

**Die Freizügigkeit von viralen T-Zell-Epitopen innerhalb
des HLA-A*03-Supertyps und ihre Bedeutung für die
angewandte Immuntherapie von Krebs**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Grabenbauer, Christoph Georg

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanović

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schindler

Meinen lieben Eltern

Willst du des Übels Herr werden, geh auf seinen Grund.

Adolph Kolping, 1850.

1. EINLEITUNG	1
1.1. Was macht das Immunsystem?	1
1.2. Grundlagen	1
1.2.1. Angeborene Immunität	2
1.2.2. Adaptive Immunität	2
1.3. Entwicklung und Funktion von T-Zellen	3
1.3.1. Die Entwicklung im Thymus.....	3
1.3.2. Rezirkulation und Priming.....	4
1.4. Molekulare Mechanismen	5
1.4.1. HLA und Antigenpräsentation	5
1.4.1.1. Aufbau und Nomenklatur.....	5
1.4.1.2. Peptidbindung und Struktur.....	6
1.4.1.3. HLA-Supertypen und Verteilung in der Bevölkerung.....	7
1.4.2. Antigenprozessierung für HLA Klasse I	9
1.4.3. <i>Kiss of death</i>	10
1.5. Immuntherapie	11
1.6. Epstein-Barr-Virus	11
1.6.1. Posttransplantationslymphome.....	12
1.6.2. Weitere EBV-assoziierte maligne Erkrankungen	13
1.7. Ziele und Konzeption dieser Arbeit	13
2. MATERIAL UND METHODEN	14
2.1. Selektion und Synthese der T-Zell-Epitope	14
2.1.1. Auswahl der Viren und Antigene.....	14
2.1.2. Bestimmung potentieller T-Zell-Epitope.....	15
2.1.3. Peptidsynthese und -aufbereitung	16
2.2. Akquirierung von PBMCs	16
2.2.1. Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut	16
2.2.2. Kryokonservierung der PBMCs.....	18
2.2.3. Auftauvorgang	18

2.3. T-Zell-Experimente	18
2.3.1. 12-Tages Prästimulation.....	18
2.3.2. IFN γ ELISPOT-Assay.....	19
2.3.2.1. Durchführung.....	19
2.3.2.2. Auswertungskriterien.....	20
2.3.2.3. Statistische Analyse.....	21
2.3.3. Durchflusszytometrie.....	21
2.3.4. Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	23
2.3.5. HLA-Tetramerfärbung von virusspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	25
2.3.5.1. Synthese von MHC-Monomeren.....	26
2.3.5.2. Tetramerisierung mittels Streptavidin.....	28
2.3.5.3. HLA-Tetramerfärbung.....	28
2.3.6. <i>Gating</i> -Strategien.....	29
3. ERGEBNISSE	29
3.1. Effekt der 12-Tages-Prästimulation auf die per Elispot nachweisbare Immunreaktion	29
3.2. Epitopscreening	32
3.2.1. Unterscheidung zwischen Immundominanz und der Erkennungsfrequenz von Epitopen.....	32
3.2.2. Ergebnisse der Epitopauswahl und des Screenings auf Immundominanz sowie die Erkennungsfrequenz auf HLA-A*11.....	33
3.2.3. Konsequenzen aus der serologischen Bestimmung und somit niedrigen Auflösung der Typisierung der Blutspender.....	36
3.3. Testung der Freizügigkeit von definierten Peptiden	37
3.3.1. Hochfrequenz-Epitope und Promiskuität.....	37
3.3.2. Niedrigfrequenz-Epitope und Promiskuität.....	40
3.3.3. Intrazellulärfärbung sowie Spezifität der freizügigen Reaktionen gegen niederfrequente Epitope.....	42
3.4. Synopse der HLA-Primärstrukturen	44
4. DISKUSSION	45

4.1. Amplifikation antigenspezifischer T-Zellen zur Detektion <i>via</i> Elispot	45
4.2. Immundominanz und Erkennungsfrequenz von Peptiden auf HLA-A*11	47
4.3. Freizügigkeiten innerhalb der HLA-Klasse I	49
4.3.1. Begrenzte Freizügigkeit von hochfrequenten Epitopen	50
4.3.2. Tendenz zur Freizügigkeit von kryptischen EBV-Epitopen	52
4.3.3. Die Bedeutung der HLA-Supertypen	53
5. ZUSAMMENFASSUNG	57
6. LITERATURVERZEICHNIS	58
ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	65
DANKSAGUNG	66
CURRICULUM VITAE	67

Abkürzungsverzeichnis:

aa	amino acid (Aminosäure)
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CMV	Cytomegalievirus
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISPOT	<i>enzyme-linked immunospot</i>
FCS	fetal calf serum
h	<i>hours</i> (Stunden)
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minuten
NA/LE	no-azide/low endotoxin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PHA	Phytohämagglutinin

PLC	peptide loading complex
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SCI	<i>spot count index</i>
SFU	<i>spot-forming units</i>
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
TCM	T-Zell Medium
U	units (Einheiten)

1. EINLEITUNG

1.1. Was macht das Immunsystem?

An das Immunsystem eines Lebewesens werden komplexe Anforderungen herangetragen. Im Falle einer Infektion soll es gegen den Eindringling aktiv werden, bei einer malignen Entartung ist eine potentielle Tumorzelle zu beseitigen. Wenn an sich harmlose Antigene übermäßig bekämpft werden kommt es jedoch zum klinischen Bild einer Allergie. Gleichzeitig darf der eigene Körper nicht Ziel der Zerstörung werden, wie es bei rheumatischen Erkrankungen vorkommt. In den letzten beiden Fällen ist also die Toleranz gegenüber harmlosem Äußeren bzw. Inneren herabgesetzt, bei der Krebsentstehung spielt zu hohe Selbst-Toleranz eine Rolle. Bei der allogenen Transplantation von Organen richtet sich die Abwehr unerwünschterweise gegen das fremde Organ, woraus ohne iatrogene Immunsuppression eine Abwehrreaktion und folglich der Verlust des Organs resultiert. Dieser Überblick soll verdeutlichen, dass bei der Behandlung von höchst unterschiedlichen Krankheitsbildern durch einen Arzt ein gutes Verständnis von immunologischen Vorgängen, in diesem Zusammenhang hier besonders des adaptiven Immunsystems, notwendig ist. Gerade im Hinblick auf die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ist ein optimales Verständnis der immunologischen Vorgänge hilfreich, denn je zielgerichteter eine Therapie wird, desto weniger ausgeprägt fallen die unerwünschten Arzneimittelwirkungen potentiell aus.

1.2. Grundlagen

Aus Sicht eines Pathogens gibt es auf dem Weg zur Infektion des Körpers einige Hindernisse zu überwinden: Die physikalischen Barrieren (Haut, Schleimhaut), die es zu durchbrechen gilt, werden von einer ständigen mikrobiologischen Flora bewohnt, mit der um Nahrung und Platz konkurriert werden muss. Außerdem werden verschiedenste lösliche antimikrobielle Enzyme und Peptide wie Lysozym und Defensine, aber auch Immunglobuline

teils auf die Oberfläche, teils in Körperflüssigkeiten wie Blut, Tränenflüssigkeit, Speichel oder Magensaft sezerniert.

1.2.1. Angeborene Immunität

Zur angeborenen Immunität gehören neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten, Mastzellen und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Dendritische Zellen (DC) sowie Monozyten und die daraus entstehenden ortsständigen Phagozyten wie Kupffer'sche Sternzellen der Leber sind als professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) maßgeblich an der Vermittlung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem beteiligt. Auf der humoralen Seite gibt es das Komplementsystem, das ein Pathogen opsonieren und den sogenannten „membrane-attack-complex“ bilden kann. Schließlich werden bei der unspezifischen Aktivierung von Phagozyten auch verschiedenste proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet, die das grundlegende Milieu für die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort schaffen und die Extravasation weiterer Abwehrzellen beschleunigen. Mit dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin (IL) 1 seien an dieser Stelle nur zwei der Wichtigsten genannt.

1.2.2. Adaptive Immunität

Die humorale, adaptive Immunität wird von den B-Zellen getragen: Eine durch Antigen aktivierte B-Zelle entwickelt sich zur Antikörper-produzierenden Plasmazelle, die durch Rearrangement von Genen einen ganz bestimmten, für ein Epitop spezifischen Antikörper herstellt. Dabei gibt es fünf verschiedene Klassen von Antikörpern: Die Monomere IgD, IgE und IgG sowie das Pentamer IgM und das Dimer IgA, das vor allem auf Schleimhäuten sezerniert wird. Ein an sein Antigen gebundener Antikörper kann nun – je nach Subtyp – sowohl das Antigen durch Komplexbildung neutralisieren als auch durch Komplementaktivierung und Opsonierung zu seiner Zerstörung beitragen.

Die erworbene, zelluläre Abwehr wird von CD3⁺ T-Zellen getragen. Dabei existieren mehrere Klassen: Neben den zahlenmäßig dominanten CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen (CTL) und CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_{H1} und T_{H2}) gibt es auch die CD4⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) und weitere Untergruppen der T-Helferzellen (T_{H17}, T_{FH}).

Ein Antikörper bindet an ein spezifisches Antigen, das in nativer Form und unprozessiert vorliegt. Eine T-Zelle hingegen kann über ihren T-Zell-Rezeptor das Antigen nur erkennen, wenn es im Voraus von einer Körperzelle prozessiert wurde und ein Bruchstück davon an ein MHC-Molekül (Major Histocompatibility Complex) gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert wird, was man als MHC-Restriktion bezeichnet[1, 2].

Im Folgenden wird die Entwicklung erläutert, die zur Entstehung einer einsatzbereiten zytotoxischen T-Zelle führt, im Anschluss daran wird auf die Antigenprozessierung und –präsentation über MHC Klasse I sowie die Interaktion der zytotoxischen T-Zelle mit ihrer Zielzelle eingegangen.

1.3. Entwicklung und Funktion von T-Zellen

1.3.1. Die Entwicklung im Thymus

Nachdem die lymphatische Progenitorzelle im Knochenmark weitere Reifungsschritte durchgemacht hat, gelangen diejenigen Abkömmlinge, die zu T-Zellen werden sollen, über den Blutkreislauf in den Thymus. Bei der anschließenden Reifung und Selektion der Thymozyten entsteht die enorme Vielfalt der Antigenerkennung durch die zelluläre Immunabwehr: Ähnlich der B-Zell-Reifung kommt es zu einem Rearrangement derjenigen Genabschnitte in den Progenitorzellen, aus denen die alpha- und beta-Ketten des αβ-T-Zell-Rezeptors (αβTCR) zusammengesetzt werden. Im Falle der alpha-Kette sind dies eine Vielzahl an J- und V-Gensegmenten, bei der beta-Kette zusätzliche D-Gensegmente[1, 3]. Nach dem Rearrangement ist es nötig, dass die neu entstandene, individuelle T-Zelle selektiert wird: Bei der positiven Selektion im Kortex überleben und reifen diejenigen T-Zellen, deren TCR mit starker Affinität an MHC-Komplexe bindet. Um Reaktionen gegen körpereigene Antigene zu

vermeiden werden bei der negativen Selektion im Mark diejenigen T-Zellen in Apoptose geschickt, die zu stark durch eigene Peptid:MHC-Komplexe aktiviert werden. So verlässt nur ein Bruchteil der zuvor entstandenen T-Zellen den Thymus als naive, aber reife T-Zellen, die entweder den Korezeptor CD8 oder CD4 tragen[4]. Die Entwicklung spezieller Subpopulationen wie $\gamma\delta$ -T-Zellen, NKT-Zellen und regulatorische T-Zellen erfordert jeweils verschiedene Milieus, worauf hier nicht näher eingegangen werden soll.

1.3.2. Rezirkulation und Priming

Die reife, aber naive T-Zelle zirkuliert nun im Blutkreislauf und hat das Ziel, beim Erstkontakt mit ihrem spezifischen Antigen durch eine Dendritische Zelle aktiviert zu werden.

Zu diesem Zweck tritt sie aus dem Blutgefäß z. B. über Hochendotheliale Venulen (HEV) per Diapedese aus und dringt in lymphatische Gewebe wie Lymphknoten, die Milz oder Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT) ein. DCs und Stromazellen der T-Zell-Zonen produzieren die Chemokine CCL-19 und CCL-21, die den Rezeptor CCR7 auf den T-Zellen aktivieren, dadurch die T-Zellen anziehen und die T-Zell-Zonen der sekundären lymphatischen Organe bilden.

Dort tasten die naiven T-Zellen kontinuierlich eine Vielzahl an DCs ab, die nach Aufnahme von Antigen und Aktivierung durch dieses über afferente Lymphbahnen in die ableitenden Lymphknoten einwandern. Bei erfolgloser Aktivierung kehren die naiven T-Zellen, getrieben von einem Sphingosin-1-Phosphat-Gradienten, über das efferente lymphatische System in den Blutkreislauf zurück – im Falle der Milz auf direktem Weg. Trifft die T-Zelle allerdings auf ihren spezifischen Antigen-MHC-Komplex, so wird sie aktiviert, expandiert klonal und bildet sowohl T-Effektor-Zellen als auch T-Gedächtniszellen. Voraussetzung für diesen Priming-Prozess sind Zweitsignale, die auf den aktivierten DCs in hoher Dichte vorhanden sind. Wichtig dabei sind die Moleküle CD80 und CD86 der DCs, die den Rezeptor CD28 der naiven T-Zellen aktivieren. Daraufhin steigt die T-Zelle wieder in ihren Zellzyklus ein,

exprimiert das autokrin-stimulierend wirkende Interleukin (IL) 2 und außerdem einen IL-2-Rezeptor mit erhöhter Affinität. Nach einigen Tagen der Proliferation differenziert die T-Zelle nun zu einer T-Effektor-Zelle, die jetzt keine Kostimulation mehr benötigt, um ihrer zugeordneten Aktivität nachzugehen. Während es bei CD4⁺ Zellen mehrere direkte Subpopulationen gibt (TH₁, TH₂, TH₁₇, T_{reg} und T_{FH}), lassen sich antigenenerfahrene CD8⁺ T-Zellen lediglich in zwei Gruppen gliedern: T_{CM}-Zellen (Central Memory) tragen den CC-Motiv Chemokin-Rezeptor CCR7 sowie das Selektin CD62L, besitzen keine direkte Effektor-Funktion und patrouillieren hauptsächlich in Lymphorganen[5]. T_{EM}-Zellen (Effector Memory) exprimieren weder CCR7 noch CD62L, besitzen eine sofortige Effektor-Funktion und migrieren nicht in Lymphorgane, sondern bevorzugt in periphere Gewebe.

1.4. Molekulare Mechanismen

1.4.1. HLA und Antigenpräsentation

1.4.1.1. Aufbau und Nomenklatur

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) wurde erstmals bei der Untersuchung von immunologischen Reaktionen gegen transplantiertes Gewebe entdeckt. Später wurden im MHC kodierte Moleküle dann auch auf menschlichen Leukozyten nachgewiesen, weshalb diese Gruppe von Antigenen beim Menschen als Humanes Leukozyten-Antigen (HLA) bezeichnet wird.

Auf der Oberfläche einer jeden kernhaltigen Körperzelle befinden sich membranständig HLA-Moleküle der Klasse I, die allesamt eine besondere Furche besitzen, über welche sie ein Peptid binden können. Dabei sind die HLA-Moleküle des Menschen insbesondere in der Peptidbindungsregion hoch polymorph, wodurch eine enorme Vielfalt der Peptidbindung entsteht (Anzahl der HLA-Klasse I-Gene, abgerufen am 20. Juni 2014: 8576)[6]. Außerdem besteht eine Polygenie: ist ein Mensch heterozygot für alle drei Gene der Klasse I (HLA-A, -B und -C), so stehen sechs verschiedene HLA-Moleküle zur Antigenpräsentation zur Verfügung.

Allesamt bestehen sie aus einem heterotrimeren Komplex: Die schwere Kette beinhaltet die Transmembrandomäne und eine $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domäne, die einen stabilen Komplex mit einem Peptid von acht bis elf Aminosäuren formen. Das beta2-Mikroglobulin ist mit ihm assoziiert. Das Gen für die Codierung dieser Proteine liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 6 im MHC-Lokus. Lediglich TCRs, die mit dem Korezeptor CD8 assoziiert sind, können an die HLA-Moleküle der Klasse I binden. HLA-Moleküle der Klasse II können aufgrund einer etwas anderen Struktur einen Komplex mit längeren Peptiden bilden und werden von T-Zellen erkannt, die den Korezeptor CD4 exprimieren.

Ein HLA-Molekül ist in seiner Primärstruktur eindeutig festgelegt, wenn in der Nomenklatur zwei Zahlen auftauchen, die durch einen Doppelpunkt voneinander getrennt sind. Mit der Beschreibung „HLA-A*11:01“ ist das Molekül also eindeutig definiert. Alle weiteren Zahlen, die zusätzlich in der Nomenklatur auftauchen, beziehen sich auf Veränderungen auf der Nukleinsäure-Ebene und haben keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz des Proteins.

1.4.1.2. Peptidbindung und Struktur

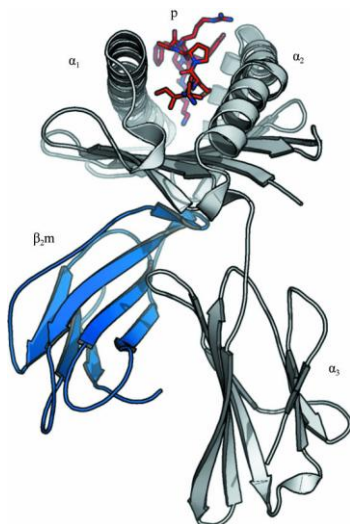


Abbildung 1: Bändermodell des HLA-A*11:01-Moleküls mit gebundenem Peptid; entnommen aus[7]. Die α -Kette (grau) besteht aus einer $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne, von denen $\alpha 1$ und $\alpha 2$ die Peptidbindungsfurche bilden, welche das Peptid (p) bindet. Der dritte Teil des Heterotrimers, $\beta 2m$, ist in blau dargestellt.

Für die Bindung des Peptids zeichnen Van-der-Waals-Kräfte und Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Rückgrat und Seitenketten des Peptids einerseits und andererseits den Seitenketten der beiden alpha-Helices verantwortlich[8]. Durch den extremen Polymorphismus der

Peptidbindungsregion der MHC-Moleküle entstehen nun Präferenzen für unterschiedliche Aminosäuren an verschiedenen Stellen des Peptids.

Durch aufwändige Peptidbindungsassays[9] oder die massenspektrometrische Analyse natürlich präsentierter Peptide[10] konnte seit den späten 80er Jahren determiniert werden, welchem Muster die gebundenen Peptide eines HLA-Moleküls folgen. Dies ermöglichte – auch in Kombination mit Kenntnissgewinn über die Antigenprozessierung – die Vorhersage von HLA-Liganden und potentiellen T-Zell-Epitopen, wofür im Internet frei zugängliche Werkzeuge zur Verfügung stehen[11, 12].

Röntgenkristallographische Analysen lassen Einblicke in die Quartärstruktur der HLA-Komplexe zu und liefern Erklärungen für die Präferenz von bestimmten Peptiden. Die starke Präferenz von HLA-A*11:01 für Peptide mit C-terminalem Lysin kann beispielsweise unter anderem durch die drei Asparaginreste 74, 77 und 116 erklärt werden, die die Tasche F (P9) zur Bindung des basischen C-Terminus bilden[7, 13, 14]. Es gibt mehrere HLA-Moleküle, die Peptide mit basischem C-Terminus, sogenannten P9K-Liganden, präsentieren. Diese lassen sich – zumindest theoretisch – in den HLA-A*03-Supertyp einordnen[15, 16], zu dem die in **Tabelle 1** aufgeführten HLA-Allele gezählt werden. Bioinformatische Analysen der Primärstrukturen haben gezeigt, dass die Moleküle des A*03-Supertyps durch folgende Aminosäurepositionen charakterisiert werden können (Position im Exponenten dargestellt): Tyr⁹/Phe⁹/Ser⁹, Ile⁹⁷/Met⁹⁷ und Glu¹¹⁴ oder Asp¹¹⁶[16].

1.4.1.3. HLA-Supertypen und Verteilung in der Bevölkerung

Im Gegensatz zur HLA-Klasse II, bei deren Peptidbindung eine allgemeine Freizügigkeit herrscht[17], wurden wie oben erwähnt durch Elution von Klasse I-Liganden bereits Anfang der 90er Jahre allelspezifische Peptidmotive postuliert[10]. Gleichzeitig führte die Beobachtung, dass bestimmte Moleküle der HLA-Klasse I ähnliche Peptidbindungsmotive aufweisen, zur Gruppierung in sogenannte HLA-Supertypen[18]. Die Konsequenz aus ähnlichen Peptidbindungsmotiven ist das Vorhandensein von HLA-Liganden, die auf

mehreren unterschiedlichen HLA-Klasse I-Molekülen präsentiert werden. Ein solcher Ligand wird als promiskuitiv (lat. *promiscus*, -a, -um: gemeinsam, ohne Unterschied, gemischt) bezeichnet, somit weist er eine Freizügigkeit im Hinblick auf die Präsentation über verschiedene Klasse I-Moleküle auf.

Insgesamt wurden in den darauffolgenden Jahren 9 HLA-Supertypen identifiziert, die die Auswirkungen des Polymorphismus von HLA Klasse I-Molekülen relativieren sollen[9, 16, 19, 20]. Im Jahr 2008 wurde die Klassifikation von Sette et al. nochmals aktualisiert[15].

Die angegebene Frequenz der einzelnen HLA-Moleküle in **Tabelle 1**, die Bestandteil des HLA-A*03-Supertyps sind, entstammen einer Untersuchung von knapp 320.000 Knochenmarkspendern in Deutschland durch Schmidt et al., die sich zwischen 2005 und 2008 bei der Deutschen Knochenmarkspenderdatei (DKMS) – der größten Knochenmarkspenderdatei weltweit – registrieren ließen[21]. Ältere Angaben schätzen die kumulative Allelfrequenz dieses Supertyps (ohne die niedrigprävalenten Antigene A*66 und A*74) je nach Population auf 37% bis 53%[9]. Freizügige HLA-Liganden, die mehrere dieser HLA-Moleküle binden, würden die Entwicklung von Peptidimpfstoffen vereinfachen und es ermöglichen, eine größere Breite der Bevölkerung mit einer wirksamen Vakzine zu versorgen. Schipper et al. entwickelten 1996 einen Algorithmus, mit dem eine minimale Anzahl an HLA-Molekülen eine maximale Abdeckung einer bestimmten Bevölkerungsgruppe ermöglicht[22].

Tabelle 1: Antigenfrequenzen des HLA-A*03-Supertyps in Deutschland, nach Schmidt et al. 2010 (gerundet auf 1 Nachkommastelle)

HLA-	A*03	A*11	A*31	A*33	A*66	A*68	A*74 ¹⁾
Antigenfrequenz (%)	15,7	5,2	2,6	1,1	0,5	4,3	0,1

¹⁾: Zuordnung zum A*03-Supertyp durch Frahm et al., 2007

1.4.2. Antigenprozessierung für HLA Klasse I

Betroffen von der Präsentation an der Zelloberfläche sind alle Proteine, die nach Polyubiquitinylierung im Proteasom abgebaut und im Endoplasmatischen Retikulum auf MHC Klasse I-Moleküle geladen werden. Das Proteasom bestimmt dabei maßgeblich den C-Terminus der Peptide, während der N-Terminus nachträglich durch zytosolische Aminopeptidasen verkürzt werden kann. Im Endeffekt wird nur ein Bruchteil dieser Produkte durch ein Heterodimer aus den Proteinen TAP1 und TAP2 (transporter associated with antigen processing-1 und -2) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert[23]. TAP transportiert vorzugsweise Peptide mit basischen oder hydrophoben Aminosäuren an beiden Enden[24]. Zu lange Peptide werden im ER nochmals durch ERAP1 (endoplasmatic reticulum aminopeptidase associated with antigen presentation) auf eine Länge von 8-9 Aminosäuren gebracht[25], bevor die Beladung von MHC Klasse I-Molekülen dort durch den *peptide-loading complex* (PLC) stattfinden kann. Dieser besteht aus TAP, Tapasin, der schweren α -Kette, β_2 -Mikroglobulin (β_2m) und verschiedenen weiteren Chaperonen. Dabei faltet sich das Heterodimer aus α -Kette und β_2m sukzessive mit dem Peptid in seine endgültige Konformation, löst sich vom PLC und kann schließlich zur Zelloberfläche wandern.

Im Gegensatz zu den MHC-Molekülen zeigen die Proteine, die an der Antigenprozessierung beteiligt sind, bemerkenswert hoch konservierte Strukturen.

Je nach Zelltyp werden schlussendlich etwa 100.000 bis 500.000 HLA Klasse I-Komplexe an der Zelloberfläche präsentiert, ein Großteil der entstehenden Peptide bleibt bei dem Prozess auf der Strecke[26]. Hauptsächlich werden HLA-A und HLA-B-Moleküle superfiziell präsentiert; HLA-C stellt den geringsten Anteil dar[27].

Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, benötigt der zytotoxische T-Lymphozyt zum *Priming* eine spezielle DC, die ihm über HLA Klasse I ein entsprechendes Peptid präsentiert. Da bei weitem nicht alle Viren einen Tropismus für DCs besitzen, muss es eine Möglichkeit zum *Priming* durch eine DC geben, ohne dass sie

selbst vom Virus befallen ist. Dieses Phänomen, von extrazellulär aufgenommene Antigene über Moleküle der HLA-Klasse I zu präsentieren, bezeichnet man als Kreuzpräsentation, zu der nur bestimmte Subtypen von DCs fähig sind[3, 28].

Die enorme Dynamik der Antigenprozessierung wird klar, wenn man beobachtet, dass mit dem Influenzavirus infizierte Zellen nach etwa 90 Minuten schon von CTLs erkannt werden, obwohl die ersten stabilen Virusproteine erst acht Stunden später abgebaut werden[29]. Dies wird dadurch ermöglicht, dass bereits bei der Translation defekte Proteine und deren Fragmente entstehen, die direkt abgebaut und per MHC präsentiert werden können. Man spricht dabei von *Defective Ribosomal Products* (DRiPs).

Es gibt eine ganze Reihe von Viren, die im Laufe der Evolution verschiedenste Mechanismen entwickelt haben, um der Überwachung durch das Immunsystem zu entgehen (immune escape)[30]. Meist interferiert dabei ein Genprodukt des Virus mit einer Einheit der Antigenprozessierung, so dass beispielsweise der proteosomale Abbau, der Peptidtransport oder die Beladung von MHC mit einem Peptid verhindert oder die MHC-Moleküle im ER zurückgehalten werden[31].

1.4.3. Kiss of death

Beim Aufeinandertreffen eines CTL und seiner Zielzelle, die das passende Epitop präsentiert, wird eine immunologische Synapse geformt, die es ermöglicht, die Zielzelle individuell zu zerstören[32]. Im Zentrum der Synapse formiert sich ein Cluster von TCRs und deren Korezeptoren, über die das HLA-gebundene Epitop erkannt und eine intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung des CTL gestartet wird. Dabei werden zytotoxische Granula zielgerichtet freigesetzt, die hauptsächlich Granzyme, Perforin und Granulysin beinhalten und konsequent einen apoptotischen Zelltod herbeiführen. Zudem erfolgt die Freisetzung von Zytokinen wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ und $\text{LT}\alpha$. Dadurch kann die Virusreplikation verhindert und die Expression von HLA Klasse I

hochreguliert werden. Außerdem führt dieses spezielle Mikromilieu zur Aktivierung von weiteren Abwehrzellen wie Makrophagen.

1.5. Immuntherapie

Als naturgemäß auf spezifische Zielstrukturen gerichtet, hat die Immuntherapie längst Einzug in die moderne Medizin gehalten. Monoklonale Antikörper gegen CD20, VEGF oder EGFR (z. B. Rituximab, Bevacizumab und Cetuximab) werden im klinischen Alltag eingesetzt und tragen zur Verlängerung der Überlebenszeit oder sogar zur Heilung bestimmter onkologischer Erkrankungen bei. Die zelluläre Abwehr als therapeutische Option hingegen findet noch keine vergleichbare, routinemäßige Anwendung. Erforscht wird besonders der Einsatz von spezifischen Peptidimpfstoffen zur T-Zell-Aktivierung bei der Behandlung von Krebs[33] oder der adoptive Zelltransfer, sei es zur Behandlung von Viruserkrankungen unter Immunsuppression mit T-Zellen[34] oder zur Behandlung des Prostatakarzinoms mit DCs, die mit tumorassoziierten Antigenen beladen werden[35].

1.6. Epstein-Barr-Virus

Dass ein Großteil dieser Arbeit auf dem Epstein-Barr-Virus basiert, ist nicht dem Zufall überlassen. Als vierter von acht Vertretern der Humanen Herpesviren (HHV4) infiziert es über 90% der menschlichen Bevölkerung und persistiert lebenslanglich in B-Zellen[36]. Bei der Primärinfektion kommt es zur Virusvermehrung in der initialen lytischen Phase. Anschließend tritt das EBV in die Latenzphase III ein, in der die Antigenexpression auf zehn Latenzproteine beschränkt ist, nur um anschließend seine Antigenexpression ganz herunterzufahren (Latenzphase 0) und unsichtbar zu werden. Der spontane Wiedereintritt in die lytische Phase ist möglich, so dass es zur Virusverbreitung insbesondere über orale Epithelien kommen kann. Geschieht die Primärinfektion erst im Jugendalter oder später, ist man eher gefährdet für die Entwicklung einer Infektiösen Mononukleose (syn. Kissing Disease, Pfeiffer'sches Drüsenfieber), die unter anderem durch eine überschießende

Proliferation von EBV-spezifischen, CD8⁺ T-Lymphozyten charakterisiert ist, die sich als mononukleäre Zellen im Blutbild darstellen.

Die Aktivität der T-Zellen richtet sich vor allem gegen Antigene der frühen lytischen Phase und Latenzproteine, da HLA vorübergehend im Verlauf der Lyse herunterreguliert wird[37-39]. Maßgeblich daran beteiligt ist das immediate-early-Protein BZLF1, das in der lytischen Phase der heraufregulierenden Wirkung von LMP1 auf MHC-Moleküle entgegenwirkt. In diesem Zusammenhang spielen bei der Eliminierung der infizierten Zellen auch NK-Zellen eine Rolle, für die das Epstein-Barr-Virus keine Evasionsstrategie bereithält.

1.6.1. Posttransplantationslymphome

Gefährlich wird die Infektion, wenn das EBV im Rahmen einer Transplantation durch iatrogene Immunsuppression ein Posttransplantationslymphom (Posttransplant Lymphoproliferative Disorder, PTL) hervorruft[40, 41]. Bei anhaltender und schwerer Immunsuppression kommt es wegen der eingeschränkten Kontrolle durch die zelluläre Immunität zu einer überschießenden B-Zell-Proliferation. Die Therapie zielt auf eine Wiederherstellung der T-Zell-Aktivität ab, z.B. durch Reduktion der Immunsuppression, oder eine Unterdrückung der proliferierenden B-Zellen, z.B. durch den CD20-Antikörper Rituximab und Chemotherapie nach dem CHOP-Schema (Vincristin, Doxorubicin, Cyclophosphamid und Prednison). Dabei ergeben sich einige Komplikationen: Das Herabsetzen der Immunsuppression kann zum Aufflammen der *Graft-versus-Host*-Erkrankung führen, außerdem wirkt besagte Chemo-Immuntherapie zusätzlich immunsuppressiv und macht anfällig für Infektionen. Da die Immunsuppression zur Verhinderung der Transplantatabstoßung weitergeführt werden muss, wird auch die Ausbildung einer langanhaltenden natürlichen Immunität gegen die Lymphomzellen, in denen im Übrigen alle zehn Latenzproteine exprimiert werden (Latenzphase III), unterbunden. Der adoptive T-Zell-Transfer stellt hier eine äußerst zielgerichtete

Therapieoption dar, die in jüngster Zeit bemerkenswerte Fortschritte gemacht hat[41, 42].

1.6.2. Weitere EBV-assoziierte maligne Erkrankungen

Die Expression einer reduzierten Anzahl an Latenzproteinen zeigen die Sternberg-Reed-Riesenzellen beim EBV-assoziierten Hodgkin-Lymphom sowie Zellen des Nasopharynxkarzinoms: In der Latenzphase II werden lediglich EBNA1 und die latenten Membranproteine LMP1 und LMP2 exprimiert. In Zellen des in Afrika endemischen Burkitt-Lymphoms wird jedoch ausschließlich EBNA1 exprimiert (Latenzphase I).

Im Laufe der Jahre wurden Zusammenhänge zwischen HLA-Haplotypen und EBV-assoziierten Erkrankungen erforscht, so besteht beispielsweise für Träger des HLA-A*01 ein erhöhtes Risiko, ein Hodgkin-Lymphom zu entwickeln, während HLA-A*02 das Risiko senkt[43]. *In vitro* lassen sich B-Zellen durch eine Infektion mit dem EBV immortalisieren, so dass *Lymphoblastoid Cell Lines* (LCL) entstehen, die ebenfalls von der Latenzphase III geprägt sind[44].

Heslop et al. untersuchten im Jahr 2010 die Effekte des adoptiven T-Zell-Transfers nach Stammzelltransplantation zur Prävention und Therapie der PTLD und zeigten, dass dies sicher und vergleichsweise kostengünstig durchgeführt werden kann und auch langanhaltende Effekte erzielt[42].

Elliott et al. stellten 2008 eine australische Phase-I-Studie vor, in der gesunde Probanden mit einer Peptidimpfstoff gegen die Infektiöse Mononukleose geimpft wurden – dabei wurde lediglich das HLA-B*08-Epitop FLRGRAYGL aus EBNA3 eingesetzt, das in 8 von 9 Probanden eine Immunantwort hervorrief[45].

1.7. Ziele und Konzeption dieser Arbeit

Grundsätzlich ist das Ziel dieser Arbeit, die Freizügigkeit von viralen T-Zell-Epitopen innerhalb des HLA-A*03 Supertyps zu quantifizieren, um zu einer genaueren Einschätzung ihrer Bedeutung für die zielgerichtete Immuntherapie von Krebs zu gelangen. Die Grundlage einer zielgerichteten Therapie ist es, die

Zielstrukturen der T-Zellen genau zu charakterisieren. Zu diesem Zweck werden in der vorliegenden Arbeit per ELISPOT diejenigen Fragmente der EBV-Antigene (i.e. Peptide) identifiziert, die im Rahmen von HLA-A*11 als T-Zell-Epitope fungieren. Dabei werden zusätzlich die Funktionalität und auch die Spezifität der T-Zell-Reaktionen per Durchflusszytometrie nachgewiesen und auf das Ausmaß der spezifischen Reaktionen geachtet. Um der Frage nachzugehen, ob Epitope auch im Zusammenhang mit anderen HLA-Molekülen immunogen sind, i.e. freizügig sind, wird anschließend nach T-Zell-Reaktionen gesucht, die gegen neu gefundene sowie zuvor beschriebene EBV-Epitope aus der Gruppe des HLA-A*03-Supertypen gerichtet sind. Dabei werden auch bereits beschriebene Epitope aus dem Cytomegalievirus verwendet.

Zum Sichtbarmachen der T-Zell-Reaktionen per ELISPOT werden die Zellen der Blutspender einem 12-Tages-Prästimulationsprogramm unterzogen, dessen Analyse den spezifischeren Fragestellungen voransteht.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Selektion und Synthese der T-Zell-Epitope

2.1.1. Auswahl der Viren und Antigene

Zur Bestimmung der über HLA-A*11:01 präsentierten Epitope wurden 12 Antigene aus dem Erregerstamm EBV B95-8 ausgewählt. 10 dieser Antigene sind dafür bekannt, sehr immundominante Epitope hervorzubringen und starke Reaktionen durch CD8⁺ T-Zellen hervorzurufen[37].

Außerdem wurden Epitope aus zwei zusätzlichen, weniger immunogenen Antigenen aus der späten lytischen Phase bezüglich Immundominanz getestet: BNRF1 und BLLF1 (**Tabelle 2**).

Tabelle 2: Getestete Antigene aus dem Epstein-Barr-Virus, Stamm B95-8

		Gen-Name	Proteinname	
			Lang	kurz
lytische Phase	IE*	BRLF1	Replication and transcription activator	Rta
		BZLF1	Trans-activator protein BZLF1	EB1
	E*	BMLF1	mRNA export factor EB2	Mta
		BALF2	Single stranded DNA-binding protein	DNBI
		BMRF1	DNA polymerase processivity factor BMRF1	EA-D
	L*	BNRF1	Major tegument protein	MTP
BLLF1		Envelope glycoprotein GP350	MA	
latente Phase		EBNA3	Epstein-Barr nuclear antigen 3	EBNA3
		EBNA4	Epstein-Barr nuclear antigen 4	EBNA4
		EBNA6	Epstein-Barr nuclear antigen 6	EBNA6
		LMP1	Latent membrane protein 1	LMP1
		LMP2	Latent membrane protein 2	LMP2

*) IE (Immediate-Early), E (Early) und L (Late)

2.1.2. Bestimmung potentieller T-Zell-Epitope

Nachdem die bis dato als am meisten immunogen identifizierten Antigene aus dem Epstein-Barr-Virus feststanden, war es möglich, diejenigen Epitope vorherzusagen, die am wahrscheinlichsten über das Molekül HLA-A*11:01 präsentiert werden. Dazu wurde die online frei verfügbare Datenbank „Syfpeithi“ [11] herangezogen, die nach Eingabe der FASTA-Sequenz des Proteins von allen theoretisch möglichen Proteinfragmenten (i.e. Peptiden) mit einer bestimmten Länge eine Rangliste erstellt. Zur Beurteilung der Wertigkeit einzelner Aminosäure-Positionen innerhalb des Peptids greift Syfpeithi auf Matrizen zu, nach denen Punkte für bestimmte Aminosäuren an bestimmten Positionen des Peptids vergeben werden. Die 2% am höchsten bewerteten Peptide wurden synthetisiert und für die Analysen verwendet.

Bei der Auswahl der Peptide für die Negativkontrollen (**Tabelle 3**) wurde darauf geachtet, dass sie aus einem körpereigenen Antigen stammen und als gesicherte Liganden auf ihrer HLA-Restriktion gelten.

Tabelle 3: Als Negativkontrolle verwendete natürliche HLA-Liganden

HLA	Nummer	Sequenz	Syfpeithi-Score	Protein _{Lokalisation}
A*03	9395	AVAIKAMAK ^a	31	eIF5a ₁₄₅₋₁₅₃
A*11	101185	ASEDYVAPPK ^b	26	MKX ₂₀₈₋₂₁₇
A*31	9463	LQFPVGRVHR ^a	n/a	Histon H2a ₂₃₋₃₂
A*33	9093	KVFRGNKVK ^a	n/a	PSMA ₂₀₇₋₂₁₅
A*68	4094	ESGPSIVHR ^a	24	beta actin ₃₆₃₋₃₇₁

a) aus der Datenbank Syfpeithi

b) aus der Diplomarbeit von Felix Dingler

2.1.3. Peptidsynthese und -aufbereitung

Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden hauptsächlich von Frau Nicole Zuschke per Standard-Fmoc-Chemie hergestellt unter Benutzung der beiden Geräte ABIMED Economy Peptide Synthesizer EPS 221 und ABI 433A Peptide Synthesizer. Identität und Reinheit der Peptide wurden per HPLC und Massenspektrometrie überprüft und die Peptide als Lyophilisate bei 4°C aufbewahrt.

Die Auflösung des Lyophilisats erfolgte in ddH₂O/10% DMSO mit einer Konzentration von 1 mg/ml, so dass die Lösung sofort eingesetzt oder nochmals einmalig bei -80°C gelagert werden konnte.

2.2. Akquirierung von PBMCs

2.2.1. Isolierung von PBMCs aus peripherem Blut

Vom Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin wurden freundlicherweise *Buffy Coats* aus heparinisiertem Vollblut von gesunden Blutspendern in Infusionsbeuteln zur Verfügung gestellt und die klassischen HLA-Haplotypen

dieser Spender im *low-resolution-typing* bestimmt. Im Verlauf dieser Arbeit wurden kontinuierlich durch den Autor selbst *Buffy Coats* aufbereitet und damit sowohl das eigene Projekt unterstützt als auch die laborinterne PBMC-Bank gespeist.

Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät Tübingen für die Analyse gesunder Blutspender auf Virusantigene liegt unter der Projektnummer 432/2012B02 vor.

Aufgrund der hohen Infektionsprävalenz mit EBV fand die Testung von EBV-Epitopen im Rahmen dieser Arbeit ohne vorherige Bestimmung des serologischen Status der Blutspender statt. Die *Buffy Coats* wurden standardmäßig einer CMV-Serologie unterzogen, so dass für die Testung von CMV-Epitopen nur CMV-seropositive Blutspender verwendet wurden.

Am Anfang des sterilen Aufbereitungsprozesses stand das Überführen der *Buffy Coats* aus den Beuteln in Zellkulturflaschen und das Auffüllen mit PBS (*phosphate buffered saline*) auf etwa 125 ml. Vier Röhrchen à 50 ml wurden nun mit je 15 ml einer Lymphozytenseparationslösung (LSM 1077 Lymphocyte von PAA Laboratories, Pasching, Austria) befüllt, je 30 ml des verdünnten *Buffy Coat* vorsichtig darüber geschichtet und ohne Bremse bei 2000 rpm (rounds per minute) für 30 min zentrifugiert (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0 R, 20°C).

Die schweren neutrophilen Granulozyten und Erythrozyten befinden sich nun in der unteren Phase, mononukleäre Zellen in der mittleren und der Plasmaüberstand in der oberen Phase.

Nach vorsichtigem Abziehen eines Großteils des Überstands konnten die lymphozytenreichen mittleren Schichten von 2 Röhrchen in einem zusammengeführt und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt werden. Beide Röhrchen wurden wieder zentrifugiert (1500 rpm, 10 min, 20°C), das Dekantat verworfen und das verbliebene Zellpellet gebrochen und zu Reinigungszwecken wieder in 50 ml PBS gelöst und zentrifugiert (1300 rpm, 10 min, 20°C). Die Pellets wurden erneut gelöst und in einem Röhrchen in 50 ml PBS gesammelt, so dass die Zellzählung stattfinden konnte.

2.2.2. Kryokonservierung der PBMCs

Die erneute Zentrifugation (1500 rpm, 10 min, 20°C) ermöglicht es, das Zellpellet in eiskaltem Einfriermedium (hitzeinaktiviertes FCS (*fetal calf serum*) mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid)) so aufzunehmen, dass in einer entsprechenden Anzahl an Kryoröhrchen (Merck) jeweils 10^8 Zellen pro 2 ml gelagert werden konnten. Die letzten verbleibenden 10^8 Zellen pro 2 ml wurden mit 3 ml Einfriermedium aufgefüllt, um nochmals 5 Aliquots mit je 2×10^7 Zellen pro 1 ml füllen zu können. Zum Einfrieren wurden die gefüllten Kryoröhrchen für 24 h in speziellen, mit Isopropanol gefüllten und vorgekühlten Boxen (Thermo Scientific Nalgene „Mr. Frosty“) bei -80°C gelagert, die eine optimale Abkühlrate von ca. -1°C/min erzeugen.

2.2.3. Auftauvorgang

Für den Auftauvorgang wurde sogenanntes Auftaumedium (ATM) verwendet: IMDM als Basissubstanz wird versetzt mit 25 µg/ml Gentamicin, 100 U/l Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5×10^{-5} mol/l β-Mercaptoethanol und enthält DNase I (3 µg/ml). Der Inhalt eines Kryoröhrchens wurde nun möglichst zügig in 10 ml des vorgewärmten ATMs gelöst, zentrifugiert (1400 rpm, 7 min, 20°C), das Dekantat verworfen und das Zellpellet nochmals in 10 ml ATM resuspendiert. Es folgte eine Resuspendierung in 6 ml T-Zell-Medium (TCM; IMDM mit 5% hitzeinaktiviertem, gepooltem Humanserum, 25 µg/ml Gentamicin, 100 U/l Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 5×10^{-5} mol/l β-Mercaptoethanol) und die gleichmäßige Verteilung auf 3 Wells einer 6-well-Platte.

2.3. T-Zell-Experimente

2.3.1. 12-Tages Prästimulation

Nach dem Auftauen und Waschen der PBMCs am Tag 0 wurden diese in insgesamt 6 ml TCM resuspendiert und gleichmäßig auf 3 Wells einer 6-well-Platte aufgeteilt. Die Kultivierung fand bei 37°C und angefeuchteter Luft mit

7,5% CO₂-Gehalt statt. Die Peptidstimulation fand am Tag 1 statt, indem die Peptide so hinzugefügt wurden, dass deren Konzentration 1 µg/ml betrug. Interleukin 2 (IL-2) als Wachstumsstimulator wurde an den Tagen 2, 5 und 7 mit einer finalen Konzentration von 20 U/ml zugeführt. Der gewünschte Test konnte also am Tag 13 stattfinden, *ex vivo*-Experimente wurden an Tag 1 durchgeführt.

2.3.2. IFN γ ELISPOT-Assay

2.3.2.1. Durchführung

Bei der „enzyme-linked immunospot technique“ (ELISPOT) handelt es sich um ein immunologisches Testverfahren, mit dem die Frequenz von aktivierten T-Zellen bestimmt wird. Dazu wird eine bestimmte Anzahl von PBMCs über 24 Stunden mit einem Antigen stimuliert. Das von einer T-Zelle produzierte und per Exozytose ausgeschiedene Zytokin IFN γ wird auf dem Boden des Wells mit spezifischen Antikörpern abgefangen, mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion als „spot“ sichtbar gemacht und elektronisch ausgewertet.

Die hierzu verwendeten Mikrotiterplatten, Antikörper und Reagenzien stammten allesamt von Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA.

Zunächst wurden die Mikrotiterplatten mit 96 Wells und flachem Boden über Nacht im Kühlschrank mit dem Antikörper inkubiert, der gegen das nachzuweisende Protein gerichtet ist (5 µg/ml in PBS). Wir verwendeten den Antikörper NA/LE Anti-human IFN γ . Diejenigen Antikörper, welche nicht an die Nitrozelluloseoberfläche gebunden haben, wurden mit IMDM zweimal ausgewaschen und die Platten anschließend mit 50 µl TCM für 2 h bei 37°C inkubiert. Es folgte die Beladung mit 5×10^5 PBMCs pro Well und die Stimulation mit 1 µg/ml des entsprechenden Peptids nun in einem Gesamtvolumen von 150 µl pro Well.

Um die Immunreaktion gegen Peptide immer in Duplikaten testen zu können, wurden mit den PBMCs eines Spenders meist 2 Reihen a 12 Wells beschickt. Die hierzu erforderliche Mindestanzahl von insgesamt 12×10^6 Zellen wurde annähernd immer erreicht. Bei 12 Spalten auf der Mikrotiterplatte konnte nun regelmäßig die Reaktion gegen 10 verschiedene Peptide getestet werden,

zusätzlich das Negativpeptid als Duplikat, eine Positivkontrolle mit dem unspezifischen Mitogen Phytohämagglutinin (PHA, 10 µg/ml) und eine zweite Negativkontrolle ohne Peptid.

Die Kultivierung fand bei 37°C für 24 bis 26 h unter erschütterungsfreien Bedingungen statt, um eine Delokalisation der IFN γ -produzierenden Zellen und somit ein Erschweren der Auswertung zu verhindern.

Insgesamt sieben Waschschrte abwechselnd mit der seifigen Lösung PBS/0,05% Tween20 und ddH₂O stellen sowohl ein Auswaschen aller Rückstände sowie ein Platzen der Zellen sicher, so dass die Plaques aus gebundenem IFN γ detektiert werden können. Zu diesem Zweck wurde die Platte mit dem biotinylierten Detektionsantikörper 2 h lang bei einer Konzentration von 2 µg/ml in PBS/0,5% BSA und 20°C inkubiert. Nach 6 weiteren Waschvorgängen mit PBS/0,05% Tween20 folgte die Inkubation mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat für 1 h bei 20°C oder über Nacht bei 4°C. Streptavidin ist ein tetrameres Protein, von dem jedes seiner 4 Untereinheiten sehr stark an Biotin bindet. Ein Substrat der daran gekoppelten *horseradish peroxidase* (HRP) ist 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC), das in dieser enzymatischen Reaktion zu einem roten Farbstoff umgewandelt wird und letztendlich die einzelnen spots in rötlicher Farbe darstellt. 20 µl der AEC-Chromogen-Lösung wurden dazu mit 1 ml der AEC-Substrat-Lösung gemäß der Anleitung des Herstellers gemischt und die Reaktion nach ca. 3 min Einwirkzeit mit fließendem Wasser gestoppt. Nach dem Trocknen der Mikrotiterplatten kam zum Auszählen der einzelnen spots der ImmunoSpot Series 5 Core ELISPOT Reader von C.T.L. Europe, Bonn, Deutschland, zum Einsatz.

2.3.2.2. Auswertungskriterien

Um von einer positiven Immunantwort gegen ein bestimmtes Peptid auf Grundlage der ELISPOT-Daten sprechen zu können, wurde eine empirische Regel von Moodie et al.[46], die zwei Kriterien beinhaltet, laborintern leicht modifiziert: Pro 5×10^5 Zellen müssen mindestens zehn spot forming units (SFU)

sichtbar sein, gleichzeitig muss ihre Zahl die der Negativkontrollen mindestens um das dreifache überschreiten, das heißt der *spot count index* (SCI) muss größer als 3 sein.

$$\text{positiv genau dann, wenn Spotanzahl } n \geq \frac{10 \text{ SFU}}{5 \times 10^5} \wedge \text{SCI} \geq 3$$

2.3.2.3. Statistische Analyse

Zur Auswertung der 12-Tages-Prästimulation wurde ein abhängiger T-Test (Paardifferenzentest) verwendet. Dieser prüft, ob sich die Differenz der Mittelwerte signifikant von 0 unterscheidet. Um den *spot count index* (SCI) auszurechnen wurde die kleinstmögliche Anzahl an spots als 1 definiert.

Der exakte Fisher-Test erlaubt es, kategorische Daten selbst bei einer geringen Zahl an Beobachtungen noch zuverlässig zu vergleichen. Er kam zum Einsatz bei der Unterscheidung, ob eine positive oder negative Immunantwort eines bestimmten Peptids im Zusammenhang mit seinem Ursprungs-HLA-Allel oder eines anderen Allels des HLA-A*03-Supertyps vorkommt. In beiden Tests beträgt das Signifikanzniveau $\alpha=0.05$.

2.3.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, umgangssprachlich auch FACS (fluorescence activated cell sorting), erlaubt eine Analyse der Charakteristika von einzelnen Zellen in einem Hochdurchsatzverfahren. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie dazu benutzt, um a) die Funktionalität von CD8⁺ CTLs nach spezifischer Peptidstimulation per Intrazellulärfärbung zu belegen, d.h. die Produktion von IFN γ und TNF α nachzuweisen, sowie b) exemplarisch die Antigenpezifität der CD8⁺ T-Lymphozyten per HLA-Tetramerfärbung aufzuzeigen. Dies erfolgt nach folgendem Prinzip:

Die Strukturen von Interesse werden mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, um später von der Färbung jeder Einzelzelle auf das Vorhandensein einer bestimmten Struktur schließen zu können. Beispielsweise kann der Korezeptor

CD8 mit einem monoklonalen Antikörper markiert sein, an den ein Farbstoff gekoppelt ist. Die Zellsuspension wird in einem Flüssigkeitsstrom durch eine vibrierende Kammer geführt, um eine Vereinzelung der Zellen zu bewirken. In einer feinen Hülse wird der Wasserstrahl nun fokussiert, so dass die Partikel (hier: Zellen) einzeln durch einen Laserstrahl geführt werden (**Abbildung 2**). Diesen streuen sie in einer bestimmten Art und Weise, so dass das Vorwärtsstreulicht (FSC, Forward Scatter) eine Aussage über das Volumen (Größe) und das Seitwärtsstreulicht (SSC, Side Scatter) eine Aussage über die innere Komplexität (Granularität) der Zelle zulässt, auch ohne jegliche Färbung. Sind bestimmte Antigene mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert, wird dieser Farbstoff durch einen Laser (bei optimaler Wellenlänge) in einen angeregten Zustand versetzt. Beim „Zurückfallen“ in den Ausgangszustand wird Licht in einer für den Farbstoff charakteristischen Wellenlänge emittiert, so dass dieses herausgefiltert und detektiert werden kann. Über die Farbintensität einer einzelnen Zelle kann somit indirekt auf die Dichte des gefärbten Antigens geschlossen werden. Beim Einsatz von verschiedenen Antikörpern mit unterschiedlichen Farbstoffen ist nun die simultane Erfassung von mehreren Zell-Charakteristika gleichzeitig möglich. Dazu müssen sich die Farbstoffe lediglich in der Wellenlänge unterscheiden, in der ihr Emissionsmaximum liegt (**Tabelle 4**). In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer FACS Canto II (BD) benutzt, das drei Laser mit unterschiedlicher Wellenlänge zur Exzitation der Farbstoffe verwendet: blau (488 nm), rot (633 nm) und violett (405 nm). Dargestellt werden können die Parameter entweder einzeln im sogenannten Histogramm, oder zwei gleichzeitig im Dotplot (Beispiel **Abbildung 6**).

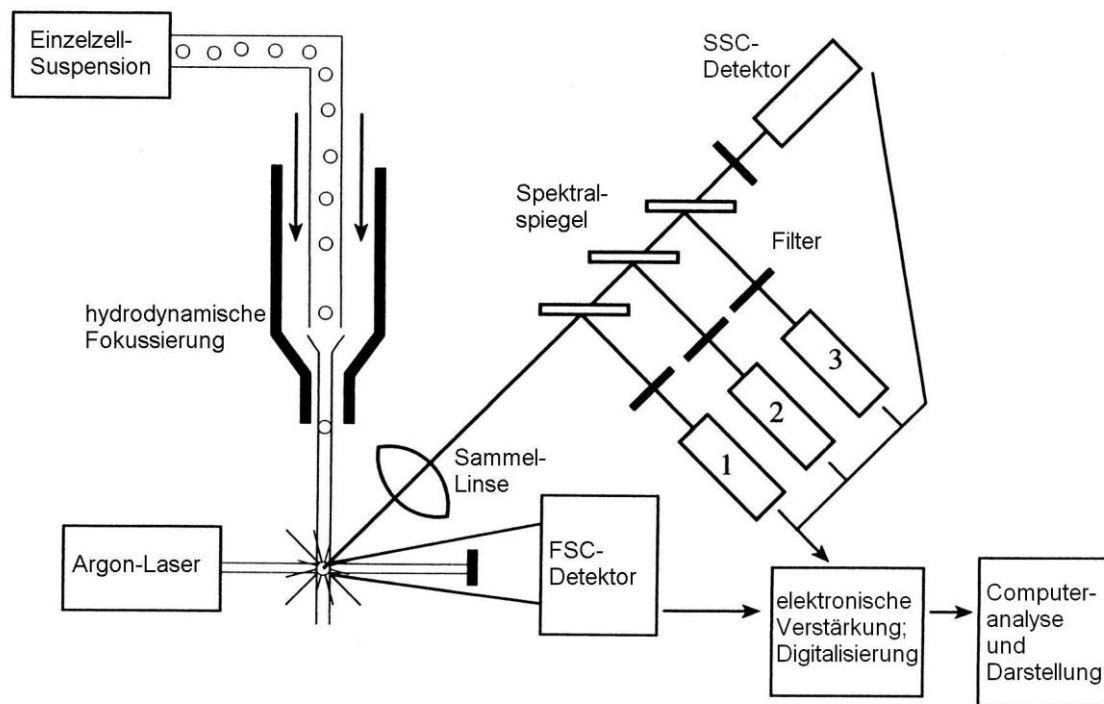


Abbildung 2: Prinzip der Durchflusszytometrie (entnommen aus Brown et al., 2000[47], modifiziert). Hydrodynamisch fokussiert tritt jede Zelle einzeln durch den Laserstrahl, woraufhin dieser gestreut wird. Vorwärts gestreutes Licht wird im FSC-Detektor erfasst, seitliches Streulicht durch einen SSC-Detektor. Vom Farbstoff emittiertes Licht wird gefiltert und von Detektoren aufgenommen (1-3), das Signal elektronisch verstärkt, digitalisiert und per Computer ausgewertet und graphisch dargestellt. FSC (Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht), SSC (Side Scatter, Seitwärtsstreulicht).

2.3.4. Intrazelluläre Zytokinfärbung

Um zu belegen, dass die per ELISPOT gewonnenen Erkenntnisse auf der Aktivierung von CD8⁺, zytotoxischen T-Zellen (CTL) beruhen, wurden die Zytokine IFN γ und Tumornekrosefaktor (TNF) α intrazellulär angefärbt. Eine phänotypische Einordnung der Zellen erfolgte durch Markierung der extrazellulären Korezeptoren CD4 und CD8.

Am Tag 12 der Prästimulation wurden dazu die PBMCs gezählt und jeweils etwa eine Million, mindestens aber 400.000 PBMCs in einzelnen Wells einer 96-Well-Rundbodenplatte ohne Steg steril vorgelegt. Die Intrazellulärfärbungen im Rahmen dieser Arbeit wurden durch den Autor selbst angefertigt.

Die spezifischen Peptide wurden in Duplikaten getestet, es gab zusätzlich mindestens eine Negativkontrolle mit irrelevantem Peptid (**Tabelle 2**) und eine Positivkontrolle entweder mit den Stimulantien PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und Ionomycin (beide Sigma) oder dem bakteriellen Superantigen SEB (Staphylokokken-Enterotoxin B) sowie ein Kontroll-Well mit ungefärbten Zellen, das auch den Waschvorgängen unterzogen wurde.

Für jedes Well, in dem sich die Zellen nun in einem Volumen von 100 µl befinden, wurden 100 µl einer Brefeldin A-Lösung mit einer finalen Konzentration von 10 µg/ml vorgesehen, in der die Stimulantien gelöst waren: Das spezifische Peptid (final: 1 µg/ml), PMA (50 ng/ml) und Ionomycin (1 µM) oder SEB (1 µg/ml). Die Inkubation erfolgte 6 h lang bei 37°C im Brutschrank.

Die Peptide und Stimulantien bewirken eine Aktivierung der T-Zellen, die unter anderem verschiedene Zytokine produzieren und ausschütten. Brefeldin A interferiert mit dem Transport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat, so dass der Transport gehemmt wird, die produzierten Zytokine in der Zelle verweilen[48] und anfärbbar werden.

Alle folgenden Zentrifugationsschritte fanden bei 1800 rpm und 4°C für 2 min statt. Ein Waschvorgang bestand aus der Zentrifugation und somit Sedimentation der Zellen, Abkippen des Überstandes und erneutem Lösen der Zellen in dem jeweiligen Waschmedium. Es wurde lichtgeschützt gearbeitet.

Nach 2 Waschvorgängen mit PBSE (PBS/2mM EDTA) wurden die Zellen in 50 µl der Aqua Live/Dead Färbelösung (**Tabelle 4**, in PBSE) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Aqua Live/Dead ist ein aminreaktiver Fluoreszenz-Farbstoff. Bei toten Zellen mit gestörter Zellmembran werden im Gegensatz zu lebendigen Zellen auch intrazelluläre Aminogruppen angefärbt, so dass tote Zellen bis zu 50-fach stärker anfärbbar und somit unterscheidbar sind. Am Ende der Inkubationszeit werden die Wells mit 150 µl PBSE aufgefüllt, zentrifugiert und noch zweimal mit FACS-Puffer (PFEA: PBS, 2% hitzeinaktiviertes FCS, 2 mM EDTA, 0,01% NaN₃) gewaschen.

Es folgte die Färbung der extrazellulären Strukturen CD4 und CD8, indem die Antikörper in PFEA verdünnt (**Tabelle 4**) und die Zellen in je 50 µl der Lösung

resuspendiert wurden. Nach 20 min Inkubation und 2 weiteren Waschvorgängen erfolgte die Permeabilisierung der Zellen mit Cytotfix/Perm (BD, 100 µl pro Well). An die Inkubation und 2 Waschvorgänge mit Permwash (PBS, 0,1% Saponin S-7900, 0,5% BSA, 0,02% NaN₃) anschließend wurden die Wells in 50 µl der Lösung mit IFN γ - und TNF α -Antikörpern in Permwash resuspendiert. 20 min später konnten die Zellen nach zweimaligem Waschen mit Permwash in 200 µl pro Well FACS Fix (PFEA, 1% Formaldehyd) fixiert werden und waren einsatzbereit.

Tabelle 4: Für die intrazelluläre Zytokinfärbung verwendete Antikörper und Farbstoffe: Spezifität, gekoppelte Farbstoffe, Hersteller, Verdünnung und Exzitations-/Emissionsmaxima (Ex_{max}/Em_{max}).

Antigen	Farbstoff	Hersteller	Verdünnung	Ex_{max}	Em_{max}
CD8	FITC	laborintern	1:400	495 nm	520 nm
CD4	APC-Cy7	BD	1:100	650 nm	767 nm
IFN γ	PE	BioLegend	1:200	495 nm	576 nm
IFN γ	PE-Cy7	BioLegend	1:400	495 nm	785 nm
TNF α	Pacific Blue	BioLegend	1:120	405 nm	456 nm
Spezifität	Farbstoff	Hersteller	Verdünnung	Ex_{max}	Em_{max}
Amine	Aqua Live/Dead	Invitrogen	1:400	367 nm	526 nm

2.3.5. HLA-Tetramerfärbung von virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen

MHC-Monomere bestehen aus einem bestimmten HLA-Molekül, das ein bestimmtes Peptid in der Peptidbindungsfurche gebunden hat. Beispielsweise wurde die biotinylierte schwere Kette des Moleküls HLA-A*11:01 in einem Rückfaltungsprozess mit einem Peptid vereinigt, so dass sie mit dem β 2-Mikroglobulin zusammen ein MHC-Monomer bildet. Im weiteren Verlauf können vier dieser biotinylierten Monomere an ein Farbstoff-gekoppeltes Streptavidin gebunden werden, um HLA-Tetramere zu erzeugen. Durch die Färbung von Zellen mit Tetrameren binden passende TCRs an diese Tetramere, so dass die Antigen-spezifität der CTLs nachgewiesen werden kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier verschiedene Tetramere hergestellt, um exemplarisch zu

zeigen, dass die Immunantwort gegen die untersuchten Epitope auf antigenspezifischen CTLs beruht.

2.3.5.1. Synthese von MHC-Monomeren

Der Rückfaltungsprozess dauert 5 Tage, daran anschließend finden die Konzentrierung, Säulenchromatographie, Biotinylierung und die Protein-Quantifizierung statt.

Nachdem die schwere Kette von HLA-A*11:01 sowie das β 2-Mikroglobulin gentechnisch hergestellt und die Proteine aus den *inclusion bodies* aufgereinigt wurden, startete der Rückfaltungsprozess an Tag 1. Dazu wurde in einer 250 ml-Flasche der Rückfaltungspuffer angesetzt (200 ml ddH₂O, 17,42 g L-Arginin (Fluka), 5,95 g HEPES (Roth), 1 ml EDTA 0,5 M pH 8 (Sigma)), bei 10°C mit HCl auf einen pH-Wert von 7,76 eingestellt und mit ddH₂O auf 250 ml aufgefüllt. Alle folgenden Schritte fanden im Kühlraum bei 4°C unter ständigem Rühren statt: 385 mg reduziertes und 77,5 mg oxidiertes Glutathion wurden zugegeben und die Lösung mit 250 μ l des Proteaseinhibitors PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) und ca. 5 mg des eingewogenen Peptids (gelöst in DMSO, 10 mg/ml) versetzt. 8 mg der schweren Kette wurden anschließend mit einer Harnstofflösung auf eine Konzentration von 20 mg/ml gebracht, mit 700 μ l Injektionspuffer (3 M Guanidiniumchlorid (Fluka), 10 mM Natriumacetat (Sigma), 10 mM EDTA (Sigma), pH = 4,2) gemischt und nahe des Strudels injiziert. Nach der Injektion von 7 mg der leichten Kette (in 780 μ l Injektionspuffer gelöst) folgte eine zwölfstündige Inkubation auf einer Rüttelplatte im Kühlraum. Am zweiten Tag wurde morgens und abends auf gleiche Weise 8 mg der schweren Kette hinzugefügt.

Am Tag 3 fand die erste Konzentrierung statt: Nach Filtrierung durch einen 0,22 μ m-Vakuum-Filter wurde das Pellet verworfen und das Permeat mittels einer Amicon-Rührzelle (Millipore) bei einem Druck von 60 psi filtriert, bis etwa 25 ml übrig waren. Dieses Retentat enthält nun hauptsächlich fertig rückgefaltete MHC-Monomere in konzentrierter Form. Es wurde abgeschöpft, die Membran der Rührzelle mit etwas Permeat gewaschen und im Kühlschrank gelagert. Der

Rest des Permeats enthält nun PMSF und leichte und schwere Ketten und wurde nochmals einer zweiten Rückfaltung auf einem Rütteltisch (12 h, 4°C) unterzogen. Am Tag 4 wurde analog zu Tag 2 die schwere Kette hinzugefügt.

Eine erneute Konzentrierung am fünften Tag erlaubte das Zusammenführen der Monomer-Lösungen von den Tagen 3 und 5 in einem Zentrifugenröhrchen (50 ml, BD Falcon). Um die Lösung von gröberen Proteinaggregaten zu befreien, wurde sie für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand, der die gewünschten MHC-Monomere enthält, wurde nochmals stärker konzentriert, indem Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (Millipore) verwendet wurden. Nach einer Prääquilibrierung mit TBS (20 mM Tris (Sigma), pH 8,0/4°C, 150 mM NaCl (Merck), 0,5% NaN₃, gefiltert und autoklaviert) bei 4000 rpm und 4°C für 5 min, wurde der Überstand der vorher zentrifugierten Monomer-Lösung immer wieder eingefüllt und zentrifugiert, bis die Lösung auf ca. 4-5 ml eingedickt war.

Am Tag 6 erfolgten die Größenausschluss-Chromatographie, eine erneute Konzentrierung und die Biotinylierung.

Dazu wurde nach einem erneuten Zentrifugationsschritt zur Auftrennung der unterschiedlichen Proteine eine FPLC (fast protein liquid chromatography) durchgeführt und die Lösung unter spektroskopischer Kontrolle (280 nm) in Fraktionen zu je 5 ml gesammelt (FPLC-System mit Superdex 75 HiLoad-Säule, 26/60). Die Fraktionen, die die Monomere enthalten, wurden in einem Zentrifugenröhrchen zusammengeführt, sofort mit den Proteaseinhibitoren PMSF, Pepstatin und Leupeptin versehen (1:1000) und etwaige Proteinaggregate abzentrifugiert, bevor eine erneute Konzentrierung mit Amicon Ultra-15 Filtereinheiten (s.o.) durchgeführt wurde.

Es folgte die Biotinylierung der mit Biotinylierungssequenzen versehenen schweren Ketten: Die nun 5 ml umfassende Lösung wurde mit Tris (1 M), MgCl₂ (1 M) und ATP (Adenosintriphosphat, 100 µM) versehen, bevor 10-20 µg des BirA-Enzyms und seines Substrats (Biotin, 100 mM) zugegeben und gut vermischt wurden. Die Inkubation erfolgte über 12-16 h in einem Wasserbad bei 27°C. Anschließend fand eine erneute FPLC und Konzentrierung bis auf ca.

350-450 µl statt. Um die synthetisierten Monomere in angemessener Konzentration einfrieren zu können, musste eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt werden, indem die Probe in zwei verschiedenen Verdünnungen (1:200 und 1:500) in Triplikaten auf eine 96-Well-Platte pipettiert wurde. Als Standardlösung diente der Roti-Nanoquant Proteinassay, der BSA in verschiedenen Konzentrationen enthält (20, 40, 60, 80 und 100 µg/ml). Die Messung erfolgte nach 5 min Inkubationszeit im ELISA-Reader Spectramax 340 (Molecular Devices). Nach Auftragung der Standardkurve konnte die Konzentration der Monomere ermittelt, auf 2 mg/ml angepasst und in Aliquots zu je 50 µg pro 25 µl bei -80°C gelagert werden.

2.3.5.2. Tetramerisierung mittels Streptavidin

Zur Tetramerisierung wurde Streptavidin verwendet, das mit R-Phycoerythrin (R-PE) gekoppelt ist (Molecular Probes S-866, 1 mg/ml). Da ein Streptavidin-Molekül vier Biotineinheiten bindet, beträgt das stöchiometrische Verhältnis der Mischung aus Monomeren und Streptavidin idealerweise 4:1. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichts wurden nun 50 µg des Monomers (45 kDa) schrittweise mit 78,5 µl des Konjugats aus R-PE (240 kDa) und Streptavidin (60 kDa) versehen. Die Zugaben erfolgten in zehn einzelnen Schritten zu je 10% der Gesamtmenge (78,5 µl), jeweils gefolgt von einer 30-minütigen, lichtgeschützten Inkubationszeit unter konstantem Schütteln bei 4°C.

Zur Kryokonservierung der synthetisierten HLA-Tetramere wurde ein Einfriermedium aus Glycerin (48%), BSA (1,5%), Tris (20 mM), NaN₃ (0,06%) und einem Proteaseinhibitor hergestellt. Ein Teil Einfriermedium wurde mit zwei Teilen Tetramerlösung gemischt und eingefroren und enthielt nun Tetramere mit einer Konzentration von 32,2 µg pro 100 µl.

2.3.5.3. HLA-Tetramerfärbung

Die Vorgehensweise bei der Tetramerfärbung entspricht weitgehend der Intrazellulären Zytokinfärbung, nur wird hierbei auf die Permeabilisierung der

Zellen verzichtet. Nach der Färbung mit dem Aqua Live/Dead-Farbstoff wurden die Zellen zweimal mit *Tetramer-Staining-Buffer* (TSB: 50% PBS, 50% FCS, 2 mM EDTA) gewaschen. Anschließend wurden die Tetramere mit TSB auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt, bei 13.000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert und die Zellen für 30 min in einem Volumen von 50 µl pro Well inkubiert. Es folgte die Färbung mit den Extrazellulärantikörpern gegen CD4 und CD8 und die Fixierung in FACS-Fix, um die Zellen in der Durchflusszytometrie analysieren zu können.

2.3.6. Gating-Strategien

Standardmäßig wurden die Populationen sukzessive auf lebendige Zellen (FSC-A vs. Aqua Live/Dead), Lymphozyten (FSC-A vs. SSC-A) und Einzelzellen (FSC-A vs. FSC-H) eingeschränkt. Für die reine Intrazellulärfärbung erfolgte anschließend die Auswahl der CD8⁺CD4⁻ sowie der CD4⁺CD8⁻ Population. Bei der Tetramerfärbung wurde die gesamte CD4⁻ Population verwendet. Die konsequente Anwendung dieser *Gating*-Strategie führte zu den in **Abbildung 6** dargestellten Grafiken.

3. ERGEBNISSE

3.1. Effekt der 12-Tages-Prästimulation auf die per Elispot nachweisbare Immunreaktion

Um die Zahl der antigenspezifischen T-Zellen, die zuvor im Körper der Blutspender bei der Infektion aktiviert wurden und im zirkulierenden Blut persistieren, zu erhöhen und damit einfacher nachweisbar zu machen, wurde die 12-Tages-Prästimulation angewandt. Zur Evaluation des Effektes wurden 8 Kombinationen aus Blutspender und viralem Peptid per IFN γ -Elispot getestet.

Dazu wurden die Prozesse so geplant, dass die PBMCs sowohl nach 12-Tages-Prästimulation als auch *ex vivo* im einem einzigen Ansatz gleichzeitig in Triplikaten verwendet werden konnten. Die folgenden Epitope kamen zur

Anwendung: EBV-Epitope AVFDRKSDAK, IVTDFSVIK, SSCSSCPLSK, RLRAEAQVK und KVAKVAPLK, und das CMV-Epitop GPISGHVLK (weitere Details siehe **Tabelle 7** und **Tabelle 8**).

Die resultierenden Elispot-Abbildungen von drei Blutspendern, die mit unterschiedlichen Peptiden stimuliert wurden, sind beispielhaft in **Abbildung 3** dargestellt.

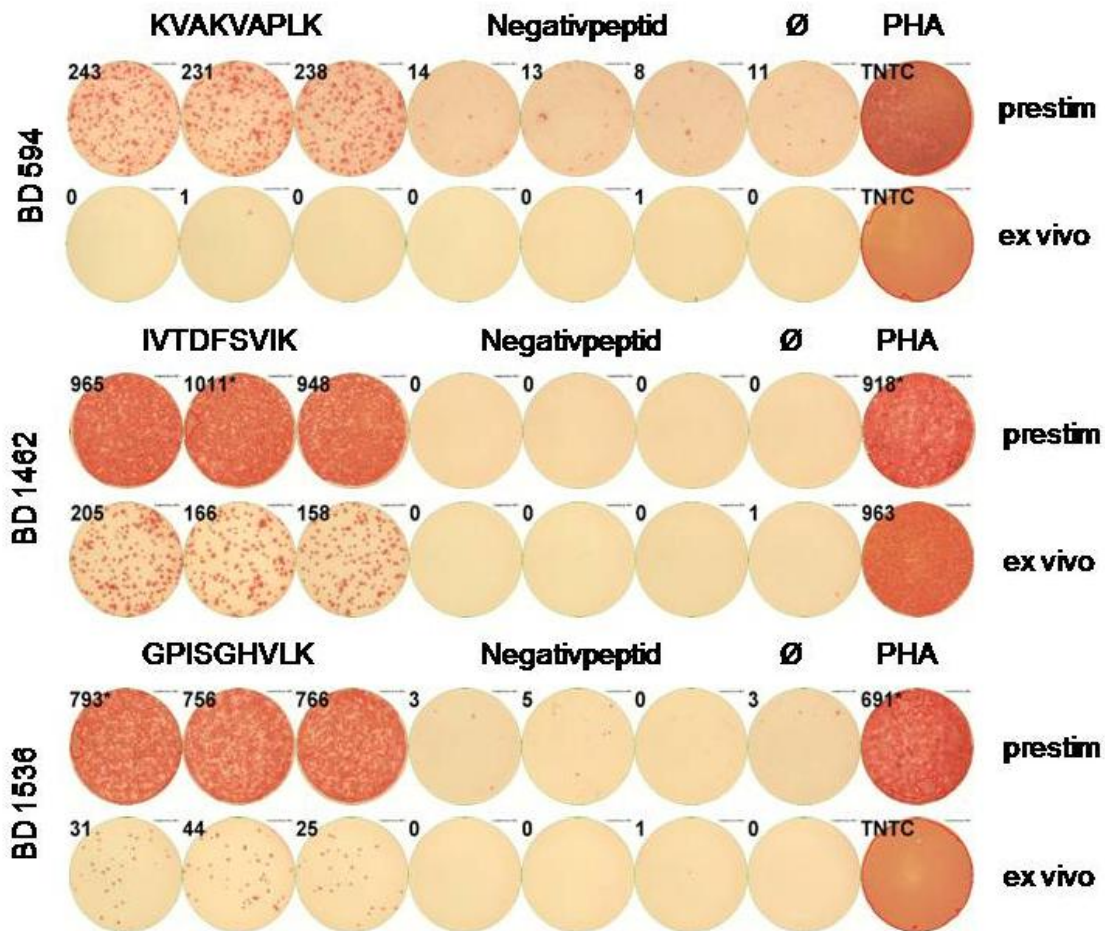


Abbildung 3: Vergleich der Elispots von 3 verschiedenen Blutspendern (BD) gegen 3 virale Peptide (Auswahl), mit 12 Tages-Prästimulation (prestim) und ohne (ex vivo). Dargestellt sind jeweils Triplikate des Peptids und des Negativpeptids, eine Probe ohne Stimulans (Ø) und eine PHA-Positivkontrolle. Das Experiment wurde in einem einzigen Setting durchgeführt. Bei allen dargestellten Peptiden ist eine Amplifikation der Spotanzahl durch die Prästimulation erkennbar. TNTC = *Too Numerous To Count*; PHA = Phytohämagglutinin; BD = Blutspender (*Blood Donor*).

Gegen alle 3 Peptide ist nach Prästimulation eine starke Reaktion nachweisbar. Während eine Reaktion gegen KVAKVAPLK *ex vivo* ausbleibt (mittlere Spotanzahl 0,3), rufen IVTDFSVIK (176,3 spots) und GPISGHVLK (33,3 spots) jeweils auch *ex vivo* eine Reaktion hervor, die schwächer ist als nach der Prästimulation. Unsere empirische Regel für eine positive Immunantwort gegen ein Peptid besteht aus 2 Kriterien: (a) Mindestens 10 Spots pro Well (und damit pro 500.000 PBMCs) und (b) eine 3-fach höhere Anzahl an Spots als in der Negativkontrolle müssen vorhanden sein (dargestellt jeweils in **Abbildung 4A** und **B**).

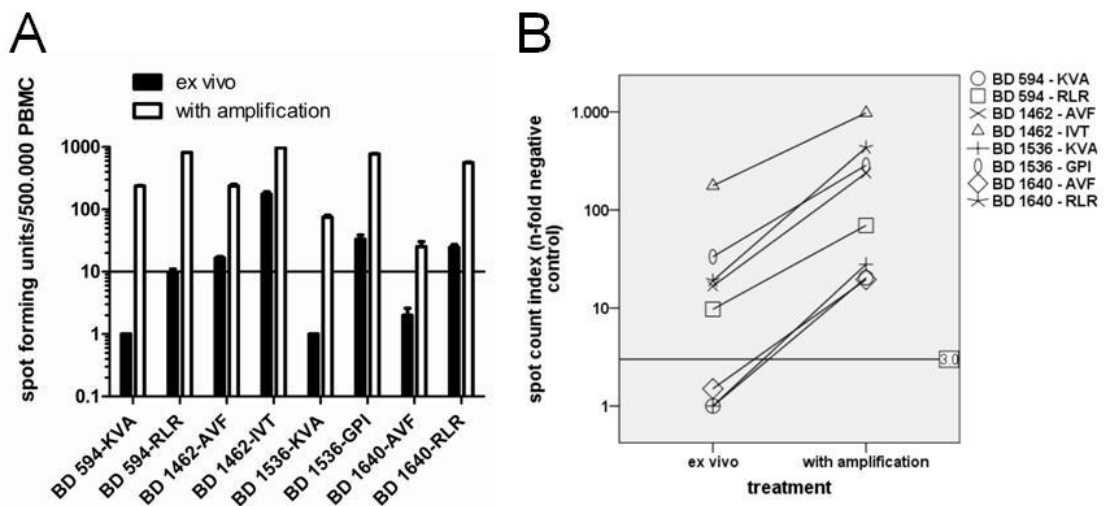


Abbildung 4: Effekt der 12-Tages-Prästimulation auf die Detektion von T-Zellen per Elispot. Die Beschriftungen zeigen die Kombination von Blutspender (BD) und stimulierendem Peptid (erste 3 Buchstaben der FASTA-Sequenz). **(A)** Anzahl an *spot forming units* (SFU) pro 10^5 PBMCs nach spezifischer Peptidstimulation, *ex vivo* (schwarze Säulen) und nach Prästimulation (weiße Säulen). Die Angaben sind die arithmetischen Mittelwerte der Triplikate, die Balken zeigen den Standardfehler an. Die horizontale Linie bei $y=10$ visualisiert den Schwellenwert der ersten Regel, ab dem eine Reaktion als positiv gewertet wird. **(B)** *Spot count index* aller 8 Proben, sowohl *ex vivo* als auch nach 12-Tages-Prästimulation. Die horizontale Linie bei $y=3$ visualisiert den Schwellenwert der zweiten Regel, ab dem eine Reaktion als positiv gewertet wird.

Die Unterschiede in der Spotanzahl zwischen *ex vivo*-Messungen und dem Amplifikationsprozess waren bei allen acht Kombinationen signifikant (BD 1640-

AVFDRKSDAK, $p=0,0350$) bis sehr signifikant (BD 594-RLRAEAQVK, $p<0,0001$) unter Zuhilfenahme eines abhängigen T-Tests. Nach dem Amplifikationsprozess konnte gegen alle Epitope eine Reaktion belegt werden, i.e. beide Kriterien der empirischen Regel wurden erfüllt. Vier Epitope haben *ex vivo* die Minimalschwelle von 10 Spots nicht überschritten (BD 594-KVA, BD 594-RLR, BD 1536-KVA und BD 1640-AVF), von denen drei Epitope auch das zweite Kriterium nicht erfüllt haben (lediglich BD 594-RLR). KVAKVAPLK, RLRAEAQVK und AVFDRKSDAK sind somit in diesen vier Spendern *ex vivo* als nicht immundominant identifiziert worden.

Auf der Grundlage der vier getesteten Kombinationen, in denen auch *ex vivo* eine Reaktion zustande kam, konnten Amplifikationsfaktoren aus dem *spot count index* berechnet werden: Diese reichten von 5,5-facher (BD 1462-IVT) bis hin zu 22,8-facher Amplifikation (BD 1640-RLR), mit einem Median von 11,0 und einem arithmetischen Mittelwert von 12,6.

Dieses Protokoll der 12-Tages-Prästimulation wurde in den folgenden Experimenten verwendet, um Immunreaktionen gegen eine Vielzahl von HLA-gebundenen Epitopen per Elispot nachzuweisen.

3.2. Epitopscreening

3.2.1. Unterscheidung zwischen Immundominanz und der Erkennungsfrequenz von Epitopen

EBV-Infektionen sind hoch prävalent in der menschlichen Bevölkerung. Daher stellen CTL-Reaktionen gegen dieses Virus ein ausgezeichnetes Mittel dar, um zu bestimmen, in welchen Individuen ein bestimmtes T-Zell-Epitop *per vias naturalis* eine Immunantwort hervorgerufen hat. Gerade im Hinblick auf die spezifische Immuntherapie von Komplikationen nach Transplantationen oder von Krebs ist es interessant, in wiefern ein therapeutisches Epitop eine größere Bevölkerungsgruppe abdecken kann.

Bestimmte Proteine aus dem latenten und frühen lytischen Zyklus sind als besonders immunogenes Ziel von CTL-Reaktionen beschrieben[37] und führten

somit zu unserer Auswahl von 12 EBV-Antigenen, aus denen mögliche Epitopkandidaten vorhergesagt wurden. Diese Epitopkandidaten wurden anschließend auf *Immundominanz* getestet, das heißt es wurde nach dem Epitop gesucht, das im Gegensatz zu vielen anderen möglichen Kandidaten aus einem Antigen dasjenige ist, das für den Großteil der T-Zellen eines Individuums verantwortlich zeichnet[49, 50]. Davon zu unterscheiden ist die Einteilung der Epitope in solche, gegen die bei einer hohen Anzahl an Blutspendern zytotoxische T-Zellen nachweisbar sind (hohe Erkennungsfrequenz, frequently recognised epitopes, FREP) und solche, die mit einer niedrigen Erkennungsfrequenz behaftet sind (kryptische Epitope). Bei der Berücksichtigung dieser Einteilung sind die Parameter „Erkennungsfrequenz“ und „Immundominanz“ grundsätzlich erst einmal unabhängig voneinander zu sehen: Dabei ist es theoretisch möglich, dass ein Epitop, das als nicht immundominant (i.e. subdominant) gilt, bei einer großen Anzahl an Individuen eine T-Zell-Reaktion hervorruft. Andererseits muss ein immundominantes Epitop nicht zwangsläufig mit einer hohen Erkennungsfrequenz auftreten. Andere Autoren nutzen zur Unterscheidung auch die Terminologie „intraindividuelle Immundominanz“, die die klassische Immundominanz darstellt, und „interindividuelle Immundominanz“, die die Erkennungsfrequenz darstellt[51].

3.2.2. Ergebnisse der Epitopauswahl und des Screenings auf Immundominanz sowie die Erkennungsfrequenz auf HLA-A*11

Die überwiegende Anzahl der über HLA-A*11 präsentierten Peptide weisen eine Länge von neun oder zehn Aminosäuren auf, dementsprechend wurden nur Nonamere und Dekamere bei der Epitopvorhersage berücksichtigt. Bei einem Protein mit n Aminosäuren kommen nun $n-8$ mögliche Nonamere und $n-9$ mögliche Dekamere in Frage, aus denen Syfpeithi eine Rangliste erstellt. Die Beschränkung auf 2% der Kandidaten mit den höchsten Scores ergab bei den 12 EBV-Antigenen eine Gesamtzahl von 167 Epitopkandidaten, von denen insgesamt 10 Peptide wegen einer unangemessenen C-terminalen

Ankeraminosäure vernachlässigt wurden. Beispielhaft sind 2% der Epitopkandidaten mit der höchsten Punktzahl (Nonamere und Dekamere) aus dem Early-Protein DNBI in **Tabelle 5** dargestellt.

Immunogene Peptide sind lediglich aus acht der insgesamt 12 untersuchten Antigene hervorgegangen. Im Zusammenhang mit HLA-A*11 sind keine Peptide aus den vier Proteinen BZLF1, BMRF1, LMP1 und MTP als immundominant identifiziert worden.

Tabelle 5: 2% der *Highscore*-Peptide (n=23) aus dem EBV-Protein **DNBI** (BALF2), getestet auf HLA-A*11⁺ Blutspendern, die kein anderes Allel aus der HLA-A*03-Gruppe tragen. Reaktive Epitope sind fett markiert.

Start-aa	Sequenz	Syfpethi-score	Batch-Nummer	Reaktionsrate	reaktive Blutspender
340	SVLYVSGVSK	28	100172	2/8 pos	1604,1610
410	ASFSPNLLAR	27	101180	0/8 pos	-
897	ATDCLSQVCK	27	101181	0/8 pos	-
911	VTLPVTINK	26	100174	1/8 pos	1610
241	SLQDQAKVAK	25	100177	0/8 pos	-
542	GIDAEGKLEK	25	100178	0/8 pos	-
971	ATPTLGLTVK	25	100180	0/16 pos	-
671	GVLTAKEAK	25	100176	0/8 pos	-
63	FSINVKALHR	24	100187	0/8 pos	-
910	VVTLPVTINK	24	100188	2/15 pos	668,884
150	AVAITEAFK	24	100179	0/7 pos	-
183	SVRVPLYDK	24	100186	0/8 pos	-
224	ALRVRRVGK	24	100189	0/8 pos	-
247	KVAKVAPLK	24	100195	4/15 pos	856,884,996,1162
973	PTLGLTVKR	24	101176	1/16 pos	1395
182	ASVRVPLYDK	23	100196	1/16 pos	856
346	GVSKSTGQGK	23	101170	0/8 pos	-
848	ISLIQGLVPR	23	100197	0/8 pos	-
64	SINVKALHR	23	101197	0/7 pos	-
177	AVGQSASVR	23	101177	1/16 pos	1395
849	SLIQGLVPR	22	101178	0/8 pos	-
1110	GSGGRRKRR	22	110100	1/8 pos	1650
220	GLAQALRVRR	22	110137	0/8 pos	-

Alle bis *dato* für die Restriktion HLA-A*11 bekannten und meist durch das systematische Testen von überlappenden Peptiden entdeckten EBV-Epitope

sind in diesem Screening enthalten gewesen und in ihrer Immundominanz bestätigt worden (**Tabelle 6**). Drei der Epitope (AVFDRKSDAK, IVTDFSVIK [beide EBNA4] und SSCSSCPLSK [LMP2]) werden von einer breiteren Anzahl an HLA-A*11⁺ Individuen erkannt, was sie zu sehr hochfrequenten Epitopen macht. Sie entstammen außerdem Antigenen, die in der Latenzphase exprimiert werden. Bei ATIGTAMYK, das dem Immediate-Early-Antigen BRLF1 entstammt, betrug die Reaktionsrate nur 3/8. Grundsätzlich wurde bei reaktiven Epitopen angestrebt, sie auf einer zweistelligen Anzahl an Blutspendern per Elispot zu testen.

Tabelle 6: Alle im Verlauf des Epitopscreenings auf HLA-A*11⁺ Blutspendern als reaktiv getesteten Epitope. Bereits bekannte Epitope sind fett hervorgehoben.

Antigen	Start aa*	Peptid-sequenz	Score	Batch-Nummer	Reaktions-rate	Reaktive Blutspender
BRLF1	134	ATIGTAMYK	26	100157	3/8	1600,1604,1610
	186	SSKFKAFCCK	24	101150	1/8	1391
	256	PILVSGADR	17	100009	1/15	1391
DNBI	340	SVLYVSGVSK	28	100172	2/8	1604,1610
	911	VTLPVTINK	26	100174	1/8	1640
	247	KVAKVAPLK	24	100195	4/15	856,884,996,1162
	910	VVTLPTINK	24	100188	2/15	668,884
	973	PTLGLTVKR	24	101176	1/16	1395
	177	AVGQSASVR	23	101177	1/16	1395
	182	ASVRVPLYDK	23	100196	1/16	856
	1110	GSGGRRKRR	22	110100	1/8	1650
EB2	338	MSLSKVILTK	27	71045	4/15	1391,1394,1100,1162
EBNA3	210	VTFSAGTFK	22	100246	4/15	1170,1542,1597,1644
	369	IVSRGGPKVK	22	100245	2/15	1593,1644
	253	YMAIHRSLTK	21	101213	2/15	1597,1653
EBNA4	416	IVTDFSVIK	27	100220	5/8	668,845,856,859,895
	399	AVFDRKSDAK	26	71279	53/60	
	779	GVKKGRPSLK	26	101196	1/15	695
	415	AIVTDFSVIK	24	100222	5/8	668,845,856,859,895
	786	SLKLQAALER	23	100228	2/16	859,1644
EBNA6	368	TSSDEDTGR	20	100260	2/16	1597,1607
LMP2	340	SSCSCPLSK	29	60129	6/8	1600,1604,1609,1610, 1617,1618
GP 350	257	GTGYAYSLR	23	100230	1/14	884

*aa = Aminosäure

Die N-terminale Verlängerung des EBNA4-Nonamers IVTDFSVIK (Aminosäuren 416-424) um einen Alanin-Rest (AIVTDFSVIK, 415-424) führt in den gleichen 5 von 8 Blutspendern zu einer sehr ähnlichen Ausprägung der per Elispot nachweisbaren Reaktion und wird somit als IVTDFSVIK-ident angesehen.

Insgesamt wurden Reaktionen gegen 22 verschiedene Epitope aus acht EBV-Antigenen entdeckt, von denen vier Epitope bereits bekannt waren (s.o.). Dann gibt es weitere vier Epitope, die auf mehr als zwei Blutspendern Reaktionen hervorrufen, aber nicht als Hochfrequenzepitope auf HLA-A*11 angesehen werden können: KVAKVAPLK (BALF2), MSLSKVILTK (EB2), VTFSAGTFK (EBNA3) und ATIGTAMYK (BRLF1). Auf diese Epitope mit niedriger Erkennungsfrequenz wird zusammen mit deren Freizügigkeit und exemplarischem Spezifitätsnachweis in den **Kapiteln 3.3.2** und **3.3.3** eingegangen. Bei den verbleibenden 14 Epitopen, gegen die bei maximal zwei Blutspendern eine Reaktion nachweisbar war, wurde von einer Einbeziehung in weitere Analysen abgesehen.

3.2.3. Konsequenzen aus der serologischen Bestimmung und somit niedrigen Auflösung der Typisierung der Blutspender

Da die serologische HLA-Typisierung nur eine niedrige, zweistellige Auflösung hervorbringt, kann nur indirekt über Populationsstudien auf den dominierenden Anteil des genauen HLA-Haplotypen geschlossen werden. Lässt man sich auf der Homepage www.allelefrequencies.net nun alle großen Populationen auflisten, in denen beispielsweise die Haplotypen A*11:01 bis A*11:176 vorkommen, so dominiert HLA-A*11:01 klar vor allen anderen[52]. Ebenso dominieren A*03:01, A*31:01, A*66:01 und A*68:01, so dass man bei der serologischen Bestimmung mit niedriger Auflösung jeweils von diesen Haplotypen ausgehen kann. Lediglich bei dem insgesamt recht niedrigfrequent vorkommenden Antigen A*33 dominieren zwei Haplotypen, nämlich A*33:01 und A*33:03 (Stand Januar 2014).

3.3. Testung der Freizügigkeit von definierten Peptiden

Die Forderung von HLA-Supertypen basiert auf der Entdeckung, dass ein Peptid durchaus zu mehreren unterschiedlichen HLA-Molekülen eine hohe Avidität besitzen kann. Um die Freizügigkeit von T-Zell-Epitopen innerhalb des HLA-A*03-Supertyps systematisch zu untersuchen, wurden im folgenden alle Hochfrequenz-Epitope (Kapitel 3.3.1) sowie die wichtigsten niedrigfrequenten Epitope (Kapitel 3.3.2) im Zusammenhang mit den anderen Molekülen der Gruppe um HLA-A*03 auf ihre Immunogenität und Erkennungsfrequenz hin getestet. Ergänzt wurden die Analysen durch die Einbeziehung von bereits veröffentlichten EBV- sowie CMV-Epitopen.

3.3.1. Hochfrequenz-Epitope und Promiskuität

Gegen vier Epitope (aus EBV und CMV) ist jeweils in einem großen Anteil an HLA-A*11⁺ Individuen eine Immunreaktion nachweisbar, was sie *per definitionem* zu hochfrequenten Epitopen auf **HLA-A*11** macht (AVFDRKSDAK, IVTDFSVIK [beide EBNA3], SSCSSCPLSK [LMP2] und ATVQGQNLK [pp65], **Tabelle 7**).

Tabelle 7: Erkennung von hochfrequenten Epitopen durch Blutspender mit je nur einem Antigen aus der Gruppe HLA-A*03, oder gar keinem. Anerkannte Restriktionen sind fett hervorgehoben.

Virus	Peptidsequenz	Reaktionsrate von Blutspendern mit HLA-					A*03s ^{-a)}	p-Wert (n) ^{b)}
		A*03	A*11	A*31	A*33	A*68		
EBV	AVFDRKSDAK [53]	1/23	53/60	0/8	0/7	1/14	0/7	< 0,0001 (112)
EBV	SSCSCPLSK [54]	0/8	6/8	n.d. ^{c)}	0/7	0/8	1/8	< 0,0001 (31)
EBV	IVTDFSVIK [53]	0/14	5/8	0/8	0/7	3/7	0/7	0,0024 (44)
EBV	RLRAEAQVK [55]	7/8	0/7	0/8	0/7	0/8	1/8	< 0,0001 (38)
CMV	ATVQGQNLK [56]	n.d.	5/8	0/5	0/7	0/6	0/9	0,0009 (26)
CMV	FVFPTKDVALR [56]	4/13	0/8	0/5	0/7	5/6	1/9	0,0012 (39)

a) Reaktionsrate von Blutspendern ohne Antigen der Gruppe HLA-A*03

b) two sided Fisher's exact test

c) n.d. nicht durchgeführt

Das EBV-Epitop RLRAEAQVK [EBNA3] wird durchgehend erkannt von **HLA-A*03⁺** Blutspendern, während das CMV-Epitop FVFPTKDVALR [pp65] hauptsächlich von **A*68⁺** Blutspendern erkannt wird. All diese Hochfrequenzepitope besitzen also jeweils eine HLA-Restriktion, auf der sie gehäuft anzutreffen sind (= anerkannte Restriktion). Dabei erreichen sie eine Abdeckung von 62,5 % (5/8, ATVQGQNLK und IVTDFSVIK) bis hin zu 88,3 % (53/60, AVFDRKSDAK). Ihre Restriktion zu einem HLA-Molekül ist hoch signifikant, mit p-Werten von 0,0024 (IVTDFSVIK) bis <0,0001 (AVFDRKSDAK, SSCSSCPLSK und RLRAEAQVK), bestimmt durch den exakten Fisher-Test.

Das CMV-Epitop ATVQGQNLK kommt als einziges Peptid ausschließlich im Zusammenhang mit HLA-A*11 vor, so dass es als streng monogam eingestuft werden kann (**Tabelle 7** und **Abbildung 5D**). SSCSSCPLSK und RLRAEAQVK rufen zusätzlich eine Immunantwort in je einem Spender hervor, der kein Antigen aus der A*03-Gruppe trägt (BD 1633 [A*02, A*25, B*13, B*27] und 1646 [A*02, A*30, B*13, B*62]), allerdings im Falle von SSCSSCPLSK mit erheblich niedrigerem *spot count index* als bei der anerkannten HLA-Restriktion (**Abbildung 5B** und **E**). Daher wird dieses Peptid dort als kryptisches Epitop eingestuft. Lediglich AVFDRKSDAK, IVTDFSVIK und FVFPTKDVALR zeigen Immunogenität im Kontext eines zweiten (bzw. dritten) HLA-Allels aus der A*03-Gruppe und können aufgrund der Größe des *spot count index* dort bei den meisten Spendern auch als immundominant angesehen werden. Während durch intrazelluläre Anfärbung von IFN γ und TNF α der Seitensprung von AVFDRKSDAK auf dem einen HLA-A*68⁺ Spender nicht nachgewiesen werden konnte, beruhen die restlichen Elispot-Daten aus **Tabelle 7** allesamt auf der Aktivierung von bifunktionellen, CD8⁺ T-Zellen.

AVFDRKSDAK und FVFPTKDVALR sind auch immunogen im Zusammenhang mit dem A*03-Antigen, mit einer Reaktion unter 23 getesteten Spendern (4,3%) bzw. vier von 13 Spendern (30,8%), während IVTDFSVIK eine Reaktion auf drei von sieben A*68⁺ Spendern (42,9%) hervorruft. Die Höhe des *spot count index* auf Antigenen der A*03-Gruppe ist dabei etwa vergleichbar mit der Höhe auf der anerkannten Restriktion. Im Gegensatz dazu erreicht der *spot count*

index bei den freizügigen Reaktionen von SSCSSCPLSK außerhalb des A*03-Supertyps keine vergleichbar hohen Werte (**Abbildung 5**).

Die Allotypen A*31 und A*33 sind von keiner freizügigen Reaktion der Hochfrequenzepitope betroffen.

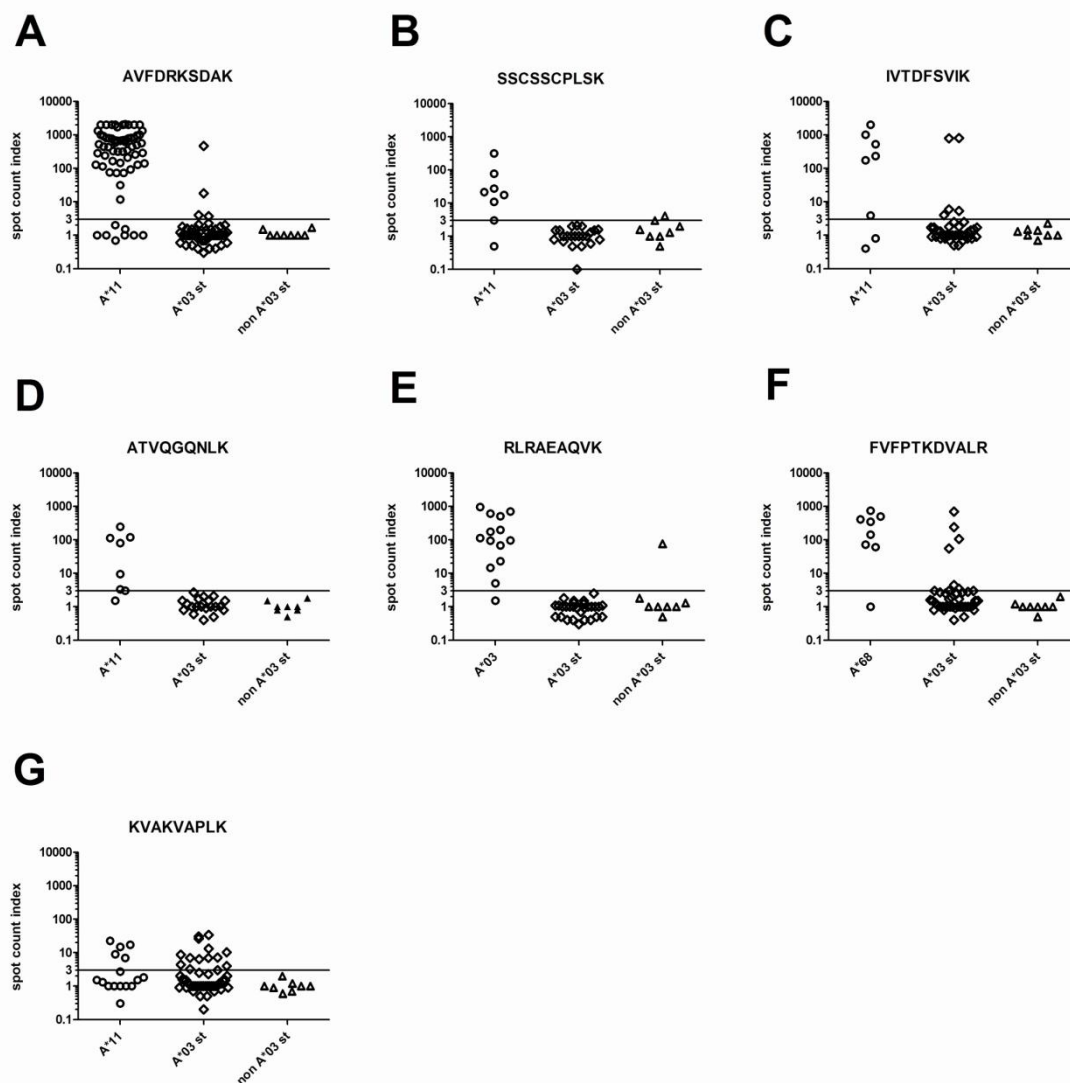


Abbildung 5: Scatterplots von sechs hochfrequenten Epitopen (**A-F**) und einem niedrigfrequenten Epitop (**G**). Der *spot count index* ist logarithmisch auf der Ordinate aufgetragen. Auf der Abszisse befinden sich 3 Kategorien: die originale HLA-Restriktion, die restlichen Allotypen des HLA-A*03-Supertyps und schließlich Allotypen, die nicht zum Supertyp gehören.

Alle diese Epitope werden also im Zusammenhang mit *einem bestimmten* HLA-Allel fast durchgehend (>62,5% der Spender) von zytotoxischen T-Zellen erkannt, während sie auf anderen Allotypen lediglich in niedrigerer Frequenz vorkommen (<42,5%).

Im Falle von AVFDRKSDAK, IVTDFSVIK, RLRAEAQVK und FVFPTKDVALR (**Abbildung 5A, C, E und F**) zeichnen sie auch außerhalb ihrer Restriktion in einzelnen Spendern für einen Großteil der T-Zellen verantwortlich (hoher *spot count index*) und gelten damit dort als immundominante, aber niedrig frequente Epitope.

Vom Leukozytenantigen A*11 aus gesehen gibt es drei hochfrequente Epitope, von denen zwei aus dem gleichen Protein stammen. Sowohl IVTDFSVIK als auch AVFDRKSDAK sind immundominante Epitope aus dem EBV-Protein EBNA4 – ein Phänomen, das im Rahmen dieser Untersuchung des A*03-Supertyps einzigartig ist.

Insgesamt besteht eine Fixierung der hochfrequenten Epitope auf eine einzelne HLA-Restriktion mit statistischer Signifikanz, wobei die Charakterisierungen von streng monogam über dominante und subdominante Seitensprünge innerhalb der A*03-Gruppe bis hin zu einzelnen Seitensprüngen außerhalb der A*03-Gruppe reichen.

3.3.2. Niedrigfrequenz-Epitope und Promiskuität

Im Folgenden wurden vier weitere EBV-Epitope, die sich im Screening auf HLA-A*11 als Epitope mit niedriger Frequenz herausstellten, auf ihre Freizügigkeit getestet zusammen mit vier weiteren CMV-Epitopen, die sich aus einer Literaturrecherche ergaben. Die Epitope KVAKVAPLK (DNBI) und MSLSKVILTK (EB2) entstammen *Early*-Proteinen, ATIGTAMYK (BRLF1) einem *Immediate-Early*-Protein und VTFSAGTFK (EBNA3) einem Antigen der Latenzphase.

Auffällig ist, dass sich die Freizügigkeit der EBV-Epitope ausschließlich auf die Allotypen A*11 und A*03 beschränkt, nicht aber auf die anderen Antigene des

Supertyps (A*31, A*33, A*68) oder gar zufällige, nicht-A*03-Gruppen-Antigene (**Tabelle 8**). Außerdem erreicht der *spot count index* bei diesen niedrigfrequenten Epitopen nicht die Höhe wie bei den immundominanten Epitopen aus Kapitel 3.3.1. Exemplarisch sei dies am subdominanten Epitop KVAKVAPLK gezeigt, dessen *spot count index* sowohl auf HLA-A*11⁺ als auch A*03⁺ Individuen weit unter dem der Hochfrequenzepitope zurückbleibt (**Abbildung 5G**). Unter Berücksichtigung des Peptidmotivs von A*11 erreicht KVAKVAPLK einen Score von 24 (Maximalscore 34) und eine Erkennungsfrequenz von 4/15 (26,7%), während es auf A*03 tatsächlich einen Score von 28 (Maximalscore hier 44) und damit eine um gut 17 Prozentpunkte höhere Erkennungsfrequenz von 10/23 (43,5%) erreicht.

Tabelle 8: Erkennung von niedrigfrequenten Epitopen durch Blutspender mit je nur einem Antigen aus der Gruppe HLA-A*03, oder gar keinem

Virus	Peptidsequenz	Reaktionsrate von Blutspendern mit HLA-					A*03s ^{-a)}
		A*03	A*11	A*31	A*33	A*68	
EBV	KVAKVAPLK ^{c)}	10/23	4/15	0/8	0/7	0/14	0/7
EBV	MSLSKVILTK ^{c)}	3/9	4/15	0/8	n.d. ^{b)}	0/8	0/8
EBV	ATIGTAMYK [57]	3/16	3/8	n.d.	0/7	0/8	0/8
EBV	VTFSAAGTFK ^{c)}	4/8	4/15	n.d.	n.d.	n.d.	0/8
CMV	TTVYPPSSTAK [58]	1/13	0/8	0/5	0/7	0/7	0/8
CMV	GPISGHVLK [59]	1/8	0/8	0/5	0/7	0/7	0/8
CMV	QTVTSTPVQGR [58]	0/5	0/8	0/5	0/7	1/6	0/9
CMV	TSAFVFPTK [56]	0/5	0/8	0/5	0/7	2/6	1/9

a) Reaktionsrate von Blutspendern ohne Antigen der Gruppe HLA-A*03

b) n.d. nicht durchgeführt

c) aus dieser Arbeit

Die 4 getesteten Epitope aus dem CMV zeigen bis auf TSAFVFPTK gar keine Freizügigkeit: Reaktionen gegen dieses Epitop treten im Zusammenhang mit der Restriktion HLA-A*68 auf, in einem einzelnen Fall aber auch mit Allelen, die nicht der A*03-Gruppe zugehörig sind (BD1144: A*01, A*02, B*07, B*08). TTVYPPSSTAK, QTVTSTPVQGR und GPISGHVLK hingegen erscheinen bei unseren Untersuchungen als streng monogam, mit der Einschränkung, dass Letzteres vormals tatsächlich als HLA-A*11-restringiertes Epitop beschrieben wurde[59].

Die Allotypen A*31 und A*33 sind von keiner freizügigen Reaktion der Epitope betroffen. Dies ist weder bei Hochfrequenzepitopen (**Tabelle 7**) noch bei Epitopen mit niedriger Erkennungsfrequenz (**Tabelle 8**) der Fall. Aufgrund einer extrem niedrigen Antigenfrequenz von HLA-A*66 und A*74 in der deutschen Bevölkerung[21] musste auf deren Einbeziehung im Rahmen dieser Arbeit verzichtet werden.

Basierend auf den Elispot-Daten tritt eine ausgeprägte Promiskuität bei allen vier niedrigfrequenten EBV-Epitopen zwischen A*03 und A*11 auf. Die CMV-Epitope verhalten sich bis auf TSAFVFPTK, was sich einen einzelnen Seitensprung auf einem fremden Allel erlaubt, streng monogam.

3.3.3. Intrazellulärfärbung sowie Spezifität der freizügigen Reaktionen gegen niederfrequente Epitope

Die durchflusszytometrische Untersuchung der freizügigen Reaktionen der EBV-Epitope KVAKVAPLK und ATIGTAMYK lässt eine nähere Charakterisierung der spezifischen T-Zellen zu. Hierzu wurde das jeweilige Peptid mit β 2-Mikroglobulin und den schweren Ketten von HLA-A*03:01 oder HLA-A*11:01 zurückgefaltet und zum Tetramer verarbeitet. Durch die Färbung stimulierter PBMCs von Blutspendern, die das entsprechende HLA-Allel nicht tragen, konnte eine unspezifische HLA-Bindung der Tetramere ausgeschlossen werden. Außerdem wird die CD8⁻ Population nicht durch das in Frage kommende Tetramer und die CD8⁺ Population nicht durch ein Kontroll-Tetramer, bestehend aus einem autologen Peptid (MUC) und einem fremden HLA (HLA-A*02:01) angefärbt (Daten nicht abgebildet). Außerdem binden die Tetramere weder bei HLA-identischen Blutspendern, die zuvor keine Reaktion gezeigt hatten, noch bei Blutspendern, denen das entsprechende HLA-Allel fehlt (A*03 beziehungsweise A*11).

Von vier durchflusszytometrisch analysierten **HLA-A*11⁺** Spendern, die zuvor im Elispot nach Stimulation durch KVAKVAPLK eine positive Reaktion gezeigt hatten, ließ sich nach Prästimulation bei einem Spender (1162 [A*01, A*11, B*07, B*57]) eine Tetramer⁺ Population von 0,16% nachweisen, während in

einem unabhängigen Experiment die Population von bifunktionalen, CD8⁺ Lymphozyten 0,03% darstellt (**Abbildung 6**).

Auf zwei von sechs getesteten HLA-A*03⁺ Blutspendern konnten KVAKVAPLK-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden (BD 1490 [A*01, A*03, B*08, B*51] und BD 1536 [A*03, B*07, B*52]), während die Population bifunktionaler T-Zellen ähnlich gering wie bei HLA-A*11 blieb (0,09%). Bei Blutspender 1536 besteht dennoch eine KVAKVAPLK-spezifische Population CD8-positiver T-Zellen von 6,57%.

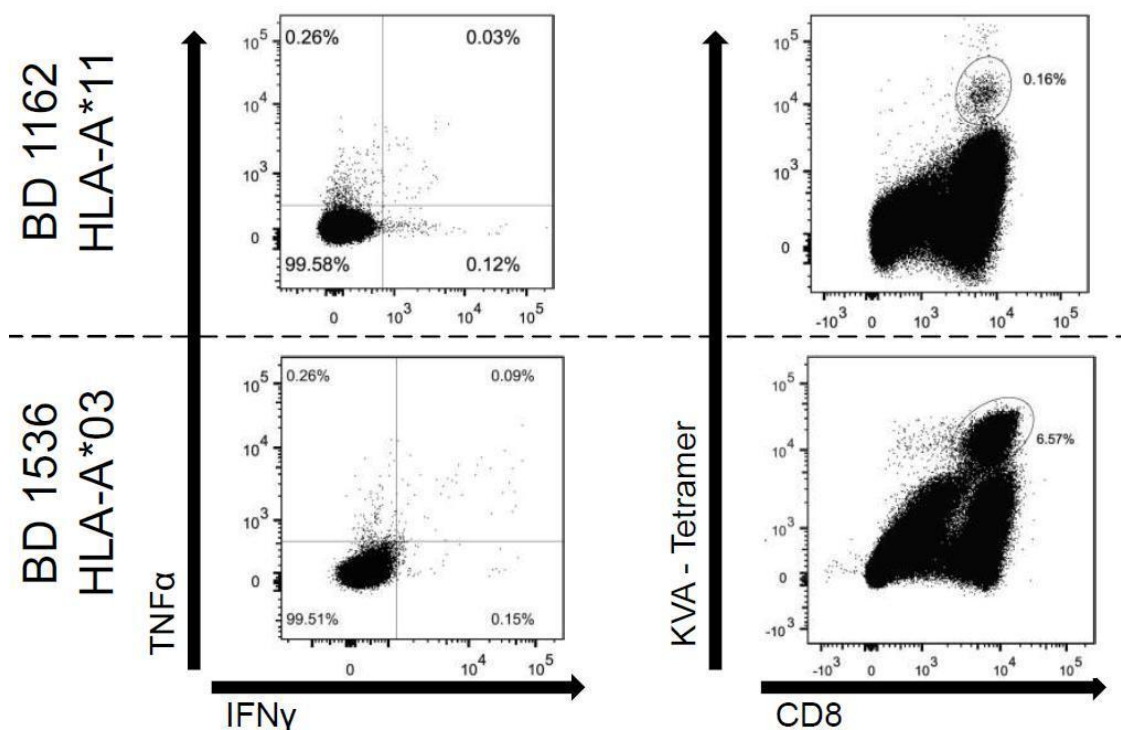


Abbildung 6: Intrazelluläre Zytokinfärbung von TNFα und IFNγ sowie Tetramerfärbung zweier Blutspender (BD 1162 und BD 1536), die zuvor im Elispot auf KVAKVAPLK reagiert haben.

Spender 1536 weist außerdem eine Population von 4,92% ATIGTAMYK-spezifischer T-Zellen auf, und in einem unabhängigen Experiment 9,32% bifunktionale T-Zellen (Daten ohne Abbildung).

Der Nachweis von KVAKVAPLK-spezifischen T-Zellen bei mindestens einem Blutspender gelang somit sowohl auf der Restriktion HLA-A*11 als auch auf A*03. Die Frequenz an CD8⁺ T-Zellen, die IFN γ und TNF α exprimieren, lag jedoch in jedem Fall unterhalb der Frequenz an Tetramer⁺ T-Zellen. Mit dem Nachweis von bifunktionalen, ATIGTAMYK-spezifischen T-Zellen beim HLA-A*03⁺ Blutspender BD1536 konnte die freizügige Reaktion eines weiteren, niedrigfrequent vorkommenden EBV-Epitops auf HLA-A*03 nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit HLA-A*11 war ATIGTAMYK als EBV-Epitop zuvor bereits beschrieben worden[57], daher wurde auf weitergehende Analysen verzichtet.

3.4. Synopse der HLA-Primärstrukturen

Die F-Tasche der HLA Klasse I-Moleküle, die den C-Terminus des Liganden bindet, ist im Allgemeinen durch folgende Aminosäurepositionen des HLA-Moleküls bestimmt: 74, 77, 80, 81, 84, 95, 97, 114, 116, 123, 133, 143, 146 und 147[15]. Dabei gelten die Schlüsselpositionen 77, 80, 81 und 116 als besonders wichtig. Insbesondere die Aspartyl-Seitenkette an Position 116, die durchweg vertreten ist, ermöglicht es, P9K-Liganden zu binden. Insgesamt unterscheidet sich HLA-A*11:01 in 7 Aminosäurepositionen von HLA-A*03:01[6, 60], davon stimmen sie in der F-Tasche vollständig überein. Alle anderen Moleküle unterscheiden sich in mehreren Positionen, und dann auch immer in den Regionen der B- und F-Tasche. Die Anzahl der Positionen, die von der Primärstruktur von HLA-A*03:01 verschieden sind, sind in jedem Fall größer als bei A*11:01 (A*31:01 – 22, A*33:01 – 25, A*66:01 – 23 und A*68:01 – 19)[6].

Da die Regionen, in denen der TCR an den Peptid-MHC-Komplex bindet, recht variabel sind, lassen sich keine Aussagen über Aminosäurepositionen machen, die für die Bindung des TCR verantwortlich sind[61]. Die hohe Übereinstimmung von A*03:01 und A*11:01 insbesondere in der Bindungsregion des C-Terminus des Peptids (Tasche F), aber auch an Stelle zwei des Peptids (Tasche B) tragen möglicherweise zu einer Erklärung bei,

warum sich nur diese beiden Moleküle eine recht große Anzahl an niedrigfrequenten EBV-Epitopen teilen.

Tabelle 9: Unterschiede der Taschen-determinierenden Aminosäuren innerhalb der Moleküle der A*03-Gruppe, entnommen aus der IMGT/HLA Database[6]. „-“ bedeutet Übereinstimmung mit der Sequenz von A*03:01.

<u>Tasche B</u>	Aminosäure-Position									
	7	9	24	34	45	63	66	67	70	99
A*03:01	R	F	A	V	M	E	N	V	Q	Y
A*11:01	-	Y	-	-	-	-	-	-	-	-
A*31:01	-	T	-	-	-	-	-	-	H	-
A*33:01	-	T	-	-	-	N	-	-	H	-
A*66:01	-	Y	-	-	-	N	-	-	-	-
A*68:01	-	Y	-	-	-	N	-	-	-	-

<u>Tasche F</u>	Aminosäure-Position													
	74	77	80	81	84	95	97	114	116	123	133	143	146	147
A*03:01	D	D	T	L	Y	I	I	R	D	Y	W	T	K	W
A*11:01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A*31:01	-	-	-	-	-	-	M	Q	-	-	-	-	-	-
A*33:01	-	-	-	-	-	-	M	Q	-	-	-	-	-	-
A*66:01	-	-	-	-	-	-	R	Q	-	-	-	-	-	-
A*68:01	-	-	-	-	-	-	M	-	-	-	-	-	-	-

4. DISKUSSION

4.1. Amplifikation antigenspezifischer T-Zellen zur Detektion *via* Elispot

Zu Beginn wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass mit dem Protokoll zur 12-Tages-Prästimulation eine effektive Vermehrung von antigenspezifischen T-Zellen zur Detektion per Elispot erreicht werden kann. Bei der Durchführung dieses Protokolls folgt auf eine einmalige Peptidstimulation mit 1 µg/ml die dreimalige Anwendung von Interleukin 2 mit 20 U/l. Beim adoptiven T-Zelltransfer kommt es auf die optimale Expansion von virusspezifischen T-Zellen an: So erbrachte bei einer Untersuchung von Lutzky et al. 2009 ebendiese Konzentration von IL-2 eine optimale Expansion der T-Zellen, sowohl für die Detektion *via* Elispot als

auch die Anwendung im Chromfreisetzungstest[62]. Die optimale Peptidkonzentration wurde dort als peptid- sowie patientenspezifisch angegeben, bewegte sich aber beim A*11-Epitop SSCSSCPLSK (ca. 998 g/mol) mit 10^{-5} bis 10^{-6} mol/l in der in dieser Arbeit eingesetzten Größenordnung.

Geyeregger et al. nutzten neuerdings das gleiche Protokoll zur Detektion von Adenovirus-spezifischen T-Zellen *via* Elispot, während für durchflusszytometrische Analysen auf ein IL-15-basiertes Stimulationsprotokoll zurückgegriffen wurde[63]. Bei der durchflusszytometrischen Untersuchung nach Tetramerfärbung konnte mit IL-15 allerdings eine doppelt so hohe Rate an Tetramer⁺ T-Zellen nachgewiesen werden, was man bei weiterführenden Analysen sicherlich berücksichtigen könnte. Hinsichtlich der phänotypischen Zusammensetzung nach dem Stimulationsprozess gab es jedoch keine Unterschiede zwischen der Verwendung von IL-2, IL-15 und einem cytokinfreien Protokoll. Eine mögliche Auswirkung der Veränderung des Cytokins bei der Prästimulation (IL-2, IL-7, IL-15 vs. kein Cytokin) auf die Detektion per Elispot wurde in der o.g. Arbeit nicht untersucht.

Die Reaktionen der T-Zellen auf die eingesetzten Peptide können als spezifisch angesehen werden, da sowohl *ex vivo* als auch nach Prästimulation die allelspezifischen Negativkontrollen aus **Tabelle 3** und ein Kontrollwell völlig ohne Stimulans eingesetzt und bei der Auswertung berücksichtigt wurden. Ein *Priming* von vormals naiven T-Zellen kann somit ausgeschlossen werden. Die empirische Regel zur Bewertung einer positiven Reaktion wurde bereits in vorherigen Studien verwendet[64] und stützt sich auf Empfehlungen der *Association for Cancer Immunotherapy* (CIMT), die bei einer angepassten Form dieser Regel eine sehr niedrige Rate an falsch-positiven Reaktionen aber auch eine vergleichsweise geringe Detektionsrate beschrieben haben[46]. Anwendung fand eine ganz ähnliche, empirische Regel auch in einer großen, internationalen Phase 1 und 2 Studie zur Peptidvakzinierung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms[33].

Eine Vermehrung der *spot forming units* nach 12-Tages-Prästimulation fand in jedem der acht untersuchten Fälle statt und reichte von 5,5-fach bis 22,8-fach. Dies deutet daraufhin, dass das Ausmaß der Amplifikation unter anderem sowohl vom eingesetzten Peptid und seiner HLA-Restriktion als auch vom Blutspender abhängig sein kann.

4.2. Immundominanz und Erkennungsfrequenz von Peptiden auf HLA-A*11

Im Epitopscreening sind Reaktionen gegen 22 verschiedene EBV-Epitope in HLA-A*11⁺ Blutspendern entdeckt worden. Die Beurteilung der Immundominanz von Epitopen stützt sich darauf, dass ein Großteil des T-Zell-Pools für die Immunreaktion verantwortlich zeichnet[49]. Da einige Epitope aus dem EBV und dem CMV, die in dieser Arbeit als immundominant identifiziert wurden, sehr gut charakterisiert und schon lange auf ihrer Restriktion beschrieben sind, ist es auch bekannt, dass ihre spezifischen T-Zellen effektiv eine Zelllyse bewirken (AVFDRKSDAK und IVTDFSVIK[53], SSCSSCPLSK[54], RLRAEAQVK[65], FVFPTKDVALR[66]).

Das in dieser Arbeit verwendete Verfahren zur Bestimmung von immundominanten Peptiden aus EBV-Antigenen basiert auf dem Prinzip, nur diejenigen Peptide zu synthetisieren, die mit größter Wahrscheinlichkeit über das entsprechende HLA präsentiert werden. Zu diesem Zweck wurde das Programm Syfpeithi verwendet, das von der Abteilung Immunologie Tübingen selbst entwickelt wurde, zu dem aber noch einige weitere Alternativen existieren[12]. Es orientiert sich an Peptidmotiven, die aus der Analyse von tatsächlichen HLA-Liganden und T-Zell-Epitopen hervorgehen. Bei einem *cut-off* von 2% der *high-score* Peptide werden so insgesamt wesentlich weniger Peptide synthetisiert und getestet als es bei aufwändigen *epitope-mapping*-Verfahren[39] mit 15-meren, bei denen jeweils 10 Aminosäuren überlappen, der Fall wäre.

Reaktionen gegen die beiden Epitope AVFDRKSDAK und IVTDFSVIK, die beide aus dem Protein EBNA4 stammen, sind unter anderem auch in einer

Untersuchung von Tan et al. im Jahr 1999 charakterisiert worden[67]. Dort lässt IVTDFSVIK das Epitop AVFDRKSDAK *in puncto* immundominanz weit hinter sich zurück. Außerdem wird IVTDFSVIK mit einer vergleichsweise höheren Erkennungsfrequenz beschrieben, was hier in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte. Was die Erkennungsfrequenz des Epitops AVFDRKSDAK angeht, steht der vorliegenden Arbeit mit der Untersuchung von insgesamt 60 verschiedenen Blutspendern allerdings im Vergleich zu Tan et al., die auf einer einstelligen Anzahl an Blutspendern testeten, eine höhere Gewichtung zu.

Als Paradebeispiel eines neuen Epitops konnte im Falle von KVAKVAPLK gezeigt werden, dass es das dominanteste und hochfrequenteste Epitop aus dem Protein DNBI darstellt. Sein *spot count index* ist nach Prästimulation jedoch im Vergleich zu den klassischen, immundominanten Epitopen aus **Tabelle 7** um einige Größenordnungen niedriger angelegt (vgl. **Abbildung 5**) und somit als kryptisch einzustufen. Eine konsequente Analyse der Verhältnisse *ex vivo* ist nicht durchgeführt worden. Lediglich exemplarisch wurde in Kapitel 3.1 gezeigt, dass bei den Expansionsanalysen in zwei verschiedenen Blutspendern *ex vivo* keine Reaktion dargestellt werden konnte, was insgesamt also auf ein eher kryptisches Epitop hinweist. Auf die höhere Erkennungsrate in HLA-A*03⁺ Blutspendern wird in **Kapitel 4.3.2** näher eingegangen.

Die Entstehung von sehr dominanten Epitopen untersuchten Villacres et al. im Jahr 2003, die einen Zusammenhang zwischen der Avidität des Peptid-MHC-Komplexes zum TCR und der zytolytischen Aktivität *ex vivo* bei CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen vermuteten[66]. Nach 5-tägiger Stimulation der *ex vivo* nicht reagierenden T-Zellen nur mit dem spezifischen Peptid war die zytolytische Aktivität dieser T-Zellen mit niedriger Avidität sowie deren IFN γ -Produktion wieder hergestellt. Dies wurde mit einer *in vitro*-Hochregulation von weiteren Adhäsionsmolekülen und einer daraus resultierenden höheren Gesamt-Avidität der T-Zellen im Rahmen der immunologischen Synapse erklärt, die eine geringe TCR-MHC-Avidität zumindest teilweise auszugleichen scheint.

Eine weitere interessante Arbeit adressiert die Avidität des Peptids zum HLA-Molekül und die Avidität des Peptid-MHC-Komplexes zum TCR: Bei einer Untersuchung im Jahr 2006 von 184 HIV- und 92 EBV-Epitopen konnte kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen beiden Formen der Aviditäten und der Erkennungsfrequenz sowie der Immundominanz nachgewiesen werden[51]. Eine Korrelation gab es aber zwischen Immundominanz und Erkennungsfrequenz an sich, sowohl bei HIV- als auch EBV-Epitopen (siehe dort, Abbildung 2). Dies deckt sich mit der Beobachtung in dieser Arbeit, dass sich die hochfrequenten Epitope als eher immundominant, die niedrigfrequenten Epitope als eher subdominant herausgestellt haben.

Zur Unterscheidung dominant-kryptisch sei gesagt, dass der Übergang schließlich, wie so oft in der Natur, durchaus als fließend angesehen werden kann und nicht eindeutig kategorisierend vorgegangen werden muss. Zur Einschätzung der klinischen Relevanz eines Epitops und seiner Anwendbarkeit in adoptiven Transfers oder Peptidvakzinen sind die Parameter „Immundominanz“ und „Frequenz in der Bevölkerung“, wie sie in dieser Arbeit untersucht worden sind, von besonderer Bedeutung. In Individuen, die trotz hoher Erkennungsfrequenz eines Epitops nicht gegen dieses reagieren, können kryptische und subdominante Epitope zum Tragen kommen und die Lücke schließen.

In dieser Arbeit wird ein eleganter, zielorientierter Weg benutzt, um aus viralen Antigenen HLA-restringierte T-Zell-Epitope zu bestimmen. Dass alle bisher bekannten Epitope sich unter den vorhergesagten Kandidaten befanden bestätigt die Qualität der benutzten Prädiktionsssoftware. Die statistisch nachgewiesene Erkenntnis aus älteren Studien, dass ein immundominantes Epitop oft mit einer hohen Erkennungsfrequenz behaftet ist, konnte bestätigt werden.

4.3. Freizügigkeiten innerhalb der HLA-Klasse I

Zur Verwendung bei zielgerichteten Immuntherapien ist es von Vorteil, wenn ein bestimmtes Epitop aus einem Antigen (a) für einen Großteil der reagierenden T-

Zellen verantwortlich, i.e. immundominant ist und (b) in einem Großteil der Individuen eine Immunreaktion auslöst, also sehr hochfrequent vorkommt[49-51]. Da die Prävalenz von EBV-Infektionen nicht bei 100% liegt und auch keine EBV-Serologie bestimmt wurde, kann die Erkennungsfrequenz der hier getesteten EBV-Epitope nie 100% erreichen. Zur Bestimmung der Reaktionen gegen CMV-Epitope hingegen wurde nur das Blut CMV-positiver Blutspender verwendet, so dass hier die tatsächliche Erkennungsfrequenz der Epitope vorliegt.

4.3.1. Begrenzte Freizügigkeit von hochfrequenten Epitopen

Von den sechs getesteten hochfrequenten Epitopen verhalten sich die zwei EBV-Epitope SSCSSCPLSK (A*11, LMP2) und RLRAEAQVK (A*03, EBNA3) sowie das CMV-Epitop ATVQGQNLK (A*11, pp65) innerhalb der A*03-Gruppe streng monogam. Bei den beiden EBV-Epitopen AVFDRKSDAK (A*11/A*03) und IVTDFSVIK (A*11/A*68, beide aus EBNA3) sowie dem CMV-Epitop FVFPTKDVALR (A*68/A*03, pp65) kommen nachweislich einige wenige Seitensprünge auf anderen HLA-Molekülen vor (**Tabelle 7**). Durch die Darstellung des *spot count index* ist die Dominanz der Reaktionen abschätzbar (**Abbildung 5**), so dass bei den drei letztgenannten Epitopen größtenteils auch von einer Immundominanz auszugehen ist. Zur endgültigen Beurteilung der Immundominanz müssten in einem nächsten Schritt die entsprechenden Antigene konsequent auf den entsprechenden HLA-Molekülen auf dominante Epitope überprüft sowie deren Reaktionsfreudigkeit *ex vivo* bestimmt werden. Insgesamt ist hier aber auch eine *Korrelation zwischen Immundominanz und Erkennungsfrequenz* zu beobachten, was als Hinweis darauf zu werten ist, dass die Immundominanz eher nicht vom MHC-Molekül abhängt, sondern maßgeblich vom Antigen bzw. dem Peptid selbst bestimmt wird (siehe Bihl et al., 2006).

Bei einer Untersuchung von Levitsky et al. im Jahr 2000 wurden unter anderem die Bindungseigenschaften von AVFDRKSDAK zu einigen einzelnen Molekülen des A*03-Supertyps untersucht[68]. Die Ausbildung einer suffizienten

Immunantwort konnte ausschließlich im Zusammenhang mit HLA-A*11 beobachtet werden trotz hoher Bindungskapazitäten vor allem zu den Allotypen A*03 und A*68. Dieses Phänomen wird mit einem hoch konservierten TCR erklärt, der z.B. HLA-A*68-Moleküle alloreaktiv erkennt und somit im Thymus von A*68⁺ Individuen negativ selektioniert wird. Wenn es dann keine andere Zusammensetzung der Gene des T-Zell-Rezeptors gibt, die die Kombination aus AVFDRKSDAK und A*68 erkennt, entfällt eine Immunantwort. Dies wird auch als „gap in the repertoire“ bezeichnet. Interessant in diesem Zusammenhang wäre die Untersuchung von Kodominanzeffekten, beispielsweise in einem Spender, der sowohl HLA-A*11 als auch A*68 trägt. Dies war aufgrund der Seltenheit dieser HLA-Kombination im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Bei Reaktionen gegen das EBV-Epitop FLRGRAYGL auf HLA-B*08 ist ebenfalls ein hoch konservierter TCR an der Immunreaktion gegen ein Antigen der Latenzphase beteiligt[69, 70]. Das Vorhandensein von hoch konservierten TCRs gegen bestimmte Antigene deutet auf eine lange Koevolution der Menschheit mit EBV hin, in der das Virus eine wichtige Rolle als Selektionsfaktor einzunehmen vermag[37]. Gleichzeitig muss einem spontanen Umschalten des Virus in die lytische Phase schnell und effizient begegnet werden können: Tan et al. kamen schon 1999 zu der Erkenntnis, dass lytische Antigene hochfrequenter und dominanter Immunantworten auslösen[67]. Dies steht im Gegensatz zum Cytomegalievirus, bei dem das Strukturprotein pp65 als HLA-übergreifendes, dominantes T-Zell-Antigen fungiert[71].

Im Zusammenhang mit HLA-A*03, A*11 und A*68 sind nur Epitope aus den Latenz-Antigenen LMP2 und EBNA3 immundominant und hochfrequent. Für sich genommen scheinen hier also die Latenz-Antigene zu dominieren, was der Beobachtung von Tan et al. widerspricht. Dies kann aber dadurch relativiert werden, dass diese Arbeit nicht für die Beurteilung von Antigen-Verteilungen konstruiert wurde, sondern auf die Analyse von Freizügigkeiten der Epitope abzielt. Interessant ist diese Beobachtung dennoch, und ein Vorherrschen der Latenz-Antigene auf HLA-Molekülen, die P9K-Liganden präsentieren, ist zu diskutieren.

Hochfrequente, dominante Epitope aus dem EBV und dem CMV verhalten sich im Allgemeinen hinsichtlich ihrer HLA-Restriktion also statistisch signifikant monogam.

4.3.2. Tendenz zur Freizügigkeit von kryptischen EBV-Epitopen

Die Monogamie der Hochfrequenz-Epitope wird von den kryptischen Epitopen nicht so sehr befolgt. Unter den untersuchten EBV-Epitopen existiert eine ausgeprägte Überlappung ausschließlich zwischen A*03 und A*11. Im Falle von KVAKVAPLK ist die Erkennungsfrequenz auf HLA-A*11 (26,7%), wo es ursprünglich getestet worden war, sogar mit einer niedrigeren Erkennungsfrequenz behaftet als auf A*03 (43,5%). Wie bereits angesprochen wurde das CMV-Epitop GPISGHVLK von Hebart et al. als HLA-A*11-restringiert beschrieben, wobei über die Erkennungsfrequenz dort keine Aussage gemacht werden kann[59]. Im Rahmen dieser Arbeit trat es lediglich als subdominantes Epitop auf HLA-A*03 in Erscheinung, so dass hier eine Freizügigkeit vorzuliegen scheint, die nicht eindeutig bestätigt werden kann. Die Einbeziehung einer größeren Anzahl an Blutspendern würde weitere Klarheit verschaffen. Da subdominante Epitope per definitionem aber einen nicht allzu großen Anteil an der gesamten Immunabwehr gegen ein Pathogen tragen, ist aus ihrer Freizügigkeit nur ein begrenzter Nutzen zu ziehen, insbesondere dann, wenn sie mit einer niedrigen Erkennungsfrequenz behaftet sind.

Bei der durchflusszytometrischen Analyse des Epitops KVAKVAPLK ließ sich eine eindeutige Population an Tetramer⁺ T-Zellen darstellen, während eine vergleichbare Population an IFN γ ⁺ TNF α ⁺ T-Zellen ausblieb (**Abbildung 6**). Eine solche Diskrepanz zwischen der spezifischen und bifunktionellen Population, die gegen ein Epitop gerichtet ist, ist durchaus schon beschrieben worden[67, 72]. Tan et al. konnten mit der Tetramerfärbung eine 4,4-fach größere Population an EBV-spezifischen T-Zellen nachweisen als per IFN γ -Elispot. Die EBV-spezifischen T-Zellen wurden als funktionell sehr heterogene Gruppe identifiziert, was eine unterschiedliche Detektionsrate mit den

verschiedenen Methoden erklären kann. Hislop et al. konnten dies 2001 bestätigen und fanden allgemein unter CD8⁺, EBV-spezifischen T-Zellen eine CCR7⁺ Population, deren T-Zellen ins *Central-Memory*-Kompartiment einzuordnen sind und konsequent keine sofortige Produktion von IFN γ oder TNF α aufweisen[72]. Die CCR7⁻ T-Zell-Populationen hingegen erscheinen sehr wohl bifunktionell.

Dass auch bei den niedrigfrequenten Epitopen keine bzw. nur äußerst wenige Seitensprünge auf HLA-Molekülen auftreten, die nicht zur Gruppe von HLA-A*03 gehören, unterstützt die per Tetramerfärbungen gewonnene Erkenntnis, dass die freizügigen Reaktionen tatsächlich auf den verschiedenen HLA-Allelen spezifisch sind.

Die untersuchten EBV-Epitope sind gleichzeitig auf den Restriktionen A*11 und A*03 vertreten, während sich CMV-Epitope streng monogam verhalten. Obwohl deren Spezifität per Tetramerfärbung gesichert werden konnte, erscheint ihre Funktionalität in Konkordanz mit früheren Studien als recht heterogen. Die hochfrequenten EBV-Epitope entstammen vollends Antigenen der Latenzphase, während unter den niedrigfrequenten Epitopen auch Immediate-Early- und Early-Antigene vertreten sind. Betrachtet man die Gruppe um HLA-A*03 mit ihren P9K-Liganden, so unterscheidet sie sich augenscheinlich von der generellen Beobachtung, dass sich Immunreaktionen gegen das EBV grundsätzlich eher gegen Antigene der lytischen Phase konzentrieren. Diese Arbeit adressiert allerdings nicht die Verteilung der T-Zell-Antworten auf die einzelnen EBV-Antigene, sondern hat sich von vornherein an denjenigen Antigenen orientiert, gegen die die meisten Antworten durch CTL beschrieben wurden.

4.3.3. Die Bedeutung der HLA-Supertypen

Eine der ersten Arbeiten, die systematisch die Prävalenz von Freizügigkeiten innerhalb von HLA-Klasse I untersuchten, wurde von Frahm et al. im Jahr 2007 publiziert. Es wurden 162 HIV- und 80 EBV-Epitope auf 100 Blutspendern unabhängig von deren HLA-Typisierung getestet, von denen insgesamt 230

Epitope (94%) Immunreaktionen in mindestens einem Spender hervorriefen, der nicht das ursprünglich zugeordnete HLA-Allel trug[73]. Interessanterweise reichte die Freizügigkeit der Epitope über die Supertypgrenzen hinaus, denn ein Drittel der Reaktionen kam im Kontext von Allelen vor, die nicht zum entsprechenden Supertyp gehören. Lediglich neun von 242 Epitopen kamen ausschließlich im Zusammenhang mit ihrem ursprünglichen HLA-Allel vor. Wie in dieser Arbeit wurden auch dort die Elispot-Daten als Grundlage genommen und ein Teil der Reaktionen per Intrazellulärfärbung verifiziert, Tetramerfärbungen wurden allerdings nicht vorgenommen. Dass ein freizügiges HIV-Peptid, das ursprünglich als A*24-Peptid beschrieben wurde, tatsächlich von diesem Allel unabhängig prozessiert und präsentiert wird, konnte mit der Transfektion von DCs nachgewiesen werden. Die Erkennungsfrequenz der Epitope wurde hierbei nicht berücksichtigt.

Zur gleichen Zeit berichteten Nakagawa et al. von immundominanten Epitopen der Proteine E6 und E7 aus HPV, die im Kontext von mehreren HLA-Allelen auftraten und sich auch über Grenzen der Supertypen hinwegsetzten[74]. Dabei wurden T-Zell-Experimente als Grundlage genommen.

Bei Untersuchungen des B*44 Supertyps kommen einerseits reine Peptidbindungsstudien[75] und andererseits Analysen von natürlich präsentierten Peptiden und Reaktionen gegen Virusepitope[76] bezüglich der Relevanzeinschätzung dieses Supertyps zu unterschiedlichen Resultaten. Sidney et al. stellten im Jahr 2003 Peptidbindungsanalysen an, bei denen ein radioaktiv markiertes Kontrollpeptid aus dem HLA verdrängt werden muss. Je niedriger dabei die benötigte Stoffmenge ist, um das Kontrollpeptid zu verdrängen, desto höher ist die Bindungskapazität für dieses bestimmte Peptid. Sowohl endogene Liganden als auch Virusepitope erreichen dabei hohe Bindungskapazitäten meist auf mehreren Kandidaten des HLA-B*44 Supertyps (siehe dort, Tabelle 1). Diese Analysen erlauben es zwar, genaue Muster in der Peptidbindung zu erkennen, vernachlässigen aber gänzlich die komplementäre Epitoperkennung durch die T-Zellen und stellen nur ein artifizielles Konstrukt dar. Deutlich wird dies im Vergleich mit Levitsky et al., die hohe

Bindungskapazitäten des AVFDRKSDAK-Epitops auf A*68 und A*03 feststellten, aber keine Immunreaktion nachweisen konnten.

Hillen et al. waren dazu in der Lage, über die Elution und nachfolgende massenspektrometrische Analysen Liganden und Peptidmotive zu vergleichen sowie T-Zell-Reaktionen gegen EBV-Epitope innerhalb des Supertyps zu bestimmen. Von 670 natürlichen Liganden wurden lediglich 25 auf mehr als einem HLA-Molekül identifiziert. Die vier getesteten EBV-Epitope verhielten sich innerhalb des B*44-Supertyps monogam, was insgesamt gegen das Vorhandensein einer ausgedehnten Freizügigkeit in diesem Supertyp spricht.

Inspiziert durch die teils widersprüchlichen Ergebnisse der oben genannten Studien, die systematisch die Freizügigkeiten von HLA Klasse I-Liganden untersuchen, führten Rao et al. 2011 eine große *in silico*-Bindungsvorhersage durch. Von 3738 HLA-Liganden, deren Grundlage die *Immune Epitope Database*[6] ist, zeigte sich in 68% der Fälle eine Freizügigkeit innerhalb der einzelnen Supertypen, in 47% über die Grenzen der Supertypen und in 23% über die HLA-Loci hinweg[77].

Bioinformatische Analysen, wie ein Vergleich der Primärstruktur der polymorphen HLA-Peptidbindungsregionen, proklamieren ebenfalls eine enorme Freizügigkeit von HLA-Klasse I-Liganden[16].

Als Erklärung dieser diskrepanten Untersuchungen legen Rao et al. (2011) abschließend folgendes dar: „Taken together, earlier studies and our present study suggest that the lower promiscuity observed by Hillen et al. might be due to other mechanisms than MHC binding *per se*.“[77]. Die Berücksichtigung anderer Mechanismen als die MHC-Bindung *per se* ist aber von eminenter Bedeutung. So wurde in dieser Arbeit angestrebt, auf der Grundlage von natürlich entstandenen T-Zell-Reaktionen gegen Viren den harten Endpunkt von Antigenprozessierung, -präsentation und -erkennung durch T-Zellen zu beurteilen. Dabei konnte bei den hochfrequenten Epitopen (>62,5% Erkennungsfrequenz) keine Freizügigkeit, die bei der Formulierung von Peptidvakzinen hilfreich sein könnte, nachgewiesen werden. Lediglich niedrigfrequente EBV-Epitope (<43,5% Erkennungsfrequenz) zeigen eine

ausgeprägte Überlappung zwischen den Molekülen A*03 und A*11, tragen aber durch Subdominanz und niedrige Frequenz nicht so viel zur Immunabwehr bei. Da Bindungsaffinität und Immundominanz nicht korrelieren, kann nicht auf eine höhere Freizügigkeit von niedrig-affinen Liganden geschlossen werden.

Interessanterweise besitzt A*03 zusätzlich die Möglichkeit, Peptide mit großem, hydrophobem C-Terminus (Tyr, Phe) zu präsentieren[9, 11]. Da sich die für die F-Tasche verantwortlich gedachten Aminosäurepositionen (**Kapitel 3.4**) in A*03:01 und A*11:01 nicht unterscheiden, scheinen noch andere, für die Bindung an sich weniger relevante Positionen die Größe der Tasche zu beeinflussen. Dabei lässt es sich leicht vorstellen, dass zumindest ein Teil der insgesamt sieben unterschiedlichen Aminosäurepositionen dieser beiden HLA-Moleküle entweder direkt die Peptid- oder TCR-Bindung beeinflussen, oder aber durch leichte Verschiebungen der Tertiärstruktur die Dynamik der T-Zell-Erkennung verändern. Die Bindung des gleichen Peptids an beide Moleküle muss dann nicht notwendigerweise in jedem Fall in einer T-Zell-Reaktion münden.

Ergänzt werden könnten diese Ergebnisse durch die massenspektrometrische Analyse von natürlichen HLA-Liganden, die auf Molekülen dieses Supertyps präsentiert werden. Dabei können sowohl über die Bestimmung der einzelnen Peptidmotive als auch der Überlappung zwischen den HLA-restringierten Liganden Rückschlüsse gezogen werden auf die Anwendbarkeit von Freizügigkeiten innerhalb dieses Supertyps.

Die Freizügigkeit von viralen T-Zell-Epitopen innerhalb des HLA-A*03-Supertyps ist insgesamt sehr eingeschränkt und würde durch ihre Ausnutzung beim Design von Peptidvakzinen, beispielsweise bei der Immuntherapie von Krebs, kaum einen Vorteil hinsichtlich der Abdeckung einer breiteren Bevölkerungsschicht bieten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Gene der MHC-Region des Menschen unterliegen einem enormen Polymorphismus, so dass die verschiedenen HLA-Klasse I-Moleküle jeweils Peptide mit unterschiedlichen Motiven präsentieren. Dadurch wird die gezielte Peptid-Immuntherapie erschwert und muss in ihrer Zusammensetzung individuell angepasst werden. Schon in den 90er Jahren wurden HLA-Moleküle der Klasse I, die eine ähnliche Peptidbindung aufweisen, in sogenannte Supertypen eingegliedert, deren Berücksichtigung bei der Immuntherapie eine Vereinfachung bringen sollten. Diese Arbeit hat es sich zum Ziel gesetzt, die Auswirkungen dieser konstruierten Gruppen von Molekülen, in diesem Fall des Supertyps HLA-A*03, mit Hilfe von T-Zell-Reaktionen gegen virale Epitope zu untersuchen, um genauere Aussagen über seine Relevanz zu machen. Zu diesem Supertyp gehören die Moleküle HLA-A*03, A*11, A*31, A*33, A*66 und A*68.

Zunächst wurden mononukleäre Blutzellen über 12 Tage kultiviert, um den Nachweis der antigenspezifischen T-Zellen per Elispot zu vereinfachen. Dabei kann durch Anwendung des Protokolls die Anzahl der Spots um das bis zu 22,8-fache gesteigert werden. Anschließend wurden Peptide aus bestimmten Antigenen des Epstein-Barr-Virus auf ihre Immunogenität im Kontext von HLA-A*11-positiven Blutspendern getestet. Die Reaktionen der 22 Epitope wurden eingeteilt nach Höhe ihrer Erkennungsfrequenz unter den Blutspendern sowie Dominanz ihrer Immunantwort.

Ein Vergleich innerhalb des HLA-A*03 Supertyps zeigt eine sehr eingeschränkte Freizügigkeit von hochfrequenten T-Zell-Epitopen. Eine ausgeprägte Überlappung konnte für einige niedrigfrequente EBV-Epitope zwischen A*03 und A*11 nachgewiesen werden. Reaktionen gegen zwei der niedrigfrequenten Epitope sind spezifisch, rufen aber keine bifunktionalen T-Zellen hervor.

Eine Ausnutzung von Freizügigkeiten innerhalb des HLA-A*03-Supertyps für die Abdeckung einer breiteren Bevölkerungsschicht bei Peptidvakzinierungen scheint somit nicht gegeben.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 **Davis, M. M., Bjorkman, P.J.**, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988. **334**: 395-402.
- 2 **Doherty, P. C. and Zinkernagel, R. M.**, A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* 1975. **Jun 28**: 1406-1409.
- 3 **Murphy, K., Travers, P., Walport, M. and Janeway, C.**, Janeway's immunobiology, 8 Edn. Garland Science, New York 2012, pp 868.
- 4 **Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T. and Robey, E. A.**, Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nature immunology* 2006. **7**: 338-343.
- 5 **Woodland, D. L. and Kohlmeier, J. E.**, Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 2009. **9**: 153-161.
- 6 **Robinson, J., Mistry, K., McWilliam, H., Lopez, R., Parham, P. and Marsh, S. G.**, The IMGT/HLA database. *Nucleic Acids Res* 2011. **39**: D1171-1176.
- 7 **Blicher, T., Kastrup, J. S., Pedersen, L. O., Buus, S. and Gajhede, M.**, Structure of HLA-A*1101 in complex with a hepatitis B peptide homologue. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 2006. **62**: 1179-1184.
- 8 **Madden, D. R.**, The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu Rev Immunol* 1995. **13**: 587-622.
- 9 **Sidney, J., Grey, H. M., Southwood, S., Celis, E., Wentworth, P. A., del Guercio, M.-F., Kubo, R. T., Chesnut, R. W. and Sette, A.**, Definition of an HLA-A3-Like Supermotif Demonstrates the Overlapping Peptide-Binding Repertoires of Common HLA Molecules. *Human Immunology* 1996. **45**: 79-93.
- 10 **Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G. and Rammensee, H. G.**, Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 1991. **351**: 290-296.
- 11 **Rammensee, H. G., Bachmann, J., Emmerich, N. P. N., Bachor, O. A. and Stevanovic, S.**, SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 1999. **50**: 213-219.
- 12 **Stevanovic, S.**, Antigen processing is predictable: From genes to T cell epitopes. *Transplant Immunology* 2005. **14**: 171-174.
- 13 **Li, L. and Bouvier, M.**, Biochemical and structural impact of natural polymorphism in the HLA-A3 superfamily. *Molecular Immunology* 2005. **42**: 1331-1344.
- 14 **Li, L. and Bouvier, M.**, Structures of HLA-A*1101 complexed with immunodominant nonamer and decamer HIV-1 epitopes clearly reveal the presence of a middle, secondary anchor residue. *J Immunol* 2004. **172**: 6175-6184.
- 15 **Sidney, J., Peters, B., Frahm, N., Brander, C. and Sette, A.**, HLA class I supertypes: a revised and updated classification. *BMC Immunol* 2008. **9**: 1.

- 16 **Doytchinova, I. A., Guan, P. and Flower, D. R.**, Identifying human MHC supertypes using bioinformatic methods. *J Immunol* 2004. **172**: 4314-4323.
- 17 **Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G. and Lanzavecchia, A.**, Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *Eur J Immunol* 1989. **19**: 2237-2242.
- 18 **Sidney, J., del Guercio, M.-F., Southwood, S., Engelhard, V. H., Appella, E., Rammensee, H. G., Falk, K., Rötzschke, O., Takiguchi, M., Kubo, R. T., Grey, H. M. and Sette, A.**, Several HLA Alleles Share Overlapping Peptide Specificities. *J Immunol* 1995. **154**: 247-259.
- 19 **Sidney, J., Grey, H. M., Kubo, R. T. and Sette, A.**, Practical, biochemical and evolutionary implications of the discovery of HLA class I supermotifs. *Immunology Today* 1996. **17**: 261-266.
- 20 **Sette, A. and Sidney, J.**, Nine major HLA class I supertypes account for the vast preponderance of HLA-A and -B polymorphism. *Immunogenetics* 1999. **50**: 201-212.
- 21 **Schmidt, A. H., Solloch, U. V., Baier, D., Stahr, A., Wassmuth, R., Ehninger, G. and Rutt, C.**, Regional differences in HLA antigen and haplotype frequency distributions in Germany and their relevance to the optimization of hematopoietic stem cell donor recruitment. *Tissue Antigens* 2010. **76**: 362-379.
- 22 **Schipper, R. F., van Els, C. A., D'Amaro, J. and Oudshoorn, M.**, Minimal phenotype panels. A method for achieving maximum population coverage with a minimum of HLA antigens. *Hum Immunol* 1996. **51**: 95-98.
- 23 **Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., Veelen, P. v., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W. and Neefjes, J.**, Peptide Diffusion, Protection, and Degradation in Nuclear and Cytosolic Compartments before Antigen Presentation by MHC Class I. *Immunity* 2003. **18**: 97-108.
- 24 **Endert, P. M. v., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A. and Bach, J.-F.**, The Peptide-binding Motif for the Human Transporter Associated with Antigen Processing. *J Exp Med* 1995. **182**: 1883-1895.
- 25 **Chang, S. C., Momburg, F., Bhutani, N. and Goldberg, A. L.**, The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. **102**: 17107-17112.
- 26 **Yewdell, J. W., Reits, E. and Neefjes, J.**, Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2003. **3**: 952-961.
- 27 **McCutcheon, J. A., Gumperz, J., Smith, K. D., Lutz, C. T. and Parham, P.**, Low HLA-C expression at cell surface correlates with increased turnover of heavy chain mRNA. *J Exp Med* 1995. **181**: 2085-2095.

- 28 **Ackerman, A. L. and Cresswell, P.**, Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nature immunology* 2004. **5**: 678-684.
- 29 **Neefjes, J., Jongasma, M. L., Paul, P. and Bakke, O.**, Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2011. **11**: 823-836.
- 30 **Vossen, M. T., Westerhout, E. M., Soderberg-Naucier, C. and Wiertz, E. J.**, Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. *Immunogenetics* 2002. **54**: 527-542.
- 31 **Loch, S. and Tampe, R.**, Viral evasion of the MHC class I antigen-processing machinery. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 2005. **451**: 409-417.
- 32 **Huse, M., Quann, E. J. and Davis, M. M.**, Shouts, whispers and the kiss of death: directional secretion in T cells. *Nature immunology* 2008. **9**: 1105-1111.
- 33 **Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P. Y., Mendrzyk, R., Hilf, N., Schoor, O., Fritsche, J., Mahr, A., Maurer, D., Vass, V., Trautwein, C., Lewandrowski, P., Flohr, C., Pohla, H., Stanczak, J. J., Bronte, V., Mandruzzato, S., Biedermann, T., Pawelec, G., Derhovanessian, E., Yamagishi, H., Miki, T., Hongo, F., Takaha, N., Hirakawa, K., Tanaka, H., Stevanovic, S., Frisch, J., Mayer-Mokler, A., Kirner, A., Rammensee, H. G., Reinhardt, C. and Singh-Jasuja, H.**, Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. *Nat Med* 2012. **18**: 1254-1261.
- 34 **Feuchtinger, T., Lang, P. and Handgretinger, R.**, Adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia & lymphoma* 2007. **48**: 244-255.
- 35 **Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., Redfern, C. H., Ferrari, A. C., Dreicer, R., Sims, R. B., Xu, Y., Frohlich, M. W., Schellhammer, P. F. and Investigators, I. S.**, Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *N Engl J Med* 2010. **363**: 411-422.
- 36 **Odumade, O. A., Hogquist, K. A. and Balfour, H. H., Jr.**, Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clinical microbiology reviews* 2011. **24**: 193-209.
- 37 **Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D. and Rickinson, A. B.**, Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 2007. **25**: 587-617.
- 38 **Keating, S., Prince, S., Jones, M. and Rowe, M.**, The Lytic Cycle of Epstein-Barr Virus Is Associated with Decreased Expression of Cell Surface Major Histocompatibility Complex Class I and Class II Molecules. *J Virol* 2002. **76**: 8179-8188.
- 39 **Pudney, V. A., Leese, A. M., Rickinson, A. B. and Hislop, A. D.**, CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J Exp Med* 2005. **201**: 349-360.

- 40 **Lim, W. H., Russ, G. R. and Coates, P. T.**, Review of Epstein-Barr virus and post-transplant lymphoproliferative disorder post-solid organ transplantation. *Nephrology* 2006. **11**: 355-366.
- 41 **Bollard, C. M., Rooney, C. M. and Heslop, H. E.**, T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease. *Nature reviews. Clinical oncology* 2012. **9**: 510-519.
- 42 **Heslop, H. E., Slobod, K. S., Pule, M. A., Hale, G. A., Rousseau, A., Smith, C. A., Bollard, C. M., Liu, H., Wu, M. F., Rochester, R. J., Amrolia, P. J., Hurwitz, J. L., Brenner, M. K. and Rooney, C. M.**, Long-term outcome of EBV-specific T-cell infusions to prevent or treat EBV-related lymphoproliferative disease in transplant recipients. *Blood* 2010. **115**: 925-935.
- 43 **Niens, M., Jarrett, R. F., Hepkema, B., Nolte, I. M., Diepstra, A., Platteel, M., Kouprie, N., Delury, C. P., Gallagher, A., Visser, L., Poppema, S., te Meerman, G. J. and van den Berg, A.**, HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood* 2007. **110**: 3310-3315.
- 44 **Young, L. S. and Rickinson, A. B.**, Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nature reviews. Cancer* 2004. **4**: 757-768.
- 45 **Elliott, S. L., Suhrbier, A., Miles, J. J., Lawrence, G., Pye, S. J., Le, T. T., Rosenstengel, A., Nguyen, T., Allworth, A., Burrows, S. R., Cox, J., Pye, D., Moss, D. J. and Bharadwaj, M.**, Phase I trial of a CD8+ T-cell peptide epitope-based vaccine for infectious mononucleosis. *J Virol* 2008. **82**: 1448-1457.
- 46 **Moodie, Z., Price, L., Gouttefangeas, C., Mander, A., Janetzki, S., Lower, M., Welters, M. J., Ottensmeier, C., van der Burg, S. H. and Britten, C. M.**, Response definition criteria for ELISPOT assays revisited. *Cancer Immunol Immunother* 2010. **59**: 1489-1501.
- 47 **Brown, N. W., C.**, Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* 2000. **46**: 1221-1229.
- 48 **Klausner, R. D. D., J.G.; Lippincott-Schwartz, J.**, Brefeldin A: Insights into the Control of Membrane Traffic and Organelle Structure. *The Journal of Cell Biology* 1992. **116**: 1071-1080.
- 49 **Sercarz, E. E., Lehmann, P. V., Amenati, A., Benichou, G., Miller, A. and Moudgil, K.**, Dominance and Crypticity of T Cell Antigenic Determinants. *Annu Rev Immunol* 1993. **11**: 729-766.
- 50 **Yewdell, J. W.**, Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity* 2006. **25**: 533-543.
- 51 **Bihl, F., Frahm, N., Di Giammarino, L., Sidney, J., John, M., Yusim, K., Woodberry, T., Sango, K., Hewitt, H. S., Henry, L., Linde, C. H., Chisholm, J. V., 3rd, Zaman, T. M., Pae, E., Mallal, S., Walker, B. D., Sette, A., Korber, B. T., Heckerman, D. and Brander, C.**, Impact of HLA-B alleles, epitope binding affinity, functional avidity, and viral coinfection on the immunodominance of virus-specific CTL responses. *J Immunol* 2006. **176**: 4094-4101.
- 52 **Gonzalez-Galarza, F. F., Christmas, S., Middleton, D. and Jones, A. R.**, Allele frequency net: a database and online repository for immune

- gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Res* 2011. **39**: D913-919.
- 53 **Gavioli, R., Kurilla, M. G., de Campos-Lima, P.-O., Wallace, L. E., Dolcetti, R., Murray, R. J., Rickinson, A. B. and Masucci, M. G.,** Multiple HLA A11-Restricted Cytotoxic T-Lymphocyte Epitopes of Different Immunogenicities in the Epstein-Barr Virus-Encoded Nuclear Antigen 4. *J Virol* 1993. **67**: 1572-1578.
- 54 **Lee, S. P., Tierney, R. J., Thomas, W. A., Brooks, J. M. and Rickinson, A. B.,** Conserved CTL Epitopes Within EBV Latent Membrane Protein 2. *J Immunol* 1997. **158**: 3325-3334.
- 55 **Hill, A. B., Lee, S. P., Haurum, J. S., Murray, N., Yao, Q.-Y., Rowe, M., Signoret, N., Rickinson, A. B. and McMichael, A. J.,** Class I Major Histocompatibility Complex-restricted Cytotoxic T Lymphocytes Specific for Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigens Fail to Lyse the EBV-transformed B Lymphoblastoid Cell Lines against Which They Were Raised. *J Exp Med* 1995. **181**: 2221-2228.
- 56 **Nastke, M. D., Herrgen, L., Walter, S., Wernet, D., Rammensee, H. G. and Stevanovic, S.,** Major contribution of codominant CD8 and CD4 T cell epitopes to the human cytomegalovirus-specific T cell repertoire. *Cell Mol Life Sci* 2005. **62**: 77-86.
- 57 **Pepperl, S., Benninger-Doring, G., Modrow, S., Wolf, H. and Jilg, W.,** Immediate-early transactivator Rta of Epstein-Barr virus (EBV) shows multiple epitopes recognized by EBV-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* 1998. **72**: 8644-8649.
- 58 **Longmate, J., York, J., La Rosa, C., Krishnan, R., Zhang, M., Senitzer, D. and Diamon, D. J.,** Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics* 2001. **52**: 165-173.
- 59 **Hebart, H., Deginik, S., Stevanovic, S., Grigoleit, U., Dobler, A., Baur, M., Rauser, G., Sinzger, C., Jahn, G., Loeffler, J., Kanz, L., Rammensee, H. G. and Einsele, H.,** Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002. **99**: 3830-3837.
- 60 **Zhang, S., Liu, J., Cheng, H., Tan, S., Qi, J., Yan, J. and Gao, G. F.,** Structural basis of cross-allele presentation by HLA-A*0301 and HLA-A*1101 revealed by two HIV-derived peptide complexes. *Mol Immunol* 2011. **49**: 395-401.
- 61 **Rudolph, M. G., Stanfield, R. L. and Wilson, I. A.,** How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu Rev Immunol* 2006. **24**: 419-466.
- 62 **Lutzky, V. P., Davis, J. E., Crooks, P., Corban, M., Smith, M. C., Elliott, M., Morrison, L., Cross, S., Tschärke, D., Panizza, B., Coman, W., Bharadwaj, M. and Moss, D. J.,** Optimization of LMP-specific CTL expansion for potential adoptive immunotherapy in NPC patients. *Immunology and cell biology* 2009. **87**: 481-488.

- 63 **Geyeregger, R., Freimuller, C., Stevanovic, S., Stemberger, J., Mester, G., Dmytrus, J., Lion, T., Rammensee, H. G., Fischer, G., Eiz-Vesper, B., Lawitschka, A., Matthes, S. and Fritsch, G.,** Short-term in-vitro expansion improves monitoring and allows affordable generation of virus-specific T-cells against several viruses for a broad clinical application. *PloS one* 2013. **8**: e59592.
- 64 **Weinzierl, A. O., Rudolf, D., Maurer, D., Wernet, D., Rammensee, H. G., Stevanovic, S. and Klingel, K.,** Identification of HLA-A*01- and HLA-A*02-restricted CD8+ T-cell epitopes shared among group B enteroviruses. *J Gen Virol* 2008. **89**: 2090-2097.
- 65 **Steven, N. M., Leese, A. M., Annels, N. E., Lee, S. P. and Rickinson, A. B.,** Epitope Focusing in the Primary Cytotoxic T Cell Response to Epstein-Barr Virus and Its Relationship to T Cell Memory. *Journal of Experimental Medicine* 1995. **184**: 1801-1813.
- 66 **Villacres, M. C., Lacey, S. F., Auge, C., Longmate, J., Leedom, J. M. and Diamond, D. J.,** Relevance of Peptide Avidity to the T Cell Receptor for Cytomegalovirus-Specific Ex Vivo CD8 T Cell Cytotoxicity. *The Journal of Infectious Diseases* 2003. **188**: 908-918.
- 67 **Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B. and Callan, M. F.,** A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 1999. **162**: 1827-1835.
- 68 **Levitsky, V., Liu, D., Southwood, S., Levitskaya, J., Sette, A. and Masucci, M. G.,** Supermotif Peptide Binding and Degeneracy of MHC: Peptide Recognition in an EBV Peptide-Specific CTL Response with Highly Restricted TCR Usage. *Human Immunology* 2000. **61**: 972-984.
- 69 **Argaet, V. P., Schmidt, C. W., Burrows, S. R., Silins, S. L., Kurilla, M. G., Doolan, D. L., Suhrbier, A., Moss, D. J., Kieff, E., Sculley, T. B. and Misko, I. S.,** Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 1994. **180**: 2335-2340.
- 70 **Kjer-Nielsen, L., Clements, C. S., Purcell, A. W., Brooks, A. G., Whisstock, J. C., Burrows, S. R., McCluskey, J. and Rossjohn, J.,** A structural basis for the selection of dominant alphabeta T cell receptors in antiviral immunity. *Immunity* 2003. **18**: 53-64.
- 71 **Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. and Sissons, J. G.,** The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996. **70**: 7569-7579.
- 72 **Hislop, A. D., Gudgeon, N. H., Callan, M. F. C., Fazou, C., Hasegawa, H., Salmon, M. and Rickinson, A. B.,** EBV-Specific CD8+ T Cell Memory: Relationships Between Epitope Specificity, Cell Phenotype, and Immediate Effector Function. *The Journal of Immunology* 2001. **167**: 2019-2029.
- 73 **Frahm, N., Yusim, K., Suscovich, T. J., Adams, S., Sidney, J., Hraber, P., Hewitt, H. S., Linde, C. H., Kavanagh, D. G., Woodberry, T., Henry, L. M., Faircloth, K., Listgarten, J., Kadie, C., Jojic, N.,**

- Sango, K., Brown, N. V., Pae, E., Zaman, M. T., Bihl, F., Khatri, A., John, M., Mallal, S., Marincola, F. M., Walker, B. D., Sette, A., Heckerman, D., Korber, B. T. and Brander, C.,** Extensive HLA class I allele promiscuity among viral CTL epitopes. *Eur J Immunol* 2007. **37**: 2419-2433.
- 74 **Nakagawa, M., Kim, K. H., Gillam, T. M. and Moscicki, A. B.,** HLA class I binding promiscuity of the CD8 T-cell epitopes of human papillomavirus type 16 E6 protein. *J Virol* 2007. **81**: 1412-1423.
- 75 **Sidney, J., Southwood, S., Paschetto, V. and Sette, A.,** Simultaneous prediction of binding capacity for multiple molecules of the HLA B44 supertype. *J Immunol* 2003. **171**: 5964-5974.
- 76 **Hillen, N., Mester, G., Lemmel, C., Weinzierl, A. O., Muller, M., Wernet, D., Hennenlotter, J., Stenzl, A., Rammensee, H. G. and Stevanovic, S.,** Essential differences in ligand presentation and T cell epitope recognition among HLA molecules of the HLA-B44 supertype. *Eur J Immunol* 2008. **38**: 2993-3003.
- 77 **Rao, X., Hoof, I., Costa, A. I., van Baarle, D. and Kesmir, C.,** HLA class I allele promiscuity revisited. *Immunogenetics* 2011. **63**: 691-701.

ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL

Die Konzeption der Arbeit wurde maßgeblich von Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović beeinflusst sowie vom Autor ergänzt. Jegliche Epitopvorhersagen und -recherchen, intrazelluläre Zytokinfärbungen sowie die HLA-Tetramersynthese und -Tetramerfärbungen wurden durch den Autor selbst durchgeführt, ebenso wie die statistische Auswertung der Ergebnisse. Bei der Durchführung der Elispot-Assays wurde er unterstützt durch Dipl. biol. Corina Heller. Die Synthese und Aufreinigung der Peptide geschah durch Frau Nicole Zuschke und Patricia Hrstić.

Die Durchführung der gesamten Arbeit stand unter ständiger Betreuung durch Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee sowie Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović.

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Prof. Dr. rer. nat. Stefan Stevanović für die Überlassung des Themas sowie seine immerwährende konstruktive Unterstützung in den vergangenen Jahren bedanken.

Desweiteren gilt mein Dank Prof. Dr. rer. nat. Hans-Georg Rammensee für die freundliche Aufnahme an sein Institut und seine kritischen Fragen und Anmerkungen. Es herrscht eine sehr angenehme und konstruktive Arbeitsatmosphäre, die maßgeblich durch euch beide geprägt ist.

Außerdem möchte ich Dr. rer. nat. Thomas Feger und Dr. rer. nat. Christina Kyzirakos sowie Dr. rer. nat. Janet Peper danken, die mich geduldig eingearbeitet haben in die Anwendung immunologischer Methoden und immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Nicole Zuschke, Patricia Hrstić und Corina Heller danke ich für ihre grundlegende Hilfe bei der Produktion von Peptiden und der Durchführung der Elispots.

Vielen Dank Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Frank und Lynne Yakes für die Koordination der Veranstaltungen des Graduiertenkollegs 794 und der Abteilung Immunologie sowie allen Elchen für die tolle Zeit!

CURRICULUM VITAE

Christoph Georg Grabenbauer

geboren am 17. Juni 1988 in Frankenberg/Eder

Eltern: Johannes F. Grabenbauer, prakt. Tierarzt

Maria T. Grabenbauer, prakt. Tierärztin

Geschwister: Uta P. Grabenbauer, cand. med. dent.

Schulischer Werdegang:

1994-2007: Grundschule und Gymnasium

12. Juni 2007: Allgemeine Hochschulreife (Note: 1,6) am Geschwister-Scholl-Gymnasium Winterberg

Zivildienst: 07-12/2007: Mutter-Kind-Klinik St. Ursula Winterberg

01-03/2008: St. Franziskus-Hospital Winterberg

Beruflicher Werdegang:

2008 bis 2014: Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

30. 03. 2010: Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: gut)

03. 12. 2014: Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note: sehr gut)

Wissenschaftlich-praktische Tätigkeiten:

07/2012-07/2013: OP-Assistenz an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen (Direktor: Prof. Dr. D. Wallwiener)

Promotion: Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Universität Tübingen. Thema: Die Freizügigkeit von viralen T-Zell-Epitopen innerhalb des HLA-A*03-Supertyps und ihre Bedeutung für die angewandte Immuntherapie von Krebs (Direktor: Prof. Dr. H.-G. Rammensee); dabei Förderung durch das Graduiertenkolleg 794 (2010-2012)