

1. Einleitung

1.1 Die Immunantwort gegen virale Infektionen

Die Immunantwort setzt sich aus vielen Arten von Zellen mit unterschiedlichsten Funktionen zusammen. Diese können grob in die angeborene und die adaptive Immunantwort eingeordnet werden. Zu den Zellen der **angeborenen Immunantwort** zählen NK-Zellen (Natürliche Killer Zellen), Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten. Sie stellen die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen dar und sind unspezifisch vor allem gegen mikrobielle Strukturen gerichtet. Sie sind sehr vielseitig und schnell einsetzbar, dafür aber wenig anpassungsfähig. Die erweiterte Kontrolle von Infektionen erfolgt durch die Zellen der **adaptiven Immunantwort**. Diese Antwort ist gezielt gegen spezifische pathogene Strukturen (Antigene) gerichtet und besteht aus T-Lymphozyten und B-Lymphozyten. Die adaptive Immunantwort gegen einen Erreger entwickelt sich erst während einer Infektion. Darum erlaubt nur das Zusammenspiel beider Antworten einen adäquaten Schutz, wobei die angeborene Immunantwort die ungehinderte Ausbreitung des Erregers zu Beginn verhindert und der adaptive Teil später die Infektion kontrolliert. Nach der Kontrolle der Infektion bleiben einige Zellen der adaptiven Immunantwort als Gedächtniszellen erhalten, sodass bei erneutem Kontakt mit demselben Erreger eine schnellere und effizientere Reaktion möglich ist.

In der Abwehr der meisten viralen Infektionen spielen T-Zellen als Teil der adaptiven Immunantwort eine entscheidende Rolle. Dies wird vor allem bei Personen mit angeborenen oder erworbenen T-Zelldefekten deutlich. Personen mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID) besitzen keine funktionellen T-Zellen und leiden häufig an schweren, zum Teil lebensbedrohlichen viralen Infekten (1).

Die Gesamtpopulation der T-Lymphozyten lässt sich mit Hilfe der Oberflächenmarker CD4 und CD8 in zwei Gruppen unterteilen. CD8⁺-T-Zellen haben vor allem zytotoxische Effektoreigenschaften (CTLs), können aber auch durch regulatorische Eigenschaften eine Immunantwort kontrollieren (2). CTLs werden als besonders wichtig für die Kontrolle von viralen Infektionen betrachtet (3, 4), da sie infizierte Wirtszellen lysieren bevor diese in der Lage sind, infektiöse Partikel zu produzieren (5). Die Lyse wird über die Ausschüttung von zytotoxischen Molekülen wie Perforin und Granzym oder über die Interaktion von Fas/Fas-Ligand vermittelt (6). CD4⁺-T-Zellen haben eine wichtige Funktion bei der Induktion und

Kontrolle einer Immunantwort (Th-Lymphozyten; regulatorische T-Zellen). Sie sind aber auch in der Lage infizierte Wirtszellen zu lysieren (7; 8). Die Hauptfunktion der Th-Lymphozyten ist die Sezernierung von proinflammatorischen Molekülen wie Interferon- γ (IFN- γ), Tumornecrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-2 (IL-2). Diese wirken sowohl lokal als auch systemisch und dienen zum Teil direkt der Virusbekämpfung, aber hauptsächlich zur Koordination der Immunantwort. Regulatorische T-Zellen (Tregs) sind in der Lage über die Ausschüttung von inhibitorischen Substanzen wie Interleukin-10 (IL-10) sowie durch Zell-Zell-Kontakt die spezifische Funktion und das Wachstum von Effektorzellen negativ zu beeinflussen (9). Dadurch wird in der Regel eine erregerspezifische Immunantwort auf ein angemessenes Niveau begrenzt.

Der Funktion von CD8⁺- und CD4⁺-Zellen geht eine spezifische Aktivierung über den T-Zellrezeptor voraus. Dieser erkennt spezifische Antigene, die in passenden Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC-Komplexen) auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Diese MHC-Komplexe werden durch humane Leukozytenantigen-Moleküle (HLA-Moleküle) genetisch kodiert. Der MHC-Komplex eines Menschen setzt sich aus der Kombination verschiedener HLA-Moleküle zusammen und diese ist so individuell wie ein Fingerabdruck. CD8⁺-Zellen erkennen nur Antigene, die in MHC-I-Komplexen gebunden sind. Diese können von fast allen Körperzellen gebildet werden. Die Bildung von antigenbeladenen MHC-I-Komplexen geschieht über die Degradierung von endogen gebildeten Proteinen (z.B. virale Antigene in infizierten Wirtszellen) zu Peptiden von 8-12 Aminosäuren (AS), optimalerweise 9 AS Länge. Diese werden intrazellulär in den MHC-I-Komplex geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert. (10). CD4⁺-Zellen werden durch Antigene in MHC-II-Komplexen aktiviert. Diese werden nur von professionell antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie dendritischen Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen exprimiert. MHC-II-Komplexe präsentieren exogene Antigene, die nach Aufnahme zu 12-19 AS langen Peptidfragmenten verdaut werden.

Der Antigen-MHC-Komplex wird als Epitop bezeichnet. Die Erkennung des Epitops durch den T-Zellrezeptor ist hoch spezifisch. So besitzt jeder T-Zellklon einen individuellen Rezeptor, der mit bestimmter Affinität an das Epitop bindet. Es können mehrere Klone gegen dasselbe Epitop gerichtet sein, die sich in ihrer Affinität unterscheiden.

Nach dem Antigenkontakt entstehen aus naiven T-Zellen Effektorzellen, die durch ihre Funktion die virale Infektion kontrollieren. Anschließend entwickelt sich ein Teil dieser Zellen zu Gedächtniszellen weiter, die eine langfristige Immunität ermöglichen.

B-Zellen spielen in der Bekämpfung vieler viraler Infektionen vor allem bei Primärinfektionen eine Rolle (11, 12). Sie produzieren Antikörper gegen Antigene, die durch den B-Zellrezeptor erkannt werden. Antikörper inaktivieren hauptsächlich extrazelluläre Partikeln. Sobald also ein Virus in die Wirtszelle vorgedrungen ist und dort persistiert, sind Antikörper wirkungslos, da körpereigene (autologe) Zellen vor der komplementvermittelten Lyse geschützt sind. Darum ist auch die Verabreichung von spezifischen Antikörpern nur mit geringem Erfolg in der Behandlung von etablierten viralen Infektionen verbunden (13). Neben B- und T-Zellen besitzen NK-Zellen ebenfalls antivirale Eigenschaften (14, 15). Ihre explizite Rolle bei der Kontrolle von viralen Infektionen ist allerdings noch unklar.

1.2 Das Zytomegalovirus

1.2.1 Aufbau

Das Zytomegalovirus (CMV) gehört zur Familie der β -Herpesviren. Es ist das größte Mitglied dieser Familie und formt Partikeln von 150-180 nm Durchmesser. Diese bestehen aus doppelsträngiger umhüllter DNA. Die virale DNA hat eine Größe von ca. 235 Kilobasen und kodiert für etwa 180 Proteine. Die Expressionskinetik der viralen Gene wird in die Phasen I-III (immediate early, early und late) unterteilt. Die Gene der Phase I kodieren Proteine, die an der Transkription der early Proteine beteiligt sind. Zu ihnen gehören immediate early 1 und 2 (IE-1 und IE-2). Phase II Proteine sind hauptsächlich für die Replikation der viralen DNA zuständig. Zu ihnen gehören u.a. die gut untersuchten Proteine Thymidinkinase und virale DNA Polymerase. Proteine der Phase III haben hauptsächlich strukturbildende Eigenschaften. Ein Vertreter dieser Gruppe ist das immundominante Phosphoprotein (pp) 65 (16). Die Proteine der Phase I können schon 1-3 Stunden nach Infektion im Zellkern nachgewiesen werden (17). Gene der Phasen II und III erscheinen hingegen erst nach 6-24 Stunden im Zellkern und Zytoplasma. Die virale DNA wird von drei Schichten umgeben: dem Kapsid, der Matrix und der äußeren Hülle (Abbildung 1). Das Kapsid umschließt die DNA und ist icosaedrisch geformt. Die Matrix umschließt das Kapsid und ist wiederum von der äußeren Hülle umgeben. Die Matrix besteht hauptsächlich aus den Proteinen pp150, pp65 und pp71, die transkriptionale oder bisher unbekannte Funktionen haben. Die äußere Hülle besteht aus Teilen der Zellkern- und Zytoplasmamembran der Wirtszelle und ist mit mindestens 33

viralen Glykoproteinen durchsetzt. Die Zusammensetzung der Glykoproteine bestimmt den Stamm des Zytomegalovirus (18).

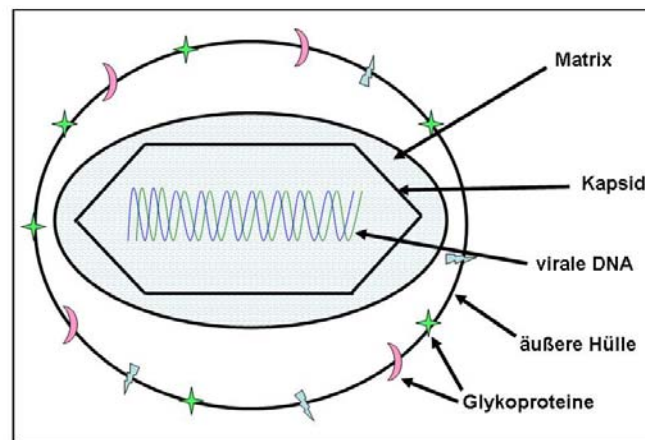


Abb. 1: Aufbau eines CMV-Virions

1.2.2 Epidemiologie

CMV ist ein streng speziesspezifisches Virus und die humane Variante (HCMV) ist weltweit endemisch. Es existieren weitere Varianten wie das murine (MCMV) oder das Rhesusaffen CMV, deren Eigenschaften sich stark ähneln und somit Studien im Tiermodell ermöglichen. Nach Primärinfektion entwickelt das Zytomegalovirus einen latenten Zustand und persistiert unbeschränkt im Körper des Wirtes (19). Dies geschieht in so genannten Reservoirzellen, zu denen $CD34^+$ hämopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark sowie $CD13^+$ - und $CD14^+$ -Zellen im Blut gehören (20-23). In diesem Zustand stellt das CMV keine Gefahr für den Wirt dar und ist auch nicht infektiös. Die Latenz wird durch Reaktivierungen, die u.a. durch Stress ausgelöst werden können, regelmäßig unterbrochen (24). In diesem Zustand verbreitet sich das Virus horizontal über Speichel, Urin und genitale Ausscheidungen oder vertikal über die Plazenta. Zusätzlich ist allgemein eine iatrogene Verbreitung durch Bluttransfusionen, Organ- und Stammzelltransplantationen möglich. Die Durchseuchungsrate mit CMV ist regional bedingt und wird weltweit auf 40-90% geschätzt, wobei der Schwerpunkt der Verbreitung in den Entwicklungsländern liegt (25). Die Wahrscheinlichkeit mit CMV-infiziert zu werden, ist in der frühen Kindheit und der späten Jugend am höchsten. Kinder werden häufig schon vor der Geburt über die Mutter angesteckt (26). Des Weiteren ist eine Infizierung durch Kontakt mit Gleichaltrigen über Speichel oder Urin möglich. In der späten Jugend erfolgt die Übertragung hauptsächlich durch sexuellen Kontakt (27).

1.2.3 Infektionen in gesunden Personen

In gesunden Personen werden primäre Infektionen oder Reaktivierungen durch das Immunsystem kontrolliert und verlaufen in der Regel asymptomatisch (28). Hierbei spielen T-Lymphozyten bei der Kontrolle der Infektion eine Schlüsselrolle. Es ist durch Depletionsexperimente im Mausmodell bekannt, dass sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zellen für eine effiziente CMV-Kontrolle von Bedeutung sind (29-31).

CMV-spezifische T-Zellen können im Blut von älteren Menschen einen Gesamtanteil von bis zu 50% erreichen (32). Diese T-Zellen sind gegen eine Vielzahl von viralen Proteinen gerichtet, wobei einige wenige stark dominant sind (33). Zu diesen zählen gB, pp65 und IE-1 (16, 34-36). Die Antigene, die durch die Prozessierung dieser Proteine entstehen, rufen T-Zellantworten mit vielen Einzelklonalitäten hervor (37, 38). Die Klone unterscheiden sich in der Affinität ihres T-Zellrezeptors zum Antigen-MHC-Komplex. Analysen mittels PCR-basierter Spektrotypisierung ergaben, dass T-Zellantworten gegen CMV-Antigene über die Zeit von sehr vielen Klonalitäten auf einige wenige zusammenschrumpfen (39). Dies wird mit der hohen Replikation von CMV-spezifischen T-Zellen erklärt, die mit den ständigen viralen Reaktivierungen assoziiert ist. Dadurch erreichen viele Klone das Ende ihrer Lebensspanne und sterben aus. Die hohe Replikation von CMV-spezifischen T-Zellen wird durch Analysen von Differenzierungsmarkern wie CD27/28 und CD45RA/45RO auf deren Oberfläche bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass CMV-spezifische T-Zellklone nach primärer Infektion einen frühen und in latenten Stadien einen späten Differenzierungsstatus aufweisen (38, 40). Die Entwicklung vom frühen zum späten Differenzierungsstatus ist mit intensiver Proliferation verbunden. Diese späten Effektorzellen sind nur noch eingeschränkt in der Lage zu proliferieren, weisen dafür aber eine hohe antivirale Funktion auf, da sie große Mengen Perforin, IFN- γ und IL-2 sezernieren (41-43).

Trotz der ausgeprägten T-Zellantwort gegen CMV ist das Virus in der Lage auf unbestimmte Zeit latent im Wirt zu persistieren. Dazu besitzt das Virus diverse Immunevasionsmechanismen, die mit verschiedenen Bestandteilen des Immunsystems interagieren und somit die völlige Eliminierung verhindern. So verhindert CMV die Aktivierung von T-Lymphozyten durch die Paralyse von dendritischen Zellen (44, 45) oder durch die Reduktion von MHC-I und II-Komplexen auf der Oberfläche von APCs (46, 47). Außerdem entgeht es der CD8⁺-T-Zell vermittelten Lyse durch die Blockade der Präsentation von viralen Antigenen (48). CMV kann auch direkt aktivierte T-Lymphozyten beeinflussen. Dies findet über die Sekretion eines IL-10-Analogons (vIL-10) oder über die Induktion von apoptotischen Molekülen auf der Oberfläche von dendritischen Zellen statt (45, 49). All diese

komplexen Evasionsmechanismen belegen die Notwendigkeit einer stark ausgeprägten T-Zellantwort, um eine Kontrolle von CMV-Infektionen zu gewährleisten.

1.2.4 Infektionen in immuninkompetenten Patienten

In Personen mit eingeschränkter Immunität kommt es häufig zu schweren CMV-Erkrankungen und Folgekomplikationen aufgrund von viralen Reaktivierungen. Dies sind vor allem Neugeborene mit unreifer Immunität, Personen mit genetischen oder erworbenen Immundefekten (vor allem HIV) sowie therapeutisch Immunsupprimierte nach solider Organ- (SOT-) oder Stammzelltransplantation (HSCT).

Nach der Geburt leidet ca. 1% der **Neugeborenen** an pränatalen CMV-Infektionen. Damit handelt es sich um die häufigste Neugeboreneninfektion. Bei schätzungsweise 10% aller CMV-Infektionen kommt es zu Erkrankungen wie Hepatosplenomegalie, Mikrocephalie, Chorioretinitis und Hautirritationen wie Petechien oder Rötung. Diese Symptome werden als CID (cytomegalic inclusion disease) bezeichnet, welches häufig zu neuronalen Folgeschädigungen wie geistiger Unterentwicklung oder Hörverlust führt (50, 51).

In **AIDS-Patienten** treten symptomatische CMV-Reaktivierungen häufig aufgrund der eingeschränkten CD4⁺-Immunität auf. Sie gehören zu den häufigsten opportunistischen Infektionen mit einer Inzidenz von bis zu 40% (52). Sie führen häufig zu Retinitis, die bis zur Erblindung gehen kann, sowie zu Enteritiden und Enzephalitiden (53). Außerdem fördern sie das Fortschreiten der HIV-Infektion und sind mit erhöhter Mortalität assoziiert (54).

Nach **solider Organtransplantation** zählen CMV-Infektionen zu den wichtigsten Komplikationen (55). Dabei ist die Inzidenz je nach Transplantationsart unterschiedlich hoch. So leiden durchschnittlich 25% aller Herz-, Leber- und Nierentransplantierten unter CMV-Komplikationen, bei der Herz-Lungen-Transplantation kann dieses Risiko aber auf über 50% ansteigen (56). Unabhängig von der Art der Transplantation besteht ein hohes Risiko bei serologischen Inkompatibilitätstransplantationen. So sind seronegative Personen, die mit einem Organ eines CMV-Infizierten transplantiert werden, besonders gefährdet (57). Dabei können durch die Übertragung von infizierten Reservoirzellen im Empfänger primäre CMV-Infektionen entstehen, die durch mangelnde T-Zellimmunität unter der Immunsuppression nicht kontrolliert werden können. Besonders in der frühen Phase nach der Transplantation kommt es zu vermehrten CMV-Erkrankungen, da hier eine besonders effiziente Immunsuppression angestrebt wird, die durch den Einsatz von hohen Dosen verschiedener immunsupprimierender Substanzen erreicht wird. In der SOT ist häufig das transplantierte

Organ der Manifestationsort der CMV-Erkrankung. So sind Pneumonitis nach Lungentransplantation, Hepatitis nach Lebertransplantation oder Koronarthrombosen nach Herztransplantation verbreitete Erscheinungsbilder (58-60). CMV-Infektionen können auch direkt zu akuten und chronischen Abstoßungsperioden führen. So können Transplantatsschädigungen bis hin zum Transplantatsverlust auftreten (24, 61).

Trotz der enormen Fortschritte der letzten Jahre sind CMV-Erkrankungen in der **Stammzelltransplantation** weiterhin problematisch. Zwar treten nach HSCT lediglich in 5% aller Transplantierten Reaktivierungen auf, in einigen Risikogruppen ist diese Wahrscheinlichkeit aber um ein Vielfaches höher (62). Als risikoreich werden zum einen serologische Inkompatibilitätstransplantationen gewertet (57). Eine weitere Risikogruppe stellen Patienten dar, deren Stammzellen nicht von einem Angehörigen sondern von einem HLA-kompatiblen oder gar inkompatiblen nicht Verwandten stammen (haploident) (63). In der HSCT sind CMV-Reaktivierungen nur in Extremfällen direkt letal. Ein großer Teil der Patienten verstirbt jedoch an CMV-vermittelten Folgekomplikationen wie opportunistischen Infektionen, Mykosen und Septitiden (64).

Neben der Art des transplantierten Organs und des Serostatus erhöhen weitere Faktoren das Risiko einer CMV-Erkrankung. So spielt die Art der angewendeten Immuntherapie eine entscheidende Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Methylprednisolon CMV-Reaktivierung auslösen kann (65, 66). Besonders aber die **Inaktivierung oder Depletion von T-Lymphozyten** wirkt sich negativ auf die CMV-Kontrolle aus. So wurde belegt, dass die Behandlung mittels OKT-3 oder anti T-Zellglobulins (ATG) sehr stark mit CMV-Komplikationen korreliert (67, 68).

Ob Transplantierte nun eine CMV-Erkrankung entwickeln und welchen Schweregrad diese besitzen, hängt maßgeblich von der Rekonstitution der CMV-spezifischen CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellantwort ab. So lässt sich der Schutz vor CMV-Erkrankungen nach Transplantation direkt mit der T-Zellfunktion korrelieren (69-71). Im Vergleich zum Gesunden ist die T-Zellfunktion im Transplantierten dauerhaft eingeschränkt. So konnte zwar durch Tetrameranaysen gezeigt werden, dass transplantierte Patienten einen höheren Anteil CMV-spezifischer T-Lymphozyten im peripheren Blut besitzen, diese aber in ihrer Klonalität stark eingeschränkt sind (72-75). Zusätzlich zeigten diese Zellen nach Antigenstimulation ein schwaches Proliferationspotential und sezernierten nur wenig Effektorzytokine (42, 76, 77). Diese eingeschränkte T-Zellantwort reicht oft allein nicht aus, um CMV-Infektionen langfristig zu kontrollieren.

1.3 Behandlungsoptionen

Da nach einer Transplantation durch mangelnde oder eingeschränkte T-Zellfunktion nur eine abgeschwächte T-Zellimmunität gegeben ist, konzentrieren sich die Behandlungsstrategien zum einen auf die Reduktion des Ausmaßes der CMV-Infektion und zum anderen auf die Stärkung der CMV-spezifischen Immunabwehr.

1.3.1 antivirale Therapie

Die antivirale Therapie ist bei der Bekämpfung von CMV-Infektionen in der Transplantation die erste therapeutische Option. Die verabreichten Virustatika hemmen über unterschiedliche Wirkmechanismen die Funktion der viralen DNA Polymerase oder der Proteinkinase, die durch das Gen UL-97 codiert wird. Dadurch wird die Replikation des Virus unterbunden (78-80). Auf diese Art wird die Zahl der viralen Partikeln drastisch reduziert, so dass selbst bei eingeschränkter T-Zellfunktion in den meisten Fällen die immunologische Kontrolle möglich ist.

Zu Anfang wurden Virustatika zur Behandlung bereits bestehender CMV-Erkrankungen verwendet. Mittlerweile werden sie aber in zahlreichen Transplantationszentren zur Prävention der Erkrankung mittels prophylaktischer oder präemptiver Therapie eingesetzt. Bei der **prophylaktischen Therapie** werden Personen mit erhöhtem Risiko für CMV-Erkrankungen behandelt. Dies sind vor allem Stammzelltransplantierte in den ersten 100 Tagen nach Transplantation. Es konnte belegt werden, dass eine antivirale Prophylaxe signifikant die Inzidenzen sowie den Schweregrad der CMV-Erkrankungen reduziert (55, 81, 82). Oft handelt es sich dabei aber lediglich um eine Verschiebung der Komplikationen auf einen Zeitpunkt nach Beendigung der antiviralen Therapie (83). Außerdem ist die kontinuierliche Verabreichung mit erhöhten Nebenwirkungen und viraler Resistenzbildung verbunden. Darum verwenden immer mehr Kliniker eine **präemptive Therapiestrategie**. Hier basiert die Verabreichung von antiviralen Substanzen auf der Überwachung der CMV-Viruslast im Blut. So wird durch den gezielten Einsatz die Dauer der Therapie verkürzt, was bei vergleichbarem Erfolg Nebenwirkungen und Kosten reduziert (84).

Die präemptive Therapie ist nur aufgrund der Einführung der Polymerase Ketten Reaktion (PCR) zur quantitativen Bestimmung von CMV-DNA in Vollblut möglich. Durch kurze Bearbeitungszeiten und hohe Sensitivität erlaubt sie die engmaschige Überwachung von Risikopatienten und damit eine frühzeitige Diagnose von CMV-Reaktivierungen sowie deren

adäquater Behandlung. Außerdem kann durch die CMV-PCR der Erfolg der antiviralen Behandlung überprüft und die Therapie angepasst werden (85, 86).

Zurzeit sind die antiviralen Substanzen Ganciclovir, Aciclovir, Foscarnet und Cidofovir für die klinische Anwendung in Gebrauch. Ganciclovir und Aciclovir sind die gängigsten Behandlungsmittel, während Foscarnet und Cidofovir nur in Ausnahmefällen wie Resistenzbildung und Unverträglichkeiten angewendet werden. Trotz guter Erfolge ist die antivirale Therapie oft durch ihr Nebenwirkungsspektrum limitiert. So führt eine längere Anwendung zu Nephrotoxizitäten und Myelotoxizitäten. Letzteres verhindert bei vielen Patienten nach HSCT das Anwachsen des Knochenmarks und führt zu einer lang anhaltenden Immuninsuffizienz. Lange Anwendungszeiträume erhöhen ebenfalls das Risiko der viralen Resistenzentwicklung. Die Inzidenz beträgt in der Transplantation 10-15% (87). So entwickeln sich über die Zeit oft Mutationen in den viralen Genen UL-54 und UL-97. Dadurch entstehen Virusstämme, die je nach Art der Mutation gegen ein oder mehrere Virustatika resistent sind. Diese Stämme sind in der Regel aggressiver und verursachen schwerere Erkrankungen als Wildtypstämme (84, 88, 89). Zusätzlich ist die antivirale Therapie mit hohen monetären Kosten verbunden, da für die Therapie häufig eine Hospitalisierung des Patienten erforderlich wird.

1.3.2 Vakzinierung

Andere Ansätze beschäftigen sich mit der *de novo*-Generierung einer CMV-spezifischen Immunantwort. Die Vakzinierung ist ein bewährtes Mittel um Immunantworten gegen Erreger zu generieren. Häufig gewähren Vakzinierungen den Schutz über die Induktion einer humoralen Immunantwort, bei der große Mengen von Antikörpern gebildet werden. Diese erlauben den Schutz vor Primärinfektionen und wären für die Behandlung von CMV-Seronegativen sinnvoll (90). So würde zum Zeitpunkt der Transplantation eine serologische Inkompatibilität vermieden, was eine deutliche Reduzierung der CMV-Erkrankungen in dieser Risikogruppe zur Folge hätte. Bei Reaktivierungen würde eine humorale Immunität lediglich zur Beschränkung der viralen Verbreitung und zur Minderung des Erkrankungsgrades führen. Darum liegt der Schwerpunkt in den Bemühungen der Impfstoffentwicklung auf der Induktion einer humoralen und zellulären Immunantwort.

Bis jetzt ist es trotz höchster Priorität noch nicht gelungen, ein effektives Vakzin gegen CMV zu entwickeln (91). In den wenigen bisher durchgeführten Vakzinierungsstudien wurden CMV-Laborstämme als attenuierte Lebendvakzine eingesetzt. Diese Studien zeigten lediglich

einen moderaten Erfolg (92, 93). Neuere Ansätze konzentrieren sich auf Mischungen verschiedener viraler Proteine, virale DNA- oder Vektorvakzine (91). Der Erfolg dieser Ansätze muss jedoch erst in klinischen Studien erbracht werden.

1.3.3 Herabsetzung der immunsuppressiven Therapie

Andere Behandlungsstrategien bezwecken die Stärkung der vorhandenen CMV-spezifischen Immunantwort. Dies kann in gewissen Grenzen durch die Reduktion der immunsuppressiven Therapie erreicht werden. Eine Herabsetzung der medikamentösen Immunsuppression führt nicht nur zur Regeneration der CMV-spezifischen T-Zellfunktion, sondern lässt auch potentiell die Bildung transplantatsschädigender alloreaktiver T-Zellen zu. So kann eine zu starke Herabsetzung zur Schädigung oder dem Verlust des transplantierten Organs führen. Des Weiteren werden durch eine zu niedrige Immunsuppression die im Transplantat enthaltenden T-Zellen nur ungenügend gehemmt. Dies kann insbesondere nach HSCT zur Entwicklung von Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD) führen.

1.3.4 Immuntherapie

Eine weitere Option zur Stärkung der Immunantwort ist der adoptive Immuntransfer. Dazu werden teilungsfähige, immunologisch aktive Zellen isoliert, *in vitro*-manipuliert und/oder expandiert und anschließend reinfundiert. Die Art der applizierten Zellen kann dabei sehr unterschiedlich sein. So können Donor Lymphozyteninfusionen (DLIs), antigenbeladene dendritische Zellen, NK-Zellen oder T-Zellen verabreicht werden. Der infundierte Zelltyp richtet sich nach der Art der zu behandelnden Erkrankung. DLIs und beladene DCs werden hauptsächlich zur Therapie von residualen Tumoren eingesetzt und zeigten Erfolg in der Behandlung von Leukämien sowie von soliden Tumoren (94-96). T-Zellen finden in der Tumorthherapie bisher nur zur Behandlung metastatischer Melanome und Epstein-Barr-Virus-(EBV-) assoziierter Lymphome Anwendung (97). Die limitierenden Faktoren sind hierbei hauptsächlich die mangelnde Kenntnis tumorspezifischer Antigene, die eine Generierung von spezifischen T-Zelllinien schwierig macht, sowie die Inhibierung der T-Zellfunktion durch den Tumor (98).

In der Behandlung chronisch viraler Infektionen stellt die T-Zelltherapie eine effektive Option dar. Die Kausalität ergibt sich aus der entscheidenden Funktion der T-Zellen in der Kontrolle dieser Infekte. Durch die Isolierung und *in vitro*-Manipulation können geringe Mengen

funktioneller T-Zellen expandiert oder die Funktion inaktiver T-Zellen wiederhergestellt werden. Der Retransfer der manipulierten T-Zellen ermöglicht die gezielte Stärkung der Immunantwort, während Nebenwirkungen wie Rejektionen oder GvHD vermieden werden. Außerdem sorgt die Bildung von Gedächtniszellen für den Langzeitschutz vor viralen Reaktivierungen.

Erste Hinweise zur Effizienz des adoptivem T-Zelltransfers lieferten Beobachtungen aus dem Mausmodell (99, 100). Hier wurde gezeigt, dass der Transfer von CD8⁺- und CD4⁺-T-Lymphozyten vor fatalen viralen Infektionen schützt.

Die erfolgreiche Wiederherstellung der CMV-spezifischen T-Zellimmunität durch den Transfer von T-Zellen konnte in mehreren klinischen Pilotstudien belegt werden. So wurden in einer initialen Studie 14 Patienten nach HSCT prophylaktisch mit CMV-spezifischen T-Zellen behandelt (101). Dabei traten keine Nebenwirkungen wie GvHD in Erscheinung. Zwei Tage nach Infusion konnten im Blut aller Patienten CMV-spezifische CTLs nachgewiesen werden. Keiner der behandelten Patienten entwickelte eine CMV-Erkrankung. In einer weiteren Studie wurden 8 HSCT-Patienten mit CMV-Erkrankung behandelt, die nach vierwöchiger antivirale Behandlung keine Besserung zeigten (102). Die immuntherapeutische Behandlung führte in allen 7 evaluierbaren Patienten zum Erfolg und verursachte keine Nebenwirkungen. Eine Infusion von CMV-spezifischen T-Zelllinien in 16 HSCT-Patienten mit früher CMV-Infektion führte zur Wiederherstellung der CMV-Immunität bei allen Patienten und nur zwei von ihnen hatten virale Reaktivierungen (103).

Neben CMV-Infektionen findet die adoptive T-Zelltherapie bei vielen viralen Infektionen Anwendung. So belegten klinische Studien die Effizienz dieser Methode bei Erkrankungen durch Epstein-Barr-Virus, Humanes Immundefizienz-Virus (HIV) und Adenovirus (104-106).

Trotz dieser Erfolge beschränkt sich die Behandlung von CMV-Erkrankungen mittels adoptiver Immuntherapie auf wenige Fälle und fand bisher nur nach HSCT Anwendung. Dies liegt vor allem an der Beschränkung bisheriger Generierungsprotokolle, die lediglich eine arbeits- und kostenintensive Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien aus ausgewählten Patienten ermöglichen.

1.4 Generierung CMV-spezifischer T-Zelllinien

1.4.1 Methodenüberblick

Bis heute wurden unterschiedliche Strategien zur Herstellung von CMV-spezifischen T-Zelllinien entwickelt. Alle entwickelten Strategien haben mehr oder weniger bedeutende Nachteile, die sie in ihrer Praktikabilität oder klinischen Anwendbarkeit einschränken. Trotz ihrer Unterschiede lassen sich alle Methoden in eine von 4 Generierungsstrategien einordnen.

I Anreicherung durch repetitive Stimulation

Bei dieser Strategie werden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) des Spenders mit replikationsgeschädigten Zellen stimuliert, die CMV-Antigene präsentieren. Durch wiederholte Zugabe dieser Zellen werden die in den PBMCs bereits vorhandenen CMV-spezifische T-Zellen expandiert und angereichert, sodass nach 3-4 Stimulationsrunden nahezu reine CMV-spezifische T-Zelllinien entstehen. Viele beschriebene Generierungsmethoden beruhen auf dieser Strategie, unterscheiden sich aber in der Art der verwendeten Stimulatorzellen.

So verwenden einige Protokolle autologe CMV-infizierte Fibroblasten oder mit CMV-Vektoren infizierte APCs (107-110). Diese Protokolle haben den Vorteil, dass sie T-Zelllinien generieren, die hohe Antigen- und Epitopdiversitäten aufweisen. Dies beugt viralen Evasionsmechanismen vor. Des Weiteren erlauben die so generierten T-Zelllinien eine Bekämpfung in jeder viralen Entwicklungsphase. Da CMV in verschiedenen Entwicklungsphasen bestimmte Proteine exprimiert (siehe 1.2.1), sind nur T-Zelllinien mit breiter Reaktivität dazu geeignet. Der Nachteil dieser Methoden ist vor allen die mangelnde Biosicherheit, die mit der Verwendung von infektiösen Virusstämmen oder genetischen Vektoren einhergeht. Ein spezieller Nachteil bei der Verwendung von Fibroblasten ist deren Eigenschaft nur MHC-I-Moleküle zu exprimieren. Dadurch ist mit ihnen die Generierung von CD4⁺ spezifischen T-Zellen nur schwer möglich.

Andere Protokolle benutzen autologe antigenbeladene APCs für die Stimulation. Dabei unterscheiden sich die Ansätze durch das verwendete Antigen. Bei dem Einsatz von Zelllysate, das aus infizierten Fibroblasten gewonnen wird, werden multispezifische Linien bestehend aus CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen, generiert (111). Der Grund dafür sind die unterschiedlichen viralen Antigene, die im Lysat enthalten sind, sowie deren Präsentation in MHC-I- und MHC-

II-Komplexen der APCs. Neben viralen Antigenen enthalten Lysate aber auch zelluläre Bestandteile. So können allo- oder autoreaktive T-Zellen entstehen, die in der Lage sind GvHD auszulösen. Des Weiteren können Lysate infektiöse Partikeln enthalten, durch die eine klinische Anwendung kritisch ist. Andere Methoden benutzen rekombinante Proteine als Antigen (112). Dabei werden Proteine wie pp65 oder IE-1 verwendet, die für ihre Immundominanz bekannt sind. Diese Ansätze generieren ähnliche T-Zelllinien wie Lysate, vermeiden aber das Risiko der GvHD. Leider ist ihre klinische Anwendung ebenfalls eingeschränkt, da sie durch die rekombinante Herstellung bakterielle Rückstände enthalten. Synthetische Einzelpeptide können mit hohem Reinheitsgrad hergestellt werden und sind deshalb biosicher. Ihre einzelne Verwendung führt aber nur zu monoklonalen Linien mit CD8⁺- oder CD4⁺-Phänotyp. Darum werden häufig mehrere Einzelpeptide für die Herstellung eingesetzt (113, 114). Der Nachteil dieses Verfahrens ist aber die nötige Kenntnis immundominanter Epitope. Deswegen ist diese Anwendung auf Personen mit weit verbreitetem HLA-Typ beschränkt.

Eine Weiterentwicklung stellt die Verwendung von überlappenden Peptidpools (OPPs) dar. Dabei handelt es sich um eine Mischung von Einzelpeptiden, die sich um eine bestimmte Anzahl von Aminosäuren überlappen und zusammen die komplette Aminosäuresequenz eines Proteins repräsentieren (Abbildung 2). Untersuchungen ergaben, dass Peptide mit einer Länge von 15 AS sowohl in MHC-I- als auch in MHC-II-Komplexen präsentiert werden und somit CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen stimulieren können (10). Durch die Überlappung der Peptide um 9-11 AS können alle potenziell immunogenen Epitope eines Proteins durch den Peptidpool erfasst werden. Dadurch ist es möglich, ohne die Kenntnis einzelner immundominanter Epitope oder HLA-Typen multispezifische T-Zelllinien bestehend aus CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen herzustellen.

All diese Techniken der repetitiven Stimulation basieren auf der Verwendung von autologen APCs. Deren Herstellung ist sehr zeit- und kostenintensiv und deswegen für die breite Anwendung wenig praktikabel. Dafür besteht durch repetitive Stimulation die Möglichkeit T-Zelllinien aus Personen mit eingeschränkter T-Zellfunktion zu generieren. So konnte die Herstellung von EBV-spezifischen T-Zelllinien aus SOT-Patienten mittels repetitiver Stimulation demonstriert werden (115).

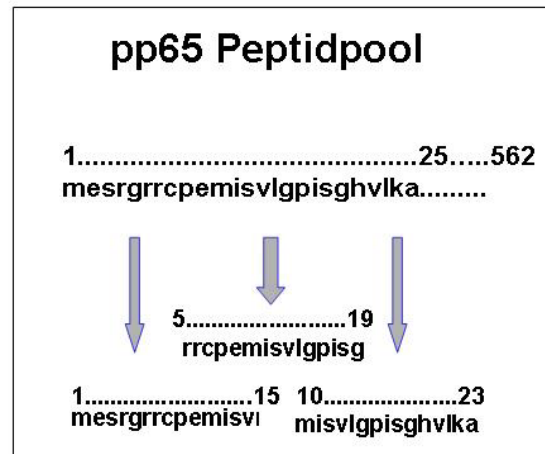


Abb. 2: Überlappender Peptidpool von pp65

Oben ist die gesamte Aminosäuresequenz des pp65-Proteins dargestellt. Darunter ist beispielhaft der Aufbau der ersten drei Fragmente des überlappenden Peptidpools abgebildet. Für die Herstellung des Polols wurde das pp65-Protein in 15 AS lange Fragmente mit 11 AS Überlappung unterteilt. Die Buchstaben bezeichnen die unterschiedlichen Aminosäuren nach internationaler Nomenklatur. Insgesamt enthält der überlappende pp65-Peptidpool bei dieser Methode 138 Peptidfragmente.

II Isolierung von CMV-spezifischen T-Zellen zur direkten Anwendung

Bei dieser Methode werden CMV-spezifische T-Zellen unter klinischen Bedingungen direkt aus dem Blut des Spenders isoliert und anschließend infundiert (116). Die Isolierung erfolgt dabei unter der Verwendung von synthetisch hergestellten Tetrameren. Dabei handelt es sich um 4 polymerisierte HLA-Moleküle, die mit ihrem spezifischen Antigen beladen sind und so die Struktur des Antigen-MHC-Komplexes imitieren (117, 118). Spezifische T-Zellen erkennen und binden diesen Komplex. Dieser ist zusätzlich mit einem Fluorochrom gekoppelt, welches die Detektion und Isolierung mittels Durchflusszytometrie ermöglicht. Diese Methode erlaubt die schnelle und effiziente Isolierung von spezifischen T-Zellen und ist aufgrund der synthetischen Herstellung der Tetramere klinisch übertragbar. Zusätzlich erlaubt die Kofärbung der markierten Zellen die eindeutige Identifizierung und Isolierung von reinen T-Zellpopulationen. Ein Nachteil dieser Methode ist die nötige Kenntnis immundominanter Epitope, deren Erforschung nicht nur zeit- und arbeitsintensiv sondern im Ganzen unmöglich ist. Außerdem beschränkt sich die Anwendung auf Personen mit verbreitetem HLA-Typ, von dem Tetramere in klinischer Qualität erhältlich sind. Da der Anteil von T-Zellen, die gegen ein Epitop gerichtet sind, im peripheren Blut sehr gering ist (0,05-1%), benötigt diese Methode eine große Menge Ausgangsmaterial, um ausreichende Zellzahlen zu gewinnen.

Somit können nur gesunde Spender zur T-Zellgewinnung genutzt werden, wodurch die Anwendung dieser Technik auf die HSCT beschränkt bleibt.

III Isolierung von CMV-spezifischen T-Zellen und anschließende Expansion

Bei dieser Strategie werden ebenfalls CMV-spezifische T-Zellen aus dem peripheren Blut isoliert und anschließend durch *in vitro*-Manipulation expandiert. Dies hat gegenüber der direkten Infusion den Vorteil, dass mit wenig Ausgangsmaterial große Zellzahlen gewonnen werden können. Die Nachteile dieser Methode sind das Risiko des Funktionsverlustes der T-Zellen durch die *in vitro*-Manipulation, das mögliche Entstehen von Alloreaktivitäten, sowie die hohen monetären Kosten der *in vitro*-Kultivierung.

Zur Isolierung können hier ebenfalls Tetramere verwendet werden. Zusätzlich ist aber auch die Selektion von Interferon- γ produzierenden Zellen nach antigenspezifischer Stimulation möglich. Dazu werden PBMCs direkt mit CMV-Antigenen stimuliert. Die Antigene werden durch Monozyten und dendritische Zellen präsentiert und von spezifischen T-Zellen erkannt. Diese werden aktiviert und beginnen Effektorzytokine wie IFN- γ zu sezernieren. Die so aktivierten Zellen werden dann mit Hilfe einer 2-Schritte-Antikörperfärbung magnetisch markiert und anschließend mittels magnetischer Säulenseparation (MACS) isoliert (119) (Abbildung 3).

Durch die Färbung und Isolierung CD154⁺-T-Zellen lassen sich ebenfalls antigenspezifische T-Zelllinien herstellen, da Th-Lymphozyten dieses Oberflächenmolekül nach spezifischer Stimulation exprimieren (120). Diese Linien haben aber einen reinen CD4⁺-Phänotyp und können durch das Fehlen von CD8⁺-CTLs ein mangelndes lytisches Potenzial aufweisen.

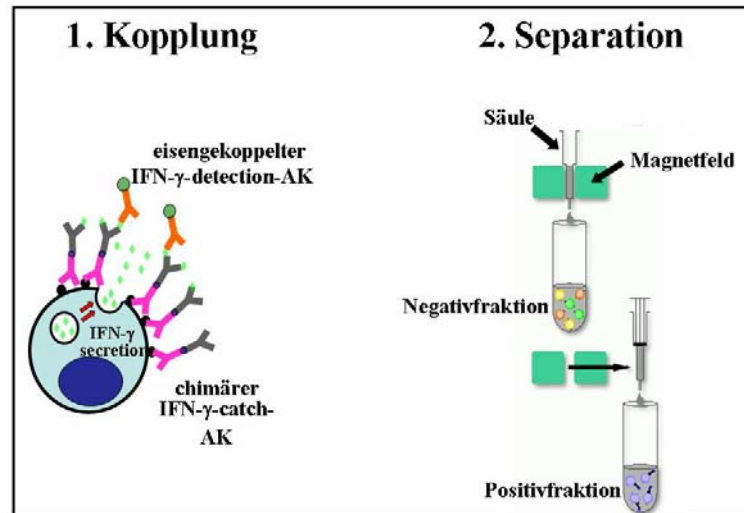


Abb. 3: Funktionsprinzip des Sekretionsassay

Die Abbildung zeigt das Prinzip der Markierung und Isolierung von antigenspezifischen Zellen mittels IFN- γ -Sekretionsassay. Die Kopplung (links) findet über eine 2-Schritt-Färbung mit monoklonalen Antikörpern statt. Dazu bindet initial ein chimärer IFN- γ -catch-AK an das Oberflächenmolekül CD45 (schwarzer Punkt), das auf allen Lymphozyten exprimiert wird. Zusätzlich ist dieser Antikörper in der Lage, von der Zelle sezerniertes IFN- γ zu binden (grüne Punkte). Das gebundene IFN- γ kann durch einen zweiten Antikörper erkannt und mit einem Eisenpartikel markiert werden (IFN- γ -detection-AK). Die Separation (rechts) findet mittels Säulen und Magnetfeld statt. Die Säulen besitzen eine eisenhaltige Matrix und befinden sich zu Beginn im Magnetfeld. Dadurch bleiben markierte Zellen auf der Säule haften, während unmarkierte Zellen ungehindert passieren können. Nach dem Waschen der Matrix wird die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und die markierten Zellen können nun in ein separates Gefäß eluiert werden.

Die Expansion der isolierten Zellen findet *in vitro* unter Verwendung verschiedener Zusätze statt.

Der Zusatz des relevanten Antigens in Kombination mit autologen APCs erlaubt die spezifische Stimulation der isolierten Zellen und kann zur Expansion eingesetzt werden. Diese Methode macht aber die Generierung von autologen APCs notwendig, die das Antigen präsentieren und ist durch die Verwendung großer Mengen Antigens, besonders in der klinischen Herstellung, mit enormen Kosten verbunden. Außerdem wird die spezifische Stimulation als unnötig betrachtet, da nach antigenspezifischer Isolierung unspezifische Zellen abgetrennt werden.

Es können geringe Konzentrationen monoklonale Antikörper gegen den T-Zellrezeptor (OKT-3) und/oder gegen kostimulatorische Moleküle (CD28) eingesetzt werden. Diese verursachen einen unspezifischen T-Zellstimulus, der zur schnellen Vermehrung von T-Zellen

führt (121). Monoklonale Antikörper sind in klinischer Reinheit erhältlich und gelten somit als biosicher. Sie werden trotzdem ungern für die klinische Herstellung von T-Zelllinien verwendet, da Rückstände dieser Antikörper im Patienten zu schweren Nebenwirkungen durch die unspezifische Aktivierung von T-Zellen führen können (122). Außerdem ist die wiederholte Stimulation von T-Zellen mittels monoklonaler Antikörper häufig mit einem Funktionsverlust verbunden, der auf die massive Proliferation der T-Zellen zurückzuführen ist (123).

Eine weitere Möglichkeit der Kostimulation ist der Zusatz von Ammenzellen (Feeder). Diese werden durch Radioaktivität oder chemische Substanzen an der Proliferation gehindert, sind aber in der Lage, wachstumsfördernde Signale durch kostimulatorische Oberflächenstrukturen an T-Zellen weiterzugeben. Die Verwendung von autologen Feedern führt zu einer stabilen Expansion von T-Zellen. Da diese aber aus dem Blut des Spenders gewonnen werden müssen, ist ihre Anzahl limitiert. Allogene Feeder können z.B. aus Apheresen oder Leukozytenkonzentraten in großen Mengen gewonnen werden. Ihre Verwendung birgt aber das Risiko der GvHD durch die Entstehung alloreaktiver T-Zellen, die durch allogene Feeder stimuliert und expandiert werden können.

Eine Alternative zu Feedern stellen artifizielle APCs in Form von Latexpartikeln (latexbeads) dar. Diese können mit Antikörpern oder Antigen beladen und zur Stimulation eingesetzt werden. Durch ihre synthetische Herstellung sind sie biosicher und in großen Mengen verfügbar. Ihre Effizienz zur Expansion von T-Zellen ist aber weitaus geringer als die von Feedern.

Das proliferationsfördernde Zytokin IL-2 wird in vielen Protokollen zur Expansion antigenspezifischer T-Zellen eingesetzt (106, 110, 119). Es bindet an den IL-2-Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen, der aus den drei Molekülen CD132, CD122 und CD25 besteht (124). Diese Bindung führt zur unspezifischen Aktivierung und Proliferation von T-Zellen. Es ist aber bekannt, dass hohe Konzentrationen von IL-2 zum aktivierungsinduzierten Zelltod führen können (125, 126).

Interleukin 15 (IL-15) ist ebenfalls ein proliferationsförderndes Zytokin. Dessen Rezeptor beinhaltet zwei der drei Untereinheiten des IL-2-Rezeptors und kann auch T-Zellen stimulieren (124). Zusätzlich verfügt IL-15 über antiapoptotische Eigenschaften (127). Es konnte gezeigt werden, dass die *in vitro*-Kultivierung von melanomreaktiven T-Zellen mit IL-15 vergleichbar effektiv ist wie die mit IL-2 (128). Die klinische Anwendung von IL-15 ist im Moment nicht gegeben, da es noch nicht in klinischer Reinheit erhältlich ist.

Tabelle 1: Vor- und Nachteile von Zusätzen bei der Expansion von antigenspezifischen T-Zellen

Zusatz	Vorteil	Nachteil
Antigen	- spezifische Stimulation	- autologe APCs nötig - hohe Kosten
monoklonale Antikörper	- schnelle Expansion - biosicher	- unspezifische T-Zellaktivierung - Funktionsverlust möglich
autologe Feeder	- vielseitige Kostimulation	- begrenzte Verfügbarkeit
allogene Feeder	- vielseitige Kostimulation - große Mengen verfügbar	- mögliche Entwicklung von Alloreaktivität
Latexbeads	- biosicher - große Mengen verfügbar	- schlechte kostimulatorische Eigenschaften
IL-2	- hohe unspezifische Stimulation - biosicher	- aktivierungsinduzierter Zelltod möglich
IL-15	- hohe unspezifische Stimulation - antiapoptotische Eigenschaften	- mangelnde Biosicherheit durch ungenügende Reinheit

IV Generierung CMV-spezifischer T-Zelllinien durch genetische Manipulation

Die direkte genetische Manipulation von unselektionierten Effektorzellen wird in der Immuntherapie zur Lösung zweier Probleme eingesetzt. Zum einen soll durch das Einfügen eines so genannten Killergens die Kontrolle von auftretender GvHD nach Injektion der Effektorzellen erleichtert werden. Dazu wurden Gene übertragen, die in den modifizierten Zellen eine Anfälligkeit gegen sonst wirkungslose Substanzen hervorrufen. So wurden beispielsweise ganciclovirempfindliche T-Lymphozyten und DLIs in der Behandlung von HIV und Leukämien eingesetzt (129, 130). Zum zweiten sollten die langen und aufwendigen Kultivierungszeiten durch genetische Modifikation verkürzt werden. Dazu wurden unselektionierte T-Lymphozyten mit einem rekombinanten T-Zellrezeptor (TCR) gegen CMV-transduziert, um schnell große Mengen CMV-spezifischer T-Lymphozyten herzustellen (131, 132). Durch die Verwendung von rekombinanten Vektoren verfügen diese Ansätze nicht über die nötige Biosicherheit, wodurch eine klinische Anwendung noch kritisch ist. Zusätzlich sind modifizierte Zellen *in vivo* nur über kurze Zeit stabil, da sie durch das Immunsystem des Empfängers als fremd (vektorkodierte Proteine) erkannt und eliminiert werden können. Außerdem können durch T-Lymphozyten mit rekombinantem TCR erhebliche Nebenwirkungen auftreten, da durch die unkontrollierte Rekombination der Gene, die für den transgenen und den natürlichen T-Zellrezeptor kodieren, Zellen mit chimären

Rezeptoren und neuer Spezifität entstehen können. Diese können gegen allogenes oder autologes Gewebe gerichtet sein und GvHD auslösen.

Tabelle 2: Übersicht Stärken und Schwächen bestehender Generierungsprotokolle für CMV-spezifische T-Zelllinien

Generierungsmethode	Herstellungszeit	CD4 ⁺ /CD8 ⁺ -Generierung	Klonalität	Vermeidung GvHD	Biosicherheit	breite Anwendung
infizierte Fibroblasten (repetitiv)	--	++	++	++	-- (infektiöses Virus)	++
genetisch modifizierte APCs	--	++	++	++	-- (virale Vektoren)	++
Lysat (repetitiv)	-	++	++	-	--	++
Protein (repetitiv)	-	++	+	++	- (rekombinante Herstellung)	++
Einzelpeptide (repetitiv)	-	--	--	++	++	- (HLA-abhängig) (nur bekannte Epitope)
Peptidpools (repetitiv)	-	++	+	++	++	++
Isolierung (Tetramer) und direkte Infusion	++	--	--	++	++	-- (HLA-restringiert) (nur bekannte Epitope) (keine SOT-Patienten)
Isolierung (IFN-γ-Sekretion)	+	++ (mit Peptidpool)	++ (mit Peptidpool)	++ (mit Peptidpool)	++ (mit Peptidpool)	+ / - (SOT nicht geklärt)
genetische T-Zellmodifikation	++	++	--	-- (Bispezifität)	-- (virale Vektoren)	++

1.4.2 Generierung von antigenspezifischen T-Zelllinien für die klinische Anwendung

Bei der klinischen Anwendung von T-Zelllinien muss die Übertragung von kontaminierenden Substanzen mit Sicherheit ausgeschlossen werden, sodass eine Gefährdung für den Patienten vermieden wird. Um dies zu gewährleisten, unterliegt die Herstellung den Vorgaben der „guten Herstellungspraxis“ (GMP). Diese definieren den Herstellungsprozess sowie die abschließende Produkttestung. Sie schreibt ebenfalls die ausführliche Dokumentation jedes Produktionsschrittes vor, um die Transparenz und Nachvollziehbarkeit zu gewährleisten.

Produktion unter GMP-Bedingungen

Die Produktion findet in speziell dafür ausgerichteten Räumlichkeiten statt. Diese Reinräume sind mit spezieller Zu- und Ablufttechnik sowie Druckschleusen ausgestattet und schaffen dadurch eine nahezu sterile Arbeitsatmosphäre. Zusätzlich verwenden herstellende Personen spezielle Schutzkleidung. Dies soll hauptsächlich eine Verunreinigung mit infektiösen Partikeln während des Arbeitsablaufes verhindern.

Neben der mikrobiellen Verunreinigung stellen Kreuzkontaminationen zwischen zwei T-Zelllinien eine große Gefahr dar. Allogenes Material kann im Empfänger direkt zum Auslösen von GvHD oder zur Transplantatsschädigung führen. Um dies während der Produktion zu vermeiden, findet eine räumliche Trennung unterschiedlicher Spenderprodukte innerhalb des Reinraumes, sowie eine zeitliche Trennung von Arbeitsabläufen mit unterschiedlichen Spendermaterialien statt.

Zur Herstellung im Reinraum werden nur GMP-zulässige Materialien und Substanzen verwendet. Dies macht die Verwendung genetisch modifizierter, viraler oder bakterieller Organismen sowie deren Produkte sehr schwierig. Dazu zählen auch virale Vektoren oder rekombinante Proteine. Die Herstellung der verwendeten Substanzen findet ebenfalls unter GMP-Bedingungen statt. Dies wird durch ein Qualitätszertifikat belegt.

Testung des Produktes

Nach dem Generierungsprozess erfolgt die Testung der T-Zelllinien, damit sie für die klinische Anwendung eingesetzt werden können. Dabei wird zwischen Reinheitstestung und Funktionstestung unterschieden. Lediglich Zelllinien, die beiden Kriterien gerecht werden, werden zur therapeutischen Anwendung zugelassen.

Die **Reinheitstestung** ist wie die Produktion durch die GMP-Richtlinien geregelt. Dabei wird das fertige Produkt auf Verunreinigungen getestet. Als Verunreinigungen werden dabei infektiöse Partikeln wie Bakterien, Mykoplasmen oder Viren aber auch deren Bestandteile wie Lipopolysaccharide (LPS) oder Toxine betrachtet. Um mikrobielle Verunreinigungen auszuschließen, wird der Zellkulturüberstand auf Antigene und DNA bestimmter Erreger untersucht. Außerdem wird ein Teil der T-Zellen und des Überstandes auf spezielle Nährböden aufgebracht, die das Wachstum von Bakterien fördern. Zum Ausschluss von Kreuzkontaminationen wird das Produkt HLA-typisiert und mit dem HLA-Typ des Spenders verglichen. Sollte keiner dieser Tests eine Verunreinigung feststellen, wird das Produkt als rein betrachtet.

Die **Funktionstestung** unterliegt in der Regel der hausinternen Kontrolle und ist durch Standard-Operations-Prozeduren (SOPs) geregelt. Sie sollen sicherstellen, dass das Produkt die vorgesehene Funktion erfüllt und keine unerwünschten Nebenwirkungen, wie z.B. durch falsche Spezifitäten verursacht. Die vorgesehene Funktion unterscheidet sich je nach Produktart und erfordert deshalb individuell angepasste Testsysteme. Bei der Untersuchung von CMV-spezifischen T-Zelllinien kommt eine Reihe von *in vitro*-Tests zur Anwendung. Diese bestimmen Parameter, die als guter Indikator für die *in vivo*-Funktion gelten. Die Kombination dieser Parameter erlaubt die bestmögliche Einschätzung der mit der Verabreichung verbundenen Risiken. Ein wichtiger Parameter ist die Zusammensetzung der T-Zelllinien. Sie sollten idealerweise nur aus CD3⁺-Lymphozyten bestehen und keine anderen Zelltypen enthalten. Die Bestimmung der Zusammensetzung findet zumeist durch die Analyse mittels Durchflusszytometrie statt. Ein weiterer Parameter ist die Antigen-spezifität der Zelllinien. Sie setzt sich zum einen aus der Aktivität gegen CMV-infizierte Zellen und zum anderen aus der Verschonung nicht infizierter Strukturen zusammen. Zur Bestimmung der Antigen-spezifität werden die T-Zellen mit autologen und allogenen Zielzellen stimuliert, die mit CMV- oder unspezifischem Antigen beladen sind. Anschließend kann die Sekretion von proinflammatorischen Molekülen, die Proliferation oder die lytische Aktivität der T-Zellen bestimmt werden. Dazu kann eine Vielzahl von Tests eingesetzt werden. Viele dieser Methoden sind äquivalent einsetzbar, sodass jeder Hersteller eine andere Kombination verwendet. Dies ist zulässig, solange die ausgewählten Tests eindeutig die Antigen-spezifität der T-Zelllinien belegen.

1.4.3 Anforderungen an ein optimales Generierungsprotokoll

Für einen maximalen Therapieerfolg sollten Spender und Empfänger genetisch identisch sein. Dies ist außer bei eineiigen Zwillingen nur durch die Verwendung autologer T-Zellen gegeben. Eine Ausnahme stellen Personen nach HSCT dar. Hier können auch Zellen des Spenders verwendet werden, weil HSCT-Patienten im Allgemeinen über einen Spenderchimärismus verfügen.

Die Verwendung von allogenen T-Zelllinien kann zwar zur Kontrolle viraler Infektionen führen, ist aber nur mit einem transienten Schutz verbunden, da diese Zellen vom Empfänger als fremd erkannt und eliminiert werden. Dabei führen schon geringe Unterschiede zur Eliminierung, wie eine Studie zur Behandlung von EBV-Erkrankungen mit HLA-kompatiblen allogenen T-Zellen zeigte (133)

T-Zelllinien für die adoptive Immuntherapie müssen strikt antigenspezifisch sein, sodass ihr Wirkspektrum auf infizierte Zellen und Gewebe begrenzt ist. Dies soll Nebenwirkungen wie GvHD oder Transplantatabstoßung ausschließen, die zur Gefährdung des Patienten führen. So besteht bei der Infusion unselektionierter DLIs die Gefahr der Präsenz von alloreaktiven T-Zellen. Mehrere Arbeiten belegten, dass die Infusion von DLIs in HSCT-Patienten zu schwerer GvHD führen können, die durch alloreaktive T-Zellen ausgelöst werden (134, 135).

Protokolle zur Herstellung von CMV-spezifischen T-Zellen müssen in der Lage sein, ausreichende Mengen funktioneller T-Zellen zu generieren. So können durch *in vitro*-Manipulation Zellen stark expandiert werden, sodass große Zellmengen entstehen. In alten Menschen konnten oft große Mengen von CMV-spezifischen Zellen beobachtet werden, die im peripheren Blut persistieren aber keine protektiven Funktion ausführen. Diese Immunseneszenz wird mit einer zu starken Expansion erklärt, die durch häufige virale Reaktivierungen ausgelöst wurde (136). Es wird angenommen, dass zu starke *in vitro*-Expansion die Funktion von CMV-spezifischen T-Zellen negativ beeinflusst. Darum sollte bei der Herstellung von T-Zelllinien neben der Zellzahl auch die Funktion der Zellen beachtet werden.

Die natürliche Immunantwort gegen CMV besteht aus T-Zellen mit vielen Klonalitäten, die gegen viele Antigene und verschiedene darin enthaltene Epitope gerichtet sind (33, 37, 38). Um diese Multireaktivität durch T-Zelltransfer vollständig wiederherzustellen, müssen die übertragenen Linien eine hohe Antigen- und Epitopdiversität aufweisen. Immuntherapeutisch

Ansätze mit monoreaktiven T-Zelllinien zeigten zwar ebenfalls Erfolg, sind aber bei viralen Evasionsmutationen besonders gefährdet komplett ihre Wirkung zu verlieren (137). Darum ist die Herstellung von multireaktiven T-Zelllinien, die gegen mehrere virale Proteine und Epitope gerichtet ist, ein großer Vorteil in der Etablierung wirksamer immuntherapeutischer Ansätze.

Damit es nicht nur zu einem transienten Therapieerfolg kommt, müssen T-Zelllinien neben der effizienten antiviralen Funktion die Eigenschaft haben, über längere Zeit im Empfänger zu persistieren. Ein wichtiger Faktor, der die Persistenz von infundierten T-Zellen verlängert, ist das Vorhandensein von spezifischen $CD4^+$ -Th-Lymphozyten (101, 138). Diese sezernieren große Mengen proliferationsfördernder Moleküle, von denen hauptsächlich IL-2 die Funktion und Persistenz von CTLs verbessert. Da sich $CD4^+$ -Th-Lymphozyten unter medikamentöser Immunsuppression nur selten von selbst entwickeln, müssen sie zusätzlich infundiert werden. Darum wird bei der Generierung von CMV-spezifischen T-Zelllinien auf einen festen Anteil von $CD4^+$ -T-Zellen Wert gelegt.

Für die klinische Anwendung muss die Kontamination der Zelllinien mit infektiösen, toxischen oder genetisch veränderten Substanzen ausgeschlossen sein, um eine Gefährdung für Patient und Anwender zu verhindern. Darum unterliegt die Herstellung zellulärer Produkte den GMP-Richtlinien. Protokolle zur Herstellung CMV-spezifischer T-Zellen sollten deshalb in diese Richtlinien übertragbar sein.

Ein gutes Generierungsprotokoll sollte die Herstellung von T-Zelllinien aus einer breiten Menge von Spendern ermöglichen. So sollte dessen Anwendung nicht auf Personen mit definiertem HLA-Typ beschränkt sein. Außerdem sollte das Protokoll die robuste Generierung aus Material von Personen mit eingeschränkter T-Zellfunktion ermöglichen. Bisherige immuntherapeutische Ansätze sind auf Patienten nach HSCT beschränkt, da hier das Blut der gesunden Spender zur T-Zellgewinnung genutzt werden kann. Die Behandlung von SOT-Patienten würde eine beachtliche Erweiterung in der Anwendung der adoptiven Immuntherapie bedeuten. Sie ist aber nur unter der Verwendung des Patientenblutes möglich. Dieses enthält hohe Dosen an immunsupprimierenden Substanzen, die eine Selektion oder Expansion der CMV-spezifischen T-Zellen verhindern können. Herstellungsprotokolle sollten in der Lage sein, trotz Immunsuppression CMV-spezifische T-Zelllinien zu generieren.

1.4.4 Vorarbeiten

Ein in unserer Arbeitsgruppe entwickeltes Protokoll erlaubt die Herstellung CMV-spezifischer T-Zelllinien unter Berücksichtigung der meisten oben genannten Anforderungen (119). Es beruht auf einer Kurzzeitstimulation von PBMCs mit überlappenden Peptidpools. Aktivierte, IFN- γ -produzierende Zellen werden mit Hilfe von Antikörpern markiert und anschließend über MACS-Separation isoliert (Abbildung 3). Die positiv isolierten Zellen werden dann mit Hilfe von autologen und allogenen Feedern und unter Zugabe von IL-2 expandiert.

Durch die Stimulation mit überlappenden Peptidpools setzt dieses Protokoll keine Kenntnis vom HLA-Typ oder immundominanten Epitopen voraus. Des Weiteren macht die direkte Stimulation von PBMCs die zeit- und kostenintensive Generierung von autologen APCs überflüssig. Der Erfolg dieser Methode bei der Generierung pp65-spezifischer T-Zellen konnte anschaulich an 8 gesunden Probanden gezeigt werden. So konnten großen Mengen T-Zellen mit CD8⁺- und CD4⁺-Phänotyp gewonnen werden. Diese zeigten eine hohe Antigenpezifität und bestanden aus mehreren T-Zellklonen. Diese Ergebnisse sind viel versprechend und zeigen das hohe Potenzial des Protokolls für die adoptive Immuntherapie.