

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

Die spezifische T-Zellantwort gegen das humane Herpesvirus 6B



Larissa Martin

aus

Gräfelfing

2013

Erklärung

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

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

Dissertation eingereicht am 12.03.2013

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

Mündliche Prüfung am 29.07.2013

Im Rahmen meiner Arbeit hat sich folgende Publikation ergeben:

Martin LK, Schub A, Dillinger S, Moosmann A (2012) Specific CD8(+) T cells recognize human herpesvirus 6B. *European Journal of Immunology* **42**: 2901-2912

In Vorbereitung:

Martin LK, Moosmann A. Cross-Sectional Analysis of CD8+ T Cell Responses to Human Herpesvirus 6B. In preparation

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Das Immunsystem	3
2.1.2 MHC-Moleküle	5
2.1.3 Der T-Zellrezeptor	7
2.2 Die Familie der Herpesviren	8
2.2.1 Morphologie der β -Herpesviren	10
2.2.2 Das humane Herpesvirus 6A und 6B	11
2.3 Aufgabenstellung	17
3. Material	19
3.1 Zellen und Zelllinien	19
3.1.1 Primäre Zellen	19
3.1.2 Zelllinien	20
3.1.3 Bakterienstämme	21
3.2 Viren	21
3.3 Plasmide	22
3.4 Oligonukleotide	22
3.4.1 Primer für das T-Zellrezeptor-Repertoire	22
3.4.2 Primer zur Klonierung der TCR α - und TCR β -Gene	
in den retroviralen Vektor MP71Gpre	24
3.4.3 Primer für RT-PCR	24
3.5 Peptide	25
3.6 Peptid/HLA-Multimere Multimere und Antikörper	29
3.6.1 Peptid/HLA-Multimere Multimere	29
3.6.2 Antikörper	31
3.7 Puffer und Stammlösungen	31
3.8 Kits	32
3.9 Chemikalien und Enzyme	32
3.9.1 Zytokine	33
3.9.2 Medien und Zusätze für eukaryotische Zellen	33
3.9.3 Medien und Zusätze für prokaryotische Zellen	33
3.9.4 Inhibitoren	33
3.10 Dienstleistungen	33
3.11 Computerprogramme und Internetseiten	34
3.12 Verbrauchsmaterial	34
3.13 Geräte	35
4. Methoden	36
4.1 Zellkulturmethoden	36
4.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden	36
4.1.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien	36
4.1.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	36
4.1.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl	36
4.1.1.3 Generierung von CD40-aktivierten B-Blasten (BBL)	37
4.1.1.4 Sammlung und Lagerung von Patientenmaterial	37

4.1.2 Isolierung von peripheren mononuklearen Zellen aus	
Vollblut mittels Dichtezentrifugation	38
4.1.3 Herstellung polyklonaler T-Zelllinien	38
4.1.4 Einzelzellklonierung	39
4.1.5 Durchflußzytometrie	39
4.1.6 Magnetische Separation von T-Zellpopulationen	40
4.1.7 Enzyme-Linked-immuno-Sorbent-Assay (ELISA)	40
4.1.8 ELISpot (enzyme-linked immunosorbent spot assay)	41
4.1.9 Infektion von Zellen mit HHV-6	42
4.1.9.1 HHV-6-Propagierung	42
4.1.9.2 Infektion von PHA-Blasten zur Herstellung als	
Zielzellen für die T-Zellanalyse	42
4.1.10 Analyse des T-Zellrezeptors	42
4.1.11 Klonierung des T-Zellrezeptors in den	
retroviralen Vektor MP71Gpre	43
4.1.12 Retroviraler TCR-Transfer	44
4.1.12.1 Herstellung von Retroviruspartikeln	44
4.1.12.2 Transfektion von T-293 mittels PEI	44
4.1.12.3 Transduktion von Jurkat76-CD8 α	45
4.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen	45
4.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien	45
4.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> DH5 α	
nach der CaCl ₂ Methode	45
4.2.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien	46
4.3 Molekularbiologische Methoden	46
4.3.1 Isolierung von RNA	46
4.3.2 Quantifizierung und Reinheit der isolierten RNA	47
4.3.3 DNase Verdau von RNA	47
4.3.4 cDNA Herstellung	47
4.3.5 RT-PCR	48
4.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA	50
4.3.6.1 Miniprep	50
4.3.6.2 Maxiprep	50
4.3.7 Restriktionsverdau von DNA	50
4.3.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA	51
4.3.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	51
4.3.10 Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen	51
4.3.11 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford-Reagenz	51
4.3.12 Dot Blot	52
5. Ergebnisse	53
5.1 T-Zellantworten gegen Epitope aus U11, U54 und U90	54
5.1.1 Auswahl der Kandidaten-Epitope	54
5.1.2 Analyse der Präsentation von U54 gegenüber spezifischen	
CD8 ⁺ -T- Zellen	56
5.1.3 Ex-vivo-Analyse der Häufigkeit von U54- und U11-spezifischen	
T-Zellen	59
5.2 Analyse der T-Zellantwort gegen das Strukturprotein U54	61
5.2.1 Ex vivo Analysen zum Überblick über die Häufigkeit	
HHV-6-spezifischer T-Zellen	61

5.2.2 Anreicherung U54-spezifischer T-Zellen	63
5.2.3 Einzelzellklonierung der U54-spezifischen T-Zelllinien	65
5.2.4 Identifizierung von T-Zellepitopen im Antigen U54	65
5.2.5 Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone	
gegenüber virusinfizierten T-Zellen	71
5.3 Querschnittanalyse der HHV-6B-spezifischen CD8-T- Zellantwort	
gegen alle Antigenklassen	74
5.3.1. Auswahl von HHV6-Peptiden	74
5.3.2 Erster Überblick über die Häufigkeit von HLA-B*0801	
-restringierten HHV-6B-spezifischen T-Zellen	75
5.3.3 Charakterisierung der HHV-6-spezifischen T-Zellklone	80
5.3.4 Bestimmung der funktionellen Avidität der T-Zellklone	85
5.3.5 Bestimmung der HLA-Restriktion	86
5.3.6 Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone	
gegenüber virusinfizierten T-Zellen	88
5.3.7 Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone gegenüber	
virusinfizierten T-Zellen unter Einfluss von Inhibitoren	90
5.3.8 Analyse und Gentransfer von HHV-6-spezifischen	
T-Zellrezeptoren	95
5.3.9 Antigenexpression im Verlauf der HHV-6B-Infektion in vitro	97
5.3.10 Untersuchung der Transkriptionsniveaus verschiedener	
HHV-6B-Gene in infizierten Zellen	100
5.3.11 Analyse der Häufigkeiten von HHV-6-spezifischen T-Zellen	
im Blut gesunder Virusträger	102
5.3.12 Häufigkeiten der HHV-6-spezifischen Zellen in Adenoiden	107
6. Diskussion	109
7. Abkürzungen	127
8. Referenzen	129
9. Danksagung	143
10. Lebenslauf	144

1. Zusammenfassung

Die Kontrolle menschlicher Herpesviren wie EBV oder CMV erfordert die Aufrechterhaltung eines vielfältigen Repertoires von virusspezifischen T-Zellen. In Analogie zu diesen Viren ist die latente Infektion mit dem humanen Herpesvirus 6B bei gesunden Trägern weit verbreitet, das Virus kann aber reaktivieren und zu schweren Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten führen. Obwohl dies nahelegt, dass die Infektion mit HHV-6B und seinem weniger verbreiteten Verwandten HHV-6A unter kontinuierlicher T-Zell-Kontrolle steht, ist bis jetzt wenig über die HHV-6-spezifische T-Zell-Antwort bekannt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Fragen zur Erkennung von HHV-6 modellhaft bearbeitet, mit in Pilotexperimenten bereits etablierten HHV-6B-spezifischen T-Zellklonen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die T-Zellerkennung durch U54-spezifische T-Zellen von der Virusreplikation abhängt und zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion unterschiedlich stark ausfällt. HLA-A*0201-restringierte U54-spezifische CD8⁺-T-Zellen erkannten nur HHV-6B, jedoch nicht HHV-6A, obwohl ihre Zielepitope vollständig oder weitgehend konserviert waren, was auf unterschiedliche Mechanismen der Immunevasion der beiden Virusspezies hinwies.

Im zweiten Teil wurde die T-Zellantwort gegen das Tegumentprotein U54 umfassend untersucht. Dafür wurde eine das komplette Protein überdeckende Peptidbibliothek verwendet. Mit ihrer Hilfe wurden U54-spezifische T-Zellen aus peripherem Blut angereichert und spezifische T-Zellklone generiert. Neun verschiedene Teilsequenzen von U54 konnten als T-Zellepitope identifiziert werden, darunter 7 CD8⁺-T-Zellepitope unterschiedlicher HLA-Restriktion und zwei CD4⁺-T-Zellepitope. Alle getesteten U54-spezifischen T-Zellklone erkannten HHV-6B-infizierte Zielzellen, dieses Antigen wird im Verlauf der Infektion also auf MHC Klasse I und II präsentiert.

Im dritten Teil wurde eine Querschnittsanalyse der Zielantigene der HHV-6B-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort durchgeführt, mit HLA-B*0801 als modellhaft gewähltem MHC-Klasse-I-Allel. 299 Peptide als potenzielle T-Zellepitope aus 79 verschiedenen HHV-6B-Proteinen wurden auf ihre Fähigkeit getestet, spezifische T-Zellantworten zu induzieren. 25 Peptide aus 19 Proteinen wurden von spezifischen T-Zellen erkannt. Für einen Teil dieser T-Zellen konnte die Erkennung virusinfizierter Zellen analysiert werden: 13 von 17 Epitopen wurden von HHV-6B-infizierten Zielzellen präsentiert und von T-Zellen erkannt, 8 von 8 Epitopen von HHV-6A-infizierten

Zellen. Antigene aus verschiedenen Phasen des viralen Replikationszyklus wurden erkannt, wie das IE-1 Protein, die virale DNA-Polymerase oder das Tegumentprotein U31 als Vertreter der späten Phase. Die Evasion von HHV-6A gegenüber der CD8⁺-T-Zellerkennung war also allelspezifisch, sie wirkte sich auf HLA-A*0201-restringierte T-Zellen, aber nicht auf HLA-B*0801-restringierte T-Zellen aus. Mittels HLA/Peptid-Multimerfärbung konnten HLA-B*0801-restringierte HHV-6-spezifische T-Zellen im Blut gesunder Virusträger regelmäßig detektiert werden. Diese T-Zellen waren im Vergleich zu anderen herpesvirusspezifischen T-Zellen von geringerer Häufigkeit, jedoch von größerer Breite der Antigenerkennung.

Demnach setzt sich das HHV-6-spezifische CD8⁺- T-Zell-Repertoire aus vielen unterschiedlichen Epitopspezifitäten zusammen, ohne offensichtliche Immundominanz einzelner Epitope. Darüber hinaus werden unterschiedliche Klassen von Antigenen im Rahmen einer Infektion präsentiert und erkannt. Somit sollte ein Immunomonitoring und eine T-Zelltherapie von HHV-6 bevorzugt in einem multiepitop-spezifischen Ansatz durchgeführt werden.

2. Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Aufgrund des permanenten Kontaktes und Stoffaustausches mit seiner Umwelt muss sich der menschliche Organismus vor schädlichen Stoffen und Krankheitserregern schützen. Diese Aufgabe übernimmt das Immunsystem, welches aus einem äußerst komplexen Netzwerk von Molekülen und Zellen besteht. Voraussetzung für diesen effektiven Schutz des Organismus ist die Fähigkeit, körpereigene von körperfremden oder veränderten Strukturen unterscheiden zu können, um diese gezielt anzugreifen, damit sich die Immunreaktionen nicht gegen Bestandteile des gesunden Organismus richten. Die vielfältigen Schutzmechanismen des Immunsystems lassen sich in die unspezifische angeborene Immunantwort und die spezifische erworbene Immunantwort einteilen. Hierbei beruht die Mehrzahl der vom Immunsystem erbrachten Leistungen auf einer engen Zusammenwirken dieser beiden Systeme.

Das **angeborene Immunsystem** wird in der Initialphase nach Eintritt eines Mikroorganismus in den Körper aktiv. Zu diesem evolutionär älteren Teil des Immunsystems gehören physiologische Barrieren (z.B. die Haut), Makrophagen, Granulozyten, dendritische Zellen (DCs), Mastzellen und natürliche Killerzellen. Des Weiteren sind lösliche Mediatoren wie Zytokine und Chemokine ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort. Diese rufen lokale und systemische Gefäß- und Gewebereaktionen hervor (Aderem & Underhill, 1999), induzieren Chemotaxis und bilden somit den Übergang zum erworbenen Immunsystem (Janeway & Medzhitov, 2000; Kadowaki et al, 2000). Die Erkennung von pathogenen Strukturen durch das angeborene Immunsystem erfolgt mit Hilfe von Rezeptoren, den pattern recognition receptors (PRRs). Diese Rezeptoren erkennen konservierte Struktur motive auf pathogenen Mikroorganismen, welche nicht auf Eukaryonten zu finden sind. (Aderem & Ulevitch, 2000; Ezekowitz et al, 1990; Gordon, 1995; Janeway, 1989; Medzhitov & Janeway, 2000). Das angeborene Immunsystem gehört von Geburt an zur Grundausstattung des menschlichen Körpers, zeigt eine geringe Spezifität und bildet kein immunologisches Gedächtnis aus.

Die **adaptive Immunantwort**, die sich im Unterschied zur angeborenen Immunabwehr erst bei dem Zusammentreffen mit dem Pathogen ausbildet, ist hochspezifisch und verfügt über die Fähigkeit zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das eine schnellere und effizientere Abwehr desselben Erregers bei einer erneuten Infektion bewirkt.

Es lässt sich darüber hinaus in einen humoralen und zellulären Anteil unterteilen. Bei beiden Systemen der adaptiven Immunantwort erfolgt die Pathogenerkennung durch eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren. Diese Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptoren, B-Zell-Rezeptoren, bzw. Antikörper) gehören der Superfamilie der Immunglobuline an und werden durch somatische Rekombination von verschiedenen Genfragmenten gebildet (Davis & Bjorkman, 1988; Tonegawa, 1983; Tonegawa, 1988).

Das **humorale** Immunsystem dient vor allem der Eliminierung von extrazellulären Mikroorganismen und wird durch lösliche Antikörpermoleküle vermittelt, die von B-Lymphozyten produziert und sezerniert werden (Jelinek & Lipsky, 1987). Die Molekülstruktur der Antikörper entspricht einem Y, bestehend aus zwei identischen Paaren von schweren und leichten Polypeptidketten, die jeweils eine variable (V) und eine konstante (C) Region besitzen. Die variable Region enthält die CDR (*complementarity-determining regions*), welche den spezifischen Kontakt zum Antigen vermitteln. Die Immunglobuline neutralisieren entweder das Antigen direkt oder markieren dieses für Aufnahme oder Abbau durch humorale und zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems.

Für die **zelluläre** Immunantwort sind hauptsächlich T-Zellen verantwortlich, die für die Eliminierung von intrazellulären Krankheitserregern, die für Antikörper folglich unerreichbar sind, sorgen. Die T-Lymphozyten haben ihren Ursprung im Knochenmark und wandern anschließend in den Thymus, wo ihre Reifung und Selektion stattfindet. Die reifen T-Zellen zirkulieren anschließend als naive T-Zellen solange zwischen Blut und Lymphsystem, bis sie auf ihr spezifisches Antigen treffen. Nach Erkennung ihres Antigens beginnen sie zu proliferieren und differenzieren zu einer Effektorzelle. Die T-Zellen lassen sich in zwei Hauptklassen unterteilen: die zytotoxischen T-Zellen und die T-Helferzellen (Mosmann & Coffman, 1989; Mosmann et al, 1997). Kennzeichen der meisten zytotoxischen T-Zellen ist die Expression des CD8-Rezeptors auf ihrer Oberfläche. Dadurch erkennen sie zusammen mit dem T-Zellrezeptor an **MHC I** (Major Histocompatibility Complex) gebundene Antigene auf der Zelloberfläche infizierter Zielzellen. CD4+-T-Zellen, die sogenannten T-Helferzellen, eliminieren Pathogene in der Regel nicht direkt, sondern wirken indirekt über die Sekretion von Zytokinen bzw. über die Stimulation anderer Immunzellen. Die Erkennung der Antigene erfolgt hierbei über die Präsentation über **MHC II**-Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen. Nach Aktivierung erfolgt die Differenzierung zu zwei Typen von Effektorzellen, den TH₁- bzw. TH₂ -Zellen (O'Garra & Arai, 2000). Die Th₁-Zellen sezernieren Interleukin 2 (IL-2), Interferon- γ (IFN- γ)

und Tumornekrosefaktor- β (TNF- β) und aktivieren dadurch Makrophagen (Munoz-Fernandez et al., 1992; Stout and Bottomly, 1989) und unterstützen darüber hinaus die Aktivierung zytotoxischer T-Zellen (Andreasen et al, 2000). Th₂-Zellen dagegen aktivieren B-Zellen (Parker, 1993). Durch die Produktion der Interleukine 4, 5 und 13 (Jonuleit & Schmitt, 2003; Robinson DS, 2002) verstärken sie dadurch die Antikörperproduktion (Croft & Swain, 1991; Depoil et al, 2005).

2.1.2 MHC-Moleküle

Um ihrer Rolle gerecht zu werden, ist die zelluläre und zum Teil auch die humorale Immunantwort von bestimmten membranständigen Glykoproteinen abhängig. Diese Glykoproteine werden allgemein als MHC-Moleküle, beim Menschen als humane Leukozytenantigene (HLA) bezeichnet und präsentieren T-Lymphozyten Antigenfragmente extrazellulärer bzw. zytosolischer Proteine. Sie werden von einem Cluster von Genen, dem Major histocompatibility complex (MHC), der auf dem Chromosom 6 lokalisiert ist kodiert. Allgemein lassen sich die MHC-Moleküle nach Struktur und Funktion in zwei Klassen unterteilen. So findet man MHC-Klasse-I-Moleküle auf beinahe allen zellkernhaltigen Zellen, dagegen werden MHC Klasse II-Moleküle im allgemeinen nur von spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen, wie beispielsweise B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen, exprimiert. In der Bevölkerung sind eine Vielzahl verschiedener Allele für die meisten der HLA-Gene, wie in Tabelle 2.1 dargestellt, zu finden.

Tab. 2.1 Polymorphismus der humanen MHC-Gene (Holdsworth et al, 2009)

Gen	MHC I			MHC II					
	A	B	C	DP α	DP β	DQ α	DQ β	DR α	DR β
Anzahl der Allele	965	1.543	626	28	138	35	107	3	855

Die HLA-Moleküle zeigen den am stärksten ausgeprägten Polymorphismus im Genom des Menschen. Dies hat zu Folge, dass sich die Gesamtheit der HLA-Allele, der HLA-Typ, zwischen einzelnen Individuen fast immer unterscheidet, und somit die HLA-Moleküle auch als eine Art körpereigener „Antigene“ bezeichnet werden können. Somit kommt ihnen auch eine entscheidende Rolle bei der Organ- und Stammzelltransplantation zu (Davis et al, 1998; Snell, 1964). MHC-I-Moleküle (Bjorkman et al, 1987) bestehen aus einer schweren oder α -Kette, die

nicht-kovalent an das β_2 -Mikroglobulin, welches nicht im MHC codiert wird, gebunden ist. Die polymorphen Bereiche der α_1 und α_2 - Domänen bilden eine Peptidbindungstasche, in die in der Regel Peptide einer Länge von 8 bis 11 Aminosäuren passen. Die α_3 -Domäne ist nicht variabel und enthält die Bindungsstelle für den Korezeptor CD8. MHC-II-Moleküle setzen sich aus zwei Ketten zusammen, einer α - und einer β -Kette. Hierbei bilden die variablen Bereiche beider Ketten (α_1 und β_1) die Peptidbindungstasche für Antigenfragmente einer Länge zwischen etwa 10 und 30 Aminosäuren. Die β_2 - Domäne ist nicht polymorph und stellt die Bindungsstelle für den Korezeptor CD4 dar. Die Peptidbindungstaschen der einzelnen HLA-Allelprodukte weisen jeweils charakteristische chemische Strukturen auf. Dies hat zur Folge, dass Antigenfragmente, die an ein bestimmtes HLA-Allel binden, strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. Daraus ergibt sich für jedes Allel ein Bindemotiv (Falk et al, 1991; Rammensee et al, 1993), das Länge und Besetzung der für die Bindung entscheidenden Positionen eines als Ligand geeigneten Peptids beschreibt. Die Entwicklung eines Elutionsverfahrens für MHC-gebundene Peptide und anschließende Sequenzierung des erhaltenen Gemisches (Falk et al, 1991; Stevanovic & Jung, 1993) ermöglichte die Identifizierung der entsprechenden Bindungsmotive vieler MHC-Allele. Ein alternativer Ansatz besteht in der Analyse der Bindung künstlicher Peptide unterschiedlicher Sequenz an MHC-Moleküle (Deng Y, 1997).

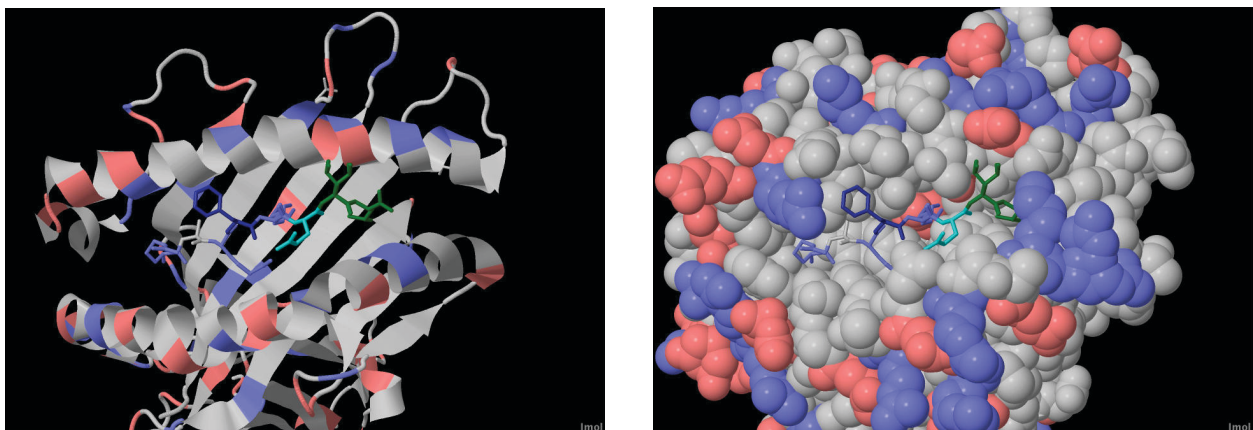


Abb. 2.2: Aufsicht auf die Bindungsfurche eines Peptid-MHC-Komplexes. Sekundärstruktur (links) und Atommodell (rechts) eines MHC-I-Komplexes mit dem gebundenen HLA-B*0801-restringierten EBV-spezifischen Epitop RAK. (basische Aminosäuren: blau; saure Aminosäuren: rot; dargestellt mit Hilfe von Jmol)
Quelle: Protein Data Bank: Gras, S.; Rossjohn, J.; DOI:10.2210/pdb3spv/pdb

2.1.3 Der T-Zellrezeptor

Die Spezifität und Reaktivität von T-Zellen ist begründet in ihrem T-Zellrezeptor (TCR), den sie auf der Oberfläche tragen. Der TCR ist ein Heterodimer, das aus zwei durch eine Disulfidbrücke verbundenen, membranständigen Glykoproteinketten besteht und zu der Immunglobulin-Superfamilie gehört. 95 % der T-Lymphozyten exprimieren einen α/β -TCR, 5 % einen γ/δ -TCR. Die strukturelle Ähnlichkeit zu membranständigen Fab-Fragmenten eines Antikörpers (Garboczi et al, 1996) zeigt sich in der Zusammensetzung aus zwei konstanten ($C\alpha/ C\beta$) und zwei variablen ($V\alpha/ V\beta$) Regionen.

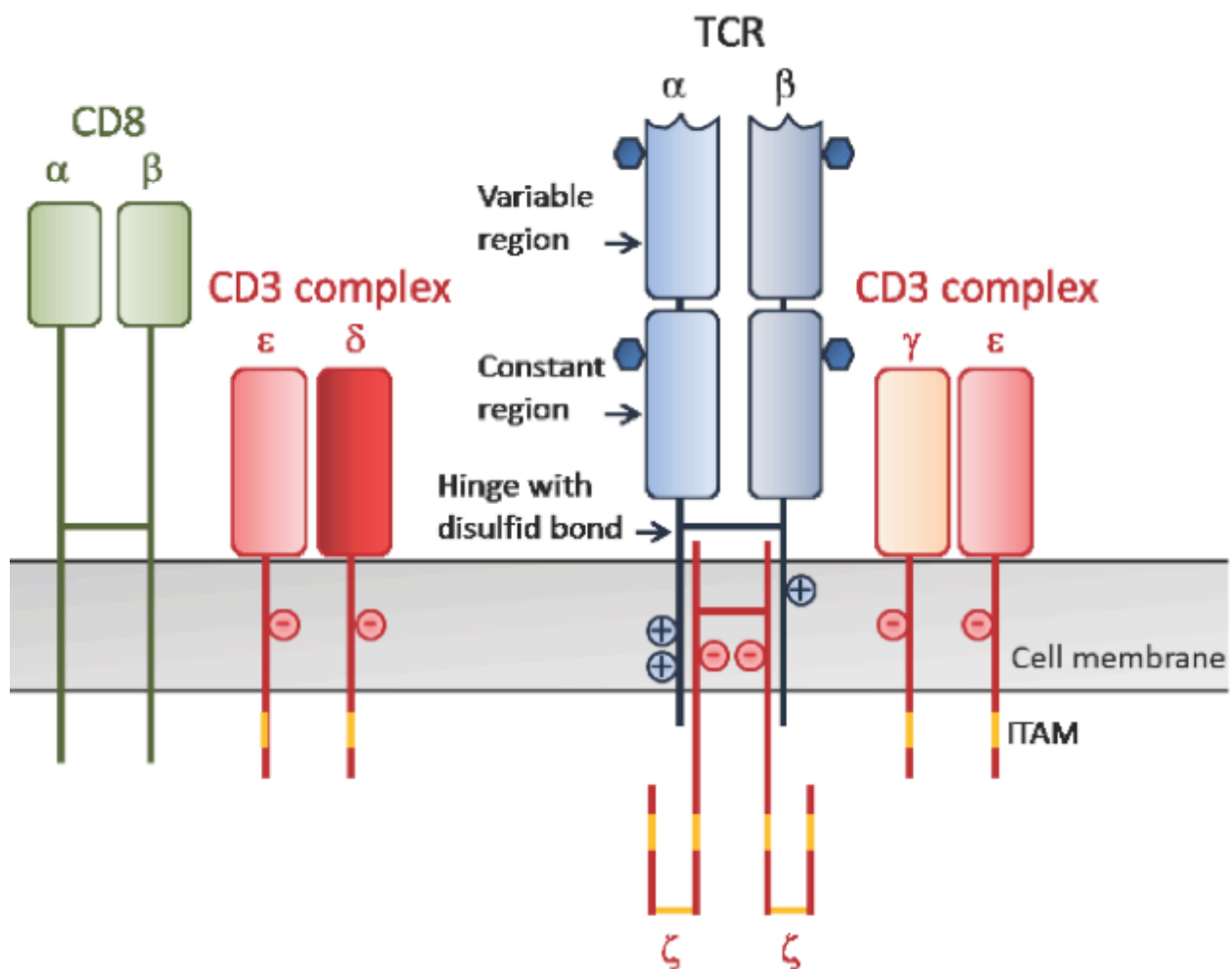


Abbildung 2.3 T-Zellrezeptorkomplex mit CD8-Korezeptor. Dargestellt ist ein T-Zellrezeptor- $\alpha\beta$ -Heterodimer, das im Bereich der Antigenerkennung hoch variabel ist. Er besteht aus einer variablen Domäne (V), konstanten Domäne (C), einem Gelenk, einer Transmembrandomäne und einem zytosomatischen Ende. Die Signalleitung ins Zytoplasma erfolgt durch invariable akzessorische Ketten, dem CD3-Komplex, bestehend aus einem $\epsilon\gamma$ - und einem $\epsilon\delta$ -Heterodimer. Zusätzlich ist ein ζ -Homodimer assoziiert. Diese Ketten besitzen ITAM-Motive (ITAM: *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*).

Der T-Zellrezeptor kann auch als $\alpha\alpha$ -Homodimer vorliegen (modifiziert nach Murphy (Janeway's), 2008).

Auf genomischer Ebene werden die variablen (V-)Regionen durch V-/J- Elemente (V = variable; J = joining) kodiert. Diese werden bei V β zusätzlich durch das D-Element (D = diversity) ergänzt (Rowen et al, 1996). Der α -Genlocus besteht aus 70 bis 80 V-, 61 J- und einem C-Gensegment, der β -Genlocus aus 52 V-, zwei D-, 13 J- und zwei C- Gensegmenten. Durch Genumlagerung und Rekombination zufällig ausgewählter Gensegmente entstehen Kombinationen von jeweils einem Kettensegment jeder Region (α -Kette: VJ, β -Kette: VDJ). Darüber hinaus wird eine zusätzliche Diversität durch den Templat-unabhängigen Einbau von Nukleotiden während der Genumlagerung erreicht. Für die Aktivierung der T-Zellen ist der CD3-Komplex notwendig. Der CD3-Komplex besteht aus 3 transmembranen Proteinen sowie den dimeren ζ -Ketten, die mit dem TCR an der Plasmamembran assoziiert sind. Die cytoplasmatischen Teile dieser CD3-Ketten bzw. ζ -Ketten enthalten sogenannte ITAM (engl. immunreceptor tyrosine-based activation motif), die mit Tyrosinkinasen in Wechselwirkung treten und so das Signal in das Zellinnere übertragen (Flaswinkel et al, 1995).

Das Zentrum der Antigenbindungstelle liegt innerhalb der CDR3-Region (complementary determining region 3). Diese Region wird von D- und J-Gensegmenten und den zufällig eingefügten Nukleotiden kodiert (Meier & Lewis, 1993).

2.2 Die Familie der Herpesviren

Die Familie der Herpesviridae gehört mit mehr als einhundert Spezies zu den größten im Reich der Viren. Sie sind mit einem Durchmesser von 150 bis 200 nm und einem doppelsträngigen linearen DNA-Genom, das für 100 bis über 200 Gene kodiert, unter den größten und komplexesten Viren. Zu den weiteren strukturellen Gemeinsamkeiten der Herpesviren zählen der Aufbau der Viruspartikel (ikosaedrische Kapsidsymmetrie sowie der Besitz einer Virushülle).

Weitere charakteristische Merkmale der Herpesviren sind der Besitz einer eigenen DNA-Polymerase für die virale Replikation und die Fähigkeit, nach der Primärinfektion latent im Organismus zu persistieren. Währenddessen lässt sich keine Virusproduktion nachweisen und die infizierte Zelle ist in ihrem Reproduktionsvermögen nicht beeinträchtigt. Dieser Zustand kann jedoch unterbrochen werden und in einen lytischen Infektionszyklus übergehen, dessen Folge vermutlich meist der Tod der Wirtszelle ist. Bisher sind 9 humane Vertreter der Familie der Herpesviridae bekannt. Sie lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen biologischen

Eigenschaften bezüglich Wirtsspektrum, die Dauer des Replikationszyklus sowie Pathogenität und Zelltropismus, in die drei Unterfamilien, α -, β - und γ -Herpesviridae, einteilen.

Tab. 2.4: Klassifikation der humanen Herpesviren

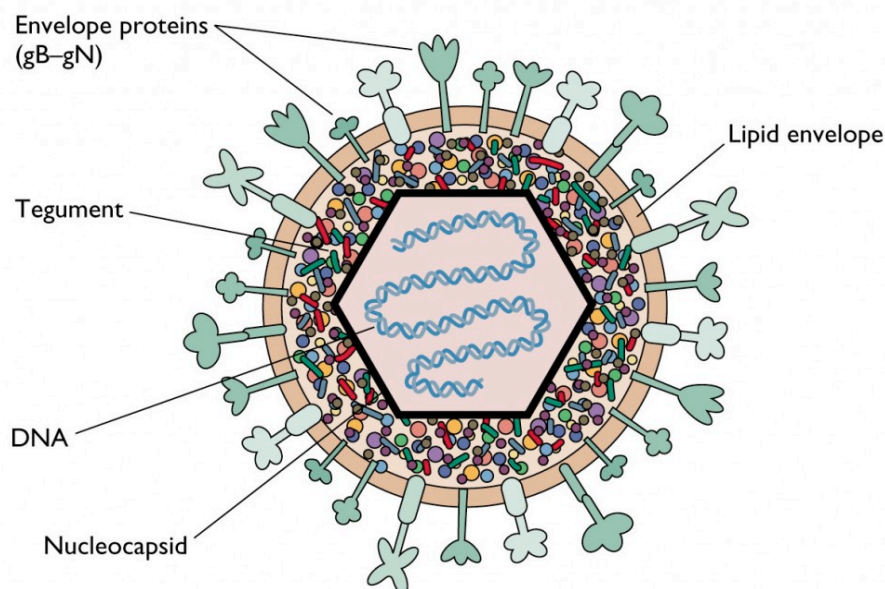
Unterfamilie	Gattung	Art	Kurzbezeichnung
α -Herpesviren	Simplexvirus	Herpes Simplex Virus 1 (Humanes Herpesvirus 1)	HSV-1 HHV-1
		Herpes Simplex Virus 2 (Humanes Herpesvirus 2)	HSV-2 HHV-2
	Varicellavirus	Varicella-Zoster-Virus (Humanes Herpesvirus 3)	VZV HHV-3
β -Herpesviren	Cytomegalievirus	Humanes Cytomegalievirus (Humanes Herpesvirus 5)	HCMV, CMV HHV-5
	Roseolovirus	Humanes Herpesvirus 6 A	HHV-6A
		Humanes Herpesvirus 6 B Humanes Herpesvirus 7	HHV-6B HHV-7
γ -Herpesviren	Lymphocryptovirus	Epstein-Barr-Virus (Humanes Herpesvirus 4)	EBV HHV-4
	Rhadinovirus	Karposi-Sarkom-Virus (Humanes Herpesvirus 8)	KSV HHV-8

Alphaherpesviren sind durch ein breites Wirtsspektrum, einen kurzen Replikationszyklus und eine schnelle Ausbreitung in Zellkultur mit effizienter Lyse der infizierten Zellen gekennzeichnet. Betaherpesviren sind dagegen durch ein eingeschränktes Wirtsspektrum und einen längeren Replikationszyklus charakterisiert. Sie breiten sich entsprechend langsam in der Zellkultur aus, wobei es zu einer charakteristischen Vergrößerung der infizierten Zellen (Zytomegalie) kommt. Die *Gammaherpesvirinae* haben meist ein enges Wirtsspektrum und unterschiedliche Vermehrungszyklen, im Gegensatz zu den anderen Vertretern der humanen Herpesviren sind die beiden humanen γ -Herpesviridae, EBV und KSHV, Tumolviren.

2.2.1 Morphologie der β -Herpesviren

Die Herpesviren können aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit im Elektronenmikroskop nicht voneinander unterschieden. Im Dünnschnitt sind vier Schichten voneinander abgrenzbar (Abb. 2.5). Im Innern des Viruspartikel befindet sich der Kern umgeben von dem Kapsid. Das Nukleokapsid, welches sich aus 162 Kapsomeren (150 Hexamere und 12 Pentamere) zusammensetzt, ist umgeben von einer amphipathischen Proteinschicht, dem Tegument. Das Tegument beinhaltet circa 20 verschiedene Proteine, die im Zuge der Infektion gemeinsam mit dem Kapsid in die Zielzelle gelangen und während der frühen Phase der Virusreplikation regulatorische Funktionen übernehmen. Die äußerste Schicht bildet die Virushülle, die aus einer Lipiddoppelschicht besteht. In diese Hülle sind zahlreiche Glykoproteine eingelagert, die im Elektronenmikroskop als „spikes“ erkennbar sind. Sie üben eine wichtige Funktion unter anderem bei der Adsorption an Zellrezeptoren, bei der Penetration und Aufnahme in die Wirtszelle aus.

Abb.2.5: Schematische Darstellung eines Herpesvirus.



Quelle: <http://www.twiv.tv/virology-101/>

2.2.2 Das humane Herpesvirus 6A und 6B

Das Humane Herpesvirus 6 (HHV-6) wurde 1986 bei der IL-2-Stimulation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (engl. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) von Patienten mit AIDS oder lymphoproliferativen Defekten entdeckt (Salahuddin et al, 1986). Dabei wurde in den Zellkulturen ein zytopathischer Effekt (CPE) beobachtet, der sich in einem „ballonartigen“ Aussehen der Zellen äußerte. Mittels Elektronenmikroskop wurde, als diesen CPE auslösendes Agens, ein Herpesvirus identifiziert. Bei seiner Erstbeschreibung wurde das Virus als humanes B-lymphotropes Virus (HBLV) bezeichnet (Salahuddin et al, 1986). Später zeigte sich allerdings, dass das Virus bevorzugt T-Lymphozyten infiziert und dort auch repliziert. Aus diesem Grund folgte die Umbenennung des Virus in Humanes Herpesvirus 6. Zunächst wurden HHV-6A und HHV-6B als zwei Varianten einer Virusspezies (HHV-6) betrachtet. Beide Gruppen sind genetisch nah verwandt. So unterscheiden sie sich auf DNA-Ebene in einigen Bereichen nur um 1-3%, während der Unterschied in anderen Bereichen 25% betragen kann. Allerdings kam es Anfang letzten Jahres, aufgrund der zahlreichen Unterschiede in genetischen, immunologischen und biologischen Eigenschaften (Ablashi et al, 1991; Mori & Yamanishi, 2007) sowie der Assoziation mit verschiedenen Krankheitsbildern (Braun et al, 1997; Di Luca et al, 1996), zur neuen Klassifizierung in 2 verschiedene Virusspezies (Adams., 2012).

Replikationszyklus

Der wichtigste Rezeptor für die Infektion durch HHV-6A und HHV-6B ist das Oberflächenmolekül CD46 (Santoro et al, 1999), das auf der Membran von allen kernhaltigen Zellen zu finden ist und an der Regulierung des Komplementsystems beteiligt ist (Liszewski et al, 1991). Dieses Glykoprotein dient unter anderem auch als Rezeptor für Impfstämme des Masernvirus (Dorig et al, 1993; Nanche et al, 1993). Hierbei erfolgt die Interaktion aber mit anderen Domänen des CD46 als bei HHV-6 (Greenstone et al, 2002).

Für HHV-6A wurde gezeigt, dass der gH-gL-gQ-Komplex als viraler Ligand für den humanen CD46-Rezeptor dient (Mori et al, 2003). Nach Bindung des Virus an seinen Rezeptor und gH-gL-gQ-vermittelte Fusion der Virushülle mit der Zellmembran, gelangt das Nucleokapsid durch das Cytoplasma zu den Kernporen, durch die das virale DNA-Genom in das Kernplasma transportiert wird. Die Transportmechanismen für HHV-6 sind im Detail noch nicht untersucht worden, jedoch wird angenommen dass sie den Mechanismen, die für HSV-1 (Lycke et al, 1988) und HCMV (Ogawa-Goto et al, 2003) beschrieben wurden, ähneln. Unter zur Hilfenahme der zellulären Proteine werden die verschiedenen kinetischen Klassen viraler Proteine synthetisiert

(IE = immediate early, E = early und L = late). IE-Proteine werden einige Stunden nach Infektion synthetisiert und regulieren die Expression späterer Gene. E-Proteine spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus und sind an der Replikation der DNA beteiligt. Die L-Proteine sind zum größten Teil glykosyliert und sind Komponenten der reifen Viruspartikel (De Bolle et al, 2005). Die Zeit zwischen Viruseintritt und Freisetzung neuer Virionen beträgt etwa 72 h (Black et al, 1989).

Zelltropismus

Obwohl HHV-6 Anfang der 90er noch als humanes B-lymphotropes Virus beschrieben wurde (Salahuddin et al, 1986) erkannte man schnell, dass sowohl HHV-6A als auch HHV-6B sehr effizient in CD4⁺-T-Lymphozyten repliziert (Takahashi et al, 1989), nicht aber in B-Lymphozyten. Alle HHV-6 Isolate infizieren sehr effizient T-Zellen im Nabelschnurblut. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass HHV-6A, nicht aber HHV-6B, neben CD4⁺-T-Zellen auch CD8⁺-T-Zellen infizieren kann (Grivel et al, 2003).

Insgesamt gesehen ist HHV-6 in der Lage, eine Vielzahl von verschiedenen Zelltypen zu infizieren, was zum Teil mit der ubiquitären Expression seines zellulären Rezeptors CD46 zu erklären ist. Allerdings wird vermutet, dass alternative Rezeptoren und verschiedene Korezeptoren für den unterschiedlichen Zelltropismus der beiden Virusvarianten verantwortlich sein könnten (Lusso, 2006).

So konnten neben T-Lymphozyten auch Fibroblasten (Luka et al, 1990), natürliche Killerzellen (Lusso et al, 1993), Leberzellen (Cermelli et al, 1996), Epithelzellen (Chen et al, 1994), Endothel-Zellen (Caruso et al, 2002), fetale Astrozyten (He et al, 1996), Oligodendrozyten und Mikroglia (Albright et al, 1998) erfolgreich mit HHV-6 in vitro infiziert werden. Auch in vivo wurde HHV-6 in zahlreichen Geweben nachgewiesen, wobei hier zum Teil keine Unterscheidung zwischen den beiden Varianten gemacht wurde. So fand man HHV-6 im Hirngewebe (Chan et al, 2001; Donati et al, 2003; Luppi et al, 1994) Lebergewebe (Harma et al, 2003; Ishikawa et al, 2002; Ozaki et al, 2001), in Tonsillen (Roush et al, 2001), Speicheldrüsen (Fox et al, 1990), und im Endothel (Caruso et al, 2002).

Latenz

Wie andere Herpesviren ist HHV-6 in der Lage, nach der Primärinfektion im menschlichen Organismus latent zu persistieren. Speicheldrüsen und Hirngewebe werden als Orte der Latenz (Chan et al, 2001; Donati et al, 2003; Fox et al, 1990; Jarrett et al, 1990) vermutet. Weitere mögliche Latenzorte sind Monozyten (Kondo et al, 1991) und die frühen Vorläuferzellen im

Knochenmark (Luppi et al, 1999). Niedrige Konzentrationen von HHV-6-DNA wurden auch in PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) von gesunden Individuen gefunden. Das Genprodukt U94 dient hierbei der Schaffung und Erhaltung des latenten Zustandes (Rotola et al, 1998). U94 ist während der lytischen Replikation auf einem niedrigen Niveau exprimiert, dagegen ist es ein wichtiges Transkript während der latenten Infektion (Rapp et al, 2000; Rotola et al, 1998).

Epidemiologie

Basierend auf seroepidemiologischen Studien ist die weltweite Durchseuchung mit HHV-6 in der Bevölkerung sehr hoch. In der erwachsenen Bevölkerung beträgt die Seroprävalenz 90 – 100% (Braun et al, 1997; Campadelli-Fiume et al, 1999; Clark, 2000; Dockrell, 2003; Ihira et al, 2002). Die Primärinfektion findet in der Regel bereits innerhalb der ersten zwei Lebensjahre statt (Asano et al, 1994; Enders et al, 1990; Okuno et al, 1989; Zerr et al, 2005), wobei die Inkubationszeit 1 bis 2 Wochen beträgt. In 20% der Fälle geht die Primärinfektion mit hohem Fieber einher (Hall et al, 1994). Bei den im frühkindlichen Alter beobachteten Infektionen handelt es sich fast ausschließlich um HHV-6B (Dewhurst et al, 1993; Schirmer et al, 1991). Das Neugeborene ist zunächst noch durch die diaplazentar übertragenen Antikörper der Mutter geschützt (Ohashi et al, 2001), die aber nach 3-6 Monaten unter die Nachweisbarkeitsgrenze absinken. Oft schon einige Monate später kommt es im Zuge der Primärinfektion zu einem starken Anstieg von anti-HHV-6-Antikörpern, die in den meisten Fällen ein Leben lang nachweisbar sind (Campadelli-Fiume et al, 1999). Bis heute ist nicht bekannt, wann die Erstinfektion mit HHV-6A stattfindet. Es wird aber angenommen, dass sie nach der Infektion mit HHV-6B ohne offensichtliche Symptome verläuft. Der häufige Nachweis von HHV-6-DNA in Speichel und Speicheldrüsengewebe (Collot et al, 2002; Di Luca et al, 1995; Suga et al, 1998; Zhao et al, 1997) legt nahe, dass die Speicheldrüsen ein potentieller Ort für HHV-6 Latenz sein könnten. Somit könnte der Speichel für die Virusübertragung entweder von der Mutter auf das Kind oder zwischen Kindern verantwortlich sein (Mukai et al, 1994; Tanaka-Taya et al, 1996; van Loon et al, 1995). In Speichelproben gesunder Spender wurde in aller Regel die B-Spezies nachgewiesen (Collot et al, 2002).

Klinik und Pathogenese

Zwei Jahre nach der Erstbeschreibung von HHV-6 wurde das Drei-Tage-Fieber (roseola infantum, exanthema subitum) als von HHV-6B verursachte Erkrankung identifiziert (Yamanishi et al, 1988). Das Exanthema subitum ist eine im allgemeinen selbstlimitierende Infektion, die sich in hohem Fieber ($\geq 40^{\circ}\text{C}$), Diarrhoen, erythematösen Papeln im Rachen und einer leichten Schwellung der Lymphknoten zeigen kann. Außerdem kann nach Abklingen des Fiebers ein Exanthem im Nacken auftreten (Asano et al, 1994; Hall et al, 1994; Zerr et al, 2005). In vielen Fällen verläuft die Primärinfektion jedoch asymptomatisch. Aufgrund der hohen Durchseuchung mit HHV-6 im Kindesalter sind Primärinfektionen im Erwachsenenalter eher selten. Bei älteren Personen kann es im Rahmen der Erstinfektion zu unspezifischem Fieber oder einer Mononukleose-ähnlichen Symptomatik kommen (Akashi et al, 1993; Niederman et al, 1988). Die Epidemiologie und klinische Relevanz von HHV-6A ist weiter unklar, obwohl im Zusammenhang mit einigen neurologischen Erkrankungen vermehrt HHV-6A DNA nachgewiesen wurde (Suga et al, 1993; Wilborn et al, 1994). Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass HHV-6A eine direkte und / oder indirekte Rolle (als Aktivator anderer Herpesviren wie EBV oder endogener Retroviren) bei Multipler Sklerose spielen könnte. Beispielsweise wurde vermehrt HHV-6 DNA bei MS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollgruppen gefunden (Alvarez-Lafuente et al, 2004; Alvarez-Lafuente et al, 2006; Berti et al, 2002; Chapenko et al, 2003; Soldan et al, 1997). Während die Infektion mit HHV-6 bei Immunkompetenten relativ harmlos verläuft, kann sie bei Immunsupprimierten wie beispielsweise AIDS-Patienten und nach einer Knochenmarks- oder Organtransplantation zu ernsthaften Komplikationen und erhöhten Sterberaten führen (Dahl et al, 1999; Razonable et al, 2002; Singh & Carrigan, 1996; Zerr, 2006). Reaktivierung von HHV-6B wird in 40-50% der Patienten, die eine hämatopoetische Stammzelltransplantation erhalten haben, bzw. in 20-30% der Patienten, die eine Organtransplantation erhalten haben, beobachtet (Humar et al, 2002; Ljungman et al, 2000; Yoshikawa, 2003; Yoshikawa et al, 2000; Yoshikawa et al, 1992). Eine Reaktivierung von HHV-6A ist hierbei eher selten und tritt nur in 2-3% der Fälle auf (Zerr, 2006; Zerr et al, 2005). Die Reaktivierung bei Immunsupprimierten ist assoziiert mit schweren Erkrankungen wie Graft-versus-Host Disease, Transplantatabstoßung und Enzephalitis (Zerr et al, 2005).

Antivirale Therapie

Obwohl keine Arzneimittel speziell für die antivirale Therapie von HHV-6-assoziierten Erkrankungen zugelassen sind, verwendet man in Anlehnung an das nah verwandte Cytomegalovirus die üblichen anti-herpesviralen Medikamente. Ganciclovir, Foscarnet und Cidofovir, nicht aber Aciclovir, zeigten in in-vitro Versuchen eine Aktivität gegenüber HHV-6 (Singh & Carrigan, 1996; Yoshida et al, 1998). In kleineren Studien wurde bereits über die klinische Wirksamkeit von Ganciclovir und Foscarnet bei Immunsupprimierten mit HHV-6-assoziierten organspezifischen Symptomen berichtet (Singh & Paterson, 2000; Wang FZ, 1999). Trotz negativer in-vitro-Daten bezüglich der Aktivität von Aciclovir gegenüber HHV-6 wurde eine Abnahme von HHV-6-Infektionen durch Prophylaxe mit hoch dosiertem Aciclovir in SZT-Patienten beschrieben (Wang et al, 1996). Auch die prophylaktische Gabe von Ganciclovir scheint eine Reduktion von Reaktivierungen zu bewirken. Allerdings ist diese präventive Behandlung mit stärkeren Nebenwirkungen verbunden als die Aciclovir-Prophylaxe (Rapaport et al, 2002; Tokimasa et al, 2002). Außerdem wurde in den letzten Jahren immer wieder von resistenten HHV-6-Stämmen berichtet. So gab es mehrere Fallberichte von Ganciclovir-resistenten HHV-6-Stämmen (Isegawa et al, 2009; Manichanh et al, 2001), die eine Mutation in der Proteinkinase U69 und/oder der DNA-Polymerase U38 aufwiesen. Problemen wie Resistenzentwicklung und geringer therapeutischer Breite versucht man durch Entwicklung neuer Virustatika entgegen zu treten. Eine Alternative wäre die zelluläre Therapie durch den adoptiven Transfer von virusspezifischen T-Zellen, die auch bei der Reaktivierung der anderen Herpesviren EBV und CMV (Moss & Rickinson, 2005) zum Einsatz kommt. Dies war jedoch wegen des sehr begrenzten Wissensstands über die Immunantwort gegen HHV-6 (Lusso, 2006) bis vor kurzem nicht möglich.

Immunmodulatorische Strategien

Wie auch die anderen Herpesviren hat das humane Herpesvirus 6 immunmodulatorische Eigenschaften, die es sich zunutze macht, um seine Persistenz im menschlichen Organismus zu sichern (Lusso, 2006). HHV-6 wurde als ein immunotropes Virus beschrieben, das sehr effizient Zellen infiziert, die an der humoralen und zellulären adaptiven Immunantwort beteiligt sind. Wie bereits erwähnt, infizieren HHV-6A und HHV-6B sehr effizient CD4⁺-T-Zellen (Lusso et al, 1988; Takahashi et al, 1989), was sich in einem zytopathischen Effekt äußert, der von manchen Autoren als direkte Ursache für eine Suppression des Immunsystems angesehen wurde (Flamand et al, 1995). Darüber hinaus repliziert HHV-6A in vitro in verschiedenen zytotoxischen Effektorzellen, wie CD8⁺-T-Zellen (Lusso et al, 1991a; Lusso et al, 1991b), NK-Zellen (Lusso

et al, 1993) und $\gamma\delta$ -T-Zellen (Lusso et al, 1995). Dies wurde so interpretiert, dass HHV-6A dadurch direkt in die antivirale Abwehr des menschlichen Organismus eingreift (Lusso, 2006). Zellen des mononukleären phagozytischen Systems sind neben den CD4⁺-T-Zellen wichtige Orte der Latenz von HHV-6 (Kondo et al, 1991). Darüber hinaus können auch Knochenmarksvorläuferzellen (CD34⁺) von HHV-6 infiziert werden. So ließ sich in vivo HHV-6 in Vorläuferzellen des Knochenmarks von Patienten mit latenter HHV-6 Infektion detektieren (Luppi et al, 1999). In vitro konnte außerdem nachgewiesen werden, dass eine HHV-6 Infektion von mononukleären Zellen des Knochenmarks negative Auswirkungen auf Wachstum und Reifung von Vorläuferzellen hat (Carrigan & Knox, 1995; Isomura et al, 1997; Knox & Carrigan, 1992).

Wie bereits erwähnt, wurde das humane Glykoprotein CD46 als zellulärer Hauptrezeptor sowohl für HHV-6A wie auch für HHV-6B beschrieben (Santoro et al, 1999). Nach Bindung von HHV-6 an CD46 kommt es zu Veränderung im Stoffwechsel von Immunzellen. Beispielsweise wird die IL-12-Produktion antigenpräsentierender Zellen gehemmt. Es kommt zu Störungen in der Komplementaktivierung und zur Induktion einer regulatorischen T-Zellantwort. Zusätzlich hat eine HHV-6-Infektion Veränderungen in der Expression verschiedener Oberflächenrezeptoren zur Folge. So wird die Expression von CD3 und dadurch die des TCR-Komplexes reduziert (Lusso et al, 1988; Sullivan & Coscoy, 2008) und die Expression von CD4 auf der Oberfläche von T-Zellen (auch CD8⁺ und $\gamma\delta$ -T-Zellen) induziert (Lusso et al, 1991a). Janelle und Flamand berichteten von der Herabregulation von Oberflächenmolekülen (CD14, CD64 (FcγRI) und HLA-DR in primären Monozyten, die eine wichtige Funktion bei der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen haben (Janelle & Flamand, 2006). Die Auswirkungen einer HHV-6 Infektion bezüglich der Zytokin- und Chemokinproduktion kommen in einer erhöhten Ausschüttung der inflammatorischen Zytokine IFN- α , TNF- α , IL-1 β , IL-8 und IL-15 (Lusso, 2006) sowie des proinflammatorischen Chemokins RANTES (Grivel JC, 2001; Grivel et al, 2003) zum Tragen. Des weiteren enthält das virale Genom des humanen Herpesvirus 6 je zwei Analoga von Chemokinen und Chemokinrezeptoren (French C, 1999; Isegawa et al, 1998; Milne et al, 2000; Zou et al, 1999).

Erstaunlicherweise hält das Immunsystem trotz dieser vielfältigen immunmodulatorischen Funktionen das Virus meist unter Kontrolle, so dass in der Regel keine HHV-6-assoziierte Erkrankung auftritt. Es wird angenommen, dass es nach der Primärinfektion wie auch bei den anderen Herpesviren wie EBV und CMV zur Ausbildung einer CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort

kommt, die somit einen lebenslangen Schutz bietet. Jedoch ist bis jetzt wenig über die Antigen-spezifische T-Zell-Antwort gegen HHV-6 bekannt. Einige Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass sich virusspezifische CD4⁺-T-Zellen aus peripheren mononukleären Zellen durch Stimulation mit HHV-6-Lysat (Wang et al, 1999; Yakushijin et al, 1991; Yakushijin et al, 1992; Yasukawa et al, 1993) anreichern ließen. Auch eine Anreicherung spezifischer CD4⁺-T-Zellen durch Stimulation mit dem HHV-6-Virusprotein 101K (Tejada-Simon et al, 2002) oder mit HHV-6 spezifischen Peptiden, die aus dem Protein U24 stammen (Tejada-Simon et al, 2003), wurde behauptet. Über die Antigen-spezifität von HHV-6-spezifischen T-Zellen war allerdings vor 2012 nichts bekannt. Erst vor kurzem identifizierten Nastke und Kollegen die ersten Epitope der HHV-6-spezifischen CD4⁺-T-Zellantwort (Nastke et al, 2012). Dabei handelt es sich um 11 DRB1-restringierte Epitope aus 6 verschiedenen Zielantigenen. Neben verschiedenen Strukturproteinen (U11, U14, U48, U54 und U57) wurde auch die DNA-Polymerase (U38) als Zielantigen von CD4⁺-T-Zellen ermittelt. Analysen der HHV-6-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort wurden erstmals von unserer Arbeitsgruppe und parallel von der Gruppe von Ann Leen in Houston durchgeführt, die ersten Ergebnisse dieser Arbeiten wurden 2012 von jeder der beiden Gruppen publiziert (Gerdemann et al, 2013; Martin et al, 2012). Diese Arbeiten zeigten erstmals, dass eine HHV-6-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort existiert, und identifizierten die ersten Zielantigene und Epitope dieser Antwort.

2.3 Aufgabenstellung

Herpesviren persistieren nach der Primärinfektion lebenslang im Organismus und werden vor allem unter Immunsuppression reaktiviert. Unter den Herpesviren tragen insbesondere CMV, EBV sowie HHV-6B (seltener HHV-6A) erheblich zu Morbidität und Mortalität nach allogener Stammzelltransplantation (Moss & Rickinson, 2005; Zerr, 2006) bei. Im Gegensatz zu CMV bzw. EBV ist der Kenntnistand zur Epidemiologie und Therapie von Infektionen mit HHV-6 und vor allem der HHV-6B-spezifischen T-Zellantwort sehr begrenzt. Derzeit gibt es nur limitierte Angaben über die T-Zellepitope und Hauptantigene der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort sowie die Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen bei gesunden HHV-6-positiven Spendern. Um jedoch die Pathogenese der HHV-6-assoziierten Erkrankungen zu verstehen und spezifische Immuntherapie und Immunomonitoring zu entwickeln, ist es notwendig, dieses Wissen zu erweitern. In Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb die HHV-6B-spezifische T-Zellantwort mit Hilfe drei verschiedener Ansätze untersucht:

Im ersten Teil der Arbeit sollten zwei in früheren Pilotstudien bereits etablierte HHV-6-spezifische T-Zellklone, die beide jeweils ein Epitop aus dem Strukturproteine U54 erkennen, hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber HHV-6A- und HHV-6B-infizierten Zellen genauer untersucht werden. Außerdem sollte mit Hilfe von Peptid/HLA-Multimeren die Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen im T-Zellgedächtnis gesunder Virusträger analysiert werden.

Im zweiten Teil sollte das Strukturprotein U54 erstmals umfassend auf mögliche T-Zellepitope untersucht werden. Zur Anreicherung U54-spezifischer T-Zellen sollten autologe CD40-aktivierte B-Zellen als antigenpräsentierende Zellen verwendet werden, die sich bereits in früheren Arbeiten als geeignete T-Zellstimulatorzellen erwiesen hatten (Wiesner et al, 2008; Zentz et al, 2007). Spezifische T-Zellklone sollten generiert werden und hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber HHV-6A- und HHV-6B-infizierten Zellen untersucht werden.

Im dritten und umfangreichsten Teil dieser Promotionsarbeit sollte eine Querschnittanalyse der HHV-6B-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort gegen alle Antigenklassen durchgeführt werden. Um dieses Vorhaben trotz der Größe des HHV-6B-Proteoms (104 Proteine, 45.500 Aminosäuren) machbar und effizient zu gestalten, wurde diese Querschnittanalyse auf alle potentiellen HLA-B*0801-restringierten CD8⁺-T-Zellepitope aller Antigene beschränkt. Die so erhaltene Peptidbank sollte zur Generierung HLA-B*0801-restringierter HHV-6B-spezifischer T-Zellen und T-Zellklone verwendet werden. Die so erhaltenen spezifischen T-Zellen sollten auf die Erkennung HHV-6A- und HHV-6B-infizierter Zellen im Zeitverlauf der Infektion untersucht werden. Der zeitliche und kausale Zusammenhang zwischen Antigenpräsentation, Antigenexpression und Virusreplikation sollte analysiert werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die direkte Detektion dieser HHV-6-spezifischen T-Zellen im Blut und anderen Organen von Virusträgern möglich ist, und ihre Häufigkeit sollte ermittelt werden.

3. Material

3.1 Zellen und Zelllinien

3.1.1 Primäre Zellen

Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von gesunden Spendern (HLA-Typen siehe Tabelle 3.1) wurden mit dem Einverständnis der Spender gemäß der Erklärung von Helsinki des Weltärztebundes zu ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen und gemäß des Ethikvotums der lokalen Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München entnommen.

Bei den Spendern mit der Abkürzung BC“XX“ handelt es sich um PBMCs, die aus Leukozytenkonzentraten (Ulm) stammen.

Tab. 3.1 HLA-Typen der verwendeten Spender

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ	HHV-6	EBV	CMV
BCLM15	A*01 A*11	B*07 B*08	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM17	A*01 A*02	B*08 B*44	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM18	A*01 -	B*08 B*57	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM24	A*01 A*30	B*08 B*18	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM25	A*01 A*02	B*08 B*60	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM28	A*02 A*24	B*08 B*14	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM30	A*01 A*32	B*08 B*44	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM46	A*01 A*23	B*08 B*35	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM50	A*03 A*33	B*08 B*61	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM63	A*01 A*24	B*07 B*08	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM69	A*01 A*24	B*08 B*44	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM70	A*01 A*24	B*08 B*57	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM79	A*02 A*28	B*07 B*08	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM80	A*01 A*11	B*08 B*44	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM82	A*01 -	B*08 B*37	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM83	A*01 -	B*08 B*57	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
BCLM87	A*03 -	B*08 -	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DR	HLA-DQ	HHV-6	EBV	CMV
AC	A*0101 A*2501	B*1801 B*3701	Cw*06 Cw*12	n.u.	n.u.	positiv	positiv	positiv
AM	A*0101 A*2601	B*3501 B*5701	Cw*0401 Cw*0602	DRB1*07, DRB1*11	DQB1*02, *03	positiv	negativ	negativ
AS	A*0201 A*2501	B*51 B*1503	Cw*1203 Cw*1402	DRB1*07 DRB1*08	DQB1*02 DQB1*04	positiv	positiv	negativ
CE	A*0205 A*23	B*1503 B*44	Cw*04 Cw*12	DRB1*07	DQB1*02	positiv	positiv	negativ
FG	A*0201 A*2601	B*1501 B*4403	Cw*0303 Cw*0401	DRB1*0701, *1201	DQB1*0202, *0301	positiv	negativ	negativ
JS	A*0201 A*2402	B*1801 B*5101	Cw*0701 Cw*1502	DRB1*0101, *1201	n.u.	positiv	positiv	positiv
LS	A*0201 A*6801	B*0702 B*0801	Cw*0701 Cw*0702	DRB1*0301, *0701	DQB1*0201, *0202	positiv	positiv	negativ
LT	A*0201	B*0702 B*4002	Cw*0202 Cw*0702	DRB1*0401, *1501 DRB4*0103 DRB5*0101	DQA1*0102, *0303 DQB1*0301, *0602 DPB1*0401, *1101	positiv	positiv	positiv
MD	A*01 A*11	B*08 B*1501	Cw*0303 Cw*0701	DRB1*0301, *1101 DRB3*0101, *0202	DQB1*0201, *0301 DPB1*0201, *0401	positiv	positiv	positiv
MK	A*30 A*31	B*13 B*27	Cw*01 Cw*06	DRB1*01 DRB1*07	DQB1*02, *05	positiv	positiv	negativ
MW	A*0101 A*0201	B*0801 B*4001	n.u. n.u.	DRB1*0301, *1302	n.u.	positiv	negativ	negativ
SJ	A*2402	B*1501 B*3508	Cw*0303 Cw*0401	DRB1*03, *11	n.u.	positiv	positiv	negativ
SM	A*03 A*33	B*07 B*14	Cw*0702 Cw*0802	DRB1*01 DRB1*15	n.u.	positiv	positiv	negativ
TW	A*0101	B*0801 B*1501	Cw*0303 Cw*0701	DRB1*0301 DRB1*1103	DQB1*0201 DQB1*0301	positiv	positiv	n.u.
TW	A*0101	B*0801 B*1501	Cw*0303 Cw*0701	DRB1*0301 DRB1*1103	DQB1*0201 DQB1*0301	positiv	positiv	n.u.

3.1.2 Zelllinien

K562	humane chronische myelogene Leukämie (CML) -Zelllinie aus dem Knochenmark; HLA-I-defizient (Lozzio & Lozzio, 1975)
CD40L	murine L-Zellen (Bindegewebsfibroblasten) mit CD40-Ligand transfiziert (Garrone et al, 1995)
293T	Humane embryonale Nierenepithel-Zelllinie, die durch die Gene E1a und E1b von Adenovirus Typ 5 transformiert wurde (Graham et al, 1977)
B95.8	Lymphoblastoide Krallenaffenzelllinie, latent und lytisch EBV-infiziert; geben ständig infektiöse B95.8 Viren in den Überstand ab (Miller & Lipman, 1973; Miller et al, 1972)
Lymphoblastoide Zelllinien (LCL)	mit B95.8 infizierte, transformierte humane B-Zellen

Mini-LCL	mit dem mini-EBV (Kempkes et al, 1995) transformierte B-Zellen, Expression aller latenten Proteine von EBV, keine Expression lytischer EBV-Proteine
B-Blasten	mittels CD40-Stimulation konditional immortalisierte humane B-Zellen (Wiesner et al, 2008)
LL8	L929, stabil transfiziert mit humanem CD40L, „Feeder“ für B-Zellimmortalisierung
Jurkat76&CD8 (J76CD8)	TCR α - und β - defiziente CD4+ T-Zelllinie, transduziert mit CD8 α ; (Wolfgang Uckert, MDC Berlin)
L721.221	lymphoblastoide Zelllinie; HLA-I-defizient (Shimizu Y, 1989) (zur Verfügung gestellt von Elfriede Nößner, Helmholtz Zentrum München)
L721.221 C*0702	L721.221 stabil transfiziert mit HLA-C*0702 (Falk CS, 1995) (zur Verfügung gestellt von Elfriede Nößner, Helmholtz Zentrum München)

3.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
E. coli DH5 α	F-, F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA1
E. coli DH10B	F-, mcrA, D (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80dlacZ M15, DlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, D (ara, leu)7697, galU, galK, l-, rpsL, nupG

3.2 Viren

HHV-6A U1102	Wildtyp-HHV-6A Stamm U1102 (Batch: NCPV #357, Health Protection Agency, Nat. Collection of Pathogenic Viruses, Salisbury, UK)
HHV-6B HST	Wildtyp-HHV-6B Stamm HST (Batch: NCPV #355, Health Protection Agency, Nat. Collection of Pathogenic Viruses, Salisbury, UK)

3.3 Plasmide

HLA B8	Vektor zur eukaryotischen Expression des HLA-B*0801
pALF10A1 ("env")	Vektor zur eukaryotischen Expression des Haupthüllproteins ("envelope") des MuLV (murines Leukämievirus)-Isolats 10A1, zur Verpackung der retroviralen MP71-DNA für die Herstellung von amphotropen Retroviren (erhalten von Wolfgang Uckert, Berlin) (Uckert et al, 2000)
pcDNA3.1-MLVg/p ("gag/pol")	Vektor zur eukaryotischen Expression der gruppenspezifischen Antigene und Polymerasen des Mo-MLV-Retrovirus, Ko-Verpackung mit MP71-DNA bei der Herstellung von MP71 Retroviren, zur Expression der MP71-DNA in den infizierten Zellen (hergestellt von Christopher Baum, Hannover; erhalten von Wolfgang Uckert, Berlin)
MP71Gpre	Retroviraler Vektor mit GFP-Markergen unter MPSC-LTR- Kontrolle, ergänzt durch mSS (modified mRNA splice site) und RPE-Element (posttranskriptionelles regulatorisches Element) des Murmeltier-Hepatitisvirus
MP71-EGR α	MP71Gpre mit der α -Kette des EGR-spezifischen TCR EGR, ohne GFP
MP71-EGR β	MP71Gpre mit der β -Kette des EGR-spezifischen TCR EGR, ohne GFP
MP71-QTR α	MP71Gpre mit der α -Kette des QTR-spezifischen TCR QTR, ohne GFP
MP71-QTR β	MP71Gpre mit der β -Kette des QTR-spezifischen TCR QTR, ohne GFP

3.4 Oligonukleotide

3.4.1 Primer für das T-Zellrezeptor-Repertoire

Die Nomenklatur bezieht sich auf B. Arden (Arden et al, 1995).

T-Zellrezeptor- α -Kette – Repertoire (Steinle et al, 1995)

Konzentration: 2,5 pmol/ μ l, falls nicht anders angegeben

P-5' α ST	CTG	TGC	TAG	ACA	TGA	GGT	CT			
P-3' α ST	CTT	GCC	TCT	GCC	GTG	AAT	GT			
3'T-C α	GGT	GAA	TAG	GCA	GAC	AGA	CTT	GTC	ACT	GGA
PANV α 1	AGA	GCC	CAG	TCT	GTG	ASC	CAG	S = C/G		
PANV α 1.1	AGA	GCC	CAG	TCR	GTG	ACC	CAG	R = A/G		
V α 2	GTT	TGG	AGC	CAA	CRG	AAG	GAG			

V α 3	GGT GAA CAG TCA ACA GGG AGA	
V α 4	TGA TGC TAA GAC CAC MCA GC	M = A/C
V α 5	GGC CCT GAA CAT TCA GGA	
V α 6	GGT CAC AGC TTC ACT GTG GCT A	
V α 7	ATG TTT CCA TGA AGA TGG GAG	
V α 8	TGT GGC TGC AGG TGG ACT	
V α 9	ATC TCA GTG CTT GTG ATA ATA	
V α 10	ACC CAG CTG CTG GAG CAG AGC CCT	
V α 11	AGA AAG CAA GGA CCA AGT GTT	
V α 12	CAG AAG GTA ACT CAA GCG CAG ACT	
V α 13	GAG CCA ATT CCA CGC TGC G	
V α 14.1	CAG TCC CAG CCA GAG ATG TC	
V α 14	CAG TCT CAA CCA GAG ATG TC	
V α 15	GAT GTG GAG CAG AGT CTT TTC	
V α 16	TCA GCG GAA GAT CAG GTC AAC	
V α 17	GCT TAT GAG AAC ACT GCG T	
V α 18	GCA GCT TCC CTT CCA GCA AT	
V α 19	AGA ACC TGA CTG CCC AGG AA	
V α 20	CAT CTC CAT GGA CTC ATA TGA	
V α 21	GTG ACT ATA CTA ACA GCA TGT	
V α 22	TAC ACA GCC ACA GGA TAC CCT TCC	
V α 23	TGA CAC AGA TTC CTG CAG CTC	
V α 24	GAA CTG CAC TCT TCA ATG C	
V α 25	ATC AGA GTC CTC AAT CTA TGT TTA	
V α 26	AGA GGG AAA GAA TCT CAC CAT AA	
V α 27	ACC CTC TGT TCC TGA GCA TG	
V α 28	CAA AGC CCT CTA TCT CTG GTT	
V α 29	AGG GGA AGA TGC TGT CAC CA	
V α 30	GAG GGA GAG AGT AGC AGT	
V α 31NEU	TCG GAG GGA GCA TCT GTG ACT A	
V α 32	CAA ATT CCT CAG TAC CAG CA	

TCR β -Repertoire – degenerierte Primer (Zhou et al., 2006)

VP1	GCI ITK TIY TGG TAY MGA CA	K = G/T, Y = C/T
VP2	CTI TKT WTT GGT AYC IKC AG	M = A/C, W = A/T
CP1	GCA CCT CCT TCC CAT TCA C	I = Inosin

3.4.2 Primer zur Klonierung der TCR α - und TCR β -Gene in den retroviralen Vektor MP71Gpre

NOTI Kozak LS-373 QTR1 (β_2)

TAG CGG CCG CCA CCA TGG GCT CCA GGC TCC TC

NOTI Kozak LS-373 QTR9 (α)

TAG CGG CCG CCA CCA TGT CAC TTT CTA GCC TG

NOTI Kozak LS-162 EGR11 (β_1)

TAG CGG CCG CCA CCA TGG GCT GCA GGC TGC TC

NOTI Kozak LS-162 EGR10 (α)

TAG CGG CCG CCA CCA TGC TCC TGC TGC TCG TC

ECOR1 KOZAK α_{rev}

TGG AAT TCT CAG CTG GAC CAC AGC CGC AGC

ECOR1 KOZAK β_{1rev}

TGG AAT TCT CAG AAA TCC TTT CTC TTG AC

ECOR1 KOZAK β_{2rev}

TGG AAT TCC TAG CCT CTG GAA TCC TTT CTC

3.4.3 Primer für RT-PCR

Die Primer wurden durch Firma Metabion, Martinsried synthetisiert. Alle Primer sind in 5'→ 3' Richtung angegeben

U38 F3	CTCACGTCTGCCCGATTT
U38 R3	AATTTTGCCTCGTCTGTGC
U41 F1	TGGAAAAACATAGATCCAAGCA
U41 R1	GATGAAAACGAAACGGTGGT
U11 F1	CTGCTAGAAATGCCGGAGAG
U11 R1	TGCCCTTCTCGCCTAAACTA
U54 F1	CAGCTGGACAGAAATGAGCA
U54 R1	CGACCGTGGTTAGACTTGGT
U79 F1	CGAAGACAAGCGGCCGGACA
U79 R1	AACGCACCCTCAACCGCTCC

3.5 Peptide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Peptide wurden von der Firma JPT (Berlin) in einer Reinheit von > 70% hergestellt.

Überlappende U54-Peptidbibliothek

1	MQPATLQWSSYVLQL
2	TLQWSSYVLQLRLTT
3	SSYVLQLRLTTAAIL
4	LQLRLTTAAILKPGE
5	LTTAAILKPGELRYF
6	AILKPGELRYFKCGL
7	PGELRYFKCGLGICP
8	RYFKCGLGICPPSSS
9	CGLGICPPSSSVVCT
10	ICPPSSSVVCTCRDE
11	SSSVVCTCRDESSFA
12	VCTCRDESSFAASPF
13	RDESSFAASPFYID
14	SFAASPFYIDPKDY
15	SPFTYIDPKDYGNIP
16	YIDPKDYGNIPFAVH
17	KDYGNIPFAVHNISD
18	NIPFAVHNISDLDL
19	AVHNISDLDLGRL
20	ISDLDLGRLPIVL
21	DLDLGRLPIVLNIFA
22	GRLPIVLNIFALPYA
23	IVLNIFALPYANVTV
24	IFALPYANVTVSNLP
25	PYANVTVSNLPVQRI
26	VTVSNLPVQRIEAYD
27	NLPVQRIEAYDRHAI
28	QRIEAYDRHAIPHGQ
29	AYDRHAIPHGQCEAQ
30	HAIPHGQCEAQFILY
31	HGQCEAQFILYGPLT
32	EAQFILYGPLTRIKI
33	ILYGPLTRIKIYAAD
34	PLTRIKIYAADIRWT
35	IKIYAADIRWTEKTP
36	AADIRWTEKTPPEEPT
37	RWTEKTPPEEPTRYLF
38	KTPPEEPTRYLFNADI
39	EPTRYLFNADIWINL
40	YLFNADIWINLQNT

41	ADIWINLQNTPLDQI
42	INLQNTPLDQIFNSA
43	NTPLDQIFNSAKIEF
44	DQIFNSAKIEFISHR
45	NSAKIEFISHRHVSI
46	IEFISHRHVSISRIL
47	SHRHVSISRILLCGN
48	VSISRILLCGNLLIL
49	RILLCGNLLILKTVY
50	CGNLLILKTVYENDY
51	LILKTVYENDYLLDD
52	TVYENDYLLDDTFFP
53	NDYLLDDTFFPEKLN
54	LLDDTFFPEKLNQLS
55	FFPEKLNQLSLTPH
56	KLNIQLSLTPHTADI
57	QLSLTPHTADITMSQ
58	TPHTADITMSQNQET
59	ADITMSQNQETLLKC
60	MSQNQETLLKCNVGS
61	QETLLKCNVGSITVG
62	LKCNVGSITVGATKN
63	VGSITVGATKNIVSN
64	TVGATKNIVSNLITP
65	TKNIVSNLITPFHCS
66	VSNLITPFHCSFHTI
67	ITPFHCSFHTIFESN
68	HCSFHTIFESNSNFT
69	HTIFESNSNFTGFFI
70	ESNSNFTGFFIPKLL
71	NFTGFFIPKLLHGIS
72	FFIPKLLHGISITTC
73	KLLHGISITTCIWDE
74	GISITTCIWDETRPL
75	TTCIWDETRPLYITM
76	WDETRPLYITMKAQK
77	RPLYITMKAQKKNCR
78	ITMKAQKKNCRINYS
79	AQKKNCRINYSQELG
80	NCRINYSQELGKVFF

81	NYSQELGKVFFFPKQ
82	ELGKVFFFPKQILPP
83	VFFFPKQILPPGNNI
84	PKQILPPGNNIEFSW
85	LPPGNNIEFSWTEMS
86	NNIEFSWTEMSNIYV
87	FSWTEMSNIYVNIES
88	EMSNYVNIESPNGP
89	IYVNIESPNGPVKDI
90	IESPNGPVKDIVALA
91	NGPVKDIVALASQPV
92	KDIVALASQPVS RAP
93	ALASQPVS RAPSLTT
94	QPVS RAPSLTTVAHV
95	RAPSLTTVAHV TPEI
96	LTTVAHV TPEISMG I
97	AHV TPEISMGIFLKS
98	PEISMGIFLKSRLIA
99	MGIFLKSRLIAFDKE
100	LKSLRIAFDKEHLVP
101	RIAFDKEHLVPLHFF
102	DKEHLVPLHFFLKPG
103	LVPLHFFLKPGESTR
104	HFFLKPGESTRMEFM
105	KPGESTRMEFMPPET
106	STRMEFMPPETPQSL
107	EFMPPETPQSLTILE
108	PETPQSLTILEGDVG
109	QSLTILEGDVGIRFI
110	ILEGDVGIRFIPCHN
111	DVGIRFIPCHNNYSH
112	RFIPCHNNYSHRSSP

HLA-B*0801-restringierte HHV-6B-spezifische Peptidbibliothek („8mere“ und „9mere“)

1	H-YLRLRKGL-OH
2	H-FARCRPLL-OH
3	H-TARVRFSL-OH
4	H-HLRARSAL-OH
5	H-LPRQRAYL-OH
6	H-RHRVRALL-OH
7	H-FSRSRDLL-OH
8	H-SRRDRGLL-OH
9	H-EMRLRMIL-OH
10	H-LKRGRMGL-OH
11	H-FYRDRQYL-OH
12	H-NLRRRRDL-OH
13	H-LLRYRQCL-OH
14	H-SVRPRPEL-OH
15	H-RRRIRSLLOH
16	H-EVRHRDSL-OH
17	H-LIRSRFSL-OH
18	H-VIRNRLML-OH
19	H-TYRARGLL-OH
20	H-GRRRRTYL-OH
21	H-RMKKRQRL-OH
22	H-ILKQRNYL-OH
23	H-FFKGRTFL-OH
24	H-KDKQRSLL-OH
25	H-LQKYRPIL-OH
26	H-VEKERKFL-OH
27	H-LCKAREEL-OH
28	H-HLKNRKPL-OH
29	H-TFKRRTKL-OH
30	H-LEKARCEL-OH
31	H-FDRSKYAL-OH
32	H-YNRKKLIL-OH
33	H-DHREKTKL-OH
34	H-FVRQKHVL-OH
35	H-QTRQKFHL-OH
36	H-ICRKKIGL-OH
37	H-RMRLKTEL-OH
38	H-MAREKNDL-OH
39	H-KDRAKIAL-OH
40	H-KVRCKKIL-OH
41	H-KRRYKQLL-OH
42	H-IHRSKTSL-OH
43	H-VPRLKFFL-OH
44	H-ELRLKSFL-OH
45	H-VPRLKYFL-OH
46	H-YNKSKRDL-OH
47	H-LYKEKYSL-OH
48	H-KKKHKKTL-OH
49	H-TNKIKEQL-OH

50	H-YEKEKSFL-OH
51	H-HIKIKKFL-OH
52	H-REKTKLYL-OH
53	H-LEKYKGHL-OH
54	H-IKKEKLLL-OH
55	H-QHKIKSLL-OH
56	H-FPKEKELL-OH
57	H-YPKMKEFL-OH
58	H-LKKIKSVL-OH
59	H-LAKFKQQL-OH
60	H-VKKNKREL-OH
61	H-IYKHKVSL-OH
62	H-EIKFKDVL-OH
63	H-LDKQKSFL-OH
64	H-SDKWKLEL-OH
65	H-SSKIKHYL-OH
66	H-LSKLERL-OH
67	H-SIRLRVCV-OH
68	H-SVRPRRHV-OH
69	H-CCRERLVV-OH
70	H-PKRQRCVV-OH
71	H-RYRQREHV-OH
72	H-LRRRRDLV-OH
73	H-GARQRLYV-OH
74	H-KKRRRHKV-OH
75	H-TFRLRKNV-OH
76	H-RQRTRTTV-OH
77	H-RGRGRGRV-OH
78	H-YDKERHRV-OH
79	H-WPKSRCLV-OH
80	H-FPKQRQNV-OH
81	H-TSKTRPTV-OH
82	H-GLRAKPWV-OH
83	H-GVRIKLLV-OH
84	H-RRRQKRIV-OH
85	H-SIRTKTYV-OH
86	H-IQRAKTAV-OH
87	H-NERIKSYV-OH
88	H-FDKGKIEV-OH
89	H-LVKNKEKV-OH
90	H-PVKRKIV-OH
91	H-PSKNKTIV-OH
92	H-TPKVKSKV-OH
93	H-KVKSKVCV-OH
94	H-TGKEKEDV-OH
95	H-ELKWKHAV-OH
96	H-TLKQKTNV-OH
97	H-WSKLFKTV-OH
98	H-KQKEKRKV-OH

99	H-ENKLKEAV-OH
100	H-KDKPKEIV-OH
101	H-SLRLREKI-OH
102	H-SERARRRI-OH
103	H-EFRERGGKI-OH
104	H-IGRVRRVI-OH
105	H-LFRYRHYI-OH
106	H-GPRGRHAI-OH
107	H-QFRKRSAI-OH
108	H-NPRFRPHI-OH
109	H-YVKKRGEI-OH
110	H-LVKDRSKI-OH
111	H-YVKTRYDI-OH
112	H-VKKYRDFI-OH
113	H-AVKKRKYI-OH
114	H-EAKRRNMI-OH
115	H-DVKSRRHDI-OH
116	H-KTKLRHTI-OH
117	H-HDKDRAKI-OH
118	H-TGKTRLKI-OH
119	H-PIKPRSI-OH
120	H-PAKHRVYI-OH
121	H-YHKGRPRI-OH
122	H-LRRVKQRI-OH
123	H-HTRMKFHI-OH
124	H-FMRQKTI-OH
125	H-RARRKQTI-OH
126	H-IVRHKQNI-OH
127	H-YSRNKILI-OH
128	H-ASRDKTKI-OH
129	H-AAKDKSVI-OH
130	H-NHKNKTQI-OH
131	H-EKTKLNI-OH
132	H-MVKEKALI-OH
133	H-CFKNKKAI-OH
134	H-DSKSKIGI-OH
135	H-LRRQRVLM-OH
136	H-ILRQRVPM-OH
137	H-LDRYRSDM-OH
138	H-FYKKRFIM-OH
139	H-QRRGKTTM-OH
140	H-LKRIKSDM-OH
141	H-GFRHKPHM-OH
142	H-EEKKKQQM-OH
143	H-FEKTkihM-OH
144	H-EKKQKLGm-OH
145	H-KSKVKHKM-OH
146	H-WTKDKYIM-OH

1	H-RARARFEWL-OH
2	H-LARGRPSKL-OH
3	H-APRPRWRSL-OH
4	H-RPRWRSLTL-OH
5	H-CCRERLVVL-OH
6	H-KERHRVRAL-OH
7	H-RYRQREHVL-OH
8	H-FYRDRQYLL-OH
9	H-YIRKRFPKL-OH
10	H-SRRKREDSL-OH
11	H-RARRRIRSL-OH
12	H-TYRARGLLL-OH
13	H-VPRRRNSNL-OH
14	H-NRRGRGHRL-OH
15	H-SPRSRLQQL-OH
16	H-GGRRRRTYL-OH
17	H-KGRPRIRYL-OH
18	H-QQFRNAGL-OH
19	H-LVKDRSKIL-OH
20	H-CRKERRRFL-OH
21	H-FEKERFLFL-OH
22	H-PMKTRFTTL-OH
23	H-EAKRRNMIL-OH
24	H-MSKMRVLFLOH
25	H-DVKSRRHDIL-OH
26	H-FYKKRFIML-OH
27	H-EIKFRYKYL-OH
28	H-KKKRRYKQL-OH
29	H-MGKFRATFL-OH
30	H-TGKTRLKIL-OH
31	H-LPKQRKQRL-OH
32	H-RRRQKRIVL-OH
33	H-IGRSKRIFL-OH
34	H-LDRDKVQRL-OH
35	H-PHRKKFNKL-OH
36	H-FIRLKIIVL-OH
37	H-NFRGKLAPL-OH
38	H-IKRLKNPDL-OH
39	H-TRREKGSDL-OH
40	H-IARQKKMKL-OH
41	H-NERIKSYVL-OH
42	H-FRKQKKLDL-OH
43	H-DSKKKLSSL-OH
44	H-PVKRKIIVL-OH
45	H-YKKDKQRSL-OH
46	H-LSKLSLYL-OH
47	H-EEKKKQQML-OH
48	H-NVKHKKNPL-OH
49	H-TLKSFKRKL-OH
50	H-LAKFKQQLL-OH
51	H-KDKPKEIVL-OH

52	H-DFKSKYLTL-OH
53	H-PSKSKKIKL-OH
54	H-SKKIKLDRL-OH
55	H-WTKDKYIML-OH
56	H-FHRRRDSFV-OH
57	H-GLRRRSSHV-OH
58	H-FRRSRSLSV-OH
59	H-NLRRRRDLV-OH
60	H-VVRNRKKKV-OH
61	H-EGRERILTV-OH
62	H-RSKPRHMCV-OH
63	H-DSKYRPPQV-OH
64	H-TKKRRRHKV-OH
65	H-IQKNRATEV-OH
66	H-KLKERLDYV-OH
67	H-LRRVKQRIV-OH
68	H-GVRIKLLVV-OH
69	H-SIRTKTYVV-OH
70	H-LKRIKWM DV-OH
71	H-NVRSKKDFV-OH
72	H-AIREKIKQV-OH
73	H-IVRHKQIV-OH
74	H-LNRSKSAQV-OH
75	H-KRRTKLEFV-OH
76	H-HRRGKNTV-OH
77	H-YNKSKRDLV-OH
78	H-EPKFKQPTV-OH
79	H-ITKNKTTSV-OH
80	H-SEKVKSIHV-OH
81	H-ITKNKSIPIV-OH
82	H-ECKTKEENV-OH
83	H-LGKEKKLAV-OH
84	H-IMKFKKKQV-OH
85	H-TSKIKASTV-OH
86	H-FHKFKQWV-OH
87	H-HQVKVQWV-OH
88	H-PHKVKQWV-OH
89	H-SDKAKQWV-OH
90	H-LHKVKDQWV-OH
91	H-PARSRTSAI-OH
92	H-TSRHRGERI-OH
93	H-EHRRRQKRI-OH
94	H-FTRMRHTPI-OH
95	H-LKRGRMGLI-OH
96	H-VLRARTFDI-OH
97	H-LIRERFPNI-OH
98	H-TVRVRNYEI-OH
99	H-TSRCRCSDI-OH
100	H-DGRYRLYEI-OH
101	H-IFRERLSYI-OH
102	H-PKRVRTLKI-OH

103	H-WPKSRCLVI-OH
104	H-KKKSRSYI-OH
105	H-VKKVRRETI-OH
106	H-ENKERYAAI-OH
107	H-EQKVRCKKI-OH
108	H-FNKLGRM RI-OH
109	H-KEYRNNAI-OH
110	H-INKNRESSI-OH
111	H-LEKARCELI-OH
112	H-TLRNKFTKI-OH
113	H-IQRAKTAVI-OH
114	H-GKRLKIVRI-OH
115	H-ISRYKWS DI-OH
116	H-SRRNKVHDI-OH
117	H-PTRQKLTNI-OH
118	H-ELRLKSFLI-OH
119	H-IYKLNTEI-OH
120	H-VKKRKYISI-OH
121	H-SSKQKQOTI-OH
122	H-LEKYKGHLI-OH
123	H-FSKLNGKI-OH
124	H-VVKGVLSI-OH
125	H-TIKIKILPI-OH
126	H-NRKKKVYWI-OH
127	H-EHKNTVFI-OH
128	H-LHKPKFISI-OH
129	H-WSKLFKTVI-OH
130	H-KEKRKVEDI-OH
131	H-ASKKKLVGI-OH
132	H-TQYKKKTHI-OH
133	H-SNKRKPRQI-OH
134	H-YAKDKPKEI-OH
135	H-TAKRKNVPI-OH
136	H-EARRR LAEM-OH
137	H-FSRSRDLLM-OH
138	H-GQRRRAPTM-OH
139	H-LDRYRSDMM-OH
140	H-LPRQRLFAM-OH
141	H-NPRGRESM-OH
142	H-SVRPRPELM-OH
143	H-KTKLRHTIM-OH
144	H-QFKRRLIHM-OH
145	H-ESKRRHADM-OH
146	H-PAKRVYIM-OH
147	H-NLKSRIIMP-OH
148	H-VLRSKPRHM-OH
149	H-GHRDKLLRM-OH
150	H-ISRNKFCDM-OH
151	H-QKKMKLDHM-OH
152	H-KNKPKKYCM-OH
153	H-SPKVK SARM-OH

Verteilung der potentiellen HLA-B*0801-restringierten Epitope (8mer, 9mer)

Protein/ Gene	Anzahl der Aminosäuren	Funktion	Anzahl der mgl. Epitope	Anzahl der gefunden. Epitope
DR1	774	DNA-directed RNA polymerase II	4	1
DR3	200	-	-	-
B1	159	-	2	-
B2	79	-	-	-
DR6	392	transactivator	4	2
B3	59	-	1	-
B4	193	transactivator	2	1
B5	79	-	-	-
U2	363	-	1	-
U3	386	transactivator	8	1
U4	535	-	11	-
B4	193	-	2	-
U7	903	-	5	1
U2	363	-	1	-
U8	411	-	1	-
U9	104	-	-	-
U10	518	-	3	-
U11	858	tegument protein	3	-
U12	205	-	-	-
U13	107	-	1	-
U14	610	-	4	-
U15	191	-	3	-
U17	334	-	3	-
U18	294	-	-	-
U19	389	IE-B	1	-
U20	434	-	2	-
U21	500	-	1	-
U22	202	-	3	-
U23	299	-	2	-
U24	88	-	-	-
U24A	57	-	-	-
U25	316	-	1	-
U26	295	-	2	1
U27	366	polymerase processivity factor	1	-
U28	804	large ribonuclease reductase	5	-
U29	299	capsid assembly and DNA maturation	3	2
U30	1082	-	1	-
U31	2077	large tegument protein	9	1
U32	89	-	2	-
U33	470	-	3	-
U34	276	-	2	-
U35	106	-	-	-
U36	484	-	6	-
U37	264	-	5	-
U38	1012	DNA polymerase	9	2
U39	830	glycoprotein B	7	-
U40	726	capsid assembly	2	-
U41	1132	major DNA binding protein	7	3
U42	516	transactivator	3	1
U43	860	helicase/primase complex	4	-
U44	231	-	3	-
U45	376	-	-	-
U46	84	-	1	-
U47	738	-	-	-
U48	694	glycoprotein H	5	-
U49	252	-	-	-
U50	555	-	4	-
U51	301	G-protein coupled receptor	1	-
U52	258	-	-	-
U53	528	proteinase	3	1
U54	459	virion transactivator	-	-
U55	492	-	2	-
U56	296	-	1	-
U57	1345	major capsid protein	4	-
U58	772	-	14	-
U59	350	tegument protein	6	1
U66	666	putative terminase	6	-
U62	87	-	-	-
U63	218	-	2	-
U64	442	tegument protein	5	1
U65	335	-	2	-
U67	353	-	4	-
U68	114	-	2	-
U69	563	ganciclovir kinase	2	-
U70	488	alkaline exonuclease	4	-
U71	81	myristylated virion protein	-	-
U72	344	glycoprotein M	2	1
U73	780	origin binding protein	8	-
U74	662	helicase/primase complex	1	-
U75	249	-	1	-
U76	662	-	8	-
U77	824	helicase/primase complex	2	-
B5	79	-	-	-
B7	75	-	-	-
U79	480	DNA replication	10	1
U81	255	uracyl-DNA glycosylase	1	-
U82	250	glycoprotein L	-	-
U83	113	Interferine cytokine	-	-
U84	342	glycoprotein	4	1
U85	292	glycoprotein	2	-
U86	1520	IE-A	13	2
U90	1078	IE-A,transactivator	4	-
U91	156	IE-A	2	-
B8	265	-	12	2
U94	490	Parvovirus rep homolog	3	-
U95	1212	IE	6	-
U100	616	gp82-105	4	-
B9	106	-	1	-

Referenzgenom für HHV-6B (Genbank-Identifikationsnummer NC_000898)

3.6 Peptid/HLA-Multimere und Antikörper

3.6.1 Peptid/HLA-Multimere

Die nicht-konjugierten Multimere wurden mit Pro5 Fluorotag R-PE (ProImmune, Oxford, England) gefärbt.

Multimer	Peptidsequenz	Konjugat	Hersteller
QIK/HLA-B*0801-Pentamer	QIKVRVDMV (IE-1, CMV)	ohne	Proimmune, Oxford, England
VLE/HLA-A*0201-Tetramer	VLEETSVML (IE-1, CMV)	PE	Beckman Coulter, Krefeld
YSE/HLA-A*0101-Pentamer	YSEHPTFTSQY (pp65, CMV)	ohne	Proimmune, Oxford, England
FLK/HLA B*0801-Pentamer	FLKEKGGL (Nef, HIV)	ohne	Proimmune, Oxford, England
GEI/HLA B*0801-Pentamer	GEIYKRWII (gag p24,HIV)	ohne	Proimmune, Oxford, England
FLR/HLA B*0801-Pentamer	FLRGRAYGL (EBNA-3A, EBV)	ohne	ProImmune, Oxford, England
GLC/HLA-A*0201-Pentamer	GLCTLVAML (BMLF1, EBV)	PE	Proimmune, Oxford, England
QAK/HLA B*0801-Pentamer	QAKWRLQTL (EBNA3A, EBV)	ohne	Proimmune, Oxford, England
RAK/HLA B*0801-Pentamer	RAKFKQLL (BZLF1, EBV)	ohne	Proimmune, Oxford, England

Multimer	Peptidsequenz	Konjugat	Hersteller
MLW/HLA-A*0201-Pentamer	MLWYTVYNI (U11, HHV-6B)	ohne	ProImmune, Oxford, England
ILY/HLA-A*0201-Pentamer	ILYGPLTRI (U54, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
EGR6A/HLA B*0801-Pentamer	EGRDRILTV (U79, HHV-6A)	ohne	Proimmune, Oxford, England
EGR6B/HLA B*0801-Pentamer	EGRERILTV (U79, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
EMR/HLA B*0801-Pentamer	EMRLRMIL (U26, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
FYR/HLA B*0801-Pentamer	FYRDRQYLL (U38, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
LCK6B/HLA B*0801-Pentamer	LCKAREEL (U38, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
MAR6B/HLA B*0801-Pentamer	MAREKNDL (U53, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
QTR/HLA B*0801-Pentamer	QTRQKFHL (U41, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
RPR/HLA B*0801-Pentamer	RPRWRSLTL (B4, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
RSK/HLA B*0801-Pentamer	RSKPRHMCV (U7, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
SPR/HLA B*0801-Pentamer	SPRSRLQQL (U86, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
TNK6A/HLA B*0801-Pentamer	TNKMKEQL (U31, HHV-6A)	ohne	Proimmune, Oxford, England
TNK6B/HLA B*0801-Pentamer	TNKIKEQL (U31, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England
VVK/HLA B*0801-Pentamer	VVKGKVLISI (U41, HHV-6B)	ohne	Proimmune, Oxford, England

3.6.2 Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Konjugat	Hersteller
CD3	HIT3a	IgG2a	PE-Cy5	BD Pharmingen, Heidelberg
CD4	RPA-T4	IgG1	PE	BD Pharmingen, Heidelberg
CD4	BW 135/80	IgG2a	FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
CD8	RPA-T8	IgG1	APC	BioLegend, San Diego, USA
HLA B8	H6098	Mab	FITC	USBiological
HHV-6 gp60/110	Sc-58156	IgG2b	ohne	Santa Cruz Biotec, Santa Cruz, USA
HHV6B- 101kDa	C3108-103	IgG	ohne	Millipore, Darmstadt
HHV6A/B- p41	9A5d12	IgG2a	ohne	Santa Cruz Biotec, Santa Cruz, USA
HHV6A- gp 82/105	2D6	IgG2b	ohne	Santa Cruz Biotec, Santa Cruz, USA
HHV6A/B- gp 116/64/54	6A5	IgG2b	ohne	Santa Cruz Biotec, Santa Cruz, USA
Goat anti- mouse	Poly4053	IgG	FITC	BioLegend, San Diego, USA

3.7 Puffer und Stammlösungen

ELISA AP Substrat (5x)	5mg/ml p-Nitrophenylphosphat (p-NPP), 0,5mM MgCl ₂ , 50% Diethanolamin pH 9,5
ELISA Waschpuffer	0,05% Tween-20 in PBS
Einfriemedium	50% (v/v) FKS 40% (v/v) Medium 10% (v/v) DMSO
FACS Puffer	2% FBS in PBS
Fixierlösung	1% PFA in PBS
PBS	138mM NaCl, 2,7mM KCl, 8,1mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, 1,76mM KH ₂ PO ₄ in H ₂ O pH 7,4
TBS	50 mM Tris pH 8 137 mM NaCl 2,7 mM KCl
TBS-T	TBS 0,05 % Tween-20
Blockierungspuffer	5 g Magermilchpulver 100 ml PBS-T
RIPA-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 8, 150mM NaCl, 1% NP40/Igepal, 0,5% DOC, 0,1% SDS
Inhibitor für 10ml RIPA*	cOmplete Mini (Roche)

3.8 Kits

Bradford Protein- Assay Kit	Biorad, München
DNase I Amplification Grade	Invitrogen, Darmstadt
ELISA für humanes GM-CSF	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISA für humanes IFN- γ	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISA für humanes IL-4	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISpot für humanes IFN- γ	Mabtech, Nacka Strand, Schweden
ELISpot-Entwickler (AP Color kit)	Biorad, München
Endofree PlasmidMAXI-Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin Gelpurifikationskit	Macherey Nagel, Düren
RNeasy Mini RNA-Isolationskit	Qiagen, Hilden
Super Script III First-Strand	Invitrogen, Darmstadt

3.9 Chemikalien und Enzyme

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), VWR (Darmstadt) oder Sigma (St. Louis, USA) in Analysequalität bezogen.

100 bp DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
1kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Adenoide	LMU-Klinikum Großhadern, HNO
Biocoll	Biochrom, Berlin
Complete, Mini, Protease Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA Agarose	Biozym, Hess
Entwicklerreagenzien	Ernst Christiansen GmbH, Planegg
FACSFlow, FACSClean, FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm, Ulm
Ionomycin-Kalziumsalz	Sigma, St. Louis, USA
Leukozytenkonzentrate aus 500ml Blut	Uniklinikum Ulm, Abteilung für Transfusionsmedizin
Milchpulver	
Nabelschnurblut	LMU-Klinikum Großhadern, Entbindungsstation
PBS	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Pfu-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Phytohämagglutinin M (PHA)	Calbiochem, Bad Soden
Protaminsulfat	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
RetroNectin	Takara Bio Inc., Shiga, Japan
T4-Ligase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Tetradecanoylphorbolacetat (TPA)	Sigma, St. Louis, USA
Trypanblau	Gibco, Invitrogen Corporation, Karlsruhe

3.9.1 Zytokine

rekombinantes humanes IL-2 (Proleukin® S)	Novartis, Basel, Schweiz
rekombinantes humanes IL-4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
rekombinantes IFN γ	Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland

3.9.2 Medien und Zusätze für eukaryotische Zellen

RPMI 1640	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories GmbH
Natriumselenit	Sigma , St. Louis, USA
Optimem I	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin / Streptomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

3.9.3 Medien und Zusätze für prokaryotische Zellen

Ampicillin-Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB-Medium	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Select-Agar	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe

3.9.4 Inhibitoren

Cyclosporin A (CsA)	Novartis, Wien
Foscarnet	Sigma , St. Louis, USA
Ganciclovir	Hoffmann-LA Roche AG, Grenzach-Wyhlen

3.10 Dienstleistungen

DNA-Sequenzierungen	Sequiserie, Vaterstetten; GATC, Konstanz
HLA-Typisierung	IMGM, Labor Dr. Klein, Martinsried
Virusserologie	Max-von-Pettenkofer-Institut, München

3.11 Computerprogramme und Internetseiten

Analyse der T-Zell-Rezeptor-Sequenzen:	IMGT (http://imgt.cines.fr)
Auswertung von DNS-Sequenzen und Planung von Klonierungen:	Sequencher 4.5, MacVector 10.0
Auswertung von durchflusszytometrischen Daten:	BD CellQuest™ Pro, FlowJo 9.5.3
Datenanalyse und Darstellung:	Excel® 2008 for Mac, Version 12.2.4 (Microsoft Corporation) Photoshop® CS (Adobe, San José, USA) Adobe Illustrator CS5 (Adobe, San José, USA) Prism 6 (GraphPad Software, Inc, CA, USA)
Errechnung der Standardkurven (ELISA):	KC4 (BioTek Instruments, Inc., Winooski, USA)
Prädiktionsanalysen:	HLA-A2 bzw. B8 -Bindungsmotive: www.syfpeithi.de www.bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind
qPCR Analysen:	LightCycler480 Software SP3, Roche, Basel, Schweiz
Textbearbeitung:	Word® 2008 for Mac, Version 12.2.1 (Microsoft Corporation)

3.12 Verbrauchsmaterial

Artikel	Bezugsquelle
96-Well-Rundbodenplatten	Nunc, Wiesbaden
96-Well-Spitzbodenplatten	Hartenstein, Würzburg
Einmalkanüle 2,1x38mm	Bovi-Vet, Kruuse, Marslev, Dänemark
Einmalküvetten 10x10x48mm	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen steril, unterschiedliche Größen	B. Braun, Melsungen
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcon-Röhrchen 15ml, 50ml	BD Biosciences, Heidelberg
Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Filtereinheit 0,45µm	Schleicher & Schuell, Dassel
Flachbodenplatten (6-/12-/24-/96-Well)	BD Falcon, Heidelberg
Impfösen	Nunc, Wiesbaden
Kanülen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kryoröhrchen Cryotube	Nunc, Wiesbaden
MACS Säulen (LS, MS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MaxiSorp® ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
MultiScreen™-HA ELISpot-Platten	Millipore, Schwalbach
Pipettenspitzen	Gilson Inc, Middleton (USA)
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf
Reaktionsgefäße verschiedener Größe	Eppendorf, Hamburg
Skalpell	A. Hartenstein, Würzburg
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellsieb, 100µm	BD Biosciences, Heidelberg

3.13 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank CO2-Unitherm 170	UniEquip Laborgerätebau Vertriebs GmbH, Planegg
Agarosegelkammer	Peqlab Biotechnologie, Erlangen Zeiss, Jena
Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena
Bestrahlungsanlage	Gammacell 40 der Firma AECL mit Cäsium- 137 (γ -Strahler)
Brutschrank CO2-AUTO-ZERO	Heraeus Holding, Hanau
Brutschrank CO2-Unitherm 170	UniEquip Laborgerätebau Vertriebs GmbH, Planegg
Eismaschine AF 200	Scotsman, Vernon Hills, USA
ELISA-Lesegerät EL-800	BioTek Instruments Inc., Winooski, USA
Entwicklermaschine	Agfa-Gevaert, Leverkusen
FACS Calibur	Becton Dickenson
Falcon-Roller TRM 50	IDL, Nidderau
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -80°C	Heraeus, München
Heiz-/Rührplatte	Thermo Scientific, Waltham, USA
Inkubationsschüttler innova 4400	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Kühlschrank	Liebherr
Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Light Cycler 480 II	Roche, Mannheim
MACS Separationseinheit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipetten	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Mikrowelle Compact Microwave Oven	Lloyds
NanoDop	PeqLab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Cycler Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
pH-Messgerät	WTW, Weilheim
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Gilson International, Limburg-Offheim
Reinstwassersystem Aquintus	MembraPure, Bodenheim
Sterilbank	BDK, Sonnenbühl-Genkingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge PICO 21 centrifuge	Heraeus Holding, Hanau
Vortexer	Scientific Industries
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Avanti J-26 XP	Beckman Coulter, Krefeld Cäsium- 137 (γ -Strahler)

4. Methoden

4.1 Zellkulturmethoden

4.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

4.1.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien und T-Zellklone wurden in einem Inkubator (Heraeus) bei 37°C und unter 5% Kohlendioxid kultiviert. Suspensionszellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % Kälberserum, 100 µg/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin und Natriumselenit gehalten. Adhärente Zellen wurden in DMEM mit den oben beschriebenen Zusätzen kultiviert. Zum Ablösen adhärenter Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellkulturflasche mit PBS gespült. Durch die Behandlung mit 0,05% Trypsin/ 0,02% EDTA bei 37°C für 5 min wurden die Zellen abgelöst und anteilig in Vollmedium weiterkultiviert.

4.1.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet mit 1,5ml Einfriermedium (bestehend aus 50% RPMI 1640 40% fötales Kälberserum und 10% DMSO) resuspendiert und in ein vorgekühltes Einfrierröhrchen überführt. Die eingefrorenen Zellen wurden zunächst bei - 80°C zwischengelagert und schließlich in die Gasphase über flüssigen Stickstoff zur dauerhaften Lagerung überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig mit vorgewärmten Medium behandelt, zentrifugiert, resuspendiert und je nach Zellart entsprechend weiterkultiviert.

4.1.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl bzw. zur Unterscheidung lebender und toter Zellen wurden diese mit Trypanblau versetzt. Tote Zellen nehmen diesen Farbstoff auf und erscheinen unter dem Mikroskop tiefblau. Vitale Zellen dagegen bleiben aufgrund ihrer intakten Zellmembran ungefärbt und erscheinen im mikroskopischen Bild hell leuchtend.

10µl einer Zellsuspension wurden mit 10 µl der Trypanlösung vermischt und zum Füllen einer Neubauer-Zählkammer verwendet.

Ein Zählgitter dieser Kammer besteht aus 4 Großquadraten mit je 16 Kleinquadraten. Das Volumen eines Großquadrates entspricht $0,1 \text{ mm}^3$. Die Zelldichte berechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{gezählte Zellzahl/ pro Großquadrat} \times 2 \times 10^4$$

4.1.1.3 Generierung von CD40-aktivierten B-Blasten (BBL)

Die Herstellung von CD40-aktivierte B-Blasten (BBL) aus primären B-Zellen erfolgte unter Verwendung von CD40-Ligand-exprimierenden Mausfibroblasten (LL8) nach dem beschriebenen Prinzip Wiesner 2008 (Wiesner et al, 2008). Diese Feederzellen wurden mit 140 Gy bestrahlt, je 1 Mio in 12well- bzw. 96well-Platte ausplattiert und innerhalb einer Woche zur Weiterkultivierung der BBL verwendet. CD40L-stimulierte B-Blasten wurden aus PBMCs generiert, indem $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 oder 1×10^5 PBMCs in einer Vertiefung einer 96-well-Flachbodenplatte mit CD40L-Zellen kokultiviert wurden. Das Medium wurde mit IL-4 (2 ng/ml) und für ca. 4-5 Wochen zusätzlich Cyclosporin A (1 μ g/ml) supplementiert. Kurz nach Absetzen des CsA wurden die BBL-Kulturen mittels PCR auf EBV-Freiheit getestet und nur die EBV-freien kultivierten Zellen wurden wöchentlich auf neue 12w-Platten mit frischen CD40L-Zellen transferiert und 2-4fach expandiert. Die LL8-Feederzellen wurden routinemäßig wöchentlich mit PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA nach 5-minütiger Inkubation bei 37°C von dem Zellkulturboden abgelöst nach 40-facher Expansion in RPMI-1640-Standardmedium weiterkultiviert.

4.1.1.4 Sammlung und Lagerung von Patientenmaterial

Die in Rahmen dieser Arbeit verwendeten Adenoide bzw. das verwendete Nabelschnurblut wurde durch die freundlicher Unterstützung der Schwestern und Ärzte des Universitätsklinikum Großhadern, der Ludwig-Maximilians-Universität München bezogen. Frisch operativ entfernte Adenoide von Kindern die maximal das neunte Lebensjahr erreicht hatten, wurden bis zur weiteren Verarbeitung maximal 24 Stunden auf Eis gelagert. Das Nabelschnurblut wurde direkt nach Abnabelung durch Punktion der Nabelvene gewonnen und bei Raumtemperatur in heparinisierten Spritzen gelagert.

4.1.2 Isolierung von peripheren mononuklearen Zellen aus Vollblut mittels Dichtezentrifugation

Mit Hilfe der Dichtezentrifugation ist es möglich Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte voneinander ab zu trennen. Als Quelle für die Gewinnung humaner Lymphozyten diente (a) frisch abgenommenes venöses Blut freiwilliger Spender, (b) Leukozytenkonzentrate (buffy coats), (c) Nabelschnurblut oder (d) frisch isolierte Adenoide. Mit Hilfe von Skalpell wurden die Adenoide zunächst mechanisch zerkleinert und anschließend durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) filtriert um Zellverbände aufzulösen. Zur Auftrennung in die zellulären Bestandteile wurden die Proben ad 35ml mit PBS verdünnt, mit 15ml Ficoll der Dichte 1,07 unterschichtet und für 30 min bei 2000g ohne Verwendung der Zentrifugenbremse zentrifugiert. Durch diesen Zentrifugationsschritt sammelten sich die PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) oberhalb der Ficolllösung in der sog. Interphase. Diese Phase wurde abgetrennt und vor der weiteren Verwendung 4 bis 5 mal mit PBS gewaschen um noch vorhandenes Ficoll bzw. Thrombozyten auszuwaschen.

4.1.3 Herstellung polyklonaler T-Zelllinien

Als Quelle für T-Zellen dienten kryokonservierte oder frische PBMCs HHV-6-positiver gesunder Spender. Durch Restimulation mit autologen mit HHV-6B-Peptiden beladenen BBL wurden daraus polyklonale T-Zelllinien generiert. Zur Anreicherung der seltenen HHV-6-spezifischen T-Zellen wurden an Tag 0 die Hälfte der frisch isolierten PBMCs mit Peptid beladen (jeweils 1 µg/ml, 2 h, 37°C). Nach mehrmaligen Waschen zur Entfernung überschüssiger Peptide wurden diese Zellen im Verhältnis 1:1 zusammen mit ungepulsten PBMCs in einer 12w-Platte 5×10^6 /well in 2 ml ausgesät. Ab Tag 14 wurde wöchentlich mit bestrahlten (50 Gy), autologen und mit entsprechenden Peptiden beladenen CD40-aktivierte B-Blasten restimuliert (Effektor:Stimulator-Verhältnis von 4:1). Zusätzlich wurde das Zytokin IL-2 als Wachstumsfaktor hinzugegeben und dessen Konzentration alle 7 Tage schrittweise erhöht. Bis zur 3. Restimulationsrunde wurde außerdem ein entsprechend dem HLA-Typ des Spenders ausgewähltes EBV- bzw. CMV- Helferpeptid hinzu gegeben. Da diese EBV- bzw. CMV spezifischen T-Zellen häufiger im Blut nachzuweisen sind, soll durch diese Kostimulation das Zytokinmilieu in der Zellkultur optimiert werden und somit die Proliferation seltener HHV-6-spezifischer T-Zellen verbessert werden.

4.1.4 Einzelzellklonierung

Zur Gewinnung von T-Zellklonen wurden polyklonale antigenspezifische T-Zelllinien einer limitierenden Verdünnungen unterzogen. Hierfür wurden je 10 Platten mit statistisch 0,7 T-Zellen pro well einer 96 Rundbodenplatte bzw. 2,5 T-Zellen zusammen mit einem Feeder-Mix ausplattiert. Der Feedermix bestand aus 10^5 /ml bestrahlten möglichst autologen oder zumindest in Bezug auf das betreffende HLA-Molekül übereinstimmender mLCLs sowie bestrahlten PBMCS von mind. 3 verschiedenen Spendern (10^6 /ml). Zusätzlich wurde das Medium mit dem Wachstumsfaktor IL-2 (1000 u/ml) supplementiert.

Nach ca. 4-5 Wochen wurden die ausgewachsenen Klone zunächst hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht und im Abstand von 2 Wochen mit einem Feedermix gleicher Zusammensetzung restimuliert.

4.1.5 Durchflußzytometrie

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie ist es möglich bestimmte Zellen in einer gemischten Zellpopulation zu quantifizieren und zu charakterisieren. Voraussetzung hierfür ist die Markierung des gewünschten Phänotyp-spezifischen Markers mit einem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörper. Sind die Zellen mit Antikörpern markiert, werden sie in einem Flüssigkeitsstrahl vereinzelt und dabei von einem Laser angeregt. Ein Detektor ermittelt nun sowohl die Anzahl aller passierenden Zellen, als auch die Anzahl der Zellen, die mit einem bestimmten Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Für die Detektion von verschiedenen Oberflächenmolekülen wurden sofern nicht anders angegeben 0,3Mio Zellen einmal in kalten FACS-Puffer (PBS/ 2% FCS) aufgenommen. Zur Färbung wurden die Zellen mit dem PE-markierten Peptid/HLA-Tetramer oder unmarkierten Peptid/HLA-Pentamer 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligen Waschen in FACS-Puffer erfolgte eine 20-minütige Inkubation auf Eis mit spezifischen Antikörper gegen verschiedene Oberflächenantigen und im Falle des unmarkierten Pentamers, zusätzlich mit Pro5 Fluorotag R-PE. Nach anschließender Fixierung mit 1,6 Paraformaldehyd Lösung wurden die Zellen innerhalb einer Woche an einem Becon Dickinson FACSCalibur Durchflußzytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte Mit Hilfe der FlowJo 8.8.4-Software.

4.1.6 Magnetische Separation von T-Zellpopulationen

Zur Isolierung einer gewünschten Zellpopulation aus PBMCs wurde eine magnetische Zellseparation durchgeführt (*magnetic activated cell sorting*; MACS). Das Verfahren der Firma Miltenyi, welches hier verwendet wurde, beruht auf der Markierung verschiedener Zellpopulation mit spezifischen monoklonalen Antikörpern, die an superparamagnetische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 50 nm gekoppelt sind. Zur endgültigen Separation wurde eine mit einer paramagnetischen Matrix ausgekleidete Säule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, verwendet. Markierte Zellen wurden durch die Antikörper an die Säule gebunden während unmarkierte Zellen die Säule durchliefen. Durch Entfernung der Säule aus dem Magnetfeld sowie unter Zuhilfenahme eines Stempels konnten die Zellen mit Puffer von der Säule gespült werden. Die Qualität der Aufreinigung wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll für positive Selektionierung.

Die gewünschte Zellsuspension wurde zentrifugiert und in 1ml Puffer (PBS+2% FCS) aufgenommen und mit 50µl des entsprechenden Erst-Antikörpers (z.B. CD-PE) für 15 min bei 4°C inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte bei 4°C sowie eine Aufnahme der Zellen in 1ml Puffer. Die darauf folgende Inkubation mit dem magnetischen Zweit-Antikörper (z.B. anti-PE; 20µl/10Mio Zellen) wurde ebenfalls bei 4°C für 15min durchgeführt. Während der anschließenden Waschschrte wurde bereits eine der Zellzahl entsprechenden Säule mit Puffer equilibriert. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und mit dem dreifachen Säulenvolumen an Puffer nachgespült. Zur Gewinnung der positiv markierten Zellen wurde die Säule vom Magneten entfernt und mit Puffer unter zur Hilfenahme eines Stempels eluiert. Um eine mögliche Aktivierung der gewünschten Zellpopulation durch die Markierung mit Antikörpern zu vermeiden wurde eine Negativselektion durchgeführt. So wurden alle nicht gewünschten Zellen durch magnetische Partikel in der Säule gehalten während die (nicht markierten) benötigten Zellen im Durchlauf aus der Säule austraten.

4.1.7 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Zur Quantifizierung verschiedener Zytokine wurden entsprechende Detektionskits der Firma Mabtech bezogen und gemäß der Herstellerangaben durchgeführt.

Üblicherweise wurde der Überstand nach einer 12 Stunden Inkubation von 10.000 Effektorzellen mit 20.000 targets verwendet. 96well-ELISA-Platten wurden zuvor über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper (capture Antikörper 1:500 in PBS) inkubiert, 4 mal gewaschen (0,05% Tween-

20 in PBS) und schließlich freie Bindungsstellen mit serumhaltigen Medium für 1 Stunde geblockiert.

Daraufhin folgte eine 2-stündige Inkubation mit je 50µl Kulturüberstand bzw. titriertem Standard. Überstand und Standard wurden nach mehrmaligen Waschen entfernt und je 50µl Zweit-Antikörper (detection Antikörper 1:1000 in PBS) pro well für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen wurde je 50 µl des Dritt-Antikörpers (gekoppelt mit alkalischen Phosphatase 1:1000 in PBS) für eine Stunde zugegeben. Zur endgültigen Entwicklung wurde das 5fach-Konzentrat p-Nitrophenylphosphat (50% Diethanolamin, 5 mg/ml *p-NPP*, 0,5 mM MgCl₂*6 H₂O, pH 9,5) entsprechend mit Wasser verdünnt und mit MGSO₄ versetzt. 50µl dieser Substratlösung wurde nach dem Waschschrift (4x) pro well zugegeben und die Entwicklung am ELISA-Lesegerät bei 405nm verfolgt. Zur Quantifizierung der Zytokinmenge wurde eine Standardkurve verwendet.

4.1.8 ELISpot (enzyme-linked immunosorbent spot assay)

Mit dem Elispot-Verfahren ist es möglich die Zytokinsekretion einzelner Immunzellen nach Kontakt mit einem definierten Antigen zu detektieren sowie die Häufigkeit dieser sezernierenden Zellen innerhalb einer Zellpopulation zu bestimmen (Versteegen JM, 1988). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der IFN-γ-ELISpot-Kit der Firma Mabtech (Nacka Strand, Schweden) gemäß den Herstellerangaben zur Quantifizierung HHV-6B-spezifischer T-Zellen verwendet. Sofern nicht anders angegeben wurden entweder HHV-6-spezifische Peptide (1µg/ml) oder mit Peptiden gepulste BBL zur Stimulation von T-Zellen verwendet. Das Gesamtvolumen pro well war 200µl. Als Positivkontrollen wurden die pan-T-Zellaktivatoren TPA (Tetradecanoylphorbolacetat, 100 ng/ml; Ionomycin 1 µM) und PHA (Phytohämagglutinin M; 10 µg/ml) eingesetzt. Der Boden einer ELISpotplatte, bestehend Nitrozellulosemembran, wurde mit Antikörpern gegen humanes IFN-γ über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen und Blocken der freien Bindungsstellen der ELISpot-Platte wurden im nächsten Schritt die Effektorzellen mit dem zu testenden Antigen zugegeben. Durch Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen wurden die T-Zellen aktiviert und sezernierten IFN-γ, das von den immobilisierten Erst-Antikörpern gebunden wurde. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Effektorzellen entfernt und ein zweiter IFN-γ-Antikörper zugegeben, an den Alkalische Phosphatase gekoppelt war. Dieses Enzym spaltet das im letzten Schritt zugegebene Substrat BCIP/NPT (5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitrotetrazolblauschlorid) und bewirkte die Färbung des Areal um die Stelle, an der zuvor eine IFNγ-sezernierende T-Zelle lag („Spot“). Die Auszählung erfolgte mit Hilfe eines

automatisierten Lesegerätes. Aus der Spotanzahl konnte auf die Frequenz spezifischer, IFN- γ -produzierender T-Zellen rückgeschlossen werden, da die eingesetzte Gesamtzellzahl von PBMCs bekannt war.

4.1.9 Infektion von Zellen mit HHV-6

4.1.9.1 HHV-6-Propagierung

Die Virusstämme U1102 (HHV-6A) und HST (HHV-6B) wurden im Rahmen dieser Arbeit durch Infektion von aus Nabelschnurblutlymphozyten hergestellten PHA-Blasten expandiert. Hierfür wurden die aus Nabelschnurblut isolierten Lymphozyten mit 5 μ g/ml PHA (Phytohämagglutinin) in einer Konzentration von 1Mio/ml (1,5Mio/well) einer 24-well Platte stimuliert. Nach einer Inkubation von 3 Tagen wurden die PHA-Blasten gezählt und erneut in einer Konzentration von 1 Mio/ml ausplattiert. Die Infektion erfolgte mit jeweils 230 μ l/well des vorher ebenfalls auf Nabelschnur-PHA-Blasten passagierten und bei -80°C gelagerten HST- bzw. U1102- haltigen Zellkulturüberstands. Nach 5-7 Tagen, als der zytopathische Effekt am höchsten war, wurden die infizierten Zellkulturen geerntet, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert (0,45 μ m). Die virushaltigen Überstände wurden zu 1ml aliquotiert und bei -80°C eingefroren oder sofort auf frischen PHA-Blasten weiterpassagiert.

4.1.9.2 Infektion von PHA-Blasten zur Herstellung als Zielzellen für die T-Zellanalyse

Zunächst wurde durch Positivselektion die CD4⁺-Subpopulation aus PBMCs isoliert, die für eine Infektion mit HHV-6 in vivo besser zugänglich ist. Die frisch separierten CD4⁺-T-Zellen wurden mit PHA (5 μ g/ml) stimuliert und in einer Zellkonzentration von 1Mio/ml in einer 24well- Platte (2ml) ausgesät. Nach 3 Tagen wurden diese PHA-Blasten erneut gezählt und auf eine Konzentration von 1Mio/ml eingestellt. 1,5ml /well dieser Zellsuspension wurden in eine neue 24w-Platte überführt und mit 240 μ l Virusüberstand infiziert. Je nach Gestaltung des Experiments wurden die infizierten Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion mit T-Zellen über Nacht kokultiviert.

4.1.10 Analyse des T-Zellrezeptors

Das TCR-V α β -Repertoire wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) untersucht. Hierfür wurden nach RNA-Isolation mit Hilfe des RNeasy Mini-Kits (Qiagen, Hilden) und cDNA-Synthese (reverse Transkription mit MuLV- reverse Transkriptase und oligo-dT-Pimer) die Gensegmente der variablen Ketten des T-Zellrezeptors mit spezifischen Primern amplifiziert.

Dazu wurde mit Hilfe von 34 verschiedener V α -Primer (Steinle et al, 1995) eine subfamilienspezifische PCR der TCR α -Kette durchgeführt. Die TCR β -Kette wurde mittels degenerierten V β -Primern (Zhou et al, 2006) untersucht. Nach Sequenzierung der spezifisch amplifizierten DNA-Produkte wurde zur Bestimmung der verwendeten TCR-Gensegmente und CDR3-Regionen das Programm V-QUEST von IMGT verwendet.

4.1.11 Klonierung des T-Zellrezeptors in den retroviralen Vektor MP71Gpre

Um die HHV-6-spezifischen T-Zellrezeptoren für den retroviralen Transfer zugänglich machen zu können, wurden die Gene der TCR α - und β -Kette in den Vektor MP71Gpre (abgeleitet vom Retrovirus Myeloproliferatives Sarkomvirus (MPSV) kloniert (Abb. 4.1).

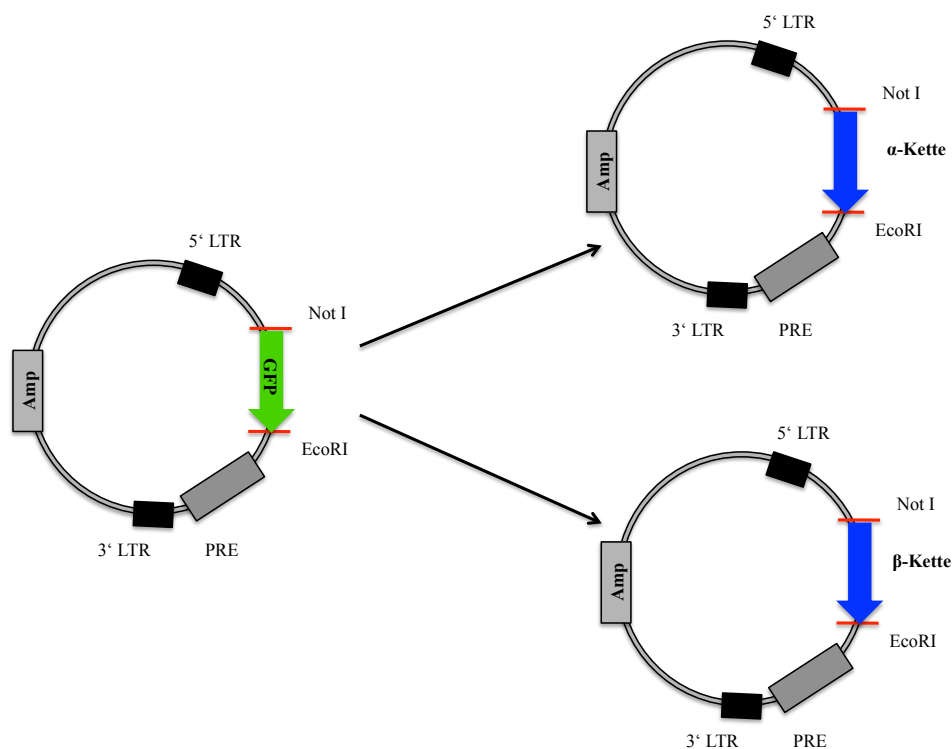


Abb. 4.1 : Schematische Darstellung der Klonierung der Vektoren für den retroviralen TCR-Transfer. Die Gene für die TCR α - und β -Kette wurden durch enzymatischen Verdau mit den Restriktionsenzymen EcoR I und Not I separat in den retroviralen Vektor MP71Gpre kloniert, wobei das vorhandene GFP-Gen ersetzt wurde. Amp: Ampicillinresistenzgen; LTR: long terminal repeats; PRE: posttranskriptionelles regulatorisches Element aus dem Murmeltier-Hepatitisvirus.

Hierfür wurden die TCR α - und β -Kette von der isolierten cDNA mit spezifischen Primern, die 5'-Not I- und 3'-EcoR I-Restriktionsschnittstellen sowie eine Kozak-Sequenz (CCACCATGG)

um das Startkodon ATG enthielten, amplifiziert. Der Einbau der TCR α - und β -Gene in den Vektor MP71Gpre erfolgte separat über die *Not* I- und *EcoR* I-Schnittstellen, so dass dadurch das im Vektor enthaltene GFP-Gen ausgetauscht wurde. Anschließend wurden die hergestellten TCR-Kassetten durch DNA-Sequenzierung überprüft.

4.1.12 Retroviraler TCR-Transfer

4.1.12.1 Herstellung von Retroviruspartikeln

Zur Herstellung von amphotropen Mausleukämievirus (MuLV)-pseudotypisierten Retroviren wurden die Expressionsplasmide für die Moloney-MLV *gag/pol*-Gene (pcDNA3.1MLVg/p) und das MuLV-10A1 *env*-Gen (pALF-10A1) zusammen mit (a) den die entsprechenden TCR-Ketten enthaltenden retroviralen Vektoren der α - und β -Kette, oder (b) dem GFP-tragenden Vektor MP71Gpre (Transfektions- und Transduktionskontrolle) oder (c) ohne retroviralen Vektor (mock-Kontrolle) in 293T-Zellen eingebracht (Leisegang et al, 2008). Dazu wurden die 293T-Zellen mit Hilfe der PEI-Transfektionsmethode transfiziert.

Nach 48 Stunden wurde der retrovirushaltige Zellkulturüberstand geerntet, filtriert (0,45 μ m Porengröße) und sofort zur Transduktion von T-Zellen eingesetzt.

4.1.12.2 Transfektion von T-293 mittels PEI

293-Zellen wurden chemisch mit Hilfe des kationischen Polymers Polyethylenimin (PEI) transfiziert. Hierfür wurden am Tag zuvor 6×10^5 Zellen pro Well in einer 6-well-Platte in 3ml Medium ohne Selektionszusätze ausplattiert. Für eine effiziente Transfektion sollte die Platte am nächsten Tag zu 70 % konfluent sein. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und 1 ml Optimem (ohne Zusätze) zugegeben. Pro Well wurde folgender Ansatz verwendet:

Lösung A: 100 μ l Optimem + 1 μ g zu transfizierende DNA Lösung

B: 100 μ l Optimem + 4 μ l PEI (1 mg /ml)

Nach Vereinigung der beiden Lösungen und 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die ausplattierten Zellen damit behandelt. Nach vier bis sechs Stunden Inkubation bei 37°C wurde das Transfektionsreagenz abgesaugt und durch 3ml frisches Medium (ohne Selektionszusätze) ersetzt und die transfizierten Zellen weiter unter Standardbedingungen kultiviert. Nach 2 Tagen wurde im Falle einer Transfektion mit retroviralen Plasmiden der

Virusüberstand geerntet. Im Falle einer Transfektion mit HLA-kodierenden Plasmiden wurden die transfizierten Zellen ebenfalls nach 2 Tage für ein T-Zellexperiment verwendet.

4.1.12.3 Transduktion von Jurkat76-CD8 α

Zur Verbesserung der Aufnahme von retroviralen Partikeln durch Zellen wurden die Transduktionen in RetroNectin beschichteten Platten durchgeführt. Hierzu wurden unbehandelte 24-well-Platten mit 400 μ l RetroNectin ($c_{\text{end}} = 12,5$ mg/ml) beschichtet. Nach 2 h Inkubation bei RT wurde das RetroNectin durch 500 μ l 2 %ige BSA-Lösung ersetzt. Nach weiterer Inkubation (30 min bei 37 °C) wurden die wells mit 2 ml PBS (2,5 % HEPES) gewaschen, in 2 ml PBS (2,5% HEPES) bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche verwendet.

Zur Transduktion von Jurkat76-CD8 α -Zellen wurden 0,1 Mio Zellen mit 4 μ g/ml Protaminsulfat in 1 ml RPMI (10 % FKS) aufgenommen und in ein RetroNectin- beschichtetes well überführt. 1 ml Virusüberstand wurde je well zugegeben. Die Platten wurden bei 2 000 rpm und 32 °C 90 min zentrifugiert und anschließend im Brutschrank inkubiert. Nach circa 3 bis 4 Tagen konnten die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Als Transfektionskontrolle wurde der ursprüngliche pMP71GPRE-Vektor, der die eGFP- Sequenz beinhaltet, verwendet. Anhand der grün fluoreszierenden Jurkat76-CD8 α -Zellen konnte eine Aussage über die Transduktionseffizienz getroffen werden.

4.2 Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

4.2.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Die Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agarplatten bei 37 °C kultiviert. Durch Zugabe von Antibiotika (Ampicillin 100 μ g/ml) wurden transformierte Bakterien entsprechend dem vektorkodierten Resistenzgen selektiert. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine konfluent gewachsene Bakterienkultur mit 50% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

4.2.2 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* DH5 α nach der CaCl₂ Methode

400 ml LB-Medium wurden mit einer 5 ml Übernachtskultur von *E.coli* DH5 α angeimpft und bei 18 °C und 200rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 hochgeschüttelt. Die Kultur wurde anschließend auf eisgekühlte 50ml-Röhrchen verteilt, 10 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (1600 g, 7 min, 4 °C). Die Zellpellets wurden in jeweils 10ml eiskalter CaCl₂-

Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (1100 g, 5 min, 4 °C). Die Zellpellets wurden erneut in 10ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (1100 g, 5 min, 4 °C). Schließlich wurden die Zellpellets in 2ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, in Aliquots von 200µl in eiskalte 1,5ml- Reaktionsgefäße überführt, in flüssigen Stickstoff gefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

4.2.3 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Als Transformation wird das Einbringen von Plasmid-DNA in elektro- oder chemokompetente Bakterien und Hefen bezeichnet (Cohen et al, 1972). Pro Ansatz wurden 50µl chemischer kompetenter DH5α langsam auf Eis aufgetaut und anschließend 1-2µl des entsprechenden Ligationsansatzes zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis sowie einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42 °C erfolgte erneut eine Inkubation auf Eis (2min). Im Anschluss daran wurden die transformierten Zellen mit 1000µl LB-Medium ohne Antibiotikum versetzt und 60 Minuten bei 37 °C geschüttelt. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000g 3min pelletiert, in 100µl Medium resuspendiert und auf LB-Nährbodenplatten mit entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und ca. 16 Stunden bei 37°C inkubiert.

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits der Firma QIAGEN und wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Entsprechende Zellen wurden eingesammelt und zentrifugiert, anschließend lysiert und 2min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der klare Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 70%-igen Ethanol vermischt. Dieses Gemisch wurde auf eine RNeasy Mini-Säule gegeben, die auf einem Zentrifugenröhrchen saß, und für 15s bei 10.000U/min zentrifugiert. Dadurch wurde die RNA an der Silikon-Gel-Membran der Säule absorbiert und die durch die Membran in das Zentrifugenröhrchen durchgetretene Flüssigkeit wurde verworfen. Es folgten insgesamt zwei Waschschrte bis die RNA schließlich mit RNA-freien Wasser eluiert wurde.

4.3.2 Quantifizierung und Reinheit der isolierten RNA

Die in DEPC Wasser gelöste RNA wurde bei 260nm und 280nm photometrisch (Nanodrop) vermessen. Die RNA Menge wird durch den Wert bei 260nm quantifiziert. Für die RNA Qualität kann der Quotient aus den Werten bei 260nm und 280nm gebildet werden. Je näher der Quotient sich dem Wert 2.0 nähert, umso geringer sind die Verunreinigungen mit Proteinen. Typische Werte für den Quotienten lagen im Bereich von 1,6 –1,8.

4.3.3 DNase Verdau von RNA

Vor der weiteren Verwendung der RNA wurde eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA durch einen DNase Verdau entfernt. Hierfür wurde die RNA zu Beginn für 90min bei 37°C mit „DNaseI -Amplification Grade“ (Invitrogen) inkubiert gefolgt von einer Hitzehinaktivierung der DNase (10min 65°C).

Reagenz	Volumen/Probe
RNA	1 µg
Puffer [10x]	1 µl
DNase I [1U/µl]	1 µl
rRNasin RNase Inhibitor [40U/µl]	0,5 µl

4.3.4 cDNA Herstellung

Für die Herstellung von cDNA wurden 500ng der isolierte RNA verwendet. Die reverse Transkription der mRNA erfolgte mit dem „SuperScript™ III First-Strand“ cDNA Kit von Invitrogen. Die Proben wurden nach folgendem Schema zusammenpipettiert:

500 ng RNA

1 µl Random Hexamers

1 µl Annealing Buffer

ad 8 µl RNase/DNase-free Wasser

der Ansatz wurde für 5 min bei 65°C inkubiert, anschließend während der Zugabe von

10 µl 2X First-Strand Reaction Mix

2 µl SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix

auf 4°C gehalten. Zusätzlich wurde eine Kontrolle ohne Enzym Mix angesetzt. Die cDNA Herstellung wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

25°C: 5-10 min

50°C: 50 min

85°C: 5min

4°C

Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt oder unmittelbar nach einer 1:10 Verdünnung mit Wasser für (semi-)quantitative RT-PCR-Analysen weiter verwendet.

4.3.5 RT-PCR

Die *real-time* PCR ist eine sensitive Technik zur Amplifikation und gleichzeitigen Quantifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz, basierend auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR (Higuchi et al, 1992). Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenzmessungen während der PCR-Zyklen und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach Ablauf der PCR quantitativ ausgewertet werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Die PCR-Produkte können beispielsweise durch Fluoreszenzfarbstoffe, die unspezifisch doppelsträngige DNA binden, detektiert werden. Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff SYBR GREEN führt durch Interkalierung zu einer starken Erhöhung der Fluoreszenz, wohingegen freies SYBR GREEN nur sehr schwach fluoresziert. Die Signalstärke nimmt aufgrund der Amplifikation des PCR-Produktes mit zunehmender Zyklenzahl zu. Um spezifische von unspezifischen Produkten und von Primer-Dimeren zu unterscheiden, wurde jeweils am Ende des PCR Laufes eine Schmelzkurve bestimmt. Proben, bei denen die Schmelzkurve mehrere Produkte zeigte, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die Primersequenzen wurden mit Hilfe der Universal Probe Library Software von Roche (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp>) und der Software Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) entwickelt.

Für jedes Primerpaar wurde die PCR Reaktion solange optimiert, bis sie eine Effizienz von mehr als 1,9 ohne unspezifische Produkte erreicht hatten.

Der Zeitpunkt, zu dem genügend Amplifikat vorhanden ist, so dass das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund tritt, wird als *Crossing-point (Cp)* bezeichnet. Je mehr *Template* vorhanden ist, desto früher tritt das Fluoreszenzsignal aus dem Hintergrund. Die Menge an *Template* ist dabei umgekehrt proportional zur Anzahl der erforderlichen PCR- Zyklen. Der Cp-Wert wird anhand des Maximums der zweiten Ableitung der während der Amplifikation aufgezeichneten Fluoreszenzkurve berechnet.

Um Schwankungen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA zu berücksichtigen, werden die Transkriptmengen der Zielgene auf ein Referenzgen normalisiert. Als Referenzgen werden meist nicht regulierte Haushaltsgene (hier: GUSB) herangezogen.

Die Mastermixe für verschiedene Proben wurden zusammengemischt und in eine spezielle 96 Well Platte (Roche) pipetiert.

1µl Forward-Primer
 1µl Reverse-Primer
 2µl Wasser
 5µl SYBR Green I (Roche)

Im Anschluss wurden 2µl cDNA dazugegeben, die Platte kurz abzentrifugiert und in das Light Cyclor 480 Gerät (Roche) platziert. Als Kontrollen wurde statt der cDNA Wasser zugegeben. Nach Zugabe aller Reaktionskomponenten wurden die Platten mit selbstklebenden optischen Folien (Roche) verschlossen. Die RT-PCR wurde nach folgendem Programm durchgeführt:

Aktivierung:	95°C; 10 min
Amplifikation: (45 Zyklen)	95°C; 10s 60°C; 10s 72°C; 10s
Schmelzphase:	95°C; 5s 65°C; 10s Erhitzen auf 95°C
Abkühlung:	4°C; 10s

4.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA

4.3.6.1 Miniprep

Für die Isolierung kleiner Plasmid-DNA-Mengen wurde am Vortag eine entsprechende Bakterienkolonie gepickt und über Nacht in 5ml LB-Medium mit entsprechendem Selektionsantibiotikum in einem Bakterienröhrchen bei 37°C und 200rpm geschüttelt.

Unter Verwendung des Miniprep Kits der Firma Qiagen wurde die Plasmid-DNA nach dem Prinzip der alkalischen Lyse gewonnen und die Konzentration anschließend photometrisch bestimmt.

4.2.6.2 Maxiprep

Zur Gewinnung größerer DNA-Mengen wurden 5ml einer Vorkultur mit 400 ml LB-Medium versetzt mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum in einem Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C im Schüttler bei 200 rpm angesetzt. Die anschließende Plasmid-Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die so gewonnene Plasmid-DNA wurde anschließend in H₂O aufgenommen und die Konzentration photometrisch ermittelt.

4.2.7 Restriktionsverdau von DNA

Plasmid-DNA und durch PCR gewonnene DNA-Fragmente wurden mit Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas bzw. NEB geschnitten. Die Versuche wurden den Herstelleranweisungen folgend und mit den vom Hersteller empfohlenen Puffern durchgeführt. Bei einem Doppelverdau wurde der Puffer verwendet, durch welchen die höchste Enzymaktivität gegeben war. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde anschließend durch Gelelektrophorese überprüft.

Restriktionsspaltung von DNA	
DNA	1 µg
Restriktionsenzym	2-10 U
10x Restriktionspuffer	2 µl
100x BSA	0,2 µl
ad 20 µl H ₂ O	
Inkubation für 2 h bei 37°C	

4.2.8 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Anhand der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Je nach Größe der Fragmente erfolgte die Auftrennung in 1,0-1,5%igen Agarosegelen, die in TAE-Laufpuffer angesetzt worden waren. Zur Detektion der Fragmente waren dem Gel 10 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben worden. Das ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der in die DNA interkaliert und nach Absorption von ultraviolettem Licht bei 254 nm, sichtbares Licht emittiert. Die Proben wurden mit 1 x DNA-Ladepuffer versetzt und auf das Gel geladen. Der Gellauf erfolgte bei 5-8 V/cm. Die Fragmentgröße und die DNA-Menge wurden anhand eines DNA-Größenstandards bestimmt.

4.3.9 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Für die weitere Verwendung eines PCR-Produkts mussten zunächst aus dem Ansatz die Primer, Nukleotide und die Polymerase entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin® Extract Kit von Macherey-Nagel. Das PCR-Produkt wurde in 2 x 15 bzw. 25 µl dH₂O eluiert. Um ein DNA-Fragment nach einem Restriktionsverdau aufzureinigen wurde der Ansatz auf ein Agarosegel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande mit dem gewünschten DNA-Fragment wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin® Extract Kit von Macherey-Nagel aufgereinigt. Das Fragment wurde in 2 x 25 µl 1 x TE-Puffer eluiert.

4.3.10 Isolierung von Gesamtprotein aus eukaryotischen Zellen

Die Zellen wurden geerntet und mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 10 µl RIPA-Lysepuffer pro 10⁶ Zellen für 30 min auf Eis. Unerwünschte Zellbestandteile wurden bei 4°C und 14.000 x g für 20 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

4.3.11 Bestimmung des Proteingehaltes mittels Bradford-Reagenz

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in 96-well Flachboden Microtiterplatten. Zur Herstellung einer Eichgeraden diente ein BSA-Standard (mit den Konzentrationen 1200 µg/ml, 1000 µg/ml, 800 µg/ml, 600 µg/ml, 400 µg/ml, 200 µg/ml). Zu den BSA-Standards, den Nullkontrollen und den Proben wurden jeweils das Bradford-Reagenz (Biorad) hinzu gegeben 5 Minuten bei 37°C inkubiert und die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 595nm im ELISA-

Reader gemessen und die Proteinkonzentrationen anhand einer Eichgeraden des BSA-Standards bestimmt. Es wurde jeweils der Mittelwert aus Triplikaten ermittelt.

4.3.12 Dot Blot

Die Expression viraler Antigene in infizierten Zellen wurde mit fünf kommerziell erhältlichen Antikörpern unterschiedlicher Spezifität im Dot Blot getestet. Hierfür wurden pro Antikörper je 0,5 Mio intakte bzw. lysierte Zellen auf eine Hybond ECL-Membran (Amersham) aufgebracht. Nachdem die Flüssigkeit vollständig getrocknet war, wurde sie für eine Stunde in 5% Milchpulver in TBS/Tween geblockt und anschließend über Nacht, ebenfalls in dieser Blocklösung, mit einem der verschiedenen Antikörper (Verdünnung: 1:100) bei 4°C auf einer Rollmaschine inkubiert. Nach drei Waschsritten in TBS/0,05% Tween für je 5 min erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (anti-Maus, HRP-gekoppelt, 1:10.000) für 1 h bei Raumtemperatur. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS/0,05% Tween entfernt. Da dieser direkt mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war, konnte der Blot nach Benetzung mit ECL-Reagens direkt entwickelt werden (ECL-Reagens, Amersham).

5. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die umfassende Untersuchung antigen-spezifischer CD8⁺-T-Zell-Antworten gegen HHV-6B. Hierfür wurden im Verlauf dieser Arbeit 3 verschiedene Ansätze verwendet (Abb. 5.1.1). Die Fragestellung wurde zunächst mit einem vergleichsweise limitierten Ansatz bearbeitet, um erste Informationen darüber zu erhalten, ob HHV-6B-spezifische CD8⁺-T-Zellen überhaupt existieren und in vitro analysiert werden können. Für diesen Ansatz wurden lediglich drei Antigene von HHV-6B ausgewählt, und eine begrenzte Zahl von Epitopkandidaten wurde vorhergesagt und getestet, indem periphere Blutzellen mit den entsprechenden Peptiden stimuliert und so antigen-spezifische T-Zelllinien hergestellt wurden (Abb. 5.1.1). Bei den drei Antigenen handelte es sich um die Genprodukte von U11, U54 und U90, diese wurden wegen ihrer Funktions- oder Positionshomologie zu bekannten immundominanten Antigenen aus CMV ausgewählt.

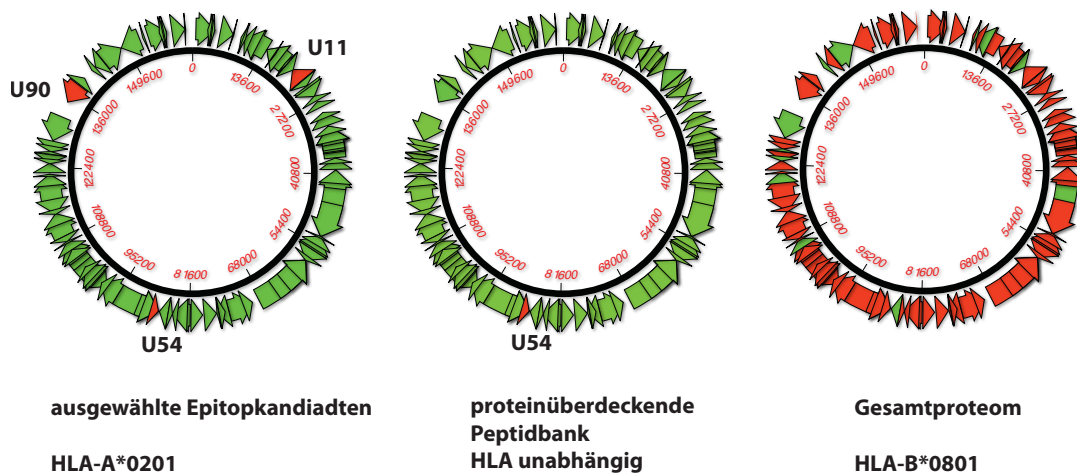


Abb.5.1.1 Überblick über drei peptidbasierte Ansätze zur Identifizierung und Charakterisierung von HHV-6B-spezifischen T-Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Ausgewählte Proteine wurden rot hervorgehoben.

Dieser erste Ansatz wurde im Labor von Dr. Andrea Schub etabliert und die funktionelle Analyse von daraus erhaltenen HHV-6B-spezifischen T-Zellklonen bildete den ersten Teil der vorliegenden Arbeit. Nachdem etabliert war, dass U54 ein Zielantigen der HHV-6B-spezifischen T-Zellantwort ist, wurde im zweiten Teil der Arbeit eine proteinüberdeckende Peptidbank

verwendet, um die U54-spezifische T-Zellantwort gründlicher zu untersuchen. Im dritten und umfangreichsten Teil der vorliegenden Arbeit wurde schließlich eine Querschnittsanalyse von Zielantigenen der HHV-6B-spezifischen T-Zellantwort ohne Einschränkung auf bestimmte Antigene durchgeführt, jedoch mit der Einschränkung auf ein bestimmtes, besonders geeignetes MHC-Klasse-I-Allel, nämlich HLA-B*0801. Mit Hilfe dieses dritten Ansatzes konnte gezeigt werden, dass die HHV-6B-spezifische T-Zellantwort gegen ein breites Spektrum von viralen Antigenen aus unterschiedlichen Phasen des Replikationszyklus gerichtet ist.

5.1 T-Zellantworten gegen Epitope aus U11, U54 und U90

5.1.1 Auswahl der Kandidaten-Epitope

Im Rahmen von Vorarbeiten war es Andrea Schub in unserem Labor gelungen, HHV-6B-spezifische T-Zellklone zu generieren und erste Epitope zu charakterisieren. Diese Klone richteten sich gegen die Strukturproteine U11 und U54.

Die Proteine U11, U54 und U90 waren als Kandidaten-Antigene aufgrund ihrer Homologie zu bekannten T-Zellantigenen des Beta-Herpesvirus CMV ausgewählt worden. Bei CMV richten sich ausgeprägte CD8⁺-T-Zellantworten gegen die Tegumentproteine pp65 und pp150 sowie gegen das Nukleoprotein IE-1 (Elkington et al, 2003; Sylwester et al, 2005). Deren postulierte Funktionshomologe in HHV-6B sind U11, U54 und U90 (Dominguez et al, 1999; Gompels et al, 1995). Für eine Anzahl von HLA-Allelen, die in der europäischen Bevölkerung häufig vorkommen (HLA-A*0101, HLA-A*0201, HLA-A*2402, HLA-B*0702, HLA-B*0801 und HLA-B*3501), wurde zur Auswahl potentieller CD8⁺-T-Zellepitope der Vorhersage-Algorithmus SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) (Rammensee et al, 1999) sowie weitere Kriterien verwendet. Bei SYFPEITHI wird davon ausgegangen, dass jede Aminosäure eines an MHC-Klasse-I gebundenen Peptids einen unabhängigen Beitrag zur Stabilität des MHC-Peptid-Komplexes leisten kann. Jede Aminosäure an jeder Position des Peptids erhält einen Koeffizienten zwischen -3 und 10, und die Addition dieser Koeffizienten ergeben eine Punktzahl, die mit der Wahrscheinlichkeit der Bindung des Peptids an das MHC-Molekül korreliert (Rammensee et al, 1999). Besonders wichtig für die Bindung eines Peptids an ein MHC-Molekül sind bestimmte Aminosäuren wichtig, sogenannte Ankerreste, deren Seitenketten in Bindetaschen im Inneren des MHC-Moleküls hineinragen. Die Identität dieser Ankerreste ist daher der wichtigste Anhaltspunkt für die Vorhersage der Bindung eines bestimmten Peptids an

ein bestimmtes MHC-Molekül. Daher wurden aus den möglichen Epitopen aus den HHV-6B-Proteinen U11, U54 und U89/90 solche ausgewählt, die erstens einen hohen SYFPEITHI-Score hatten und die zweitens die für das jeweilige HLA-Allel erforderlichen konservierten Ankerreste aufwiesen. Die folgende Tabelle gibt Aufschluss über die Zusammensetzung der so definierten ersten Peptidbank aus Epitopkandidaten verschiedener HLA-Klasse-I-Restriktionen.

Tab. 5.1.2 Übersicht der 30 Epitopkandidaten aus dem HHV-6B Stamm Z29

Protein	CMV-Homolog	HHV-6B (Z29)	HHV-6B (HST)	HHV-6A (U1102)	HLA-Restriktion
U11	pp150	YLVTSINKL	YLVTSINKL	YL I TSINKL	A2
		SLMSGVEPL	SLMSGVEPL	SLMSGVE SP	A2
		YLGKLFVTL	YLGKLFVTL	YLGKLF LAL	A2
		GILDFGVKL	GILDFGVKL	GILDF NVKF	A2
		DLSRDLDV	DLSRDLDV	DLS RE LDSA	A2
		MLWYTVYNI	MLWYTVYNI	MLWYTVYNI	A2
		DVVNGLANL	DVVNGLANL	DVVNG F ANL	A2
		LYNTFILWL	LYNTFILWL	LYN LLV LWL	A24
		DYEIIKSSL	DYEIIKSSL	DY D IIKSSL	A24
		FRKQKKLDL	FRKQKKLDL	FRKQK QSDI	B8
		LDRDKVQRL	LDRDKVQRL	LDRDKV ERL	B8
		RPSADLARL	RPSADLARL	KSS LDPARL	B7
		DPWDENGYL	DPWDENGYL	DPWDENGYL	B7
QPKSLDAPL	QPKSLDAPL	NSR SLDSFL	B7		
U54	pp65	LLCGNLLIL	LLCGNLLIL	LLCGNLLIL	A2
		ILYGPLTRI	ILYGPLTRI	VI YGPLTRI	A2
		SMGIFLKSL	SMGIFLKSL	NMGIFL SSL	A2
		DYLLDDTFF	DYLLDDTFF	DYLLDD NFY	A24
		LPVQRIEAY	LPVQRIEAY	LPVQRIE AH	B35
		GPLTRIKIY	GPLTRIKIY	GPLTRIKI Q	B35
		MPPETPQSL	MPPETPQSL	MPP GTP QNL	B7
		QPVSRAPSL	QPVSRAPSL	QAVLR TPSL	B7
U89/90	IE-1	LVLEQLGQL	LVLEQLGQL	LGLEQL S QL	A2
		KLDKEMEAV	KLDKEMEAV	KLDKEMEAV	A2
		GYPDYDPF	GYPDYDPF	GYPDYDPF	A24
		TAKRKNVPI	TAKRKNVPI	VAKRKHVSS	B8
		SKKIKLDR	SKKIK I DKL	NKKIKT DQL	B8
		PSKSKIKL	PSKSKIK I	SPKNKKIKT	B8
		ISEMITFGY	ISEMITFGY	ISEM MM FGY	A1
		KPRRHQFKI	KP HRH QFKI	KLLR RGFKV	B7

Mit Hilfe dieser Peptidbank waren erste Untersuchungen zur Analyse der HHV-6B-spezifischen T-Zellantwort durchgeführt worden (Vorarbeiten von Andrea Schub). U11-spezifische (MLW, SLM und GIL; siehe Tabelle 5.1.2) sowie U54-spezifische (ILY, LLC) T-Zellklone waren

generiert und hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht worden. Für die U54-spezifischen T-Zellklone war eine Erkennung von HHV-6B-infizierten Zellen 6 Tage nach Infektion nachgewiesen worden. Dieser Zeitpunkt war gewählt worden, weil der durch das Virus verursachte zytopathische Effekt in diesem Stadium maximal erschien. Darüber hinaus waren MHC/Peptid-Multimerfärbungen durchgeführt worden, um die T-Zellhäufigkeiten von ILY- und MLW-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut gesunder Spender zu erfassen.

5.1.2 Analyse der Präsentation von U54 gegenüber spezifischen CD8+-T-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die zuvor etablierten U54-spezifischen T-Zellklone HHV-6A (Stamm U1102) bzw. HHV-6B (Stamm HST) erkennen. Auch sollte untersucht werden, ob diese Erkennung davon abhängt, ob die infizierten Zellen das Virus aktiv replizieren. Zu diesem Zweck wurden die Versuche auch unter Zugabe von Replikationsinhibitoren durchgeführt. Zunächst musste hierfür ein geeignetes Infektionssystem etabliert werden. Aus der Literatur war bereits bekannt, dass HHV-6B in der T-Zellleukämie-Linie MOLT-3 vermehrt werden kann (Ablashi et al, 1991), und dass HHV-6A und -6B in zuvor mit PHA (Phytohämagglutinin M) aktivierten primären mononukleären Nabelschnurblutzellen (Biberfeld et al, 1987) kultiviert werden können. Generell werden primäre aktivierte CD4+-T-Zellen von HHV-6 in vitro besonders effizient infiziert (Lusso et al, 1988). Zur ersten Überprüfung, ob Infektion stattgefunden hat, genügt eine mikroskopische Kontrolle, da HHV-6-infizierte Zellen einen deutlichen zytopathischen Effekt zeigen, der ähnlich wie bei CMV-infizierten Zellen mit starker Zellvergrößerung einhergeht. Da die Kultivierung von HHV-6B auf Molt-3-Zellen, entgegen der Literatur, zu keinerlei phänotypischer Veränderung der Zellen führte und sich auch sonst keine Hinweise auf eine produktive Infektion dieser Zellen ergaben, wurde im folgenden zur Propagierung von HHV-6A (U1102) und HHV-6B (HST) ausschließlich Nabelschnurblutzellen verwendet. Hierfür wurden frisch isolierte mononukleäre Nabelschnurblutzellen mit PHA für 3 Tage aktiviert und anschließend mit HHV-6A bzw. HHV-6B infiziert. Etwa ab dem 3. Tag nach Infektion waren bereits erste morphologische Veränderungen der Kultur sichtbar. An Tag 6 waren die infizierten Zellen maximal vergrößert, und der Virusüberstand wurde geerntet und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

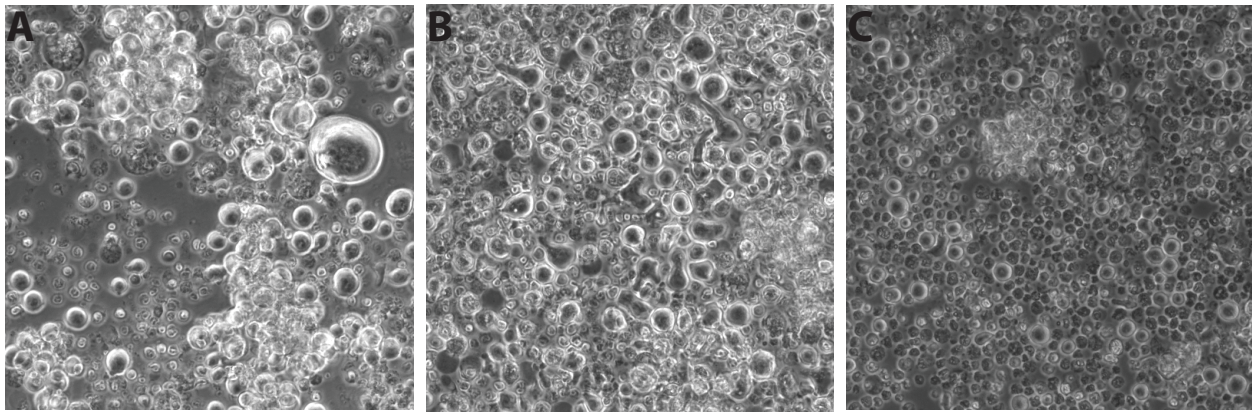


Abbildung 5.1.3: Morphologie von HHV-6A bzw. HHV-6B-infizierten T-Zellen. Mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut wurden nach Aktivierung durch PHA mit HHV-6A (U1102) (A) oder HHV-6B (HST) (B) infiziert. Als Vergleich dienten nicht infizierte Zellen (C). 6 Tage nach Infektion wurden die Zellkulturen am Durchlichtmikroskop in 20-facher Vergrößerung fotografiert.

Zur Untersuchung der Reaktivität HHV-6-spezifischer T-Zellen gegenüber virusinfizierten Zielzellen wurden frisch isolierte, PHA-aktivierte CD4⁺T-Zellen von erwachsenen HLA-typisierten Spendern verwendet. Ein solches Experiment ist in Abb. 5.1.4 gezeigt. Im vorliegenden Fall wurden PHA-aktivierte CD4⁺T-Zellen eines HLA-A2-positiven Spenders mit HHV-6A(U1102) bzw. HHV-6B(HST) infiziert, letzteres auch in Gegenwart der Virustatika Foscarnet (FOS) bzw. Ganciclovir (GCV). Diese Substanzen werden auch zur Therapie viraler Komplikationen nach Transplantationen (Abdel Massih & Razonable, 2009; Tokimasa et al, 2002) eingesetzt. Bei Foscarnet handelt es sich um ein Analogon des Pyrophosphats, es blockiert die Pyrophosphatbindungsstelle der DNA-Polymerase. Foscarnet wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt, was mit unter Therapie erreichten physiologischen Konzentrationen vergleichbar ist. Bei Ganciclovir handelt sich um ein Nukleosid-Analogon, das erst durch virale Kinasen aktiviert werden muss und dann zum Kettenabbruch bei der DNA-Replikation führt. Um physiologische Konzentrationen zu erreichen, kamen 20 µg/ml Ganciclovir zum Einsatz. Wichtig war in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob das vom Virus mitgebrachte Strukturprotein U54 bereits einer Präsentation gegenüber T-Zellen zugänglich ist (wie es auch von dem Strukturhomolog pp65 aus CMV bekannt ist (Pepperl et al, 2000; Pepperl-Klindworth et al, 2003; Riddell et al, 1991), oder ob eine Neusynthese von U54 im Rahmen der viralen Replikation für die Präsentation dieses Antigens gegenüber T-Zellen erforderlich ist. Zunächst wurden die Zielzellen bereits einen Tag nach Infektion zusammen mit dem HHV-6-spezifischen, HLA-A2-restringierten T-Zellklon AS-15 ILY kokultiviert (Abb. 5.1.4 A). Dieser T-Zellklon zeigte zu diesem frühen Zeitpunkt keine Erkennung gegenüber HHV-6A- bzw. HHV-6B-infizierten Zielzellen, auch nicht in Abwesenheit von antiviralen Inhibitoren. Des weiteren

wurde die Erkennung von infizierten Zielzellen durch U54-spezifische T-Zellklone zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion untersucht.

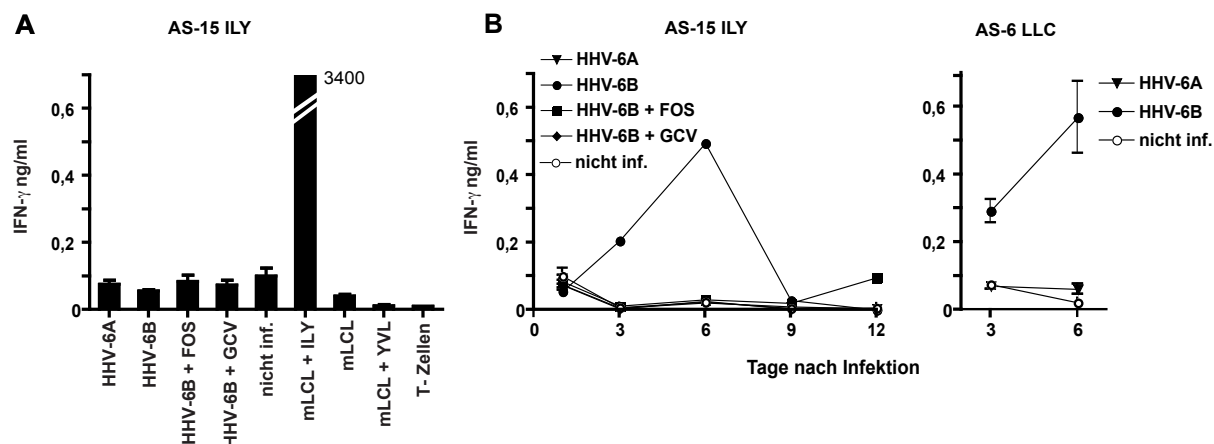


Abb. 5.1.4 Erkennung von HHV-6A bzw. HHV-6B-infizierten CD4⁺-T-Zellen durch viruspezifische T-Zellklone im zeitlichen Verlauf nach Infektion. PHA-aktivierte CD4⁺-T-Zellen HLA-A2-positiver Spender wurden am ersten Tag (A) bzw. zu verschiedenen Zeiten (B) nach Infektion mit HHV-6A (U1102) und HHV-6B (HST) zusammen mit den HHV-6-spezifischen T-Zellklonen AS-15 ILY (A, B) und AS-6 LLC (B) kokultiviert. Die infizierten Zellen wurden, wo angegeben, vom Zeitpunkt der Infektion an mit Foscarnet (FOS) oder Ganciclovir (GCV) behandelt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte PHA-Blasten, unbeladene autologe B-Zellen (mini-LCLs) bzw. autologe mini-LCLs, die mit relevantem Peptid (ILY) oder irrelevantem Peptid (YVL) beladen worden waren (A). Die Konzentration an IFN- γ wurde per ELISA ermittelt. Es sind die Mittelwerte und Wertebereiche von Duplikaten gezeigt.

Die Erkennung von HHV-6B infizierten Zellen durch den T-Zellklon AS-15 ILY nahm bis Tag 6 stetig zu und fiel danach wieder ab. Zu keinem Zeitpunkt der Infektion wurden HHV-6A-infizierte Zellen, mit Foscarnet bzw. Ganciclovir behandelte infizierte Zellen sowie nicht infizierte Zellen erkannt. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit des U54-spezifischen T-Zellklons LS-6 LLC konnte die Erkennung von virusinfizierten Zielzellen nur für 2 Zeitpunkte (Tag 3 und 6) untersucht werden. Auch hier kam es zu einem Anstieg der Erkennung von HHV-6B-infizierten Zellen im Zeitverlauf. Auch von diesem Klon wurde nur HHV-6B, nicht aber HHV-6A erkannt. Dies ist für diesen T-Zellklon besonders bemerkenswert, da sein Zielepitop LLCGNLLIL sowie die nähere Umgebung dieses Nonamers im U54-Protein beider Virustämme vollständig konserviert ist. Das Epitop ILYGPLTRI aus HHV-6B dagegen liegt in HHV-6A in veränderter Sequenz vor, als VIYGPLTRI, weist also zwei konservative Ersetzungen von Aminosäuren auf. Dies könnte ein potentieller Grund für das Fehlen der Erkennung von HHV-6A durch den T-Zellklon AS-15 ILY sein; allerdings war in Peptidtitrationen zuvor bereits gezeigt worden, dass dieser T-Zellklon das synthetische Peptid in der Sequenzvariante aus HHV-6A mit gleicher Sensitivität erkennt wie das HHV-6B-Peptid (Schub, 2009). Einen Hinweis auf

eine andere mögliche Erklärung für das beobachtete Phänomen, dass HHV-6A-infizierte Zellen trotz konservierter bzw. verwandter Epitope nicht erkannt werden, könnte die Beobachtung von Glosson und Kollegen geben (Glosson & Hudson, 2007). Sie fanden heraus, dass das immunevasive Protein U21 aus HHV-6A die Expression von MHC-I-Molekülen auf der Zelloberfläche effizienter absenkt als das homologe U21-Protein aus HHV-6B. Dies könnte die effiziente Präsentation von HHV-6A-Antigenen im Kontext der Infektion behindern.

5.1.3 Ex-vivo-Analyse der Häufigkeit von U54- und U11-spezifischen T-Zellen

Die Häufigkeit von HLA-A2-restringierten HHV-6B-spezifischen T-Zellen im Blut von gesunden Virusträgern wurde durch MHC/Peptid-Multimerfärbung für die Epitope ILY aus U54 und MLW aus U11 ermittelt. Dazu wurden je 1,5 Mio PBMCs mit den entsprechenden Multimeren gefärbt und im Durchflusscytometer analysiert. Als Kontrolle diente die Färbung auf YVL- bzw. CLG- (EBV) spezifische T-Zellen sowie ohne Zugabe des Multimers. Die Abb. 5.1.5 A zeigt die Analyse zwei verschiedener Spender. MLW-spezifische T-Zellen konnten mit einer Frequenz von 0,004 % (Spender AS) bzw. 0,014 % (Spender LT) nachgewiesen werden, was ca. 40 bzw. 140 Zellen innerhalb einer Million CD8⁺-T-Zellen entspricht. ILY-spezifische T-Zellen konnten für beide Spender mit einer Häufigkeit von 0,001% nachgewiesen werden. Weitere Färbungen von ILY-spezifischen T-Zellen im Blut von insgesamt 8 Spendern (nicht gezeigt) ergaben eine mittlere Häufigkeit (Median) von 0.0013% im CD8⁺-Kompartiment, der Bereich reichte von von 0–0.0064%. Ein Nachweis ILY-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut ist daher durch Färbung großer Zellzahlen gerade noch möglich, ihre Häufigkeit liegt jedoch hart an der Nachweisgrenze der Multimerfärbung. Demnach sind HHV-6-spezifische T-Zellen der untersuchten Epitopspezifitäten im Blut weit seltener vertreten als T-Zellen gegen bekannte Antigene anderer Herpesviren, beispielsweise EBV: die Häufigkeit von T-Zellen spezifisch für die Epitope CLG aus LMP2 und YVL aus BRLF1 liegt im Median bei jeweils 0.1%, für T-Zellen spezifisch für das Epitop GLC aus BMLF1 bei 0,7% (Hislop et al, 2002)(12 gesunde Virusträger). Für das CMV-Epitop NLV aus pp65 wurde ein Median von 0.4% spezifischer T-Zellen innerhalb der CD8⁺-T-Zellen im peripheren Blut beschrieben (Khan et al, 2002).

Es wurden Kurzzeit-stimulierte Zelllinien von 13 verschiedenen Spendern angesetzt, um zu weiteren, wenn auch indirekten Informationen über die Häufigkeitsverteilung von MLW- und

ILY-spezifischen T-Zellen bei gesunden Spendern zu gelangen. Dazu wurden die frisch isolierten PBMCs zur Hälfte mit den HHV-6B-spezifischen Peptiden ILY und MLW gepulst und der gesamten Kultur IL-2 als Wachstumsfaktor zugesetzt. Nach 10 Tagen Stimulation wurde die Kultur mittels entsprechenden Multimeren auf das Vorhandensein von ILY- und MLW-spezifischen T-Zellen hin untersucht.

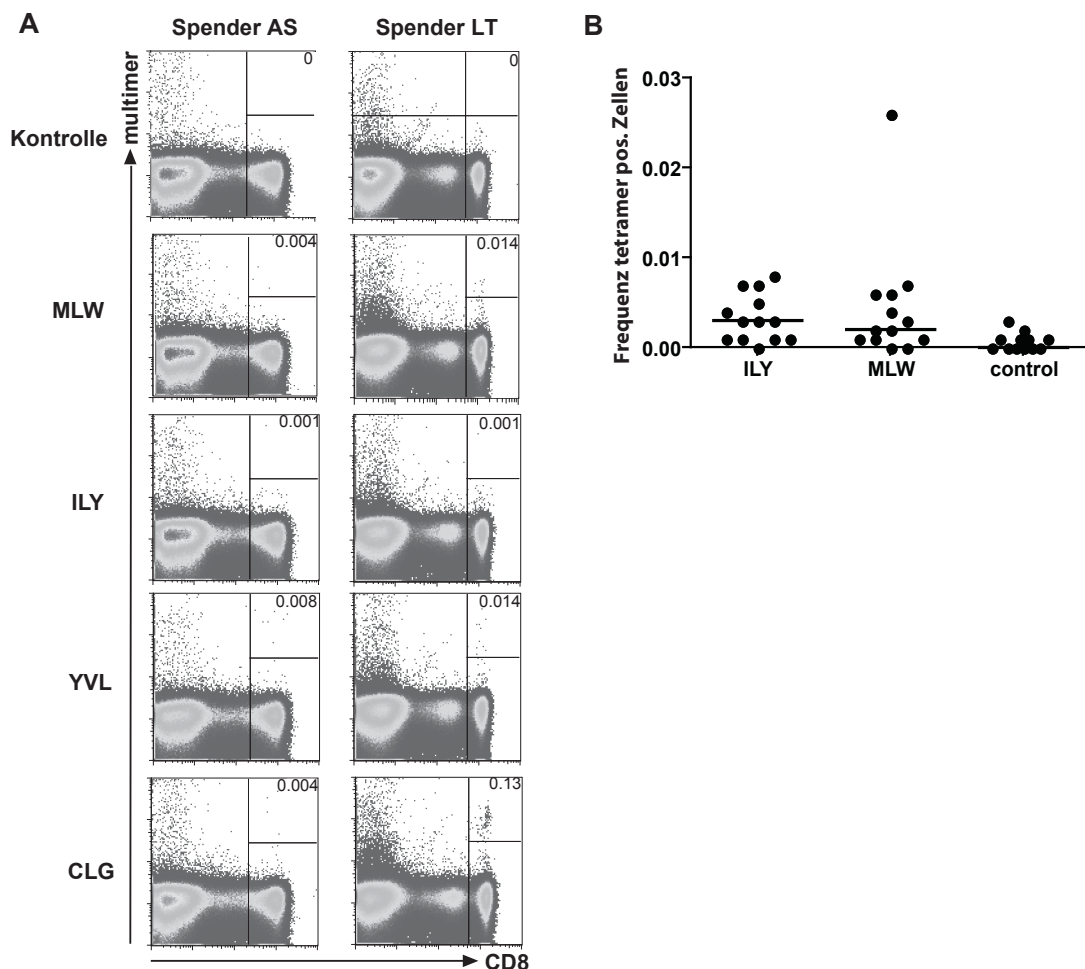


Abb. 5.1.4 Analyse der Häufigkeiten der HHV-6-spezifischen Zellen in primären peripheren T-Zellen und in Kurzzeitlinien von gesunden Spendern

HHV-6-spezifische T-Zellen in PBMCs wurden mit Hilfe des entsprechenden Peptid/HLA-Multimers und eines anti-CD8-Antikörpers gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (MLW, HHV-6B U11, A*0201; ILY, HHV-6B U54, A*0201). Als Kontrolle wurde die Färbung ohne Zugabe des Multimers durchgeführt bzw. Multimere für die EBV-Epitope YVL und CLG verwendet (A). Kurzzeitlinien, die durch eine einmalige Stimulation mit HHV-6B-spezifischen Peptiden (ILY, MLW) geniert wurden, wurden auf dieselbe Weise mit Peptid/HLA-Multimers gefärbt (B).

Die Abbildung 5.1.4 B zeigt das Ergebnis dieser Analyse. Die Häufigkeit von ILY-spezifischen T-Zellen in diesen Zelllinien lag im Median bei 0.003%, die von MLW-spezifischen bei 0.002%. Ein Spender zeigt jedoch eine sehr deutliche Population von MLW-spezifischen T-Zellen mit

einer Häufigkeit von 0.027 %. Dieser Stimulationsansatz bestätigte daher, dass die meisten HLA-A*0201-positiven HHV-6-Träger spezifische T-Zellen gegen die HHV-6B-Epitope ILY und MLW aufweisen. Durch die einmalige Peptidstimulation wurde allerdings nur eine moderate Steigerung des Anteils der HHV-6B-spezifischen T-Zellen erreicht. Daher rechtfertigt der damit verbundene Aufwand nicht den Informationsgewinn. Für eine noch sicherere Bestimmung der Häufigkeiten von HHV-6B-spezifischen T-Zellen im Blut ist daher eine direkte Multimerfärbung großer Zahlen von Blutzellen vorzuziehen.

5.2 Analyse der T-Zellantwort gegen das Strukturprotein U54

Wie im vorigen Kapitel beschrieben, konnte das Strukturprotein U54 als ein Zielantigen der HHV-6-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort definiert werden. Es wurde gezeigt, dass U54 mehrere Epitope enthält, die von infizierten Zellen gegenüber CD8⁺-T-Zellen präsentiert wurden.

Aus diesem Grund erschien es im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sinnvoll, das gesamte Protein U54 aus HHV-6B hinsichtlich weiterer Epitope unterschiedlicher HLA-Restriktion genauer zu untersuchen. Hierfür wurde eine das komplette Protein überdeckende Peptidbibliothek aus 15mer-Peptiden mit einer jeweiligen Überlappung von 11 Aminosäuren verwendet. Wenn geeignete Zellen mit einer derartigen Peptidbank beladen werden, präsentieren sie nahezu sämtliche möglichen MHC-Klasse-I-Epitope aus dem Antigen, wie für CMV-Proteine bereits gezeigt wurde (Kern et al, 2000). Daher eignet sich eine solche Peptidbank für eine umfassende Analyse der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellantwort.

5.2.1 Ex vivo Analysen zum Überblick über die Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen

Um einen ersten Eindruck über die Häufigkeiten U54-spezifischer T-Zellen im Blut gesunder HHV-6-Virusträger zu bekommen, wurden zunächst ex-vivo-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden je 250.000 PBMCs HHV-6-seropositiver Spender unterschiedlicher HLA-Typen im IFN- γ -ELISpot-Assay mit dem U54-Gesamtmix stimuliert, bestehend aus 122 Peptiden. Zum Vergleich wurde in Parallelansätzen mit dem zuvor beschriebenen HHV-6B-Peptid-Mix aus 30 ausgewählten Kandidaten-Peptiden, oder mit einem EBV-Peptid-Mix aus 29 bekannten Klasse-I-

präsentierten Peptiden verschiedener HLA-Restriktion stimuliert. Insgesamt konnte jedoch keine eindeutige HHV-6B-spezifische Reaktivität gegen einer der Peptidpools nachgewiesen werden. Einzig und allein der Spender AS lässt vermuten, dass auch HHV-6B-spezifische T-Zellen im peripheren Blut vorhanden sind.

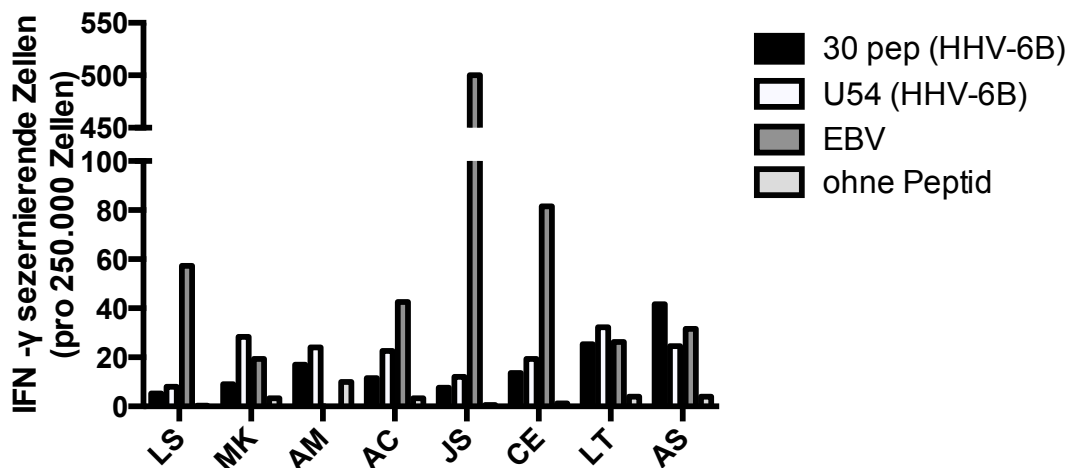


Abb. 5.2.1 Häufigkeit von IFN- γ -sezernierenden HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellen im peripheren Blut gesunder Spender. PBMCs von 8 verschiedenen HHV-6-seropositiver Spender unterschiedlicher HLA-Typen (LS, MK, AM, AC, JS, CE, LT und AS) wurden im ELISpot-Assay mit verschiedenen Peptidpools stimuliert: dem U54-überdeckenden Peptidmix aus 15-meren ("U54"), einem Mix 30 ausgewählter HHV-6-Peptidkandidaten ("30 pep") oder einem Mix aus 29 EBV-Peptiden. "T-Zellen" bezeichnet die Negativkontrolle ohne exogene Peptide.

Bei allen 8 Spendern wies die ELISpot-Analyse auf die Anwesenheit von U54-peptidspezifischen T-Zellen im peripheren Blut hin. Im Median reagierten 23,3 Zellen pro 250 000 PBMCs auf U54-Peptide mit der Sekretion von IFN- γ , bei einem Hintergrund von 3,3 Spots pro 250 000 PBMCs. Auch eine Reaktivität gegen den 30 Kandidatenpeptide umfassenden HHV-6B-Mix (s. S.56 Tab: 5.1.2) war bei allen Spendern festzustellen (Median 12,6 Spots). Demnach liegt die Häufigkeit IFN- γ -sezernierender HHV-6B-peptidspezifischer T-Zellen in PBMCs bei 0,009% für U54, bei 0,005% für die 30 ausgewählten Kandidaten.

Bei einem geschätzten mittleren Anteil von 20% CD8⁺-T-Zellen ergäbe das einen Anteil von 0,04% U54-spezifischen CD8⁺-T-Zellen. T-Zellen mit Spezifität für einen EBV-Peptidpool waren in diesem Experiment im Median etwa doppelt so häufig. Als gute interne Spezifitätskontrolle in diesem Experiment kann der EBV-negative Spender AM angesehen werden, der als einziger keine EBV-reaktiven T-Zellen aufwies.

Das Experiment legt nahe, dass U54-spezifische T-Zellen im peripheren Blut seltener sind als EBV- oder CMV-spezifische T-Zellen (Sylwester et al, 2005), jedoch deutlich oberhalb der Nachweisgrenze der direkten Detektion liegen. Die tatsächliche Häufigkeit U54-spezifischer T-

Zellen im peripheren Blut liegt voraussichtlich noch höher, da ELISpot-Analysen nur einen Teil der spezifischen T-Zellen erfassen. Beispielsweise liegen im Falle von EBV die tatsächlichen Häufigkeiten typischerweise drei- bis vierfach oberhalb der im ELISpot ermittelten Zahlen (Tan et al, 1999).

5.2.2 Anreicherung U54-spezifischer T-Zellen

Um die genaue Spezifität und Funktion U54-spezifischer T-Zellen besser untersuchen zu können, wurden sie aus peripherem Blut durch mehrere Stimulationen mit U54-Peptiden angereichert. Die hierfür verwendete Stimulationsmethode wurde in Anlehnung an das etablierte Protokoll zur Anreicherung von EBV- und CMV-spezifischen T-Zellen (Wiesner et al, 2008) modifiziert. Frisch isolierte oder kryokonservierte PBMCs wurden je zur Hälfte mit der gesamten U54-Peptidbank für 2h bei 37°C beladen. Nach anschließendem Entfernen von ungebunden Peptid durch mehrmaliges Waschen wurden beladene (2,5Mio/ml) und unbeladene PBMCs in Verhältnis 1:1 kultiviert. Ab Tag 10 wurde wöchentlich mit bestrahlten, autologen und mit entsprechenden Peptiden beladenen CD40-aktivierten B-Blasten im Verhältnis 4:1 restimuliert. Zusätzlich wurde das Zytokin IL-2 als Wachstumsfaktor hinzugegeben und dessen Konzentration alle 7 Tage schrittweise erhöht. Bis zur 3. Restimulationsrunde wurde außerdem ein entsprechend dem HLA-Typ des Spenders ausgewähltes EBV- bzw. CMV- Helferpeptid hinzugegeben, da diese EBV- bzw. CMV-spezifischen T-Zellen häufiger im Blut nachzuweisen sind. Durch diese Kostimulation sollte das Zytokininmilieu in der Zellkultur optimiert werden und somit die Proliferation seltener HHV-6B-spezifischer T-Zellen verbessert werden. Dieses Verfahren hatte sich in Vorexperimenten mit den 30 Peptidkandidaten aus U54, U11 und U90 bewährt (s. S.56). Für die Generierung und Analyse von U54-spezifischen T-Zellen wurden 3 Spender ausgewählt.

Tab 5.2.2 Übersicht über die Spender, deren U54-spezifisches T-Zellrepertoire analysiert wurde

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HHV- 6	EBV	CMV	Helferpeptid
BC3	A*0101	B*0801	Cw*0401	n.u	positiv	n.u	GLC (HLA-A2, EBV, BMLF1)
	A*0201	B*3502	Cw*0701				
FG	A*0201	B*1501	Cw*0303	positiv	positiv	negativ	GLC (HLA-A2, EBV, BMLF1)
	A*2601	B*4403	Cw*0401				
LT	A*0201	B*0702	Cw*0202	positiv	positiv	positiv	VLE (HLA-A2, CMV pp65)
		B*4002	Cw*0702				

Die U54-peptidstimulierten T-Zelllinien wurden alle 1 – 2 Wochen im Durchflußzytometer analysiert, um den Anteil von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen festzustellen. Um einer Verdrängung der CD8⁺-T-Zellen durch CD4⁺-T-Zellen entgegenzuwirken, die sich im Lauf der Kultivierung meist vermehrten als CD8⁺-T-Zellen (Daten nicht gezeigt), wurden in der Regel nach ca. 4-5 Restimulationsrunden aus der polyklonalen T-Zellkultur die CD4⁺-T-Zellen immunmagnetisch isoliert. Positiv- und Negativfraktion wurden wie beschrieben durch Stimulation mit peptidbeladenen CD40-B-Zellen separat weiterkultiviert. Die CD4⁺-Negativfraktion enthielten je nach Spender zwischen 80% und 95% CD8⁺-T-Zellen.

Abbildung 5.2.3 zeigt die Spezifitätsanalyse der T-Zelllinie des Spenders LT vor und nach Separation in CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Sieben Tage nach der 3. Restimulation wurde diese T-Zelllinie auf das Vorhandensein von U54-spezifischen T-Zellen untersucht (**A**). Je 10.000 T-Zellen wurden mit je 10.000 U54-peptidbeladenen, mit dem CMV-Helferpeptid VLE beladenen oder unbeladenen autologen B-Blasten (LTL16) inkubiert, und die IFN- γ -sezernierenden Zellen wurden per ELISpot nachgewiesen. Die Häufigkeit U54-spezifischer, IFN- γ -produzierender T-Zellen betrug 2,8%. Verglichen mit der zuvor ermittelten Ausgangshäufigkeit von 0,013% U54-peptidspezifischen T-Zellen in PBMCs von Spender LT (Abb. 5.2.1) entsprach dies einer 215-fachen Anreicherung. Der Anteil von VLE-spezifischen T-Zellen innerhalb der Kultur betrug 4,5%, dieser recht hohe Anteil an CMV-helferpeptidspezifischen T-Zellen in der Kultur kann mit den hohen Häufigkeiten (ca. 1%) VLE-spezifischer T-Zellen im Blut von Spender LT erklärt werden. Nach einer weiteren Restimulation wurde eine Trennung der Kultur in CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen durchgeführt. Eine Woche später (Tag 42 der Kultur) wurden die beiden Fraktionen separat auf die Anwesenheit von U54-spezifischen T-Zellen im ELISpot getestet (**B**). Hierfür wurden je 20.000 T-Zellen mit je 20.000 mit dem U54-Gesamtmix bzw. dem Peptid VLE beladenen autologen B-Zellen stimuliert. Nach Abzug der Hintergrundreaktivität gegen unbeladene B-Zellen (LTL16) betrug der Anteil HHV-6-spezifischer T-Zellen in der CD8⁺-Kultur 2,7%, in der CD4⁺-Kultur 1,5%. Der Anteil von T-Zellen mit Spezifität gegen das Helferpeptid VLE, mit dem seit Tag 28 nicht mehr stimuliert worden war, war auf 0,8% der CD8⁺-Fraktion zurückgegangen. Diese Analysen zeigten, dass U54-spezifische T-Zellen durch Stimulation mit einem komplexen Peptidgemisch und autologen B-Zellen effizient angereichert und vermehrt werden konnten. Zudem wurden U54-Peptide sowohl von CD8⁺- als auch von CD4⁺-T-Zellen erkannt.

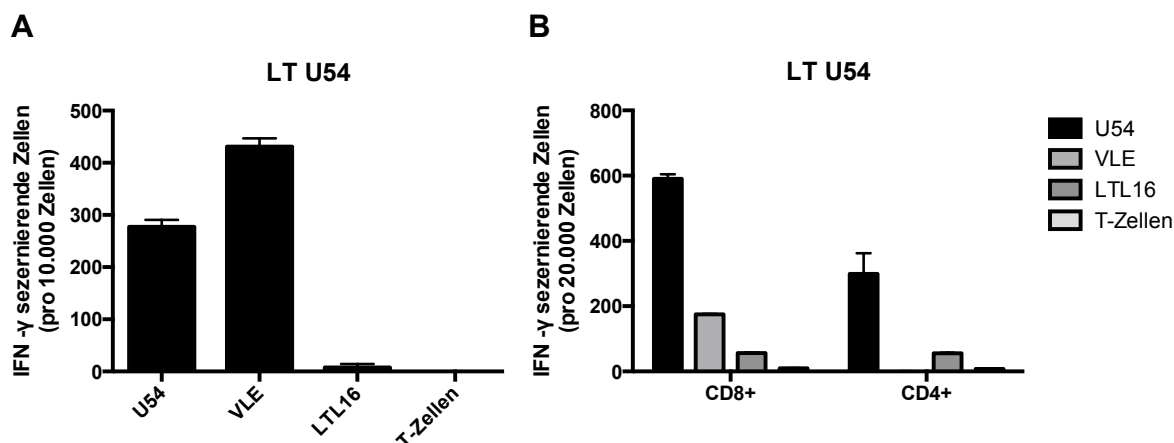


Abbildung 5.2.3: Quantifizierung der Anreicherung spezifischer, IFN- γ -sezernierender Zellen der T-Zelllinie LT nach Stimulation mit U54-Peptiden. Die T-Zelllinie LT wurde an Tag 28 (nach der 3. Restimulation) analysiert (A). Nach der Separation dieser Zelllinie in eine CD4⁺-angereicherte und CD8⁺-angereicherte Fraktion an Tag 35 wurden die beiden Kulturen erneut an Tag 42 analysiert (B). Die T-Zellen wurden im IFN- γ -ELISpot-Assay mit U54-beladenen, mit dem CMV-Peptid VLE beladenen und unbeladenen autologen B-Zellen inkubiert. Als Kontrolle dienten T-Zellen ohne B-Zellzugabe („T-Zellen“). Es sind die Mittelwerte und Wertebereiche von Triplikaten gezeigt.

5.2.3 Einzelzellklonierung der U54-spezifischen T-Zelllinien

U54-peptidstimulierte, CD8⁺-angereicherte T-Zelllinien von drei Spendern (siehe Tabelle 5.2.2) wurden nach 6 bis 8 Restimulationen einer Einzelzellklonierung unterzogen. Diese wurde, wie unter 4.1.4 beschrieben, an Tag 35 (Spender BC3) oder an Tag 56 (Spender FG und LT) durchgeführt. Dabei wurden je Spender jeweils 960 Mikrokulturen mit statistisch 0,7 Zellen pro Kultur und 2,5 Zellen pro Kultur angesetzt. Aus diesen Ansätzen wuchsen nach ca. 4 Wochen 199 Klone des Spenders BC3, 322 Klone des Spenders FG und 119 Klone des Spenders LT aus. Mittels IFN- γ -ELISA wurden die einzelnen Klone auf die spezifische Erkennung des U54-Peptidmix untersucht. Bei Spender BC3 wurden 45 (23%), bei Spender FG wurden 77 (24%) und bei Spender LT wurden 28 (26%) U54-peptidspezifische T-Zellklone identifiziert. Die 10 bestwachsenden T-Zellklone pro Spender wurden genauer analysiert.

5.2.4 Identifizierung von T-Zellepitopen im Antigen U54

Die Epitop-Spezifität jedes dieser T-Zellklone wurde mit Hilfe von Subpools der U54-überdeckenden Peptidbank bestimmt. Jedes einzelne Peptid dieser Bank ist 15 Aminosäuren

lang, und benachbarte Peptide haben einen gemeinsamen Überlappungsbereich von 11 Aminosäuren (Peptid 1 besteht aus den Aminosäuren 1-15 von U54, Peptid 2 aus den Aminosäuren 5-19 usw.). Dies bedeutet, dass jede mögliche U54-Teilsequenz von bis zu 12 Aminosäuren Länge in der Peptidbank enthalten ist. Da CD8+-Epitope in der Regel 8-11 Aminosäuren lang sind, gestattet dies die Identifizierung nahezu aller CD8+-Epitope und der meisten CD4+-Epitope (Kern et al, 2000). Die 112 Peptide der U54-Bank wurden analog einer zweidimensionalen Matrix in 22 Gruppen (Subpools) angeordnet (Abb. 5.2.4), dabei wurde jedes Peptid je einem „Horizontal“- und „Vertikal“-Pool zugeordnet. So wird die Identifizierung des Zielepitops eines T-Zellklons mittels eines Funktionstests mit nur 22 Einzelreaktionen ermöglicht.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
15	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
16	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
17	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
18	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
19	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
20	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
21	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98
22	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112

Abb. 5.2.4 Zusammensetzung der Peptid-Subpools zur Identifizierung neuer T-Zellepitope aus dem Strukturprotein U54. Jedes der 112 Einzelpeptide (weiß) wurde je einem von 14 „Vertikal“-Subpools und einem von 8 „Horizontal“-Subpools (grau) zugeordnet. Insgesamt decken die 112 Peptide die gesamte Sequenz des HHV-6B-Strukturproteins U54 ab.

Zur Identifizierung der einzelnen Epitope wurden autologe B-Blasten mit jeweils einer der 22 Peptid-Gruppen beladen und zusammen mit T-Zellklonen über Nacht inkubiert. Die IFN- γ -Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA quantitativ bestimmt. In Abbildung 5.2.5 sind exemplarisch Ergebnisse mit dem Klon 283 des Spenders FG und dem Klon 10 des Spenders LT dargestellt.

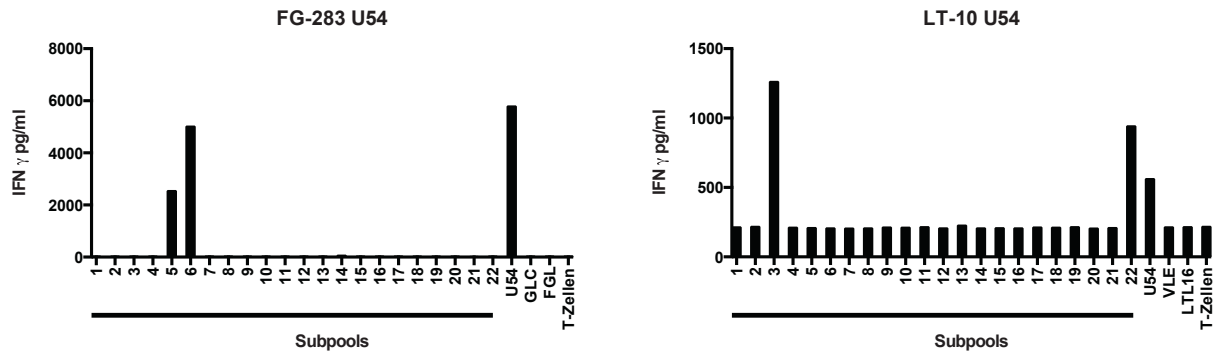


Abb. 5.2.5: Identifizierung von Epitopen, die von U54-spezifischen T-Zellklonen erkannt werden. Gezeigt ist in (A) der U54-spezifische CD4⁺-T-Zellklon 283 des Spenders FG und in (B) der U54-spezifische CD8⁺-T-Zellklon 10 des Spenders LT. Zur Identifizierung des Epitops wurde eine U54-Peptidbank benutzt, die aufgebaut ist wie in Abb. 5.2.4 gezeigt. T-Zellklone wurden mit B-Blasten stimuliert, die zuvor mit je einem der 22 Peptid-Subpools beladen worden waren. Als Kontrolle dienten mit dem Gesamtmix U54 beladene, mit den CMV- oder EBV-Helferpeptiden VLE und GLC beladene sowie unbeladene autologe B-Blasten. Die jeweiligen autologen B-Blasten sind mit FGL und LTL16 bezeichnet. „T-Zellen“ bezeichnet die Negativkontrolle ohne Peptid und B-Zellen. Die Konzentration von IFN- γ im Überstand wurde mittels ELISA quantitativ bestimmt.

Klon 283 des Spenders FG reagierte auf die Peptid-Subpools 1, 5 und 6 (Abb. 5.2.5 A). Somit sollte die von dem T-Zellklon erkannte Epitopsequenz im Überlappungsbereich der Einzelpeptide 5 und 6 liegen (vgl. Abb. 5.2.4). Dieser Bereich hat die Sequenz A I L K P G E L R Y F. Eine Überprüfung dieser Vermutung ist in Abb. 5.2.6. zu sehen. In diesem Experiment wurde der T-Zellklon 283 gegen jedes der Peptide der Gruppen 5 und 6 einzeln im IFN- γ -ELISA getestet. Der U54-spezifische Klon FG-283 zeigte eine starke Erkennung des Peptides 6 sowie eine leichte Erkennung von Peptid 5. Alle anderen Peptide wurden nicht erkannt. Das Zielepitop dieses T-Zellklons ist also vermutlich in Einzelpeptid 6 vollständig und in Einzelpeptid 5 weitgehend enthalten.

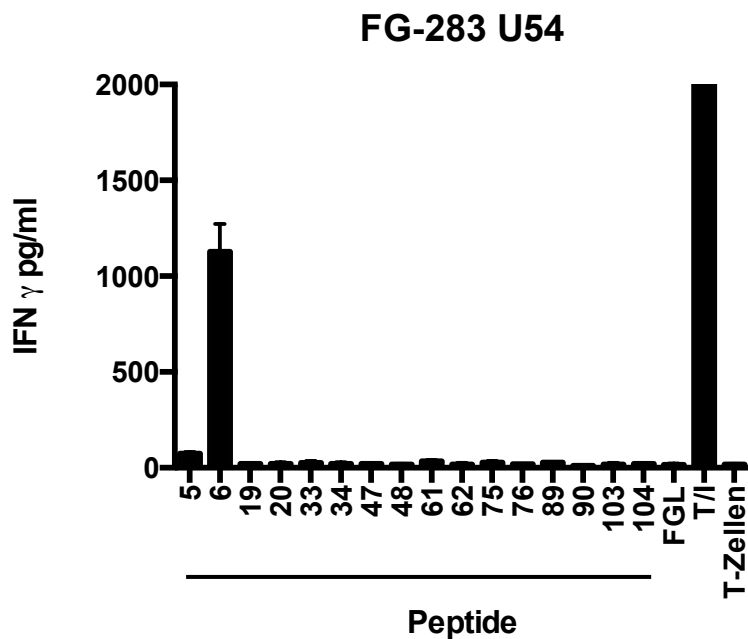


Abb. 5.2.6 Erkennung von U54-Einzelpeptiden durch den U54-spezifischen T-Zellklon FG-283.

Autologe B-Blasten wurden mit den Peptiden beladen und zusammen mit dem spezifischen T-Zellklon über Nacht inkubiert. Als Kontrollen dienten ungepulste B-Blasten (FGL) bzw. als Positivkontrolle die Stimulatoren TPA/Ionomycin (T/I). „T-Zellen“ bezeichnet die Negativkontrolle ohne Peptid und B-Zellen. Die Konzentration an IFN- γ wurde per ELISA ermittelt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten gezeigt.

Der U54-spezifische Klon 10 des Spenders LT erkannte die Subpools 3 und 22 (Abb. 2.5.5 B). Beide beinhalten das Peptid 101, welches folgende Sequenz besitzt: R I A F D K E H L V P L H F F. Bei Klon 10 handelt es sich um einen CD8⁺-positiven T-Zellklon, daher können unter Umständen Vorhersagen zur erkannten Minimal-Peptidsequenz gemacht werden. Der HLA-Typ des Spenders LT (A*0201; B*0702,*4002; Cw*0202, *0702) enthält mehrere Allotypen, für die konservierte Sequenzmotive der präsentierten Peptide bereits bekannt sind. Das Sequenzmotiv HLA-A*0201-restringierter Peptide ist charakterisiert durch aliphatische Aminosäuren in Position 2 und der C-terminalen Position 9 oder 10. Die Peptidsequenzen R I A F D K E H L (V) würden diesem Motiv entsprechen. Allerdings sind diese Sequenzen auch in Peptid 100 vollständig enthalten, was die Frage aufwirft, warum dann Peptid 100 (enthalten in Subpool 2) nicht erkannt wurde. Ein B*0702-restringiertes Epitop ist in Peptid 101 wahrscheinlich nicht enthalten, da ein solches Epitop ein Prolin in Position 2 erfordert und das Prolin in Peptid 101 zu weit C-terminal positioniert ist. In Frage käme jedoch eine Restriktion durch B*4002 mit dem postulierten Konsensusmotiv xExxxxx Φ (Φ = hydrophobe Aminosäure). Einem bereits bekannten B*4002-restringierten EBV-Epitop aus dem Protein BZLF1 liegt das gleiche Motiv zugrunde: S E N D R L R L L (Scotet et al, 1996). Die Sequenz K E H L V P L H F aus Peptid 101 erfüllt diese Bedingung, ist jedoch auch komplett in Peptid 102 enthalten, das nicht erkannt wurde. Es ergibt sich also zunächst kein bevorzugter Kandidat für ein zum HLA-Typ von Spender LT passendes Epitop.

In dem folgenden Experiment wurde zunächst die Erkennung des Einzelpeptides 101 und seiner Nachbarn nochmals untersucht, präsentiert von autologen B-Zellen (LTL16). Es bestätigte sich, dass von T-Zellklon LT-10 und einem weiteren T-Zellklon (LT-105) des gleichen Spenders ausschließlich Peptid 101 erkannt wurde (Abb. 2.5.7 A). Peptid 101 wurde auch im Kontext von B-Zellen (MBW) eines Spenders erkannt, der mit Spender LT nur in HLA-B*4002 und HLA-C*02 übereinstimmt (Abb. 2.5.7 A), was die Vermutung der HLA-B*4002-Restriktion des Epitops weiter unterstützt. Zur noch genaueren Bestimmung der HLA-Restriktion (**B**) des Klons LT-10 wurde noch eine Reihe weiterer B-Zelllinien von Spendern unterschiedlicher HLA-Typen verwendet.

Peptid 101 wurde erkannt, wenn es von autologen B-Zellen (mLCLs) bzw. von HLA-B*4002-positiven Zellen präsentiert wurde. Zellen, die einen oder mehrere der Allotypen HLA-A*0201, B*0702, C*0202 und C*0702 exprimierten (f60W, RRB, B348, MWW), wurden nicht erkannt. Dies spricht klar für eine Präsentation des in Peptid 101 enthaltenen Epitops durch HLA-B*4002. Es wird jedoch noch zu prüfen sein, ob es beim durch B*4002 präsentierten Minimalepitop wirklich um die Sequenz **K E H L V P L H F** handelt. Hierfür müssten verschiedene Subsequenzen des Peptids **R I A F D K E H L V P L H F F** synthetisiert und individuell getestet werden.

In analoger Weise wurden jeweils 10 U54-peptidspezifische T-Zellklone der drei Spender BC3, FG und LT getestet. Dabei wurden 10 unterschiedliche Sequenzen identifiziert (2 davon überlappend, alle anderen nichtüberlappend), die von CD8⁺- oder CD4⁺-T-Zellen erkannte Epitope enthalten. Tabelle 5.2.8 zeigt eine Zusammenfassung dieser Analysen. Unter 10 getesteten Klonen des Spenders BC3 erkannten 4 das Peptid 28, und 6 erkannten die Peptide 57 und 58. Der Überlappungsbereich dieser beiden Peptide enthält vollständig das Nonamer **T P H T A D I T M**, das die Konsensussequenz für HLA-B*35-restringierte Peptide erfüllt. Experimente mit Zielzellen unterschiedlicher Spender bestätigten die Restriktion des von diesen T-Zellen erkannten Epitops durch HLA-B*3502, jedoch nicht B*3501 (Daten nicht gezeigt). Alle getesteten Klone des Spenders FG waren CD4⁺-T-Zellklone und für die Sequenz AILK... spezifisch. Der Spender LT zeigte die größte Vielfalt von Epitopen. So konnten 4 KEH-spezifische sowie 2 RFIP-spezifische Klone charakterisiert werden. Weitere 4 Spezifitäten waren durch jeweils einen T-Zellklon repräsentiert. Bei insgesamt 5 der 9 identifizierten Sequenzen handelt es sich um CD8⁺-T-Zellepitope, bei 2

um CD4+-T-Zellepitope (AILK, RFIP). Bei 2 T-Zellklonen konnte nicht untersucht werden, ob es sich um CD4+- oder CD8+-T-Zellen handelte.

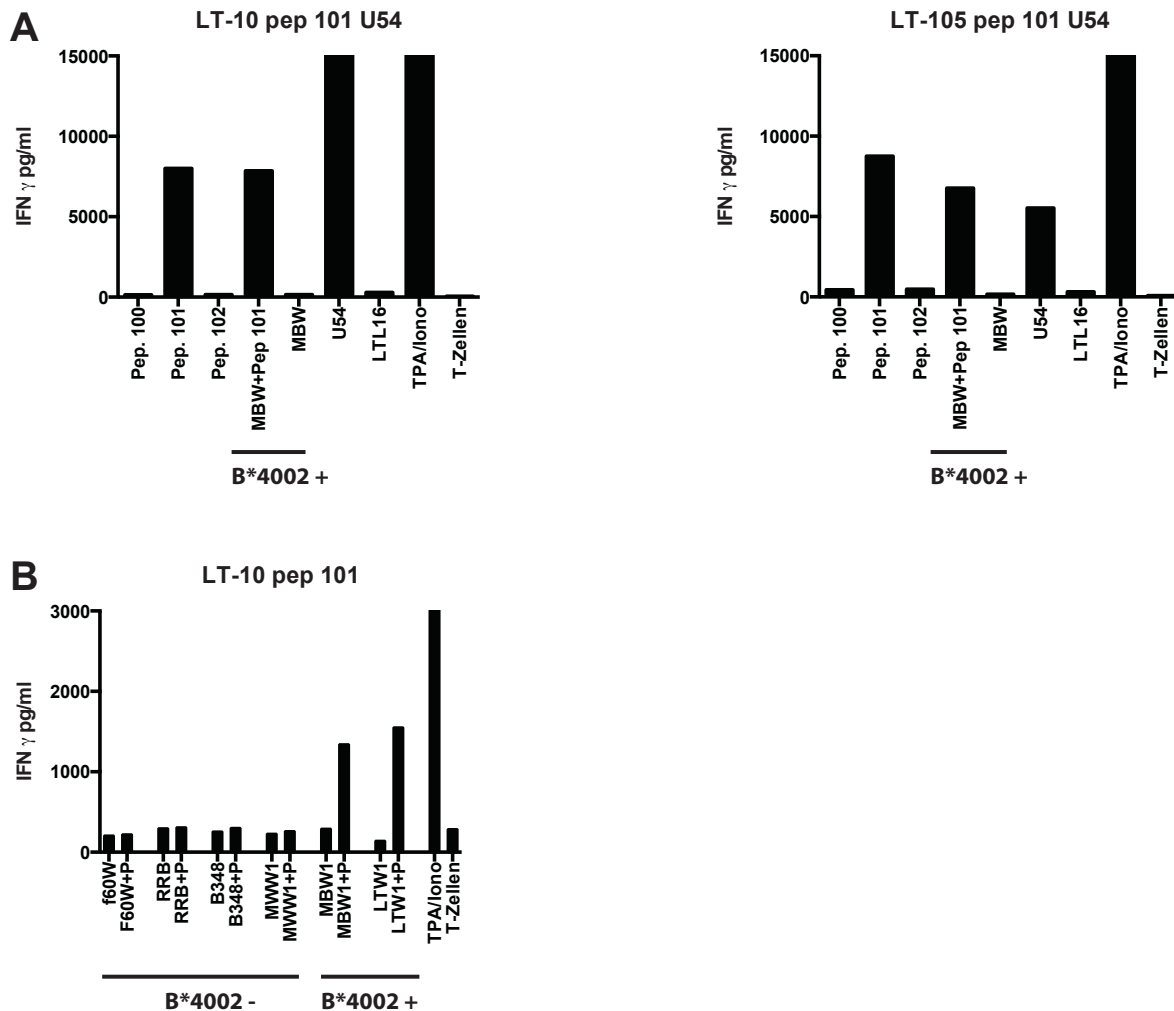


Abb. 5.2.7 Ermittlung der Peptidspezifität (A) sowie der HLA-Restriktion (B) der U54-spezifischen CD8+-T-Zellklone LT-10 bzw. LT-105. Für die Einzelpeptidbestimmung wurden die autologen B-Blasten (LTL16) mit den relevanten Peptiden (Peptid 100,101,102) beladen und mit den T-Zellklonen LT-10 bzw. LT-105 inkubiert. Zusätzlich wurden mit dem Peptid 101 gepulste und ungeladene HLA-B*4002-positive mLCLs verwendet. Als Kontrolle dienten U54-beladene bzw. unbeladene autologe B-Blasten. Zur Bestimmung der HLA-Restriktion (B) wurden verschiedene B-Zelllinien verwendet, die in mindestens einem HLA-Molekül mit dem Spender LT übereinstimmen (HLA-Typen siehe Tabelle 3.1). Die B-Zellen wurden in peptidbeladener („+P“) oder unbeladener Form mit dem T-Zellklon LT-10 koinkubiert. IFN- γ wurde mittels ELISA im Überstand bestimmt.

Tabelle 5.2.8 zeigt auch, welche der erkannten Sequenzen aus U54 von HHV-6B sich auch in HHV-6A finden, und den Grad der Homologie dieser Sequenzen zwischen beiden Viruspezies. Die Sequenzen der 10 verschiedenen Epitope lassen sich nur zum Teil in HHV-6A (U1102) wiederfinden. Das Undecamer AILKPGELRYF findet sich in vollständig konservierter Form in HHV-6A wieder. Bei 6 Epitopen sind je zwischen 1 und 3 Aminosäuren ausgetauscht, darunter befinden sich auch nichtkonservative Substitutionen. Ob die HHV-6A-Sequenzen von den HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellklonen ebenfalls erkannt werden, muss noch im Detail noch analysiert werden. 3 Epitope lassen sich ausschließlich in HHV-6B (HST) wieder finden (YLF..., RIAF..., KEH).

Tabelle 5.2.8: Von T-Zellen erkannte Sequenzen in U54

Spender	CD4+	CD8+	Erkennung von Subpools	Einzelpeptide	HHV-6B (HST)	HHV-6A (U1102)
BC3	-	+	14,16	28	QRIEAYDRHAIPHGQ	QRIEA H DRH I IPHGQ
	-	+	1,2,19	57,58	QLSLTPHTADITMSQNQET	QISL T P Q TADIT L SQNQET
FG	+	-	1,5,6	5,6	LTAAAILKPGELRYFKCGL	VTTT AILKPGELRLFKCGL
LT	-	+	16,9	23	IVLNIFALPYANVTV	IVLNIFAL P HAN V NI
	-	+	11, 12, 17	39, 40	EPTRYLFNADIWINLQNTF	-
	n.d.	n.d.	3, 4, 8	45, 46	NSAKIEFISHRHVVISRIL	KTGNIEFISH K N V YISRIL
	-	+	3, 22	101	RIAFDKEHLVPLHFF	-
	-	+	3, 4, 22	101, 102	RIAF D KEHLVPLH F FLKPG	-
	n.d.	n.d.	7,22	105	KPGESTRMEFMPP E T	KPGESTRMEFMPP G T
	+	-	13, 14, 22	111,112	DVGIR F IPCHNNYSHR S SP	DVGIR H FIPCHN H SHR S SP

5.2.5 Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone gegenüber virusinfizierten T-Zellen

Um die Erkennung von virusinfizierten Zellen durch U54-spezifische T-Zellklone zu untersuchen, wurde dasselbe Infektionssystem verwendet wie unter 5.1.2 beschrieben. Frisch isolierte CD4+-T-Zellen von Spendern mit geeigneten HLA-Typen wurden an Tag 0 für 3 Tage mit PHA stimuliert und anschließend mit HHV-6A oder HHV-6B infiziert. An Tag 6 nach Infektion, als der cytopathische Effekt am größten war, sowie im Einzelfall zu weiteren

Zeitpunkten wurden die virusinfizierten CD4⁺-T-Zellen zusammen mit den virusspezifischen T-Zellen inkubiert und die IFN- γ Ausschüttung mittels ELISA detektiert.

Für die Analyse des T-Zellklons LT-10 KEH wurden CD4⁺-T-Zellen des autologen Spenders und zweier HLA-B*4002-negativer Spender mit Virus beider Spezies infiziert. Als Positivkontrolle wurden autologe B-Zellen (mLCL) mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladen. Als Negativkontrolle dienten die unbehandelten B-Zellen und K562-Zellen als Indikatoren für natürliche Killerzellaktivität.

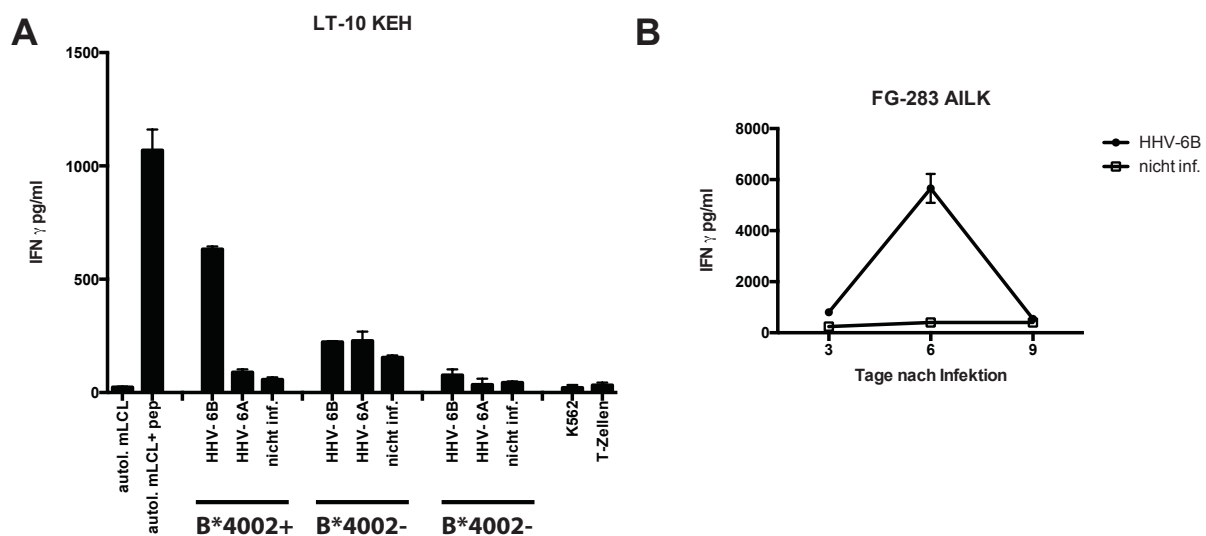


Abb. 5.2.9 Erkennung von HHV-6-infizierten CD4⁺-T-Zellen durch U54-spezifische CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellklone. HST (HHV-6B) bzw. U1102 (HHV-6A) infizierte CD4⁺-T-Zellen verschiedener HLA-B4002-positiver und -negativer Spender wurden 6 Tage nach der Infektion mit dem CD8⁺-T-Zellklon LT-10 KEH kokultiviert (A). Als Kontrolle wurde die mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladene bzw. unbeladene autologe mLCL verwendet. Die Erkennung von HHV-6B-infizierten Zellen durch den CD4⁺-T-Zellklon FG-283 AILK wurde an Tag 3, 6 und 9 nach Infektion überprüft. Als Kontrolle wurden nicht infizierte PHA-Blasten verwendet. Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten gezeigt.

Wie in Abbildung 5.2.9 zu sehen ist, wurden die mit HHV-6B-infizierten CD4⁺-T-Zellen des HLA-B*4002-positiven Spenders, jedoch nicht Zellen von B*4002-negativen Spendern, durch den U54-spezifischen T-Zellklon LT-10 KEH erkannt. Des Weiteren wurden die mit Peptid beladenen autologen B-Zellen erkannt. Durch den direkten Vergleich mit der peptidbeladenen B-Zellen ist die starke Erkennung von HHV-6B-virusinfizierten Zellen besonders gut sichtbar. Nicht erkannt wurden mit HHV-6A-infizierte CD4⁺-T-Zellen sowie die Negativkontrollen. Die Reaktivität des U54-spezifischen CD4⁺-T-Zellklons FG-283 AILK gegenüber HHV-6B (HST) infizierten CD4⁺-T-Zellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion getestet (B). Eine maximale Erkennung infizierter Zellen wurde an Tag 6 beobachtet. Nicht infizierte Zellen

wurden zu keinem Zeitpunkt der Infektion erkannt. Dieser Verlauf ähnelt der Erkennung von ILY-spezifischen T-Zellen (Abb. 5.1.3), die ebenfalls ein Epitop aus dem Strukturprotein U54 erkennen und im ersten Teil der vorliegenden Arbeit genauer untersucht wurden.

Durch die detaillierten Analysen konnte das HHV-6B-Protein U54 als Zielantigen der HHV-6-spezifischen CD8+-T-Zellantwort bestätigt werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass U54 auch ein Zielantigen der CD4+-T-Zellantwort ist. Die folgende Tabelle zeigt zusammenfassend alle 12 bisher identifizierten Epitope innerhalb des Strukturproteins U54. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt aus 3 verschiedenen Spendern 10 Epitope verifiziert. Die Epitope ILY und LLC wurden erstmalig von Andrea Schub identifiziert und gemeinsam mit ihr in der Literatur beschrieben (Martin et al, 2012; Schub, 2009). T-Zellklone 5 verschiedener Spezifitäten (AILK, ILY, LLC, TPH, KEH) wurden auf eine Erkennung von HHV-6B-infizierten Zellen getestet. Alle diese T-Zellklone erkannten infizierte Zellen. Das Strukturprotein U54 enthält also Zielepitope verschiedener HLA-Restriktionen, die von infizierten Zellen präsentiert und von CD4+- bzw. CD8+-T-Zellen spezifisch erkannt werden.

Tab.5.2.10: Übersicht der Epitope aus dem Strukturprotein U54

Epitope	Spender	HLA-Restriktion	Erkennung von HHV-6B infizierten Zellen
AILKPGELRYF	FG	-	ja
IVLNIFALPYANVTV	LT	-	nicht getestet
QRIEYDRHAIPHG	BC3	-	nicht getestet
ILYGPLTRI ¹	AS	A* 0201	ja
YLFNADIWINL	LT	-	nicht getestet
IEFISHRHVSI	LT	-	nicht getestet
LLCGNLLIL ¹	AS	A* 0201	ja
TPHTADITMSQ	BC3	B* 3502	ja
KEHLVPLHF	LT	B* 4002	ja
RIAFDKEHLVPLHFF	LT	-	-
KPGESTRMEFMPPET	LT	-	nicht getestet
DVGIRFIPCHNNYSH	LT	-	nicht getestet

¹„1“ Martin et al., 2012

5.3 Querschnittanalyse der HHV-6B-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort gegen alle Antigenklassen

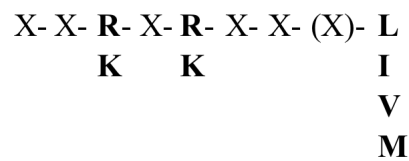
5.3.1. Auswahl von HHV6-Peptiden

In den oben beschriebenen Arbeiten wurden die beiden Strukturproteine U11 und U54 als Zielantigene der virusspezifischen CD8⁺-T-Zellantwort identifiziert. Das nächste Ziel war nun, einen noch umfassenderen Überblick über die T-Zellantwort gegen HHV-6B zu bekommen. Das HHV-6B-Proteom mit seinen 104 Proteinen und insgesamt ca. 45.500 Aminosäuren ist so groß, dass ein sehr großer Aufwand nötig wäre, um es vollständig durch synthetische Peptide zu erfassen und die T-Zellantwort gegen alle diese Peptide zu testen. Auch die Expressionsklonierung aller bekannten und vermuteten Antigene aus HHV-6B zum Zweck der Identifikation spezifischer T-Zellen wäre ein sehr aufwendiges Projekt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine Querschnitts-Analyse durch das gesamte virale Proteom auf CD8⁺-T-Zellepitope durchgeführt, jedoch beschränkt auf eine einzige, repräsentative HLA-Restriktion. Aus den im folgenden genannten Gründen wurde HLA-B*0801 als potentiell besonders geeigneter HLA-Allotyp ausgewählt:

- (1) HLA-B*0801-restringierte Peptide weisen eine bekannte, wohldefinierte Konsensussequenz auf, die drei konservierte Ankerreste enthält (statt nur zwei, wie bei vielen anderen HLA-Klasse-I-Allotypen) und daher nicht zu häufig ist (DiBrino et al, 1994; Rammensee et al, 1999; Suhrbier et al, 1993).
- (2) Bei anderen humanen Herpesviren wie EBV und CMV sind sehr ausgeprägte, immundominante HLA-B*0801-restringierte CD8⁺-T-Zellantworten zu finden, deren Zielepitope der Konsensussequenz streng folgen (Elkington et al, 2003; Tan et al, 1999).
- (3) HLA-B*0801 ist mit 19.6% das zweithäufigste HLA-B-Allel in der europäischen Bevölkerung (Schmidt et al, 2009).

HLA-B*0801-restringierte Peptide sind 8 oder 9 Aminosäuren lang. Als Ankerreste befinden sich basische Aminosäuren, Arginin (R) oder Lysin (K), in den Positionen 3 und 5, sowie eine

aliphatische Aminosäure (L, I, V oder M) in der C-terminalen Position. Das Motiv entspricht demnach der folgenden Sequenz:



Sämtliche Peptide in allen bekannten oder postulierten Proteinen von HHV-6B, die diesem Motiv folgen, wurden mittels eines Scripts (in AppleScript) aus dem Referenzgenom für HHV-6B (Genbank-Identifikationsnummer NC_000898) extrahiert. Die so identifizierten 299 Peptide wurden kommerziell synthetisiert und für die Analyse der virusspezifischen T-Zellantwort verwendet. Diese Peptide umfassen 146 Oktamere und 153 Nonamere. Diese Zahlen liegen in einem ähnlichen Bereich wie die erwarteten Anzahlen, die sich aus der Häufigkeit der einzelnen Aminosäuren im HHV-6B-Proteom bei Annahme einer Zufallsverteilung der Aminosäuren über die Gesamtsequenz berechnen (Erwartungswert: 127,1 Oktamere und 126,8 Nonamere). Demnach sind Peptide mit dem HLA-B*0801-Motiv im HHV-6B-Proteom nicht auffällig an- oder abgereichert. Die Oktamere und Nonamere wurden jeweils zu einem Peptidmix vereinigt, und diese beiden Gemische im folgenden in der Regel separat zur Generierung und Analyse von HHV-6B-spezifischen T-Zellen verwendet.

5.3.2 Erster Überblick über die Häufigkeit von HLA-B*0801-restringierten HHV-6B-spezifischen T-Zellen

Als ein erstes Experiment wurde die Häufigkeit von HLA-B*0801-restringierten HHV-6B-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut gesunder erwachsener Virusträger untersucht. Hierfür wurden frisch isolierte PBMCs über Nacht jeweils mit dem Oktamer- und Nonamer-Peptidmix bzw. mit je einer Teilmenge dieser Peptide (vgl.S.82) über Nacht stimuliert. Die IFN- γ -sezernierenden Zellen wurden mit der ELISpot-Methode detektiert.

Diese ersten Ergebnisse deuteten zunächst darauf hin, dass die Häufigkeit HLA-B*0801-restringierter T-Zellen im Blut von Virusträgern zu niedrig ist, um ihre detaillierte quantitative Analyse ex vivo zu erlauben. Die Häufigkeit lag zwischen 0,003 und 0,012%. In Abbildung 5.3.1 ist stellvertretend für alle untersuchten Spender die ex vivo Analyse des Spenders MD gezeigt. Die Häufigkeit HLA-B*0801-restringierter HHV-6B-spezifischer T-Zellen im Blut liegt

deutlich unterhalb derjenigen, die für HLA-B*0801-restringierte T-Zellen mit Spezifität gegen EBV-Epitope (Tan et al, 1999) oder CMV-Epitope (Elkington et al, 2003) beobachtet wird.

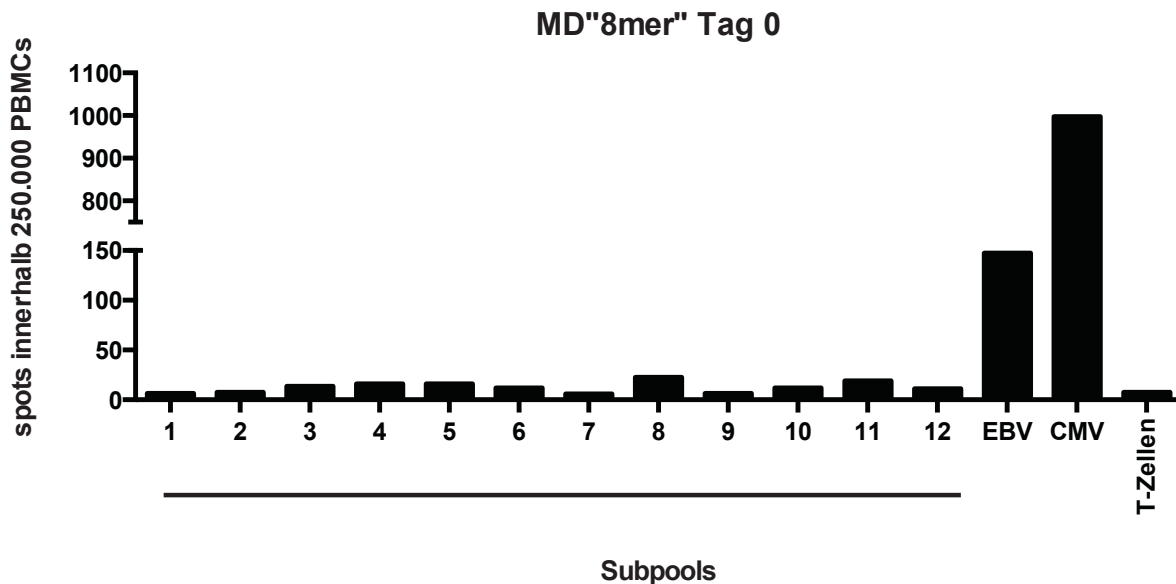


Abb. 5.3.1 Stimulation primärer T-Zellen des HHV-6-seropositiver Spender MD mit HLA-B*0801-restringierter HHV-6B-spezifische Peptiden. Frisch isolierte PBMCs des Spenders MD wurden mit dem „9mer“- bzw. „8mer“-Gesamtmix sowie den einzelnen Subpools der „8mere“stimuliert. Als Kontrollen dienten die Stimulation mit EBV-spezifischen Peptiden sowie unstimulierte T-Zellen. Die IFN- γ sezernierenden Zellen wurden mit Hilfe der ELISpot-Methode ausgelesen.

Um dennoch HHV-6B-spezifische T-Zellen näher untersuchen zu können, war eine Expansion durch wiederholte Stimulation aus primären T-Zellen erforderlich. Wie oben für U54 beschrieben, wurden autologe CD40-aktivierte B-Zellen mit Peptiden beladen und als Stimulatorzellen zur Herstellung polyklonaler Linien HHV-6B-spezifischer T-Zellen verwendet. Die folgende Tabelle (Tab. 5.3.2) gibt einen Überblick über die verwendeten Spender, ihren HLA-Klasse-I-Typ, ihren Trägerstatus bezüglich der Viren HHV-6, EBV und CMV sowie die entsprechend dem jeweiligen HLA-Typ ausgesuchten Helferpeptide. Von den Spendern LS, TW und MD wurden jeweils Oktamer- und Nonamer-stimulierten T-Zelllinien generiert, von Spender MW nur eine Oktamer-stimulierte T-Zelllinie.

Tab. 5.3.2 Überblick über die Spender, deren HLA-B*0801-restringierte HHV-6B-spezifische T-Zellen untersucht wurden

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HHV- 6	EBV	CMV	Helferpeptid
LS	A*0201 A*6801	B*0702 B*0801	Cw*0701 Cw*0702	positiv	positiv	negativ	GLC (HLA-A2, EBV, BMLF1)
TW	A*0101	B*0801 B*1501	Cw*0303 Cw*0701	positiv	positiv	positiv	YSE (HLA-A1, CMV, pp65)
MD	A*01 A*11	B*08 B*1501	Cw*0303 Cw*0701	positiv	positiv	positiv	QIK (HLA-A1, CMV IE-1)
MW	A*0101 A*0201	B*0801 B*4001	n.u.	positiv	negativ	negativ	ohne

n.u. = nicht untersucht

Im folgenden werden hauptsächlich die T-Zelllinien des Spenders LS zur Veranschaulichung herangezogen. In Abbildung 5.3.3 ist der Verlauf der Gesamtzellzahl der T-Zelllinie LS, stimuliert mit Oktamer-Peptiden, dargestellt (Abb. 5.3.3 A). Die starke Abnahme der Zellzahl in den ersten 14 Tagen war vermutlich auf das Absterben von unspezifischen Zellen zurückzuführen und daher erwartet und erwünscht. Aufgrund einer relativen Zunahme an CD4+-T-Zellen in der Kultur (ca. 60% der Zellen waren CD4+CD8- an Tag 21) (Abb. 5.3.3 B) wurde an Tag 28 eine CD8+-Positivselektion durchgeführt. Nach zwei weiteren Stimulationen wurde diese CD8+-angereicherte T-Zelllinie auf das Vorhandensein von HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellen getestet. Hierfür wurde die Reaktivität der T-Zelllinie gegenüber autologe B-Zellen (LSL3) getestet, die mit verschiedenen Subpools der Oktamer-Peptidbank (1 bis 12; "8mere") beladen wurden (Abb. 5.3.3 C). Die polyklonale T-Zelllinie zeigte eine starke Reaktivität gegen 5 der 12 Subpools, was auf ein breites Spektrum HHV-6B-spezifischer T-Zellen hinweist. Zudem wurde die polyklonale Zelllinie retrospektiv, im Anschluß an die Identifikation relevanter T-Zellepitope (siehe unten), mit entsprechenden HHV-6B-spezifischen HLA-Peptid-Multimeren gefärbt. Diese Analyse zeigte, dass die polyklonale Zelllinie an Tag 42 bereits 1.5% bzw. 3.6% HLA-B*0801-restringierte CD8+-T-Zellen mit einer Spezifität für die Epitope TNK und QTR enthielt (Abb. 5.3.3 D).

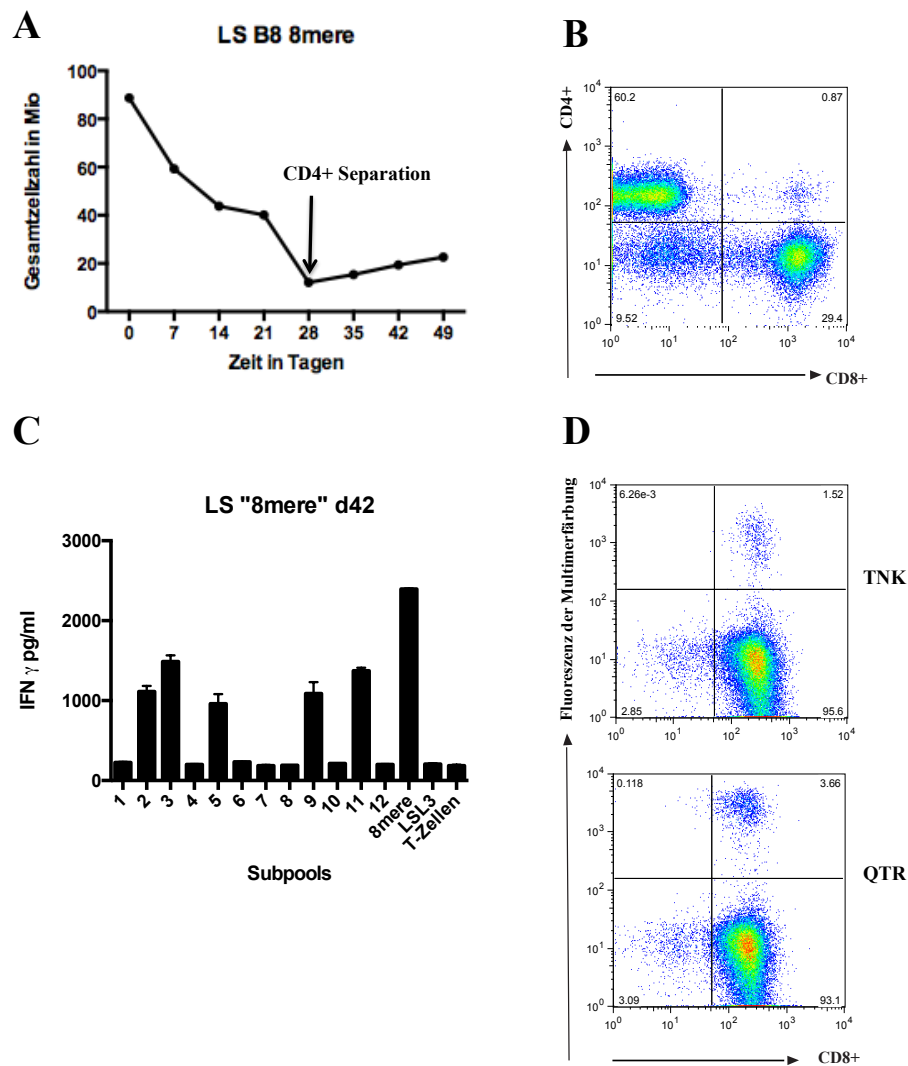


Abb. 5.3.3 Analyse der T-Zelllinie LS. Diese T-Zelllinie von Spender LS wurde durch wöchentliche Restimulation mit autogenen CD40-B-Zellen generiert, die mit einem Gemisch aller 146 potentiellen B*0801-restringierten oktameren Peptide beladen worden waren. (A) zeigt die Gesamtzellzahl der Kultur vor und nach der CD8-Anreicherung an Tag 28. Die Zellkulturen wurden an Tag 21 (B) mit den Oberflächenantikörpern CD4-FITC und CD8-APC bzw. an Tag 42 (D) mit Peptid/HLA-B*0801-Multimeren (TNK, QTR) und anti-CD8-Antikörper gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (C) zeigt die Reaktivität der polyklonalen T-Zelllinie an Tag 42 gegenüber mit verschiedenen Peptid-Subpools (1-12; „8mere“) beladenen autogenen B-Zellen. Als Kontrolle dienten die Stimulation mit dem Gesamtmix aus 8meren und mit B-Zellen (LSL3) ohne Peptidbeladung. Anschließend wurde die Konzentration von IFN- γ im Überstand mittels ELISA quantitativ bestimmt.

Zwischen Tag 42 und Tag 56 der Kultur wurden aus den polyklonalen Linien durch limitierende Verdünnung (siehe Methoden 4.1.4) T-Zellklone hergestellt, um eine genauere Untersuchung des T-Zellrepertoires und der Funktion der spezifischen T-Zellen zu ermöglichen. Nach ca. 4 bis 5 Wochen wurde die Spezifität der so erhaltenen T-Zell-Klone untersucht. Dazu wurden diese mit der jeweiligen HHV-6B-Peptidmix bzw. den entsprechenden Helferpeptiden, geladen auf CD40-B-Zellen, stimuliert, und ihre Reaktivität im IFN- γ -ELISA ermittelt. Abbildung 5.3.4 zeigt repräsentative Reaktivitätsanalysen für einen Teil der T-Zellklone aus 6 der 7 polyklonalen T-Zell-Linien.

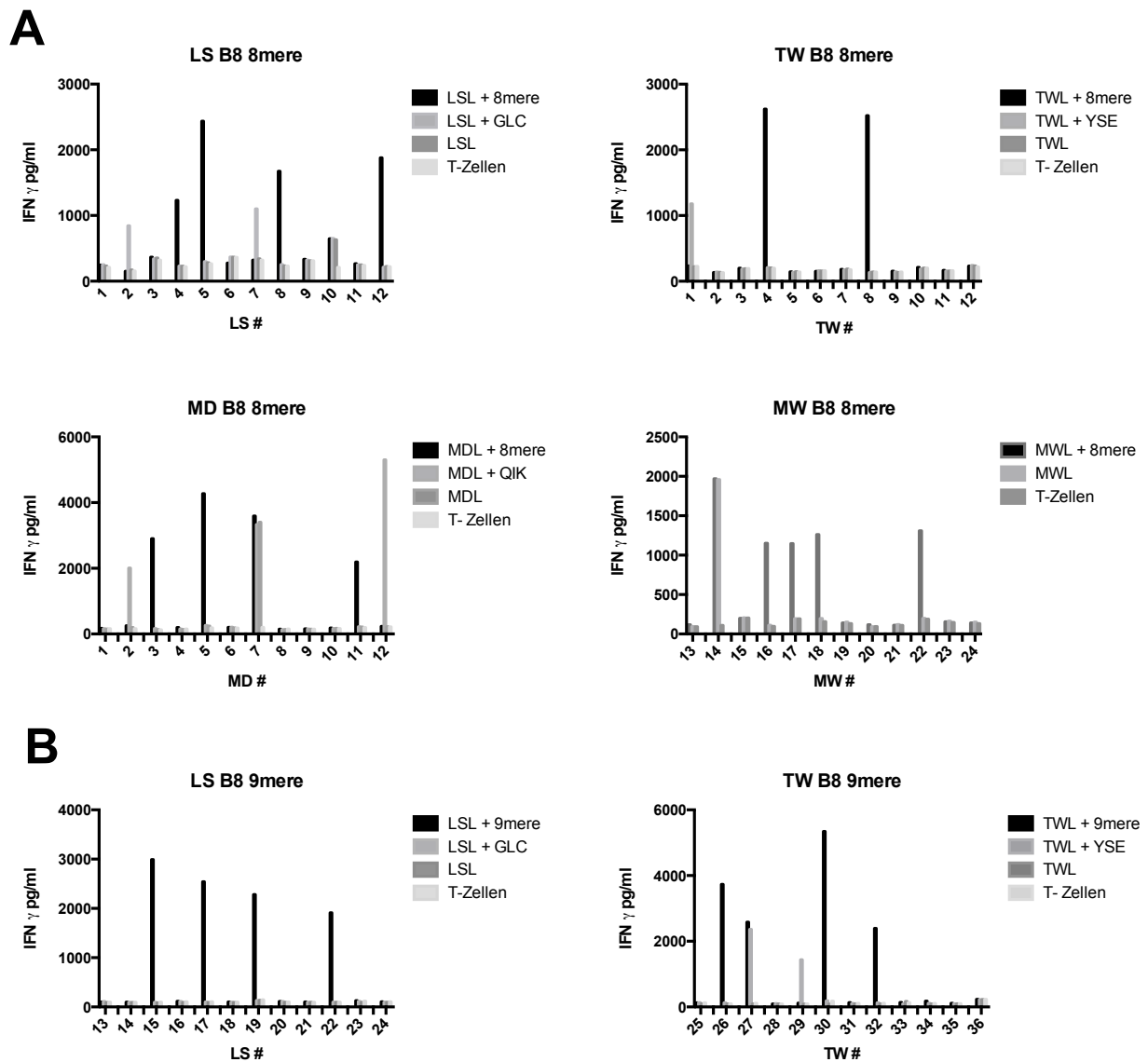


Abb. 5.3.4 Reaktivitäts- und Spezifitätsanalyse von HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellklonen. **(A)** T-Zellklone mit potentieller Spezifität für B*0801-restringierte oktamere Peptide aus HHV-6B wurden durch Kokultur mit peptidbeladenen autologen B-Blasten stimuliert und die Reaktivität im anschließendem IFN- γ -ELISA bestimmt. **(B)** HHV-6-peptidspezifische Reaktivität von T-Zellklonen mit potentieller Spezifität gegen nonamere HHV-6B-Peptide. **(A, B)** „8mere“ und „9mere“ bezeichnet die HHV-6B-Oktamer-Peptidbank bzw. die Nonamer-Peptidbank; GLC, YSE und QIK sind CD8-T-Zellepitope aus EBV und CMV, die zu Beginn der polyklonalen T-Zellkulturen als Helferpeptide verwendet wurden; LSL, TWL, MDL und MWL sind die jeweiligen autologen CD40-B-Zelllinien. „T-Zellen“ bezeichnet die Negativkontrolle in Abwesenheit von Stimulatorzellen. Die x-Achse zeigt die Identifikationsnummern der einzelnen T-Zellklone.

Wie Abb. 5.3.4 zeigt, ergab sich in dieser Testreihe für alle T-Zellklone ein klares Reaktivitätsmuster. Bei allen 4 Spendern waren unter den erhaltenen T-Zellklonen auch solche mit einer Spezifität für HHV-6B-Peptide. Einen Überblick über die Spezifitäten der T-Zellklone gibt Tabelle 5.3.5.

Tab. 5.3.5 Anzahl der erhaltenen T-Zellklone unterschiedlicher Spezifität.

	Gesamtklon- zahl	HHV-6- spezifisch	Helferpeptid- spezifisch	B-Blasten- spezifisch	keine Reaktivität
LS "8mere"	250	37 (14,8%)	15 (GLC)	7	191
TW "8mere"	300	45 (15%)	8 (YSE)	1	246
MD "8mere"	190	26 (13,7%)	6 (QIK)	2	156
MW "8mere"	44	10 (22,7%)	n.anw.	3	31

Wie Tabelle 5.3.5 zeigt, bewegte sich der Anteil HHV-6B-spezifischer, IFN- γ -sezernierender T-Zellklone für die verschiedenen Spender in einem ähnlichen Bereich (14 – 23%). Der Anteil von T-Zellen mit einer Spezifität gegen irrelevantes Antigen (Helferpeptide oder unbeladene CD40-B-Zellen) blieb jeweils unter 9%. Dies zeigt, dass die verwendete Stimulationsmethode in verlässlicher Weise präferentiell T-Zellen mit Spezifität gegen HHV-6B-Peptide anreichert. Den größten Anteil unter den T-Zellklonen machten allerdings unreaktive Klone aus; ob diese Klone tatsächlich kein relevantes Antigen erkennen, oder ob sie eventuell HHV-6B-spezifische T-Zellen enthalten, die kein IFN- γ sezernieren können, konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht weiter verfolgt werden. Da T-Zellklone mit der Fähigkeit zur IFN- γ -Sekretion die interessantesten Kandidaten für eine potente antivirale Funktion sind, wurden nur solche T-Zellklone im folgenden weiter untersucht.

Daher wurden die T-Zellklone der Spender LS und TW weiterkultiviert und im Detail analysiert: ihre genaue Peptidspezifität wurde ermittelt, und ihre potentielle Erkennung HHV-6-infizierter Zellen wurde analysiert.

5.3.3 Charakterisierung der HHV-6-spezifischen T-Zellklone

Um die Identifikation der von den T-Zellklonen jeweils erkannten HHV-6B-Peptide zu vereinfachen, wurden die beiden Sortimente von 146 Oktameren und 153 Nonameren jeweils in Untergruppen aufgeteilt. Die Peptide wurden im Sinne einer zweidimensionalen Matrix in 25 Gruppen angeordnet, so dass jedes Peptid in je einer "vertikalen" und einer "horizontalen" Gruppe enthalten war, und im Falle der Erkennung nur eines einzigen Peptids dieses mittels 25 Einzelreaktionen eindeutig identifiziert werden konnte. Die zwei folgenden Tabellen zeigen die Anordnung der Peptide. Die grau unterlegten Nummern bezeichnen die Gruppen, die weiß hinterlegten Zahlen die Kennnummern der Einzelpeptide. Die Sequenzen aller Peptide sind auf S.26 gezeigt.

A

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
24	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
25	145	146										

B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
14	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
15	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
16	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39
17	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52
18	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
19	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78
20	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91
21	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
22	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117
23	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130
24	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143
25	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153			

Tab. 5.3.6 Zusammensetzung der Peptid-Gruppen zur Identifizierung neuer HLA-B8 restringierter T-Zell-Epitope. Einteilung der 146 Einzelpeptide bestehend aus je 8 Aminosäuren (A) bzw. der 153 Einzelpeptide aus je 9 Aminosäuren (B). Die Aufteilung erfolgte in je 25 Gruppen (grau unterlegt)

Um die Epitopspezifität der einzelnen T-Zellklone der Spender TW und LS zu ermitteln, wurden autologe B-Blasten mit je einem der 25 Subpools beladen und zusammen mit den T-Zellen über Nacht inkubiert. Als Kontrollen dienten Reaktionen mit dem HHV-6B-Gesamtmix (Okta- oder Nonamere), Helferpeptid oder ohne exogenes Peptid. In Abbildung 5.3.7 sind repräsentative Beispiele zur Bestimmung der Epitopspezifität gezeigt. So erkannte der T-Zellklon LS-373 die Oktamer-Subpools 11 und 15. Der Tabelle 5.3.6 ist zu entnehmen, dass nur Peptid 35 in beiden Subpools enthalten ist. Dieses Peptid hat die Sequenz Q T R Q K F H L, stammt aus U41, dem

DNA-bindenden Protein, und ist mit identischer Sequenz ebenfalls in U41 aus HHV-6A zu finden (Tab. 5.3.8).

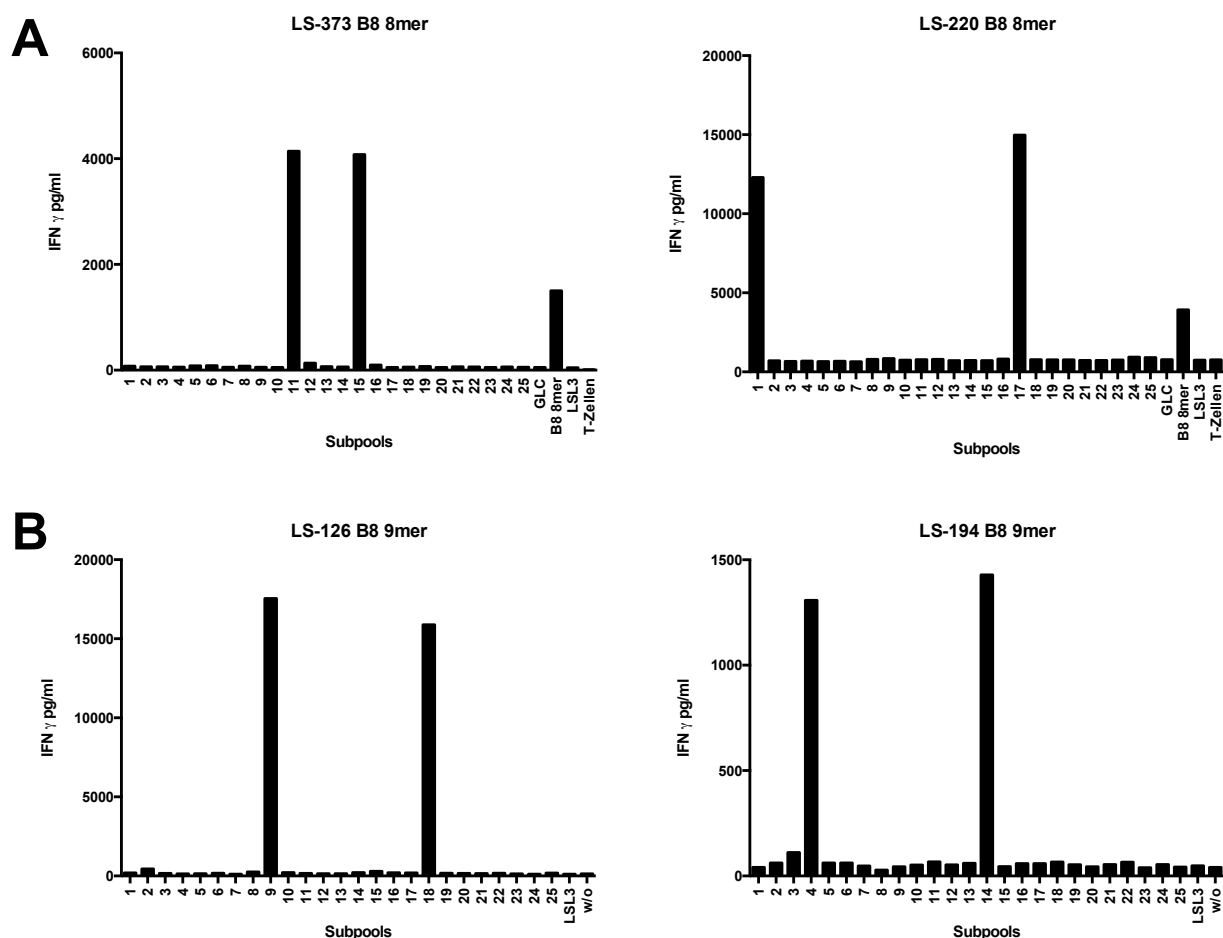


Abb. 5.3.7: Identifizierung von HHV-6B-Peptiden, die von HLA-B8-restringierten spezifischen T-Zellklonen erkannt werden. Gezeigt sind in (A) die HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellklone LS-373 und LS-220, die durch wiederholte Stimulation mit dem HLA-B8-Peptidmix (**8mer**) geniert wurden. Durch analoges Vorgehen unter Verwendung des HLA-B8-Peptidmix (**9mer**) wurden die T-Zellklone LS-126 und LS-194 (**B**) gewonnen. Zur Identifizierung des Epitops wurde eine Peptid-Bank wie in Abb. 5.3.6 gezeigt verwendet. T-Zellklone wurden mit autologen B-Blasten (LSL3) stimuliert, die zuvor mit je einer der 25 Peptidgruppen des jeweiligen Peptidpools aus 8- oder 9-meren beladen worden waren. Als Kontrolle dienten die Stimulation mit dem Gesamtmix aus 8- bzw. 9-meren, mit Helferpeptid (nur in (A) gezeigt), und mit B-Blasten ohne Peptidbeladung. Anschließend wurde die Konzentration von IFN- γ im Überstand mittels ELISA quantitativ bestimmt.

Ein weiterer T-Zellklon des gleichen Spenders (LS-220) erkannte die Peptidgruppen 1 und 17, also das Peptid 49 der 8mer-Peptidbank mit der Sequenz T N **K I K E Q L**. Dieses Peptid, abgekürzt TNK, entstammt dem Tegumentprotein U31 von HHV-6B und findet sich in variierte Form in HHV-6A (U1102) wieder, mit der Sequenz T N **K M K E Q L**. Anstatt eines Isoleucin befindet sich hier Methionin in Position 4. Aufgrund ähnlicher chemisch-struktureller Eigenschaften der beiden Aminosäuren war es vorstellbar, dass HHV-6B-TNK-spezifische T-

Zellklone auch das analoge Epitop aus HHV-6A erkennen könnten. Diese Vermutung wird in späteren Kapiteln genauer untersucht. Als T-Zellklone mit einer Spezifität gegen nonamere HHV-6B-Peptide sind in Abb. 5.3.7 **B** beispielhaft die Klone LS-162 EGR und LS-194 SPR mit ihren Analyseergebnissen aufgeführt. Der T-Zellklon LS-162 erkannte die Subpools 9 und 18 der Nonamer-Peptidbank, also das Peptid 61 (E G **R E R** I L T V) aus dem Protein U79, das wahrscheinlich ein funktionelles Homolog von CMV UL112/113 und demnach bei der viralen DNA-Replikation beteiligt ist (Taniguchi 2000, Harris 2010). Mit einem Austausch von Glutaminsäure durch Asparaginsäure in Position 4 findet sich das Epitop auch in HHV-6A wieder, als E G **R D R** I L T V. Der T-Zellklon LS-194 zeigte eine starke Erkennung der Subpools 4 und 14. Hierbei handelt es sich um das Epitop S P **R S R** L Q Q L. Diese Sequenz entstammt dem U86, einem immediate-early-Protein. Ein homologes Peptid liegt in HHV-6A nicht vor, da das U86-Protein von HHV-6A eine deutlich kürzere Aminosäuresequenz aufweist.

Die Tabelle 5.3.8 zeigt alle mit der HLA-B*0801-restringierten Peptidbank gefundenen Peptide, die durch T-Zellklone spezifisch erkannt wurden, aufgeteilt nach 8- und 9-meren. Dargestellt ist die Epitopsequenz mit den hervorgehobenen Ankerresten in den Positionen 3, 5 und 8 bzw. 9. Sofern vorhanden, ist die analoge Sequenz aus HHV-6A mit aufgeführt. Unterschiede in einzelnen Aminosäuren zwischen den HHV-6B- und HHV-6A-Homologen sind farblich hervorgehoben.

Insgesamt konnten mit Hilfe der HLA-B*0801-restringierten Peptidbibliothek T-Zellklone generiert werden, die 25 HHV-6B-Peptide spezifisch erkannten. Hierbei handelt es sich um 14 Oktamere bzw. 11 Nonamere, die insgesamt aus 19 verschiedenen viralen Proteinen stammen. Dabei waren sämtliche Genklassen enthalten: immediate-early-Proteine wie das U86 (IE-A), early/late-Proteine wie beispielsweise das U41, das DNA-bindende Protein, oder late-Proteine wie das U31, das Haupt-Tegumentprotein. Des Weiteren entstammten aus 4 Proteinen mehr als ein Epitop, dies waren die drei soeben genannten Proteine sowie die DNA-Polymerase U38. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Proteine der Präsentation gegenüber T-Zellen generell besonders zugänglich sind, könnte aber auch lediglich bedeuten, dass diese Proteine eine größere Zahl geeigneter HLA-B*0801-restringierter Peptide enthalten. 12 der 25 Epitope sind zwischen HHV-6B und HHV-6A streng konserviert. Von 9 weiteren HHV-6B-Peptidepitopen existiert ein HHV-6A-Homolog, das in einer bis drei Aminosäurepositionen abweicht. In den meisten (7/9) dieser HHV-6A-Homologe ist nur eine einzige Aminosäure verändert. Bei einigen dieser Homologe sind chemisch verwandte Aminosäuren ausgetauscht (TNK: I durch M; KRR: L durch V; EGR: E durch D), so dass die Möglichkeit einer Erkennung

des variierten Peptids durch den gleichen T-Zellklon bestand (Burrows et al, 1995; Khan et al, 2002). Bei anderen Peptiden waren die chemischen Unterschiede zwischen den beiden Varianten größer, was eine mögliche Kreuzerkennung unwahrscheinlicher macht. Die 4 Epitope VPR, RSK, RPR und PKR sind ausschließlich in HHV-6B zu finden, drei davon stammen aus B4 und B8, also aus postulierten Proteinen, deren Gene nur im Genom von HHV-6B, nicht aber in HHV-6A vorkommen.

Tab. 5.3.8 Von T-Zellklonen erkannte HHV-6B-Peptide, und ihre HHV-6A-Homologe, mit potentieller Restriktion durch HLA-B*0801

Epitope bestehend aus 8 Aminosäuren

Epitop	HHV- 6B	HHV- 6A	Protein	Funktion
EMR	EMRLRMIL	EMRLRMIL	U26	-
AVK	AVK K RKYI	AVK K RKYI	U29	Kapsidbildung
TNK	TNK I KEQL	TNK M KEQL	U31	Tegumentprotein
LCK	LC K AREEL	LC E AREEL	U38	DNA-Polymerase
QTR	QTR Q KFHL	QTR Q KFHL	U41	DNA-Bindungsprotein
TPK	TPK V RSKV	TPK V KSKV	U42	Transaktivator/multifunktionaler Expressionsregulator
MAR	MARE K NDL	MARE K NDL	U53	Proteinase
ELK	ELK W KHAV	ELK W KHAV	U59	Tegumentprotein UL88
KVR	KVR C KKIL	-	U64	DNA-Verpackung/ Tegumentprotein UL17
KRR	KRRYK Q LL	KRRYK V LL	U72	gM
TSK	TSK T RPTV	TSK T RQTV	U84	putatives Glykoprotein
VPR	VPRL K FFL	VPRL C FFFL	B8	-
YLR	YLRL R KGL	YLRL H KGL	DR1	DNA abhängige RNA-Polymerase II
LPR	LPR Q RAYL	LPR Q RLFA	DR6	Transaktivator

Epitope bestehend aus 9 Aminosäuren

Epitop	HHV- 6B	HHV- 6A	Protein	Funktion
EAR	EARRRLAEM	EARRRLAEM	U3	Transaktivator
RSK	RSK P RHMCV	RSK P RHMCV	U7	-
FEK	FEKER F FLFL	FEKER F FLFL	U29	Kapsidbildung
FYR	FYRDR Q YLL	FYRDR Q YLL	U38	DNA-Polymerase
VVK	VVK G KVLSI	VVK G KVLSI	U41	DNA-Bindungsprotein
NVK	NVK H KKNPL	NVK H KKNPL	U41	DNA-Bindungsprotein
EGR	EGR E RILTV	EGR D RILTV	U79	DNA-Replikation
SPR	SPRSRL Q QL	-	U86	IE-A
DFK	DFK S KYLTL	EFK S KFSTL	U86	IE-A
RPR	RPR W RS L TL	-	B4	-
PKR	PKR V RTLKI	-	B8	-

„ - „, Funktion nicht bekannt

Die Proteine sind mit den Namen der jeweiligen “open reading frames” bezeichnet. Ein Teil dieser Proteine sind bislang nur postuliert, aber nicht nachgewiesen.

5.3.4 Bestimmung der funktionellen Avidität der T-Zellklone

Im folgenden wurden ausgewählte HHV-6B-spezifische T-Zellklone hinsichtlich ihrer funktionellen Avidität für das Zielantigen mittels IFN- γ ELISA untersucht. Ein einfacher Test, der einen Hinweis auf die funktionelle Avidität von T-Zellen geben soll und insbesondere für HLA-A2-restringierte T-Zellen viel verwendet wird, besteht in der Analyse der T-Zellreaktivität gegen Zielzellen, die mit seriell verdünntem Zielpeptid beladen wurden (Schuster et al, 2007). Die T-Zellen wurden mit autologen B-Blasen kokultiviert, die mit absteigenden Verdünnungen (10^{-5} – 10^{-11} M) des jeweiligen Peptids beladen worden waren. Anschließend wurde die Menge des in den Überstand abgegebenen IFN- γ bestimmt.

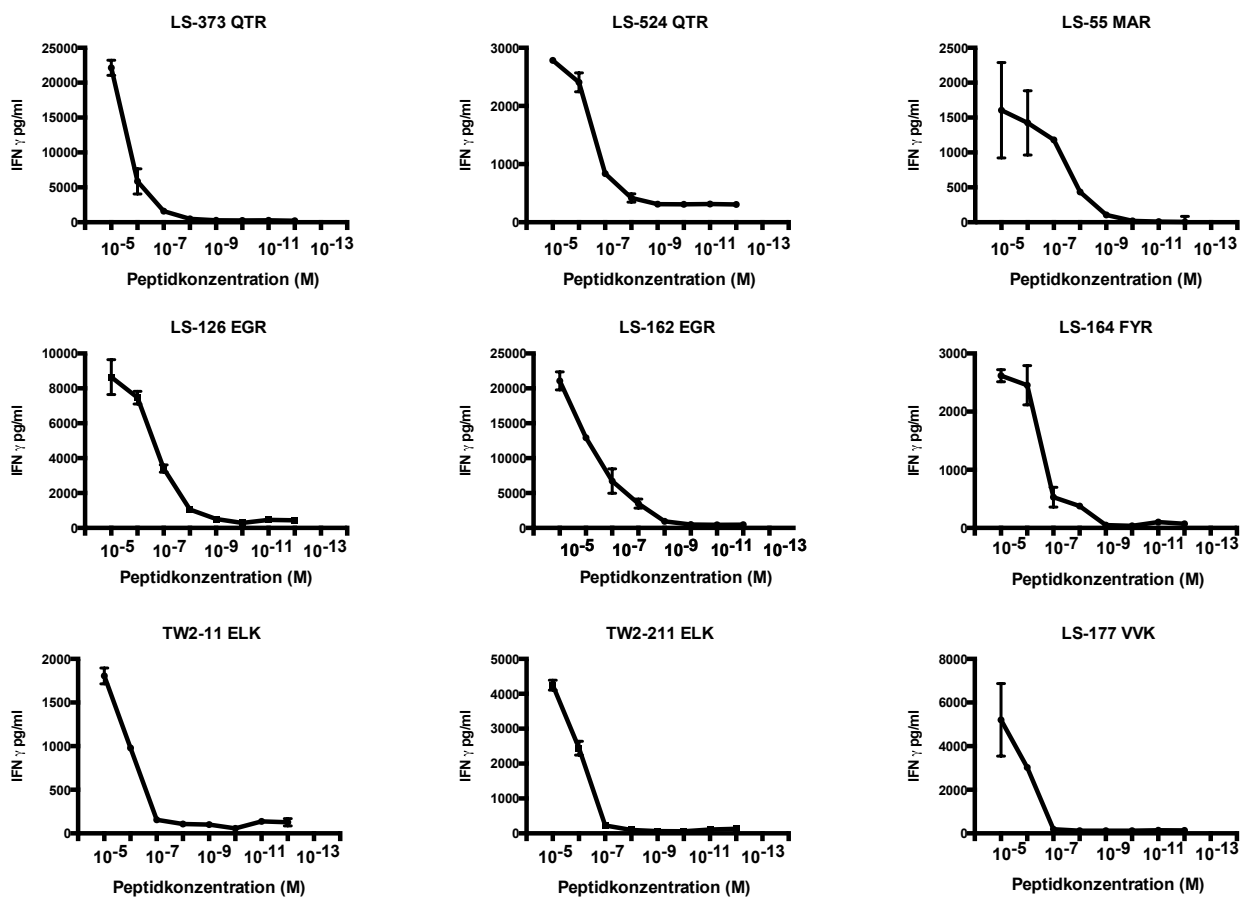


Abbildung 5.3.9: Analyse der funktionellen Avidität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone. Die HHV-6-spezifischen T-Zellklone wurden zusammen mit autologen B-Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden HHV-6-Peptids (QTR, EGR, ELK, VVK, MAR, FYR) über Nacht inkubiert. Die Konzentration an ausgeschüttetem IFN- γ im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Wertebereiche von Duplikaten gezeigt.

Wie in Abbildung 5.3.9 dargestellt, zeigen die Reaktivitätskurven der meisten der in diesem Experiment getesteten, potentiell B*0801-restringierten T-Zellklone einen ähnlichen Verlauf, mit einer halbmaximalen Erkennung des Peptids bei einer Beladungskonzentration zwischen 10^{-6} und 10^{-7} M. Lediglich zwei T-Zellklone fielen aus diesem Bereich heraus: Klon LS-373 QTR zeigte eine etwas geringere Sensitivität, Klon LS-55 MAR eine etwas höhere Sensitivität. Diese relativ geringe Bandbreite steht im Kontrast zu Beobachtungen etwa zu HLA-A*0201-restringierten T-Zellen, die eine weit größere Bandbreite der Erkennung von titriertem Peptid aufweisen, bis hinunter zu einer halbmaximalen Erkennung von Peptid in einer Konzentration von 10^{-12} M (Conrad et al, 2008; Zentz et al, 2007). Allerdings bietet selbst die Erkennung einer so niedrigen Peptidkonzentration nicht die Gewähr dafür, dass T-Zellen ihr Zielantigen in physiologischem Kontext (nach intrazellulärer Prozessierung) erkennen (Conrad et al, 2008; Zentz et al, 2007). Im Falle von HLA-B*0801-restringierten T-Zellen wurden vergleichsweise geringe halbmaximale Reaktivitäten im Peptidtitrationstest oberhalb von 10^{-8} M beschrieben, obwohl die getesteten T-Zellen ihr Antigen nach intrazellulärer Prozessierung erkennen können (Bogedain et al, 1995). Daher bestanden nach Durchführung dieses Experiments Zweifel, ob der Peptidtitrationstest zur Vorhersage der antigenspezifischen Avidität und zur Auswahl hochavidere T-Zellklone geeignet ist. Es wurden deshalb im folgenden alle T-Zellklone auf ihre Fähigkeit zur Erkennung von prozessiertem Antigen untersucht. Möglicherweise sind generelle chemische Unterschiede zwischen HLA-A*0201-restringierten und HLA-B*0801-restringierten Epitopen dafür verantwortlich, dass der Peptidtitrationstest für letztere weniger geeignet sein könnte: A*0201-restringierte Peptide weisen nur hydrophobe Ankerreste auf (Falk et al, 1991) und sind oft insgesamt von hoher Hydrophobizität, B*0801-restringierte Peptide dagegen enthalten mindestens zwei positiv geladene Aminosäuren, die als Ankerreste benötigt werden. B*0801-Peptide werden daher vermutlich in wässrigem Medium in der Regel besser solubilisiert, und dies könnte ihre Bindung an HLA-B*0801-Moleküle aus der wässrigen Phase behindern.

5.3.5 Bestimmung der HLA-Restriktion

Entsprechend der Ausgangshypothese sollten die hier untersuchten T-Zellklone ihr spezifisches Peptid nach Präsentation auf HLA-B*0801 erkennen. Manche der aufgrund des HLA-B*0801-Motivs ausgewählten Peptide könnten jedoch auch den Bedingungen genügen, die zur Präsentation durch bestimmte andere HLA-Moleküle erfüllt sein müssen. Zum Beispiel wäre für das Peptid RPRWRSLTL aus Antigen B4 auch eine Präsentation durch HLA-B*0702 nicht

auszuschließen, da dieses Peptid die dafür nötigen Ankerreste aufweist (Prolin in Position 2 und aliphatische Aminosäure in C-terminaler Position).

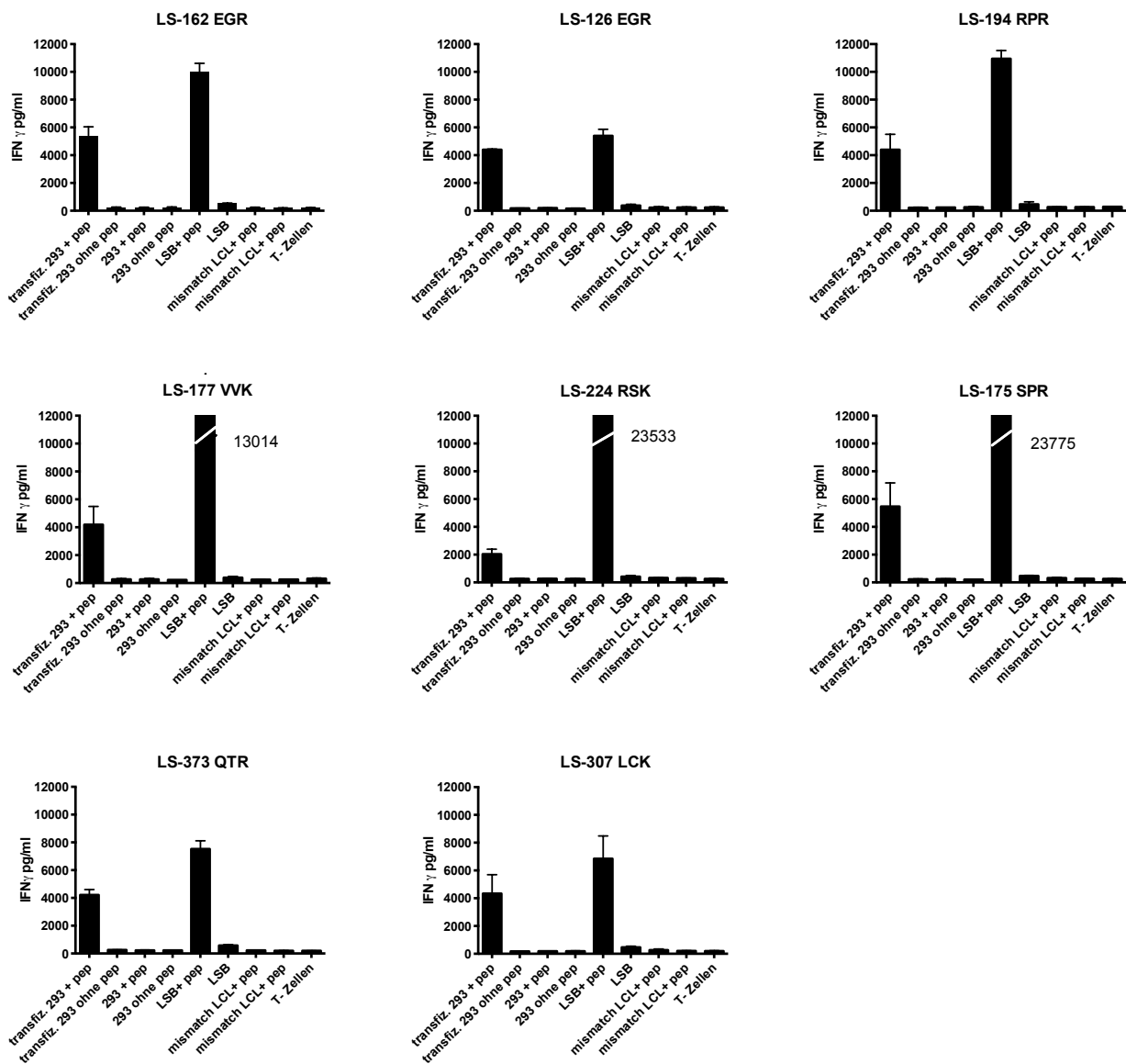


Abb. 5.3.10 Überprüfung der HLA-B*0801-Restriktion von HHV-6B-spezifischen T-Zellklonen. Zur Überprüfung der HLA-Restriktion wurden 293-Zellen mit einem Plasmidvektor für HLA-B*0801 transfiziert, und etwa 48 h später wurden die Zellen mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladen. Anschließend wurden die Zellen mit HHV-6B-spezifischen T-Zellklonen LS-162 EGR, LS-126 EGR, LS-194 RPR, LS-177 VVK, LS-224 RSK, LS-175 SPR, LS-373 QTR und LS-307 LCK kokultiviert. Als Negativkontrollen dienten nicht transfizierte und/oder nicht peptidbeladene 293T-Zellen in jeder möglichen Kombination. Als Positivkontrolle wurde die mit Peptid beladene autologe LCL eingesetzt („LSB + pep“). Als weitere Negativkontrollen dienten die unbeladene autologe LCL („LSB“), HLA-A*0801-negative LCLs mit Peptid („mismatch + pep“) und eine Kultur ohne Zielzellen („T-Zellen“). Die Menge an sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA detektiert. Es sind die Mittelwerte und Wertebereiche von Duplikaten gezeigt.

Um die Frage der HLA-Restriktion in einem genetisch definierten System zu testen, wurde ein Expressionsplasmid für HLA-B*0801 in 293-HEK-Zellen transfiziert und die T-Zell-Erkennung der transfizierten Zellen nach Peptidbeladung untersucht. Als Transfektionskontrolle diente ein GFP-kodierendes Plasmid. Etwa 48 Stunden nach Transfektion wurde die Transfektionsrate anhand der GFP-positiven Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop abgeschätzt (nicht gezeigt). Bei einer Transfektionsrate oberhalb 60-70% wurden die Zellen für das T-Zell-Experiment verwendet, unter der Annahme, dass dann auch eine ausreichende Transfektions- und Expressionsrate für das HLA-B*0801-Expressionsplasmid zu vermuten war. Ein Teil der HLA-B*0801-transfizierten bzw. der nicht transfizierten 293-Zellansätze sowie autologe HLA-B*0801-positive LCL und allogene HLA-B*0801-negative LCL wurden mit dem jeweiligen Peptid beladen. Die andere Hälfte der Zellen wurde unbeladen in diesem Versuch eingesetzt. Die Zielzellen wurden zusammen mit den HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellklonen in einem Verhältnis von 1:1 über Nacht inkubiert und die IFN- γ -Konzentration im Überstand mittels ELISA ermittelt. Abbildung 5.3.10 zeigt eine Auswahl der getesteten T-Zellklone. Alle 8 gezeigten Klone erkannten mit Peptid beladene HLA-B*0801-transfizierte 293-Zellen bzw. autologe LCL, jedoch keine der Negativkontrollen. Hiermit ist die HLA-B*0801-Restriktion für die gezeigten Spezifitäten nachgewiesen.

5.3.6 Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone gegenüber virusinfizierten T-Zellen

Die Reaktivität der T-Zellklone gegenüber virusinfizierten Zellen und damit die Erkennung der viralen Proteine im Viruskontext wurde nun analysiert. Es wurde dieselbe Infektionsmethode verwendet wie bereits unter 5.1.2 beschrieben. CD4⁺-T-Zellen wurden aus Leukozytenkonzentraten HLA-B*08-positiver Spender isoliert, mit PHA stimuliert, und 3 Tage später mit dem HHV-6B-Stamm HST infiziert. Die HHV-6-spezifischen T-Zellen wurden an unterschiedlichen Tagen nach Infektion mit den infizierten Zellen kokultiviert und die Menge des sezernierten IFN- γ wurde mittels ELISA bestimmt.

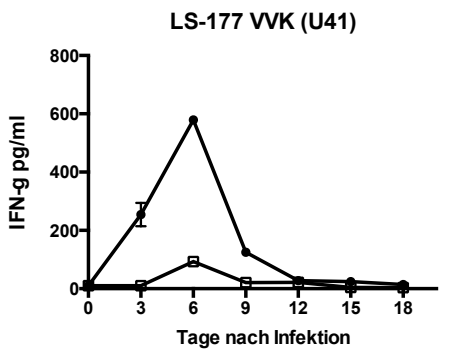
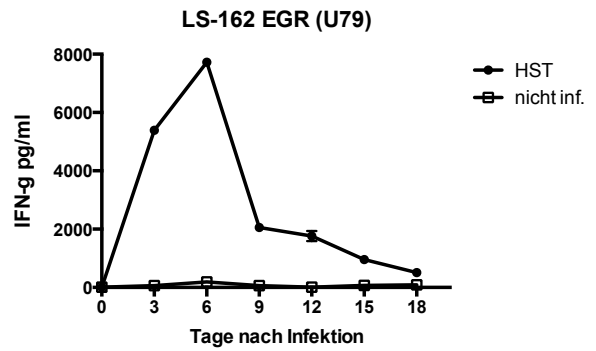
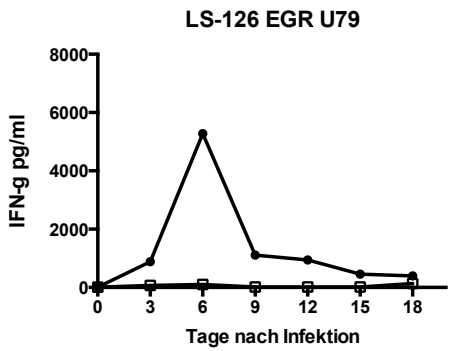
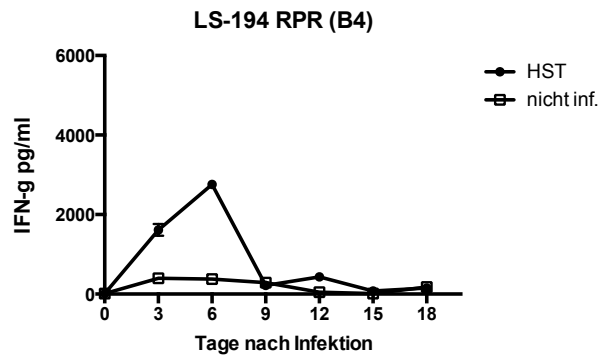
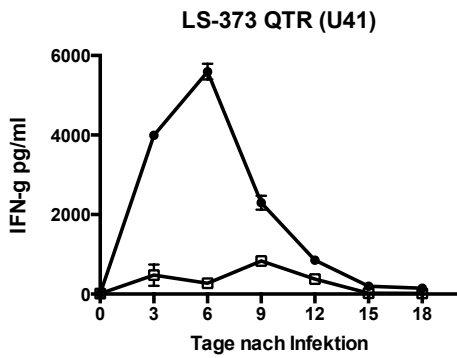
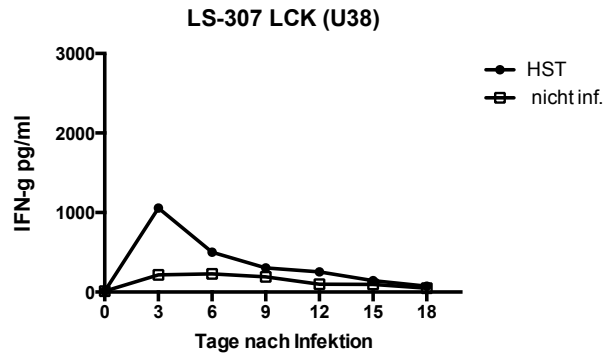
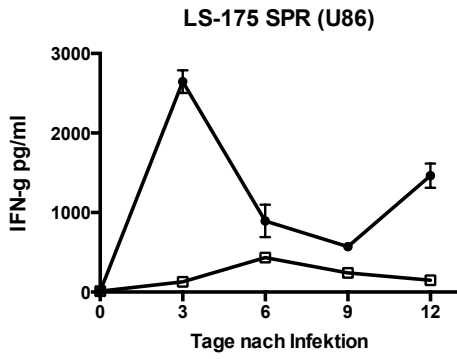


Abbildung 5.3.10: Erkennung von HHV-6B-infizierten PHA-Blasten durch HHV-6B-spezifischen T-Zellklone. Die T-Zellklone LS-175 SPR, LS-307 LCK, LS-373 QTR, LS-194 SPR, LS-126 EGR, LS-162 EGR und LS-177 VVK wurden mit HST (HHV-6B)- infizierten PHA-Blasten, die aus den CD4+-T-Zellen eines HLA-B8-positiven Spenders hergestellt worden waren (wie angegeben), an den Tagen 3,6,9,12,15, und 18 nach der HHV-6-Infektion kokultiviert. Als zusätzliche Kontrollen wurde die mit dem entsprechenden HHV-6B-Peptid beladene bzw. unbeladene HLA-B8-positiv autologe mLCL verwendet (nicht gezeigt). Die Menge an in den Zellkulturüberstand sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA bestimmt. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von Duplikaten gezeigt.

In der Abbildungen 5.3.10 sind die Ergebnisse für 7 HHV-6-spezifische T-Zellklone mit 6 unterschiedlichen Spezifitäten dargestellt. Zwei unterschiedliche Muster des Zeitverlaufs der Erkennung wurden beobachtet. Die T-Zellklone LS-175 SPR (spezifisch für IE-A, codiert durch U86) und LS-307 LCK (spezifisch für die virale DNA-Polymerase, codiert durch das early-Gen U38) zeigen eine maximale Erkennung bereits an Tag 3 der Infektion. Alle übrigen in diesem Experiment getesteten Klone erkennen die Infektion zwar bereits ebenfalls ab Tag 3, erreichen aber erst an Tag 6 das Maximum ihrer Reaktivität. Diese größere Gruppe von T-Zellklonen erkennt Epitope aus den Antigenen U41, U79 und B4. Da U79 und B4 als IE-Gene, U41 als early-Gen klassifiziert wurde (Tsao et al, 2009), lässt sich aus diesen kinetischen Verläufen kein klarer Zusammenhang zwischen der postulierten Expressionskinetik und der T-Zell-Erkennungskinetik erschließen.

5.3.7 Reaktivität der HHV-6-spezifischen T-Zellklone gegenüber virusinfizierten T-Zellen unter Einfluss von Inhibitoren

Um zu untersuchen, ob die Erkennung infizierter Zellen durch HHV-6B-spezifische T-Zellen von der viralen Replikation abhängig ist, wurde das zuvor beschriebene Experiment in Gegenwart von Ganciclovir wiederholt, eines Inhibitors der viralen DNA-Replikation. Ganciclovir wird durch virale und zelluläre Kinasen aktiviert und führt so als Nukleosidanalogon nach Einbau in die virale DNA zum Kettenabbruch.

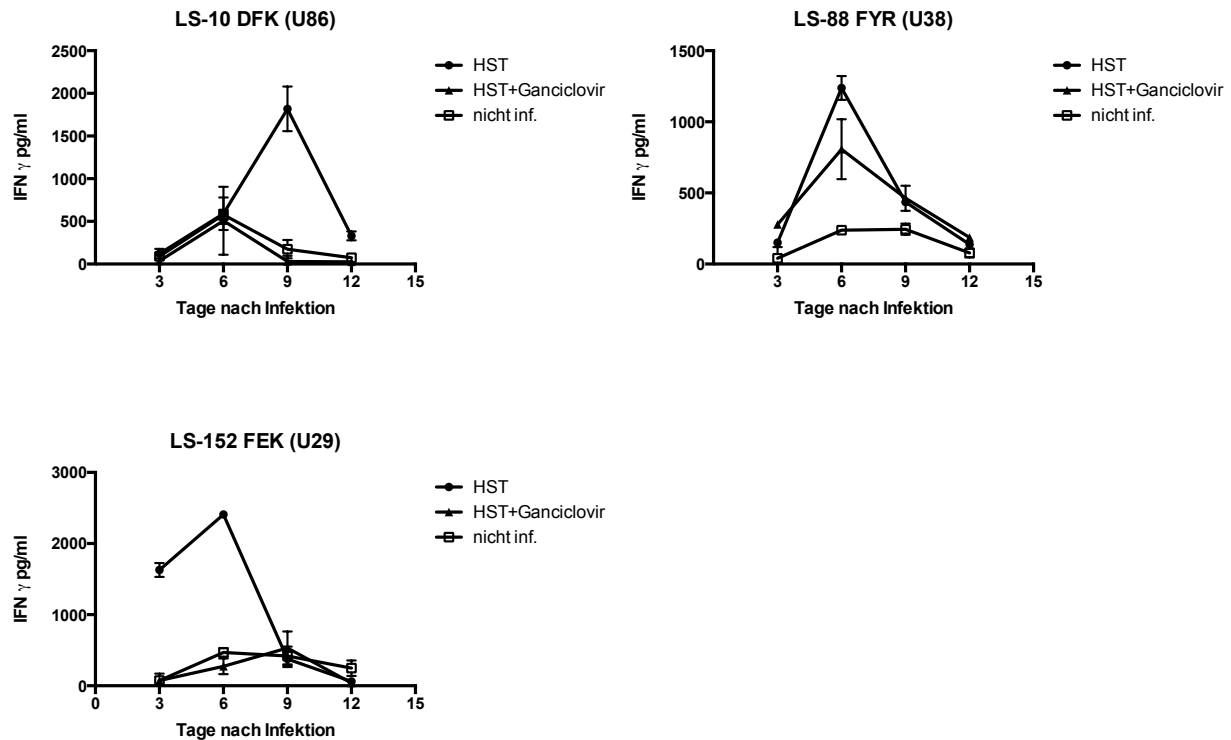


Abb. 5.3.11 Zeitlicher Verlauf der Erkennung von HHV-6B(HST)-infizierten Zellen durch HHV-6-spezifische T-Zellklone unter Einfluss des Inhibitors Ganciclovir. Die T-Zellklone LS-10 DFK, LS-88 FYR und LS-152 FEK wurden mit Ganciclovir-behandelten oder nicht behandelten HST-infizierten CD4⁺-T-Zellen kokultiviert. Zum Vergleich wurden die T-Zellklone mit nicht infizierten CD4⁺-T-Zellen getestet. Die Menge an sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA detektiert. Es sind die Mittelwerte und Wertebereiche von Duplikaten gezeigt.

Wie aus Abbildung 5.3.11 ersichtlich ist, wurden 3 HHV-6B-spezifische T-Zellklone mit unterschiedlicher Spezifität ausgewählt. Der IE-A(U86)-spezifische T-Zellklon LS-10 DFK erkannte wider Erwarten die Infektion erst an Tag 9, und diese Erkennung wurde durch Ganciclovir vollständig inhibiert. Dies steht im Gegensatz zur für ein IE-Protein erwarteten Präsentationskinetik. Ein anderes Epitop aus IE-A, SPR, wurde bereits an Tag 3 erkannt (siehe oben, Abb. 5.3.10). T-Zellklone, die für die Epitope FYR (DNA-Polymerase U38, early) und FEK (U29, Kapsidbildung, late) spezifisch waren, erkannten die Infektion bereits zu früheren Zeitpunkten, und die Erkennung war auch hier durch Ganciclovir vollständig oder teilweise inhibiert. Auch in diesem Experiment spiegelte der Zeitverlauf der Erkennung nicht direkt den erwarteten ersten Expressionszeitpunkt des Antigens. Vermutlich wird ein Teil der HHV-6B-Epitope erst nach Ablauf einer ersten Replikationsrunde in der infizierten Kultur hinreichend akkumuliert, um eine T-Zellerkennung zu ermöglichen. Dies scheint insbesondere für das IE-A-Epitop DFK der Fall zu sein, dessen Präsentation andernfalls durch Ganciclovir nicht inhibiert werden sollte.

Die DNA-Sequenzen von HHV-6B und HHV-6A sind zu 70% identisch (Isegawa et al, 1999). Dementsprechend ist die Mehrzahl der identifizierten HHV-6B-Epitope in HHV-6A entweder vollständig konserviert oder weist nur einen konservativen Austausch einer Aminosäure auf (Tab. 5.3.8, S.85). Daher lag es nahe, eine Reaktivität der HHV-6B-peptidspezifischen T-Zellklone gegenüber HHV-6A zu vermuten. Um dies zu untersuchen, wurden die primären aktivierten CD4⁺-T-Zellen eines HLA-B*08-positiven Spenders mit HHV-6A (U1102) infiziert, ggf. zusätzlich mit Ganciclovir behandelt und mit den T-Zellen inkubiert (Abb. 5.3.12).

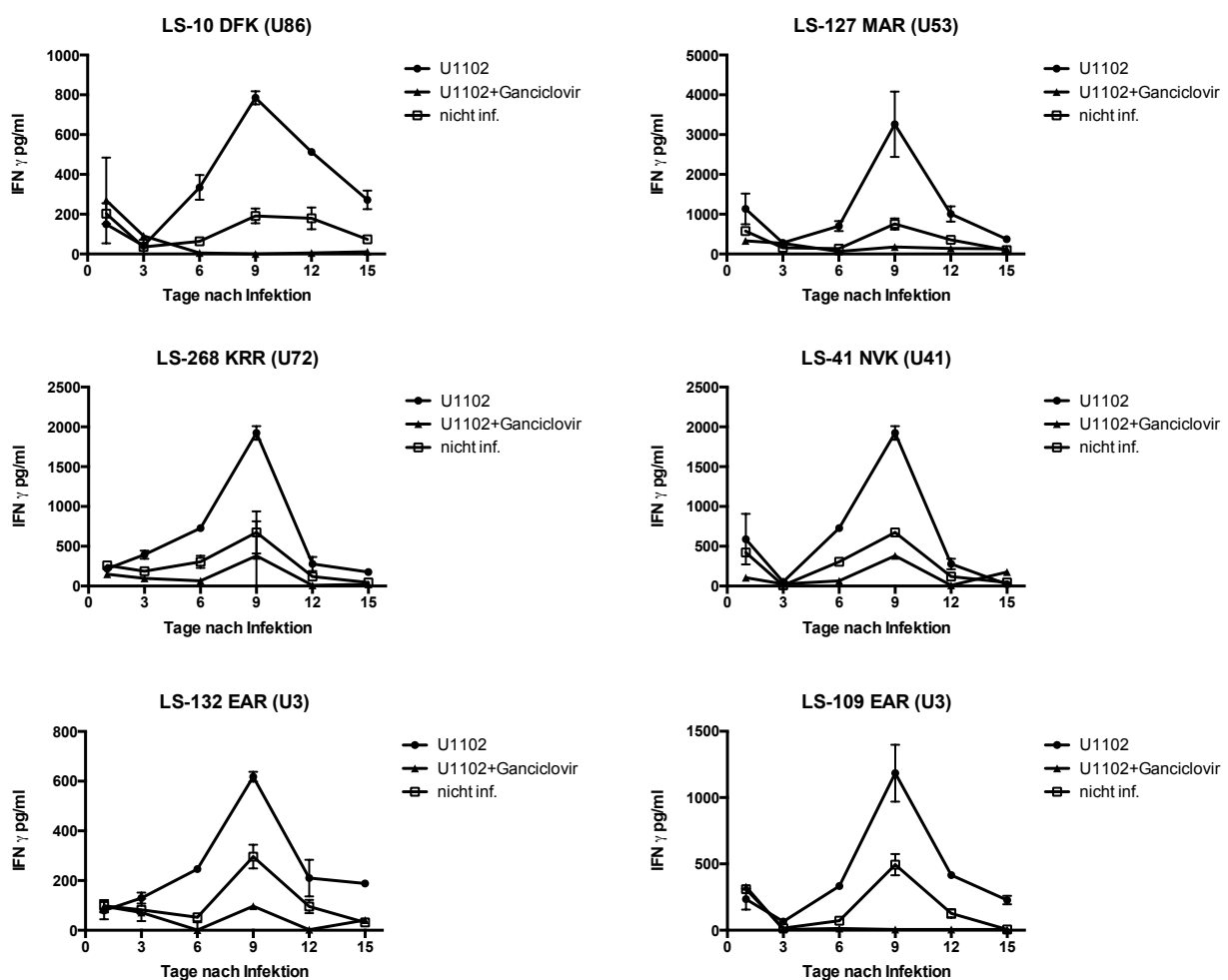


Abb. 5.3.12 Zeitlicher Verlauf der Erkennung von HHV-6A-infizierten Zellen durch HHV-6-spezifische T-Zellklone. Die T-Zellen LS-10 DFK, LS-127 MAR, LS-268 KPR, LS-41 NVK, LS-132 EAR, LS-109 EAR und LS-7 PKR wurden zusammen mit Ganciclovir behandelten oder unbehandelten U1102-infizierten CD4⁺-T-Zellen kokultiviert. Zum Vergleich wurden die T-Zellklone mit nicht-infizierten CD4⁺-T-Zellen getestet. Die Menge an sezerniertem IFN- γ wurde mittels ELISA detektiert. Es sind die Mittelwerte und Schwankungsbreiten von Duplikaten gezeigt.

Gezeigt sind 6 HHV-6-spezifische T-Zellklone mit 5 unterschiedlichen Spezifitäten, deren Zielantigene verschiedenen kinetischen Klassen angehören. Alle Klone zeigten ihre stärkste Erkennung von HHV-6A-infizierten Zellen erst an Tag 9 der Infektion. Der T-Zellklon LS-10 DFK ist beispielsweise für ein Epitop aus dem IE-Antigen U86 spezifisch, was eine frühere Erkennung von infizierten Zellen erwarten ließe. Obwohl dieses Epitop zwischen beiden Virusspezies vergleichsweise gering konserviert ist (3 von 9 Aminosäuren sind substituiert, davon 2 konservativ, siehe Tab. 5.3.8, S.85), werden auch HHV-6A-infizierte Zellen erkannt. Bei den anderen gezeigten T-Zellklonen handelt es sich jeweils um konservierte Epitope. Für alle hier gezeigten T-Zellklone gilt, dass die Erkennung mit Ganciclovir inhibiert werden konnte. Die offenbar synchrone Erkennung der unterschiedlichen kinetischen Klassen viraler Antigene, immediate-early (U86, DFK), early/late (U53, MAR; U41, NVK; U3 EAR) und late (KPR, U72) in diesem Experiment bestätigt, dass die Expressionskinetik der viralen Antigene von HHV-6A sich, ebenso wie bei HHV-6B (vgl. Abb. 5.3.10 und 5.3.11), nicht in einer unterschiedlichen T-Zellerkennungskinetik widerspiegelt. Die verzögerte Erkennung von HHV-6A im Vergleich mit HHV-6B könnte mit unterschiedlichen Replikationsgeschwindigkeiten im verwendeten Zellkulturmodell oder mit einem eventuell niedrigeren Virustiter in der HHV-6A-Präparation in Zusammenhang stehen.

Die folgende Tabelle 5.3.13 fasst die Ergebnisse der Experimente zur Erkennung infizierter Zellen zusammen. Von 25 verschiedenen Epitopen wurden 13 von HHV-6B-infizierten Zellen präsentiert, 4 wurden nicht präsentiert, und 8 Spezifitäten konnten nicht getestet werden. Alle 8 gegen HHV-6A getesteten T-Zellklone unterschiedlicher Spezifität erkannten infizierte Zellen. Für 5 T-Zellklone unterschiedlicher Spezifität (TNK, QTR, LCK, MAR und DFK) konnte eine Erkennung sowohl von HHV-6A- als auch von HHV-6B-infizierten Zellen gezeigt werden.

Wie diese Resultate zeigen, werden HLA-B*0801-restringierte Epitope aus verschiedenen Klassen viraler Antigene also regelmäßig nicht nur von HHV-6B, sondern auch HHV-6A präsentiert. Im Gegensatz dazu wurden, wie auf S.59 gezeigt, HLA-A*0201-restringierte Epitope aus zwei verschiedenen Tegumentproteinen (U11, U54) von HHV-6A-infizierten Zellen nicht präsentiert. Diese Befunde sind mit der Hypothese vereinbar, dass es bei HHV-6A ähnlich wie bei CMV (Schust et al, 1998)(Ameres et al, unpubliziert) immunevasive Funktionen gibt, die spezifisch für bestimmte HLA-Allotypen sein könnten und gegenüber denen HLA-B*0801 resistent sein könnte, z.B. vermittelt durch das Protein U21 (Glosson & Hudson, 2007).

Tab. 5.3.13: Zusammenfassung der Experimente: Erkennung von infizierten CD4+-T-Zellen

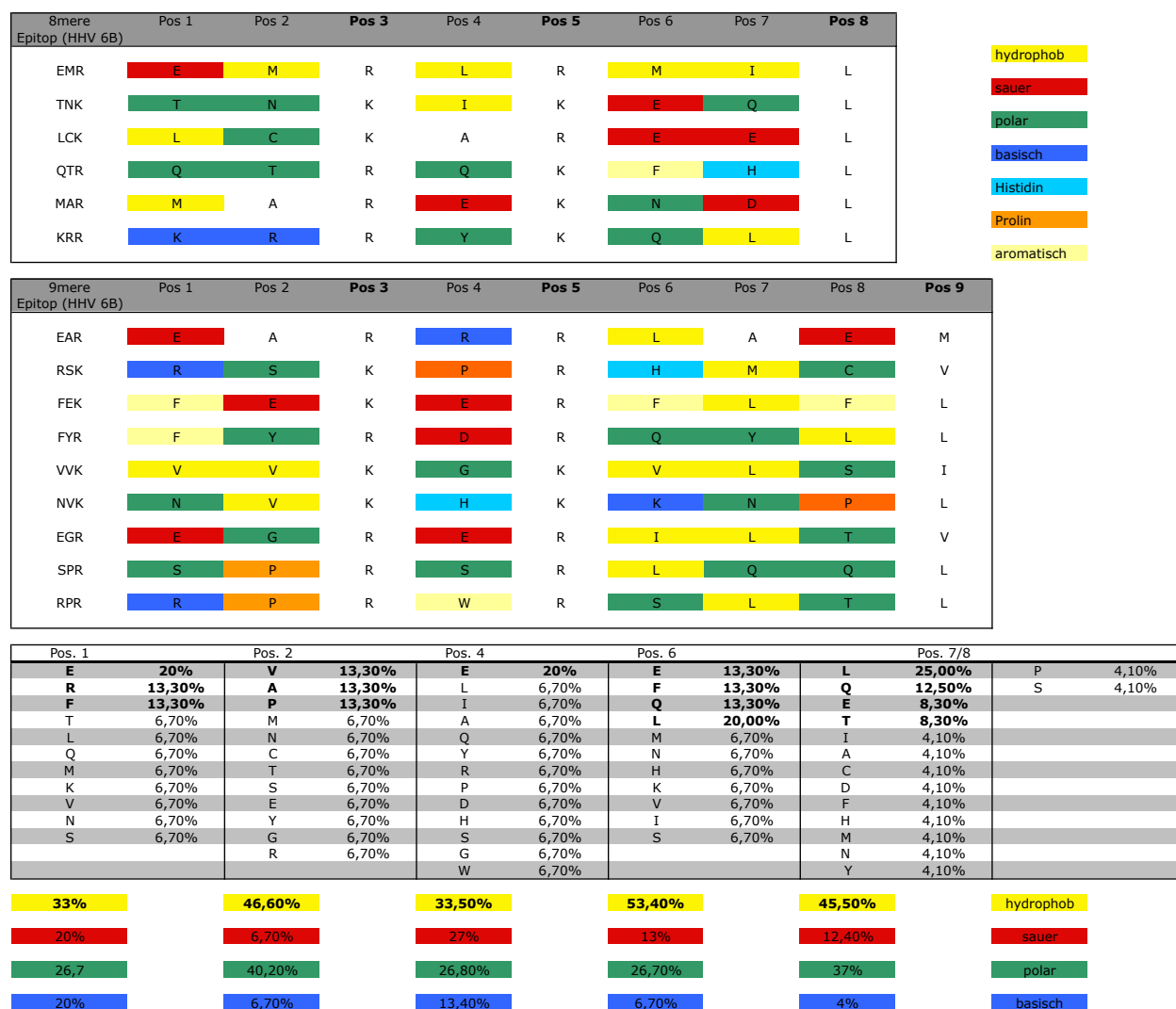
Epitop	Spender	HHV- 6B	HHV- 6A	Erkennung von HHV- 6B	Erkennung von HHV- 6A
EMR	LS	EMRLRMIL	EMRLRMIL	ja	n.u.
AVK	LS	AVKKRKYI	AVKKRKYI	n.u.	n.u.
TNK	LS/TW	TNK I KEQL	TNK M KEQL	ja	ja
LCK	LS	LC K AREEL	LC E AREEL	ja	ja
QTR	LS/TW	QTRQKFHL	QTRQKFHL	ja	ja
TPK	TW	TPK V RSKV	TPK V KSKV	nein	n.u.
MAR	LS	MAREKNDL	MAREKNDL	ja	ja
ELK	TW	ELK W KHAV	ELK W KHAV	nein	n.u.
KVR	TW	KVR C KKIL	-	n.u.	n.u.
KRR	TW	KRRY K QLL	KRRY K QL V	n.u.	ja
TSK	TW	TSK T R P TV	TSK T R Q TV	nein	n.u.
VPR	TW	VPRL K FFL	VPRL C FFFL	n.u.	n.u.
YLR	TW	YLRL R KGL	YLRL H KGL	n.u.	n.u.
LPR	TW	LPR Q R A YL	LPR Q R L FA	nein	n.u.

Epitop	Spender	HHV- 6B	HHV- 6A	Erkennung von HHV- 6B	Erkennung von HHV- 6A
EAR	LS	EARRRLAEM	EARRRLAEM	n.u.	ja
RSK	LS	RSKPRHMCV	RSKPRHMCV	ja	n.u.
FEK	LS	FEKERFLFL	FEKERFLFL	ja	n.u.
FYR	LS	FYRDRQYLL	FYRDRQYLL	ja	n.u.
VVK	LS	VVKGKVL S I	VVKGKVL S I	ja	n.u.
NVK	LS	NVKHKK N PL	NVKHKK N PL	n.u.	ja
EGR	LS	EGR E RILTV	EGR D RILTV	ja	n.u.
SPR	LS	SPRSRLQQL	-	ja	n.u.
DFK	LS	DFK S KY L TL	DFK S K F STL	ja	ja
RPR	LS	RPR W RS L TL	-	ja	n.u.
PKR	LS	PKRV R TLKI	-	n.u.	n.u.

„n.u.“ nicht untersucht

Im folgenden werden nur diejenige Epitope in einer Tabelle dargestellt, die im Rahmen einer HHV-6-Infektion erkannt wurden und für die eine HLA-B*0801-Restriktion nachgewiesen wurde. Darüber hinaus wird die Aminosäurenstatistik für die einzelnen Positionen im Peptid wiedergegeben. Hierbei wurden die Position 7 der Oktamere mit den Positionen 7 und 8 der Nonamere zusammengefasst. In Position eins wurden saure (E), basische (R, K), aromatische (F) und andersartige Aminosäuren gefunden, ohne dass eine eindeutige Präferenz für eine bestimmte Kategorie von Aminosäure zu erkennen war. Auch in den anderen Nichtankerpositionen 2,4,6,7/8 gab es keine oder nur geringe Tendenzen zur Anreicherung bestimmter Aminosäuren.

Abb. 5.3.14 : Aminosäuresequenzen bestätigter HLA-B*0801-restringierter HHV-6B-spezifischer T-Zellepitope



5.3.8 Analyse und Gentransfer von HHV-6-spezifischen T-Zellrezeptoren

Die Spezifität einer T-Zelle wird vom T-Zellrezeptor definiert, der aus einer α - und einer β -Kette besteht. Die Kenntnis der Sequenzen virusspezifischer T-Zellrezeptoren ist wertvoll, weil mit ihrer Hilfe Patientenmaterial durch PCR-Verfahren in besonders sensitiver Weise auf die Anwesenheit virusspezifischer T-Zellen getestet werden kann. Zudem können virusspezifische T-Zellen durch TCR-Gentransfer synthetisch hergestellt werden, was wegen der relativ niedrigen Häufigkeit von HHV-6-spezifischen T-Zellen im Blut (siehe S.63 und S.77) für einen Einsatz in der Immuntherapie attraktiv sein könnte. Daher wurden von einer Auswahl HHV-6-spezifischer T-Zellklone die Sequenzen ihrer TCRs analysiert. Um die vollständige Sequenz der TCR- α - und β -Ketten zu ermitteln, wurde jeweils eine PCR mit Primern durchgeführt, die die hypervariable

Region (CDR3, komplementaritäts-determinierende Region 3) flankieren, und das PCR-Produkt wurde sequenziert.

Hierfür wurden zwei T-Zellklone ausgewählt, die sich in Kultur besonders robust vermehrten. Diese T-Zellklone erkannten die Epitope QTR (LS-373 QTR) und EGR (LS-162 EGR) aus den Antigenen U41 und U79. Tabelle 5.3.15 zeigt das Ergebnis der Charakterisierung der CDR3-Regionen und die Verwendung der V- und J-Gensegmente.

Tab 5.3.15 : TCR-Analyse HHV-6-spezifischer T-Zellklone

Epitop	TCR alpha CDR3 α			TCR beta CDR3 β		
	AV	AJ	BV	BJ		
QTR	14*02 CAI SSPTVTDLIF GTG	34*01	3-1*01	CAS SQARSMNTGELFF GEG	2-2*01	
EGR	8-6*02 CAV KYGQNFVF GPG	26*01	4-1*01	CAS SQAQKGGRLGDTEAFF GQG	1-1*01	

Die TCR α - und β -Ketten dieser beiden Spezifitäten wurden jeweils in das retrovirale Vektorplasmid pMP71Gpre kloniert. Die HHV6-spezifischen TCR-Gene wurden durch retroviralen Transfer in J76CD8-T-Zellen gebracht, welche die humane CD8 α -Kette, jedoch keinen humanen TCR exprimieren. Diese T-Zelllinie eignet sich besonders gut zur Expressionsanalyse der eingebrachten TCRs, da das Konkurrieren mit endogenen T-Zellrezeptoren umgangen wird. Allerdings sei erwähnt, dass diese Zellen für funktionelle TCR-Analysen weniger geeignet sind, da sie weder zytotoxisch reagieren noch antigenspezifisch Zytokine sezernieren. Wie der Abbildung 5.3.16 zu entnehmen ist, wurden EGR- und QTR-spezifische TCRs nach retroviralem Gentransfer auf J76CD8-Zellen exprimiert und konnten durch spezifische Peptid/HLA-Multimerfärbung nachgewiesen werden. Die transgene Expression beider TCRs lag in einer ähnlichen Größenordnung wie die als Positivkontrolle ermittelte GFP-Expression nach retroviralem Gentransfer von GFP, beide TCRs ließen sich also effizient exprimieren. In zukünftigen Experimenten wird getestet werden, ob der Transfer dieser TCRs in funktionelle T-Zellen auch zur Übertragung der Spezifität gegen HHV-6-infizierte Zellen führt. Sollte sich dies wie erwartet bestätigen, wären diese beiden TCRs interessante Kandidaten für eine therapeutische Anwendung.

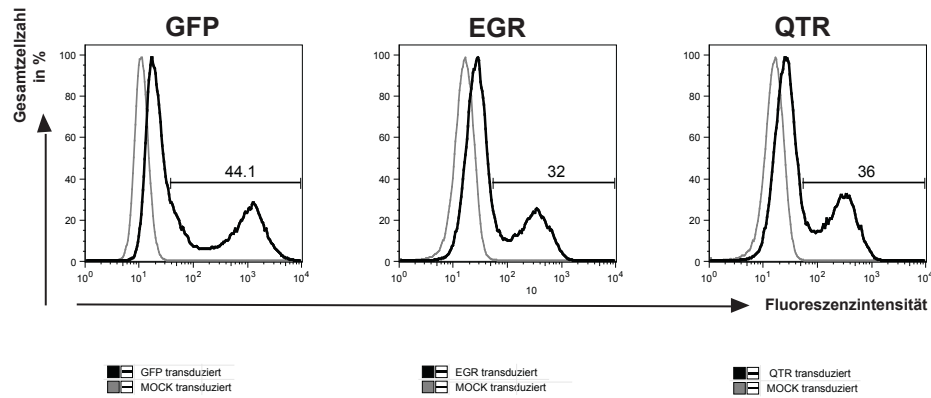


Abbildung 5.3.16: Transfer zweier HHV-6-spezifischer TCRs in die T-Zelllinie J76CD8. Mittels retroviralem Transfer wurden die zwei HHV-6-spezifischen TCRs EGR und QTR in J76CD8-Zellen exprimiert. Die Expressionanalyse erfolgte 4 Tage nach Transfer durch Färbung mit dem entsprechenden Peptid/HLA-Multimer (dicke Linie). Als Negativkontrolle dienten mock-transduzierte Zellen, die durch Färbung mit dem selben Multimer (dünne Linie) analysiert wurden. Als Positivkontrolle diente der retrovirale Gentransfer von GFP.

5.3.9 Antigenexpression im Verlauf der HHV-6B-Infektion in vitro

Um besser zu verstehen, wie die HHV-6B-Infektion in primären CD4⁺-T-Zellen in vitro verläuft, und die biologischen Hintergründe für die oben beschriebenen T-Zellerkennungskinetiken näher zu analysieren, wurde die Expression viraler Antigene in infizierten Zellen mit fünf kommerziell erhältlichen Antikörpern unterschiedlicher Spezifität im Dot Plot getestet. Diese fünf Antikörper wurden aus der Vielzahl kommerziell erhältlicher monoklonaler Antikörper ausgewählt, weil für sie ein Mindestmaß an Dokumentation ihrer Antigen-spezifität von Herstellerseite verfügbar war, und ein Teil dieser Antikörper bereits in der Literatur beschrieben war (Lautenschlager et al, 1998; Savolainen et al, 2005; Tuddenham et al, 2012). Für die Analyse wurden HHV-6B-infizierte Zellen und Lysate dieser Zellen eingesetzt. Ein besonders klares spezifisches Signal, insbesondere im Lysat infizierter Zellen, ergab sich für gp60/110 und das 101kD-Glykoprotein U11 (Abb. 5.3.17). Die Expression des Kernproteins p41 und des Glykoproteins gp82/105 konnten ebenfalls nachgewiesen werden, allerdings mit geringerer Deutlichkeit, nicht aber die Expression des Glykoproteins gp116/64/54. Der gp82/105-spezifische Antikörper wurde gegen HHV-6A generiert, das vorliegende Experiment weist auf eine Kreuzreaktivität dieses Antikörpers mit HHV-6B hin. Von besonderem Interesse war der klare Nachweis von gp60/110, weil dieses Glykoprotein als einziges HHV-6-Antigen auf der Zelloberfläche von infizierten dendritischen Zellen bereits nachgewiesen wurde (Bertelsen et al, 2010). Daher wurde im folgenden die Expression dieses Antigens auf der

Oberfläche infizierter CD4⁺-T-Zellen mittels Durchflusszytometrie näher untersucht (Abb. 5.3.18).

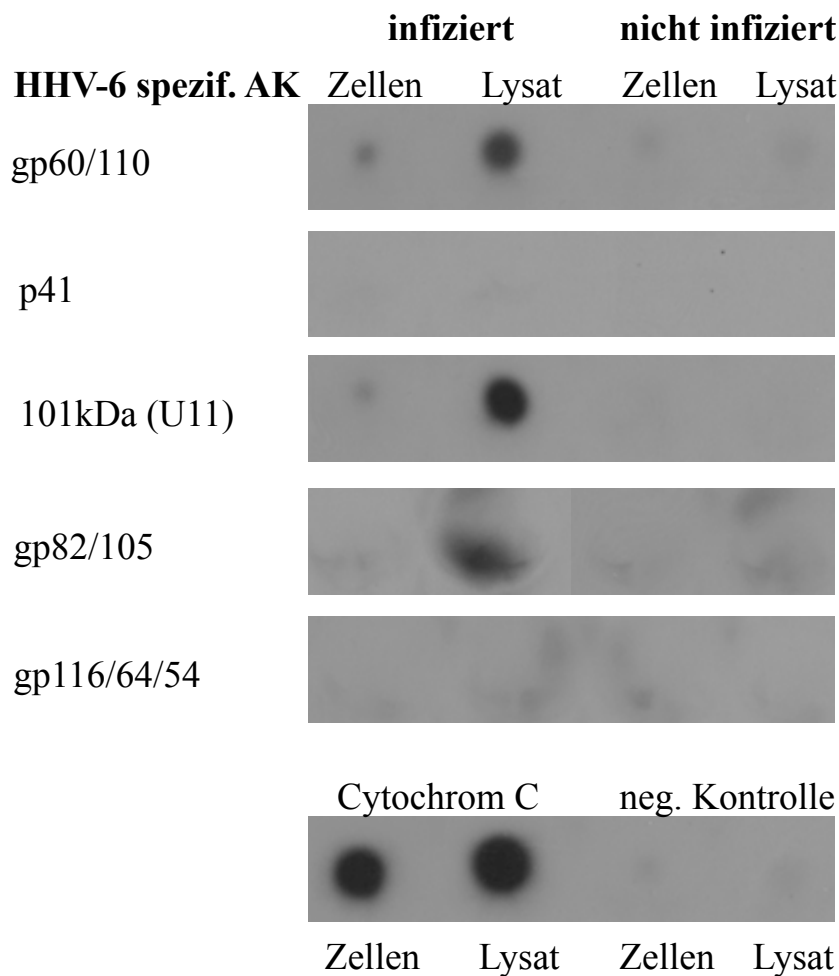


Abb. 5.3.17 Detektion von HHV-6B-Antigenen in infizierten CD4⁺-T-Zellen. Zellen bzw. Zelllysate HHV-6B-infizierter PHA-stimulierter CD4⁺-T-Zellen wurden an Tag 6 nach Infektion mit Hilfe der HHV-6-spezifischen Antikörper gp60/110, 101kDa, p41, gp 82/105 und gp116/64/54 im Dot Plot analysiert. Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Zellen bzw. nur der sekundäre Antikörper verwendet. Als Positivkontrolle diente ein Cytochrom-c-spezifischer Antikörper.

Alle fünf Antikörper wurden auch in einer durchflusszytometrischen Färbung mit HHV-6B-infizierten Zellen getestet. Vier der fünf Antikörper ergaben keine Färbung von spezifischem Antigen an der Zelloberfläche (nicht gezeigt). Der Antikörper gegen gp60/110 ergab eine spezifische Färbung, die bei permeabilisierten und nicht permeabilisierten Zellen ähnlich intensiv war. Daher wurde dieser Antikörper für eine Analyse infizierter Zellen im Zeitverlauf der Infektion ausgewählt.

Dazu wurden die PBMCs aus Leukozytenkonzentraten nach CD4+-Separation und drei Tagen PHA-Behandlung mit dem Virusstamm HST (HHV-6B) infiziert. An verschiedenen Tagen (1,2,3,4,5,6,9 und 12) nach Infektion wurden infizierte und nicht infizierte Zellen mit dem HHV-6 spezifischen Antikörper gp60/110 bzw. der Isotypkontrolle (IgG_{2b}) gefärbt.

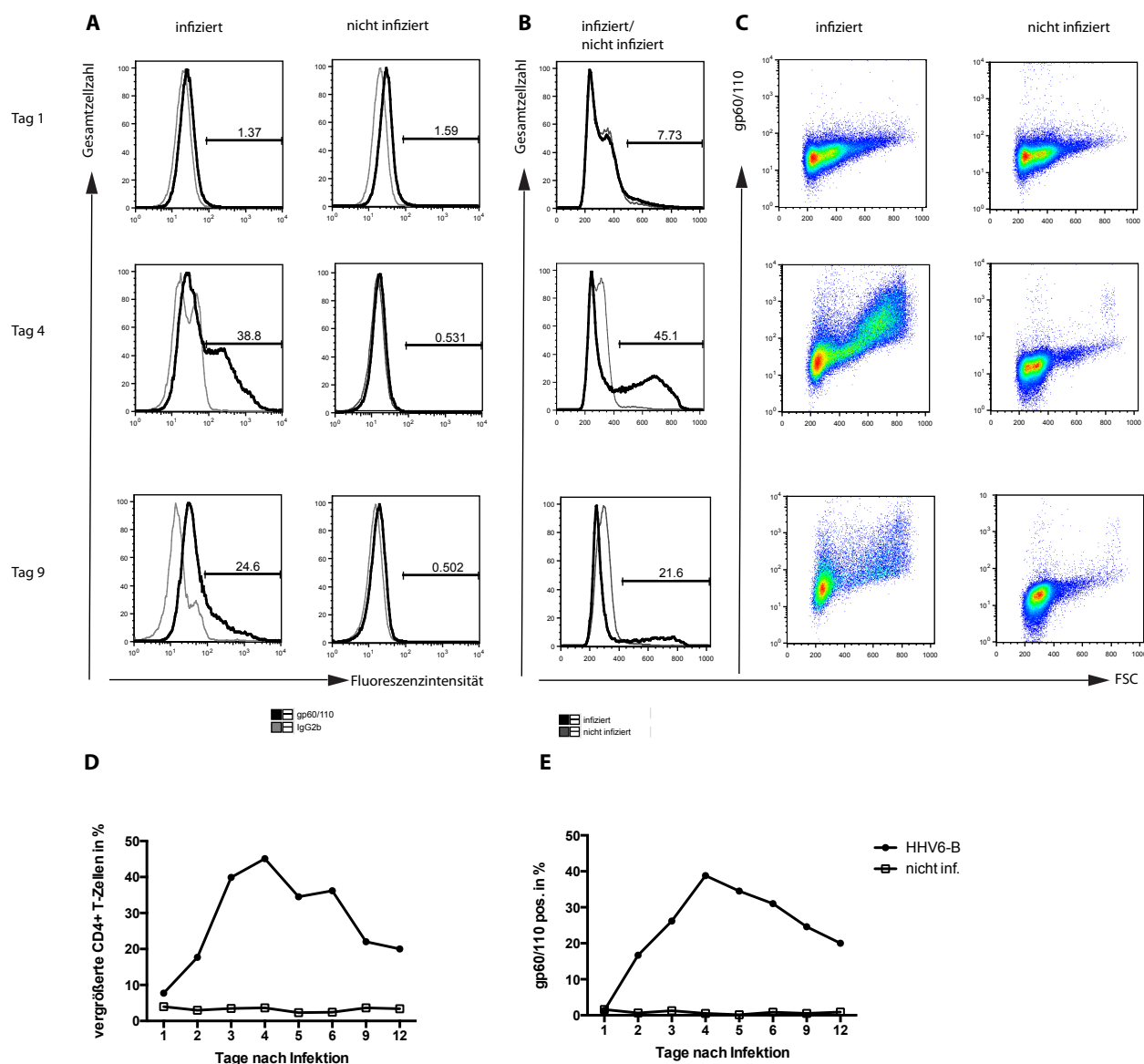


Abb. 5.3.18 Analyse von HHV-6B(HST)-infizierte CD4+-T-Zellen im zeitlichen Verlauf. Isolierte CD4+-T-Zellen aus Leukozytenkonzentraten wurden nach 3-tägiger PHA-Stimulation mit HHV-6B(HST) infiziert. Der Verlauf der Infektion wurde mit dem HHV-6-spezifischen Antikörper gp60/110 an den Tagen 1,2,3,4,5,6,9 und 12 im Durchflusscytometer verfolgt. Als Kontrolle dienten nicht infizierte CD4+-T-Zellen. Dargestellt ist die Expression von gp60/110 auf infizierten Zellen an Tag 1, 4 und 9 nach Infektion (**A,C**) und im gesamten Untersuchungszeitraum (**D**). Parallel dazu ist die Vergrößerung (ablesbar als Vorwärtstreuung, FSC) der infizierten CD4+-T-Zellen an Tag 1, 4 und 9 nach Infektion (**B**) oder im Verlauf der Infektion gezeigt. (**D**)

In Abbildung 5.3.18 sind ausgewählte Zeitpunkte nach Infektion gezeigt. Bereits an frühen Tagen nach Infektion war eine Expression von gp 60/110 im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle nachweisbar. Die Expression von gp60/110 nahm von Tag 1 (<2% positive Zellen) über Tag 2 (ca. 18 %) bis hin zu Tag 4 (ca. 40 % positive Zellen) stark zu, anschließend wieder ab (Abb. 5.3.18 A, E).

Parallel dazu wurde die Vergrößerung der infizierten Zellen für dieselben Zeitpunkte untersucht (Abb. 5.3.18 B, D). Die Größenzunahme verlief annähernd parallel zur gp60/110 Expression und durchlief ebenfalls an Tag 4 ein Maximum. Die zweidimensionale Auftragung von gp60/110-Färbung und Vorwärtsstreuung zeigte, dass zu diesem Zeitpunkt die beiden Parameter weitgehend korrelierten, durch Infektion wurde also eine Population von stark vergrößerten, gp60/110-positiven Zellen induziert. Der Zeitverlauf dieser Infektionsparameter korrelierte als nicht streng mit der T-Zellerkennung HHV-6B-infizierter Zellen (vgl. Abb. 5.3.10 und 5.3.11), die für die meisten Antigene erst an Tag 6 ein Maximum erreichte. Ein möglicher Grund für diese Verzögerung ist die für die Antigenprozessierung und MHC-Beladung benötigte zusätzliche Zeit. Diese Prozesse werden möglicherweise vom Virus durch noch nicht bekannte Mechanismen verzögert.

5.3.10 Untersuchung der Transkriptionsniveaus verschiedener HHV-6B-Gene in infizierten Zellen

Die Expression weiterer HHV-6-Gene, die für T-Zell-Antigene codieren, wurde durch quantitative Analyse ihrer mRNAs im zeitlichen Verlauf der Infektion von CD4⁺-T-Zellen durch real-time RT-PCR untersucht. Zur Standardisierung diente das Gen der beta-Glucuronidase (GUSB), die als konstant exprimiertes Referenzgen anerkannt ist (Radonic et al, 2004).

Abbildung 5.3.19 zeigt die Ergebnisse dieser Analysen für die Gene U38, U41 und U79, die alle eine Funktion bei der viralen DNA-Replikation haben und bei denen daher eine frühere Expression zu erwarten ist, und für die drei späten Gene U11, U54 und U31, die für Tegumentproteine codieren.

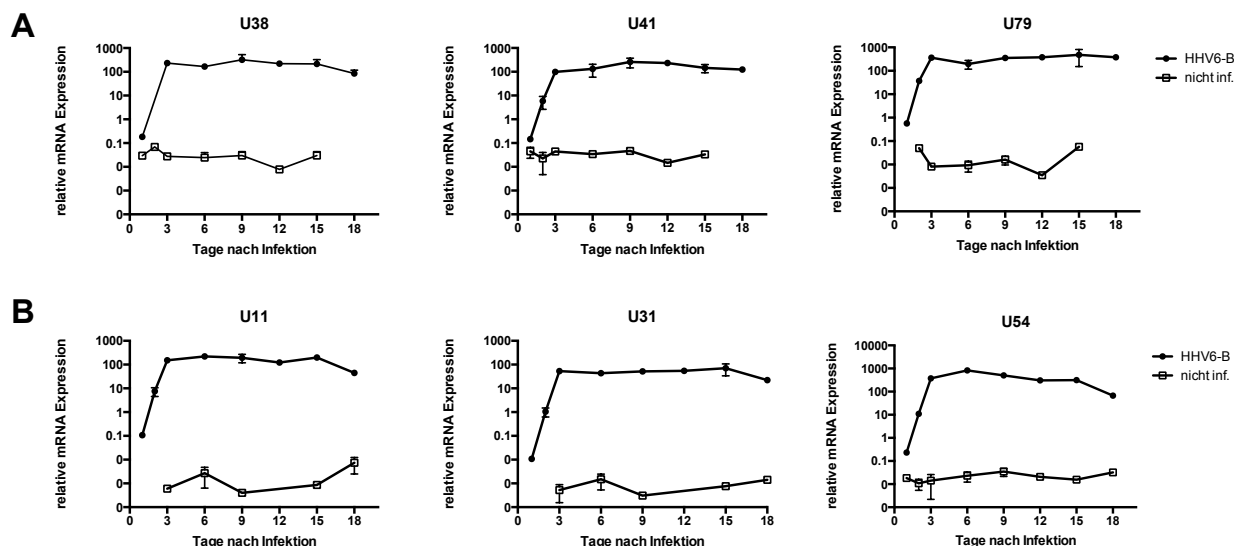


Abb. 5.3.19 mRNA-Expression verschiedener HHV-6B-Antigene im zeitlichen Verlauf der Infektion von CD4+-T-Zellen. (A) mRNA-Expression der Gene U38, U41 und U79, deren Produkte an der DNA-Replikation beteiligt sind. (B) mRNA-Expression der Gene U54, U11 und U31, die für Tegumentproteine codieren. Die mRNA-Expression wurde jeweils durch quantitative Real-time-RT-PCR ermittelt. Zur Standardisierung diente das Expressionsniveau der beta-Glucuronidase (GUSB). Angegeben ist jeweils der Mittelwert aus Triplikaten. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Wie Abb. 5.3.19 zeigt, ergab sich für die sechs HHV-6B-Gene ein sehr ähnlicher zeitlicher Verlauf der mRNA-Expression: ein starker Anstieg bis Tag 3, gefolgt von einem langanhaltenden Plateau. Nur für U79, das einzige dieser Gene, das als immediate-early beschrieben wurde, wurde ein etwas früherer Anstieg der mRNA beobachtet als für die anderen Gene. Insgesamt wird jedoch die erwartete unterschiedliche Expressionskinetik der viralen Gene (Oster & Hollsberg, 2002; Tsao et al, 2009) in dieser Analyse nicht deutlich wiedergespiegelt. Eine genauere Analyse in den ersten Stunden und Tagen der Infektion hätte hier vermutlich größere Unterschiede ergeben. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Analyse der infizierten Zellkultur nicht den Ablauf eines einzigen viralen Replikationszyklus widerspiegelt, sondern dass mehrere Replikationszyklen hintereinander durchlaufen werden, bis die maximale beobachtete Genexpression erreicht wird. Dies entspricht vermutlich einem Zustand, in dem alle suszeptiblen CD4+-T-Zellen infiziert sind. Das Experiment zeigt, dass die viralen mRNA-Expressionsniveaus nicht zeitgleich mit der Intensität der spezifischen T-Zellerkennung verschiedener Antigene korrelieren (vgl. Abb. 5.3.10 und 5.3.11), sondern dass die T-Zellerkennung gegenüber der Transkription des Antigens in der Regel verzögert ist.

5.3.11 Analyse der Häufigkeiten von HHV-6-spezifischen T-Zellen im Blut gesunder Virusträger

Frühe Untersuchungen zur Häufigkeit von HLA-A*0201-restringierten HHV-6-spezifischen T-Zellen haben gezeigt, dass diese im peripheren Blut gesunder Spender weit seltener sind als andere Herpesvirus-spezifische T-Zellen (Schub, 2009).

Um nun die Häufigkeit von HLA-B*0801-restringierten HHV-6-spezifischen T-Zellen zu bestimmen, wurden PBMCs von 9 HLA-B*08-positiven Spendern untersucht. Darunter war ein B*0801-positiver, HHV-6-seropositiver Laborspender (TW). Acht Proben waren Leukozytenkonzentrate von anonymen erwachsenen Spendern, deren HLA-Typ nur niedrig aufgelöst bekannt war (HLA-B*08). Da 95%-100% der Erwachsenen HHV-6-Träger sind (Aberle et al, 1996) und 99.9% der B*08-positiven Personen in Deutschland das Allel B*0801 tragen (Schmidt et al, 2009), bestand auch bei diesen Spendern eine sehr hohe Wahrscheinlichkeit für ihren Status als B*0801-positiver HHV-6-Virusträger. Für die Färbungen wurde jeweils 1 Million PBMCs in separaten Ansätzen mit 13 verschiedenen Multimeren bei gleichzeitiger Färbung von CD8-Oberflächenantigen analysiert. Bei diesen 13 Pentameren handelte es sich um die ersten 11 im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten HHV-6B-Epitope und je eine Variante von zwei dieser Epitope (TNK, EGR) entsprechend der Sequenz von HHV-6A (siehe Tab. 5.3.8 S.85).

Abbildung 5.3.20 zeigt beispielhaft die detaillierte Analyse für zwei Spender, Abbildung 5.3.21 die Zusammenstellung der Häufigkeiten von HHV-6-spezifischen HLA-B*0801-restringierten T-Zellen im peripheren Blut für alle Spender.

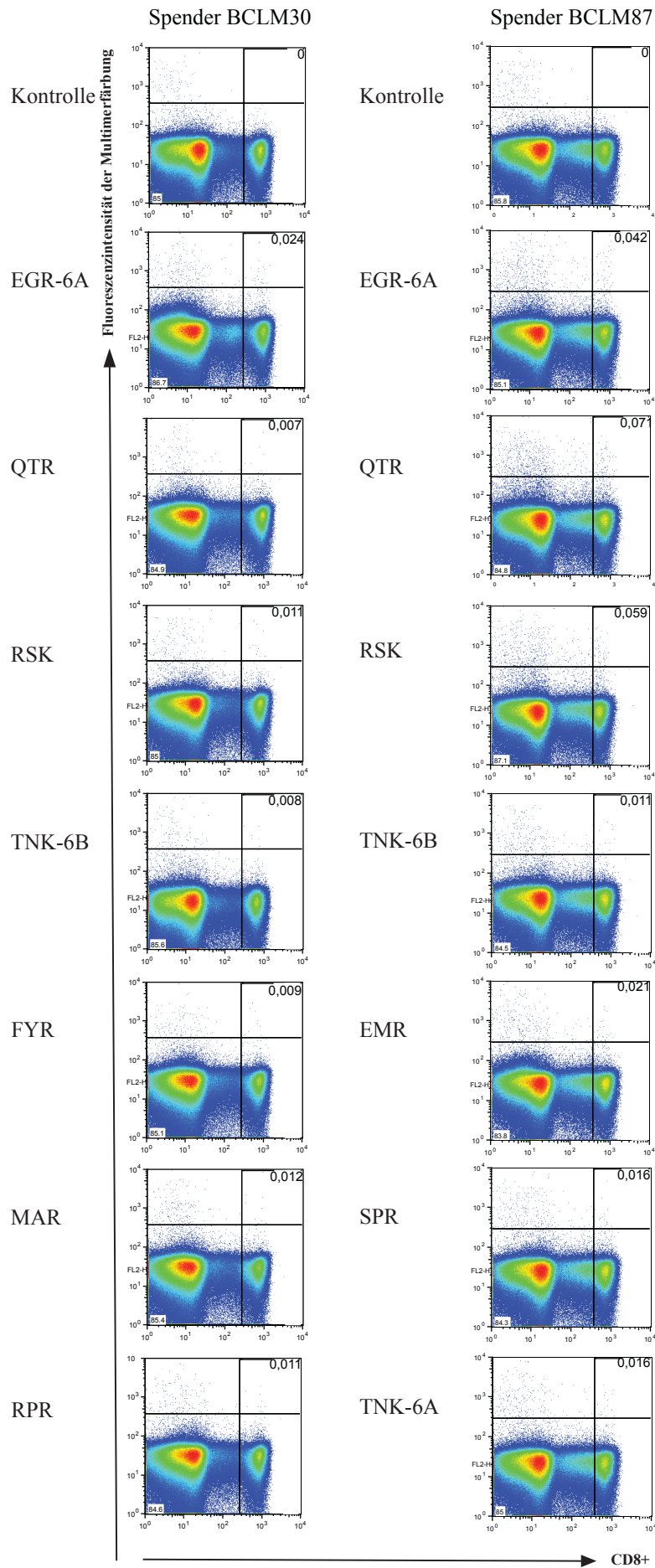


Abbildung 5.3.20: Analyse der Häufigkeit von HHV-6-spezifischen T-Zellen in Blut von gesunden Spendern. PBMCs der Spender BCLM30 und BCLM87 wurden mit Hilfe des entsprechenden Peptid/HLA-Multimers (EGR-6A, QTR, RSK, TNK-6B, FYR, MAR, RPR, SPR, TNK,6A) und anti-CD8-Antikörpers gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle wurde die Färbung ohne Zugabe des Multimers durchgeführt.

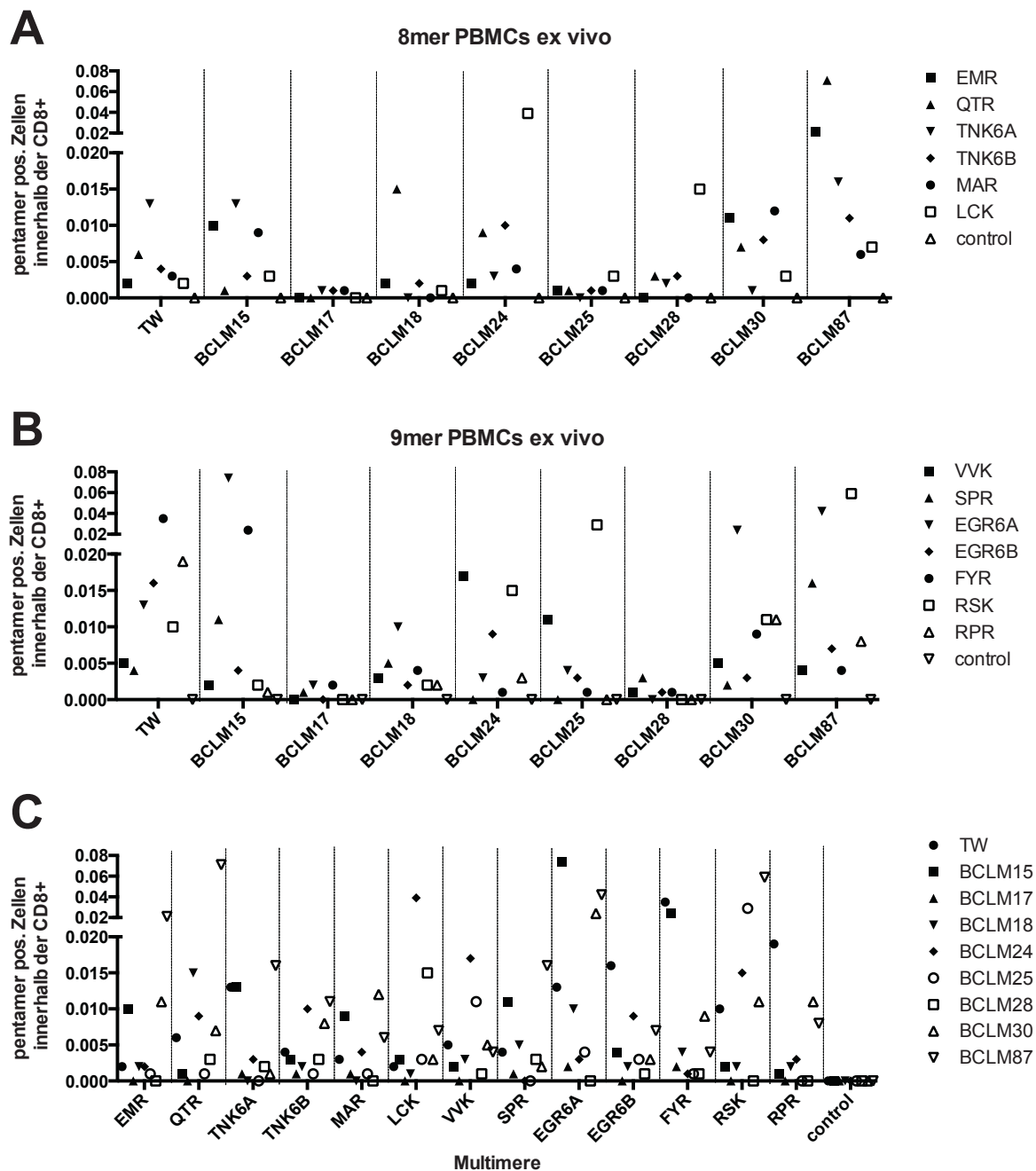


Abb. 5.3.21: Analyse der Häufigkeiten der HHV-6-spezifischer Zellen in primären peripheren T-Zellen von gesunden Spendern

HHV-6-spezifische T-Zellen in PBMCs wurden mit Hilfe des entsprechenden Peptid/HLA-Multimers und anti-CD8- Antikörpers gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle wurde die Färbung ohne Zugabe des Multimers durchgeführt. (A) zeigt die Analyse der „8mer“-Multimere, (B) die der „9mer“-Multimere jeweils geordnet nach Spendern (TW, BCLM XX). (C) zeigt die Zusammenfassung aller Färbungen und Spender geordnet nach Epitopen (vgl.S.85).

Bei 8 der 9 Spender konnten für je mindestens ein Epitop HHV-6-spezifische T-Zellen in einer Häufigkeit von $\geq 0.01\%$ der CD8+-T-Zellen detektiert werden. Bei 4 der 9 Spender gab es je mindestens eine Epitopspezifität, die $\geq 0.07\%$ der CD8+-T-Zellen ausmachte. Keine

epitopspezifische T-Zellpopulation überstieg eine Häufigkeit von 0.10% im CD8+-T-Zell-Kompartiment. Bei verschiedenen Spendern traten jeweils unterschiedliche Spezifitäten besonders hervor. Damit sind die Häufigkeiten der hier untersuchten HHV-6-Spezifitäten höher als die der zuvor untersuchten HLA-A*0201-restringierten T-Zellen (Abb. 5.1.4, S.61), jedoch deutlich geringer als die Häufigkeiten von HLA-B*0801-restringierten CMV- bzw. EBV-spezifischen T-Zellen bei Trägern dieser Viren (Elkington et al, 2003; Tan et al, 1999). Im Gegenzug enthält die HHV-6-spezifische T-Zellantwort eine größere Zahl von Epitopen, als bisher für EBV oder CMV gezeigt werden konnte. Insgesamt ist festzustellen, dass sich ein breites Spektrum HLA-B*0801-restringierter HHV-6-spezifischer T-Zellen nachweisen lässt, wobei keine bestimmten Epitope als besonders immundominant hervortreten. Die T-Zellantwort gegen HHV-6 erscheint also breiter und weniger von Immundominanz geprägt als die T-Zellantwort gegen andere Herpesviren.

Da die Häufigkeiten von HLA-B*0801-restringierten HHV-6-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut für einen Teil der Spezifitäten gering waren, womit sich für diese Epitope die Frage der Nachweisgrenze stellte, wurde im folgenden untersucht, ob sich diese HHV-6-spezifischen T-Zellen nach einer Peptidstimulation in Kurzzeitkultur besser detektieren lassen.

Hierzu wurden PBMCs aus Leukozytenkonzentraten anonymer erwachsener B*08-positiver Spender (HHV-6-Status wie auch zuvor beschrieben unbekannt) in einer Kurzzeitkultur für 11 Tage mit ausgewählten HHV-6-Peptiden stimuliert. Pro Spender wurden 2 getrennte Linien angesetzt, wobei eine Linie mit dem HHV-6-spezifischen Peptiden EMR, QTR, TNK6A, TNK6B, MAR und LCK (8mere), die andere Line mit den Peptiden VVK, SPR, EGR6A, EGR6B, FYR, RSK, und RPR (9mere) stimuliert wurde. Zusätzlich wurde IL-2 als Wachstumsfaktor hinzugegeben. Nach 11 Tagen wurde die Häufigkeit HLA-B*0801-restringierter HHV-6-spezifischer T-Zellen mittels Multimer-Färbungen analysiert.

Wie der Abbildung 5.3.22 zu entnehmen ist, liegen die Häufigkeiten für die meisten Spezifitäten unterhalb 0.05%. Jedoch ist hervorzuheben, dass bei 5 von 10 Spendern einzelne Spezifitäten mit mehr als 0,1% nachgewiesen werden konnten. So konnte QTR-spezifische T-Zellen mit einer Häufigkeit von 0.55% für den Spender BCLM80 detektiert werden. Die größte Population an HHV-6-spezifischen T-Zellen zeigt Spender BCLM79 mit einer Frequenz von 1.7% EGR6B-spezifischen T-Zellen. Dies entspricht 1500 Zellen. Insgesamt bestätigten auch diese Ergebnisse aus den Kurzzeitstimulationen den Befund einer breit angelegten HHV-6-spezifischen T-Zellantwort.

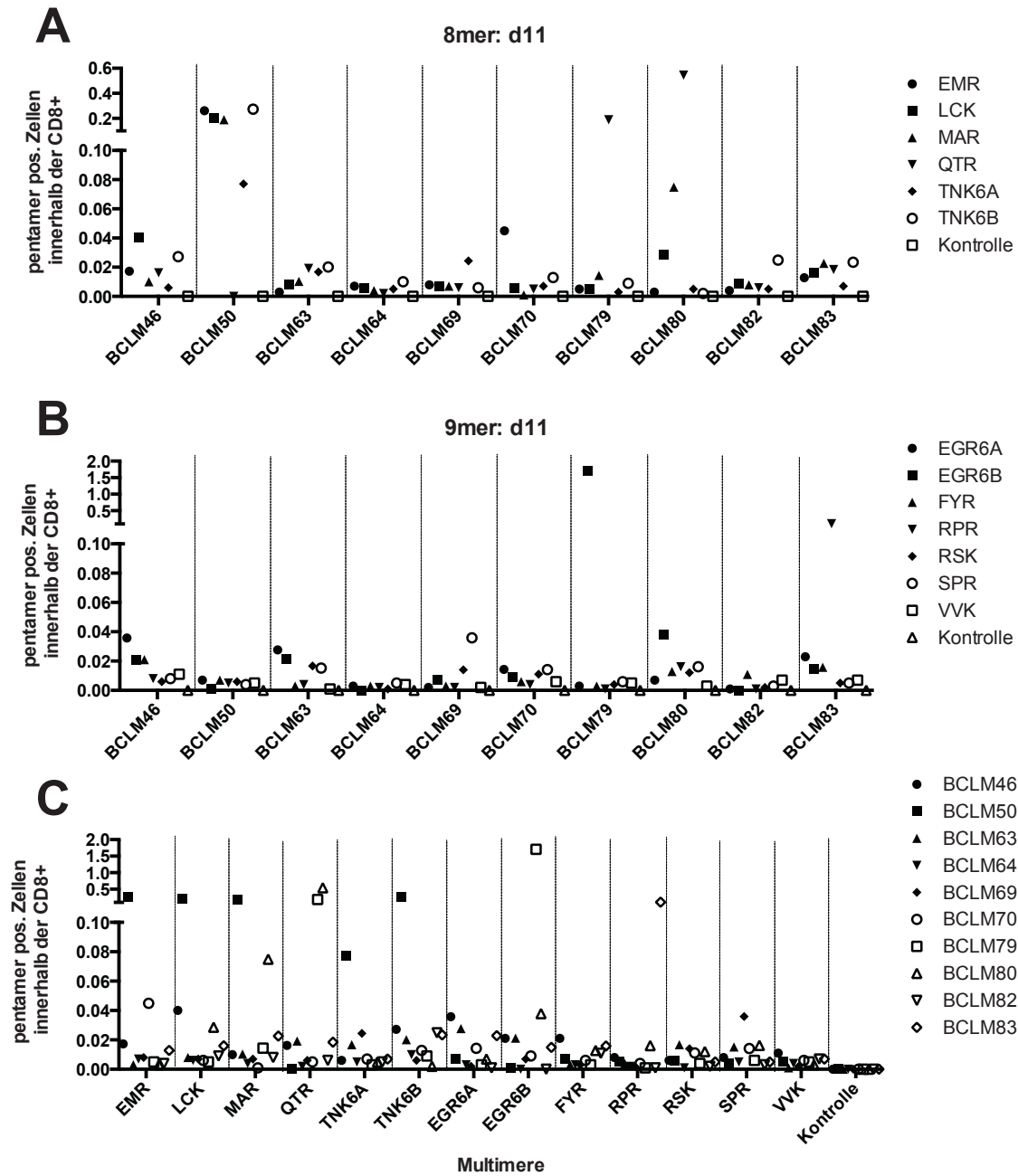


Abb. 5.3.22 Analyse der Häufigkeiten der HHV-6-spezifischer Zellen in Kurzzeitlinien von gesunden Spendern

HHV-6-spezifische T-Zellen in PBMCs wurden nach 11 Tage Stimulation mit HHV-6-spezifischen 8meren (EMR, QTR, TNK6A, TNK6B, MAR und LCK) bzw. 9meren (VVK, SPR, EGR6A, EGR6B, FYR, RSK, und RPR) mit Hilfe des entsprechenden Peptid/HLA-Multimers und anti-CD8-Antikörpers gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle wurde die Färbung ohne Zugabe des Multimers durchgeführt. (A) zeigt die Analyse der „8mer“-Multimere, (B) die der „9mer“-Multimere jeweils geordnet nach Spender (TW, BCLM XX). (C) zeigt die Zusammenfassung aller Färbungen und Spender geordnet nach Epitopen (vgl. S.85).

5.3.12 Häufigkeiten der HHV-6-spezifischen Zellen in Adenoiden

HHV-6-spezifische T-Zellen könnten in anderen Geweben eine höhere Häufigkeit haben als in peripherem Blut. Ein mögliches Zielorgan der HHV-6-Latenz und Replikation könnten sekundäre lymphoide Organe sein, und hier könnten sich auch antigenspezifische T-Zellen bevorzugt finden. Darüber hinaus könnte sich das HHV-6-spezifische T-Zellrepertoire von Kindern und Erwachsenen unterscheiden. Um diese Hypothesen zu testen, wurde Material aus Adenoidektomien von Kindern im Alter von 3 bis 9 Jahren auf HHV-6-spezifische T-Zellen untersucht. Allerdings war der HHV-6-Status dieser Kinder unbekannt. Da HHV-6 meist in den ersten beiden Lebensjahren erworben wird (Zerr et al, 2005), war es wahrscheinlich, dass die meisten Spender HHV-6-positiv waren. Da die Spender nicht HLA-typisiert waren, wurden zunächst frisch isolierte Lymphozyten aus Adenoidmaterial verschiedener Spender auf die Expression von HLA-B*08 hin untersucht. Mononukleäre Zellen aus 4 positiv getesteten Adenoiden konnten HHV-6-spezifischen HLA/Peptid-Multimeren gefärbt werden (Abb. 5.3.23). Im Vergleich zu Blutproben erwachsener Spender ist zunächst festzustellen, dass die T-Zellhäufigkeit in den von uns untersuchten Adenoiden im Durchschnitt deutlich höher war (die medianen Häufigkeiten einzelner Epitopspezifitäten lagen um 0,05% der CD8+-T-Zellen). Eine gemeinsame dominante Spezifität für alle Spender wurde, wie auch bei den Blutproben, nicht nachgewiesen, sondern je nach Spender rückten einzelne Spezifitäten in den Vordergrund. Die Häufigkeitsverteilung bei den verschiedenen Spendern war unterschiedlich: Spender Ad11 zeigte für die meisten analysierten Epitope höhere Häufigkeiten als die anderen drei Spender. Die höchste Häufigkeit für eine einzelne Spezifität wurde jedoch bei Spender Ad22 gemessen, der/die 0.17% EGR6B-spezifische T-Zellen aufwies. Diese Ergebnisse zeigen, dass HHV-6-spezifische CD8+-T-Zellen in Adenoiden von Kindern in geringfügig höherer Häufigkeit vorkommen als in peripherem Blut von Erwachsenen. Einzelne Spender (hier Ad11) haben gegenüber anderen Spendern erhöhte Zahlen solcher T-Zellen. Die Analyse einer größeren Zahl von Proben wird zeigen, ob sich diese Befunde bestätigen. Es wäre interessant, zu testen, ob diese höheren Zahlen mit einem veränderten Status der Infektion des Gewebes mit HHV-6 einhergehen, dies könnte durch DNA- und mRNA-Analysen näher untersucht werden.

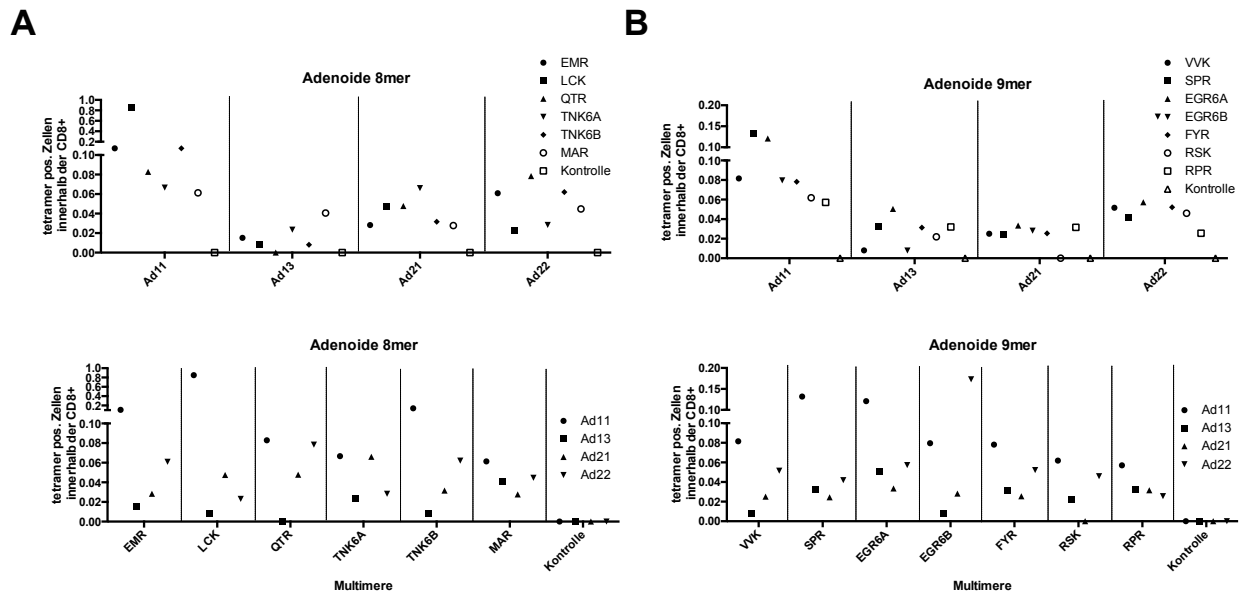


Abb. 5.3.23 Analyse der Häufigkeiten der HHV-6-spezifischer Zellen in Adenoiden von Kindern im von 3 bis 9 Jahren. HHV-6-spezifische T-Zellen in PBMCs in Adenoiden von Kindern im Alter zwischen 3 und 9 Jahren wurden mit Hilfe des entsprechenden Peptid/HLA-Multimers und anti-CD8-Antikörpers gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle wurde die Färbung ohne Zugabe des Multimers durchgeführt. **(A)** zeigt die Analyse der „8mer“-Multimere, **(B)** die der „9mer“-Multimere jeweils geordnet nach Spendern bzw. Epitopen.

6. Diskussion

Wie auch die anderen Herpesviren persistiert HHV-6 nach der Primärinfektion lebenslang im Organismus. Im Allgemeinen verläuft die Infektion mit HHV-6 bei Immunkompetenten relativ harmlos (Caselli & Di Luca, 2007). Jedoch kommt es in Phasen der Immunsuppression, beispielsweise nach einer Knochenmarks- oder Organtransplantation, zu Reaktivierungen von HHV-6 (vor allem von HHV-6B), die mit schweren Erkrankungen einhergehen können (Hentrich et al, 2005). Dazu zählen zum Beispiel Enzephalitis (Drobyski et al, 1994; Singh & Paterson, 2000), interstitielle Pneumonitis (Cone et al, 1993) und Knochenmarksunterdrückung (Carrigan & Knox, 1994).

Gesunde Menschen tragen häufig eine Reihe persistierender Viren, die unter Immunsuppression reaktivieren können, wie beispielsweise die Herpesvirus Familienmitglieder Epstein-Barr-Virus (EBV) und Cytomegalovirus (CMV) (Moss & Rickinson, 2005). Es wird angenommen, dass diese Viren unter permanenter Kontrolle von Antigen-spezifischen T-Zellen stehen und virale Reaktivierung aus einem Mangel an virusspezifischen T-Zellen beispielsweise durch therapiebedingte Immunsuppression resultiert (Moss & Rickinson, 2005). In der Vergangenheit hatte man jedoch Zweifel, ob spezifische T-Zellen eine ähnlich wichtige Rolle bei der Kontrolle der HHV-6-Infektion spielen. Gründe für solche Zweifel lieferten die biologischen Eigenschaften des HHV-6. Dieses Virus hat in vitro ein Repertoire von immunsuppressiven Funktionen (Lusso, 2006), die möglicherweise die Entwicklung oder die Funktion einer solchen T-Zellantwort in gesunden Trägern oder Patienten stören könnte. Diese immunmodulierenden Effekte beinhalten die direkte Infektion und Lyse von T-Zellen (Lusso et al, 1988), die funktionelle Hemmung von T-Zellen (Flamand et al, 1995) und die Hemmung von antigenpräsentierenden Zellen (Smith et al, 2003). Aus diesen genannten Gründen bestanden Zweifel, ob virusspezifische T-Zellen dazu beitragen können, eine HHV-6-Infektion und Replikation zu kontrollieren.

Das häufige Auftreten und die Schwere von HHV-6-Reaktivierungen bei Patienten mit einer Schwäche in der zellulären Immunität, beispielsweise nach Transplantationen, führt jedoch vor Augen, dass die zelluläre Immunantwort bei der Kontrolle von HHV-6 durchaus eine Rolle spielt. Nach Infektionen mit den Herpesviren EBV und CMV kommt es zur Ausbildung einer ausgeprägten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellantwort, die in immunkompetenten Personen einen lebenslangen Schutz vor EBV- bzw. CMV-assoziierten Erkrankungen bietet (Moss & Rickinson, 2005). Ein ähnlicher Zusammenhang zwischen Infektion und Kontrolle ist auch bei HHV-6

vorstellbar. Bei Reaktivierung anderer Herpesviren wie EBV und CMV kommt als Alternative zur Standardtherapie die zelluläre Therapie (Moss & Rickinson, 2005) zum Einsatz. Dieser adoptive Transfer von virusspezifischen T-Zellen hat sich in der Vergangenheit als wirksames Instrument für die Behandlung von herpesviralen Komplikationen erwiesen (Cobbold et al, 2005; Moosmann et al, 2010; Rooney et al, 1998). Allerdings reicht der momentane Kenntnisstand über die HHV-6-spezifische zelluläre Immunität nicht aus, um eine derartige Therapie zu verwirklichen.

HHV-6 und Multiple Sklerose

Insbesondere die beiden Herpesviren EBV und HHV-6 wurden in letzter Zeit mit der Entstehung von Multipler Sklerose in Verbindung gebracht. Falls tatsächlich ein kausaler Zusammenhang zwischen herpesviraler Infektion und MS-Erkrankung besteht, dann ist zu erwarten, dass auch die virusspezifische T-Zellantwort auf die Erkrankung einen Einfluss hat. Welcher Art dieser Einfluss sein könnte, ist jedoch noch unklar. Es könnte sich je nach mechanistischer Vorstellung um einen positiven oder negativen Einfluss handeln. Zum einen wäre vorstellbar, dass Spender, die ihre Primärinfektion effizient mit Hilfe virusspezifischer T-Zellen kontrollieren und daher bei der Primärinfektion auch nicht erkranken, auch später gegen unerwünschte Folgen der Infektion generell besser geschützt sind. Andererseits könnte die Immunreaktion gegen das Virus selbst eine pathogene Rolle spielen, entweder weil am Ort der antiviralen Reaktion durch "Bystander"-Aktivierung schädliche autoreaktive T-Zellen induziert werden, oder weil virusspezifische T-Zellen selbst gegen Autoantigene kreuzreagieren könnten (Duke, 1989; Fujinami et al, 2006; Wucherpfennig, 2001). Sowohl für EBV als auch HHV-6 wurden solche kreuzreaktiven CD4⁺-T-Zellen in der Literatur beschrieben, in beiden Fällen ist ihre pathologische Rolle in vivo jedoch rein spekulativ, und es ist auch nicht bekannt, ob diese T-Zellen das Autoantigen unter physiologischen Bedingungen der Antigenpräsentation überhaupt erkennen können (Lunemann et al, 2008b; Tejada-Simon et al, 2003). Für EBV ist auch beschrieben, dass EBNA-1-spezifische T-Zellen bei MS-Patienten generell höhere Häufigkeiten haben (Lunemann et al, 2008a), für das HHV-6-Antigen U11 wurde allerdings das Gegenteil postuliert (Tejada-Simon et al, 2003). Insbesondere für HHV-6 sind hier jedoch detaillierte Analysen notwendig, da die einzigen beiden Studien zum Thema der Rolle HHV-6-spezifischer T-Zellen bei MS (Tejada-Simon et al, 2002; Tejada-Simon et al, 2003) nur die T-Zellantwort gegen zwei von ca. 104 HHV-6-Antigenen adressieren und in beiden Fällen die beschriebenen

T-Zellspezifitäten hart an der Nachweisgrenze des verwendeten Proliferations-Nachweistests liegen (im Bereich $1/10^6$) und sie möglicherweise bei den meisten untersuchten Spendern unterschreiten (Tejada-Simon et al, 2002; Tejada-Simon et al, 2003).

HHV-6-spezifische T-Zellen

Neben den bereits gezeigten Studien gibt es derzeit nur 3 weitere, in denen Zielantigene der HHV-6 spezifischen Immunantwort identifiziert wurden (Gerdemann et al, 2013; Martin et al, 2012; Nastke et al, 2012). Alle diese Arbeiten sind erst in jüngster Zeit erschienen, obwohl bereits Anfang der 90 Jahre der Nachweis über die Existenz HHV-6-spezifischer T-Zellen erbracht wurde.

In drei Studien Anfang der 90er Jahre ist es bereits gelungen, HHV6-spezifische CD4⁺-T-Zellen innerhalb mononukleärer Zellen des peripheren Blutes von gesunden HHV-6-positiven Spendern durch Stimulation mit einem Lysat HHV-6-infizierter Zellen anzureichern und zu analysieren (Yakushijin et al, 1991; Yakushijin et al, 1992; Yasukawa et al, 1993). Die dadurch entstandenen oligoklonalen T-Zelllinien konnten in verschiedene Gruppen von HHV-6-spezifischen T-Zellen eingeteilt werden. Manche erkannten nur Zelllysate aus HHV-6A- oder HHV-6B-infizierten Zellen und andere erkannten beide HHV-6-Spezies (Yasukawa et al, 1993). Diese Erkennung wurde unter Verwendung eines anti-HLA-DR-Antikörpers unterbunden, was auf eine HLA-restringierte Antigenerkennung hinweist (Yakushijin et al, 1991; Yakushijin et al, 1992). Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden jedoch keine Erkenntnisse über Epitope oder potentielle Antigene der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort gewonnen, noch wurden Daten zu T-Zellhäufigkeiten erhoben.

Erst circa 20 Jahre später konnte dieses Wissen durch die, vor kurzem von Nastke et al. (Nastke et al, 2012) veröffentlichten Ergebnisse erweitert werden. Diese Autoren definierten die ersten sechs Zielantigene (U11, U14, U38, U48, U54 und U57) der HHV-6-spezifischen CD4⁺-T-Zellantwort (Nastke et al, 2012). Insgesamt wurden 11 DRB1-restringierte Epitope aus diesen 6 verschiedenen Zielantigenen identifiziert. Interessanterweise konnten wir in unseren Untersuchungen gegen 3 dieser Antigene (U11, U54 und U38) auch eine CD8⁺-spezifische T-Zellantwort nachweisen.

Im Gegensatz zu der HHV-6-spezifischen CD4⁺-T-Zellantwort waren bis zum Jahre 2012 weder Zielantigene noch Epitope der HHV-6-spezifischen CD8⁺-T-Zellantwort bekannt. Unserer Arbeitsgruppe gelang es Mitte letzten Jahres als erste, die HHV-6-spezifische CD8⁺-T-

Zellantwort zu beschreiben (Martin et al, 2012). Durch wiederholte Stimulation mit vorhergesagten CD8⁺-T-Zell-Peptidepitopen aus den HHV-6B-Strukturproteinen U11 und U54 gelang es, HHV-6-spezifische CD8⁺-T-Zellen von gesunden HHV-6-seropositiven Spendern anzureichern und T-Zellklone zu generieren. Insgesamt konnten 5 verschiedene HLA-A*0201-restringierte Epitope identifiziert werden. 3 Spezifitäten zeigten in vitro eine Reaktivität gegenüber HHV-6B infizierten CD4⁺-T-Zellen. Damit konnte gezeigt werden, dass sich die HHV-6-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort wie auch die CD4⁺-T-Zellantwort gegen virale Tegumentproteine richtet (Schub, 2009). Ein Teil dieser publizierten Arbeit war Bestandteil der vorliegenden Doktorarbeit (Abschnitt 5.1, S.55): die Analyse der Erkennungskinetik der HHV-6-Infektion durch HLA-A*0201-restringierte CD8⁺-T-Zellen, der Nachweis der Inhibition der Erkennung durch Ganciclovir und PFA, sowie die Untersuchung der Häufigkeit solcher epitopspezifischer T-Zellen im Blut gesunder Virusträger.

Ende letzten Jahres erschien eine weitere Arbeit, deren Gegenstand ebenfalls die Charakterisierung HHV-6-spezifischer T-Zellen war.

Die Arbeitsgruppe um Ann Leen in Houston (Gerdemann et al, 2013) stellte durch Kurzzeitstimulation mit den auch von uns untersuchten Antigenen U11, U54 und U90 sowie zusätzlich U14 und U71 polyklonale HHV-6B-spezifische T-Zelllinien her. Linien aller 14 Spender zeigten eine Reaktivität gegen 4 der 5 ausgewählten Antigene, die höchste Zahl spezifischer T-Zellen wurde in den Zelllinien für das IE-1-Protein, U90, beobachtet (ca. 400±50 Spots im IFN- γ -ELISpot-Assay) und gegenüber HHV-6B-infizierten Zellen. Darüber hinaus wurden 3 neue CD8⁺-T-Zellepitope identifiziert. Insgesamt stand im Fokus dieser Untersuchung die weitere Charakterisierung der HHV-6B-spezifischen Immunantwort, um eine Virus-spezifische Immuntherapie zu entwickeln (Gerdemann et al, 2013). Zuvor etablierten sie ein Verfahren, mit dem sich durch eine einzige Stimulation mit Peptiden schnell virusspezifische T-Zellen für den adoptiven Transfer herstellen lassen (Gerdemann et al, 2012). Gerdemann et al. (2013) konnten auch zeigen, dass CD8⁺-T-Zelllinien mit angereicherten HHV-6-spezifischen T-Zellen in der Lage waren, HHV-6-infizierte Monozyten zytolytisch anzugreifen. Da diese Experimente jedoch nur mit komplex zusammengesetzten, polyklonalen T-Zellen durchgeführt wurden, blieb die Frage offen, welche Epitop- und Antigen-spezifitäten für eine Erkennung von infizierten Zellen verantwortlich sind. Dies gelang erstmals unserer Gruppe, die anhand von T-Zellklonen zeigte, dass U54- und U11-spezifische CD8⁺-T-Zellen infizierte CD4⁺-T-Zellen erkennen und lysieren (Martin et al, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen stark ausgeweitet werden, indem gezeigt wurde, dass HLA-B*0801-restringierte CD8⁺-T-Zellen mit insgesamt 15 verschiedenen Epitopspezifitäten aus 12 verschiedenen

Antigenen verschiedener Phasen des viralen Replikationszyklus infizierte Zellen erkennen können.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die antigen-spezifische CD8⁺-T-Zellantwort gegen HHV-6B umfassend untersucht werden, um in Zukunft die immunologische Kontrolle dieses Virus und die Pathogenese der HHV-6-assoziierten Erkrankungen zu verstehen und spezifische Immuntherapien und Immunomonitoring zu entwickeln.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Fragen zur Erkennung von HHV-6 modellhaft, mit bereits vorhandenen HHV-6B-spezifischen T-Zellklonen, bearbeitet. Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, wie die T-Zellerkennung infizierter Zellen zeitlich mit der Virusreplikation zusammenhängt und ob sie von dieser abhängt. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob CD8⁺-T-Zellen eine Kreuzspezifität gegen HHV-6B und HHV-6A aufweisen, den beiden Virusspezies der HHV-6-Familie. Hierfür wurden bereits etablierte U54-spezifischen CD8⁺-T-Zellklone AS-15 ILY und AS-6 LLC gegenüber HHV-6A- und HHV-6B-infizierten CD4⁺-T-Zellen genauer untersucht. Von diesen T-Zellklonen war bereits bekannt, dass sie HHV-6B-infizierte CD4⁺-T-Zellen 6 Tage nach Infektion erkennen können (Martin et al, 2012; Schub, 2009). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, erkannten die beiden HHV-6B-spezifischen T-Zellklone HHV-6B infizierte Zellen bereits an Tag 3 nach Infektion mit einer maximalen Erkennung an Tag 6. Mit dem Inhibitor der viralen DNA-Replikation, Ganciclovir, behandelte Zielzellen wurden nicht erkannt. Demnach ist die Virusreplikation eine wichtige Voraussetzung für die Präsentation des Strukturproteins U54 gegenüber CD8⁺-T-Zellen. Beide T-Zellklone zeigten keine Erkennung von HHV-6A, obwohl in einem Fall das Epitop streng konserviert ist und in anderen Fall lediglich 2 konservative Aminosäure-Substitutionen aufweist. Obwohl das analoge Peptid aus HHV-6A in Peptidtitrationsassays erkannt wurde, erkannte der AS-15 ILY spezifische T-Zellklon zu keinem Zeitpunkt der Infektion HHV-6A-infizierte Zellen. Ein möglicher Grund könnte sein, dass das analoge VIY-Peptid aus HHV-6A durch den Austausch zweier ebenfalls aliphatischer Aminosäuren (Valin statt Isoleucin bzw. Isoleucin statt Leucin) nicht zur Bindung und zur Präsentation auf HLA-A*0201 Molekülen kommt. Ein wahrscheinlicherer Grund könnte sein, dass das VIY-Peptid aus HHV-6A, aufgrund der nicht konservierten dem Epitop angrenzenden Aminosäuren, bei der endogenen Prozessierung des HHV-6A-U54-Proteins nicht entsteht und deshalb nicht zur Präsentation durch virusinfizierte Zellen zur Verfügung steht. Das Epitop LLC, das durch HHV-6B-infizierte Zellen präsentiert wird ist identisch in HHV-6A. Dennoch waren LLC-spezifischen CD8⁺-T-Zellen allein spezifisch für HHV-6B und erkannten HHV-6A infizierte Zellen nicht. Möglicherweise ist das

Strukturprotein aus HHV-6A im zellulären System schlechter exprimiert, so dass es nicht unbedingt zur Kreuzerkennung zwischen HHV-6A und HHV-6B kommen muss, selbst wenn es sich um ein konserviertes Epitop handelt. Interessanterweise wurde beobachtet, dass das Immunevasin U21 von HHV-6A MHC-Klasse-I Moleküle auf Oberfläche von Astrozyten effizienter die Expression erniedrigt als das HHV-6B Pendant (Glosson & Hudson, 2007). Diese immunevasiven Strategien wurden auch für andere β -Herpesviren wie beispielweise CMV nachgewiesen. So führt die Infektion mit CMV zu einer antigenabhängigen Störung der MHC-Klasse-I-Präsentation, (Gilbert et al, 1993; Manley et al, 2004) welche zusätzlich MHC-I allelspezifisch ist (Ameres et al., unveröffentlicht). Für HHV-6 müsste dieser Sachverhalt noch genauer untersucht werden. Eine stärkere Wirkung des Immunevasins aus HHV-6A gegenüber HHV-6B gegenüber HLA-A*0201 könnte aber eine mögliche Erklärung für das Fehlen der Erkennung von HHV-6A infizierten Zellen sein.

Die im ersten Teil dieser Arbeit charakterisierten T-Zellklone entstanden aus Experimenten mit einer vergleichsweise kleinen Zahl ausgewählter, definierter Peptidepitop-Kandidaten (12 potentielle HLA-A*0201-restringierte nonamere Peptide aus 3 Kandidaten-Antigenen). Im zweiten Teil der Arbeit wurde die T-Zellantwort gegen ein besonders geeignet erscheinendes Antigen, U54, mit Hilfe einer das komplette Protein überdeckenden Peptidbibliothek aus 15mer-Peptiden näher analysiert. Die Tatsache, dass mit dem überlappenden U54-Gesamtpool nicht deutlich mehr HHV-6-spezifische T-Zellen ex-vivo nachzuweisen waren, als mit dem ausgewählten U54-Epitopkandidaten, deutet daraufhin, dass es im gesamten U54-Protein bei unseren untersuchten Spendern keine Epitope gibt, die dominanter sind, als die bisher identifizierten Epitope ILY und MLW.

Dies steht im Einklang damit, dass Gerdemann und Kollegen HHV-6-spezifische T-Zellen erst nach Peptidstimulation zuverlässig nachweisen konnten (Gerdemann et al, 2013). Ähnliches berichteten auch Nastke et al. über CD4+-Epitopkandidaten aus U54 und anderen Antigenen, die erst nach Anreicherung eindeutig detektiert werden konnten (Nastke et al, 2012). Aus diesem Grund wurde ein B-Blasten vermittelte Stimulationsverfahren wie in Martin et al. beschrieben verwendet, um HHV-6B-spezifische T-Zellen zu generieren. Durch dieses Stimulationsprotokoll war es möglich, aus 3 von 3 gesunden HHV-6-positiven Spendern aus den oligoklonalen T-Zelllinien durch limitierende Verdünnung T-Zellklone zu generieren.

Mit diesem Ansatz konnten 9 neue Epitope unterschiedlicher HLA-Restriktion identifiziert werden. Darunter waren zwei CD4+-Epitope und 7 CD8+-Epitope, bei denen zunächst nur die Peptiderkennung untersucht wurde. Drei Klone verschiedener Spezifitäten konnten lang genug

kultiviert werden, um die Erkennung infizierter Zellen zu untersuchen, und bei zwei CD8+-Epitopen konnte zusätzlich die HLA-Restriktion bestimmt werden. Diese drei verschiedenen Epitope, darunter auch das CD4+-Epitop, wurden von HHV-6B infizierten Zellen präsentiert und von den jeweiligen T-Zellen erkannt.

Die beiden CD8+-Epitope hatten beide von HLA-A*0201 verschiedene Restriktion, nämlich HLA-B*3501 und HLA-B*4002, was durch Verwendung verschiedener Zielzellen mit unterschiedlichen HLA-Typen ermittelt wurde. Diese gefundenen Epitope stehen im Einklang mit dem Bindemotive der jeweiligen Restriktionen, auch wenn die Bestimmung des jeweiligen Minimalepitops noch aussteht.

Interessanterweise wurden bei einem Spender 6 verschiedene U54-Epitopspezifitäten gefunden, davon 5 verschiedene CD8+- und ein CD4+-T-Zellepitop.

Zusammenfassend zeigten diese Experimente, dass das Strukturprotein U54 Zielepitope verschiedenster HLA-Restriktionen enthält, die auf MHC Klasse I und II gegenüber CD4+- bzw. CD8+-T-Zellen auch von infizierten Zellen präsentiert werden können.

Im 3. Teil dieser Promotionsarbeit ging es darum, ein noch umfassenderes Bild über die HHV-6-spezifische CD8+-Immunantwort zu bekommen und sich somit nicht auf ein, sondern auf möglichst viele virale Antigene zu beziehen. Hierfür gibt es verschiedene Herangehensweisen, wie beispielsweise Untersuchungen des verwandten Herpesvirus CMV zeigen. Eine umfassende Studie zur Untersuchung der CMV-spezifischen Immunität wurde in der Vergangenheit von Sylwester und Kollegen durchgeführt (Sylwester et al, 2005). Hierbei wurde das gesamte CMV-Proteom, repräsentiert durch überlappende Peptidbibliotheken über alle Antigene, auf die T-Zellepitope sämtlicher HLA-Restriktionen analysiert, um ein Gesamtbild über die Immunität dieses Virus zu bekommen. Ein Nachteil dieser detaillierten Studie ist aber der sehr hohe Kostenaufwand (die Studie verwendete 13 700 Peptide) sowie die begrenzte Sensitivität der verwendeten Detektionsmethode. Es wurden ex-vivo-Analysen der T-Zellreaktivität mittels intrazellulärer Zytokinfärbung durchgeführt, der Hintergrund bei diesen Analysen betrug 0.06% der CD4+-T-Zellen bzw. 0.08% der CD8+-T-Zellen. Dies führte beispielsweise dazu, dass die Autoren nur in knapp der Hälfte der Spender CMV-spezifische T-Zellen gegen das Antigen IE-1 nachweisen konnten, wohingegen Daten unserer Arbeitsgruppe anhand von stimulierten T-Zelllinien zeigen, dass alle CMV-positiven Spender (18/18) IE-1-spezifische T-Zellen im peripheren Blut tragen (Ameres et al, unveröffentlicht). Wegen der geringeren Häufigkeit HHV-6-spezifischer T-Zellen (siehe Abschnitt 5.1, 5.3) wären die meisten der in der vorliegenden Arbeit gefundenen und analysierten T-Zellantworten mit der von Sylwester et al. verwendeten

Methode nicht nachweisbar gewesen. Eine weitere umfassende Studie zur Immunität des β -Herpesvirus CMV wurde im Jahre 2003 von Elkington et al. veröffentlicht. Hierbei wurde versucht, gegen eine Reihe ausgewählter Proteine Peptidepitope bestimmter HLA-Restriktionen vorherzusagen und zu verifizieren. Zur Identifikation neuer Antigene fokussierte man sich damals auf 14 von 200 Proteinen des CMV Proteoms sowie 10 verschiedene HLA-Restriktionen. Trotz dieser Einschränkung auf eine kleine Auswahl der Proteine und bestimmter HLA-Restriktionen konnte eine Vielzahl von Peptidspezifitäten und immundominanter Epitope ermittelt werden. Auch diese Arbeit war auf ex-vivo-Analysen beschränkt, sie verwendete einen ELISpot-Test.

In der vorliegenden Studie wurde bei der Auswahl der Kandidaten-Peptide weder der Ansatz von Elkington noch der von Sylvester verfolgt, da der Ansatz von Elkington et al. zu eingeschränkt erschien (auf nur 6% der viralen Antigene), der von Sylvester et al. zu aufwendig war (Testung von vielen tausend Peptiden). Da nicht bekannt war, welches die immundominanten Antigene der HHV-6-spezifischen T-Zellantwort sind, erschien es notwendig, sich auf eine HLA-Restriktion zu beschränken, und für diese sämtliche vorhergesagten Kandidaten-Peptide zu testen. Auf diese Weise wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Querschnittsanalyse durch das gesamte (vorhergesagte) virale Proteom auf CD8+-T-Zellepitope durchgeführt, jedoch beschränkt auf eine einzige, repräsentative HLA-Restriktion. Hierfür wurde aus folgenden Gründen HLA*B0801 ausgewählt. HLA-B*0801-restringierte Peptide weisen eine bekannte, wohldefinierte Konsensussequenz auf (DiBrino et al, 1994; Rammensee et al, 1999; Suhrbier et al, 1993). Darüber hinaus sind bei anderen humanen Herpesviren wie EBV und CMV sehr ausgeprägte, immundominante HLA-B*0801-restringierte CD8+-T-Zellantworten zu finden, deren Zielepitope dieser Konsensussequenz streng folgen (Elkington et al, 2003; Tan et al, 1999)(Abb. 6.1). Da das HLA-B*0801 zu 20% in der europäischen Bevölkerung zu finden ist, ist es von hinreichender Relevanz (Schmidt et al, 2009)um einen Gesamteindruck über die HHV-6-spezifische CD8+-T-Zellantwort zu bekommen.

Abb. 6.1 : Überblick über immundominante HLA-B*0801-restringierte T-Zellepitope

CMV →	IE-1:	QIK	Q-I-K-V-R-V-D-M-V
		ELK	E-L-K-R-K-M-M-Y-M
EBV →	EBNA3A:	RAK	R-A-K-F-K-Q-L-L
		QAK	Q-A-K-W-R-L-Q-T-L
		FLR	F-L-R-G-R-A-Y-G-L

Die Konsensussequenz HLA-B8-restringierter Epitope ist gekennzeichnet durch die basischen Aminosäuren Arginin bzw. Lysin, jeweils in Position 3 und 5, sowie eine aliphatische Aminosäure in der C-terminalen Position. Diese drei Reste sind die Ankerreste, die das Peptid im HLA-B*0801-Molekül verankern. Sämtliche Peptide in allen bekannten oder postulierten Proteinen von HHV-6B, die diesem Motiv folgen, wurden mittels eines Scripts (in AppleScript) aus dem Referenzgenom für HHV-6B (Genbank-Identifikationsnummer NC_000898) extrahiert. Die so identifizierten 299 Peptide verteilten sich auf ca. 80% der Proteine. Je nach Größe und Basizität waren in den Proteinen unterschiedlich viele potenzielle Epitope enthalten (S.28). In dieser Arbeit wurden also die möglichen HLA-B*0801-restringierten Kandidaten-Epitope ausschließlich aufgrund der drei konservierten Ankerreste ermittelt. Dieses Verfahren kontrastiert daher mit herkömmlichen Methoden der Vorhersage von HLA-bindenden Peptiden bzw. T-Zellepitopen, die komplexer sind, da sie auch die Identität der anderen Aminosäuren zur Vorhersage heranziehen.

Solche herkömmlichen Verfahren sind „BIMAS“ (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) und „SYFPEITHI“ (www.syfpeithi.de). Es war dadurch auch ein Ziel dieser Arbeit, zu ermitteln, ob die Heranziehung von Nicht-Anker-Resten bei der Epitopvorhersage durch solche Algorithmen gerechtfertigt ist und die Vorhersage verbessert.

Strategien der Peptidvorhersage

Aus der ersten veröffentlichten Kristallstruktur eines MHC-Klasse-I-Moleküls von Bjorkman und Kollegen konnte man erstmals ableiten, dass die Bindung eines Peptides in eine speziell geformte Furche des MHC-Moleküls erfolgt (Bjorkman et al, 1987). Diese Peptidbindungsgrube wird im MHC-Klasse-I-Molekül durch die α 1- und α 2- Domäne gebildet. Sie enthält besondere Bindungstaschen (numeriert A bis F) (Saper et al, 1991), die bestimmte Seitenketten des gebundenen Peptids aufnehmen, die Ankerreste (Falk et al, 1991). Durch den hohen

Polymorphismus der klassischen MHC-Klasse-I-Moleküle werden bestimmte Positionen in der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ - Domäne durch allelspezifisch unterschiedliche Aminosäuren besetzt, deren Seitenketten mit dem gebundenen antigenen Peptid interagieren (Saper et al, 1991). Diese polymorphen Aminosäuren liegen insbesondere auch in der Peptidbindungsgrube und den Bindungstaschen. Insbesondere weil die Bindungstaschen A bis F allelspezifische Charakteristika aufweisen, binden verschiedene HLA-Allotypen unterschiedliche Peptide.

Aus den speziellen Strukturen der MHC-Moleküle ergeben sich bei verschiedenen MHC-Molekülen bevorzugte Peptidmotive (Rammensee et al, 1993). Die C- und N-Termini der Peptide werden über unveränderliche Positionen der Bindungsfurchen gehalten (Bouvier & Wiley, 1994), die Seitenketten jedoch stehen in Interaktion mit Bindungstaschen („specificity pockets“) innerhalb der Furche. Diese Bindungstaschen sind hochpolymorph, werden durch mehrere spezifische Aminosäuren gebildet (Bouvier & Wiley, 1994; Falk et al, 1991; Saper et al, 1991) und binden die Ankerreste der Peptide. Als Ankerreste für den jeweiligen MHC-Allotyp sind werden bestimmte Aminosäuren oder kleine Gruppen von nahen verwandten Aminosäuren bezeichnet, die an der gleichen Position im Peptidliganden eines MHC-Moleküls auftreten. Sie bilden die Grundlage der großen Variabilität verschiedener MHC-I-Allotypen und der dazu passenden Peptidliganden (Rammensee et al, 1993). Daraus ergibt sich aus den Taschen eines jeden Moleküls und den Ankerresten seiner Liganden ein spezifisches Peptidmotiv, wodurch eine Vorhersage von MHC-I-Liganden möglich wird (Pamer et al, 1991; Parker et al, 1994; Rotzschke et al, 1991). Die Bestimmung solcher Peptidmotive erfolgt mit Hilfe homozygoter Zelllinien, von denen MHC-I-gebundene Peptide eluiert und durch beispielsweise N-terminalen Edman-Abbau sequenziert werden und so die Ankeraminosäuren an den hierfür typischen Stellen vermehrt detektiert werden (Falk et al, 1991).

Mit Hilfe bestimmter Datenbanken („SYFPEITHI“, „BIMAS“) kann eine Aussage über die Bindungswahrscheinlichkeit von Liganden getroffen werden. Da diese Algorithmen jedoch nicht direkt auf bekannten Eigenschaften der MHC-Struktur beruhen, sondern durch Zusammenfassung verschiedenartiger empirischer Daten konstruiert wurden, ziehen sie auch Nicht-Ankerreste zur Ligandenvorhersage heran. Es ist unklar, ob dieses Vorgehen gerechtfertigt ist.

SYFPEITHI ist zum einen eine Datenbank von mittlerweile mehr als 7000 Peptidsequenzen publizierter natürlicher MHC-Liganden der Klasse I und II verschiedener Spezies sowie veröffentlichter T-Zell-Epitope. Zum anderen stellt SYFPEITHI einen Algorithmus für die Vorhersage von T-Zellepitopen in beliebigen Proteinen für eine Vielzahl von HLA-Allotypen

zur Verfügung. Dieser Algorithmus basiert auf der Vergabe einer Punktzahl (meist zwischen 0 und 10) für jede Aminosäureposition des Peptids bezüglich der Bindungswahrscheinlichkeit, wodurch die Genauigkeit der Motivübereinstimmung für jedes Peptid des analysierten Proteins anhand eines *Score* abgelesen werden kann, der durch die Summe der Punktzahlen über alle Aminosäurepositionen gebildet wird (Rammensee et al, 1999). Dabei werden bei SYFPEITHI nicht nur Ankeraminosäuren und bevorzugte/weniger bevorzugte Nebenbindungsstellen miteinbezogen, sondern auch Aminosäuren, die voraussichtlich nicht mit dem MHC, sondern mit dem T-Zellrezeptor interagieren. Die jeweiligen Punktzahlen wurden von Rammensee und Kollegen im wesentlichen aus eigenen Daten zu den vom jeweiligen HLA-Allel gebundenen Selbst-Peptiden abgeleitet (Rammensee et al, 1999), wahrscheinlich wurden auch einzelne bis dahin bekannte T-Zellepitope aus viralen und Tumorantigenen berücksichtigt. Aminosäuren, die sehr häufig in einer Ankerposition auftauchen, erhalten für diese Position den Wert 10, weniger häufige 8, seltene 6. Aminosäuren, welche in Hilfsankerpositionen auftauchen, erhalten Werte von 4-6 und sonstige bevorzugte Aminosäuren an bestimmten Positionen Werte von 1- 4. Aminosäuren, welche die Bindung negativ beeinflussen, erhalten negative Werte bis minus 3, solche, welche die Bindung nicht erkennbar negativ oder positiv beeinflussen, erhalten den Wert 0 (Rammensee et al, 1999). Die Summe dieser Werte über alle Positionen eines Peptids bildet dessen *Score*. Die zytosolische Peptidprozessierung durch das Proteasom mit dessen bevorzugten Schnittstellen sowie die Spezifität des Transports durch TAP ins endoplasmatische Retikulum - bevor die Peptide überhaupt in Kontakt mit Molekülen der MHC-Klasse-I kommen – wird von “SYFPEITHI” nicht explizit berücksichtigt, ist jedoch Gegenstand weiterer Algorithmen, die ebenfalls von der Tübinger Arbeitsgruppe angeboten werden (PAPROC, <http://www.paproc.de/>) und deren Kombination mit der SYFPEITHI-Vorhersage empfohlen wird.

BIMAS (http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/hla_bind/) ist ein Werkzeug der *Bioinformatics and Molecular Analysis Section* (BIMAS) des *National Institute of Health* (NIH). Es ermöglicht für ausgesuchte HLA-Moleküle 8-, 9- und 10mer-Peptide, die Peptidbindungsmotive für HLA-Klasse-I Moleküle besitzen, zu lokalisieren und diese anhand der errechneten Dissoziationshalbwertszeit in einer Rangliste einzustufen. Für die Berechnung wird davon ausgegangen, dass jede Aminosäure innerhalb eines Peptids zur Bindung an das HLA-Molekül beiträgt. Aminosäuren, die weder einen Vor- noch Nachteil bezüglich des Bindungsverhaltens haben, bekommen den Wert 1. Aminosäuren, die für die Bindung entscheidend sind, haben Werte, die sich signifikant von 1 unterscheiden. Günstigen Aminosäuren werden Werte zugeteilt,

die größer als 1 sind, ungünstigen Aminosäuren positive Punktwerte, die kleiner als 1 sind. Aminosäuren, die als Nebenanker dienen, haben Koeffizienten, die zwar größer als 1 sind, aber einen kleineren Wert haben als die dominanten Ankerreste. Die Werte der einzelnen Aminosäuren werden hier nicht wie bei SYFPEITHI addiert, sondern multipliziert. Abschließend wird das Produkt noch mit einer für jedes HLA-Allel festgelegten Konstante multipliziert. Der resultierende *score-Wert* soll mit der Dissoziationshalbwertszeit des MHC-Molekül-Peptid-Komplexes bei 37°C und einem pH von 6.5 korrelieren. Im Gegensatz zu SYFPEITHI ist der Ausgangspunkt dieses Algorithmus und der verwendeten Koeffizienten nicht ein Satz natürlicher Peptide, deren Sequenz empirisch ermittelt wurde, sondern in-vitro-Analysen der Bindung von gezielt synthetischen Peptiden an MHC-Moleküle.

Neben den *position-specific scoring matrices* (PSSMs), die von den Algorithmen von „SYFPEITHI“ und „BIMAS“ verwendet werden gibt es noch andere, höher entwickelte Methoden, um Bindungsstabilitäten zu berechnen, wie beispielsweise *support vector machines* (SVMs) oder *artificial neural networks* (ANNs). Letzteres wird bei dem Programm „NetMHC“ angewandt, das unter Verwendung von *sparse encoding*, *Blosum encoding* und *hidden Markov models* (HMMs) für die Vorhersagen nicht nur die Aminosäuren an ihren einzelnen Positionen, sondern auch die Aminosäuren in Relation zueinander berücksichtigt (Lundegaard et al, 2008).

Im Rahmen unserer Querschnittsanalyse wurden periphere mononukleäre Zellen 4 erwachsener gesunder Spender separat mit einem der beiden HLA-B*08-restringierten Peptidbanken stimuliert und zunächst polyklonale HHV-6B-spezifische T-Zelllinien generiert. Durch limitierende Verdünnungen wurden HHV-6B-spezifische T-Zellklone hergestellt, die hinsichtlich ihrer Spezifität genauer untersucht wurden. Insgesamt konnten 25 Epitope aus 19 Peptiden verifiziert werden. Auffallend ist hierbei, trotz der langen Stimulationszeit, das breite Spektrum der CD8+-spezifischen T-Zellantwort und die Abwesenheit von immundominanten Epitopen im Vergleich zu dem verwandten Herpesvirus CMV. Insgesamt gesehen ist das die bis jetzt höchste Zahl an HLA-B*0801-restringierten Epitopen, die bisher für ein humanes Pathogen nachgewiesen wurde. Darüber hinaus werden alle möglichen Antigenklassen aus allen Phasen des viralen Replikationszyklus von IE, E und Late adressiert. Außerdem ist weder eine Präferenz für 8mere oder für 9mere HLA-B*0801-restringierter Epitope feststellbar.

Die Erkennung von HHV-6-infizierten CD4+-T-Zellen wurde in Form einer Kinetik untersucht. Insgesamt erkannten 16 der 20 untersuchten Spezifitäten HHV-6A- und/oder HHV-6B-infizierte

CD4⁺-T-Zellen. Dieser Anteil von 80% tatsächlich im Kontext der Infektion präsentierter Peptide erscheint sehr hoch, wenn man folgende Faktoren in Betracht zieht: (1) mögliche Restriktionen durch die proteasomale Peptidprozessierung wurden nicht berücksichtigt; (2) andere Herpesviren (Schust et al, 1998)(Ameres et al, unpubliziert) und wahrscheinlich auch HHV-6 (Glosson & Hudson, 2007) haben multiple Immunevasionsstrategien, die der Antigenpräsentation entgegenwirken. Es ist nicht auszuschließen, dass auch die vier fehlenden Peptidspezifitäten auf bestimmten Zelltypen oder in Abwesenheit anderer viraler Faktoren präsentiert werden können. Um hierzu eine abschließende Aussage treffen zu können, könnte man diese T-Zellen beispielsweise in einem künstlichen transgenen Modell (Vektoren) oder durch Infektion alternativer Zielzellen testen.

Früh erkannt (Tag 3 und spätere) wurde beispielsweise ein Epitop aus dem IE-1 und der DNA-Polymerase.

Allerdings wurde ein weiteres Epitop (DFK), das ebenfalls aus dem IE-1 stammt, erst später (ab Tag 6, mit Maximum erst an Tag 9) erkannt. Hier muss jedoch erwähnt werden, dass bis jetzt für dieses Epitop, als einziges der identifizierten Epitope, die Restriktion durch HLA-B*0801 nicht überprüft werden konnte. So ist es durchaus vorstellbar, dass dieses Epitop einer anderen HLA-Restriktion folgt; dies könnte eine andere Kinetik der Präsentation bedingen. In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden (Iskra et al., unveröffentlicht), dass aus dem EBV-Antigen LMP2 HLA-A*0201-restringierte Epitope früher präsentiert werden als ein HLA-B*4001 restringierte Epitope aus dem gleichen Antigen.

Der Großteil der HHV-6-Antigene wurde an Tag 3 bzw. an Tag 6 nach Infektion erkannt. Diese Ergebnisse stimmen in gewissem Grad mit den Transkriptionsniveaus der hier untersuchten Antigene überein, bei denen ein ähnlicher Verlauf mit der maximalen Expression an Tag 3 festgestellt wurde. Die Präsentationskinetik ist gegenüber der Expressionskinetik leicht verzögert, was sich unter anderem mit dem Aufbau der MHC-Komplexe erklären lässt.

Insgesamt wurden alle HHV-6A-infizierten CD4⁺-T-Zellen später erkannt als HHV-6B-infizierte Zellen. Dies hängt möglicherweise mit dem schlechteren Virustiter zu Beginn der Infektion zusammen. Es wäre daher ein wichtiges Ziel zukünftiger Arbeiten, eine geeignete vergleichende Titrationsmethode für die beiden HHV-6-Spezies zu etablieren.

Betrachtet man nur diejenigen Spezifitäten, bei denen die Erkennung von virusinfizierten Zellen und die HLA-B*0801-Restriktion eindeutig nachgewiesen wurde, ergibt sich folgende Verteilung der Epitope (Tab. 6.2; Abb. 5.3.14, S.95). Sämtliche Antigenklassen aus allen Phasen des viralen Replikationszyklus wurden adressiert, wobei keine besonders in den Vordergrund rückt. Das U79 ist hierbei ein Vertreter der IE-Proteine und an der DNA-Replikation beteiligt.

Wie erwartet ist dieser Transkriptionsfaktor durch viele basische Reste in seiner Sequenz gekennzeichnet und besitzt bei einer Länge von ca. 500bp 10 potentielle HLA-B*0801-restringierte Epitope, wovon eines von uns bestätigt werden konnte. Das DNA-Bindungsprotein U41 ist das analoge Antigen zu UL-57 aus CMV und wird als „early“ Protein klassifiziert. Die DNA-Polymerase U38, das analoge Protein zu UL54 aus CMV, zählt nach Einteilung von Oster et al. zu den „late“ Antigenen. Nach der funktionellen Betrachtung und nach unseren Untersuchungen in Form von T-Zellexperimenten wäre die Zuordnung zu den „early“ Proteinen sinnvoller. Das Tegumentprotein U31 gehört zu den „late“ Antigenen. Sein homologer Partner UL48 aus CMV ist nach Sylwester eines der immundominanten Zielantigene der CMV-spezifischen T-Zellantwort. Das U31 enthält mit seinen 2077 Aminosäuren 9 aufgrund der Ankerreste mögliche HLA-B*0801-restringierte Epitope, in unseren Untersuchungen konnte davon eines als T-Zellepitop identifiziert werden.

Tab. 6.2: Einteilung der identifizierten Zielantigene nach Genklassen

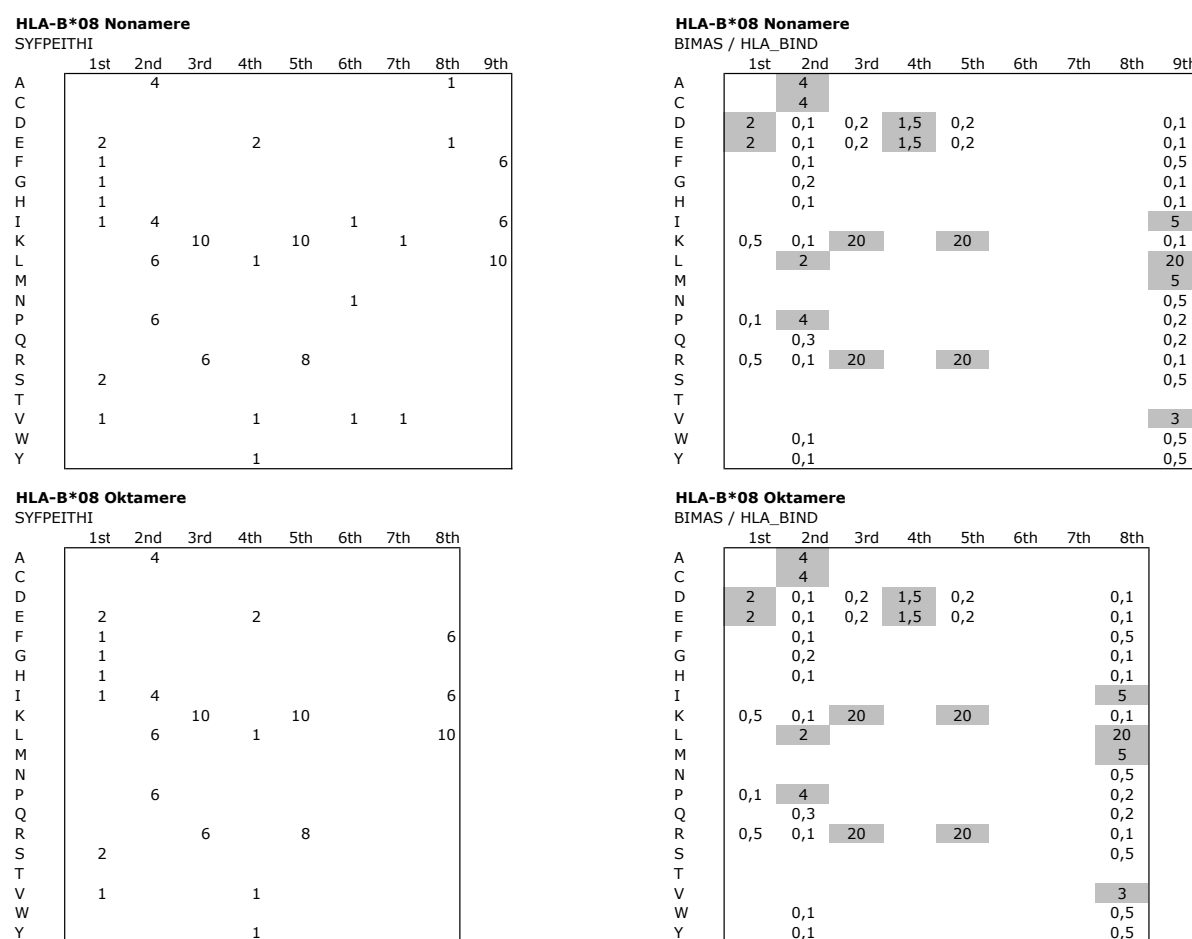
Protein	Funktion	Oster et al. 2002 Tsao et al. 2009
U86	IE-A	IE
U79	DNA Replikation	IE
B4	-	IE
U3	Transaktivator	E
U7	-	E
U26	-	E
U41	DNA-Bindungsprotein	E
U29	Kapsidbildung	L
U31	Tegumentprotein	L
U38	DNA Polymerase	L
U53	Proteinase	L
U72	gM	L

Insgesamt gesehen finden wir viele interessante Antigene einschließlich mehrerer vermutlich essentieller viraler Proteine aus verschiedenen Replikationsphasen, als Zielantigene der CD8⁺-T-Zellantwort. Die Hemmung der Virusreplikation durch virusspezifische CD8⁺-T-Zellen kann

demnach auf verschiedenen Stufen der Replikation erfolgen. Die meisten dieser Antigene hätten nicht aufgrund von funktionellen Proteinomologien zu CMV vorhergesagt werden können.

Die Voraussage von T-Zellepitopen durch die Algorithmen SYFPEITHI und BIMAS erfolgt anhand der Vergabe von Koeffizienten für jede mögliche Aminosäure in den Positionen der Ankerreste und weiteren Aminosäurepositionen. Um die Vergabe dieser Koeffizienten für HLA-B*0801-restringierte Epitope zu überprüfen, wurde ein Vergleich mit den beobachteten Aminosäuresequenzen unserer identifizierten Epitopen vorgenommen. (Abb. 5.3.14, S.95)

Abb. 6.3: Vergleich der Algorithmen SYFPEITHI und BIMAS anhand der Vergabe von Koeffizienten für HLA-B*0801 bindende Peptide



Zunächst einmal ist festzustellen, dass der Algorithmus BIMAS die beiden basischen Aminosäuren Arginin und Lysin in den Positionen 3 und 5 gleich behandelt und beide Male den höchsten Koeffizienten 20 vergibt. Dagegen vergibt SYFPEITHI erniedrigte Werte für Arginin in Position 5 und insbesondere Position 3. Vergleicht man diese Einteilung mit den von uns

identifizierten Epitopen (Abb. 5.3.14, S.95), so weisen die von uns identifizierten Epitope nicht darauf hin, dass ein Unterschied zwischen diesen beiden basischen Aminosäuren gemacht werden sollte, da eine der beiden Aminosäuren nicht signifikant häufiger auftritt als die andere. Die aliphatischen Aminosäuren Isoleucin, Lysin, Methionin und Leucin in der C-terminalen Position erhalten bei BIMAS Werte über 1, wobei Leucin den bei weitem höchsten Koeffizienten (20) erhält. SYFPEITHI dagegen vergibt in der C-terminalen Position Koeffizienten größer 0 nur an zwei der vier aliphatischen Aminosäuren, Isoleucin und Leucin, sowie an die aromatische Aminosäure Phenylalanin. Ein Vergleich mit unseren Daten zeigt, dass bei den Epitopen, die aus 8 Aminosäure bestehen, die Bevorzugung von Leucin in der C-terminalen Position bestätigt wird: 6 / 6 oktameren HHV-6-Epitopen tragen ein Leucin in dieser Position. Falls diese Beobachtung verallgemeinbar ist, könnte ein möglicher struktureller Grund hierfür sein, dass bei kürzeren Peptiden die letzte Aminosäure so beschaffen sein muss, dass sie die „Kürze“ des Peptids kompensieren kann und dennoch mit der C-terminalen F-Bindetasche des MHC-Moleküls wechselwirken kann. Leucin mit seiner langen, erst am Ende verzweigten Seitenkette könnte dies am besten leisten. Es ist bemerkenswert, dass das einzige bereits bekannte immundominante herpesvirale Epitop mit 8 Aminosäuren Länge ebenfalls ein C-terminales Leucin aufweist (Tab. 6.1). In der C-terminalen Position der nonameren HHV-6-Epitope traten alle 4 hydrophoben Aminosäuren Isoleucin, Lysin, Methionin und Leucin auf, mit einer Präferenz für Leucin, was aber mit der größeren Häufigkeit von Leucin im Proteom erklärt werden könnte. Vergleicht man neben den von uns definierten Hauptankern die übrigen Aminosäurepositionen, so kommt laut den beiden Datenbanken der Position 2 eine besondere Rolle zu. Bei BIMAS förderlich sind in dieser Position die Aminosäuren Alanin, Cystein, Leucin und Prolin. 5 aus den 15 von uns identifizierten Epitope besitzen einer dieser Aminosäuren in Position 2, was aber keine besondere Anhäufung widerspiegelt, sondern mit der statistischen Verteilung der Aminosäuren zu erklären ist. Zudem besitzen 3 der von uns identifizierten 9mere laut BIMAS vermeintlich negativ auswirkende Reste. SYFPEITHI vergibt an Alanin, Isoleucin, Leucin und Prolin in Position 2 hohe Koeffizienten. Nur vier unserer 15 bestätigten Epitope tragen eine dieser Aminosäuren, insgesamt kommen 12 verschiedene Aminosäuren in dieser Position vor, es wurde also keine starke Präferenz für bestimmte Aminosäuren beobachtet. Unser Ergebnis bestätigt insgesamt den von uns verwendeten Ansatz, HLA-B*0801-Epitope aufgrund der Hauptanker in Position 3, 5 und der C-terminalen Position zu vorherzusagen, und sich nicht wie in den beiden genannten Algorithmen durch die Berücksichtigung von Koeffizienten für zusätzliche Aminosäurepositionen einzuschränken.

Durch die Identifizierung zahlreicher B*0801-restringierter HHV-6-spezifischer Epitope und die Verwendung der entsprechenden MHC/Peptid-Multimere war es in dieser Arbeit erstmals möglich, umfangreiche Studien zu ex-vivo-Häufigkeiten HHV-6-epitopspezifischer T-Zellen durchzuführen. In allen untersuchten Spendern war es möglich, HHV-6-spezifische T-Zellen nachzuweisen. Im Gegensatz zu CMV- oder EBV-spezifischen T-Zellen (Elkington et al, 2003; Tan et al, 1999) sind die primären Häufigkeiten jedoch vergleichsweise niedrig, was im Einklang mit den benötigten mehrwöchigen Stimulationszeiten zur Herstellung HHV-6-spezifischer T-Zelllinien stand. Ebenfalls im Gegensatz zu diesen anderen Herpesviren (Khan et al, 2004) ergaben sich keine Hinweise auf eine ausgeprägte Immundominanz und Konkurrenz zwischen den Antigenen, es wurde vielmehr eine überraschende Vielfalt der von jedem Spender erkannten Antigene gefunden, die mit einer ähnlichen Häufigkeit dieser verschiedenen T-Zellantworten einherging. Wenn man bedenkt, dass diese Analyse nur die T-Zellen einer einzigen HLA-Restriktion berücksichtigt, ist also anzunehmen, dass es sich bei der HHV-6-spezifischen Immunantwort um eine breite, auf viele verschiedene Zielantigene ausgerichtete T-Zellantwort handelt.

Insgesamt gesehen können die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit dazu beitragen, die Immunkontrolle von HHV-6, das in der letzten Vergangenheit eher als immunsuppressives Virus angesehen wurde, besser zu verstehen.

Uns ist es gelungen eine Reihe von unterschiedlichen Zielantigenen unterschiedlicher HLA-Restriktion der CD8⁺- sowie der CD4⁺-spezifischen T-Zellantwort zu definieren. Dies könnte der Ausgangspunkt für weitere ex-vivo T-Zellanalysen sein, um einerseits die Viruskontrolle in gesunden Spendern sowie in Patienten besser zu verstehen. Dabei wäre es sicherlich sinnvoll, auch die HHV-6-assoziierten Erkrankungen wie beispielsweise Multiple Sklerose nicht außer Acht zu lassen und bei diesen Erkrankten das HHV-6-spezifische T-Zellspektrum genauer zu untersuchen. Möglicherweise könnte man hierdurch erste Hinweise darüber erlangen, ob HHV-6-spezifische T-Zellen vor dieser Erkrankung schützen oder, im Gegenteil, an ihrer Pathogenese beteiligt sind. Wie bereits beschrieben, kommt es in Situationen der Immunsuppression häufig zu Reaktivierung von HHV-6B (Zerr, 2006), wobei hier mehr als die Hälfte der Patienten ernsthaft erkranken (Hentrich et al, 2005). Dies könnte durchaus, wie bei den anderen Herpesviren CMV und EBV, mit dem Mangel an virusspezifischen T-Zellen zusammenhängen. In Analogie zur Prophylaxe und Therapie von Komplikationen der Herpesviren CMV und EBV, beispielsweise nach einer allogenen Stammzelltransplantation, ist auch bei HHV-6 der Transfer von herpesvirus-spezifischen T-Zellen durchaus vorstellbar. Im Prinzip kommen hier verschiedene

Strategien in Frage. Die direkte Isolation HHV-6-spezifischer T-Zellen aus dem Spenderblut scheint jedoch aufgrund der niedrigen T-Zellhäufigkeiten im peripheren Blut weniger sinnvoll. Stattdessen könnten durch eine Kurzzeitstimulation durch viele verschiedene Antigene die Häufigkeiten der HHV-6-spezifischen T-Zellen kummuliert werden. Einen derartigen Ansatz beschrieben bereits Gerdemann und Kollegen, die mit Hilfe überlappender Peptidbanken und einen bereits etablierten Protokoll oligoklonale T-Zelllinien durch einmalige Stimulation herstellten (Gerdemann et al, 2013). Grundsätzlich können virusspezifische T-Zellen aber auch durch TCR-Gentransfer hergestellt werden (Schub et al, 2009), was wegen der relativ niedrigen Häufigkeit von HHV-6-spezifischen T-Zellen im Blut eine Alternative darstellen könnte. Eine Auswahl relevanter TCRs wurde bereits im Rahmen dieser Arbeit kloniert und erfolgreich auf ihre Expression in einem geeigneten Modellsystem untersucht.

7. Abkürzungen

AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
allo-HSCT	allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation
allo-KMT	allogene Knochenmarkstransplantation
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
BBL	B-Blasten (CD40-aktivierte B-Zellen)
BCIP/NPT	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat/Nitrotetrazolblauschlorid
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin
CD...	cluster of differentiation (Oberflächenmarker)
CDR	komplementaritätsbestimmende Region (complementarity-determining region)
CMV	Cytomegalievirus
CsA	Cyclosporin A
D	Spender (donor)
DC	dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
E.coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme linked immunospot assay
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FSC	forward scatter
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
FOS	Foscarnet (siehe PFA)
g	Erdbeschleunigung
GCV	Ganciclovir
GFP	green fluorescent protein
HBLV	humanes B-lymphotropes Virus (alte Bezeichnung von HHV-6)
HHV-6	humanes Herpesvirus 6
HLA	human leucocyte antigen
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus 1 (Lippenherpesvirus)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
J76CD8	Jurkat76&CD8
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (EBV-transformierte B-Zelllinie)
LTR	long terminal repeats
MACS	magnetic cell sorting
mHA	minor histocompatibility antigen
MHC	major histocompatibility complex
mLCL	mini-lymphoblastoide Zelllinie (mini-EBV-transformierte B-Zelllinie)
Mo-MLV	moloney murine leukemia virus
MuLV	murines Leukämievirus
n.u.	nicht untersucht

NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
OKT-3	anti-CD3-Antikörper
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
pCMV	CMV-Promotor
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cyanin5
PFA	Phosphonoformiat (= Foscarnet)
PHA	Phytohämagglutinin M
p-NPP	para-Nitrophenylphosphat
PRE	posttranskriptionelles Element
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disease
rpm	rounds per minute
SSC	Seitwärtsstreuung (side scatter)
TAP	transporter associated with antigen processing
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TPA	Tetradecanoylphorbolacetat
U	unit
VZV	Varicella-Zoster-Virus (Windpockenvirus)
z.B.	zum Beispiel

8. Referenzen

- Abdel Massih RC, Razonable RR (2009) Human herpesvirus 6 infections after liver transplantation. *World journal of gastroenterology* : **WJG 15**: 2561-2569
- Aberle SW, Mandl CW, Kunz C, Popow-Kraupp T (1996) Presence of human herpesvirus 6 variants A and B in saliva and peripheral blood mononuclear cells of healthy adults. *Journal of clinical microbiology* **34**: 3223-3225
- Ablashi DV, Balachandran N, Josephs SF, Hung CL, Krueger GR, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC (1991) Genomic polymorphism, growth properties, and immunologic variations in human herpesvirus-6 isolates. *Virology* **184**: 545-552
- Adams. (2012) HHV6-A and HHV6-B now recognized as two distinct viruses. *HHV-6 Foundation, 2012*
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**: 782-787
- Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* **17**: 593-623
- Akashi K, Eizuru Y, Sumiyoshi Y, Minematsu T, Hara S, Harada M, Kikuchi M, Niho Y, Minamishima Y (1993) Brief report: severe infectious mononucleosis-like syndrome and primary human herpesvirus 6 infection in an adult. *The New England journal of medicine* **329**: 168-171
- Albright AV, Lavi E, Black JB, Goldberg S, O'Connor MJ, Gonzalez-Scarano F (1998) The effect of human herpesvirus-6 (HHV-6) on cultured human neural cells: oligodendrocytes and microglia. *Journal of neurovirology* **4**: 486-494
- Alvarez-Lafuente R, De las Heras V, Bartolome M, Picazo JJ, Arroyo R (2004) Relapsing-remitting multiple sclerosis and human herpesvirus 6 active infection. *Archives of neurology* **61**: 1523-1527
- Alvarez-Lafuente R, Garcia-Montojo M, De las Heras V, Bartolome M, Arroyo R (2006) Clinical parameters and HHV-6 active replication in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **37 Suppl 1**: S24-26
- Andreasen SO, Christensen JE, Marker O, Thomsen AR (2000) Role of CD40 ligand and CD28 in induction and maintenance of antiviral CD8+ effector T cell responses. *J Immunol* **164**: 3689-3697
- Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW (1995) Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* **42**: 455-500
- Asano Y, Yoshikawa T, Suga S, Kobayashi I, Nakashima T, Yazaki T, Kajita Y, Ozaki T (1994) Clinical features of infants with primary human herpesvirus 6 infection (exanthem subitum, roseola infantum). *Pediatrics* **93**: 104-108
- Bertelsen LB, Petersen CC, Kofod-Olsen E, Oster B, Hollsberg P, Agger R, Hokland M (2010) Human herpesvirus 6B induces phenotypic maturation without IL-10 and IL-12p70 production in dendritic cells. *Scandinavian journal of immunology* **71**: 431-439
- Berti R, Brennan MB, Soldan SS, Ohayon JM, Casareto L, McFarland HF, Jacobson S (2002) Increased detection of serum HHV-6 DNA sequences during multiple sclerosis (MS) exacerbations and correlation with parameters of MS disease progression. *Journal of neurovirology* **8**: 250-256

- Biberfeld P, Kramarsky B, Salahuddin SZ, Gallo RC (1987) Ultrastructural characterization of a new human B lymphotropic DNA virus (human herpesvirus 6) isolated from patients with lymphoproliferative disease. *Journal of the National Cancer Institute* **79**: 933-941
- Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* **329**: 506-512
- Black JB, Sanderlin KC, Goldsmith CS, Gary HE, Lopez C, Pellett PE (1989) Growth properties of human herpesvirus-6 strain Z29. *Journal of virological methods* **26**: 133-145
- Bogedain C, Wolf H, Modrow S, Stuber G, Jilg W (1995) Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *Journal of virology* **69**: 4872-4879
- Bouvier M, Wiley DC (1994) Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules. *Science* **265**: 398-402
- Braun DK, Dominguez G, Pellett PE (1997) Human herpesvirus 6. *Clinical microbiology reviews* **10**: 521-567
- Burrows SR, Silins SL, Moss DJ, Khanna R, Misko IS, Argaet VP (1995) T cell receptor repertoire for a viral epitope in humans is diversified by tolerance to a background major histocompatibility complex antigen. *The Journal of experimental medicine* **182**: 1703-1715
- Campadelli-Fiume G, Mirandola P, Menotti L (1999) Human herpesvirus 6: An emerging pathogen. *Emerging infectious diseases* **5**: 353-366
- Carrigan DR, Knox KK (1994) Human herpesvirus 6 (HHV-6) isolation from bone marrow: HHV-6-associated bone marrow suppression in bone marrow transplant patients. *Blood* **84**: 3307-3310
- Carrigan DR, Knox KK (1995) Bone marrow suppression by human herpesvirus-6: comparison of the A and B variants of the virus. *Blood* **86**: 835-836
- Caruso A, Rotola A, Comar M, Favilli F, Galvan M, Tosetti M, Campello C, Caselli E, Alessandri G, Grassi M, Garrafa E, Cassai E, Di Luca D (2002) HHV-6 infects human aortic and heart microvascular endothelial cells, increasing their ability to secrete proinflammatory chemokines. *Journal of medical virology* **67**: 528-533
- Caselli E, Di Luca D (2007) Molecular biology and clinical associations of Roseoloviruses human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7. *The new microbiologica* **30**: 173-187
- Cermelli C, Concari M, Carubbi F, Fabio G, Sabbatini AM, Pecorari M, Pietrosevoli P, Meacci M, Guicciardi E, Carulli N, Portolani M (1996) Growth of human herpesvirus 6 in HEPG2 cells. *Virus research* **45**: 75-85
- Chan PK, Ng HK, Hui M, Cheng AF (2001) Prevalence and distribution of human herpesvirus 6 variants A and B in adult human brain. *Journal of medical virology* **64**: 42-46
- Chapenko S, Millers A, Nora Z, Logina I, Kukaine R, Murovska M (2003) Correlation between HHV-6 reactivation and multiple sclerosis disease activity. *Journal of medical virology* **69**: 111-117
- Chen M, Popescu N, Woodworth C, Berneman Z, Corbellino M, Lusso P, Ablashi DV, DiPaolo JA (1994) Human herpesvirus 6 infects cervical epithelial cells and transactivates human papillomavirus gene expression. *Journal of virology* **68**: 1173-1178
- Clark DA (2000) Human herpesvirus 6. *Reviews in medical virology* **10**: 155-173

- Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, Tauro S, McDonald D, Osman H, Assenmacher M, Billingham L, Steward C, Crawley C, Olavarria E, Goldman J, Chakraverty R, Mahendra P, Craddock C, Moss PA (2005) Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *The Journal of experimental medicine* **202**: 379-386
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 2110-2114
- Collot S, Petit B, Bordessoule D, Alain S, Touati M, Denis F, Ranger-Rogez S (2002) Real-time PCR for quantification of human herpesvirus 6 DNA from lymph nodes and saliva. *Journal of clinical microbiology* **40**: 2445-2451
- Cone RW, Hackman RC, Huang ML, Bowden RA, Meyers JD, Metcalf M, Zeh J, Ashley R, Corey L (1993) Human herpesvirus 6 in lung tissue from patients with pneumonitis after bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine* **329**: 156-161
- Conrad H, Gebhard K, Kronig H, Neudorfer J, Busch DH, Peschel C, Bernhard H (2008) CTLs directed against HER2 specifically cross-react with HER3 and HER4. *J Immunol* **180**: 8135-8145
- Croft M, Swain SL (1991) B cell response to T helper cell subsets. II. Both the stage of T cell differentiation and the cytokines secreted determine the extent and nature of helper activity. *J Immunol* **147**: 3679-3689
- Dahl H, Fjaertoft G, Norsted T, Wang FZ, Mousavi-Jazi M, Linde A (1999) Reactivation of human herpesvirus 6 during pregnancy. *The Journal of infectious diseases* **180**: 2035-2038
- Davis MM, Bjorkman PJ (1988) T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**: 395-402
- Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y (1998) Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annual review of immunology* **16**: 523-544
- De Bolle L, Naesens L, De Clercq E (2005) Update on human herpesvirus 6 biology, clinical features, and therapy. *Clinical microbiology reviews* **18**: 217-245
- Deng Y YJ, Eisenlohr LC, Bennink JR (1997) MHC affinity, peptide liberation, T cell repertoire, and immunodominance all contribute to the paucity of MHC class I-restricted peptides recognized by antiviral CTL. *J Immunol: J Immunol.*
- Depoil D, Zaru R, Guiraud M, Chauveau A, Harriague J, Bismuth G, Utzny C, Muller S, Valitutti S (2005) Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* **22**: 185-194
- Dewhurst S, McIntyre K, Schnabel K, Hall CB (1993) Human herpesvirus 6 (HHV-6) variant B accounts for the majority of symptomatic primary HHV-6 infections in a population of U.S. infants. *Journal of clinical microbiology* **31**: 416-418
- Di Luca D, Mirandola P, Ravaioli T, Bigoni B, Cassai E (1996) Distribution of HHV-6 variants in human tissues. *Infectious agents and disease* **5**: 203-214
- Di Luca D, Mirandola P, Ravaioli T, Dolcetti R, Frigatti A, Bovenzi P, Sighinolfi L, Monini P, Cassai E (1995) Human herpesviruses 6 and 7 in salivary glands and shedding in saliva of healthy and human immunodeficiency virus positive individuals. *Journal of medical virology* **45**: 462-468

- DiBrino M, Parker KC, Shiloach J, Turner RV, Tsuchida T, Garfield M, Biddison WE, Coligan JE (1994) Endogenous peptides with distinct amino acid anchor residue motifs bind to HLA-A1 and HLA-B8. *J Immunol* **152**: 620-631
- Dockrell DH (2003) Human herpesvirus 6: molecular biology and clinical features. *Journal of medical microbiology* **52**: 5-18
- Dominguez G, Dambaugh TR, Stamey FR, Dewhurst S, Inoue N, Pellett PE (1999) Human herpesvirus 6B genome sequence: coding content and comparison with human herpesvirus 6A. *Journal of virology* **73**: 8040-8052
- Donati D, Akhyani N, Fogdell-Hahn A, Cermelli C, Cassiani-Ingoni R, Vortmeyer A, Heiss JD, Cogen P, Gaillard WD, Sato S, Theodore WH, Jacobson S (2003) Detection of human herpesvirus-6 in mesial temporal lobe epilepsy surgical brain resections. *Neurology* **61**: 1405-1411
- Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD (1993) The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**: 295-305
- Drobyski WR, Knox KK, Majewski D, Carrigan DR (1994) Brief report: fatal encephalitis due to variant B human herpesvirus-6 infection in a bone marrow-transplant recipient. *The New England journal of medicine* **330**: 1356-1360
- Duke RC (1989) Self recognition by T cells. I. Bystander killing of target cells bearing syngeneic MHC antigens. *The Journal of experimental medicine* **170**: 59-71
- Elkington R, Walker S, Crough T, Menzies M, Tellam J, Bharadwaj M, Khanna R (2003) Ex vivo profiling of CD8⁺-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *Journal of virology* **77**: 5226-5240
- Enders G, Biber M, Meyer G, Helftenbein E (1990) Prevalence of antibodies to human herpesvirus 6 in different age groups, in children with exanthema subitum, other acute exanthematous childhood diseases, Kawasaki syndrome, and acute infections with other herpesviruses and HIV. *Infection* **18**: 12-15
- Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A (1990) Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine* **172**: 1785-1794
- Falk CS SA, Schendel DJ. (1995) Expression of HLA-C molecules confers target cell resistance to some non-major histocompatibility complex-restricted T cells in a manner analogous to allospecific natural killer cells. *J Exp Med* 1005-1018.
- Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**: 290-296
- Flamand L, Gosselin J, Stefanescu I, Ablashi D, Menezes J (1995) Immunosuppressive effect of human herpesvirus 6 on T-cell functions: suppression of interleukin-2 synthesis and cell proliferation. *Blood* **85**: 1263-1271
- Flaswinkel H, Barner M, Reth M (1995) The tyrosine activation motif as a target of protein tyrosine kinases and SH2 domains. *Seminars in immunology* **7**: 21-27
- Fox JD, Briggs M, Ward PA, Tedder RS (1990) Human herpesvirus 6 in salivary glands. *Lancet* **336**: 590-593
- French C MP, Nicholson L, Macaulay H, DiLuca D, Gompels UA (1999) Novel, nonconsensus cellular splicing regulates expression of a gene encoding a chemokine-like protein that shows high variation and is specific for human herpesvirus 6. *Virology*: 139-151

- Fujinami RS, von Herrath MG, Christen U, Whitton JL (2006) Molecular mimicry, bystander activation, or viral persistence: infections and autoimmune disease. *Clinical microbiology reviews* **19**: 80-94
- Garboczi DN, Ghosh P, Utz U, Fan QR, Biddison WE, Wiley DC (1996) Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**: 134-141
- Garrone P, Neidhardt EM, Garcia E, Galibert L, van Kooten C, Banchereau J (1995) Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* **182**: 1265-1273
- Gerdemann U, Keirnan JM, Katari UL, Yanagisawa R, Christin AS, Huye LE, Perna SK, Ennamuri S, Gottschalk S, Brenner MK, Heslop HE, Rooney CM, Leen AM (2012) Rapidly generated multivirus-specific cytotoxic T lymphocytes for the prophylaxis and treatment of viral infections. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**: 1622-1632
- Gerdemann U, Keukens L, Keirnan JM, Katari UL, Nguyen CT, de Pagter AP, Ramos CA, Kennedy-Nasser A, Gottschalk SM, Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM, Leen AM (2013) Immunotherapeutic strategies to prevent and treat human herpesvirus 6 reactivation after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* **121**: 207-218
- Gilbert MJ, Riddell SR, Li CR, Greenberg PD (1993) Selective interference with class I major histocompatibility complex presentation of the major immediate-early protein following infection with human cytomegalovirus. *Journal of virology* **67**: 3461-3469
- Glosson NL, Hudson AW (2007) Human herpesvirus-6A and -6B encode viral immunoevasins that downregulate class I MHC molecules. *Virology* **365**: 125-135
- Gompels UA, Nicholas J, Lawrence G, Jones M, Thomson BJ, Martin ME, Efsthathiou S, Craxton M, Macaulay HA (1995) The DNA sequence of human herpesvirus-6: structure, coding content, and genome evolution. *Virology* **209**: 29-51
- Gordon S (1995) The macrophage. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **17**: 977-986
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology* **36**: 59-74
- Greenstone HL, Santoro F, Lusso P, Berger EA (2002) Human Herpesvirus 6 and Measles Virus Employ Distinct CD46 Domains for Receptor Function. *The Journal of biological chemistry* **277**: 39112-39118
- Grivel JC IY, Fagà G, Santoro F, Shaheen F, Malnati MS, Fitzgerald W, Lusso P, Margolis L. (2001) Suppression of CCR5- but not CXCR4-tropic HIV-1 in lymphoid tissue by human herpesvirus 6. *Nat Med*: 1232-1235.
- Grivel JC, Santoro F, Chen S, Faga G, Malnati MS, Ito Y, Margolis L, Lusso P (2003) Pathogenic effects of human herpesvirus 6 in human lymphoid tissue ex vivo. *Journal of virology* **77**: 8280-8289
- Hall CB, Long CE, Schnabel KC, Caserta MT, McIntyre KM, Costanzo MA, Knott A, Dewhurst S, Insel RA, Epstein LG (1994) Human herpesvirus-6 infection in children. A prospective study of complications and reactivation. *The New England journal of medicine* **331**: 432-438
- Harma M, Hockerstedt K, Lautenschlager I (2003) Human herpesvirus-6 and acute liver failure. *Transplantation* **76**: 536-539
- He J, McCarthy M, Zhou Y, Chandran B, Wood C (1996) Infection of primary human fetal astrocytes by human herpesvirus 6. *Journal of virology* **70**: 1296-1300

- Hentrich M, Oruzio D, Jager G, Schlemmer M, Schleuning M, Schiel X, Hiddemann W, Kolb HJ (2005) Impact of human herpesvirus-6 after haematopoietic stem cell transplantation. *British journal of haematology* **128**: 66-72
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology* **10**: 413-417
- Hislop AD, Annels NE, Gudgeon NH, Leese AM, Rickinson AB (2002) Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *The Journal of experimental medicine* **195**: 893-905
- Holdsworth R, Hurley CK, Marsh SG, Lau M, Noreen HJ, Kempenich JH, Setterholm M, Maiers M (2009) The HLA dictionary 2008: a summary of HLA-A, -B, -C, -DRB1/3/4/5, and -DQB1 alleles and their association with serologically defined HLA-A, -B, -C, -DR, and -DQ antigens. *Tissue antigens* **73**: 95-170
- Humar A, Kumar D, Caliendo AM, Moussa G, Ashi-Sulaiman A, Levy G, Mazzulli T (2002) Clinical impact of human herpesvirus 6 infection after liver transplantation. *Transplantation* **73**: 599-604
- Ihira M, Yoshikawa T, Suzuki K, Ohashi M, Suga S, Horibe K, Tanaka N, Kimura H, Kojima S, Kato K, Matsuyama T, Nishiyama Y, Asano Y (2002) Monitoring of active HHV-6 infection in bone marrow transplant recipients by real time PCR; comparison to detection of viral DNA in plasma by qualitative PCR. *Microbiology and immunology* **46**: 701-705
- Isegawa Y, Hara J, Amo K, Osugi Y, Takemoto M, Yamanishi K, Fukunaga R, Shibata M, Ohshima A, Horiguchi Y, Sugimoto N (2009) Human herpesvirus 6 ganciclovir-resistant strain with amino acid substitutions associated with the death of an allogeneic stem cell transplant recipient. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **44**: 15-19
- Isegawa Y, Mukai T, Nakano K, Kagawa M, Chen J, Mori Y, Sunagawa T, Kawanishi K, Sashihara J, Hata A, Zou P, Kosuge H, Yamanishi K (1999) Comparison of the complete DNA sequences of human herpesvirus 6 variants A and B. *Journal of virology* **73**: 8053-8063
- Isegawa Y, Ping Z, Nakano K, Sugimoto N, Yamanishi K (1998) Human herpesvirus 6 open reading frame U12 encodes a functional beta-chemokine receptor. *Journal of virology* **72**: 6104-6112
- Ishikawa K, Hasegawa K, Naritomi T, Kanai N, Ogawa M, Kato Y, Kobayashi M, Torii N, Hayashi N (2002) Prevalence of herpesviridae and hepatitis virus sequences in the livers of patients with fulminant hepatitis of unknown etiology in Japan. *Journal of gastroenterology* **37**: 523-530
- Isomura H, Yamada M, Yoshida M, Tanaka H, Kitamura T, Oda M, Nii S, Seino Y (1997) Suppressive effects of human herpesvirus 6 on in vitro colony formation of hematopoietic progenitor cells. *Journal of medical virology* **52**: 406-412
- Janelle ME, Flamand L (2006) Phenotypic alterations and survival of monocytes following infection by human herpesvirus-6. *Archives of virology* **151**: 1603-1614
- Janeway C (1989) Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0. *Immunology today* **10**: 283-286
- Janeway C, Jr., Medzhitov R (2000) Viral interference with IL-1 and toll signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10682-10683
- Jarrett RF, Clark DA, Josephs SF, Onions DE (1990) Detection of human herpesvirus-6 DNA in peripheral blood and saliva. *Journal of medical virology* **32**: 73-76

- Jelinek DF, Lipsky PE (1987) Regulation of human B lymphocyte activation, proliferation, and differentiation. *Advances in immunology* **40**: 1-59
- Jonuleit H, Schmitt E (2003) The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* **171**: 6323-6327
- Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ (2000) Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *The Journal of experimental medicine* **192**: 219-226
- Kempkes B, Pich D, Zeidler R, Sugden B, Hammerschmidt W (1995) Immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *Journal of virology* **69**: 231-238
- Kern F, Faulhaber N, Frommel C, Khatamzas E, Prosch S, Schonemann C, Kretzschmar I, Volkmer-Engert R, Volk HD, Reinke P (2000) Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *European journal of immunology* **30**: 1676-1682
- Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, Rickinson AB, Moss PA (2004) Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol* **173**: 7481-7489
- Khan N, Shariff N, Cobbold M, Bruton R, Ainsworth JA, Sinclair AJ, Nayak L, Moss PA (2002) Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* **169**: 1984-1992
- Knox KK, Carrigan DR (1992) In vitro suppression of bone marrow progenitor cell differentiation by human herpesvirus 6 infection. *The Journal of infectious diseases* **165**: 925-929
- Kondo K, Kondo T, Okuno T, Takahashi M, Yamanishi K (1991) Latent human herpesvirus 6 infection of human monocytes/macrophages. *The Journal of general virology* **72 (Pt 6)**: 1401-1408
- Lautenschlager I, Hockerstedt K, Linnavuori K, Taskinen E (1998) Human herpesvirus-6 infection after liver transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **26**: 702-707
- Leisegang M, Engels B, Meyerhuber P, Kieback E, Sommermeyer D, Xue SA, Reuss S, Stauss H, Uckert W (2008) Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. *Journal of molecular medicine* **86**: 573-583
- Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP (1991) Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annual review of immunology* **9**: 431-455
- Ljungman P, Wang FZ, Clark DA, Emery VC, Remberger M, Ringden O, Linde A (2000) High levels of human herpesvirus 6 DNA in peripheral blood leucocytes are correlated to platelet engraftment and disease in allogeneic stem cell transplant patients. *British journal of haematology* **111**: 774-781
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* **45**: 321-334
- Luka J, Okano M, Thiele G (1990) Isolation of human herpesvirus-6 from clinical specimens using human fibroblast cultures. *Journal of clinical laboratory analysis* **4**: 483-486
- Lundegaard C, Lamberth K, Harndahl M, Buus S, Lund O, Nielsen M (2008) NetMHC-3.0: accurate web accessible predictions of human, mouse and monkey MHC class I affinities for peptides of length 8-11. *Nucleic acids research* **36**: W509-512

- Lunemann JD, Huppke P, Roberts S, Bruck W, Gartner J, Munz C (2008a) Broadened and elevated humoral immune response to EBNA1 in pediatric multiple sclerosis. *Neurology* **71**: 1033-1035
- Lunemann JD, Jelcic I, Roberts S, Lutterotti A, Tackenberg B, Martin R, Munz C (2008b) EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *The Journal of experimental medicine* **205**: 1763-1773
- Luppi M, Barozzi P, Maiorana A, Marasca R, Torelli G (1994) Human herpesvirus 6 infection in normal human brain tissue. *The Journal of infectious diseases* **169**: 943-944
- Luppi M, Barozzi P, Morris C, Maiorana A, Garber R, Bonacorsi G, Donelli A, Marasca R, Tabilio A, Torelli G (1999) Human herpesvirus 6 latently infects early bone marrow progenitors in vivo. *Journal of virology* **73**: 754-759
- Lusso P (2006) HHV-6 and the immune system: mechanisms of immunomodulation and viral escape. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* **37 Suppl 1**: S4-10
- Lusso P, De Maria A, Malnati M, Lori F, DeRocco SE, Baseler M, Gallo RC (1991a) Induction of CD4 and susceptibility to HIV-1 infection in human CD8+ T lymphocytes by human herpesvirus 6. *Nature* **349**: 533-535
- Lusso P, Garzino-Demo A, Crowley RW, Malnati MS (1995) Infection of gamma/delta T lymphocytes by human herpesvirus 6: transcriptional induction of CD4 and susceptibility to HIV infection. *The Journal of experimental medicine* **181**: 1303-1310
- Lusso P, Malnati M, De Maria A, Balotta C, DeRocco SE, Markham PD, Gallo RC (1991b) Productive infection of CD4+ and CD8+ mature human T cell populations and clones by human herpesvirus 6. Transcriptional down-regulation of CD3. *J Immunol* **147**: 685-691
- Lusso P, Malnati MS, Garzino-Demo A, Crowley RW, Long EO, Gallo RC (1993) Infection of natural killer cells by human herpesvirus 6. *Nature* **362**: 458-462
- Lusso P, Markham PD, Tschachler E, di Marzo Veronese F, Salahuddin SZ, Ablashi DV, Pahwa S, Krohn K, Gallo RC (1988) In vitro cellular tropism of human B-lymphotropic virus (human herpesvirus-6). *The Journal of experimental medicine* **167**: 1659-1670
- Lycke E, Hamark B, Johansson M, Krotochwil A, Lycke J, Svennerholm B (1988) Herpes simplex virus infection of the human sensory neuron. An electron microscopy study. *Archives of virology* **101**: 87-104
- Manichanh C, Olivier-Aubron C, Lagarde JP, Aubin JT, Bossi P, Gautheret-Dejean A, Huraux JM, Agut H (2001) Selection of the same mutation in the U69 protein kinase gene of human herpesvirus-6 after prolonged exposure to ganciclovir in vitro and in vivo. *The Journal of general virology* **82**: 2767-2776
- Manley TJ, Luy L, Jones T, Boeckh M, Mutimer H, Riddell SR (2004) Immune evasion proteins of human cytomegalovirus do not prevent a diverse CD8+ cytotoxic T-cell response in natural infection. *Blood* **104**: 1075-1082
- Martin LK, Schub A, Dillinger S, Moosmann A (2012) Specific CD8(+) T cells recognize human herpesvirus 6B. *European journal of immunology* **42**: 2901-2912
- Medzhitov R, Janeway C, Jr. (2000) Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological reviews* **173**: 89-97
- Meier JT, Lewis SM (1993) P nucleotides in V(D)J recombination: a fine-structure analysis. *Molecular and cellular biology* **13**: 1078-1092

- Miller G, Lipman M (1973) Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **70**: 190-194
- Miller G, Shope T, Lisco H, Stitt D, Lipman M (1972) Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 383-387
- Milne RS, Mattick C, Nicholson L, Devaraj P, Alcami A, Gompels UA (2000) RANTES binding and down-regulation by a novel human herpesvirus-6 beta chemokine receptor. *J Immunol* **164**: 2396-2404
- Moosmann A, Bigalke I, Tischer J, Schirmann L, Kasten J, Tippmer S, Leeping M, Prevalsek D, Jaeger G, Ledderose G, Mautner J, Hammerschmidt W, Schendel DJ, Kolb HJ (2010) Effective and long-term control of EBV PTLD after transfer of peptide-selected T cells. *Blood* **115**: 2960-2970
- Mori Y, Yamanishi K (2007) HHV-6A, 6B, and 7: pathogenesis, host response, and clinical disease. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, Moore PS, Roizman B, Whitley R, Yamanishi K (eds). Cambridge
- Mori Y, Yang X, Akkapaiboon P, Okuno T, Yamanishi K (2003) Human herpesvirus 6 variant A glycoprotein H-glycoprotein L-glycoprotein Q complex associates with human CD46. *Journal of virology* **77**: 4992-4999
- Mosmann TR, Coffman RL (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual review of immunology* **7**: 145-173
- Mosmann TR, Li L, Hengartner H, Kagi D, Fu W, Sad S (1997) Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Foundation symposium* **204**: 148-154; discussion 154-148
- Moss P, Rickinson A (2005) Cellular immunotherapy for viral infection after HSC transplantation. *Nature reviews Immunology* **5**: 9-20
- Mukai T, Yamamoto T, Kondo T, Kondo K, Okuno T, Kosuge H, Yamanishi K (1994) Molecular epidemiological studies of human herpesvirus 6 in families. *Journal of medical virology* **42**: 224-227
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *Journal of virology* **67**: 6025-6032
- Nastke MD, Becerra A, Yin L, Dominguez-Amorocho O, Gibson L, Stern LJ, Calvo-Calle JM (2012) Human CD4+ T cell response to human herpesvirus 6. *Journal of virology* **86**: 4776-4792
- Niederman JC, Liu CR, Kaplan MH, Brown NA (1988) Clinical and serological features of human herpesvirus-6 infection in three adults. *Lancet* **2**: 817-819
- O'Garra A, Arai N (2000) The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in cell biology* **10**: 542-550
- Ogawa-Goto K, Tanaka K, Gibson W, Moriishi E, Miura Y, Kurata T, Irie S, Sata T (2003) Microtubule network facilitates nuclear targeting of human cytomegalovirus capsid. *Journal of virology* **77**: 8541-8547
- Ohashi M, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Asano Y, Yoshikawa T, Saito Y, Sakui H (2001) Transfer of human herpesvirus 6 and 7 antibodies from mothers to their offspring. *The Pediatric infectious disease journal* **20**: 449-450
- Okuno T, Takahashi K, Balachandra K, Shiraki K, Yamanishi K, Takahashi M, Baba K (1989) Seroepidemiology of human herpesvirus 6 infection in normal children and adults. *Journal of clinical microbiology* **27**: 651-653

- Oster B, Hollsberg P (2002) Viral gene expression patterns in human herpesvirus 6B-infected T cells. *Journal of virology* **76**: 7578-7586
- Ozaki Y, Tajiri H, Tanaka-Taya K, Mushiake S, Kimoto A, Yamanishi K, Okada S (2001) Frequent detection of the human herpesvirus 6-specific genomes in the livers of children with various liver diseases. *Journal of clinical microbiology* **39**: 2173-2177
- Pamer EG, Harty JT, Bevan MJ (1991) Precise prediction of a dominant class I MHC-restricted epitope of *Listeria monocytogenes*. *Nature* **353**: 852-855
- Parker DC (1993) The functions of antigen recognition in T cell-dependent B cell activation. *Seminars in immunology* **5**: 413-420
- Parker KC, Biddison WE, Coligan JE (1994) Pocket mutations of HLA-B27 show that anchor residues act cumulatively to stabilize peptide binding. *Biochemistry* **33**: 7736-7743
- Pepperl S, Munster J, Mach M, Harris JR, Plachter B (2000) Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *Journal of virology* **74**: 6132-6146
- Pepperl-Klindworth S, Frankenberg N, Riegler S, Plachter B (2003) Protein delivery by subviral particles of human cytomegalovirus. *Gene therapy* **10**: 278-284
- Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A (2004) Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* **313**: 856-862
- Rammensee H, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, Stevanovic S (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* **50**: 213-219
- Rammensee HG, Falk K, Rotzschke O (1993) Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annual review of immunology* **11**: 213-244
- Rapaport D, Engelhard D, Tagger G, Or R, Frenkel N (2002) Antiviral prophylaxis may prevent human herpesvirus-6 reactivation in bone marrow transplant recipients. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society* **4**: 10-16
- Rapp JC, Krug LT, Inoue N, Dambaugh TR, Pellett PE (2000) U94, the human herpesvirus 6 homolog of the parvovirus nonstructural gene, is highly conserved among isolates and is expressed at low mRNA levels as a spliced transcript. *Virology* **268**: 504-516
- Razonable RR, Fanning C, Brown RA, Espy MJ, Rivero A, Wilson J, Kremers W, Smith TF, Paya CV (2002) Selective reactivation of human herpesvirus 6 variant a occurs in critically ill immunocompetent hosts. *The Journal of infectious diseases* **185**: 110-113
- Riddell SR, Rabin M, Geballe AP, Britt WJ, Greenberg PD (1991) Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* **146**: 2795-2804
- Robinson DS OGA (2002) Further checkpoints in Th1 development. *Immunity*: 755-758.
- Rooney CM, Smith CA, Ng CY, Loftin SK, Sixbey JW, Gan Y, Srivastava DK, Bowman LC, Krance RA, Brenner MK, Heslop HE (1998) Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* **92**: 1549-1555

- Rotola A, Ravaoli T, Gonelli A, Dewhurst S, Cassai E, Di Luca D (1998) U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 13911-13916
- Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG (1991) Exact prediction of a natural T cell epitope. *European journal of immunology* **21**: 2891-2894
- Roush KS, Domiati-Saad RK, Margraf LR, Krisher K, Scheuermann RH, Rogers BB, Dawson DB (2001) Prevalence and cellular reservoir of latent human herpesvirus 6 in tonsillar lymphoid tissue. *American journal of clinical pathology* **116**: 648-654
- Rowen L, Koop BF, Hood L (1996) The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus. *Science* **272**: 1755-1762
- Salahuddin SZ, Ablashi DV, Markham PD, Josephs SF, Sturzenegger S, Kaplan M, Halligan G, Biberfeld P, Wong-Staal F, Kramarsky B, et al. (1986) Isolation of a new virus, HBLV, in patients with lymphoproliferative disorders. *Science* **234**: 596-601
- Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P (1999) CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* **99**: 817-827
- Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC (1991) Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *Journal of molecular biology* **219**: 277-319
- Savolainen H, Lautenschlager I, Piiparinen H, Saarinen-Pihkala U, Hovi L, Vettenranta K (2005) Human herpesvirus-6 and -7 in pediatric stem cell transplantation. *Pediatric blood & cancer* **45**: 820-825
- Schirmer EC, Wyatt LS, Yamanishi K, Rodriguez WJ, Frenkel N (1991) Differentiation between two distinct classes of viruses now classified as human herpesvirus 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 5922-5926
- Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C (2009) Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Human immunology* **70**: 895-902
- Schub A (2009) Herpesvirusspezifische T-Zellen für die Immuntherapie: Von ihrer Identifikation zum Transfer ihrer Spezifität. In *Fakultät für Chemie und Pharmazie (München, Ludwig-Maximilians-Universität)*
- Schub A, Schuster IG, Hammerschmidt W, Moosmann A (2009) CMV-specific TCR-transgenic T cells for immunotherapy. *J Immunol* **183**: 6819-6830
- Schust DJ, Tortorella D, Seebach J, Phan C, Ploegh HL (1998) Trophoblast class I major histocompatibility complex (MHC) products are resistant to rapid degradation imposed by the human cytomegalovirus (HCMV) gene products US2 and US11. *The Journal of experimental medicine* **188**: 497-503
- Schuster IG, Busch DH, Eppinger E, Kremmer E, Milosevic S, Hennard C, Kuttler C, Ellwart JW, Frankenberger B, Nossner E, Salat C, Bogner C, Borkhardt A, Kolb HJ, Krackhardt AM (2007) Allorestricted T cells with specificity for the FMNL1-derived peptide PP2 have potent antitumor activity against hematologic and other malignancies. *Blood* **110**: 2931-2939
- Scotet E, David-Ameline J, Peyrat MA, Moreau-Aubry A, Pinczon D, Lim A, Even J, Semana G, Berthelot JM, Breathnach R, Bonneville M, Houssaint E (1996) T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. *The Journal of experimental medicine* **184**: 1791-1800

- Shimizu Y DR (1989) Production of human cells expressing individual transferred HLA-A, -B, -C genes using an HLA-A, -B, -C null human cell line. *J Immunol*: 3320-3328.
- Singh N, Carrigan DR (1996) Human herpesvirus-6 in transplantation: an emerging pathogen. *Annals of internal medicine* **124**: 1065-1071
- Singh N, Paterson DL (2000) Encephalitis caused by human herpesvirus-6 in transplant recipients: relevance of a novel neurotropic virus. *Transplantation* **69**: 2474-2479
- Smith A, Santoro F, Di Lullo G, Dagna L, Verani A, Lusso P (2003) Selective suppression of IL-12 production by human herpesvirus 6. *Blood* **102**: 2877-2884
- Snell GD (1964) Methods for Study of Histocompatibility Genes and Isoantigens. *Methods in medical research* **10**: 1-7
- Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, Patnaik M, Jacobson S (1997) Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nature medicine* **3**: 1394-1397
- Steinle A, Reinhardt C, Jantzer P, Schendel DJ (1995) In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: evidence for maintenance of an oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *The Journal of experimental medicine* **181**: 503-513
- Stevanovic S, Jung G (1993) Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Analytical biochemistry* **212**: 212-220
- Suga S, Suzuki K, Ihira M, Furukawa H, Yoshikawa T, Asano Y (1998) [Clinical features of primary HHV-6 and HHV-7 infections]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine* **56**: 203-207
- Suga S, Yoshikawa T, Asano Y, Kozawa T, Nakashima T, Kobayashi I, Yazaki T, Yamamoto H, Kajita Y, Ozaki T, et al. (1993) Clinical and virological analyses of 21 infants with exanthem subitum (roseola infantum) and central nervous system complications. *Annals of neurology* **33**: 597-603
- Suhrbier A, Schmidt C, Fernan A (1993) Prediction of an HLA B8-restricted influenza epitope by motif. *Immunology* **79**: 171-173
- Sullivan BM, Coscoy L (2008) Downregulation of the T-cell receptor complex and impairment of T-cell activation by human herpesvirus 6 u24 protein. *Journal of virology* **82**: 602-608
- Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ (2005) Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *The Journal of experimental medicine* **202**: 673-685
- Takahashi K, Sonoda S, Higashi K, Kondo T, Takahashi H, Takahashi M, Yamanishi K (1989) Predominant CD4 T-lymphocyte tropism of human herpesvirus 6-related virus. *Journal of virology* **63**: 3161-3163
- Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, Hansasuta P, O'Callaghan CA, Rowland-Jones S, McMichael AJ, Rickinson AB, Callan MF (1999) A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* **162**: 1827-1835
- Tanaka-Taya K, Kondo T, Mukai T, Miyoshi H, Yamamoto Y, Okada S, Yamanishi K (1996) Seroepidemiological study of human herpesvirus-6 and -7 in children of different ages and detection of these two viruses in throat swabs by polymerase chain reaction. *Journal of medical virology* **48**: 88-94

- Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Killian JM, Zhang JZ (2002) Detection of viral DNA and immune responses to the human herpesvirus 6 101-kilodalton virion protein in patients with multiple sclerosis and in controls. *Journal of virology* **76**: 6147-6154
- Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ (2003) Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis. *Annals of neurology* **53**: 189-197
- Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, Ohta H, Matsuda Y, Fujisaki H, Sawada A, Kim JY, Sashihara J, Amou K, Miyagawa H, Tanaka-Taya K, Yamanishi K, Okada S (2002) Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone marrow transplantation* **29**: 595-598
- Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* **302**: 575-581
- Tonegawa S (1988) Antibody and T-cell receptors. *JAMA : the journal of the American Medical Association* **259**: 1845-1847
- Tsao EH, Kellam P, Sin CS, Rasaiyaah J, Griffiths PD, Clark DA (2009) Microarray-based determination of the lytic cascade of human herpesvirus 6B. *The Journal of general virology* **90**: 2581-2591
- Tuddenham L, Jung JS, Chane-Woon-Ming B, Dolken L, Pfeffer S (2012) Small RNA deep sequencing identifies microRNAs and other small noncoding RNAs from human herpesvirus 6B. *Journal of virology* **86**: 1638-1649
- Uckert W, Becker C, Gladow M, Klein D, Kammertoens T, Pedersen L, Blankenstein T (2000) Efficient gene transfer into primary human CD8+ T lymphocytes by MuLV-10A1 retrovirus pseudotype. *Human gene therapy* **11**: 1005-1014
- van Loon NM, Gummuluru S, Sherwood DJ, Marentes R, Hall CB, Dewhurst S (1995) Direct sequence analysis of human herpesvirus 6 (HHV-6) sequences from infants and comparison of HHV-6 sequences from mother/infant pairs. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **21**: 1017-1019
- Versteegen JM LT, Ballieux RE. (1988) Enumeration of IFN-gamma-producing human lymphocytes by spot-ELISA. A method to detect lymphokine-producing lymphocytes at the single-cell level. *J Immunol Methods*: 25-29
- Wang FZ, Dahl H, Linde A, Brytting M, Ehrnst A, Ljungman P (1996) Lymphotropic herpesviruses in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* **88**: 3615-3620
- Wang FZ, Dahl H, Ljungman P, Linde A (1999) Lymphoproliferative responses to human herpesvirus-6 variant A and variant B in healthy adults. *Journal of medical virology* **57**: 134-139
- Wang FZ LA, Hägglund H, Testa M, Locasciulli A, Ljungman P. (1999) Human herpesvirus 6 DNA in cerebrospinal fluid specimens from allogeneic bone marrow transplant patients: does it have clinical significance? *Clin Infect Dis*: :562-568.
- Wiesner M, Zentz C, Mayr C, Wimmer R, Hammerschmidt W, Zeidler R, Moosmann A (2008) Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PLoS one* **3**: e1464
- Wilborn F, Schmidt CA, Brinkmann V, Jendroska K, Oettle H, Siegert W (1994) A potential role for human herpesvirus type 6 in nervous system disease. *Journal of neuroimmunology* **49**: 213-214
- Wucherpfennig KW (2001) Structural basis of molecular mimicry. *Journal of autoimmunity* **16**: 293-302

- Yakushijin Y, Yasukawa M, Kobayashi Y (1991) T-cell immune response to human herpesvirus-6 in healthy adults. *Microbiology and immunology* **35**: 655-660
- Yakushijin Y, Yasukawa M, Kobayashi Y (1992) Establishment and functional characterization of human herpesvirus 6-specific CD4+ human T-cell clones. *Journal of virology* **66**: 2773-2779
- Yamanishi K, Okuno T, Shiraki K, Takahashi M, Kondo T, Asano Y, Kurata T (1988) Identification of human herpesvirus-6 as a causal agent for exanthem subitum. *Lancet* **1**: 1065-1067
- Yasukawa M, Yakushijin Y, Furukawa M, Fujita S (1993) Specificity analysis of human CD4+ T-cell clones directed against human herpesvirus 6 (HHV-6), HHV-7, and human cytomegalovirus. *Journal of virology* **67**: 6259-6264
- Yoshida M, Yamada M, Tsukazaki T, Chatterjee S, Lakeman FD, Nii S, Whitley RJ (1998) Comparison of antiviral compounds against human herpesvirus 6 and 7. *Antiviral research* **40**: 73-84
- Yoshikawa T (2003) Human herpesvirus-6 and -7 infections in transplantation. *Pediatric transplantation* **7**: 11-17
- Yoshikawa T, Ihira M, Suzuki K, Suga S, Iida K, Saito Y, Asonuma K, Tanaka K, Asano Y (2000) Human herpesvirus 6 infection after living related liver transplantation. *Journal of medical virology* **62**: 52-59
- Yoshikawa T, Kojima S, Asano Y (1992) Human herpesvirus-6 infection and bone marrow transplantation. *Leukemia & lymphoma* **8**: 65-73
- Zentz C, Wiesner M, Man S, Frankenberger B, Wollenberg B, Hillemanns P, Zeidler R, Hammerschmidt W, Moosmann A (2007) Activated B cells mediate efficient expansion of rare antigen-specific T cells. *Human immunology* **68**: 75-85
- Zerr DM (2006) Human herpesvirus 6: a clinical update. *Herpes : the journal of the IHMF* **13**: 20-24
- Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nguy L, Boeckh M (2005) Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **40**: 932-940
- Zhao J, Fan H, Mu G, Shen X, Cheng X (1997) Detection of human herpesvirus 6(HHV-6) DNA in salivary glands by the polymerase chain reaction. *Chinese medical sciences journal = Chung-kuo i hsueh k'o hsueh tsa chih / Chinese Academy of Medical Sciences* **12**: 126-128
- Zhou D, Srivastava R, Grummel V, Cepok S, Hartung HP, Hemmer B (2006) High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **86**: 314-321
- Zou P, Isegawa Y, Nakano K, Haque M, Horiguchi Y, Yamanishi K (1999) Human herpesvirus 6 open reading frame U83 encodes a functional chemokine. *Journal of virology* **73**: 5926-5933

9. Danksagung

Zu guter letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt dabei

... insbesondere **Dr. Andreas Moosmann** für die Vergabe dieses interessanten Projekts, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und die unermüdliche Unterstützung bei der Lösung aller Probleme.

... **Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt** für die Übernahme der offiziellen Betreuung und für sein Interesse an meiner Arbeit.

... **Prof. Dr. Horst Domdey** dafür, dass er sich als Gutachter dieser Arbeit zur Verfügung gestellt hat und somit die offizielle Betreuung meiner Doktorarbeit seitens der Universität übernommen hat.

... allen **freiwilligen Blutspender**, ohne die meine Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

... meiner Masterstudentin **Anna Stahuber** für die gute Zusammenarbeit.

... meinen Laborkollegen **Judith, Chiara, Viet A, Steffi** und **Gabor** für die schöne gemeinsame Zeit und die tollen Betriebsausflüge.

... **Leah**, die jederzeit ein offenes Ohr hatte und in allen Lebenslagen immer hinter mir stand.

..., „Master“ **Simon alias „Der Kollege“**, der stets für jedes Problemchen eine Lösung hatte und der mir geholfen hat die kleinen und großen Katastrophen des Laboralltags mit seinem ganz speziellen Humor zu überstehen.

... **Xiaoling**, für die gemeinsame Zeit im „Exil“ und die vielen Diskussionen vor allem gegen Ende dieses Projekts.

... **Andrea**, die immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mich vor allem in der Anfangsphase dieses Projekts sehr unterstützt hat.

... meinen **Freunden** und meiner **Familie**, die mich unterstützt und immer wieder aufgebaut haben.

... und **Christoph**.