

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

**Spezifische T-Zellantwort und Immunevasion  
beim humanen Herpesvirus 6  
und SARS-CoV-2**

**Alexandra Cornelia Hollaus**

aus

Rosenheim

Deutschland

**2023**



## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn PD Dr. Andreas Moosmann betreut und von Herrn Hon.-Prof. Dr. Horst Domdey vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 22.02.2023

---

Alexandra Hollaus

Dissertation eingereicht am 23.11.2022

1. Gutachter: Hon.-Prof. Dr. Horst Domdey
2. Gutachter: PD Dr. Andreas Moosmann

Mündliche Prüfung am 09.02.2023

## Im Rahmen meiner Arbeit haben sich folgende Publikationen ergeben:

Martin LK, **Hollaus A**, Stahuber A, Hübener C, Fraccaroli A, Tischer J, Schub A, Moosmann A.

“Cross-sectional analysis of CD8 T cell immunity to human herpesvirus 6B”.

PLoS Pathog. 2018 Apr 26;14(4):e1006991. doi: 10.1371/journal.ppat.1006991. PMID: 29698478; PMCID: PMC5919459.

Eren OE, Tonon M, Schöberl F, Gießen-Jung C, Moosmann A, **Hollaus A**, Muenchhoff M, Dimitriadis K.

“Coincidental SARS-CoV-2 infection and mRNA vaccination: a case report addressing the most important clinical questions”.

Infection. 2021 Aug;49(4):785-788. doi: 10.1007/s15010-021-01613-w. PMID: 33963523; PMCID: PMC8104037.

Khatamzas E, Antwerpen MH, Rehn A, Graf A, Hellmuth JC, **Hollaus A**, Mohr AW, Gaitzsch E, Weiglein T, Georgi E, Scherer C, Stecher SS, Gruetzner S, Blum H, Krebs S, Reischer A, Leutbecher A, Subklewe M, Dick A, Zange S, Girtl P, Müller K, Weigert O, Hopfner KP, Stemmler HJ, von Bergwelt-Baildon M, Keppler OT, Wölfel R, Muenchhoff M, Moosmann A.

“Accumulation of mutations in antibody and CD8 T cell epitopes in a B cell depleted lymphoma patient with chronic SARS-CoV-2 infection”.

Nat Commun. 2022 Sep 23;13(1):5586. doi: 10.1038/s41467-022-32772-5. PMID: 36151076; PMCID: PMC9508331.

Keppler-Hafkemeyer A, Greil C, Wratil PR, Shoumariyeh K, Stern M, Hafkemeyer A, Ashok D, **Hollaus A**, Lupoli G, Priller A, Bischof ML, Ihorst G, Engelhardt M, Marks R, Finke J, Bertrand H, Dächert C, Muenchhoff M, Badell I, Emmerich F, Halder H, Spaeth PM, Knolle PA, Protzer U, von Bergwelt-Baildon M, Duyster J, Hartmann TN, Moosmann A, Keppler OT.

“Potent high-avidity neutralizing antibodies and T cell responses after COVID-19 vaccination in individuals with B cell lymphoma and multiple myeloma”.

Nat Cancer. 2023 Jan;4(1):81-95. doi: 10.1038/s43018-022-00502-x. Epub 2022 Dec 21. PMID: 36543907; PMCID: PMC9886553.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>5</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Das humane Herpesvirus 6 .....</b>	<b>7</b>
1.1.1 Die Familie der humanen Herpesviren.....	7
1.1.2 Biologie von HHV-6A und HHV-6B .....	8
1.1.2.1 Eigenschaften der beiden Viren .....	8
1.1.2.2 Unterschiede zwischen HHV-6A und -6B.....	10
1.1.3 Pathobiologie von HHV-6.....	10
1.1.3.1 Zelltropismus .....	10
1.1.3.2 Primärinfektion.....	11
1.1.3.3 Reaktivierungen und chronische Infektionen.....	12
1.1.3.4 Pathophysiologie der Infektion .....	14
1.1.4 Replikationszyklus von HHV-6 .....	15
1.1.5 Chromosomale Integration von HHV-6: iciHHV-6.....	16
<b>1.2 SARS-CoV-2 .....</b>	<b>17</b>
1.2.1 Entwicklung der Pandemie.....	17
1.2.2 Aufbau und Replikation von SARS-CoV-2 .....	19
1.2.3 Kontrolle der SARS-CoV-2-Infektion mittels T-Zellen .....	20
1.2.4 Immunevasion von SARS-CoV-2.....	21
<b>1.3 Aufgabenstellung dieser Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>2 Materialien.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 Zellen und Zelllinien .....</b>	<b>25</b>
2.1.1 Probanden und Ethik.....	25
2.1.2 Zelllinien und Zellkulturen .....	28
2.1.3 Bakterienstämme .....	28
2.1.4 Verwendete Virenstämme.....	29
<b>2.2 Plasmide.....</b>	<b>29</b>
<b>2.3 Peptide.....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Peptidbibliotheken.....	30
2.3.2 Peptidmatrizen zur Bestimmung der Epitopspezifikation .....	33
<b>2.4 Antikörper und HLA/Peptid-Multimere .....</b>	<b>34</b>
<b>2.5 Reagenzien.....</b>	<b>35</b>
<b>2.6 Zellkulturreagenzien.....</b>	<b>37</b>

---

<b>2.7</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b> .....	<b>38</b>
<b>2.8</b>	<b>Laborausstattung</b> .....	<b>39</b>
<b>2.9</b>	<b>Kommerzielle Kits</b> .....	<b>40</b>
<b>2.10</b>	<b>Software und Dienstleitungen</b> .....	<b>41</b>
<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Präparation und Kultur von Zellen</b> .....	<b>42</b>
3.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	42
3.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl .....	42
3.1.3	Kryokonservierung lebender Zellen .....	43
3.1.4	Etablierung von CD40-aktivierten B-Blasten.....	43
3.1.5	Aufarbeitung und Lagerung von Patientenmaterial.....	44
3.1.6	Isolierung von peripheren mononuklearen Zellen aus Vollblut .....	45
3.1.7	Generierung von polyklonalen T-Zelllinien.....	46
3.1.8	Einzelzellklonierung aus polyklonalen T-Zelllinien .....	47
3.1.9	Transfektion von humanen Zellen mit Plasmid-DNA .....	47
<b>3.2</b>	<b>Analyse von Immunzellen</b> .....	<b>49</b>
3.2.1	Phänotypische Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie .....	49
3.2.2	Magnetische Separation von Zellpopulationen .....	50
3.2.3	Quantifizierung von Zytokinen durch ELISA .....	50
3.2.4	Quantifizierung reaktiver T-Zellen mittels IFN- $\gamma$ -ELISpot.....	52
3.2.5	Epitopbestimmung durch Peptidbibliotheken .....	53
3.2.6	Bestimmung der HLA-Restriktion.....	54
3.2.7	Messung der Zytotoxizität von T-Zellen .....	55
<b>3.3</b>	<b>Virologische Methoden</b> .....	<b>56</b>
3.3.1	Propagierung von humanen Herpesviren HHV-6B .....	56
3.3.2	Propagierung von HHV-7 und HHV-6A.....	56
3.3.3	Erkennung infizierter PHA-Blasten durch T-Zellklone und polyklonale T-Zelllinien ...	57
<b>3.4</b>	<b>Molekular-und mikrobiologische Methoden</b> .....	<b>58</b>
3.4.1	Kultivierung und Transformation von Bakterien .....	58
3.4.2	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus E. coli .....	58
3.4.3	Nachweis von EBV in primären Zelllinien mittels einer PCR .....	59
3.4.4	Agarose-Gelelektrophorese von DNA.....	60
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1</b>	<b>Funktionelle Analyse von immundominanten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in HHV-6B...</b>	<b>61</b>
4.1.1	Analyse der T-Zellantwort gegen HHV-6 .....	61
4.1.2	Häufigkeit von CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen gegen verschiedene HHV-6B-Epitope .....	63
4.1.3	Anreicherung von DFK-spezifischen CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen.....	64

4.1.4	Analyse von T-Zellkulturen auf eine DFK-Spezifität.....	65
4.1.5	Charakterisierung der Epitopspezifität der Klone 16 und 23.....	66
4.1.6	Erkennung von HHV-6A, -6B und -7 infizierten Zellen.....	68
4.1.7	DFK-Klone lysieren HHV-6B-infizierte Zellen.....	71
4.1.8	Analyse von Differenzierungsmarkern auf HHV-6B-spezifischen T-Zellen ex vivo....	73
<b>4.2</b>	<b>Analyse der T-Zellantwort auf die DNA-Polymerase U38 .....</b>	<b>74</b>
4.2.1	Ex vivo Untersuchungen zur Häufigkeit einer U38-spezifischen T-Zell-antwort .....	74
4.2.2	Anreicherung der U38-spezifischen T-Zellantwort durch Peptid-stimulationen .....	76
4.2.3	Einzelzellklonierung der U38-spezifischen T-Zelllinien .....	79
4.2.4	Identifizierung von T-Zellepitopen im Antigen U38 .....	81
4.2.5	Bestimmung der HLA-Restriktion.....	90
4.2.5.1	Ermittlung mittels allogener B-Blasten.....	91
4.2.5.2	Ermittlung mittels anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern .....	93
4.2.5.3	Verifizierung mittels HLA-transfizierter DG-75-Zellen.....	95
4.2.6	Avidität von einzelnen Klonen bezüglich Peptidkonzentration .....	99
4.2.7	Erkennung von HHV-6B-infizierten CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	100
4.2.8	Bestimmung des Minimalepitops zweier Klone.....	102
4.2.9	Erkennung von HHV-6A, -6B und -7 infizierten Zellen.....	105
4.2.10	Übersicht der U38-epitopspezifischen T-Zellkulturen und Klone.....	106
<b>4.3</b>	<b>Untersuchung der T-Zellantwort gegen das DNA-Bindeprotein U41 .....</b>	<b>108</b>
4.3.1	Ex vivo Untersuchungen zu Häufigkeit von U41-T-Zellantworten.....	108
4.3.2	Anreicherung U41-spezifischer T-Zellen durch Peptidstimulationen .....	110
4.3.3	Identifizierung von T-Zellepitopen im Antigen U41 .....	113
4.3.4	Bestimmung der HLA-Restriktion.....	115
4.3.4.1	Analyse mit anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern .....	115
4.3.4.2	Analyse mittels HLA-Transfektion .....	116
4.3.5	Funktionsspektrum von einzelnen Klonen bezüglich Peptid-konzentrationen .....	118
4.3.6	Erkennung von HHV-6B infizierten CD4 <sup>+</sup> -Zellen.....	119
4.3.7	Übersicht der U41-spezifischen Klone.....	121
<b>4.4</b>	<b>Untersuchungen zur T-Zellantwort gegen SARS-CoV-2.....</b>	<b>123</b>
4.4.1	Immunevasion von SARS-CoV-2 durch Epitopmutationen.....	123
4.4.2	Spezifische T-Zellantwort in einer Krebspatientenkohorte nach Impfung.....	131
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>137</b>
<b>5.1</b>	<b>Immundominanz einzelner Epitope in Herpesviren .....</b>	<b>137</b>
<b>5.2</b>	<b>HHV-6-spezifische Epitope in den Antigenen U38 und U41 .....</b>	<b>141</b>
<b>5.3</b>	<b>SARS-CoV-2: Evolution und Immunität.....</b>	<b>146</b>
	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>155</b>

<b>Referenzen</b> .....	<b>157</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>175</b>

## Zusammenfassung

Die Primärinfektion mit dem humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) findet meist im frühen Kindesalter statt und verursacht vor allem ein mehrtägiges Fieber („Drei-Tage-Fieber“). Nach dem Erstkontakt etabliert sich eine latente Infektion mit dem HHV-6-Virus, die von immunkompetenten Menschen in der Regel lebenslang gut beherrscht wird. Bei Immunsupprimierten kann sich das HHV-6-Virus reaktivieren und teils schwere Erkrankungen hervorrufen. Die Behandlung dieser Erkrankungen mit antiviralen Medikamenten ist mit starken Nebenwirkungen verbunden, weshalb ein hoher Bedarf an alternativen Therapien besteht. Eine mögliche, wesentlich nachhaltigere Therapieform wäre ein adoptiver Transfer virusspezifischer T-Zellen. Dafür bedarf es einer genaueren Erforschung der Komponenten der virusspezifischen T-Zellantwort gegen HHV-6.

Im ersten Teil dieser Dissertation wurden Vorarbeiten über ein immunogenes Antigen U86 (IE-2) weitergeführt und insbesondere die T-Zellantwort des stark immundominanten Epitops DFK aus HHV-6B genauer charakterisiert. Auch sollte eine mögliche Ursache für die Immundominanz DFK-spezifischer T-Zellen in HHV-6-positiven Spendern gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass das DFK-Epitop einen ungewöhnlich hohen Grad an Polymorphismus zu anderen Roseoloviren aufwies, da die DFK-spezifischen T-Zellen nur HHV-6B- aber weder HHV-6A- noch HHV-7-infizierte Zellen erkannten. Generell ist Polymorphismus ein Zeichen für einen hohen Selektionsdruck, der auf diesem Epitop liegt. Dieser Selektionsdruck spricht stark für die Tatsache, dass es sich bei dem DFK-Epitop nicht nur um ein besonders immundominierendes, sondern auch protektives Epitop handelt, welches zukünftig auch in einer therapeutischen Behandlung nützlich sein kann.

Der zweite Teil der Arbeit konzentrierte sich auf die Charakterisierung der T-Zellantwort gegen die beiden HHV-6B-Antigene U38 (DNA-Polymerase) und U41 (DNA-Bindeprotein) hinsichtlich ihrer Spezifität und Funktionalität. Gegen beide Antigene U38 und U41 konnten in einem HHV-6B-positiven Spender spezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gefunden werden. Diese T-Zellen waren sowohl in der Lage das Virus im Kontext der Infektion *in vitro* zu erkennen als auch infizierte Zellen erfolgreich zu lysieren. Die so identifizierten U38- und U41-spezifischen Epitope der analysierten T-Zellen können zukünftig beispielsweise für ein krankheitsbegleitendes Immunmonitoring verwendet werden aber geben uns jetzt schon einen weiteren Einblick in die spezifische Immunantwort gegen HHV-6B.

Im letzten Teil der Arbeit wurde die T-Zellimmunität gegen das im Dezember 2019 erstmals in Wuhan (China) entdeckte, pandemische Virus SARS-CoV-2 untersucht.

Hierzu wurde in einem ersten Projekt eine Patientin mit einem follikulären Lymphom und einer SARS-CoV-2 Infektion analysiert. Es gab für diese Patientin einen bereits vorhandenen Datensatz zu neuen SARS-CoV-2-Mutationen, die in ihr gefunden worden waren. Daher wurde die Hypothese getestet, ob ein Teil der Mutationen durch Immunevasion gegenüber CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten zu erklären sei. Dazu wurden SARS-CoV-2-spezifische T-Zellkulturen etabliert und diese gegen mögliche T-Zellepitope in ihrer Wildtyp- und Mutanten-Version getestet. Da die SARS-CoV-2-spezifischen T-Zellen nicht in der Lage waren die mutierten Epitope zu erkennen, konnte hier eine Immunevasion der T-Zellen nachgewiesen werden.

Das zweite Projekt untersuchte inwieweit mRNA-basierte Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 bei einer Kohorte von Krebspatienten, die an verschiedenen hämatologischen Malignomen erkrankt sind, Spike-spezifische T-Zell-Antworten auslösen können. Es konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine Zwei-Dosen-Impfung gegen SARS-CoV-2 in der Lage ist, funktionelle IFN- $\gamma$ -sekretierende Spike-spezifische T-Zellen bei der Mehrheit der Patienten zu induzieren.

Zusammengefasst können die Ergebnisse dieser Doktorarbeit dazu beitragen, dass der Wissensstand zur T-Zellimmunität gegen die zwei stark verbreiteten Viren HHV-6 und SARS-CoV-2 erweitert wird, um in Zukunft T-Zell-basierte Immuntherapien, Impfungen, Diagnose- und Monitoringverfahren zu entwickeln.

# 1 Einleitung

## 1.1 Das humane Herpesvirus 6

### 1.1.1 Die Familie der humanen Herpesviren

Herpesviren sind weit verbreitete virale Infektionserreger, die bei allen fünf Ordnungen der Vertebraten (Säugetieren, Vögeln, Amphibien, Reptilien und Fischen) und bei den Invertebraten (Mollusken) vorkommen. Bisher konnten über 200 unterschiedliche Herpesviren nachgewiesen werden, wobei davon nur ein kleiner Prozentsatz den Menschen infizieren kann (Davison 2014). Bis heute zählt die Familie der humanen Herpesviridae neun verschiedene Mitglieder. Basierend auf einer genetischen Analyse des konservierten Strukturproteins gH wird die Familie der Herpesviridae in drei große Unterfamilien der Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae unterteilt (siehe Tabelle 1). Ihr wichtigstes gemeinsames Merkmal ist ihre Fähigkeit, in ihrem Wirt eine lebenslange latente Infektion zu etablieren. Zum Teil reaktivieren Herpesviren sporadisch, z. B. in einer Situation der lokalen oder systemischen Immunsuppression, zum Teil werden sie kontinuierlich produziert und z.B. in den Speichel freigesetzt (Louten 2016).

Tabelle 1: Übersicht der neun verschiedenen Herpesviren. Trivialname, Gattung und Zuordnung zu einer der drei Herpesfamilien.

taxonomischer Name	Trivialname	Genus	Unterfamilie
<b>Humanes Herpesvirus 1</b>	Herpes-simplex-Virus 1	Simplexvirus	Alphaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 2</b>	Herpes-simplex-Virus 2	Simplexvirus	Alphaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 3</b>	Varizella-Zoster-virus	Varicellovirus	Alphaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 4</b>	Epstein-Barr-Virus	Lymphocryptovirus	Gammaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 5</b>	Humanes Cytomegalievirus	Cytomegalovirus	Betaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 6A</b>		Roseolovirus	Betaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 6B</b>		Roseolovirus	Betaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 7</b>		Roseolovirus	Betaherpesvirinae
<b>Humanes Herpesvirus 8</b>	Kaposi-Sarkom-Herpesvirus	Rhadinovirus	Gammaherpesvirinae

Die Alphaherpesvirinae besitzen einen schnellen Replikationszyklus (< 24 Stunden), haben ein breites Wirtsspektrum und sind neurotrop. Die Gammaherpesvirinae Epstein-Barr-Virus und das humane Herpesvirus 8 sind lymphotrop und die einzigen humanen Herpesviren mit nachgewiesenem onkogenem Potenzial. Die Betaherpesvirinae bestehen

aus dem humanes Cytomegalovirus und den Roseoloviren HHV-6A, -B und HHV-7. Diese besitzen ein kleines Spektrum an potenziellen Wirten, haben einen langsamen Replikationszyklus und verbreiten sich dadurch eher langsam (Davison 2014).

### **1.1.2 Biologie von HHV-6A und HHV-6B**

Das humane Herpesvirus 6A (HHV-6A) wurde im Jahr 1986 zufällig aus T-Zellkulturen isoliert, die eigentlich zur Suche nach neuen Retroviren angelegt wurden (Fujikawa et al. 1986). Zwei Jahre später wurde das humane Herpesvirus 6B (HHV-6B) unter ähnlichen Umständen identifiziert (Lopez et al. 1988; Yamanishi et al. 1988). Seit dieser Zeit wurde dieses Virus zusammenfassend als HHV-6A/B bezeichnet.

Im Jahr 2013 wurde auf der Basis von phänotypischen und genetischen Argumenten vorgeschlagen, dass HHV-6A und HHV-6B als zwei verschiedene Viruspezies aufgefasst werden sollten. Zuvor waren HHV-6A und HHV-6B meist als Varianten einer Spezies betrachtet worden (Ablashi et al. 2013). Die beiden HHV-6-Spezies unterscheiden sich voneinander in Zelltropismus, Genomsequenz und Antigenität, zudem finden sich trotz ihrer hohen Homologie keine natürlichen gemischten Rekombinanten (Ablashi et al. 2013). Ein etwas entfernter mit HHV-6A und HHV-6B verwandtes Virus ist HHV-7. Dieses wurde im Jahre 1990 identifiziert (Frenkel et al. 1990). Die drei Viren HHV-6A, HHV-6B und HHV-7 sind in der Allgemeinbevölkerung weit verbreitet, wobei der Mensch der einzige natürliche Wirt ist (De Bolle, Naesens, and De Clercq 2005). Sie persistieren wie andere humane Herpesviren unbegrenzt im infizierten Organismus und können zu Reaktivierungen führen, die meist asymptomatisch sind, aber z.B. in Fällen einer schweren Immunsuppression auch mit mehr oder weniger schweren klinischen Syndromen einhergehen können (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean 2015).

#### **1.1.2.1 Eigenschaften der beiden Viren**

Sowohl HHV-6A als auch HHV-6B sind Mitglieder der Roseolovirus-Gattung der Betaherpesvirus-Unterfamilie (Ablashi et al. 1991). Sie teilen mit den anderen sieben humanen Herpesviren eine ähnliche Virionstruktur und genomische Architektur. Virale Partikel (auch Virionen genannt) bestehen von außen nach innen aus einer Lipiddoppelschicht in die die viralen Glykoproteine eingebettet sind, den äußeren und inneren Tegumentschichten, das mit Proteinen in lose strukturierter Anordnung gefüllt ist, und dem Nukleokapsid mit ikosaedrischer Symmetrie und einem Durchmesser von 90 bis

110 nm, das die genomische DNA enthält (vergleiche Abbildung 1) (Biberfeld et al. 1987; Yoshida et al. 1989).

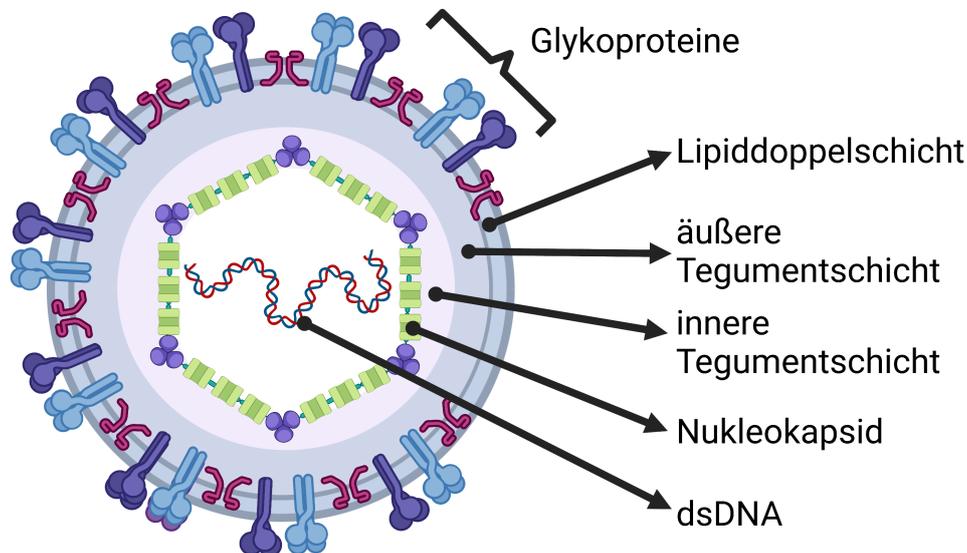


Abbildung 1: Die schematische Darstellung eines Roseolovirions. Die Glykoproteine befinden sich in der Lipiddoppelschicht. Erstellt mit BioRender.com.

Reife Virionen haben einen Durchmesser von etwa 200 nm. Die Lipidnatur der Umhüllung bedingt eine schlechte Beständigkeit gegenüber chemischen oder physikalischen Inaktivierungsmitteln.

HHV-6A, HHV-6B und HHV-7 besitzen Genome, die 159, 165 bzw. 145 Kilobasenpaare groß sind und jeweils aus einer doppelsträngigen linearen DNA bestehen (Ablashi et al. 2013). Die Genome sind sehr homolog zueinander und besitzen jeweils eine 143 bis 145 kb große einzigartige (U) Region, flankiert von terminalen direkten Wiederholungen (DR) von 8 bis 9 kb und sind unterbrochen durch drei Zwischenwiederholungen, bezeichnet als R1, R2 und R3, in der unmittelbar frühen A-Region (IE-A). Die DRs enthalten die Spaltungsverpackungsmotive pac-1 und pac-2 und Wiederholungen des Hexanukleotids (GGGTTA)<sub>n</sub>, d.h. Telomer-artige Repetitionen (Thomson, Dewhurst, and Gray 1994). Es wird angenommen, dass diese Wiederholungen eine Rolle bei der DNA-Replikation und bei der Aufrechterhaltung des viralen Genoms in latent infizierten Zellen spielen (Gompels and Macaulay 1995).

### 1.1.2.2 Unterschiede zwischen HHV-6A und -6B

Die Genomsequenzen der Varianten HHV-6A und HHV-6B sind auf Nukleotidebene zu 90 % konserviert. Allerdings weisen HHV-6A und HHV-6B jeweils charakteristische Restriktionsendonukleaseprofile auf, die eine eindeutige Klassifizierung von entnommenen Proben als A- oder B-Spezies erlauben (Ablashi et al. 1991; Aubin et al. 1991). Es findet sich der höchste Grad an Sequenzdivergenz in der IE-1-Region (Chou and Marousek 1994). Dessen Spleißmuster und zeitliche Transkriptionsregulation unterscheiden sich zwischen den Spezies A und B (Dominguez et al. 1999), was darauf hindeutet, dass diese Region für bestimmte biologische Unterschiede zwischen den beiden Spezies verantwortlich sein könnte. Zudem wurde beobachtet, dass sich die HHV-6B IE-1-Sequenzen weiter in zwei verschiedene Untergruppen aufspalten, die durch die Laborstämme Z29 und HST repräsentiert werden (Stanton, Wilkinson, and Fox 2003).

Ein weiterer phänotypischer Unterschied zwischen A- und B-Spezies ist die U97-U100-Region, kodierend für den Virion-Hüllglykoprotein-Komplex gp82-gp105. Ein als HN3 bezeichnetes Exon dieses Gens findet sich nur in HHV-6B (Isegawa et al. 1999). Umfangreiches Spleißen seiner mRNA-Transkripte führt zu verschiedenen Proteinen, die virusspezifische neutralisierende Epitope enthalten (Pfeiffer et al. 1993). Da das als gQ bezeichnete 80-kDa-U100-Genprodukt an der CD46-Rezeptorbindung und der anschließenden Membranfusion beteiligt ist, könnte eine Divergenz in dieser Region zu Unterschieden im Zelltropismus zwischen A- und B-Varianten beitragen (Mori et al. 2003).

### 1.1.3 Pathobiologie von HHV-6

#### 1.1.3.1 Zelltropismus

Sowohl HHV-6A als auch HHV-6B besitzen die Fähigkeit ein breites Spektrum von Zelltypen zu infizieren. Sie können sowohl T-Zellen, insbesondere CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, aber auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Monozyten-Makrophagen, hämatopoetische Zellen des Knochenmarks, Epithelzellen der Niere und Speicheldrüsen, Endothelzellen, Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und Astrozyten infizieren (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean 2015). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass beide Viren (insbesondere HHV-6A) CD46 als zellulären Rezeptor verwenden können (Santoro et al. 1999). CD46 ist ein regulatorischer Komplementrezeptor und wird von allen kernhaltigen menschlichen Zellen exprimiert. Der hauptsächlich von HHV-6B verwendete zelluläre Rezeptor ist CD134 (Tang et al. 2013).

Die Isolierung und Kultivierung beider HHV-6-Spezies kann im Labor mit mononuklearen Zellen des peripheren Bluts von gesunden Spendern durchgeführt werden, da sich sowohl HHV-6A als auch HHV-6B am effizientesten *in vitro* in CD4<sup>+</sup>-T-Lymphozyten replizieren (Salahuddin et al. 1986; Takahashi et al. 1989). Für die Kultivierung beider Viren wird auch häufig auf Nabelschnurblutzellen zurückgegriffen, da diese den Vorteil bieten, dass sie frei von latentem HHV-6 sind, das bei erwachsenen PBMCs häufig vorkommt (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean 2015). Im Vergleich zu HHV-6B infiziert HHV-6A kultivierte Zellen neuronalen Ursprungs leichter und führt eher zu einer produktiven lytischen Infektion, die zu einem zytopathischen Effekt führt (De Bolle et al. 2005).

*In vitro* hat HHV-7 einen selektiven Tropismus für CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, während es *in vivo* in der Haut, in den Speicheldrüsen und vielen anderen Organen beobachtet wird (De Bolle, Naesens, and De Clercq 2005). Die Isolierung und Kultivierung von HHV-7 wird ebenfalls am besten mittels CD4<sup>+</sup>-T-Zellkulturen durchgeführt. Die HHV-7-Kultur ist jedoch schwierig, da sie normalerweise nur einen schwachen zytopathischen Effekt in den infizierten Zellen auslöst. Die erhaltenen Virusstocks haben immer einen niedrigen Infektionstiter (Boutolleau et al. 2005).

Derzeit ist kein natürliches Tiermodell für eine produktive Infektion mit diesen Viren bekannt, obwohl transgene Mäuse, die humanes CD46 exprimieren, experimentell mit HHV-6A über intrazerebrale Injektionen infiziert werden konnten (Reynaud et al. 2014).

### 1.1.3.2 Primärinfektion

Die HHV-6B-Primärinfektion tritt normalerweise in der frühen Kindheit zwischen 6 Monaten und 3 Jahren auf, wenn die mütterlichen Antikörper nachlassen (Pruksananonda et al. 1992; Hall et al. 1994). HHV-7- und HHV-6A-Primärinfektionen treten später auf. Die Erstinfektion erfolgt am häufigsten durch den Kontakt von infiziertem Speichel oder Nasenschleim mit den Atemwegen, einschließlich der Mandeln (Braun, Dominguez, and Pellett 1997) und olfaktorischen Zellen der Nasenhöhle (Harberts et al. 2011). Stillen scheint keine Rolle bei der Übertragung von HHV-6A und HHV-6B zu spielen, aber das Vorhandensein von HHV-7 in der Muttermilch wurde nachgewiesen und deutet auf einen möglichen Übertragungsweg hin (Fujisaki et al. 1998). Eine Primärinfektion mit HHV-6A oder HHV-6B im Mutterleib ist möglich und wird bei etwa 1 von 100 Geburten beobachtet, aber eine solche angeborene Infektion scheint im Gegensatz zu CMV bei der Geburt nicht mit eindeutigen Symptomen verbunden zu sein. Es konnte allerdings ein negativer Einfluss auf die spätere neuropsychologische Entwicklung des Kindes festgestellt werden (Caserta et al. 2014). Auch über die Übertragung von HHV-6 durch Organtransplantationen wurde

berichtet, während eine Übertragung über Blutspenden nie beobachtet wurde (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean 2015).

Die HHV-6B-Primärinfektion verläuft oft asymptomatisch, ansonsten wird diese mit einem Exanthem subitum (auch Roseola infantum oder Drei-Tage-Fieber genannt), einer gutartigen akuten Erkrankung des Säuglings, assoziiert (Zerr et al. 2005; Yamanishi et al. 1988). Sie besteht normalerweise aus zwei aufeinander folgenden Phasen: Fieber für drei bis fünf Tage, oft verbunden mit Krampfanfällen, und dann ein Röteln-ähnlicher Ausschlag an Hals und Brust, der nach dem Fieber beobachtet wird und für ein bis zwei Tage anhält. In einigen Fällen kann die Primärinfektion auch mit schwereren Symptomen wie einer Meningoenzephalitis, einer Leberfunktionsstörung und einem Makrophagen-Aktivierungssyndrom verbunden sein (Asano et al. 1992; Crawford et al. 2007). Einige Enzephalitis-Fälle im Zusammenhang mit einer HHV-6B-Primärinfektion hatten einen besonders schlechten Verlauf und führten zum Tod des Patienten oder zu erheblichen neurologischen Folgeerkrankungen (Yoshikawa et al. 2009; Tesini, Epstein, and Caserta 2014). Symptomatische HHV-6A-Primärinfektionen sind nicht so gut dokumentiert wie solche, die durch HHV-6B verursacht werden (Tembo et al. 2014; Bates et al. 2009).

Die HHV-6-Primärinfektion löst eine spezifische Immunantwort aus, die anhand ihrer humoralen und zellulären Komponenten identifiziert werden kann (Gerdemann et al. 2013; Becerra et al. 2014). Die zelluläre Immunantwort kann durch die Proliferation von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nach Exposition gegenüber viralen Antigenen nachgewiesen werden. Trotz dieser bereits bei der Primärinfektion beobachteten Immunantwort ist eine Reinfektion durch exogene Virusstämme derselben Virusspezies möglich, die mit bereits latent vorhandenen homologen Virusstämmen koexistieren. Dies könnte genetische Rekombinationsereignisse auslösen (Achour et al. 2008).

Klare HHV-7-Primärinfektionen sind mit Ausnahme einiger potenzieller Fälle von Exanthem subitum schlecht dokumentiert (Tanaka et al. 1994). Spezifische Symptome mit mononukleären Zellen im Blut, Krampfanfälle oder andere neurologische Beeinträchtigungen wurden in Studien ebenfalls mit HHV-7 in Verbindung gebracht, während der Zusammenhang mit Pityriasis rosea noch in Frage gestellt wird (Ward et al. 2005; Rebora, Drago, and Broccolo 2010).

### 1.1.3.3 Reaktivierungen und chronische Infektionen

HHV-6A und HHV-6B sind für opportunistische Infektionen verantwortlich, die hauptsächlich auf Reaktivierungen dieser Viren aus ihrem latenten Zustand während einer Immunschwäche des Patienten zurückzuführen sind. Bei einer Reaktivierung in

Organtransplantatempfängern kommt es oft zu Fieber mit Hautausschlag, Pneumonitis, Hepatitis und einer Enzephalitis. Zudem kann es bei HIV-infizierten Patienten zu einer Kolitis oder Retinitis kommen (Clark and Griffiths 2003; Boutolleau et al. 2003). Häufig ist die Enzephalitis bei Patienten, die sich zuvor einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation unterzogen haben verbunden mit neurokognitiven Beeinträchtigungen (Ogata 2009; Zerr et al. 2011). Hingegen führen bei Empfängern von soliden Organtransplantaten HHV-6A- und HHV-6B-Reaktivierungen seltener zu schweren Erkrankungen (Razonable 2013). Außerdem wird CMV oft gleichzeitig mit HHV-6A oder HHV-6B nachgewiesen wodurch sich die Frage der jeweiligen Verantwortung jedes Virus bei diesen Krankheitsbildern eröffnet. Eine HHV-6-Reaktivierung kann mit einer akuten Transplantatabstoßung („Graft-versus-host-disease“) einhergehen, aber es ist immer noch schwierig zu beweisen, ob die Virusreaktivierung die Ursache oder Folge der Abstoßung ist (Agut 2011).

HHV-6B wurde auch mit dem arzneimittelinduzierten Hypersensitivitätssyndrom (DIHS) in Verbindung gebracht, das auch als Arzneimittelausschlag mit Eosinophilie und systemischen Symptomen (DRESS) bekannt ist (Suzuki et al. 1998; Sekiguchi et al. 2005; Tohyama et al. 2007; Mardivirin et al. 2009). Die Erkrankung tritt meist nach Einnahme von Antibiotika oder Antiepileptika auf. Sie kann mit Fieber, Hautausschlag, Adenopathie, zytolytische Hepatitis, Hypereosinophilie im Blut und mit einer signifikanten Verschlechterung des Allgemeinzustands des Patienten verbunden sein. Es wurde gezeigt, dass einige dieser Medikamente die in-vitro-Replikation von HHV-6B stimulieren, was somit die Ursache der Erkrankung sein könnte (Spira et al. 1990).

Eine mögliche Rolle von HHV-6A als Cofaktor des Humanen Immundefizienz Virus (HIV) bei der Progression zu AIDS wurde aufgrund von in-vitro-Experimenten vermutet. So infizieren beide Viren gemeinsam CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, zudem induziert HHV-6A die Expression der CD4-Rezeptoren in den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die beide dadurch für HIV noch empfindlicher werden und es kommt zu einer HIV-Genreaktivierung durch HHV-6 (Lusso and Gallo 1995). Im Gegensatz dazu scheint der Nachweis einer HHV-7-Infektion mit einer besseren Prognose einer HIV-Infektion zu korrelieren. Ein Grund könnte das Vorhandensein einer erhöhten Anzahl von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sein, die die Progression zu AIDS verzögern (Boutolleau et al. 2005).

Die Rolle von HHV-6A und HHV-6B beim Auftreten von Autoimmunerkrankungen wurde bei Patienten mit Multipler Sklerose und mit Hashimoto-Thyreoiditis diskutiert (Leibovitch and Jacobson 2014; Caselli et al. 2012). Diese Viren werden im Zentralnervensystem von Patienten mit Multipler Sklerose nachgewiesen, insbesondere in demyelinisierten Plaques. Serologische Daten zeigen auch eine höhere antivirale Immunantwort bei Patienten mit Multipler Sklerose. Das gleiche gilt für die potenzielle ätiologische Rolle dieser Viren bei

einigen Kardiomyopathien oder chronischen Arteriopathien (Leveque et al. 2011; Takatsuka et al. 2003). Obwohl dieser Befund noch bestätigt werden muss, könnte die chromosomale Integration von HHV-6A und HHV-6B ein Risikofaktor für Angina pectoris sein (Gravel et al. 2015). Auch wird eine mögliche Assoziation von HHV-6 mit Morbus Alzheimer in den letzten Jahren immer stärker diskutiert, hier bedarf es allerdings noch mehr Daten, um dies zu verifizieren (Allnutt et al. 2020).

Das Problem der Reaktivierung von HHV-6 ist mit einer großen medizinischen Herausforderung verbunden: Der Behandlung schwerer Formen aktiver HHV-6A- und HHV-6B-Infektionen, da es bisher nur die Möglichkeit gibt antivirale Medikamente zu geben, die gegen Infektionen mit dem verwandten Betaherpesvirus Cytomegalievirus (CMV) entwickelt wurden. Diese zeigen auch gegen HHV-6 eine Wirksamkeit, sind allerdings mit starken Nebenwirkungen für die Patienten verbunden (Agut 2011).

#### 1.1.3.4 Pathophysiologie der Infektion

Nach einer Primärinfektion persistieren beide Spezies von HHV-6 und HHV-7 latent in unterschiedlichen Zelltypen, beispielsweise in den Speicheldrüsen (Chan et al. 2001) oder auch in Monozyten/Makrophagen (Kondo et al. 1991), in T-Zellen oder im zentralen Nervensystem (Chan et al. 2001). Wie andere Herpesviren können diese Viren eine latente Infektion etablieren und für den Rest des Lebens im Organismus bestehen bleiben, wobei sie die Fähigkeit zur Reaktivierung und erneuten Replikation behalten (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean 2015).

Während die meisten Herpesviren Latenz durch die Bildung zirkulärer Episomen in Verbindung mit nuklearen Proteinen erreichen, konnte gezeigt werden, dass bei der latenten Infektion mit HHV-6 das Genom in die subtelomere Region einer somatischen Zelle integriert wird, ein Prozess, der durch Telomer-Repeats am Ende seines Genoms erleichtert wird (Arbuckle et al. 2010).

Die selektive Expression einiger viraler Gene kann jedoch ausreichen, um Veränderungen der Zellfunktionen zu induzieren, selbst wenn kein vollständiger Replikationszyklus vorliegt. Hierbei kann vor allem das virale Gen U94 eine wichtige Rolle beim Aufbau der Latenz spielen (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean 2015).

Pathogenität kann sowohl bei lytischen Reaktivierungen als auch bei veränderten Latenzzuständen auftreten (Hogestyn, Mock, and Mayer-Proschel 2018).

Über 95 % der Erwachsenen sind dauerhaft mit HHV-6B infiziert, und ein kleinerer, aber erheblicher Anteil ist ebenfalls dauerhaft mit HHV-6A infiziert (Agut, Bonnafous, and Gautheret-Dejean 2015).

### 1.1.4 Replikationszyklus von HHV-6

Sowohl HHV-6A als auch HHV-6B gelangen durch Interaktion mit CD46 (Santoro et al. 1999) in die Zelle, das auf der Membran aller kernhaltigen Zellen vorhanden ist. Nach Bindung an seinen Rezeptor und Fusion der Virushülle an die Zellmembran wird das eintretende Nukleokapsid durch das Zytoplasma (durch Assoziation mit dem Mikrotubuli-Netzwerk) zum Kernporenkomplex transportiert, wo das virale DNA-Genom in das Nukleoplasma freigesetzt wird (Mori et al. 2003). Die zytosolischen Transportmechanismen sind für HHV-6 noch nicht im Detail untersucht, zeigen aber wahrscheinlich starke Ähnlichkeit mit denen, die für HCMV beschrieben wurden (Ogawa-Goto et al. 2003). Das Virus nutzt dann die zelluläre Transkriptions- und Translationsmaschinerie, um drei kinetische Klassen viraler Proteine zu produzieren:

Unmittelbare frühe Gene (immediate early gene; IE), frühe Gene (early gene; E) und späte Gene (late gene; L). HHV-6 IE-Proteine werden innerhalb weniger Stunden nach der Infektion synthetisiert und regulieren die Expression anderer Gene. Die Expression von E-Genen hängt von der IE-Proteinsynthese ab und liefert Proteine, die hauptsächlich am DNA-Stoffwechsel und der DNA-Replikation beteiligt sind. Die Abhängigkeit von der Aktivität der viralen DNA-Polymerase unterscheidet zeitlich E- und L-Proteine, obwohl Ausnahmen existieren (Øster and Höllsberg 2002).

Die DNA-Replikation eines Herpesvirus erfordert sieben viral kodierte Faktoren. Erstens das Ursprungsbindungsprotein das in HCMV und in Gammaherpesvirinae an den Ursprung der lytischen Replikation (ori-lyt) bindet und einen Teil des zirkulären viralen DNA-Genoms denaturiert (Dewhurst et al. 1993; Inoue et al. 1994). Diese Lücke wird durch den Helikase/Primase-Komplex aufrechterhalten, der auch RNA-Primer für die Nachlaufstrang-DNA-Synthese bereitstellt (Nicholas 1994). Die einzelsträngige DNA in der „Replikationsblase“ wird durch das Haupt-DNA-Bindungsprotein (bei HHV-6 kodiert durch U41) stabilisiert, bis die Zweitstrangsynthese durch die DNA-Polymerase (U38) (Teo, Griffin, and Jones 1991) katalysiert wird. Die vier Proteine, die von den Genen U79 und U80 von HHV-6 kodiert werden, sind wahrscheinlich auch an der DNA-Replikation beteiligt (Taniguchi et al. 2000). Wenn der neue Strang wächst, wird die kreisförmige Replikationsstruktur eingeschnitten, um ein Zwischenprodukt zu bilden. Lange Stränge von neugebildeter DNA werden durch die Wechselwirkung von Spaltungs- und Verpackungsproteinen mit spezifischen Verpackungssignalen (pac) am Ende der viralen Genome eingekapselt (Deng and Dewhurst 1998). Die ori-lyt- und pac-Sequenzen für die A- und B-Varianten von HHV-6 unterscheiden sich voneinander (Turner, DiLuca, and Gompels 2002). Die reifen Kapside knospen aus dem Kern in das Zytoplasma, wo sie am Golgi-Komplex ein Tegument und eine sekundäre Virushülle bilden (Cardinali et al. 1998).

Diese werden in Transportvesikeln glykosyliert, bevor die reifen Viruspartikel durch Exozytose extrazellulär freigesetzt werden. Die Gesamtzeit von der Infektion bis zur Freisetzung neuer Virionen dauert ungefähr 72 Stunden (Black et al. 1989).

### **1.1.5 Chromosomale Integration von HHV-6: iciHHV-6**

Die chromosomale Integration von HHV-6A- und HHV-6B-DNA ist ein einzigartiges Phänomen unter den humanen Herpesviren. Etwa 1 % der Menschheit wird mit dem gesamten Virusgenom in jeder Zelle geboren, in Form eines chromosomal integrierten HHV-6 (iciHHV-6) (Arbuckle et al. 2010; Pellett et al. 2012; Zhang et al. 2017).

Hierbei kommt es zu einer Insertion des viralen Genoms in die DNA in der Telomerregion eines bestimmten Chromosoms. Das integrierte virale Genom ist in allen Zellen des Organismus in der gleichen Position des gleichen Chromosoms vorhanden und kann vertikal durch Keimzellen oder horizontal über Gewebe- oder Organtransplantate übertragen werden. Das vererbte virale Genom kann transkriptionell aktiv sein, kann also virale Proteine und sogar infektiöse Virionen produzieren (Endo et al. 2014).

## 1.2 SARS-CoV-2

### 1.2.1 Entwicklung der Pandemie

Im Dezember 2019 wurde das neuartige Coronavirus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2) erstmals in Wuhan, Hubei, China entdeckt (Wu et al. 2020). Im Frühjahr 2020 verbreitete sich das Virus weltweit und die Weltgesundheitsorganisation (WHO) erklärte das Infektionsgeschehen zur Pandemie (Dong et al. 2021). Die durch das Virus verursachte Erkrankung wird COVID-19 (coronavirus disease 2019) genannt. Typische Symptome bei einer COVID-19-Erkrankung sind Fieber, Schüttelfrost, Husten, Atembeschwerden, Müdigkeit, Gliederschmerzen, Kopfschmerzen, Geschmacks- oder Geruchsverlust, Halsschmerzen, laufende Nase, Übelkeit oder Erbrechen und Durchfall (Monroe et al. 2022). Die Verbreitung von COVID-19 hat unser Leben in den letzten beiden Jahren stark verändert, indem es nicht nur wirtschaftliche Veränderungen gebracht hat, sondern auch Menschen daran gestorben sind. Besonders anfällig für einen schweren Krankheitsverlauf für COVID-19, der zu Krankenhausaufenthalten oder eben zum Tod führen kann, sind ältere Menschen und Menschen mit anderen Vorerkrankungen (Monroe et al. 2022). Bei der Mehrheit der jungen Menschen, die sich mit SARS-CoV-2 infizieren, verläuft die Infektion asymptomatisch oder sie erleiden eine leichte Erkrankung mit den oben genannten Symptomen. Bei einem Teil der COVID-19-Patienten, einschließlich derjenigen, die eine leichte Erkrankung hatten, wurden länger andauernde Folgeerscheinungen beschrieben (Long-COVID-19), mit Symptomen wie Gelenkschmerzen, Gedächtnisverlust, Konzentrations- oder Schlafstörungen, Depressionen oder Angstzuständen (Picone et al. 2022). Jedoch wurde auch berichtet, dass Long-COVID-Symptome bei Personen mit und ohne vorige bestätigte SARS-CoV-2-Infektion ähnlich häufig auftraten (Matta et al. 2022). Solche Symptome korrelierten mit der subjektiven Annahme, infiziert gewesen zu sein (Matta et al. 2022) oder mit einem hohen Grad von seelischem Stress vor der Infektion (Wang et al. 2022).

Es gibt wenig Zweifel, dass mittlerweile (Stand: Oktober 2022) die Mehrheit der Weltbevölkerung bereits mit dem Virus infiziert worden ist, wie Seroprävalenzstudien aus allen Weltteilen zeigen (Clarke et al. 2022; Jahan et al. 2022) abgesehen von China. Wie andere Coronaviren evolviert auch SARS-CoV-2 kontinuierlich und nach der ursprünglichen Variante (Wuhan-Hu-1) haben neue Varianten des Virus wie Alpha (B.1.1.7), Beta (B.1.351), Gamma (P.1), Kappa (B.1.617.1), Delta (B.1.617.2) und Omikron (B.1.1.529) nacheinander das Infektionsgeschehen in einzelnen Weltteilen oder global stark bestimmt (Dong et al. 2021; Dyer 2021). Die RNA-Polymerase von SARS-CoV-2 hat Korrekturlesefähigkeiten, wodurch die Mutationsrate niedriger ist als bei anderen RNA-

Viren wie beispielsweise beim Influenzavirus oder dem humanen Immundefizienz Virus 1 (HIV), jedoch weit höher als bei DNA-Viren wie z.B. den Herpesviren (Sanjuán et al. 2010). Diese neuen Varianten von SARS-CoV-2 unterscheiden sich in mehreren Eigenschaften, wie etwa ihrer Übertragbarkeit, ihrer Rezeptorbindung oder ihrer Resistenz gegen eine vorbestehende Immunantwort (Liu, Liu, et al. 2022).

Laut WHO werden bestimmte Variantenstämme von SARS-CoV-2 basierend auf ihrem jeweiligen Krankheits- oder Verbreitungspotential in zwei Klassen eingeteilt: VOC (Variant of Concern) und VOI (Variant of Interest). Erstere verursachen weltweit eine große Zahl von Fällen, sie werden schnell von einer Person auf die andere übertragen, haben eine hohe Virulenz und die Wirksamkeit der Impfstoffe ist gegen diese Variante verringert. Bei VOIs wurden begrenzte, lokale, unabhängige Ausbrüche in mehr als einem Land beobachtet. Zu den VOCs zählen die weitverbreiteten Varianten Alpha, Beta, Gamma, Delta und Omikron (Dong et al. 2021).

Der Alpha-Stamm verbreitete sich Ende 2020 schnell und wurde in der ersten Hälfte des Jahres 2021 zu der am stärksten verbreiteten Mutante. Die Beta-Variante zeichnete sich besonders durch ihre „Immunescape“-Fähigkeit (Immunflucht) aus, was ihr eine hohe Infektiosität verlieh. Die Gamma-Variante wurde erstmals im November 2020 in Brasilien entdeckt und war für 76 % der COVID-19-Fälle in Südamerika im Juni 2021 verantwortlich. Im Jahr 2021 hatte sich die Delta-Mutante, die ursprünglich im Oktober 2020 in Indien auftrat, weltweit zu einer stark dominierenden Virusvariante entwickelt, die in der COVID-19-Pandemie aufgrund ihrer erhöhten Übertragbarkeit weltweit eine neue Infektionswelle verursachte und bisherige Varianten verdrängte (Wheatley and Juno 2022). Von Indien aus verbreitete sich diese Variante in 92 Länder von Asien über Amerika, Europa und Afrika. Bis zum 23. November 2021, hatte die Delta-Variante bereits 1 Million bestätigte COVID-19 Fälle in den Vereinigten Staaten, 820.000 Fälle in Großbritannien und etwa 110.000 Fälle in Deutschland verursacht (Haldane et al. 2021).

Seit der Entdeckung Ende 2021 in Südafrika hat sich Omikron schnell weltweit verbreitet und in Europa, Nordamerika, ostasiatischen Ländern und Ozeanien, wo zuvor nur eine Minderheit der Bevölkerung mit SARS-CoV-2 Kontakt hatte, große Bevölkerungsteile erreicht. Glücklicherweise sind schwere und tödliche Verläufe bei einer Omikron-Infektion wesentlich seltener als bei den meisten früheren Varianten (Sigal, Milo, and Jassat 2022; Elliott et al. 2022). Man kann Omikron aufgrund einiger charakteristischer Mutationen in mehrere Untervarianten aufteilen (Hui et al. 2022). Die ersten beiden gefundenen Untervarianten erhielten die Bezeichnungen BA.1 und BA.2. Es folgten noch weitere neue Linien BA.1.1, BA.2.12.1, BA.2.3, BA.2.9, BA.3, BA.4, von denen einige einander als weltweit dominierende Varianten ablösten (Yamasoba et al. 2022; Xia et al. 2022). Die

Linien BA.1 und BA.2 haben 32 identische Mutationen, aber unterscheiden sich auch durch weitere 28 Mutationen (Yu et al. 2022).

In den meisten europäischen Ländern folgten einander im Winter 2021/22 in kurzer Folge Infektionswellen mit den Omikron-Varianten BA.1 und BA.2 (Elliott et al. 2022). Im Sommer 2022 folgte eine Welle mit der Omikron-Variante BA.5. Welche Varianten das Geschehen im Winter 2022/23 dominieren werden, ist offen. Dies könnte beispielsweise weiterhin BA.5 sein oder auch BA.2.75.2, ein Stamm, der bisherigen neutralisierenden Antikörpern am stärksten ausweicht (Sheward et al. 2022).

### 1.2.2 Aufbau und Replikation von SARS-CoV-2

Der Erreger aus der Gattung der Betacoronaviren SARS-CoV-2 ist ein umhülltes RNA-Virus, dessen Lipiddoppelschicht sich mit der Wirtszellmembran fusioniert, um eine Zelle zu infizieren (Abbildung 2). Dies wird durch das auf der Oberfläche von SARS-CoV-2 präsentierte trimere Spike-Glykoprotein (S) ermöglicht, das mit dem Angiotensin-Converting-Enzym 2 (ACE2) Rezeptor auf der Wirtszelloberfläche interagiert, was den Eintritt der viralen RNA in Wirtszellen der oberen und unteren Atemwege ermöglicht (Shang et al. 2020).

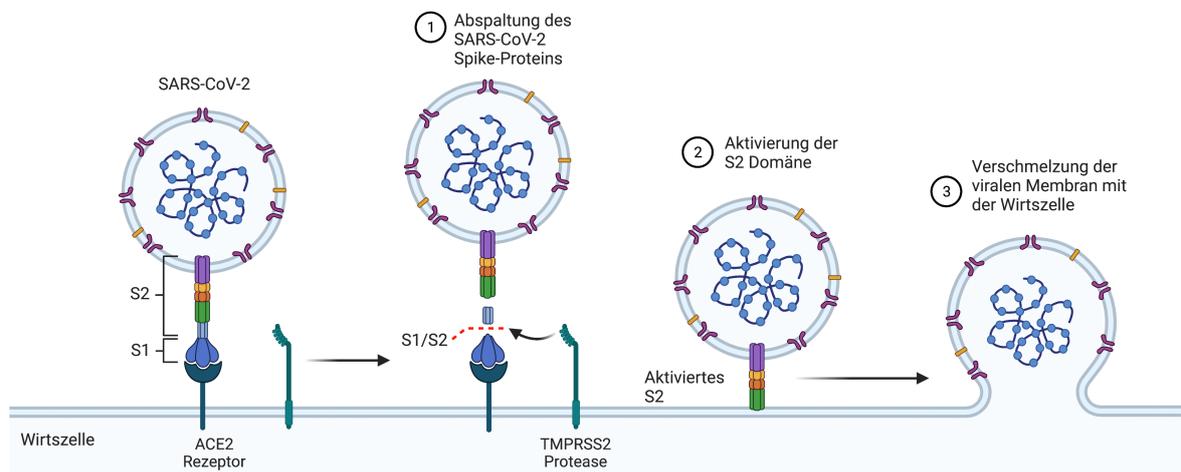


Abbildung 2: Bindung von SARS-CoV-2 mittels des Spike-Proteins an eine Wirtszelle und Eintritt der viralen RNA in die Wirtszelle. Erstellt mit BioRender.com.

Das S-Protein ist ein einkettiges Homotrimer, das aus der rezeptorbindenden S1- und der die Fusion vermittelnden S2-Untereinheit besteht (Hu et al. 2021). Die S1-Untereinheit enthält die Rezeptor-Bindungsdomäne (RBD), die S2-Domäne enthält das Fusionspeptid (Walls et al. 2020). Das membranständige S-Protein wird wohl bereits in der

virusproduzierenden Zelle durch Furin an der S1/S2-Spaltstelle prozessiert. Bei Kontakt des Virus mit der Zelle kommt es durch die Protease TMPRSS2 zur Spaltung an S2', zur S1-Dissoziation verbunden mit einer S2-Konformationsänderung und einer anschließenden Membranfusion zwischen Virushülle und Wirtszellmembran (Hu et al. 2021). Die Infektion mit Omikron ist allerdings vermehrt unabhängig von TMPRSS2 (Willett et al. 2022). Auch Cathepsin 1 ist an der S1/S2-Spaltung beteiligt (Hoffmann et al. 2020). S1 besteht aus vier Domänen, die als N-terminale Domäne (NTD), Rezeptorbindungsdomäne (RBD) und zwei C-terminale Domänen (CTDs) bezeichnet werden (Peng et al. 2021). Funktionell bindet NTD Faktoren wie AXL, L-SIGN und DC-SIGN, und RBD interagiert mit ACE2, während die CTDs das Präfusions-S2 vor einer Bindung durch Antikörper des Wirtes schützen (Kielian 2020). Die S2-Untereinheit enthält die Heptad Repeats HR1 und HR2 und ein Fusionspeptid, die S2 dazu bringen, seine Konformation zu modifizieren, um die Fusion zu initiieren und in Wirtszellen einzudringen und dadurch Infektionen verursachen (Shang et al. 2020).

### 1.2.3 Kontrolle der SARS-CoV-2-Infektion mittels T-Zellen

Während eine starke Antikörperreaktion bei Patienten, die sich mit SARS-CoV-2 infiziert haben, mit einem schweren COVID-19-Verlauf assoziiert ist (Imai et al. 2021), ist die Situation bei T-Zellen komplexer. Einerseits ist eine starke T-Zellantwort nach Infektion mit einem schwereren Verlauf korreliert (Peng et al. 2021), andererseits ist die frühe koordinierte Mobilisierung einer T-Zellantwort mit einem leichten Krankheitsverlauf verbunden (Tan et al. 2021). Ein hoher Spiegel an regulatorischen T-Zellen (Treg) war mit schwerem COVID-19 assoziiert (Neidleman et al. 2021).

Ein häufig gemessener Parameter sind neutralisierende Antikörper, welche die Wahrscheinlichkeit einer Infektion verringern und sowohl durch Infektion als auch durch die aktuellen COVID-19-Impfstoffe hervorgerufen werden (Goel et al. 2021). Solche Antikörper scheinen auch im Verlauf der Erkrankung zu deren Kontrolle beizutragen, was auch therapeutisch bei der Verabreichung von monoklonalen Antikörpern zur Behandlung von schwer an COVID-19 erkrankten Patienten genutzt wird (Miguez-Rey et al. 2022).

Die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort nach einer SARS-COV-2-Infektion ist zeitlich koordiniert. So können CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bereits nach zwei bis vier Tage nach dem Auftreten der Symptome nachgewiesen werden (Tan et al. 2021) und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bereits nach einem Tag (Tan et al. 2021) während die Bildung von Antikörpern fünf bis 15 Tagen dauert (Long et al. 2020). Es wurde auch untersucht, wie lange nach einer natürlichen SARS-CoV-2 Infektion die humorale und zelluläre Immunität anhält. CD4<sup>+</sup>- und

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gehen zunächst nach einer Halbwertszeit von drei bis fünf Monaten zurück (Cohen et al. 2021; Dan et al. 2021), stabilisieren sich jedoch später (Goel et al. 2021). Die Zahl von Gedächtnis-B-Zellen steigt in den ersten Monaten nach Infektion noch an (Goel et al. 2021). Die IgG-Antworten gegen Spike in den ersten sechs Monaten nach Infektion werden als stabil beschrieben (Dan et al. 2021).

Es gibt aber auch Unterschiede innerhalb der hervorgerufenen T-Zellantwort nach einer SARS-CoV-2 Infektion. Bei 90-100 % der rekonvaleszenten Patienten wurden SARS-CoV-2-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gebildet, wobei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nur in etwa 70 % der rekonvaleszenten Patienten nachgewiesen werden konnten (Grifoni et al. 2020; Cohen et al. 2021). Innerhalb der CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation überwiegen Typ-1-T-Helferzellen (Th1) und folliculäre T-Helferzellen (Tfh) (Tincati et al. 2020). Th1-Zellen unterstützen die Generierung von CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten (Ridge, Di Rosa, and Matzinger 1998), produzieren Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und sind direkt oder indirekt antiviral wirksam. Tfh-Zellen interagieren mit B-Zellen, induzieren deren Ig-Klassenwechsel und sind somit wichtig für die Bildung effektiver virusspezifischer Antikörper vom Typ IgG oder IgA (Baumjohann and Fazilleau 2021).

Allerdings können bei einer anhaltender Virusinfektion T-Zellen in einen Erschöpfungszustand fallen. CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Erschöpfung beinhaltet den Verlust von Interleukin-2 (IL-2), Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und IFN- $\gamma$ -Produktion und einen allmählichen Verlust der Proliferationsfähigkeit. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können auch erschöpft sein, was einen Verlust der Effektorfunktion bewirkt (Mishra et al. 2022). Die Häufigkeit erschöpfter SARS-CoV-2-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen war bei COVID-19-Patienten mit leichter Erkrankung im Vergleich zu Patienten mit schwerer Erkrankung erhöht (Khanolkar 2021). Auch zeigten diese Patienten weniger Zytotoxizität der T-Zellen und niedrigere Entzündungswerte. Diese Studie präsentierte zudem das Ergebnis, dass es bei Patienten mit einer schweren Erkrankung eine starke Beeinträchtigung bei der Erzeugung einer robusten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Gedächtnisantwort gab (Khanolkar 2021). Und es konnte gezeigt werden, dass die Häufigkeit der erschöpften CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei Patienten mit einer schweren Infektion erhöht war (Zheng et al. 2020). Generell ist Lymphopenie ein häufiges Merkmal von schwerem COVID-19 und ist oft mit schlechten Überlebenschancen für diese Patienten verbunden (Huang and Pranata 2020).

#### 1.2.4 Immunevasion von SARS-CoV-2

Das Spektrum von T-Zellepitopen und T-Zellspezifitäten bei SARS-CoV-2 ist hoch divers. Eine Metaanalyse von Arbeiten, in denen über SARS-CoV-2-Epitope berichtet wurde,

wurde im Juli 2021 veröffentlicht und verzeichnete insgesamt 382 verschiedene CD4<sup>+</sup>- und 1052 CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope aus 25 Studien (Grifoni et al. 2021). Die meisten davon stammten aus einer umfassenden Analyse mit dem sensitiven AIM-Assay (activation induced marker) (Tarke et al. 2021). Es stellt sich die Frage, ob und in welchem Umfang SARS-CoV-2 dieser T-Zellantwort durch Mutation von Epitopen ausweichen kann, sei es auf der Ebene der Population oder einzelner Patienten.

Es gibt eine Reihe von Hinweisen auf eine solche Immunevasion gegenüber T-Zellen durch SARS-CoV-2-Varianten, sowohl auf Epitopebene als auch in Bezug auf die Gesamtreaktivität. Tarke et al (2021) fanden heraus, dass die Gesamtreaktivität von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei Rekonvaleszenten und geimpften Personen gegen B.1.351 (Beta) um 14 % bzw. 22 % und die Reaktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen CAL.20 C (eine südkalifornische Variante) um 10 % verringert gesunken ist. Nur 7 % der zuvor identifizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope und 3 % der CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope waren in dieser Studie in verschiedenen VOCs mutiert (Tarke et al. 2021). Eine neuere Studie berichtete, dass die Gesamtantwort der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) gegen B.1.1.529 (Omikron) bei rekonvaleszenten und geimpften Personen um 16 % bzw. 9 % im Vergleich zu der Reaktion auf den Wildtypvirus zurückging; die von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sank um 30 % bzw. 8 % (Gao et al. 2022). Das Phänomen wurde auch auf der Ebene einzelner Epitope untersucht. Eine Publikation von de Silva et al. 2021 untersuchte 360 T-Zell-Epitope und identifizierte sieben immundominante Epitope, die seltene Varianten in globalen SARS-CoV-2-Sequenzdaten aufwiesen. Sie stellten polyklonale CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zelllinien gegen jedes dieser Wildtyp-Sequenz-Epitope her und konnten feststellen, dass es bei sechs der Varianten zu einem vollständigen Verlust der Reaktionsfähigkeit der T-Zelllinien kam (de Silva et al. 2021). Eine besonders detaillierte Analyse zu einem dominanten HLA-A\*02:01-restringierten Epitop zeigte, dass immunevasive Mutationen in Europa in diesem Epitop immer wieder auftraten, jedoch nie mehr als 2 % der zirkulierenden Stämme eines Landes betrafen (Dolton et al. 2022).

Bislang ist nicht bekannt, ob sich eine T-Zell-Immunevasion durch Mutation bestimmter Epitope in anderen Fällen stärker auf dominante zirkulierende Stämme ausgewirkt hat als in diesem Beispiel (Dolton et al. 2022). Im Moment sieht es so aus, als würden T-Zellen die Evolution des Virus in der Bevölkerung weit weniger stark beeinflussen als neutralisierende Antikörper. Dies könnte allerdings bei der Evolution des Virus innerhalb einzelner immunsupprimierter Langzeitpatienten ganz anders sein (Munnink et al. 2022). Es ist gut vorstellbar, dass bei der Verbreitung des Virus in der Bevölkerung (bei Vorliegen einer Vorimmunität) der stärkste Evolutionsdruck von neutralisierenden Antikörpern ausgeht, die bereits in situ in den Atemwegen vorhanden sind und eine Infektion von vornherein verhindern können. Nicht jedoch von T-Zellen, die erst aktiv werden können,

wenn das Virus bereits Zellen des Körpers infiziert hat und diese zudem noch an den Ort des Geschehens rekrutiert werden müssen. Bei einer langzeitinfizierten Person könnte dagegen die Mutation nur weniger T-Zellepitope einer Virusmutante einen Selektionsvorteil verschaffen, besonders, wenn die Person ein eingeschränktes T-Zellrepertoire hat, das nur T-Zellen gegen wenige Epitope des Virus enthält. Dieser Frage widmete sich eines der Teilprojekte dieser Doktorarbeit.

### 1.3 Aufgabenstellung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Doktorarbeit war die Charakterisierung von T-Zellantworten gegen die beiden weitverbreiteten humanpathogenen Viren HHV-6 und SARS-CoV-2.

Es sollten zum einen T-Zellen gegen ein bereits in Vorarbeiten ermitteltes, immundominantes CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitop (DFK) von HHV-6B aus dem Antigen U86 funktionell näher charakterisiert werden. Insbesondere sollte die Erkennung von HHV-6B und anderer verwandter Roseoloviren getestet werden. Auch sollten T-Zellklone und T-Zelllinien dieser Spezifität hergestellt und ihre Reaktion auf infizierte Zellen getestet werden.

Im zweiten Teil sollte die T-Zellantwort gegen die beiden wenig untersuchten, aber vielversprechenden HHV-6B-Antigene U38 und U41 von Grund auf und HLA-unabhängig untersucht werden. Dazu sollten mittels Peptidbibliotheken T-Zelllinien und T-Zellklone hergestellt werden, deren Epitopspezifität und HLA-Restriktion ermittelt werden und ihr funktionelles Repertoire charakterisiert werden, einschließlich der Erkennung infizierter Zielzellen. Es sollten Hinweise gefunden werden, ob diese Antigene antiviral protektiv sein könnten, und wie die T-Zellantwort gegen sie zusammengesetzt ist.

Der letzte Teil dieser Arbeit konzentrierte sich auf das neue Coronavirus SARS-CoV-2. Hier sollte als erstes Teilprojekt auf der Basis eines vorhandenen Datensatzes zu SARS-CoV-2-Mutationen in einer Patientin mit einer schweren Langzeiterkrankung die Hypothese getestet werden, ob ein Teil der Mutationen durch Immunevasion gegenüber CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten zu erklären war. Dazu sollten SARS-CoV-2-spezifische T-Zellkulturen etabliert und diese gegen mögliche T-Zellepitope in ihrer Wildtyp- und Mutanten-Version getestet werden.

Das zweite Teilprojekt basierte auf einer Kohorte von SARS-CoV-2-geimpften Krebspatienten. Hier sollte getestet werden, ob die Impfung auch bei solchen Patienten eine virusspezifische T-Zellantwort hervorruft und inwieweit sich diese von der T-Zellantwort von gesunden Geimpften unterscheidet.

Ein weiterführendes Ziel der Aufgabenstellung war die Erarbeitung eines größeren Wissensstandes zur T-Zellimmunität gegen die zwei weitverbreiteten Viren HHV-6 und SARS-CoV-2, um in Zukunft beispielsweise epitopspezifische T-Zell-basierte Immuntherapien, Impfungen, Diagnose- und Monitoringverfahren entwickeln oder weiterentwickeln zu können.

## 2 Materialien

### 2.1 Zellen und Zelllinien

#### 2.1.1 Probanden und Ethik

Es wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von gesunden Spendern HLA-Typen (siehe Tabelle 2) mit ihrem informierten Einverständnis gemäß der Erklärung von Helsinki des Weltärztebundes zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen asserviert. Ein positives Ethikvotum der lokalen Ethikkommission lag vor (Ethikkommission bei der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München, Projektnummer 17-455).

Aus den so gewonnenen PBMCs der Spender wurden zum einen T-Zelllinien angesetzt, aus denen im Weiteren dann monoklonale T-Zellkulturen hergestellt wurden. Es wurden auch CD40-aktivierte B-Zellkulturen („B-Blasten“, kurz BBL), EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (LCL) und mini-EBV-transformierte lymphoblastoide Zelllinien (mini-LCL) von diesen Spendern angesetzt und weiter kultiviert.

Tabelle 2: HLA-Typen der in dieser Arbeit untersuchten Spender. Für einige Spender ist anstelle eines einzelnen HLA-Allels der NMDP-Code (National Marrow Donor Program) der ermittelten Gruppen von HLA-Allelen angegeben.

Spender	HLA			HLA				
	A*	B*	C*	DRB	DQA	DQB	DPA	DPB
<b>0102</b>	01:01 02:01	39:06 44:02	07:02 07:04	1*0404 1*1101				
<b>0111</b>	25:01 68:01	07:02 44:02	05:01 07:02	1*12:01 1*15:01		1*03:01 1*06:02		1*04:01 1*05:01
<b>0108</b>	01:01 03:01	07:02 08:01	07:01 07:02	1*15:01		1*06:02		1*04:01
<b>0113</b>	01:01 26:01	35:01 57:01	04:01 06:02	1*07:01 1*11:04 3*0202 4*0101	1*0201 1*0505	1*02:02 1*03:01		1*04:01 1*04:02
<b>0124</b>	03:01 30:02	49:01 51:01	07:01 15:02	1*0404 1*0701		1*0202 1*0302		1*0401 1*1401
<b>0308</b>	02:01 03:01	07:02 39:01	07:02 12:03	1*11:01 1*15:01 3*02:02 5*01:01	1*01:02 1*05:05	1*03:01 1*06:02		1*04:01 1*04:02
<b>0313</b>	01:01 02:01	08:01 44:02	05:01 07:01	1*09:01 1*15:01		1*03:03 1*06:02		
<b>0502</b>	01:01 32:01	07:02 51:01	07:02 15:02	1*08:01 1*15:01		1*04:02 1*06:02		1*03:FYKD 1*04:ADCGE
<b>0506</b>	02:01 33:01	14:02 51:01	02:02 08:02	1*04:03 1*07:01		1*02:02 1*03:04		1*02:01 1*04:02
<b>0607</b>	02:01 26:01	15:01 44:03	03:03 04:01	1*07:01 1*12:01 3*02:02 4*01:01		1*02:02 1*03:01		1*04:01 1*13:01

Spender	HLA			HLA				
	A*	B*	C*	DRB	DQA	DQB	DPA	DPB
0506	02:01	14:02	02:02	1*04:03		1*02:02		1*02:01
	33:01	51:01	08:02	1*07:01		1*03:04		1*04:02
0607	02:01	15:01	03:03	1*07:01		1*02:02		1*04:01
	26:01	44:03	04:01	1*12:01		1*03:01		1*13:01
				3*02:02				
				4*01:01				
0610	02:01	18:01	01:02	1*11:01				
	24:02	51:01	12:03	1*11:04				
1001	03:BUVE	35:BEZX	04:KBG	1*01:01	1*01:SXYS	1*05:01	1*01:03	1*04:01
	25:01							
1004	11:01	35:03	03:04	1*04:08		1*03:04		
	31:01	40:01	12:03	1*13:01		1*06:03		
1107	02:05	07:02	07:01	1*11:02		1*03:01		1*03:01
	03:01	49:01	07:02	1*15:01		1*06:02		1*15:01
				3*02:02				
				5*01:01				
1201	01:01	07:02	07:01	1*03:01		1*02:01		1*03:01
		08:01	07:02	1*15:01		1*06:02		1*04:01
				3*01:01				
				5*01:01				
1213	02:01	14:01	04:01	1*01:02		1*03:02		1*02:01
	03:01	35:01	08:02	1*04:01		1*05:01		1*04:01
				4*01:03				
1314	02:01	44:03	03:02	1*03:01		1*02:01		1*03:01
	23:01	58:01	04:01	1*11:04		1*03:01		1*04:02
1613	02:01	18:01	04:01	1*11:01	1*01:02	1*03:01		1*03:01
	25:01	35:01	12:03	1*15:01	1*05:09	1*06:02		1*23:01
				3*02:02				
				5*01:01				
1902	02:01	27:ADJRJ	01:02	1*01:01		1*03:01		1*04:01
	24:02	44:ADJSE	05:01	1*04:01		1*05:01		1*04:01
2313	01:01	08:01	07:01	1*03:01	1*03:03	1*02:01		1*03:01
	34:02	14:01	08:02	1*04:05	1*05:01	1*03:02		1*04:01
				3*01:01				
				4*01:03				

## 2.1.2 Zelllinien und Zellkulturen

Neben den in Tabelle 2 gelisteten Spendern, aus denen verschiedene Lymphozytenkulturen hergestellt wurden, wurden auch Zelllinien verwendet, die bereits länger in vitro verwendet werden (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4).

Tabelle 3: Permanente Zelllinien. Zellen der hier beschriebenen Typen wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Zelllinie	Spezifikation
<b>DG-75</b>	B-Zelllinie, die aus Metastasen eines humanen Burkitt's Lymphom entnommen wurde.
<b>J-Jhan</b>	Eine humane lymphoide T-Zelllinie, die von einer Jurkat-Zelllinie abstammt.
<b>LL8</b>	L929, die stabil mit humanem CD40L transfiziert wurden, dienen als Stimulator-Zellen für die B-Zellimmortalisierung (Rancan et al. 2015).
<b>Sup-T1</b>	T-Zellen, die aus einem non-Hodgkins Lymphom isoliert wurden.

Tabelle 4: Primäre Zellkulturen und sonstige Zelllinien. Zellen der hier beschriebenen Typen wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

Zelllinie	Spezifikation
<b>B-Blasten (BBL)</b>	Mittels der CD40-Stimulation immortalisierte humane B-Zellen (Wiesner et al. 2008).
<b>LCL</b>	Lymphoblastoide Zelllinie, die mit B95.8 infiziert wurde. Eine transformierte humane B-Zelle.
<b>Mini-LCL (mLCL)</b>	B-Zellen, die mit dem mini-EBV (Kempkes et al. 1995) transformiert wurden und so alle latenten Proteine, aber nicht lytischen Proteine von EBV exprimieren.

## 2.1.3 Bakterienstämme

Für Standardplasmide wurde DH5 $\alpha$  verwendet, für große EBV-Konstrukte DH10B (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Zur Herstellung und Vermehrung von Plasmiden wurden folgende *E. coli* Stämme verwendet.

Stamm	Genotyp
<b>E. coli DH5<math>\alpha</math></b>	F-, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA
<b>E. coli DH10B</b>	F-, mcrA, D (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80dlacZ M15, DlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, D (ara, leu)7697, galU, galK, l-, rpsL, nupG

## 2.1.4 Verwendete Virenstämme

Tabelle 6: Zur Infektion von PHA-aktivierten CD4-T-Zellen wurden die folgenden drei Virusstämme verwendet. Zwei der der Stämme wurden freundlicherweise von der HHV-6-Foundation zur Verfügung gestellt, der dritte von der NCPV (National Collection of Pathogenic Viruses) käuflich erworben.

Abkürzung	Bezeichnung	Batch	Bereitgestellt durch
HHV-6A AJ	Wildtyp-HHV-6A Stamm AJ	#643	Ablashi, DV. HHV-6 Foundation (USA)
HHV-6B HST	Wildtyp-HHV-6B Stamm HST	NCPV #355	UK Health Protection Agency, Nat. Collection of Pathogenic Viruses, Salisbury (UK)
HHV-7 JI	Wildtyp-HHV-7 Stamm JI	H10-850	Ablashi, DV. HHV-6 Foundation (USA)

## 2.2 Plasmide

Tabelle 7: Eine Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Merkmale.

Stamm	Beschreibung
<b>MP71Gpre</b>	Retroviraler Vektor mit GFP-Markergen unter MPSC-LTR- Kontrolle. Zusätzlich wurde es ergänzt durch ein posttranskriptionelles, regulatorisches Element (PRE-Element) und einer modifizierten mRNA Spleißregion (mSS) des Murmeltier-Hepatitisvirus.
<b>pCMV-HLA-A*02:01, pCMV-HLA-A*03:01</b>	Rekombinante HLA-Klasse-I-Expressionsplasmide. Die Expression des HLA-Gens wird jeweils durch den Immediate-Early-Enhancer und - Promotor von HCMV kontrolliert werden. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Josef Mautner (Helmholtz Zentrum München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.
<b>pCMV-HLA-DRB1*11:01, pCMV-HLA-DRB1*15:01, pCMV-HLA-DRB5*01:01</b>	Rekombinante HLA-Klasse-I-Expressionsplasmide. Die Expression des HLA-Gens wird jeweils durch den Immediate-Early-Enhancer und - Promotor von HCMV kontrolliert werden. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Josef Mautner (Helmholtz Zentrum München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

## 2.3 Peptide

### 2.3.1 Peptidbibliotheken

Die Peptide aus dieser Arbeit wurden alle von der Firma JPT (Berlin) in einer Reinheit von 70 % hergestellt. Alle lyophilisierten Einzelpeptide wurden für die spätere in vitro Verwendung in einer Konzentration von 10 mg/ml in DMSO gelöst. Aus diesen Einzelpeptiden wurden neben sogenannten Gesamtpools, die aus allen Einzelpeptiden eines Antigens bestanden, auch sogenannte Subpools hergestellt. Diese setzten sich laut einer selbstdefinierten Matrix aus einer Untergruppe von Einzelpeptiden zusammen (siehe 2.3.2).

Für die spätere Stimulation von Antigen-präsentierenden Zellen wurde eine Standardkonzentration von 1 µg/ml der Peptidpools verwendet.

Peptide werden im Verlauf dieser Arbeit dann entweder mit ihren ersten drei oder vier Aminosäuren (AS) abgekürzt, abhängig davon, ob sie einen HLA-Klasse-I restringierten T-Zellrezeptor (drei AS) oder HLA-Klasse-II restringierten T-Zellrezeptor erkennen (vier AS). Die Peptidbibliotheken bestehend aus den Antigenen U38 und U41 wurden zur Identifizierung von spezifischen T-Zellen verwendet. Hierbei besteht jede Bibliothek aus Einzelpeptiden mit einer Länge von 15 AS, wobei sich die benachbarten Einzelpeptide um vier AS jeweils überlappen. Da die Antigene U38 und U41 jeweils aus über 200 Einzelpeptiden bestanden, wurden hier die Gesamtpools in einen Gesamtpool 1 (G1) und einen Gesamtpool 2 (G2) unterteilt, um in vitro keine unerwünschten Effekte aufgrund der so erhöhten DMSO-Konzentration in den Zellen zu beobachten.

Das Antigen U38 besteht insgesamt aus 255 Einzelpeptiden. Diese wurden für die späteren Experimente in die zwei Gesamtpools G1 und G2 mit jeweils 144 und 111 Einzelpeptiden aufgeteilt (Tabelle 8). Ebenso wurden auch die Einzelpeptide des Antigens U41 in zwei Gesamtpools mit 144 Einzelpeptiden für G1 und 137 Einzelpeptiden für G2 aufgeteilt (Tabelle 9).

Tabelle 8: Die U38-Peptidbibliothek besteht aus 255 Einzelpeptiden und deckt die ganze Aminosäuresequenz des Antigens U38 (HHV-6B Stamm Z29) ab.

Bezeichnung	Sequenz
U38 Peptid 1	H-MDSVFFNFYLEANR-OH
U38 Peptid 2	H-SFFNFYLEANRLKKK-OH
U38 Peptid 3	H-PYLEANRLKKKSRSS-OH
U38 Peptid 4	H-ANRLKKKSRSSYIRI-OH
U38 Peptid 5	H-KKKSRSSYIRILPRG-OH
U38 Peptid 6	H-RSSYIRILPRGIMHD-OH
U38 Peptid 7	H-IRILPRGIMHDGAAG-OH
U38 Peptid 8	H-PRGIMHDGAAGLIKD-OH
U38 Peptid 9	H-MHDGAAGLIKDVCS-OH
U38 Peptid 10	H-AAGLIKDVCSDEPRM-OH
U38 Peptid 11	H-IKDVCSDEPRMFYRD-OH
U38 Peptid 12	H-CDSEPRMFYRDRQYL-OH
U38 Peptid 13	H-PRMFYRDRQYLLSKE-OH
U38 Peptid 14	H-YDRQYLLSKEMTWP-OH
U38 Peptid 15	H-QYLLSKEMTWPSLDR-OH
U38 Peptid 16	H-SKEMTWPSLDRVRSK-OH
U38 Peptid 17	H-TWPSLDRVRSKDYDH-OH
U38 Peptid 18	H-LDRVRSKDYDHTRMK-OH
U38 Peptid 19	H-RSKDYDHTRMKFHYI-OH
U38 Peptid 20	H-YDHTRMKFHYIDAVE-OH
U38 Peptid 21	H-RMKFHYIDAVETLMF-OH
U38 Peptid 22	H-HYIDAVETLMFTDSI-OH
U38 Peptid 23	H-AVETLMFTDSIENLP-OH
U38 Peptid 24	H-LMFTDSIENLPPQYR-OH
U38 Peptid 25	H-DSIENLPPQYRHFVI-OH
U38 Peptid 26	H-NLPPQYRHFVIPSQT-OH
U38 Peptid 27	H-QYRHFVIPSQTVIRM-OH
U38 Peptid 28	H-FVIPSQTVIRMFGRS-OH
U38 Peptid 29	H-SQTVIRMFGRSEDEGE-OH
U38 Peptid 30	H-IRMFGRSEDEGEICV-OH
U38 Peptid 31	H-GRSEDEGEICVNVFG-OH
U38 Peptid 32	H-DGEICVNVFGQESY-OH
U38 Peptid 33	H-ICVNVFGQEQYFYCE-OH
U38 Peptid 34	H-VFGQEQYFYCEVDG-OH
U38 Peptid 35	H-EQYFYCEVDGKSLK-OH
U38 Peptid 36	H-YCEVDGKSLKNTN-OH
U38 Peptid 37	H-VDGKSLKATINLML-OH
U38 Peptid 38	H-SLKATINLMLTGEV-OH
U38 Peptid 39	H-TINLMLTGEVKMCS-OH
U38 Peptid 40	H-LMLTGEVKMCSFYI-OH
U38 Peptid 41	H-GEVKMCSFVIEPAD-OH
U38 Peptid 42	H-MCSFVIEPADKLSL-OH
U38 Peptid 43	H-FVIEPADKLSLYGYN-OH
U38 Peptid 44	H-PADKLSLYGYNANTV-OH
U38 Peptid 45	H-LSLYGYNANTVNLFO-OH
U38 Peptid 46	H-GYNANTVNLFKVSF-OH
U38 Peptid 47	H-NFVNLFKVSFGNFY-OH
U38 Peptid 48	H-NLFKVSFGNFYVSQR-OH
U38 Peptid 49	H-VSFGNFYVSQRIGI-OH
U38 Peptid 50	H-NFYVSQRIGIKLQNE-OH
U38 Peptid 51	H-SQRIGIKLQNEGFVV-OH
U38 Peptid 52	H-GRIGIKLQNEGFVYED-OH
U38 Peptid 53	H-QNEGFVYEDVDLVL-OH
U38 Peptid 54	H-FVYEDVDLVLTRFF-OH
U38 Peptid 55	H-EIDVDLVLTRFFVDNG-OH
U38 Peptid 56	H-DVLTRFFVDNGFLSF-OH
U38 Peptid 57	H-REFVDNGFLSEFGYN-OH
U38 Peptid 58	H-DNGFLSEFGYWNKKY-OH
U38 Peptid 59	H-LSFGYWNKKYIPQD-OH
U38 Peptid 60	H-WYNKKYIPQDMGKG-OH
U38 Peptid 61	H-KKYIPQDMGKGSNLE-OH
U38 Peptid 62	H-PQDMGKGSNLEVEIN-OH
U38 Peptid 63	H-GKGSNLEVEINCHVS-OH
U38 Peptid 64	H-NLEVEINCHVSDVLS-OH
U38 Peptid 65	H-EINCHVSDVLSLENV-OH
U38 Peptid 66	H-HVSDVLSLENVNWL-OH
U38 Peptid 67	H-LVLSLENVNWLPGCW-OH
U38 Peptid 68	H-ENVNWLPGCWGCFDI-OH
U38 Peptid 69	H-WPLYGCWCFDIEICLG-OH
U38 Peptid 70	H-GCWCFDIEICLQNGN-OH
U38 Peptid 71	H-FDIEICLQNGNFPDA-OH
U38 Peptid 72	H-CLQNGNFPDAENLIG-OH
U38 Peptid 73	H-NGNFPDAENLIDIVI-OH
U38 Peptid 74	H-PDAENLIDIVIQISV-OH
U38 Peptid 75	H-NLGDIVIQISVVSFD-OH
U38 Peptid 76	H-IVIQISVVSFDTEGD-OH
U38 Peptid 77	H-ISVVSFDTEGDRDER-OH
U38 Peptid 78	H-SFDTEGDRDERHFT-OH
U38 Peptid 79	H-EGDRDERHFTLGTCC-OH
U38 Peptid 80	H-DERHFTLGTCCQID-OH
U38 Peptid 81	H-LFTLGTCCQIDGVHI-OH
U38 Peptid 82	H-GTCCQIDGVHIYEF-AH
U38 Peptid 83	H-QIDGVHIYEFASEFE-OH
U38 Peptid 84	H-VHIYEFASEFELLG-OH
U38 Peptid 85	H-EFASEFELLGFFFF-OH

Bezeichnung	Sequenz
U38 Peptid 86	H-EFELLGFFFFIFLRIB-OH
U38 Peptid 87	H-LLGFFIFLRIESPEF-OH
U38 Peptid 88	H-FIFLRIESPEFITGY-OH
U38 Peptid 89	H-RIESPEFITGYNNIN-OH
U38 Peptid 90	H-PEFITGYNNINFDLK-OH
U38 Peptid 91	H-TGNINNFDFLKYLCI-OH
U38 Peptid 92	H-INNFDFLKYLCIRMDK-OH
U38 Peptid 93	H-DLKYLCIRMDKIYHY-OH
U38 Peptid 94	H-LCIRMDKIYHYEIGC-OH
U38 Peptid 95	H-MDKIYHYEIGCFSKL-OH
U38 Peptid 96	H-YHYEIGCFSKLKNKG-OH
U38 Peptid 97	H-IGCFSKLKNKGIGIS-OH
U38 Peptid 98	H-SKLKNKGIGISVPHE-OH
U38 Peptid 99	H-NGKIGISVPHEQYKK-OH
U38 Peptid 100	H-GISVPHEQYKKGFLQ-OH
U38 Peptid 101	H-PHEQYKKGFLQOQTK-OH
U38 Peptid 102	H-YKKGFLQOQTKVFTS-OH
U38 Peptid 103	H-FLQOQTKVFTSGVLY-OH
U38 Peptid 104	H-QTKVFTSGVLYDMY-OH
U38 Peptid 105	H-FTSVLYDMYFVYS-OH
U38 Peptid 106	H-VLYDMYFVYSKAIT-OH
U38 Peptid 107	H-DMYFVYSKAITAQN-OH
U38 Peptid 108	H-VYSKAITAQNKLDT-OH
U38 Peptid 109	H-KITAQNKLDTIAKI-OH
U38 Peptid 110	H-QNYKLDTIAKICLQQ-OH
U38 Peptid 111	H-LDTIAKICLQQEKEQ-OH
U38 Peptid 112	H-AKICLQQEKEQLSYK-OH
U38 Peptid 113	H-LQEQEQLSYKEIPK-OH
U38 Peptid 114	H-KEQLSYKEIPKFKIS-OH
U38 Peptid 115	H-SYKEIPKFKISGSPG-OH
U38 Peptid 116	H-IPKFKISGSPGRAVV-OH
U38 Peptid 117	H-FISGSPGRAVVGKYC-OH
U38 Peptid 118	H-PSGRAVVGKYCLQDS-OH
U38 Peptid 119	H-AVVVGKYCLQDSVLV-OH
U38 Peptid 120	H-KYCLQDSVLVRLFK-OH
U38 Peptid 121	H-QDSVLVRLFKQINY-OH
U38 Peptid 122	H-LVRLFKQINYHYEV-OH
U38 Peptid 123	H-LFKQINYHYEVAEVA-OH
U38 Peptid 124	H-INYHYEVAEVARLAH-OH
U38 Peptid 125	H-YEVAEVARLAHVTAH-OH
U38 Peptid 126	H-EVARLAHVTAARCVV-OH
U38 Peptid 127	H-LAHVTAARCVVFEQQ-OH
U38 Peptid 128	H-TARCVVFEQQKFI-F-OH
U38 Peptid 129	H-VVFEQQKFIFFCIL-OH
U38 Peptid 130	H-GQKFIFFCILTEAK-OH
U38 Peptid 131	H-KIFFCILTEAKRRNM-OH
U38 Peptid 132	H-CILTEAKRRNMLPS-OH
U38 Peptid 133	H-EAKRRNMLPSMVSS-OH
U38 Peptid 134	H-RNMLPSMVSSHNRQ-OH
U38 Peptid 135	H-LPSMVSSHNRQIGY-OH
U38 Peptid 136	H-VSSHNRQIGYKGTAT-OH
U38 Peptid 137	H-NRQIGYKGTATVLEP-OH
U38 Peptid 138	H-IGYKGTATVLEPKTY-OH
U38 Peptid 139	H-GATVLEPKTYVAVP-OH
U38 Peptid 140	H-LEPKTYVAVPVVVF-OH
U38 Peptid 141	H-TGYVAVPVVDFDQS-OH
U38 Peptid 142	H-AVPTVDFDQSLYPS-OH
U38 Peptid 143	H-VVDFDQSLYPSIMMA-OH
U38 Peptid 144	H-FQSLYPSIMMAHNL-OH
U38 Peptid 145	H-YPSIMMAHNLCYSTL-OH
U38 Peptid 146	H-MAHNLCYSTLVLDL-OH
U38 Peptid 147	H-NLCYSTLVLDLRQIA-OH
U38 Peptid 148	H-STLVLDLRQIAGLSE-OH
U38 Peptid 149	H-LDERQIAGLSESDIL-OH
U38 Peptid 150	H-QIAGLSESDILTVKL-OH
U38 Peptid 151	H-LSESDILTVKLGDET-OH
U38 Peptid 152	H-DILTVMKLGDETHRFV-OH
U38 Peptid 153	H-VKLGDETHRFVPCV-OH
U38 Peptid 154	H-DETHRFVPCVRESV-OH
U38 Peptid 155	H-RFVPCVRESVLSGL-OH
U38 Peptid 156	H-PCVRESVLSGLKDW-OH
U38 Peptid 157	H-ESVLSGLKDWLAKR-OH
U38 Peptid 158	H-GSLKDWLAKRREVK-OH
U38 Peptid 159	H-KDWLAKRREVKAEQM-OH
U38 Peptid 160	H-AKRREVKAEQMNCSD-OH
U38 Peptid 161	H-EVKAEQMNCSDPMMK-OH
U38 Peptid 162	H-EMKNCSDPMMKLLLD-OH
U38 Peptid 163	H-CSDPMMKLLLDKQK-OH
U38 Peptid 164	H-MMKLLLDKQKALKT-OH
U38 Peptid 165	H-LLDKQKALKTTCNS-OH
U38 Peptid 166	H-KQKALKTTCNSVYGV-OH
U38 Peptid 167	H-LKTCNSVYGVGTAA-OH
U38 Peptid 168	H-NSVYGVGTAAHGLL-OH
U38 Peptid 169	H-YGVGTAAHGLLPCVA-OH
U38 Peptid 170	H-GAAHGLLPCVAASA-OH

Bezeichnung	Sequenz
U38 Peptid 171	H-GLLPCVAASAASVTCL-OH
U38 Peptid 172	H-CVAASAASVTCLGREN-OH
U38 Peptid 173	H-AASVTCLGREMLCST-OH
U38 Peptid 174	H-TCLGREMLCSTVDVYV-OH
U38 Peptid 175	H-REMLCSTVDVYVNSKM-OH
U38 Peptid 176	H-CSTVDVYVNSKMSEQ-OH
U38 Peptid 177	H-DVYVNSKMSEQEFCF-OH
U38 Peptid 178	H-SKMSEQEFCFCEELG-OH
U38 Peptid 179	H-SEQEFCFCEELGLTAS-OH
U38 Peptid 180	H-FCEELGLTASDFTGD-OH
U38 Peptid 181	H-LGLTASDFTGDLKVE-OH
U38 Peptid 182	H-ASDFTGDLKVEVYIG-OH
U38 Peptid 183	H-TGDLKVEVYIGDFTDS-OH
U38 Peptid 184	H-KVEVYIGDFTDSIFMS-OH
U38 Peptid 185	H-YIGDFTDSIFMSVRNM-OH
U38 Peptid 186	H-TDSIFMSVRNMNANES-OH
U38 Peptid 187	H-FMSVRNMNANESLRR-OH
U38 Peptid 188	H-RNMNANESLRRIAFMI-OH
U38 Peptid 189	H-NESLRRIAFMIATAH-OH
U38 Peptid 190	H-RIAATAFMIATAHITDRL-OH
U38 Peptid 191	H-PIATAFMIATAHITDRL-OH
U38 Peptid 192	H-KHITDRLFKSPKLE-OH
U38 Peptid 193	H-TRLFKSPKLEFKI-OH
U38 Peptid 194	H-KSEFKLEFKILCPLI-OH
U38 Peptid 195	H-KLEFKLEFKILCPLILIC-OH
U38 Peptid 196	H-EKILCPLILICCKRY-OH
U38 Peptid 197	H-CPLILICCKRYIGRQ-OH
U38 Peptid 198	H-LICKRYIGRQDSDL-OH
U38 Peptid 199	H-KRYIGRQDSDLIFK-OH
U38 Peptid 200	H-GRQDSDLIFKGVLD-OH
U38 Peptid 201	H-DSLIFKGVLDLVRKT-OH
U38 Peptid 202	H-IFKGVLDLVRKTSCEP-OH
U38 Peptid 203	H-VDLVRKTSCEPVGKVO-OH
U38 Peptid 204	H-RKTSCEPVGKGVKTD-OH
U38 Peptid 205	H-CDVPGKGVKDVLDL-OH
U38 Peptid 206	H-KGVKGVKDVLDLDFDE-OH
U38 Peptid 207	H-RDVLDFDEEVQTAOE-OH
U38 Peptid 208	H-DLDFDEEVQTAOAAE-OH
U38 Peptid 209	H-FDEEVQTAOAAEVFSHM-OH
U38 Peptid 210	H-VQTAOAAEVFSHMTQT-OH
U38 Peptid 211	H-AVEFSHMTQTLRDE-OH
U38 Peptid 212	H-SHMTQTLRDEGVVPO-OH
U38 Peptid 213	H-QTLRDEGVVPGVHKH-OH
U38 Peptid 214	H-RDEGVVPGVHKILRR-OH
U38 Peptid 215	H-VPVGHKILRRILCKA-OH
U38 Peptid 216	H-IHKILRRILCKARELE-OH
U38 Peptid 217	H-LRILCKARELEFQNR-OH
U38 Peptid 218	H-CKARELEFQNRADNR-OH
U38 Peptid 219	H-BELEFQNRADNRHLVR-OH
U38 Peptid 220	H-QNRADNRHLVMSLVL-OH
U38 Peptid 221	H-DVRHLVMSLVLKVEV-OH
U38 Peptid 222	H-LMLVMSLVLKVEVAAYK-OH
U38 Peptid 223	H-SVLKVEVAAYKQPNL-OH
U38 Peptid 224	H-KEVAAYKQPNLAHLS-OH
U38 Peptid 225	H-AYKQPNLAHLSVIRR-OH
U38 Peptid 226	H-PNLAHLSVIRRAAQR-OH
U38 Peptid 227	H-HLSVIRRAAQRKEEII-OH
U38 Peptid 228	H-IRRAAQRKEEIPNVG-OH
U38 Peptid 229	H-AQRKEEIPNVGDRIM-OH
U38 Peptid 230	H-EEIPNVGDRIMVYLI-OH
U38 Peptid 231	H-NVGDRIMVYLIAPST-OH
U38 Peptid 232	H-RIMVYLIAPSTGNKQ-OH
U38 Peptid 233	H-VLIAPSTGNKQTHNY-OH
U38 Peptid 234	H-PSGNKQTHNYELAE-OH
U38 Peptid 235	H-NKQTHNYELAEADPNY-OH
U38 Peptid 236	H-HNYELAEADPNYVLEH-OH
U38 Peptid 237	H-LAEDPNYVLEHKIPI-OH
U38 Peptid 238	H-PNYVLEHKIPIHAEK-OH
U38 Peptid 239	H-LEHKIPIHAEKYFDQ-OH
U38 Peptid 240	H-PIHAEKYFDQILKA-OH
U38 Peptid 241	H-AEKYFDQIKAVTNA-OH
U38 Peptid 242	H-PDQIKAVTNAISPI-OH
U38 Peptid 243	H-IAVTNAISPIPFKTI-OH
U38 Peptid 244	H-NAISPIPFKTIIDKK-OH
U38 Peptid 245	H-SPIPFKTIIDKKEKLL-OH
U38 Peptid 246	H-PKTIIDKKEKLLLYLL-OH
U38 Peptid 247	H-KEKLLLYLLPMKYV-OH
U38 Peptid 248	H-KLLLYLLPMKYVYLD-OH
U38 Peptid 249	H-LYLLPMKYVYLDLTF-OH
U38 Peptid 250	H-LPMKYVYLDLTFSAIA-OH
U38 Peptid 251	H-KVYLDLTFSAIAEVM-OH
U38 Peptid 252	H-AVEFSHMTQTLRQEQ-OH
U38 Peptid 253	H-SHMTQTLRQEQVPGVHKH-OH
U38 Peptid 254	H-QTLRQEQVPGVHKH-OH
U38 Peptid 255	H-REQVPGVHKILRR-OH

Tabelle 9: Die U41-Peptidbibliothek besteht aus 281 Einzelpeptiden, und deckt die ganze Aminosäuresequenz des Antigens U41 aus HHV-6B (Z29) ab.

Bezeichnung	Sequenz	Bezeichnung	Sequenz	Bezeichnung	Sequenz
U41 Peptid 1	H-MADENETVVSAPVST-0H	U41 Peptid 95	H-LLRSLSPFNALSSLT-0H	U41 Peptid 189	H-YFKNKVHKHKNPLSG-0H
U41 Peptid 2	H-NETVVSAPVSTAANI-0H	U41 Peptid 96	H-LSFCNALSSTLDEVY-0H	U41 Peptid 190	H-NVKKHKNPLSGCISF-0H
U41 Peptid 3	H-VSAPVSTAAMVYVPE-0H	U41 Peptid 97	H-NALSSLTEDVYNDNR-0H	U41 Peptid 191	H-KKNPLSGCISFLFK-0H
U41 Peptid 4	H-VSTAAMVYVPEKRE-0H	U41 Peptid 98	H-SLTEDVYNDNRKIK-0H	U41 Peptid 192	H-LSGCISFLFKYHDK-0H
U41 Peptid 5	H-AWVYVPEKRELLDV-0H	U41 Peptid 99	H-DVYNDNRKIKCDST-0H	U41 Peptid 193	H-ISFLFKYHDKLFPN-0H
U41 Peptid 6	H-VPEKRELLDVSVL-0H	U41 Peptid 100	H-DNRKIKCDSTSGKD-0H	U41 Peptid 194	H-LFKYHDKLFPNVKIS-0H
U41 Peptid 7	H-EKRELLDVSVLSLME-0H	U41 Peptid 101	H-IKCDSTSGKDKFS-0H	U41 Peptid 195	H-HDKLFPNVKISCLLE-0H
U41 Peptid 8	H-LDVSVLSLMEKNSF-0H	U41 Peptid 102	H-DSTSGKDKFSANHL-0H	U41 Peptid 196	H-FPNVKISCLLEWQRF-0H
U41 Peptid 9	H-SVLSLMEKNSFPVSI-0H	U41 Peptid 103	H-GKDKFSANHLAYAC-0H	U41 Peptid 197	H-KISCLLEWQRFLLNN-0H
U41 Peptid 10	H-LMEKNSFPVSIPLML-0H	U41 Peptid 104	H-KFSANHLAYACATCF-0H	U41 Peptid 198	H-LLEWQRFLLNNVPTK-0H
U41 Peptid 11	H-NSFPVSIPLMLNLT-0H	U41 Peptid 105	H-NHLAYACATCPQLLS-0H	U41 Peptid 199	H-QRFLLNNVPTKLDIG-0H
U41 Peptid 12	H-VISPLMLNLTVDNF-0H	U41 Peptid 106	H-YACATCPQLLSYVVM-0H	U41 Peptid 200	H-LNNVPTKLDIGNPEE-0H
U41 Peptid 13	H-LLMLNLTVDNFSTV-0H	U41 Peptid 107	H-TCPQLLSYVVMNLR-0H	U41 Peptid 201	H-PKLDIGNPEEVKTF-0H
U41 Peptid 14	H-LTVDNFSTVTKPTI-0H	U41 Peptid 108	H-LLSYVVMNLRMSVY-0H	U41 Peptid 202	H-DIGNPEEVKTFIKFA-0H
U41 Peptid 15	H-NDFTVTKPTITNFG-0H	U41 Peptid 109	H-VVMNLRMSVYNAGN-0H	U41 Peptid 203	H-PEEVKTFIKFAFSIT-0H
U41 Peptid 16	H-TVTKPTITNFGGTL-0H	U41 Peptid 110	H-LNRMSVYNAGNAYE-0H	U41 Peptid 204	H-KTFIKFAFSITNVD-0H
U41 Peptid 17	H-TPTNFGGTLTKTI-0H	U41 Peptid 111	H-SVYNAGNAYEYLYN-0H	U41 Peptid 205	H-KFAFSITNVDYDEI-0H
U41 Peptid 18	H-NFGGTLTKTISFMP-0H	U41 Peptid 112	H-AGNAYEYLYNHVNC-0H	U41 Peptid 206	H-SITNVDYDEIDIDQ-0H
U41 Peptid 19	H-TILTKTISFMPVCF-0H	U41 Peptid 113	H-YEYLYNHVNCANL-0H	U41 Peptid 207	H-TYDEIDIDIQECL-0H
U41 Peptid 20	H-KTISFMPVCFPHGT-0H	U41 Peptid 114	H-YNHVNCANLCEFC-0H	U41 Peptid 208	H-IDIDIQECLSTPI-0H
U41 Peptid 21	H-FMPVCFPHGTQGL-0H	U41 Peptid 115	H-VNCANLCEFCQK-0H	U41 Peptid 209	H-DIQECLSTPIQCY-0H
U41 Peptid 22	H-CFFPHGTQGLVMAE-0H	U41 Peptid 116	H-ANLCEFCQKQCSQ-0H	U41 Peptid 210	H-ECLSTPIQCYHNK-0H
U41 Peptid 23	H-HGTQGLVMAEDHGD-0H	U41 Peptid 117	H-EFCQKQCSQIGTA-0H	U41 Peptid 211	H-TPIQCYHNKFLSAL-0H
U41 Peptid 24	H-QLVMAEDHGDRLR-0H	U41 Peptid 118	H-GKCCQSIGTAMVRV-0H	U41 Peptid 212	H-CYHNKFLSALGPH-0H
U41 Peptid 25	H-MAEDHGDRLRCEQT-0H	U41 Peptid 119	H-QSIGTAMVRVTRL-0H	U41 Peptid 213	H-NKFLSALGFHDYLS-0H
U41 Peptid 26	H-HGDRLRCEQTRKQF-0H	U41 Peptid 120	H-GTAMVRVTRVPAIF-0H	U41 Peptid 214	H-SALGFHDYLSLHGL-0H
U41 Peptid 27	H-IRLCEQTRKQFLQS-0H	U41 Peptid 121	H-VRVTRVPAIPKRVK-0H	U41 Peptid 215	H-FHDYLSLHGLTSKL-0H
U41 Peptid 28	H-EQTRKQFLQSEFV-0H	U41 Peptid 122	H-TRVPAIPKRVKKEPL-0H	U41 Peptid 216	H-LTSLHGLTSKLVTON-0H
U41 Peptid 29	H-QKFLQSEFVPTARK-0H	U41 Peptid 123	H-AIPKRVKKEPLVMS-0H	U41 Peptid 217	H-HGLTSKLVTONPVLF-0H
U41 Peptid 30	H-LQSEFVPTARKVIDI-0H	U41 Peptid 124	H-NVKKEPLVMSFERY-0H	U41 Peptid 218	H-SKLVTONPVLPVVL-0H
U41 Peptid 31	H-EVPTARKVIDIKALC-0H	U41 Peptid 125	H-EPLVMSFERYAEV-0H	U41 Peptid 219	H-TQNPVLPVVLKQPF-0H
U41 Peptid 32	H-ARKVIDIKALCSAVG-0H	U41 Peptid 126	H-MSMFERYAEVDILG-0H	U41 Peptid 220	H-VLPVVLKQPKFSS-0H
U41 Peptid 33	H-IDIKALCSAVGKAD-0H	U41 Peptid 127	H-SRYAEVDILGSEFR-0H	U41 Peptid 221	H-VLQPKFSSIQEY-0H
U41 Peptid 34	H-ALCSAVGKADSVIC-0H	U41 Peptid 128	H-AEVDILGSEFRKFS-0H	U41 Peptid 222	H-QPKFSSIQEYLVVV-0H
U41 Peptid 35	H-AVGKADSVICHVAC-0H	U41 Peptid 129	H-ILGSEFRKFSVLSK-0H	U41 Peptid 223	H-FSSIQEYLVVVKLV-0H
U41 Peptid 36	H-DADSVICHVACNFG-0H	U41 Peptid 130	H-FGRKFSVLSKIKGD-0H	U41 Peptid 224	H-QEYLVVVKLVLDGV-0H
U41 Peptid 37	H-VICHVACNFGKELL-0H	U41 Peptid 131	H-FVSKIKGDKQNT-0H	U41 Peptid 225	H-VVVKLVLDGVNPFV-0H
U41 Peptid 38	H-VACNFGKELLFAGL-0H	U41 Peptid 132	H-LKEIKGDKQNTLSLD-0H	U41 Peptid 226	H-KLVLDGVNPFVIA-0H
U41 Peptid 39	H-NGKELLFAGLLIFC-0H	U41 Peptid 133	H-GDKQNTLSLDGRKF-0H	U41 Peptid 227	H-DGVNPFVIA-0H
U41 Peptid 40	H-ELLFAGLLIFCQVGE-0H	U41 Peptid 134	H-QNTLSLDGRKFVSI-0H	U41 Peptid 228	H-NPFVIA-0H
U41 Peptid 41	H-AGLLIFCQVGEIQV-0H	U41 Peptid 135	H-SLDGRKFVSIQDFY-0H	U41 Peptid 229	H-ASLKEPNFTIPTS-0H
U41 Peptid 42	H-IPCQVGEIQVQVGE-0H	U41 Peptid 136	H-GKFSVSIQDFYCKNS-0H	U41 Peptid 230	H-KEPNFTIPTSRS-0H
U41 Peptid 43	H-EQVQVGEIQVSVCK-0H	U41 Peptid 137	H-SQVQVGEIQVSVCK-0H	U41 Peptid 231	H-FQVQVGEIQVSVCK-0H
U41 Peptid 44	H-QVQVGEIQVSVCK-0H	U41 Peptid 138	H-DYCKNSVSIQDFY-0H	U41 Peptid 232	H-FTSRSVSIQDFY-0H
U41 Peptid 45	H-GEYSVCKVPLYSATL-0H	U41 Peptid 139	H-KNSVSIQDFY-0H	U41 Peptid 233	H-SVSIQDFY-0H
U41 Peptid 46	H-CVKVPLYSATLPE-0H	U41 Peptid 140	H-IDPVTGEDTFNVRK-0H	U41 Peptid 234	H-FGLTLEKFSVLANRE-0H
U41 Peptid 47	H-PLYSATLPEETETIS-0H	U41 Peptid 141	H-TGEDTFNVRKKEFV-0H	U41 Peptid 235	H-LEKFSVLANREYF-0H
U41 Peptid 48	H-ATLPEETETISLSSC-0H	U41 Peptid 142	H-TFNVRKKEFVSIH-0H	U41 Peptid 236	H-VLANREYFQGLG-0H
U41 Peptid 49	H-ETEETISLSSCETFI-0H	U41 Peptid 143	H-RSKKEFVSIHGLTQ-0H	U41 Peptid 237	H-NREYFQGLG-0H
U41 Peptid 50	H-TISLSSCETFIQERG-0H	U41 Peptid 144	H-DFVSIHGLTQCEB-0H	U41 Peptid 238	H-FQGLG-0H
U41 Peptid 51	H-SSCETFIQERGFEL-0H	U41 Peptid 145	H-IIHGLTQCEBECVSR-0H	U41 Peptid 239	H-QLGIGGSDVNRNL-0H
U41 Peptid 52	H-EFIQERGFELPALSE-0H	U41 Peptid 146	H-LTQCEBECVSRIV-0H	U41 Peptid 240	H-IGGSDVNRNLPTSS-0H
U41 Peptid 53	H-ERGFELPALSETLEF-0H	U41 Peptid 147	H-IEECVSRIVEMRRT-0H	U41 Peptid 241	H-GVNRNLPTSSALQD-0H
U41 Peptid 54	H-FLPALSETLEFYVFT-0H	U41 Peptid 148	H-VSRIVEMRRTQTPR-0H	U41 Peptid 242	H-NLPTSSALQDFRFM-0H
U41 Peptid 55	H-LSETLEFYVFTSWGT-0H	U41 Peptid 149	H-IVEMRRTQTPREIE-0H	U41 Peptid 243	H-TSSALQDFRFMRQT-0H
U41 Peptid 56	H-LFYVFTSWGTTLRF-0H	U41 Peptid 150	H-RRTQTPREIENCLQ-0H	U41 Peptid 244	H-LQDFRFMRQRTIIAT-0H
U41 Peptid 57	H-VFTSWGTTLRFNSKT-0H	U41 Peptid 151	H-TPREIENCLQSFNV-0H	U41 Peptid 245	H-RFMQRTIIATFSE-0H
U41 Peptid 58	H-WGTTLRFNSKTLID-0H	U41 Peptid 152	H-QIENCLQSFNVDTF-0H	U41 Peptid 246	H-QTIATFSEVIVK-0H
U41 Peptid 59	H-LRFNSKTLIDAGLKR-0H	U41 Peptid 153	H-CLQSFNVDTFPYATA-0H	U41 Peptid 247	H-IATFSEVIVKVR-0H
U41 Peptid 60	H-NTKTLIDAGLQKQ-0H	U41 Peptid 154	H-FNVDTFPYATFSPF-0H	U41 Peptid 248	H-FSEVIVKVRRETIM-0H
U41 Peptid 61	H-LIDAGLQKQFTQDQ-0H	U41 Peptid 155	H-TPYATFSPFLFTA-0H	U41 Peptid 249	H-IVKVRRETIMDFTE-0H
U41 Peptid 62	H-GLQKQFTQDQVTKL-0H	U41 Peptid 156	H-ATFSPFLTFAYYK-0H	U41 Peptid 250	H-VRRETIMDFTEVVG-0H
U41 Peptid 63	H-FTQDQVTKLAFK-0H	U41 Peptid 157	H-SPLTFAYYKVLTV-0H	U41 Peptid 251	H-TIMDFTEVVGKVL-0H
U41 Peptid 64	H-GEQVTKLAFKHTYLG-0H	U41 Peptid 158	H-TFAYYKVLTVLQNL-0H	U41 Peptid 252	H-DTEVVGKVLIVEN-0H
U41 Peptid 65	H-VKLAFTYLGISGG-0H	U41 Peptid 159	H-YKVLTVLQNLALIV-0H	U41 Peptid 253	H-VKGLVIVENLND-0H
U41 Peptid 66	H-PHKTYLISGQKISA-0H	U41 Peptid 160	H-LTVLQNLALIVASG-0H	U41 Peptid 254	H-VLIVENLNDIDPE-0H
U41 Peptid 67	H-YLISGQKISAVEK-0H	U41 Peptid 161	H-QNLALIVASGHVDR-0H	U41 Peptid 255	H-VENLNDIDPELLII-0H
U41 Peptid 68	H-SGQKISAVEKDFML-0H	U41 Peptid 162	H-LIVASGHVDRPCT-0H	U41 Peptid 256	H-TNDIDPELLIIAIVM-0H
U41 Peptid 69	H-ISAVEKDFMLVDSV-0H	U41 Peptid 163	H-SGHVDRPCTGNSIS-0H	U41 Peptid 257	H-DEPELLIIAIVMRDR-0H
U41 Peptid 70	H-EKDFMLVDSVVEL-0H	U41 Peptid 164	H-VDRPCTGNSISKVL-0H	U41 Peptid 258	H-LIAIVMRDRDKPT-0H
U41 Peptid 71	H-LMLVDSVVELTFSH-0H	U41 Peptid 165	H-CTGNSISKVLQVQY-0H	U41 Peptid 259	H-EVMRDRDKPTMDM-0H
U41 Peptid 72	H-DSVVELTFSHVAEY-0H	U41 Peptid 166	H-SISKVLQVQYQSLY-0H	U41 Peptid 260	H-DREDKPTMDMLFV-0H
U41 Peptid 73	H-TELSHVAEYLDV-0H	U41 Peptid 167	H-WLVQYQSLYGFTHS-0H	U41 Peptid 261	H-KPTMDMLFVVDGR-0H
U41 Peptid 74	H-FSHVAEYLDVSDV-0H	U41 Peptid 168	H-QVQYQSLYGFTHSSY-0H	U41 Peptid 262	H-DMMLFVVDGREALA-0H
U41 Peptid 75	H-AEYLDVSDVSDV-0H	U41 Peptid 169	H-LYGFTHSSYKRGFL-0H	U41 Peptid 263	H-FVDGREALAASIM-0H
U41 Peptid 76	H-DSVSDVSDVSDV-0H	U41 Peptid 170	H-FHSSYKRGFLNTRT-0H	U41 Peptid 264	H-GREALAASIMLKN-0H
U41 Peptid 77	H-DPSQIMNDFWPIIR-0H	U41 Peptid 171	H-YLKGFLNTRTVKVA-0H	U41 Peptid 265	H-LAASIMLKNLHLDV-0H
U41 Peptid 78	H-IMNDFWPIIRNSET-0H	U41 Peptid 172	H-GFLNTRTVKVASND-0H	U41 Peptid 266	H-IMLKNLHLDVMDV-0H
U41 Peptid 79	H-NDWPIIRNSETHAER-0H	U41 Peptid 173	H-TRTVKVASNDMEQI-0H	U41 Peptid 267	H-LNLDVMDVMDVFSIA-0H
U41 Peptid 80	H-IRNSETHAERMAQL-0H	U41 Peptid 174	H-KVASNDMEQILDCC-0H	U41 Peptid 268	H-VMDVMDVFSIANLQ-0H
U41 Peptid 81	H-SETHAERMAQLTNL-0H	U41 Peptid 175	H-NVDMQILDCCLYKS-0H	U41 Peptid 269	H-VRDFSIANLQVFEA-0H
U41 Peptid 82	H-AERMAQLTNLKLHLS-0H	U41 Peptid 176	H-EQILDCCLYKSGVY-0H	U41 Peptid 270	H-SIANLQVFEAVSSN-0H
U41 Peptid 83	H-AQLTNLKLHLSHLA-0H	U41 Peptid 177	H-DDCLYKSGVYKVTI-0H	U41 Peptid 271	H-LQVFEAVSSNDAPV-0H
U41 Peptid 84	H-NLKLHLSHLAVLIF-0H	U41 Peptid 178	H-YKSGVYKVTIQA-0H	U41 Peptid 272	H-FAVSSNDAPVDFV-0H
U41 Peptid 85	H-HLSHLAVLIFAFNS-0H	U41 Peptid 179	H-KYVVTIQA-0H	U41 Peptid 273	H-SSNDAPVDFVDFSE-0H
U41 Peptid 86	H-HLAVLIFAFNSILYC-0H	U41 Peptid 180	H-TIQA-0H	U41 Peptid 274	H-APVDFSEILAEEDD-0H
U41 Peptid 87	H-LIFAFNSILYCSKLA-0H	U41 Peptid 181	H-AKLCRLSMQCLRDF-0H	U41 Peptid 275	H-DFSEILAEEDDQAS-0H
U41 Peptid 88	H-FNSILYCSKLAFLFN-0H	U41 Peptid 182	H-RLSMQCLRDFRIK-0H	U41 Peptid 276	H-ILAEEDDQASVGLK-0H
U41 Peptid 89	H-LYCSKLAFLFNKVF-0H	U41 Peptid 183	H-QCLRDFRIKRNPF-0H	U41 Peptid 277	H-EDDQASVGLKCEDE-0H
U41 Peptid 90	H-KLAFLFNKVFQNSV-0H	U41 Peptid 184	H-DFRIKRNPFKNSK-0H	U41 Peptid 278	H-ASVGLKCEDETFE-0H
U41 Peptid 91	H-IPNVKQNSVMTQ-0H	U41 Peptid 185	H-KNRFKNSKSTAHN-0H	U41 Peptid 279	H-VLKCEDETFEDEM-0H
U41 Peptid 92	H-KQNSVMTQELLLR-0H	U41 Peptid 186	H-FKNSKSTAHNPFY-0H	U41 Peptid 280	H-CEDETFEDEMFKK-0H
U41 Peptid 93	H-NSVMTQELLLRSLF-0H	U41 Peptid 187	H-SKTAHNPYFKRN-0H	U41 Peptid 281	H-TETETDEMFKKRN-0H
U41 Peptid 94	H-TQELLLRSLFCNAL-0H	U41 Peptid 188	H-HNPFKRNKKN-0H		

### 2.3.2 Peptidmatrizen zur Bestimmung der Epitopspezifikation

Die Einzelpeptide der beiden Antigene U38 und U41 wurden für die spätere Analyse der Spezifität der T-Zellen in Matrizen angeordnet, sodass jedes Einzelpeptid sowohl in einem vertikalen als auch in einem horizontalen Subpool vorkam. Auch hier wurden die Peptide erneut in einer Konzentration von 1 mg/ml je Peptid verwendet.

*Tabelle 10: Die beiden Matrizen zum Antigen U38, für den Gesamtpool Teil 1 mit den ersten 144 Einzelpeptiden, und des Gesamtpool Teil 2 mit den restlichen 111 Einzelpeptiden. Jedes Peptid erscheint sowohl in einem der vertikalen (Subpools 1-12 und 25-36) als auch in einem der horizontalen Subpools (Subpools 13-24 und 37-46).*

Gesamtpool 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
24	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144

Gesamtpool 2	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
38	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
39	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
40	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
41	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
42	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216
43	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228
44	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
45	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252
46	253	254	255									

*Tabelle 11: Das Antigen U41 besitzt ebenfalls zwei Matrizen für G1 und G2. Der Gesamtpool Teil 1 besteht aus den ersten 144 Einzelpeptiden, und der Gesamtpool Teil 2 aus den restlichen 137 Einzelpeptiden. Jedes Peptid kommt sowohl in einem der vertikalen (Subpools 1-12 und 25-36) als auch in einem der horizontalen Subpools (Subpools 13-24 und 37-48) vor.*

Gesamtpool 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
24	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144

Gesamtpool 2	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
37	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
38	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
39	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
40	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
41	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
42	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216
43	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228
44	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
45	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252
46	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264
47	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276
48	277	278	279	280	281							

## 2.4 Antikörper und HLA/Peptid-Multimere

Tabelle 12: Alle in dieser Arbeit verwendeten Antikörper mit der Angabe des Herstellers und des genutzten Verdünnungsfaktors für durchflusszytometrische Färbungen (zum Protokoll 3.2.1).

Spezifität	Klon	Fluorochrom	Hersteller	Stock [µg/ml]	Verdünnung
<b>CD3</b>	HIT3a	PE-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg	50	1:100
<b>CD3</b>	HIT3a	Alexa 700	Biolegend, San Diego (USA)	500	1:100
<b>CD4</b>	RPA-T4	PE	Pharmingen, Heidelberg	12,5	1:100
<b>CD4</b>	RPA-T4	ALEXA 488	Biolegend, San Diego (USA)	100	1:100
<b>CD4</b>	BW 135/80	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach	100	1:100
<b>CD8</b>	RPA-T8	APC	Biolegend, San Diego (USA)	200	1:250
<b>CD8</b>	RPA-T8	APC/H7	Biolegend, San Diego (USA)	200	1:100
<b>CD8</b>	RPA-T8	APC	Biolegend, San Diego (USA)	200	1:100
<b>CD14</b>	HCD14	FITC	Biolegend, San Diego (USA)	400	1:100
<b>CD27</b>	M-T271	APC	Biolegend, San Diego (USA)	50	1:50
<b>CD28</b>	CD28.2	PE-Cy5	Biolegend, San Diego (USA)	100	1:100
<b>CD45 RA</b>	HI100	Pacific Blue	Biolegend, San Diego (USA)	25	1:50
<b>CD57</b>	HNK-1	Pacific Blue	Biolegend, San Diego (USA)	50	1:50
<b>CD197/CCR7</b>	G043H7	PE-Cy7	Biolegend, San Diego (USA)	400	1:100
<b>HLA-DP</b>	B7/21	ungefärbt	Leinco Technologies, St.Louis (USA)	1000	10 µg/ml
<b>HLA-DQ</b>	SPV-L3	ungefärbt	BIO-RAD, München	1000	10 µg/ml
<b>HLA-DR</b>	L243	ungefärbt	Biolegend, San Diego (USA)	1000	40 µg/ml

Zur immunomagnetischen Isolation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden anti-human-CD4-MicroBeads (Herstellernummer 130-045-201) verwendet und von der Firma Miltenyi Biotec (Bergisch-Gladbach) bezogen.

Tabelle 13: Die verwendeten HLA-B\*08:01-Monomere mit ihren gebundenen Peptidsequenzen wurden von der Firma Immudex (Dänemark) hergestellt.

Peptidsequenz	HLA-Klasse-I	Konjugat	Hersteller	Verdünnung
DFK SKY LTL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
EAR RRL AEM	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
EGR ERI LTV	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
EFK SKY LTL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
EFK SKF STL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
EMR LRM IL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
FEK ERF LFL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
ILY GPLT RI	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
LLC GNL LIL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
MAR EKN DL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
NVK HKK NPL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
QTR QKF HL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
RAK FKQ LL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
SPR SRL QQL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
TNK IKE QL	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl
VVK GKV LSI	HLA-B*08:01	PE	Immudex, Kopenhagen (Dänemark)	0,5 µl

## 2.5 Reagenzien

Tabelle 14: Verwendete Chemikalien, Reagenzien, Enzyme und Puffer.

Artikel	Spezifikation	Hersteller
Agarose	je nach Anwendungszweck	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Ampicillin	Einsatz 30 µg/ml in Agarplatten	Carl Roth, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	verschiedene Verwendungen	Berlin-Chemie, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	≥ 99,8 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
DNA-Größenstandard	100 bp, 1 kb	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Einfriermedium	50 % (v/v) FCS 40 % (v/v) Medium 10 % (v/v) DMSO	frisch hergestellt

<b>ELISA pNPP-Substrat (5x)</b>	5 mg/ml p-NPP, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 50 % Diethanolamin pH 9,5	selbst hergestellt
<b>ELISA Waschpuffer</b>	0.05 % Tween 20 in 1x PBS	frisch hergestellt
<b>Ethanol</b>	≥ 99.8 % p.a., Einsatz 35% in Wasser für ELISpot-Plattenaktivierung	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Ethidiumbromid</b>	gebrauchsfertig	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<b>FACS Clean</b>	gebrauchsfertig	BD Biosciences, Heidelberg
<b>FACS Fixierlösung</b>	2 % Paraformaldehyd in 1 x PBS	frisch hergestellt
<b>FACS Flow</b>	gebrauchsfertig	BD Biosciences, Heidelberg
<b>FACS Puffer</b>	2 % FCS in 1 x PBS	frisch hergestellt
<b>HCl</b>	32 %	Merck, Darmstadt
<b>Heparin-Natrium</b>	5,000 IE/ml	Rotexmedica, Trittau
<b>Ionomycin-Kalziumsalz</b>	gebrauchsfertig	Tocris Bioscience, Bristol (Vereinigtes Königreich)
<b>Isopropanol</b>	≥ 99.9 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Kompensationsbeads, anti-mouse</b>	gebrauchsfertig	BD Biosciences, Heidelberg
<b>Magnesiumsulfat (MgSO<sub>4</sub>)</b>	25 mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Natriumhydroxid (NaOH)</b>	≥ 99 % p.a.	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Pancoll</b>	1.077 g/ml	PAN Biotech, Aidenbach
<b>para-Nitrophenyl- phosphat (pNPP)</b>	gebrauchsfertig	Carl Roth, Karlsruhe
<b>para-Nitrophenyl- phosphat (pNPP)</b>	5 x (50 % Diethanolamin und 5 mg/ml pNPP in sterilem Wasser bei pH 9,5)	frisch hergestellt oder gelagert bei -20°C
<b>Formaldehyd (PFA)</b>	gebrauchsfertig	Carl Roth, Karlsruhe
<b>PBS Dulbecco (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>)</b>	1 x gelöst	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<b>PBS Dulbecco (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>)</b>	10 x, fest	AppliChem, Darmstadt
<b>PCR Reagenzien</b>	gebrauchsfertig	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
<b>Tetradecanoylphorbol acetate (TPA)</b>	gebrauchsfertig	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<b>Tris/HCl</b>	1 M	Carl Roth, Karlsruhe
<b>Trypanblau</b>	0,2 % Trypanblau in PBS mit 0,1 % Natriumazid gelöst	Merck, Darmstadt
<b>Türksche Lösung</b>	gebrauchsfertig	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
<b>Tween 20</b>	gebrauchsfertig	Carl Roth, Karlsruhe

## 2.6 Zellkulturreagenzien

Tabelle 15: Speziell für die Kultivierung von humanen Zellen verwendete Reagenzien.

Name	Anwendung	Hersteller	Referenznr. / LOT-Nummer
<b>DMEM</b>	Zellkulturmedium für adhärenzte Zellen	Life Technologies, Paisley (Vereinigtes Königreich)	41966-029/ verschiedene
<b>Fetales Kälberserum</b>	Nährstoff für Zellkultur	Anprotec, Bruckberg	AC-SM-0143 / AN-18537
<b>Fetales Kälberserum</b>	Nährstoff für Zellkultur	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)	F7524/ BCBT7617
<b>Fetales Kälberserum</b>	Nährstoff für Zellkultur	Bio&Sell, Feucht / Nürnberg	FCS.SAM.0500/ BS225160.5
<b>Humanserum (off-the-clot, AB, male)</b>	Nährstoff für Zellkultur	PAN Biotech, Aidenbach	P40-2701/ P-020317
<b>Opti-MEM</b>	Zellkulturmedium für Transfektion	Life Technologies, Paisley (Vereinigtes Königreich)	31985-047/ verschiedene
<b>Penicillin (10000 U/ml) / Streptomycin (10000 mg/µl)</b>	Antibiotikum	Life Technologies, Paisley (Vereinigtes Königreich)	15140-122/ verschiedene
<b>RPMI 1640</b>	Zellkulturmedium für humane Zellen	Life Technologies, Paisley (Vereinigtes Königreich)	21875-034/ verschiedene
<b>Natriumselenit (100 mM, sterilfiltriert)</b>	essenzielles Spurenelement für Zellkulturmedium	Fisher Scientific, Göteborg (Schweden)	11492021
<b>Trypsin-EDTA (0,05 %)</b>	Ablösen von adhärenzten Zellen	Life Technologies, Paisley (Vereinigtes Königreich)	25300-54/ verschiedene

Tabelle 16: Zytokine, die für die Kultivierung von einzelnen Zellpopulationen notwendig sind.

Artikel	Anwendung	Hersteller
<b>Rekombinantes humanes IL-2 (Proleukin® S)</b>	Kultivierung von T-Zellen	Novartis, Basel (Schweiz)
<b>Rekombinantes humanes IL-4</b>	Kultivierung von BBL	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
<b>Rekombinantes IFN-γ</b>	Erhöhung der MHC-Expression	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

## 2.7 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 17: In dieser Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien.

Artikel	Spezifikation	Hersteller
Einmalküvetten	Elektroporation, 0,4 cm	Bio-Rad, München
Einmalspritzen	steril, 1 ml oder 5 ml	B. Braun, Melsungen
FACS-Röhrchen	Falcon, 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg
Filtereinheit für Spritze	0,45 µm	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Flachbodenplatten	6-, 12-, 24-, 48- oder 96-well	BD Falcon, Heidelberg
Kanülen	Multifly, 21G, 240 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Kryoröhrchen	1,8 ml	NUNC, Wiesbaden
MACS Säulen	LS oder MS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Galdbach
MaxiSorp ELISA-Platten	96-well	NUNC, Wiesbaden
MultiScreen-HA ELISpot-Platten	96-well, Cellulose-Membran	Millipore, Schwalbach
MultiScreen-IP ELISpot-Platten	96-well, PVDF-Membran	Millipore, Schwalbach
Pasteurpipetten	3,2 ml, steril	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Diamond Tower Pack, 2-200 µl oder 100-1000 µl	Gilson Inc., Middleton (USA)
Pipettenspitzen	epT.I.P.S. Reloads 0,1-10 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, gestopft	10 µl, 20 µl, 200 µl oder 1000 µl	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Plastikpipetten	5 ml, 10 ml oder 25 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reagenzienreservoir	Costar, 50 ml	Corning Inc., Corning (USA)
Reaktionsgefäße	0,5, 1,5 oder 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Spritze	Infuject, 50 ml	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Zählkammer	Neubauer Improved	NanoENTek, Seoul (Südkorea)
Zellkulturflaschen	25, 75 oder 175 cm <sup>2</sup>	NUNC, Wiesbaden
Zellkulturplatte	96-well, rund	NUNC, Wiesbaden
Zellkulturplatte	96-well, spitz	Hartenstein, Würzburg
Zellsieb	100 µm	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugationsgefäß	Falcon, 15 ml oder 50 ml	Corning Inc., Corning (USA)

## 2.8 Laborausstattung

Tabelle 18: Verwendete Geräte und Laborausstattung.

Gerät	Hersteller
Bakterienschüttler iinova 4400	New Brunswick Scientific, Enfield (USA)
Bestrahlungsanlage CIX2	X-strahl, Camberley (Vereinigtes Königreich)
Bestrahlungsanlage Gammacell 40, 137Cs	Atomic Energy of Canada Limited, Ottawa (Kanada)
Durchflusszytometer Calibur	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD Biosciences, Heidelberg
Eismaschine AF 206	Scotsman, Milan (Italien)
Elektroporations-Gerät GenePulser II	BIO-RAD, München
ELISpot Reader Immunospot S6 FluoroCore M2	Cellular Technology Limited, Cleveland (USA)
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Biberach an der Riss
Gefrierschrank -80°C	Igloo Green Line 830L Telstar, Terrassa (Spanien)
Geldokumentationssystem Quantum ST4-1100/26LMX	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Gelelektrophorese Netzgerät PowerPac 200	Bio-Rad, München
Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Glasware	Schott, Mainz
Inkubator	Binder, Tuttlingen
Kühlschrank 2-8 °C	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS separator Quadro	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Monotherm Variomag, Daytona Beach (USA)
Mikroskop (invers) Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Lesegerät EL-800	BIO-TEK Instruments, Winooski (USA)
Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite F200 Pro	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Mikrotiterplatten-Waschgerät hydroSPEED	Tecan, Männedorf (Schweiz)
Mikrowelle R-202	Sharp, Osaka (Japan)
PCR-Block Biometra T gradient	Biometra, Göttingen
PCR-Block compact	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter pH 526	Xylem Analytics Germany, Weilheim
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald

<b>Pipette Transferpette (Multikanal, 20–200 µl)</b>	Brand, Wertheim
<b>Pipetten (0,1–2,0 µl, 2–20 µl, 20–200 µl, 200–1000 µl)</b>	Gilson, Mettmenstetten (Schweiz)
<b>Reinstwasseranlage</b>	Aquintus membraPure, Hennigsdorf
<b>Rollenmischer TRM-50</b>	IDL, Nidderau
<b>Sicherheitswerkbank</b>	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
<b>Spektralphotometer Nanodrop ND-1000</b>	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
<b>UV-Transilluminator UVT 400 M</b>	International Biotechnologies Inc., New Haven (USA)
<b>Vakuumpumpe</b>	Fröbel Labortechnik, Lindau
<b>Vortex Mischer Vortex-Genie 2</b>	Scientific Industries, Bohemia (USA)
<b>Wasserbad</b>	GFL, Burgwedel
<b>Zählkammer Neubauer Improved</b>	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
<b>Zentrifuge 5415 R</b>	Eppendorf, Hamburg
<b>Zentrifuge Avanti J-26 XP</b>	Beckman Coulter, Krefeld
<b>Zentrifuge Heraeus Pico 21</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
<b>Zentrifuge Rotanta 46 RSC</b>	Hettich, Tuttlingen
<b>Zentrifuge Rotanta 460 R</b>	Hettich, Tuttlingen
<b>Zentrifuge Rotina 38 R</b>	Hettich, Tuttlingen

## 2.9 Kommerzielle Kits

Tabelle 19: Kommerziell erworbene Kits.

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller</b>
<b>ELISA Assay für humanes Granzym B</b>	MABTECH, Nacka Strand (Schweden)
<b>ELISA Assay für humanes Interleukin-10</b>	MABTECH, Nacka Strand (Schweden)
<b>ELISA Assay für humanes Interferon-γ</b>	MABTECH, Nacka Strand (Schweden)
<b>ELISA Assay für humanes TNF-α</b>	MABTECH, Nacka Strand (Schweden)
<b>ELISpot für humanes Interferon-γ</b>	MABTECH, Nacka Strand (Schweden)
<b>ELISpot-Entwickler (AP Conjugate Substrate Kit)</b>	BIO-RAD Laboratories, München
<b>Endofree PlasmidMAXI-Kit</b>	Qiagen, Hilden
<b>Rneasy Mini RNA-Isolationskit</b>	Qiagen, Hilden
<b>HiPure Plasmid Maxiprep Kit</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

## 2.10 Software und Dienstleitungen

Tabelle 20: Für diese Arbeit benutzte Software.

Name	Version	Anwendung	Hersteller
<b>BD FACSDiva</b>	8.0.1	Software des Durchflusszytometers	BD Biosciences, Heidelberg
<b>EndNote</b>	X9.3.3	Literaturmanagement	Clarivate, Boston (USA)
<b>FlowJo</b>	10.5.3	Analyse der durchflusszytometrischen Daten	TreeStar Inc., Ashland (USA)
<b>i-control</b>	1.10	ELISA Messung	Tecan, Männedorf (Schweiz)
<b>Immunospot DC Professional</b>	5.1.36	Auszählung und Analyse der ELISpot-Platten	Cellular Technology Limited, Cleveland (USA)
<b>KC4</b>	2.7	ELISA Messung	BioTek, Winooski (USA)
<b>MacVector</b>	14.5.3	Nukleotid- und Proteinsequenzanalyse und Alignment	MacVector Inc., Cary (USA)
<b>Microsoft Excel</b>	15.32	Datenauswertung	Microsoft, Redmond (USA)
<b>Microsoft PowerPoint</b>	15.32	Abbildungen	Microsoft, Redmond (USA)
<b>Microsoft Word</b>	16.16.27	Verfassen dieser Arbeit	Microsoft, Redmond (USA)
<b>Prism</b>	9.2	Datenanalyse und Darstellung	GraphPad Software, La Jolla (USA)

Neben frischen Blutproben wurden PBMCs auch aus sogenannten Buffy Coats isoliert, der angereicherten Lymphozytenfraktion aus 500-ml-Standard-Blutspenden für Transfusionszwecke. Solche Buffy Coats wurden in anonymisierter Form (teils HLA-Klasse-I typisiert) vom Institut für Transfusionsmedizin der Universität Ulm bezogen.

Die serologische Bestimmung von Antikörpern gegen persistierende Viren (EBV, CMV, BKV, HHV-6) wurde in der Regel mit EDTA-Plasma vorgenommen und am Max-von-Pettenkofer-Institut (München) durchgeführt.

Die hochauflösende HLA-Typisierung aus Vollblut, isolierten PBMCs oder etablierten Zelllinien von Blutspendern erfolgte am „Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik, Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen“ (Martinsried).

Die Sanger-DNA-Sequenzierung von gereinigten PCR-Produkten wurde von Eurofins Genomics (Ebersberg) durchgeführt.

## 3 Methoden

### 3.1 Präparation und Kultur von Zellen

#### 3.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien und T-Zellklone wurden in einem Inkubator (Binder) bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und unter einer befeuchteten Atmosphäre kultiviert. Die Zellen wurden nur unter Benutzung von sterilen Materialien in Sicherheitswerkbänken der Klasse 2 bearbeitet.

Um die Zellen zu waschen oder aufzukonzentrieren wurden sie für 10 min bei Raumtemperatur und 300 x g zentrifugiert.

Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 (high glutamine) mit 7,5 % fötalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, und 100 nM Natriumselenit als Standardmedium gehalten (siehe 2.6) und je nach Art der Kultur wurden Zytokine und Hilfsstoffe zugegeben wie weiter unten erläutert. Für die Kultivierung von Primärzellen wie beispielsweise T-Zelllinien oder T-Zellklonen wurde zusätzlich 250 µg Amphotericin B zugegeben, um Hefen und mehrzelligen Pilze zu abzutöten.

Adhärente Zellen wurden in DMEM-Medium mit den oben beschriebenen Zusätzen, ohne Amphotericin B, kultiviert. Zum Ablösen adhärenter Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellkulturflasche einmal mit PBS gespült. Durch die Behandlung mit 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA in PBS für 5 min bei 37°C wurden die Zellen abgelöst, einmal mit Medium (mit Serum) gewaschen und anteilig in Vollmedium weiterkultiviert.

#### 3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt. Tote Zellen nehmen diesen Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop dunkelblau. Lebende Zellen dagegen bleiben aufgrund ihrer intakten Zellmembran ungefärbt, da hier kein Trypanblau in die Zelle gelangen kann, und erscheinen im mikroskopischen Bild somit hell leuchtend.

Es wurden 10 µl einer Zellsuspension mit 10 µl der Trypanlösung (0,2 % Trypanblau in PBS mit 0,1 % Natriumazid) vermischt und diese Mischung zum Füllen einer Neubauer-Zählkammer verwendet.

Ein Zählgitter dieser Kammer besteht aus 4 Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten. Das Volumen eines Großquadrates entspricht  $0,1 \text{ mm}^3$ . Die Zelldichte (Zellzahl pro Volumen) der Zellsuspension vor der Verdünnung mit der Trypanblaulösung berechnet sich mit folgender Formel:  $\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl/pro Großquadrat} \times 2 \times 10^4$

### 3.1.3 Kryokonservierung lebender Zellen

Zur Kryokonservierung lebender menschlicher und tierischer Zellen wurden diese zuerst für 10 min bei Raumtemperatur und  $300 \times g$  abzentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml kaltem Einfriermedium (bestehend aus 50 % Standardmedium, 40 % fötalem Kälberserum und 10 % DMSO) resuspendiert und in ein vorgekühltes 1,8-ml-Einfrierröhrchen überführt. Die eingefrorenen Zellen wurden zuerst in einen  $-80^\circ\text{C}$  Gefrierschrank und schließlich in Lagertanks mit flüssigem Stickstoff zur dauerhaften Lagerung in der Gasphase überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden diese mit mindestens auf Raumtemperatur vorgewärmtem Medium resuspendiert (mindestens 20 ml je Aliquot), zum Waschen zentrifugiert und das Pellet (je nach Zellart entsprechend) in neuem Medium mit den jeweiligen Zusätzen aufgenommen und in Kultur genommen oder anderweitig verarbeitet wie angegeben.

### 3.1.4 Etablierung von CD40-aktivierten B-Blasten

Die Herstellung von CD40-aktivierte B-Blasten (BBL) aus primären B-Zellen erfolgte unter Verwendung von CD40-Ligand-exprimierenden Mausfibroblasten (LL8) wie beschrieben (Wiesner et al. 2008; Rancan et al. 2015). Diese Stimulatorzellen wurden mit 180 Gy bestrahlt (Röntgenanlage XStrahl mit 0.5-mm-Kupferfilter und den Einstellungen 195 kV, 15 mA, 30 cm Abstand zur Quelle, ca.  $2,4 \text{ Gy/min}$ ). Dann wurden je 1 Mio. Zellen je Platte in 12-well, 24-well, 48-well oder 96-well-Flachbodenplatten ausplattiert und innerhalb einer Woche zur Weiterkultivierung der BBL verwendet.

CD40L-stimulierte B-Blasten wurden aus PBMCs generiert, indem in mehreren Replikaten je  $2,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$  oder  $1 \times 10^5$  PBMCs in einer Vertiefung einer 96-well-Flachbodenplatte mit CD40L-Zellen kokultiviert wurden. Die Replikate wurden getrennt weiter kultiviert, indem die Kulturen wöchentlich auf neue, d.h. maximal eine Woche alte Stimulatorzellplatten überführt wurden. Entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurde das Kulturvolumen vom 96-well-Format auf ein 48-, 24- und schließlich 12-

well-Format erhöht. Das Medium wurde stets mit IL-4 (2 ng/ml) und für die ersten ca. 4-5 Wochen zusätzlich mit Cyclosporin A (1 µg/ml) versetzt.

Die BBL-Kulturen wurden nach diesem Zeitraum mittels PCR (siehe 3.4.3) auf EBV getestet. Nur EBV-negative Kulturen wurden weiterverwendet. Diese wurden wöchentlich auf neue 12-well-Platten mit frischen CD40L-Zellen überführt und dabei 2-4-fach expandiert. Die LL8-Stimulatorzellen wurden parallel dazu in einer 175-cm<sup>2</sup>-Flasche in 30 ml Medium gehalten. Alle sieben Tage wurde die Zellschicht mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA durch 5-minütige Inkubation bei 37°C von dem Flaschenboden abgelöst und nach einer 1/25-Verdünnung der Zellen wurden diese in einer neuen Flasche in RPMI-1640-Standardmedium weiterkultiviert. Die verbliebenen Zellen wurden wie bereits oben beschrieben bestrahlt und ausplattiert.

### **3.1.5 Aufarbeitung und Lagerung von Patientenmaterial**

Die in Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nabelschnurblutproben wurden durch die freundliche Unterstützung der Schwestern, Hebammen und Ärzte der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Aufsicht des Oberarztes Prof. Dr. med. Christoph Hübener entnommen. Blutproben von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation wurden freundlicherweise in der Medizinischen Klinik und Poliklinik III des Universitätsklinikums Großhadern der LMU München in der José-Carreras-Transplantationseinheit unter Leitung der Oberärztin PD Dr. med. Johanna Tischer gesammelt.

Der Verwendung dieses Materials für das Forschungsprojekt wurde durch die Ethikkommission bei der Medizinischen Fakultät der LMU München zugestimmt (Projekt-Nr. 17-455, Bescheid vom 16.10.2017).

Das Nabelschnurblut wurde direkt nach Abnabelung durch Punktion der Nabelvene gewonnen und bei Raumtemperatur für bis zu 5 h in heparinisierten Spritzen gelagert. Ebenso wurde den Patienten Blut abgenommen und dieses ebenfalls in Spritzen, die Heparin enthielten, bei Raumtemperatur für bis zu 5 h zwischengelagert, bis die peripheren mononukleären Zellen daraus gewonnen wurden.

### 3.1.6 Isolierung von peripheren mononuklearen Zellen aus Vollblut

Periphere mononukleäre Zellen (PBMCs) wurden aus Blutabnahmen von freiwilligen, erwachsenen Spendern oder Patienten des Klinikums Großhadern oder aus Leukozyten-Konzentraten (Buffy coats) anonymer freiwilliger Blutspender mittels eines Dichtegradientenzentrifugationsschrittes isoliert. Mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut wurden in gleicher Weise aufgereinigt wie PBMCs aus Blutabnahmen. Buffy Coats wurden aus der Transfusionsmedizin der Universität Ulm bezogen, sie enthalten die Mehrzahl der mononukleären Zellen aus 500-ml-Blutspenden sowie residuale Erythrozyten, suspendiert in einem Volumen von etwa 30 ml.

Für die Aufreinigung der mononukleären Zellen wurde das Blut 1:1 mit 1 x PBS verdünnt. Die Buffy Coats wurden, da diese die PBMCs in höherer Konzentration enthalten, bis zu 5:1 mit 1 x PBS verdünnt. In einem 50 ml Reaktionsgefäß wurden dann 35 ml verdünntes Blut vorgelegt und mit 12 ml Ficoll-Lösung der Dichte 1,077 g/ml vorsichtig unterschichtet. Anschließend wurde das Blut bei Raumtemperatur für 30 min bei 1 000 x g zentrifugiert, hierbei wurde die jeweils niedrigste Beschleunigungsstufe für das Anlaufen und auch das Abbremsen der Zentrifuge ausgewählt. Durch diesen Zentrifugationsschritt trennen sich die Blutbestandteile nach ihrer Dichte auf, sodass sich ganz unten im Reaktionsgefäß die Erythrozytenschicht befindet. Darüber liegt die Ficoll-Schicht, auf deren Oberfläche eine weißliche Schicht aus PBMCs schwimmt und an die leicht gelbliche Plasmaschicht grenzt, welche sich in der oberen Hälfte des Reaktionsgefäßes befindet (siehe Abbildung 3).

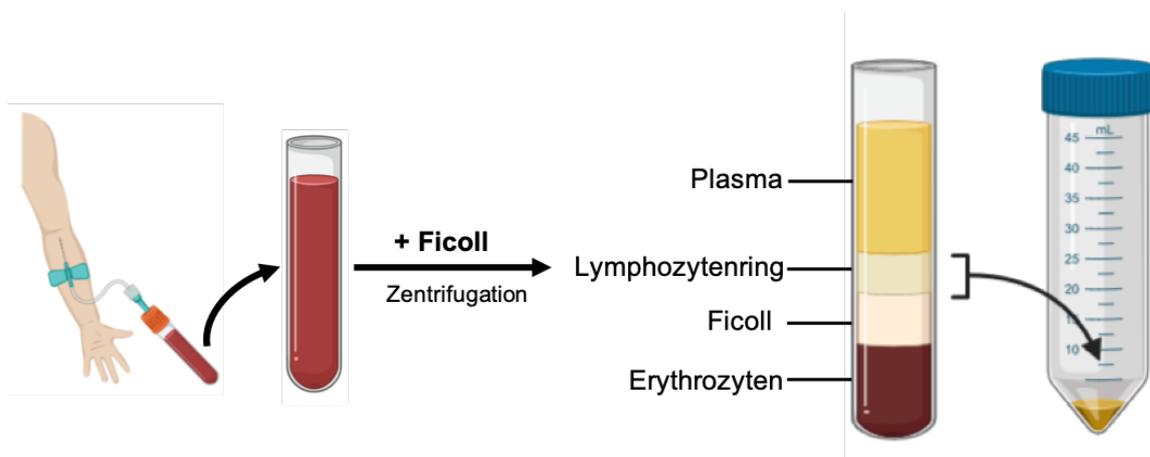


Abbildung 3: Arbeitsschritte zur Isolierung von PBMCs aus Vollblut. Zuerst wird Blut eines Spenders entnommen. Dieses wird mit Ficoll unterschichtet und zentrifugiert. Dadurch trennt sich das Vollblut in mehrere Schichten auf: Das fast klare Plasma, das u.a. Antikörper enthält, der weißliche Lymphozytenring, das restliche Ficoll und eine pelletartige, abgesunkene Schicht aus Erythrozyten. Im letzten Schritt wird der Lymphozytenring, der die benötigten PBMCs enthält, vorsichtig mittels einer Pipette entnommen. Erstellt mit BioRender.com.

Nachdem etwa 15 ml der Plasmaschicht abgenommen und verworfen oder für weitere Analysen in ein neues Gefäß überführt wurde, wurden die PBMCs vorsichtig mittels einer

10-ml-Pipette von der Oberfläche der Ficoll-Schicht abgesaugt und in ein neues 50-ml-Gefäß überführt. Hier wurden sie um das mindestens 5-fache mit 1 x PBS verdünnt (zur Erniedrigung der Dichte der Flüssigkeit), um so ein Abzentrifugieren der PBMCs zu ermöglichen und restliches Ficoll sowie Thrombozyten zu entfernen. Hierfür wurden die so verdünnten Zellen nochmals zentrifugiert, nun aber bei 8 min, 300 x g, Raumtemperatur und sowohl voller Stärke bei Beschleunigung und Abbremsen der Zentrifuge. Dieser Waschschrift wurde abhängig von der Reinheit der gewonnenen PBMCs bis zu fünfmal wiederholt. Die Anzahl der so gewonnenen PBMCs wurde im Anschluss mittels einer „Neubauer Improved“-Zählkammer und einer 0,5 % Trypanblaulösung ermittelt, wie unter 3.1.2 beschrieben.

### 3.1.7 Generierung von polyklonalen T-Zelllinien

Kryokonservierte oder gerade aus Vollblut isolierte PBMCs HHV-6-positiver gesunder Spender dienten als Quelle für T-Zellen. Durch die wiederholte Stimulation mit autologen, mit HHV-6B Peptiden beladene CD40-stimulierte B-Zellen (B-Blasten, BBL) wurden polyklonale T-Zelllinien hergestellt (Wiesner et al. 2008). Hierzu wurde an Tag 0 die Hälfte der aufgetauten oder frisch isolierten PBMCs mit Peptiden beladen (Konzentration der Peptide 1 µg/ml, 2 h, 37°C). Daraufhin wurden die mit Peptid inkubierten Zellen mit 1 x PBS mindestens dreimal gewaschen, um ungebundenes Peptid zu entfernen und mit nicht peptidgeladenen PBMCs im Verhältnis von 1:1 in einer 12-well-Platte  $5 \times 10^6$  pro well ausgesät.

Nach zehn Tagen Inkubation fand die erste Restimulation statt. Hierfür wurden die Zellen aus der Platte geerntet, gezählt und mit bestrahlten (60 Gy), autologen und mit entsprechenden Peptiden beladenen CD40-aktivierten B-Zellen in eine neue 12-well-Platte überführt wurden. Dabei wurde ein Effektor-zu-Stimulator Verhältnis von 4 zu 1 eingestellt und als Wachstumsfaktor das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) in einer Konzentration von 10 U/ml hinzugegeben. Die Konzentration von IL-2 wurde in den folgenden Restimulationen wöchentlich auf 20, 50 und schließlich 100 U/ml in Woche 3 erhöht.

Bis zur dritten Restimulationsrunde wurde außerdem in manchen Ansätzen, wenn angegeben, ein entsprechend dem HLA-Typ des Spenders ausgewähltes EBV- bzw. CMV-Helferpeptid hinzugegeben. Da diese EBV- bzw. CMV-spezifischen T-Zellen häufiger im Blut nachzuweisen sind als HHV-6-spezifische T-Zellen, sollte durch die vorübergehende gleichzeitige Stimulation von EBV- und CMV-spezifischen T-Zellen das Zytokinmilieu in der Zellkultur optimiert werden und somit die Proliferation seltener HHV-6-spezifischer T-Zellen verbessert werden (Schub, Dissertation 2009; Martin, Dissertation 2013).

### 3.1.8 Einzelzellklonierung aus polyklonalen T-Zelllinien

Zur Gewinnung von T-Zellklonen wurden polyklonale antigenspezifische T-Zelllinien nach der mehrwöchigen *in vitro* Stimulation (siehe 3.1.7) einer limitierenden Verdünnungen unterzogen (Schub et al. 2009). Hierfür wurden T-Zellen in hoher Verdünnung auf 96-well-Rundbodenplatten verteilt (durchschnittlich 0,7 oder 2,5 T-Zellen je „well“), in 200 µl je well einer 96-Rundbodenplatte zusammen mit einem Feeder-Mix ausplattiert. Letzterer bestand aus  $0,1 \times 10^6$ /ml bestrahlten (60 Gy) möglichst autologen oder zumindest in Bezug auf das betreffende HLA-Molekül übereinstimmender mLCLs oder BBL sowie aus  $1,5 \times 10^6$ /ml bestrahlten (60 Gy) allogenen PBMCs, die von mindestens drei verschiedenen Spendern stammten. Das Standardmedium (siehe 3.1.1) wurde für die Etablierung und Kultivierung von T-Zellklonen mit dem Wachstumsfaktor IL-2 (1000 U/ml) supplementiert.

Auswachsene T-Zell-Klone wurden zunächst nach zwei bis drei Wochen, danach dann regelmäßig alle zwei Wochen mit einem Feeder-Mix gleicher Zusammensetzung restimuliert und nach individuell vorhandener T-Zellzahl expandiert. Jeweils eine Woche nach dem letzten Ausplattieren (Erstansatz oder Restimulation) wurde die Hälfte (100 µl je well) des überstehenden Mediums abgenommen und verworfen und je 100 µl frisches Standardmedium mit zugesetztem IL-2 (1000 U/ml) zugegeben. Etwa vier bis fünf Wochen nach der limitierenden Verdünnung wurden die T-Zell-Klone erstmals mittels Peptidbibliotheken (Abschnitt 3.2.5) auf ihre Epitopspezifität im ELISA (siehe 3.2.3) und im Durchflusszytometer (siehe 3.2.1) analysiert. Die phänotypische Analyse der Expression von CD4, CD3, CD8 ergab bereits einen ersten Hinweis auf die durchschnittliche Klonalität der nach der limitierenden Verdünnung auswachsenden T-Zellkulturen.

### 3.1.9 Transfektion von humanen Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Herstellung von HLA-transgenen Zellen zur Analyse der HLA-Restriktion von T-Zellklonen wurden Zellen der Burkitt-Lymphomlinie DG-75 mit HLA-codierenden Plasmiden durch Elektroporation transient transfiziert. DG-75-Zellen wurden gesammelt, einmal in RPMI 1640 Medium ohne Zusätze und einmal in OptiMEM (einem serumfreien Medium) gewaschen. Die Zellen wurden dann in einer Konzentration von  $16,67 \times 10^6$  Zellen/ml in OptiMEM suspendiert. Von dieser Suspension wurden 0,3 ml zusammen mit 10 µg Plasmid-DNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt und dann in eine „Gene Pulser“-Küvette gegeben wurden mit 0,4 mm Spaltbreite gegeben.

Als negative Elektroporationskontrolle diente der gleiche Ansatz mit Zellen und OptiMEM, jedoch mit TE-Puffer anstelle von Plasmid-DNA und als Positivkontrolle 10 µg GFP-

---

Plasmid-DNA (MP71Gpre). Die Küvette wurde zwischen die beiden Kontakte eines GenePulser II platziert und die Zellen mit einer Spannung von 230 V unter Verwendung von 975  $\mu$ F elektroporiert. Die Zellsuspension wurde sofort in 1 ml vorgewärmtem FCS aufgenommen und in ein „well“ einer 12-well-Platte gegeben, in der sich bereits 2 ml Medium (Standardmedium) befanden. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurde die GFP-Expression der Positivkontrolle am Fluoreszenzmikroskop überprüft. Bei Anwesenheit einer erheblichen Zahl von GFP-positiven Zellen (nach Augenschein  $\geq 50\%$ ) wurde eine erfolgreiche Transfektion angenommen und die parallel dazu HLA-transfizierten Zellen wurden zur Bestimmung der HLA-Restriktion eines T-Zellklons in einem IFN- $\gamma$ -ELISA verwendet (siehe 3.2.3).

## 3.2 Analyse von Immunzellen

### 3.2.1 Phänotypische Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Durchflusszytometrie (FACS, „fluorescence-activated cell sorting“) verwendet, um poly- und monoklonale T-Zellen hinsichtlich Phänotyps (T-Zell-Typen, Differenzierung, Homogenität) oder Spezifität (Multimerfärbung) zu charakterisieren. Hierbei wurden primäre, kryokonservierte oder in Kultur befindliche Zellen gleichzeitig mit mehreren Fluorenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern oder HLA/Peptid-Multimeren angefärbt und dann im Zytometer analysiert.

Pro Messung wurden, sofern nicht anders angegeben, 0,3 Mio. Zellen in Medium einmal bei Raumtemperatur zentrifugiert (1000 x g, 5 min) und der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden dann in 50 µl kaltem FACS-Puffer (2 % FCS in 1 x PBS) resuspendiert. Zur Färbung wurden die Zellen dann mit den jeweiligen fluorochrommarkierten Antikörpern für 20 min bei 4°C inkubiert, um unterschiedliche Oberflächenantigene messen zu können. Anschließend wurden die gefärbten Zellen zweimal in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, jeweils mit Zentrifugation bei 1000 x g, 5 min. Zum Schluss wurden die Zellen in 0,2 ml FACS-Puffer gelöst, falls sie sofort gemessen werden sollten. Im Falle einer späteren Messung wurden die Zellen nach dem Waschen fixiert, indem sie in FACS-Puffer mit 1 % (v/v) Formaldehyd (stabilisiert) resuspendiert wurden. Die fixierten Zellen konnten vor der FACS-Analyse bei 4°C bis zu 7 Tage gelagert werden.

Die gefärbten Zellen wurden an einem BD Biosciences FACS Calibur oder LSR Fortessa Durchflusszytometer analysiert. Die weitere Auswertung erfolgte mittels der FlowJo Software. Lebensfähige Lymphozyten wurden hierbei nach ihrer charakteristischen Position im Punktdiagramm der Vorwärts-/Seitwärtsstreuung (FSC/SSC) eingegrenzt. Die Achsen der Dot-Plot-Diagramme in dieser Arbeit wurden biexponentiell skaliert und umfassen für die verschiedenen Fluoreszenzparameter meist einen Bereich von  $10^3$  bis  $10^5$  arbiträren Einheiten der Fluoreszenzintensität. Für die Streuungsparameter FSC und SSC wurden Intensitäten von 0 bis 260.000 auf einer linearen Skala abgebildet. Die Pseudofarben-Punktdiagramme zeigen eine zunehmende Zellzahl pro Fläche durch unterschiedliche Farben an, der von blau (niedrige Zahl) über grün, gelb und orange bis rot (hohe Zahl) reicht.

### 3.2.2 Magnetische Separation von Zellpopulationen

Um eine gewünschte Zellpopulation aus PBMCs zu isolieren, wurde eine magnetische Zellseparation durchgeführt („magnetic activated cell sorting“, MACS). Diese Methode der Firma Miltenyi beruht auf der Markierung von Oberflächenmarkern, die spezifisch für bestimmte Zellpopulationen sind, mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, die an superparamagnetische Partikeln mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Zur Separation wird eine mit einer paramagnetischen Matrix ausgekleidete Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, verwendet. Magnetisch markierte Zellen werden an die Säule gebunden, während unmarkierte Zellen die Säule durchlaufen und die Negativfraktion bildeten. Nach dem Entnehmen der Säule aus dem Magnetfeld und unter Zuhilfenahme eines Stempels konnten die Zellen mit etwas Puffer von der Säule gespült werden. Diese Zellen wurden als „Positivfraktion“ weiterverwendet. Die Qualität der Aufreinigung wurde anschließend mittels Durchflusszytometrie überprüft, indem sowohl die Positiv- als auch die Negativfraktionen gemessen wurden.

Zum Zweck der Aufreinigung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden die frisch isolierten oder aufgetauten PBMCs zentrifugiert (300 x g, 10 min) und in 80 µl Puffer (2 % FCS in 1 x PBS) pro 10<sup>7</sup> Zellen aufgenommen. Es wurden 20 µl der anti-CD4-MicroBeads pro 10<sup>7</sup> Zellen hinzugegeben, gemischt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte sowie die Aufnahme von bis zu 10<sup>8</sup> Zellen in 500 µl Puffer.

Während der Waschschrte wurde bereits eine der Zellzahl entsprechende Säule mit 500 µl Puffer equilibriert, für bis zu 10<sup>7</sup> Zellen wurde eine MACS-Säule des Typs MS zur positiven Selektion verwendet. Die 500 µl Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und die Säule wurde dreimal mit 1 ml Puffer gewaschen. Zur Gewinnung der positiv markierten Zellen wurde die Säule vom Magneten entfernt und die Zellen mit 500 µl Puffer unter Zuhilfenahme eines Stempels eluiert. Um die Reinheit jeder Fraktion zu überprüfen, wurden sie mit spezifischen Antikörpern gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

### 3.2.3 Quantifizierung von Zytokinen durch ELISA

Die Erkennung von Zielzellen durch Effektorzellen wie T-Zellklone und polyklonale T-Zelllinien wurde unter anderem durch Quantifizierung freigesetzter Zytokine gemessen. Hierfür wurde der Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet. Die Effektorzellen wurden mit Zielzellen (mit Peptiden gepulste BBL oder infizierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen) in verschiedenen Konzentrationen für 16-18 Stunden in 200 µl Standardmedium

pro well in 96-well V-Boden Platten bei 37°C zusammen kultiviert. Hierbei wurden meistens Duplikate der einzelnen Konditionen verwendet. Als Positivkontrolle für die IFN- $\gamma$ -Sekretion wurden Effektorzellen gleichzeitig mit 50 ng/ml Tetradecanoylphorbolacetat (TPA) und 0,5  $\mu$ M Ionomycin (Iono) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten Effektorzellen, die nur mit Standardmedium inkubiert wurden.

Um Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) oder Granzym B (GraB) quantifizieren zu können, wurden ELISA-Kits oder einzelne Antikörper von der Firma Mabtech bezogen und gemäß der Herstellerangaben verwendet. Im Folgenden wird das Protokoll für IFN- $\gamma$  genauer beschrieben.

Stark proteinadsorbierende 96-well-ELISA-Platten (MaxiSorp Immunoplate, Nunc A/S) wurden über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (coating Antikörper, anti-IFN- $\gamma$  Klon 1-D1-K, 2  $\mu$ g/ml in 1 x PBS) inkubiert, anschließend viermal mit je 300  $\mu$ l Waschpuffer gewaschen (0,05 % Tween 20 in 1 x PBS) und schließlich wurden freie Bindungsstellen mit serumhaltigem Medium (7,5 % FCS, Standardmedium) für 1 Stunde geblockt.

Nun wurden die zu analysierenden Proben (je 50  $\mu$ l Zellkulturüberstand), Negativkontrollen (nur Medium) und eine Zytokin-Standardreihe von 20 bis 20.000 pg/ml IFN- $\gamma$  aufgetragen und die Platte(n) 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die überstehende Flüssigkeit wurde entfernt, die Platte mehrmals mit Waschpuffer gewaschen und je Vertiefung 50  $\mu$ l biotinylierter Zweit- oder Detektions-Antikörper (anti-IFN- $\gamma$ -Biotin, Klon 7-B6-1, 1:1000 in 1 x PBS, final 1  $\mu$ g/ml) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Nach Verwerfen der Antikörperlösung und erneutem viermaligem Waschen wurde je Vertiefung 50  $\mu$ l Streptavidin-ALP zugegeben (1:1000 in 1 x PBS) und für eine Stunde inkubiert. Die Platten wurden wiederum viermal mit 300  $\mu$ l ELISA-Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen und je mit 100  $\mu$ l Substratlösung für alkalische Phosphatase (ALP) versetzt. Die ALP-Substratlösung wurde frisch hergestellt, indem 5 x pNPP-Stammlösung (50 % Diethanolamin und 5 mg/ml pNPP in sterilem Wasser, pH 9,5, gelagert bei -20°C) auf 1 x Lösung mit sterilem Wasser verdünnt und als Co-Faktor von ALP MgSO<sub>4</sub>-Lösung hinzugefügt wurde (Stammkonzentration 200 mM, Endkonzentration 0,8 mM). ALP katalysiert die Hydrolyse von farblosem pNPP zu gelbem para-Nitrophenol, das ein Absorptionsmaximum bei 405 nm hat und das mit einem Spektrophotometer gemessen wird.

Die Standardkurve zur Berechnung der Konzentration jeder Probe sowie die Berechnung selbst wurden mit der GraphPad Prism Software unter Verwendung einer sigmoidalen logistischen Kurvenanpassung mit vier Parametern durchgeführt, wobei der Wert der Negativkontrolle als untere Asymptote der Kurvenanpassung diente.

### 3.2.4 Quantifizierung reaktiver T-Zellen mittels IFN- $\gamma$ -ELISpot

Der ELISpot-Test (Enzyme-Linked-Immuno-Spot-Test) ist ein sehr sensitives Verfahren, um die Zahl reaktiver Zellen quantifizieren zu können. Im vorliegenden Fall wurde der ELISpot verwendet, um antigenspezifische T-Zellen in PBMCs oder in T-Zellkulturen zu quantifizieren. Bei virusspezifischen T-Zellen ist hierfür das Zytokin IFN- $\gamma$  besonders geeignet. Im Test sezernieren die spezifischen T-Zellen nach Stimulation durch Antigene das Zytokin, das in unmittelbarer Umgebung der Zellen in Form kleiner Flecken auf einer Membran immobilisiert wird. Diese Flecken oder Spots können dann mittels einer Färbung weitgehend analog zum ELISA-Verfahren sichtbar gemacht werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der IFN- $\gamma$ -ELISpot-Kit der Firma Mabtech gemäß den Herstellerangaben zur genauen Quantifizierung von HHV-6B-spezifischen T-Zellen verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurden entweder HHV-6-spezifische Peptide (1  $\mu\text{g/ml}$ ) oder mit Peptiden gepulste BBL zur Stimulation von T-Zellen verwendet. Das Gesamtvolumen pro Well war 200  $\mu\text{l}$ . Als Positivkontrollen wurden wie bereits in 3.2.3 beschrieben die PBMCs oder T-Zellkulturen mit pan-T-Zellaktivatoren TPA (50  $\text{ng/ml}$ ) und Ionomycin (0,5  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Als Negativkontrollen dienten die gleichen Zellen ohne Stimulus.

Für die meisten ELISpot-Experimente wurden ELISpot-Platten mit einer Membran aus PVDF (Polyvinylidendifluorid) verwendet. Diese Platten wurden im ersten Schritt mit Ethanol aktiviert.

Die ELISpot-Platten, deren Membran aus PVDF (Polyvinylidenfluorid) bestanden, mussten im ersten Schritt mit 35 % Ethanol aktiviert werden. Hierfür wurde die Membran für 30 Sekunden mit 15  $\mu\text{l}$  35 % Ethanol bedeckt und nach der Zeit fünfmal mit 200  $\mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Anschließend wurde die Platte mit 50  $\mu\text{l}$  je Well des monoklonalen Erstantikörpers (anti-human IFN- $\gamma$ , 1-D1K, 1  $\mu\text{g/ml}$  in 1 x PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert.

Seltener wurden ELISpot-Platten mit einer Nitrozellulosemembran verwendet. Diese benötigten keinen Aktivierungsschritt und wurden direkt mit dem Erstantikörper über Nacht unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die nachfolgenden Bearbeitungsschritte waren für beide Plattentypen identisch.

Nach dem fünfmaligen Waschen mit 1 x PBS und Blocken der freien Bindungsstellen der ELISpot-Platte mit humanserumhaltigem Medium (5 % humanes Serum in RPMI) wurden im nächsten Schritt die Effektorzellen mit den zu testenden Antigenen (in Form von Peptiden oder Peptid-Mixen) inkubiert. Sofern nicht anders angegeben, wurden 0,25 Mio. PBMCs pro Well eingesetzt. Im Experiment werden die Peptide von HLA-Molekülen auf Antigen-präsentierenden Zellen gebunden. T-Zellen erkennen diese HLA/Peptid-

Komplexe, werden aktiviert und sezernieren IFN- $\gamma$ , das von den an der Membran immobilisierten Erstantikörpern gebunden wird.

Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden Zellen und Überstand entfernt, die Membran mit Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in 1 x PBS) viermal mit 300  $\mu$ l gewaschen und ein zweiter biotinylierter IFN- $\gamma$  Antikörper (anti-human IFN- $\gamma$ , 7-B6-1, 1  $\mu$ g/ml in 1 x PBS) zugegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde viermal gewaschen und ein Konjugat aus Streptavidin und alkalischer Phosphatase zugegeben (1  $\mu$ g/ml in PBS). Es wurde 2 h inkubiert, die Membran erneut gewaschen und mit einer Substratlösung (AP Conjugate Substrate Kit, BIO-RAD Laboratories) inkubiert. Das Substrat BCIP/NBT (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat / Nitrotetrazolblau-chlorid) wird durch alkalische Phosphatase gespalten und es entsteht ein tiefblauer unlöslicher Farbstoff, der sich an den entsprechenden Stellen der Membran niederschlägt und die IFN- $\gamma$ -Spots sichtbar macht. Nach sichtbarer Bildung der Spots, typischerweise nach 20-30 min, wurden die Platten unter fließendem Leitungswasser für 2 min gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auszählung der Spots erfolgte am nächsten Tag mittels eines automatisierten Lesegerätes (ELISpot Reader S6 FluoroCore M2). Aus der gemessenen Spotanzahl wurde auf die Häufigkeit spezifischer, IFN- $\gamma$  produzierender T-Zellen rückgeschlossen.

### 3.2.5 Epitopbestimmung durch Peptidbibliotheken

Um die Epitopspezifität von T-Zellklonen oder T-Zelllinien genauer zu bestimmen, wurden autologe oder allogene, HLA-übereinstimmende BBL mit synthetischen Einzelpeptiden mit einer Länge von 15 Aminosäuren, Subpools aus mehreren Einzelpeptiden oder Gesamtpools, die ganze Antigene abdecken, gepulst (siehe Materialliste 2.3.1).

Die BBL wurden mit einer Endkonzentration von 1  $\mu$ g/ml pro 15-mer Peptid für 1 Stunde bei 37°C inkubiert, dann dreimal mit 1 x PBS gewaschen und in 7,5 % Standardmedium aufgenommen.

Die peptidbeladenen BBL wurden mit den Effektorzellen in einem Verhältnis von 10 000 : 20 000 (10 000 Effektorzellen und 20 000 Zielzellen in jeder einzelnen 96-well-Reaktion in einem Volumen von 200  $\mu$ l) in Duplikaten für 16-18 Stunden bei 37°C in einer 96-well Platte mit V-Boden kokultiviert.

Am nächsten Tag wurde je 50  $\mu$ l der Kulturen mittels eines ELISAs auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion untersucht (siehe 3.2.3).

### 3.2.6 Bestimmung der HLA-Restriktion

T-Zellklone oder T-Zelllinien wurden mit HLA-typisierten Antigen-präsentierenden Zellen auf drei verschiedene Arten kokultiviert, um die HLA-Klasse-I- bzw. Klasse-II-Restriktion der T-Zellen zu bestimmen.

Bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellklonen wurde die HLA-Klasse-I-Restriktion, bei CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen die HLA-Klasse-II-Restriktion näher untersucht. In keinem Fall ergaben sich Hinweise auf eine von diesem Muster abweichende, unübliche HLA-Restriktion.

Bei CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Klonen wurde die HLA-Klasse-I-Restriktion bereits im ersten Schritt über ein Panel an HLA-gepaarten sowie HLA-fehlgepaarten allogenen BBL getestet. Hierbei wurden die T-Zellen als Effektorzellen in einem ELISA (siehe 3.2.3) verwendet und die jeweiligen BBL mit in Frage kommenden Peptiden gepulst. Bei passender HLA-Klasse-I Kombination wurde das Peptid präsentiert und es zeigte sich ein Signal im ELISA, bei falschen HLA-Klasse-I Allelen konnte das Peptid nicht präsentiert werden und es gab keine Erkennung im ELISA.

Bei CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Klonen wurde im ersten Schritt durch blockierende Antikörper (siehe *Tabelle 12*) gegen jede der drei Isoformen von HLA-Klasse-II (HLA-DP, -DQ und -DR) ermittelt, welche dieser Isoformen der HLA-Restriktion der T-Zelle entspricht.

Zur genaueren Ermittlung der HLA-Restriktion im zweiten Schritt wurden sowohl bei den CD8<sup>+</sup>- als auch bei CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Klonen Tests auf Reaktivität gegen genau definierte HLAs durchgeführt. Hierfür wurden HLA-fehlgepaarte, transformierte B-Zellen transient transfiziert (siehe auch 3.1.9) um vorübergehend ein bestimmtes HLA-Klasse-I- oder HLA-Klasse-II-Molekül zu exprimieren und zusätzlich mit dem entsprechenden Peptid beladen. Für den anschließenden Funktionstest wurden je 20 000 T-Zellen mit 40 000 HLA-transgenen DG-75-Zellen in 200 µl je Vertiefung in Platten mit 96 Vertiefungen (V-Boden) in Doppel- oder Dreifachansätzen zusammengeführt.

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C für 16-18 Stunden inkubiert. Die sezernierten IFN-γ-Spiegel wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA, siehe Abschnitt 3.2.3) analysiert, um die Aktivierung von T-Zellen durch Erkennung ihres Zielpetid/HLA-Komplexes zu quantifizieren.

### 3.2.7 Messung der Zytotoxizität von T-Zellen

Die neu etablierten T-Zellklone wurden auch auf ihre Fähigkeit hin getestet, HHV-6A/B- oder HHV-7-infizierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu lysieren. Hierfür wurde ein „Calcein Release Assay“ verwendet, der eine Quantifizierung der lysierten Zellen mittels des Fluoreszenzfarbstoffes Calcein ermöglichte. Calcein AM ist die zelldurchlässige Vorstufe eines Farbstoffs, der sich zur Ermittlung der Zellviabilität in eukaryotischen Zellen eignet. In lebenden Zellen wird das nicht-fluoreszierende Calcein AM nach der Acetoxymethylester-Hydrolyse durch intrazelluläre Esterasen in grün fluoreszierendes Calcein umgewandelt.

Die infizierten Zellen wurden im ersten Schritt für 30 min bei 37°C mit Calcein AM inkubiert (Stammlösung in DMSO 1 mg/ml, Inkubationslösung 5 µg/ml in Standardmedium). Dann wurden die gefärbten Zielzellen dreimal mit 1 x PBS gewaschen und in RPMI mit 5 % FCS aufgenommen. Je 5000 Zellen suspendiert in 100 µl wurden in 96-well Platten mit V-Boden vorgelegt.

In die wells wurden in unterschiedlichen Verdünnungsstufen Effektorzellen wie T-Zellklone oder polyklonale T-Zelllinien in 100 µl Volumen hinzugegeben. Als Positivkontrolle (Maximallyse) wurden drei wells mit 100 µl einer 5 %igen Triton X100 Lösung in RPMI versetzt. Als Negativkontrolle dienten drei wells, in die noch 100 µl RPMI-Medium mit 5 % FCS gegeben wurde.

Nach einer kurzen Zentrifugation, um die Zellgemische in engen Kontakt zu bringen und die Reaktion zum definierten Zeitpunkt zu starten, wurden die Platten bei 37°C für 3,5 Stunden inkubiert. Dann wurden 100 µl des Überstandes aus den Platten in 96 well-Flachbodenplatten (Nunc MaxiSorp Immunoplate, Nunc A/S) überführt. Die Messung der Calcein-Fluoreszenz erfolgte bei 485 nm und einer 80-fachen Verstärkung an einem Spektrophotometer (Mikrotiterplatten-Lesegerät Infinite F200 Pro, Tecan).

### 3.3 Virologische Methoden

#### 3.3.1 Propagierung von humanen Herpesviren HHV-6B

Der Virusstamm HST der Spezies HHV-6B wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Infektion von aus Nabelschnurblutlymphozyten hergestellten PHA-Blasten expandiert. Hierfür wurden die aus frischem Nabelschnurblut isolierten Lymphozyten mit 5 µg/ml PHA-M (Phytohämagglutinin M) in einer Konzentration von 1 Mio./ml in Standardmedium in einer 24-well Platte (1,5 ml/well) stimuliert, sodass sich 1,5 Mio. Lymphozythen in einem well befanden. Nach einer dreitägigen Inkubationsphase wurden die PHA-M-Blasten gesammelt, zentrifugiert und gezählt und erneut in einer Konzentration von 1 Mio./ml auf einer 24-well Platte ausplattiert. Die Infektion erfolgte mit jeweils 230 µl pro well des vorher ebenfalls auf Nabelschnur-PHA-Blasten passagierten und bei -80°C gelagerten HHV-6B HST-haltigen Zellkulturüberstands. Nach etwa sieben Tagen, als der zytopathische Effekt visuell am stärksten war, wurden die infizierten Zellkulturen geerntet, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand filtriert (0,45 µm). Die virushaltigen Überstände wurden jeweils in 1 ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren, auf frischen PHA-Blasten weiterpassagiert oder direkt für die Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verwendet.

#### 3.3.2 Propagierung von HHV-7 und HHV-6A

Zur Herstellung und Vermehrung von infektiösem HHV-7 des Stamms JI wurden zuerst die Zellen der Linie SupT1 bei einer Dichte von maximal 1 Mio./ml in Standardmedium kultiviert. Dann wurden je 1,5 Mio. SupT1 Zellen (1 Mio./ml) in ein well einer 24-well Platte vorgelegt. Dazu wurden im Verhältnis 1:5 0,3 Mio. bereits vorher mit HHV-7 JI infizierte SupT1-Zellen hinzugegeben und leicht gemischt. Nach etwa sieben Tagen bei 37°C waren mehr als 60 % der Zellen infiziert, was über den zytopathischen Effekt mikroskopisch festgestellt wurde. Die Überstände wurden gesammelt, zentrifugiert und durch einen 0,45 µm Filter gereinigt. Dieser gereinigte Überstand wurde dann in 1 ml pro Aliquot bei -80 °C eingefroren oder sofort zur Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verwendet. Für die Infektion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden 400 µl pro 1,5 Mio. T-Zellen verwendet, da hier nach sieben Tagen der größte zytopathische Effekt messbar war, was vorher in Titrationen ermittelt wurde. Nach demselben Prinzip erfolgte die Anzucht von HHV-6A des Stamms AJ, nur dass hier J-Jhan Suspensionszellen verwendet wurden. Für die Infektion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit HHV-6A JI wurden 350 µl des hergestellten, infektiösen Überstandes verwendet.

### **3.3.3 Erkennung infizierter PHA-Blasten durch T-Zellklone und polyklonale T-Zelllinien**

Zunächst wurde durch positive immunmagnetische Separation die CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulation aus PBMCs isoliert (siehe 3.2.2). Jeweils 1,5 Mio. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eignen sich besser für eine in vitro Infektion mit HHV-6 und HHV-7.

Jeweils 1,5 Mio. T-Zellen wurden in einer 24-well Platte mit 5 µg/ml PHA-M aktiviert und in einer Zellkonzentration von 1 Mio./ml in Standardmedium ausplattiert. Nach drei Tagen wurden diese PHA-M-Blasten geerntet, zentrifugiert und erneut gezählt und erneut auf eine Konzentration von 1 Mio./ml eingestellt.

Jeweils 1,5 ml dieser Zellsuspension wurden in die wells einer neuen 24-well Platte überführt. Um die Zellen zu infizieren, wurde jedem well das jeweilige Volumen an infektiösem Virusüberstand zugegeben: Für HHV-6A AJ 350 µl, für HHV-6B HST 230 µl und für HHV-7 400 µl.

Die so infizierten Zellen wurden für bis zu 10 Tage bei 37°C kultiviert und wurden je nach experimenteller Fragestellung zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet. Der höchste zytopathische Effekt konnte an Tag 7 nach Infektion für alle drei Viren gemessen werden.

## 3.4 Molekular-und mikrobiologische Methoden

### 3.4.1 Kultivierung und Transformation von Bakterien

Der *Escherichia coli* (*E. coli*) - Stamm DH5 $\alpha$  wurde zur Vermehrung von Plasmiden verwendet (siehe Abschnitt 3.1.9). Die Bakterien wurden bei 37°C über Nacht auf LB-Agarplatten oder in LB-Medium mit dem zur Selektion des jeweiligen Plasmids notwendigen Antibiotikum (100  $\mu$ g/ml Ampicillin, 30  $\mu$ g/ml Chloramphenicol oder 30  $\mu$ g/ml Kanamycin) unter konstantem Rühren bei 200 U/min kultiviert. Nach Inkubation über Nacht wurden die LB-Platten bis zu 7 Tage bei 4°C gelagert.

Zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde ein Aliquot mit hochkonzentrierten, chemisch kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Die chemisch kompetenten Bakterien wurden nach einer klassischen Methode in der Arbeitsgruppe präpariert (Hanahan 1983). 1  $\mu$ g Plasmid-DNA wurde zu 50  $\mu$ l Bakterien gegeben, wobei die Mischung für 15 min auf Eis inkubiert wurde. Nach einem kurzen Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42°C wurde die Bakteriensuspension weiter für 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurde 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben und die Suspension bei 37°C und 900 U/min geschüttelt. Nach 1 h wurde die Suspension bei 3.000  $\times$  g für 3 min zentrifugiert, der Großteil des Überstands wurde verworfen und das verbleibende Volumen (ca. 50  $\mu$ l) wurde verwendet, um die pelletierten Bakterien zu resuspendieren und sie auf einer vorgewärmten LB-Platte (mit dem jeweiligen Antibiotikum) auszuplattieren. Schließlich wurden die Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Gut gewachsene Einzelkolonien wurden zur weiteren Vermehrung verwendet.

Eine gut gewachsene und gut vereinzelt Kolonie wurde von einer Übernacht-LB-Platte gepickt und in 400 ml sterilem LB-Medium einschließlich des zur Selektion von transformierten Bakterien erforderlichen Antibiotikums inkubiert.

### 3.4.2 Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* zur Transfektion humaner Zellen wurde nach den Prinzipien der alkalischen Lyse und Bindung an Silica-Säulen unter Verwendung des HiPure Plasmid Maxiprep Kits gemäß den Anweisungen des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Jeweils 400 ml gesättigte Übernacht-Bakterienkultur wurden für eine einzelne Präparation verwendet, die hierbei Ausbeuten von bis zu 1 mg DNA lieferte. Die Konzentration und Reinheit des so gewonnen Plasmids wurde durch Absorptionsablesungen bei 260 nm und 280 nm unter Verwendung des Spektrophotometers Nanodrop ND-1000 analysiert.

### 3.4.3 Nachweis von EBV in primären Zelllinien mittels einer PCR

Nachdem aus PBMCs mittels einer CD40L-Stimulation B-Blasten hergestellt wurden (siehe 3.1.4), mussten diese auf ein das Vorhandensein von Epstein-Barr-Virus (EBV) getestet werden, da die meisten gesunden erwachsenen Spender EBV-positiv sind und daher die Möglichkeit eines unerwünschten Auswachsens EBV-transformierter B-Zellen in Kultur besteht. Da die BBL für die Herstellung von HHV-6-spezifischen T-Zelllinien gedacht waren, würde die Anwesenheit von EBV-infizierten B-Zellen die HHV-6-spezifische T-Zell-Stimulation oder die spezifische Analyse der T-Zellen stören.

Für die PCR-Analyse wurden zunächst alle BBL-Proben (jeweils 3 Mio. Zellen), die bei -20°C ohne Flüssigkeit weggefroren worden waren, mit 25 µl einer 50 mM NaOH behandelt. Darauf wurde etwas Mineralöl gegeben und für 10 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde 4 µl 1M Tris/HCl (pH 7) hinzugegeben und für mehrere Sekunden stark gemischt. Zum Schluss wurde das Lysat für 2 min bei 300 x g zentrifugiert. Dann wurden 3 µl des Lysats entnommen und zu dem in Tabelle 21 aufgelisteten PCR-Mastermix hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde dann in einen PCR-Thermocycler gestellt und unter den in Tabelle 22 gezeigten Bedingungen repliziert. Anschließend wurde das so entstandene PCR-Produkt auf einem Agarosegel analysiert (3.4.4).

Tabelle 21: Mastermix der PCR zum Nachweis von EBV.

PCR-Ansatz	1 x [µl]
Taq-Polymerase	1,25
Puffer	5
Primer gp85c	2,5
Primer gp85d	2,5
Primer cam-up	2,5
Primer cam-down	2,5
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	2,5
dNTPs	5
Wasser	25,25
Gesamt	49

Tabelle 22: Bedingungen der PCR für den EBV-Nachweis.

Schritte	Zeit	Temperatur
Denaturierung	5 min	95°C
Hybridisierung	45 sek	95°C
(30 Zyklen)	45 sek	59°C
	45 sek	72°C
Polymerisation	10 min	72°C
	unendlich	4°C

### 3.4.4 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Mittels der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Größe der Fragmente erfolgte die Auftrennung in 1,0-1,5 %igen Agarosegelen, die in TAE-Laufpuffer angesetzt wurden.

Zur Detektion der DNA-Fragmente wurden dem Gel 10 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Ethidiumbromid ist ein mutagener Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und nach Absorption von ultraviolettem Licht bei 254 nm sichtbares Licht emittiert. Die Proben aus der PCR (3.4.3) wurden mit einem 1 x DNA-Ladepuffer in Verhältnis 1:1 gemischt und auf das Gel geladen. Das Gel lief anschließend bei 5-8 V/cm. Nach dem Gellauf konnte die Fragmentgröße und die DNA-Menge anhand eines DNA-Größenstandards bestimmt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Funktionelle Analyse von immundominanten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in HHV-6B

#### 4.1.1 Analyse der T-Zellantwort gegen HHV-6

Einer der Schwerpunkte dieser Arbeit war die Untersuchung von T-Zellantworten gegen HHV-6 (A und B). Vorarbeiten dazu wurden in unserer Arbeitsgruppe hauptsächlich von Andrea Schub und Larissa Martin durchgeführt. In Martin et al. (2012) wurden erstmals HHV-6-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen identifiziert, deren Epitope charakterisiert und gezeigt, dass auch virusinfizierte Zellen von diesen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt werden. Diese Vorarbeit beschränkte sich noch auf Epitope aus ausgewählten Strukturproteinen des Virus. In einem zweiten Schritt wurde zur Identifikation weiterer HHV-6-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine Querschnittsanalyse durchgeführt, quer durch das virale Proteom, jedoch beschränkt auf ein modellhaft ausgewähltes HLA. Hierfür wurde HLA-B\*08:01 gewählt, weil es für eine Epitopvorhersage aufgrund konservierter Ankerreste im Peptid besonders geeignet ist und zudem einer der häufigsten HLA-Klasse-I-Allotypen in Personen europäischer Herkunft ist und der zweithäufigste HLA-Allotyp der kaukasischen Bevölkerung. Die Tabelle 23 ist die Auflistung der so neu gefundenen Epitope und zeigt, dass hierbei drei Proteine mehrere neue Epitope beinhalten.

Tabelle 23: HLA-B\*08:01-restringierte HHV-6 Epitope. Verändert aus Martin et al. (2018).

Epitop Abk.	HHV-6B	HHV-6A	ORF	Proteinfunktion	Kinetik	Erkennung von Zellen infiziert mit:		HLA-B*08:01 Restriktion bestätigt durch:		
	Sequenz Stamm Z29	Sequenz Stamm U1102				HHV-6B	HHV-6A	match	mult.	trfec.
EAR	EARRRLAEM	EARRRLAEM	U3	transactivator	E <sup>2</sup>	nt	+	+	nt	nt
RSK	RSKPRHMCV	RSKPRHMCV	U7	unknown	E <sup>1,2</sup>	+	nt	+	nt	+
EMR	EMRLRMIL	EMRLRMIL	U26	putative transmembrane	E <sup>2</sup>	+	nt	+	nt	nt
AVK	AVKKRKYI	AVKKRKYI	U29	capsid assembly	L <sup>1,2</sup>	nt	nt	nt	nt	nt
FEK	FEKERFLFL	FEKERFLFL	U29			+	nt	+	nt	nt
TNK	TNKIKEQL	TNKIKEQL	U31	large tegument protein	L <sup>2</sup>	+	+	+	+	nt
LCK	LCKAREEL	LCKAREEL	U38	DNA polymerase	E <sup>1/L</sup>	+	nt	+	nt	+
FYR	FYDRQYLL	FYDRQYLL	U38			+	nt	+	nt	nt
QTR	QTRQKPHL	QTRQKPHL	U41	major DNA binding protein	E <sup>1,2</sup>	+	+	+	+	+
VVK	VVKGKLSI	VVKGKLSI	U41			+	nt	+	nt	+
NVK	NVKHKNPL	NVKHKNPL	U41			nt	+	+	nt	nt
TPK	TPKVKSKV	TPKVKSKV	U42	transactivator/regulator	E <sup>2</sup>	-	nt	nt	nt	nt
MAR	MAREKNDL	MAREKNDL	U53	proteinase	L <sup>2</sup>	+	+	+	nt	nt
ELK	ELKWKHAV	ELKWKHAV	U59	tegument protein	L <sup>2</sup>	-	nt	nt	nt	nt
KVR	KVRCKKIL	KVRCKKIL	U64	tegument protein	E <sup>2</sup>	nt	nt	nt	nt	nt
KRR	KRRYKQLL	KRRYKQLL	U72	glycoprotein M	L <sup>2</sup>	nt	+	+	nt	nt
EGR	EGRERILTV	EGRERILTV	U79	DNA replication	IE <sup>2/E</sup>	+	nt	+	+	+
TSK	TSKTRPTV	TSKTRPTV	U84	putative glycoprotein	L <sup>2</sup>	-S	nt	+	nt	nt
SPR	SPRSRLQQL	-	U86	IE2 transcriptional activator	IE <sup>1</sup>	+	nt	+	nt	+
DFK	DFKSKYLT	DFKSKYLT	U86			+	nt	+	nt	nt
RPR	RPRWRSLT	-	B4	unknown	IE <sup>2/L</sup>	+	nt	+	nt	+
PKR	PKRVRTLKI	-	B8	unknown	E <sup>2</sup>	nt	nt	nt	nt	nt
VPR	VPRLKFFL	-	B8			nt	nt	nt	nt	nt
YLR	YLRRLKGL	YLRRLKGL	DR1	putative RNA polymerase II	L <sup>2</sup>	nt	nt	nt	nt	nt
LPR	LPRQRAYL	-	DR6	transactivator	L <sup>2</sup>	-S	nt	nt	nt	nt

In den Proteinen U38 und U86 konnten jeweils zwei und in dem Protein U41 drei neue Epitope charakterisiert werden. Den T-Zellen dieser sieben Epitope war es in sechs Fällen möglich Zellen, die mit HHV-6B infiziert wurden, zu erkennen. Hier gab es zudem starke Homologien zwischen der HHV-6B spezifischen Aminosäuresequenz mit der nah verwandten HHV-6A-Sequenz, sodass bei diesen Epitopen eine hohe Wahrscheinlichkeit bestand, dass diese T-Zellen nicht nur HHV-6B spezifisch reagierten, sondern ebenfalls HHV-6A infizierte Zellen erkennen könnten.

Neben dieser potenziellen Kreuzreaktivität sollten zwei neu identifizierte immunogene Proteine (U38 und U41) im Detail unabhängig von der HLA-Restriktion untersucht werden (siehe nächster Abschnitt 4.2). Hierzu wurde eine modifizierte Methode zur Etablierung von HHV-6B-spezifischen T-Zellen verwendet, bei der keine SAMBA-Motiv (simple anchor motif based algorithm) geratene Peptide, sondern proteinüberdeckende Peptidbibliotheken verwendet werden sollten. SAMBA beschreibt eine einfache Methode zur Vorhersage von Epitopen, die keine komplexe Bioinformatik benötigt, sondern zieht nur die für das jeweilige HLA bekannten konservierten Ankerreste heran. Diese Methode (Martin et al. 2018) berücksichtigt dabei stark die Anker motive von gut untersuchten und in der Literatur mehrfach bestätigten T-Zellepitopen. Sind für ein HLA-Allotyp nicht genügend Informationen dazu vorhanden, können ersatzweise auch konservierte Aminosäure motive von HLA-eluierten Selbst-Peptidliganden verwendet werden, zu denen mittlerweile große, verifizierte Datensätze vorliegen (Sarkizova et al. 2020).

Zusätzlich zu diesem Ansatz der Identifikation neuer Targets und dazugehöriger T-Zellen wurde in dieser Arbeit auch die T-Zellantwort gegen ein bereits bekanntes Epitop vertieft untersucht. Dies wird in diesem Kapitel 4.1 nun genauer erläutert. In den oben genannten Analysen von HLA-B\*08:01-Epitopen stellte sich das Epitop DFKSKYLT (DFK) aus dem Antigen U86 (IE-2) als ein immundominantes Epitop heraus, denn T-Zellen dieser Spezifität waren in HHV-6 positiven Spendern weit häufiger als T-Zellen gegen jedes andere bekannte Epitop aus HHV-6 (Martin et al. 2018). Daher sollte nun ein stärkerer Fokus auf diesem Epitop liegen, um vielleicht eine Ursache für seine Immundominanz in der T-Zellantwort von HHV-6 positiven Spendern zu finden. Dieses Epitop DFK wurde daher ausgewählt, um es im Einzelnen noch genauer zu charakterisieren und mögliche Kreuzreaktivitäten zu anderen Herpesviren zu untersuchen. Auch hier wurde zu Beginn wieder eine Peptidstimulation durchgeführt, um spezifische CD8<sup>+</sup>-Klone zu generieren, die dann im Weiteren unter anderem phänotypisch und auf die Erkennung von infizierten Zellen untersucht werden sollten.

#### 4.1.2 Häufigkeit von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen verschiedene HHV-6B-Epitope

CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit einer Spezifität für das von HLA-B\*08:01 präsentierte Epitop DFKSKYLTL (DFK) hatten unter den 16 Epitopspezifitäten, die in der Arbeit von Martin et al. (2018) identifiziert und charakterisiert wurden, im Mittel die höchste ex vivo Häufigkeit. Die HLA-Peptid-Multimerfärbung erlaubt eine sehr präzise Ermittlung der Häufigkeit antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Sims, Willberg, and Klenerman 2010). Für elf HLA-B\*08:01-restringierte Epitope aus HHV-6B-Antigenen sowie den HHV-6A-Varianten von zwei dieser Epitope waren Multimere verfügbar und wurden zur Färbung von PBMCs von acht gesunden Spendern mit dem passenden HLA verwendet (Abbildung 4). Die meisten Spender zeigten gegen die Epitope eine Färbung unterhalb des Hintergrundniveaus (<0.01 % der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen). Nur bei drei Epitopen war dies nicht der Fall. Hier stach das Epitop DFK mit einer besonders hohen T-Zellhäufigkeit, mit einem Median von 0,09 % der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, klar heraus. DFK-spezifische T-Zellen waren daher von besonderem Interesse für eine weiterführende funktionelle Analyse und für diese aufgrund ihrer Häufigkeit auch gut zugänglich.

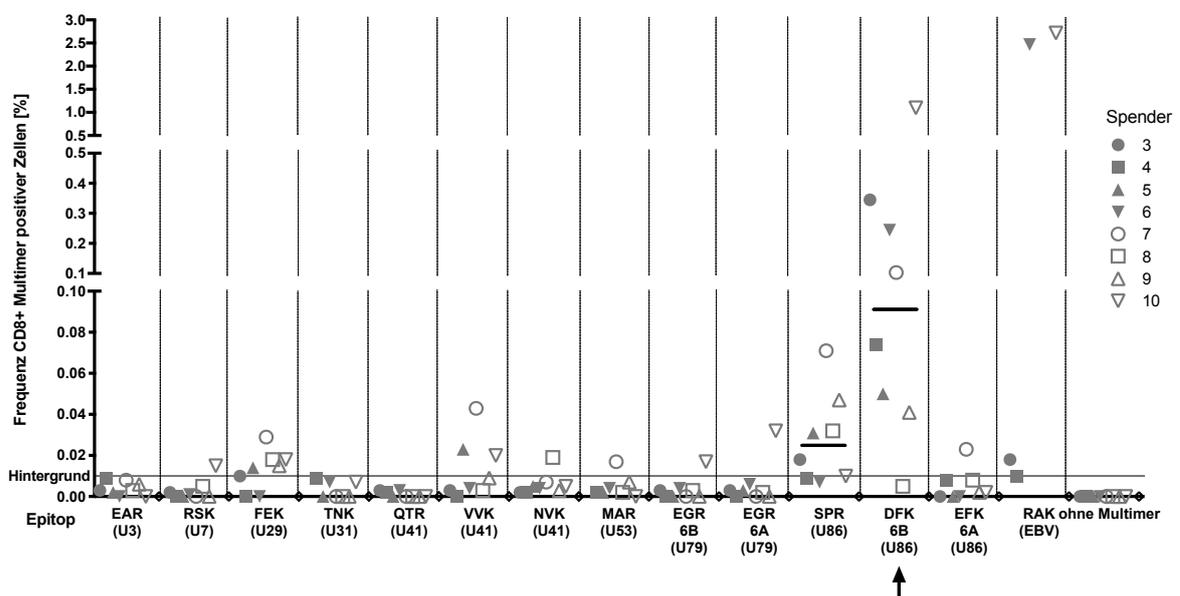


Abbildung 4: Ex vivo Häufigkeit von T-Zellen gegen elf HHV-6B-Epitope, zwei HHV-6A-Varianten und ein bekanntes, immundominantes EBV-Epitop, analysiert in acht HHV-6B-positiven Spendern. Markiert mit einem Pfeil ist das Epitop DFK. Gezeigt sind die Ergebnisse einer Färbung von PBMCs mit HLA-Peptid-Multimeren, mit einem „Gating“ auf CD8<sup>+</sup>-positive Zellen. Die Färbungen wurden von L. Martin unter Mitwirkung von A. Hollaus durchgeführt. Verändert aus Martin et al. 2018.

### 4.1.3 Anreicherung von DFK-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen

Bei der Untersuchung der Häufigkeitsverteilung von T-Zellen gegen elf HHV-6B Epitope (siehe 4.1.2) zeigte sich, dass die meisten Spender eine klar nachweisbare T-Zellantwort gegen das Epitop DFK hatten. Aus diesen wurde ein verfügbarer Spender für weiterführende Analysen ausgewählt. Dieser Spender 5 hatte 0,05 % DFK-spezifische Zellen unter seinen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, d.h. eine epitopspezifische T-Zellantwort von mittlerer Stärke.

Zuerst wurden DFK-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus den PBMCs des Spenders 5 angereichert. Dafür wurden aus am gleichen Tag abgenommenem peripherem Blut PBMCs isoliert und diese mit dem Peptid DFKSKYLTL (DFK) stimuliert und in Kultur genommen. Danach wurde die Kultur wöchentlich mit peptidbeladenen CD40-aktivierten B-Zellen restimuliert (Zentz et al. 2007). Die Anreicherung der DFK-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch diese Peptidstimulation wurde wöchentlich durch eine Peptid-Multimer-Färbung im FACS gemessen (Abbildung 5).

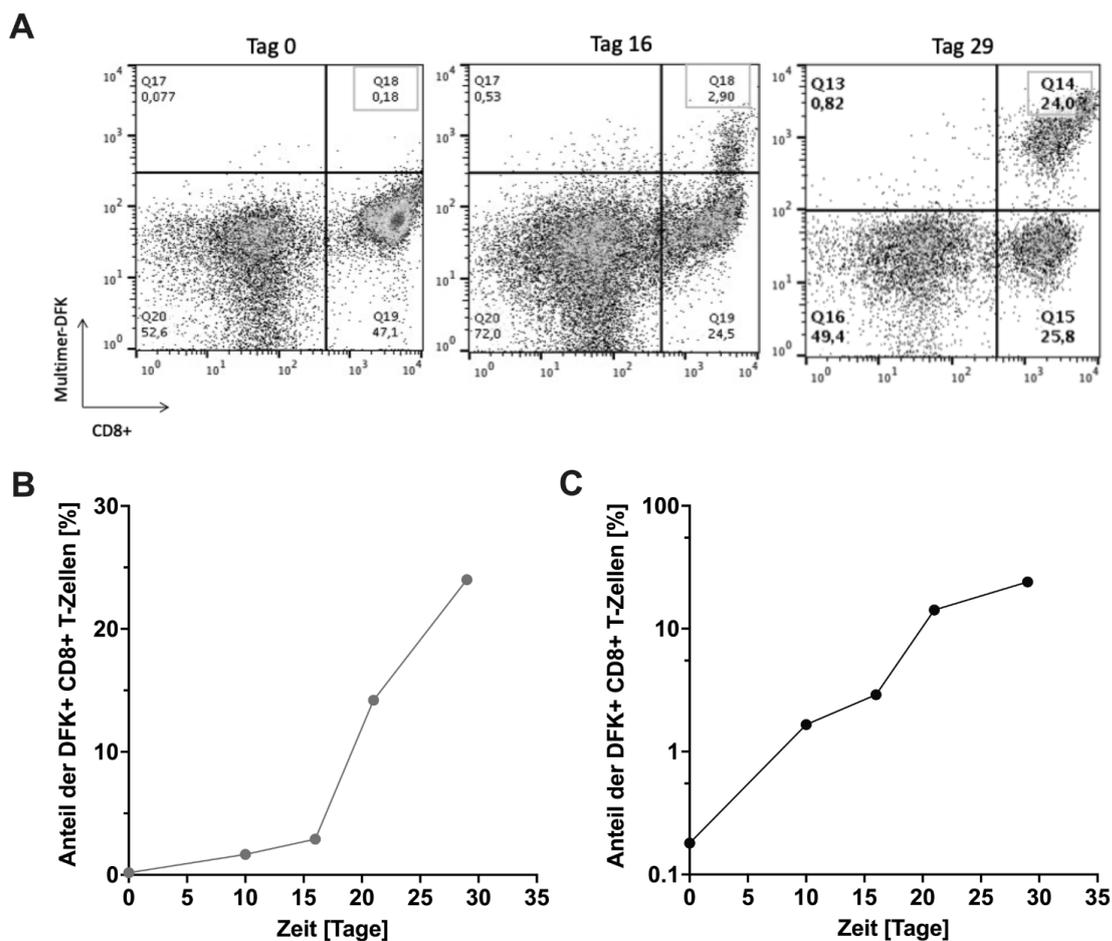


Abbildung 5: Anreicherung der DFK-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Population. (A) FACS-Analyse der DFK-Peptid-stimulierten T-Zellkultur, die mittels einer HLA/Peptid-Multimerfärbung analysiert wurde. Gezeigt werden drei exemplarischen Messpunkte: Tag 0, 16 und 29 nach Ansetzen der Kultur. (B) und (C) Übersicht über die Anreicherung der DFK-spezifischen T-Zellen bis Tag 29 mit linearer (B) und logarithmischer (C) y-Achse.

Durch den Stimulationsprozess wurde die DFK-spezifische, CD8<sup>+</sup>-Population von anfangs 0,18 % auf 24 % der T-Zellen in Kultur an Tag 29 angereichert. Nach dieser erfolgreichen Anreicherung der DFK-spezifischen Zellen konnte die Kultur für eine Einzelzellklonierung verwendet werden, um im Weiteren die so gewonnenen spezifischen T-Zellklone genauer charakterisieren zu können.

#### 4.1.4 Analyse von T-Zellkulturen auf eine DFK-Spezifität

Nach der Anreicherung der DFK-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurde mit der T-Zellkultur (siehe 4.1.3) eine Einzelzellklonierung durchgeführt werden. Dabei wurden die Zellen in einem so hohen Verdünnungsfaktor in Multiwell-Platten ausgebracht, dass im Mittel jedes well weniger als eine vermehrungsfähige Zelle erhielt. Dabei war die Erfahrung zu berücksichtigen, dass die Klonierungseffizienz in solchen Ansätzen typischerweise in der Größenordnung von 10 % liegt. Nach dem Ausplattieren der Zellen in zwei verschiedenen Verdünnungsstufen (0,7 und 2,5 Zellen pro well) in 10 Kulturplatten (96-well) wurden die so hergestellten 960 Einzelkulturen für 4 Wochen kultiviert. Nach diesem Zeitraum war in 26 Kulturen eine deutliche Zellvermehrung feststellbar. Die vermuteten T-Zellklone wurden auf ihre Spezifität gegen das DFK-Peptid getestet. Hierzu wurde ein Teil der T-Zellkulturen mit B-Blasten als antigenpräsentierende Zellen kokultiviert, in An- oder Abwesenheit des DFK-Peptids. Nach Inkubation über Nacht wurde das freigesetzte Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) im ELISA gemessen. Die ausgewachsenen Kulturen werden im Folgenden als „Klone“ bezeichnet, obwohl sie per Definition unter Umständen keine Klone sind, dies soll weiterhin noch bewiesen werden.

Unter den 26 getesteten Klonen befanden sich zwei, die die mit dem DFK-Peptid beladenen B-Blasten im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid besonders gut erkannten, die Klone Nummer 16 und 23 (Abbildung 6). Klon 16 erkannte auch unbeladene B-Blasten in gewissem Umfang, während Klon 23 ausschließlich die mit dem DFK-Peptid beladenen B-Blasten erkannte. Daher wurden diese beiden Klone im Folgenden weiter untersucht. Die restlichen Klone, die nicht bevorzugt das Peptid erkannten oder kein IFN- $\gamma$  produzierten, wurden nicht weiterverfolgt.

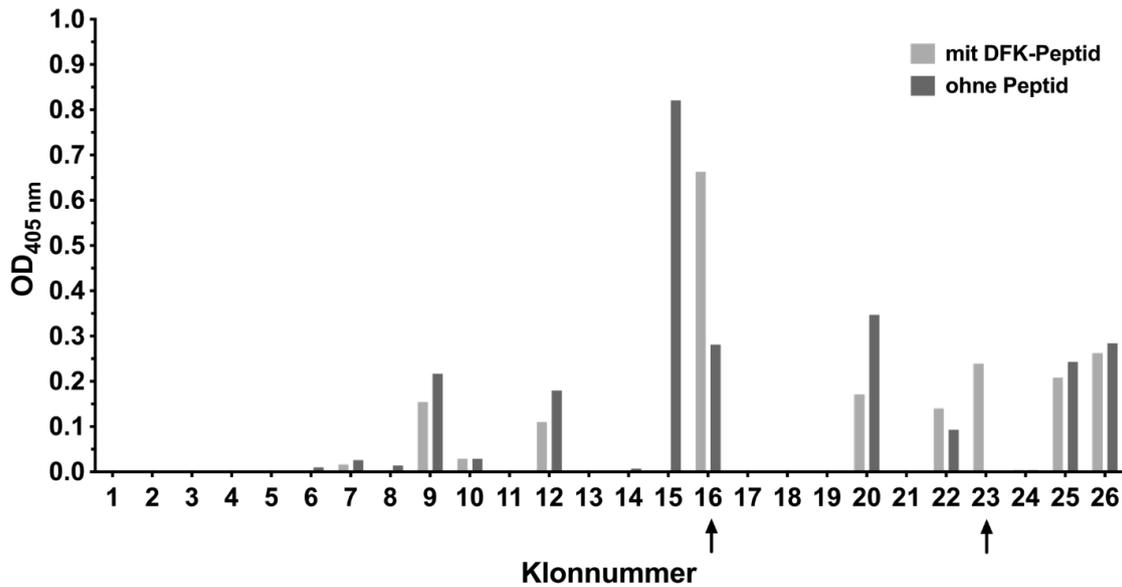


Abbildung 6: Funktionelle Analyse von 26 potentiellen T-Zell-Klonen 4 Wochen nach limitierender Verdünnung. Die Freisetzung von IFN- $\gamma$  wurde nach Inkubation von 10 000 T-Zellen mit 10 000 B-Blasten, mit oder ohne Peptid DFK, semiquantitativ im ELISA gemessen. OD, optische Dichte.

#### 4.1.5 Charakterisierung der Epitopspezifität der Klone 16 und 23

Die beiden vielversprechenden Klone 16 und 23 wurden mittels Analysen im Durchflusszytometer phänotypisch genauer charakterisiert. Hierbei sollten die Klone nicht nur auf ihre Epitopspezifität hinsichtlich des Peptids DFK untersucht werden, sondern auch auf mögliche weitere Spezifitäten. Die zum Epitop DFKSKYLTL aus HHV-6B homologe Sequenz in HHV-6A ist unerwartet stark verändert (EFKSKFSTL), mit drei Aminosäuren Unterschied, obwohl der Konservierungsgrad der Aminosäuresequenzen der beiden Viren insgesamt 90 % und des U86-Proteins 86 % beträgt (Ablashi et al. 2014; Dominguez et al. 1999). Dennoch wurde die Erkennung dieses HHV-6A-Homologs durch die DFK-spezifischen T-Zellen im Test überprüft. Bei einer Suche nach weiteren ähnlichen und daher potenziell kreuzreaktiven Peptidsequenzen aus anderen Organismen mittels BLAST (Johnson et al. 2008) wurde eine hohe Homologie zu einem Peptid aus dem Malaria-Erreger Plasmodium falciparum festgestellt. Die betreffende Sequenz aus dem Antigen Falcipain-2 lautet EKFSKYLTL und unterscheidet sich somit in nur einer Aminosäure von DFKSKYLTL aus HHV-6B. Um diese beiden eventuellen Kreuzreaktivitäten zu untersuchen, wurden für die drei Peptidsequenzen HLA/Peptid-Multimere hergestellt und diese in einer durchflusszytometrischen Analyse zur Färbung der beiden DFK-spezifischen Klone 16 und 23 verwendet (Abbildung 7):

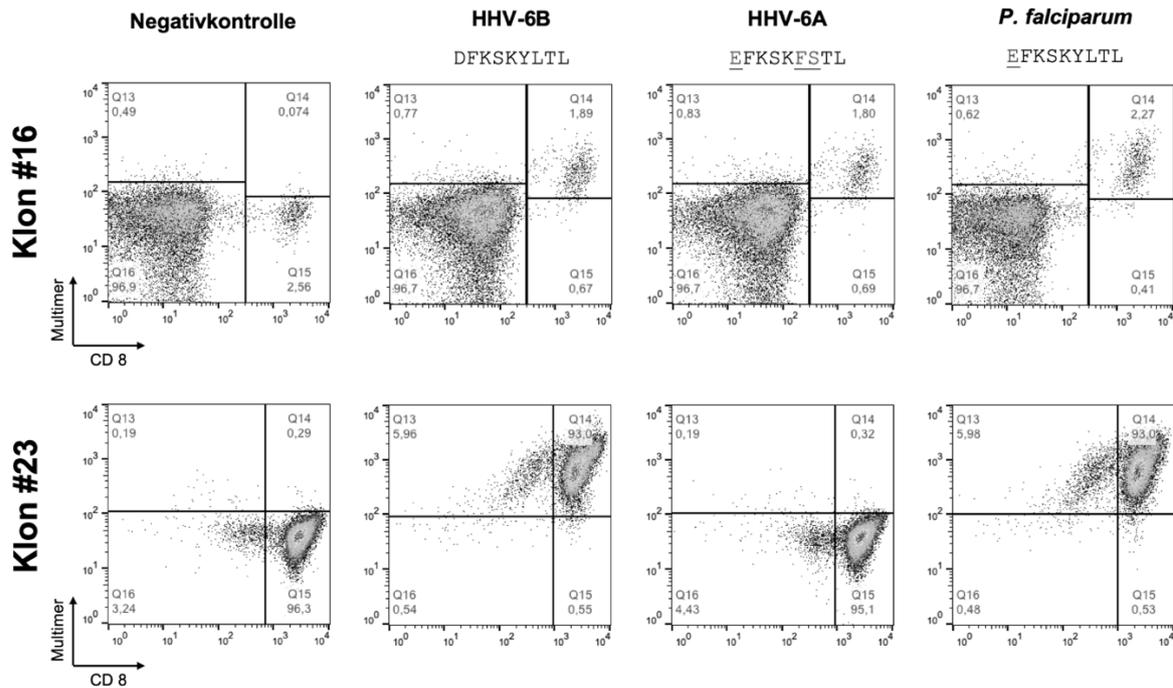


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Analyse der Bindung der DFK-reaktiven T-Zellklone 16 und 23 an HLA/Peptid-Multimere mit drei verschiedenen Peptiden. Die Zellen wurden auf CD3<sup>+</sup> vorgegattet. Hier sind nur die CD3<sup>+</sup>-T-Zellen dargestellt. Die Negativkontrolle zeigt die Färbung ohne HLA/Peptid-Multimer.

Die Multimer-FACS-Färbung zeigte, dass es sich bei dem Klon 16 um eine Mischkultur handelte, die sowohl aus einer CD4<sup>+</sup>- als auch aus einer CD8<sup>+</sup>-Population bestand. Die etwa 2 % CD8<sup>+</sup>-Zellen banden jedes der drei Multimere. Die Populationsgrößen und Fluoreszenzintensitäten waren zwischen den von HHV-6B und HHV-6A abgeleiteten HLA/Peptid-Multimeren nicht unterscheidbar, trotz der erheblichen Abweichung in der Aminosäure-Sequenz. Das weniger abweichende P. falciparum-Epitop wurde ebenfalls gebunden.

Klon 23 zeigte eine weitgehend homogene CD8<sup>+</sup>-Population. Diese konnte durch die Multimere DFK und EFK (P. falciparum) gut gefärbt werden. Hingegen wurde das Peptid EFK (HHV-6A) mit den drei Aminosäurenunterschieden nicht erkannt. Die Analyse der beiden T-Zell-Klone zeigte, dass unterschiedliche Spezifitätsmuster der Interaktion mit homologen Epitopen aus HHV-6B und HHV-6A möglich sind. Mit hoher Wahrscheinlichkeit trugen die beiden CD8<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen unterschiedliche T-Zellrezeptoren, was ein unterschiedliches Spektrum an Kreuzreaktivitäten erklären kann (Burrows et al. 1995). Die Kreuzerkennung des P. falciparum-Epitops durch beide T-Zellklone ist ein interessanter Befund, der weiter abgeklärt werden muss. Zufällige Ähnlichkeiten humaner T-Zellepitope mit Aminosäuresequenzen fremder Organismen sind nicht selten (Birnbauer et al. 2014). Eine derartige Kreuzreaktivität zwischen bedeutenden, nicht verwandten humanen Pathogenen ist jedoch eine Besonderheit.

#### 4.1.6 Erkennung von HHV-6A, -6B und -7 infizierten Zellen

Experimente zur Erkennung von synthetischen Peptiden, wie oben beschrieben, geben eine erste Auskunft über die Spezifität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und sind in Screening-Untersuchungen besonders praktikabel. Zur Einschätzung der tatsächlichen funktionellen Relevanz von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist es aber nötig zu testen, ob auch in Zellen endogen prozessiertes Antigen von den T-Zellen erkannt wird. Im optimalen Fall gibt es bei manchen Pathogenen sogar in-vitro-Systeme mit dem tatsächlichen Krankheitserreger, die verwendet werden können, um die CD8<sup>+</sup>-T-Zellerkennung zu testen. Dies ist bei humanen Roseoloviren (HHV-6B, HHV-6A und HHV-7) der Fall. Unsere Arbeitsgruppe zeigte bereits vor einiger Zeit (Martin et al. 2012), dass primäre humane CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit HHV-6B oder -6A in vitro infiziert werden können und dann ein Antigen gegenüber CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentieren. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit aufgegriffen und auf HHV-7 erweitert. Primäre CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus geeigneten humanen Blutproben (in diesem Falle von HLA-B\*08:01-positiven Spendern) mittels immunmagnetischer Positivisolation (mit CD4-Microbeads) frisch aufgereinigt, für drei Tage in Kultur mit PHA-M stimuliert und dann mit virushaltigen Zellkulturüberständen versetzt, um die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit dem jeweiligen Virus zu infizieren. Mit allen drei Roseoloviren ergab sich nach einigen Tagen ein typischer zytopathischer Effekt mit ballonartiger Zellvergrößerung. Abbildung 8 zeigt diesen Effekt für Tag 6 nach Infektion. Der Effekt war bei HHV-6B noch ausgeprägter als bei den beiden anderen Viren.

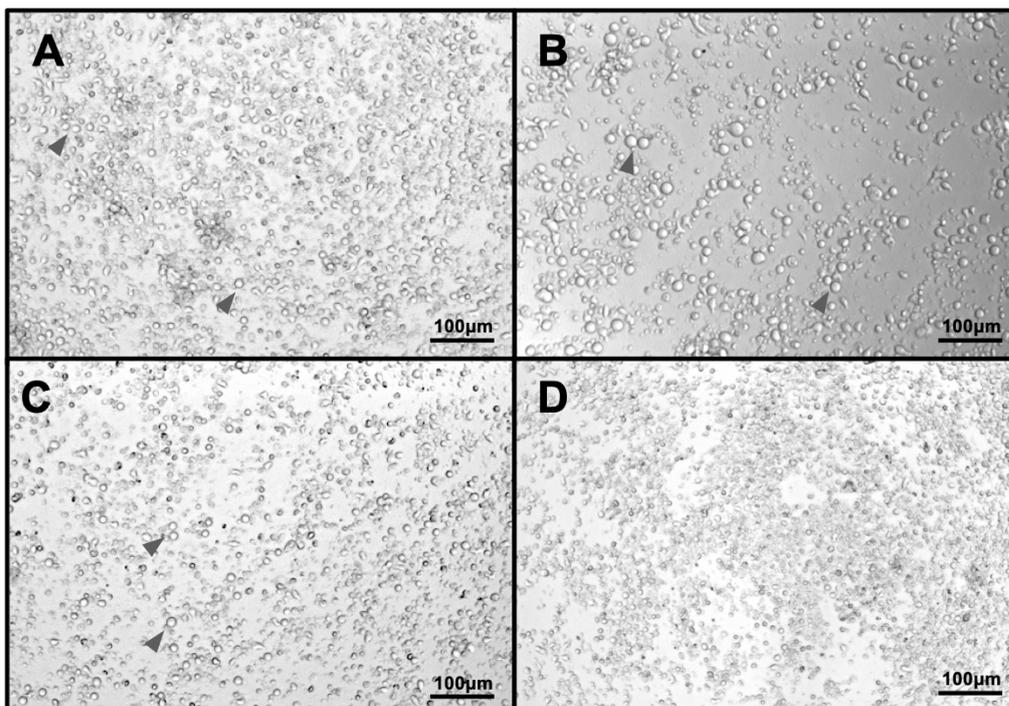


Abbildung 8: Infizierte Zellen an Tag 6 nach Infektion. Die Markierung zeigt infizierte Zellen mit zytopathischem Effekt, bei dem sich die Zellen ballonartig vergrößern, bevor sie apoptotisch werden. Infizierte Zellen mit HHV-6A (A), HHV-6B (B), HHV-7 (C) und nicht infizierte Zellen (D).

Die infizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden dann als Zielzellen in funktionalen Tests mit den beiden oben genannten HHV-6B-spezifischen T-Zellkulturen (Kultur 16 und Klon 23) als Effektorzellen verwendet. Beide T-Zellkulturen erkannten jeweils das Peptid DFK (nun als Positivkontrolle) und die HHV-6B-infizierten Zellen in ähnlicher Intensität. Offenbar wird das DFK-Peptid von infizierten Zellen effektiv produziert und präsentiert. HHV-6A- und HHV-7-infizierte Zellen schienen ebenfalls erkannt zu werden, aber deutlich schwächer und das Signal lag näher am Hintergrundsignal. Zu diesen beiden Viren kann also noch keine sichere Aussage getroffen werden. Wie in Tabelle 24 gezeigt, unterscheidet sich die Sequenz des HHV-6B-Peptids (DFKSKYLTL) von den beiden Homologen aus den anderen Viren um je drei Aminosäuren, die Unterschiede zwischen HHV-6A und HHV-7 betragen sogar fünf Aminosäuren. Daher ist eine Kreuzerkennung nicht sehr wahrscheinlich zumal auch wichtige Ankerminosäuren in HHV-6A und HHV-7 verändert vorliegen.

Tabelle 24: Sequenzvergleich des DFK-Epitops mit HHV-6A und HHV-7.

Virus	Antigen	Sequenz
HHV-6A AJ	U86	<u>E</u> FKSK <u>F</u> STL
HHV-6B HST	U86	DFKSKYLTL
HHV-7 JI	U86	D <u>F</u> LSKY <u>T</u> AL

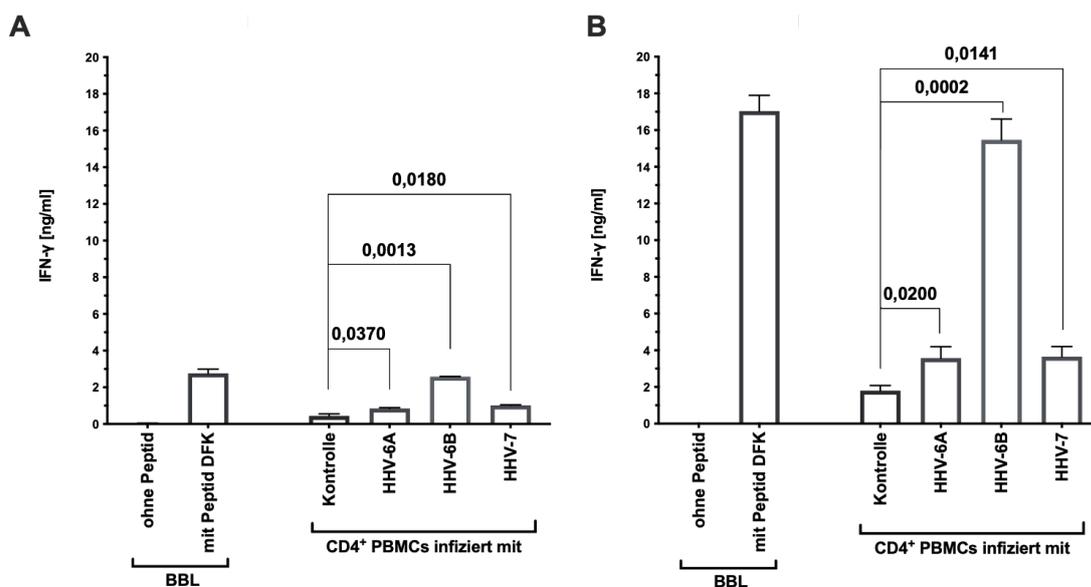


Abbildung 9: Reaktivität der beiden DFK-spezifischen Klone 16 und 23 auf infizierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. A) Der Klon 16, der aus einer CD4<sup>+</sup>- und einer CD8<sup>+</sup>-Population besteht, erkennt die mit dem DFK-Peptid beladenen BBL. Zudem erkennt er auch die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die mit HHV-6B infiziert sind. B) Der CD8<sup>+</sup>-Klon 23 erkennt die BBL, die mit dem DFK-Peptid beladen sind. Zudem erkennt er die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die mit HHV-6B infiziert sind sehr gut. Erste Anzeichen einer Erkennung zeigen sich gegen die mit HHV-6A und HHV-7 infizierten T-Zellen.

Klon 23 hat weder das HHV-6A-Multimer erkannt, noch gab es eine eindeutige Reaktivität gegen HHV-6A-infizierte Zellen. Das war nicht überraschend, da eine Abweichung von drei Aminosäuren sehr stark ist. Es gibt wenige Beispiele dafür, dass ein so stark modifiziertes Peptid von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen noch erkannt wird. Bereits eine Abweichung von nur einer Aminosäure im Peptid führt bei CD8<sup>+</sup>-T-Zellen oft zu einer Verhinderung der Reaktivität (de Silva et al. 2021).

Da der Klon 16 jedoch auch das HHV-6A-Multimer zu binden schien, sind hier weitere Untersuchungen mit einer größeren Zahl von Klonen nötig. Dies lohnt sich auch wegen der Immundominanz und daher potenziellen Bedeutung des Epitops für Anwendungen in Diagnostik oder Therapie. Möglicherweise sind HHV-6B-DFK-spezifische T-Zellen je nach ihrem TCR mit HHV-6A kreuzreaktiv oder nicht.

Es fällt auf, dass das hier untersuchte Epitop DFK in den humanen Roseoloviren wesentlich schlechter konserviert ist als die anderen von uns identifizierten HLA-B\*08:01-Epitope (Martin et al. 2018). Zugleich ist dieses Epitop innerhalb dieser Gruppe klar immundominant. Möglicherweise ist es kein Zufall, dass dieses Epitop und seine homologen Sequenzen in HHV-6A und -7 so stark abweichen, sondern es könnte hier eine Immunselektion vorliegen. (Dabei ist zu berücksichtigen, dass das U86-Antigen zwischen HHV-6A und 6B insgesamt eher wenig konserviert ist.) Die meisten gesunden Spender sind positiv für HHV-6B. HHV-6A ist von geringerer, aber nicht genau bekannter Prävalenz. Eine mögliche Hypothese wäre, dass die Eliminierung der immundominantesten Epitope durch Mutation der homologen Sequenzen im HHV-6A Genom eine Infektion von bereits HHV-6B-positiven Personen mit HHV-6A begünstigt.

#### 4.1.7 DFK-Klone lysieren HHV-6B-infizierte Zellen

In den bereits präsentierten Experimenten konnte gezeigt werden, dass DFK-spezifische T-Zellklone IFN- $\gamma$  produzieren, wenn sie entweder exogen präsentiertes DFK-Peptid auf antigenpräsentierenden Zellen (siehe 4.1.4) oder dieses nach endogener Prozessierung auf mit HHV-6B infizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen (siehe 4.1.6). Eine weitere Hauptfunktion von antiviralen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist ihre Fähigkeit infizierte Zellen abzutöten, indem sie diese zur Apoptose veranlassen. Der anschließende Zerfall der Zellen kann mittels eines Calcein Release Assays sichtbar gemacht und gemessen. Der Calcein Release Assay ist eine Zytotoxizitätsanalyse, bei der die Targetzellen zunächst mittels des Farbstoffes Calcein AM grün fluoreszierend eingefärbt werden. Die Targetzellen werden dann mit den Effektorzellen, den T-Zellklonen oder einer polyklonalen T-Zelllinie in unterschiedlichen Konzentrationsstufen zusammen für 3-4 h inkubiert. Während dieser Inkubation verursachen T-Effektorzellen den Tod der Targetzellen und diese setzen den Farbstoff frei, der im Überstand fluorometrisch gemessen wird. Anhand einer Positivkontrolle (Detergens-vermittelte Lyse der Targetzellen) kann dann die spezifische Lyse einer einzelnen Probe berechnet werden. Der DFK-Klon 23 und die polyklonale T-Zelllinie, der der DFK-Klon 23 entstammte, wurden in einem solchen Test mit HHV-6B-infizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen konfrontiert, die entweder HLA-B\*08:01-positiv waren oder nicht (siehe Abbildung 10). Der spezifische DFK-Klon 23 konnte die autologen HLA-B\*08:01-positiven mit HHV-6B infizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen in abstuften Target- zu Effektorzellverhältnissen sehr gut erkennen und erfolgreich abtöten. Bei einem Effektor-zu-Target-Verhältnis von 16:1 konnten über 90 % der infizierten Zellen lysiert werden. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ohne HLA-B\*08:01-Allel konnten durchschnittlich nur in einem Bereich von etwa 20-30 % lysiert werden (Abbildung 10 A und B). Ein insgesamt recht ähnliches Verhalten zeigte auch die polyklonale, DFK-peptidstimulierte T-Zelllinie (Abbildung 10 C und D). Bei diesen Experimenten dienten nicht infizierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen des jeweiligen Spenders in den einzelnen Effektor-zu-Target-Verhältnissen jeweils als Negativkontrolle. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass der spezifische DFK-Klon 23 die zytotoxische Fähigkeit einer CD8<sup>+</sup>-T-Zelle hinsichtlich der Erkennung und Lyse von HHV-6B infizierten Zellen besitzt und daher für weitere Untersuchungen diesbezüglich gut geeignet ist.

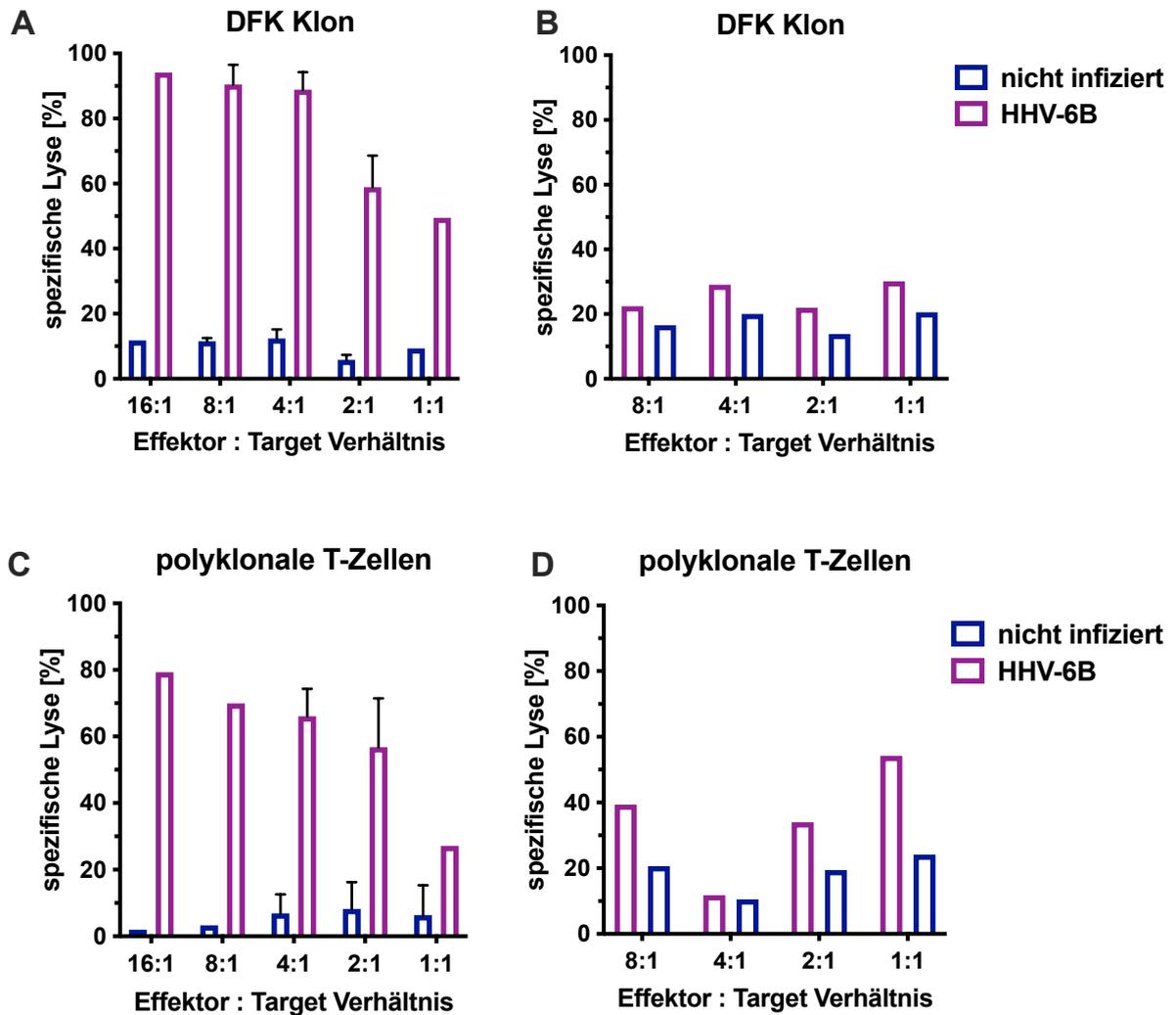


Abbildung 10: Zytotoxizitätsanalyse des CD8<sup>+</sup>-DFK-Klons 23 und einer polyklonalen DFK-peptidstimulierten T-Zelllinie, aus der der DFK-Klon 23 hergestellt wurde. Es wird der Anteil der Zellen gezeigt, die spezifisch in unterschiedlichen Effektor-zu-Target-Verhältnissen spezifisch lysiert wurden. Hierbei wurden sowohl mit HHV-6B infizierte als auch nicht infizierte CD4<sup>+</sup>-Zellen als Targetzellen verwendet. In (A) und (C) wurden autologe HLA-B\*08:01-positive CD4<sup>+</sup>-Zellen als Targetzellen verwendet, und als Effektorzellen entweder der DFK-Klon 23 (A) oder eine polyklonale T-Zelllinie (C). In (B) und (D) wurden allogene, HLA-B\*08:01-negative CD4<sup>+</sup>-Zellen als Targetzellen verwendet. Diese wurden ebenfalls mit dem DFK-Klon 23 (B) oder einer polyklonalen T-Zelllinie (D) als Effektorzellen getestet.

#### 4.1.8 Analyse von Differenzierungsmarkern auf HHV-6B-spezifischen T-Zellen ex vivo

Die T-Zelldifferenzierung kann mittels einer durchflusszytometrischen Analyse von Oberflächenmarkern charakterisiert werden. Diese Marker korrelieren mit bestimmten Differenzierungszuständen und somit auch unterschiedlichen dominierenden Funktionen von T-Zellen (Sallusto et al. 1999). Um die Differenzierung von DFK-spezifischen T-Zellen ex vivo genauer zu untersuchen, wurden von zwei gesunden HLA-B\*08:01-positiven Spendern PBMCs isoliert und diese für eine durchflusszytometrische Analyse mit verschiedenen Differenzierungsmarkern gefärbt. Beide Spender hatten wie in 4.1.2 gezeigt, bereits ex vivo eine überdurchschnittliche Anzahl an CD8<sup>+</sup>-DFK-spezifischen T-Zellen. Die Spender 3 und 6 hatten in dieser ersten Analyse 0,35 % bzw. 0,25 % CD8<sup>+</sup>-DFK-spezifische T-Zellen, die mittels Multimer-Färbung gemessen wurden.

In diesem Experiment zeigten die DFK-spezifischen T-Zellen beider Spender ex vivo einen gemischten Phänotyp in Bezug auf Marker für zentrale Gedächtnis-T-Zellen, Effektor-Gedächtnis-T-Zellen oder für terminale Differenzierung (Abbildung 11). Die meisten spezifischen T-Zellen waren im Bereich von Effektor-Gedächtnis-T-Zellen angesiedelt (TEM, CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>, oder TEMRA, CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>). Besonders bei Spender 6 fiel eine starke Population von CD57-positiven Zellen auf, ein Marker, der mit terminaler Differenzierung in Verbindung gebracht wird (Brenchley et al. 2003; Kared et al. 2016).

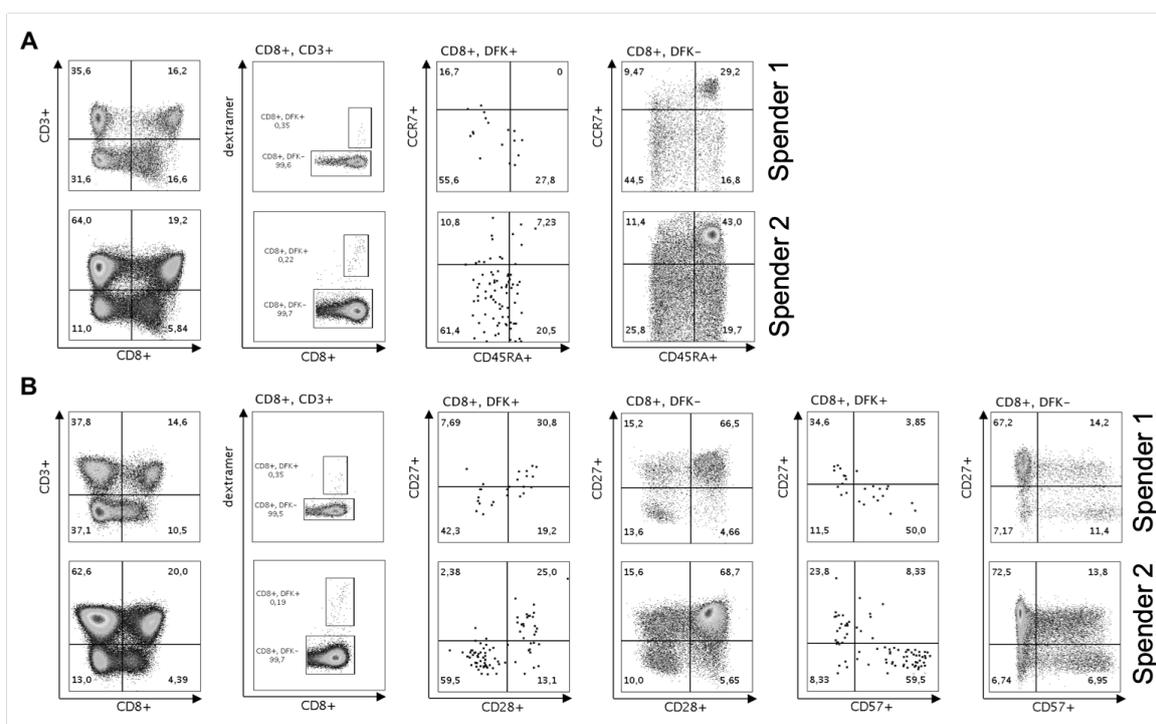


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse mittels Oberflächenmarkern von HHV-6B spezifischen T-Zellen bei zwei gesunden HHV-6B-positiven Spendern.

## 4.2 Analyse der T-Zellantwort auf die DNA-Polymerase U38

In dieser Phase des Projekts sollte die T-Zellantwort gegen die vollständige Aminosäuresequenz von einzelnen, ausgewählten HHV-6B-Antigenen näher untersucht werden. Kriterien für die Auswahl waren, dass die Antigene bisher noch nicht in dieser Weise untersucht wurden, aber zumindest im Prinzip ihre Immunogenität für CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten bereits gezeigt worden war. Wie oben kurz dargestellt (siehe Kapitel 4.1), wurden in einer Querschnittsanalyse von HHV-6B-Epitopen in zwei Antigenen (U38 und U41) zwei oder mehr Epitope identifiziert und gezeigt, dass epitopspezifische T-Zellklone infizierte Zellen erkennen. Daher wurden diese Antigene in die engere Wahl genommen. In diesem Kapitel wird die Untersuchung der T-Zellantwort gegen U38, die virale DNA-Polymerase, beschrieben. Außer den von uns (siehe Kapitel 4.1) beschriebenen beiden HLA-B\*08:01-restringierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitopen (Martin et al. 2018) sind in der Literatur keine spezifischen T-Zellantworten gegen U38 oder T-Zellepitope in diesem Antigen beschrieben. Im Gegensatz zur Querschnittsanalyse gab es nun keine Beschränkung mehr auf ein bestimmtes HLA, es wurden aber bevorzugt Spender mit in der Population häufigen HLAs ausgewählt.

### 4.2.1 Ex vivo Untersuchungen zur Häufigkeit einer U38-spezifischen T-Zellantwort

Analysen der ex vivo T-Zellantwort gegen U38 wurden mit peripherem Blut gesunder, HLA-typisierter gesunder HHV-6-seropositiver Spender vorgenommen. Das Antigen U38 wurde in der Form einer überlappenden Peptidbibliothek eingesetzt (15-mer-Peptide, überlappend in je 11 Aminosäuren, insgesamt 255 Peptide). Diese Peptidbibliothek wurde nach Bedarf in großen oder kleinen Pools oder in Form einzelner Peptide zur T-Zellstimulation verwendet. Um sich einen Überblick über die T-Zellantwort gegen U38 zu schaffen, wurden zunächst ex vivo IFN- $\gamma$ -ELISpot-Analysen durchgeführt. Hierbei wurde der Peptidpool von U38 in zwei große Pools aufgeteilt: Pool 1 bestand aus den 144 N-terminalen Peptiden, Pool 2 aus den restlichen 111 Peptiden von U38. Zusätzlich wurden die Peptide der beiden großen Pools noch jeweils auf Subpools verteilt, die maximal 12 Peptide enthielten und in der Art einer zweidimensionalen Matrix angesetzt wurden (Tabelle 10), daher kann man von „horizontalen“ und „vertikalen“ Subpools sprechen. Dieser Ansatz diente zur vereinfachten Identifizierung der erkannten T-Zellepitope innerhalb der Sequenz von U38. Die Signale (Spots) im ELISpot entstehen, wenn eine T-Zelle auf einer antigenpräsentierenden Zelle (z.B. einem Monozyten) einen HLA/Peptid-

Komplex erkennt, aktiviert wird und das Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) ausschüttet. Das Zytokin wird dann im näheren Bereich der T-Zelle durch einen passenden Antikörper auf der Membran am Boden des Gefäßes gebunden und später mittels einer enzymatischen Färbereaktion sichtbar gemacht. Zur Ermittlung der Häufigkeit von U38-spezifischen T-Zellen wurden ein IFN- $\gamma$ -ELISpot mit kryokonservierten Zellen des HHV-6 positiven Spenders 0308 durchgeführt, mit den einzelnen horizontalen und vertikalen Subpools (Abbildung 12).

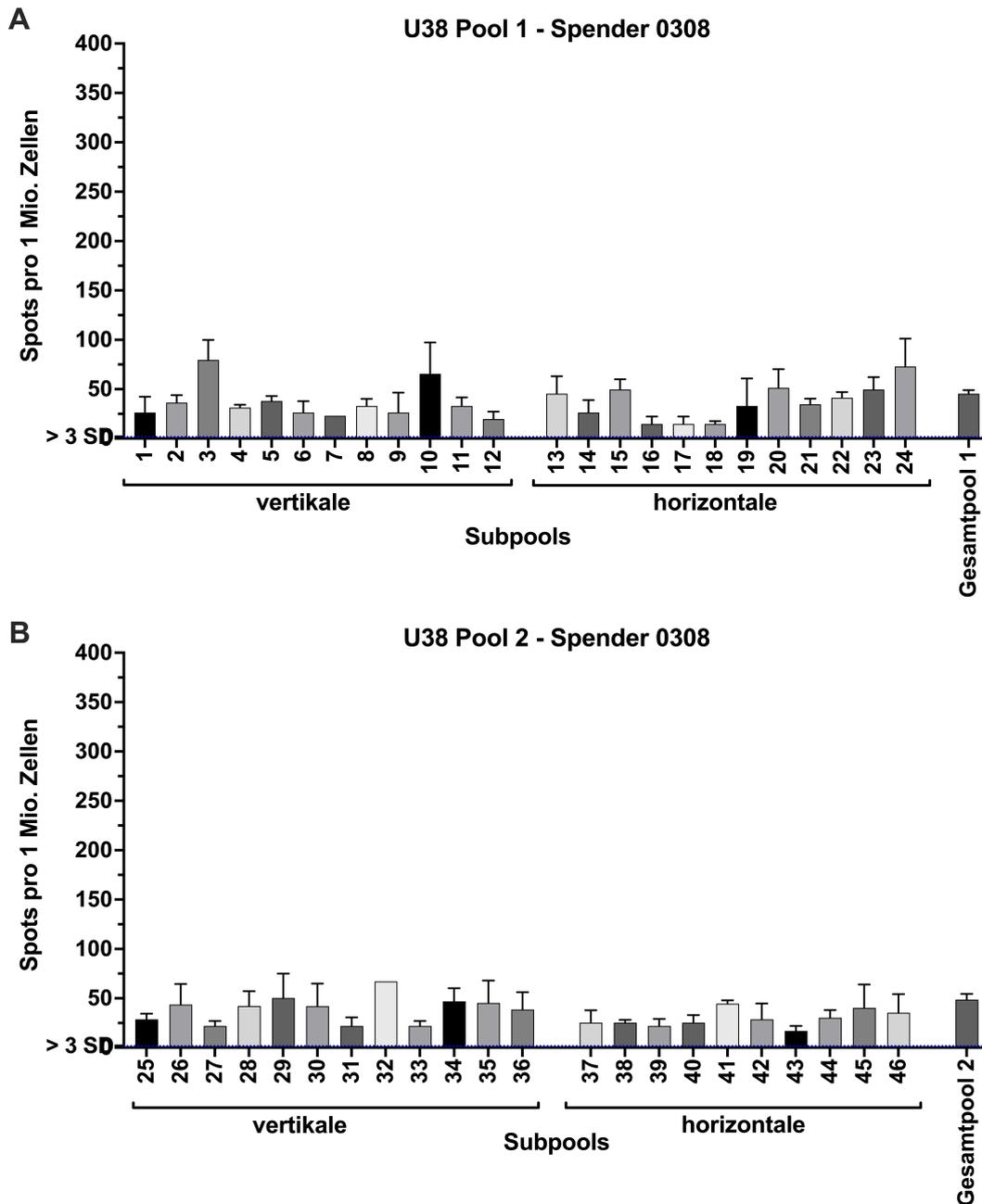


Abbildung 12: Ex vivo Häufigkeiten von HHV-6 spezifischen T-Zellen gegen das Antigen U38. Je well einer ELISpot-96-well-Platte wurden  $2,5 \times 10^5$  frisch aufgetaute PBMCs verwendet. In dieser Darstellung wurden die Ergebnisse auf Spots pro  $10^6$  Zellen umgerechnet. Die gestrichelte Linie markiert die Negativkontrolle plus 3-fache Standardabweichung („ $>3$  SD“).

Sowohl Pool 1 als auch Pool 2 zeigten im ELISpot nur sehr geringe T-Zellantworten gegen die Subpools der DNA-Polymerase U38 ebenso wie gegen die beiden Gesamtpools 1 und 2, die zusammen das U38-Antigen abdecken (Abbildung 12). Die Anzahl der gemessenen Spots gegen einzelne Subpools lag zwischen 15 und 80 Spots je 1 Million Zellen. Die unspezifische Hintergrundreaktion lag bei 20 Spots. Die höchsten Signale, mit über 70 Spots je 1 Million Zellen, gab es bei den Subpools Nummer 3, 10, 24 und 32. Zwar lagen diese Signale erheblich über der Negativkontrolle, sind jedoch noch nicht hoch genug, um die Anwesenheit entsprechender spezifischer T-Zellen ohne Überprüfung mit hoher Konfidenz anzunehmen. Insgesamt hatten bei diesem Spender U38-spezifische T-Zellen eine klar niedrigere Häufigkeit, als sie z.B. für T-Zellen gegen dominante Antigene anderer Herpesviren wie CMV oder EBV im gleichen Testsystem beobachtet wird (Elkington et al. 2003).

#### **4.2.2 Anreicherung der U38-spezifischen T-Zellantwort durch Peptidstimulationen**

Nachdem die ELISpot Analysen gezeigt hatten, dass HHV-6 spezifische T-Zellen ex vivo in zu geringer Häufigkeit vorhanden waren, um sie unmittelbar weiter analysieren zu können, wurde eine Restimulationsmethode gewählt, um zu virusspezifischen T-Zellkulturen zu gelangen und mit diesen die Spezifität und Funktion von U38-spezifischen Zellen untersuchen zu können. Es wurde auf das bereits erfolgreich etablierte Protokoll von Wiesner et al. (2008) zurückgegriffen, das sich mit der Anreicherung von EBV und CMV spezifischen T-Zellen befasst. Hierbei werden frisch aus Vollblut isolierte oder kryokonservierte PBMCs je zur Hälfte mit der gesamten Peptidbank des zu untersuchenden Antigens für 2 h bei 37°C beladen. Anschließend werden durch mehrmaliges Waschen die ungebundenen Peptide entfernt und die beladenen PBMCs werden im Verhältnis von 1:1 mit unbeladenen PBMCs zusammen kultiviert. Hierbei soll die Zellzahl  $2,5 \times 10^6$  pro ml betragen, um ein optimales Zellwachstum zu garantieren. Da das Antigen U38 aus insgesamt 255 Einzelpeptiden bestand, und es üblich ist, eine Maximalpeptidanzahl für eine T-Zellkultur von 150 Peptiden nicht wesentlich zu überschreiten (Ameres et al. 2015; Kern, Faulhaber, Frommel, et al. 2000), wurden zwei T-Zellkulturen parallel angesetzt, wobei Kultur 1 mit den ersten 144 Peptiden (Gesamtpool 1) und Kultur 2 mit den restlichen 111 Peptiden (Gesamtpool 2) stimuliert wurde.

Nach zehn Tagen wurde mit bestrahlten, autologen und mit den entsprechenden Peptiden beladenen CD40-aktivierten B-Blasten restimuliert, wobei das Verhältnis von T-Zellen zu B-Blasten 4:1 betrug. Um als Wachstumsfaktor zu fungieren, wurde das Zytokin Interleukin

2 (IL-2) zur Kultur zugegeben, dessen Konzentration alle sieben Tage schrittweise erhöht wurde.

Die mit den U38-Peptiden stimulierten T-Zelllinien wurden in den ersten fünf Wochen im Durchflusszytometer analysiert, um die Anteile von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu bestimmen, um frühzeitig zu erkennen, ob die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eventuell von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen verdrängt werden würden (Abbildung 13). In beiden Kulturen steigerte der CD8<sup>+</sup>-T-Zellanteil in den ersten 17 Tagen und blieb anschließend bei rund 50-70 % konstant. Die restlichen Zellen waren überwiegend CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

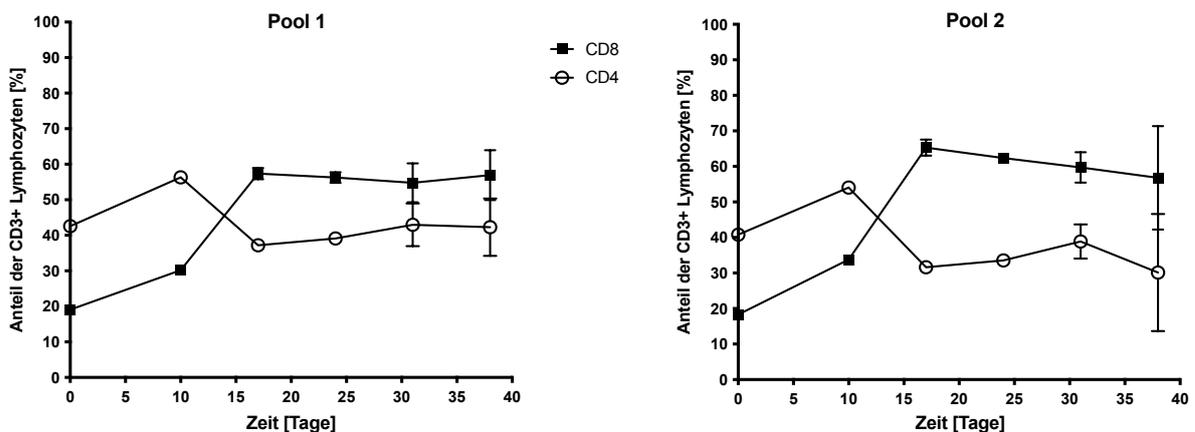


Abbildung 13: Analyse der T-Zellkulturen von U38 mittels Durchflusszytometer. Es wurden jeweils sechs Zeitpunkte bis Tag 38 nach Ansetzen der Kulturen gemessen.

Nach 31 Tagen in Kultur, also nach der vierten Restimulation, wurden die beiden T-Zellkulturen auf das Vorhandensein von U38-spezifischen T-Zellen untersucht. Hierbei wurden je  $1,5 \times 10^5$  T-Zellen mit  $1,5 \times 10^5$  autologen B-Blasten in Anwesenheit von Peptid-Subpools oder dem jeweils dazu passenden Gesamtpool inkubiert (Abbildung 14 A und C). Hierbei zeigte sich allerdings weder in Kultur 1 noch Kultur 2 eine starke Anreicherung von spezifischen T-Zellen. In beiden Kulturen wurde eine hohe Hintergrundreaktivität gegen die autologen, unbeladenen B-Blasten gemessen und eine peptidspezifische Reaktivität war nicht erkennbar. Das Restimulationsprotokoll wurde noch weitere drei Wochen fortgesetzt und dann erneut die gleiche Analyse wie gerade beschrieben durchgeführt.

Nach somit insgesamt sieben Wochen Restimulation zeigten sich in beiden T-Zellkulturen nun eine klare Anreicherung von U38-spezifischen T-Zellen gegen bestimmte Teile des Antigens (Abbildung 14 B). Kultur 1 zeigte eine starke Antwort auf die Peptide aus den Subpools 8 und 9, Kultur 2 reagierte stark gegen die Subpools 31, 32 und 33 (zudem noch schwach gegen die Subpools 27 und 28). Die Signale von zwei, in selteneren Fällen sogar von drei benachbarten vertikalen Peptidpools gehen oft auf das gleiche Epitop zurück

(Ameres et al. 2015), da derart benachbarte Pools Peptide enthalten, die sich in 11 Aminosäuren überschneiden und typische CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitope mit einer Länge von 9 Aminosäuren meist in mehr als einem der benachbarten Pools vertreten sind. Daher ließ sich in diesem Stadium der Analyse sagen, dass in Kultur 1 und Kultur 2 jeweils T-Zellen gegen mindestens ein Epitop klar expandiert waren, eventuell auch gegen weitere Epitope.

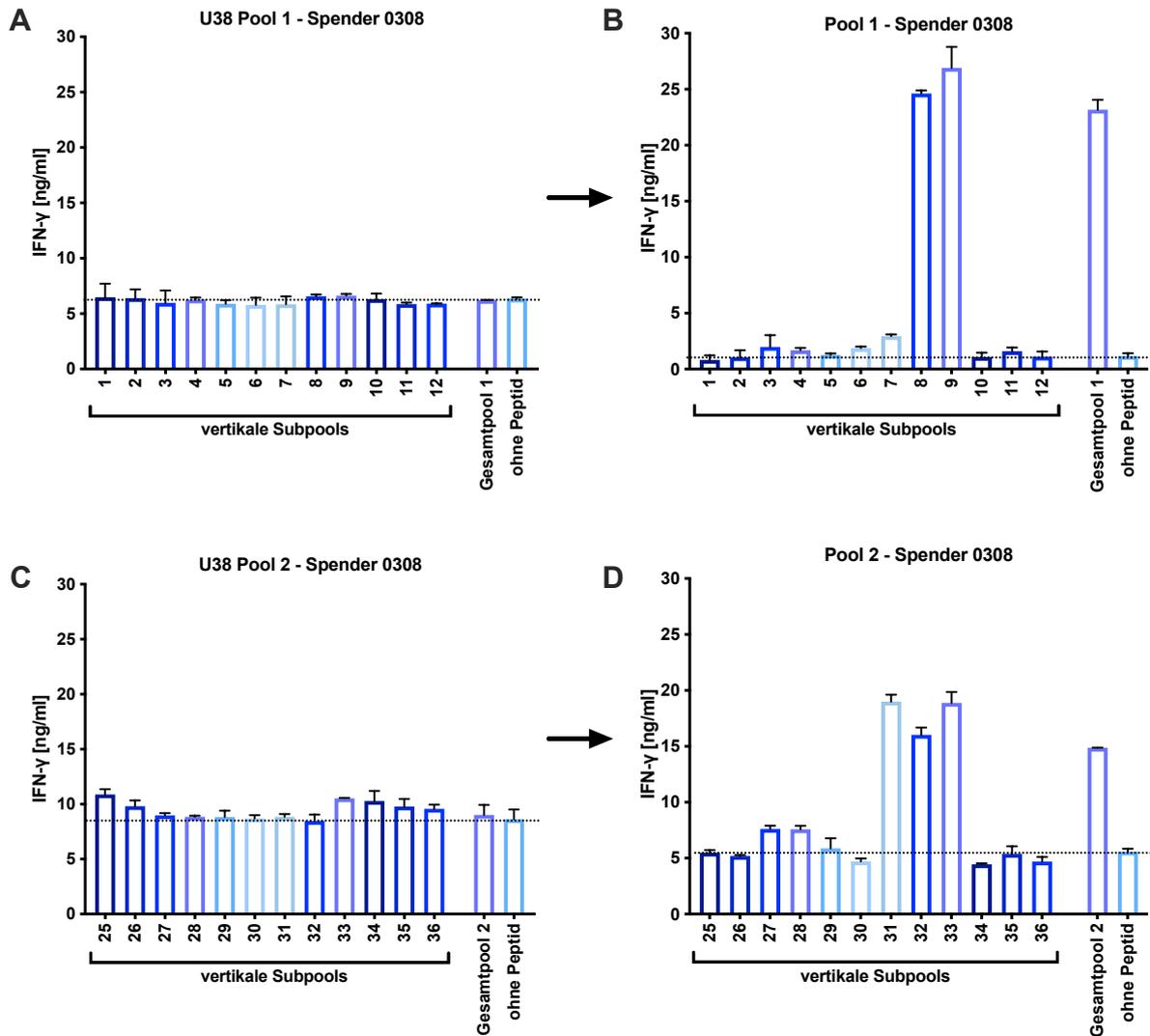


Abbildung 14: Quantifizierung der funktionellen Anreicherung von spezifischen, IFN- $\gamma$  sezernierenden T-Zellen in den T-Zellkulturen 1 und 2 von Spender 0308 nach Stimulation mit U38-Peptiden. Die T-Zellen wurden nach 4 Wochen Kultur (A) und nach 7 Wochen Kultur (B) gegen Peptidpools in Anwesenheit autologer B-Blasten wie angegeben getestet, und die Menge des über Nacht freigesetzten IFN- $\gamma$  wurde im ELISA ermittelt.

### 4.2.3 Einzelzellklonierung der U38-spezifischen T-Zelllinien

Da Spezifität und Funktion von T-Zellen anhand von T-Zellklonen am genauesten untersucht werden können, wurden die beiden mit U38-Peptiden stimulierten T-Zellkulturen nach sieben Restimulationen und der beobachteten funktionellen Anreicherung von U38-spezifischen T-Zellen (siehe 4.2.2) einer Einzelzellklonierung unterzogen. Die dafür nötigen Ansätze zur limitierenden Verdünnung wurden an Tag 58 durchgeführt. Hierbei wurden ausgehend von den polyklonalen Kulturen 1 und 2 je 1920 Mikrokulturen (20 Platten zu je 96 wells) angesetzt, davon 960 Mikrokulturen mit statistisch je 0,7 T-Zellen und die restlichen 960 Mikrokulturen mit statistisch je 2,5 T-Zellen.

Nach fünf Wochen wuchsen aus diesen Ansätzen in 135 Mikrokulturen makroskopisch sichtbare Zellpopulationen aus. Jede dieser ausgewachsenen Mikrokulturen wird erneut wie bereits in 4.1 beschrieben im Folgenden vereinfachend als "Klon" bezeichnet, obwohl die Kriterien eines „echten“ Klones, also einer monospezifischen und monoklonalen T-Zelllinie, noch mittels der hier folgenden Analysen geprüft werden mussten.

Von den insgesamt 135 ausgewachsenen Klonen, wuchsen 38 Klone aus Gesamtpool 1, hier betrug die Kloniereffizienz somit nur etwa 2 %. Die Klone 1 bis 10 entstammten der Verdünnungsstufe von 0,7 Zellen pro well, die Klone 11 bis 38 aus der Verdünnungsstufe von 2,5 Zellen pro well.

Aus Gesamtpool 2 wuchsen 97 Klone aus, sodass hier die Kloniereffizienz etwa 5 % betrug. Hier gingen die Klone 39 bis 59 aus der Verdünnungsstufe von 0,7 Zellen pro well hervor und die Klone 60 bis 135 aus der Verdünnungsstufe von 2,5 Zellen pro well. Für beide Ausgangskulturen wurde also konsistent beobachtet, dass die Klonierungseffizienz der eingesetzten Zellzahl (0,7 oder 2,5 Zellen pro well) in etwa proportional war.

Im nächsten Schritt musste geklärt werden, ob die ausgewachsenen Klone auch gegen das U38 Antigen spezifisch reagierten. Deshalb wurden mittels einer IFN- $\gamma$ -ELISA-Analyse die Klone 1 bis 38 auf die spezifische Erkennung des U38-Gesamtpools 1 und die Klone 39 bis 135 auf den U38-Gesamtpool 2 untersucht (Abbildung 15). Die meisten Klone reagierten etwas stärker in Ansätzen ohne U38-Peptide als mit Peptiden oder waren vollständig unreaktiv und wurden daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die verbleibenden Klone (in Abbildung 15 mit Pfeil markiert) wurden im Folgenden weiter analysiert, unabhängig davon, ob sie ihre Reaktivität gegen U38-Peptide im Vergleich zur Kontrolle stark oder nur gering erhöht war. Die Mehrzahl der betreffenden Klone zu Gesamtpool 1, aber nur eine Minderzahl der Klone zu Gesamtpool 2 zeigte ein sehr deutlich U38-peptidspezifisches Erkennungsmuster.

Von den 10 weiter zu analysierenden Klonen aus Gesamtpool 1 entstammten drei Klone der 0,7 Zellen/well- und sieben der 2,5 Zellen/well-Verdünnungsstufe. Die neun zu untersuchenden Klone aus Gesamtpool 2 entstammen alle der Verdünnungsstufe von 2,5 Zellen pro well.

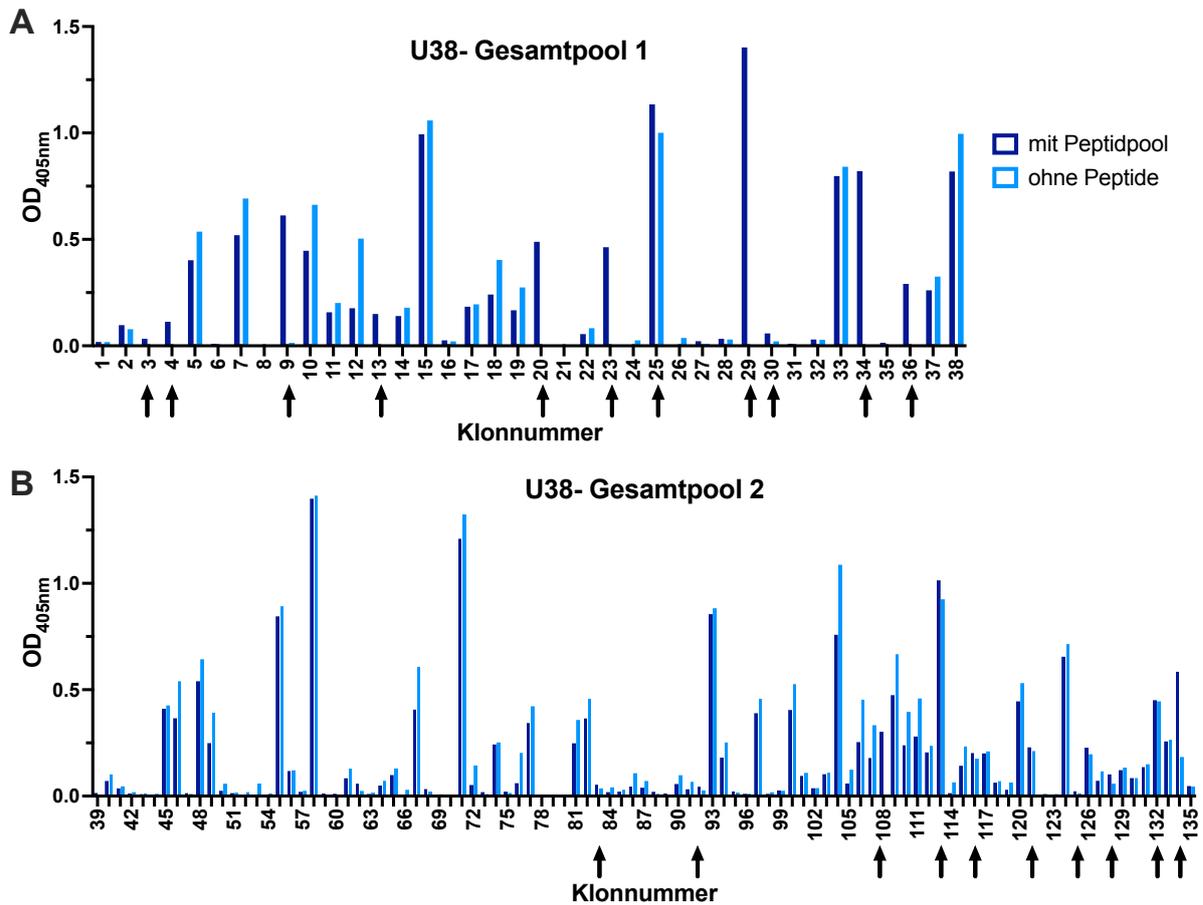


Abbildung 15: Ausgewachsene Klone aus Gesamtpool 1 (A) und Gesamtpool 2 (B). Die Pfeile markieren die Klone, die in Anwesenheit von U38-Gesamtpools stärker reagieren als in deren Abwesenheit. Diese markierten Klone wurden im weiteren Verlauf genauer analysiert. Klone 1 bis 10 (A) und 39 bis 59 (B) entstammten der Verdünnungsstufe von 0,7 Zellen pro well, die übrigen einer Verdünnung von 2,5 Zellen pro well.

#### 4.2.4 Identifizierung von T-Zellepitopen im Antigen U38

Durch Restimulation und weitere 10 Tage Kultivierung konnten 19 Klone expandiert werden. Anschließend wurde ihre Funktionalität gegenüber U38 im Test mit U38-Peptid-Subpools genauer analysiert.

Die Anordnung der Subpools soll hier nochmals kurz erläutert werden. Jedes einzelne Peptid der U38-Peptidbank besteht aus 15 Aminosäuren, wobei benachbarte Peptide einen gemeinsamen Überlappungsbereich von 11 Aminosäuren besitzen. Das bedeutet beispielsweise, dass Peptid 1 aus den Aminosäuren 1 bis 15 besteht und das benachbarte Peptid 2 dann aus den Aminosäuren 5 bis 19. Somit ist jede Teilsequenz bis zu einer Länge von 12 Aminosäuren in der Peptidbank enthalten. Dies ermöglicht eine Identifizierung aller CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope, die bis zu 12 Aminosäuren lang sind, was auf die große Mehrzahl der CD8<sup>+</sup>-Epitope zutrifft. Auch die meisten CD4<sup>+</sup>-Epitope können erfasst werden (Kern et al., 2000). Optimale CD4<sup>+</sup>-Epitope haben zwar oft eine Länge im Bereich von 15 Aminosäuren, aber im Gegensatz zu CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitopen sind ihre Enden nicht präzise definiert und sie werden auch in verkürzter Form oft noch erkannt (Ameres et al. 2015). Wie bereits beschrieben, wurden die 255 Peptide der U38-Peptidbank auf Gesamtpool 1 (144 Peptide) und Gesamtpool 2 (111 Peptide) verteilt. Die 144 Peptide, die zu Gesamtpool 1 gehören, wurden analog einer zweidimensionalen Matrix in 24 Gruppen, sog. Subpools angeordnet (Abbildung 16). Hierbei wurde jedes Peptid je einem horizontalen und einem vertikalen Pool zugeordnet, sodass später die Identifikation des von einem T-Zellklon erkannten Peptids mittels eines Funktionstests mit nur 24 einzelnen Reaktionen möglich ist, anstatt alle 144 Peptide einzeln zu testen.

Pool 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
24	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144

Abbildung 16: Zusammensetzung der Peptid-Subpools aus dem Antigen U38 zur Identifizierung neuer T-Zellepitope. Insgesamt besteht die Peptidbibliothek des Antigens U38 aus 251 Einzelpeptiden, die allerdings zu viele für einen einzigen Peptidmix wären. Deswegen wurden die Peptide in zwei große Gesamtpools unterteilt. Die hier dargestellten 144 Einzelpeptide sind Gesamtpool 1 des Antigens U38. Jedes der 144

Einzelpeptide (weiß) wurden je einem der 12 „vertikalen“ und einem der 12 „horizontalen“ Subpools (grau) zugeordnet. In blau, violett und grün sind die von Klon 9-1 erkannten vertikalen und horizontalen Subpools gekennzeichnet. Die rot markierten Peptide 128 und 129 zeigen die Schnittmenge der markierten Subpools von Klon 9-1.

Zur Identifizierung der spezifischen Epitope wurden autologe B-Blasten mit jeweils einer der 24 Peptidmischungen beladen und für 16 h kokultiviert. Anschließend wurde die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Überständen mittels eines ELISA-Tests quantitativ bestimmt. Beispielhaft gezeigt wird das Ergebnis für Klon 9-1, dieser zeigte eine Erkennung der vertikalen Subpools 8 und 9 und des horizontalen Subpools 23 (Abbildung 17), sowie des Gesamtpools 1. Alle Reaktivitäten waren nahezu gleich stark, was demonstriert, dass die Anwesenheit jeweils anderer irrelevanter Peptide in solchen Analysen das Ergebnis nicht wesentlich beeinflusst. Im gedachten „Kreuzungspunkt“ dieser Peptidpools liegt somit das tatsächliche Epitop (Abbildung 16), also im Überschneidungsbereich der Einzelpeptide 128 und 129.

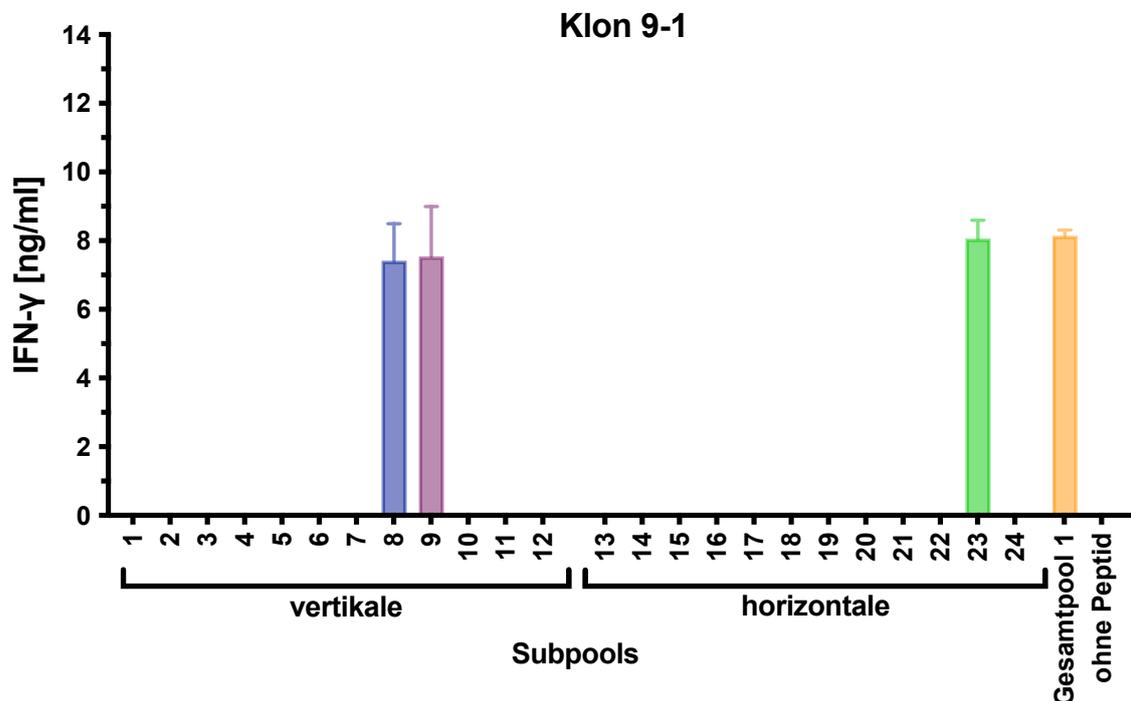


Abbildung 17: Erkennung von vertikalen und horizontalen Subpools aus dem Antigen U38 des Klons 9-1. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Subpool beladen und mit dem T-Zellklon 9-1 für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildetete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

Dieser hat die Sequenz VVFEQGQKKIF (siehe auch Abbildung 18 und die Sequenzen aller Peptide in Tabelle 8). Im nächsten Schritt wurde dies überprüft, indem der T-Zellklon mit den Einzelpeptiden 126 bis 131 getestet wurde (Abbildung 18).

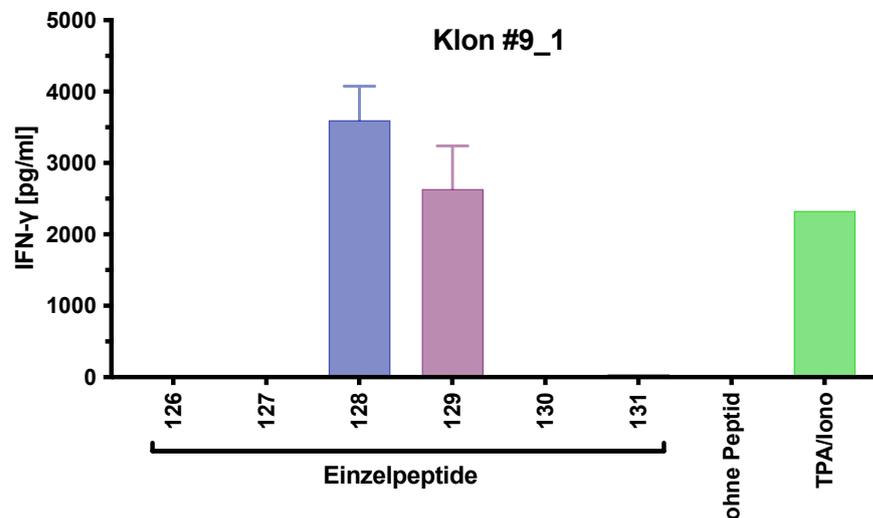


Abbildung 18: Identifizierung von Einzelpeptiden, die von dem U38-spezifischen T-Zellklon 9-1 erkannt werden. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Einzelpeptid (1 µg/ml) beladen und mit dem T-Zellklon 9-1 für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildetete IFN-γ Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

Hierbei bestätigte sich, dass der Klon 9-1 beide Einzelpeptide, 128 und 129, klar und mit ähnlicher Reaktionsintensität erkannte. Andere Peptide in der weiteren Umgebung der U38-Sequenz wurden nicht erkannt. Somit erkannte der T-Zell-Klon als Epitop eine Sequenz im Überschneidungsbereich dieser beiden Einzelpeptide (Abbildung 19).

	127	LAHVTARCVVFEQGQ
Subpool 8	<b>128</b>	<b>TARCVVFEQGQKKIF</b>
Subpool 9	<b>129</b>	<b>VVFEQGQKKIFPCIL</b>
	130	GQKKIFPCILTEAK

Abbildung 19: Aminosäuresequenzen der von Klon 9-1 erkannten (128, 129) und der benachbarten Peptide (127, 130) aus dem Gesamtpool 1 zum Antigen U38. Rot markiert ist der Überlappungsbereich von Peptid 128 und 129, der vermutlich das erkannte Minimalepitop enthält.

Der Klon 13-1 erkannte jeweils nur einen vertikalen (Nr. 12) und einen horizontale (Nr. 16) Subpool. Diese beiden Subpools überschneiden sich im Peptid 48. Das bedeutet, dass der Klon 13-1 spezifisch gegen ein Epitop reagiert, das sich in der Sequenz NLFKVSEGNEY befindet.

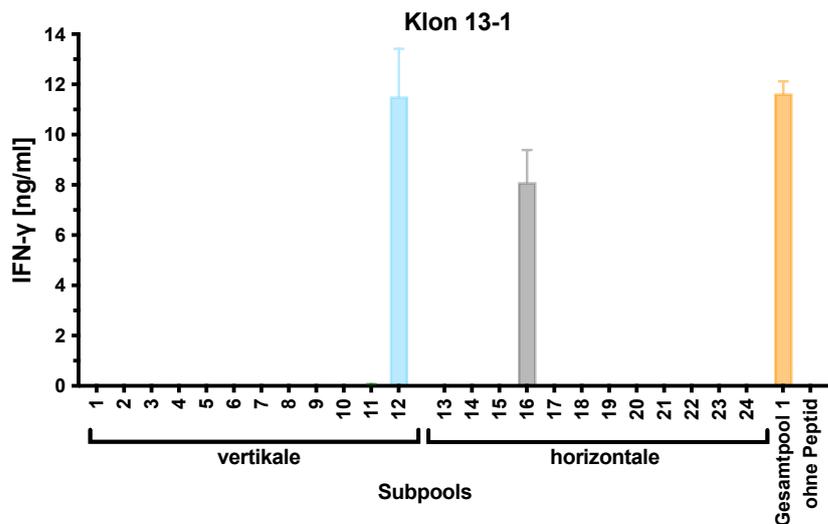


Abbildung 20: Erkennung von vertikalen und horizontalen Subpools aus dem Antigen U38 des Klons 13-1. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Subpool beladen und mit dem T-Zellklon 13-1 für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

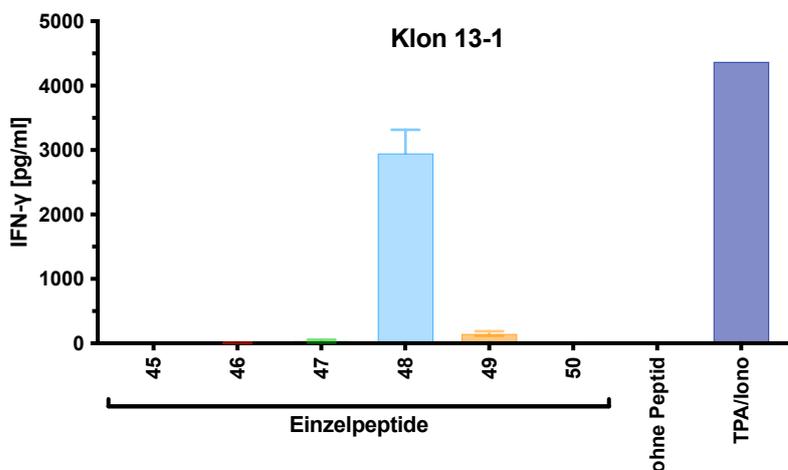


Abbildung 21: Identifizierung von Einzelpeptiden, die von dem U38-spezifischen T-Zellklon 13-1 erkannt werden. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Einzelpeptid (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) beladen und mit dem T-Zellklon 13-1 für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

Auf diese Weise wurden alle 19 potentiellen U38 spezifischen T-Zellklone getestet (Abbildung 22 und Abbildung 23). Hier stellte sich allerdings heraus, dass nur elf Klone ein U38-Peptid erkennen, die restlichen acht Klone reagierten unspezifisch auf die autologen B-Blasten und wurden somit nicht weiter analysiert. Als Beispiel hierfür dient Klon 25-1, dieser zeigte eine Erkennung aller vertikaler und horizontaler Subpools, sodass kein klares Erkennungsmuster erkennbar war (Abbildung 24).

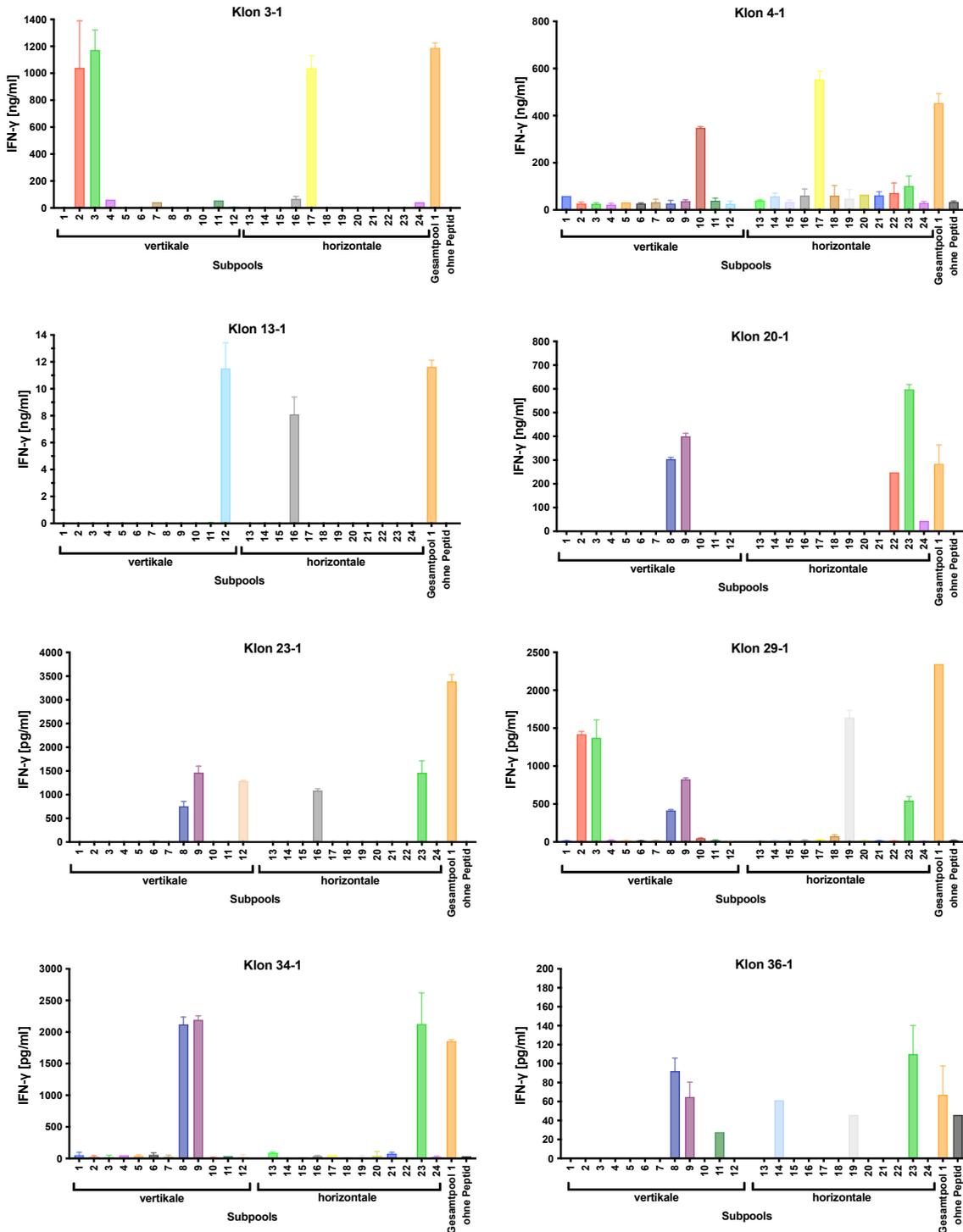


Abbildung 22: Erkennung von vertikalen und horizontalen Subpools der Klone aus dem Gesamtpool 1 von U38. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Subpool beladen und mit einem T-Zellklon für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildete IFN-γ Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

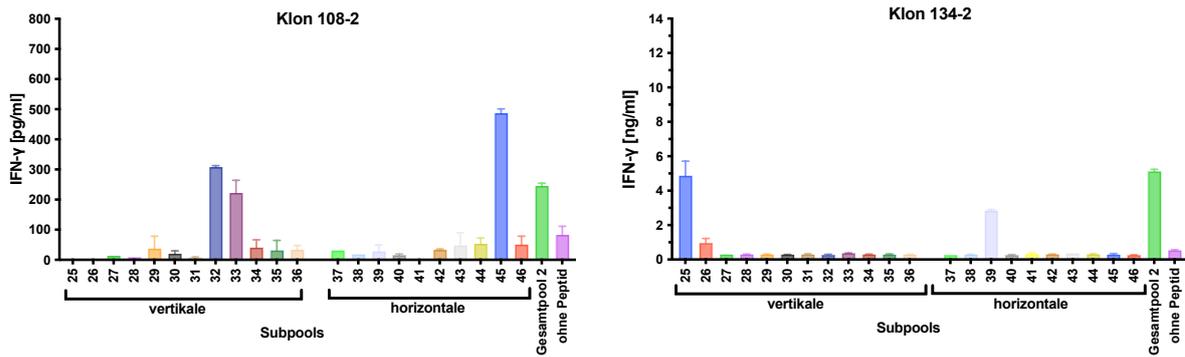


Abbildung 23: Erkennung von vertikalen und horizontalen Subpools der Klone aus dem Gesamtpool 2 von U38. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Subpool beladen und mit einem T-Zellklon für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

Dies war im Einklang mit dem vorläufigen Befund aus dem ursprünglichen Screening, dass dieser Klon peptidbeladene B-Zellen nur geringfügig stärker erkannt hatte als unbeladene (Abbildung 15). Dieser und ähnliche Klone mit entsprechendem Ergebnis (insgesamt acht) wurden verworfen und nicht weiter analysiert. Es ist nicht ganz auszuschließen, dass mit dem hier beschriebenen Verfahren neben U38-Peptid spezifischen auch unspezifisch B-Zell-reaktive T-Zellklone generiert wurden. Wie bereits früher gezeigt wurde, führt die Stimulation mit aktivierten B-Zellen als antigenpräsentierenden Zellen auch zu einer Vermehrung von autoreaktiven, möglicherweise B-Zell-spezifischen T-Zellklonen (Adhikary et al. 2007).

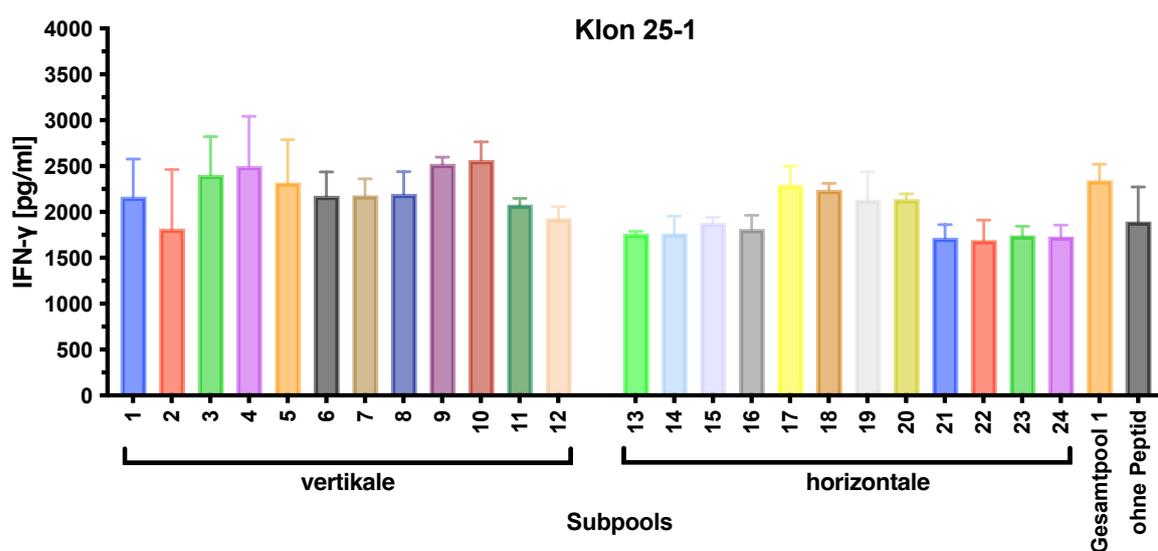


Abbildung 24: Beispiel eines Klons, der unspezifisch reagiert und kein Peptid aus dem Antigen U38 erkannt hat. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Subpool beladen und mit einem T-Zellklon für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

Nachdem die Epitopsequenzen der antigenspezifischen Klone ermittelt waren, wurde der Phänotyp der elf Klone bestimmt. Hierbei ging es vor allem um die Frage, ob die Klone CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>- T-Lymphozyten waren.

Hierfür wurden die T-Zellklone an Tag sieben nach Restimulation mit Feederzellen jeweils mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD8 gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen. Hierbei zeigten sich drei verschiedene Klonalitätstypen (Abbildung 25). Die Klone 3-1, 4-1, 13-1 und 134-2 enthielten ausschließlich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, dagegen zeigten die Klone 9-1, 20-1, 34-1 und 108-2 eine ausschließliche CD8<sup>+</sup>-Population. Geringe Hintergrundkomponenten (unter 2 %) von T-Zellen anderen Phänotyps sind in solchen Analysen unvermeidbar, da die T-Zellklone regelmäßig mit bestrahlten PBMC restimuliert werden, die CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen enthalten (die allerdings nicht proliferationsfähig sind). Drei Mikrokulturen (23-1, 29-1 und 36-1) zeigten eine gemischte Population, die aus CD4<sup>+</sup>- und aus CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestand. Diese drei Kulturen waren somit nachweislich keine Klone, sondern Gemische aus je mindestens zwei Klonen. Diese „Mischklone“ entstammten alle dem gleichen Verdünnungsansatz, nämlich „U38 Gesamtpool 1“ mit höherer eingesetzter Zellzahl (2,5 Zellen / well).

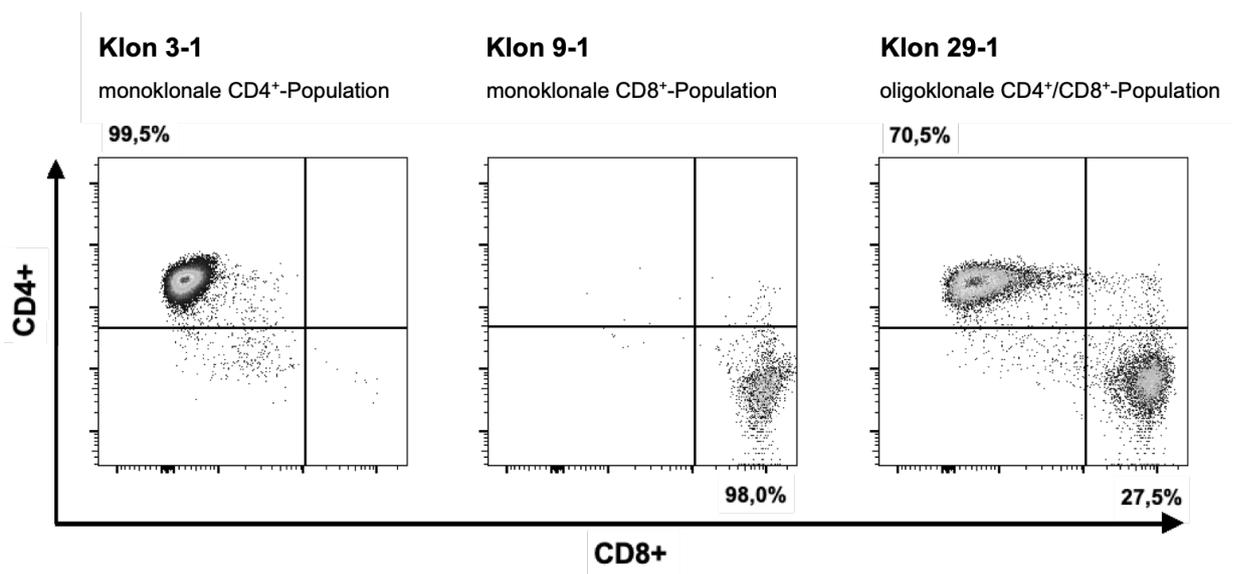


Abbildung 25: Durchflusszytometrische Analyse der antigenspezifischen T-Zellklone. Der Klon 3-1 dient als Beispiel einer monoklonalen CD4<sup>+</sup>-Population, der Klon 9-1 einer monoklonalen CD8<sup>+</sup> Population und der Klon 29-1 einer oligoklonalen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Population.

Einen Überblick aller elf U38-spezifischen Klone und Mikrokulturen bietet Tabelle 25. Neben der spezifisch erkannten Aminosäuresequenz ist auch der jeweilige T-Zellphänotyp angegeben. Unter den elf Klonen und Mikrokulturen sind acht vermutlich echte T-Zellklone, da sie erstens nur homogen entweder CD4 (vier Kulturen) oder CD8 (vier Kulturen) exprimierten und zweitens nur je ein Epitop erkannten. Die drei verbleibenden Mikrokulturen dagegen (23-1, 29-1 und 36-1) waren mit einiger Wahrscheinlichkeit Mischkulturen aus einem CD4<sup>+</sup>- und einem CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Klon, da sie klar erkennbare Subpopulationen von CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen enthielten und je zwei Epitope erkannten, nämlich stets das Peptidpaar 129/130 sowie je ein weiteres nur von der betreffenden Mikrokultur erkanntes Peptid (oder Peptidpaar).

Tabelle 25: Übersicht der aus der limitierenden Verdünnung hervorgegangenen T-Zellkulturen und vermutlichen T-Zellklone gegen das Antigen U38. Es konnten insgesamt elf verschiedene U38-spezifische Mikrokulturen hinsichtlich ihrer Spezifität charakterisiert werden. Je vier der Kulturen waren vermutlich reine CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> Klone und erkannten jeweils ein Epitop (d.h. ein spezifisches Peptid oder ein Paar überlappender Peptide. Die drei verbleibenden Kulturen hatten einen gemischten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Phänotyp und erkannten je zwei Epitope. Die jeweils erkannten 15-mer sind genannt, die Überlappungsbereiche von erkannten Peptidpaaren sind fett gedruckt. Soweit Minimalepitope definiert werden konnten, sind diese unterstrichen (siehe unten im Text). Die erkannten 15-mer wurden in allen Fällen in einem zweistufigen Prozess ermittelt, erstens mittels Subpools (vertikal und horizontal), und zweitens zur Überprüfung dieses Resultats durch Testung gegen die somit als Kandidaten in Frage kommenden Einzelpeptide.

Bezeichnung	vertikaler Subpool (Nr.)	horizontaler Subpool (Nr.)	erkanntes Peptid (Nr.)	Aminosäuresequenz	T-Zell-phänotyp
3-1	2	17	<u>50</u>	NFYV <b>SQRIGKILQNE</b>	CD4
	3		51	<b>SQRIGKILQNE</b> GFVV	
4-1	10	17	<u>58</u>	DNGFLSFGWYNVKKY	CD4
9-1	8	23	128	TARCV <b>VFEGQQKKIF</b>	CD8
	9		<u>129</u>	<b>VFEGQQKKIF</b> PCIL	
13-1	11	16	47	NTVV <b>NLFKVSFGNFY</b>	CD4
	12		<u>48</u>	<b>NLFKVSFGNFY</b> VSQR	
20-1	8	23	128	TARCV <b>VFEGQQKKIF</b>	CD8
	9		<u>129</u>	<b>VFEGQQKKIF</b> PCIL	
23-1	8	23	128	TARCV <b>VFEGQQKKIF</b>	CD8
	9		<u>129</u>	<b>VFEGQQKKIF</b> PCIL	
	12	16	<u>48</u>	NLFKVSFGNFYVSQR	CD4
29-1	2	19	<u>74</u>	PDAEN <b>LGDIVIQISV</b>	CD4
	3		75	<b>NLGDIVIQISV</b> SFSD	
	8	23	128	TARCV <b>VFEGQQKKIF</b>	CD8
	9		<u>129</u>	<b>VFEGQQKKIF</b> PCIL	
34-1	8	23	128	TARCV <b>VFEGQQKKIF</b>	CD8
	9		<u>129</u>	<b>VFEGQQKKIF</b> PCIL	
36-1	11	19	<u>83</u>	QIDGVHIYEFASEFE	CD4
	8	23	128	TARCV <b>VFEGQQKKIF</b>	CD8
	9		<u>129</u>	<b>VFEGQQKKIF</b> PCIL	
108-2	32	45	<u>248</u>	KLLLYLLPMKVYLDE	CD8
	33		249	<b>LYLLPMKVYLDE</b> TFS	
134-2	25	39	<u>169</u>	YGV <b>TGAHGLLPCVA</b>	CD4
	26		170	<b>GAAHGLLPCVA</b> IAAS	

#### 4.2.5 Bestimmung der HLA-Restriktion

T-Zellen können nur dann aktiviert werden, wenn ihr TCR ihr spezifisches Antigen erkennt. Dabei handelt es sich um einen Komplex aus spezifischem Peptid, das an ein bestimmtes HLA gebunden ist, d.h. die Antigenerkennung durch T-Zellen ist HLA-restringiert. Zum Beispiel muss bei der adoptiven T-Zelltherapie der Patient über das geeignete HLA verfügen, damit die T-Zellen reagieren können. Für Zwecke des Immunmonitorings ist die Kenntnis der HLA-Restriktion ebenfalls notwendig. Daher wurden die oben identifizierten T-Zellklone und Mikrokulturen auf ihre spezifische HLA-Restriktion hin weiter analysiert. Die Kulturen waren durch Stimulation mit einem Peptidgemisch generiert worden, welches das U38-Antigen vollständig abdeckte, ohne vorherige Auswahl von Subsequenzen mit bestimmten HLA-Bindemotiven. Daher war das Verfahren HLA-unabhängig und es bestand die Möglichkeit, T-Zellen beliebiger HLA-Restriktionen zu identifizieren, soweit die HLAs im T-Zell-Spender vorhanden waren.

Wie in Tabelle 25 gezeigt, konnten sowohl CD4<sup>+</sup>-, als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellklone gegen das Antigen U38 erfolgreich kultiviert werden. Die erkannten Epitope umfassten mindestens zwei unterschiedliche CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitope (daher sehr wahrscheinlich HLA-Klasse-I-restringiert) und sechs CD4<sup>+</sup>-T-Zellepitope (HLA-Klasse-II-restringiert). Deren HLA-Restriktionen wurden mit unterschiedlichen Methoden nachgewiesen. Bei den CD8<sup>+</sup>-T-Zellklonen wurden ein oder wenige in Frage kommende HLA-Moleküle durch die Koinkubation der T-Zellen mit peptidbeladenen allogenen BBLs unterschiedlichen HLA-Typs und anschließende Quantifizierung von freigesetztem IFN- $\gamma$  ermittelt. Die Restriktion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone durch eine der drei HLA-Klasse-II-Isoformen wurde im ersten Schritt mittels blockierender Antikörper gegen jede der drei Subklassen (HLA-DP, -DQ, -DR) eingegrenzt. Im zweiten Schritt wurde die so ermittelten HLA-Restriktionsmuster sowohl der CD8<sup>+</sup>- als auch die CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone durch Stimulation mit den jeweils in Frage kommenden HLA-Molekülen transfizierte, peptidbeladene DG-75-Zellen überprüft.

#### 4.2.5.1 Ermittlung mittels allogener B-Blasten

HLA-Klasse-I-Moleküle binden Peptide mit einer Länge von 8 bis über 12 Aminosäuren in der dafür vorgesehenen "Peptidbindefurche". Die am häufigsten vorkommende Länge ist 9 Aminosäuren, je nach HLA-Allel werden auch andere Peptidlängen mehr oder weniger oft beobachtet. Der Spender 0308 besaß den folgenden HLA-Klasse-I-Typ: HLA-A\*02:01, \*03:01; HLA-B\*07:02, \*39:01; HLA-C\*07:02, \*12:03. Zunächst kam also jeder dieser sechs HLA-Allotypen als Restriktionselement für die CD8<sup>+</sup>-Klone in Frage.

Die Klone und Mikrokulturen 9-1, 20-1, 23-1, 29-1, 34-1, 36-1 erkannten jeweils die beiden benachbarten 15-meren (Peptide Nr. 128 und 129) mit nahezu identischer Intensität. Dies legte nahe, dass der Überlappungsbereich der beiden Peptide, mit der Sequenz VVFEGQQKKIF, das Minimalepitop vollständig enthielt. Dieser Sequenz fehlten typische Ankerreste (Sarkizova et al. 2020) für die Allele HLA-B\*07:02 (Pro in Position 2), B\*39:01 (His in Position 2) und C\*07:02 (Tyr oder Arg in Position 2). Vorhanden war ein aliphatischer Ankerrest (hier Valin) in Position 2, der mit den drei verbliebenen HLA-Restriktionen (A\*02:01, A\*03:01, C\*12:03) kompatibel wäre. Vorhanden waren außerdem Lys-Reste, die als C-terminale Ankerreste von HLA-A\*03:01 gefordert werden. Auch eine Restriktion durch HLA-A\*02:01 oder C\*12:03 erschien möglich, mit einem Ile (I) oder Phe (F) als C-terminalem Ankerrest. Die sechs Klone bzw. LV-Kulturen, die die Peptidsequenz VVFEGQQKKIF erkannten, wurden auf ihre Reaktion gegen allogene B-Blasten von Spendern getestet, die nur entweder HLA-A\*02:01 oder HLA-A\*03:01 mit dem T-Zellspender gemeinsam hatten (Abbildung 26). Je nach Erkennung der allogener B-Blasten konnte dann ein Rückschluss auf die jeweilige HLA-Restriktion getroffen werden, die dann mittels HLA-Transfektion noch bestätigt werden musste.

In Abbildung 26 sind die CD8<sup>+</sup>-Klone 9-1, 20-1 und 34-1 und die Mikrokulturen 23-1, 29-1 und 36-1, die alle entweder nur die Peptidsequenz VVFEGQQKKIF oder diese in Kombination mit einer anderen Peptidsequenz erkennen. Der Klon 9-1 erkennt die autologen B-Blasten, die mit Peptid beladen wurden und sowohl HLA-A\*02:01 als auch HLA-A\*03:01 positiv sind sehr gut. Der Klon wurde mit allogener B-Blasten die entweder HLA-A\*02:01, HLA-A\*03:01 oder keines der beiden HLA-Moleküle tragen mit und ohne Peptid kokultiviert. Es zeigte sich, dass der Klon 9-1 die peptidbeladenen, allogener B-Blasten, die nur das HLA-A\*03:01-Molekül mit den autologen B-Blasten teilten sehr gut erkannte.

Dieselbe Vorgehensweise wurde bei dem Klon 108-2 angewendet. Es konnte eine HLA-Restriktion auf HLA-A\*02:01 festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

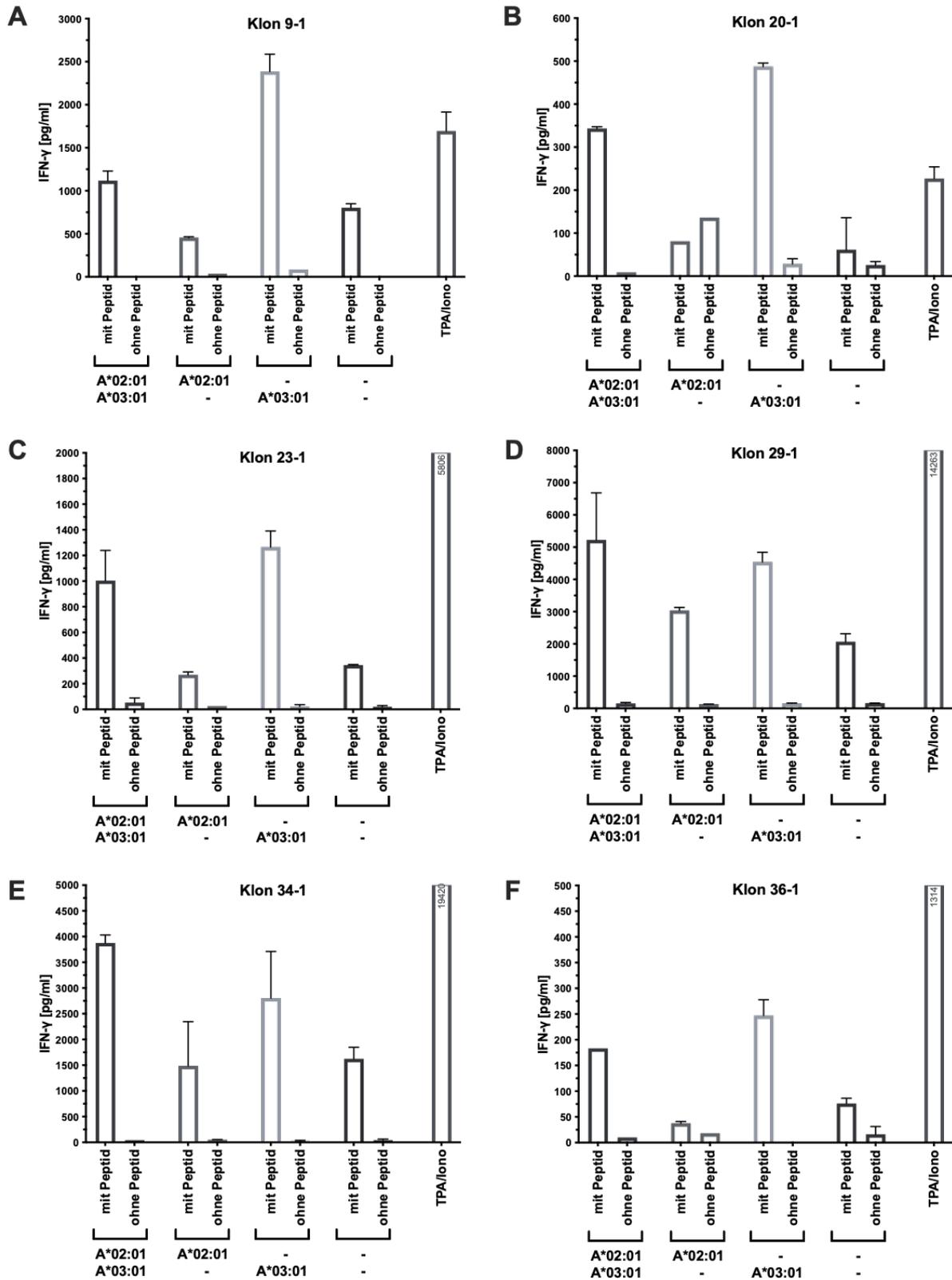


Abbildung 26: Überprüfung der HLA-Restriktion der CD8<sup>+</sup>-T-Zellklone gegen das Antigen U38. Es wurden jeweils autologe und allogene B-Blasten mit und ohne passendem Peptid für 16 Stunden im ELISA mit dem jeweiligen Klon im Verhältnis von 1:1 kokultiviert. Gezeigt werden gemittelte Werte von Triplikaten.

#### 4.2.5.2 Ermittlung mittels anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern

Es gibt drei verschiedene Isoformen von HLA-Klasse-II, nämlich HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP. Jede Isoform besteht aus zwei Polypeptidketten,  $\alpha$  und  $\beta$ , die von separaten Genen in der HLA-Klasse-II-Region kodiert werden und mit Ausnahme von HLA-DRA (= HLA-DR $\alpha$ ) sehr polymorph sind. Im Gegensatz zu HLA-Klasse-I-Molekülen sind beide Ketten eines HLA-Klasse-II-Heterodimers an der Präsentation von Peptiden beteiligt und somit für die Bestimmung der HLA-Restriktion relevant.

Zunächst wurde die Restriktion auf eine der drei HLA-Klasse-II-Isoformen eingegrenzt. Anti-HLA-DR-, -HLA-DQ- oder -HLA-DP-Antikörper wurden verwendet, um Wechselwirkungen der Peptid/HLA-Komplexe mit autologen B-Blasten, die das spezifische Peptid präsentierten, von CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen zu blockieren (Ameres et al. 2015). Das Blockieren einer irrelevanten HLA-Klasse-II-Isoform beeinflusste die Erkennung von präsentierten Epitopen durch einen T-Zellklon nicht. Das Blockieren der spezifischen HLA-Klasse-II-Isoform, die das Epitop eines T-Zellklons präsentierte, verringerte oder verhinderte sogar komplett die Sekretion von IFN- $\gamma$ .

In Abbildung 27 werden exemplarisch vier verschiedene CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone gegen das Antigen U38 gezeigt. Alle vier erkennen die B-Blasten, die mit dem jeweiligen Peptid beladen wurden, sehr gut. Die Klone 4-1 und 13-1 zeigen eine nur schwache bzw. keine Erkennung der B-Blasten, neben dem Peptid auch mit dem anti-HLA-DR Antikörper inkubiert wurden. Daher besitzen diese beiden Klone eine HLA-DR-Restriktion. Der Klon 3-1 erkennt die B-Blasten, die mit dem anti-HLA-DP-Antikörper inkubiert wurden am schlechtesten daher, ist dieser HLA-DP restringiert. Der Klon 134-2 zeigt als einziger eine HLA-DQ-Restriktion.

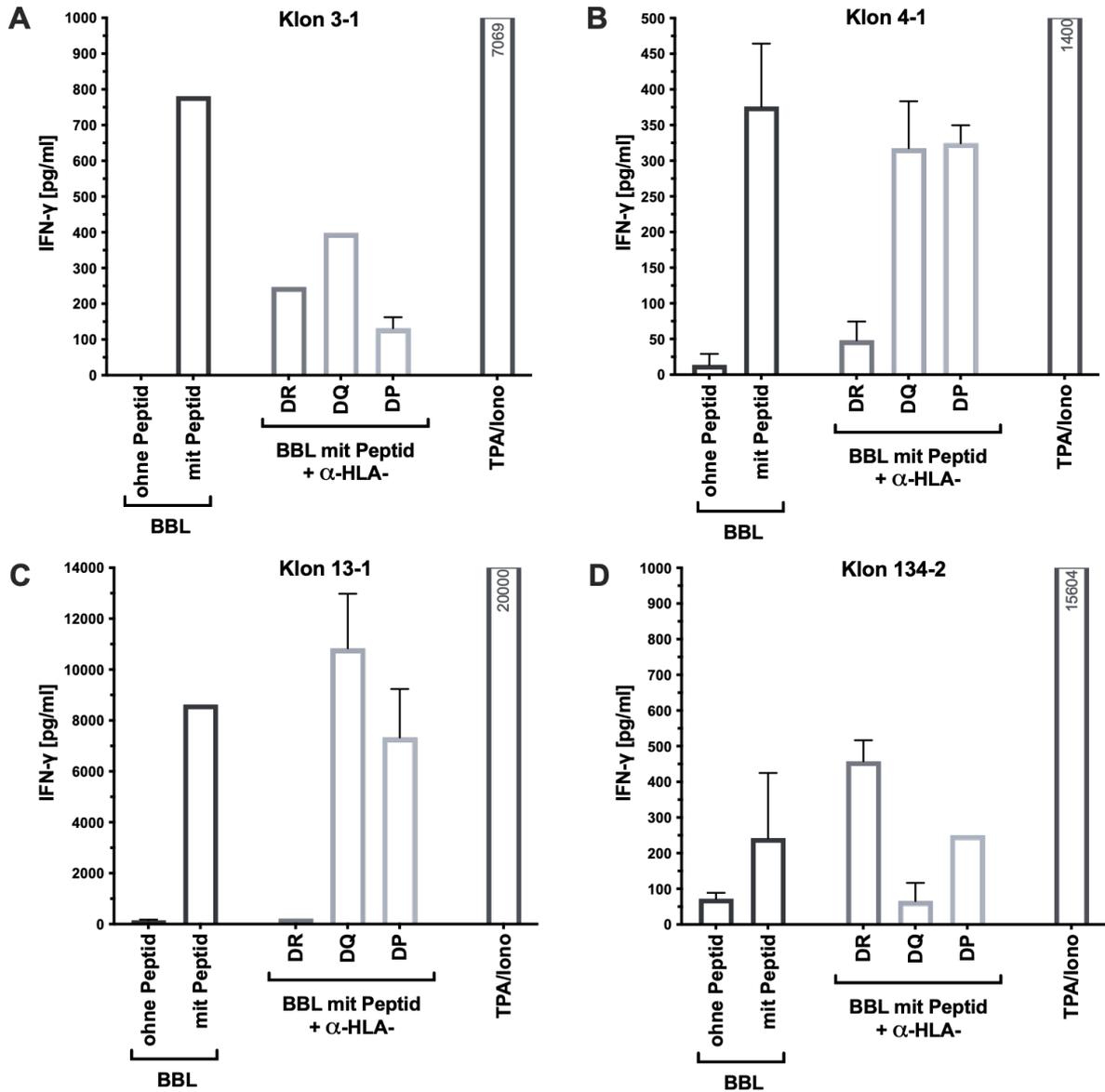


Abbildung 27: Überprüfung der HLA-Restriktion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone gegen das Antigen U38. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Peptid beladen und mit einem anti-HLA-spezifischen Antikörper inkubiert. Die so behandelten B-Blasten wurden dann mit den CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Triplikaten gezeigt.

#### 4.2.5.3 Verifizierung mittels HLA-transfizierter DG-75-Zellen

In den letzten Abschnitten wurden Hinweise auf die HLA-Restriktion der U38-spezifischen CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellkulturen erhoben. Um deren HLA-Restriktion nun noch genauer zu testen, wurden Expressionsplasmide für unterschiedliche HLA-Moleküle in DG-75-Zellen transfiziert und die T-Zell-Erkennung der transfizierten Zellen nach Peptidbeladung untersucht. Die Burkitt-Lymphomzelllinie DG-75 wurde ausgewählt, da sie effektiv Antigen auf HLA-Klasse-I und -II präsentieren können und gut transfizierbar sind. Als Transfektionskontrolle diente ein GFP-kodierendes Plasmid. Etwa 48 Stunden nach Transfektion wurde die Transfektionsrate anhand des Anteils der GFP-positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop abgeschätzt. Bei einer Transfektionsrate oberhalb von 60-70 % wurden die Zellen für das folgende Experiment verwendet, unter der Annahme, dass dann auch eine ausreichende Transfektions- und Expressionsrate für das jeweilige HLA-Expressionsplasmid zu vermuten war. Ein Teil der HLA-transfizierten und der nicht transfizierten DG-75-Zellansätze sowie autologe BBL wurden mit dem jeweiligen Peptid beladen, unbeladene Zellen wurden jeweils als Kontrolle ebenfalls verwendet. Zur Peptidbeladung wurde jeweils ein 15-mer-Peptid verwendet, das in den bisherigen Experimenten für die betreffende T-Zellkultur zu der stärksten Reaktion geführt hatte (unterstrichen in Tabelle 24).

Die Zielzellen wurden zusammen mit den HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellklonen in einem Verhältnis von 1:1 über Nacht inkubiert und die IFN- $\gamma$ -Konzentration im Überstand am nächsten Tag mittels ELISA ermittelt. Abbildung 28 zeigt eine Auswahl der getesteten CD8<sup>+</sup>-T-Zellklone. Alle drei gezeigten Klone wurden auf ihre Fähigkeit getestet, ob diese ihr spezifisches Peptid auf autologen B-Blasten, untransfizierten DG-75 Zellen oder mit einem passenden HLA-Plasmid transfizierte DG-75 Zellen erkannten. Sowohl Klon 9-1 als auch 34-1 und der Klon 108-2 konnten ihr spezifisches Peptid auf autologen B-Blasten erkennen. Keiner der Klone war in der Lage das Peptid auf untransfizierten DG-75-Zellen aufgrund des fehlenden HLAs zu erkennen. Die beiden Klone 9-1 und 34-1 zeigten eine deutlich erhöhte Reaktivität gegen DG-75 Zellen, die mit einem HLA-A\*03:01-Plasmid transfiziert und mit Peptid 129 beladen wurden, gegenüber allen Negativkontrollen (ohne Peptid bzw. ohne HLA-Transfektion). Entsprechend zeigte der Klon 108-2 eine IFN- $\gamma$ -Sekretion in der Anwesenheit von DG-75-Zellen, die mit einem HLA-A\*02:01-Plasmid transfiziert und mit Peptid 248 beladen wurden. Hiermit ist die HLA-A\*02:01-Restriktion für den Klon 108-2 und die HLA-A\*03:01-Restriktion für die Klone 9-1 und 34-1 nachgewiesen.

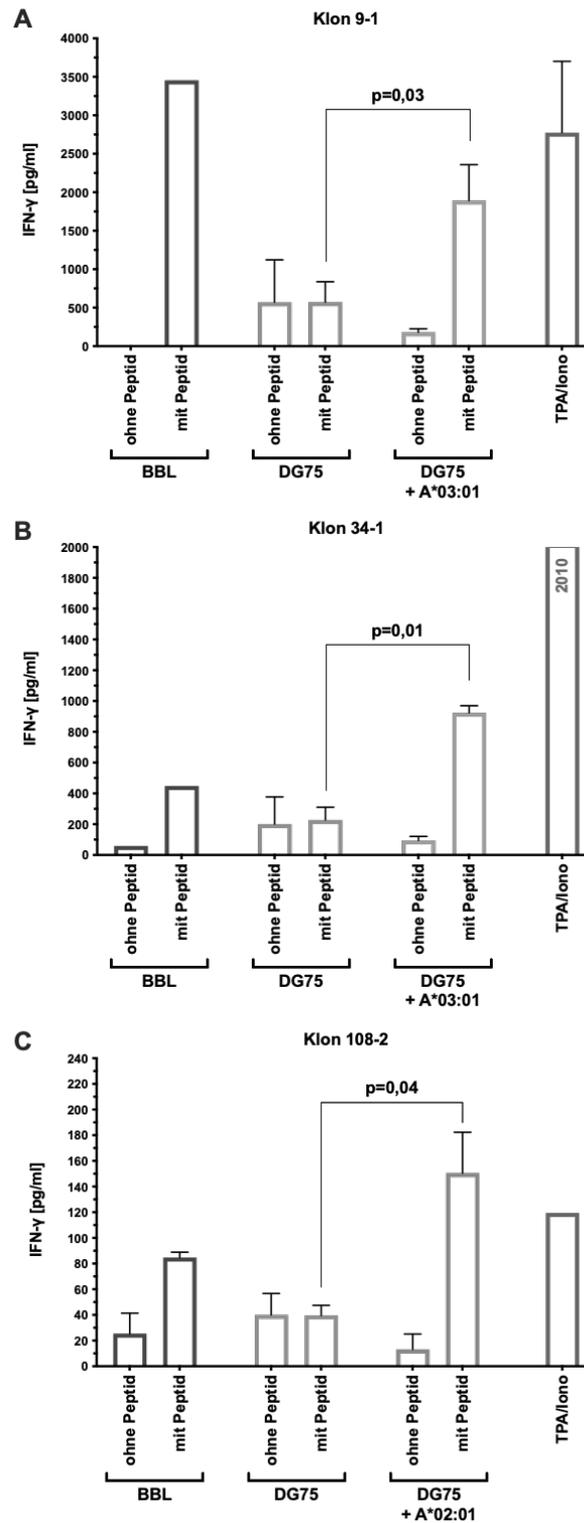


Abbildung 28: Reaktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellklonen mit HLA-transfizierten DG-75-Zellen. Die DG-75-Zellen wurden, wo angegeben, mit einem HLA-A\*02:01- oder mit einem HLA-A\*03:01-Expressionsplasmid transfiziert. Die Klone 9-1 (A) und 34-1 (B) wurden auf eine HLA-A\*03:01-restringierte Erkennung des Peptides 129 getestet, der Klon 108-2 (C) auf eine HLA-A\*02:01-restringierte Erkennung des Peptides 248. Die so behandelten DG-75-Zellen wurden dann mit den CD8<sup>+</sup>-T-Zellklonen für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde das freigesetzte IFN-γ im ELISA gemessen. Es sind die Mittelwerte von Triplikaten gezeigt. Die Analyse auf statistische Signifikanz wurde unter Verwendung eines durchzweiseitig ungepaarten t-Tests durchgeführt.

In Abbildung 29 sind exemplarisch die Analysen von zwei CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen gezeigt. Die Experimente basierten auf der vorhergehenden Identifikation der erkannten HLA-Klasse-II-Isoform (HLA-DP, -DQ oder -DR). Für die gezeigten T-Zellklone wurden also alle drei in Frage kommenden (im HLA-Typ des Spenders vorhandenen) Allotypen von HLA-DR getestet, indem deren Expressionsplasmide in DG-75-Zellen transfiziert wurden. Sowohl Klon 4-1 als auch Klon 13-1 konnten das Peptid auf autologen B-Blasten gut erkennen. Beide Klone erkannten das Peptid auf DG-75-Zellen, die mit Plasmiden für HLA-DRB1\*15:01 bzw. HLA-DRB1\*11:01 transfiziert worden waren, auf dem Niveau des Hintergrunds mit nicht HLA-transfizierten DG-75-Zellen. Lediglich in Anwesenheit von mit HLA-DRB5\*01:01 transfizierten DG-75-Zellen war die Reaktivität beider Klone deutlich erhöht. Das recht konstante Hintergrundsignal gegenüber peptidbeladenen DG75, die nicht oder mit anderen HLAs transfiziert worden waren, ist vermutlich durch Präsentation des Peptids durch die T-Zellen selbst zu erklären, denn aktivierte T-Zellen exprimieren HLA-Klasse-II, und das Peptid war während der Koinkubation der Zellen im Überstand anwesend. Somit ist die Schlussfolgerung zulässig, dass die beiden T-Zellklone HLA-DRB5\*01:01-restringiert waren. Da sie zwei unabhängige Peptide erkennen, (Nr. 58 bzw. 48), existieren somit mindestens zwei U38-Epitope, die durch dieses HLA-DR-Molekül restringiert sind.

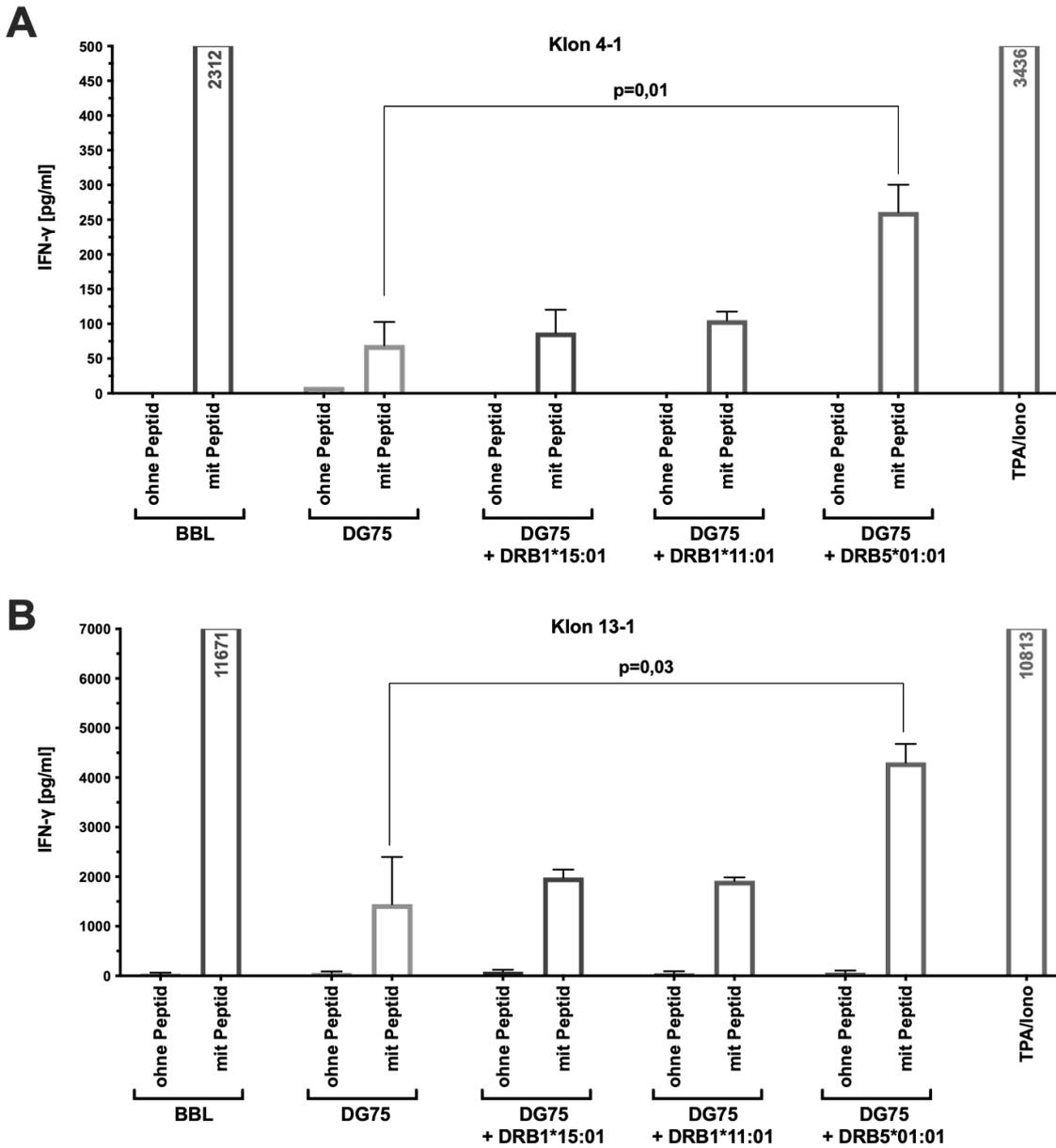


Abbildung 29: Analyse der Kokultur von CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen mit HLA- transfizierten DG-75-Zellen. Die beiden T-Zellklone 4-1 (A) und 13-1 (B) wurden jeweils auf ihre Erkennung von transfizierten DG-75-Zellen mit den drei HLA-Expressionsplasmiden DRB1\*15:01, DRB1\*11:01 und DRB5\*01:01 untersucht. Die Peptidbeladung erfolgte mit Peptid 58 (zur Analyse von Klon 4-1) oder Peptid 48 (zur Analyse von Klon 13-1) aus der U38-Peptidbibliothek von 15-meren (siehe Tab. 24). Die so behandelten DG-75-Zellen wurden dann mit den CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildetet IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Triplikaten gezeigt. Die Analyse auf statistische Signifikanz wurde unter Verwendung eines durchzweiseitig ungepaarten t-Tests durchgeführt.

#### 4.2.6 Avidität von einzelnen Klonen bezüglich Peptidkonzentration

Im nächsten Schritt wurden ausgewählte U38-spezifische T-Zellklone hinsichtlich ihrer funktionellen Avidität für das Zielantigen mittels ELISA untersucht. Ein einfacher Test hierfür besteht in der Analyse der T-Zellreaktivität gegen Zielzellen, die mit seriell verdünntem Zielpeptid beladen wurden (Schuster et al. 2007). Hierbei wurden drei wichtige sezernierte Effektormoleküle gemessen: IFN- $\gamma$ , Granzym B und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Es wurden jeweils T-Zellen mit autologen B-Blasten kokultiviert, die mit absteigenden Verdünnungen (10000 – 0 nM) des jeweiligen Peptids beladen worden waren. Anschließend wurde die Menge von IFN- $\gamma$ , Granzym B und TNF- $\alpha$  bestimmt, die von den T-Zellen in den Überstand abgegeben wurde, bestimmt.

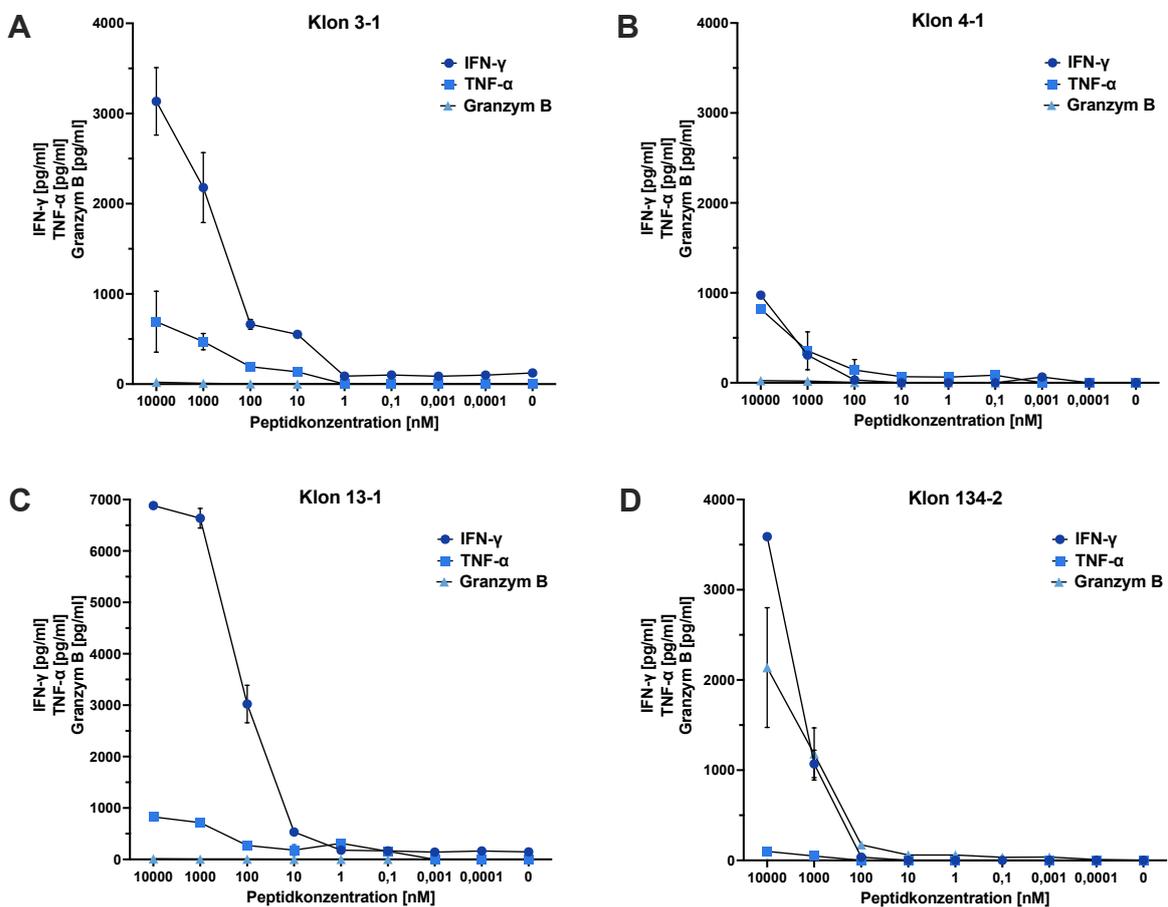


Abbildung 30: Analyse der funktionellen Avidität der U38-spezifischen T-Zellklone. Die HHV-6-spezifischen T-Zellklone wurden zusammen mit autologen B-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden U38-Peptids (bei Klon 3-1: Peptidnr. 50, bei Klon 4-1: Peptidnr. 58, bei Klon 13-1: Peptidnr. 48, bei Klon 134-2: Peptidnr. 169, siehe auch Tabelle 25) über Nacht inkubiert. Die Konzentration an ausgeschüttetem IFN- $\gamma$ , Granzym B und TNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Wertebereiche von Triplikaten gezeigt.

Wie in Abbildung 30 dargestellt, zeigen alle vier CD4<sup>+</sup>-Klone eine klare Dosisabhängigkeit der T-Zellreaktivität von der Peptidkonzentration für alle drei gemessenen Effektormoleküle. Die beiden Klone 3-1 und 13-1 zeigten eine IFN- $\gamma$ -Reaktivität bis zu einer Konzentration von 1 nM Peptid. Die Klone 4-1 und 134-2 hingegen benötigten eine höhere Peptidkonzentration von über 100 nM, um eine IFN- $\gamma$ -Sekretion der T-Zellen zu aktivieren. Alle vier Klone zeigten einen abnehmender Kurvenverlauf bezüglich der Sekretion von TNF- $\alpha$ . Die beiden CD4<sup>+</sup>-Klone 3-1 und 4-1 setzten bei keiner Peptidkonzentration Granzym B frei. Hingegen setzten die beiden CD8<sup>+</sup>-Klone bis zu der Peptidkonzentration von 10 nM noch Granzym B frei.

Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass vier CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone, die vier unterschiedliche Epitope aus U38 erkannten, alle ein von IFN- $\gamma$  dominiertes, somit Th1-artiges Zytokinprofil hatten. Zwei der CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone konnten zudem Granzym B sekretieren und wiesen somit eine Eigenschaft zytotoxischer T-Zellen auf. Zytotoxische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden bereits für eine Reihe anderer Viren wie den Herpesviren wie CMV und EBV (Appay 2004; Cenerenti et al. 2022) und in einer neueren Arbeit auch für HHV-6B beschrieben (Becerra-Artiles et al. 2019).

#### 4.2.7 Erkennung von HHV-6B-infizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen

Die bisherigen Analysen der Reaktivität der U38-spezifischen T-Zellklone waren beschränkt auf die Verwendung von synthetischem Peptid als Antigen. Nun sollte ihre gegenüber virusinfizierten Zellen und damit die Erkennung der viralen Proteine im Viruskontext analysiert werden. Es wurde dieselbe Infektionsmethode verwendet wie bereits in Kapitel 4.1.6 beschrieben. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus PBMCs von HLA-passenden Spendern isoliert, mit PHA-M stimuliert und drei Tage später mit dem HHV-6B-Stamm HST infiziert. Die HHV-6-spezifischen T-Zellen wurden an zwei unterschiedlichen Tagen nach Infektion mit den infizierten Zellen kokultiviert (Tag 3 oder Tag 6 nach Infektion) und die Menge des sezernierten IFN- $\gamma$  wurde mittels ELISA bestimmt.

Der Klon 13-1 zeigt eine maximale Erkennung bereits an Tag 3 der Infektion. An Tag 6 nach Infektion gab es keine Erkennung der infizierten Zellen mehr (Abbildung 31).

Der CD8<sup>+</sup>-T-Zellklon 34-1 zeigte eine spezifische Erkennung der infizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erst an Tag 6 nach Infektion (Abbildung 32). Am Tag 3 wurden nicht infizierte und infizierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gleichermaßen erkannt. Möglicherweise wurde hier eine bereits vorhandene Erkennung des viralen Antigens durch eine nichtspezifische Erkennung überdeckt. Die Ursachen dieses nichtspezifischen Signals sind bisher noch nicht abschließend geklärt.

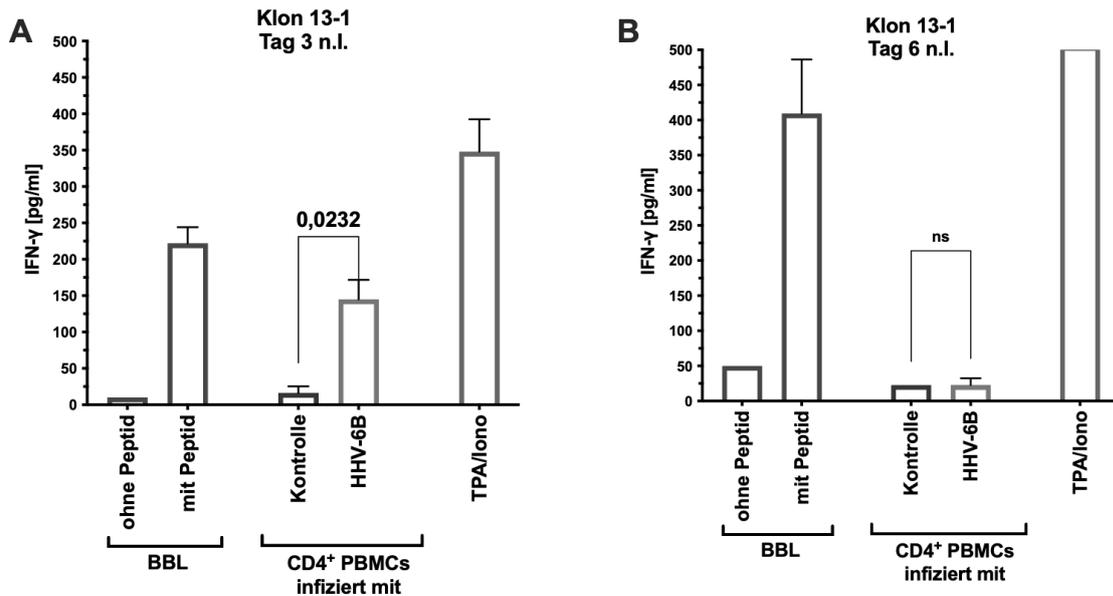


Abbildung 31: Erkennung von HHV-6B-infizierten CD4<sup>+</sup>-PHA-Blasten durch den HHV-6B-spezifischen T-Zellklon 13-1. Es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eines HLA-DR1\*15:01-positiven Spenders mit HHV-6B (HST) 3 bzw. 6 Tage nach der Infektion mit dem CD4<sup>+</sup>-T-Zellklon für 16 h kokultiviert. Als Kontrollen wurde zum einen die mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladenen bzw. unbeladenen autologen B-Blasten, als auch nicht infizierte PHA-M-Blasten („Kontrolle“) verwendet. Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN-γ wurde am nächsten Tag mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten gezeigt.

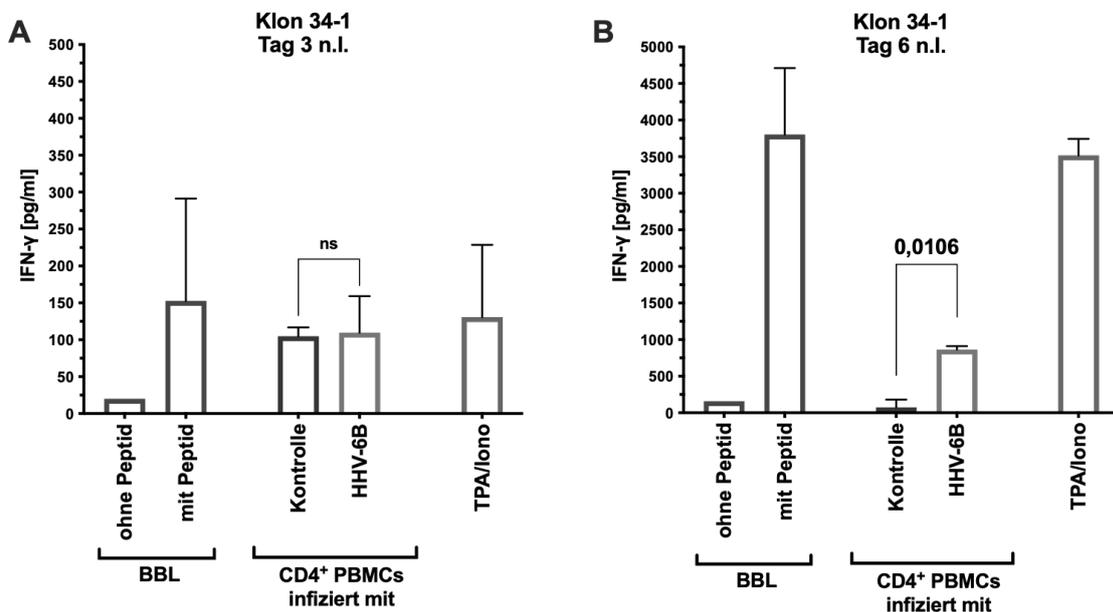


Abbildung 32: Erkennung von HHV-6B-infizierten CD4<sup>+</sup>-PHA-Blasten durch den HHV-6B-spezifischen T-Zellklon 34-1. Es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eines HLA-A\*03:01-positiven Spenders mit HHV-6B (HST) 3 bzw. 6 Tage nach der Infektion mit dem CD8<sup>+</sup>-T-Zellklon für 16 h kokultiviert. Als Kontrollen wurde zum einen die mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladenen bzw. unbeladenen autologen B-Blasten, als auch nicht infizierte PHA-M-Blasten („Kontrolle“) verwendet. Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN-γ wurde am nächsten Tag mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten gezeigt.

#### 4.2.8 Bestimmung des Minimalepitops zweier Klone

In 4.2.4 wurde für jeden U38-spezifischen Klon diejenigen 15mer-Peptide bestimmt, auf die der Klon reagierte. Generell erkennen CD8<sup>+</sup>-Klone Epitope mit einer Länge von meist nur 8 bis 11 Aminosäuren. Diese Länge wird dadurch festgelegt, dass die MHC-I-Moleküle die von ihnen präsentierten Peptide sowohl C- als auch N-terminal binden. Die tatsächlichen CD8<sup>+</sup>-Epitope werden bei der Verwendung von 15-mer-Peptiden in Immunassays wahrscheinlich durch proteolytische Spaltung durch Serum- oder Zelloberflächenproteasen gebildet, der Mechanismus ist allerdings nicht genau bekannt (Maecker et al. 2001).

In Tabelle 25 erkennt man, dass drei CD8<sup>+</sup>-Klone aus dem Gesamtpool 1 das gleiche Peptidpaar 128/129 erkennen (9-1, 20-1 und 34-1). Die gleiche Reaktivität trat in drei Mischkulturen auf, und im Vergleich zu den anderen gefundenen Epitopen war dies die klar dominante CD8<sup>+</sup>-Spezifität innerhalb von U38 bei diesem Spender. Repräsentativ für diese Klone und Kulturen wurde der Klon 34-1 zur Ermittlung des Minimalepitops herangezogen. Zudem wurde noch das Minimalepitop eines weiteren CD8<sup>+</sup>-Klones aus dem Gesamtpool 2 ermittelt, des Klons 108-2.

Jeder der beiden Klone erkannte ein Paar benachbarter 15-mere (Tabelle 24) und für beide Klone galt, dass die beiden Peptide nahezu gleich stark erkannt wurden. Es wurde daher davon ausgegangen, dass der 11 Aminosäuren lange Überlappungsbereich das Minimalepitop vollständig enthielt. Im Falle von Klon 34-1 war dies die 11-mer-Sequenz VVFEGQQKKIF, im Fall von Klon 108-2 die Sequenz YLLPMKVYLD. Jeweils wurden die beiden enthaltenen 10-mere und die 3 enthaltenen 9-mere synthetisiert und die Reaktion der T-Zellen auf diese Peptide im direkten Vergleich getestet.

Zudem wurde ein Vergleich der genannten 11-mer-Sequenzen mit den homologen Sequenzen aus HHV-6A und HHV-7 vorgenommen. Die beiden Sequenzen waren in HHV-6A voll konserviert, HHV-7 zeigte jedoch Abweichungen.

Wie zuvor wurden die T-Zell-Klone mit peptidbeladenen B-Blasten 16 h inkubiert und anschließend ein IFN- $\gamma$ -ELISA durchgeführt.

Für beide Klone konnte je ein 9-mer-Peptid aus HHV-6B U38 als wahrscheinliches Minimalepitop ermittelt werden (Abbildung 33), da je ein solches 9-mer besser als die anderen 9-mere und nicht schlechter als jedes der 10-mere erkannt wurde.

Bei Klon 34-1 war das bevorzugte 9-mer und wahrscheinlichste Minimalepitop VVFEGQQKK, ein Peptid, das ein publiziertes Ankermotiv  $x\Phi\text{xxxxxx}K$  ( $\Phi$  = aliphatische Aminosäure) für HLA-A\*03:01 enthielt (Sarkizova et al. 2020). Bei Klon 108-2 ergab sich als wahrscheinliches Minimalepitop YLLPMKVYL. Dieses Peptid enthielt das Ankermotiv  $x\Phi\text{xxxxxx}\Phi$ , das das für HLA-A\*02:01 typisch ist (Sarkizova et al. 2020).

Der T-Zell-Klon 34-1 erkannte neben dem 9-mer VVFEGQQKK, auch die in einer Aminosäure veränderte Variante AVFEGQQKK aus dem Virus HHV-7 (Abbildung 33 A). Dies schien plausibel, da der Aminosäureaustausch von Valin zu dem chemisch nicht ganz unähnlichen Alanin in der Nicht-Ankerposition 1 mit dem Erhalt einer T-Zellerkennung vereinbar scheint. Der T-Zell-Klon 34-1 könnte somit auch HHV-7-infizierte Zellen erkennen, was weiter unten noch getestet wird.

Der Klon 108-2 erkannte das getestete 10-mer aus HHV-7 im Rahmen der Genauigkeit des Experiments ähnlich gut wie das homologe 10-mer aus HHV-6B (Abbildung 33 B). Dies war nicht unbedingt zu erwarten, da zwischen den beiden Peptiden gleich vier Aminosäuren verändert waren. Zwischen dem am besten erkannten 9-mer aus HHV-6B (YLLPMKVYL) und dem homologen 9-mer aus HHV-7 (SILPLKVYV) liegen somit ebenfalls vier veränderte Aminosäuren vor. Es erscheint recht unwahrscheinlich, dass der T-Zellklon HHV-7 erkennen könnte (wegen der hohen Zahl veränderter Aminosäuren im Epitop), kann jedoch nicht ganz ausgeschlossen werden (da die meisten Aminosäuren durch chemisch verwandte ersetzt sind).

Zum Experiment in Abbildung 33 muss angemerkt werden, dass das Hintergrundsignal und die Fehlerbereiche recht hoch waren (man beachte die angepasste x-Achse). Leider waren für dieses Experiment die T-Zellklone in einem eher schlechten Zustand. Die Ergebnisse sind daher mit Vorsicht zu betrachten, fügen sich allerdings widerspruchsfrei in den bisherigen Gang der Untersuchungen ein.

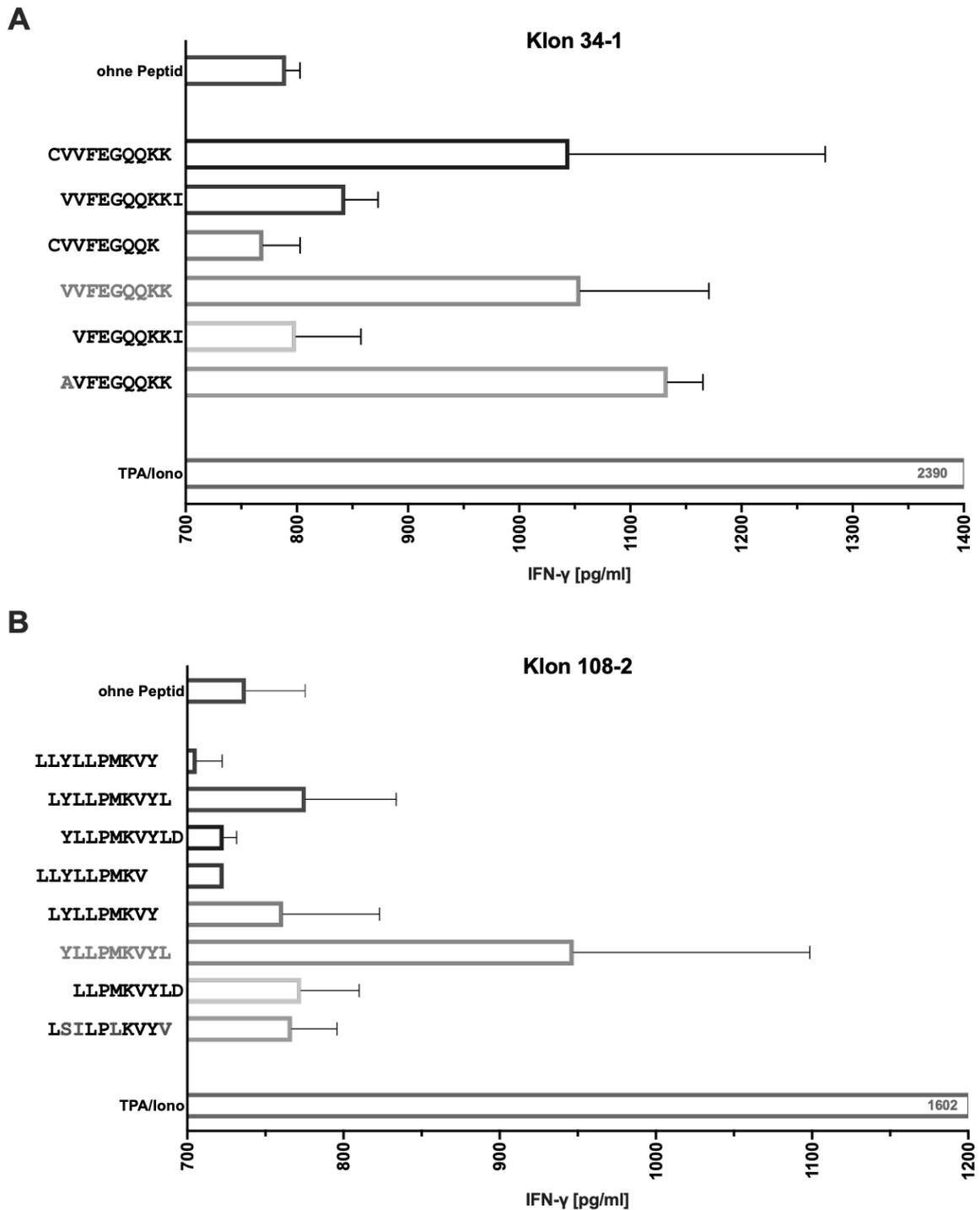


Abbildung 33: Zur Bestimmung der Minimalepitope von Klon 34-1 (A) und 108-2 (B) wurden von den erkannten Peptiden jeweils Längenvarianten und die homologe Aminosäuresequenz aus den verwandten Virus HHV-7 des erkannten Peptids getestet. In rot markiert die veränderten Aminosäuren in HHV-7 dargestellt. Als Positivkontrolle diente TPA/Ionomycin. Die Klone wurden mit B-Blasten, die mit den jeweiligen Peptiden beladen wurden für 16 h kokultiviert. Dann wurde die gebildetete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Duplikaten gezeigt.

#### 4.2.9 Erkennung von HHV-6A, -6B und -7 infizierten Zellen

Im Abschnitt 4.2.8 wurde gezeigt, dass Klone, die das Peptid VVFEGQQKK erkannten, auch dessen HHV-7-Variante AVFEGQQKK erkannten. Daher wurden die Experimente zur T-Zellerkennung von U38 in infizierten Zellen (wie in 4.2.7 für HHV-6B gezeigt) nun auf die beiden anderen humanen Roseoloviren HHV-6A und HHV-7 ausgeweitet. Getestet wurden die beiden T-Zell-Klone 9-1 und 34-1, die zum Zeitpunkt des Experiments in hinreichender Zahl verfügbar waren (Abbildung 34). Beide waren für das HLA-A\*03:01-restringierte Epitop VVFEGQQKK spezifisch (siehe Tabelle 25).

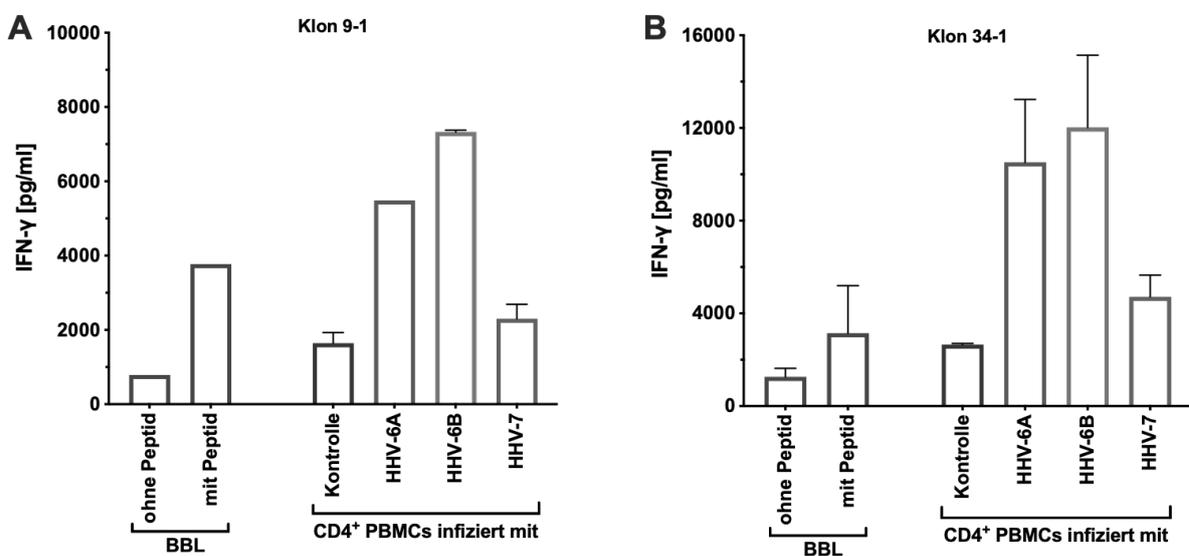


Abbildung 34: Erkennung von HHV-6-infizierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen durch U38-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellklone. Es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eines HLA-A\*03:01-positiven Spenders mit HHV-6A (AJ), -6B (HST) und -7 (JI) 6 Tage nach der Infektion mit den CD8<sup>+</sup>-T-Zellklonen für 16 h kokultiviert. Als Kontrollen wurde zum einen die mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladenen bzw. unbeladenen autologen B-Blasten, als auch nicht infizierte PHA-M-Blasten („Kontrolle“) verwendet. Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN-γ wurde am nächsten Tag mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Triplikaten gezeigt.

Auch hier wurde dieselbe Infektionsmethode verwendet wie bereits in Kapitel 4.1.6 beschrieben. Es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus PBMCs von HLA-passenden Spender isoliert, mit PHA-M stimuliert und drei Tage später mit dem HHV-6A (Stamm AJ), HHV-6B (Stamm HST) oder HHV-7 (Stamm JI) infiziert. Die HHV-6-spezifischen T-Zellklone wurden an Tag 6 nach Infektion mit den infizierten Zellen für 16 h kokultiviert. Die Menge des sezernierten IFN-γ wurde am nächsten Tag mittels ELISA bestimmt.

Es zeigte sich, dass beide T-Zellklone am besten die mit HHV-6B infizierten Zellen erkannten und nur geringfügig schwächer auch die mit HHV-6A infizierten Zellen. Die

Aminosäuresequenz VVFEGQQKK ist zwischen HHV-6B und HHV-6A vollständig konserviert, weswegen eine Kreuzerkennung von HHV-6A infizierten Zellen wahrscheinlich war. Das Peptid schien nach Infektion sehr effektiv prozessiert und präsentiert zu werden, da die HHV-6B- oder 6A-infizierten Zellen eine stärkere Reaktion hervorriefen als peptidbeladene B-Blasten. Die Erkennung von Zellen, die mit HHV-7 infiziert wurden, war bei beiden Klonen eher schwach, wobei sie bei Klon 34-1 noch etwas stärker über der Kontrollreaktion mit nicht infizierten PHA-M-Blasten lag als bei Klon 9-1.

#### 4.2.10 Übersicht der U38-epitopspezifischen T-Zellkulturen und Klone

In Tabelle 26 sind die Resultate zu U38-spezifischen T-Zellkulturen, ihren Epitopspezifitäten, HLA-Restriktionen und Reaktionsmustern zusammengefasst. Drei von vier CD8<sup>+</sup>-T-Zellklonen erkannten das HLA-A\*03:01-restringierte Epitop VVFEGQQKK, das auch von HHV-6B- und HHV-6A-infizierten Zellen präsentiert und dann von den T-Zellen erkannt wurde. Darüber hinaus erkannten drei von vier nichtklonalen Kulturen das gleiche Epitop. Nur ein CD8<sup>+</sup>-T-Zellklon erkannte ein HLA-A\*02:01-restringiertes Epitop YLLPMKVYL, das ebenfalls von infizierten Zellen präsentiert und von den CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt wurde. In Bezug auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen U38 liegt im untersuchten Spender also das Muster einer Immundominanz vor. Dabei ist VVFEGQQKK das dominante und YLLPMKVYL ein subdominantes Epitop. Möglicherweise wären bei noch umfassenderer Analyse noch weitere CD8-Epitope aufgefunden worden.

Im Falle der CD4<sup>+</sup>-T-Zellantwort gegen U38 war die Situation eine andere: Jeder der vier CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone erkannte ein anderes Epitop mit je einer anderen HLA-Restriktion. Interessanterweise waren alle drei Subklassen vertreten (HLA-DP, DQ, DR). Alle vier Epitope wurden von infizierten Zellen präsentiert und von den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erkannt. Die Ergebnisse für die drei nichtklonalen CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-Kulturen weisen auf die Existenz von mindestens zwei weiteren, sich mit den oben genannten nicht überschneidenden CD4<sup>+</sup>-T-Zellepitopen hin, diese wurden aber nicht näher untersucht.

Somit weisen die vorliegenden Daten auf eine Immundominanz-Hierarchie innerhalb der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen hin und identifizieren mindestens ein potenziell immundominantes Epitop. Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellantwort scheint dagegen von hoher Diversität und die Zahl der tatsächlich von T-Zellen eines Spenders erkannten Epitope könnte noch weit höher liegen als die hier, in einem Spender, gefundenen 4 bzw. 6 Epitope. Dieses Muster ähnelt dem, das für andere herpesvirale Proteine gefunden wurde, wie z.B. das CMV-Antigen IE-1 (Ameres et al. 2015). Alle beschriebenen Epitope sind neu und in der Literatur noch unbekannt.

Tabelle 26: Übersicht der T-Zellkulturen und Klone gegen das Antigen U38. Es konnten aus der limitierenden Verdünnung (Abschnitt 4.2.3) insgesamt elf verschiedene U38-spezifische T-Zellkulturen oder T-Zellklone in Kultur expandiert und charakterisiert werden. Kulturen, die nur eine Peptidspezifität aufwiesen und ausschließlich entweder aus CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>- T-Zellen bestanden, werden hier als T-Zell-Klone bezeichnet. In diesem Sinne zeigt die Tabelle vier CD8<sup>+</sup>-T-Zellklone, vier CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone sowie drei kombinierte CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellkulturen.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz (Minimalpeptid)	T-Zell- phänotyp	HLA Restriktion			Erkennung	
			HLA-	B-Blasten	Transfektion	Peptid- beladene B- Blasten	mit HHV-6B infizierte Zellen [an Tag n.I.]
108-2	<u>KL</u> LLYLLPMKVYLDE <u>LY</u> LLPMKVYLDETFE	CD8	A*02:01	+	+	+	3
9-1	TARC <u>VV</u> FEGQKKIF <u>VV</u> FEGQKKIFPCIL	CD8	A*03:01	+	+	+	6
20-1	TARC <u>VV</u> FEGQKKIF <u>VV</u> FEGQKKIFPCIL	CD8	A*03:01	+	+	+	6
34-1	TARC <u>VV</u> FEGQKKIF <u>VV</u> FEGQKKIFPCIL	CD8	A*03:01	+	+	+	6
13-1	NTVVNLFKVSGNFY NLFKVSGNFYVSQR	CD4	DRB1*15:01	+	+	+	6
4-1	DNGFLSFGWYNVKKY	CD4	DRB5*01:01	+	+	+	3
3-1	NFYVSQRIGKILQNE SQRIGKILQNEGFVV	CD4	DPB1*04:01	+	n.t.	+	3
134-2	YGVTTGAHGLLPCVA GAHGLLPCVAIAAS	CD4	DQB1*03:01	+	n.t.	+	n.t.
23-1	TARC <u>VV</u> FEGQKKIF <u>VV</u> FEGQKKIFPCIL	CD8	A*03:01	+	n.t.		
	NLFKVSFGNFYVSQR	CD4	DRB1*15:01	n.t.	n.t.	+	6
29-1	PDAENLGDIVIQISV NLGDIVIQISVVSFD	CD4	n.t.	n.t.	n.t.		
	TARC <u>VV</u> FEGQKKIF <u>VV</u> FEGQKKIFPCIL	CD8	A*03:01	+	n.t.	+	6
36-1	QIDGVHIYEFASEFE	CD4	n.t.	n.t.	n.t.		
	TARC <u>VV</u> FEGQKKIF <u>VV</u> FEGQKKIFPCIL	CD8	A*03:01	+	n.t.	+	n.t.

## **4.3 Untersuchung der T-Zellantwort gegen das DNA-Bindeprotein U41**

### **4.3.1 Ex vivo Untersuchungen zu Häufigkeit von U41-T-Zellantworten**

Wie bereits in 4.2.1 beschrieben, wurde auch das Antigen U41 wegen seiner Größe von 1132 Aminosäuren in Form zwei großer Peptidpools mit 144 und 137 Einzelpeptiden getestet, die auf die entsprechenden vertikalen und horizontalen Subpools verteilt wurden. Hier wurde ebenfalls der gleiche Spender wie zuvor bei U38 verwendet. Die PBMCs dieses Spenders wurden wie zuvor im ELISpot getestet: Sie wurden für 16 h mit den Subpools der U41-Peptide kultiviert und die erhaltenen IFN- $\gamma$ -Spots wieder mittels einer enzymatischen Färbereaktion sichtbar gemacht und anschließend ausgezählt.

Abbildung 35 zeigt das Resultat eines solchen Experiments. Auch bei U41 war das Ergebnis zu wenig trennscharf, um bestimmte Spezifitäten ex vivo klar identifizieren zu können. Daher wurden im folgenden U41-spezifische T-Zellen durch Peptidstimulation angereichert und die entstandenen T-Zellkulturen dann näher analysiert.

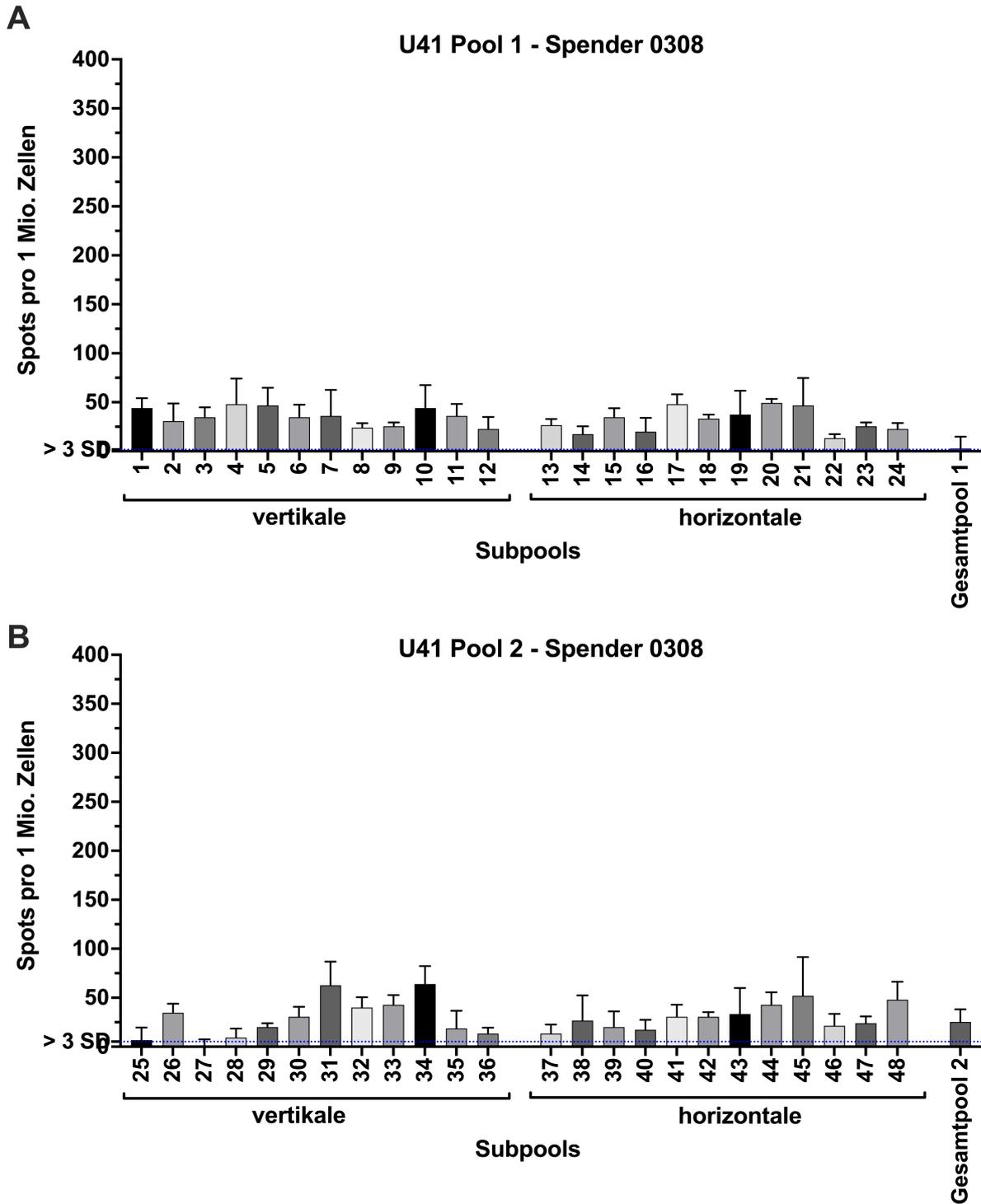


Abbildung 35: Ex vivo Häufigkeiten von HHV-6 spezifischen T-Zellen gegen das Antigen U41. Je well einer ELISpot-96-well-Platte wurden  $2,5 \times 10^5$  frisch aufgetaute PBMCs verwendet. In dieser Darstellung wurden die Ergebnisse auf Spots pro 106 Zellen umgerechnet. Die gestrichelte Linie markiert die Negativkontrolle plus deren 3-fache Standardabweichung („3 SD“).

### 4.3.2 Anreicherung U41-spezifischer T-Zellen durch Peptidstimulationen

Die ELISpot Analysen in 4.3.1 hatten gezeigt, dass U41-spezifische T-Zellen ex vivo zu selten waren, um sie direkt weiter analysieren zu können. Dies entsprach dem vorigen Befund für U38 (siehe Abschnitt 4.2.2). Daher wurden nun PBMCs mit Peptiden stimuliert und expandiert, um zu virusspezifischen T-Zellkulturen zu gelangen und mit diesen die Spezifität und Funktion von U41-spezifischen Zellen zu untersuchen.

Da das Antigen U41 aus insgesamt 271 Einzelpeptiden bestand, wurden wie bei U38 wiederwieder zwei T-Zellkulturen parallel angesetzt, wobei Kultur 1 mit den ersten 144 Peptiden (Gesamtpool 1) und Kultur 2 mit den restlichen 137 Peptiden (Gesamtpool 2) stimuliert wurde.

Nach zehn Tagen, und von da an alle sieben Tage, wurden die T-Zell-Kulturen mit bestrahlten, autologen, mit Peptiden beladenen CD40-aktivierten B-Blasten in Gegenwart von IL-2 restimuliert.

Nach 38 Tagen in Kultur, also nach der fünften Stimulation, wurden die beiden T-Zellkulturen auf das Vorhandensein von U41-spezifischen T-Zellen untersucht. Hierbei wurden je  $1,5 \times 10^5$  T-Zellen mit  $1,5 \times 10^5$  autologen B-Blasten in Anwesenheit von Peptid-Subpools oder dem jeweils dazu passenden Gesamtpool inkubiert.

In beiden T-Zellkulturen zeigte sich in dieser Analyse noch kein klares Bild der enthaltenen U41-Spezifitäten (Abbildung 36 A und B). Gewisse Tendenzen konnten vermutet werden: Kultur 1 zeigte eine etwas verstärkte Antwort auf die Peptide aus den Subpools 1, 4 und 12, Kultur 2 reagierte etwas stärker gegen die Subpools 26, 31 und 36.

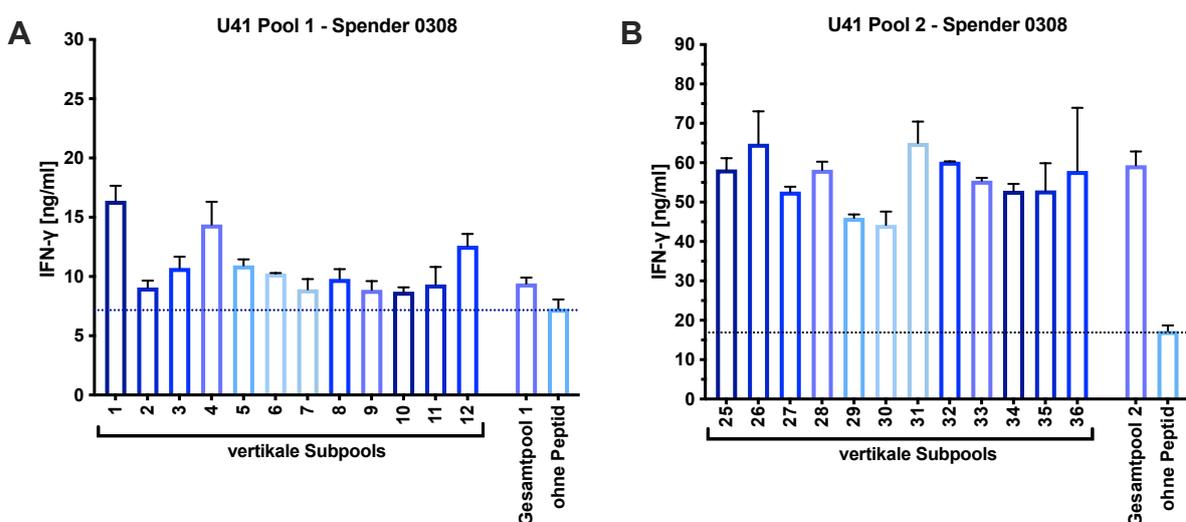


Abbildung 36: Quantifizierung der funktionellen Anreicherung von spezifischen, IFN- $\gamma$  sezernierenden T-Zellen in den T-Zellkulturen 1 (A) und 2 (B) von Spender 0308 nach Stimulation mit U38-Peptiden. Die T-Zellen wurden nach 38 Tagen in Kultur gegen Peptidpools in Anwesenheit autologer B-Blasten wie angegeben getestet, und die Menge des über Nacht freigesetzten IFN- $\gamma$  wurde im ELISA ermittelt.

Da auch hier die Spezifität und Funktion von T-Zellen anhand von T-Zellklonen am genauesten untersucht werden können, wurden die beiden mit U41-Peptiden stimulierten T-Zellkulturen nach einer weiteren Stimulation einer limitierenden Verdünnung an Tag 42 unterzogen. Es wurden jeweils 960 Mikrokulturen mit statistisch je 0,7 T-Zellen und mit statistisch je 2,5 T-Zellen angesetzt.

Nach 4 Wochen wuchsen aus diesen Ansätzen in 117 Mikrokulturen makroskopisch sichtbare Zellpopulationen aus. Von diesen wuchsen 28 aus den Ansätzen für U41-Gesamtpool 1 aus, hier betrug die Auswachsrate somit nur etwa 3 %. Die Kulturen 1 bis 3 entstammten der Verdünnungsstufe von 0,7 Zellen pro well, die Kulturen 4 bis 28 aus der Verdünnungsstufe von 2,5 Zellen pro well. Aus den Ansätzen mit U41-Gesamtpool 2 wuchsen 88 Kulturen aus, sodass hier die Auswachsrate etwa 9 % betrug. Hier gingen die Kulturen 29 bis 50 aus der Verdünnungsstufe von 0,7 Zellen pro well und die Kulturen 51 bis 117 aus der Verdünnungsstufe von 2,5 Zellen pro well hervor. Für beide Ansätze wurde also konsistent beobachtet, dass die Auswachsrate der eingesetzten Zellzahl (0,7 oder 2,5 Zellen pro well) in etwa proportional war, allerdings war die Rate bei U41-Gesamtpool 2 deutlich höher als bei U41-Gesamtpool 1.

Im nächsten Schritt musste geklärt werden, ob diese Mikrokulturen gegen U41-spezifisch reagierten. Deshalb wurden mittels einer IFN- $\gamma$ -ELISA-Analyse die Kulturen auf spezifische Erkennung des entsprechenden Peptidpools (U41-Gesamtpool 1 oder 2) getestet (Abbildung 37). Die meisten Mikrokulturen reagierten etwas stärker in Ansätzen ohne U41-Peptide als mit Peptiden oder waren vollständig unreaktiv und wurden daher von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Die verbleibenden Mikrokulturen (in Abbildung 37 mit Pfeil markiert) wurden im Folgenden weiter analysiert, unabhängig davon, ob sie ihre Reaktivität gegen U41-Peptide im Vergleich zur Kontrolle stark oder nur gering erhöht war. Die Mehrzahl der betreffenden Mikrokulturen zu Gesamtpool 1, aber nur eine Minderzahl der Mikrokulturen zu Gesamtpool 2 zeigte ein sehr deutlich U41-peptidspezifisches Erkennungsmuster.

Von den fünf weiter zu analysierenden Kulturen zu Gesamtpool 1 entstammte eine der 0,7- und vier Mikrokulturen entstammten der 2,5 Zellen/well-Verdünnungsstufe. Bei den zehn zu untersuchenden Kulturen aus Gesamtpool 2 entstammten vier Klone der 0,7 Zellen pro well und sechs der 2,5-Verdünnungsstufe.

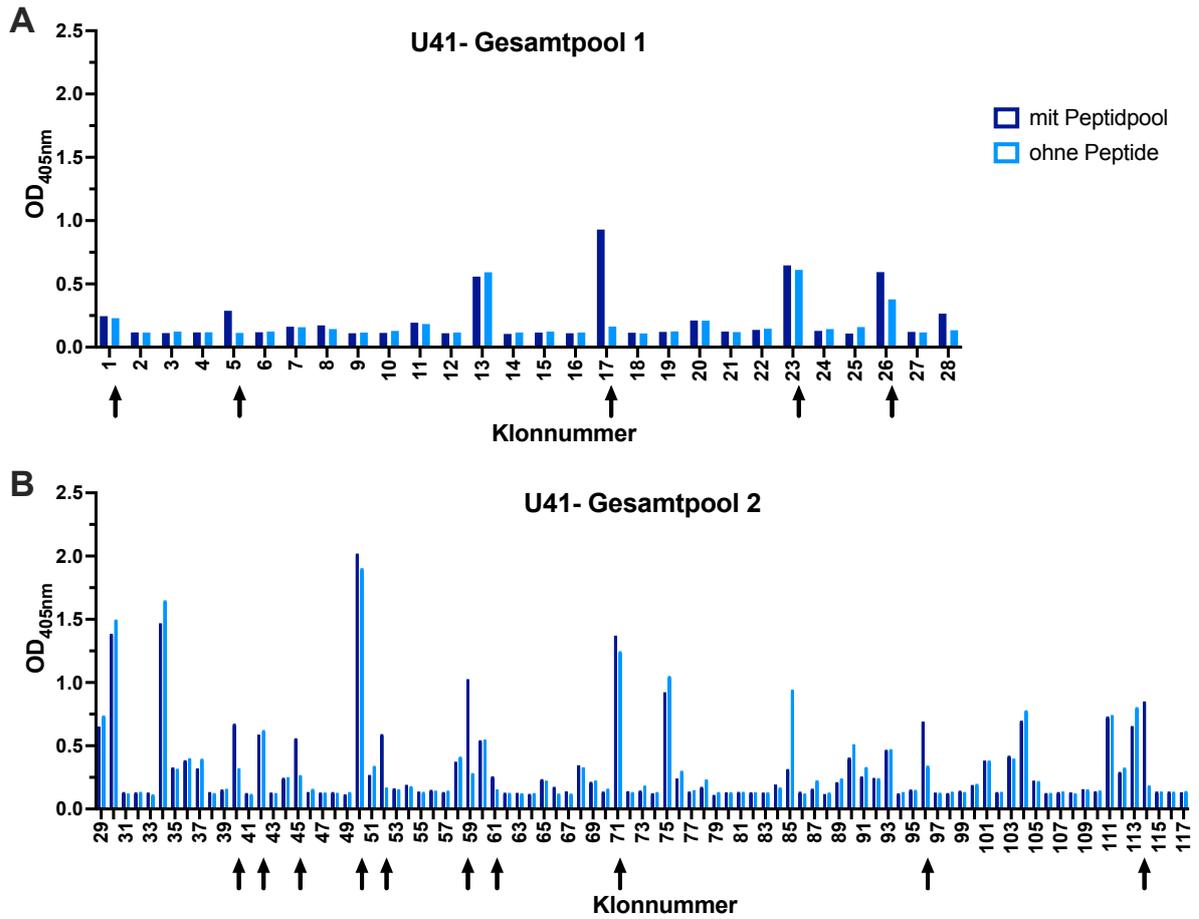


Abbildung 37: Ausgewachsene Mikrokulturen aus Gesamtpool 1 (A) und Gesamtpool 2 (B). Die Pfeile markieren die Mikrokulturen, die in Anwesenheit von U41-Gesamtpools stärker reagieren als in deren Abwesenheit. Diese markierten Mikrokulturen wurden im weiteren Verlauf genauer analysiert. Mikrokulturen 1 bis 3 (A) und 29 bis 50 (B) entstammten der Verdünnungsstufe von 0,7 Zellen pro well, die übrigen einer Verdünnung von 2,5 Zellen pro well.

### 4.3.3 Identifizierung von T-Zellepitopen im Antigen U41

Durch Restimulation und weitere 10 Tage Kultivierung konnten die 15 Mikrokulturen, bei denen getestet werden musste ob es sich um Klone handelt, weiter expandiert werden. Anschließend wurde ihre Funktionalität gegenüber U41 im Test mit U41-Peptid-Subpools genauer analysiert. Wie bereits oben beschrieben, wurden zur Identifizierung der spezifischen Epitope autologe B-Blasten mit jeweils einer der 24 Peptidmischungen beladen und für 16 h kokultiviert. Anschließend wurde die IFN- $\gamma$ -Konzentration in den Überständen mittels eines ELISA Tests quantitativ bestimmt. Auf diese Weise wurden alle 15 potentiellen U41 spezifischen Mikrokulturen getestet (Daten nicht gezeigt).

Nachdem die Epitopsequenzen der antigenspezifischen Mikrokulturen ermittelt waren, wurden diese nun weiter als Klone behandelt. Im nächsten Schritt wurde der Phänotyp der zehn Klone bestimmt, um die Frage, ob die Klone CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>- T-Lymphozyten waren, klären zu können. Hierfür wurden die T-Zellklone an Tag 7 nach Restimulation mit Feederzellen jeweils mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4 und CD8 gefärbt und im Durchflusszytometer gemessen.

Einen Überblick aller zehn U41-spezifischen Klone bietet Tabelle 27. Neben der spezifisch erkannten Aminosäuresequenz ist auch der jeweilige T-Zellphänotyp angegeben. Alle zehn Klone sind vermutlich echte T-Zellklone, da sie erstens nur homogen CD4 exprimierten und zweitens nur je ein Epitop erkannten.

Tabelle 27: Übersicht der T-Zellklone gegen das Antigen U41. Es konnten insgesamt zehn verschiedene T-Zellklone hinsichtlich ihrer Spezifität charakterisiert werden. Alle zehn Kulturen waren vermutlich reine CD4<sup>+</sup>-Klone und erkannten jeweils ein Epitop (d.h. ein spezifisches Peptid oder Peptidpaar). Die jeweils erkannten 15-mere sind genannt, die Überschneidungsbereiche von erkannten Peptidpaaren sind fett gedruckt. Die erkannten 15-mere wurden in allen Fällen in einem zweistufigen Prozess ermittelt, erstens mittels Subpools (vertikal und horizontal), und zweitens zur Überprüfung dieses Resultats durch Testung gegen die somit als Kandidaten in Frage kommenden Einzelpeptide. Das im Falle eines Peptidpaars tendenziell besser erkannte Peptid ist unterstrichen.

Bezeichnung	vertikaler Subpool (Nr.)	horizontaler Subpool (Nr.)	erkanntes Peptid (Nr.)	Aminosäuresequenz	T-Zell-phänotyp
5-1	3	16	<u>39</u>	NGFKELLFAGLLIPC	CD4
17-1	11	21	<u>107</u>	TCPQLLSYVVWNLNR	CD4
26-1	10 11	23	130 <u>131</u>	FGRK <b>PVSELKEIGKD</b> <b>PVSELKEIGKD</b> QQNT	CD4
40-2	25	38	<u>157</u>	SPFLTFAYYKVILTV	CD4
45-2	25	38	<u>157</u>	SPFLTFAYYKVILTV	CD4
52-2	34 35	38	166 <u>167</u>	SISK <b>WLVQQYQSLYG</b> <b>WLVQQYQSLYG</b> TFHS	CD4
59-2	35	40	<u>191</u>	KKNPLSGCISFLLFK	CD4
61-2	25	38	<u>157</u>	SPFLTFAYYKVILTV	CD4
96-2	28 29	45	<u>244</u> 245	LQDF <b>RFMRQKTI</b> IAT <b>RFMRQKTI</b> IATKFSE	CD4
144-2	36	46	<u>264</u>	GREALAASIMLKLNH	CD4

#### 4.3.4 Bestimmung der HLA-Restriktion

Wie bereits erläutert, war das Verfahren der U41-Epitopidentifikation bis zu diesem Stadium HLA-unabhängig. Nun musste daher die HLA-Restriktion der T-Zellklone ermittelt werden, um ihre Spezifität vollständig zu beschreiben.

Wie in Tabelle 27 gezeigt, konnten nur CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone gegen das Antigen U41 erfolgreich kultiviert werden. Deren HLA-Restriktionen wurden mit zwei aufeinander aufbauenden Methoden nachgewiesen. Zuerst wurde ihre Restriktion auf eine der drei HLA-Klasse-II-Isoformen mittels blockierender Antikörper eingegrenzt. Im zweiten Schritt wurde die so ermittelten HLA-Restriktionsmuster der CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone durch mit den jeweiligen HLA-Molekülen transfizierten DG-75-Zellen überprüft.

##### 4.3.4.1 Analyse mit anti-HLA-Klasse-II-Antikörpern

Im ersten Schritt wurde mittels der in 4.2.5.2 dargestellten Methode die HLA-Restriktion der U41-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone auf eine der drei HLA-Klasse-II-Isoformen eingegrenzt. Diese Analyse wurde mit allen 10 Klonen aus Tabelle 27 durchgeführt.

In Abbildung 38 werden exemplarisch die Resultate für vier dieser CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone gezeigt. Alle vier zeigten eine deutliche Erkennung von B-Blasten in Abhängigkeit von deren Beladung mit dem spezifischen Peptid. Bei jedem T-Zellklon führte jeweils genau einer der drei anti-HLA-Antikörper zu einer Erniedrigung der Erkennung von B-Zellen auf das jeweilige Hintergrundniveau, das mit peptidunbeladenen B-Zellen beobachtet wurde. Bei den Klonen 17-1 und 59-2 war dies der anti-HLA-DR-Antikörper, bei den Klonen 26-1 und 114-2 der anti-HLA-DP-Antikörper.

Diese Analyse wurde mit allen zehn U41-spezifischen Klonen durchgeführt, siehe auch unten Tabelle 28 für das Endresultat. Es wurden Restriktionen durch HLA-DR und HLA-DP festgestellt, jedoch keine durch HLA-DQ.

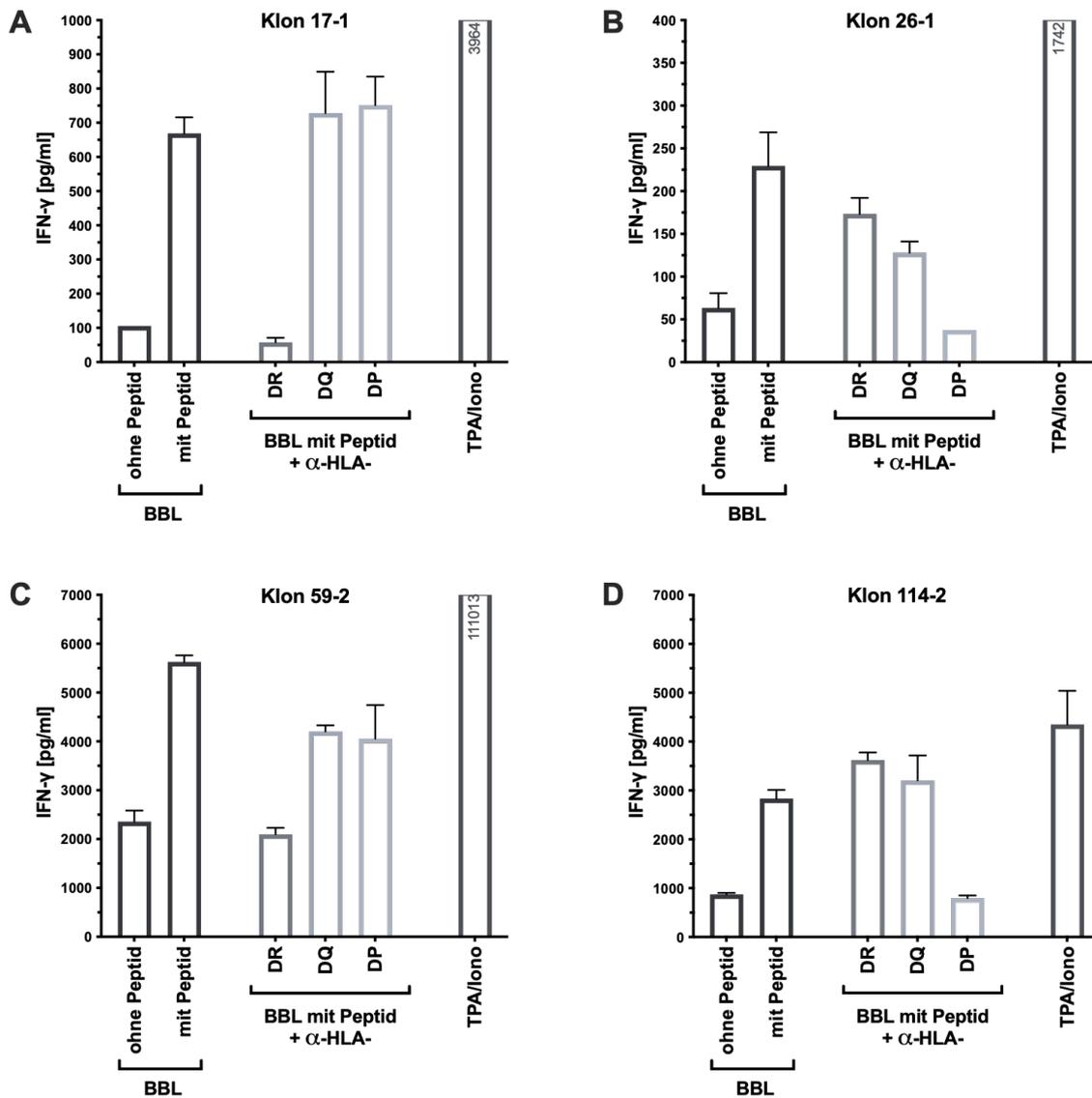


Abbildung 38: Ermittlung der HLA-Klasse-II-Restriktion der CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone gegen das Antigen U41. Es wurden B-Blasten mit dem jeweiligen Peptid beladen und mit blockierenden Antikörpern gegen HLA-DP, -DQ oder -DR inkubiert. Die so behandelten B-Blasten wurden dann mit den CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildetet IFN-γ Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Triplikaten gezeigt.

#### 4.3.4.2 Analyse mittels HLA-Transfektion

Um die HLA-Restriktion der U41-spezifischen T-Zellkulturen genauer zu ermitteln, wurden Expressionsplasmide für unterschiedliche autologe HLA-Moleküle in DG-75-Zellen transfiziert und die T-Zell-Erkennung der transfizierten Zellen nach Peptidbeladung untersucht, wie bereits oben in 4.2.5.3 beschrieben.

In Abbildung 39 sind exemplarisch die Analysen von zwei CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen gezeigt, die bereits im Antikörper-Blockierungsexperiment eine HLA-DR-Restriktion gezeigt hatten.

Diese wurden nun auf ihre Reaktivität gegen Transfektanden mit jedem der drei in Frage kommenden (autologen) HLA-DR-Moleküle getestet. Es ergab sich ein deutliches Muster, um die HLA-Restriktion zu identifizieren: Der Klon 5-1 zeigte eine Reaktivität weit über Hintergrund nur mit HLA-DRB5\*01:01- transfizierten Zielzellen, der Klon 40-2 hingegen nur mit DRB1\*15:01- transfizierten Zielzellen. Die besonders beim zweiten Klon beobachtete Hintergrundreaktivität ist wahrscheinlich durch eine Präsentation der Peptide von den T-Zellen selbst zu erklären.

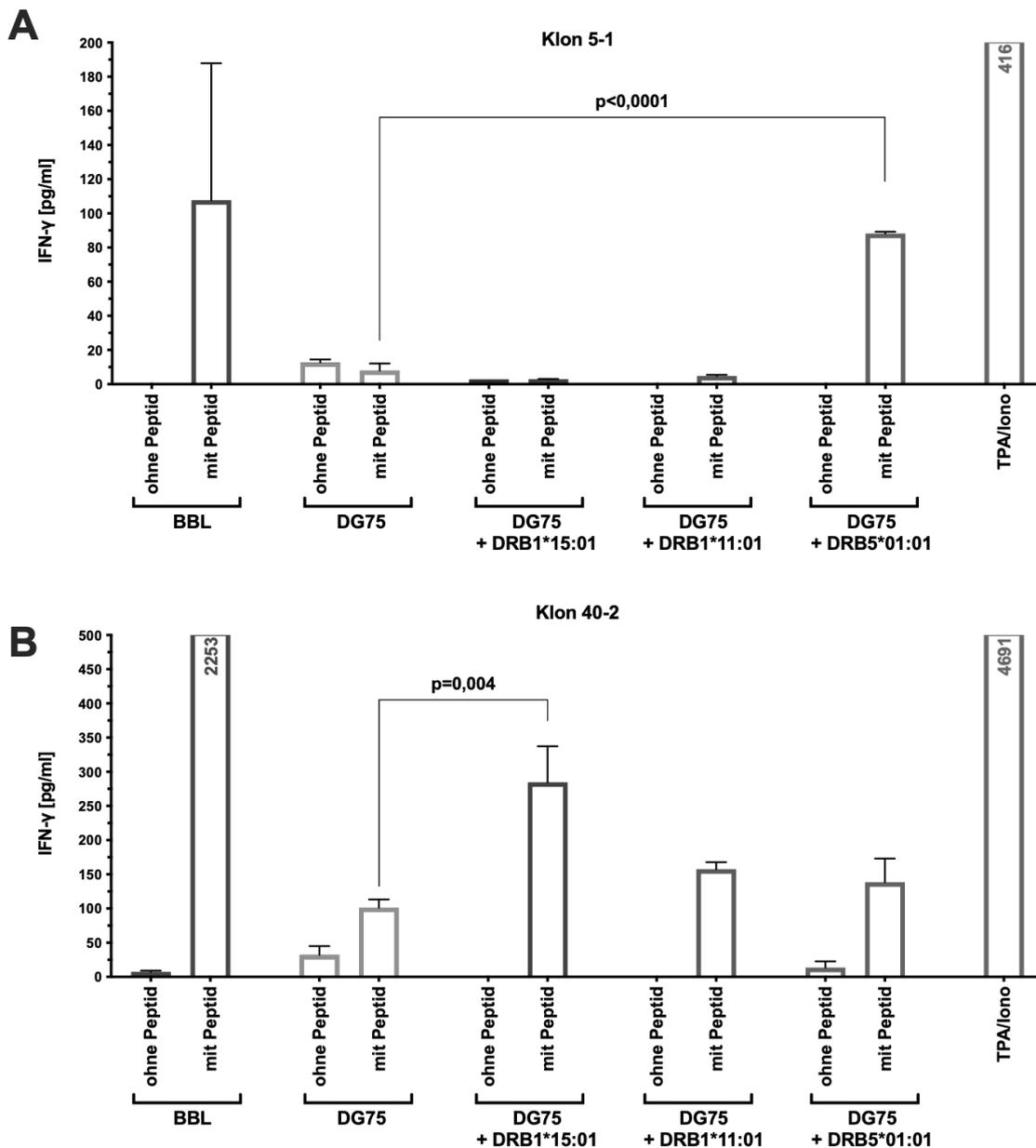


Abbildung 39: Analyse der Kokultur von CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen mit transfizierten DG-75-Zellen. Die beiden T-Zellklone 5-1 (A) und 40-2 (B) wurden jeweils auf ihre Erkennung von transfizierten DG-75-Zellen mit den drei HLA-Expressionsplasmiden DRB1\*15:01, DRB1\*11:01 und DRB5\*01:01 untersucht. Die so behandelten DG-75-Zellen wurden dann mit den CD4<sup>+</sup>-T-Zellklonen für 16 h kokultiviert. Am nächsten Tag wurde die gebildete IFN- $\gamma$  Menge gemessen. Es sind die Mittelwerte von Triplikaten gezeigt.

### 4.3.5 Funktionsspektrum von einzelnen Klonen bezüglich Peptidkonzentrationen

Ausgewählte HHV-6B-spezifische T-Zellklone wurden wieder hinsichtlich ihrer funktionellen Avidität für das Zielantigen durch Analyse ihrer Reaktivität gegen autologe B-Blasten untersucht, die mit seriell verdünntem Peptid beladen worden waren. Wie bereits oben beschrieben, wurden dann IFN- $\gamma$ , Granzym B und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) per ELISA im Kulturüberstand gemessen.

Die Abbildung 40 zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf der gemessenen Parameter für alle drei CD4<sup>+</sup>-Klone. Die beiden Klone 40-2 und 45-2 besitzen eine IFN- $\gamma$ -Reaktivität bis zu einer Konzentration von 1 nM Peptid. Alle drei Klone wiesen einen abnehmender Kurvenverlauf bezüglich der Sekretion von TNF- $\alpha$  auf.

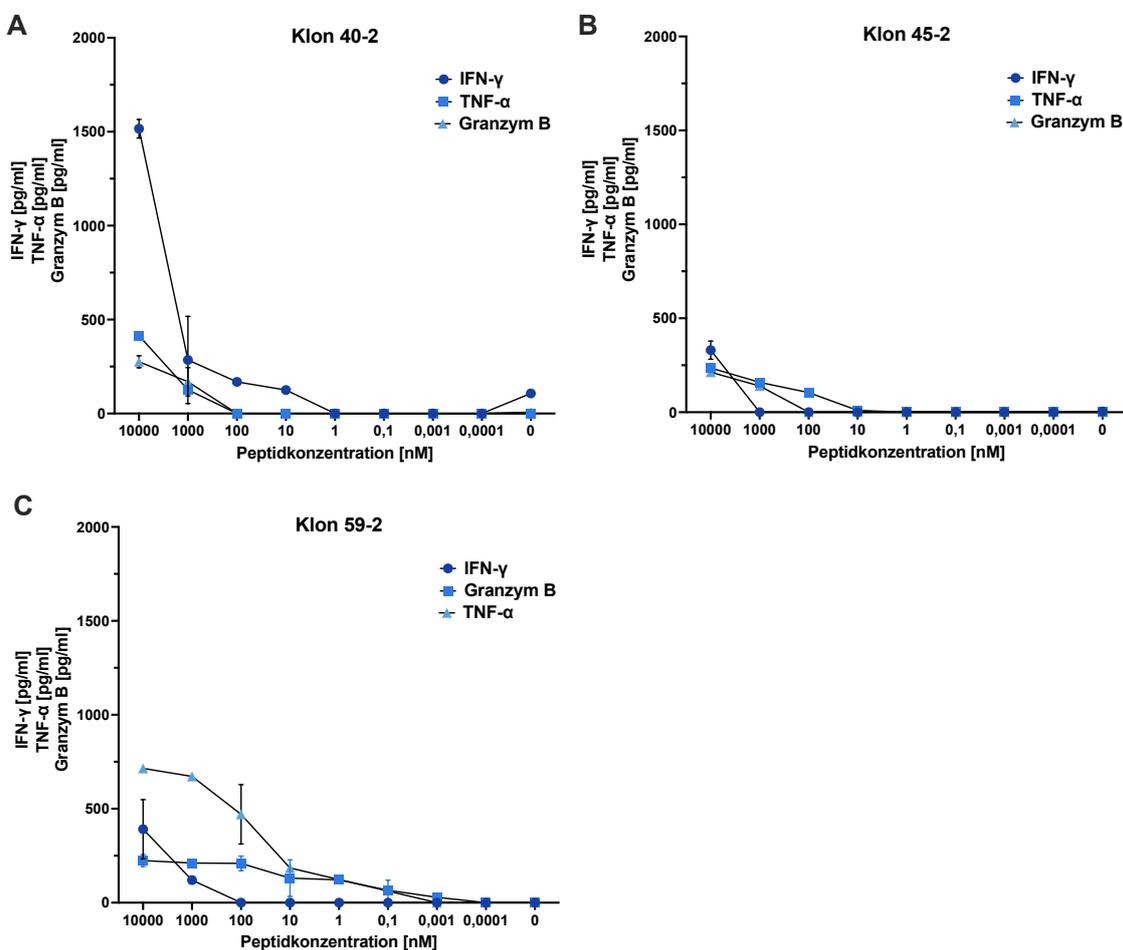


Abbildung 40: Analyse der funktionellen Avidität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone. Die HHV-6-spezifischen T-Zellklone wurden zusammen mit autologen B-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden HHV-6-Peptids (bei den Klonen 40-2 und 45-2: Peptidnr.157, bei Klon 59-2: Peptidnr.191, siehe auch Tabelle 27) über Nacht inkubiert. Die Konzentration an ausgeschüttetem IFN- $\gamma$ , Granzym B und TNF- $\alpha$  im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Wertebereiche von Triplikaten gezeigt.

#### 4.3.6 Erkennung von HHV-6B infizierten CD4<sup>+</sup>-Zellen

Die Reaktivität der U41-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zellklone gegenüber virusinfizierten Zellen und damit die Erkennung der viralen Proteine im Viruskontext wurde nun analysiert. Es wurde dieselbe Methode verwendet, wie bereits in Kapitel 4.1.6 beschrieben. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden aus PBMCs von HLA-kompatiblen Spendern isoliert, mit PHA-M stimuliert und drei Tage später mit dem HHV-6B-Stamm HST infiziert. Die HHV-6-spezifischen T-Zellen wurden an zwei unterschiedlichen Tagen nach Infektion mit den infizierten Zellen kokultiviert (Tag 3 und Tag 6 nach Infektion) und die Menge des sezernierten IFN- $\gamma$  wurde mittels ELISA bestimmt (Abbildung 41).

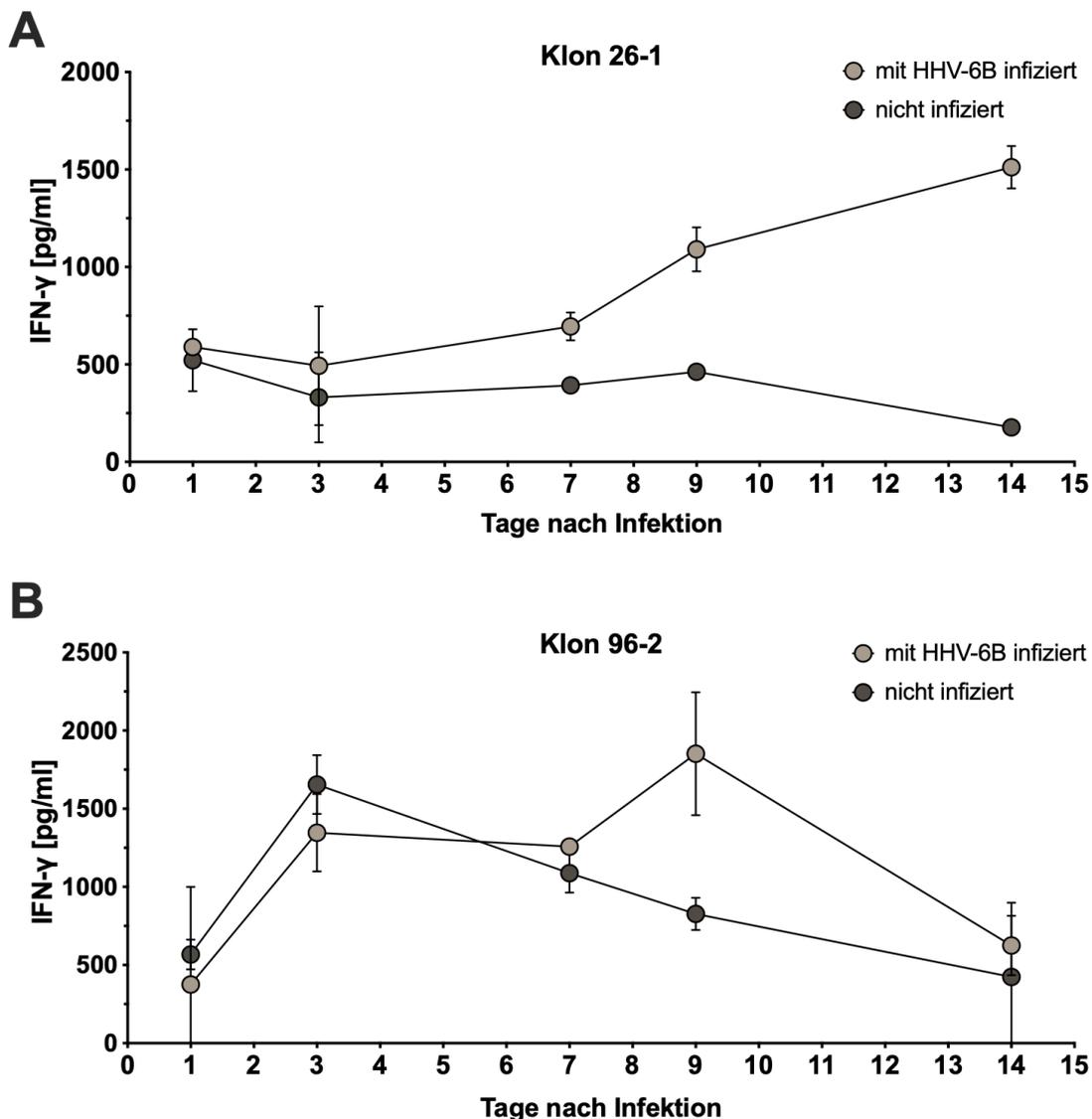


Abbildung 41: Erkennung von HHV-6B-infizierten CD4<sup>+</sup>-PHA-Blasten durch die beiden HHV-6B-spezifischen T-Zellklone 26-1 und 96-2. Es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eines HLA-passenden Spenders mit HHV-6B (HST) 1, 3, 6, 9 bzw. 14 Tage nach der Infektion mit dem CD4<sup>+</sup>-T-Zellklon für 16 h jeweils mit einem Klon kokultiviert. Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN- $\gamma$  wurde am nächsten Tag mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten gezeigt.

Die Erkennung von infizierten Zellen durch jeden der zehn U41-spezifischen T-Zellklone wurde in ähnlicher Weise zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen Tag 1 und Tag 14 nach Infektion untersucht. Wie Abbildung 42 zeigt, ergab sich im Mittel der zehn Klone eine maximale Erkennung infizierter Zellen von etwa 30 % über Hintergrund an Tag 9, gemessen als das Verhältnis von sezerniertem IFN- $\gamma$  mit vs. ohne Infektion. Einzelne T-Zellklone stachen durch stärkere Erkennung heraus, wie z.B. der HLA-DP-restringierte Klon 26-1, der an Tag 9 und 12 nach Infektion Werte vom 1,9–2,0-fachen des Hintergrunds erreichte. Somit waren U41-spezifische CD4<sup>+</sup>-T-Zellen grundsätzlich zur funktionellen Erkennung einer HHV-6B-Infektion befähigt, die Stärke der Erkennung war jedoch nicht für jede Epitopspezifität zu beobachten. Die drei Klone mit der deutlichsten Erkennung (5-1, 26-1, 96-2) erkannten drei unterschiedliche Epitope mit unterschiedlichen HLA-Restriktionen (siehe Tabelle 28).

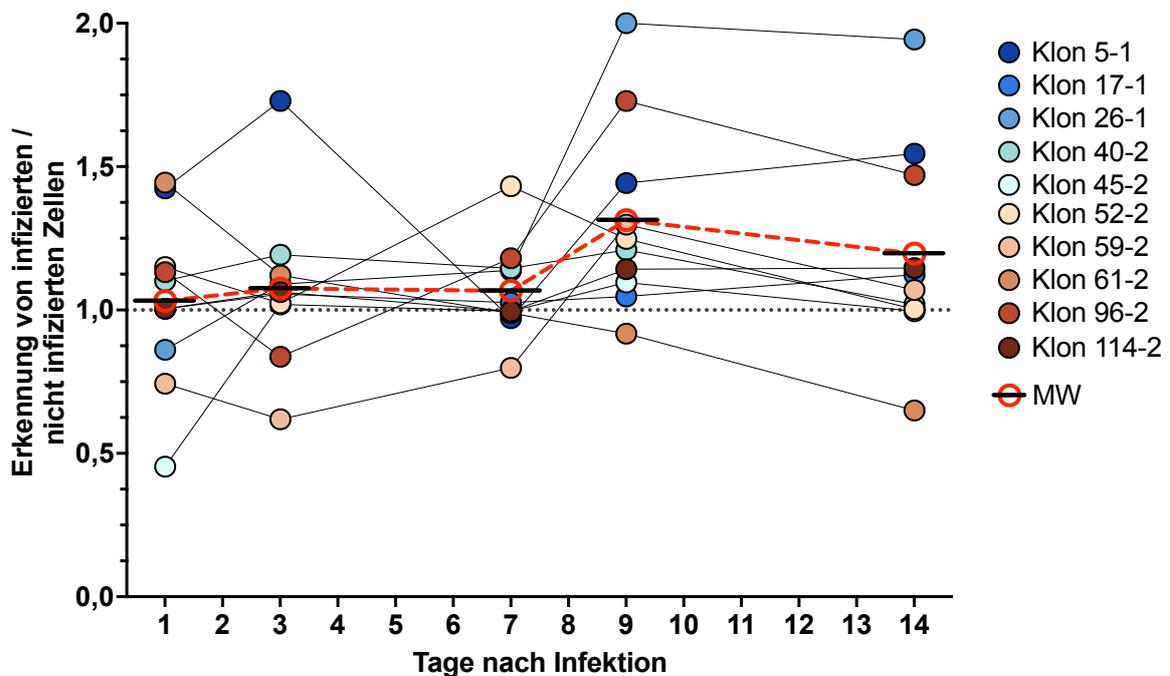


Abbildung 42: Zeitverlauf der Erkennung von HHV-6B-infizierten CD4<sup>+</sup>-PHA-Blasten durch die U41-spezifischen T-Zellklone aus U41. Es wurden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eines HLA-passenden Spenders mit HHV-6B (HST) 1, 3, 6, 9 bzw. 14 Tage nach der Infektion mit dem CD4<sup>+</sup>-T-Zellklon für 16 h kokultiviert. Die Menge des in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN- $\gamma$  wurde am nächsten Tag mittels ELISA bestimmt. Als Kontrollen wurden jeweils nicht infizierte PHA-M-Blasten verwendet. Auf der y-Achse ist der Quotient der IFN- $\gamma$ -Menge aus den Ansätzen mit infizierten und nicht infizierten PHA-M-Blasten dargestellt. MW: Mittelwert aller zehn Klone.

### 4.3.7 Übersicht der U41-spezifischen Klone

Einen Überblick über Spezifitäten und Reaktionsverhalten der U41-spezifischen T-Zellklone, die in dieser Arbeit hergestellt und analysiert wurden, gibt Tabelle 28.

Folgende Aussagen zur T-Zellantwort gegen U41 lassen sich ableiten – mit der generellen Einschränkung, dass diese Beobachtungen vorläufig nur für den hier untersuchten Spender gelten. Alle Spezifitäten waren mit niedriger (quantitativ nicht bekannter) Häufigkeit im ex vivo Repertoire vertreten und konnten nur durch in vitro Restimulation sichtbar gemacht werden, was für HHV-6-spezifische T-Zellantworten typisch ist (Martin et al. 2012; Becerra-Artiles et al. 2019). Die U41-spezifische T-Zellantwort war stark auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ausgerichtet, eine CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort wurde nicht beobachtet. Die HLA-Restriktionen waren divers und umfassten zwei HLA-DR-Restriktionen und mindestens eine DP-Restriktion; die HLA-DP-Restriktionen konnten in dieser Arbeit nicht näher ermittelt werden, da die Klone vor der abschließenden Analyse gestorben sind. Das Spektrum von T-Zellepitopen war vielfältig: Die Beobachtung, dass zehn T-Zellklone eines Spenders bereits acht verschiedene Epitope erkannten, lässt darauf schließen, dass es intra- und interindividuell noch eine weit größere Zahl von Epitopen geben könnte. Zudem deutet die Tatsache, dass ein Epitop dreimal vertreten war, auf eine relative Immundominanz dieses Epitops hin, dies muss allerdings in zukünftigen Analysen noch bewiesen werden.

Tabelle 28: Übersicht der T-Zellklone gegen U41. Es konnten insgesamt zehn verschiedene Klone identifiziert werden, wovon alle zehn reine CD4+-Klone waren. Alle Klone erkannten eine spezifische Aminosäuresequenz aus dem Antigen U41, die jeweils durch die Kombination der horizontalen mit den vertikalen Peptidpools des Antigens U41 festgestellt werden konnte. Drei Klone reagierten auf je zwei benachbarte vertikale Peptidpools, die dann in Kombination mit dem erkannten horizontalen Peptidpool auf angrenzende Aminosäuresequenzen hinwiesen.

Bezeichnung	Aminosäuresequenz	T-Zell-phänotyp	HLA Restriktion			Erkennung	
			HLA-	B-Blasten	Transfektion	Peptid-beladene B-Blasten	mit HHV-6B infizierte Zellen [an Tag n.I.]
17-1	TCPQLLSYVVWNLNR	CD4	DRB1*15:01	+	+	+	14
40-2	SPFLTFAYYKVILTV	CD4	DRB1*15:01	+	+	+	9
45-2	SPFLTFAYYKVILTV	CD4	DRB1*15:01	+	+	+	9
61-2	SPFLTFAYYKVILTV	CD4	DRB1*15:01	+	+	+	1
52-2	SISKWLVQQYQSLYG WLVQQYQSLYGTFS	CD4	DRB1*15:01	+	+	+	6
96-2	LQDFRMRQKTIAT RMRQKTIATKFSE	CD4	DRB1*15:01	+	+	+	9
5-1	NGFKELLFAGLLIPC	CD4	DRB5*01:01	+	+	+	3
59-2	KKNPLSGCISFLLEFK	CD4	DRB5*01:01	+	+	+	9
26-1	FGRKPVSELKEIGKD PVSELKEIGKQQNT	CD4	DP	+	n.t.	+	14
144-2	GREALAASIMLKLNH	CD4	DP	+	n.t.	+	14

## 4.4 Untersuchungen zur T-Zellantwort gegen SARS-CoV-2

### 4.4.1 Immunevasion von SARS-CoV-2 durch Epitopmutationen

Die Infektion mit dem Coronavirus SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) ruft eine spezifische Immunantwort hervor, die meist die Infektion eliminiert. Dazu gehören Antikörper, CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Antikörper gegen das Spike-Protein üben einen erheblichen Selektionsdruck auf das Virus aus. Das zeigt sich an Mutationen im Spike-Protein, die es ermöglicht, dass einer Erkennung durch Antikörper ausgewichen wird. Somit werden später aufgetretene Virusvarianten von Antikörpern weniger gut neutralisiert, die gegen frühe Varianten (oder davon abgeleitete SARS-CoV-2-Impfungen) gebildet wurden. Weniger klar ist, ob ein entsprechender Selektionsdruck auch durch T-Zellen ausgeübt wird und Mutationen in T-Zellepitopen begünstigt.

Bei immungeschwächten Personen besteht die erhöhte Gefahr einer schweren, teils langandauernden (chronischen) Infektion mit SARS-CoV-2. Die Untersuchung der Mutationsmuster von SARS-CoV-2 in chronisch infizierten Patienten kann dabei helfen, herauszufinden, welche Komponenten des Immunsystems die Evolution des Virus besonders beeinflussen.

In diesem Teilprojekt wurde die Evolution von SARS-CoV-2 in einer stark immungeschwächten Patientin untersucht, die aufgrund von SARS-CoV-2 an einem langandauernden schweren akuten Atemnotsyndrom (ARDS) litt und nach fünfmonatiger Behandlung schließlich an einem Multiorganversagen verstarb. Über einen Zeitraum von 150 Tagen hinweg wurden Proben der oberen und unteren Atemwege entnommen und daraus 21 Genome von SARS-CoV-2 mit nahezu voller Länge charakterisiert. Der zu Beginn vorhandene Virusstamm wurde als B.1.1.29 (20B) klassifiziert. Dieser Stamm trug die Spike-Mutation D614G und war mit anderen im Frühjahr 2020 zirkulierenden Sequenzen eng verwandt. In den folgenden 5 Monaten diversifizierte sich das Virus umfassend. Gegenüber der SARS-CoV-2-Urvariante (Wuhan-Hu-1) traten 34 verschiedenen Mutationen in kodierenden Regionen auf, die zu mindestens einem Zeitpunkt eine relative Häufigkeit von > 40% der Viruspopulation hatten. Nach sequenziellem Ausschluss von 6 Mutationen, die bereits zu Beginn vorhanden waren, 11 nur vorübergehend auftretenden und fünf synonymen verblieben 12 nicht-synonyme Mutationen, die in dominanten Varianten bis zum Tod erhalten blieben (siehe Abbildung 43).

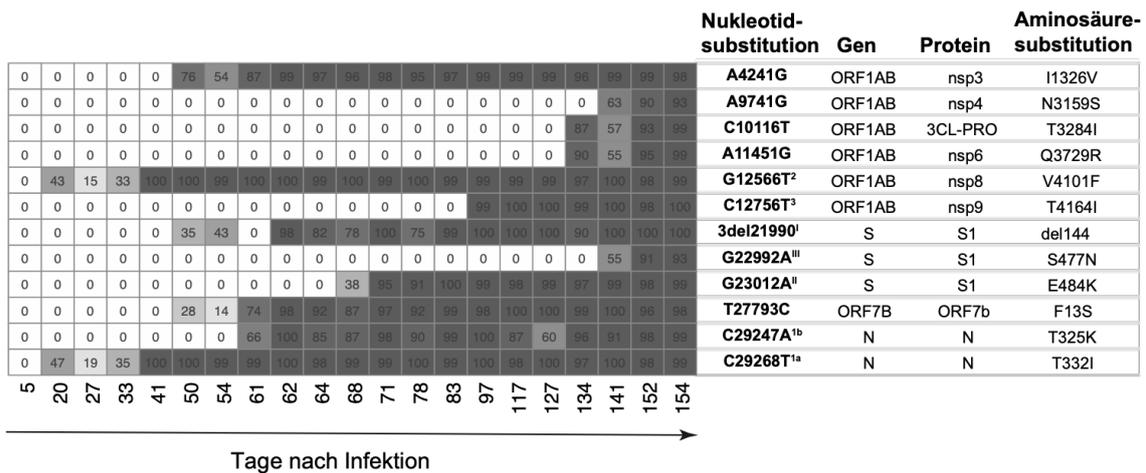


Abbildung 43: Analyse der SARS-CoV-2-Genomsequenzen in der Patientin. Die Heatmap zeigt die Häufigkeiten von Mutationen in kodierenden Regionen für die 21 Sequenzierungen der untersuchten Patientin. Nukleotid- und Aminosäuresubstitutionen sind relativ zum Referenzstamm Wuhan-Hu-1 angegeben. Die Sequenzanalysen wurden durchgeführt von M. Antwerpen et al. (Universität der Bundeswehr), H. Blum et al. (Genzentrum der LMU), M. Münchhoff (Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU München). Abbildung ursprünglich erstellt von M. Münchhoff, verändert aus Khatamzas et al. (2022).

Eine Überprüfung mit Hilfe von SAMBA für alle 12 Mutationen und sechs HLA-Klasse-I-Allotypen der Patienten (siehe Motive Tabelle 29) ergab 18 potenzielle T-Zellepitope (Tabelle 30). Ein Teil dieser Epitope war bereits literaturbekannt. Insbesondere hatten Ferretti et al. in einem Screening-Ansatz bereits beide potenziellen A\*01:01-Epitope und eines der HLA-A\*02:01-Epitope als dominante Spezifitäten von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in konvaleszenten Spendern identifiziert, die auch endogen prozessiertes Antigen erkannten (Ferretti et al. 2020). Dies machte die Hypothese noch wahrscheinlicher, dass ein Teil der Mutationen durch evolutionären Druck durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen der Patientin begünstigt wurde.

Da die Patientenproben begrenzt waren, wurde die Wirkung der Mutationen auf die T-Zell-Erkennung zunächst in immunkompetenten HLA-passenden rekonvaleszenten Spendern untersucht. Dazu wurden 15-mere Peptide und die vorhergesagten CD8<sup>+</sup>-Epitope (9- oder 10-mere, Tabelle 30) in mutierter und unmutierter Form synthetisiert (JPT) und Peptid-stimulierte T-Zellkulturen hergestellt. Deren Reaktivität gegen ursprüngliche und veränderte Epitopeptide wurde mittels einer ELISA-Analyse getestet. Nur ein Teil der Ansätze ergab proliferierende T-Zellkulturen. Bei dem HLA-B\*35:01-positivem Spender 1 expandierte die Stimulation mit dem Nukleokapsid-Peptid TPSGTWPTY eine T-Zellkultur. Diese Kultur erkannte die Wildtyp Variante TPSGTWPTY sehr gut. Der T332I-Austausch verringerte die T-Zell-Erkennung und die darauffolgende T325K-Substitution machte eine Erkennung unmöglich (Abbildung 44 A). Somit war die T-Zellerkennung erst nach zwei sequenziellen Mutationen, die dieses Epitop verändern, nicht mehr möglich.

Es wurden auch T-Zelllinien von zwei HLA-A\*02:01-positiven Spendern durch Stimulation mit dem Peptid ASALWEIQVVDADS hergestellt, welches das bereits bekannte Epitop ALWEIQVVD aus nsp8/ORF1ab enthielt. Dieses Epitop ist in SARS-CoV und SARS-CoV-2 vollständig konserviert (Ferretti et al. 2020). Die T-Zellen erkannten in einem Experiment mit 15-mer-Peptiden zwar das Peptid, das die Wildtyp-Version ALWEIQVVD enthielt, nicht aber seine Variante ALWEIQVVD (ORF1ab V4101F) (Abbildung 44 B). Von zwei HLA-A\*01:01-positiven Spendern wurden T-Zellkulturen durch Stimulation mit den beiden Peptiden CTDDNALAY und CTDDNALAYY von nsp9/ORF1ab angesetzt. T-Zellen von Spender 2 erkannten jedes der Wildtyp-Peptide und die Erkennung der Varianten war reduziert (Abbildung 44 C). Daher können Peptide CTDDNALAY(Y) zwei T-Zell-Epitope darstellen, wobei deren T-Zell-Antworten durch die ORF1ab-T4164I-Mutation beeinträchtigt werden, die einen optimalen Ankerrest Threonin in Position 2 durch suboptimales Isoleucin ersetzt.

*Tabelle 29: Die zur Identifizierung von Epitopkandidaten für HLA-Klasse-I-Allotypen der Patienten verwendeten Anker motive. Es wird der Ein-Buchstaben-Aminosäurecode in Groß- oder Kleinschreibung verwendet. X gibt eine beliebige Aminosäure an. Aminosäuren in Klammern sind Alternativen; somit bezeichnet (ST) S oder T. X2-3 bezeichnet XX oder XXX. Großbuchstaben zeigen am meisten bevorzugte Aminosäuren an, Kleinbuchstaben weniger bevorzugte Aminosäuren. Tabelle verändert aus Khatamzas et al. (2022).*

HLA-Allotyp	Ankermotiv
A*01:01	X(ST)(DE)X <sub>5-7</sub> Y
A*02:01	X(LIMv)X <sub>6-7</sub> (LVIM)
B*08:01	XX(RK)X(RK)X <sub>2-3</sub> (LVIM)
B*35:01	XPX <sub>5-8</sub> (YFLVIM)
C*04:01	X(FYWX)(De)X <sub>4-6</sub> (LFMivyw)
C*07:01	(KRx)(Rt)X <sub>5-7</sub> (LFYMivw)

Tabelle 30: Kandidaten für mögliche CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope, die bei der Patientin identifiziert werden konnten. Nk. Nukleotidposition der Mutation. AS: Aminosäureänderung (Austausch oder Deletion). Tag: Tag, an dem die Mutation dominant wurde (> 50 % der Sequenzierungs-Reads). n: kein Kandidat identifiziert. Für die Allele HLA-B\*08:01 und HLA-C\*07:01 wurden keine Epitopkandidaten identifiziert. Kandidaten für CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope wurden anhand der oben gezeigten Ankermotive identifiziert. Peptidsequenzen vor der Mutation sind gezeigt, Stellen von Aminosäureaustauschen oder -deletion sind unterstrichen. Tabelle verändert aus Khatamzas et al. (2022).

Nk	AS	Tag	Protein	Epitopkandidaten, HLA-Klasse-I			
				A*01:01	A*02:01	B*35:01	C*04:01
4241	I1326V	50	nsp3	PTDNY <u>I</u> TTY	n	VPTDNY <u>I</u> TTY	PTDNY <u>I</u> TTY
9741	N3159S	141	nsp4	n	n	n	n
10116	T3284I	134	3CLpro	n	QV <u>T</u> CGTTTL	n	n
11451	Q3729R	134	nsp6	n	n	n	n
12566	V4101F	41	nsp8	n	ALWEIQ <u>Q</u> VV	n	n
12756	T4164I	97	nsp9	C <u>T</u> DDNALAY	n	n	C <u>T</u> DDNALAY
				C <u>T</u> DDNALAY Y			C <u>T</u> DDNALAY Y
21990	del144	62	spike	n	n	DPFLGV <u>Y</u> Y	n
22992	S477N	141	spike	n	n	n	n
23012	E484K	71	spike	n	n	TPCNGV <u>E</u> GF	n
27793	F13S	61	ORF7b	n	YLC <u>F</u> LAFLL	n	n
					<u>F</u> LAFLLFLV		
					<u>F</u> LAFLLFLVL		
29247	T325K	61	nucleo	n	EV <u>T</u> PSGTWL	<u>T</u> PSGTWLIY	n
29268	T332I	41	nucleo	n	WL <u>T</u> YTGAIKL	TPSGTWL <u>I</u> Y	n

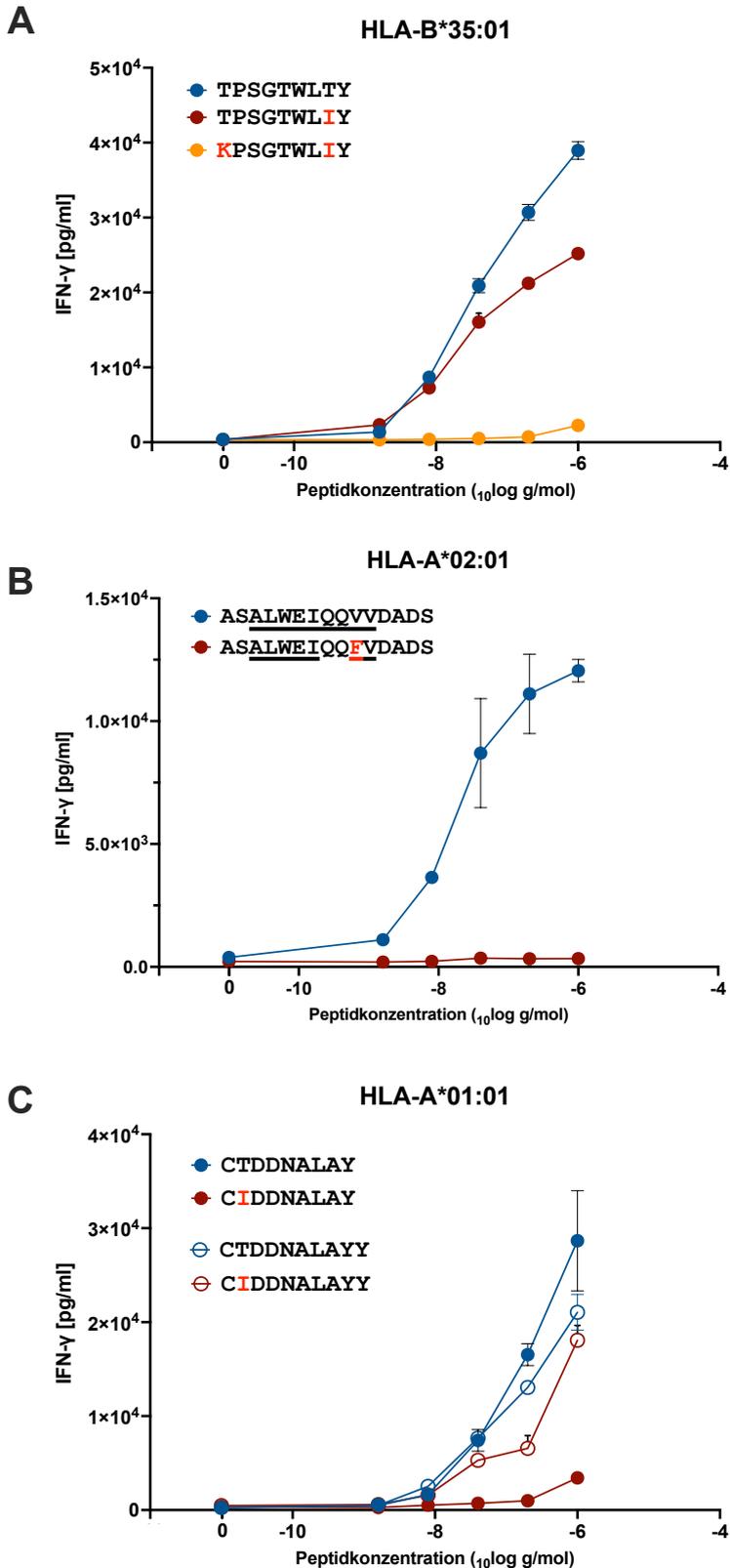


Abbildung 44: Reaktivität von T-Zellen gegenüber ursprünglichen und mutierten Epitopeptiden. Die T-Zellkulturen wurden von gesunden HLA-passenden Spendern durch Stimulation und Expansion mit den Wildtyppeptiden TPSGTWLTLY (in A), ASALWEIQQVVDADS (in B) und CTDDNALAY(Y) (in C) etabliert. Die Reaktivität der T-Zellen gegenüber diesen Epitopen und ihren Mutanten wurde durch Kokultivierung über Nacht mit HLA-übereinstimmenden B-Zellen und Peptiden in den angegebenen Konzentrationen getestet. Anschließend wurden Überstände geerntet und die IFN- $\gamma$ -Konzentrationen durch einen ELISA bestimmt.

Diese Ergebnisse untermauerten die Hypothese, dass die Patientin möglicherweise spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen diese drei betreffenden Epitope in ihrem Repertoire gehabt haben könnte. Eine Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der absoluten CD8<sup>+</sup>-T-Zellzahlen der Patientin ergab Hinweise auf einen zeitlichen Zusammenhang mit Mutationen dieser CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope (Abbildung 45). Unmittelbar vor dem Auftreten der Mutation T325K (TPSGTWLTY zu KPSGTWLIY) und der Mutation T4164I (CTDDNALAY zu CIDDNALAY) gab es einen transienten Anstieg der peripheren CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, der möglicherweise mit spezifischen T-Zellen gegen diese Epitope zusammenhing. Proben der Patientin, um dies zu überprüfen, sind allerdings nicht mehr verfügbar.

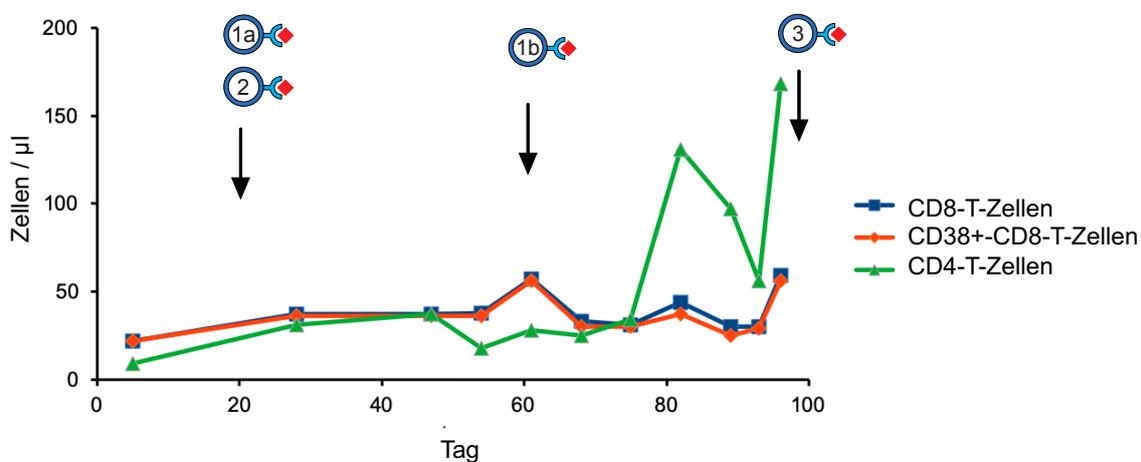


Abbildung 45: Zeitlicher Verlauf der absoluten Zahl von CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und Zeitpunkte des Auftretens von Mutationen in T-Zell-Epitopen. Die mit Zahlen bezeichneten Mutationen sind: 1a, T332I; 1b, T325K (beide betreffend TPSGTWLTY). 2, V4101F (betreffend ALWEIQQVV). 3, V4164I (betreffend CTDDNALAY(Y)). Peripheres Blut wurde dem Patienten zu den angegebenen Zeiten entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert (Daten analysiert im Max-von-Pettenkofer Institut München). Nach Tag 96 wurden keine Analysen durchgeführt. Abbildung verändert aus Khatamzas et al. (2022).

Um die Epitope noch näher zu charakterisieren, wurde im nächsten Schritt sowohl die HLA-Restriktion verifiziert als auch der Einfluss der Mutationen auf die Bindung von HLA/Peptid-Komplexen an T-Zellen getestet.

Um diese beiden Fragen zu beantworten, wurden die T-Zellkulturen mit HLA/Peptid-Tetrameren gefärbt und mittels eines Durchflusszytometers gemessen. Die vorhergesagten HLA-Restriktionen bestätigten sich: TPSGTWLT<sup>Y</sup> hatte eine HLA-B\*35:01-Restriktion und CTDDNALAY(Y) eine HLA-A\*01:01-Restriktion. Die Kulturen von Spender 1 wurden von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dominiert, die an das HLA-B\*35:01/TPSGTWLT<sup>Y</sup>-Tetramer zu 77 % banden (Abbildung 46). Die erste Mutation reduzierte den Anteil stark tetramerbindender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen auf 24 % und die Doppelmutation sogar auf 1,6 %.

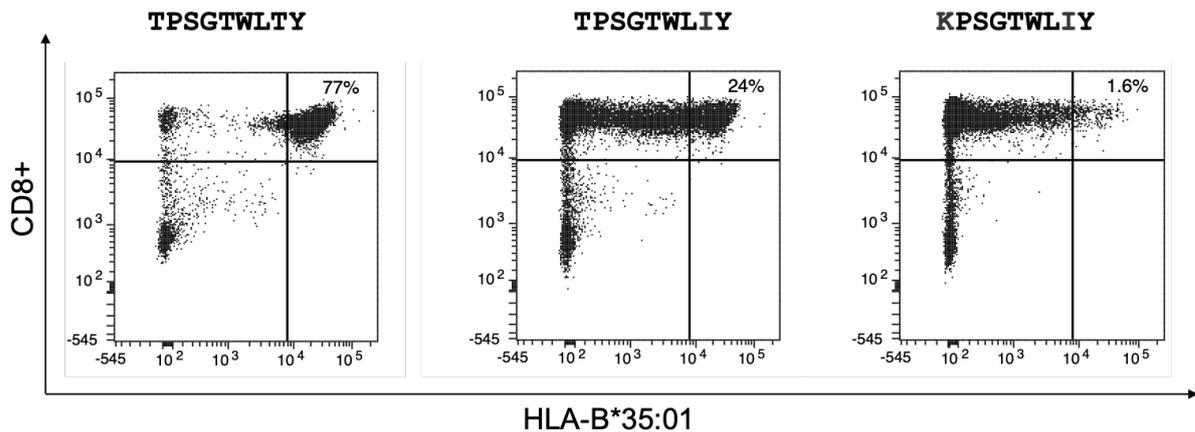


Abbildung 46: HLA/Peptid-Tetramer-Analyse der TPS-T-Zellkulturen. T-Zellkulturen von Spender 1 wurden mit PE-markierten HLA-B\*35:01-Tetrameren gefärbt, die mit dem Peptid TPSGTWLTLY oder seinen beiden Mutantenvarianten beladen waren. Der anti-CD8-Antikörper war mit Pacific Blue markiert. Abbildung verändert aus Khatamzas et al. (2022).

Ebenso enthielten die Kulturen von Spender 2 hohe Anteile an HLA-A\*01:01/CTDDNALAY(Y)-Tetramer-bindenden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (18-23 %) und die Mutantenpeptide erzeugten eine Verringerung des Anteils stark bindender T-Zellen von ursprünglichen 18 % auf nur noch 2,7 % (Abbildung 47).

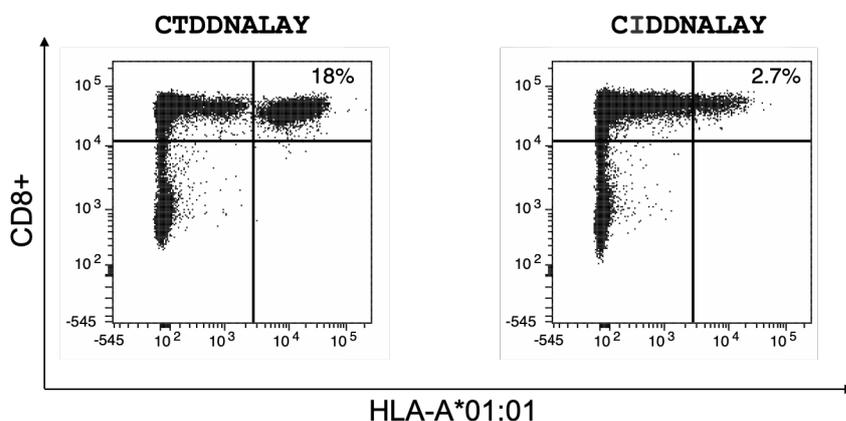


Abbildung 47: HLA/Peptid-Tetramer-Analyse der CTD-T-Zellkulturen. T-Zellkulturen von Spender 2 wurden mit PE-markierten HLA-A\*01:01-Tetrameren gefärbt, die mit dem Peptid CTDDNALAY oder seiner Mutantenvariante gekoppelt war. Die anti-CD8-Antikörper wurde mit Pacific Blue markiert. Abbildung verändert aus Khatamzas et al. (2022).

Es konnte auch eine kryokonservierte PBMC-Probe der Patientin im Spätstadium (Tag 145) mittels einer Tetramer-Färbung analysiert werden (Abbildung 48). Hierbei band eine große Fraktion (29,7 %) der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an das Wildtyp-HLA-B\*35:01-TPSGTWLTLY-

Multimer, während die Bindung mit dem Einzelmutantenpeptid auf 12,4 % reduziert wurde. Die Färbung mit der Doppelmutante zeigte nahezu keine Signale (0,5 %). Somit hatte die Patientin auch 84 Tage nach der zweiten Mutation noch eine hohe Anzahl von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aufrechterhalten, die für das ursprüngliche Epitop spezifisch waren. Letztlich waren zwei Mutationen erforderlich, um diese T-Zellen nahezu vollständig daran zu hindern, ihr Ziel-Epitop zu erkennen.

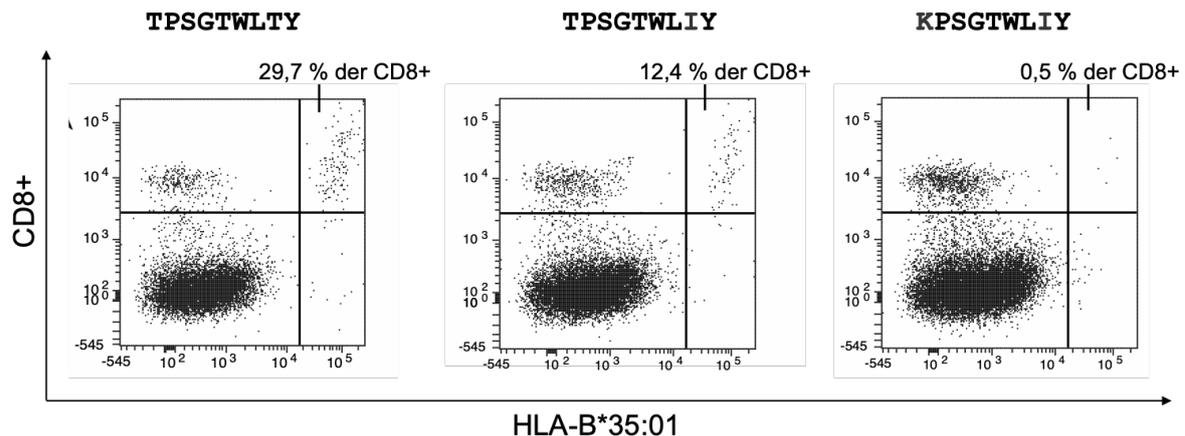


Abbildung 48: HLA/Peptid-Tetramer-Analyse von PBMCs der Patientin. Die PBMCs wurden mit PE-markierten HLA-B\*35:01-Tetrameren gefärbt, die mit dem Peptid TPSGTWLT Y oder seinen beiden mutierten Varianten beladen waren. Der anti-CD8-Antikörper war mit Pacific Blue markiert. Abbildung verändert aus Khatamzas et al. (2022).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen im Lauf der Zeit einen Selektionsdruck auf SARS-CoV-2 bei der immunsupprimierten chronisch infizierten Patientin ausgeübt hatten. Es war nur eine geringe Zahl von T-Zell-Epitopen, deren Mutation die Infektionskontrolle bei dieser Patientin möglicherweise stark beeinträchtigt hatte. Solche Patienten haben vermutlich ein eingeschränktes T-Zell-Repertoire und ihre T-Zellantwort gegen das Virus richtet sich vermutlich gegen eine kleinere Zahl von Epitopen als dies bei Immunkompetenten der Fall ist, deren T-Zellen im Durchschnitt rund 30 Epitope des Virus erkennen (Moss 2022; Tarke et al. 2021).

#### 4.4.2 Spezifische T-Zellantwort in einer Krebspatientenkohorte nach Impfung

Bei Personen mit Risikofaktoren, wie z.B. Krebspatienten, ist es besonders wichtig, zur Vermeidung schwerer Erkrankungen durch SARS-CoV-2 einen guten Schutz durch Impfung zu erreichen. Zu Beginn des folgenden Teilprojekts war jedoch nur wenig darüber bekannt, ob und wie gut dies bei Krebspatienten möglich ist. Es ergab sich die Möglichkeit einer Beteiligung an einer analytischen klinischen Studie zu Immunantworten nach Impfung von Patienten mit verschiedenen Krebserkrankungen in Kooperation mit der Universität Freiburg und dem Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU München. In dieser Studie wurde die SARS-CoV-2-spezifische humorale und zelluläre Immunantwort nach zwei bzw. drei Impfdosen von hauptsächlich BNT162b2 (mRNA-Impfung von BioNTech/Pfizer) bei 60 Patienten mit hämatologischen Malignomen und acht soliden Krebspatienten mit NSCLC unter Checkpoint-Inhibitor-Therapie (Pembrolizumab) untersucht. Die Patienten wurden zwischen Anfang 2021 bis Ende 2021 am Universitätsklinikum Freiburg, Deutschland, behandelt.

Zu dieser Studie gehörte die Analyse von Antikörper-Antworten, unter anderem der Virusneutralisationskapazität gegen wichtige besorgniserregende Varianten (VOC), einschließlich B.1.1.529 (Omikron, Sublinie BA.1) gemessen, die am Max-von-Pettenkofer-Institut durchgeführt wurde (Daten hier nicht gezeigt). Die Analyse der spezifischen zellulären Immunität nach der COVID-19-Impfung wurde mittels der Enzyme-Linked-Immunospot-Methode (ELISpot) im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt.

Zur Analyse der T-Zell-Antwort im ELISpot-Assay wurden PBMCs mit Pools von überlappenden Peptiden stimuliert, die SARS-CoV-2 Spike in der Delta-Variante und eine Reihe von Vergleichsantigenen umfassten. Diese Analysen wurden zunächst mit Proben durchgeführt, die bei 59 Patienten kurz vor der ersten Dosis (Zeitpunkt 1, Median 2 Tage zuvor) und 2–8 Wochen nach der zweiten Dosis (Zeitpunkt 2) abgenommen wurden. Die Delta-Variante wurde gewählt, da sie zu Beginn der Wintersaison 2021/22 dominierte. In Delta sind gegenüber der Urvariante Wuhan-Hu-1, die auch den Impfungen zugrunde liegt, von den 1293 Aminosäuren des Spike-Proteins sieben ausgetauscht und zwei deletiert. Diese kleinen Unterschiede ließen keinen größeren Einfluss auf die gesamte T-Zellantwort erwarten (Tarke et al. 2021).

Die in Freiburg kryokonservierten PBMCs der Kohortenpatienten konnten in aller Regel mit guten Ausbeuten vitaler Zellen aufgetaut werden, sodass bei den meisten Patienten eine Analyse der Antwort gegen verschiedene Antigene möglich war. Delta-Spike-spezifischen T-Zellen nahmen bei der Mehrzahl der Patienten nach der 2-Dosen-Impfung zu (Abbildung 49 A-C). Bei Zeitpunkt 2 hatten 83 % aller Krebspatienten einen Anstieg der Häufigkeit

von Delta-Spike-spezifischen T-Zellen gegenüber Zeitpunkt 1, und bei 73 % der Patienten betrug dieser Anstieg 10 oder mehr Spots pro Million T-Zellen. Bei 53 Patienten mit hämatologischen Malignomen stieg die mediane Reaktion von 5 auf 50 Spots pro Million Zellen ( $p=3 \times 10^{-10}$ , Abbildung 49 C). Drei von sechs Patienten mit NSCLC zeigten ebenfalls eine ausgeprägte Reaktion auf die Impfung, während die anderen drei nicht ansprachen (Abbildung 49 C). Die Reaktion war etwa gleichmäßig auf die S1- und S2-Einheiten des Spike-Antigens verteilt (Abbildung 49 A und B). Insgesamt zeigen diese Daten eine solide Entwicklung einer zellulären Immunantwort nach zwei mRNA-Impfungen bei den meisten der 53 Patienten mit hämatologischen Malignomen und bei der Hälfte der sechs verfügbaren Patienten mit NSCLC.

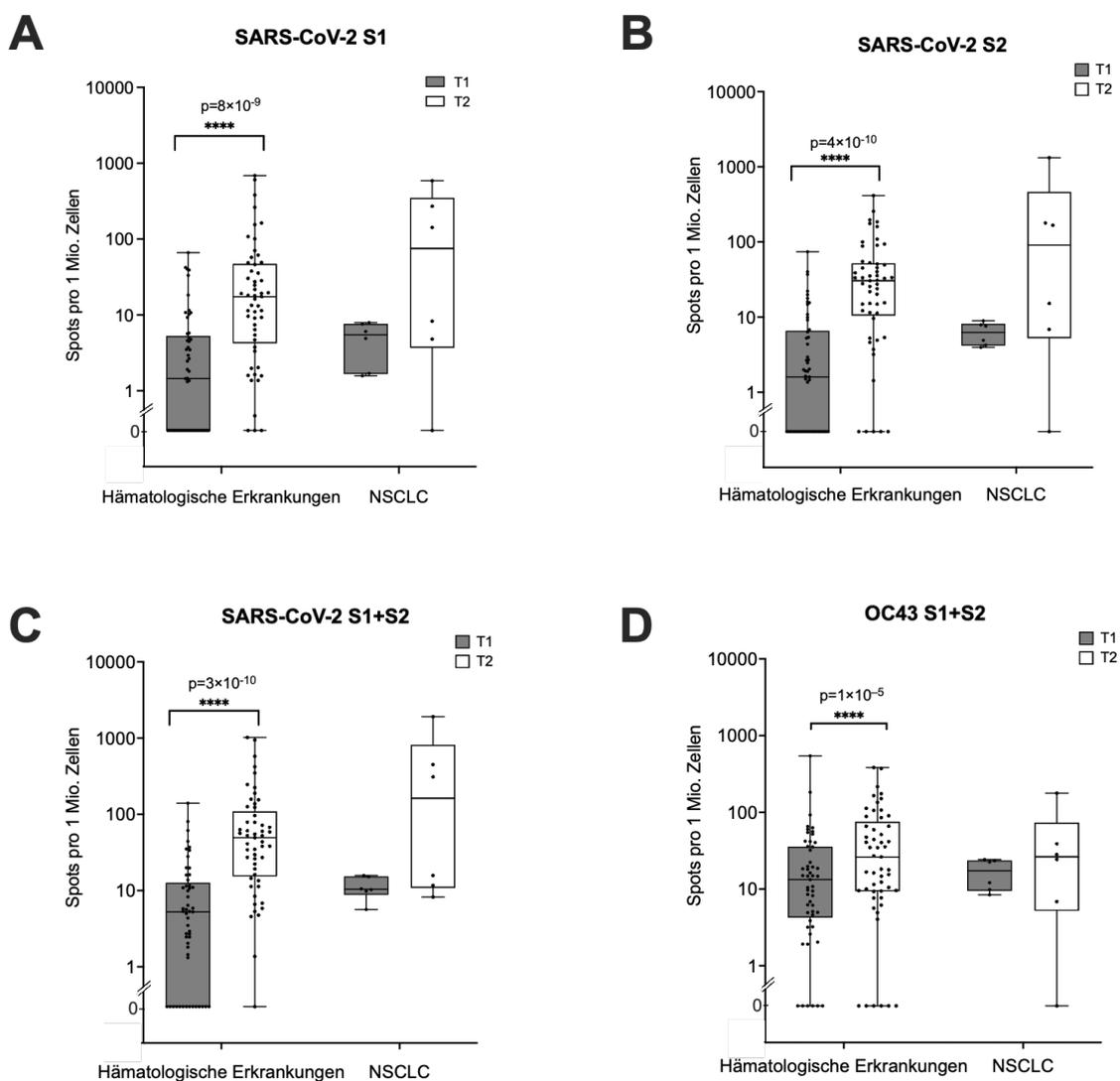


Abbildung 49: SARS-CoV-2- und OC43-spezifische T-Zell-Antworten bei 53 Patienten mit hämatologischen Malignomen vor (Zeitpunkt 1, T1) und nach einer COVID-19-mRNA-Impfung mit zwei Dosen (Zeitpunkt 2, T2). (A) T-Zell-Antworten auf SARS-CoV-2-Spike S1. (B) T-Zell-Antworten auf SARS-CoV-2-Spike S2. Summe der T-Zell-Antworten auf (C) SARS-CoV-2-Spike S1+S2 und (D) OC43 Spike S1+S2. Die T-Zell-Antworten wurden mittels eines IFN- $\gamma$  ELISpots analysiert. Es sind Boxplots mit Median, Grenzen zwischen oberen und unteren Quartilen und Whiskers zwischen dem 10. und 90. Perzentil angegeben. Die Unterschiede zwischen den

Zeitpunkten wurden unter Verwendung des Wilcoxon-Rangtests auf statistische Signifikanz analysiert. \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

Es ist unklar, in welchem Maß eine vorbestehende Immunantwort gegen die klassischen endemischen Coronaviren auch gegen Antigene aus SARS-CoV-2 reagiert und so den Impferfolg beeinflusst. Um diesem Aspekt nachzugehen, wurde auch die T-Zell-Antwort der Patienten auf das Spike-Antigen des endemischen Betacoronavirus OC43 untersucht (Abbildung 49 D). Bei Zeitpunkt 1 waren die OC43-Spike-spezifischen T-Zellen in erheblich höherer Zahl nachweisbar als die SARS-CoV-2-Spike-spezifischen T-Zellen, ein Hinweis auf ein vorbestehendes T-Zellgedächtnis gegen OC43. Die OC43-spezifischen T-Zellen waren nach der Impfung zum Zeitpunkt 2 bei Patienten mit hämatologischen Malignomen erhöht, dieser Anstieg war allerdings weniger ausgeprägt (2,0-fach höhere mediane Reaktion) als der durch den Impfstoff induzierte Anstieg der SARS-CoV-2-Spike-spezifischen T-Zellen (9,6-fach höhere mediane Reaktion). Daher schien eine T-Zell-Kreuzreaktivität zwischen diesen beiden Coronaviren zumindest auf Peptidebene zwar vorhanden zu sein, spielte jedoch bei der Effektivität der SARS-CoV-2-Impfung bei Krebspatienten eine untergeordnete Rolle (Abbildung 50).

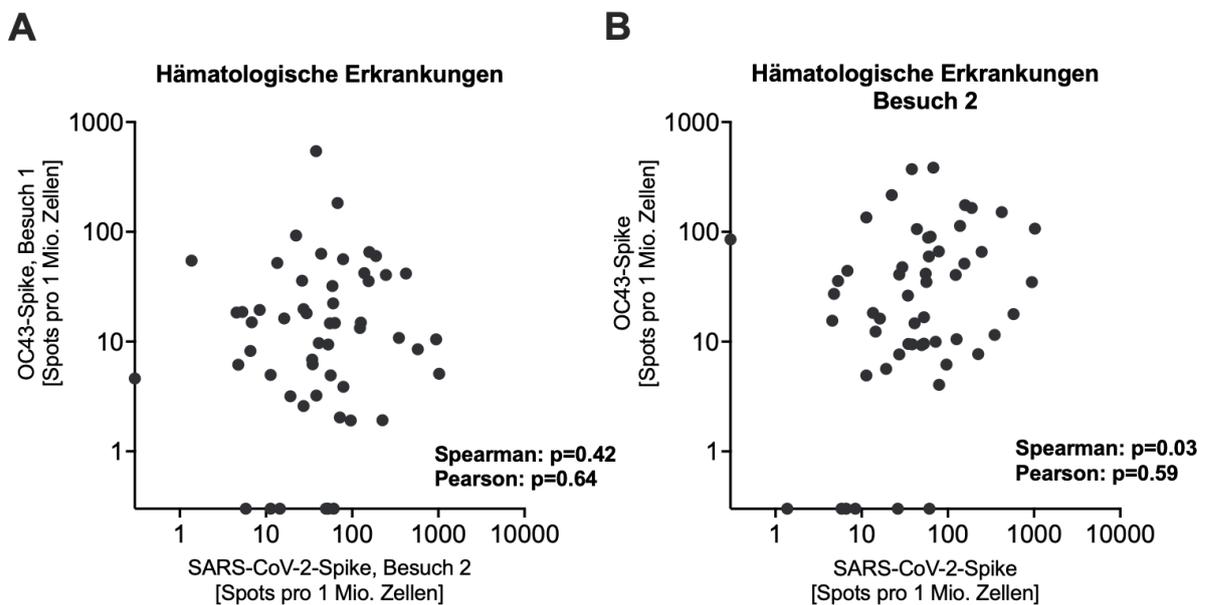


Abbildung 50: Korrelationsanalyse von T-Zellantworten bei hämatologischen Patienten zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der COVID-19-Impfung. Dot-Plots von T-Zell-Antworten, mittels IFN- $\gamma$  ELISpot analysiert wurden. Die Rangkorrelationsanalyse nach Spearman wurde durchgeführt, um die Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) zu berechnen und die statistische Signifikanz zu analysieren. (A) Korrelation von T-Zell-Antworten auf Peptidpools für Delta-Spike oder für humanes Coronavirus (hCoV) OC43 bei 53 Patienten

*mit hämatologischer Neoplasie 2–8 Wochen nach Impfung Nr. 2. (B) Korrelation der T-Zell-Antworten auf Peptidpools für Delta-Spike, 2–8 Wochen nach der Impfung Nr. 2, und für hCoV-OC43 vor der Impfung bei 53 Patienten mit unterschiedlichen hämatologischen Neoplasien.*

Bei 49 Patienten dieser Kohorte, die einer von fünf Untergruppen mit hämatologischen Malignomen zugeordnet werden konnten, wurde die T-Zell-Antwort nochmals separat analysiert. Ein Anstieg der medianen T-Zell-Antwort war in allen fünf Untergruppen offensichtlich und in vier der fünf Untergruppen (außer Lymphom unbehandelt) für SARS-CoV-2 S1, S2 und die Gesamtantwort statistisch signifikant (Abbildung 51 A, B und C). In zwei der fünf Untergruppen wurde ein Anstieg der OC43-Spike-spezifischen T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 51 D). Die schwächste Reaktion auf SARS-CoV-2-Spikes wurde bei unbehandelten Lymphompatienten beobachtet, aber selbst in dieser Gruppe zeigte sich ein Anstieg der gesamten Spike-spezifischen T-Zellen von einem Median von 0 Spots auf 16 Spots. In den anderen vier Patienten-Untergruppen wurde eine solide impfinduzierte T-Zell-Antwort beobachtet, was durch einen Anstieg von einem mittleren Ausgangswert von 3 - 11 Spots bei Zeitpunkt 1 zu mittleren Werten von 36 - 78 Spots bei Zeitpunkt 2 gemessen werden konnte (Abbildung 51 A, B und C). Es entwickelten auch alle 13 Patienten, die innerhalb des Jahres vor der ersten Impfdosis mit anti-CD20-Antikörpern behandelt worden waren ("LY Rx < 12"), nachweisbare T-Zellen gegen SARS-CoV-2-Spike (Median 53 Spots,  $p=0,0005$ , Abbildung 51). Diese Patienten bildeten nach Impfung wegen ihres starken B-Zellmangels überwiegend keine nachweisbare Antikörperantwort gegen Spike (Daten nicht gezeigt). Bemerkenswert ist auch, dass die SARS-CoV-2-Spike-spezifische T-Zell-Antwort nach der Impfung bei Patienten mit multiplem Myelom (MM), die aktuell medikamentös behandelt wurden (Median 62 Spots) und bei aktuell unbehandelten MM-Patienten (Median 78 Spots) ähnlich stark war.

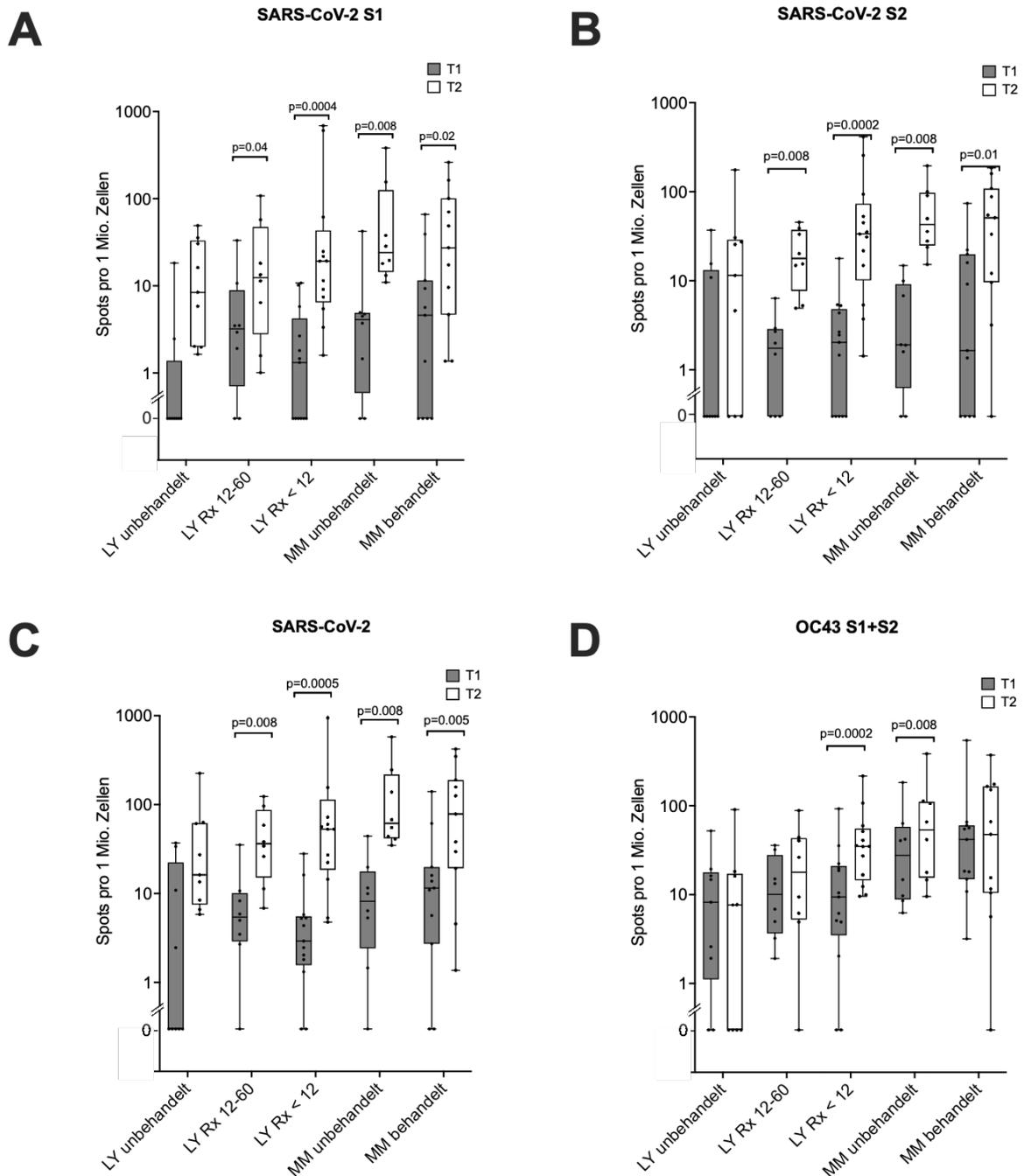


Abbildung 51: SARS-CoV-2- und OC43-spezifische T-Zell-Antworten bei Patienten mit hämatologischen Malignomen vor (T1) und nach (T2) einer COVID-19-mRNA-Impfung mit zwei Dosen. Die T-Zell-Antworten wurden mittels IFN- $\gamma$  ELISpot analysiert. Die Ergebnisse für infektionsnaive Patienten mit hämatologischen Malignomen sind aufgeteilt in fünf Untergruppen: Lymphom-(LY)-Patienten, die nie oder zuletzt vor mehr als fünf Jahren mit Rituximab (Rx) oder einem anderen anti-CD20-Antikörper behandelt (unbehandelt, n=9), LY-Patienten, die zuletzt 12–60 Monate vor der Impfung mit anti-CD20 behandelt wurden (Rx 12–60, n=8), LY-Patienten, die innerhalb der letzten 12 Monate vor der Impfung mit Rx behandelt wurden (LY <12, n=13), MM-Patienten, die zum Zeitpunkt der Impfung keine Therapie erhielten (unbehandelt, n=8) und MM-Patienten, die zum Zeitpunkt der Impfung eine Therapie erhalten (behandelt, n=10). Abkürzungen: LY: Lymphom; Rx: Rituximab; MM: Multiples Myelom.

Die Patienten hatten überwiegend ihre zwei Impfdosen zwischen April und Juli 2021 erhalten. Die Mehrzahl der Patienten der Kohorte erhielt im Spätherbst/Winter 2021 eine dritte Impfdosis (Booster). Von einer der Untergruppen der Kohorte, nämlich von acht Lymphompatienten der Gruppe "LY Rx 12-60", standen Proben von späteren Zeitpunkten nämlich vor und nach der dritten Impfdosis für die ELISpot-Analyse zur Verfügung. Von diesen Patienten wurden nochmals Proben von Zeitpunkt 2, von Zeitpunkt 3 (etwa 5 Monate nach Impfdosis 2) und von Zeitpunkt 4 (2-8 Wochen nach Impfdosis 3) analysiert (Abbildung 52). Für diese Analyse wurden T-Zellen gegen Spike-Peptid-Pools aus den Varianten Delta und Omikron (BA.1) getestet, da Omikron zu der Zeit begonnen hatte, Delta als vorherrschende zirkulierende Variante abzulösen. Die Stimulation mit den Delta-Peptid-Pools (S1+S2) löste bei Zeitpunkt 2 und 4 eine geringfügig stärkere T-Zell-Antwort aus als die Omikron-Peptid-Pools (S1+S2), obwohl diese Unterschiede statistisch nicht signifikant waren (Abbildung 51). Bei der mittleren Reaktion gegen Delta und Omikron wurde jeweils ein Anstieg durch die dritte Impfdosis beobachtet (von Zeitpunkt 3 zu Zeitpunkt 4), dies war aber in beiden Fällen nicht statistisch signifikant, möglicherweise aufgrund der geringen Probandenzahl.

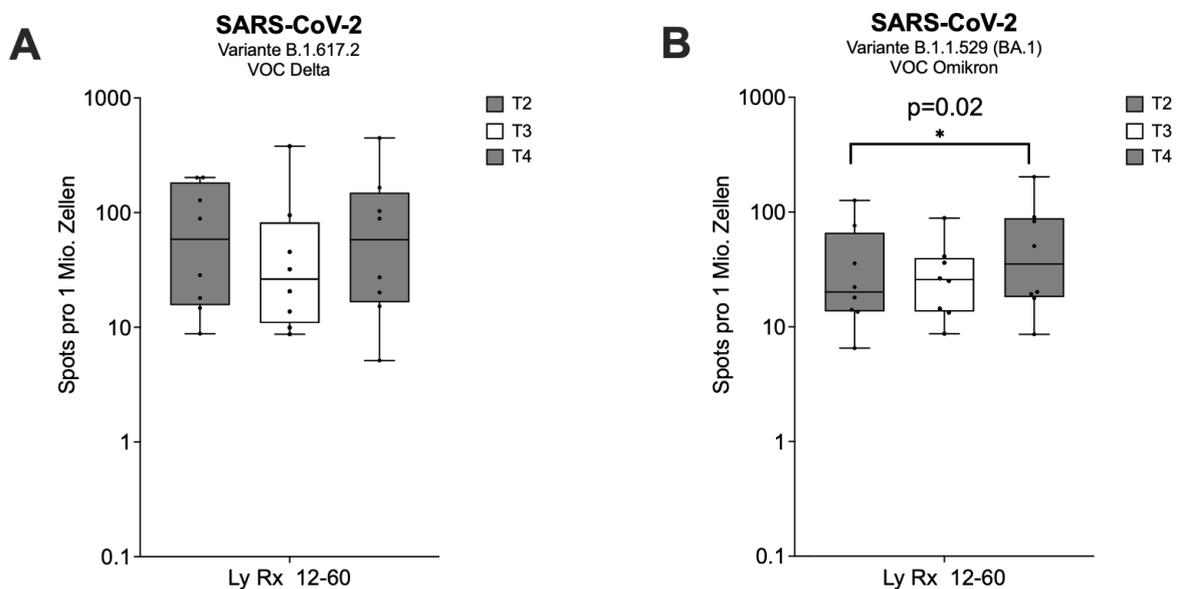


Abbildung 52: T-Zell-Antworten auf die VOCs Delta und Omikron bei Patienten mit Lymphomen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der zweiten und dritten COVID-19-mRNA-Impfung. Analyse der T-Zell-Antworten auf Spike-Peptide von Delta (A) oder Omikron (B). Die T-Zell-Antworten, die mittels IFN- $\gamma$  ELISpot analysiert wurden, werden als Boxplots mit Median, Grenzen zwischen oberen und unteren Quartilen und Whiskers zwischen dem 10. und 90. Perzentil gezeigt. Die Analyse auf statistische Signifikanz wurde unter Verwendung des Friedman-Tests mit Dunns multipler Testkorrektur durchgeführt. \* $p \leq 0,05$ .

## 5 Diskussion

### 5.1 Immundominanz einzelner Epitope in Herpesviren

HHV-6 verursacht eine Reihe unterschiedlicher Erkrankungen. Die Primärinfektion im frühen Kindesalter, die auch als Roseola infantum oder Drei-Tage-Fieber bezeichnet wird, ist häufig symptomatisch und bisweilen mit Komplikationen verbunden (Zerr et al. 2005; Yamanishi et al. 1988). Nach dem Erstkontakt etabliert sich eine latente Infektion, die von immunkompetenten Menschen in der Regel lebenslang gut beherrscht wird. Bei Immunsupprimierten dagegen, etwa AIDS-Patienten oder Empfängern einer Transplantation, kann HHV-6 reaktivieren und teils schwere Erkrankungen verschiedener Organe hervorrufen (Clark and Griffiths 2003; Boutolleau et al. 2003). Auch andere Herpesviren wie EBV und CMV können in immunsupprimierten Patienten reaktiviert werden und schwere Erkrankungen auslösen. Diese Erkrankungen können zwar oft mit antiviralen Medikamenten therapiert werden, jedoch ist eine derartige Behandlung oft mit schweren Nebenwirkungen in den Patienten verbunden (Heslop 2009; Servais et al. 2016). Eine noch nachhaltigere Lösung für Patienten wäre ein adoptiver Transfer virusspezifischer T-Zellen (Bollard et al. 2004). Zur Verwirklichung dieser Therapieform wurden für Viren wie EBV und CMV im Lauf der Zeit verschiedene Methoden entwickelt, optimiert und klinisch eingesetzt, oft mit vielversprechenden Ergebnissen (Moss and Rickinson 2005; Peggs 2009). Jedoch wurde für HHV-6 eine adoptive T-Zelltherapie bisher nur im Einzelfall verwirklicht (Gerdemann et al. 2013; Tzannou et al. 2017). Um eine solche Therapie für Patienten mit HHV-6-Reaktivierung in größerem Umfang zu ermöglichen, bedarf es einer genaueren Erforschung der Komponenten der virusspezifischen T-Zellantwort und ihrer jeweiligen Funktion. Daher war es ein Ziel dieser Arbeit, das Wissen über HHV-6-spezifische T-Zellen zu erweitern, indem T-Zellen gegen bisher nicht untersuchte Antigene und Epitope identifiziert und charakterisiert wurden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde auf Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe zurückgegriffen. So konnten in Martin et al. (2012) zum ersten Mal HHV-6-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen isoliert und charakterisiert werden und es wurde gezeigt, dass diese HHV-6B-infizierte Zellen von diesen T-Zellen erkannt und angegriffen wurden. Es wurde auch eine Methode zum Testen dieser Funktion entwickelt, bei der autologe oder HLA-passende primäre CD4<sup>+</sup>-T-Zellen kurzzeitig aktiviert und dann mit Virus infiziert werden, entsprechend dem natürlichen Tropismus von HHV-6B für T-Zellen. Eine virusspezifische T-Zellerkennung konnte in dieser frühen Arbeit für drei Epitope aus zwei Antigenen gezeigt werden, den Strukturproteinen U54 und U11. Wenig später publizierten Gerdemann et al. (2013) ihre

Analyse der T-Zellantwort gegen fünf Proteine von HHV-6B (U90, U11, U14, U54 und U71) auf potentielle Epitope. Sie fanden insgesamt drei spezifische CD8<sup>+</sup>-Epitope in HHV-6, die sich in dem IE-Transaktivatorprotein U90 und in dem Tegument-Phosphoprotein U14 befanden. Ob CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit diesen Epitopspezifitäten auch HHV-6B-infizierte Zellen erkennen, wurde von Gerdemann et al. (2013) aber nicht genauer untersucht. Eine weitere Arbeit konzentrierte sich auf die Suche nach weiteren CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitopen im Transaktivatorprotein U90 (Iampietro et al. 2014). Mit Hilfe von xenogenen, antigenpräsentierenden Zellen wurden polyklonale T-Zelllinien etabliert, die vier Peptidepitope aus U90 erkannten und auch zytotoxisch gegen mit HHV-6B behandelte autologe PBMCs reagierten. Es bleibt allerdings etwas unklar, inwieweit dieser Testaufbau die Funktion HHV-6B-spezifischer T-Zellen hinreichend sicher nachweisen kann.

In diesen drei beschriebenen Arbeiten (Martin et al. (2018), Gerdemann et al. (2013) und Iampietro et al. (2014)) wurde von einer begrenzten Zahl von 1-5 ausgewählten HHV-6B-Proteinen oder von vorhergesagten Peptidepitopen ausgegangen. Daher konnte nur ein kleiner Teil des möglichen spezifischen T-Zellrepertoires erfasst werden, denn HHV-6B kodiert insgesamt für etwa 98 virale Proteine mit zusammen etwa 45 400 Aminosäuren. Für die genannten Arbeiten wurden solche HHV-6B-Proteine ausgewählt, deren CMV-Homologe als starke T-Zellantigene bekannt waren. CMV war dasjenige  $\beta$ -Herpesvirus, das hinsichtlich der T-Zellantwort mit großem Abstand am besten untersucht war und die Hierarchie der Immundominanz zwischen allen bekannten CMV-Antigenen war bereits charakterisiert worden (Sylwester et al. 2005). HHV-6B und CMV sind nicht ausreichend konserviert, um davon auszugehen, dass viele Epitopsequenzen konserviert sein könnten, sondern die Basis der Überlegung war die Vermutung, dass Antigene mit äquivalenter Funktion sich auch immunbiologisch ähnlich verhalten könnten. Solange keine anderen geeigneten Entscheidungskriterien zur Verfügung standen, war diese Überlegung sicherlich plausibel. Ob die Immunbiologie von HHV-6 und CMV tatsächlich so ähnlichen Regeln folgt, konnte mit einem solchen Ansatz allerdings nicht bewiesen werden.

Im nächsten Schritt wurde daher ein Ansatz gewählt, der im Sinne einer Querschnittsanalyse nicht nur eine kleine Minderheit, sondern die Mehrzahl der HHV-6B-Proteine umfasste. Dieser Ansatz basierte auf der Auswahl eines HLA-Moleküls und der möglichst vollständigen Vorhersage von Epitopen zu diesem HLA quer durch das virale Proteom. Zur Vorhersage von HLA-Klasse-I-präsentierten Epitopen gibt es verschiedene Algorithmen, die online genutzt werden können (Lundegaard et al. 2008) und zum Teil auf "machine learning" und umfangreichen Datensätzen von weltweit publizierten T-Zellepitopen und HLA-Liganden basieren (Vita et al. 2019). Trotz dieser Komplexität beruht

die Qualität der Vorhersage wohl hauptsächlich auf dem Vorhandensein von konservierten Ankerresten, die für die Bindung des Peptids an HLA-Klasse-I wesentlich sind (Jackson et al. 2022). Eine einfachere Methode, die ohne Bioinformatik möglich ist, zieht nur die für das jeweilige HLA bekannten konservierten Ankerreste zur Epitopvorhersage heran. Diese Methode (Martin et al. 2018), genannt SAMBA (simple anchor motif based algorithm), berücksichtigt dabei stark die Ankermotive von gut untersuchten und in der Literatur mehrfach bestätigten T-Zellepitopen. Sind für ein HLA-Allotyp nicht genügend Informationen dazu vorhanden, können ersatzweise auch konservierte Aminosäuremotive von HLA-eluierten Selbst-Peptidliganden verwendet werden, zu denen mittlerweile große, verifizierte Datensätze vorliegen (Sarkizova et al. 2020). Mit dieser Methode konnte auch Stefanie Ameres in Ameres et al. (2014) bereits einige neue Epitope für CMV erfolgreich finden. Diese Methode wurde nun auf eine Querschnittsanalyse von CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitopen quer durch das Proteom von HHV-6B angewandt. HLA-B\*08:01 wurde als exemplarisches HLA-Molekül ausgewählt, weil hier ein Ankermotiv von drei Aminosäuren herangezogen werden konnte, welches durch viele gut untersuchte T-Zellepitope erhärtet worden war (Martin et al. 2018). Als Ergebnis konnten 16 neue CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope identifiziert werden, die von HHV-6B-infizierten Zellen präsentiert wurden. Diese Epitope stammten aus 12 verschiedenen Antigenen verschiedener Funktion, darunter Struktur- und Nichtstrukturproteine, frühe und späte Genprodukte des Virus und sogar solche, deren Existenz als Protein zuvor nur hypothetisch war. In diesen Analysen wurden für das Antigen IE-2 (U86) zwei Epitope gefunden, und die Häufigkeiten von spezifischen T-Zellen gegen diese Epitope lagen auf Platz 1 und 2 unter den 16 insgesamt gefundenen Epitopen. T-Zellen gegen das "dominanteste" Epitop (DFKSKYLTL) waren in ex vivo Experimenten in einer so hohen Häufigkeit nachweisbar, wie es sonst für dominante Antigene bei CMV oder EBV der Fall ist (Tan et al. 1999; Schlott et al. 2018). Vermutlich sind HHV-6-spezifische T-Zellen bei gesunden Virusträgern im Mittel seltener als CMV-spezifische T-Zellen (Fastenackels et al. 2019). Wie das hier dargestellte Beispiel zeigt, dürfte die gesamte Häufigkeit HHV-6-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aber auch stark vom HLA-Typ und somit von der Erkennung einzelner besonders dominanter Epitope abhängen.

Wegen der besonderen Prominenz dieses Epitops wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit die Virusreaktivität von T-Zellen (klonal und polyklonal) mit dieser Epitopspezifität genauer überprüft und es zeigte sich, dass DFK-spezifische T-Zellklone sehr gut in der Lage waren Zellen, die mit HHV-6B infiziert wurden, zu erkennen. Die Stärke der Erkennung ist vergleichbar zu mit Peptid beladenen B-Blasten. Allerdings konnten weder mit HHV-6A noch mit HHV-7 infizierte Zellen durch die DFK-Klone erkannt werden. Dies ist allerdings aufgrund der sehr schlechten Konservierung der Sequenz von DFK in den beiden anderen

Viren nicht sehr verwunderlich. So gibt es zu HHV-6A (EFKSKFSTL) und zu HHV-7 (DFLSKYTAL) jeweils einen Austausch von drei Aminosäuren, sodass sich in beiden Fällen die Motive stark verändern und eine Erkennung durch die DFK-spezifischen Klone nicht mehr möglich ist. Diese sehr starke Variation der Aminosäuresequenz in diesem Bereich könnte im Zusammenhang mit der starken Immundominanz dieses Epitops in der HHV-6B-Variante stehen, sodass auf diesen Bereich ein besonders hoher Selektionsdruck lag. Auch bei CMV kann man diesen Zusammenhang beobachten, dass besonders im IE-1-Protein Polymorphismen in T-Zellepitopen vorkommen, die die spätere T-Zellerkennung beeinträchtigen können. Möglicherweise enthalten besonders polymorphe Bereiche mit einer höheren Wahrscheinlichkeit T-Zellepitope. Bei RNA- und Retroviren wurde immer wieder beobachtet, dass solche schnell mutierenden Viren durch Mutation in Epitopen einer T-Zellantwort ausweichen können, etwa bei HIV oder HCV (Shoukry and Walker 2021; Balasubramaniam et al. 2022). Bei SARS-CoV-2 konnten wir bei einer immunkompromittierten Patientin mit chronischer Infektion den Zusammenhang zwischen Virusmutation und Immunevasion genauer untersuchen, diese Experimente werden weiter unten in Abschnitt 5.3 diskutiert.

Diese Beschreibung eines immundominanten Epitops in einem Immediate-Early-Antigen von HHV-6B, U86 (IE-2), fügt sich recht gut in ein Muster ein, das bei Herpesviren allgemein beobachtet wird. Bei CMV gehören IE-1 und IE-2 zu den vier "stärksten" Antigenen unter den über 200 viralen Proteinen (Sylwester et al. 2005). Auch bei EBV liegen die beiden IE-Proteine (BZLF1 und BRLF1) auf den vordersten Plätzen in Bezug auf die Stärke der CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort in gesunden Virusträgern (Taylor et al. 2015). Es stellt sich die Frage, wie es zu dieser Immundominanz von IE-Antigenen kommt. Eine einfache Erklärung dafür wäre eine kinetische: Je früher das virale Protein in der infizierten Zelle exprimiert wird und seine Epitope präsentiert werden, desto mehr könnten sich T-Zellen gegen diese Epitope gegenüber anderen T-Zellen im Wettbewerb durchsetzen (Kastenmuller et al. 2007). Abhängig vom Virus könnten die IE-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen somit auch eine besonders gute protektive Wirkung gegen virale Erkrankung besitzen. Für die murine CMV-Infektion wurde dies für IE-1-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bereits gezeigt (Reddehase et al. 1987). Für die humane CMV-Infektion deuten klinische Daten in die gleiche Richtung: IE-1-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen korrelieren stark mit einem Schutz vor schwerer Erkrankung bei Patienten mit Herz/Lungen-Transplantation, CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen das (ebenfalls immundominante) Strukturprotein pp65 jedoch nicht (Bunde et al. 2005). Ein ähnlicher Trend zeigte sich für Patienten nach allogener Stammzelltransplantation (Sacre et al. 2008). Es wäre wichtig, in zukünftigen Ansätzen für adoptive Immuntherapie und Vakzinierung gegen Herpesvirus-Erkrankungen den Fokus auf Antigene zu legen, die eine protektive Antwort hervorrufen.

## 5.2 HHV-6-spezifische Epitope in den Antigenen U38 und U41

Ein Hauptbestandteil dieser Arbeit lag im Studium der T-Zellantwort gegen die HHV-6-Antigene U38 und U41 und in der Identifizierung neuer T-Zell-Epitope in diesen Antigenen. Diese beiden Antigene wurden aufgrund der ersten Analysen von Larissa Martin für diese Arbeit gewählt, da beide relevante CD8<sup>+</sup>-T-Zellantigene sind, wie in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Martin et al. 2018) gezeigt. In diesen Vorarbeiten waren zwei CD8<sup>+</sup>-Epitope in U38 und drei in U41 identifiziert worden. Es wurde dort auch gezeigt, dass spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Klone gegen diese Epitope ebenso in der Lage waren mit HHV-6 infizierte T-Zellen zu erkennen und zu lysieren. Begrenzte Hinweise auf eine Immunogenität der beiden Antigene lagen auch in anderer Literatur schon vor: Nastke et al. (2012) hatten mittels algorithmischer Vorhersagen von HLA-Klasse-II-bindenden Peptiden im Virusproteom bereits einen Epitopkandidaten in U38 identifiziert, der in ELISpot- oder HLA/Peptid-Multimeranalysen positive Signale ergab. Becerra-Artiles et al. (2015) hatten einen anderen Ansatz gewählt, um die Komplexität des viralen Proteoms zu handhaben: Sie nutzten die Reaktivität von T-Zellen gegen fraktioniertes Viruslysate zur Vorauswahl von potenziellen Antigenen. Aus diesem Screening ergaben sich zehn HHV-6B-Antigene als Kandidaten, darunter U41, jedoch konnten die Autoren letztlich in diesem Antigen keine T-Zellepitope nachweisen. Somit war das Spektrum von T-Zell-Epitopen in diesen beiden Antigenen zu Beginn der vorliegenden Arbeiten noch weitgehend unerforscht.

Zwar gehören die beiden Proteine nicht zu den besonders abundanten Proteinen in HHV-6B-infizierten Zellen und haben auch keine bekannte Funktion als Komponenten von Viruspartikeln (Becerra-Artiles et al. 2015; Nastke et al. 2012) jedoch sind sie essentiell für die virale DNA-Replikation (U38: DNA-Polymerase, U41: DNA-Bindeprotein).

In Martin et al. (2018) wurden Epitope mittels eines simplen Ankermotiv-basierten Ansatzes (SAMBA) vorhergesagt und zwar nur für eine einzige HLA-Restriktion (HLA-B\*08:01) quer durch das Virus, was durch das sehr klar strukturierte Bindemotiv von HLA-B\*08:01 erleichtert wurde. In der hier vorliegenden Arbeit sollte die T-Zellantwort gegen die beiden Antigene U38 und U41 nun ohne Epitopvorhersage oder sonstige anfängliche Einschränkung von Grund auf analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden für beide Antigene vollständige, überlappende 15-mer-Peptidbibliotheken verwendet. Solche Peptidbibliotheken eignen sich für die Identifikation von CD8<sup>+</sup>-Epitopen und CD4<sup>+</sup>-Epitopen (Kern et al. 1999; Kern, Faulhaber, Frömmel, et al. 2000), da die kürzeren Peptide, die für die Beladung von HLA-Klasse-I benötigt werden, durch extrazelluläre Prozessierung der 15-meren durch Proteasen im Serum oder auf der Zelloberfläche unter

Zellkulturbedingungen gebildet werden (Kern, Faulhaber, Frommel, et al. 2000; Kozlowski et al. 1993). Die Peptide werden verwendet, um antigenpräsentierende Zellen zu beladen, beispielsweise PBMCs oder aktivierte B-Zellen und so T-Zellen zu stimulieren. Die Methode ist flexibel, da die Peptide als Pools bis zu rund 150 Peptiden, als Subpools oder Einzelpeptide verwendet werden. Die Peptide können sowohl zur Vermehrung und Anreicherung spezifischer T-Zellen benützt werden als auch zu Testung von deren funktioneller Spezifität. Dabei können die Funktionen Proliferation, Zytokinsekretion, Zytotoxizität oder Aktivierungsmarker-Hochregulation als Testparameter dienen (Kern, Faulhaber, Frommel, et al. 2000; Ameres et al. 2015; Wiesner et al. 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde als funktioneller Testparameter vorwiegend IFN- $\gamma$ -Sekretion verwendet, da dadurch virusspezifische CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in aller Regel sensitiv und umfassend nachgewiesen werden können und auch noch spezifische Zytotoxizität gezeigt werden kann.

In Vorexperimenten wurde die ex vivo Häufigkeit von T-Zellen gegen U38 und U41 mittels ELISpot-Testung von PBMCs mit kompletten Subpools in Matrixanordnung getestet (Abbildung 12 und 35). Die Hoffnung, so schon zu vorläufigen Informationen zu potenziellen immunogenen Regionen in diesen Antigenen zu kommen, erfüllte sich nicht, denn die U38- und U41-spezifischen T-Zellen waren zu selten, um in diesen Tests klare Resultate zu ergeben. Dies war aber nicht überraschend, sondern stand im Einklang mit typischen Ergebnissen zur Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen anderer Arbeitsgruppen (Nastke et al. 2012; Becerra-Artiles et al. 2015; Hanson et al. 2019). Daher mussten spezifische T-Zellen vor weiterführenden Analysen gezielt angereichert werden. Dafür wurden PBMCs gesunder, HHV-6-seropositiver Spender über mehrere Wochen mit Peptiden, die das gesamte Proteom von U38 oder U41 abdecken, stimuliert, ab der zweiten Stimulation mittels autologer, peptidbeladener CD40-aktiverter B-Zellen (Wiesner et al. 2008; Zentz et al. 2007). Zwischenzeitliche Tests der so entstehenden T-Zellkulturen gaben Auskunft über eine eventuelle Vermehrung von antigenspezifischen T-Zellen gegen bestimmte Subpools. Bei Nachweis einer deutlichen Anreicherung von antigenspezifischen T-Zellen wurde dann eine Einzelzellklonierung der Kulturen unternommen, da T-Zellklone die genaueste Untersuchung der spezifischen Funktion von T-Zellen gestatten. Insbesondere ihrer Fähigkeit, auch infizierte Zellen in vitro zu erkennen (Martin et al. 2018).

In der vorliegenden Arbeit kann die erfolgreiche Absolvierung dieser Methodik für einen gesunden HHV-6-positiven Spender gezeigt werden. Analoge Versuche, bei vier weiteren HHV-6-positiven Spendern U38- und U41-spezifische T-Zellen zu vermehren, waren nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Die Gründe dafür sind unklar. Möglicherweise war bei

diesen anderen Spendern die Häufigkeit von U38- und U41-spezifischen T-Zellen noch geringer, sodass eine Vermehrung mit dem verwendeten Protokoll nicht möglich war. Für diese Vermutung würde auch sprechen, dass ein aktuelles Screening von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gegen einen vollständigen Satz von HHV-6B-Proteinen mit 18 gesunden Spendern nur in einem dieser Spender eine Antwort gegen U38 fand, und nur in zwei der Spender eine Antwort gegen U41 (Hanson et al. 2019). Das Sensitivitätslimit der dort verwendeten Methode (Proliferationstests mit 3H-Thymidin-Einbau) kann allerdings nicht quantitativ mit den hier präsentierten verglichen werden. Gleichwohl scheint es möglich, dass auch bei den hier nicht erfolgreich untersuchten Spendern U38- und U41-spezifische T-Zellen vorhanden sein könnten, mindestens CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, wenn auch in geringer Häufigkeit. Dafür spricht unter anderem die hohe Diversität der hier bei einem einzigen gesunden Spender bereits identifizierbaren Epitope und HLA-Klasse-II-Restriktionen in diesen Antigenen. Auf diese wird im Folgenden nochmals kurz eingegangen.

Insgesamt konnten elf U38-spezifische und zehn U41-spezifische Klone oder biklonale/bireaktive Mikrokulturen etabliert werden, die, wie von oligo/monoklonalen Kulturen zu erwarten (Ameres et al. 2013; Martin et al. 2018), ein klares Reaktionsmuster und hohes Signal- zu Hintergrundverhältnis aufwiesen. Durch Analyse dieser Klone wurden für beide Antigene mehrere Epitope identifiziert. Bei U38 waren dies zwei CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope und vier CD4<sup>+</sup>-T-Zellepitope, bei U41 waren es acht CD4<sup>+</sup>-T-Zellepitope, jedoch kein CD8<sup>+</sup>-Epitop. Bei U38 ergaben sich erste Hinweise auf eine mögliche Immundominanz eines HLA-A\*03:01-restringierten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitops, da diese Spezifität in sechs der mono/biklonalen Kulturen enthalten war, alle anderen Spezifitäten jedoch in jeweils nur einer Kultur. Bei U41 war eine der CD4<sup>+</sup>-Spezifitäten in drei Klonen vertreten, die anderen sieben Spezifitäten nur je einmal.

Ebenso wie in früheren Analysen unserer Arbeitsgruppe zum Antigen IE-1 aus dem humanen Cytomegalievirus (Ameres 2015) wurde bei den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen ein breites Spektrum von HLA-Restriktionen gefunden, welches alle drei HLA-Subklassen umfasste (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR). Daraus lässt sich folgern, dass Analysen virusspezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und ihrer Epitope, die sich auf HLA-DR beschränken, nur einen Teil des tatsächlichen Repertoires erfassen. Diese Einschränkung muss bei der Einschätzung der meisten bisherigen Studien zum Repertoire HHV-6-spezifischer CD4<sup>+</sup>-T-Zellen berücksichtigt werden (Nastke et al. 2012; Becerra-Artiles et al. 2015; Becerra-Artiles et al. 2019). Sie ist auch relevant für Studien zu CD4<sup>+</sup>-T-Zellantworten gegen andere Viren, die sich auch oft auf HLA-DR beschränken (Weiskopf et al. 2015).

Die Tatsache, dass die meisten Spezifitäten sowohl bei U38 als auch U41 nur einmal gefunden wurden, lässt vermuten, dass die hier gezeigten Analysen das T-Zellrepertoire gegen diese Antigene nur unvollständig erfasst haben und es noch erheblich mehr T-Zellepitope, insbesondere CD4<sup>+</sup>-T-Zellepitope in diesen Antigenen geben könnte. Es ist schwierig, allgemeine Aussagen über die zu erwartende Vielfalt von Epitopen zu machen. Die Untersuchung des CMV IE-1-spezifischen CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Repertoires unserer Arbeitsgruppe, die ähnliche Methoden verwendete wie die hier gezeigte Analyse (jede Spezifität wurde mit T-Zellklonen bestätigt), identifizierte bei sieben CMV-positiven gesunden Spendern insgesamt mindestens 27 unabhängige T-Zellepitope (Ameres et al. 2015). Auch für die CD4<sup>+</sup>-T-Zellantwort gegen CMV IE-1 gilt, dass die T-Zellen eine niedrige Häufigkeit haben und daher nur schwer ex vivo nachzuweisen sind. Insgesamt wurden bis dato in der Datenbank IEBD (Vita et al. 2019) 72 CD4<sup>+</sup>-Epitope aus CMV IE-1 belegt (Abfrage im Oktober 2022), aber hier ist zu berücksichtigen, dass die Daten aus sehr unterschiedlichen Quellen zusammenkommen und die gleichen Epitope möglicherweise als unterschiedliche Peptide angeführt werden (mit nicht von T-Zellen erkannten unterschiedlichen N- oder C-terminalen Verlängerungen). Bei EBV, als weiteres Beispiel eines viel untersuchten Herpesvirus, ist EBNA1 das Antigen mit der bisher höchsten Epitopdiversität: Nach jetzigem Stand 63 Epitope in IEDB und 31 Epitope in einem jüngeren Übersichtsartikel (Taylor 2015). Die beiden Proteine U38 und U41 sind mit 1012 bzw. 1132 Aminosäuren jeweils mehr als doppelt so lang wie CMV IE-1 (491 Aminosäuren) und EBV EBNA1 (ca. 420 Aminosäuren abzüglich repetitiver Sequenzen), eine entsprechend höhere Zahl von Epitopen könnte also vermutet werden.

Die humanen Roseoloviren (HHV-6A, -6B und -7) und in besonderem Maß HHV-6A und 6B, sind hinreichend konserviert, dass die Möglichkeit identischer oder gut konservierter T-Zellepitope zwischen diesen Viren besteht. Zum Beispiel waren von den in Martin et al. (2018) beschriebenen 16 Epitopen, die durch Erkennung von infizierten Zellen bestätigt wurden, zehn zwischen HHV-6A und 6B vollständig konserviert. Soweit dort getestet, erkannten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gegen konservierte Epitope sowohl HHV-6A als auch 6B-infizierte Zellen. Die Konservierung auf Aminosäure-Ebene der hier untersuchten Antigene ist bei U38: Zwischen HHV-6B und HHV-6A 97,9 %; zwischen HHV-6B und HHV-7: 66,6 %. Bei U41: Zwischen HHV-6B und 6A 98,8 %; zwischen HHV-6B und HHV-7 68,5 %. Eine Konservierung der meisten T-Zellepitope in diesen Antigenen zwischen HHV-6A und 6B wäre daher zu erwarten, ebenso die Konservierung einiger Epitope zwischen HHV-6A/B und HHV-7. In Rahmen dieser Arbeit konnte das entsprechende Reaktivitätsverhalten von T-Zellen für das HLA-A\*03:01-restringierte U38-Epitop VVFEGQQKK näher untersucht werden. Dieses Epitop ist in HHV-6A und 6B vollständig

konserviert und die drei getesteten T-Zellklone mit dieser Peptidspezifität erkannten sowohl HHV-6A- als auch 6B-infizierte Zellen. HHV-7-infizierte Zellen wurden ebenfalls noch erkannt, wenn auch deutlich schwächer; in HHV-7 ist die Epitopsequenz VVFEGQQKK in der ersten Aminosäure zu AVFEGQQKK verändert. Ein Austausch einer Aminosäure durch eine chemisch verwandte lässt manchmal einen Erhalt der T-Zellerkennung noch zu, aber dies ist im Einzelfall schwer vorherzusagen, da die Toleranz für solche Veränderungen auch bei T-Zellen gleicher Spezifität, aber mit unterschiedlichem TCR, sehr unterschiedlich sein kann (Burrows et al. 1995). Die entsprechenden Erkennungsmuster für die anderen hier beschriebenen Spezifitäten müssen in Zukunft untersucht werden. Es könnte auch für eine adoptive Immuntherapie in der Zukunft nützlich sein, spezifische T-Zellen oder TCRs zur Verfügung zu haben, die nicht nur HHV-6B, sondern auch die anderen Roseoloviren erkennen und kontrollieren können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl gegen U38 als auch gegen U41 in einer gesunden Virusträgerin T-Zellen vorliegen, die in der Lage sind, das Virus im Kontext der Infektion *in vitro* zu erkennen. Für die zukünftige Nutzung HHV-6-spezifischer T-Zellen in der adoptiven Immuntherapie oder für ein krankheitsbegleitendes Immunmonitoring sind dies wichtige Informationen. Jedoch werden weitere Untersuchungen nötig sein, um das T-Zell- und Epitoprepertoire gegen die beiden Antigene in unterschiedlichen Spendern mit unterschiedlichem HLA-Hintergrund noch genauer und repräsentativer zu charakterisieren. Eine verbesserte Kenntnis von HHV-6-spezifischen T-Zellen und ihrer genauen Zielstrukturen könnte auch dabei helfen, die Pathomechanismen von potenziell HHV-6-assoziierten Erkrankungen wie beispielsweise Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer oder auch des Chronic-Fatigue-Syndromes genauer zu erforschen, indem bei diesen Patienten das HHV-6-spezifische T-Zellspektrum genauer untersucht wird.

### 5.3 SARS-CoV-2: Evolution und Immunität

Seit Beginn der Zirkulation des Coronavirus SARS-CoV-2 im Jahre 2019 entwickelten sich immer wieder neue Virusvarianten mit jeweils charakteristischen Mutationen. Es wurde intensiv untersucht, in welcher Form sich die einzelnen Mutationen auf die Eigenschaften des Virus wie z.B. Übertragbarkeit, Virulenz oder Immunogenität auswirken (Harvey et al. 2021). Besonders viele Mutationen betreffen das Spike-Protein und insbesondere dessen S1-Untereinheit, die rund die Hälfte des Spike-Proteins ausmacht und auch die Rezeptor-Bindedomäne (RBD) enthält. Die S1-Untereinheit ist das Hauptziel von neutralisierenden Antikörpern und neue Varianten enthalten oft Mutationen in Epitopen für solche Antikörper, die deren Bindung reduzieren (Planas et al. 2021). Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass neue Virusvarianten Personen infizieren können, die bereits Immunität gegen frühere Varianten von SARS-CoV-2 aufweisen, sei es nach Impfung oder Infektion. Besonders ausgeprägt ist diese Immunevasion im Falle der Omikron-Varianten, die seit Mitte Winter 2021/2022 das infektiöse Geschehen bestimmen und einer Vorimmunität in Form neutralisierender Antikörper weitgehend ausweichen (Liu, Iketani, et al. 2022; Hachmann et al. 2022). Darüber hinaus können neue Mutationen im Spike-Gen die Affinität von Spike zu seinem zellulären Rezeptor ACE2 oder die Fähigkeit zum ACE2-unabhängigen Zelleintritt die Replikationsfähigkeit und die Virusinfektiosität beeinflussen (Meng et al. 2022; Willett et al. 2022). Spike-Mutationen in den Omikron-Varianten sind dafür verantwortlich, dass diese Varianten Zellen der oberen Atemwege effektiver infizieren als Zellen der Lunge und dies geht einher mit einer höheren Affinität des Omikron-Spike zu ACE2 und einer Unabhängigkeit der Infektion von der zellulären Protease TMPRSS2 (Meng et al. 2022; Willett et al. 2022). Die Kombination aus molekularen Unterschieden gegenüber früheren Varianten und einer erheblichen Immunevasion ist wohl der Hauptgrund dafür, dass Omikron-Varianten in kurzer Zeit einen Großteil der Bevölkerung infiziert haben. Weil die bis Sommer 2022 verfügbaren Impfstoffe von der ursprünglichen Variante von SARS-CoV-2 (Wuhan-Hu-1) abgeleitet waren, wirkt sich die Immunevasion so aus, dass Geimpfte vor Infektion und Erkrankung mit Omikron-Varianten wesentlich weniger geschützt sind als vor früheren Varianten (Altarawneh et al. 2022; Andrews et al. 2022) und zum Teil einige Monate nach Impfung bereits eine negative Effektivität bei geimpften Personen beobachtet wurde (Buchan et al. 2022).

In dieser Arbeit wurden zwei Projekte zur Immunität gegen SARS-CoV-2 durchgeführt. Im ersten Projekt wurde der Fall einer Patientin mit einer chronischen schweren COVID-19-Erkrankung untersucht. Die Patientin war nach Behandlung eines follikulären Lymphoms B-Zell-defizient und IgG-defizient, da sie im Zuge der Krebstherapie auch einen anti-CD20-Antikörper erhalten hatte. Ihre COVID-19-Erkrankung wurde unter anderem mit

Rekonvaleszenten-Plasma behandelt. Die hier präsentierten Ergebnisse legen nahe, dass das Auftreten von Mutationen im SARS-CoV-2 Genom, verbunden mit der Immunflucht vor spezifischen Antikörpern und CD8<sup>+</sup>-T-Zellantworten, mit hoher Wahrscheinlichkeit zum schweren und letztlich letalen Verlauf der Erkrankung beigetragen haben.

In der Publikation zu diesem Fall (Khatamzas et al. 2022) sind die Beiträge verschiedener Arbeitsgruppen zusammengeführt. Die Neutralisationstests mit verschiedenen Virusisolaten der Patientin (durchgeführt von Markus Antwerpen et al., Universität der Bundeswehr) zeigten, dass das in der Patientin evolvierte SARS-CoV-2-Varianten gegenüber neutralisierenden Antikörpern aus transfundiertem Rekonvaleszentenplasma zunehmend resistent waren. Somit ermöglichten die neu erworbenen Mutationen dem Virus, den transfundierten, polyklonalen Antikörpern zu entkommen. Mit größter Wahrscheinlichkeit ist diese Immunevasion auf die drei Mutationen im Spike-Gen zurückzuführen, die im Laufe der Erkrankung der Patientin entstanden und dann fixiert und dominant wurden. Es ist auffallend, dass alle drei Mutationen später in "variants of concern" auftraten (siehe unten). Grundsätzlich wäre eine Gabe von Rekonvaleszentenplasma bei der Behandlung von immungeschwächten COVID-19-Patienten mit längerer Infektion eine mögliche Therapieform. In der Realität ist die beobachtete therapeutische Wirksamkeit uneinheitlich (Abani and Group 2021; Franchini et al. 2022). Es wurde vorgeschlagen, eine solche Therapie vorwiegend im Frühstadium der Erkrankung bei Gefährdeten anzuwenden, da sie dann effektiver sei (Libster et al. 2021; Katz 2021). Bei einer Anwendung bei Omikron-Erkrankten dürfte es wichtig sein, Plasma von Spendern zu verwenden, die vorher mit Omikron (möglichst der gleichen Variante) infiziert waren, da neutralisierende Antikörper gegen frühere Varianten Omikron in geringerem Umfang neutralisieren, wie man zum Beispiel bei Geimpften sieht (Cele et al. 2022; Bruel et al. 2022). Die Antikörper-Therapie wird nun meist mit monoklonalen Antikörpern durchgeführt, aber auch hier sind die Verhältnisse weiterhin sehr dynamisch. Nach dem Stand vom Herbst 2022 werden aktuelle Omikron-Varianten wie BA.5 und BA.2.75 noch teilweise von den aktuell verfügbaren Antikörpern neutralisiert (Takashita et al. 2022; Sheward et al. 2022).

Die in dieser Patientin gefundenen Spike-Mutationen traten allesamt später auch in zirkulierenden SARS-CoV-2-Varianten in Erscheinung: Der Austausch E484K in Beta und Gamma, die Deletion an Position 144 in Alpha und der Austausch S477N in Omikron (BA.1, BA.2, BA.4 und BA.5). Alle diese Mutationen sind als Antikörper-Evasionsmutationen bekannt (Khatamzas et al. 2022). In der Patientin traten also bereits im Sommer 2020 Mutationen auf, die unabhängig davon im Verlauf des anschließenden Jahres von

zirkulierenden Varianten erneut entwickelt wurden. Das Auftreten von E484K in immunsupprimierten COVID-19-Patienten wurde auch von anderen beobachtet (Jensen et al. 2021). Dies legt die hohe Bedeutung dieser Mutationen für die Immunevasion nahe und zeigt, dass Zielepitope neutralisierender Antikörper im Spike-Protein nicht nur bei der ersten Infektion, sondern auch bei der Aufrechterhaltung einer chronischen Infektion unter Druck des Immunsystems stehen. Möglicherweise spielt die Eliminierung von freiem Virus durch neutralisierende Antikörper auch bei der chronischen Infektion eine wichtige Rolle. Alternativ könnte es sein, dass infizierte Zellen Spike-Protein auf ihrer Zellmembran tragen, dieses durch Antikörper gebunden und die Zellen dann durch antikörperabhängige Zytotoxizität (ADCC), etwa durch NK-Zellen, eliminiert werden (Hagemann et al. 2022; Rieke et al. 2022). Allerdings ist Immunevasion nicht der einzige mögliche Grund für das Auftreten dieser Mutationen, da eine Mutation von Oberflächenstrukturen auf dem Spike-Protein auch dessen molekulare Eigenschaften beeinflussen kann: Zum Beispiel beeinflusst die E484K-Mutation je nach Kontext auch die Bindung von Spike an den Rezeptor ACE2 (Wolf, Kwan, and Kamil 2022; Gobeil et al. 2021).

Zusätzlich zu diesen drei Mutationen im Spike-Gen traten bei der Patientin im Laufe der Erkrankung neun nichtsynonyme Mutationen in anderen Genen auf, die fixiert und dominant wurden. Die Patientin hatte im peripheren Blut CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, wenn auch in reduzierter Zahl und insbesondere die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigten einen aktivierten Phänotyp. Es lag nahe, der Frage nachzugehen, ob hier Mutationen in T-Zellepitopen vorliegen könnten. Alle betroffenen Regionen wurden daher als Peptide in unmutierter und mutierter Form synthetisiert und in T-Zellexperimenten getestet. Neben 15-meren wurden auch definierte, mit SAMBA (Martin et al. 2018) vorhergesagte CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitope zur Stimulation von T-Zellen verwendet. Da Proben der Patientin knapp waren, wurden hierfür vorwiegend konvaleszente Spender herangezogen, die in der ersten Welle im Frühjahr 2020 ihre SARS-CoV-2-Infektion durchgemacht hatten. Mit T-Zellkulturen, die aus solchen Spendern hergestellt wurden, konnte für vier dieser Mutationen (in drei T-Zellepitopen mit drei verschiedenen HLA-Restriktionen) gezeigt werden, dass sie zu einer Evasion gegenüber einer Erkennung durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen führen. Für eines dieser Epitope, das B\*35:01-Epitop TPS, konnte sogar gezeigt werden, dass zwei Mutationen, die zeitlich nacheinander im gleichen Epitop aufgetreten waren, kumulativ zur Immunevasion beitrugen. Bereits die erste Mutation verringerte die funktionelle T-Zellerkennung und die HLA/Peptid-Multimerfärbung, aber erst nach der zweiten Mutation wurde beides weitgehend verhindert. Dieses Epitop war zwar bereits in der Literatur genannt (Tarke et al. 2021), jedoch noch nicht als immundominant oder anderweitig auffallend beschrieben worden. In hier nicht gezeigten Daten der Arbeitsgruppe waren T-

Zellen gegen dieses Epitop jedoch bei einer konvaleszenten Spenderin als dominant aufgefallen (Arbeiten von W. Mohr). Die anderen beiden Epitope (CTD, HLA-A\*01:01; ALW, HLA-A\*02:01) waren in der Literatur bereits genauer beschrieben worden: Sie gehörten zu den dominantesten Epitopen ihrer HLA-Restriktion in SARS-CoV-2, und es wurde gezeigt, dass entsprechende T-Zellen auch endogen prozessiertes Antigen erkennen (Ferretti et al. 2020). Jedoch ist auffällig, dass diese "CD8-T-Zell-evasiven" Mutationen bisher nicht in vorherrschenden VOCs dominant geworden sind (Stand: Oktober 2022), obwohl sie gelegentlich in geringer Häufigkeit beobachtet wurden (Khatamzas et al. 2022). Dies könnte bedeuten, dass CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei immungeschwächten Patienten mit einer chronischen Infektion einen stärkeren Selektionsdruck auf das Virus ausüben als bei üblicher kurzzeitiger Infektion und es somit hier häufiger zu Mutationen kommt als in immunkompetenten Patienten (Kemp et al. 2021).

Allerdings haben Mutationen in CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitopen auch in zirkulierendem Virus eine durchaus bemerkbare Häufigkeit. Am detailliertesten wurde dies bisher für die Spike-Mutation P272L herausgearbeitet, die dazu führt, dass ein HLA-A\*02:01-restringiertes Epitop von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nicht mehr erkannt wird (Dolton et al. 2022). Virusvarianten mit dieser Mutation wurden bereits im ersten Jahr der Pandemie in Europa beobachtet und erreichten in einigen Ländern zeitweilig eine Häufigkeit von bis zu 2 % der sequenzierten Virusgenome (Dolton et al. 2022). Diese setzten sich aber nicht nachhaltig durch und sind auch in keiner der aktuellen Omikron-Varianten dominant. Es scheint nicht bekannt zu sein, ob auch das mutierte Epitop ein funktionales CD8<sup>+</sup>-Epitop ist. Seine Sequenz (YLQPRTFLL wird zu YLQLRTFLL) lässt dies wahrscheinlich zu, da die Ankerreste auf den Positionen 2 und 9 nicht mutiert sind. Auch weitere immunevasive Mutationen in CD8<sup>+</sup>-T-Zellepitopen wurden bereits beschrieben, aber auch diese setzten sich in zirkulierenden Varianten bislang nicht durch (Agerer et al. 2021; de Silva et al. 2021).

Warum spielt Immunselektion durch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine geringere Rolle bei der Evolution von SARS-CoV-2 als neutralisierende Antikörper? Dafür könnte es mehrere Erklärungen geben. Erstens wird die Verbreitung und Evolution des Virus wahrscheinlich mehr durch leicht verlaufende als schwer verlaufende Infektionen determiniert und bei leichten Verläufen wird das Virus möglicherweise vorwiegend zu einem Zeitpunkt weitergegeben, zu dem sich eine spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort noch nicht voll ausgebildet hat. Zweitens ist die Diversität von HLA-Klasse-I-Molekülen in den meisten Bevölkerungen der Welt hoch und somit ist der evolutionäre Druck nicht genug, um Mutationen zu erzwingen, die ohnehin nur ein einziges Epitop einer einzigen HLA-Restriktion betreffen werden und somit nur für eine Minderheit der Infizierten überhaupt relevant sein könnten. Drittens reagieren

immunkompetente Personen gegen das Virus mit einer T-Zellantwort von durchschnittlich rund 30 Epitopen (Tarke et al. 2021; Moss 2022) und die Mutation eines dieser Epitope könnte die Kontrolle des Virus nur unwesentlich beeinflussen. Die durchschnittliche Mutationsgeschwindigkeit von Coronaviren (Sanjuán et al. 2010) dürfte aber zu niedrig sein, um das Auftreten mehrerer relevanter Mutationen in den drei bis zehn Tagen einer durchschnittlichen Infektion zu ermöglichen.

Anders ist die Situation bei langandauernden Infektionen in immunsupprimierten Patienten. In der hier beschriebenen Patientin wurden, trotz ihres immunkompromittierten Status, die ersten immunevasiven Mutationen erst nach 20 Tagen beobachtet und es dauerte bis zum Tag 41, bis sie dominant wurden (Khatamzas et al. 2022). Zudem dürften bei Immunkompromittierten weniger Mutationen ausreichen, um eine erhebliche CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Immunevasion zu bewirken, denn bei immungeschwächten Personen werden nämlich aufgrund eines reduzierten T-Zell-Repertoires und einer funktionellen T-Zell-Beeinträchtigung vermutlich weniger SARS-CoV-2-Epitope erkannt als bei einer immunkompetenten Person (Tarke et al. 2021; Enssle et al. 2022). Zukünftige Analysen der T-Zell-Diversität bei Immunkompromittierten, vorzugsweise durch hochauflösende T-Zell-Rezeptor-Sequenzierung (Huth et al. 2019), werden helfen, diese Vermutungen zu überprüfen. Bislang ist bekannt, dass die Gesamtzahl der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei Patienten mit hämatologischen Malignomen und B-Zelldefizienz einen wichtigen günstigen prognostischen Faktor für den Verlauf von COVID-19 darstellen (Bange et al. 2021).

Auch das zweite Projekt zu SARS-CoV-2 im Rahmen der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Rolle von T-Zellen bei immunkompromittierten Patienten. In diesem Projekt sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit mRNA-basierte Impfstoffe gegen SARS-CoV-2 bei einer Kohorte von Krebspatienten, die an verschiedenen hämatologischen Malignomen erkrankt sind, Spike-spezifische T-Zell-Antworten auslösen können. Diese Impfstoffe induzierten bei der Mehrheit der gesunden Empfänger Spike-spezifische T-Zell-Antworten (Goel et al. 2021; Tarke et al. 2021). Bei Krebspatienten, die entweder gerade eine immunsuppressive Therapie erhalten oder diese vor einiger Zeit erhalten haben, konnte dies nicht unbedingt angenommen werden. Eine Reihe von Publikationen beschrieb suboptimale T-Zellantworten bei Patienten mit verschiedenen hämatologischen Krebserkrankungen nach der SARS-CoV-2-Impfung. Fendler et al. (2021) fanden nach Impfung eine T-Zell-Antwort bei 4 von 4 Patienten mit bösartigen B-Zell-Erkrankungen, die nach einer Behandlung mit anti-CD20-Antikörpern eine B-Zell-Defizienz aufwiesen und somit auch in ihrer Fähigkeit zur Bildung neuer Antikörperantworten stark defizient waren. Dieses ermutigende Ergebnis wurde von anderen nur teilweise bestätigt: Liebers et al.

(2022) legten Daten zu einer größeren Kohorte von Patienten mit bösartigen B-Zell-Erkrankungen vor, die ebenfalls eine anti-CD20-Behandlung gerade erhielten oder erhalten hatten. In dieser Studie wurden mittels ELISpot zwei Wochen nach der Impfung bei nur 58 % aller 50 Patienten Spike-spezifische T-Zellen nachgewiesen (Liebers et al. 2022). Noch schlechter waren die beschriebenen Impferfolge beim malignen Myelom, bei dem nur in 34 % der Patienten nach Impfung eine SARS-CoV-2-spezifische T-Zellantwort gefunden wurde, ebenfalls im IFN- $\gamma$ -ELISpot. Obwohl viele dieser Studien den gleichen Test verwendet hatten (IFN- $\gamma$ -ELISpot mit SARS-CoV-2-Spike-Peptiden als Stimulator), unterschieden sie sich doch erheblich in Einzelheiten der Durchführung, in der eingesetzten Zellzahl, in der genauen Gestaltung des Antigens (Peptidbibliotheken, die das Spike-Protein ganz oder nur teilweise abdeckten) und in den Ergebnissen der Negativkontrollen und gesunden Kontrollspender.

Daher schien es notwendig, diese Resultate unabhängig zu überprüfen. Diese Gelegenheit ergab sich, da A. Hafkemeyer und KollegInnen an der Universität Freiburg eine Kohorte von Krebspatienten, vorwiegend mit hämatologischen Krebserkrankungen rekrutiert hatten, insbesondere mit B-Zellmalignomen mit und ohne anti-CD20-Antikörperbehandlung und mit multiplem Myelom (MM). Von 59 Patienten waren Proben verfügbar, die für die Analyse von T-Zellantworten mittels IFN- $\gamma$ -ELISpot im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden. Die Mehrzahl der Patienten hatte eine Grundimmunisierung mit zwei Dosen der Pfizer/Biontech-Impfung BNT162b2 (Libster et al. 2021) erhalten. Die Impfantworten wurden gegen Peptide getestet, die das Spike-Protein der Delta-Variante abdeckten. Omikron war zum Zeitpunkt der Analysen (ab Oktober 2021) noch nicht verbreitet und Reagenzien dafür standen noch nicht zur Verfügung.

Bei einer deutlichen Mehrheit der Patienten mit hämatologischem Krebs wurde nach zwei Impfstoffdosen eine impfstoffinduzierte T-Zell-Antwort gefunden: Es gab nach der zweiten mRNA-Impfung einen Anstieg der Spike-spezifischen T-Zellen bei 85 % aller Patienten und bei 76 % der Patienten sogar eine Zunahme von mehr als 10 Spots pro Million eingesetzter PBMCs (Hafkemeyer et al., zur Publikation eingereicht).

Auch bei den Patienten, die zur Zeit der Impfung oder kurz davor noch mit anti-CD20-Antikörpern behandelt wurden, zeigten 12 von 13 Patienten eine funktionelle T-Zell-Antwort gegen das Spike-Antigen von SARS-CoV-2 nach der zweiten Impfung. Dies unterstützt die These, dass eine SARS-CoV-2-mRNA-Impfung selbst bei den meisten Patienten von Nutzen sein kann, die nicht in der Lage sind, aufgrund fehlender B-Lymphozyten anti-Spike-Antikörper zu bilden. In diesen Patienten kommt es dennoch in

den meisten Fällen zu einer primären Aktivierung von spezifischen T-Zellen und damit zum Aufbau einer zellulären Immunität.

Ebenso zeigte die Mehrheit der MM-Patienten (89 %, 16/18) nach zwei BNT162b2-mRNA-Impfungen eine nachweisbare SARS-CoV-2-Spike-spezifische T-Zell-Antwort. Dies stand im Gegensatz zur oben genannten Publikation von Enssle et al. (2022) die feststellten, dass nur 34 % der MM-Patienten eine solche Reaktion zeigten. Allerdings konnten Enssle et al. (2022) nur bei 71 % ihrer geimpften gesunden Kontrollen ein positives Signal in ihrem T-Zell-Experiment messen, was im Gegensatz zu den Erkenntnissen vieler anderer Arbeitsgruppen steht, dass eine Spike-spezifische T-Zell-Antwort bei praktisch allen gesunden geimpften Personen zumindest kurz danach zu finden ist (Zhang, Mateus, et al. 2022). Bei Enssle et al. (2022) lag das Hintergrundsignal im ELISpot ohne Antigen ungewöhnlich hoch, was die Autoren veranlasste, dafür einen Cut-off von 55 Spots anzusetzen (Enssle et al. 2022). Es liegt nahe, bei einem so hohen Hintergrund ein technisches Problem zu vermuten. Hierfür gibt es verschiedene Möglichkeiten: Eine Kontaminationen der verwendeten Medien oder Peptide mit immunogenen Substanzen; Verwendung von Seren wie z.B. fötalem Kälberserum, das eine zu starke nichtspezifische Stimulation von irrelevanten T-Zellen bewirkt oder ungeeignete Kriterien bei der maschinellen Auszählung der Spots (Dittrich and Lehmann 2012; Janetzki and Britten 2012). Der in unserem Labor etablierte ELISpot-Test (Moosmann et al. 2010; Ameres et al. 2013) wurde von uns in den letzten Jahren weiter verbessert (W. Mohr, A. Hollaus, nicht publiziert). Insbesondere gelang uns durch Ersatz von tierischen Seren durch geringe Mengen Humanserum eine weitere Reduktion des Hintergrundsignals. Im Einklang damit ergab bei einer Mehrzahl an Patienten der hier beschriebenen Kohorte ein Hintergrundsignal von null Spots (Hafkemeyer et al., eingereicht). Dies war eine wichtige Grundlage für die sensitive Detektion spezifischer T-Zellen nach der SARS-CoV-2-Impfung im Rahmen der vorliegenden Arbeit.

Parallel zur Analyse spezifischer T-Zellen, die hier dargestellt wurde, wurden die Patienten der Kohorte am Max-von-Pettenkofer-Institut der LMU auf SARS-CoV-2-spezifische Antikörper untersucht: Auf bindende Antikörper im ELISA, auf neutralisierende Antikörper in Neutralisationstests mit sechs verschiedenen Virusisolaten einschließlich Omikron BA.1 und auch eine Analyse der Antikörper-Affinität wurde durchgeführt. Die verwendeten Methoden sind in einer früheren Arbeit des Instituts beschrieben (Wratil et al. 2021), auf die Ergebnisse zur Krebspatienten-Kohorte kann in der vorliegenden Arbeit nicht im Detail eingegangen werden. Insgesamt zeigen die Daten, dass die Mehrheit der MM-Patienten sowohl Spike-spezifische T-Zell-Antworten als auch neutralisierende Antikörper-Antworten

nach einer BNT162b2-mRNA-Impfung induziert, unabhängig von ihrem aktuellen Behandlungsschema.

Die meisten Patienten der Kohorte erhielten im Herbst 2021 noch eine dritte Impfdosis, da in der Zwischenzeit klar geworden war, dass der Effekt einer SARS-CoV-2-Grundimmunisierung schneller nachlässt als erwartet (Shrotri et al. 2021; Goldberg et al. 2022). Der Effekt einer dritten Dosis ließ, gerade bei immunkompromittierten Patienten, eine wichtige Verbesserung des Immunschutzes erwarten. Im Nachgang der oben beschriebenen Analysen konnte die T-Zellantwort nach dritter Impfdosis bei acht Patienten getestet werden und dabei konnten T-Zellen gegen Omikron BA.1 mit analysiert werden. Es ergab sich ein Hinweis auf eine Verstärkung der T-Zellantwort durch die dritte Dosis, die allerdings nicht signifikant war, was wahrscheinlich mit der geringen Patientenzahl erklärbar ist. Zudem ergab sich der ermutigende Befund, dass die T-Zellen von 7 dieser 8 Patienten sowohl die Delta- als auch die Omikron-Variante ähnlich gut erkannten. Dies stand im Einklang damit, dass der Großteil der Spike-Sequenz und somit die meisten T-Zellepitope über die verschiedenen SARS-CoV-Varianten hinweg konserviert sind (Keeton et al. 2022). Ein Patient zeigte ein abweichendes Verhalten und eine weit niedrigere Erkennung von Omikron. Es wird von Interesse sein zu überprüfen, ob dieser Patient ein eingeschränktes T-Zellrepertoire hatte und vorwiegend gegen ein oder mehrere Epitope reagierte, die Sequenzunterschiede zwischen diesen Varianten aufweisen.

Als Hauptergebnis der Analyse dieser Kohorte von Krebspatienten konnte ich zeigen, dass eine Zwei-Dosen-Impfung gegen SARS-CoV-2 in der Lage ist, funktionelle IFN- $\gamma$ -sekretierende Spike-spezifische T-Zellen bei der Mehrheit der Patienten mit hämatologischen Malignomen zu induzieren, einschließlich Patienten mit Lymphomen, die derzeit eine anti-CD20-Behandlung erhalten und MM-Patienten unabhängig von der gleichzeitigen Behandlung. Andere Publikationen scheinen hinsichtlich T-Zellen den Impferfolg bei solchen Patienten teilweise zu unterschätzen (Liebers et al. 2022; Enssle et al. 2022). Insbesondere sind impfstoffinduzierte, SARS-CoV-2-spezifische T-Zellen besonders für Patienten wichtig, die eine anti-CD20-Immuntherapie (Rituximab) erhalten, da es bei diesen Patienten zu einer Beeinträchtigung der humoralen Immunantwort kommt. Zusammenfassend erreichten 92 % aller Patienten mit hämatologischem Krebs in der untersuchten Kohorte eine Immunantwort nach der Impfung gegen SARS-CoV-2, humoral, zellulär oder beides. Wie könnte man immunkompromittierten Patienten, die auf eine solche Impfung nicht ansprechen, zu einem besseren Schutz verhelfen? SARS-CoV-2 nähert sich nunmehr der Endemie-Situation und die nun zirkulierenden Varianten führen zum Glück zu Erkrankungen geringerer Schwere. Es bleibt abzuwarten, ob das Problem

auch bei immunsupprimierten Patienten klinisch in nächster Zeit in den Hintergrund tritt. Gleichwohl wäre es gut, Möglichkeiten der Prophylaxe und Therapie für solche Patienten vorrätig zu halten. Dies gilt für SARS-CoV-2 und weitere respiratorische Viren in ähnlicher Weise wie für humane Herpesviren einschließlich HHV-6, für die meist ohnehin keine Impfstoffe zur Verfügung stehen. Eine Prophylaxe durch Transfer virusspezifischer Antikörper wäre eine Möglichkeit, aber sie zeigte bisher teilweise unbefriedigende Resultate, sowohl bei SARS-CoV-2 (Abani and Group 2021) als auch bei Herpesviren wie CMV (Revello et al. 2014). Eine therapeutische Alternative könnte ein Transfer virusspezifischer T-Zellen sein. Bei Herpesviren gibt es hier schon länger starke Aktivitäten (Riddell et al. 1992; Moosmann et al. 2010), bei HHV-6 wird dies noch in geringem Umfang praktiziert (Tzannou et al. 2017). Auch bei SARS-CoV-2 beginnen nun klinische Aktivitäten in dieser Richtung (Boni et al. 2021).

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit könnten zukünftig dazu beitragen, solche Therapien zu entwickeln: Sie beschreibt T-Zellepitope aus mehreren Antigenen von HHV-6, die von infizierten Zellen effektiv präsentiert werden, wodurch die T-Zellen protektiv sein können. Sie beschreibt auch T-Zellepitope aus mehreren Antigenen von SARS-CoV-2, die von T-Zellen erkannt werden, die wahrscheinlich protektiv sind, da sie in einer ungewöhnlichen Langzeitpatientin der Immunselektion unterlagen. Bei Patienten nach einer allogenen Stammzelltransplantation können virusspezifische T-Zellen unmittelbar aus Stammzellspendern gewonnen werden (Riddell et al. 1992; Moosmann et al. 2010; Tzannou et al. 2017). Bei sonstigen immunkompromittierten Patienten könnten sie aus patienteneigenen T-Zellen anderer Spezifität durch Gentransfer spezifischer T-Zellrezeptoren gewonnen werden (Schub et al. 2009; Stief et al. 2022). In der Therapie von B-Zell-Lymphomen werden in vitro genmodifizierte T-Zellen mittlerweile vielfach klinisch eingesetzt, nämlich in der Form von CD19-CAR-T-Zellen (Zhang, Hu, et al. 2022). Vielleicht wird dies in Zukunft auch für virusspezifische T-Zellen möglich sein.

Aber schon heute geben die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse einen weiteren detaillierten Einblick nicht nur in die bisher nur sehr selektiv untersuchte spezifische T-Zellimmunität gegen HHV-6, sondern offenbaren auch, dass es bei SARS-CoV-2 noch weiterer Analysen bedarf, um dessen spezifische T-Zellantwort genauer zu charakterisieren und verstehen zu können.

## Abkürzungen

### Abkürzung Bedeutung

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
allo-HSCT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
allo-KMT	allogene Knochenmarkstransplantation
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BBL	B-Blasten (CD40-aktivierte B-Zellen)
BCIP/NPT	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitrotetrazolblauschlorid
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD...	cluster of differentiation (Oberflächenmarker) komplementaritätsbestimmende Region (complementarity-determining region)
CDR	
CMV	Cytomegalievirus
CsA	Cyclosporin A
DC	dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynucleoside triphosphate
E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme linked immunospot assay
FACS	Fluorescence-activated cell scanning (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
g	Erdbeschleunigung
GCV	Ganciclovir
GFP	green fluorescent protein
HBLV	humanes B-lymphotropes Virus (alte Bezeichnung von HHV-6)
HHV-6	humanes Herpesvirus 6
HLA	human leucocyte antigen (Humanes Leukozyten-Antigen)
HS	Human Serum
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus 1 (Lippenherpesvirus)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (EBV-transformierte B-Zelllinie)

---

LTR	long terminal repeats
M/mM	Stoffmengenkonzentration molar/millimolar
MACS	Magnetic activated cell sorting (magnetische Trennung von Zellen)
mg	Milligramm
mHA	minor histocompatibility antigen
MHC	major histocompatibility complex
Mio.	Million
ml	Milliliter
mLCL	mini-lymphoblastoide Zelllinie (mini-EBV-transformierte B-Zelllinie)
MuLV	murines Leukämievirus
MW	Mittelwert
n.d.	nicht untersucht
n.i.	nach Infektion
NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
nm	Nanometer
ORF	Open Reading Frame
p-NPP	para-Nitrophenylphosphat
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate-buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
pCMV	CMV-Promotor
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin5
Pen	Penicilin
PHA-M	Phytohämagglutinin M
PRE	posttranskriptionelles Element
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disease
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute-1640 Medium
SAMBA	simple anchor motif-based algorithm
SSC	Seitwärtsstreuung (side scatter)
TAP	transporter associated with antigen processing
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
U	unit
VZV	Varicella-Zoster-Virus (Windpockenvirus)
z.B.	zum Beispiel
$\alpha$	Alpha/anti
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter

## Referenzen

- Abani, Obbina, and RECOVERY Collaborative Group. 2021. 'Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial', *Lancet*, 397: 2049-59.
- Ablashi, D., H. Agut, R. Alvarez-Lafuente, D. A. Clark, S. Dewhurst, D. DiLuca, L. Flamand, N. Frenkel, R. Gallo, U. A. Gompels, P. Hollsberg, S. Jacobson, M. Luppi, P. Lusso, M. Malnati, P. Medveczky, Y. Mori, P. E. Pellett, J. C. Pritchett, K. Yamanishi, and T. Yoshikawa. 2014. 'Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses', *Arch Virol*, 159: 863-70.
- Ablashi, D. V., N. Balachandran, S. F. Josephs, C. L. Hung, G. R. Krueger, B. Kramarsky, S. Z. Salahuddin, and R. C. Gallo. 1991. 'Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates', *Virology*, 184: 545-52.
- Ablashi, Dharam, Henri Agut, Roberto Alvarez-Lafuente, Duncan A. Clark, Stephen Dewhurst, Dario DiLuca, Louis Flamand, Niza Frenkel, Robert Gallo, Ursula A. Gompels, Per Höllsberg, Steven Jacobson, Mario Luppi, Paolo Lusso, Mauro Malnati, Peter Medveczky, Yasuko Mori, Philip E. Pellett, Joshua C. Pritchett, Koichi Yamanishi, and Tetsushi Yoshikawa. 2013. 'Classification of HHV-6A and HHV-6B as distinct viruses', *Archives of Virology*, 159: 863-70.
- Achour, Abba, Isabelle Malet, Frédéric Le Gal, Axelle Dehée, Agnès Gautheret-Dejean, Pascale Bonnafous, and Henri Agut. 2008. 'Variability of gB and gH genes of human herpesvirus-6 among clinical specimens', *Journal of Medical Virology*, 80: 1211-21.
- Adhikary, D., U. Behrends, H. Boerschmann, A. Pfunder, S. Burdach, A. Moosmann, K. Witter, G. W. Bornkamm, and J. Mautner. 2007. 'Immunodominance of lytic cycle antigens in Epstein-Barr virus-specific CD4+ T cell preparations for therapy', *PLoS One*, 2: e583.
- Agerer, B., M. Koblischke, V. Gudipati, L. F. Montañó-Gutierrez, M. Smyth, A. Popa, J. W. Genger, L. Endler, D. M. Florian, V. Mühlgrabner, M. Graninger, S. W. Aberle, A. M. Husa, L. E. Shaw, A. Lercher, P. Gattinger, R. Torralba-Gombau, D. Trapin, T. Penz, D. Barreca, I. Fae, S. Wenda, M. Traugott, G. Walder, W. F. Pickl, V. Thiel, F. Allerberger, H. Stockinger, E. Puchhammer-Stöckl, W. Weninger, G. Fischer, W. Hoepler, E. Pawelka, A. Zoufaly, R. Valenta, C. Bock, W. Paster, R. Geyeregger, M. Farlik, F. Halbritter, J. B. Huppa, J. H. Aberle, and A. Bergthaler. 2021. 'SARS-CoV-2 mutations in MHC-I-restricted epitopes evade CD8(+) T cell responses', *Sci Immunol*, 6.
- Agut, H. 2011. 'Deciphering the clinical impact of acute human herpesvirus 6 (HHV-6) infections', *J Clin Virol*, 52: 164-71.
- Agut, H., P. Bonnafous, and A. Gautheret-Dejean. 2015. 'Laboratory and clinical aspects of human herpesvirus 6 infections', *Clin Microbiol Rev*, 28: 313-35.
- Allnutt, M. A., K. Johnson, D. A. Bennett, S. M. Connor, J. C. Troncoso, O. Pletnikova, M. S. Albert, S. M. Resnick, S. W. Scholz, P. L. De Jager, and S. Jacobson. 2020. 'Human Herpesvirus 6 Detection in Alzheimer's Disease Cases and Controls across Multiple Cohorts', *Neuron*, 105: 1027-35.e2.
- Altarawneh, H. N., H. Chemaitelly, M. R. Hasan, H. H. Ayoub, S. Qassim, S. AlMukdad, P. Coyle, H. M. Yassine, H. A. Al-Khatib, F. M. Benslimane, Z. Al-Kanaani, E. Al-Kuwari, A. Jeremijenko, A. H. Kaleeckal, A. N. Latif, R. M. Shaik, H. F. Abdul-Rahim, G. K. Nasrallah, M. G. Al-Kuwari, A. A. Butt, H. E. Al-Romaihi, M. H. Al-Thani, A. Al-Khal, R. Bertollini, P. Tang, and L. J. Abu-Raddad. 2022. 'Protection against the Omicron Variant from Previous SARS-CoV-2 Infection', *N Engl J Med*, 386: 1288-90.
- Ameres, S., K. Besold, B. Plachter, and A. Moosmann. 2014. 'CD8 T cell-evasive functions of human cytomegalovirus display pervasive MHC allele specificity, complementarity, and cooperativity', *J Immunol*, 192: 5894-905.

- Ameres, S., X. Liang, M. Wiesner, J. Mautner, and A. Moosmann. 2015. 'A Diverse Repertoire of CD4 T Cells Targets the Immediate-Early 1 Protein of Human Cytomegalovirus', *Front Immunol*, 6: 598.
- Ameres, S., J. Mautner, F. Schlott, M. Neuenhahn, D. H. Busch, B. Plachter, and A. Moosmann. 2013. 'Presentation of an immunodominant immediate-early CD8+ T cell epitope resists human cytomegalovirus immunoevasion', *PLoS Pathog*, 9: e1003383.
- Andrews, N., J. Stowe, F. Kirsebom, S. Toffa, T. Rickeard, E. Gallagher, C. Gower, M. Kall, N. Groves, A. M. O'Connell, D. Simons, P. B. Blomquist, A. Zaidi, S. Nash, N. Iwani Binti Abdul Aziz, S. Thelwall, G. Dabrera, R. Myers, G. Amirthalingam, S. Gharbia, J. C. Barrett, R. Elson, S. N. Ladhani, N. Ferguson, M. Zambon, C. N. J. Campbell, K. Brown, S. Hopkins, M. Chand, M. Ramsay, and J. Lopez Bernal. 2022. 'Covid-19 Vaccine Effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) Variant', *N Engl J Med*, 386: 1532-46.
- Appay, V. 2004. 'The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail?', *Clin Exp Immunol*, 138: 10-3.
- Arbuckle, Jesse H., Maria M. Medveczky, Janos Luka, Stephen H. Hadley, Andrea Luegmayer, Dharam Ablashi, Troy C. Lund, Jakub Tolar, Kenny De Meirleir, Jose G. Montoya, Anthony L. Komaroff, Peter F. Ambros, and Peter G. Medveczky. 2010. 'The latent human herpesvirus-6A genome specifically integrates in telomeres of human chromosomes in vivo and in vitro', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 5563-68.
- Asano, Y, T Yoshikawa, Y Kajita, R Ogura, S Suga, T Yazaki, T Nakashima, A Yamada, and T Kurata. 1992. 'Fatal encephalitis/encephalopathy in primary human herpesvirus-6 infection', *Archives of Disease in Childhood*, 67: 1484-85.
- Aubin, J. T., H. Collandre, D. Candotti, D. Ingrand, C. Rouzioux, M. Burgard, S. Richard, J. M. Huraux, and H. Agut. 1991. 'Several groups among human herpesvirus 6 strains can be distinguished by Southern blotting and polymerase chain reaction', *J Clin Microbiol*, 29: 367-72.
- Balasubramaniam, M., B. O. Davids, A. Bryer, C. Xu, S. Thapa, J. Shi, C. Aiken, J. Pandhare, J. R. Perilla, and C. Dash. 2022. 'HIV-1 mutants that escape the cytotoxic T-lymphocytes are defective in viral DNA integration', *PNAS Nexus*, 1: pgac064.
- Bange, E. M., N. A. Han, P. Wileyto, J. Y. Kim, S. Gouma, J. Robinson, A. R. Greenplate, M. A. Hwee, F. Porterfield, O. Owoyemi, K. Naik, C. Zheng, M. Galantino, A. R. Weisman, C. A. G. Ittner, E. M. Kugler, A. E. Baxter, O. Oniyide, R. S. Agyekum, T. G. Dunn, T. K. Jones, H. M. Giannini, M. E. Weirick, C. M. McAllister, N. E. Babady, A. Kumar, A. J. Widman, S. DeWolf, S. R. Boutemine, C. Roberts, K. R. Budzik, S. Tollett, C. Wright, T. Perloff, L. Sun, D. Mathew, J. R. Giles, D. A. Oldridge, J. E. Wu, C. Alanio, S. Adamski, A. L. Garfall, L. A. Vella, S. J. Kerr, J. V. Cohen, R. A. Oyer, R. Massa, I. P. Maillard, K. N. Maxwell, J. P. Reilly, P. G. Maslak, R. H. Vonderheide, J. D. Wolchok, S. E. Hensley, E. J. Wherry, N. J. Meyer, A. M. DeMichele, S. A. Vardhana, R. Mamtani, and A. C. Huang. 2021. 'CD8(+) T cells contribute to survival in patients with COVID-19 and hematologic cancer', *Nat Med*, 27: 1280-89.
- Bates, Matthew, Mwaka Monze, Humphrey Bima, Mirriam Kapambwe, David Clark, Francis C. Kasolo, and Ursula A. Gompels. 2009. 'Predominant human herpesvirus 6 variant A infant infections in an HIV-1 endemic region of Sub-Saharan Africa', *Journal of Medical Virology*, 81: 779-89.
- Baumjohann, D., and N. Fazilleau. 2021. 'Antigen-dependent multistep differentiation of T follicular helper cells and its role in SARS-CoV-2 infection and vaccination', *Eur J Immunol*, 51: 1325-33.
- Becerra, Aniuska, Laura Gibson, Lawrence J. Stern, and J. Mauricio Calvo-Calle. 2014. 'Immune response to HHV-6 and implications for immunotherapy', *Current Opinion in Virology*, 9: 154-61.

- Becerra-Artiles, A., J. Cruz, J. D. Leszyk, J. Sidney, A. Sette, S. A. Shaffer, and L. J. Stern. 2019. 'Naturally processed HLA-DR3-restricted HHV-6B peptides are recognized broadly with polyfunctional and cytotoxic CD4 T-cell responses', *Eur J Immunol*, 49: 1167-85.
- Becerra-Artiles, A., O. Dominguez-Amorocho, L. J. Stern, and J. M. Calvo-Calle. 2015. 'A Simple Proteomics-Based Approach to Identification of Immunodominant Antigens from a Complex Pathogen: Application to the CD4 T Cell Response against Human Herpesvirus 6B', *PLoS One*, 10: e0142871.
- Biberfeld, P., B. Kramarsky, S. Z. Salahuddin, and R. C. Gallo. 1987. 'Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease', *J Natl Cancer Inst*, 79: 933-41.
- Birnbaum, M. E., J. L. Mendoza, D. K. Sethi, S. Dong, J. Glanville, J. Dobbins, E. Ozkan, M. M. Davis, K. W. Wucherpfennig, and K. C. Garcia. 2014. 'Deconstructing the peptide-MHC specificity of T cell recognition', *Cell*, 157: 1073-87.
- Black, J. B., K. C. Sanderlin, C. S. Goldsmith, H. E. Gary, C. Lopez, and P. E. Pellett. 1989. 'Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29', *J Virol Methods*, 26: 133-45.
- Bollard, C. M., I. Kuehnle, A. Leen, C. M. Rooney, and H. E. Heslop. 2004. 'Adoptive immunotherapy for posttransplantation viral infections', *Biol Blood Marrow Transplant*, 10: 143-55.
- Boni, C., D. Cavazzini, A. Bolchi, M. Rossi, A. Vecchi, C. Tiezzi, V. Barili, P. Fiscaro, C. Ferrari, and S. Ottonello. 2021. 'Degenerate CD8 Epitopes Mapping to Structurally Constrained Regions of the Spike Protein: A T Cell-Based Way-Out From the SARS-CoV-2 Variants Storm', *Front Immunol*, 12: 730051.
- Boutolleau, D., C. Fernandez, E. André, B. M. Imbert-Marcille, N. Milpied, H. Agut, and A. Gautheret-Dejean. 2003. 'Human herpesvirus (HHV)-6 and HHV-7: two closely related viruses with different infection profiles in stem cell transplantation recipients', *J Infect Dis*, 187: 179-86.
- Boutolleau, David, Olivia Bonduelle, Amélie Sabard, Laure Devers, Henri Agut, and Agnès Gautheret-Dejean. 2005. 'Detection of human herpesvirus 7 DNA in peripheral blood reflects mainly CD4+ cell count in patients infected with HIV', *Journal of Medical Virology*, 76: 223-28.
- Braun, D K, G Dominguez, and P E Pellett. 1997. 'Human herpesvirus 6', *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 521-67.
- Brenchley, J. M., N. J. Karandikar, M. R. Betts, D. R. Ambrozak, B. J. Hill, L. E. Crotty, J. P. Casazza, J. Kuruppu, S. A. Migueles, M. Connors, M. Roederer, D. C. Douek, and R. A. Koup. 2003. 'Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8+ T cells', *Blood*, 101: 2711-20.
- Bruel, T., J. Hadjadj, P. Maes, D. Planas, A. Seve, I. Staropoli, F. Guivel-Benhassine, F. Porrot, W. H. Bolland, Y. Nguyen, M. Casadevall, C. Charre, H. Péré, D. Veyer, M. Prot, A. Baidaliuk, L. Cuyppers, C. Planchais, H. Mouquet, G. Baele, L. Mouthon, L. Hocqueloux, E. Simon-Loriere, E. André, B. Terrier, T. Prazuck, and O. Schwartz. 2022. 'Serum neutralization of SARS-CoV-2 Omicron sublineages BA.1 and BA.2 in patients receiving monoclonal antibodies', *Nat Med*, 28: 1297-302.
- Buchan, S. A., H. Chung, K. A. Brown, P. C. Austin, D. B. Fell, J. B. Gubbay, S. Nasreen, K. L. Schwartz, M. E. Sundaram, M. Tadrous, K. Wilson, S. E. Wilson, and J. C. Kwong. 2022. 'Estimated Effectiveness of COVID-19 Vaccines Against Omicron or Delta Symptomatic Infection and Severe Outcomes', *JAMA Netw Open*, 5: e2232760.
- Bunde, T., A. Kirchner, B. Hoffmeister, D. Habedank, R. Hetzer, G. Cherepnev, S. Proesch, P. Reinke, H. D. Volk, H. Lehmkuhl, and F. Kern. 2005. 'Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells', *J Exp Med*, 201: 1031-6.

- Burrows, S. R., S. L. Silins, D. J. Moss, R. Khanna, I. S. Misko, and V. P. Arguet. 1995. 'T cell receptor repertoire for a viral epitope in humans is diversified by tolerance to a background major histocompatibility complex antigen', *J Exp Med*, 182: 1703-15.
- Cardinali, G., M. Gentile, M. Cirone, C. Zompetta, L. Frati, A. Faggioni, and M. R. Torrisi. 1998. 'Viral glycoproteins accumulate in newly formed annulate lamellae following infection of lymphoid cells by human herpesvirus 6', *J Virol*, 72: 9738-46.
- Caselli, Elisabetta, Maria Chiara Zatelli, Roberta Rizzo, Sabrina Benedetti, Debora Martorelli, Giorgio Trasforini, Enzo Cassai, Ettore C. degli Uberti, Dario Di Luca, and Riccardo Dolcetti. 2012. 'Virologic and Immunologic Evidence Supporting an Association between HHV-6 and Hashimoto's Thyroiditis', *PLOS Pathogens*, 8: e1002951.
- Caserta, Mary T., Caroline B. Hall, Richard L. Canfield, Philip Davidson, Gerry Lofthus, Kenneth Schnabel, Jennifer Carnahan, Lynne Shelley, and Hongyue Wang. 2014. 'Early Developmental Outcomes of Children With Congenital HHV-6 Infection', *Pediatrics*, 134: 1111-18.
- Cele, S., L. Jackson, D. S. Khoury, K. Khan, T. Moyo-Gwete, H. Tegally, J. E. San, D. Cromer, C. Scheepers, D. G. Amoako, F. Karim, M. Bernstein, G. Lustig, D. Archary, M. Smith, Y. Ganga, Z. Jule, K. Reedoy, S. H. Hwa, J. Giandhari, J. M. Blackburn, B. I. Gosnell, S. S. Abdool Karim, W. Hanekom, A. von Gottberg, J. N. Bhiman, R. J. Lessells, M. S. Moosa, M. P. Davenport, T. de Oliveira, P. L. Moore, and A. Sigal. 2022. 'Omicron extensively but incompletely escapes Pfizer BNT162b2 neutralization', *Nature*, 602: 654-56.
- Cenerenti, M., M. Saillard, P. Romero, and C. Jandus. 2022. 'The Era of Cytotoxic CD4 T Cells', *Front Immunol*, 13: 867189.
- Chan, P. K., H. K. Ng, M. Hui, and A. F. Cheng. 2001. 'Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain', *J Med Virol*, 64: 42-6.
- Chou, S., and G. I. Marousek. 1994. 'Analysis of interstrain variation in a putative immediate-early region of human herpesvirus 6 DNA and definition of variant-specific sequences', *Virology*, 198: 370-6.
- Clark, D. A., and P. D. Griffiths. 2003. 'Human herpesvirus 6: relevance of infection in the immunocompromised host', *Br J Haematol*, 120: 384-95.
- Clarke, K. E. N., J. M. Jones, Y. Deng, E. Nycz, A. Lee, R. Iachan, A. V. Gundlapalli, A. J. Hall, and A. MacNeil. 2022. 'Seroprevalence of Infection-Induced SARS-CoV-2 Antibodies - United States, September 2021-February 2022', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 71: 606-08.
- Cohen, K. W., S. L. Linderman, Z. Moodie, J. Czartoski, L. Lai, G. Mantus, C. Norwood, L. E. Nyhoff, V. V. Edara, K. Floyd, S. C. De Rosa, H. Ahmed, R. Whaley, S. N. Patel, B. Prigmore, M. P. Lemos, C. W. Davis, S. Furth, J. B. O'Keefe, M. P. Gharpure, S. Gunisetty, K. Stephens, R. Antia, V. I. Zarnitsyna, D. S. Stephens, S. Edupuganti, N. Roupael, E. J. Anderson, A. K. Mehta, J. Wrammert, M. S. Suthar, R. Ahmed, and M. J. McElrath. 2021. 'Longitudinal analysis shows durable and broad immune memory after SARS-CoV-2 infection with persisting antibody responses and memory B and T cells', *Cell Rep Med*, 2: 100354.
- Crawford, John R., Nadja Kadom, Maria Rita Santi, Brian Mariani, and Bennett L. Lavenstein. 2007. 'Human Herpesvirus 6 Rhombencephalitis in Immunocompetent Children', *Journal of Child Neurology*, 22: 1260-68.
- Dan, J. M., J. Mateus, Y. Kato, K. M. Hastie, E. D. Yu, C. E. Faliti, A. Grifoni, S. I. Ramirez, S. Haupt, A. Frazier, C. Nakao, V. Rayaprolu, S. A. Rawlings, B. Peters, F. Krammer, V. Simon, E. O. Saphire, D. M. Smith, D. Weiskopf, A. Sette, and S. Crotty. 2021. 'Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection', *Science*, 371.
- Davison, A. J. 2014. 'Herpesviruses: General Features☆.' in *Reference Module in Biomedical Sciences* (Elsevier).

- De Bolle, L., L. Naesens, and E. De Clercq. 2005. 'Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy', *Clin Microbiol Rev*, 18: 217-45.
- De Bolle, L., J. Van Loon, E. De Clercq, and Lieve Naesens. 2005. 'Quantitative analysis of human herpesvirus 6 cell tropism', *Journal of Medical Virology*, 75: 76-85.
- de Silva, T. I., G. Liu, B. B. Lindsey, D. Dong, S. C. Moore, N. S. Hsu, D. Shah, D. Wellington, A. J. Mentzer, A. Angyal, R. Brown, M. D. Parker, Z. Ying, X. Yao, L. Turtle, S. Dunachie, M. K. Maini, G. Ogg, J. C. Knight, Y. Peng, S. L. Rowland-Jones, and T. Dong. 2021. 'The impact of viral mutations on recognition by SARS-CoV-2 specific T cells', *iScience*, 24: 103353.
- Deng, H., and S. Dewhurst. 1998. 'Functional identification and analysis of cis-acting sequences which mediate genome cleavage and packaging in human herpesvirus 6', *J Virol*, 72: 320-9.
- Dewhurst, S., S. C. Dollard, P. E. Pellett, and T. R. Dambaugh. 1993. 'Identification of a lytic-phase origin of DNA replication in human herpesvirus 6B strain Z29', *J Virol*, 67: 7680-3.
- Dittrich, M., and P. V. Lehmann. 2012. 'Statistical analysis of ELISPOT assays', *Methods Mol Biol*, 792: 173-83.
- Dolton, G., C. Rius, M. S. Hasan, A. Wall, B. Szomolay, E. Behiry, T. Whalley, J. Southgate, A. Fuller, T. Morin, K. Topley, L. R. Tan, P. J. R. Goulder, O. B. Spiller, P. J. Rizkallah, L. C. Jones, T. R. Connor, and A. K. Sewell. 2022. 'Emergence of immune escape at dominant SARS-CoV-2 killer T cell epitope', *Cell*, 185: 2936-51.e19.
- Dominguez, G., T. R. Dambaugh, F. R. Stamey, S. Dewhurst, N. Inoue, and P. E. Pellett. 1999. 'Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A', *J Virol*, 73: 8040-52.
- Dong, Y., T. Dai, B. Wang, L. Zhang, L. H. Zeng, J. Huang, H. Yan, L. Zhang, and F. Zhou. 2021. 'The way of SARS-CoV-2 vaccine development: success and challenges', *Signal Transduct Target Ther*, 6: 387.
- Dyer, O. 2021. 'Covid-19: Delta infections threaten herd immunity vaccine strategy', *BMJ*, 374: n1933.
- Elkington, R., S. Walker, T. Crough, M. Menzies, J. Tellam, M. Bharadwaj, and R. Khanna. 2003. 'Ex vivo profiling of CD8<sup>+</sup>-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers', *J Virol*, 77: 5226-40.
- Elliott, P., O. Eales, N. Steyn, D. Tang, B. Bodinier, H. Wang, J. Elliott, M. Whitaker, C. Atchison, P. J. Diggle, A. J. Page, A. J. Trotter, D. Ashby, W. Barclay, G. Taylor, H. Ward, A. Darzi, G. S. Cooke, C. A. Donnelly, and M. Chadeau-Hyam. 2022. 'Twin peaks: The Omicron SARS-CoV-2 BA.1 and BA.2 epidemics in England', *Science*, 376: eabq4411.
- Endo, Akifumi, Ken Watanabe, Tamae Ohye, Kyoko Suzuki, Tomoyo Matsubara, Norio Shimizu, Hiroki Kurahashi, Tetsushi Yoshikawa, Harutaka Katano, Naoki Inoue, Kohsuke Imai, Masatoshi Takagi, Tomohiro Morio, and Shuki Mizutani. 2014. 'Molecular and Virological Evidence of Viral Activation From Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6A in a Patient With X-Linked Severe Combined Immunodeficiency', *Clinical Infectious Diseases*, 59: 545-48.
- Enssle, J. C., J. Campe, A. Schwenger, E. Wiercinska, H. Hellstern, R. Durrwald, M. A. Rieger, S. Wolf, O. Ballo, B. Steffen, H. Serve, H. Bonig, H. F. Rabenau, M. Widera, S. Ciesek, I. V. Metzler, and E. Ullrich. 2022. 'Severe impairment of T-cell responses to BNT162b2 immunization in patients with multiple myeloma', *Blood*, 139: 137-42.
- Fastenackels, S., C. Bayard, M. Larsen, P. Magnier, P. Bonnafous, N. Seddiki, V. Appay, A. Gautheret-Dejean, and D. Sauce. 2019. 'Phenotypic and Functional Differences between Human Herpesvirus 6- and Human Cytomegalovirus-Specific T Cells', *J Virol*, 93.

- Fendler, A., S. T. C. Shepherd, L. Au, K. A. Wilkinson, M. Wu, F. Byrne, M. Cerrone, A. M. Schmitt, N. Joharatnam-Hogan, B. Shum, Z. Tippu, K. Rzeniewicz, L. A. Boos, R. Harvey, E. Carlyle, K. Edmonds, L. Del Rosario, S. Sarker, K. Lingard, M. Mangwende, L. Holt, H. Ahmod, J. Korteweg, T. Foley, J. Bazin, W. Gordon, T. Barber, A. Emslie-Henry, W. Xie, C. L. Gerard, D. Deng, E. C. Wall, A. Agua-Doce, S. Namjou, S. Caidan, M. Gavrielides, J. I. MacRae, G. Kelly, K. Peat, D. Kelly, A. Murra, K. Kelly, M. O'Flaherty, L. Dowdie, N. Ash, F. Gronthoud, R. L. Shea, G. Gardner, D. Murray, F. Kinnaird, W. Cui, J. Pascual, S. Rodney, J. Mencil, O. Curtis, C. Stephenson, A. Robinson, B. Oza, S. Farag, I. Leslie, A. Rogiers, S. Iyengar, M. Ethell, C. Messiou, D. Cunningham, I. Chau, N. Starling, N. Turner, L. Welsh, N. van As, R. L. Jones, J. Droney, S. Banerjee, K. C. Tatham, M. O'Brien, K. Harrington, S. Bhide, A. Okines, A. Reid, K. Young, A. J. S. Furness, L. Pickering, C. Swanton, S. Gandhi, S. Gamblin, D. L. V. Bauer, G. Kassiotis, S. Kumar, N. Yousaf, S. Jhanji, E. Nicholson, M. Howell, S. Walker, R. J. Wilkinson, J. Larkin, and S. Turajlic. 2021. 'Adaptive immunity and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern following vaccination in patients with cancer: the CAPTURE study', *Nat Cancer*, 2: 1305-20.
- Ferretti, Andrew P., Tomasz Kula, Yifan Wang, Dalena M. V. Nguyen, Adam Weinheimer, Garrett S. Dunlap, Qikai Xu, Nancy Nabilsi, Candace R. Perullo, Alexander W. Cristofaro, Holly J. Whitton, Amy Virbasius, Kenneth J. Olivier, Lyndsey R. Buckner, Angela T. Alistar, Eric D. Whitman, Sarah A. Bertino, Shrikanta Chattopadhyay, and Gavin MacBeath. 2020. 'Unbiased Screens Show CD8+ T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein', *Immunity*, 53: 1095-107.e3.
- Franchini, M., D. Focosi, E. Percivalle, M. Beccaria, M. Garuti, O. Arar, A. Pecoriello, F. Spreafico, G. Greco, S. Bertacco, M. Ghirardini, T. Santini, M. Schiavulli, M. Stefania, T. Gagliardo, J. C. Sammartino, A. Ferrari, M. Zani, A. Ballotari, C. Glingani, and F. Baldanti. 2022. 'Variant of Concern-Matched COVID-19 Convalescent Plasma Usage in Seronegative Hospitalized Patients', *Viruses*, 14.
- Frenkel, N, E C Schirmer, L S Wyatt, G Katsafanas, E Roffman, R M Danovich, and C H June. 1990. 'Isolation of a new herpesvirus from human CD4+ T cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87: 748-52.
- Fujikawa, L. S., S. Z. Salahuddin, D. Ablashi, A. G. Palestine, H. Masur, R. B. Nussenblatt, and R. C. Gallo. 1986. 'HTLV-III in the tears of AIDS patients', *Ophthalmology*, 93: 1479-81.
- Fujisaki, H., K. Tanaka-Taya, H. Tanabe, T. Hara, H. Miyoshi, S. Okada, and K. Yamanishi. 1998. 'Detection of human herpesvirus 7 (HHV-7) DNA in breast milk by polymerase chain reaction and prevalence of HHV-7 antibody in breast-fed and bottle-fed children', *J Med Virol*, 56: 275-9.
- Gao, Y., C. Cai, A. Grifoni, T. R. Müller, J. Niessl, A. Olofsson, M. Humbert, L. Hansson, A. Österborg, P. Bergman, P. Chen, A. Olsson, J. K. Sandberg, D. Weiskopf, D. A. Price, H. G. Ljunggren, A. C. Karlsson, A. Sette, S. Aleman, and M. Buggert. 2022. 'Ancestral SARS-CoV-2-specific T cells cross-recognize the Omicron variant', *Nat Med*, 28: 472-76.
- Gerdemann, Ulrike, Laura Keukens, Jacqueline M. Keirnan, Usha L. Katari, Chinh T. Q. Nguyen, Anne P. de Pagter, Carlos A. Ramos, Alana Kennedy-Nasser, Stephen M. Gottschalk, Helen E. Heslop, Malcolm K. Brenner, Cliona M. Rooney, and Ann M. Leen. 2013. 'Immunotherapeutic strategies to prevent and treat human herpesvirus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation', *Blood*, 121: 207-18.
- Gobeil, S. M., K. Janowska, S. McDowell, K. Mansouri, R. Parks, V. Stalls, M. F. Kopp, K. Manne, D. Li, K. Wiehe, K. O. Saunders, R. J. Edwards, B. Korber, B. F. Haynes, R. Henderson, and P. Acharya. 2021. 'Effect of natural mutations of SARS-CoV-2 on spike structure, conformation, and antigenicity', *Science*, 373.
- Goel, R. R., M. M. Painter, S. A. Apostolidis, D. Mathew, W. Meng, A. M. Rosenfeld, K. A. Lundgreen, A. Reynaldi, D. S. Khoury, A. Pattekar, S. Gouma, L. Kuri-Cervantes, P. Hicks, S. Dysinger, A. Hicks, H. Sharma, S. Herring, S. Korte, A. E. Baxter, D. A. Oldridge, J. R. Giles, M. E. Weirick, C. M. McAllister, M. Awofolaju, N. Tanenbaum, E. M. Drapeau, J.

- Dougherty, S. Long, K. D'Andrea, J. T. Hamilton, M. McLaughlin, J. C. Williams, S. Adamski, O. Kuthuru, I. Frank, M. R. Betts, L. A. Vella, A. Grifoni, D. Weiskopf, A. Sette, S. E. Hensley, M. P. Davenport, P. Bates, E. T. Luning Prak, A. R. Greenplate, and E. J. Wherry. 2021. 'mRNA vaccines induce durable immune memory to SARS-CoV-2 and variants of concern', *Science*, 374: abm0829.
- Goldberg, Y., M. Mandel, Y. M. Bar-On, O. Bodenheimer, L. S. Freedman, N. Ash, S. Alroy-Preis, A. Huppert, and R. Milo. 2022. 'Protection and Waning of Natural and Hybrid Immunity to SARS-CoV-2', *N Engl J Med*, 386: 2201-12.
- Gompels, U. A., and H. A. Macaulay. 1995. 'Characterization of human telomeric repeat sequences from human herpesvirus 6 and relationship to replication', *J Gen Virol*, 76 ( Pt 2): 451-8.
- Gravel, Annie, Isabelle Dubuc, Guillaume Morissette, Ruth H. Sedlak, Keith R. Jerome, and Louis Flamand. 2015. 'Inherited chromosomally integrated human herpesvirus 6 as a predisposing risk factor for the development of angina pectoris', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 8058-63.
- Grifoni, A., J. Sidney, R. Vita, B. Peters, S. Crotty, D. Weiskopf, and A. Sette. 2021. 'SARS-CoV-2 human T cell epitopes: Adaptive immune response against COVID-19', *Cell Host Microbe*, 29: 1076-92.
- Grifoni, A., D. Weiskopf, S. I. Ramirez, J. Mateus, J. M. Dan, C. R. Moderbacher, S. A. Rawlings, A. Sutherland, L. Premkumar, R. S. Jadi, D. Marrama, A. M. de Silva, A. Frazier, A. F. Carlin, J. A. Greenbaum, B. Peters, F. Krammer, D. M. Smith, S. Crotty, and A. Sette. 2020. 'Targets of T Cell Responses to SARS-CoV-2 Coronavirus in Humans with COVID-19 Disease and Unexposed Individuals', *Cell*, 181: 1489-501.e15.
- Hachmann, N. P., J. Miller, A. Y. Collier, J. D. Ventura, J. Yu, M. Rowe, E. A. Bondzie, O. Powers, N. Surve, K. Hall, and D. H. Barouch. 2022. 'Neutralization Escape by SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BA.2.12.1, BA.4, and BA.5', *N Engl J Med*, 387: 86-88.
- Hagemann, K., K. Riecken, J. M. Jung, H. Hildebrandt, S. Menzel, M. J. Bunders, B. Fehse, F. Koch-Nolte, F. Heinrich, S. Peine, J. Schulze Zur Wiesch, T. T. Brehm, M. M. Addo, M. Lütgehetmann, and M. Alfeld. 2022. 'Natural killer cell-mediated ADCC in SARS-CoV-2-infected individuals and vaccine recipients', *Eur J Immunol*, 52: 1297-307.
- Haldane, V., A. S. Jung, R. Neill, S. Singh, S. Wu, M. Jamieson, M. Verma, M. Tan, C. De Foo, S. M. Abdalla, P. Shrestha, A. Q. Chua, A. Nordström, and H. Legido-Quigley. 2021. 'From response to transformation: how countries can strengthen national pandemic preparedness and response systems', *BMJ*, 375: e067507.
- Hall, Caroline Breese, Christine E. Long, Kenneth C. Schnabel, Mary T. Caserta, Kim M. McIntyre, Maria A. Costanzo, Anne Knott, Stephen Dewhurst, Richard A. Insel, and Leon G. Epstein. 1994. 'Human Herpesvirus-6 Infection in Children -- A Prospective Study of Complications and Reactivation', *New England Journal of Medicine*, 331: 432-38.
- Hanahan, D. 1983. 'Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids', *J Mol Biol*, 166: 557-80.
- Hanson, D. J., O. Tsvetkova, G. F. Rerolle, A. L. Greninger, A. Sette, L. Jing, V. L. Campbell, and D. M. Koelle. 2019. 'Genome-Wide Approach to the CD4 T-Cell Response to Human Herpesvirus 6B', *J Virol*, 93.
- Harberts, Erin, Karen Yao, Jillian E. Wohler, Dragan Maric, Joan Ohayon, Robert Henkin, and Steven Jacobson. 2011. 'Human herpesvirus-6 entry into the central nervous system through the olfactory pathway', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108: 13734-39.

- Harvey, W. T., A. M. Carabelli, B. Jackson, R. K. Gupta, E. C. Thomson, E. M. Harrison, C. Ludden, R. Reeve, A. Rambaut, S. J. Peacock, and D. L. Robertson. 2021. 'SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape', *Nat Rev Microbiol*, 19: 409-24.
- Heslop, H. E. 2009. 'How I treat EBV lymphoproliferation', *Blood*, 114: 4002-8.
- Hoffmann, M., H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T. S. Schiergens, G. Herrler, N. H. Wu, A. Nitsche, M. A. Müller, C. Drosten, and S. Pöhlmann. 2020. 'SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor', *Cell*, 181: 271-80.e8.
- Hogestyn, Jessica, David Mock, and Margot Mayer-Proschel. 2018. 'Contributions of neurotropic human herpesviruses herpes simplex virus 1 and human herpesvirus 6 to neurodegenerative disease pathology', *Neural Regeneration Research*, 13: 211-21.
- Hu, B., H. Guo, P. Zhou, and Z. L. Shi. 2021. 'Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19', *Nat Rev Microbiol*, 19: 141-54.
- Huang, I., and R. Pranata. 2020. 'Lymphopenia in severe coronavirus disease-2019 (COVID-19): systematic review and meta-analysis', *J Intensive Care*, 8: 36.
- Huth, A., X. Liang, S. Krebs, H. Blum, and A. Moosmann. 2019. 'Antigen-Specific TCR Signatures of Cytomegalovirus Infection', *J Immunol*, 202: 979-90.
- Iampietro, M., G. Morissette, A. Gravel, and L. Flamand. 2014. 'Inhibition of interleukin-2 gene expression by human herpesvirus 6B U54 tegument protein', *J Virol*, 88: 12452-63.
- Imai, K., Y. Kitagawa, S. Tabata, K. Kubota, M. Nagura-Ikeda, M. Matsuoka, K. Miyoshi, J. Sakai, N. Ishibashi, N. Tarumoto, S. Takeuchi, T. Ito, S. Maesaki, K. Tamura, and T. Maeda. 2021. 'Antibody response patterns in COVID-19 patients with different levels of disease severity in Japan', *J Med Virol*, 93: 3211-18.
- Inoue, N., T. R. Dambaugh, J. C. Rapp, and P. E. Pellett. 1994. 'Alphaherpesvirus origin-binding protein homolog encoded by human herpesvirus 6B, a betaherpesvirus, binds to nucleotide sequences that are similar to ori regions of alphaherpesviruses', *J Virol*, 68: 4126-36.
- Isegawa, Y., T. Mukai, K. Nakano, M. Kagawa, J. Chen, Y. Mori, T. Sunagawa, K. Kawanishi, J. Sashihara, A. Hata, P. Zou, H. Kosuge, and K. Yamanishi. 1999. 'Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B', *J Virol*, 73: 8053-63.
- Jackson, K. R., D. A. Antunes, A. H. Talukder, A. R. Maleki, K. Amagai, A. Salmon, A. S. Katailaha, Y. Chiu, R. Fasoulis, M. M. Rigo, J. R. Abella, B. D. Melendez, F. Li, Y. Sun, H. M. Sonnemann, V. Belousov, F. Frenkel, S. Justesen, A. Makaju, Y. Liu, D. Horn, D. Lopez-Ferrer, A. F. Huhmer, P. Hwu, J. Roszik, D. Hawke, L. E. Kavraki, and G. Lizée. 2022. 'Charge-based interactions through peptide position 4 drive diversity of antigen presentation by human leukocyte antigen class I molecules', *PNAS Nexus*, 1: pgac124.
- Jahan, N., A. Brahma, M. S. Kumar, B. S. Bagepally, M. Ponnaiah, T. Bhatnagar, and M. V. Murhekar. 2022. 'Seroprevalence of IgG antibodies against SARS-CoV-2 in India, March 2020 to August 2021: a systematic review and meta-analysis', *Int J Infect Dis*, 116: 59-67.
- Janetzki, S., and C. M. Britten. 2012. 'The impact of harmonization on ELISPOT assay performance', *Methods Mol Biol*, 792: 25-36.
- Jensen, B., N. Luebke, T. Feldt, V. Keitel, T. Brandenburger, D. Kindgen-Milles, M. Lutterbeck, N. F. Freise, D. Schoeler, R. Haas, A. Dilthey, O. Adams, A. Walker, J. Timm, and T. Luedde. 2021. 'Emergence of the E484K mutation in SARS-COV-2-infected immunocompromised patients treated with bamlanivimab in Germany', *Lancet Reg Health Eur*, 8: 100164.
- Johnson, M., I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, and T. L. Madden. 2008. 'NCBI BLAST: a better web interface', *Nucleic Acids Res*, 36: W5-9.

- Kared, H., S. Martelli, T. P. Ng, S. L. Pender, and A. Larbi. 2016. 'CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes', *Cancer Immunol Immunother*, 65: 441-52.
- Kastenmuller, W., G. Gasteiger, J. H. Gronau, R. Baier, R. Ljapoci, D. H. Busch, and I. Drexler. 2007. 'Cross-competition of CD8+ T cells shapes the immunodominance hierarchy during boost vaccination', *J Exp Med*, 204: 2187-98.
- Katz, L. M. 2021. '(A Little) Clarity on Convalescent Plasma for Covid-19', *N Engl J Med*, 384: 666-68.
- Keeton, R., M. B. Tincho, A. Ngomti, R. Baguma, N. Benede, A. Suzuki, K. Khan, S. Cele, M. Bernstein, F. Karim, S. V. Madzorera, T. Moyo-Gwete, M. Mennen, S. Skelem, M. Adriaanse, D. Mutithu, O. Aremu, C. Stek, E. du Bruyn, M. A. Van Der Mescht, Z. de Beer, T. R. de Villiers, A. Bodenstern, G. van den Berg, A. Mendes, A. Strydom, M. Venter, J. Giandhari, Y. Naidoo, S. Pillay, H. Tegally, A. Grifoni, D. Weiskopf, A. Sette, R. J. Wilkinson, T. de Oliveira, L. G. Bekker, G. Gray, V. Ueckermann, T. Rossouw, M. T. Boswell, J. N. Bhiman, P. L. Moore, A. Sigal, N. A. B. Ntusi, W. A. Burgers, and C. Riou. 2022. 'T cell responses to SARS-CoV-2 spike cross-recognize Omicron', *Nature*, 603: 488-92.
- Kemp, S. A., D. A. Collier, R. P. Datir, Iatm Ferreira, S. Gayed, A. Jahun, M. Hosmillo, C. Rees-Spear, P. Mlcochova, I. U. Lumb, D. J. Roberts, A. Chandra, N. Temperton, K. Sharrocks, E. Blane, Y. Modis, K. E. Leigh, J. A. G. Briggs, M. J. van Gils, K. G. C. Smith, J. R. Bradley, C. Smith, R. Doffinger, L. Ceron-Gutierrez, G. Barcenas-Morales, D. D. Pollock, R. A. Goldstein, A. Smielewska, J. P. Skittrall, T. Gouliouris, I. G. Goodfellow, E. Gkrania-Klotsas, C. J. R. Illingworth, L. E. McCoy, and R. K. Gupta. 2021. 'SARS-CoV-2 evolution during treatment of chronic infection', *Nature*, 592: 277-82.
- Kempkes, B., D. Pich, R. Zeidler, and W. Hammerschmidt. 1995. 'Immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 5875-9.
- Kern, F., N. Faulhaber, C. Frommel, E. Khatamzas, S. Prosch, C. Schonemann, I. Kretzschmar, R. Volkmer-Engert, H. D. Volk, and P. Reinke. 2000. 'Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides', *Eur J Immunol*, 30: 1676-82.
- Kern, F., N. Faulhaber, C. Frömmel, E. Khatamzas, S. Prösch, C. Schönemann, I. Kretzschmar, R. Volkmer-Engert, H. D. Volk, and P. Reinke. 2000. 'Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides', *Eur J Immunol*, 30: 1676-82.
- Kern, F., I. P. Surel, N. Faulhaber, C. Frömmel, J. Schneider-Mergener, C. Schönemann, P. Reinke, and H. D. Volk. 1999. 'Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited', *J Virol*, 73: 8179-84.
- Khanolkar, A. 2021. 'Elucidating T Cell and B Cell Responses to SARS-CoV-2 in Humans: Gaining Insights into Protective Immunity and Immunopathology', *Cells*, 11.
- Khatamzas, E., M. Antwerpen, A. Rehn, A. Graf, J. Hellmuth, A. Hollaus, A-W. Mohr, E. Gaitzsch, T. Weiglein, E. Georgi, C. Scherer, S. Stecher, S. Gruetzner, H. Blum, S. Krebs, A. Reischer, A. Leutbecher, M. Subklewe, A. Dick, S. Zange, P. Girl, K. Mueller, O. Weigert, K-P. Hopfner, H-J. Stemmler, M. von Bergwelt-Baildon, O. Keppler, R. Wölfel, M. Muenchhoff, and A. Moosmann. 2022. 'Accumulation of mutations in antibody and CD8 T cell epitopes in a B-cell depleted lymphoma patient with chronic SARS-CoV-2 infection', *Nature Communications*.
- Kielian, M. 2020. 'Enhancing host cell infection by SARS-CoV-2', *Science*, 370: 765-66.
- Kondo, Kazuhiro, Toshio Kondo, Toshiomi Okuno, Michiaki Takahashi, and Koichi Yamanishi. 1991. 'Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages', *Journal of General Virology*, 72: 1401-08.

- Kozlowski, S., M. Corr, M. Shirai, L. F. Boyd, C. D. Pendleton, J. A. Berzofsky, and D. H. Margulies. 1993. 'Multiple pathways are involved in the extracellular processing of MHC class I-restricted peptides', *J Immunol*, 151: 4033-44.
- Leibovitch, Emily C., and Steven Jacobson. 2014. 'Evidence linking HHV-6 with multiple sclerosis: an update', *Current Opinion in Virology*, 9: 127-33.
- Leveque, Nicolas, Camille Boulagnon, Camille Brasselet, François Lesaffre, David Boutolleau, Damien Metz, Paul Fornes, and Laurent Andreoletti. 2011. 'A fatal case of Human Herpesvirus 6 chronic myocarditis in an immunocompetent adult', *Journal of Clinical Virology*, 52: 142-45.
- Libster, R., G. Pérez Marc, D. Wappner, S. Coviello, A. Bianchi, V. Braem, I. Esteban, M. T. Caballero, C. Wood, M. Berrueta, A. Rondan, G. Lescano, P. Cruz, Y. Ritou, V. Fernández Viña, D. Álvarez Paggi, S. Esperante, A. Ferreti, G. Ofman, Á Ciganda, R. Rodriguez, J. Lantos, R. Valentini, N. Itcovici, A. Hintze, M. L. Oyarvide, C. Etchegaray, A. Neira, I. Name, J. Alfonso, R. López Castelo, G. Caruso, S. Rapelius, F. Alvez, F. Etchenique, F. Dimase, D. Alvarez, S. S. Aranda, C. Sánchez Yanotti, J. De Luca, S. Jares Baglivo, S. Laudanno, F. Nowogrodzki, R. Larrea, M. Silveyra, G. Leberzstein, A. Debonis, J. Molinos, M. González, E. Perez, N. Kreplak, S. Pastor Argüello, L. Gibbons, F. Althabe, E. Bergel, and F. P. Polack. 2021. 'Early High-Titer Plasma Therapy to Prevent Severe Covid-19 in Older Adults', *N Engl J Med*, 384: 610-18.
- Liebers, N., C. Speer, L. Benning, P. M. Bruch, I. Kraemer, J. Meissner, P. Schnitzler, H. G. Krausslich, P. Dreger, C. Mueller-Tidow, I. Poschke, and S. Dietrich. 2022. 'Humoral and cellular responses after COVID-19 vaccination in anti-CD20-treated lymphoma patients', *Blood*, 139: 142-47.
- Liu, L., S. Iketani, Y. Guo, J. F. Chan, M. Wang, L. Liu, Y. Luo, H. Chu, Y. Huang, M. S. Nair, J. Yu, K. K. Chik, T. T. Yuen, C. Yoon, K. K. To, H. Chen, M. T. Yin, M. E. Sobieszczyk, Y. Huang, H. H. Wang, Z. Sheng, K. Y. Yuen, and D. D. Ho. 2022. 'Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2', *Nature*, 602: 676-81.
- Liu, Y., J. Liu, B. A. Johnson, H. Xia, Z. Ku, C. Schindewolf, S. G. Widen, Z. An, S. C. Weaver, V. D. Menachery, X. Xie, and P. Y. Shi. 2022. 'Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant', *Cell Rep*, 39: 110829.
- Long, Q. X., B. Z. Liu, H. J. Deng, G. C. Wu, K. Deng, Y. K. Chen, P. Liao, J. F. Qiu, Y. Lin, X. F. Cai, D. Q. Wang, Y. Hu, J. H. Ren, N. Tang, Y. Y. Xu, L. H. Yu, Z. Mo, F. Gong, X. L. Zhang, W. G. Tian, L. Hu, X. X. Zhang, J. L. Xiang, H. X. Du, H. W. Liu, C. H. Lang, X. H. Luo, S. B. Wu, X. P. Cui, Z. Zhou, M. M. Zhu, J. Wang, C. J. Xue, X. F. Li, L. Wang, Z. J. Li, K. Wang, C. C. Niu, Q. J. Yang, X. J. Tang, Y. Zhang, X. M. Liu, J. J. Li, D. C. Zhang, F. Zhang, P. Liu, J. Yuan, Q. Li, J. L. Hu, J. Chen, and A. L. Huang. 2020. 'Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19', *Nat Med*, 26: 845-48.
- Lopez, C., P. Pellett, J. Stewart, C. Goldsmith, K. Sanderlin, J. Black, D. Warfield, and P. Feorino. 1988. 'Characteristics of human herpesvirus-6', *J Infect Dis*, 157: 1271-3.
- Louten, Jennifer. 2016. 'Chapter 13 - Herpesviruses.' in Jennifer Louten (ed.), *Essential Human Virology* (Academic Press: Boston).
- Lundegaard, C., K. Lamberth, M. Harndahl, S. Buus, O. Lund, and M. Nielsen. 2008. 'NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11', *Nucleic Acids Res*, 36: W509-12.
- Lusso, Paolo, and Robert C. Gallo. 1995. 'Human herpesvirus 6 in AIDS', *Immunology Today*, 16: 67-71.
- Maecker, B., Bergwelt-Baildon von, K. S. Anderson, R. H. Vonderheide, and J. L. Schultze. 2001. 'Linking genomics to immunotherapy by reverse immunology--'immunomics' in the new millennium', *Curr Mol Med*, 1: 609-19.

- Mardivirin, Laurent, Vincent Descamps, Aurélie Lacroix, Sylvie Delebassée, and Sylvie Ranger-Rogez. 2009. 'Early effects of drugs responsible for DRESS on HHV-6 replication in vitro', *Journal of Clinical Virology*, 46: 300-02.
- Martin, L. K., A. Hollaus, A. Stahuber, C. Hubener, A. Fraccaroli, J. Tischer, A. Schub, and A. Moosmann. 2018. 'Cross-sectional analysis of CD8 T cell immunity to human herpesvirus 6B', *PLoS Pathog*, 14: e1006991.
- Martin, L. K., A. Schub, S. Dillinger, and A. Moosmann. 2012. 'Specific CD8(+) T cells recognize human herpesvirus 6B', *Eur J Immunol*, 42: 2901-12.
- Matta, J., E. Wiernik, O. Robineau, F. Carrat, M. Touvier, G. Severi, X. de Lamballerie, H. Blanché, J. F. Deleuze, C. Gouraud, N. Hoertel, B. Ranque, M. Goldberg, M. Zins, and C. Lemogne. 2022. 'Association of Self-reported COVID-19 Infection and SARS-CoV-2 Serology Test Results With Persistent Physical Symptoms Among French Adults During the COVID-19 Pandemic', *JAMA Intern Med*, 182: 19-25.
- Meng, B., A. Abdullahi, Iatm Ferreira, N. Goonawardane, A. Saito, I. Kimura, D. Yamasoba, P. P. Gerber, S. Fatih, S. Rathore, S. K. Zepeda, G. Papa, S. A. Kemp, T. Ikeda, M. Toyoda, T. S. Tan, J. Kuramochi, S. Mitsunaga, T. Ueno, K. Shirakawa, A. Takaori-Kondo, T. Brevini, D. L. Mallery, O. J. Charles, J. E. Bowen, A. Joshi, A. C. Walls, L. Jackson, D. Martin, K. G. C. Smith, J. Bradley, J. A. G. Briggs, J. Choi, E. Madissoon, K. B. Meyer, P. Mlcochova, L. Ceron-Gutierrez, R. Doffinger, S. A. Teichmann, A. J. Fisher, M. S. Pizzuto, A. de Marco, D. Corti, M. Hosmillo, J. H. Lee, L. C. James, L. Thukral, D. Veessler, A. Sigal, F. Sampaziotis, I. G. Goodfellow, N. J. Matheson, K. Sato, and R. K. Gupta. 2022. 'Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity', *Nature*, 603: 706-14.
- Miguez-Rey, E., D. Choi, S. Kim, S. Yoon, and O. Săndulescu. 2022. 'Monoclonal antibody therapies in the management of SARS-CoV-2 infection', *Expert Opin Investig Drugs*, 31: 41-58.
- Mishra, K. P., M. Singh, D. Saraswat, L. Ganju, and R. Varshney. 2022. 'Dysfunctional State of T Cells or Exhaustion During Chronic Viral Infections and COVID-19: A Review', *Viral Immunol*, 35: 284-90.
- Monroe, I., M. Dale, M. Schwabe, R. Schenkel, and P. J. Schenarts. 2022. 'The COVID-19 Patient in the Surgical Intensive Care Unit', *Surg Clin North Am*, 102: 1-21.
- Moosmann, A., I. Bigalke, J. Tischer, L. Schirrmann, J. Kasten, S. Tippmer, M. Leeping, D. Prevalsek, G. Jaeger, G. Ledderose, J. Mautner, W. Hammerschmidt, D. J. Schendel, and H. J. Kolb. 2010. 'Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells', *Blood*, 115: 2960-70.
- Mori, Y., X. Yang, P. Akkapaiboon, T. Okuno, and K. Yamanishi. 2003. 'Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46', *J Virol*, 77: 4992-9.
- Moss, P. 2022. 'The T cell immune response against SARS-CoV-2', *Nat Immunol*, 23: 186-93.
- Moss, P., and A. Rickinson. 2005. 'Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation', *Nat Rev Immunol*, 5: 9-20.
- Munnink, B. B. O., R. H. T. Nijhuis, N. Worp, M. Boter, B. Weller, B. E. Verstrepen, C. GeurtsvanKessel, M. L. Corsten, A. Russcher, and M. Koopmans. 2022. 'Highly Divergent SARS-CoV-2 Alpha Variant in Chronically Infected Immunocompromised Person', *Emerg Infect Dis*, 28: 1920-23.
- Nastke, M. D., A. Becerra, L. Yin, O. Dominguez-Amorocho, L. Gibson, L. J. Stern, and J. M. Calvo-Calle. 2012. 'Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6', *J Virol*, 86: 4776-92.

- Neidleman, J., X. Luo, A. F. George, M. McGregor, J. Yang, C. Yun, V. Murray, G. Gill, W. C. Greene, J. Vasquez, S. A. Lee, E. Ghosn, K. L. Lynch, and N. R. Roan. 2021. 'Distinctive features of SARS-CoV-2-specific T cells predict recovery from severe COVID-19', *Cell Rep*, 36: 109414.
- Nicholas, J. 1994. 'Nucleotide sequence analysis of a 21-kbp region of the genome of human herpesvirus-6 containing homologues of human cytomegalovirus major immediate-early and replication genes', *Virology*, 204: 738-50.
- Ogata, Masao. 2009. 'Human Herpesvirus 6 in Hematological Malignancies', *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 49: 57-67.
- Ogawa-Goto, K., K. Tanaka, W. Gibson, E. Moriishi, Y. Miura, T. Kurata, S. Irie, and T. Sata. 2003. 'Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid', *J Virol*, 77: 8541-7.
- Øster, B., and P. Höllsberg. 2002. 'Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells', *J Virol*, 76: 7578-86.
- Peggs, K. S. 2009. 'Adoptive T cell immunotherapy for cytomegalovirus', *Expert Opin Biol Ther*, 9: 725-36.
- Pellett, Philip E., Dharam V. Ablashi, Peter F. Ambros, Henri Agut, Mary T. Caserta, Vincent Descamps, Louis Flamand, Agnès Gautheret-Dejean, Caroline B. Hall, Rammurti T. Kamble, Uwe Kuehl, Dirk Lassner, Irmeli Lautenschlager, Kristin S. Loomis, Mario Luppi, Paolo Lusso, Peter G. Medveczky, Jose G. Montoya, Yasuko Mori, Masao Ogata, Joshua C. Pritchett, Sylvie Rogez, Edward Seto, Katherine N. Ward, Tetsushi Yoshikawa, and Raymund R. Razonable. 2012. 'Chromosomally integrated human herpesvirus 6: questions and answers', *Reviews in Medical Virology*, 22: 144-55.
- Peng, R., L. A. Wu, Q. Wang, J. Qi, and G. F. Gao. 2021. 'Cell entry by SARS-CoV-2', *Trends Biochem Sci*, 46: 848-60.
- Pfeiffer, B., Z. N. Berneman, F. Neipel, C. K. Chang, S. Tirwatnpong, and B. Chandran. 1993. 'Identification and mapping of the gene encoding the glycoprotein complex gp82-gp105 of human herpesvirus 6 and mapping of the neutralizing epitope recognized by monoclonal antibodies', *J Virol*, 67: 4611-20.
- Picone, P., T. Sanfilippo, R. Guggino, L. Scalisi, R. Monastero, R. Baschi, V. Mandalà, L. San Biagio, M. Rizzo, D. Giacomazza, C. Dispenza, and D. Nuzzo. 2022. 'Neurological Consequences, Mental Health, Physical Care, and Appropriate Nutrition in Long-COVID-19', *Cell Mol Neurobiol*: 1-11.
- Planas, D., D. Veyer, A. Baidaliuk, I. Staropoli, F. Guivel-Benhassine, M. M. Rajah, C. Planchais, F. Porrot, N. Robillard, J. Puech, M. Prot, F. Gallais, P. Gantner, A. Velay, J. Le Guen, N. Kassis-Chikhani, D. Edriss, L. Belec, A. Seve, L. Courtellemont, H. Péré, L. Hocqueloux, S. Fafi-Kremer, T. Prazuck, H. Mouquet, T. Bruel, E. Simon-Lorière, F. A. Rey, and O. Schwartz. 2021. 'Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization', *Nature*, 596: 276-80.
- Pruksananonda, Prasong, Caroline Breese Hall, Richard A. Insel, Kim McIntyre, Philip E. Pellett, Christine E. Long, Kenneth C. Schnabel, Patricia H. Pincus, Felicia R. Stamey, Timothy R. Dambaugh, and John A. Stewart. 1992. 'Primary Human Herpesvirus 6 Infection in Young Children', *New England Journal of Medicine*, 326: 1445-50.
- Rancan, C., L. Schirrmann, C. Huls, R. Zeidler, and A. Moosmann. 2015. 'Latent Membrane Protein LMP2A Impairs Recognition of EBV-Infected Cells by CD8+ T Cells', *PLoS Pathog*, 11: e1004906.
- Razonable, R. R. 2013. 'Human Herpesviruses 6, 7 and 8 in Solid Organ Transplant Recipients', *American Journal of Transplantation*, 13: 67-78.

- Rebora, Alfredo, Francesco Drago, and Francesco Broccolo. 2010. 'Pityriasis rosea and herpesviruses: Facts and controversies', *Clinics in Dermatology*, 28: 497-501.
- Reddehase, M. J., W. Mutter, K. Münch, H. J. Bühring, and U. H. Koszinowski. 1987. 'CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity', *J Virol*, 61: 3102-8.
- Revello, M. G., T. Lazzarotto, B. Guerra, A. Spinillo, E. Ferrazzi, A. Kustermann, S. Guaschino, P. Vergani, T. Todros, T. Frusca, A. Arossa, M. Furione, V. Rognoni, N. Rizzo, L. Gabrielli, C. Klersy, and G. Gerna. 2014. 'A randomized trial of hyperimmune globulin to prevent congenital cytomegalovirus', *N Engl J Med*, 370: 1316-26.
- Reynaud, J. M., J. F. Jégou, J. C. Welsch, and B. Horvat. 2014. 'Human herpesvirus 6A infection in CD46 transgenic mice: viral persistence in the brain and increased production of proinflammatory chemokines via Toll-like receptor 9', *J Virol*, 88: 5421-36.
- Riddell, S. R., P. D. Greenberg, R. W. Overell, T. P. Loughran, M. J. Gilbert, S. D. Lupton, J. Agosti, S. Scheeler, R. W. Coombs, and L. Corey. 1992. 'Phase I study of cellular adoptive immunotherapy using genetically modified CD8+ HIV-specific T cells for HIV seropositive patients undergoing allogeneic bone marrow transplant. The Fred Hutchinson Cancer Research Center and the University of Washington School of Medicine, Department of Medicine, Division of Oncology', *Hum Gene Ther*, 3: 319-38.
- Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. 'A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell', *Nature*, 393: 474-8.
- Rieke, G. J., K. van Bremen, J. Bischoff, M. ToVinh, M. B. Monin, S. Schlabe, J. Raabe, K. M. Kaiser, C. Finnemann, A. Odainic, A. Kudaliyanage, E. Latz, C. P. Strassburg, C. Boesecke, S. V. Schmidt, B. Krämer, J. K. Rockstroh, and J. Nattermann. 2022. 'Natural Killer Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Against SARS-CoV-2 After Natural Infection Is More Potent Than After Vaccination', *J Infect Dis*, 225: 1688-93.
- Sacre, K., S. Nguyen, C. Deback, G. Carcelain, J. P. Vernant, V. Leblond, B. Autran, and N. Dhedin. 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: 10143-52.
- Salahuddin, S. Z., D. V. Ablashi, P. D. Markham, S. F. Josephs, S. Sturzenegger, M. Kaplan, G. Halligan, P. Biberfeld, F. Wong-Staal, B. Kramarsky, and et al. 1986. 'Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders', *Science*, 234: 596-601.
- Sallusto, F., E. Kremmer, B. Palermo, A. Hoy, P. Ponath, S. Qin, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. 'Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells', *Eur J Immunol*, 29: 2037-45.
- Sanjuán, R., M. R. Nebot, N. Chirico, L. M. Mansky, and R. Belshaw. 2010. 'Viral mutation rates', *J Virol*, 84: 9733-48.
- Santoro, Fabio, Paul E. Kennedy, Giuseppe Locatelli, Mauro S. Malnati, Edward A. Berger, and Paolo Lusso. 1999. 'CD46 Is a Cellular Receptor for Human Herpesvirus 6', *Cell*, 99: 817-27.
- Sarkizova, S., S. Klaeger, P. M. Le, L. W. Li, G. Oliveira, H. Keshishian, C. R. Hartigan, W. Zhang, D. A. Braun, K. L. Ligon, P. Bachireddy, I. K. Zervantonakis, J. M. Rosenbluth, T. Ouspenskaia, T. Law, S. Justesen, J. Stevens, W. J. Lane, T. Eisenhaure, G. Lan Zhang, K. R. Clauser, N. Hacohen, S. A. Carr, C. J. Wu, and D. B. Keskin. 2020. 'A large peptidome dataset improves HLA class I epitope prediction across most of the human population', *Nat Biotechnol*, 38: 199-209.

- Schlott, F., D. Steubl, S. Ameres, A. Moosmann, S. Dreher, U. Heemann, V. Hösel, D. H. Busch, and M. Neuenhahn. 2018. 'Characterization and clinical enrichment of HLA-C\*07:02-restricted Cytomegalovirus-specific CD8+ T cells', *PLoS One*, 13: e0193554.
- Schub, A., I. G. Schuster, W. Hammerschmidt, and A. Moosmann. 2009. 'CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy', *J Immunol*, 183: 6819-30.
- Schuster, I. G., D. H. Busch, E. Eppinger, E. Kremmer, S. Milosevic, C. Hennard, C. Kuttler, J. W. Ellwart, B. Frankenberger, E. Nössner, C. Salat, C. Bogner, A. Borkhardt, H. J. Kolb, and A. M. Krackhardt. 2007. 'Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies', *Blood*, 110: 2931-9.
- Sekiguchi, Atsushi, Takayuki Kashiwagi, Akemi Ishida-Yamamoto, Hidetoshi Takahashi, Yoshio Hashimoto, Hiroshi Kimura, Mikiko Tohyama, Koji Hashimoto, and Hajime Iizuka. 2005. 'Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome due to Mexiletine Associated with Human Herpes Virus 6 and Cytomegalovirus Reactivation', *The Journal of Dermatology*, 32: 278-81.
- Servais, S., N. Dumontier, L. Biard, N. Schnepf, M. Resche-Rigon, R. Peffault de Latour, C. Scieux, M. Robin, M. Meunier, A. Xhaard, F. Sicre de Fontbrune, J. Le Goff, G. Socié, F. Simon, and M. C. Mazon. 2016. 'Response to antiviral therapy in haematopoietic stem cell transplant recipients with cytomegalovirus (CMV) reactivation according to the donor CMV serological status', *Clin Microbiol Infect*, 22: 289.e1-7.
- Shang, J., G. Ye, K. Shi, Y. Wan, C. Luo, H. Aihara, Q. Geng, A. Auerbach, and F. Li. 2020. 'Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2', *Nature*, 581: 221-24.
- Sheward, D. J., C. Kim, J. Fischbach, S. Muschiol, R. A. Ehling, N. K. Björkström, G. B. K. Hedestam, S. T. Reddy, J. Albert, T. P. Peacock, and B. Murrell. 2022. 'Evasion of neutralising antibodies by omicron sublineage BA.2.75', *Lancet Infect Dis*, 22: 1421-22.
- Shoukry, N. H., and C. M. Walker. 2021. 'T cell responses during HBV and HCV infections: similar but not quite the same?', *Curr Opin Virol*, 51: 80-86.
- Shrotri, M., A. M. D. Navaratnam, V. Nguyen, T. Byrne, C. Geismar, E. Fragaszy, S. Beale, W. L. E. Fong, P. Patel, J. Kovar, A. C. Hayward, and R. W. Aldridge. 2021. 'Spike-antibody waning after second dose of BNT162b2 or ChAdOx1', *Lancet*, 398: 385-87.
- Sigal, A., R. Milo, and W. Jassat. 2022. 'Estimating disease severity of Omicron and Delta SARS-CoV-2 infections', *Nat Rev Immunol*, 22: 267-69.
- Sims, S., C. Willberg, and P. Klenerman. 2010. 'MHC-peptide tetramers for the analysis of antigen-specific T cells', *Expert Rev Vaccines*, 9: 765-74.
- Spira, Thomas J., Lorna H. Bozeman, Karen C. Sanderlin, Donna T. Warfield, Paul M. Feorino, Robert C. Holman, John E. Kaplan, Daniel B. Fishbein, and Carlos Lopez. 1990. 'Lack of Correlation between Human Herpesvirus-6 Infection and the Course of Human Immunodeficiency Virus Infection', *The Journal of Infectious Diseases*, 161: 567-70.
- Stanton, R., G. W. Wilkinson, and J. D. Fox. 2003. 'Analysis of human herpesvirus-6 IE1 sequence variation in clinical samples', *J Med Virol*, 71: 578-84.
- Stief, T. A., T. Kaeuferle, T. R. Müller, M. Döring, L. M. Jablonowski, K. Schober, J. Feucht, K. M. Dennehy, S. Willier, F. Blaesche, R. Handgretinger, P. Lang, D. H. Busch, and T. Feuchtinger. 2022. 'Protective T cell receptor identification for orthotopic reprogramming of immunity in refractory virus infections', *Mol Ther*, 30: 198-208.
- Suzuki, Yosuke, Reiko Inagi, Toshiya Aono, Koichi Yamanishi, and Tetsuo Shiohara. 1998. 'Human Herpesvirus 6 Infection as a Risk Factor for the Development of Severe Drug-Induced Hypersensitivity Syndrome', *Archives of Dermatology*, 134: 1108-12.

- Sylwester, A. W., B. L. Mitchell, J. B. Edgar, C. Taormina, C. Pelte, F. Ruchti, P. R. Sleath, K. H. Grabstein, N. A. Hosken, F. Kern, J. A. Nelson, and L. J. Picker. 2005. 'Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells dominate the memory compartments of exposed subjects', *J Exp Med*, 202: 673-85.
- Takahashi, K., S. Sonoda, K. Higashi, T. Kondo, H. Takahashi, M. Takahashi, and K. Yamanishi. 1989. 'Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus', *J Virol*, 63: 3161-3.
- Takashita, E., S. Yamayoshi, V. Simon, H. van Bakel, E. M. Sordillo, A. Pekosz, S. Fukushi, T. Suzuki, K. Maeda, P. Halfmann, Y. Sakai-Tagawa, M. Ito, S. Watanabe, M. Imai, H. Hasegawa, and Y. Kawaoka. 2022. 'Efficacy of Antibodies and Antiviral Drugs against Omicron BA.2.12.1, BA.4, and BA.5 Subvariants', *N Engl J Med*, 387: 468-70.
- Takatsuka, H., T. Wakae, A. Mori, M. Okada, Y. Fujimori, Y. Takemoto, T. Okamoto, A. Kanamaru, and E. Kakishita. 2003. 'Endothelial damage caused by cytomegalovirus and human herpesvirus-6', *Bone Marrow Transplantation*, 31: 475-79.
- Tan, A. T., M. Linster, C. W. Tan, N. Le Bert, W. N. Chia, K. Kunasegaran, Y. Zhuang, C. Y. L. Tham, A. Chia, G. J. D. Smith, B. Young, S. Kalimuddin, J. G. H. Low, D. Lye, L. F. Wang, and A. Bertoletti. 2021. 'Early induction of functional SARS-CoV-2-specific T cells associates with rapid viral clearance and mild disease in COVID-19 patients', *Cell Rep*, 34: 108728.
- Tan, L. C., N. Gudgeon, N. E. Annels, P. Hansasuta, C. A. O'Callaghan, S. Rowland-Jones, A. J. McMichael, A. B. Rickinson, and M. F. Callan. 1999. 'A re-evaluation of the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells specific for EBV in healthy virus carriers', *J Immunol*, 162: 1827-35.
- Tanaka, Keiko, Toshio Kondo, Sadayoshi Torigoe, Shintaro Okada, Tetsu Mukai, and Koichi Yamanishi. 1994. 'Human herpesvirus 7: Another causal agent for roseola (exanthem subitum)', *The Journal of Pediatrics*, 125: 1-5.
- Tang, Huamin, Satoshi Serada, Akiko Kawabata, Megumi Ota, Emi Hayashi, Tetsuji Naka, Koichi Yamanishi, and Yasuko Mori. 2013. 'CD134 is a cellular receptor specific for human herpesvirus-6B entry', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110: 9096-99.
- Taniguchi, T., T. Shimamoto, Y. Isegawa, K. Kondo, and K. Yamanishi. 2000. 'Structure of transcripts and proteins encoded by U79-80 of human herpesvirus 6 and its subcellular localization in infected cells', *Virology*, 271: 307-20.
- Tarke, A., J. Sidney, N. Methot, E. D. Yu, Y. Zhang, J. M. Dan, B. Goodwin, P. Rubiro, A. Sutherland, E. Wang, A. Frazier, S. I. Ramirez, S. A. Rawlings, D. M. Smith, R. da Silva Antunes, B. Peters, R. H. Scheuermann, D. Weiskopf, S. Crotty, A. Grifoni, and A. Sette. 2021. 'Impact of SARS-CoV-2 variants on the total CD4(+) and CD8(+) T cell reactivity in infected or vaccinated individuals', *Cell Rep Med*, 2: 100355.
- Taylor, G. S., H. M. Long, J. M. Brooks, A. B. Rickinson, and A. D. Hislop. 2015. 'The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease', *Annu Rev Immunol*, 33: 787-821.
- Tembo, John, Mwila Kabwe, Lophina Chilukutu, Moses Chilufya, Nyaxewo Mwaanza, Chishala Chabala, Alimuddin Zumla, and Matthew Bates. 2014. 'Prevalence and Risk Factors for Betaherpesvirus DNAemia in Children >3 Weeks and <2 Years of Age Admitted to a Large Referral Hospital in Sub-Saharan Africa', *Clinical Infectious Diseases*, 60: 423-31.
- Teo, I. A., B. E. Griffin, and M. D. Jones. 1991. 'Characterization of the DNA polymerase gene of human herpesvirus 6', *J Virol*, 65: 4670-80.
- Tesini, Brenda L., Leon G. Epstein, and Mary T. Caserta. 2014. 'Clinical impact of primary infection with roseoloviruses', *Current Opinion in Virology*, 9: 91-96.

- Thomson, B. J., S. Dewhurst, and D. Gray. 1994. 'Structure and heterogeneity of the a sequences of human herpesvirus 6 strain variants U1102 and Z29 and identification of human telomeric repeat sequences at the genomic termini', *J Virol*, 68: 3007-14.
- Tincati, C., E. S. Cannizzo, M. Giacomelli, R. Badolato, A. d'Arminio Monforte, and G. Marchetti. 2020. 'Heightened Circulating Interferon-Inducible Chemokines, and Activated Pro-Cytolytic Th1-Cell Phenotype Features Covid-19 Aggravation in the Second Week of Illness', *Front Immunol*, 11: 580987.
- Tohyama, M., K. Hashimoto, M. Yasukawa, H. Kimura, T. Horikawa, K. Nakajima, Y. Urano, K. Matsumoto, M. Iijima, and N.H. Shear. 2007. 'Association of human herpesvirus 6 reactivation with the flaring and severity of drug-induced hypersensitivity syndrome', *British Journal of Dermatology*, 157: 934-40.
- Turner, S., D. DiLuca, and U. Gompels. 2002. 'Characterisation of a human herpesvirus 6 variant A 'amplicon' and replication modulation by U94-Rep 'latency gene"', *J Virol Methods*, 105: 331-41.
- Tzannou, I., A. Papadopoulou, S. Naik, K. Leung, C. A. Martinez, C. A. Ramos, G. Carrum, G. Sasa, P. Lulla, A. Watanabe, M. Kuvalekar, A. P. Gee, M. F. Wu, H. Liu, B. J. Grilley, R. A. Krance, S. Gottschalk, M. K. Brenner, C. M. Rooney, H. E. Heslop, A. M. Leen, and B. Omer. 2017. 'Off-the-Shelf Virus-Specific T Cells to Treat BK Virus, Human Herpesvirus 6, Cytomegalovirus, Epstein-Barr Virus, and Adenovirus Infections After Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation', *J Clin Oncol*, 35: 3547-57.
- Vita, R., S. Mahajan, J. A. Overton, S. K. Dhanda, S. Martini, J. R. Cantrell, D. K. Wheeler, A. Sette, and B. Peters. 2019. 'The Immune Epitope Database (IEDB): 2018 update', *Nucleic Acids Res*, 47: D339-d43.
- Walls, A. C., Y. J. Park, M. A. Tortorici, A. Wall, A. T. McGuire, and D. Veasley. 2020. 'Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein', *Cell*, 181: 281-92.e6.
- Wang, S., L. Quan, J. E. Chavarro, N. Slopen, L. D. Kubzansky, K. C. Koenen, J. H. Kang, M. G. Weisskopf, W. Branch-Elliman, and A. L. Roberts. 2022. 'Associations of Depression, Anxiety, Worry, Perceived Stress, and Loneliness Prior to Infection With Risk of Post-COVID-19 Conditions', *JAMA Psychiatry*.
- Ward, K N, N J Andrews, C M Verity, E Miller, and E M Ross. 2005. 'Human herpesviruses-6 and -7 each cause significant neurological morbidity in Britain and Ireland', *Archives of Disease in Childhood*, 90: 619-23.
- Weiskopf, D., D. J. Bangs, J. Sidney, R. V. Kolla, A. D. De Silva, A. M. de Silva, S. Crotty, B. Peters, and A. Sette. 2015. 'Dengue virus infection elicits highly polarized CX3CR1+ cytotoxic CD4+ T cells associated with protective immunity', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: E4256-63.
- Wheatley, A. K., and J. A. Juno. 2022. 'COVID-19 vaccines in the age of the delta variant', *Lancet Infect Dis*, 22: 429-30.
- Wiesner, M., C. Zentz, M. H. Hammer, M. Cobbold, F. Kern, H. J. Kolb, W. Hammerschmidt, R. Zeidler, and A. Moosmann. 2005. 'Selection of CMV-specific CD8+ and CD4+ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines', *Eur J Immunol*, 35: 2110-21.
- Wiesner, M., C. Zentz, C. Mayr, R. Wimmer, W. Hammerschmidt, R. Zeidler, and A. Moosmann. 2008. 'Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation', *PLoS One*, 3: e1464.
- Willett, B. J., J. Grove, O. A. MacLean, C. Wilkie, G. De Lorenzo, W. Furnon, D. Cantoni, S. Scott, N. Logan, S. Ashraf, M. Manali, A. Szemiel, V. Cowton, E. Vink, W. T. Harvey, C. Davis, P. Asamaphan, K. Smollett, L. Tong, R. Orton, J. Hughes, P. Holland, V. Silva, D. J. Pascall, K. Puxty, A. da Silva Filipe, G. Yebra, S. Shaaban, M. T. G. Holden, R. M. Pinto, R. Gunson, K. Templeton, P. R. Murcia, A. H. Patel, P. Klenerman, S. Dunachie, J. Haughney, D. L.

- Robertson, M. Palmarini, S. Ray, and E. C. Thomson. 2022. 'SARS-CoV-2 Omicron is an immune escape variant with an altered cell entry pathway', *Nat Microbiol*, 7: 1161-79.
- Wolf, K. A., J. C. Kwan, and J. P. Kamil. 2022. 'Structural Dynamics and Molecular Evolution of the SARS-CoV-2 Spike Protein', *mBio*, 13: e0203021.
- Wrtil, P. R., N. A. Schmacke, B. Karakoc, A. Dulovic, D. Junker, M. Becker, U. Rothbauer, A. Osterman, P. M. Spaeth, A. Rühle, M. Gapp, S. Schneider, M. Muenchhoff, J. C. Hellmuth, C. Scherer, J. Mayerle, M. Reincke, J. Behr, S. Kääh, B. Zwissler, M. von Bergwelt-Baildon, J. Eberle, L. Kaderali, N. Schneiderhan-Marra, V. Hornung, and O. T. Keppler. 2021. 'Evidence for increased SARS-CoV-2 susceptibility and COVID-19 severity related to pre-existing immunity to seasonal coronaviruses', *Cell Rep*, 37: 110169.
- Wu, F., S. Zhao, B. Yu, Y. M. Chen, W. Wang, Z. G. Song, Y. Hu, Z. W. Tao, J. H. Tian, Y. Y. Pei, M. L. Yuan, Y. L. Zhang, F. H. Dai, Y. Liu, Q. M. Wang, J. J. Zheng, L. Xu, E. C. Holmes, and Y. Z. Zhang. 2020. 'A new coronavirus associated with human respiratory disease in China', *Nature*, 579: 265-69.
- Xia, S., L. Wang, Y. Zhu, L. Lu, and S. Jiang. 2022. 'Origin, virological features, immune evasion and intervention of SARS-CoV-2 Omicron sublineages', *Signal Transduct Target Ther*, 7: 241.
- Yamanishi, K., T. Okuno, K. Shiraki, M. Takahashi, T. Kondo, Y. Asano, and T. Kurata. 1988. 'Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum', *Lancet*, 1: 1065-7.
- Yamasoba, D., I. Kimura, H. Nasser, Y. Morioka, N. Nao, J. Ito, K. Uriu, M. Tsuda, J. Zahradnik, K. Shirakawa, R. Suzuki, M. Kishimoto, Y. Kosugi, K. Kobiyama, T. Hara, M. Toyoda, Y. L. Tanaka, E. P. Butlertanaka, R. Shimizu, H. Ito, L. Wang, Y. Oda, Y. Orba, M. Sasaki, K. Nagata, K. Yoshimatsu, H. Asakura, M. Nagashima, K. Sadamasu, K. Yoshimura, J. Kuramochi, M. Seki, R. Fujiki, A. Kaneda, T. Shimada, T. A. Nakada, S. Sakao, T. Suzuki, T. Ueno, A. Takaori-Kondo, K. J. Ishii, G. Schreiber, H. Sawa, A. Saito, T. Irie, S. Tanaka, K. Matsuno, T. Fukuhara, T. Ikeda, and K. Sato. 2022. 'Virological characteristics of the SARS-CoV-2 Omicron BA.2 spike', *Cell*, 185: 2103-15.e19.
- Yoshida, M., F. Uno, Z. L. Bai, M. Yamada, S. Nii, T. Sata, T. Kurata, K. Yamanishi, and M. Takahashi. 1989. 'Electron microscopic study of a herpes-type virus isolated from an infant with exanthem subitum', *Microbiol Immunol*, 33: 147-54.
- Yoshikawa, Tetsushi, Masahiro Ohashi, Fumi Miyake, Ayano Fujita, Chie Usui, Ken Sugata, Sadao Suga, Shuji Hashimoto, and Yoshizo Asano. 2009. 'Exanthem Subitum-Associated Encephalitis: Nationwide Survey in Japan', *Pediatric Neurology*, 41: 353-58.
- Yu, J., A. Y. Collier, M. Rowe, F. Mardas, J. D. Ventura, H. Wan, J. Miller, O. Powers, B. Chung, M. Siamatu, N. P. Hachmann, N. Surve, F. Nampanya, A. Chandrashekar, and D. H. Barouch. 2022. 'Neutralization of the SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and BA.2 Variants', *N Engl J Med*, 386: 1579-80.
- Zentz, C., M. Wiesner, S. Man, B. Frankenberger, B. Wollenberg, P. Hillemanns, R. Zeidler, W. Hammerschmidt, and A. Moosmann. 2007. 'Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells', *Hum Immunol*, 68: 75-85.
- Zerr, D. M., A. S. Meier, S. S. Selke, L. M. Frenkel, M. L. Huang, A. Wald, M. P. Rhoads, L. Nguy, R. Bornemann, R. A. Morrow, and L. Corey. 2005. 'A population-based study of primary human herpesvirus 6 infection', *N Engl J Med*, 352: 768-76.
- Zerr, Danielle M., Jesse R. Fann, David Breiger, Michael Boeckh, Amanda L. Adler, Hu Xie, Colleen Delaney, Meei-Li Huang, Lawrence Corey, and Wendy M. Leisenring. 2011. 'HHV-6 reactivation and its effect on delirium and cognitive functioning in hematopoietic cell transplantation recipients', *Blood*, 117: 5243-49.

- Zhang, Enjie, Adam J. Bell, Gavin S. Wilkie, Nicolás M. Suárez, Chiara Batini, Colin D. Veal, Isaac Armendáriz-Castillo, Rita Neumann, Victoria E. Cotton, Yan Huang, David J. Porteous, Ruth F. Jarrett, Andrew J. Davison, Nicola J. Royle, and Rozanne M. Sandri-Goldin. 2017. 'Inherited Chromosomally Integrated Human Herpesvirus 6 Genomes Are Ancient, Intact, and Potentially Able To Reactivate from Telomeres', *Journal of Virology*, 91: e01137-17.
- Zhang, J., Y. Hu, J. Yang, W. Li, M. Zhang, Q. Wang, L. Zhang, G. Wei, Y. Tian, K. Zhao, A. Chen, B. Tan, J. Cui, D. Li, Y. Li, Y. Qi, D. Wang, Y. Wu, D. Li, B. Du, M. Liu, and H. Huang. 2022. 'Non-viral, specifically targeted CAR-T cells achieve high safety and efficacy in B-NHL', *Nature*, 609: 369-74.
- Zhang, Z., J. Mateus, C. H. Coelho, J. M. Dan, C. R. Moderbacher, R. I. Gálvez, F. H. Cortes, A. Grifoni, A. Tarke, J. Chang, E. A. Escarrega, C. Kim, B. Goodwin, N. I. Bloom, A. Frazier, D. Weiskopf, A. Sette, and S. Crotty. 2022. 'Humoral and cellular immune memory to four COVID-19 vaccines', *Cell*, 185: 2434-51.e17.
- Zheng, H. Y., M. Zhang, C. X. Yang, N. Zhang, X. C. Wang, X. P. Yang, X. Q. Dong, and Y. T. Zheng. 2020. 'Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients', *Cell Mol Immunol*, 17: 541-43.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen, die mich bei der Anfertigung meiner Doktorarbeit sehr unterstützt haben, **meinen großen Dank** aussprechen:

Zum einen möchte ich mich bei **Hon-Prof. Dr. Horst Domdey** dafür bedanken, dass er sich als Erstgutachter für meine Arbeit zur Verfügung gestellt hat und somit die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Universität übernommen hat.

Mein besonderer Dank gilt **PD Dr. Andreas Moosmann**, ohne den diese Arbeit nie zustande gekommen wäre. Vielen Dank für das spannende Thema, die wissenschaftliche Betreuung, die Diskussionsbereitschaft und die enorme Unterstützung bei der Umsetzung der gesamten Arbeit.

Auch möchte ich mich bei den Mitgliedern meines Thesis Committee **Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmid** und **Prof. Dr. Elfriede Nößner** sowohl für ihre Ideen zu meinem Projekt als auch ihre konstruktive Kritik bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei allen aktuellen und auch ehemaligen Kollegen aus dem Laboren 205 und 208 herzlich nicht nur für ihre fachliche Hilfe, sondern auch für ihre emotionale Unterstützung bedanken, dies gilt vor allem **Julia, Tanja, Elisabeth, Larissa** und noch vielen mehr.

Nicht zuletzt möchte ich meiner ganzen **Familie** herzlich für ihre sechsjährige Geduld, ihre Ermutigungen und die immerwährende Unterstützung in allen Lebenslagen danken. Danke, dass ihr es mir ermöglicht habt diese Doktorarbeit zu schreiben!