 2012). Klar ist, dass es bei IM zu einer fulminanten Expansion EBV-spezifischer CD8-T-Zellen in der Peripherie kommt (Callan et al., 1998), verbunden mit weiteren transienten Veränderungen des peripheren Immunzellrepertoires (Panikkar et al., 2015). Das Krankheitsbild der IM könnte demnach vor allem auf eine überschießende Immunantwort zurückzuführen sein, deren prädisponierende Faktoren allerdings nicht geklärt sind. Verschiedene bakterielle Koinfektionen, die bei der mit IM einhergehenden Tonsillitis beobachtet werden (Stenfors und Raisanen, 1993; Brook, 2005), könnten hier eine Rolle spielen. Auch die Rolle bakterieller Koinfektionen bei der PTLD dürfte eine vertiefte Untersuchung

verdienen. Ebenso könnte die hypomethylierte DNA des EBV-Genoms selbst in B-Zellen TLR9 aktivieren, was zur Effizienz der Infektion beitragen könnte.

Ein CD8-T-Zell-Immunevasin der latenten Phase von EBV

EBV-transformierte B-Zellen nehmen, analog zu auf physiologische Weise aktivierten B-Zellen, deren Programm sie nachahmen (Thorley-Lawson, 2001), einen stark immunstimulatorischen Phänotyp an (Wroblewski et al., 2002), der auch ihre Eigenschaft erklärt, verschiedene Typen von T-Zellen effektiv zu aktivieren (Bhaduri-McIntosh et al., 2008). Es verwundert nicht, dass EBV als komplexes immunogenes Virus ebenso wie CMV (siehe oben) eigene Mechanismen entwickelt hat, um eine antivirale T-Zellantwort einzudämmen und eine Etablierung der EBV-Infektion im Wirt zu ermöglichen. Als erstes EBV-Immunevasin, das die spezifische T-Zellerkennung infizierter Zellen beeinträchtigt, wurde der TAP-Inhibitor BNLF2a identifiziert (BamHI N fragment, leftward frame 2a; Hislop et al., 2007a). Später folgte die Identifikation weiterer immunmodulatorischer EBV-Proteine mit Einfluss auf die T-Zellerkennung (Ressing et al., 2015). Dabei fiel auf, dass alle diese Proteine zum lytischen Zyklus von EBV gehörten, während die immunmodulatorischen Funktionen von Proteinen der Latenz zunächst unbekannt blieben. Wegen ihrer potentiell großen Bedeutung auch für das Verständnis der Entstehung von EBV-assoziierten Tumorerkrankungen widmeten wir uns daher der Frage, ob EBV-Proteine in der Latenz die T-Zellerkennung beeinflussen. Da das "latente Membranprotein" LMP2A in verschiedenen Latenzmodi von EBV exprimiert ist, einschließlich der Latenz III (Thorley-Lawson, 2001), andererseits aber für das Wachstum etablierter transformierter B-Zellen weitgehend entbehrlich zu sein scheint (Longnecker et al., 1992; Brielmeier et al., 1996), machte dies eine andere, möglicherweise immunologische Funktion dieses Proteins noch wahrscheinlicher. Weitere Hinweise auf eine solche Funktion gaben Genexpressionsanalysen, die einen dämpfenden Effekt von LMP2A auf die Expression von Genen der Kategorie Immunität/Inflammation zeigten (Portis et al., 2003). Bereits etablierte LMP2A-deletierte Virusmutanten (Mancao und Hammerschmidt, 2007) erlaubten die experimentelle Untersuchung der Frage anhand von autologen EBV-infizierten B-Zellen und spezifischen T-Zellen verschiedener Spender.

Zur Untersuchung dieser Frage (**Rancan et al., 2015**) etablierten wir LMP2A-deletierte LCLs einer Reihe gesunder Spender unterschiedlicher HLA-Typen sowie EBV-spezifische T-Zellklone unterschiedlicher Antigenspezifität und HLA-Restriktion. Die Etablierung LMP2A-deletierter LCLs wurde durch exogene CD40-Stimulation während der ersten Phase der Infektion unterstützt; bei Verwendung dieser Methode ergab sich kein Unterschied zwischen der Transformationseffizienz von komplettem und LMP2A-deletiertem EBV, und die daraus entstehenden B-Zelllinien waren nicht abhängig von einer CD40-Stimulation. Im Einklang mit unserer Arbeitshypothese fanden wir eine

stark erhöhte CD8-T-Zellreaktivität gegen LMP2A-deletierte LCLs im Vergleich mit Wildtyp-EBV-LCLs. Dies galt in sehr allgemeingültiger Weise für CD8-T-Zellen unterschiedlicher Antigenspezifität und HLA-Restriktionen. Mehrere Mechanismen waren dafür verantwortlich. In LMP2A-deletierten LCLs war die Expression bestimmter T-Zellantigene erhöht, insbesondere die von EBNA1; erhöht war die Expression von MHC-I-Molekülen, allerdings nur in recht geringem Ausmaß; und deutlich erhöht war die Expression zweier agonistischer Liganden des Rezeptors NKG2D, nämlich der Moleküle MICA und ULBP4. Die Rolle von NKG2D bei diesem Effekt von LMP2A konnte in T-Zellexperimenten mit inhibitorischen Antikörpern bestätigt werden.

Diese Resultate zeigten, dass LMP2A ein generell wirksames Immunevasin in der latenten Phase von EBV ist, das erste, das bislang beschrieben wurde. Zuvor war bereits gezeigt worden, dass EBNA1 und LMP1 Funktionen aufweisen, die die T-Zellerkennung hemmen (Levitskaya et al., 1995; Smith et al., 2009); diese Funktionen sind aber ausschließlich in cis wirksam und beeinflussen nicht die Präsentation anderer Antigene. LMP2A ist nicht nur in der Latenz III, sondern auch im Latenzprogramm II exprimiert, das auch in Krebserkrankungen wie dem Nasopharynxkarzinom und dem EBV-assoziierten Hodgkin-Lymphom vorliegt. Somit könnte LMP2A auch bei diesen Krebserkrankungen die T-Zellkontrolle des Tumors unterlaufen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Rolle von LMP2A in der Immunevasion von EBV noch umfassender zu verstehen.

In jüngster Zeit ist deutlich geworden, dass nicht nur EBV-Proteine, sondern auch von EBV kodierte mikro-RNAs (miRNAs) die Erkennung infizierter Zellen durch T-Zellen reduzieren, mithin Immunevasine sind (Albanese et al., 2016; Tagawa et al., 2016). Durch direktes Targeting entsprechender mRNAs reduzieren EBV-kodierte miRNAs insbesondere die Expression des Peptidtransporters TAP und des Zytokins IL-12. Zum Teil sind die miRNAs von EBV auch in der Latenz III exprimiert, wenn auch in geringerem Ausmaß als in der frühen Infektionsphase von B-Zellen (Seto et al., 2010), und daher dürften sie auch eine Rolle bei der Verminderung der immunologischen Kontrolle der PTLD und möglicherweise weiterer EBV-assoziiierter Krebserkrankungen spielen.

6. Die T-Zellantwort gegen HHV-6

Wie EBV und CMV ist auch HHV-6 ein verbreitetes Pathogen bei Immunsupprimierten und im besonderen nach allogener Stammzelltransplantation (allo-HZT). Es handelt sich dabei fast immer um HHV-6B, die am weitesten verbreitete Spezies dieser Gruppe (Zerr et al., 2012). Von einer HHV-6-Reaktivierung nach allo-HZT ist oft das Nervensystem betroffen (Hill und Zerr, 2014), es können aber auch andersartige Komplikationen auftreten, wie Gastroenteritis und Pneumonitis (Tischer et al., 2015). HHV-6-Reaktivierung ist auch mit verschlechtertem Engraftment und verringertem Gesamtüberleben assoziiert (Zerr et al., 2005). Die Behandlung mit antiviralen Medikamenten wie Foscarnet kann schwere virale Komplikationen verhindern, jedoch nur in rund der Hälfte der Patienten (Ogata et al., 2013; Hill und Zerr, 2014), und die Nebenwirkungen dieser Therapie sind bedeutend. Die Entwicklung einer T-Zelltherapie erscheint daher wünschenswert.

Identifikation von HHV-6-spezifischen CD8-T-Zellen

Zu Beginn unserer Forschungen auf diesem Gebiet waren zwar lymphoproliferative Antworten gegen HHV-6 beschrieben worden, sowohl bei gesunden Spendern (Yakushijin et al., 1991, 1992; Yasukawa et al., 1993) als auch bei allo-HZT-Patienten (Wang et al., 1999, 2002). Es waren jedoch nicht die Antigene bekannt, die von HHV-6-spezifischen CD4-T-Zellen erkannt werden. Von HHV-6-spezifischen CD8-T-Zellen war nicht einmal bekannt, ob diese existieren. Zwischenzeitlich wurde HHV-6 als immunsuppressives Virus eingeschätzt (Lusso et al., 2006). Diese Einschätzung wurde aus vielleicht nicht sehr überraschenden Beobachtungen abgeleitet, dass die von HHV-6 infizierten T-Zellen funktionell beeinträchtigt sind (Lusso et al., 1991; Horvat et al., 1993; Flamand et al., 1995), und daraus, dass HHV-6-Reaktivierung nach allo-HZT assoziiert war mit Lymphopenie (Wang et al., 1999) und CMV-Reaktivierung (Wang et al., 2002). Diese Ableitung ist jedoch nicht unbedingt stichhaltig, da die Kausalität ebenso oder noch wahrscheinlicher umgekehrt verlaufen könnte: die Lymphopenie könnte mit einem reduzierten T-Zellschutz gegen HHV-6 und andere Viren einhergehen und daher jeweils ursächlich für die virale Reaktivierung sein (Tormo et al., 2010). Die Idee eines "immunsuppressiven" HHV-6 ließ es möglich erscheinen, dass die T-Zellantwort gegen HHV-6 von den ansonsten für humane Herpesviren gültigen Paradigmen abweicht. Demgegenüber stellten wir die Hypothese auf, dass HHV-6-antigenspezifische CD8-T-Zellen existieren und antivirale Funktionen aufweisen, und überprüften diese Hypothese in vitro.

Zu diesem Zweck identifizierten und testeten wir 12 mögliche Epitopkandidaten einer HLA-A*02:01-restringierten CD8-T-Zellantwort aus drei Antigenen von HHV-6B (Martin et al., 2012). Da keine anderweitige Information vorlag, welche der rund 100

Proteine von HHV-6 als Zielantigene einer CD8-T-Zellantwort in Frage kommen könnten, wurden Sequenz- oder Funktionshomologe von Antigenen ausgewählt, die bei CMV-Infektion starke T-Zellantworten auf sich ziehen. Die entsprechenden Antigene waren UL11 und U54 (Strukturproteine von HHV-6) und U90 (major immediate early protein). Zur Expansion möglicher HHV-6B-spezifischer CD8-T-Zellen aus dem peripheren Blut benützten wir peptidbeladene autologe CD40-aktivierte B-Zellen. Expandierte T-Zelllinien wurden einzelzellkloniert, um anhand von T-Zellklonen eine präzise Analyse der virusspezifischen Funktion sicherzustellen. Zudem wurde ein Testsystem entwickelt, bei dem primäre autologe CD4-T-Zellen isoliert und mit dem Virus infiziert werden und dann als Zielzellen in einer T-Zellreaktion dienen, die in verschiedener Weise durchgeführt werden kann, als Zytotoxizitäts-Test oder als Zytoxinfreisetzungstest. Es gelang uns die Herstellung von spezifischen T-Zellklonen gegen fünf der zwölf Kandidaten. Für drei der Kandidaten konnten wir zeigen, dass entsprechende CD8-T-Zellklone nicht nur das dargebotene synthetische Peptid, sondern auch HHV-6-infizierte Zellen erkannten, diese lysierten und mit Zytokinfreisetzung reagierten. Somit sind gegen das Virus wirksame CD8-T-Zellen Teil des natürlichen Immunrepertoires gesunder HHV-6-Träger. Solche T-Zellen erkennen die viralen Strukturproteine U11 und U54.

Diese Arbeit zeigte somit erstmals die Existenz, Funktion und Antigen-spezifität von HHV-6-spezifischen CD8-T-Zellen. In einer zeitgleich erschienenen Arbeit wurden von anderer Seite die ersten Antigene und Epitope der CD4-T-Zellantwort (Nastke et al., 2012) ermittelt, und kurze Zeit später wurde in Houston bestätigt, dass HHV-6-spezifische CD8-T-Zellen Teil des Immunrepertoires sind (Gerdemann et al., 2013). Letztere Arbeit benützte allerdings einen ungewöhnlichen Test zum Nachweis der Erkennung infizierter Zellen, nämlich HHV-6-infizierte Monozyten, obgleich von einem solchen natürlichen Tropismus von HHV-6 nichts bekannt ist.

Gleichwohl war damit die Existenz und Zugänglichkeit eines HHV-6-spezifischen CD8- und CD4-T-Zellrepertoires etabliert, und von der Houston-Gruppe wurden diese Resultate verdienstvollerweise sehr schnell in eine erste klinische Anwendung der adoptiven T-Zelltherapie umgesetzt (Papadopoulou et al., 2014). Weitere Analysen anderer bestätigten zudem die Anwesenheit und Funktion von HHV-6-spezifischen CD8-T-Zellen (Iampetro et al., 2014; Halawi et al., 2015).

Publizierte Studien der HHV-6-spezifischen CD8-T-Zellantwort sind gleichwohl bis dato auf eine kleine Zahl von Antigenen beschränkt geblieben, und die bis dato beobachteten Häufigkeiten ex vivo sind durchweg niedrig (Becerra et al., 2014). In noch unpublizierten Arbeiten (Martin et al.) haben wir daher eine Querschnittsanalyse der T-Zellantwort gegen rund 300 Epitopkandidaten aus den meisten Proteinen des viralen Proteoms durchgeführt. Diese Analyse identifizierte 16 Epitope in 10 weiteren Proteinen, die von CD8-T-Zellen im Kontext der Infektion erkannt wurden. Virale

Proteine unterschiedlicher kinetischer Stadien und funktioneller Klassen sind also einer HHV-6-spezifischen T-Zellantwort zugänglich. Zudem identifizierten wir das erste Epitop, das zu T-Zellantworten führt, deren Häufigkeit eine regelmäßige und robuste ex-vivo-Detektion mittels Peptid-MHC-Multimeren gestattet. Diese Analysen werden zur Zeit auf Patienten nach allo-SZT ausgedehnt, um näheres über den Zusammenhang zwischen T-Zellantwort und Kontrolle der Infektion bei immunsupprimierten Patienten in Erfahrung zu bringen und die Grundlage für eine entsprechende Therapie mittels Transfer von HHV-6-spezifischen T-Zellen zu schaffen.

7. Techniken und Werkzeuge zur T-Zellanalyse

CD40-aktivierte B-Zellen proliferieren unbegrenzt

Ein gemeinsamer Aspekt der meisten Arbeiten im Rahmen dieses Habilitationsprojekts ist die Analyse und technische Ausnutzung der Interaktion humaner spezifischer T-Zellen mit aktivierten B-Zellen, die als antigenpräsentierende Zellen (APC) fungieren. Für EBV stellt dies zugleich das vielleicht wichtigste und repräsentativste Modell für relevante Virus-Wirts-Interaktionen dar, da EBV in B-Zellen latent im Körper residiert, sich durch Proliferation aktivierter EBV-transformierter B-Zellen vermehrt, aus B-Zellen reaktiviert und lytisch freigesetzt wird, und somit die Interaktion von T-Zellen mit unterschiedlichen Typen EBV-infizierter B-Zellen der wichtigste Aspekt der virusspezifischen Immunkontrolle sein dürfte (Thorley-Lawson, 2001; Küppers, 2003; Hislop et al., 2007b; Rickinson et al., 2014). Auch über das EBV-Modell hinaus sind aktivierte B-Zellen ein wichtiger Typ professioneller APCs, selbst wenn sie in dieser Hinsicht nicht die volle funktionelle Kompetenz dendritischer Zellen erreichen (Cassell und Schwartz, 1994). Aktivierte B-Zellen tragen zur Hervorbringung einer verstärkten T-Zellantwort bei (Hayglass et al., 1986; Janeway et al., 1987; Kleindienst und Brocker, 2005; Kroeger et al., 2013), sei es eine antiinfektiöse oder eine Autoimmunantwort.

Zur detaillierten Analyse humaner antigenspezifischer T-Zellantworten ist in vielen Fällen die Verfügbarkeit einer humanen, wenn möglich autologen professionellen APC Bedingung. Nicht immer eignen sich hier EBV-transformierte B-Zellen, besonders wegen der zuweilen störenden Expression von EBV-Antigenen. Daher wurde von Banchereau und Kollegen ein System entwickelt, bei dem humane B-Zellen in vitro mit zelloberflächenständigem anti-CD40-Antikörper oder CD40-Ligand (CD40L) in Gegenwart von Zytokinen stimuliert werden (Banchereau et al, 1991; Garrone et al., 1995). Die entstehenden aktivierten B-Zellkulturen sind frei von Fremdartigen und können effektiv T-Zellen antigenspezifisch aktivieren; allerdings war festgestellt worden, dass solche Kulturen nur vorübergehend in Kultur stabil proliferierten (Schultze et al., 1997; von Bergwelt-Baildon et al., 2002), was die Verfügbarkeit solcher Zellen und die Möglichkeiten ihrer experimentellen Nutzung natürlich wesentlich einschränkte. Wir optimierten daher die Kultivierung humaner B-Zellen mittels des CD40L-Stimulationssystems. Unsere optimierte Methode der B-Zellkultivierung nutzten wir erstmals zur Vermehrung sehr seltener T-Zellen gegen ein Antigen des humanen Papillomvirus (Zentz et al., 2007). Parallel beschrieben wir die Funktionsweise unseres Kultivierungssystems und die Eigenschaften der betreffenden B-Zellen (Wiesner et al, 2008).

Die Grundlage für das verbesserte Kultursystem für CD40-aktivierte B-Zellen (**Wiesner et al., 2008**) war unsere Beobachtung, dass die Qualität und Wachstumsfähigkeit der B-Zellkulturen entscheidend von der initialen Gesamtzellzahl abhing, während es nicht entscheidend war, ob die primären B-Zellen vor Kultivierung aufgereinigt werden. Im übrigen wurden die B-Zellen analog zu früher beschriebenen Protokollen (Garrone et al., 1995) regelmäßig mit CD40L-exprimierenden Stimulatorzellen und Interleukin-4 stimuliert und zudem die T-Zellaktivierung mit Cyclosporin A gehemmt. In Kulturen, die zu Beginn eine zu hohe absolute Zahl von T-Zellen enthielten, wurde trotz Anwesenheit des T-Zell-Hemmers eine parallele Vermehrung von T-Zellen und B-Zellen beobachtet, und solche Kulturen stellten nach einigen Wochen ihre Vermehrung ein; das Phänomen erinnert an die durch T-Zellen bewirkte Regression EBV-infizierter B-Zellkulturen (Gudgeon et al., 2005). Als wirksamste Methode zur Verhinderung dieser Regression stellte sich eine einfache Zelltitration zur Reduktion der initialen Gesamtzahl mononukleärer Blutzellen (PBMCs) je Kultur heraus. Überraschenderweise stellten sich die auf diese Weise generierten B-Zellkulturen, die nach kurzer Kultivierung frei von jeglichen kontaminierenden T-Zellen wurden, als beispiellos langlebig heraus; in den meisten Fällen, in denen dies versucht wurde, konnten sie mehrere Jahre kontinuierlich kultiviert werden, was über 350 Zellteilungen entspricht, und es wurde kein Kultur-Endpunkt erreicht. Der normale Karyotyp der Zellen blieb dabei oft erhalten, was zeigt, dass für diese extrem lange Kultivierung offenbar keine Sekundärmutationen erforderlich sind. Die erreichte Zahl an Proliferationen lag weit oberhalb der Hayflick-Grenze, die am Beispiel von Fibroblasten die maximal erreichbare Zahl der Zellteilungen humaner diploider nichtmaligner Zellen in Kultur beschreibt (Hayflick, 1965).

Um diese Beobachtungen näher erklären zu können, untersuchten wir die Telomerlänge und Telomeraseaktivität der CD40-aktivierten B-Zellen. Im Gegensatz zu EBV-transformierten B-Zellen wiesen die CD40-aktivierten B-Zellen eine starke Telomeraseaktivität auf, die bei einer untersuchten B-Zelllinie sogar zu einer Verlängerung der ursprünglichen Telomerlänge führte; eine Verlängerung der Telomere humaner B-Zellen nach Aktivierung in vivo oder in vitro war zuvor bereits beschrieben worden (Weng et al., 1997; Martens et al., 2002). Unsere Arbeit zeigt somit, dass die besonders ausgeprägte natürliche Fähigkeit von B-Zellen, ihre Telomere aufrechtzuerhalten, für ein Kultursystem genutzt werden kann, bei dem normale humane B-Zellen ohne die Notwendigkeit einer genetischen Modifikation nur durch exogene Stimuli permanent vermehrt werden können. Dieses Phänomen bezeichneten wir als konditionale Immortalisierung. In einem Anwendungsbeispiel zeigten wir ferner die Fähigkeit von solchermaßen kultivierten B-Zellen, naive und Gedächtnis-T-Zellen zu aktivieren und vermehren.

CD40-aktivierte B-Zellen als potente Stimulatoren seltener T-Zellen

In einer weiteren Arbeit (**Zentz et al., 2007**) präsentierten wir ein Anwendungsbeispiel der Expansion seltener, ex vivo nicht detektierbarer antigenspezifischer T-Zellpopulationen mittels des CD40-B-Zell-Systems. Als Antigen wurde das am häufigsten untersuchte CD8-T-Zellepitop eines onkogenen humanen Papillomvirus (HPV) ausgewählt, nämlich das HLA-A*02:01-restringierte T-Zell-Epitop YMLDLQPETT (YML) aus dem E7-Protein von HPV-16 (Ressing et al., 1995; Youde et al., 2000). HPV-16 ist der häufigste HPV-Typ in HPV-assoziierten Krebserkrankungen, insbesondere Zervixkarzinomen, und die Untersuchung der T-Zellimmunität gegen die transformierenden Proteine E6 und E7 ist von besonderem Interesse, da nur diese beiden Proteine regelmäßig in Zervixkarzinomen exprimiert sind (Walboomers et al., 1999). Gegen das YML-Peptid wurden regelmäßig in Tumorpatienten CD8-T-Zellantworten festgestellt (Evans et al., 1997; Schreurs et al., 2003; Youde et al., 2005). Auch bei gesunden Spendern konnten durch Stimulation mit autologen dendritischen Zellen T-Zellkulturen angelegt werden, die diese Spezifität aufwiesen (Evans et al., 1997; Youde et al., 2000). In einigen Fällen konnten auch T-Zelllinien und Klone hergestellt werden, die nicht nur überexprimiertes Antigen, sondern auch entsprechende HPV-positive Tumorzelllinien erkannten und zytolytisch angriffen (Schreurs et al., 2003; Youde et al., 2005). Allerdings waren entsprechende T-Zelllinien oft von uneinheitlicher Qualität, wie Peptid/HLA-Multimerfärbungen zeigten (Youde et al., 2000), und die Verfügbarkeit solcher T-Zellen für weiterführende Experimente war sehr beschränkt.

Wir generierten daher CD40-stimulierte B-Zellkulturen von sechs gesunden HLA-A*02:01-positiven Spendern und stimulierten autologe Blutzellen mit peptidbeladenen B-Zellen (Zentz et al., 2007). Die Expansion von YML-spezifischen CD8-T-Zellen, nachgewiesen mittels Peptid/HLA-Multimerfärbung, gelang aus 6 von 6 Spendern, obwohl CD8-T-Zellen dieser Spezifität in PBMC ex vivo bei keinem der Spender über der Nachweisgrenze lagen. Durch die Stimulation wurden T-Zelllinien generiert, die antigenspezifisch IFN- γ sezernierten und zytolytisch waren. Sie erkannten nicht nur exogenes Peptid, sondern auch mittels Vakzinia-Vektor intrazellulär exprimiertes und prozessiertes E7-Antigen. Auch YML-spezifische T-Zellklone konnten hergestellt und ihre TCR-Sequenzen ermittelt werden. Allerdings hatte ein besonders wichtiges Experiment ein negatives Ergebnis: A*02:01-positive, HPV-16-positive Tumorzellen wurden von den T-Zellen nicht erkannt. Dieses Ergebnis steht nicht im Widerspruch mit der ansonsten guten antigenspezifischen Funktion der T-Zellen, da bekannt ist, dass HPV-positive Tumorzellen die HPV-Onkogene E6 und E7 in äußerst geringen Mengen exprimieren und zudem Defekte in ihrer Antigenprozessierung aufweisen (Evans et al., 2001).

Unser Ergebnis zeigte, dass das CD40-B-Zellsystem sich für die Expansion funktionsfähiger antigenspezifischer T-Zellen gut eignet. Hinsichtlich der Verwendbarkeit von

YML-spezifischen T-Zellen für eine Immuntherapie waren unsere Ergebnisse nur mäßig ermutigend. Zwar wurde in der Literatur mehrfach eine Erkennung von HPV-16-positiven Tumorzellen durch YML-spezifische CD8-T-Zellen beschrieben (Schreurs et al., 2003; Youde et al., 2005); allerdings konnten wegen der Knappheit solcher T-Zellen immer nur wenige Experimente durchgeführt werden, und es standen jeweils nur eine oder zwei geeignete (HLA-A2-positive, HPV-16-positive) Tumorzelllinien zur Verfügung. Der Nachweis einer antigenspezifischen Erkennung von Tumorzellen durch CD8-T-Zellen dieser Spezifität bleibt daher mit einer gewissen Unsicherheit behaftet. Direkte Analysen des Peptidrepertoires auf Tumorzellen mittels Elution und massenspektrometrischer Sequenzierung legen nahe, dass das tatsächlich präsentierte Peptid gegenüber dem von den meisten Autoren und auch uns studierten um eine Aminosäure kürzer ist (Riemer et al., 2010); jedoch bleibt es auch in dieser Version ein ungewöhnliches HLA-A*02:01-Peptid, da ihm der typische hydrophobe C-terminale Ankerrest fehlt. Die Rolle dieses Epitops innerhalb der HPV-spezifischen T-Zellantwort bleibt daher unklar.

Gleichwohl gilt die HPV-spezifische Peptidvakzinierung als vielversprechender Ansatz, und sie ist in jüngerer Zeit insbesondere von der Leidener Gruppe in verschiedenen klinischen Studien mit teilweise guten Erfolgen getestet worden. Vakzinieren wurde dabei mit einem Gemisch langer Peptide, die die Sequenzen der Onkogene E6 und E7 abdecken. Die Verwendung langer Peptide hat den Vorteil, dass diese nicht direkt auf die Oberfläche von suboptimal antigenpräsentierenden Zellen geladen werden können, sondern dass ihre Präsentation wahrscheinlich von der Aufnahme durch dendritische Zellen abhängt; dadurch werden Toleranz- und Fratrid-Mechanismen umgangen (Melief und van der Burg, 2008). Zudem werden theoretisch alle T-Zellepitope der beiden Onkoproteine durch die Vakzinierung abgedeckt, ohne dass diese im Detail bekannt sein müssen; dies ist bei der Kürze der Proteine (158 bzw. 98 Aminosäuren) mit nur 13 Peptiden erreichbar. Nach therapeutischer Vakzinierung von Patientinnen mit HPV-16-positiven intraepithelialen Neoplasien der Vulva wurde bei rund der Hälfte der 20 Patientinnen eine Vollremission beobachtet; die retrospektive Spontanremissionsrate betrug nur 1.5% (Kenter et al., 2009). Eine Vollremission war assoziiert mit kleinerer Läsion, der Erzeugung IFN- γ -produzierender spezifischer T-Zellen und verringerter Induktion regulatorischer T-Zellen (Welters et al., 2010). Die HPV-16-E6/E7-Peptidvakzine wurde auch bei Patientinnen mit intraepithelialer Zervix-Neoplasie (de Vos van Steenwijk et al., 2014) und fortgeschrittenem Zervixkarzinom (van Poelgeest et al., 2013) klinisch getestet; in diesen Studien ergab sich bislang kein Hinweis auf eine Veränderung des Krankheitsverlaufs, jedoch wurden HPV-16-spezifische T-Zellen induziert. Die Epitopspezifitäten und HLA-Restriktionen der induzierten T-Zellen sind nicht im Detail bekannt. Ihre Untersuchung könnte möglicherweise aufschlussreiche Hinweise zum Wirkmechanismus der Vakzine geben und zu ihrer Optimierung beitragen.

8. Referenzen

- Ablasser, A., Bauernfeind, F., Hartmann, G., Latz, E., Fitzgerald, K. A., and Hornung, V. (2009). RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate. *Nat Immunol* 10, 1065-1072.
- Adams, M. J., and Carstens, E. B. (2012). Ratification vote on taxonomic proposals to the International Committee on Taxonomy of Viruses (2012). *Arch Virol* 157, 1411-1422.
- Adhikary, D., Behrends, U., Moosmann, A., Witter, K., Bornkamm, G. W., and Mautner, J. (2006). Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med* 203, 995-1006.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y., and Fruh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 10990-10995.
- Albanese, M., Tagawa, T., Bouvet, M., Maliqi, L., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., Martin, L., Moosmann, A., and Hammerschmidt, W. (2016). Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E6467-E6475.
- Alp, N. J., Allport, T. D., Van Zanten, J., Rodgers, B., Sissons, J. G., and Borysiewicz, L. K. (1991). Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early 1 protein. *J Virol* 65, 4812-4820.
- Ameres, S., Besold, K., Plachter, B., and Moosmann, A. (2014). CD8 T cell-evasive functions of human cytomegalovirus display pervasive MHC allele specificity, complementarity, and cooperativity. *J Immunol* 192, 5894-5905.
- Ameres, S., Liang, X., Wiesner, M., Mautner, J., and Moosmann, A. (2015). A Diverse Repertoire of CD4 T Cells Targets the Immediate-Early 1 Protein of Human Cytomegalovirus. *Front Immunol* 6, 598.
- Ameres, S., Mautner, J., Schlott, F., Neuenhahn, M., Busch, D. H., Plachter, B., and Moosmann, A. (2013). Presentation of an immunodominant immediate-early CD8+ T cell epitope resists human cytomegalovirus immunoevasion. *PLoS Pathog* 9, e1003383.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S., and Vivier, E. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25, 331-342.
- Apolloni, A., Moss, D., Stumm, R., Burrows, S., Suhrbier, A., Misko, I., Schmidt, C., and Sculley, T. (1992). Sequence variation of cytotoxic T cell epitopes in different isolates of Epstein-Barr virus. *Eur J Immunol* 22, 183-189.
- Banchereau, J., de Paoli, P., Vallé, A., Garcia, E., and Rousset, F. (1991). Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* 251, 70-72.
- Barel, M. T., Pizzato, N., van Leeuwen, D., Bouteiller, P. L., Wiertz, E. J., and Lenfant, F. (2003). Amino acid composition of alpha1/alpha2 domains and cytoplasmic tail of MHC class I molecules determine their susceptibility to human cytomegalovirus US11-mediated down-regulation. *Eur J Immunol* 33, 1707-1716.
- Barel, M. T., Rensing, M., Pizzato, N., van Leeuwen, D., Le Bouteiller, P., Lenfant, F., and Wiertz, E. J. (2003). Human cytomegalovirus-encoded US2 differentially affects surface expression of MHC class I locus products and targets membrane-bound, but not soluble HLA-G1 for degradation. *J Immunol* 171, 6757-6765.
- Becerra, A., Gibson, L., Stern, L. J., and Calvo-Calle, J. M. (2014). Immune response to HHV-6 and implications for immunotherapy. *Curr Opin Virol* 9, 154-161.
- Besold, K., Wills, M., and Plachter, B. (2009). Immune evasion proteins gpUS2 and gpUS11 of human cytomegalovirus incompletely protect infected cells from CD8 T cell recognition. *Virology* 391, 5-19.

- Bhaduri-McIntosh, S., Rotenberg, M. J., Gardner, B., Robert, M., and Miller, G. (2008). Repertoire and frequency of immune cells reactive to Epstein-Barr virus-derived autologous lymphoblastoid cell lines. *Blood* *111*, 1334-1343.
- Boeckh, M., and Geballe, A. P. (2011). Cytomegalovirus: pathogen, paradigm, and puzzle. *J Clin Invest* *121*, 1673-1680.
- Boeckh, M., Leisenring, W., Riddell, S. R., Bowden, R. A., Huang, M. L., Myerson, D., Stevens-Ayers, T., Flowers, M. E., Cunningham, T., and Corey, L. (2003). Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* *101*, 407-414.
- Boeckh, M., Murphy, W. J., and Peggs, K. S. (2015). Recent advances in cytomegalovirus: an update on pharmacologic and cellular therapies. *Biol Blood Marrow Transplant* *21*, 24-29.
- Borysiewicz, L. K., Hickling, J. K., Graham, S., Sinclair, J., Cranage, M. P., Smith, G. L., and Sissons, J. G. (1988). Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med* *168*, 919-931.
- Braendstrup, P., Mortensen, B. K., Justesen, S., Osterby, T., Rasmussen, M., Hansen, A. M., Christiansen, C. B., Hansen, M. B., Nielsen, M., Vindeløv, L., Buus, S., and Stryhn, A. (2014). Identification and HLA-tetramer-validation of human CD4+ and CD8+ T cell responses against HCMV proteins IE1 and IE2. *PLoS One* *9*, e94892.
- Brielse, M., Mautner, J., Laux, G., and Hammerschmidt, W. (1996). The latent membrane protein 2 gene of Epstein-Barr virus is important for efficient B cell immortalization. *J Gen Virol* *77*, 2807-2818.
- Brook, I. (2005). The association of anaerobic bacteria with infectious mononucleosis. *Anaerobe* *11*, 308-311.
- Bunde, T., Kirchner, A., Hoffmeister, B., Habedank, D., Hetzer, R., Cherepnev, G., Proesch, S., Reinke, P., Volk, H. D., Lehmkühl, H., and Kern, F. (2005). Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med* *201*, 1031-1036.
- Burrows, S. R., Rodda, S. J., Suhrbier, A., Geysen, H. M., and Moss, D. J. (1992). The specificity of recognition of a cytotoxic T lymphocyte epitope. *Eur J Immunol* *22*, 191-195.
- Burrows, S. R., Sculley, T. B., Misko, I. S., Schmidt, C., and Moss, D. J. (1990). An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell epitope in EBV nuclear antigen 3 (EBNA 3). *J Exp Med* *171*, 345-349.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., and Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus *In vivo*. *J Exp Med* *187*, 1395-1402.
- Cassell, D. J., and Schwartz, R. H. (1994). A quantitative analysis of antigen-presenting cell function: activated B cells stimulate naive CD4 T cells but are inferior to dendritic cells in providing costimulation. *J Exp Med* *180*, 1829-1840.
- Chalandon, Y., Degermann, S., Villard, J., Arlettaz, L., Kaiser, L., Vischer, S., Walter, S., Heemskerk, M. H., van Lier, R. A., Helg, C., Chapuis, B., and Roosnek, E. (2006). Pretransplantation CMV-specific T cells protect recipients of T-cell-depleted grafts against CMV-related complications. *Blood* *107*, 389-396.
- Cobbold, M., Khan, N., Pourgheysari, B., Tauro, S., McDonald, D., Osman, H., Assenmacher, M., Billingham, L., Steward, C., Crawley, C., Olavarria, E., Goldman, J., Chakraverty, R., Mahendra, P., Craddock, C., and Moss, P. A. (2005). Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* *202*, 379-386.
- Crough, T., and Khanna, R. (2009). Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev* *22*, 76-98.

- Cwynarski, K., Ainsworth, J., Cobbold, M., Wagner, S., Mahendra, P., Apperley, J., Goldman, J., Craddock, C., and Moss, P. A. (2001). Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 97, 1232-1240.
- De Bolle, L., Naesens, L., and De Clercq, E. (2005). Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clin Microbiol Rev* 18, 217-245.
- de Vos van Steenwijk, P. J., van Poelgeest, M. I., Ramwadhoebe, T. H., Löwik, M. J., Berends-van der Meer, D. M., van der Minne, C. E., Loof, N. M., Stynenbosch, L. F., Fathallah, L. M., Valentijn, A. R., Oostendorp, J., Osse, E. M., Fleuren, G. J., Nooij, L., Kagie, M. J., Hellebrekers, B. W., Melief, C. J., Welters, M. J., van der Burg, S. H., and Kenter, G. G. (2014). The long-term immune response after HPV16 peptide vaccination in women with low-grade pre-malignant disorders of the uterine cervix: a placebo-controlled phase II study. *Cancer Immunol Immunother* 63, 147-160.
- Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C., and Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5188-5193.
- Dollard, S. C., Grosse, S. D., and Ross, D. S. (2007). New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. *Rev Med Virol* 17, 355-363.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G., and Hebart, H. (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-3922.
- Elkington, R., Walker, S., Crough, T., Menzies, M., Tellam, J., Bharadwaj, M., and Khanna, R. (2003). Ex vivo profiling of CD8⁺-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol* 77, 5226-5240.
- Elkington, R., and Khanna, R. (2005). Cross-recognition of human alloantigen by cytomegalovirus glycoprotein-specific CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes: implications for graft-versus-host disease. *Blood* 105, 1362-1364.
- Evans, E. M., Man, S., Evans, A. S., and Borysiewicz, L. K. (1997). Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* 57, 2943-2950.
- Evans, M., Borysiewicz, L. K., Evans, A. S., Rowe, M., Jones, M., Gileadi, U., Cerundolo, V., and Man, S. (2001). Antigen processing defects in cervical carcinomas limit the presentation of a CTL epitope from human papillomavirus 16 E6. *J Immunol* 167, 5420-5428.
- Feuchtinger, T., Matthes-Martin, S., Richard, C., Lion, T., Fuhrer, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Peters, C., Schuster, F. R., Beck, R., Schumm, M., Lotfi, R., Jahn, G., and Lang, P. (2006). Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 134, 64-76.
- Feuchtinger, T., Opherk, K., Bethge, W. A., Topp, M. S., Schuster, F. R., Weissinger, E. M., Mohty, M., Or, R., Maschan, M., Schumm, M., Hamprecht, K., Handgretinger, R., Lang, P., and Einsele, H. (2010). Adoptive transfer of pp65-specific T cells for the treatment of chemorefractory cytomegalovirus disease or reactivation after haploidentical and matched unrelated stem cell transplantation. *Blood* 116, 4360-4367.
- Feuchtinger, T., Richard, C., Joachim, S., Scheible, M. H., Schumm, M., Hamprecht, K., Martin, D., Jahn, G., Handgretinger, R., and Lang, P. (2008). Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother* 31, 199-206.
- Flamand, L., Gosselin, J., Stefanescu, I., Ablashi, D., and Menezes, J. (1995). Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* 85, 1263-1271.

- Garrone, P., Neidhardt, E. M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C., and Banchereau, J. (1995). Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* *182*, 1265-1273.
- Gavin, M. A., Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Greenberg, P. D., and Bevan, M. J. (1993). Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC-restricted CTL epitopes. *J Immunol* *151*, 3971-3980.
- Gerdemann, U., Keukens, L., Keirnan, J. M., Katari, U. L., Nguyen, C. T., de Pagter, A. P., Ramos, C. A., Kennedy-Nasser, A., Gottschalk, S. M., Heslop, H. E., Brenner, M. K., Rooney, C. M., and Leen, A. M. (2013). Immunotherapeutic strategies to prevent and treat human herpesvirus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* *121*, 207-218.
- Gilham, D. E., Anderson, J., Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Exley, M. A., Stauss, H., Maher, J., Pule, M., Sewell, A. K., Bendle, G., Lee, S., Qasim, W., Thrasher, A., and Morris, E. (2015). Adoptive T-cell therapy for cancer in the United Kingdom: a review of activity for the British Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2015. *Hum Gene Ther* *26*, 276-285.
- Gordon, C. L., Miron, M., Thome, J. J., Matsuoka, N., Weiner, J., Rak, M. A., Igarashi, S., Granot, T., Lerner, H., Goodrum, F., and Farber, D. L. (2017). Tissue reservoirs of antiviral T cell immunity in persistent human CMV infection. *J Exp Med* *214*, 651-667.
- Gottschalk, S., Rooney, C. M., and Heslop, H. E. (2005). Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Med* *56*, 29-44.
- Gratama, J. W., van Esser, J. W., Lamers, C. H., Tournay, C., Löwenberg, B., Bolhuis, R. L., and Cornelissen, J. J. (2001). Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* *98*, 1358-1364.
- Grob, J. P., Grundy, J. E., Prentice, H. G., Griffiths, P. D., Hoffbrand, A. V., Hughes, M. D., Tate, T., Wimperis, J. Z., and Brenner, M. K. (1987). Immune donors can protect marrow-transplant recipients from severe cytomegalovirus infections. *Lancet* *1*, 774-776.
- Gudgeon, N. H., Taylor, G. S., Long, H. M., Haigh, T. A., and 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*, 5477-5488.
- Gumá, M., Angulo, A., Vilches, C., Gómez-Lozano, N., Malats, N., and López-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* *104*, 3664-3671.
- Halawi, M., Khan, N., and Blake, N. (2015). Identification of novel CD8+ T cell epitopes in human herpesvirus 6B U11 and U90. *Immun Inflamm Dis* *3*, 118-131.
- Hanley, P. J., Cruz, C. R., Savoldo, B., Leen, A. M., Stanojevic, M., Khalil, M., Decker, W., Mouldrem, J. J., Liu, H., Gee, A. P., Rooney, C. M., Heslop, H. E., Dotti, G., Brenner, M. K., Shpall, E. J., and Bollard, C. M. (2009). Functionally active virus-specific T cells that target CMV, adenovirus, and EBV can be expanded from naïve T-cell populations in cord blood and will target a range of viral epitopes. *Blood* *114*, 1958-1967.
- Hanley, P. J., Melenhorst, J. J., Nikiforow, S., Scheinberg, P., Blaney, J. W., Demmler-Harrison, G., Cruz, C. R., Lam, S., Krance, R. A., Leung, K. S., Martinez, C. A., Liu, H., Douek, D. C., Heslop, H. E., Rooney, C. M., Shpall, E. J., Barrett, A. J., Rodgers, J. R., and Bollard, C. M. (2015). CMV-specific T cells generated from naïve T cells recognize atypical epitopes and may be protective in vivo. *Sci Transl Med* *7*, 285ra63.
- Hansen, S. G., Powers, C. J., Richards, R., Ventura, A. B., Ford, J. C., Siess, D., Axthelm, M. K., Nelson, J. A., Jarvis, M. A., Picker, L. J., and Fruh, K. (2010). Evasion of CD8+ T cells is critical for superinfection by cytomegalovirus. *Science* *328*, 102-106.
- Hartmann, G., and Krieg, A. M. (2000). Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* *164*, 944-953.
- Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* *37*, 614-636.

- Hayglass, K. T., Naides, S. J., Scott, C. F., Benacerraf, B., and Sy, M. S. (1986). T cell development in B cell-deficient mice. IV. The role of B cells as antigen-presenting cells in vivo. *J Immunol* *136*, 823-829.
- Heemskerk, M. H., Hagedoorn, R. S., van der Hoorn, M. A., van der Veken, L. T., Hoogeboom, M., Kester, M. G., Willemze, R., and Falkenburg, J. H. (2007). Efficiency of T-cell receptor expression in dual-specific T cells is controlled by the intrinsic qualities of the TCR chains within the TCR-CD3 complex. *Blood* *109*, 235-243.
- Hengel, H., Koopmann, J. O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G. J., Koszinowski, U. H., and Momburg, F. (1997). A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity* *6*, 623-632.
- Heslop, H. E. (2009). How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* *114*, 4002-4008.
- Heslop, H. E., Slobod, K. S., Pule, M. A., Hale, G. A., Rousseau, A., Smith, C. A., Bollard, C. M., Liu, H., Wu, M. F., Rochester, R. J., Amrolia, P. J., Hurwitz, J. L., Brenner, M. K., and Rooney, C. M. (2010). Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* *115*, 925-935.
- Hesse, J., Ameres, S., Besold, K., Krauter, S., Moosmann, A., and Plachter, B. (2013). Suppression of CD8+ T-cell recognition in the immediate-early phase of human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* *94*, 376-386.
- Hill, J. A., and Zerr, D. M. (2014). Roseoloviruses in transplant recipients: clinical consequences and prospects for treatment and prevention trials. *Curr Opin Virol* *9*, 53-60.
- Hislop, A. D., Rensing, M. E., van Leeuwen, D., Pudney, V. A., Horst, D., Koppers-Lalic, D., Croft, N. P., Neefjes, J. J., Rickinson, A. B., and Wiertz, E. J. (2007a). A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J Exp Med* *204*, 1863-1873.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., and Rickinson, A. B. (2007b). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* *25*, 587-617.
- Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdörfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G. (2002). Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* *168*, 4531-4537.
- Horvat, R. T., Parmely, M. J., and Chandran, B. (1993). Human herpesvirus 6 inhibits the proliferative responses of human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* *167*, 1274-1280.
- Iampietro, M., Morissette, G., Gravel, A., Dubuc, I., Rousseau, M., Hasan, A., O'Reilly, R. J., and Flamand, L. (2014). Human herpesvirus 6B immediate-early I protein contains functional HLA-A*02, HLA-A*03, and HLA-B*07 class I restricted CD8(+) T-cell epitopes. *Eur J Immunol* *44*, 3573-3584.
- Icheva, V., Kayser, S., Wolff, D., Tuve, S., Kyzirakos, C., Bethge, W., Greil, J., Albert, M. H., Schwinger, W., Nathrath, M., Schumm, M., Stevanovic, S., Handgretinger, R., Lang, P., and Feuchtinger, T. (2013). Adoptive transfer of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 1-specific T cells as treatment for EBV reactivation and lymphoproliferative disorders after allogeneic stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* *31*, 39-48.
- Iskra, S., Kalla, M., Delecluse, H. J., Hammerschmidt, W., and Moosmann, A. (2010). Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by Epstein-Barr virus. *J Virol* *84*, 3612-3623.
- Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K., and Takada, K. (2009). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* *206*, 2091-2099.
- Janeway, C. A., Ron, J., and Katz, M. E. (1987). The B cell is the initiating antigen-presenting cell in peripheral lymph nodes. *J Immunol* *138*, 1051-1055.

- Jochum, S., Moosmann, A., Lang, S., Hammerschmidt, W., and Zeidler, R. (2012). The EBV immunoevasins vIL-10 and BNLF2a protect newly infected B cells from immune recognition and elimination. *PLoS Pathog* 8, e1002704.
- Jones, T. R., Wiertz, E. J., Sun, L., Fish, K. N., Nelson, J. A., and Ploegh, H. L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11327-11333.
- Joseph, A. M., Babcock, G. J., and Thorley-Lawson, D. A. (2000). Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils. *J Virol* 74, 9964-9971.
- Karpanen, T., and Olweus, J. (2015). T-cell receptor gene therapy--ready to go viral. *Mol Oncol* 9, 2019-2042.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., and Hammerschmidt, W. (1995). immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5875-5879.
- Kenneson, A., and Cannon, M. J. (2007). Review and meta-analysis of the epidemiology of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. *Rev Med Virol* 17, 253-276.
- Kenter, G. G., Welters, M. J., Valentijn, A. R., Lowik, M. J., Berends-van der Meer, D. M., Vloon, A. P., Essahsah, F., Fathors, L. M., Offringa, R., Drijfhout, J. W., Wafelman, A. R., Oostendorp, J., Fleuren, G. J., van der Burg, S. H., and Melief, C. J. (2009). Vaccination against HPV-16 oncoproteins for vulvar intraepithelial neoplasia. *N Engl J Med* 361, 1838-1847.
- Kern, F., Sural, I. P., Faulhaber, N., Frommel, C., Schneider-Mergener, J., Schonemann, C., Reinke, P., and Volk, H. D. (1999). Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* 73, 8179-8184.
- Khan, N. (2007). The immunological burden of human cytomegalovirus infection. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 55, 299-308.
- Khan, N., Best, D., Bruton, R., Nayak, L., Rickinson, A. B., and Moss, P. A. (2007). T cell recognition patterns of immunodominant cytomegalovirus antigens in primary and persistent infection. *J Immunol* 178, 4455-4465.
- Khan, N., Bruton, R., Taylor, G. S., Cobbold, M., Jones, T. R., Rickinson, A. B., and Moss, P. A. (2005). Identification of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro is greatly enhanced by the use of recombinant virus lacking the US2 to US11 region or modified vaccinia virus Ankara expressing individual viral genes. *J Virol* 79, 2869-2879.
- Khanna, R., Bell, S., Sherritt, M., Galbraith, A., Burrows, S. R., Rafter, L., Clarke, B., Slaughter, R., Falk, M. C., Douglass, J., Williams, T., Elliott, S. L., and Moss, D. J. (1999). Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10391-10396.
- Khattab, B. A., Lindenmaier, W., Frank, R., and Link, H. (1997). Three T-cell epitopes within the C-terminal 265 amino acids of the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus recognized by human lymphocytes. *J Med Virol* 52, 68-76.
- Kleindienst, P., and Brocker, T. (2005). Concerted antigen presentation by dendritic cells and B cells is necessary for optimal CD4 T-cell immunity in vivo. *Immunology* 115, 556-564.
- Koning, D., Costa, A. I., Hoof, I., Miles, J. J., Nanlohy, N. M., Ladell, K., Matthews, K. K., Venturi, V., Schellens, I. M., Borghans, J. A., Kesmir, C., Price, D. A., and van Baarle, D. (2013). CD8+ TCR repertoire formation is guided primarily by the peptide component of the antigenic complex. *J Immunol* 190, 931-939.
- Kroeger, D. R., Rudulier, C. D., and Bretscher, P. A. (2013). Antigen presenting B cells facilitate CD4 T cell cooperation resulting in enhanced generation of effector and memory CD4 T cells. *PLoS One* 8, e77346.
- Kruschinski, A., Moosmann, A., Poschke, I., Norell, H., Chmielewski, M., Seliger, B., Kiessling, R., Blankenstein, T., Abken, H., and Charo, J. (2008). Engineering antigen-specific primary

- human NK cells against HER-2 positive carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 17481-17486.
- Küppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* *3*, 801-812.
- Kurth, J., Spieker, T., Wustrow, J., Strickler, G. J., Hansmann, L. M., Rajewsky, K., and Küppers, R. (2000). EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* *13*, 485-495.
- Landgren, O., Gilbert, E. S., Rizzo, J. D., Socié, 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., and Curtis, R. E. (2009). Risk factors for lymphoproliferative disorders after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* *113*, 4992-5001.
- Lehner, P. J., Karttunen, J. T., Wilkinson, G. W., and Cresswell, P. (1997). The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 6904-6909.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P. M., Klein, G., Kurilla, M. G., and Masucci, M. G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* *375*, 685-688.
- Li Pira, G., Bottone, L., Ivaldi, F., Pelizzoli, R., Del Galdo, F., Lozzi, L., Bracci, L., Loregian, A., Palù, G., De Palma, R., Einsele, H., and Manca, F. (2004). Identification of new Th peptides from the cytomegalovirus protein pp65 to design a peptide library for generation of CD4 T cell lines for cellular immunoreconstitution. *Int Immunol* *16*, 635-642.
- Ljungman, P., Brand, R., Einsele, H., Frassoni, F., Niederwieser, D., and Cordonnier, C. (2003). Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* *102*, 4255-4260.
- Long, H. M., Haigh, T. A., Gudgeon, N. H., Leen, A. M., Tsang, C. W., Brooks, J., Landais, E., Houssaint, E., Lee, S. P., Rickinson, A. B., and Taylor, G. S. (2005). CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Virol* *79*, 4896-4907.
- Longnecker, R., Miller, C. L., Miao, X. Q., Marchini, A., and Kieff, E. (1992). The only domain which distinguishes Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A (LMP2A) from LMP2B is dispensable for lymphocyte infection and growth transformation in vitro; LMP2A is therefore nonessential. *J Virol* *66*, 6461-6469.
- Lopez-Vergès, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., Houchins, J. P., Miller, S., Kang, S. M., Norris, P. J., Nixon, D. F., and Lanier, L. L. (2011). Expansion of a unique CD57⁺NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 14725-14732.
- Lusso, P. (2006). HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *J Clin Virol* *37 Suppl 1*, S4-10.
- Lusso, P., Malnati, M., De Maria, A., Balotta, C., DeRocco, S. E., Markham, P. D., and Gallo, R. C. (1991). Productive infection of CD4⁺ and CD8⁺ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol* *147*, 685-691.
- Luzuriaga, K., and Sullivan, J. L. (2010). Infectious mononucleosis. *N Engl J Med* *362*, 1993-2000.
- Mancao, C., and Hammerschmidt, W. (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* *110*, 3715-3721.
- Manley, T. J., Luy, L., Jones, T., Boeckh, M., Mutimer, H., and Riddell, S. R. (2004). Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8⁺ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood* *104*, 1075-1082.
- Martens, U. M., Brass, V., Sedlacek, L., Pantic, M., Exner, C., Guo, Y., Engelhardt, M., Lansdorp, P. M., Waller, C. F., and Lange, W. (2002). Telomere maintenance in human B lymphocytes. *Br J Haematol* *119*, 810-818.

- Martin, L. K., Schub, A., Dillinger, S., and Moosmann, A. (2012). Specific CD8(+) T cells recognize human herpesvirus 6B. *Eur J Immunol* 42, 2901-2912.
- Melief, C. J., and van der Burg, S. H. (2008). Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines. *Nat Rev Cancer* 8, 351-360.
- Mesri, E. A., Feitelson, M. A., and Munger, K. (2014). Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 15, 266-282.
- Milosevic, S., Behrends, U., Adhikary, D., and Mautner, J. (2006). Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach. *J Virol* 80, 10357-10364.
- 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., and Kolb, H. J. (2010). Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 115, 2960-2970.
- Moosmann, A., Hammerschmidt, W., and Kolb, H. J. (2012). Virus-specific T cells for therapy – approaches, problems, solutions. *Eur J Cell Biol* 91, 97-101.
- Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H. J., Hollweck, G., Hislop, A. D., Blake, N. W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., Moss, P. A., Zeidler, R., Rickinson, A. B., and Hammerschmidt, W. (2002). B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* 100, 1755-1764.
- Morgan, R. A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., Gros, A., Robbins, P. F., Zheng, Z., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Phan, G. Q., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Miller, A. D., Hessman, C. J., Stewart, A. A., Restifo, N. P., Quezado, M. M., Alimchandani, M., Rosenberg, A. Z., Nath, A., Wang, T., Bielekova, B., Wuest, S. C., Akula, N., McMahon, F. J., Wilde, S., Mosetter, B., Schendel, D. J., Laurencot, C. M., and Rosenberg, S. A. (2013). Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *J Immunother* 36, 133-151.
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., Zheng, Z., Nahvi, A., de Vries, C. R., Rogers-Freezer, L. J., Mavroukakis, S. A., and Rosenberg, S. A. (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* 314, 126-129.
- Nastke, M. D., Becerra, A., Yin, L., Dominguez-Amorocho, O., Gibson, L., Stern, L. J., and Calvo-Calle, J. M. (2012). Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *J Virol* 86, 4776-4792.
- Neuenhahn, M., Albrecht, J., Odendahl, M., Schlott, F., Dössinger, G., Schiemann, M., Lakshminpathi, S., Martin, K., Bunjes, D., Harsdorf, S., Weissinger, E. M., Menzel, H., Verbeek, M., Uharek, L., Kröger, N., Wagner, E., Kobbe, G., Schroeder, T., Schmitt, M., Held, G., Herr, W., Germeroth, L., Bonig, H., Tonn, T., Einsele, H., Busch, D. H., and Grigoleit, G. U. (2017). Transfer of minimally manipulated CMV-specific T cells from stem cell or third-party donors to treat CMV infection after allo-HSCT. *Leukemia*
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., and Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33, 1250-1259.
- Ogata, M., Satou, T., Inoue, Y., Takano, K., Ikebe, T., Ando, T., Ikewaki, J., Kohno, K., Nishida, A., Saburi, M., Miyazaki, Y., Ohtsuka, E., Saburi, Y., Fukuda, T., and Kadota, J. (2013). Foscarnet against human herpesvirus (HHV)-6 reactivation after allo-SCT: breakthrough HHV-6 encephalitis following antiviral prophylaxis. *Bone Marrow Transplant* 48, 257-264.
- Panikkar, A., Smith, C., Hislop, A., Tellam, N., Dasari, V., Hogquist, K. A., Wykes, M., Moss, D. J., Rickinson, A., Balfour, H. H., and Khanna, R. (2015). Impaired Epstein-Barr Virus-Specific Neutralizing Antibody Response during Acute Infectious Mononucleosis Is Coincident with Global B-Cell Dysfunction. *J Virol* 89, 9137-9141.
- Papadopoulos, E. B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M. H., Castro-Malaspina, H., Childs, B. H., Gillio, A. P., and Small, T. N. (1994). Infusions of donor

leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 330, 1185-1191.

Papadopoulou, A., Gerdemann, U., Katari, U. L., Tzannou, I., Liu, H., Martinez, C., Leung, K., Carrum, G., Gee, A. P., Vera, J. F., Krance, R. A., Brenner, M. K., Rooney, C. M., Heslop, H. E., and Leen, A. M. (2014). Activity of broad-spectrum T cells as treatment for AdV, EBV, CMV, BKV, and HHV6 infections after HSCT. *Sci Transl Med* 6, 242ra83.

Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol* 5, 201-214.

Peggs, K., Verfuërth, S., and Mackinnon, S. (2001). Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood* 97, 994-1000.

Peggs, K. S., Verfuërth, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P. A., and Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 362, 1375-1377.

Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M. E., Merville, P., Moreau, J. F., and Déchanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* 112, 1317-1324.

Portis, T., Dyck, P., and Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 102, 4166-4178.

Rancan, C., Schirrmann, L., Hüls, C., Zeidler, R., and Moosmann, A. (2015). Latent Membrane Protein LMP2A Impairs Recognition of EBV-Infected Cells by CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* 11, e1004906.

Rapoport, A. P., Stadtmauer, E. A., Binder-Scholl, G. K., Goloubeva, O., Vogl, D. T., Lacey, S. F., Badros, A. Z., Garfall, A., Weiss, B., Finklestein, J., Kulikovskaya, I., Sinha, S. K., Kronsberg, S., Gupta, M., Bond, S., Melchiori, L., Brewer, J. E., Bennett, A. D., Gerry, A. B., Pumphrey, N. J., Williams, D., Tayton-Martin, H. K., Ribeiro, L., Holdich, T., Yanovich, S., Hardy, N., Yared, J., Kerr, N., Philip, S., Westphal, S., Siegel, D. L., Levine, B. L., Jakobsen, B. K., Kalos, M., and June, C. H. (2015). NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21, 914-921.

Reddehase, M. J. (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2, 831-844.

Reddehase, M. J., Mutter, W., Munch, K., Buhning, H. J., and Koszinowski, U. H. (1987). CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 61, 3102-3108.

Reeves, M., and Sinclair, J. (2008). Aspects of human cytomegalovirus latency and reactivation. *Curr Top Microbiol Immunol* 325, 297-313.

Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J., and Kast, W. M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* 154, 5934-5943.

Ressing, M. E., van Gent, M., Gram, A. M., Hooykaas, M. J., Piersma, S. J., and Wiertz, E. J. (2015). Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 391, 355-381.

Reusser, P., Riddell, S. R., Meyers, J. D., and Greenberg, P. D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78, 1373-1380.

Rickinson, A. B., Long, H. M., Palendira, U., Münz, C., and Hislop, A. D. (2014). Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol* 35, 159-169.

Riddell, S. R., Rabin, M., Geballe, A. P., Britt, W. J., and Greenberg, P. D. (1991). Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* 146, 2795-2804.

- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., and Greenberg, P. D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241.
- Riemer, A. B., Keskin, D. B., Zhang, G., Handley, M., Anderson, K. S., Brusic, V., Reinhold, B., and Reinherz, E. L. (2010). A conserved E7-derived cytotoxic T lymphocyte epitope expressed on human papillomavirus 16-transformed HLA-A2+ epithelial cancers. *J Biol Chem* 285, 29608-29622.
- Robbins, P. F., Kassim, S. H., Tran, T. L., Crystal, J. S., Morgan, R. A., Feldman, S. A., Yang, J. C., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Restifo, N. P., Raffeld, M., Lee, C. C., Li, Y. F., El-Gamil, M., and Rosenberg, S. A. (2015). A pilot trial using lymphocytes genetically engineered with an NY-ESO-1-reactive T-cell receptor: long-term follow-up and correlates with response. *Clin Cancer Res* 21, 1019-1027.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S., Li, C., Krance, R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E. (1995). Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345, 9-13.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Srivastava, D. K., Bowman, L. C., Krance, R. A., Brenner, M. K., and Heslop, H. E. (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-1555.
- Röttschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., and Rammensee, H. G. (1990). Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature* 348, 252-254.
- Rowe, M., Lear, A. L., Croom-Carter, D., Davies, A. H., and Rickinson, A. B. (1992). Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 66, 122-131.
- Ruprecht, C. R., and Lanzavecchia, A. (2006). Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol* 36, 810-816.
- Sacre, K., Nguyen, S., Deback, C., Carcelain, G., Vernant, J. P., Leblond, V., Autran, B., and Dhedin, N. (2008). Expansion of human cytomegalovirus (HCMV) immediate-early 1-specific CD8+ T cells and control of HCMV replication after allogeneic stem cell transplantation. *J Virol* 82, 10143-10152.
- Salahuddin, S. Z., Ablashi, D. V., Markham, P. D., Josephs, S. F., Sturzenegger, S., Kaplan, M., Halligan, G., Biberfeld, P., Wong-Staal, F., Kramarsky, B., and et, A. (1986). Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* 234, 596-601.
- Schirmer, E. C., Wyatt, L. S., Yamanishi, K., Rodriguez, W. J., and Frenkel, N. (1991). Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5922-5926.
- Schmidt, A. H., Baier, D., Solloch, U. V., Stahr, A., Cereb, N., Wassmuth, R., Ehninger, G., and Rutt, C. (2009). Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol* 70, 895-902.
- Schreurs, M. W., Scholten, K. B., Kueter, E. W., Ruizendaal, J. J., Meijer, C. J., and Hooijberg, E. (2003). In vitro generation and life span extension of human papillomavirus type 16-specific, healthy donor-derived CTL clones. *J Immunol* 171, 2912-2921.
- Schub, A., Schuster, I. G., Hammerschmidt, W., and Moosmann, A. (2009). CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy. *J Immunol* 183, 6819-6830.
- Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G., and Nadler, L. M. (1997). CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* 100, 2757-2765.

- Seto, E., Moosmann, A., Grömminger, S., Walz, N., Grundhoff, A., and Hammerschmidt, W. (2010). Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoS Pathog* 6, e1001063.
- Slezak, S. L., Bettinotti, M., Selleri, S., Adams, S., Marincola, F. M., and Stroncek, D. F. (2007). CMV pp65 and IE-1 T cell epitopes recognized by healthy subjects. *J Transl Med* 5, 17.
- Smith, C., Gras, S., Brennan, R. M., Bird, N. L., Valkenburg, S. A., Twist, K. A., Burrows, J. M., Miles, J. J., Chambers, D., Bell, S., Campbell, S., Kedzierska, K., Burrows, S. R., Rossjohn, J., and Khanna, R. (2014). Molecular imprint of exposure to naturally occurring genetic variants of human cytomegalovirus on the T cell repertoire. *Sci Rep* 4, 3993.
- Smith, C., and Khanna, R. (2013). Immune regulation of human herpesviruses and its implications for human transplantation. *Am J Transplant* 13 Suppl 3, 9-23; quiz 23.
- Smith, C., Wakisaka, N., Crough, T., Peet, J., Yoshizaki, T., Beagley, L., and Khanna, R. (2009). Discerning regulation of cis- and trans-presentation of CD8+ T-cell epitopes by EBV-encoded oncogene LMP-1 through self-aggregation. *Blood* 113, 6148-6152.
- Stenfors, L. E., and Räisänen, S. (1993). The membranous tonsillitis during infectious mononucleosis is nevertheless of bacterial origin. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 26, 149-155.
- Story, C. M., Furman, M. H., and Ploegh, H. L. (1999). The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8516-8521.
- Strowig, T., Gurer, C., Ploss, A., Liu, Y. F., Arrey, F., Sashihara, J., Koo, G., Rice, C. M., Young, J. W., Chadburn, A., Cohen, J. I., and Münz, C. (2009). Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J Exp Med* 206, 1423-1434.
- Sylwester, A., Nambiar, K. Z., Caserta, S., Klenerman, P., Picker, L. J., and Kern, F. (2016). A new perspective of the structural complexity of HCMV-specific T-cell responses. *Mech Ageing Dev* 158, 14-22.
- Sylwester, A. W., Mitchell, B. L., Edgar, J. B., Taormina, C., Pelte, C., Ruchti, F., Sleath, P. R., Grabstein, K. H., Hosken, N. A., Kern, F., Nelson, J. A., and Picker, L. J. (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med* 202, 673-685.
- Tagawa, T., Albanese, M., Bouvet, M., Moosmann, A., Mautner, J., Heissmeyer, V., Zielinski, C., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (2016). Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *J Exp Med* 213, 2065-2080.
- Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B., and Callan, M. F. (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 162, 1827-1835.
- Tattevin, P., Le Tulzo, Y., Minjolle, S., Person, A., Chaplain, J. M., Arvieux, C., Thomas, R., and Michelet, C. (2006). Increasing incidence of severe Epstein-Barr virus-related infectious mononucleosis: surveillance study. *J Clin Microbiol* 44, 1873-1874.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1, 75-82.
- Thorley-Lawson, D. A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* 350, 1328-1337.
- Thorley-Lawson, D. A., Hawkins, J. B., Tracy, S. I., and Shapiro, M. (2013). The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol* 3, 227-232.
- Tischer, J., Engel, N., Fritsch, S., Prevalsek, D., Hubmann, M., Schulz, C., Zoellner, A. K., Bücklein, V., Reibke, R., Mumm, F., Rieger, C. T., Hill, W., Ledderose, G., Stemmler, H. J., Köhnke, T., Jäger, G., Kolb, H. J., Schmid, C., Moosmann, A., and Hausmann, A. (2015). Virus infection in HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: incidence in the context of immune recovery in two different transplantation settings. *Ann Hematol* 94, 1677-1688.

Tormo, N., Solano, C., de la Cámara, R., Garcia-Noblejas, A., Cardeñoso, L., Clari, M. A., Nieto, J., López, J., Hernández-Boluda, J. C., Remigia, M. J., Benet, I., and Navarro, D. (2010). An assessment of the effect of human herpesvirus-6 replication on active cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 653-661.

Townsend, A. R., Rothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G., Wraith, D., and McMichael, A. J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44, 959-968.

Trappe, R. U., Dierickx, D., Zimmermann, H., Morschhauser, F., Mollee, P., Zaucha, J. M., Dreyling, M. H., Dührsen, U., Reinke, P., Verhoef, G., Subklewe, M., Hüttmann, A., Tousseyn, T., Salles, G., Kliem, V., Hauser, I. A., Tarella, C., Van Den Neste, E., Gheysens, O., Anagnostopoulos, I., Leblond, V., Riess, H., and Choquet, S. (2016). Response to Rituximab Induction Is a Predictive Marker in B-Cell Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder and Allows Successful Stratification Into Rituximab or R-CHOP Consolidation in an International, Prospective, Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol* JCO2016693564.

van der Veken, L. T., Hagedoorn, R. S., van Loenen, M. M., Willemze, R., Falkenburg, J. H., and Heemskerk, M. H. (2006). Alphabeta T-cell receptor engineered gammadelta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer Res* 66, 3331-3337.

van Lent, A. U., Nagasawa, M., van Loenen, M. M., Schotte, R., Schumacher, T. N., Heemskerk, M. H., Spits, H., and Legrand, N. (2007). Functional human antigen-specific T cells produced in vitro using retroviral T cell receptor transfer into hematopoietic progenitors. *J Immunol* 179, 4959-4968.

van Poelgeest, M. I., Welters, M. J., van Esch, E. M., Stynenbosch, L. F., Kerpershoek, G., van Persijn van Meerten, E. L., van den Hende, M., Löwik, M. J., Berends-van der Meer, D. M., Fathers, L. M., Valentijn, A. R., Oostendorp, J., Fleuren, G. J., Melief, C. J., Kenter, G. G., and van der Burg, S. H. (2013). HPV16 synthetic long peptide (HPV16-SLP) vaccination therapy of patients with advanced or recurrent HPV16-induced gynecological carcinoma, a phase II trial. *J Transl Med* 11, 88.

Virgin, H. W., Wherry, E. J., and Ahmed, R. (2009). Redefining chronic viral infection. *Cell* 138, 30-50.

von Bergwelt-Baildon, M. S., Vonderheide, R. H., Maecker, B., Hirano, N., Anderson, K. S., Butler, M. O., Xia, Z., Zeng, W. Y., Wucherpennig, K. W., Nadler, L. M., and Schultze, J. L. (2002). Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* 99, 3319-3325.

Vouloumanou, E. K., Rafailidis, P. I., and Falagas, M. E. (2012). Current diagnosis and management of infectious mononucleosis. *Curr Opin Hematol* 19, 14-20.

Wagner, M., Poeck, H., Jahrsdoerfer, B., Rothenfusser, S., Prell, D., Bohle, B., Tuma, E., Giese, T., Ellwart, J. W., Endres, S., and Hartmann, G. (2004). IL-12p70-dependent Th1 induction by human B cells requires combined activation with CD40 ligand and CpG DNA. *J Immunol* 172, 954-963.

Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., and Muñoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189, 12-19.

Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., and Riddell, S. R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333, 1038-1044.

Wang, F. Z., Linde, A., Dahl, H., and Ljungman, P. (1999). Human herpesvirus 6 infection inhibits specific lymphocyte proliferation responses and is related to lymphocytopenia after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 24, 1201-1206.

Welters, M. J., Kenter, G. G., de Vos van Steenwijk, P. J., Löwik, M. J., Berends-van der Meer, D. M., Essahsah, F., Stynenbosch, L. F., Vloon, A. P., Ramwadhoebe, T. H., Piersma, S. J., van der Hulst, J. M., Valentijn, A. R., Fathers, L. M., Drijfhout, J. W., Franken, K. L., Oostendorp,

- J., Fleuren, G. J., Melief, C. J., and van der Burg, S. H. (2010). Success or failure of vaccination for HPV16-positive vulvar lesions correlates with kinetics and phenotype of induced T-cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 11895-11899.
- Weng, N. P., Granger, L., and Hodes, R. J. (1997). Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 10827-10832.
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogoyo, M., Geuze, H. J., and Ploegh, H. L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* *84*, 769-779.
- Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogoyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., Rapoport, T. A., and Ploegh, H. L. (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* *384*, 432-438.
- Wiesner, M., Zentz, C., Hammer, M. H., Cobbold, M., Kern, F., Kolb, H. J., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., and Moosmann, A. (2005). Selection of CMV-specific CD8+ and CD4+ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines. *Eur J Immunol* *35*, 2110-2121.
- Wiesner, M., Zentz, C., Mayr, C., Wimmer, R., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., and Moosmann, A. (2008). Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PLoS One* *3*, e1464.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B., and Sissons, J. G. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* *70*, 7569-7579.
- Wroblewski, J. M., Copple, A., Batson, L. P., Landers, C. D., and Yannelli, J. R. (2002). Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *J Immunol Methods* *264*, 19-28.
- Yakushijin, Y., Yasukawa, M., and Kobayashi, Y. (1991). T-cell immune response to human herpesvirus-6 in healthy adults. *Microbiol Immunol* *35*, 655-660.
- Yakushijin, Y., Yasukawa, M., and Kobayashi, Y. (1992). Establishment and functional characterization of human herpesvirus 6-specific CD4+ human T-cell clones. *J Virol* *66*, 2773-2779.
- Yamanishi, K., Okuno, T., Shiraki, K., Takahashi, M., Kondo, T., Asano, Y., and Kurata, T. (1988). Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* *1*, 1065-1067.
- Yasukawa, M., Yakushijin, Y., Furukawa, M., and Fujita, S. (1993). Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. *J Virol* *67*, 6259-6264.
- Youde, S. J., Dunbar, P. R., Evans, E. M., Fiander, A. N., Borysiewicz, L. K., Cerundolo, V., and Man, S. (2000). Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res* *60*, 365-371.
- Youde, S. J., McCarthy, C. M., Thomas, K. J., Smith, K. L., and Man, S. (2005). Cross-typic specificity and immunotherapeutic potential of a human HPV16 E7-specific CTL line. *Int J Cancer* *114*, 606-612.
- Zentz, C., Wiesner, M., Man, S., Frankenberger, B., Wollenberg, B., Hillemanns, P., Zeidler, R., Hammerschmidt, W., and Moosmann, A. (2007). Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells. *Hum Immunol* *68*, 75-85.
- Zerr, D. M., Boeckh, M., Delaney, C., Martin, P. J., Xie, H., Adler, A. L., Huang, M. L., Corey, L., and Leisenring, W. M. (2012). HHV-6 reactivation and associated sequelae after hematopoietic cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* *18*, 1700-1708.
- Zerr, D. M., Corey, L., Kim, H. W., Huang, M. L., Nguy, L., and Boeckh, M. (2005). Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* *40*, 932-940.

9. Vollständiges Verzeichnis eigener Veröffentlichungen

Nach dem Stand vom 26. Mai 2017 liegen 32 Originalarbeiten vor, davon 2 als Erstautor und 10 als Letztautor. Ferner wurde ein Übersichtsartikel als Erstautor und ein Buchkapitel als Erstautor veröffentlicht.

Alle 11 in dieser Habilitationsschrift vorgestellten Originalarbeiten sind Erst- oder Letztautorarbeiten. Sie sind im Verzeichnis durch Randmarkierung gekennzeichnet.

Originalarbeiten als Erst- oder Letztautor

Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H. J., Hollweck, G., Hislop, A. D., Blake, N. W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., Moss, P. A., Zeidler, R., Rickinson, A. B., and Hammerschmidt, W. (2002). B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* 100, 1755-1764.

Wiesner, M., Zentz, C., Hammer, M. H., Cobbold, M., Kern, F., Kolb, H. J., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., and **Moosmann, A.** (2005). Selection of CMV-specific CD8+ and CD4+ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines. *Eur J Immunol* 35, 2110-2121.

Zentz, C., Wiesner, M., Man, S., Frankenberger, B., Wollenberg, B., Hillemanns, P., Zeidler, R., Hammerschmidt, W., and **Moosmann, A.** (2007). Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells. *Hum Immunol* 68, 75-85.

Wiesner, M., Zentz, C., Mayr, C., Wimmer, R., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., and **Moosmann, A.** (2008). Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PLoS One* 3, e1464.

Schub, A., Schuster, I. G., Hammerschmidt, W., and **Moosmann, A.** (2009). CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy. *J Immunol* 183, 6819-6830.

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., and Kolb, H. J. (2010). Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* 115, 2960-2970.

Iskra, S., Kalla, M., Delecluse, H. J., Hammerschmidt, W., and **Moosmann, A.** (2010). Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by Epstein-Barr virus. *J Virol* 84, 3612-3623.

Martin, L. K., Schub, A., Dillinger, S., and **Moosmann, A.** (2012). Specific CD8+ T cells recognize human herpesvirus 6B. *Eur J Immunol* 42, 2901-2912.

Ameres, S., Mautner, J., Schlott, F., Neuenhahn, M., Busch, D. H., Plachter, B., and **Moosmann, A.** (2013). Presentation of an immunodominant immediate-early CD8+ T cell epitope resists human cytomegalovirus immunoevasion. *PLoS Pathog* 9, e1003383.

Ameres, S., Besold, K., Plachter, B., and **Moosmann, A.** (2014). CD8 T cell-evasive functions of human cytomegalovirus display pervasive MHC allele specificity, complementarity, and cooperativity. *J Immunol* 192, 5894-5905.

Ameres, S., Liang, X., Wiesner, M., Mautner, J., and **Moosmann, A.** (2015). A Diverse Repertoire of CD4 T Cells Targets the Immediate-Early 1 Protein of Human Cytomegalovirus. *Front Immunol* 6, 598.

Rancan, C., Schirrmann, L., Hüls, C., Zeidler, R., and **Moosmann, A.** (2015). Latent Membrane Protein LMP2A Impairs Recognition of EBV-Infected Cells by CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* 11, e1004906.

Originalarbeiten als Koautor

Mayr, C., Bund, D., Schlee, M., **Moosmann, A.**, Kofler, D. M., Hallek, M., and Wendtner, C. M. (2005). Fibromodulin as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes. *Blood* 105, 1566-1573.

Hammer, M. H., Meyer, S., Brestrich, G., **Moosmann, A.**, Kern, F., Tesfa, L., Babel, N., Mittenzweig, A., Rooney, C. M., Hammerschmidt, W., Volk, H. D., and Reinke, P. (2005). HLA type-independent generation of antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *Eur J Immunol* 35, 2250-2258.

Adhikary, D., Behrends, U., **Moosmann, A.**, Witter, K., Bornkamm, G. W., and Mautner, J. (2006). Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med* 203, 995-1006.

Lang, S., Picu, A., Hofmann, T., Andratschke, M., Mack, B., **Moosmann, A.**, Gires, O., Tiwari, S., and Zeidler, R. (2006). COX-inhibitors relieve the immunosuppressive effect of tumor cells and improve functions of immune effectors. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19, 409-419.

Hettich, E., Janz, A., Zeidler, R., Pich, D., Hellebrand, E., Weissflog, B., **Moosmann, A.**, and Hammerschmidt, W. (2006). Genetic design of an optimized packaging cell line for gene vectors transducing human B cells. *Gene Ther* 13, 844-856.

Lang, S., Tiwari, S., Andratschke, M., Loehr, I., Lauffer, L., Bergmann, C., Mack, B., Lebeau, A., **Moosmann, A.**, Whiteside, T. L., and Zeidler, R. (2007). Immune restoration in head and neck cancer patients after in vivo COX-2 inhibition. *Cancer Immunol Immunother* 56, 1645-1652.

Adhikary, D., Behrends, U., Boerschmann, H., Pfänder, A., Burdach, S., **Moosmann, A.**, Witter, K., Bornkamm, G. W., and Mautner, J. (2007). Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy. *PLoS One* 2, e583.

Kruschinski, A., **Moosmann, A.**, Poschke, I., Norell, H., Chmielewski, M., Seliger, B., Kiessling, R., Blankenstein, T., Abken, H., and Charo, J. (2008). Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 17481-17486.

Landmeier, S., Altvater, B., Pscherer, S., Juergens, H., Varnholt, L., Hansmeier, A., Bollard, C. M., **Moosmann, A.**, Bisping, G., and Rossig, C. (2009). Activated human gammadelta T cells as stimulators of specific CD8+ T-cell responses to subdominant Epstein Barr virus epitopes: potential for immunotherapy of cancer. *J Immunother* 32, 310-321.

Liang, X., Weigand, L. U., Schuster, I. G., Eppinger, E., van der Griendt, J. C., Schub, A., Leisegang, M., Sommermeyer, D., Anderl, F., Han, Y., Ellwart, J., **Moosmann, A.**, Busch, D. H., Uckert, W., Peschel, C., and Krackhardt, A. M. (2010). A single TCR alpha-chain with dominant peptide recognition in the allorestricted HER2/neu-specific T cell repertoire. *J Immunol* 184, 1617-1629.

Seto, E., **Moosmann, A.**, Grömminger, S., Walz, N., Grundhoff, A., and Hammerschmidt, W. (2010). Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle

progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoS Pathog* 6, e1001063.

Fiebigler, B. M., **Moosmann, A.**, Behrends, U., and Mautner, J. (2012). Mature proteins derived from Epstein-Barr virus fail to feed into the MHC class I antigenic pool. *Eur J Immunol* 42, 3167-3173.

Jochum, S., Ruiss, R., **Moosmann, A.**, Hammerschmidt, W., and Zeidler, R. (2012). RNAs in Epstein-Barr virions control early steps of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E1396-404.

Jochum, S., **Moosmann, A.**, Lang, S., Hammerschmidt, W., and Zeidler, R. (2012). The EBV immunoevasins vIL-10 and BNLF2a protect newly infected B cells from immune recognition and elimination. *PLoS Pathog* 8, e1002704.

Hesse, J., Ameres, S., Besold, K., Krauter, S., **Moosmann, A.**, and Plachter, B. (2013). Suppression of CD8+ T-cell recognition in the immediate-early phase of human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* 94, 376-386.

Gabaev, I., Elbasani, E., Ameres, S., Steinbrück, L., Stanton, R., Döring, M., Lenac Rovis, T., Kalinke, U., Jonjic, S., **Moosmann, A.**, and Messerle, M. (2014). Expression of the human cytomegalovirus UL11 glycoprotein in viral infection and evaluation of its effect on virus-specific CD8 T cells. *J Virol* 88, 14326-14339.

Tischer, J., Engel, N., Fritsch, S., Prevalsek, D., Hubmann, M., Schulz, C., Zoellner, A. K., Bücklein, V., Reibke, R., Mumm, F., Rieger, C. T., Hill, W., Ledderose, G., Stemmler, H. J., Köhnke, T., Jäger, G., Kolb, H. J., Schmid, C., **Moosmann, A.**, and Hausmann, A. (2015). Virus infection in HLA-haploidentical hematopoietic stem cell transplantation: incidence in the context of immune recovery in two different transplantation settings. *Ann Hematol* 94, 1677-1688.

Tagawa, T., Albanese, M., Bouvet, M., **Moosmann, A.**, Mautner, J., Heissmeyer, V., Zielinski, C., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (2016). Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *J Exp Med* 213, 2065-2080.

Albanese, M., Tagawa, T., Bouvet, M., Maliqi, L., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., Martin, L., **Moosmann, A.**, and Hammerschmidt, W. (2016). Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113, E6467-E6475.

Hubmann, M., Fritsch, S., Zoellner, A. K., Prevalsek, D., Engel, N., Bücklein, V., Mumm, F., Schulz, C., Stemmler, H. J., Jäger, G., Ledderose, G., Kolb, H. J., Hausmann, A., Hiddemann, W., **Moosmann, A.**, and Tischer, J. (2016). Occurrence, risk factors and outcome of adenovirus infection in adult recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Virol* 82, 33-40.

Übersichtsartikel

Moosmann, A., Hammerschmidt, W., and Kolb, H. J. (2012). Virus-specific T cells for therapy - approaches, problems, solutions. *Eur J Cell Biol* 91, 97-101.

Buchkapitel

Moosmann, A. und Krackhardt, A (2009). Adoptive T-cell transfer in cancer treatment. In: Gires O, Seliger B (Editors): Tumor-associated antigens. Wiley-VCH, Weinheim.

Danksagung

Mein Dank gilt zuerst meinem Mentor Herrn Professor Dr. Wolfgang Hammerschmidt, der mich während meiner ganzen wissenschaftlichen Tätigkeit in jeder nur möglichen Weise gefördert, unterstützt und inspiriert hat.

Herrn Professor Dr. Reinhard Zeidler danke ich dafür, dass er mir den Weg in die Forschung ermöglicht und geebnet hat, und dass ich auf seine Unterstützung auch nach meiner Promotionszeit stets bauen konnte.

Herrn Professor Dr. Wolfgang Hiddemann bin ich sehr dankbar dafür, dass er meiner Arbeitsgruppe und mir vier Jahre lang eine zweite Heimat gegeben hat, mir ermöglichte, am wissenschaftlichen Austausch in seiner Klinik intensiv teilzuhaben, und den Vorsitz des Fachmentorats für meine Habilitation übernommen hat.

Herr Professor Dr. Hans-Jochem Kolb hat mich in klinische Fragestellungen eingeführt und mir so neue Horizonte eröffnet, die Vorstellung meiner Arbeit auf seinen Symposien ermöglicht und mich stets aufs beste gefördert und unterstützt. Hierfür danke ich ihm sehr.

Herr Professor Dr. Ulrich Koszinowski nahm mich in seinen SFB auf und ermöglichte es mir so, erste "eigene" Projekte einzuwerben und vielfältige Anregungen zu empfangen. Dafür und für die Übernahme des Fachmentorats danke ich ihm sehr.

Herr Professor Dr. Horst Domdey ermöglichte mir nicht nur meine ersten Schritte in die biologische Forschung; von unschätzbarem Wert war auch seine Bereitschaft, stets aufs neue die Fachvertretung unserer Doktorand/innen zu übernehmen.

Frau Dr. Johanna Tischer, Herrn Professor Dr. Armin Gerbitz, Herrn PD Dr. Josef Mautner, Frau Professor Dr. Uta Behrends und Herrn Dr. Helmut Blum danke ich dafür, dass es eine stetige Freude und Bereicherung war und ist, mit ihnen zusammenzuarbeiten. Johanna Tischer und Alessia Fraccaroli gebührt zudem mein ganz besonderer Dank in Beziehung auf das Projekt "H".

Herrn PD Dr. Reinhard Obst danke ich dafür, dass er mir Gelegenheit gab, mich in den immunologischen Unterricht einzubringen, und für sein anspornendes Vorbild als akademischer Lehrer.

Für vielfältige wertvolle und hilfreiche Unterstützung und Förderung danke ich Frau Professor Dr. Dolores Schendel, Frau Iris Bigalke, Herrn Professor Dr. Bodo Plachter, Herrn Professor Dr. Thomas Blankenstein, Herrn Professor Dr. Dirk Busch, Herrn Professor Dr. Wolfgang Uckert, Herrn Professor Dr. Alan B. Rickinson und Herrn Professor Dr. Paul Moss.

Meinen früheren und jetzigen Mitarbeitern und Doktoranden Frau Dr. Caroline Zilbauer (Zentz), Frau Dr. Martina Wiesner, Frau Dr. Stefanie Iskra, Frau Dr. Andrea Kratzer (Schub), Frau Julitta Kasten, Frau Leah Schirrmann, Frau Dr. Stefanie Ameres, Frau Dr. Larissa Martin, Frau Dr. Chiara Rancan, Frau Dr. Xiaoling Liang, Frau Alina Huth, Herrn Clemens Joos und Frau Alexandra Hollaus danke ich dafür, dass sie das Wagnis eingegangen sind, mit mir zusammenzuarbeiten. Ich danke dafür, dass ich von ihnen allen viel lernen konnte, und für ihren großen Einsatz für die gemeinsame Sache. Ohne sie alle wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.