

Aus der Medizinischen Klinik I
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

**Frequenz und Phänotyp Epstein-Barr Virus
(EBV)-spezifischer T-Lymphozyten im Verlauf
asymptomatischer EBV-Reaktivierungen gesunder
Virussträger**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der medizinischen Fakultät –
vorgelegt von
Bastian Vogl
aus Nabburg
Lübeck 2008

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Wolfram J. Jabs

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt, Lübeck, den

gez. der Dekan der Medizinischen Fakultät

*Mi tradì quell'alma ingrata,
Infelice, o Dio!, mi fa.
Tradita e abbandonata,
Provo ancor per lui pietà.
Quando sento il mio tormento,
Di vendetta il cor favella;
Ma, se guardo il suo cimento,
Palpitando il cor mi va.*

— *Donna Elvira in Mozarts Don Giovanni*

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Die angeborene, unspezifische Immunität	1
1.1.2	Die erworbene, spezifische Immunität	2
1.1.2.1	B-Lymphozyten – die humorale Immunität	2
1.1.2.2	T-Lymphozyten – die zelluläre Immunität	3
1.2	Das Epstein-Barr Virus	4
1.2.1	Klassifikation und Aufbau	4
1.2.2	Epidemiologie	5
1.2.3	Infektion und Persistenz des EBV	5
1.2.3.1	Adsorption	5
1.2.3.2	Penetration und Uncoating	6
1.2.3.3	Frühphase nach der Infektion	6
1.2.3.4	Persistenz des EBV im Wirtsorganismus	8
1.2.4	Molekularbiologische Grundlagen der EBV-Reaktivierung	9
1.2.4.1	Immediate early genes	9
1.2.4.2	Early genes	10
1.2.4.3	Late genes	10
1.2.5	EBV und das Immunsystem	10
1.2.6	EBV-assoziierte Erkrankungen	12
1.2.6.1	Akute infektiöse Mononukleose (AIM)	12
1.2.6.2	Burkitt-Lymphom (BL)	12
1.2.6.3	Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD)	13
1.3	EBV-Reaktivierung <i>in vivo</i>	13
1.3.1	Stand der Forschung	13
1.3.2	Fragestellung und Ziel der vorliegenden Studie	15
2	Methoden	16
2.1	Studiendesign und -durchführung	16
2.1.1	Probandenkollektiv	16
2.1.2	Probenverarbeitung	16
2.1.3	Ethische Prüfung	17

2.2	Enzyme-linked Immunospot-Assay (Elispot)	17
2.2.1	Anwendung und Prinzip	17
2.2.2	Vergleich mit anderen Methoden	18
2.2.3	Praktische Durchführung und Protokoll	19
2.2.4	Auswertung	19
2.3	EBV-Serologie mittels ELISA	20
2.4	Quantitative <i>real-time</i> Polymerase Chain Reaction (PCR)	20
2.4.1	Historische Entwicklung und Prinzip	20
2.4.2	DNA-Isolation aus PBMC und Plasma	22
2.4.3	Praktische Durchführung und Protokoll	22
2.4.4	Auswertung	23
2.4.4.1	PBMC-Proben	23
2.4.4.2	Plasma-Proben	23
2.4.4.3	Genomische DNA pro ml Plasma	24
2.4.4.4	EBV-Reaktivierung	24
2.5	Durchflußzytometrie (FACS)	24
2.5.1	Entwicklung und Anwendung	24
2.5.1.1	Methodisches Prinzip und Theorie	24
2.5.1.2	Datengewinnung und Analyse	25
2.5.1.3	Aussagekraft bzw. Einschränkungen der Methode	26
2.5.2	Probenpräparation und Durchführung	26
2.5.3	Analyse und statistische Auswertung	27
2.6	HLA-Tetramer Synthese	27
3	Ergebnisse	28
3.1	EBV-Reaktivierungen in der Studienpopulation	28
3.1.1	EBV-Serologie	28
3.1.2	Quantitative <i>real-time</i> PCR	28
3.2	Verlauf der EBV-spezifischen Immunität – Elispot	28
3.2.1	Reaktivität gegenüber der autologen LCL	29
3.2.2	Reaktivität gegenüber einzelnen viralen Epitopen	32
3.3	Quantifikation EBV-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen – FACS	32

4	Diskussion	33
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	33
4.2	Kritische Würdigung der verwendeten Methoden und Meßverfahren	33
4.2.1	Diagnostik von EBV-Reaktivierungen	33
4.2.2	Quantifizierung der EBV-spezifischen Immunität	34
4.2.3	Interpretation der Ergebnisse	35
4.2.4	Ausblick	36
5	Zusammenfassung	37
A	Abbildungen	38
A.1	Elispot	38
A.2	Verläufe der EBV-spezifischen PBMC-Frequenzen einzelner Probanden im Elispot	40
A.3	Durchflußzytometrie	49
B	Tabellen	50
C	Material	53
C.1	Geräte und Software	53
C.2	Laborbedarf	54
C.3	Zellisolation und -kultur	54
C.4	Kryopräservierung von Zellmaterial	54
C.5	Interferon- γ Elispot	55
C.6	DNA-Isolation und quantitative <i>real-time</i> PCR	55
C.7	Enzygnost ELISA	55
C.8	FACS	56
D	Laborprotokolle	57
D.1	Isolation von PBMC	57
D.2	Kryopräservierung	57
D.3	Etablierung von autologen lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs)	57
D.4	Interferon- γ Elispot	58
D.5	Reaktionsansatz für die quantitative <i>real-time</i> PCR	59
D.6	FACS	59

Abbildungsverzeichnis	61
Tabellenverzeichnis	61
Literatur	62
Danksagung	73
Lebenslauf	74

1 Einführung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes, praktisch ubiquitär im menschlichen Körper vorhandenes Organ, das ein Überleben trotz der Vielzahl an Pathogenen in der Umwelt ermöglicht. Es besteht aus lymphatischen Geweben und Organen im engeren Sinne sowie aus Zellen und Proteinen. Ein Teil des Immunsystems ist angeboren und bietet grundlegenden Schutz gegenüber der breiten Masse an Krankheitserregern. Außerdem ist diese sog. unspezifische Immunität die Grundlage für das erworbene Immunsystem, das sich dynamisch im Laufe des Lebens durch Antigenkontakt entwickelt und über ein "immunologisches Gedächtnis" verfügt.

1.1.1 Die angeborene, unspezifische Immunität

Die zelluläre Basis der unspezifischen Immunität stellen Monozyten und Granulozyten dar, die in der Lage sind, Mikroorganismen durch Phagozytose zu inkorporieren und durch verschiedene Mechanismen, z.B. die Bildung zytotoxischer Sauerstoffradikale (O_2^- , H_2O_2 , OH^\bullet) oder Peptide (Defensine, Lysozym), effektiv unschädlich zu machen. Makrophagen verfügen über eine Reihe von Oberflächenmolekülen, u.a. die sog. Toll-like Rezeptoren (TLRs), die es ihnen erlauben, Pathogene direkt zu erkennen und eine Entzündungsreaktion anzustossen, deren Ziel es ist, die Infektion lokal zu begrenzen und den Erreger zu eliminieren. Dies geschieht durch die Sekretion verschiedener Zytokine (u.a. IL-1 [Interleukin-1], IL-6, IL-8, TNF- α [Tumornekrosefaktor- α]), die weitere immunkompetente Zellen rekrutieren und lokale Veränderungen des Endothels induzieren (Vasodilatation, Expression von Adhäsionsmolekülen, Lockerung der tight junctions). Ferner wird das T- und B-Zellsystem der spezifischen Immunität aktiviert (s.u.).

Bisher wurden zehn verschiedene Toll-like Rezeptoren beschrieben, deren Liganden typische Oberflächenantigene oder Bestandteile von Mikroorganismen sind. So erkennt bspw. TLR-4 im Zusammenspiel mit CD14 (cluster of differentiation 14) das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien. Weitere wichtige Antigenrezeptoren auf Phagozyten sind der Makrophagen-Mannoserezeptor oder die Scavenger-Rezeptoren.

Neben den verschiedenen zellulären Bestandteilen der unspezifischen Immunabwehr spielt das Komplementsystem als humorale Komponente eine entscheidende Rolle. Es besteht aus einer Reihe von Enzymvorstufen (Zymogene) im Plasma, die, ähnlich dem Ge-

rinnungssystem, kaskadenartig aktiviert werden können. Dies geschieht u.a. durch Antigen-Antikörperkomplexe oder durch zufällige Bindung von Komplementbestandteilen an die Oberfläche von Pathogenen. Am Ende der Komplementkaskade stehen sowohl die Opsonierung und das Abtöten des entsprechenden Erregers als auch die Aktivierung der zellulären Immunabwehr (s.o.).

1.1.2 Die erworbene, spezifische Immunität

Auch bei der erworbenen Immunität läßt sich ein zellulärer von einem humoralen Anteil unterscheiden. Beiden gemein ist ihre gegenseitige Abhängigkeit sowohl voneinander als auch von den oben besprochenen unspezifischen Abwehrmechanismen. Nur das reibungslose Zusammenwirken aller Bestandteile des Immunsystems garantiert die volle Immunkompetenz.

1.1.2.1 B-Lymphozyten – die humorale Immunität B-Lymphozyten machen ca. 15% der gesamten Lymphozytenpopulation im Blut aus. B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche membrangebundene Immunglobuline (Ig), mit deren Hilfe sie Antigen direkt erkennen können. Dieses wird daraufhin internalisiert und nach Degradation in zytoplasmatischen Vesikeln von MHC-II (major histocompatibility complex) Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Die meisten Antigene sind thymusabhängig, d.h. der entsprechende B-Lymphozyt muß durch eine ebenfalls für dieses Antigen spezifische T-Helferzelle (s.u.) stimuliert werden, damit er sich weiter differenzieren kann. Die Stimulation durch die T_H-Zelle erfolgt u.a. mittels CD154, das an CD40 der B-Zelle bindet und deshalb auch CD40-Ligand genannt wird. Dies ermöglicht dem B-Lymphozyt einerseits durch Eintritt in den Zellzyklus die Proliferation und andererseits die vermehrte Expression von B7.1 und B7.2, die wiederum potente Stimulatoren von T-Zellen sind.

Der Kontakt und die Stimulation durch T-Helferzellen erfolgt an der Grenze zwischen T- und B-Zellzone lymphatischer Organe. Nach einer ersten klonalen Expansion bildet sich ein Keimzentrum antigenspezifischer B-Lymphozyten aus, die sich zu antikörperproduzierenden Plasmazellen und zu B-Gedächtniszellen differenzieren. Dabei findet eine sog. somatische Hypermutation statt, die durch aufeinanderfolgende Mutation und Selektion sicherstellt, daß nur Klone überleben, die Antikörper immer höherer Spezifität sezernieren. Ferner wird durch den Ig-Klassenwechsel die endgültige Immunglobulinklasse festgelegt. Plasmazellen wandern in das Knochenmark ein, B-Gedächtniszellen rezirkulieren im peripheren Blut.

1.1.2.2 T-Lymphozyten – die zelluläre Immunität T-Lymphozyten lassen sich grob nach den Oberflächenantigenen CD4 und CD8 in T-Helferzellen ($CD4^+CD8^-$) und zytotoxische T-Zellen ($CD4^-CD8^+$) einteilen. Erstere sind bei der Aktivierung darauf angewiesen, daß ihrem T-Zellrezeptor (TCR) das Antigen im Kontext eines MHC-II Moleküls dargeboten wird. Sie sind damit von spezialisierten Zellen abhängig, die Antigen phagozytieren und einzelne Epitope in MHC:Peptid Komplexen präsentieren: Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen. Zytotoxische T-Zellen hingegen verfügen über einen TCR, der mit MHC-I interagiert, das auf den meisten Zellen exprimiert wird und die von der Zelle selbst synthetisierten Proteine in degradierter Form präsentiert, so daß z.B. virusinfizierte Zellen MHC-I:Peptid Komplexe präsentieren, die als pathologisch erkannt werden.

T-Zellaktivierung Die Bindung des TCR an den MHC:Peptid Komplex reicht zur Aktivierung naiver T-Lymphozyten nicht aus. Wichtige Kostimulatoren sind die oben erwähnten B7 Moleküle, die an CD28 auf T-Zellen binden. Auch CD40 stimuliert T-Lymphozyten durch Bindung an CD154 (CD40-Ligand, s.o.); dadurch wird außerdem B7 in antigenpräsentierenden Zellen induziert. Erwähnenswert ist ferner CTLA-4, ein inhibitorischer Rezeptor, der nach T-Zellaktivierung exprimiert wird und eine überschießende T-Zellantwort verhindert. Bei alleiniger Bindung des T-Zellrezeptors ohne Kostimulation wird die entsprechende Zelle anerg.

T-Zellen exprimieren nach Aktivierung einen hochaffinen IL-2 Rezeptor und sezernieren autokrin IL-2. Dadurch setzen sie ihre eigene Proliferation und Differenzierung in Gang, an deren Ende reife Effektor-T-Zellen stehen. Diese sind in der Lage, durch alleinigen Antigenkontakt, ohne Kostimulation, aktiv zu werden. Zudem exprimieren sie das Adhäsionsmolekül VLA-4, das es ihnen ermöglicht, an Gefäßendothel in entzündetem Gewebe zu binden, so daß sie direkt vor Ort ihre Funktion erfüllen können.

T-Helferzellen $CD4^+$ T-Zellen differenzieren sich weiter in T_H1 - oder T_H2 -Zellen, die sich im wesentlichen durch das Expressionsmuster ihrer Zytokine unterscheiden. Obwohl T-Helferzellen auch direkt zytotoxisch wirken können, besteht ihre Hauptaufgabe darin, die Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen zu lenken, indem sie B-Zellen und Makrophagen stimulieren. So produzieren T_H1 -Zellen Zytokine, welche die Abwehr intrazellulärer Pathogene, z.B. Viren, ermöglichen (u.a. $IFN-\gamma$ [Interferon- γ], $TNF-\alpha$ und $-\beta$, IL-2 und -3). Insbesondere IL-2 fördert die Proliferation $CD8^+$, also zytotoxischer, T-Zellen. T_H2 -Zellen

begünstigen hingegen die humorale Immunabwehr durch B-zellaktivierende Faktoren (u.a. IL-4, -5, -15 und CD40-Ligand).

Zytotoxische T-Zellen $CD8^+$ T-Zellen besitzen eine Reihe von Effektormolekülen, die in Vesikeln gespeichert sind und die Zielzelle unmittelbar angreifen können. So kann Granulysin in Zielzellen die Apoptose induzieren, Perforin zerstört die Zellmembran durch Bildung von Transmembranporen und Granzyme gehören als Serinproteasen zu den proteolytischen Enzymen. Neben diesen Effektormolekülen sezernieren $CD8^+$ T-Zellen auch verschiedene Zytokine, u.a. auch TNF- α , TNF- β und IFN- γ . Letzteres inhibiert die Virusreplikation in infizierten Zellen, induziert eine vermehrte Expression von MHC-I Molekülen und aktiviert Makrophagen. $CD8^+$ T-Lymphozyten besitzen somit verschiedene Möglichkeiten, intrazelluläre Pathogene abzuwehren.

1.2 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr Virus wurde 1964 in Lymphoblastenkulturen aus Burkitt-Lymphomen entdeckt^[22] und gehört als γ -Herpesvirus (HHV 4) zu einer Familie humanpathogener Viren, die nach Primärinfektion lebenslang im Wirtsorganismus persistieren. Es war zur damaligen Zeit das einzige bekannte menschliche Tumovirus und gilt heute als das am besten untersuchte γ -Herpesvirus.

1.2.1 Klassifikation und Aufbau

Die Familie der Herpesviridae umfaßt die drei Subfamilien der α -, β - und γ -Herpesvirinae, zu denen jeweils zwei Gattungen gehören: die Gattungen

- *Simplexvirus* und *Varizellavirus* mit den Arten Herpes-simplex-Virus Typ 1 (HHV 1) und Typ 2 (HHV 2) bzw. Varizella-zoster-Virus (HHV 3) und Pseudorabiesvirus,
- *Zytomegalievirus* und *Roseolovirus* und ihre Arten Zytomegalievirus (HHV 5) bzw. HHV 6A, HHV 6B als Auslöser des Exanthema subitum und HHV 7, das bisher als apathogen gilt,
- *Lymphocryptovirus* und *Rhadinovirus* mit dem Epstein-Barr Virus (HHV 4) als einzigem humanpathogenen Lymphocryptovirus bzw. dem HHV 8, das im Verdacht steht, Mitauslöser des Karposi-Sarkoms zu sein.

Alle Herpesviren besitzen ein ikosaedrisches Kapsid, eine Hülle und verfügen über lineare Doppelstrang-DNA mit einem 124–235 kbp (Kilobasenpaare) großen Genom; ihre Größe beträgt zwischen 150 und 200 nm. Sie kommen ubiquitär vor und infizieren je nach Art Mensch, Tier oder beides. Insgesamt sind mehr als 100 Arten klassifiziert^[38, S. 199f.].

Das EBV besteht aus einem Protein-Kern, einer 184 kbp umfassenden DNA, einem Nukleokapsid mit 162 Kapsomeren, einer Hüllstruktur um das Nukleokapsid und einer äußeren Hülle mit nach außen ragenden Glykoprotein-Spikes^[49, S. 2513]. Man unterscheidet EBV Typ 1 von EBV Typ 2, die, abgesehen von den Genen für die EBNA (Epstein-Barr nuclear antigens, s. Abschnitt 1.2.3.3), kaum Differenzen aufweisen. EBV Typ 2 hat eine weitaus niedrigere Prävalenz, obwohl es in Teilen Afrikas und in Neu Guinea ähnlich häufig vorkommt wie Typ 1^[49, S. 2514].

1.2.2 Epidemiologie

Die Prävalenz EBV-infizierter Erwachsener beträgt in Entwicklungsländern nahezu 100%, während in Industrienationen bis zu 5% der Erwachsenen seronegativ bleiben^[75, S. 2578f.]. Diese Diskrepanz wird auf unterschiedliche Lebensgewohnheiten und Hygieneverhältnisse zurückgeführt, da einzelne Virusstämme innerhalb von Familien von einer Generation auf die nächste übertragen werden^[28] und das Erstinfektionsalter in Bevölkerungsgruppen und geographischen Regionen mit geringem sozioökonomischen Status niedriger liegt^[16, S. 1046].

Neben der meist asymptomatisch verlaufenden Primärinfektion im Kleinkindalter tritt vor allem in der entwickelten Welt ein zweiter Häufigkeitsgipfel in der Pubertät auf, der wohl im Zusammenhang mit dem oralen Infektionsweg steht^[75, S. 2579]. Dabei kommt es in weitaus höherem Maße (bis zu 75%) zu symptomatischen Erkrankungen im Sinne einer akuten infektiösen Mononukleose (s. 1.2.6.1, S. 12)^[16, S. 1046].

1.2.3 Infektion und Persistenz des EBV

Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt des EBV. Die Übertragung erfolgt in erster Linie mit dem Speichel, da der Pharynx und das dortige lymphatische Gewebe auch nach der Primärinfektion als kontinuierliche Quelle neuer Virionen dienen^[27, 90].

1.2.3.1 Adsorption Das EBV ist ein extrem B-lymphotropes Virus; die entscheidende Rolle kommt dabei dem Glykoprotein CD21 zu, das vor allem auf CD19⁺ B-Lymphozyten exprimiert wird und ohne das eine Adsorption des Virus an die entsprechende Zelle nur

schwer oder gar nicht möglich ist^[49, S. 2518]. CD21 fungiert im Immunsystem als Rezeptor für den Komplementbestandteil C3d^[43, S. 732].

Ein nichtphysiologischer Ligand des CD21-Rezeptors ist das Glykoprotein gp350/220 auf der äußeren Hülle des EBV. Die Affinität dieses Proteins beruht dabei auf einer zu C3d ähnlichen Peptidsequenz im Bereich der entsprechenden Bindungsstelle^[49, S. 2518]. gp350/220 ist das häufigste Oberflächenprotein des EBV.

Da eine Infektion epithelialer Zellen mit EBV *in vitro* möglich ist und *in vivo*, wenngleich auch selten, stattfindet^[75, 90] (z.B. Nasopharynxkarzinom), scheint es eine Alternative zur CD21-gp350/220-vermittelten Adsorption zu geben, zumal gp350/220 weder für die Infektion von B-Lymphozyten noch für die Infektion von Epithelzellen unabdingbar ist^[49, S. 2518].

1.2.3.2 Penetration und Uncoating Nach der Interaktion von Virus und B-Lymphozyt kommt es zur Aggregation von CD21-Molekülen in der Plasmamembran und zur Internalisierung des CD21:EBV-Komplexes in zytoplasmatische Vesikel. Dabei scheint die Aktivierung von CD21-assoziierten Tyrosinkinasen eine Rolle zu spielen^[49, S. 2518]. Die neu infizierte Zelle synthetisiert zunächst RNA, sezerniert dann Immunglobuline, exprimiert Aktivierungsmarker sowie Adäsionsmoleküle und aggregiert *in vitro*^[49, S. 2518].

Neben dem durch gp350/220 aktivierten CD21-Signaltransduktionsweg spielt auch das gp85, das nach dem gp350/220 das zweithäufigste Oberflächenmolekül des EBV ist, eine entscheidende Rolle bei der Fusion von Zellmembran und Virushülle und damit auch beim Transfer des Nukleokapsids in das Zytoplasma^[49, S. 2519].

Ein weiteres virales Glykoprotein, das vor allem durch seine Wechselwirkung mit MHC-II Molekülen auffällt, ist ebenfalls an der Infektion von B-Lymphozyten, nicht aber an der Infektion von epithelialen Zellen beteiligt: das gp42.

1.2.3.3 Frühphase nach der Infektion Wahrscheinlich findet der Transport des EBV-Nukleokapsids zum Zellkern durch das Zytoskelett der infizierten Zelle statt^[49, S. 2519]. Über den Abbau des Kapsids ist wenig bekannt.

Nach der Infektion nimmt der B-Lymphozyt einen lymphoblastoiden Phänotyp an und beginnt zu proliferieren^[90]. Dieses sog. *growth program*, alternativ auch *Latency III* oder *lymphoblastoide Form der Latenz* genannt, ist charakterisiert durch die Expression von neun Genen und deren Produkten: EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C und -LP sowie LMP-1 (latent membrane protein), -2A und -2B.

EBNA-1 ist dafür zuständig, das kovalent geschlossene virale Episom zufällig mit zell-eigenen Chromosomen zu assoziieren, so daß es während der Mitose nicht verloren-geht^[89] Es bedient sich dabei eines cis-acting elements des EBV, dem sog. OriP. EBNA-1 ist für das Überleben des EBV unabdingbar.

EBNA-2 gilt als zentraler Regulator der Immortalisierung von lymphoblastoiden B-Lymphozyten. Es ist das erste der sog. latenten Proteine, das in neu infizierten Zellen gefunden wird^[90]. EBNA-2 bindet an das nukleäre Protein RBPJ κ /CBP, das physiologisch mit Notch IC assoziiert und ein Teil des sog. Notch-Signaltransduktionsweges ist, dessen Aktivierung Proliferation begünstigt und Zelldifferenzierung hemmt. Da EBNA-2 als Homolog von Notch IC angesehen wird^[90], nimmt man an, daß es, genau wie Notch IC selbst, zur Repression von Genen führt, die zur Differenzierung und zur Unterbrechung des Zellzyklus notwendig sind.

Darüberhinaus ist EBNA-2 in der Lage, die Promotoren aller Gene des *growth program* zu transaktivieren und *c-myc*^[89], sowie CD21 und CD23 hoch zu regulieren^[49, S. 2525].

EBNA-3A, -3B, -3C Diese drei Antigene besitzen eine relativ große Halbwertszeit, was die im Vergleich zur geringen Menge an zytoplasmatisch vorhandener mRNA große Masse an zellulärem EBNA-3 erklärt^[49, S. 2527]. Sie interagieren, ähnlich dem EBNA-2, mit RBPJ κ .

Die Funktion von EBNA-3B ist unklar. EBNA-3B ist weder für die Infektion von B-Lymphozyten noch für deren Überleben notwendig und auch die Virusreplikation ist nicht an das Vorhandensein von funktionierendem EBNA-3B gebunden^[49, S. 2526]. Epitope dieses Proteins werden von T-Lymphozyten erkannt und entsprechende Immunantworten sind häufig dominant^[75, S. 2585ff.], womit EBNA-3B eine für das EBV wesentliche Funktion erfüllen muß, da es als potentes Antigen einem hohen Selektions- und Mutationsdruck unterliegt.

EBNA-3A und -3C sind sowohl für das Wachstum als auch für das Überleben von lymphoblastoiden Zellen notwendig, wenn auch im Falle von EBNA-3A nur bedingt^[49, S. 2528]. Zu den aktivierenden Funktionen dieser beiden Proteine gehört die Induktion von CD21, CD40 und *bcl-2*; EBNA-3C transaktiviert zusammen mit EBNA-2 den Promotor von LMP1. Die repressiven Effekte beider Antigene betreffen vor allem den Cp-Promotor, der die Expression der sechs EBNAs reguliert^[49, S. 2528].

LMP-1 ist ein funktionelles Homolog des CD40-Antigens auf B-Lymphozyten. CD40 vermittelt nach Bindung von CD154 auf T-Helferzellen das für die Proliferation und das Überleben des entsprechenden B-Lymphozyten notwendige T_H -Signal u.a. durch die Induktion von $bcl-X_L$ [43, S. 382].

LMP-1 imitiert die Signaltransduktion von CD40, allerdings ohne daß es dafür eines Liganden bedarf. Es bindet dabei ebenso wie CD40 an sog. TRAFs (tumor necrosis factor receptor associated factors) und aktiviert dadurch $NF\kappa B$, welches seinerseits antiapoptotisch wirksam ist und Zellwachstum fördert [90]. Somit stellt LMP-1 dauerhaft und von T-Helferzellen unabhängig das zur Proliferation notwendige T_H -Signal zur Verfügung.

LMP-2A und -2B Diese beiden Antigene sind, bis auf ihre ersten beiden Exons, identisch und spielen bei der Transformation von B-Lymphozyten in LCLs (lymphoblastoid cell line, s. Abschnitt 2.2.3, S. 19) sowie deren Überleben keine wesentliche Rolle [49, S. 2536]. LMP-2A unterdrückt die durch Quervernetzung von Oberflächen-IgM, CD19 und MHC-II aktivierten Signaltransduktionswege. Wahrscheinlich werden nach Aggregation von LMP-2A und dessen Phosphorylierung die Kinasen *src* und *syk* gebunden sowie weitere rezeptorassoziierte Kinasen der *src*-Familie durch Aktivierung von Kinasen oder Phosphatasen geblockt [49, S. 2537]. Damit wird verhindert, daß nach Aktivierung des lymphoblastoiden B-Lymphozyten durch Quervernetzung von Oberflächen-Ig, d.h. durch Antigenkontakt, die Zelle in die replikative, lytische Phase des viralen Lebenszyklus eintritt (s. 1.2.4, S. 9).

Da LMP-2A mRNA das einzige EBV-Transkript ist, das reproduzierbar *in vivo* in infizierten B-Gedächtniszellen zu finden ist, wird dem LMP-2A eine bedeutende Rolle beim Langzeitüberleben dieser Zellen zugeschrieben. Diese These wird gestützt durch die Tatsache, daß LMP-2A über einen mit dem B-Zell-Rezeptor identischen ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) verfügt. Dadurch ist es dem EBV möglich, analog zu LMP-1, einen dauerhaft aktiven Rezeptor zu simulieren, der unabhängig von einem Liganden agiert. Nach Thorley-Lawson und Babcock [90] ist der durch LMP-2A vermittelte Stimulus lediglich ein antiapoptotisches Signal, das ein Überleben der Zelle ermöglicht, das aber nicht zur Aktivierung, Differenzierung und Proliferation derselben ausreicht.

1.2.3.4 Persistenz des EBV im Wirtsorganismus Nachdem die infizierte Zelle durch das *growth program* des EBV aktiviert wurde, wandert sie wahrscheinlich, genau

wie ein physiologisch durch Antigen aktivierter B-Lymphozyt^[43, S. 377f.], in einen Follikel eines peripheren lymphatischen Organs ein und bildet dort ein Keimzentrum aus^[89]. Für die weitere Differenzierung in Zentroblast, Zentrozyt und schließlich zur Gedächtniszelle ist die Repression von EBNA-2 notwendig^[89, 90], da EBNA-2 wie oben erwähnt die Zelldifferenzierung hemmt. Daneben kommt es zu einem Wechsel des Genexpressionsmusters von Latency III zu *Latency II*, auch *default program* genannt. Hierbei werden nur noch EBNA-1 sowie LMP-1 und -2A exprimiert^{[75, S. 2582][89, 90]}.

Die genauen Vorgänge, die zu diesen Veränderungen führen, sind nicht bekannt, obwohl davon auszugehen ist, daß sie sich in den Keimzentren abspielen^[89].

Ohne Antigenkontakt und T-Zell-Interaktion treten Zentroblasten und Zentrozyten in die Apoptose ein^[43, S. 382]. Die Proteine des Latency II-Expressionsmusters (s.o.) stellen somit die notwendigen Signale zur Verfügung, die ein Weiterleben der Zelle und damit die Differenzierung ermöglichen: LMP-1 simuliert die durch CD40 vermittelte Stimulation durch eine T-Helferzelle und LMP-2A imitiert die Transduktion eines aktivierten B-Zellrezeptors.

Am Ende dieses Weges steht eine EBV-infizierte, ruhende B-Gedächtniszelle, in der keinerlei virale Antigene mehr exprimiert werden und deren virale Transkription sich auf nichtkodierende RNAs beschränkt^[75, S. 2581f.].

1.2.4 Molekularbiologische Grundlagen der EBV-Reaktivierung

Der Ablauf der Virusreplikation ist an die sequentielle Expression einer Reihe von Genen gebunden, die im folgenden vorgestellt werden.

1.2.4.1 Immediate early genes *In vitro* können EBV-infizierte Zellen relativ einfach in den replikativen Zyklus gebracht werden. Akata-Zellen, aus einem Burkitt-Lymphom gewonnen, befinden sich im Latency I-Stadium der Infektion, d.h. sie exprimieren nur EBNA1 als EB virales Antigen. Durch Quervernetzung ihrer oberflächengebundenen Immunglobuline mittels Anti-Ig-Antikörper wird direkt BZLF1 induziert, das als das wichtigste sog. *immediate early* Gen die replikative Phase einleitet. BZLF1 transaktiviert BRLF1, ein weiteres *immediate early* Antigen; ferner interagiert es u.a. mit mit NF- κ B und p53.

BZLF1 und BRLF1 wirken synergistisch bei der Transaktivierung der sog. *early* Gene und leiten so die nächste Phase des replikativen Zyklus ein.

1.2.4.2 Early genes Insgesamt erfüllen mehr als 30 mRNAs die Definition eines *early* Genes, nach der das Vorhandensein von Inhibitoren der viralen DNA-Synthese die Transkription von *early* Genen nicht mehr unterbinden kann.

BSMLF1 und BMRF1 gehören zu den ersten *early* Genen und transaktivieren deren weitere. Ersteres wirkt positiv auf den zytoplasmatischen Transport ungesplicerter mRNA und damit indirekt auch auf die Transkription.

BHRF1 und BALF1 besitzen eine dem zellulären *bcl-2* verwandte Struktur. *Bcl-2* spielt eine wichtige Rolle als antiapoptotisches Protein, so daß BHRF1 und BALF1 als virale Antigene ähnliche Eigenschaften während des Replikationszyklus zugeschrieben werden.

Weitere wichtige *early* Gene sind direkt in die EB virale DNA-Replikation involviert: BALF5 ist eine DNA-Polymerase, BORF2 eine Ribonukleotidreduktase und BGLF5 eine alkalische Exonuklease.

1.2.4.3 Late genes Alle bisher bekannten viralen Glykoproteine gehören zu den spät während der Replikation transkribierten Genen. Insbesondere das Hüllprotein gp350/220, das für die Infektion unerlässlich ist (s. 1.2.3.1, S. 6), ist in diesem Zusammenhang erwähnenswert. gp350/220 findet sich bevorzugt in der Zellmembran, während die Kernmembran relativ wenig gp350/220 enthält. Aus dieser Diskrepanz ergibt sich die Hypothese, daß das EBV seine endgültige Hülle erst im Zytoplasma der infizierten Zelle erhält.

BCRF1 wird auch als virales IL-10 bezeichnet, da seine Aminosäuresequenz der des humanen IL-10 homolog ist. Entsprechend scheinen die Eigenschaften von BCRF1 *in vivo* in einer Makrophagen- und NK-Zellsuppression zu bestehen. *In vitro* ist die Bedeutung von BCRF1 vernachlässigbar.

1.2.5 EBV und das Immunsystem

Die EBV-spezifische Immunität wird im wesentlichen durch T-Lymphozyten vermittelt, ist also zellulärer Natur. Besonders eindrucklich wird dies während der Primärinfektion, bei der es zu einer maximalen Expansion einzelner EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellklone kommt und mehr als 40% des gesamten CD8⁺ T-Zellpools im Blut spezifisch für ein einzelnes virales Epitop sein können^[15].

Der Lebenszyklus des EBV ist von der Expression gänzlich unterschiedlicher Proteinmuster während der Viruspersistenz und der Replikation/Reaktivierung geprägt (s. 1.2.3 und 1.2.4). So findet sich während der akuten, replikativen Phase nur eine niedrige Frequenz CD8⁺ T-Zellen, die spezifisch sind für Epitope aus latenten Proteinen (vorwiegend EBNA-

3A, -3B und -3C*). Die immundominanten Epitope entstammen vor allem den *immediate early* und den *early* Antigenen: z.B. HLA-B8:RAK (mit Frequenzen z.T. >30% aller CD8⁺ T-Zellen), HLA-A2:YVL (>30%) oder HLA-A2:GLC (>10%)^[15, 36].

Demgegenüber verändert sich die Zusammensetzung des EBV-spezifischen T-Zellpools nach der akuten Erkrankung. Vor allem die lytischen Epitope, die die primäre Immunantwort dominiert haben, verlieren relativ an Gewicht — ihre Frequenz beträgt dann allerdings immer noch 0,2–2% aller CD8⁺ T-Lymphozyten für jedes einzelne Epitop. Die absoluten Zahlen bzw. Frequenzen für latente Epitope sind mit je 0,05–1% sehr niedrig, doch haben sie im Verhältnis zu ihren lytischen Gegenübern deutlich zugenommen^[37].

Obwohl der zellulären Immunabwehr die tragende Rolle bei der Kontrolle der EBV-Infektion zukommt, löst das Virus eine durchaus nennenswerte B-Zellantwort mit konsekutiver Antikörperproduktion aus. Dabei werden grob Anti-EBNA, Anti-EA, Anti-VCA und Anti-MA Antikörper unterschieden. Anti-EA umfaßt die wesentlichen *immediate early* und *early* Antigene; Anti-VCA (virus capsid antigen) ist spezifisch für Teile des Viruskapsids, bswp. BcLF1, BFRF3, BLRF2 und gp110; Anti-MA (membrane antigen) binden das gp350 und haben damit als neutralisierende Antikörper besondere Bedeutung. ^[75, S. 2528]

Die Antikörperantwort sowohl während der primären als auch während der darauffolgenden latenten Infektion ist gut untersucht^[75, 2528ff.]. IgM-VCA sowie IgG-VCA und IgG-EA Antikörper finden sich schon in der Frühphase der akuten Mononukleose. Während die IgM Antikörper im Verlauf quantitativ bis unter die Nachweisgrenze absinken, bleiben detektierbare IgG-Titer lebenslang erhalten. Die virusneutralisierenden und komplementaktivierenden IgM- und IgG-MA Antikörper finden sich nur in geringer Zahl. Desweiteren treten noch IgA Antikörper gegen verschiedene Antigene (VCA, EA, gp350) auf, deren Rolle allerdings noch nicht abschließend verstanden ist.

Die Frage, welche Variablen bestimmen, ob die Immunantwort auf ein Pathogen in eine eher zelluläre oder eine eher humorale Richtung gelenkt wird, ist von allgemeinem immunologischen Interesse und im Fall des EBV von besonderer Bedeutung. Den CD4⁺ T-Lymphozyten kommt dabei eine tragende Rolle zu (s. 1.1.2.2, S. 3f.), denn das Verhältnis von T_H1- zu T_H2-Zellen ist für den Verlauf der Immunreaktion von Bedeutung. Allerdings sind die Umstände, die zur Differenzierung von T_H1- bzw. T_H2-Zellen führen, nicht genau geklärt. So scheint bspw. das durch die antigenpräsentierenden Zellen erzeugte Zytokinmilieu wichtigen Einfluß zu nehmen^[43, S. 420ff.]. Auch die Art des Antigens selbst sowie

*Eine vollständige Liste der in dieser Studie untersuchten viralen Epitope und deren Proteinzugehörigkeit findet sich in Tabelle 2, S. 51f.

dessen Prozessierung und Präsentation auf der Zelloberfläche scheint von Bedeutung zu sein: je höher die Antigendichte auf der Zelloberfläche und je höher die Affinität zum T-Zellrezeptor, desto eher wird die Differenzierung von T_H1 begünstigt, also die zelluläre Immunabwehr bevorzugt^[43, S. 424f.].

Nach Zinkernagel^[95] wird die Entscheidung, ob es zu einer Immunreaktion kommt und, wenn ja, welcher Art diese sein wird, im wesentlichen von vier Variablen bestimmt: Antigenkonzentration und -struktur sowie Zeit und Ort (in oder außerhalb von sekundär lymphatischen Organen). Nach diesem Modell induzieren hochreplikative Erreger (bspw. VZV, Rhino- oder Influenzaviren) eine vor allem B-zellvermittelte Immunantwort, da die hohe Antigenkonzentration, die durch die Replikation erreicht wird, einen Großteil der potentiell spezifischen T-Zellen anerg macht oder depletiert. Das EBV ist im Gegensatz dazu ein wenig zytopathisches Virus, die verfügbare Menge Antigen deshalb gering, so daß es zu keiner T-Zelldepletion kommt.

1.2.6 EBV-assoziierte Erkrankungen

1.2.6.1 Akute infektiöse Mononukleose (AIM) Vier Jahre nach seiner Entdeckung konnte eine Verbindung zwischen dem EBV und der AIM hergestellt und das EBV als auslösendes Agens identifiziert werden^[32].

Wie bereits erwähnt verläuft der Erstkontakt mit dem EBV im Kleinkindalter in der Regel asymptomatisch. Bei einer Infektion im Jugend- oder Erwachsenenalter tritt meist die typische Symptomtrias der infektiösen Mononukleose, auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt, auf: Pharyngitis (Angina tonsillaris), Fieber und eine zervikal führende Lymphadenitis. Hinzu kommen evtl. Hepatosplenomegalie, Ex- und/oder Enanthem und ein mehr oder minder ausgeprägtes Krankheitsgefühl. Im Blutbild findet sich eine Leukozytose, die durch das Vorhandensein von sog. Pfeiffer-Zellen bedingt ist. Entgegen früherer Annahmen entsprechen Pfeiffer-Zellen aktivierten $CD8^+$ T-Lymphozyten und nicht durch die EBV-Infektion lymphoblastoid veränderten B-Zellen.

Die Erkrankung ist im allgemeinen nach wenigen Wochen selbstlimitierend, die Prognose entsprechend gut. Mögliche Komplikationen sind selten: schwere Blutbildveränderungen, Milzruptur, Guillain-Barré-Syndrom, Meningoenzephalitis.

Die infektiöse Mononukleose ist die einzige bekannte Primärerkrankung des EBV.

1.2.6.2 Burkitt-Lymphom (BL) Das Burkitt-Lymphom ist ein B-Zell Lymphom, das vor allem in Afrika und Neu Guinea endemisch mit einer Inzidenz von bis zu 10/100.000

Einwohner pro Jahr vorkommt. In anderen Teilen der Welt, insbesondere in Europa und den USA, ist die Inzidenz 50–100fach geringer; das BL wird dort deshalb als sporadische Form klassifiziert. Zytogenetisch findet sich beim BL eine Translokation zwischen Chromosom 8 in der Nähe des *c-myc*-Lokus und, in den meisten Fällen, Chromosom 14.

Insbesondere bei der endemischen Form des BL besteht eine starke Assoziation zum EBV. So sind alle Zellen dieses Burkitt Lymphoms EBV-infiziert und bei den Patienten finden sich erhöhte Anti-EBV Antikörpertiter, während nur in ca. 15–20% der sporadischen Burkitt Lymphome EBV-Genom gefunden wird. *In vivo* befinden sich die EBV-infizierten Zellen im Latency I-Stadium, das, im Gegensatz zu Latency III (s. 1.2.3.3, S. 6), durch die alleinige Expression von EBNA1 charakterisiert ist; die für die Immortalisierung nötigen Proteine werden nicht exprimiert. Nichtsdestotrotz ist die Rolle des EBV in der Pathogenese des BL bisher nicht eindeutig geklärt.

1.2.6.3 Post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) Abhängig vom Grad der Immunsuppression nach Organtransplantation, insbesondere der T-Zellsuppression, kommt es bei 1–8% der Transplantatempfänger zur Entwicklung einer PTLD, die durch das Auftreten von Lymphomen gekennzeichnet ist. Daneben ist auch EBV-Seronegativität zum Zeitpunkt der Transplantation ein prognostischer Faktor, der mit einem bis zu 20fach erhöhten PTLD-Risiko vergesellschaftet ist. Klinisch werden mononukleoseähnliche Symptome, Lymphadenopathie, extranodale Tumoren und gelegentlich fulminante Verläufe beobachtet. Mindestens 90% der PTLD-Fälle sind EBV-assoziert.

1.3 EBV-Reaktivierung *in vivo*

1.3.1 Stand der Forschung

Auch gesunde, EBV-seropositive Individuen scheiden Viruspartikel im Speichel aus^[27], so daß vom Vorhandensein einer lytisch infizierten Zellpopulation im Waldeyerschen Rachenring auszugehen ist^[41]. Die Prävalenz EBV-infizierter Zellen dort und im Blut ist bis zu 20 Mal höher als in der Milz und den mesenterialen Lymphknoten^[53]. Lange wurde ein Zusammenhang zwischen B-Zelldifferenzierung und der EBV-Replikation vermutet^[17], der schließlich von Laichalk und Thorley-Lawson bestätigt werden konnte^[54]: so löst die Differenzierung zur Plasmazelle sozusagen physiologisch die Aktivierung des BZLF1-Promotors aus und induziert damit die virale Replikation.

Da die EBV-infizierte, ruhende Gedächtniszelle keinerlei virale Proteine mehr exprimiert, nehmen die Autoren dieser Studie an, daß das Signal zur EBV-Reaktivierung nicht vom EBV selbst sondern vom Wirtsorganismus ausgeht. Eine naheliegende Möglichkeit besteht darin, daß die B-Zelle durch Antigenkontakt zur Differenzierung angeregt wird. Darüberhinaus werden vorhandene (und damit auch die EBV-infizierten) B-Gedächtniszellen polyklonal aktiviert, bspw. durch “bystander” T_H-Zellen oder TLR-vermittelt^[9].

Untersuchungen an organtransplantierten und damit iatrogen immunsupprimierten Patienten haben ergeben, daß es bei diesen zu einer Zunahme detektierbarer EBV-DNA im Blut kommt^[39, 60]. Nach allogener Stammzelltransplantation treten zudem gehäuft EBV-Reaktivierungen auf^[91]. Auch bei anderweitig Immunsupprimierten, z.B. durch HIV, finden sich erhöhte Konzentrationen von EBV-DNA sowohl im Speichel^[20] als auch im Plasma; dies ist offensichtlich durch eine herabgesetzte T-Zellimmunität bedingt^[58].

Warum auch bei Immunkompetenten gelegentlich eine EBV-Reaktivierung mit detektierbarer Plasmavirämie und einer konsekutiven Zunahme EBV-infizierter B-Lymphozyten, d.h. einer erhöhten PBMC-Viruslast, auftritt, ist nach wie vor unklar. Studien an Astronauten vor, während und nach einem Flug ins All haben ergeben, daß ein Zusammenhang zwischen Streß im weitesten Sinne (objektiviert durch die Messung der Katecholamin- und Kortisolausscheidung im Urin) und einer EBV-Reaktivierung besteht^[72, 73, 87]. Zumindest von Dexamethason, einem Glukokortikoid, ist bekannt, daß es auf EB virale Promotoren wirkt und so EBV-Reaktivierungen beeinflussen kann^[81]. Katecholamine hingegen modulieren im Mausmodell die HSV-spezifische, zellulär vermittelte Immunität negativ^[21]. Daneben konnte gezeigt werden, daß es bei Studentinnen im ersten und zweiten Studienjahr während der Prüfungszeit zu einer Zunahme von EBV-Antikörpertitern (IgG und IgA) kommt^[78]. Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Untersuchung an Probanden, die an einem sechswöchigen militärischen Training an der Westpoint Military Academy teilnahmen. Dabei kam es vor den Abschlußprüfungen zu einer signifikanten Zunahme von IgG-VCA Antikörpern als Zeichen erhöhter viraler Aktivität, wobei die Antikörpertiter von HSV-1 und HHV-6 interessanterweise konstant blieben^[25]. Die Ergebnisse dieser Studien scheinen nicht zwingend abhängig von erhöhten Plasmakortisolspiegeln zu sein^[26].

Die genannten Arbeiten legen die Vermutung nahe, daß asymptomatische EBV-Reaktivierungen Gesunder durch transiente Immunsuppression ermöglicht werden, allerdings gibt es bisher keine Arbeit hierzu. Ferner wurde noch keine longitudinale Studie an Gesunden durchgeführt, welche die Häufigkeit von EBV-Reaktivierungen überhaupt quantifizieren

konnte, jedoch dürfte diese nach unseren Beobachtungen in der Größenordnung 1–4/Jahr liegen. Weiterhin ist unklar, ob das EBV bei seiner Reaktivierung durch die wiederholte Provokation einer zellulären Immunantwort eine Boosterung ebendieser zur Folge hat, d.h. ob es während oder nach einer EBV-Reaktivierung zu einer Expansion des EBV-spezifischen T-Zellpools kommt.

1.3.2 Fragestellung und Ziel der vorliegenden Studie

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die symptomlosen EBV-Reaktivierungen gesunder Probanden näher zu charakterisieren. Aus dem oben dargelegten Zusammenhang mit verschiedenen Formen der Immunsuppression ergibt sich die erste Hypothese, die in dieser Arbeit untersucht werden sollte: *EBV-Reaktivierungen treten bevorzugt dann auf, wenn die EBV-spezifische Immunität (quantifiziert durch die Messung EBV-spezifischer T-Zellen) niedrig ist.*

Darüberhinaus wäre es plausibel anzunehmen, daß es im Gefolge einer EBV-Reaktivierung zur Stimulation des Immunsystems mit konsekutiver Expansion des EBV-spezifischen T-Zellpools kommt^[5]. Daher sollte in der vorliegenden Studie auch folgende Frage beantwortet werden: *Kommt es während oder nach einer EBV-Reaktivierung zur reversiblen Expansion des EBV-spezifischen T-Zellpools?*

2 Methoden

2.1 Studiendesign und -durchführung

2.1.1 Probandenkollektiv

14 gesunde, EBV-seropositive Thrombozytapheresespender des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin des UK-SH, Campus Lübeck nahmen an der Studie teil. Sie willigten ein, im Rahmen dieser Studie bei jeder Blutspende 18 ml Lithium-Heparin-Blut sowie 9 ml EDTA-Blut zusätzlich abzugeben. Vor jeder Blutspende erfolgte eine ärztliche Untersuchung der Probanden. Insbesondere führten grippale Symptome (Infekt der oberen Luftwege, allgemeine Leistungsminderung) zum Ausschluß des jeweiligen Probanden am entsprechenden Termin.

Die geplante Beobachtungsdauer betrug 12 Monate.

Dem Alphabet entsprechend wurden die Probanden der Reihe nach anonym numeriert. Tabelle 1, S. 50 faßt die Charakteristika der Studienpopulation zusammen. Insgesamt nahmen 13 Männer und eine Frau teil; der Altersdurchschnitt betrug $40,4 \pm 11,7$ Jahre, der Median 35 Jahre. Der HLA-Typ (MHC Klasse I) aller Probanden war vor Studienbeginn im Rahmen ihrer Tätigkeit als Thrombozytapheresespender vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin bestimmt worden.

2.1.2 Probenverarbeitung

Alle Proben wurden innerhalb von sechs Stunden nach Entnahme ins Labor gesandt und unverzüglich weiterverarbeitet.

Aus den beiden 9 ml Lithium-Heparin-Röhrchen wurden PBMC (peripheral blood mononuclear cells) entsprechend dem Protokoll in Anhang D.1 (S. 57) mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert und für den Elispot-Ansatz zur Quantifikation der EBV-spezifischen Immunität verwendet. Weiterhin wurde Zellmaterial wie in Protokoll D.2 (S. 57) beschrieben bis zur späteren durchflußzytometrischen Analyse bei -196 °C tiefgefroren.

Für die später durchzuführenden serologischen Untersuchungen und die EBV PCR zur Quantifikation von Virämie und PBMC Viruslast wurde aus dem 9 ml EDTA-Röhrchen nach zehnminütiger Zentrifugation bei $300 \times g$ 2 ml Plasma abgenommen und bei -80 °C tiefgefroren. Danach erfolgte entsprechend den beiden o.g. Protokollen die Isolation von PBMC und die Konservierung von 5×10^6 PBMC bei -80 °C .

2.1.3 Ethische Prüfung

Mit Beginn der vorliegenden Studie wurde die Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck eingeholt. Die Ethikkommission genehmigte die Durchführung der dargestellten Studie unter der Antragsnummer 05-016.

2.2 Enzyme-linked Immunospot-Assay (Elispot)

2.2.1 Anwendung und Prinzip

Der Elispot-Assay wurde erstmals 1983 von Sedgwick und Holt beschrieben und basiert auf einem modifizierten Sandwich-ELISA^[82]. Ursprünglich wurde es entwickelt, um den Anteil antikörperproduzierender Zellen in einer Population zu ermitteln, doch ist es heute als kostengünstige und vielfältig einsetzbare Methode in der immunologischen Routine etabliert. Dabei steht vor allem der Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten im Vordergrund, u.a. in der HIV-Forschung^[2, 70] und der Entwicklung von Impfstoffen^[63, 83].

Zunächst wird eine geeignete Oberfläche (z.B. eine 96-Loch-Platte, deren Wells mit Nitrocellulose, Polyvinylidendifluorid oder Polystyrol beschichtet sind) mit einem sog. Primärantikörper gegen das nachzuweisende Zytokin beschichtet, das von den zu untersuchenden Lymphozyten nach Antigenstimulation sezerniert werden wird. Obwohl prinzipiell jedes Zytokin detektiert werden kann, verwendet man zur Quantifizierung antigenspezifischer T-Lymphozyten neben TNF- α ^[64] und Granzym B^[77] bevorzugt ein IFN- γ -Assay, da es damit die meisten Erfahrungen gibt^[6].

Nachdem die Platte mit dem Primärantikörper ausreichend lange inkubiert wurde, bspw. mind. 5 Stunden bei 37 °C^[6], wird sie geblockt (z.B. mit BSA [bovines Serumalbumin] oder FCS [fetal calf serum]), um noch freie Proteinbindungsstellen zu besetzen und so unspezifische Hintergrundfärbungen zu vermindern^{[61, S. 112f.][64]}. Danach werden die zu untersuchenden Zellen zugegeben und mit Antigen stimuliert, wobei je nach Autor bis zu 3×10^5 Zellen pro Well^[6] einer 96-Lochplatte empfohlen werden. Das Antigen kann sowohl in nativer Form vorliegen, z.B. EBV-infizierte lymphoblastoide B-Lymphozyten (LCL), oder als freies Peptid, das auch ohne Präsentation durch MHC Moleküle mit seinem spezifischen T-Zellrezeptor interagieren kann^[23]. Der genaue Mechanismus ist bisher allerdings nicht bekannt, so daß auch eine direkte Beladung von MHC-Molekülen mit Peptid vorstellbar ist.

Die so stimulierten Zellen sezernieren daraufhin eine Reihe von Mediatoren, so z.B. die bereits erwähnten Moleküle TNF- α , Granzym B und IFN- γ . Je nach Spezifität des anfangs eingesetzten Primärantikörpers wird das jeweilige Zytokin am Boden der Platte gebunden.

Durch die Zugabe eines enzymgekoppelten Sekundärantikörpers, der an ein weiteres Epitop des nachzuweisenden Zytokins bindet, wird eine Farbreaktion katalysiert, die nach entsprechender Substratzufuhr beginnt und welche die für die Auswertung nötigen Spots erzeugt. Als Enzyme kommen hierbei entweder Meerrettich-Peroxidase oder Alkalische Phosphatase zum Einsatz.

Die Spots werden entweder unter dem Mikroskop manuell oder mittels Elispot-Reader und spezieller Software am Computer gezählt und auf die Einheit *sfu* (spot forming units) pro Million Zellen hochgerechnet. Die Abbildungen 3 (S. 38) und 4 (S. 39) veranschaulichen dies.

Prinzipiell sind auch Zwei-Farben-Elispots möglich, wobei dann in einem Assay simultan zwei Merkmale nachgewiesen werden können^[19].

2.2.2 Vergleich mit anderen Methoden

Verglichen mit anderen Methoden zur Detektion antigenspezifischer T-Lymphozyten fällt die erheblich höhere Sensitivität des Elispot-Assays auf. So kann damit, je nach Autor, 1 unter 3×10^5 ^[31] oder sogar bis zu 1 unter 10^6 ^[61, S. 119] antigenspezifischen Zellen erfaßt werden, während die Nachweisgrenze des ^[51Cr]-Release-Assay in der Größenordnung von nur 1 Zelle unter 100 liegt^[64] und selbst die durchflußzytometrische Bestimmung nach intrazellulärem Zytokinstaining nur 1 von 2×10^3 ^[64] bzw. nur 1 von 5×10^3 ^[31] positiven Zellen erkennt.

Weiterhin findet die Messung bei der Elispot-Technik auf der Ebene einer einzelnen Zelle statt, d.h. jeder Spot entspricht einer aktivierten Zelle und die Stärke der Aktivierung spiegelt sich in der Größe der Spots wider^[33]. Es ist wichtig zu beachten, daß es sich hierbei um einen funktionellen Assay handelt, der auf die Fähigkeit der Zelle angewiesen ist, auf einen dargebotenen Stimulus mit Zytokinausschüttung reagieren zu können. Daher ist es wenig verwunderlich, daß andere Methoden, insbesondere die antigenspezifische Durchflußzytometrie mittels Detektion durch HLA-Tetramere (s. Abschnitt 2.5, S. 24), die unabhängig vom funktionellen Status einer Zelle Phänotyp und/oder Antigenpezifität bestimmen, in der Praxis eine höhere Sensitivität besitzen, jedoch Änderungen der zellulären Aktivierbarkeit nur unzureichend erfassen^[52].

2.2.3 Praktische Durchführung und Protokoll

Um die EBV-spezifische Immunität eines Probanden zum Spendezeitpunkt zu bestimmen, stimulierten wir PBMC dieses Probanden mit bekannten, dem jeweiligen HLA-Typ entsprechenden EBV-Epitopen und quantifizierten die Anzahl Interferon- γ produzierender Zellen mittels Elispot. Die vollständige Liste verwendeter EBV Epitope und deren HLA-Restriktion findet sich in Tabelle 2 (S. 51). Weiterhin erfolgte die Stimulation von Spender-PBMC mit der autologen, EBV-transformierten, lymphoblastoiden Zelllinie (s. Anhang D.3, S. 57). Die LCL eignet sich vor allem deshalb als Stimulator, weil sie alle latenten Gene des EBV exprimiert (s. 1.2.3) und ihre Zellen phänotypisch aktivierten B-Zellen entsprechen und somit potente Antigenpräsentatoren darstellen.

Die bei jedem Reaktionsansatz mitgeführte Positivkontrolle wurde mittels PHA (Phytohaemagglutinin) stimuliert; die Negativkontrolle blieb unbehandelt.

Alle Ansätze wurden sowohl mit $2,5 \times 10^5$ als auch mit $0,625 \times 10^5$ eingesetzten PBMC durchgeführt, um die Sensitivität zu erhöhen und eine möglichst große Bandbreite an Reaktivität quantifizieren zu können. Das Verhältnis von Effektoren (PBMC) zu Stimulatoren (LCL) betrug 5:1 bzw. 1,25:1.

Weiterhin wurden alle Reaktionsansätze doppelt bestimmt.

Das genaue Laborprotokoll findet sich in Anhang D.4 (S. 58).

2.2.4 Auswertung

Alle Elispot-Platten wurden bei der computergestützten Quantifizierung der Spots mit den gleichen Einstellungen gescannt. Offensichtliche Meß- und Pipettierfehler wurden dabei direkt manuell korrigiert.

Bei der anschließenden Berechnung fanden ausschließlich die Mittelwerte aller Doppelbestimmung Verwendung. Zur Berechnung der *sfu* pro 10^6 eingesetzter PBMC betrachteten wir die Spot-Zahl aus den $2,5 \times 10^5$ -Zell-Wells. Lag dieser Wert über 250 Spots pro Well oder wurden entsprechende Wells von der Software des Elispot-Readers als ungültig eingestuft*, so fand die Berechnung aus den Ansätzen mit $0,625 \times 10^5$ PBMC statt. Wurden auch diese Wells von der Software als invalide erkannt, so konnten wir die Reaktivität der Zellen nur noch semiquantitativ als "maximal" ansehen und legten aus Gründen der Praktikabilität für diese Wells einen Wert von 5.000 *sfu* fest.

*Die Auswertung einzelner Wells galt als nicht mehr valide, sobald die Farbsättigung 60% überschritt und somit einzelne Spots nichtmehr voneinander abzugrenzen waren.

Schließlich wurde der Wert der unstimulierten Negativkontrolle, der dem unspezifischen Background entspricht, von allen anderen Reaktionsansätzen abgezogen.

2.3 EBV-Serologie mittels ELISA

Der Enzyme-linked Immunospot Assay dient dem Antigen- oder, wie in der vorliegenden Studie, dem Antikörpernachweis. Das entsprechend komplementäre Antigen wird dazu an eine geeignete Trägersubstanz gebunden und ermöglicht die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen. Ein enzymgekoppelter Sekundärantikörper bindet an diesen Komplex und katalysiert nach Substratzugabe eine Farbreaktion, die photometrisch gemessen wird. Innerhalb eines definierten Bereiches ist die gemessene Extinktion direkt proportional der Menge an vorhandenen Antikörpern.

Das verwendete Kit (Enzygnost, Dade Behring) bedient sich zum Nachweis von Anti-EBV Antikörpern einer Mikrotiterplatte, die mit EA-, VCA- und EBNA-Antigenen beschichtet ist. IgM und IgA werden dabei nur qualitativ, IgG hingegen quantitativ bestimmt.

Das Laborprotokoll entsprach exakt dem in der Herstellerbeschreibung des Kits angegebenen Vorschriften.

2.4 Quantitative *real-time* Polymerase Chain Reaction (PCR)

2.4.1 Historische Entwicklung und Prinzip

Erste Überlegungen zur Amplifikation von DNA mittels DNA-Polymerasen reichen bis in die frühen 1970er Jahre zurück^[50], jedoch entwickelte erst Kary Mullis in den 1980er Jahren das Verfahren der PCR, wie wir es heute kennen. Dabei wird ein Zyklus aus im Wesentlichen drei Schritten mehrmals durchlaufen:

- Durch Erhitzen der DNA auf ca. 90 °C wird diese denaturiert, d.h. die Wasserstoffbrückenbindungen lösen sich und es liegen zwei voneinander getrennte DNA-Einzelstränge vor.
- Zwei synthetische Oligonukleotide, die sog. Primer, hybridisieren nun mit den Einzelsträngen und bilden die Ausgangspunkte für die DNA-Neusynthese. Der sog. forward Primer lagert sich dabei an das 3'-Ende des Plusstranges an, der sog. reverse Primer an das 3'-Ende des Minusstranges. Dieser Schritt läuft, je nach verwendeten Primern, bei ca. 50 °C bis 65 °C ab.

- Die Elongation (auch Primer extension genannt), also die eigentliche Neusynthese von DNA, geht von den Primern aus und wird durch die Taq-Polymerase katalysiert. Dabei handelt es sich um ein hitzestabiles Enzym, das z.B. dem Bakterium *Thermus aquaticus* entstammt und von diesem seinen Namen erhielt. Das Wirkoptimum der Taq-Polymerase liegt bei 70 °C; kurzzeitig ist sie allerdings auch bei bis zu 95 °C stabil, was für die Denaturierung (s.o.) von Bedeutung ist.

Theoretisch verdoppelt sich die Menge an amplifiziertem Genmaterial mit jedem Zyklus, sollte also nach n Zyklen 2^n Kopien entsprechen. Durch die temperaturbedingte Aktivitätsminderung der eingesetzten Taq-Polymerase und letztlich auch durch ein limitiertes Angebot an freien Nukleotiden wird dieser Wert in der Praxis nicht erreicht. Nach Ende eines PCR-Laufes mit 40 Zyklen erwartet man eine Amplifikation des entsprechenden Genabschnittes um den Faktor 10^6 bis 10^7 .

Die DNA-Stränge, die während des ersten Zyklus synthetisiert werden (1. Generation), haben keine definierte Länge und entsprechend auch kein definiertes 5'-Ende. Ab der 2. Generation werden jedoch nur noch Tochterstränge synthetisiert, deren Länge und Peptidsequenz der des zu amplifizierenden Genabschnitts entsprechen.

Durch die Entdeckung hitzestabiler DNA-Polymerasen konnte die PCR automatisiert in sog. Cyclern ablaufen und entwickelte sich so zum wenig arbeitsintensiven Routineverfahren. Die für die DNA-Quantifikation erforderliche Nachbearbeitung des Amplifikats blieb jedoch durch Gelelektrophorese, Hybridisierung, etc. zeitaufwendig und durch Kontaminationsgefahr fehleranfällig. Deshalb wurde nach Methoden gesucht, die Amplifikation und Detektion des PCR-Produktes in einem Ansatz erlauben. Mittlerweile existieren verschiedenste derartige Verfahren, u.a. SYBR[®] Green 1, LightCycler[®]-Sonden (auch Hybridisierung-Sonden genannt), Molecular Beacons und Scorpion Primer (eine Review der genannten Methoden findet sich in [8]).

In dieser Studie fand die sog. TaqMan[®]-PCR Verwendung, die mit Hydrolysisierungs-Sonden arbeitet. Für jedes zu detektierende PCR-Produkt wird dem Ansatz eine Sonde zugegeben, die an den Matrizenstrang hybridisiert. Diese Sonde ist mit zwei Farbstoffen markiert, dem sog. Reporter am 5'-Ende (z.B. VIC oder FAM, beides Fluoreszinderivate) und dem sog. Quencher am 3'-Ende (z.B. TAMRA, einem Rhodaminderivat). Solange die Sonde intakt ist, zwischen Reporter und Quencher also eine gewisse räumliche Nähe herrscht, wird aufgrund des Förster Energietransfers die vom Reporter emittierte Energie strahlungsfrei auf den Quencher übertragen und damit kein Licht abgestrahlt^[18, S. 253f]. Sobald die Sonde

von der Taq-Polymerase hydrolysiert wird, trennen sich Reporter und Quencher, so daß die nach Anregung mittels Laserlicht entstehende Fluoreszenz detektiert werden kann. Diese ist dabei proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produkts und wird vom Cycler nach jedem Zyklus gemessen.

Durch das Mitführen eines internen Standards wird die Quantifikation der zu Beginn im Ansatz enthaltenen DNA-Kopien möglich. Dazu wird der sog. C_t -Wert ermittelt, der die Zykluszahl anzeigt, ab dem ein exponentielles Ansteigen des Reporter-Signales und damit der Konzentration an PCR-Amplifikat beobachtet wird. Der C_t -Wert verhält sich daher umgekehrt proportional zur Menge ursprünglich in der Probe vorhandener Ziel-DNA. Die absolute Anzahl an Startkopien wird vom System anhand einer Standardkurve errechnet. Vor dem exponentiellen Anstieg des Reporter-Signals ist lediglich ein unspezifisches Grundrauschen detektierbar, das als Baseline bezeichnet wird.

Neben der konventionellen Multiplex-PCR, also der Koamplifikation verschiedener DNA-Sequenzen in einem Reaktionsgefäß und Durchgang, ist auch die TaqMan-PCR als Multiplex-Ansatz möglich. Dabei werden, wie in unserem Fall, neben verschiedenen forward und reverse Primern auch unterschiedlich markierte Sonden verwendet (s.o.).

2.4.2 DNA-Isolation aus PBMC und Plasma

Die Extraktion von DNA erfolgte aus 5×10^6 tiefgefrorenen PBMC bzw. 2 ml Plasma (s. 2.1.2, S. 16). Dazu wurde das Probenmaterial in einem guanidinisothiocyanthaltigen Puffer enzymatisch lysiert und die freigesetzte DNA anschließend an einer kieselsäurehaltigen Membran adsorbiert. Durch zwei Waschvorgänge wurde die isolierte DNA von Proteinen, z.B. DNAsen, und anderen Kontaminationen gereinigt.

Das Laborprotokoll entsprach exakt dem in der Herstellerbeschreibung des verwendeten Kits (QIAamp DNA Blood Mini, Qiagen) aufgeführten Vorgaben.

2.4.3 Praktische Durchführung und Protokoll

Zur Quantifikation der virologischen Parameter Virämie und Viruslast, die der Anzahl EBV-Kopien pro ml Plasma bzw. pro μg PBMC DNA entsprechen, bedienen wir uns einer in unserer Arbeitsgruppe etablierten und veröffentlichten Methode^[42, 65, 92]. Zum Nachweis von EBV-DNA wird ein Teil des EBNA1-Gens amplifiziert. Simultan dazu erfolgt im gleichen Ansatz die Koamplifikation einer Sequenz des menschlichen CRP-Gens. Letzteres dient dabei der Qualitätskontrolle der zuvor durchgeführten DNA-Extraktion; weiterhin stellt die

Menge an vorhandener CRP-DNA ein Maß für die Gesamtmenge an tatsächlich vorhandener, amplifizierbarer genomischer DNA dar.

Um eine Quantifizierung zu ermöglichen, wurde bei jedem Ansatz eine Standardreihe mitgeführt. Diese bestand aus semilogarithmischen Verdünnungen bekannter Konzentrationen der Namalwa-Zelllinie ($10^{1,5}$ bis $10^{4,5}$ pg). Namalwa-Zellen enthalten zwei Kopien des CRP single copy gene sowie zwei in die chromosomale DNA integrierte Kopien des EBV-Genoms auf Chromosom 1^[55].

Für jede Probe wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt; ferner trug jede Probenplatte am Ende vier Negativkontrollen (sog. no template controls, NTC), die *Aqua dest.* enthielten.

Das von uns benutzte Protokoll in Anhang D.5 (S. 59) entspricht exakt der von Jabs et al. in [42] publizierten Methode.

2.4.4 Auswertung

Da die Standardkurve durch Messung von Namalwa-DNA zustande kam, war eine Umrechnung aller Meßwerte in genomische DNA notwendig. Diese wurde wie folgt durchgeführt:

2.4.4.1 PBMC-Proben

$$C = \frac{A_{EBV}}{A_{CRP} \times 3,3} \times 10^6 \quad (1)$$

C EBV-DNA-Konzentration [EBV-Kopien pro μ g PBMC-DNA]

A_{EBV} Menge an EBNA1-spezifischer DNA [pg Namalwa-DNA]

A_{CRP} Menge an CRP-spezifischer DNA [pg Namalwa-DNA]

3,3 Konversionsfaktor für single copy genes [pg DNA pro copy]

10⁶ Umrechnungsfaktor von pg in μ g

2.4.4.2 Plasma-Proben

$$N = \frac{A_{EBV}}{3,3} \times 10 \quad (2)$$

N Anzahl EBV-Kopien pro ml Plasma

A_{EBV} Menge an EBNA1-spezifischer DNA [pg Namalwa-DNA]

10 Faktor zur Umrechnung des Proben- und Elutionsvolumens auf
1ml Plasma

3,3 Konversionsfaktor für single copy genes [pg DNA pro copy]

2.4.4.3 Genomische DNA pro ml Plasma

$$C = A_{CRP} \times 10 \quad (3)$$

C DNA-Konzentration pro ml Plasma

A_{CRP} Menge CRP-spezifischer DNA [pg Namalwa-DNA]

10 Faktor zur Umrechnung des Proben- und Elutionsvolumens auf
1ml Plasma

2.4.4.4 EBV-Reaktivierung Eine EBV-Reaktivierung wurde in jedem Fall angenommen, sobald eine detektierbare Virämie vorlag. Detektierbare PBMC Viruslast führte nur dann zur Diagnose EBV-Reaktivierung, wenn offensichtliche Spitzenwerte größer waren als die Summe aus arithmetischem Mittel und dreifacher Standardabweichung der restlichen Werte oder wenn Probanden bei ansonsten nicht nachweisbarer Viruslast einzelne Episoden detektierbarer Viruslast zeigten.

2.5 Durchflußzytometrie (FACS)

2.5.1 Entwicklung und Anwendung

2.5.1.1 Methodisches Prinzip und Theorie Der Grundgedanke der Durchflußzytometrie, d.h. die Analyse einzelner Zellen in einem laminaren Flüssigkeitsstrom, geht auf Wallace Coulter zurück, der in den frühen 1950er Jahren erstmals ein derartiges Verfahren beschrieb^[66, S. 1].

Ursprünglich war mit dem Durchflußzytometer nur die Messung des sog. *forward scatter (FSC)* und des sog. *side scatter (SSC)* möglich^[44]. Die zu untersuchenden Zellen laufen dabei, wie oben erwähnt, nacheinander in einem laminaren Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbei, der jede einzelne Zelle "durchleuchtet". Das dabei in Längsrichtung (0,5 – 10°)

gestreute Licht, der FSC, ist dabei proportional der Zellgröße. Durch in der Zelle enthaltene Partikel, u.a. den Zellkern, wird Licht auch in rechtwinkliger Richtung (90°) gestreut, was dem SSC entspricht. Dieser steigt daher mit der Granularität der untersuchten Zelle.

Die Einführung von fluoreszenzmarkierten, monoklonalen Antikörpern in die Durchflußzytometrie erlaubte es, neben den eher unspezifischen Parametern FSC und SSC zusätzliche Informationen zu gewinnen. Dazu werden die Zellen vor der eigentlichen Messung mit einem oder mehreren solcher Antikörper inkubiert (Staining), die dann an ihre Antigene auf der Zelloberfläche binden. Im Durchflußzytometer befindet sich ein komplexes System aus Lasern und Detektoren, das es ermöglicht, die auf jeder einzelnen Zelle gebundenen Antikörper zur Fluoreszenz anzuregen und diese anschließend zu messen. Je mehr verschiedene Fluoreszenzen simultan zum Einsatz kommen können, desto größer ist naturgemäß die Anzahl gleichzeitig bestimmbarer Zelleigenschaften, z.B. Oberflächenantigene oder spezielle intrazytoplasmatische Merkmale. Mittlerweile existieren Geräte, die eine Zelle in bis zu zwölf "Dimensionen" vermessen.

Der Ausdruck FACS, abgekürzt für fluorescence activated cell sorting, bezieht sich dabei nicht nur auf die Zellanalyse mittels Fluoreszenz, sondern auch auf das sog. Sorting, also das Abtrennen und Aussortieren homogener Subpopulationen eines Samples.

2.5.1.2 Datengewinnung und Analyse Da sich die Emissionsspektren der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe in durchaus nicht geringem Maße überlappen können, ist vor jeder Mehrfarbmessung eine Kompensation durchzuführen. Dabei wird festgestellt, wie weit eine definiert markierte Zellpopulation in einen anderen sog. Meßkanal hineinstrahlt, d.h. wie groß die Überlappung zweier Farbstoffe ist. Dieses Ergebnis wird dann für eine mathematische Korrektur verwendet.

Einzelne Subpopulationen eines Samples werden durch das sog. Gating bestimmt und quantifiziert. Durch die Software des Durchflußzytometers werden jeder Zelle alle gemessenen Attribute zugeordnet. Durch die sequentielle Auswahl geeigneter Gates, die von der wissenschaftlichen Fragestellung abhängen, werden schließlich die interessanten Populationen ermittelt. So kann man bspw. aus einem Sample mit Vollblut die Population der Lymphozyten mittels FSC und SSC gaten und damit der weiteren Analyse zugänglich machen. Aus den Lymphozyten lassen sich dann z.B. alle $CD8^+$ Zellen ermitteln und in einem weiteren Gate betrachten, in dem dann z.B. nur HLA-Tetramer positive Zellen quantifiziert werden.

Einzelne Gates lassen sich auf unterschiedliche Weise darstellen. Am gängigsten ist der zweidimensionale Dotplot, bei dem auf der X- und der Y-Achse zwei Fluoreszenzintensitäten

aufgetragen werden. Dieser Graph wird durch ein Kreuz in vier Quadranten unterteilt; doppelt negative Zellen finden sich dabei im linken unteren, doppelt positive Zellen im rechten oberen Quadranten. Neben dem Dotplot ist auch die Darstellung einzelner Gates im eindimensionalen Histogrammplot möglich. Auf der X-Achse findet sich dabei die Fluoreszenz; die Y-Achse gibt die Zellzahl wieder. Dreidimensionale Modelle sind ebenso möglich, jedoch weitaus weniger gebräuchlich.

2.5.1.3 Aussagekraft bzw. Einschränkungen der Methode Ähnlich dem Elispot-Assay handelt es sich um eine Untersuchung auf Ebene der einzelnen Zelle. Der herausragende Unterschied ist allerdings, daß es sich bei der Durchflußzytometrie um eine reine Phänotypanalyse handelt, d.h. daß der funktionelle Status von Zellen nicht ohne weiteres erfaßt werden kann.* Im Rahmen der vorliegenden Studie ist dies insofern von Bedeutung, als daß die EBV-spezifische Immunität der Probanden somit einerseits mit einem funktionellen Ansatz bestimmt wurde (Elispot) als auch andererseits durch eine reine Phänotypanalyse mittels HLA-Tetrameren.

2.5.2 Probenpräparation und Durchführung

Die durchflußzytometrische Analyse EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen der Probanden zu den jeweiligen Spendeterminen erfolgte nach Abschluß des Beobachtungszeitraumes aus den dafür bei $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ tiefgefrorenen Proben. Diese wurden dazu mit einem monoklonalen Anti-CD8-Antikörper gefärbt, der an ein PE-Cy5-Konjugat (TriColor) gekoppelt ist. Die EBV-spezifischen HLA-Tetramere sind PE-markiert (s. Abschnitt 2.6, S. 27). Zusätzlich wurde für jedes Tetramer eine Färbung mit einem der folgenden, FITC-markierten Antikörper durchgeführt: CD27, CD28, CD49d, CD45RA, CD45RO, CD69, CD103, CXCR1. Das ausführliche Laborprotokoll findet sich in Anhang D.6 (S. 59). Die Messung der Proben erfolgte an einem Cytomics FC500, das die Detektion von bis zu fünf Fluoreszenzen gleichzeitig erlaubt.

Vor der Messung der an einem bestimmten Termin gewonnenen PBMC fand eine vollständige Kompensation statt. Dabei wurde zuerst mit ungefärbten Zellen die Spannungsregelung der einzelnen Kanäle des Gerätes überprüft. Danach wurde jeder der drei verwendete

*Es existieren jedoch einige funktionelle Analysemöglichkeiten in der Durchflußzytometrie, z.B. intrazytoplasmatisch vorhandenes IFN- γ durch spezielle Behandlung mit Antikörpern zu markieren und so im FACS sichtbar zu machen^[51]. Ebenso sind Proliferationsuntersuchungen möglich, die völlig unabhängig von der Betrachtung des zellulären Phänotyps stattfinden können^[62].

ten Kanäle gegen die jeweils anderen beiden mittels FITC-, PE- bzw. TriColor-markierten CD8⁺ Zellen kompensiert.

Jede einzelne Messung zielte auf die Analyse von 10⁵ Zellen ab. Da pro Tetramer acht Samples mit jeweils einem anderen FITC-markierten "Phänotyp"-Antikörper gemessen wurden, standen für die Quantifizierung CD8⁺HLA_{Tet}⁺ Zellen theoretisch 8 × 10⁵ Zellen zur Verfügung.

2.5.3 Analyse und statistische Auswertung

Da während der Messung nur ein orientierendes Gating erfolgen konnte, bedienten wir uns zur endgültigen Analyse und Auswertung der Proben des Programms FlowJo 7.1. Die Lymphozytenpopulation wurde im Dotplot mittels FSC und SSC bestimmt und ein entsprechendes Gate erstellt. Alle weiteren Betrachtungen fanden nach Gating der CD8⁺ Population im Histogrammplot statt. Darin erfolgte die Quantifikation von HLA_{Tet}⁺ Zellen sowie von HLA_{Tet}⁺ Zellen, die zusätzlich noch durch einen der o.g. FITC-markierten "Phänotyp"-Antikörper als positiv gewertet wurden.

2.6 HLA-Tetramer Synthese

Die Synthese von HLA-Tetrameren fand in der Arbeitsgruppe von PD Dr. med. Wolfram J. Jabs statt. Die zugrundeliegende Methodik wird daher nur in Grundzügen beschrieben und wurde erstmals 1996 von Altman et al. publiziert^[3].

HLA-Tetramere sind lösliche Komplexe aus vier HLA-Molekülen, die spezifisch an T-Zellrezeptoren binden und mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen sind. Dadurch lassen sich antigenspezifische T-Zellen bspw. im Durchflußzytometer quantitativ bestimmen (s. Abschnitt 2.5, S. 24).

Ausgangspunkt der Herstellung von HLA-Tetrameren ist die Synthese von β₂-Mikroglobulin und den sog. heavy chains von HLA-A2 bzw. -B8 Molekülen in bestimmten Stämmen des Bakteriums *E. coli* nach Transformation mit entsprechender DNA. Die so gewonnenen Bestandteile, d.h. β₂-Mikroglobulin und die heavy chains, werden nach Zugabe des eigentlichen Epitop-Peptids, z.B. FLRGRAYGL bei einem HLA-B8 Tetramer (s. Tab. 2, S. 51), zu Monomeren gefaltet (sog. refolding) und anschließend biotinyliert. Nach mehreren Waschschritten (Gelfiltration, Ionenaustausch) wird die Synthese der Tetramere aus den Monomerbestandteilen durch Zugabe von Streptavidin induziert, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff PE gekoppelt ist.

3 Ergebnisse

3.1 EBV-Reaktivierungen in der Studienpopulation

3.1.1 EBV-Serologie

Die qualitative und quantitative EBV-Serodiagnostik mittels ELISA (s. 2.3, S. 20) zeigte bei allen Studienteilnehmern den typischen Befund einer stattgehabten EBV-Infektion, d.h. nachweisbare Anti-EBV IgG-Antikörper. Lediglich bei einem Probanden (Nr. 14, s. Abb. 13, S. 48) konnte ein IgG-Titer >650 U/ml bei gleichzeitig detektierbarem IgM gemessen werden, was auf eine EBV-Reaktivierung hinweist. Parallel dazu bestätigte in diesem Fall die quantitative *real-time* PCR die Virusreaktivierung durch den Nachweis einer zeitgleich vorliegenden Virämie.

Die serologische Diagnose einer EBV-Reaktivierung mit einem IgG-Titer >650 U/ml bei gleichzeitigem Vorhandensein detektierbarer IgA-Antikörper konnte bei keinem Probanden gestellt werden.

3.1.2 Quantitative *real-time* PCR

Im Gegensatz zur EBV-Serologie ermöglichte der direkte Nachweis virologischer Parameter mittels quantitativer *real-time* PCR (s. 2.4, S. 20) die Detektion von Virämie und/oder signifikanten* Veränderungen der PBMC-Viruslast im peripheren Blut bei insgesamt 12 der 14 Probanden (s. Tabelle 1, S. 50). Bei neun Individuen fand sich hierbei mindestens eine virämische Episode; sieben Probanden zeigten signifikante Schwankungen der PBMC-Viruslast; bei vier Probanden war beides zu beobachten.

3.2 Verlauf der EBV-spezifischen Immunität – Elispot

Wir quantifizierten die EBV-spezifische Immunität zu jedem Untersuchungszeitpunkt mittels Elispot. Die EBV-spezifische “Gesamtimmunität” maßen wir durch Stimulation von Spender-PBMC mit Zellen der autologen LCL; weiterhin wurde die Reaktivität der PBMC gegenüber Peptiden erfaßt, die einzelnen EBV-Epitopen entsprechen (s. 2.2, S. 17 und Tabelle 2, S. 51).

*s. 2.4.4.4, S. 24

3.2.1 Reaktivität gegenüber der autologen LCL

Von 14 Probanden zeigten neun im Verlauf der Untersuchung erheblich schwankende Frequenzen LCL-spezifischer T-Zellen; bei acht dieser Probanden konnte mindestens ein Mal eine EBV-Reaktivierung nach o.g. Kriterien beobachtet werden (s.a. Tabelle 1, S. 50). Im zeitlichen Zusammenhang gesehen traten dabei Episoden viraler Replikation (i.S.v. Plasma-virämie und/oder ansteigender PBCM-Viruslast) fast ausschließlich bei im Elispot deutlich verminderter oder fallender LCL-spezifischer IFN- γ -Produktion auf. Siehe hierzu die Abbildungen 1 und 2 (ab S. 30) sowie die Abbildungen in Anhang A.2 ab S. 40 und insbesondere:

- Abb. 5, S. 40
- Abb. 6, S. 41
- Abb. 7, S. 42
- Abb. 13, S. 48

Nichtsdestotrotz konnten allerdings auch einige EBV-Reaktivierungen scheinbar unabhängig von der im Elispot quantifizierten Anzahl LCL-spezifischer PBMC beobachtet werden (s. Abbildung 8, S. 43 und Abbildung 10, S. 45); eine verminderte IFN- γ -Sekretion führte auch nicht zwangsläufig zur EBV-Reaktivierung.

Die Auswertung der bei jeder Untersuchung mitgeführten Positivkontrollen ergab regelmäßig Werte > 250 *sfu* pro einer Million eingesetzter Zellen; in den meisten Fällen sogar Werte > 1.000 *sfu* pro einer Million Zellen. Der Verlauf der PHA-stimulierten IFN- γ -Antwort verlief dabei nicht parallel zur Reaktivität gegenüber autologen LCL, was eine unspezifische, allgemeine T-Zellaktivierung unwahrscheinlich macht.

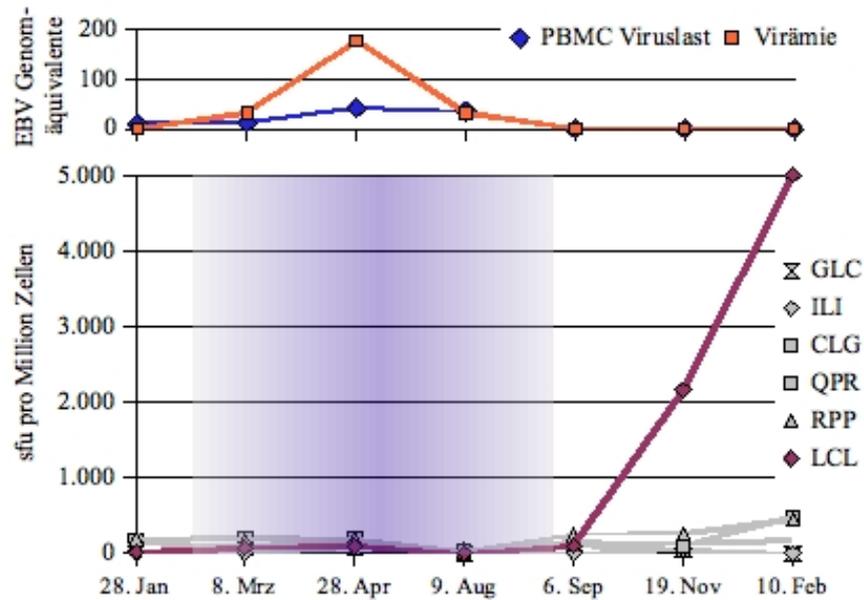


Abbildung 1: Proband 9. Darstellung des zeitlichen Verlaufs von PBMC Viruslast und Plasmavirämie im oberen Teil des Diagramms (ausgedrückt als EBV-Genomäquivalente pro μg PBMC DNA bzw. EBV-Genomäquivalente pro ml Plasma). Eine EBV-Reaktivierung wurde diagnostiziert, sofern a) eine detektierbare Virämie vorlag und/oder b) die PBMC Viruslast zu einem Zeitpunkt höher lag als die Summe aus der dreifachen Standardabweichung und dem Mittelwert der restlichen Werte (s. auch Abschnitt 2.4.4.4, S. 24). Im unteren Teil des Diagramms sind die Verläufe der LCL- und peptidspezifischen T-Zellreaktivitäten als *spot forming units* pro Million eingesetzter Zellen aufgetragen (s. auch Abschnitt 2.2.4, S. 19). Zur Veranschaulichung sind die Zeitpunkte einer diagnostizierten EBV-Reaktivierung bläulich hinterlegt. Die Diagnose einer EBV-Reaktivierung konnte an drei Terminen aufgrund der Detektion einer Virämie gestellt werden. Die LCL-spezifische T-Zellreaktivität zu diesen Zeitpunkten war deutlich supprimiert. Kurz nach der letzten EBV-Reaktivierung kam es zu einem deutlichen Anstieg der LCL-spezifischen IFN- γ Sekretion bis auf Maximalwerte.

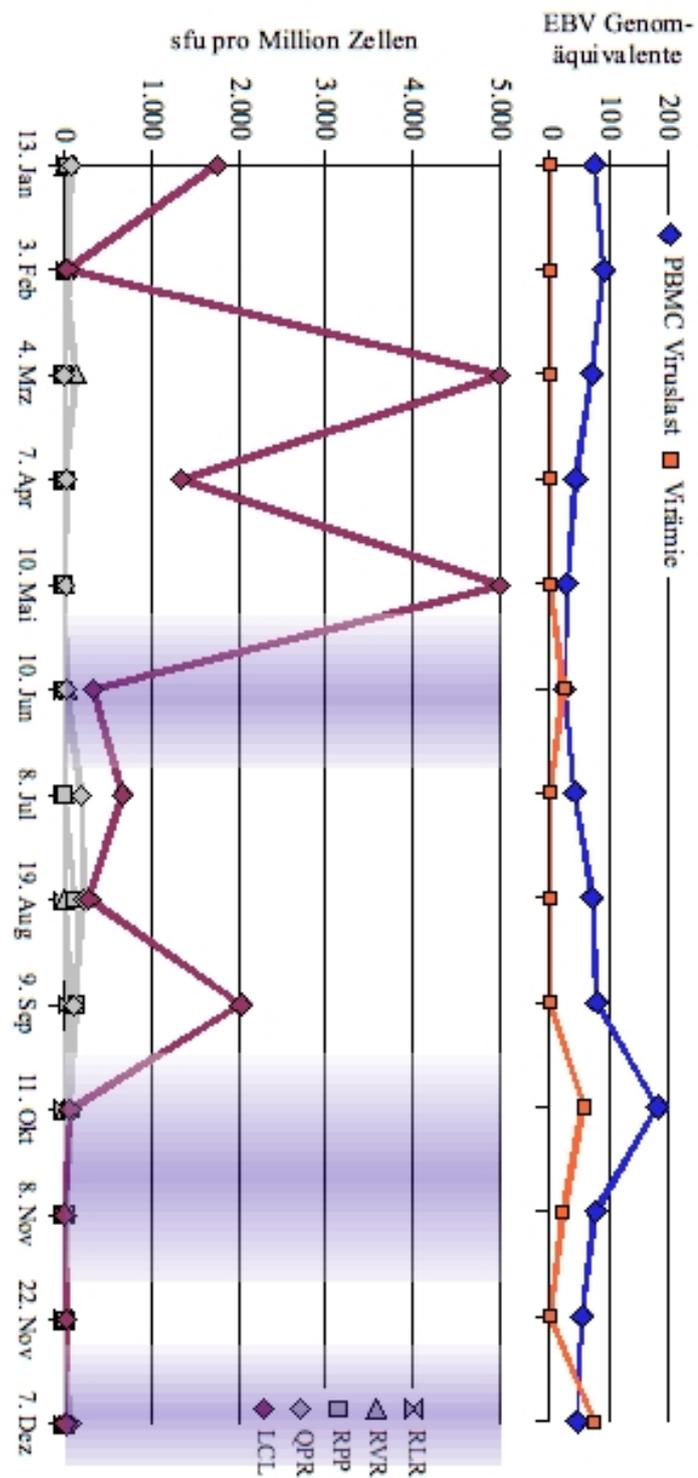


Abbildung 2: Proband 12. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Vier Episoden von EBV-Reaktivierungen. Auffallend ist zum einen die stark fluktuierende LCL-spezifische T-Zellantwort und zum anderen die Tatsache, daß diese zu allen detektierten EBV-Reaktivierungen supprimiert ist.

3.2.2 Reaktivität gegenüber einzelnen viralen Epitopen

Verglichen mit den großen Amplituden der LCL-spezifischen Reaktivität bot sich bei der Analyse der einzelnen, d.h. peptidspezifischen, CD8⁺ T-Zellfrequenzen im IFN- γ Elispot ein deutlich stabileres Bild. So konnten lediglich bei sechs von 14 Probanden deutliche Schwankungen einzelner epitopspezifischer T-Zellfrequenzen beobachtet werden. Insbesondere waren maximale Anstiege beinahe ausschließlich während Phasen viraler Replikation zu verzeichnen, was im Kontrast zu den supprimierten LCL-spezifischen Reaktivitäten während solcher Episoden steht.

3.3 Quantifikation EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen – FACS*

Die Quantifikation EBV-spezifischer T-Zellen mittels Durchflußzytometrie wurde bei sieben HLA-A2 und/oder -B7 positiven Probanden durchgeführt (s. Kapitel 2.5, 24). Hierbei ergaben sich über die Zeit relativ stabile epitopspezifische CD8⁺ T-Zellfrequenzen, welche die Schwankungsbreite der epitopspezifischen T-Zellreaktivität, die im Elispot nachzuweisen war, nicht widerspiegelten. Abbildung 14, S. 49 zeigt exemplarisch Daten der FACS-Analyse von Proband 5. Dieser wies CD8⁺RAK⁺ T-Zellfrequenzen zwischen 0,59% und 1,33% auf, während die analogen Ergebnisse der Elispot-Untersuchung zwischen praktisch nicht detektierbarer Reaktivität und 738 sfu pro Million Zellen lagen.

*In diesem Zusammenhang war auch, wie in Abschnitt 2.5.2, S. 26 beschrieben, vorgesehen, antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen mittels verschiedener Antikörper phänotypisch zu analysieren. Auf die detaillierte Analyse dieser Ergebnisse wurde allerdings verzichtet, da die geringe Anzahl CD8⁺ T-Lymphozyten, die spezifisch für nur jeweils ein EBV-Epitop waren, bei der beschränkten Gesamtmenge an Zellmaterial (8×10^5 Zellen pro HLA-Tetramer und damit 1×10^5 Zellen pro Oberflächenantigen) keine validen Aussagen über die Prävalenz bestimmter, z.T. seltener Oberflächenmarker auf diesen Zellen erlaubt hätte.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ausgangspunkt der vorgelegten Arbeit war die Hypothese, daß einerseits asymptomatische EBV-Reaktivierungen durch eine passagere Immunsuppression ermöglicht werden und andererseits es im Anschluß an eine solche Reaktivierung durch Stimulation des Immunsystems, analog zur Boosterung der humoralen Immunität nach einer Impfung, zur Expansion des EBV-spezifischen T-Zellpools kommen könnte^[5]. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, daß die EBV-spezifische Immunität bei den meisten Virusträgern keinen statischen Zustand darstellt, sondern im Laufe der Zeit deutlichen Veränderungen unterliegt.

Der erste Teil der Arbeitshypothese wird durch die Ergebnisse der Elispot-Untersuchungen untermauert: EB-virale Reaktivierungen traten bevorzugt dann auf, wenn die LCL-spezifische Reaktivität der Spender-PBMC zum Untersuchungszeitpunkt *in vitro* gering war. Die “paradoxe” Antwort gegenüber einzelnen viralen Epitopen, d.h. die vermehrte Reaktivität im peptidspezifischen IFN- γ -Elispot während EBV-Reaktivierungen, scheint eher den zweiten Teil der Hypothese zu stützen.

Die Quantifizierung EBV-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten mittels HLA-Tetrameren in der Durchflußzytometrie spiegelte den im IFN- γ -Elispot beobachteten, variablen “Reaktivitätsverlauf” nicht wider. Es konnte kein Zusammenhang mit den diagnostizierten EBV-Reaktivierungen hergestellt werden.

4.2 Kritische Würdigung der verwendeten Methoden und Meßverfahren

4.2.1 Diagnostik von EBV-Reaktivierungen

Zur Untersuchung des EB-viralen Lebenszyklus *in vivo* steht eine Reihe von Untersuchungsmethoden zur Verfügung: Transformationsassays von Nabelschnurblut (durch Zugabe von Viruspartikeln, die mittels Rachenspülungen gewonnen wurden, sog. throat washings)^[74, 93] und das spontane Auswachsen von lymphoblastoiden Zellen in einer PBMC-Zellkultur^[93] sind dabei nur noch von historischem Interesse. Mittels serologischer Methoden läßt sich zum einen der Infektionsstatus eines Individuums bestimmen, zum anderen ist es prinzipiell möglich, EBV-Reaktivierungen zu diagnostizieren (s. 2.3, S. 20)^[40, 71, 80], wenngleich auch mit eher zweifelhafter Sensitivität^[65]. Darüberhinaus ist zu bedenken, daß serologische Marker, sprich: ansteigende oder erhöhte Antikörper-Titer, prinzipbedingt dem antigenen Stimulus nachfolgen und auch nach Beseitigung des Antigens nicht sofort wieder auf Nor-

malwerte abfallen. Als elegante und vergleichsweise exakte Methode hat sich die Quantifizierung virologischer Parameter, d.h. Plasmavirämie und Viruslast von PBMCs, mittels PCR erwiesen (s. 2.4, S. 20)^[42, 65, 92], die auch in der vorliegenden Studie die Grundlage der EBV-Reaktivierungsdiagnostik bildete.

4.2.2 Quantifizierung der EBV-spezifischen Immunität

Um die EBV-spezifische Immunität der Probanden zum jeweiligen Entnahmezeitpunkt der Blutproben zu erfassen, bedienten wir uns zweier Methoden, die scheinbar diskrepante Ergebnisse lieferten: Elispot und Durchflußzytometrie (s. Kapitel 2.2 bzw. 2.5).

Letzteres Verfahren hat sich bei der Quantifikation antigenspezifischer T-Lymphozyten in zahllosen Publikationen bewährt^[29, 84, 88]. Wie bereits im Methodik-Teil beschrieben, handelt es sich dabei um eine Analysemethode, die lediglich durch die Messung von Oberflächenantigenen Rückschlüsse auf die tatsächliche Effektorfunktion, also die “Aktivierbarkeit” der untersuchten Zellen erlaubt. (Die theoretisch vorhandene Möglichkeit, intrazytoplasmatisch vorhandenes IFN- γ mit Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren und so der durchflußzytometrischen Messung zugänglich zu machen^[7, 51, 59], fand in der vorliegenden Studie aufgrund der, im Vergleich insbesondere zum ELispot-Assay, aufwendigeren und damit fehleranfälligeren Handhabung, keine Anwendung.) Insofern spiegeln die Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen lediglich die numerische Größe des jeweiligen antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellpools zum Untersuchungszeitpunkt wider.

Im Gegensatz dazu wird im Elispot, wenn auch indirekt durch Messung der IFN- γ -Sekretion, die funktionelle Kapazität stimulierter Zellen erfaßt. In dieser Hinsicht erscheint es plausibel, daß die tatsächliche Zahl bzw. Frequenz der untersuchten EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen während asymptomatischer EBV-Reaktivierungen vergleichsweise geringen Schwankungen unterliegt, ihre funktionelle Leistung allerdings beträchtlich variieren kann. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen der virologischen Untersuchungen, d.h. dem bevorzugten Auftreten von EBV-Reaktivierungen während “supprimierten” LCL-spezifischen IFN- γ -Antworten im Elispot, scheint letzteres dem Begriff der EBV-spezifischen “Immunität” als Gesamtleistung des entsprechenden T-Zellpools eher Rechnung zu tragen als dessen schiere Größe.

4.2.3 Interpretation der Ergebnisse

Wie in Kapitel 2.2.3 (S. 19) bereits dargelegt, stellt die autologe LCL ein ideales Antigen dar, das zumindest theoretisch einen Großteil der EBV-spezifischen T-Zellen “ansprechen” sollte. Ein insofern überraschendes Ergebnis war die Tatsache, daß die im Elispot gemessenen Frequenzen epitopspezifischer T-Zellen in der Summe nicht der Frequenz LCL-spezifischer T-Zellen entsprachen. Dies wirft unmittelbar die Frage nach dem Ablauf der LCL-spezifischen T-Zellreaktivität auf, die bisher nicht dezidiert untersucht ist.

Die Charakterisierung der EBV-spezifischen Immunantwort wurde lange Zeit im wesentlichen durch die Untersuchung von CD8⁺ T-Lymphozyten getragen, deren Frequenz, Phänotyp und Effektorfunktion sowohl während der Primär- als auch während der chronischen Infektion mittlerweile gut charakterisiert sind^[36, 69, 86]. Erst in den letzten Jahren gab es größere Fortschritte bei der Entdeckung von MHC-II-restringierten EBV-Epitopen und die Möglichkeit, neben den bereits länger verfügbaren MHC-I- auch MHC-II-Tetramere zu synthetisieren^[4, 67, 94]. Dadurch mehrten sich u.a. Hinweise darauf, daß CD4⁺ T-Zellen direkt zytotoxisch wirken können und evtl. bei der Kontrolle von sowohl EBV-Infektion als auch -Persistenz eine wichtige Rolle innehaben^[1, 30].

Da in der vorliegenden Arbeit bei der Quantifizierung der LCL-spezifischen T-Zellreaktivität keine getrennte Untersuchung der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozytenpopulation erfolgte (bspw. durch Depletion der jeweils anderen Population im entsprechenden Ansatz), kann keine Aussage darüber getroffen werden, welchen Anteil CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen an der Gesamtreaktivität haben. Darüberhinaus war die Untersuchung der einzelnen EBV-spezifischen Antigene auf solche beschränkt, die MHC-I-restringiert sind, d.h. nur von CD8⁺ T-Lymphozyten erkannt werden. Daher ist zu vermuten, daß der Anteil, den die CD4⁺ T-Zellpopulation an der Gesamtreaktivität gegenüber der autologen LCL (zumindest *in vitro*) hat, bisher unterschätzt wurde. Dies wäre auch ein Indiz dafür, daß die Rolle dieser sog. T-Helferzellen bei der Aufrechterhaltung der virus-host balance größer ist als bisher angenommen.

In diesem Zusammenhang könnte die beobachtete Diskrepanz zwischen supprimierter LCL-Antwort und eher gesteigerter Reaktivität gegenüber einzelnen viralen Epitopen während einer EBV-Reaktivierung auch auf verschiedene “Reaktionskinetiken” von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hindeuten.

Außerdem wäre es denkbar, daß die Antigenität der LCL im zeitlichen Verlauf natürlichen Schwankungen unterliegt^[85]. Das könnte zum Einen die beobachteten, ausgeprägten

Unterschiede in der LCL-Reaktivität bei den Probanden erklären, wenngleich der Zusammenhang mit den beobachteten EBV-Reaktivierungen dies sehr unwahrscheinlich macht. Zum Anderen wäre bei inkonstanter Antigenität der LCL die T-Zellreaktivität ihr gegenüber nicht mehr nur die Summe der einzelnen epitopspezifischen T-Zellantworten.

Weiterhin ist es vorstellbar, daß neben den in dieser Arbeit generell nicht berücksichtigten MHC-II-restringierten Epitopen noch weitere immundominante, MHC-I-restringierte Epitope existieren, die in der Literatur noch nicht bekannt sind. Allerdings ist dies bei 14 Studienteilnehmern und einer entsprechend großen Vielfalt an HLA-Typen eher unwahrscheinlich.

4.2.4 Ausblick

Weitere Arbeiten sind notwendig, um die in der vorliegenden Studie aufgeworfenen Fragen und Probleme näher zu untersuchen. Insbesondere die Reaktion von PBMC bzw. T-Lymphozyten mit der autologen LCL *in vitro* bedarf näherer Charakterisierung. Dabei ist u.a. zu klären, welche Rolle den CD4⁺ bzw. den CD8⁺ T-Zellen zukommt. Wie bereits oben dargelegt, ist davon auszugehen, daß der Stellenwert von CD4⁺ T-Zellen in diesem Zusammenhang bislang unterschätzt wurde. Sollte sich dies *in vitro* bestätigen, wäre das ein wichtiges Indiz dafür, daß die Bedeutung dieser Zellen bei der Kontrolle der EBV-Infektion *in vivo* größer ist als bisher angenommen.

Die beobachtete Diskrepanz zwischen gemessenen Zahlen EBV-spezifischer T-Lymphozyten und deren funktionaler Kapazität bedarf weiterer Untersuchungen. Dazu sind Phänotypenanalysen EBV-spezifischer T-Zellen sowohl während der viralen Latenz als auch während EBV-Reaktivierungen erforderlich, die Veränderungen von Oberflächenmolekülen und Aktivierungsmarkern untersuchen. Dies könnte neue Blickwinkel zum einen auf die EBV-spezifische Immunität und zum anderen auf allgemeine immunologische Mechanismen eröffnen.

Schließlich wären Untersuchungen wünschenswert, die EBV-Reaktivierungen und die ggf. in deren Gefolge auftretenden Veränderungen des T-Zellpools (Größe, Zusammensetzung, Phänotyp, Effektorfunktion) in engeren Zeitabständen messen. Wir gehen davon aus, daß die Zeitfenster von transienter Replikation und nachfolgend detektierbarer Virämie und PBMC Viruslast nur sehr klein sind, da das EBV bei Gesunden unter strenger Kontrolle des Immunsystems steht. Daher würden engmaschigere, d.h. wöchentliche oder sogar tägliche Untersuchungen ein realistischeres Bild von EBV-Reaktivierungen bei Gesunden liefern.

5 Zusammenfassung

Das Epstein-Barr Virus gehört zur Familie der Herpesviren. Nach der Primärinfektion, die entweder asymptomatisch bzw. subklinisch oder als akute infektiöse Mononukleose verläuft, persistiert das EBV lebenslang im Organismus. Es weist eine Durchseuchungsrate von $> 95\%$ auf und ist extrem B-lymphotrop. Die symptomlose Persistenz des Virus wird gelegentlich von replikativen Phasen mit transientem Vorhandensein von Viruspartikeln im Blut unterbrochen. Es konnte bereits durch mehrere Studien gezeigt werden, daß bei gesunden Probanden EBV-Reaktivierungen auftreten und daß es durch "Streß" im weitesten Sinne zu einer Zunahme der viralen Aktivität kommt. Um unsere Hypothese zu überprüfen, daß EBV-Reaktivierungen bei Gesunden durch transiente Immunsuppression ermöglicht werden, haben wir 14 gesunde Thrombozytapheresespender über ein Jahr beobachtet und mittels quantitativer *real-time* PCR auf EBV-Reaktivierungen hin untersucht. Diese Methode ist der weit verbreiteten serologischen Diagnostik deutlich überlegen. Daneben wurde die EBV-spezifische Immunität zu jedem Untersuchungszeitpunkt bestimmt, wobei zwei verschiedene Ansätze verfolgt wurden. Einerseits wurde mittels Elispot die T-Zellreaktivität sowohl gegenüber der autologen LCL als auch gegenüber einzelnen viralen Epitopen erfaßt, andererseits quantifizierten wir die Größe des Pools epitopspezifischer $CD8^+$ T-Lymphozyten durchflußzytometrisch mittels HLA-Tetramerfärbung.

Von 14 untersuchten Probanden zeigten nur zwei während der Beobachtungsdauer keine detektierbare EBV-Reaktivierung. Überraschenderweise war der Verlauf der EBV-spezifischen Immunität (entspricht der T-Zellreaktivität gegenüber der autologen LCL im ELISPOT) über die Zeit teilweise heftigsten Schwankungen unterworfen. EBV-Reaktivierungen wurden bevorzugt dann beobachtet, wenn die EBV-spezifische Immunität niedrig war. Allerdings konnte bei einigen Probanden ein Anstieg der Reaktivität gegenüber einzelnen viralen Epitopen nachgewiesen werden. Wir werteten dies als Hinweis darauf, daß die LCL-spezifische Reaktivität zu einem größeren Teil durch $CD4^+$ T-Zellen bedingt ist als bisher angenommen und es so auch bei geringer LCL-spezifischer Reaktivität zu einem Anstieg von $CD8^+$ -spezifischen T-Zellen kommt. Die Frequenz epitopspezifischer T-Zellzahlen, die durchflußzytometrisch ermittelt wurde, war bei geringer Schwankungsbreite relativ konstant, so daß kein Zusammenhang zu viralen Reaktivierungen hergestellt werden konnte. Dies ist als Hinweis darauf zu werten, daß die EBV-spezifische Immunität nur bedingt von der Größe des EBV-spezifischen T-Zellpools abhängig ist und durch funktionelle Ansätze wie ELISPOT besser zu erfassen ist.

A Abbildungen

A.1 Elispot



Abbildung 3: Beispiel einer Elispot 96-Lochplatte (Ausschnitt mit allen genutzten Wells). Jedes Well enthält entweder $2,5 \times 10^5$ oder $0,625 \times 10^5$ Zellen mit Peptid bzw. LCLs. Zusätzlich Positiv- und Negativkontrolle mit den gleichen Zellzahlen.

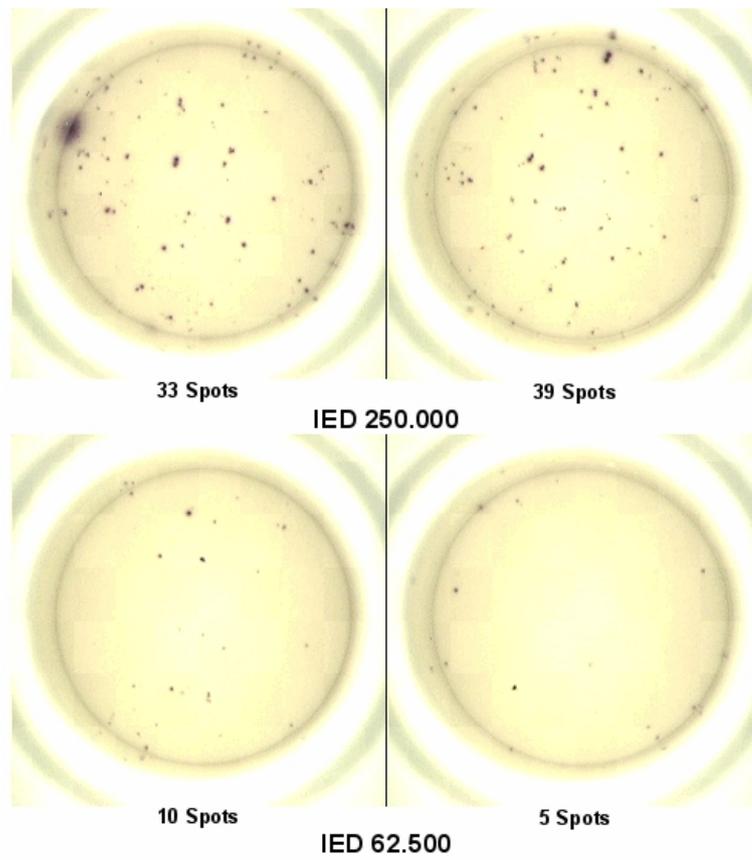


Abbildung 4: Detaillierte Darstellung der vier Wells E7, E8, F7, F8 mit Peptid IED aus Abb. 3 mit Angabe der Ergebnisse der computergestützten Spot-Auszählung.

A.2 Verläufe der EBV-spezifischen PBMC-Frequenzen einzelner Probanden im Elispot

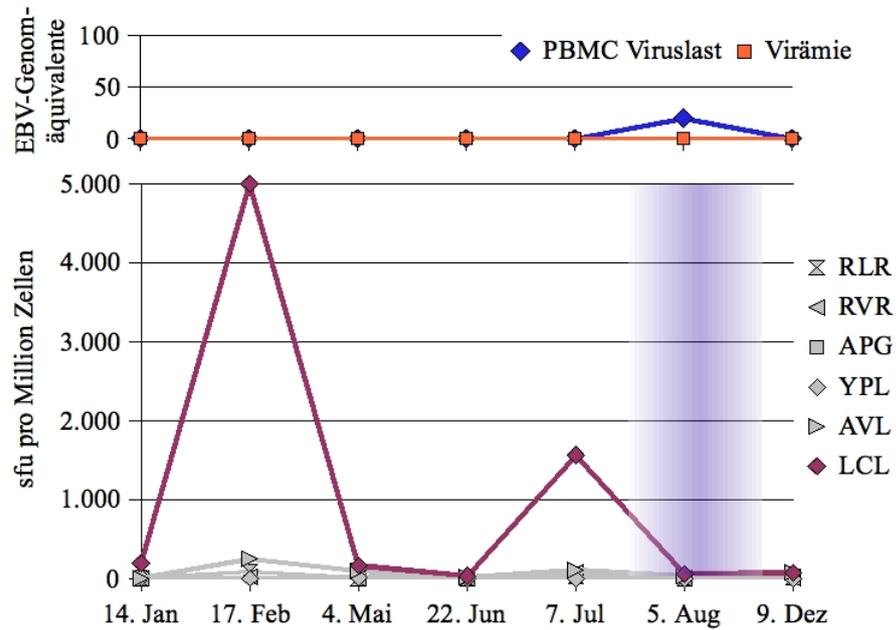


Abbildung 5: Proband 2. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Bei Proband 2 Diagnose einer EBV-Reaktivierung bei einmaliger Detektion von EBV-Genom in PBMC (PBMC Viruslast). Bei insgesamt stark fluktuierenden LCL-spezifischen und konstant niedrigen epitopspezifischen Reaktivitäten war die LCL-spezifische IFN- γ Sekretion zum Zeitpunkt der EBV-Reaktivierung supprimiert.

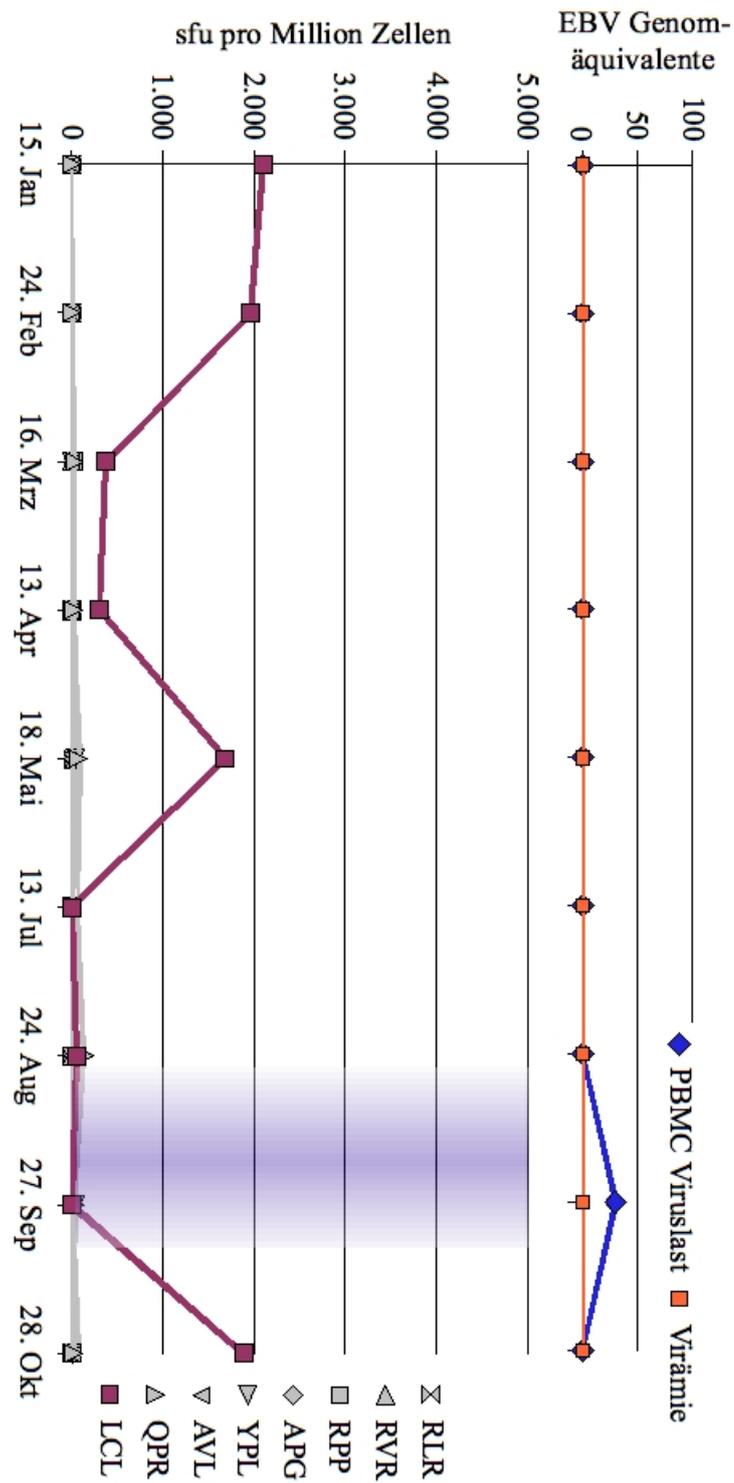


Abbildung 6: Proband 3. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Diagnose einer EBV-Reaktivierung aufgrund einmaligen Nachweises von PBMC Viruslast bei supprimierter LCL-spezifischer T-Zellreaktivität.

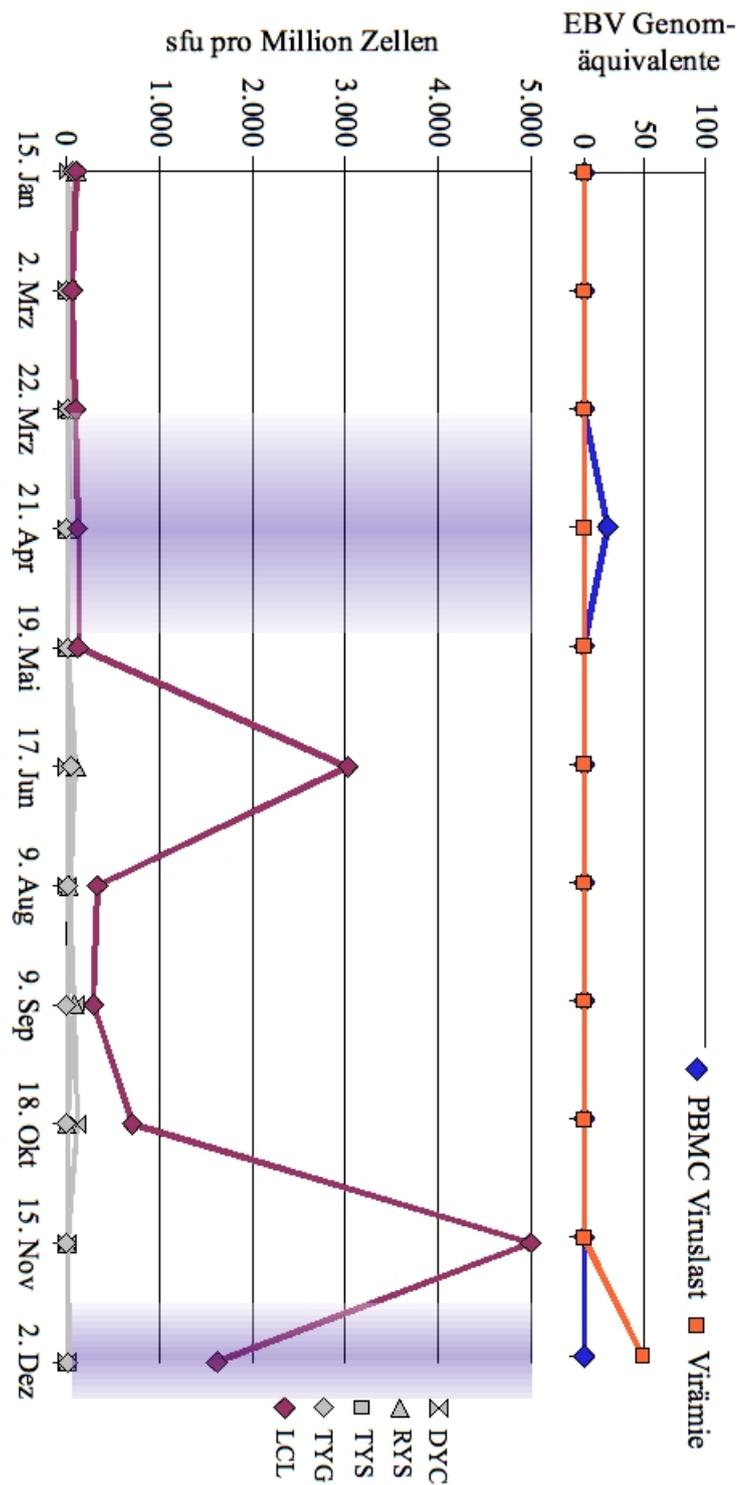


Abbildung 7: Proband 4. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Es konnten aufgrund je einmaliger Detektion von PBMC Viruslast und von Virämie zwei EBV-Reaktivierungen bei niedrigen bzw. fallenden LCL-spezifischen T-Zellreaktivitäten diagnostiziert werden.

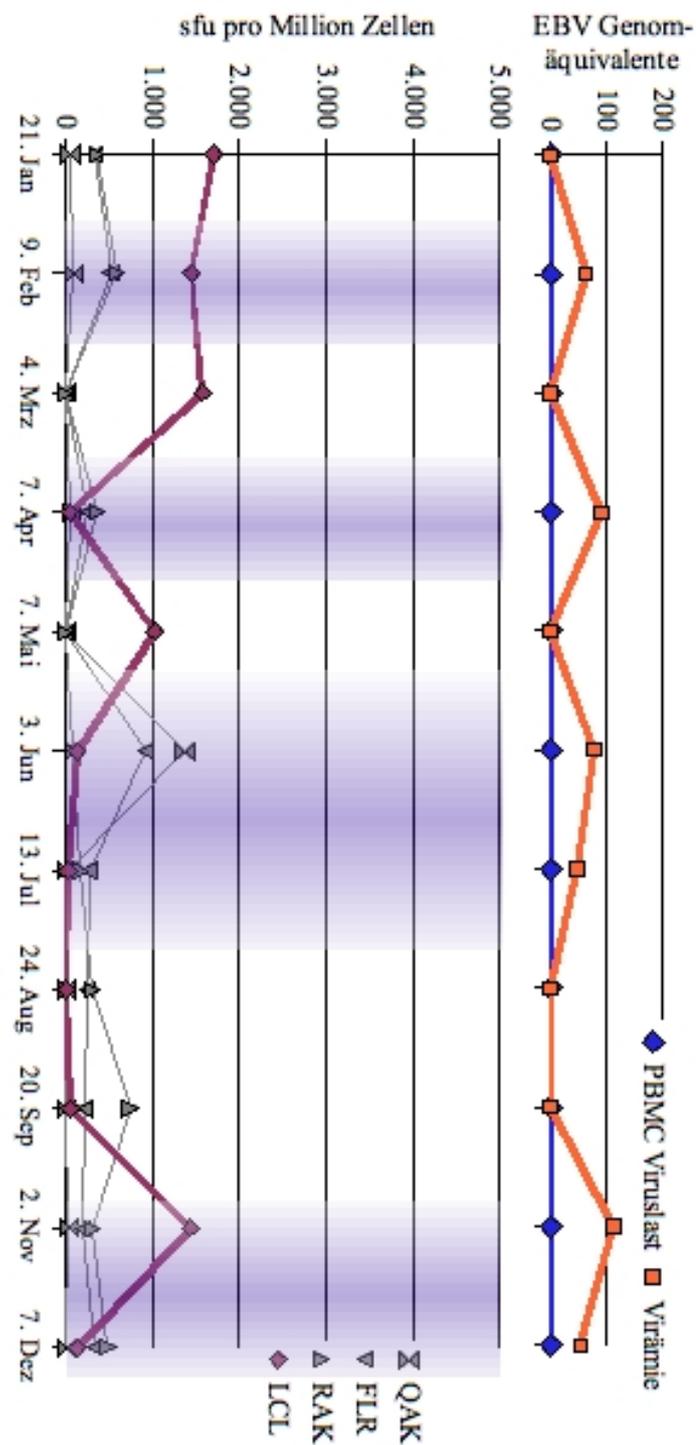


Abbildung 8: Proband 5. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Nachweis einer EB-Virämie an sechs von 11 Terminen. Neben der fluktuierenden LCL-spezifischen Reaktivität ist auch die Variabilität der T-Zellreaktivität gegenüber den HLA-B8 restringierten Epitopen QAK, FLR und RAK bemerkenswert.

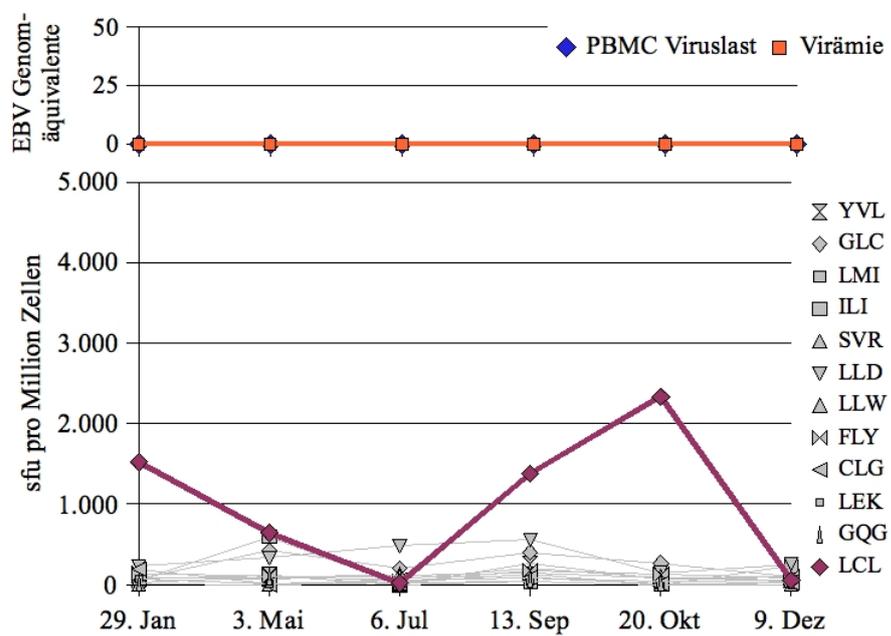


Abbildung 9: Proband 8. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Hier erfolgte kein Nachweis viraler Aktivitätsparameter i.S.v. Virämie bzw. PBMC Viruslast und somit keine Diagnose einer EBV-Reaktivierung.

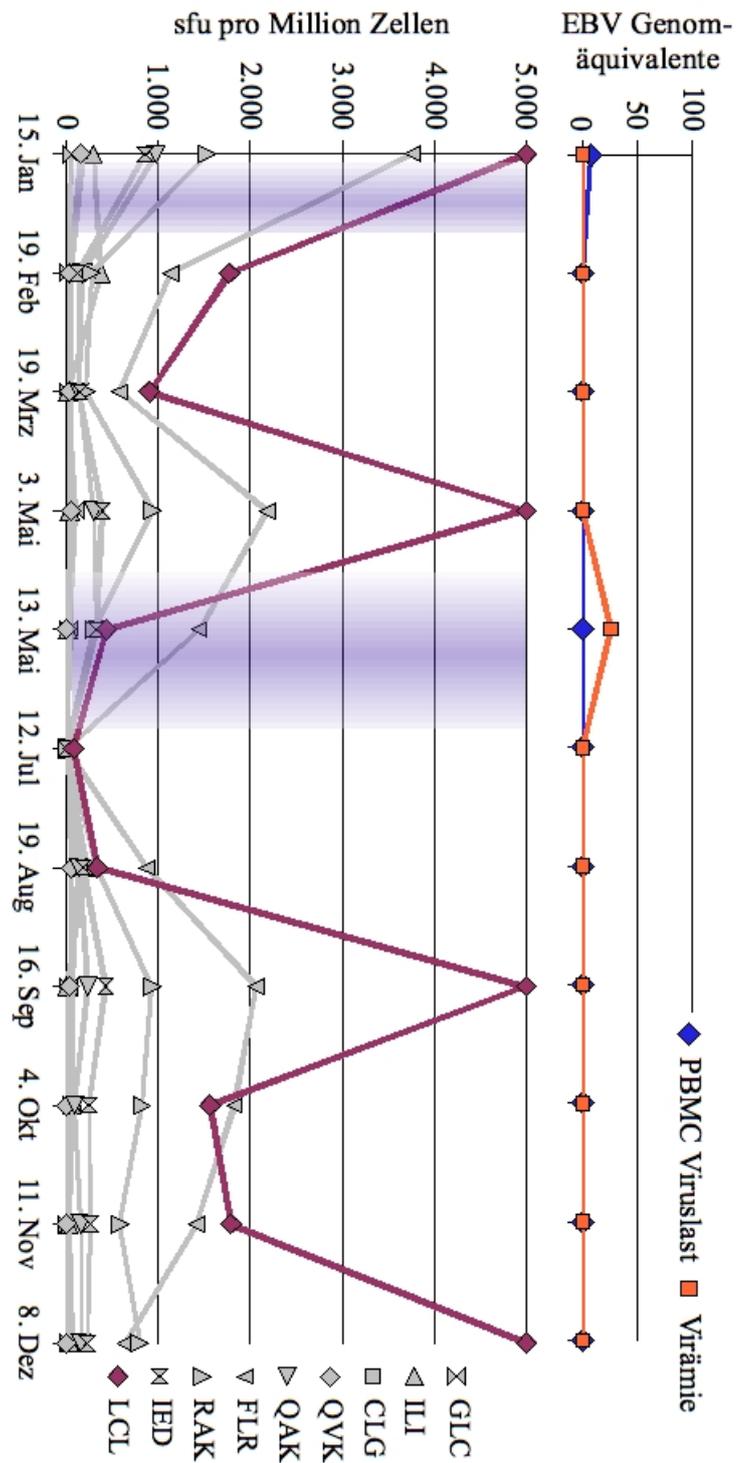


Abbildung 10: Proband 10. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Diagnose von zwei Episoden EB-viraler Reaktivierung. Sowohl LCL- als auch epitopspezifische Reaktivitäten unterliegen stärksten Schwankungen.

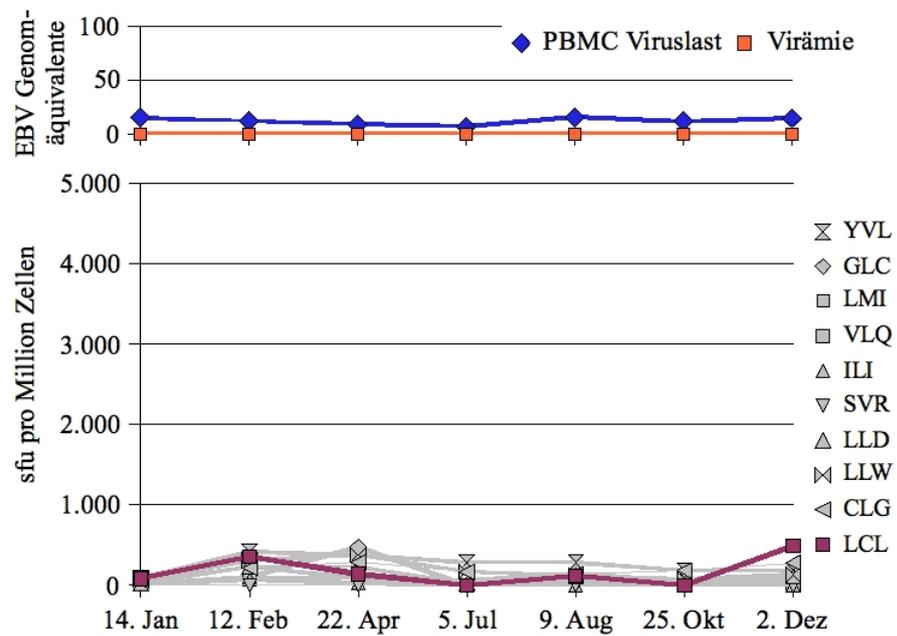


Abbildung 11: Proband 11. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Bei konstant nachweisbarer PBMC Viruslast ohne Abweichungen von mehr als drei Standardabweichungen erfolgte hier keine Diagnose einer EBV-Reaktivierung. Sowohl LCL- als auch epitopspezifische Reaktivitäten bewegen sich auch einem niedrigen Level ohne nennenswerte Schwankungen.

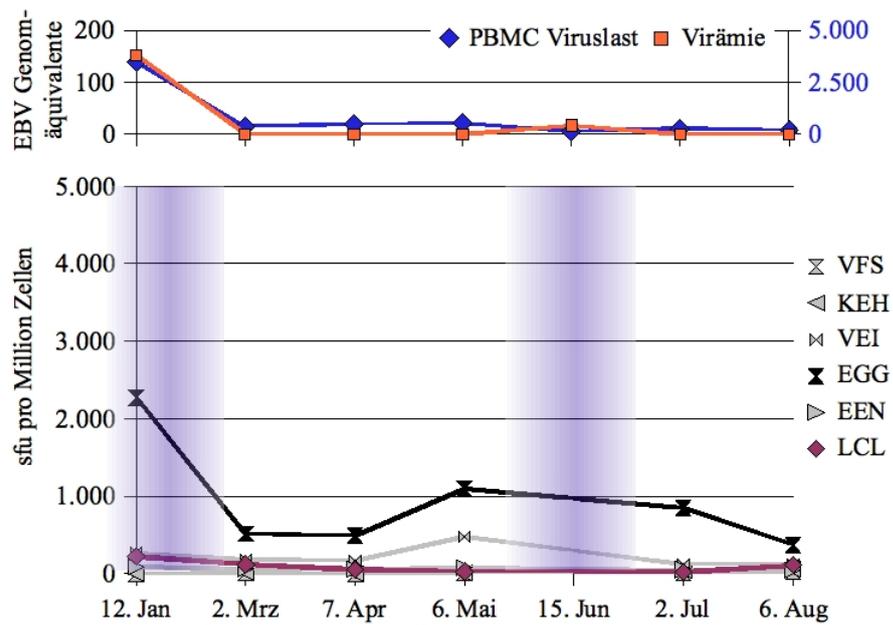


Abbildung 12: Proband 13. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 5, S. 40. Die links auf der x-Achse aufgetragene Skalierung bezieht sich bei dieser Abbildung auf die EBV-Kopien pro ml Plasma, d.h. die Plasmavirämie. Konsekutiv gibt die rechte Skala die EBV-Kopien pro μ g PBMC-DNA wieder.) Zwei EBV-Reaktivierungen bei konstant niedriger LCL-spezifischer T-Zellreaktivität. Allerdings ist eine ungewöhnlich starke Reaktivität gegenüber dem HLA-B44 restringierten EGG-Epitop zu beobachten.

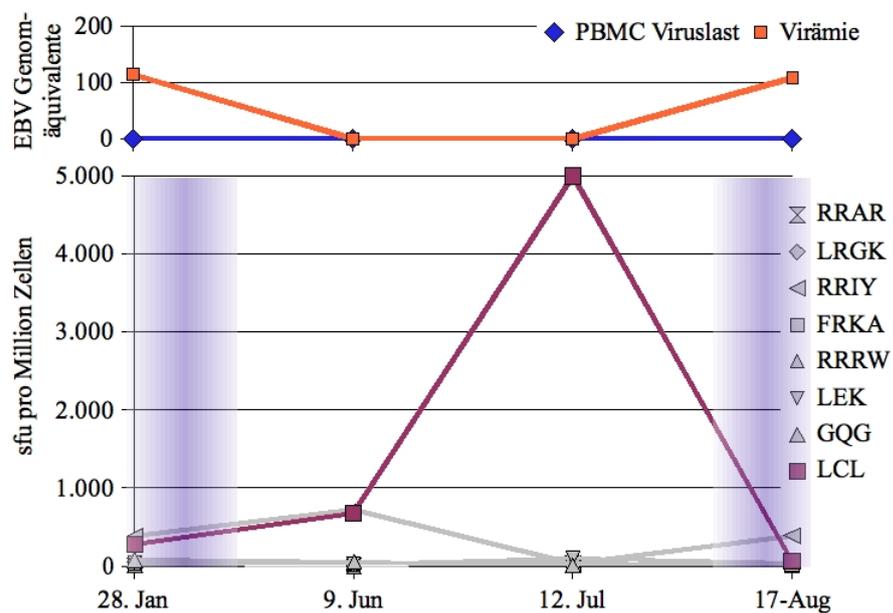


Abbildung 13: Proband 14. (Zur Erklärung s. Bildunterschrift Abb. 1, S. 30.) Zwei Episoden EB-viraler Reaktivierung mit jeweils deutlich verminderter LCL-spezifischer IFN- γ Sekretion. Die am 17. August gemessene EBV-Reaktivierung wurde als einzige auch mittels serologischer Methoden diagnostiziert (s. Abschnitt 3.1.1, S. 28).

A.3 Durchflußzytometrie

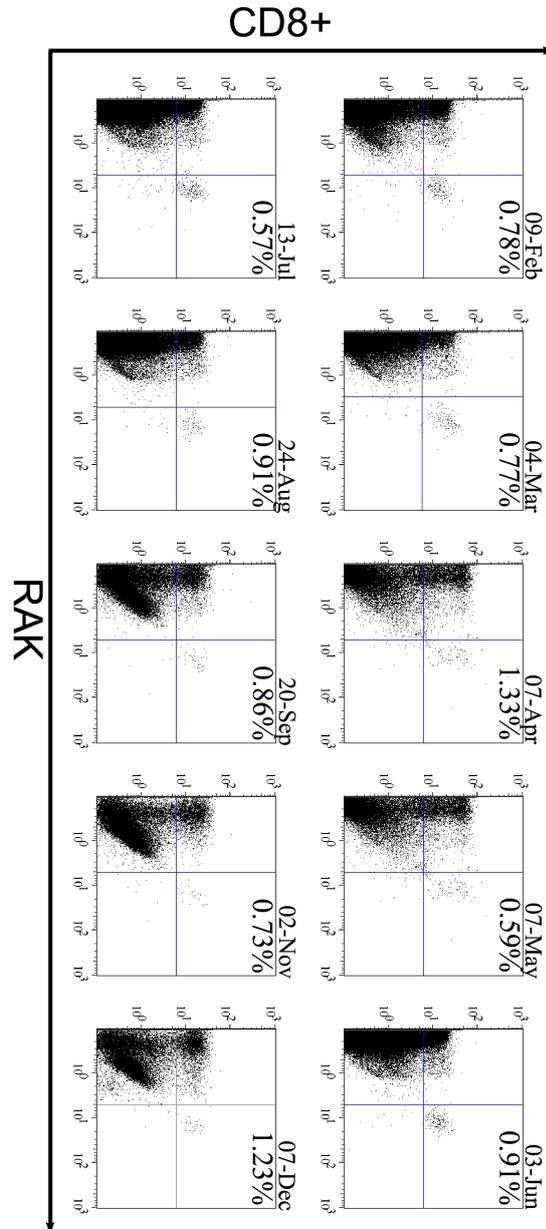


Abbildung 14: Graphische Darstellung der durchflußzytometrischen Untersuchungen von Proband 5 (s.a. Tabelle 1 und Abbildung 8, S. 43) im Dotplot nach Gating der Lymphozytenpopulation. Jedes Histogramm entspricht einem Untersuchungstermin; auf der y-Achse ist die Intensität des CD8-Signals dargestellt, auf der x-Achse die des Tetramersignals (in diesem Falle RAK). Doppelt positive, d.h. CD8⁺RAK⁺ Zellen befinden sich im rechten oberen Quadranten des jeweiligen Plots. Die angegebene Prozentzahl entspricht dem Anteil doppelt positiver Zellen an der gesamten Lymphozytenpopulation. Die teilweise ausgeprägte Diskrepanz zwischen der visuell wahrgenommenen CD8⁺RAK⁺ Population und deren prozentualen Anteil an der Gesamtlymphozytenpopulation zu einzelnen Terminen liegt in den unterschiedlichen absoluten Lymphozytenzahlen begründet.

B Tabellen

Tabelle 1: Übersicht über die Studienpopulation. Die Probanden wurden alphabetisch nummeriert. Neben Geschlecht, Alter und MHC-I Phänotyp ist auch angegeben, ob bei dem jeweiligen Probanden im Studienverlauf eine EBV-Reaktivierung im peripheren Blut nachweisbar war. Außerdem ist in den beiden rechten Spalten dargestellt, wie sich die LCL- bzw. peptidspezifische Reaktivität während den detektierten EBV-Reaktivierungen im IFN- γ Elispot verhalten hat (\downarrow supprimiert/fallend, \uparrow hoch/steigend, \updownarrow inkonstante Reaktion, \leftrightarrow konstante Reaktivität).

Nr.	Geschlecht	Alter	MHC-I Phänotyp	Periphere EBV Reaktivierung	Reaktivität im IFN- γ ELISPOT	
					LCL	Peptide
2	männlich	57	A3, B13/35	ja	\downarrow	\leftrightarrow
3	weiblich	26	A3, B7/35	ja	\downarrow	\leftrightarrow
4	männlich	40	A1/24, B57	ja	\downarrow	\leftrightarrow
9	männlich	39	A2/24, B5/7	ja	\downarrow	\leftrightarrow
12	männlich	35	A1/3, B7/57	ja	\downarrow	\leftrightarrow
14	männlich	32	A26/31, B27/62	ja	\downarrow	\leftrightarrow
5	männlich	35	A1, B8/51	ja	\updownarrow	\uparrow
10	männlich	34	A2, B8/60	ja	\updownarrow	\uparrow
1	männlich	31	A3/11, B7/51	ja	\leftrightarrow	\uparrow
6	männlich	35	A2, B8/44	ja	\leftrightarrow	\uparrow
7	männlich	35	A2/31, B51/62	ja	\leftrightarrow	\uparrow
13	männlich	61	A29, B44	ja	\leftrightarrow	\uparrow
8	männlich	41	A2, B13/62	nein		
11	männlich	64	A2, B61	nein		

Tabelle 2: Verwendete EBV-Epitope mit Angabe der HLA-Restriktion, des zugehörigen EBV-Proteins, der Kurzbezeichnung mit vollständiger Peptidsequenz und Referenz. Epitope, die als HLA-Tetramer verfügbar waren, sind mit einem Asterisk (*) markiert.

HLA-Restriktion	EBV Protein	Epitop	Peptidsequenz	Referenz
HLA-A2	BMLF1	YVL	YVLDHLIVV	[79]
		GLC	GLCTLVAML*	[86]
	gp85	LMI	LMIPLINV	[46]
	gp350	VLQ	VLQWASLAV	[48]
	gp110	ILI	ILYNGWYA	[46]
	EBNA3A	SVR	SVRDRLARL	[12]
	EBNA3C	LLD	LLDFVRFMGV	[45]
	LMP2A	LLW	LLWTLVVLL	[57]
		CLG	CLGGLLTMV*	[56]
HLA-A3	EBNA3A	RLR	RLRAEAQVK	[35]
	BRLF1	RVR	RVRAYTYSK	[46]
HLA-A11	EBNA3B	IVT	IVTDFSVIK	[24]
		LPG	LPGPQVTAVLLHEES	[24]
	LMP2A	SSC	SSCSSCPLSKI	[57]
HLA-A24	BRLF1	DYC	DYCNVLNKEF	[46]
	EBNA3A	RYS	RYSIFFDY	[12]
	EBNA3B	TYS	TYSAGIVQI	[76]
	LMP2A	TYG	TYGPFVMCL	[57]
HLA-A29	EBNA3A	VFS	VFSDGRVAC	[46]
HLA-B7	EBNA3A	RPP	RPPIFIRRL	[34]
	EBNA3C	QPR	QPRAPIRPI	[34]
HLA-B8	EBNA3A	QAK	QAKWRLQTL	[12]
		FLR	FLRGRAYGL*	[14]
	BZLF1	RAK	RAKFKQLL*	[10]
HLA-B27	EBNA3B	RRAR	RRARSLSAERY	[76]

s. nächste Seite

HLA-Restriktion	EBV Protein	Epitop	Peptidsequenz	Referenz
	EBNA3C	LRGK	LRGKWQRRYR	[11]
		RRIY	RRIYDLIEL	[11]
		FRKA	FRKAQIQGL	[76]
	LMP2A	RRRW	RRRWRRLTV	[46]
HLA-B35	BALF4	APG	APGWLIWTY	[46]
	EBNA3A	YPL	YPLHEQHGM	[12]
	EBNA3B	AVL	AVLLHEESM	[76]
HLA-B44	EBNA3C	KEH	KEHVIQNAF	[47]
	EBNA3B	VEI	VEITPYKPTW	[76]
	EBNA3C	EGG	EGGVGWRHW	[68]
		EEN	EENLLDFVRF	[13]
HLA-B60	LMP2A	IED	IEDPPFNSL	[57]
HLA-B62	EBNA3A	LEK	LEKARGSTY	[76]
	EBNA3B	GQG	GQGGSPAM	[76]

C Material

C.1 Geräte und Software

- 7500 Real-Time PCR System mit 7500 System SDS Software 1.2 (Applied Biosystems, Darmstadt)
- Zentrifuge 5417C (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf)
- CS-Lab Autoclav 85182 (Webeco, Bad Schwartau)
- Cytomics FC500 (Beckmann Coulter, Krefeld)
- Elispot Reader System ELR03 mit Software Elispot 3.2.2 (Autoimmun Diagnostika, Straßberg)
- FlowJo 7.1 (TreeStar, Ashland, OR, USA)
- Gefrierschrank Nuair Ultralow Freezer (Sarstedt, Nürnberg)
- HERAcell 240 CO₂ Inkubator (Thermo Scientific, Langenselbold)
- Kühlschrank economic froster (Bosch, München)
- Labofuge M (Heraeus, Osterode)
- Mikroskop Zeiss ID03 (Zeiss, Jena)
- Minifuge 2 (Heraeus)
- Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad, München)
- Multifuge 14S-R (Heraeus)
- Nalgene Cryo 1 °C Freezing Container, Cat. No. 5000-0001 (Nalgene, Rochester, NY, USA)
- Omnilab REAK 2000 (Heidolph, Kehlheim)
- Sterilwerkbank VRF 1206 (Heraeus)
- UNITEK HB-130 (Hassa Laborbedarf, Lübeck)
- Wasserbad 12P (Haake, Karlsruhe)

C.2 Laborbedarf

- Biopshere-Qualitätsspitzen mit und ohne Filter 2,5µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl (Sarstedt)
- Combitips plus 0,5ml, 2,5ml, 12,5ml, 50ml (Sarstedt)
- EDTA Monovetten KE 9ml (Sarstedt)
- Eppendorfgefäße 1,5ml (Eppendorf)
- Eppendorf Pipetten Reference 0,1-2,5µl, 10-100µl, 50-250µl (Eppendorf)
- Finnpipetten 0,5µl, 5-40µl, 40-200µl, 200-1000µl (Labsystems, Helsinki, Finnland)
- Li-Heparin Monovetten LH 9ml (Sarstedt)
- Multipette 4780 (Eppendorf)
- Röhren steril 15ml, 50ml (Sarstedt)

C.3 Zellisolation und -kultur

- Cyclosporin A (Sigma, München)
- Ficoll Separation Solution (Biochrom, Berlin)
- Foetal Bovine Serum Gold (PAN-Biotech, Aidenbach)
- Nunclon Surface steril 6-, 12- und 24-Lochplatten (Nunc, Roskilde, Dänemark)
- Penicillin/Streptomycin 10.000/10.000µg/ml (Sigma)
- Phosphate buffered saline PBS, ph 7,2 (Apotheke UK-SH, Lübeck)
- Zellkulturflaschen 25cm², 75cm² (Nunc)
- Zellkulturmedium RPMI 1640 mit Glutamin (PAA, Pasching, Österreich)

C.4 Kryopräservation von Zellmaterial

- AB-Serum (Institut für Immunologie und Transplantationsmedizin der Universität zu Lübeck, Lübeck)
- Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma)

C.5 Interferon- γ Elispot

- 5-bromo-4-chloro-indolyl-phosphatase/nitroblue-tetrazolium (BCIP/NBT) (Moss, Pasadena, MD, USA)
- 96-Lochplatten (Millipore, Schwalbach)
- h-IFN-gamma ELISpot kit ALP (Mabtech AB, Hamburg)
- Peptidlösungen* (Thermo Electron, Ulm)
- Phytohaemagglutinin (PHA) (Sigma)

C.6 DNA-Isolation und quantitative *real-time* PCR

- CRP *forward primer* (TIB MOLBIOL, Berlin)
- CRP *reverse primer* (TIB MOLBIOL)
- CRP Sonde (FAM) (TIB MOLBIOL)
- EBNA1 *forward primer* (TIB MOLBIOL)
- EBNA1 *reverse primer* (TIB MOLBIOL)
- EBNA1 Sonde (VIC) (TIB MOLBIOL)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden)
- RNase freies Wasser (Apotheke UK-SH, Lübeck)
- TaqMan Universal Mastermix (PE Applied Biosystems, Foster City, USA)

C.7 Enzygnost ELISA

- Anti-Human-IgA/POD-Konjugat Anti-EBV/IgM II (Dade Behring, Marburg)
- Enzygnost Anti-EBV/IgM II, Anti-IgG (Dade Behring)
- Zusatz-Reagenzien für Enzygnost/TMP (Dade Behring)

*siehe Tabelle 2, S. 51

C.8 FACS

- Anti-CD8 Antikörper, Tricolor-markiert, Isotyp IgG2a, Klon 3B5 (Invitrogen, Karlsruhe)
- Anti-CD8 Antikörper, PE-markiert, Isotyp Maus IgG1, Klon RPAT8 (Becton-Dickinson, Heidelberg)
- Anti-CD8, -CD27, -CD28, -CD49d, -CD45RA, -CD45RO, -CD69, -CD103, -CXCR1 Antikörper (IT-box 135) (Immunotools, Friesoythe)
- Paraformaldehyd (PFA) (Sigma)

D Laborprotokolle

D.1 Isolation von PBMC

- Verdünnen des Blutes 1:1 mit Waschmedium (RPMI 1640) in einem 50 ml Röhrchen.
- Langsames und vorsichtiges Überschichten von jeweils bis zu 30 ml Blut-RPMI-Gemisches auf 15 ml Ficoll-Lösung.
- Zentrifugation mit $600 \times g$ für 30 min bei abgeschalteter Bremse zum Ende des Laufes.
- Abpipettieren der PBMC und Waschen durch Auffüllen auf 50 ml mit RPMI und anschließende Zentrifugation bei $300 \times g$ für 10 min.

D.2 Kryopräservation

- Abzentrifugieren der Zellen bei $300 \times g$ für 10 Minuten.
- Vorsichtiges Lösen des Pellets durch Beträufeln mit 500 μ l AB-Serum.
- Vorsichtige Zugabe von 500 μ l Zellkulturmedium (20% DMSO-haltig, damit 10% DMSO-Konzentration im Ansatz).
- Einfrieren mit Temperaturabsenkung $1 \text{ }^\circ\text{C/h}$.
- Aufbewahrung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

D.3 Etablierung von autologen lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs)

- Isolation von PBMC aus 20 ml Vollblut (s. Protokoll D.1).
- Resuspension des Zellpellets in 4 ml B95-8 Überstand (gewonnen bei der Stimulation von B95-8 Zellen mit PMA).
- Zugabe von Cyclosporin-haltigem Zellkulturmedium (Endkonzentration von Cyclosporin A: 100 $\mu\text{g/ml}$) nach zwei Stunden.
- Inkubation bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ für 24 Stunden.
- Mediumwechsel zum Entfernen des B95-8 Überstandes.
- Dreiwöchige Kultur bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in cyclosporinhaltigem Medium.
- Anschließend Kultur in Standardkulturmedium.

D.4 Interferon- γ Elispot

- Vorbereiten der 96-Lochplatte
 - Spülen der Platte mit 70%igem Ethanol für 30 sec.
 - 3× Spülen der Platte mit Aqua dest.
 - Zugabe von 50 μ l Anti-IFN- γ -Antikörperlösung (15 μ g/ μ l).
 - 3 h Inkubation bei 20 °C.
 - 4× Waschen der Platte mit PBS-Tween (500 ml PBS + 2.500 μ l Tween).
 - Blocken mit 100 μ l Kulturmedium (RPMI 1640 + 10% FCS) pro Well.
 - 1 h Inkubation bei 20 °C.
- Einbringen der Zellen und Stimulation mittels Peptiden
 - 2,5 $\times 10^5$ PBMCs in 50 μ l bzw. 0,625 $\times 10^5$ PBMC in 12,5 μ l pro Well.
 - * Zugabe der jeweiligen Peptide: 10 μ l Peptidlösung pro Well (entsprechen 2 μ g Peptid pro ml).
 - * LCL: Zugabe von 5,0 $\times 10^4$ Zellen aus der autologen LCL in Zellkulturmedium.
 - * Positivkontrolle: Zugabe von 0,1 μ g PHA.
 - * Negativkontrolle: keine Stimulation.
 - Auffüllen aller Wells auf 100 μ l mit Kulturmedium.
- 12 – 16 h Inkubation bei 37 °C.
- 6× Waschen der Platte mit PBS-Tween.
- Zugabe von 50 μ l biotinyliertem Sekundärantikörper (1 μ g/ml).
- 2 h Inkubation bei 20 °C.
- 6× Waschen mit PBS-Tween.
- Zugabe von Streptavidin-konjugierter alkalischer Phosphatase in 50 μ l PBS.
- 1 h Inkubation bei 20 °C.

- Katalysieren der Farbreaktion durch Zugabe von 100 μl BCIP/NBT pro Well. Entsprechend den Herstellerangaben wurde die Farbreaktion durch ausreichend langes Spülen der Platte mit Leitungswasser unterbrochen, sobald einzelne Spots erkennbar wurden.

D.5 Reaktionsansatz für die quantitative *real-time* PCR

Das Probenvolumen betrug 10 μl für PBMC-DNA bzw. 20 μl für DNA aus Plasma. Um ein Probenvolumen von 50 μl zu erhalten, wurden nach Zugabe von insgesamt 29,7 μl PCR-Reagenzien (s. Tabelle 3) noch 10,3 μl bzw. 0,3 μl *Aqua dest.* zugegeben.

Tabelle 3: Reagenzien für den PCR-Ansatz.

Reagens	Volumen	Endkonzentration im Ansatz
Universal Master Mix	25,0 μl	
EBNA1 <i>forward Primer</i>	1,5 μl	300 nM
EBNA1 <i>reverse Primer</i>	1,5 μl	300 nM
EBNA1-Sonde (VIC-markiert)	1,0 μl	250 nM
CRP <i>forward Primer</i>	0,1 μl	20 nM
CRP <i>reverse Primer</i>	0,1 μl	20 nM
CRP-Sonde (FAM-markiert)	0,5 μl	100 nM
Gesamtvolumen	29,7 μl	

Die Taq-Polymerase wurde zu Beginn des PCR-Laufes 10 min bei 95 °C aktiviert. Die Amplifikation erfolgte anschließend in 40 Zyklen zu je 15 sec bei 95 °C und 1 min bei 60 °C.

D.6 FACS

- Auftauen der bei ca. -196 °C tiefgefrorenen Proben durch Inkubation bei 37 °C für 5 Minuten.
- Waschen der Probe durch ca. 10fache Verdünnung mit PBS und anschließend 10minütige Zentrifugation bei $300 \times g$.
- Resuspension des Pellets in FACS-Puffer (PBS plus 10% FCS) und Bestücken der Probenröhrchen mit jeweils gleichen Volumina der Zellsuspension (jeweils 50 μl).

- Zugabe von 2 μl entsprechendem HLA-Tetramer pro Sample. (Dieser Schritt entfällt bei den drei Ansätzen für die Kompensation.)
 - 15 min Inkubation bei 37 °C im Wasserbad.
 - Zügiges Abschrecken mit 4 °C kaltem FACS-Puffer.
 - 10min Zentrifugation bei $300 \times g$ in der auf 4 °C gekühlten Zentrifuge, anschließend sorgfältiges Abkippen des Überstandes.
- Zugabe von jeweils 100 μl FACS-Puffer pro Sample und
 - Zugabe von 5 μl CD8-FITC Antikörper und/oder
 - Zugabe von 5 μl CD8-Tricolor Antikörper und/oder
 - Zugabe von 5 μl CD8-PE Antikörper und/oder
 - Zugabe von 5 μl Antikörper gegen CD27, CD28, CD49d, CD45RA, CD45RO, CD69, CD103 oder CXCR1 (jeweils FITC-markiert) oder
 - keine Zugabe von Antikörper.
- 20 min Inkubation bei 20 °C.
- Waschen durch jeweils ca. 50fache Verdünnung der Samples mit FACS-Puffer, Zentrifugation mit $300 \times g$ (10 min) und vorsichtiges Abkippen des Überstandes.
- Fixation der Zellen durch Zugabe von 250-500 μl 2%iger Paraformaldehydlösung.
- Messung der Proben am Durchflußzytometer innerhalb von 24 Stunden.

Abbildungsverzeichnis

1	Proband 9	30
2	Proband 12	31
3	Beispiel einer Elispot 96-Lochplatte	38
4	Vier Elispot-Wells im Detail	39
5	Proband 2	40
6	Proband 3	41
7	Proband 4	42
8	Proband 5	43
9	Proband 8	44
10	Proband 10	45
11	Proband 11	46
12	Proband 13	47
13	Proband 14	48
14	FACS-Analyse von Proband 5	49

Tabellenverzeichnis

1	Übersicht über die Studienpopulation	50
2	Verwendete EBV-Epitope mit Referenzen	51
3	Reagenzien für den PCR-Ansatz	59

Literatur

- [1] Dinesh Adhikary, Uta Behrends, Andreas Moosmann, Klaus Witter, Georg W Bornkamm, and Josef Mautner. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med*, 203(4):995–1006, 2006.
- [2] M A Altfeld, A Trocha, R L Eldridge, E S Rosenberg, M N Phillips, M M Addo, R P Sekaly, S A Kalams, S A Burchett, K McIntosh, B D Walker, and P J Goulder. Identification of dominant optimal HLA-B60- and HLA-B61-restricted cytotoxic T-lymphocyte (CTL) epitopes: rapid characterization of CTL responses by enzyme-linked immunospot assay. *J Virol*, 74(18):8541–8549, 2000.
- [3] J D Altman, P A Moss, P J Goulder, D H Barouch, M G McHeyzer-Williams, J I Bell, A J McMichael, and M M Davis. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science*, 274(5284):94–96, 1996.
- [4] Elisabeth Amyes, Chris Hatton, Damien Montamat-Sicotte, Nancy Gudgeon, Alan B Rickinson, Andrew J McMichael, and Margaret F C Callan. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med*, 198(6):903–911, 2003.
- [5] Nicola E Annels, Jayant S Kalpoe, Robbert G M Bredius, Eric C Claas, Aloys C M Kroes, Andrew D Hislop, Debbie van Baarle, R Maarten Egeler, Maarten J D van Tol, and Arjan C Lankester. Management of Epstein-Barr virus (EBV) reactivation after allogeneic stem cell transplantation by simultaneous analysis of EBV DNA load and EBV-specific T cell reconstitution. *Clin Infect Dis*, 42(12):1743–1748, 2006.
- [6] Donald D Anthony and Paul V Lehmann. T-cell epitope mapping using the ELISPOT approach. *Methods*, 29(3):260–269, 2003.
- [7] Sunil K Arora. Analysis of intracellular cytokines using flowcytometry. *Methods Cell Sci*, 24(1-3):37–40, 2002.
- [8] Manit Arya, Iqbal S Shergill, Magali Williamson, Lyndon Gommersall, Neehar Arya, and Hitendra R H Patel. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*, 5(2):209–219, 2005.

- [9] Nadia L Bernasconi, Elisabetta Traggiai, and Antonio Lanzavecchia. Maintenance of serological memory by polyclonal activation of human memory B cells. *Science*, 298(5601):2199–2202, 2002.
- [10] C Bogedain, H Wolf, S Modrow, G Stuber, and W Jilg. Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J Virol*, 69(8):4872–4879, 1995.
- [11] J M Brooks, R J Murray, W A Thomas, M G Kurilla, and A B Rickinson. Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide. *J Exp Med*, 178(3):879–887, 1993.
- [12] S R Burrows, J Gardner, R Khanna, T Steward, D J Moss, S Rodda, and A Suhrbier. Five new cytotoxic T cell epitopes identified within Epstein-Barr virus nuclear antigen 3. *J Gen Virol*, 75 (Pt 9):2489–2493, 1994.
- [13] S R Burrows, I S Misko, T B Sculley, C Schmidt, and D J Moss. An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-cell epitope present on A- and B-type transformants. *J Virol*, 64(8):3974–3976, 1990.
- [14] S R Burrows, T B Sculley, I S Misko, C Schmidt, and D J Moss. An Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cell epitope in EBV nuclear antigen 3 (EBNA 3). *J Exp Med*, 171(1):345–349, 1990.
- [15] M F Callan, L Tan, N Annels, G S Ogg, J D Wilson, C A O’Callaghan, N Steven, A J McMichael, and A B Rickinson. Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med*, 187(9):1395–1402, 1998.
- [16] J I Cohen. *Harrison’s Principles of Internal Medicine*, volume I, chapter Epstein-Barr Virus infections, including Infectious Mononucleosis. McGraw-Hill Medical Publishing Division, New York, USA, 16th edition edition, 2005.
- [17] D H Crawford and I Ando. EB virus induction is associated with B-cell maturation. *Immunology*, 59(3):405–409, 1986.
- [18] J Crocker and P G Murray. *Molecular Biology in Cellular Pathology*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK, 2nd edition, 2003.

- [19] C Czerkinsky, Z Moldoveanu, J Mestecky, L A Nilsson, and O Ouchterlony. A novel two colour ELISPOT assay. I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 115(1):31–37, 1988.
- [20] F Diaz-Mitoma, A Ruiz, G Flowerdew, S Houston, B Romanowski, T Kovithavongs, J Preiksaitis, and D L Tyrrell. High levels of Epstein-Barr virus in the oropharynx: a predictor of disease progression in human immunodeficiency virus infection. *J Med Virol*, 31(2):69–75, 1990.
- [21] C M Dobbs, M Vasquez, R Glaser, and J F Sheridan. Mechanisms of stress-induced modulation of viral pathogenesis and immunity. *J Neuroimmunol*, 48(2):151–160, 1993.
- [22] M A Epstein, G Henle, B G Achon, and Y M Barr. Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt’s lymphoma. *J Exp Med*, 121:761–770, 1965.
- [23] T R Esch and D W Thomas. Ia-independent binding of peptide antigen to the T cell receptor. *J Immunol*, 145(12):3972–3978, 1990.
- [24] R Gavioli, M G Kurilla, P O de Campos-Lima, L E Wallace, R Dolcetti, R J Murray, A B Rickinson, and M G Masucci. Multiple HLA A11-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes of different immunogenicities in the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 4. *J Virol*, 67(3):1572–1578, 1993.
- [25] R Glaser, S B Friedman, J Smyth, R Ader, P Bijur, P Brunell, N Cohen, L R Krilov, S T Lifrak, A Stone, and P Toffler. The differential impact of training stress and final examination stress on herpesvirus latency at the United States Military Academy at West Point. *Brain Behav Immun*, 13(3):240–251, 1999.
- [26] R Glaser, D K Pearl, J K Kiecolt-Glaser, and W B Malarkey. Plasma cortisol levels and reactivation of latent Epstein-Barr virus in response to examination stress. *Psychoneuroendocrinology*, 19(8):765–772, 1994.
- [27] H D Golden, R S Chang, W Prescott, E Simpson, and T Y Cooper. Leukocyte-transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals. *J Infect Dis*, 127(4):471–473, 1973.

- [28] J W Gratama, M A Oosterveer, G Klein, and I Ernberg. EBNA size polymorphism can be used to trace Epstein-Barr virus spread within families. *J Virol*, 64(10):4703–4708, 1990.
- [29] J W Gratama, J W van Esser, C H Lamers, C Tournay, B Lowenberg, R L Bolhuis, and J J Cornelissen. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood*, 98(5):1358–1364, 2001.
- [30] Kevin N Heller, Cagan Gurer, and Christian Munz. Virus-specific CD4+ T cells: ready for direct attack. *J Exp Med*, 203(4):805–808, 2006.
- [31] T Helms, B O Boehm, R J Asaad, R P Trezza, P V Lehmann, and M Tary-Lehmann. Direct visualization of cytokine-producing recall antigen-specific CD4 memory T cells in healthy individuals and HIV patients. *J Immunol*, 164(7):3723–3732, 2000.
- [32] G Henle, W Henle, and V Diehl. Relation of Burkitt’s tumor-associated herpes- γ type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59(1):94–101, 1968.
- [33] M D Hesse, A Y Karulin, B O Boehm, P V Lehmann, and M Tary-Lehmann. A T cell clone’s avidity is a function of its activation state. *J Immunol*, 167(3):1353–1361, 2001.
- [34] A Hill, A Worth, T Elliott, S Rowland-Jones, J Brooks, A Rickinson, and A McMichael. Characterization of two Epstein-Barr virus epitopes restricted by HLA-B7. *Eur J Immunol*, 25(1):18–24, 1995.
- [35] A B Hill, S P Lee, J S Haurum, N Murray, Q Y Yao, M Rowe, N Signoret, A B Rickinson, and A J McMichael. Class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocytes specific for Epstein-Barr virus (EBV)-transformed B lymphoblastoid cell lines against which they were raised. *J Exp Med*, 181(6):2221–2228, 1995.
- [36] Andrew D Hislop, Nicola E Annels, Nancy H Gudgeon, Alison M Leese, and Alan B Rickinson. Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med*, 195(7):893–905, 2002.
- [37] Andrew D Hislop, Graham S Taylor, Delphine Sauce, and Alan B Rickinson. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol*, 25:587–617, 2007.

- [38] H Hof and R Dörries. *Medizinische Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. korrigierte Auflage, 2004.
- [39] Ronald D Holmes, Kathy Orban-Eller, Frederick R Karrer, David T Rowe, Michael R Narkewicz, and Ronald J Sokol. Response of elevated Epstein-Barr virus DNA levels to therapeutic changes in pediatric liver transplant patients: 56-month follow up and outcome. *Transplantation*, 74(3):367–372, 2002.
- [40] M W Hornef, G Bein, L Fricke, J Steinhoff, H J Wagner, W Hinderer, H H Sonneborn, and H Kirchner. Coincidence of Epstein-Barr virus reactivation, cytomegalovirus infection, and rejection episodes in renal transplant recipients. *Transplantation*, 60(5):474–480, 1995.
- [41] S David Hudnall, Yimin Ge, Longxing Wei, Ning-Ping Yang, Hui-Quin Wang, and Tiansheng Chen. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod Pathol*, 18(4):519–527, 2005.
- [42] W J Jabs, H Hennig, M Kittel, K Pethig, F Smets, P Bucsky, H Kirchner, and H J Wagner. Normalized quantification by real-time PCR of Epstein-Barr virus load in patients at risk for posttransplant lymphoproliferative disorders. *J Clin Microbiol*, 39(2):564–569, 2001.
- [43] C A Janeway, P Travers, M Walport, and M Shlomchik. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. Garland Science Publishing, New York, USA, 6th edition, 2005.
- [44] L A Kamensky, M R Melamed, and H Derman. Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. *Science*, 150(696):630–631, 1965.
- [45] B M Kerr, N Kienzle, J M Burrows, S Cross, S L Silins, M Buck, E M Benson, B Coupar, D J Moss, and T B Sculley. Identification of type B-specific and cross-reactive cytotoxic T-lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *J Virol*, 70(12):8858–8864, 1996.
- [46] R Khanna and S R Burrows. Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Microbiol*, 54:19–48, 2000.
- [47] R Khanna, S R Burrows, M G Kurilla, C A Jacob, I S Misko, T B Sculley, E Kieff, and D J Moss. Localization of Epstein-Barr virus cytotoxic T cell epitopes using

- recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J Exp Med*, 176(1):169–176, 1992.
- [48] R Khanna, M Sherritt, and S R Burrows. EBV structural antigens, gp350 and gp85, as targets for ex vivo virus-specific CTL during acute infectious mononucleosis: potential use of gp350/gp85 CTL epitopes for vaccine design. *J Immunol*, 162(5):3063–3069, 1999.
- [49] E Kieff and A B Rickinson. *Fields Virology*, volume 2, chapter 74: Epstein-Barr Virus and Its Replication. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 4th edition, 2001.
- [50] K Kleppe, E Ohtsuka, R Kleppe, I Molineux, and H G Khorana. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, 56(2):341–361, 1971.
- [51] Guenther Koehne, Katherine M Smith, Teresa L Ferguson, Roxanne Y Williams, Glenn Heller, Eric G Pamer, Bo Dupont, and Richard J O'Reilly. Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein-Barr virus-specific and alloreactive T cells detected by intracellular interferon-gamma production and growth of cytotoxic precursors. *Blood*, 99(5):1730–1740, 2002.
- [52] Stefan Kostense, Kristin Vandenberghe, Jeanine Joling, Debbie Van Baarle, Nening Nanlohy, Erik Manting, and Frank Miedema. Persistent numbers of tetramer+ CD8(+) T cells, but loss of interferon-gamma+ HIV-specific T cells during progression to AIDS. *Blood*, 99(7):2505–2511, 2002.
- [53] Lauri L Laichalk, Donna Hochberg, Gregory J Babcock, Richard B Freeman, and David A Thorley-Lawson. The dispersal of mucosal memory B cells: evidence from persistent EBV infection. *Immunity*, 16(5):745–754, 2002.
- [54] Lauri L Laichalk and David A Thorley-Lawson. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol*, 79(2):1296–1307, 2005.
- [55] J B Lawrence, C A Villnave, and R H Singer. Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping in situ: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell*, 52(1):51–61, 1988.

- [56] S P Lee, W A Thomas, R J Murray, F Khanim, S Kaur, L S Young, M Rowe, M Kurilla, and A B Rickinson. HLA A2.1-restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein-Barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein LMP2. *J Virol*, 67(12):7428–7435, 1993.
- [57] S P Lee, R J Tierney, W A Thomas, J M Brooks, and A B Rickinson. Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2: a potential target for CTL-based tumor therapy. *J Immunol*, 158(7):3325–3334, 1997.
- [58] Jerome Legoff, Corinne Amiel, Olivier Calissoni, Delphine Fromentin, Bakoliarisoa Rajoely, Nisen Abuaf, Eric Tartour, Willy Rozenbaum, Laurent Belec, and Jean-Claude Nicolas. Early impairment of CD8+ T cells immune response against Epstein-Barr virus (EBV) antigens associated with high level of circulating mononuclear EBV DNA load in HIV infection. *J Clin Immunol*, 24(2):125–134, 2004.
- [59] Anne Letsch and Carmen Scheibenbogen. Quantification and characterization of specific T-cells by antigen-specific cytokine production using ELISPOT assay or intracellular cytokine staining. *Methods*, 31(2):143–149, 2003.
- [60] K G Lucas, R L Burton, S E Zimmerman, J Wang, K G Cornetta, K A Robertson, C H Lee, and D J Emanuel. Semiquantitative Epstein-Barr virus (EBV) polymerase chain reaction for the determination of patients at risk for EBV-induced lymphoproliferative disease after stem cell transplantation. *Blood*, 91(10):3654–3661, 1998.
- [61] W Luttmann, K Bratke, M Küpper, and D Myrtek. *Der Experimentator: Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag, München, 1. Auflage, 2004.
- [62] A B Lyons. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*, 243(1-2):147–154, 2000.
- [63] Maryline Mancini-Bourgine, Helene Fontaine, Daniel Scott-Algara, Stanislas Pol, Christian Brechot, and Marie-Louise Michel. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology*, 40(4):874–882, 2004.
- [64] Tumelo Mashishi and Clive M Gray. The ELISPOT assay: an easily transferable method for measuring cellular responses and identifying T cell epitopes. *Clin Chem Lab Med*, 40(9):903–910, 2002.

- [65] Susanne Maurmann, Lutz Fricke, Hans-Joachim Wagner, Peter Schlenke, Holger Hennig, Jurgen Steinhoff, and Wolfram J Jabs. Molecular parameters for precise diagnosis of asymptomatic Epstein-Barr virus reactivation in healthy carriers. *J Clin Microbiol*, 41(12):5419–5428, 2003.
- [66] DA McCarthy and MG Macey. *Cytometric Analysis of Cell Phenotype and Function*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1st edition, 2001.
- [67] Slavoljub Milosevic, Uta Behrends, Dinesh Adhikary, and Josef Mautner. Identification of major histocompatibility complex class II-restricted antigens and epitopes of the Epstein-Barr virus by a novel bacterial expression cloning approach. *J Virol*, 80(21):10357–10364, 2006.
- [68] S M Morgan, G W Wilkinson, E Floettmann, N Blake, and A B Rickinson. A recombinant adenovirus expressing an Epstein-Barr virus (EBV) target antigen can selectively reactivate rare components of EBV cytotoxic T-lymphocyte memory in vitro. *J Virol*, 70(4):2394–2402, 1996.
- [69] R J Murray, M G Kurilla, J M Brooks, W A Thomas, M Rowe, E Kieff, and A B Rickinson. Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med*, 176(1):157–168, 1992.
- [70] V Novitsky, H Cao, N Rybak, P Gilbert, M F McLane, S Gaolekwe, T Peter, I Thior, T Ndung’u, R Marlink, T H Lee, and M Essex. Magnitude and frequency of cytotoxic T-lymphocyte responses: identification of immunodominant regions of human immunodeficiency virus type 1 subtype C. *J Virol*, 76(20):10155–10168, 2002.
- [71] N Obel, M Hoier-Madsen, and H Kangro. Serological and clinical findings in patients with serological evidence of reactivated Epstein-Barr virus infection. *APMIS*, 104(6):424–428, 1996.
- [72] D A Payne, S K Mehta, S K Tyring, R P Stowe, and D L Pierson. Incidence of Epstein-Barr virus in astronaut saliva during spaceflight. *Aviat Space Environ Med*, 70(12):1211–1213, 1999.
- [73] D L Pierson, R P Stowe, T M Phillips, D J Lugg, and S K Mehta. Epstein-Barr virus shedding by astronauts during space flight. *Brain Behav Immun*, 19(3):235–242, 2005.

- [74] J K Preiksaitis, F Diaz-Mitoma, F Mirzayans, S Roberts, and D L Tyrrell. Quantitative oropharyngeal Epstein-Barr virus shedding in renal and cardiac transplant recipients: relationship to immunosuppressive therapy, serologic responses, and the risk of post-transplant lymphoproliferative disorder. *J Infect Dis*, 166(5):986–994, 1992.
- [75] A B Rickinson and E Kieff. *Fields Virology*, volume 2, chapter 75: Epstein-Barr Virus. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 4th edition, 2001.
- [76] A B Rickinson and D J Moss. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol*, 15:405–431, 1997.
- [77] F H Rininsland, T Helms, R J Asaad, B O Boehm, and M Tary-Lehmann. Granzyme B ELISPOT assay for ex vivo measurements of T cell immunity. *J Immunol Methods*, 240(1-2):143–155, 2000.
- [78] O Sarid, O Anson, A Yaari, and M Margalith. Epstein-Barr virus specific salivary antibodies as related to stress caused by examinations. *J Med Virol*, 64(2):149–156, 2001.
- [79] X Saulquin, C Ibisch, M A Peyrat, E Scotet, M Hourmant, H Vie, M Bonneville, and E Houssaint. A global appraisal of immunodominant CD8 T cell responses to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus by bulk screening. *Eur J Immunol*, 30(9):2531–2539, 2000.
- [80] L Schaade, M Kleines, and M Hausler. Application of virus-specific immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA antibody detection with a polyantigenic enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Epstein-Barr virus infections in childhood. *J Clin Microbiol*, 39(11):3902–3905, 2001.
- [81] C Schuster, S Chasserot-Golaz, and G Beck. Activation of Epstein-Barr virus promoters by a growth-factor and a glucocorticoid. *FEBS Lett*, 284(1):82–86, 1991.
- [82] J D Sedgwick and P G Holt. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods*, 57(1-3):301–309, 1983.
- [83] Peter Silvera, Jay R Savary, Virginia Livingston, Jessica White, Kelledy H Manson, Michael H Wyand, Peter L Salk, Ronald B Moss, and Mark G Lewis. Vaccination with

- gp120-depleted HIV-1 plus immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides in incomplete Freund's adjuvant stimulates cellular and humoral immunity in rhesus macaques. *Vaccine*, 23(6):827–839, 2004.
- [84] H M Spiegel, G S Ogg, E DeFalcon, M E Sheehy, S Monard, P A Haslett, G Gillespie, S M Donahoe, H Pollack, W Borkowsky, A J McMichael, and D F Nixon. Human immunodeficiency virus type 1- and cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes can persist at high frequency for prolonged periods in the absence of circulating peripheral CD4(+) T cells. *J Virol*, 74(2):1018–1022, 2000.
- [85] Martin S Staeger, Steven P Lee, Teresa Frisan, Josef Mautner, Siegfried Scholz, Alexander Pajic, Alan B Rickinson, Maria G Masucci, Axel Polack, and Georg W Bornkamm. MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(7):4550–4555, 2002.
- [86] N M Steven, N E Annels, A Kumar, A M Leese, M G Kurilla, and A B Rickinson. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med*, 185(9):1605–1617, 1997.
- [87] R P Stowe, D L Pierson, and A D Barrett. Elevated stress hormone levels relate to Epstein-Barr virus reactivation in astronauts. *Psychosom Med*, 63(6):891–895, 2001.
- [88] Masanori Terajima, John Cruz, Gregory Raines, Elizabeth D Kilpatrick, Jeffrey S Kennedy, Alan L Rothman, and Francis A Ennis. Quantitation of CD8+ T cell responses to newly identified HLA-A*0201-restricted T cell epitopes conserved among vaccinia and variola (smallpox) viruses. *J Exp Med*, 197(7):927–932, 2003.
- [89] D A Thorley-Lawson. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol*, 1(1):75–82, 2001.
- [90] D A Thorley-Lawson and G J Babcock. A model for persistent infection with Epstein-Barr virus: the stealth virus of human B cells. *Life Sci*, 65(14):1433–1453, 1999.
- [91] J W van Esser, B van der Holt, E Meijer, H G Niesters, R Trenschele, S F Thijsen, A M van Loon, F Frassoni, A Bacigalupo, U W Schaefer, A D Osterhaus, J W Gratama, B Lowenberg, L F Verdonck, and J J Cornelissen. Epstein-Barr virus (EBV) reactivation is a frequent event after allogeneic stem cell transplantation (SCT) and quantitatively predicts EBV-lymphoproliferative disease following T-cell-depleted SCT. *Blood*, 98(4):972–978, 2001.

- [92] Hans-Joachim Wagner, Lars Fischer, Wolfram J Jabs, Meike Holbe, Klaus Pethig, and Peter Bucszy. Longitudinal analysis of Epstein-Barr viral load in plasma and peripheral blood mononuclear cells of transplanted patients by real-time polymerase chain reaction. *Transplantation*, 74(5):656–664, 2002.
- [93] Q Y Yao, A B Rickinson, and M A Epstein. A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer*, 35(1):35–42, 1985.
- [94] Ming Ye, Suha Kasey, Sumit Khurana, Nga T Nguyen, Scott Schubert, C Thomas Nugent, Kristine Kuus-Reichel, and Johannes Hampl. MHC class II tetramers containing influenza hemagglutinin and EBV EBNA1 epitopes detect reliably specific CD4(+) T cells in healthy volunteers. *Hum Immunol*, 65(5):507–513, 2004.
- [95] R M Zinkernagel. Localization dose and time of antigens determine immune reactivity. *Semin Immunol*, 12(3):163–171, 2000.

Danksagung

Mit dem Abschluß der vorliegenden Arbeit möchte ich einigen Personen danken, die am Gelingen wesentlichen Anteil hatten.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater PD Dr. med. Wolfram J. Jabs für das interessante und fesselnde Thema danken, für die tolle und konstruktive Zusammenarbeit, sein fortdauerndes Engagement sowie für die zahlreichen Opernbesuche.

Daneben gilt mein besonderer Dank Herrn PD Dr. med Peter Schlenke aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, dessen Wohlwollen und Kooperationsbereitschaft ich den Zugang zu den Thrombozytapheresespendern verdanke, die an dieser Studie teilgenommen haben, sowie die Möglichkeit, die gewonnenen Proben an einem Durchflußzytometer im immunologischen Institut zu messen.

Den Mitarbeitern im nephrologischen Labor, namentlich Frau Dr. rer. nat. Ursula Fagin, Frau Annette Willemsen, Frau Maren Behrensen und Frau Sabine Stark, bin ich für an- und ausdauernde Hilfe, für die fundierte Einführung in verschiedenste Arbeitstechniken sowie für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre zu Dank verpflichtet.

Bei den Mitarbeitern der Blutspendezentrale bedanke ich mich für ihre Unterstützung bei der Organisation der Blutproben. Ferner gilt mein Dank den Teilnehmern dieser Studie, ohne deren bereitwillige Mithilfe diese Arbeit nicht durchführbar gewesen wäre.

Besonderen Dank schulde ich schließlich auch meinen Eltern, auf deren Unterstützung ich mich in jeder Hinsicht verlassen konnte.