

1. EINLEITUNG

1.1 Adoptive Immuntherapie als Therapieoption

Adoptive Immuntherapie wird seit einigen Jahren als eine vielversprechende Option in der Behandlung viraler Infekte und Tumoren verfolgt. Lebensfähige und teilungsfähige immunologisch aktive Zellen werden dabei isoliert, in vitro expandiert, und retransfundiert. Zur adoptiven Immuntherapie gehören im weiteren Sinne unter anderem die Transplantation von Knochenmark und Stammzellen oder die Applikation von ex vivo durch Interleukin 2 (IL2) aktivierten Lymphozyten (LAK-Zellen). Insbesondere die T-Lymphozyten sind eine wichtige Komponente der adoptiven Immuntherapie und wurden bereits vielfach erfolgreich eingesetzt. Ziel der Immuntherapie mit T-Zellen ist eine spezifische Stärkung des Immunsystems als eine möglichst kausale Therapie. Zu den wichtigsten Anforderungen für ex vivo generierte T-Zellen im Rahmen von Anwendungen antigen-spezifischer Lymphozyten gehört ihre Antigen-spezifität. Diese kann während der In-vitro-Kultivierung kontrolliert und beeinflusst werden. Die Möglichkeit der Kontrolle der Spezifität gewährleistet zum einen die Effektivität der Zellen, zum anderen reduziert sie die Gefahr unerwünschter Nebenwirkungen und das Risiko von Autoimmunreaktionen bzw. Graft-versus-Host Disease (GvHD). Dennoch ist die klinische Anwendung von T-Zellen als Immuntherapie noch nicht weit verbreitet. Im Falle der Tumorspezifischen T-Zellgenerierung bestehen die Hauptschwierigkeiten in der Identifikation tumorspezifischer Antigene und in der aktiven Unterdrückung der Immunantwort durch den Tumor vor allem durch regulatorische Zellen. Die wichtigste Ursachen liegt aber vor allem in einem hohen Aufwand für die T-Zellgenerierung durch die Grenzen und Schwierigkeiten der aktuellen Methoden.

1.1.1 Rationale adoptiver Immuntherapie: Die Schlüsselrolle der T-Zellen

Die Rationale adoptiver Immuntherapie liegt in der Schlüsselrolle, die von den T-Zellen im Rahmen der Abwehr von akuten und chronischen Virusinfektionen sowie von Tumoren eingenommen wird. Die fundamentale Bedeutung dieser Zellen wird bei der Beobachtung von Personen mit angeborenen oder erworbenen Defekten der T-Zellfunktion deutlich. Dazu gehören z. B. Patienten, die an einer „schweren kombinierten Immunodefizienz“ (SCID) leiden. Dies ist ein Syndrom, bei dem die CD3⁺ T-Zellen im Blut fehlen, und es extrem häufig zu schweren bis lebensbedrohlichen viralen Erkrankungen kommt (Rosen 1984; Ljungman 1989; Burmester 1998; Greenberg 1999). An der immunologischen Kontrolle der viralen Persistenz und Reaktivierung sind verschiedene Kategorien von Effektorzellen beteiligt. Neben den NK-

Zellen (Natürliche Killerzellen) mit einer weniger entscheidenden Bedeutung (Biron 1999; Klingemann 2000) zeigte sich durch viele Untersuchungen die Schlüsselrolle der spezifischen $CD8^+$ und $CD4^+$ T-Lymphozyten (Quinnan 1982; Borysiewicz 1988; Ljungman 1989; Reusser 1991; Walter 1995; Fishman 1998; Zajac 1998b). Die $CD8^+$ T-Zellen (CTLs) erkennen Antigene, die ihnen auf den passenden **MHC-I**-(Haupthistokompatibilitätskomplex) Molekülen präsentiert werden. Diese Moleküle befinden sich auf fast allen Körperzellen. Für die $CD4^+$ T-Helferzellen ist die Assoziation der Antigene mit einem **MHC-II**-Molekül nötig (**Abb. 1**).

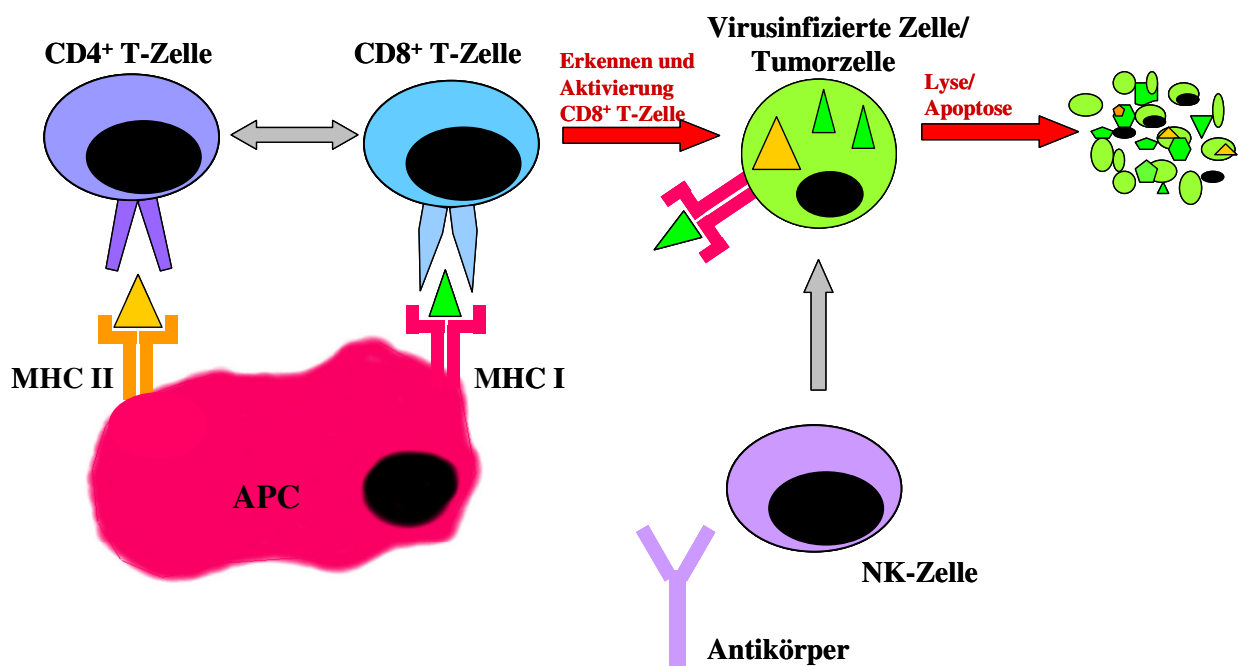


Abbildung 1: Prinzipien der Immunabwehr durch T-Zellen

Naive $CD4^+$ T-Lymphozyten erkennen nur Antigene, welche durch professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APCs) exogen aufgenommen, prozessiert, und im Zusammenhang mit einem passenden MHC-II-Molekül präsentiert werden. $CD8^+$ T-Zellen werden dagegen durch passende Antigene in einem MHC-I-Molekül aktiviert. Dies kann wie dargestellt durch MHC-I auf APCs geschehen („Kreuzpräsentation“), häufiger kommt es jedoch durch infizierte Körperzellen bzw. Tumorzellen zu einem MHC-I- $CD8^+$ Kontakt. Aktivierte $CD8^+$ CTLs führen anschließend zur Zerstörung der erkrankten Körperzelle. Für die Abwehr viraler Infekte und Tumoren sind insbesondere $CD8^+$ T-Zellen im Zusammenspiel mit den $CD4^+$ T-Helferzellen entscheidend. Teilweise können sie dabei von NK-Zellen und der humoralen Immunabwehr unterstützt werden.

Im Fall von MHC-I werden in der Zelle endogen gebildete Proteine (z. B. virale Antigene in infizierten Körperzellen) mit Hilfe der Proteasomen degradiert. Anschließend werden sie als Peptide mit einer Länge von ca. 8 - 12 Aminosäuren (AS), - idealerweise 9 AS -, an der Zelloberfläche präsentiert (Maecker 2001). Möglich ist auch ein externer MHC-I „pathway“ als sogenannte Kreuzpräsentation.

CD8⁺ T-Zellen, die das antigene Peptid in einem passenden MHC-Molekül erkennen, werden aktiviert und führen durch die Freisetzung von Perforin und Granzym oder über den Fas/Fas-Ligand zur Lyse bzw. zum apoptotischen Zelltod der erkrankten Zelle (Kyburz 1993).

MHC-II-Moleküle kommen hauptsächlich auf spezialisierten antigenspezifischen Zellen wie Dendritischen Zellen (DCs), B-Zellen oder Makrophagen und aktivierten Endothelzellen vor und präsentieren exogene Antigene, die nach Aufnahme in die Endosomen zu Peptidfragmenten verdaut und in einer Länge von ca. 12 - 19 AS mit MHC-II-Molekülen gekoppelt auf ihrer Zelloberfläche präsentiert werden. Die CD4⁺ T-Helferzellen werden durch geeignete MHC-II-Antigenkomplexe aktiviert und wirken durch Proliferation und Sekretion verschiedener Zytokine lokal und systemisch vor allem im Sinne einer Koordination der Immunantwort. Nach einem Antigenkontakt außerhalb der lymphatischen Organe entstehen aus den naiven T-Zellen die sogenannten Gedächtnis- oder Memory-T-Zellen, die für eine längerfristige Erhaltung der Immunität sorgen (Burmester 1998; Janeway 2005).

Die Antikörper (AK) -vermittelten Immunreaktionen sind hauptsächlich bei der Abwehr freier Viruspartikel unmittelbar nach der Infektion wichtig, da sie virale Pathogene nur im Extrazellulärraum bekämpfen können (Snydman 1991). Sobald sich ein Virus innerhalb der Zellen befindet und dort persistiert, können AK nicht mehr angreifen, da autologe Zellen durch bestimmte AK/Oberflächenproteine vor komplementvermittelter Lyse geschützt sind. NK-Zellen können allerdings AK-beladene Zellen über ihren CD16-Rezeptor abtöten. Studien, die die passive Infusion von Immunglobulinen inklusive antigenspezifischer Immunglobuline am Beispiel des Humanen Zytomegalievirus (HCMV) bei Knochenmarktransplantierten Patienten (KM-Tx) untersuchten, konnten jedoch allenfalls einen geringen Einfluss auf die HCMV-bedingte Morbidität und Mortalität feststellen (Ringden 1987; Winston 1993).

1.1.2 Anwendungen von T-Zellen zur adoptiven Immuntherapie

Ebenso wie durch passive Immunisierung humorale Aktivität übertragen werden kann, kann adoptiver Transfer von Lymphozyten spezifische zelluläre Immunität übertragen. Bei angeborenen oder erworbenen Defekten zellulärer Immunität ist dies bisher die einzig mögliche kausal angreifende Therapie. Durch Mausmodelle konnte zuerst gezeigt werden, dass durch Lymphozytendepletion die Immunfunktion eliminiert und anschließend durch adoptiven Transfer syngener T-Zellen wiederhergestellt werden kann. Die Effekte der transferierten T-Zellen konnten dabei nach Subpopulationen getrennt modellhaft untersucht werden und es zeigte sich, dass antigenspezifische T-Zellklone spezifische Immunität übertragen können (Reddehase 1985; Reddehase 1987b; Steffens 1998). Beim Menschen zeigten klinische Studien vor mehr als einer Dekade, dass transferierte T-Zellen bei immunsupprimierten Patienten spezifische

Immunität wiederherstellen und die Patienten erfolgreich vor bestimmten Erkrankungen schützen können. 1985 demonstrierten Versuche mit autologen Lymphokin-aktivierten Killerzellen zusammen mit Interleukin 2 (IL2) erste Erfolge in der Therapie metastatischer Tumorerkrankungen (Rosenberg 1985). Weitere initiale klinische Studien wurden bei allogenen KM-Tx vor allem im Rahmen von Infektionen mit den Herpesviren HCMV und Epstein-Barr-Virus (EBV) durchgeführt (Riddell 1992; Papadopoulos 1994; Riddell 1994; Rooney 1995; Walter 1995; Heslop 1996; Rooney 1998). Zum einen charakterisiert diese Patientengruppe eine durch Radio- und Chemotherapie erworbene Ablation ihrer T-Zellimmunität, zum anderen persistieren Herpesviren nach erfolgter Primärinfektion z. B. in hämatologischen Vorläuferzellen und können in der Situation der Immunsuppression endogen reaktivieren bzw. durch Spenderzellen übertragen werden und zu potentiell letalen Infekten fortschreiten. HCMV und EBV sind einerseits durch eine hohe Prävalenz relevant, zum anderen können HCMV-spezifische T-Zellen aus Knochenmarksspendern isoliert werden. Durch alle diese Eigenschaften diente die HCMV-Infektion bei KM-Tx als Modell für die adoptive Immuntherapie (Riddell 1997).

Für die Prophylaxe und Therapie EBV-assoziiierter lymphoproliferativer Erkrankungen nach Transplantation (PTLD) wurden 1995 adoptive T-Zelltransfusionen eingesetzt und sind seitdem eine etablierte Therapieoption. Weit über 100 Patienten sind in diesem Kontext bereits erfolgreich behandelt wurden. Erleichtert wird dieser Erfolg in starkem Maße durch eine effiziente Herstellung EBV-spezifischer T-Zellen durch die Existenz einfach zu etablierender Antigenpräsentierender Zellen aus autologen infizierten B-Zellen (Rooney 1995; Heslop 1996; Rooney 1998).

Aktuell werden immer neue Felder adoptiver Immuntherapie gegen andere virale- und Tumorerkrankungen im Labor und in klinischen Trials erforscht. Dazu gehören z. B. HIV, Hepatitis C, Melanome, hämatologische Malignome, Mammakarzinom und Prostatakarzinom (Dudley 2001; Grakoui 2003; Meidenbauer 2003; Ridolfi 2003; Bishop 2004; Bollard 2004; Ma 2004). Durch diese Möglichkeiten ist die adoptive Immuntherapie mit antigenspezifischen T-Zellen eine attraktive Therapieoption mit einem großen Potential. Weitere Verbesserungen der T-Zellgenerierungsstrategien sind für eine breitere und sichere Anwendbarkeit im klinischen Rahmen nötig. Die vorliegende Arbeit soll in diesem Kontext dazu dienen, neue Strategien zur HLA-unabhängigen Generierung von T-Zellen am Beispiel von HCMV evaluieren.

1.2. Überblick über HCMV und seine klinische Bedeutung

1.2.1 Epidemiologie

Das Humane Zytomegalievirus (HCMV), auch als HHV 5 (Humanes Herpesvirus 5) bezeichnet, ist ein weltweit endemisches Virus aus der Subgruppe der β -Herpesviren. HCMV ist streng humanspezifisch, jedoch existiert durch das Murine CMV (MCMV) ein Mausmodell mit ähnlichen biologischen Eigenschaften. Eine Übertragung erfolgt postnatal überwiegend durch Speichel, Urin, und genitale Ausscheidungen, oder iatrogen im Rahmen von Bluttransfusionen, Organ- und Knochenmarkstransplantationen. Für neonatale Infektionen spielt die transplazentare Übertragung die wichtigste Rolle (Köhler 2001). Die Prävalenz des HCMV wird in Industriestaaten auf 40-70% der erwachsenen Bevölkerung geschätzt, in sogenannten „Entwicklungsländern“ auf bis zu 100% (Lamberson 1992; Fields 1995).

1.2.2 Virusaufbau

Mit einer Größe von ca. 235.000 Basenpaaren und einer Kodierungskapazität für über 200 virale Genprodukte besitzt HCMV das größte **Genom** aller humanen Herpesviren. Viele der Gene kodieren dabei für Proteine, die mit immunologischen Mechanismen interagieren. HCMV kann Immunreaktionen des Wirtsorganismus supprimieren und benutzt vielfältige Immunescape-Mechanismen, um lebenslang im Organismus persistieren zu können. Das reichhaltige Arsenal der Immunsystem-Evasionsgene bewirkt z.B. die Downregulation der MHC-I- und MHC-II-Expression der Wirtszelle, die Blockade der Präsentation viraler Antigene in MHC-Proteinen, oder das Unterbrechen von Signalketten, die zur Aktivierung von T-Zellen notwendig sind (Riddell 1991; Gilbert 1993; Gilbert 1996; Oldstone 1997; Ploegh 1998; Moutaftsi 2002). Das Genom besteht aus linearer doppelsträngiger DNA und befindet sich in einem icosahedrischen Kapsid (**Abb. 1**). Die Matrix (=Tegument) umgibt das Kapsid und wird wiederum von einer Hülle (Envelope) umschlossen, die aus der Lipiddoppelschicht der Wirtszellmembran entstanden ist. Die Funktion der ca. 25 bekannten Matrixproteine ist teils unbekannt, teils handelt es sich um Transkriptionsfaktoren. Eine Phosphorylierung wird durch die Vorsilbe pp gekennzeichnet. Im Envelope befinden sich bis zu 60 verschiedene virale Glykoproteine, von denen insbesondere gB und auch gH als wichtige Ziele humoraler Immunität bekannt sind. (Fields of Virology, 1996).

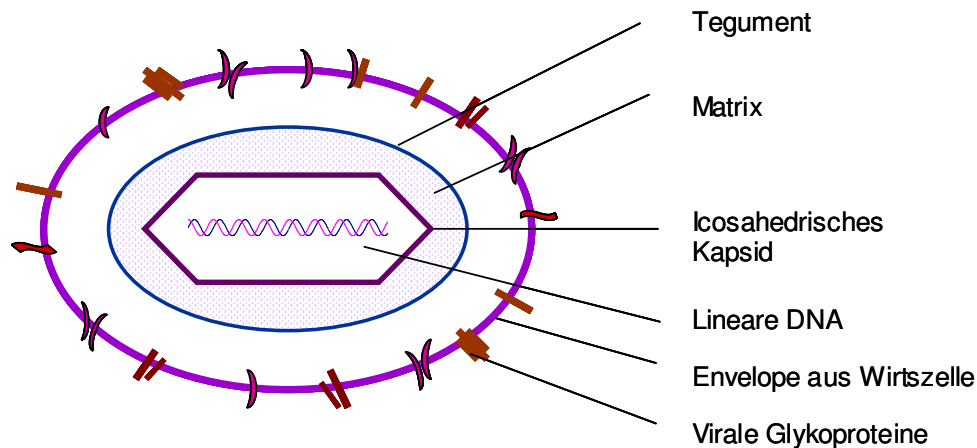


Abbildung 2: Die Struktur des HCMV-Virions

1.2.3 Die HCMV-Infektion in Immunsupprimierten

Bei gesunden, **immunkompetenten** Personen geht HCMV nach Erstinfektion in den Zustand der Latenz über und persistiert lebenslang in sogenannten Reservoirzellen. Als solche werden insbesondere insbesondere $CD34^+$ hämatopoetische Vorläuferzellen im Knochenmark sowie $CD13^+$ und $CD14^+$ Zellen im peripheren Blut diskutiert (Taylor-Wiedeman 1991; Movassagh 1996; Zhuravskaya 1997; Larsson 1998). Die Primärinfektion verläuft in diesem Personenkreis in der Regel asymptomatisch oder mit einem leichten, mononukleoseähnlichen klinischen Bild (Fields 1995). Im Gegensatz zu früherer Meinung ist heute bekannt, dass HCMV auch in gesunden Individuen und ohne bemerkte klinische Konsequenzen häufig und intermittierend reaktiviert, was z. B. mit Stress oder Entzündung assoziiert sein kann. Eine Dissemination des Virus oder ein Fortschreiten der Erkrankung wird jedoch durch HCMV-spezifische CTLs verhindert (Docke 1994; Toro 1996; Reinke 1999). Bei **eingeschränkter Immunität** ist vor allem durch die Reaktivierung und seltener durch Primär-, Neu- bzw. Superinfektion ein Fortschreiten zu einem fulminanten bis letalen Krankheitsbild möglich. Besonders gefährdet sind Feten bzw. Frühgeborene mit noch unreifer zellulärer Immunität, Menschen mit genetischen oder erworbenen Immundefekten wie vor allem HIV, sowie therapeutisch Immunsupprimierte im Rahmen von Organ- und Knochenmarkstransplantationen.

Für **Transplantierte solider Organe** ist die Wahrscheinlichkeit einer HCMV-Infektion mit der Entwicklung prognoserelevanter Komplikationen im starken Maße von der Spender/Empfänger-Serokonstellation abhängig. Am gefährdetsten ist dabei ein HCMV-seronegativer Organempfänger, der ein Organ von einem HCMV-seropositivem Spender bekommt, da durch das Transplantat z. B. HCMV-infizierte Monozyten übertragen werden, aber kein Schutz durch

spezifische T-Effektor- oder Gedächtniszellen besteht (Singh 1988; Merigan 1992; Sia 2000). Manifeste HCMV-Infektionen sind in dieser Gruppe in bis zu 60 % der Fälle beschrieben, insbesondere in der 4. bis 8. Woche nach Transplantation – bzw. später im Falle von antiviraler Prophylaxe (Fields 1995; Boeckh, M 1996b; Einsele 2000). Zu weiteren Risikofaktoren gehört die Art des transplantierten Organs - am häufigsten betroffen sind Herz-Lungen-Transplantat-Empfänger (39%), am seltensten erkranken Nierentransplantierte (8%) (Singh 1988; Merigan 1992; Ho, M 1994; Sia 2000). Dabei ist das transplantierte Organ selbst häufigster Manifestationsort der Infektion: typische Erkrankungen sind Pneumonitis nach Lungentransplantation, Hepatitis nach Lebertransplantation oder akzelerierte Koronarantherosklerose nach Herztransplantation (Zhou 1996; Rubin 2000).

Bei **Knochenmarktransplantierten** sind anders als bei Organtransplantierten HCMV-seropositive Patienten besonders gefährdet. Dies erklärt sich dadurch, dass in diesen Fällen durch die Ablation der T-Zellen nicht HCMV selbst eliminiert wird, sondern nur die schützende T-Zellfunktion. Bei bis zu 70% der Patienten, die HCMV-seropositiv sind oder ein HCMV-seropositives Transplantat bekommen, tritt deshalb eine Infektion auf, und ohne eine antivirale Intervention erkranken 20% bis die Hälfte dieser Patienten (Boeckh, ML, P 1998; Boeckh, M 1999; Einsele 1999). Die Mortalität bei Auftreten einer manifesten HCMV-Erkrankung innerhalb der ersten 3 Monate erreicht bis zu 70%. Die häufigste Todesursache dabei ist eine interstitielle Pneumonitis (Ljungman 1992; Boeckh, M 1996c). Zu den häufiger betroffenen Organsystemen gehört neben der Lunge der Gastrointestinaltrakt (de Jong 1998). Insgesamt treten sehr schwere bis tödliche HCMV-Infektionen bei ca. 10 % der KM-Tx auf (Zaia 2000).

Neben dem Serostatus und der Art des transplantierten Organs gehören die Art der immunsuppressiven Therapie (Lewis 1988; Rubin 1990; Moreso 1998), - insbesondere anti-lymphozytäre AK und OKT 3 - (Portela 1995), Koinfektionen z. B. durch HHV6 (DesJardin 1998; Ratnamohan 1998), die HLA-Kompatibilität des transplantierten Organs (Glenn 1981; Li 1994; Atkinson 1995), und Primärinfektion im Gegensatz zu endogener Reaktivierung zu weiteren Risikofaktoren. Ob es in Immunsupprimierten letztendlich zu einer HCMV-Erkrankung kommt und welches "Outcome" sie besitzt, hängt aber vor allem von der Anwesenheit bzw. Erholung antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten ab. Dies konnte in mehreren Untersuchungen, z. B. von Reusser et al. 1991 (**Tab.1**), Quinnan et al. (Quinnan 1982) und Li et al. (Li 1994) anschaulich gezeigt werden. Quinnan et al. untersuchte allogene KM-Tx in den ersten 3 Monaten. Patienten, die eine Erholung ihrer CD8⁺ HCMV-spezifischen T-Zellen zeigten, waren vor der Entwicklung einer HCMV-Pneumonie geschützt (0/25), während die anderen signifikant häufiger erkrankten (13/26). Eine Erholung der CD4⁺ Zellen alleine schützte nur in 2/7 Fällen vor HCMV-Pneumonie. Inwieweit CD4⁺ Zellen benötigt werden, um eine

effektive CTL-Antwort zu generieren, wurde leider von dieser Arbeitsgruppe nicht untersucht. Zusammengefasst demonstrieren diese Studien den deutlichen Zusammenhang einer fehlenden endogenen Erholung HCMV-spezifischer CTLs in KM-Tx in den ersten 3 Monaten nach Transplantation mit einer HCMV-Erkrankung.

Tabelle 1: Beziehung zwischen HCMV-spezifischen CTLs und HCMV-Erkrankung nach KM-Tx

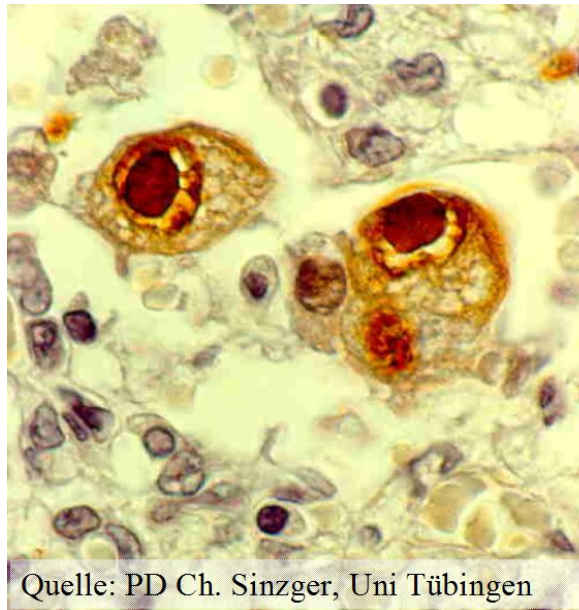
Studie von Reusser et al 1991:	Anzahl der KM-Tx Patienten	HCMV-Infektion	HCMV-Erkrankung	Outcome
HCMV-spezifische CTLs nachweisbar	10	7	1 Patient Ösophagitis, keiner Pneumonie	spontan geheilt
keine HCMV-spezifischen CTLs nachweisbar	10	6	6 Patienten Pneumonie	5 an Pneumonie verstorben (trotz Therapie mit Ganciclovir und HCMV-Immunglobulin)

Reusser et al. untersuchten 1991 20 KM-Tx von HCMV-seropositiven KM-Spendern in Bezug auf die Anwesenheit HCMV-spezifischer CTLs in der frühen Posttransplantationsperiode (3 Monate), und korrelierten diese mit der Entwicklung einer HCMV-Infektion bzw. einer manifesten HCMV-Erkrankung. Die Ergebnisse sind in dieser Tabelle dargestellt und zeigen, dass eine fehlende HCMV-spezifische CTL-Aktivität in den ersten 3 Monaten nach Transplantation mit einem stark erhöhten Risiko für eine schwere bis tödliche HCMV-Erkrankung einhergeht.

Die Diagnose einer HCMV-Erkrankung in Immunsupprimierten ist oft schwierig, da die Symptome mit Nebenwirkungen immunsuppressiver Therapie oder GvHD-Reaktion verwechselt werden können. HCMV schädigt Transplantierte jedoch nicht nur durch manifeste Erkrankung, sondern auch durch indirekte, asymptomatische Effekte (Paya 1993; Reinke 1994). Dazu gehören akute und chronische Transplantatabstoßung (Rubin 2000; Sageda 2002) und eine sekundäre Immunsuppression, die sich in opportunistischen fungalen oder bakteriellen Infekten sowie in lymphoproliferativen Erkrankungen durch EBV (PTLDs) zeigen kann (Wagner 1995; Badley 1996; George 1997; Manez 1997).

Für **HIV-Infizierte** Personen liegt die Durchseuchung mit HCMV bei fast 100%. Aktive HCMV-Erkrankungen sind demnach meist Folge einer Reaktivierung, die mit zunehmender Dysfunktion des Immunsystems häufiger auftritt. Aus nicht vollständig geklärten Gründen ist das Spektrum befallener Organe in diesem Kontext verschoben. Am häufigsten tritt eine HCMV-Retinitis auf, die sehr gefürchtet ist, da sie zur Erblindung führen kann, gefolgt von Enteritiden und Enzephalitiden (Smith 1994; Köhler 2001). Auch in HIV-Patienten gehört HCMV zu den häufigsten opportunistischen Infektionen mit einer Inzidenz bis zu 40% in fortgeschrittenen

Stadien, und ist unabhängig von der HIV-Viruslast mit einer Progression von HIV und erhöhter Mortalität assoziiert (Bowen 1996a; Bowen 1996b).



Quelle: PD Ch. Sinzger, Uni Tübingen

Abbildung 3: HCMV-infizierte Zellen im Lichtmikroskop

Fast pathognomonisch für eine HCMV-Infektion sind basophile Einschlusskörperchen, die durch Akkumulation viraler Nukleokapside im Zellkern entstehen und wie „Eulenaugen“ aussehen. Dieser typische Aspekt der so vergrößerten Zelle im Lichtmikroskop gab dem Virus den Namen „Zytomegalie“. Hier handelt es sich um eine Aufnahme von Nierenzellen.

1.2.4 Therapieoptionen bei HCMV-Infektion

Antivirale Therapie

In der letzten Dekade kam es zu deutlichen Fortschritten in der antiviralen Therapie. Mehr allerdings als konzeptuell neue antivirale Medikamente wurden verschiedene Behandlungsstrategien entwickelt, die eine Überwachung der HCMV-Viruslast voraussetzen. Dabei geht es insbesondere um Risiko-Nutzen-Kosten-Abwägungen und darum, selektiv gefährdete Patienten zu behandeln, um die Exposition der Patienten mit den sehr toxischen Medikamenten gering zu halten (Zaia 2000). Eine **prophylaktische Therapie** aller KM-Tx ist nicht nur nicht kosteneffizient, sondern zeigte vor allem durch die Toxizität der Pharmaka ein verschlechtertes Gesamtergebnis (Goodrich 1993; Winston 1993; Zaia 1997). Die **präemptive Therapie** (Frühintervention) für KM-Tx, für die eine 1-2 wöchentliche Überwachung der HCMV-Virusreplikation im Blut erforderlich ist, führte in einigen Studien nicht zu einer Senkung der Mortalitätsrate, sondern nur zu einer Verschiebung der Erkrankung von den ersten 3 Monaten („early-onset“) zu 6-12 Monaten nach Transplantation („late-onset“) (Li 1994; Krause 1997;

Einsele 2000; Zaia 2000). Die Begründung liegt vermutlich darin, dass durch die Medikamente unter anderem die endogene Erholung HCMV-spezifischer T-Zellen verzögert wird (Boeckh, M 1996a). Es gibt aber auch zahlreiche positive Berichte über präemptive Therapie. Letztendlich hemmen die antiviralen Medikamente aber nur die Virusreplikation und senken dadurch temporär die Viruslast. Ohne adäquate Immunabwehr kommt es nach Absetzen zum schnellen Relapse. Bei einer medikamentösen Dauertherapie muß nicht nur mit Resistenzentwicklung gerechnet werden (Chou 1995a; Chou 1995b), sondern diese kommt vor allem aufgrund der Nebenwirkungen nicht in Betracht. Zu den häufigsten Nebenwirkungen des für Therapie und Prophylaxe zur Zeit vor allem eingesetzten Ganciclovir gehören zum Beispiel eine schwere Neutropenie und Anämie (Bowden 1987; Goodrich 1993).

Vakzinierung

Insbesondere aufgrund der hohen sozioökonomischen Bedeutung der kongenitalen HCMV-Infektion für die Patientengruppe der Neugeborenen, aber auch für andere Patientengruppen gehört die Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes zu den wichtigsten Zielen in der Impfstoffentwicklung. Das „Institute of Medicine“ in den USA ordnete diesem Ziel 1999 sogar die höchste Priorität zu. Durch Infektion des zentralen Nervensystems ist HCMV die häufigste Ursache für Hörschäden und mentale Entwicklungsdefekte bei Neugeborenen. Ein Impfstoff, der zur Entwicklung humoraler Immunität führt, schützt allerdings hauptsächlich vor Primärinfektion, und kann im Fall endogener Reaktivierung nur zur Verminderung einer Dissemination und Schwere der Erkrankung führen. Verschiedene Ansätze zielen deshalb, darauf ab, neben einer humoralen Immunantwort gleichzeitig eine starke HCMV-spezifische CTL-Antwort zu erreichen. Das Glykoprotein gB, das Phosphoprotein pp65, und andere aus neueren Epitop-determinierenden Studien bekannte Peptide sind Ziele, gegen die durch einen Impfstoff eine Immunantwort induziert werden soll (Frey 1999; Berencsi 2001). Trotz einiger vielversprechender Ideen und vielen Weiterentwicklungen konnte bisher noch kein klinischer Schutz vor einer HCMV-Erkrankung gezeigt werden.

Adoptive Immuntherapie

Nicht nur die Toxizität und die Grenzen antiviraler Medikamente, sondern auch die eigentliche Ursache des Fehlens HCMV-spezifischer Lymphozyten machen den adoptiven Lymphozytentransfer zu einer attraktiven Therapieoption. Durch die Entwicklung von Gedächtniszellen kann die Immunität gegen HCMV dabei längerfristig erhalten bleiben und vor Reaktivierungen dieser Herpesviren schützen.

In klinischen Studien konnte die Effizienz adoptiver Immuntherapie gezeigt werden. 1992 infundierten Ridell et al. prophylaktisch in vitro expandierte antigenspezifische T-Zellen von

HCMV-seropositiven KM-Spendern in ihre Transplantatempfänger und zeigten damit den klinischen Erfolg einer HCMV-spezifischen zytotoxischen Aktivität. Zu den klinischen Pionierarbeiten mit HCMV-spezifischen T-Zellen gehört auch eine Untersuchung von Walter et al. (1995), die in einer Phase-I Studie 14 KM-Tx Patienten ohne signifikante Nebenwirkungen und 11 der 14 Patienten erfolgreich behandelten. Eine andere klinische Studie wurde 2002 von Einsele et al. durchgeführt. Hierbei ging es um die Therapie von 8 KM-Tx, die nach über 4-wöchiger antiviraler Chemotherapie an persistierender oder rezidivierender HCMV-Infektion litten. Durch Infusion HCMV-spezifischer T-Zellen der Knochenmarkspender konnte die Viruslast in allen 7 evaluierbaren Patienten gesenkt werden. Peggs et al. behandelten 2003 16 KM-Tx mit früher HCMV-Infektion durch adoptive Immuntherapie. 8 dieser Patienten benötigten keine zusätzliche antivirale Therapie, und nur 2 der Patienten erlitten trotz der Therapie Episoden von HCMV-Reaktivierung (Peggs, KS 2003).

Die Anwendung HCMV-spezifischer T-Zellen in der Klinik ist allerdings selten, insbesondere für andere Zielgruppen als KM-Tx-Empfänger. Die Ursachen liegen vor allem in den Schwierigkeiten biosicherer, praktikabler und kosteneffizienter T-Zellherstellung.

1.3 Adoptive Immuntherapie im Rahmen der HCMV-Infektion

1.3.1 Prinzipien und Anforderungen an die Generierung von T-Zellen

Für adoptiven Lymphozytentransfer müssen Spender und Empfänger genetisch weitgehend identisch sein. Dies kann, außer bei eineiigen Zwillingen, dadurch erreicht werden, dass in vitro beeinflusste autologe Zellen oder im Falle KM-Tx die Zellen der Spender verwendet werden. Durch die Infusion unselektierter Spenderzellen besteht aber auch die Gefahr der Präsenz alloreaktiver T-Zellen. Dass allogene, polyklonale T-Zellinfusionen von Knochenmarksspendern für Transplantierte tatsächlich zu schweren Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD) führen können, wurde in verschiedenen Arbeiten bestätigt (Kolb 1990; Szer 1993; Papadopoulos 1994; Heslop 1996; Rooney 1998). Da diese Nebenwirkungen bei der Infusion HCMV-spezifischer T-Zellen nicht beobachtet wurden, entwickelte sich die Anforderung, nur strikt antigenspezifische T-Zellen für die adoptive Immuntherapie zu verwenden.

Die natürliche Immunität richtet sich gegen ein breites Spektrum von Antigenen, und gegen verschiedene Epitope innerhalb eines Antigens (Kern 2000; Manley 2004). Um diese Immunität durch T-Zellinfusionen vollständig wiederherzustellen, sind Lymphozyten mit multiplen Spezifitäten - das heißt gegen mehrere verschiedene Epitope und Antigene gerichtet - erforderlich. Auch T-Zellklone, die gegen ein einzelnes Epitop gerichtet sind, können wirksam

sein, sind aber gefährdet, ihre Wirkung durch Virus-„Escape“-Mutationen zu verlieren (Gottschalk 2001; Khong 2004). Eine oligoklonale oder besser multispezifische T-Zellantwort, idealerweise gegen verschiedene Proteine des Virus, gehört deshalb zu den Anforderungen für eine effektive Immuntherapie.

Der Erfolg adoptiver Immuntherapie hängt nicht nur von der Isolation und der spezifischen Expansion antigenspezifischer T-Zellen ab, sondern auch von der Persistenz und der Funktion dieser T-Zellen im Menschen. Faktoren, die die Persistenz der T-Zellen verlängern können, sind nach bisherigem Erkenntnisstand insbesondere die Wiederherstellung spezifischer T-Helferzellen zusätzlich zu den CD8⁺ Lymphozyten, und zwar - da eine endogene Erholung oft nicht spontan auftritt - durch exogene Infusion (Riddell 1997; Zajac 1998a; Zajac 1998b). Auch IL2 kann die Funktion und Persistenz der CTLs in vivo verbessern, so dass sogar die benötigte CTL-Dosis vermindert werden kann, insbesondere da die CD4⁺ Zellen vor allem durch Sekretion von Zytokinen wirken (Cheever 1982; Greenberg 1982; Reddehase 1987a). Allerdings ist die Applikation von IL-2 in den Transplantierten aufgrund der gewünschten Immunsuppression sehr problematisch.

Da es um Anwendungen in Patienten geht, müssen Übertragungen infektiöser und genetisch modifizierter oder anders kontaminierter Produkte mit Sicherheit ausgeschlossen werden können. Die Qualität der produzierten Zellen muss beständig sein und kontinuierlich streng kontrolliert werden. Diese Kontrollen, die Produktion und die Applikation der Zellen muss daher nach strikten Standards erfolgen, die in sogenannten „Gute-Herstellungs-Praxis“ (Good-manufacturing-practice/GMP) -Richtlinien festgeschrieben sind. Eine Methode der T-Zellgenerierung, die für eine klinische Anwendung entwickelt wird, muss deshalb unter diesen Richtlinien durchführbar sein. Je weniger dabei virale, bakterielle oder gentechnisch veränderte Produkte eingesetzt werden, desto eher und desto einfacher kann diese Sicherheit gewährleistet sein.

1.3.2 Methoden zur Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen: Stand der Forschung

Aktuell werden verschiedene Methoden zur Zellherstellung eingesetzt, die alle durch bedeutende Nachteile in ihrer Praktikabilität und Anwendbarkeit eingeschränkt sind. Die Schwierigkeiten liegen insbesondere darin, ein passendes Antigen in einer autologen oder HLA-kompatiblen Zelle zu präsentieren, um eine spezifische CTL- und T-Helferzell-Antwort in vitro zu erreichen und so die spezifischen Zellen aus einem polyklonalen PBMC-Pool zu selektionieren.

Bisherige Grundprinzipien der T-Zellherstellung gegen HCMV sind folgende (siehe auch **Tab. 2**):

1) **Lysiertes HCMV**, welches aus Fibroblasten-Zelllinien gewonnen wird, wird als HCMV-Antigen verwendet. Antigenpräsentierende Zellen (APCs), in der Regel Dendritische Zellen oder Monozyten, prozessieren dieses nach Inkubation und präsentieren anschließend wichtige Epitope vor allem im MHC-II-Kontext auf ihrer Oberfläche (bei Kreuzpräsentation auch über MHC-I). Je nach HLA-Typ der Zellen werden dabei verschiedene Peptide präsentiert. Unabhängig vom HLA-Typ des Spenders können so multispezifische T-Zelllinien hergestellt werden. Ein entscheidendes Risiko liegt jedoch in der Biosicherheit der Methode. Eine Übertragung infektiöser Viren auf den Patienten kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, und die Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Methode sind durch variable Funktion und Anzahl der APCs fraglich. Es entstehen hauptsächlich Zellen vom CD4⁺ Immunphänotyp (Riddell 1992; Walter 1995; Einsele 2002b).

2) Möglich ist eine Stimulation und Selektion antigenspezifischer T-Zellen mit Hilfe von **Einzelepitopen**. Häufig angewendet werden Peptide aus 9 Aminosäuren (AS), da sich solche ohne endogene Prozessierung direkt an MHC-I-Moleküle anlagern können (Kleihauer 2001; Knutson 2002). So werden CD8⁺ Lymphozyten mit einer Spezifität gegen nur ein einzelnes Epitop stimuliert. Zusätzlich kommt es nicht zur Generierung der ebenfalls wichtigen CD4⁺ Lymphozyten. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist eine höhere Biosicherheit, da die synthetische Herstellungsweise reiner Peptide streng kontrolliert werden kann und keine potentiell infektiösen Virusbestandteile vorkommen. Allerdings müssen für ihre Herstellung die entscheidenden immunorelevanten AS-Sequenzen innerhalb des Zielantigens bekannt sein. Diese hängen aber vom jeweiligen HLA-Typ ab, und aufgrund deren Vielzahl sowie der Vielzahl möglicher Antigene wäre eine Erforschung möglicher Epitope nicht nur extrem zeitaufwendig, sondern ebenfalls mit hohen Kosten verbunden und ist schlicht nicht praktikabel. Außerdem besteht die Gefahr, dass durch Virusmutation das Einzelepitop verloren geht.

3) Eine andere Strategie basiert auf den synthetisch herstellbaren **Tetrameren** zur Antigenpräsentation. Dabei handelt es sich um 4 polymerisierte MHC-Moleküle in Kombination mit ausgewählten Epitopen, die so die Struktur des MHC-Antigen-Komplexes imitieren (Oelke 2000; Keenan 2001). Sie sind zuverlässig zur Antigenpräsentation einsetzbar und ihre Herstellung ist zeit- und arbeitssparend und unter streng kontrollierbaren Bedingungen anwendbar. Ihre Nachteile entsprechen denen der Einzelpeptide. Für die fehlenden CD4⁺ Zell-Antworten wäre allerdings prinzipiell eine gezielte Selektion CD4⁺ Zellen durch MHC-II-Tetramere möglich. Zu dieser 3. Kategorie kann man zusätzlich neuere Ansätze, die **künstliche**

– synthetisch hergestellte – **APCs** verwenden, mit einschließen. Sie haben prinzipiell die gleichen Vor- und Nachteile wie Tetramere.

4) **Dendritische Zellen** werden meist für die oben beschriebenen Methoden 1) und 2) sowie für weitere Ansätze verwendet. Sie können exogen mit relevanten Antigenen oder Peptiden beladen werden oder - nach Infektion durch Viren - endogen prozessierte Antigene präsentieren. Dadurch sind sie prinzipiell in der Lage, CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren – je nachdem, wie und welches Antigen sie präsentieren. Ihre Gewinnung ist allerdings zeit-, arbeits- und kostenaufwendig, und die Notwendigkeit ihrer gesonderten Herstellung schränkt die Effizienz der T-Zellgenerierung ein (Kleihauer 2001; Peggs, K 2001).

5) Bei **Lymphoblastoiden Zelllinien** (LCLs) handelt es sich um autologe B-Zellen, die durch Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und unter Suppression der protektiven T-Zellen durch Ciclosporin A (CsA) zu immortalen Tumorzellen transformiert werden, ähnlich wie es im Rahmen der PTLDs bei immunsupprimierten Patienten geschieht. Da B-Zellen zu den Antigenpräsentierenden Zellen gehören, die sowohl im MHC-I als auch im MHC-II-Kontext Antigene präsentieren können, handelt es sich um ideale Antigenpräsentierende Zellen, die zur Generierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelllinien eingesetzt werden können. Durch Infektion mit einem EBV-Laborstamm können LCLs in vitro einfach und HLA-unabhängig aus autologen Patientenzellen hergestellt werden, und durch ihr ausgezeichnetes Wachstum stehen sie in ausreichenden Mengen zur Verfügung. Diese Methode wurde vielfach erfolgreich zur Generierung EBV-spezifischer T-Lymphozyten verwendet (Heslop 1996; Rooney 1998). Um auch für andere Antigene wie HCMV eingesetzt werden zu können, wurden sie durch Gentransfer zur Präsentation fremder Antigene modifiziert (Sun 1999; Sun 2000). Problematisch ist allerdings wiederum ein zusätzlicher Arbeitsaufwand für den Gentransfer sowie die Notwendigkeit adeno- oder retroviraler Vektoren mit der potentiell gefährlichen Anwesenheit viraler Bestandteile.

6) Eine Weiterentwicklung von 5) ist ein genmodifiziertes EBV (**Abb. 4**), welches Zielantigene in seinem Genom integriert trägt, um sie so in LCLs zur Präsentation ohne zusätzliche Viren einzuschleusen, aber zusätzlich einiger eigener Gene beraubt wurde, die für die Fähigkeit zu lytischer Infektion verantwortlich sind. Damit kann dieses Vektorsystem B-Lymphozyten zwar zu LCLs transformieren, ist aber teilungsdefizient und damit biosicherer. Mit Hilfe einer Verpackungszelllinie gelingt es, dieses sogenannte „mini-EBV“ mitsamt dem integrierten fremden Genomabschnitt in B-Lymphozyten einzuschleusen (Kempkes 1995a; Kempkes 1995b). Diese transgenen LCLs wurden im Hinblick auf HCMV bereits mit dem pp65 Protein versehen und konnten erfolgreich zur Generierung HCMV-spezifischer Lymphozyten eingesetzt werden (Moosmann 2002). Die so hergestellten pp65 exprimierenden LCLs - im folgenden als

pp65 mini-LCLs bezeichnet - wurden in dieser Arbeit für 2 von 3 untersuchten Generierungsstrategien mit eingesetzt (Protokoll II und III). Nachteil dieser Methode ist ein zusätzlicher Zeit- und Arbeitsbedarf und ein nicht ganz einfacher Transfer in eine GMP-gerechte Arbeitsweise.

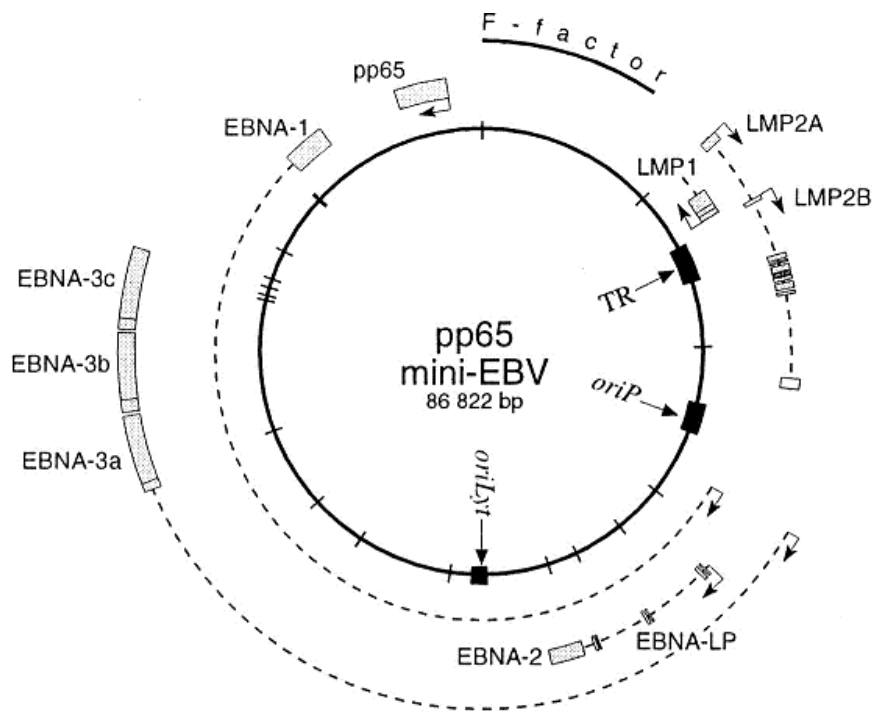


Abbildung 4: Design des mini-EBV-Plasmids zur Generierung der pp65 mini-LCLs

Zur Herstellung von autologen transgenen pp65 exprimierenden mini-LCLs dient ein mini-EBV-Plasmid, welches nur diejenigen 40% der DNA eines EBV-Virus enthält, welche zur Immortalisierung, nicht aber zur Infektion nötig ist. Zusätzlich integriert ist hier das Gen für pp65. Prinzipiell können in dieses Plasmid beliebige DNA-Abschnitte integriert und so eine Expression fremder Antigene durch die mini-LCLs erreicht werden (Kempkes 1995b). Vorteil dieser Technologie ist ein Ausschluss von Infektiosität für den Menschen, solange keine Rekombination mit normalem EBV in infizierten B-Zellen stattfindet. Dies kann unter Laborbedingungen durch genetische Analyse der Zellen mittels stammspezifischen Primern durch PCR untersucht werden.

Tabelle 2: Vor- und Nachteile aktueller Methoden zur T-Zellherstellung

Nr. im Text	Herstellungsmethode	Vorteile	Nachteile	Literatur
1)	Virale Lysate auf DCs/PBMCs	- HLA-unabhängig - multispezifische T-Zellen - spezifische CD4+ T-Zellen	- weniger CD8+ T-Zellen - Biosicherheit - Zuverlässigkeit	Walter et al 1995 Einsele et al 2002 (cytoth.)
2)	Einzelpeptide (9 AS) auf DCs/PBMCs	- spezifische CD8+ T-Zellen - Biosicherheit - klinisch getestet	- HLA-abhängig - Kenntnis immunodominanter Epitope - keine CD4+ T-Zellen - nur gegen einzelnes Epitop	Kleihauer et al Knutson et al 2002
3)	Tetramere und künstliche APCs	- zeitsparende Zellherstellung - Biosicherheit	- HLA-abhängig - Kenntnis immunodominanter Epitope - nur gegen einzelnes Epitop	Keenan et al Oelke et al 2003
4)	Dendritische Zellen als APCs	- prinzipiell CD4+ und CD8+ T-Zellen	- Zeit- und Arbeitsaufwendige Herstellung - Zuverlässigkeit	Kleihauer et al Szmania
5)	transgene LCLs	- HLA-unabhängig - multispezifische T-Zellen - spezifische CD8+ und CD4+ T-Zellen	- Biosicherheit - Arbeits- und Zeitaufwendig	Sun et al 1999 und 2000
6)	pp65 mini-LCLs	- HLA-unabhängig - multispezifische T-Zellen - spezifische CD8+ und CD4+ T-Zellen	- Biosicherheit (verbessert gegenüber 5)) - Arbeits- und Zeitaufwendig	Kempkes et al 1995 Moosmann et al 2002

Von diesen Generierungsstrategien ausgehend wird deutlich, dass noch methodische Verbesserungen nötig sind, um eine breite Anwendung antigenspezifischer T-Zellen im Rahmen der adoptiven Immuntherapie zu ermöglichen.

1.3.3 Die Immunantwort gegen HCMV als Grundlage adoptiver Immuntherapie

Studien, die sich damit beschäftigten, welche der vielen HCMV-Antigene wichtig für die Immunität sind, fanden das Matrixprotein **pp65**, auch als ppUL 83 bezeichnet, als eines der wichtigsten Ziele der CTLs (**Tab. 3**) (McLaughlin-Taylor 1994; Wills 1996; Riddell 1997; Gyulai 2000; Kern 2002). Experimente zur Identifikation immunorelevanter Epitope mittels Blockade der RNA-Synthese durch Aktinomycin D zeigten erstaunlicherweise, dass keine Produktion viraler Proteine zu seiner Antigenerkennung notwendig war (Riddell 1991). Eine Erklärung dafür ist, dass bei Eintritt des Virus in die Wirtszelle - durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran - die virale Matrix freigesetzt wird, während das Nukleokapsid in den Zellkern wandert. Dadurch ist pp65 in der Wirtszelle detektierbar und als Antigen präsentierbar, bevor aktive Virusreplikation und die damit verbundenen Immunescape-Mechanismen von HCMV in Kraft treten. Während der Virusreplikation korreliert die Anzahl pp65-positiver Zellen mit viraler

Aktivität und dem Erkrankungsrisiko, wodurch sich dieses Protein auch zur Diagnostik eignet (Boeckh, M 1992).

Ähnlich wichtig wie pp65 für die Immunantwort ist **IE1**. Hierbei handelt es sich um ein Funktionsprotein, welches in der Frühphase der Replikation eine wichtige Rolle als Transkriptionsfaktor spielt. Studien, die T-Zellreaktivitäten untersuchten, fanden interessanterweise in diesem Zusammenhang, dass manche HCMV-seropositive Probanden entweder nur auf pp65 reagieren, oder nur auf IE1, mindestens aber gegen eines der beiden (Kern 1999; Gyulai 2000; Kern 2002; Khan 2002; Bunde 2005). Vermutlich hängt dies mit dem HLA-Typ des Spenders zusammen.

Das Hauptaugenmerk der Untersucher lag dabei meist auf den **zytotoxischen Lymphozyten**, da diese die größte Bedeutung in der Abwehr von HCMV haben. Kern et al. stellte 2002 fest, dass pp65 bei einigen Probanden neben der CD8⁺ Antwort auch die **CD4⁺ Antwort** dominiert. Die individuellen T-Zellfrequenzen (n=16) waren dabei zwar sehr variabel, jedoch erstaunlich hoch und reichten für die T-Helferzellen von 0,03 bis 1,95% (Median 0,19 %), für die CD8⁺ Lymphozyten von 0,04 bis 2,38% (Median 0,85). Außerdem zeigten sich für die gleichen Spender oft T-Zellantworten gegen mehrere verschiedene Epitope. CTLs eines einzigen Spenders erkannten bis zu 4 Epitope, CD4⁺ Lymphozyten bis zu 3 Epitope von pp65.

Tabelle 3: T-Zellreaktivitäten HCMV-seropositiver Probanden gegen pp65 und IE1

pp65 CD8 ⁺	pp65 CD4 ⁺	IE1 CD8 ⁺	IE1 CD4 ⁺	Anzahl HCMV-seropositiver Probanden	Studie
75%		58%		12	Kern et al 1999
92%		76%		34	Gyulai et al 2000
83%	63%			40	Kern et al 2002

Neben pp65 und IE1 gibt es noch **weitere immunogene Proteine**, die allerdings nach heutigem Wissenstand eine geringere Bedeutung haben. Erwähnenswert als Ziele der CTLs sind das Matrixprotein pp150 und das Glykoprotein gB, für welche Gyulai et al. (2000) 30% und 33% reaktive CTLs respektive unter 34 HCMV-seropositiven Probanden unterschiedlicher Rassen und Herkunft fanden. Für die T-Helferzellen sind neben pp65 und IE1 noch die Glykoproteine gB, gH, pp65 und IE1 zu nennen. Aktuell werden unter den erwähnten Proteine

pp65 und IE1 als die bedeutendsten Antigene sowohl für die T-Helferzellen als auch für die CTLs angesehen (Kern 1999; Kern 2000).

Nicht nur für die adoptive Immuntherapie, sondern auch für die Vakzinentwicklung waren die **einzelnen Epitope** der bekannten Antigene pp65 und IE1 in den letzten Jahren Gegenstand von Interesse und konnten dadurch teilweise präzisiert werden. Dies wurde durch die Entwicklung genauerer und effektiverer Methoden zur **Analyse** von Lymphozyten ermöglicht (Altman 1996; Kern 1998). Welche Epitope aus einem Antigen von den T-Zellen erkannt werden, hängt dabei von der genauen Beschaffenheit des MHC-I und MHC-II-Rezeptors und damit vom HLA-Typ des Patienten ab.

Computerbasierte Algorithmen, die in Abhängigkeit des HLA-Typs Vorhersagen für MHC-I-Motive damit für bestimmte AS-Sequenzen treffen, sind eine Alternative zu den zeitaufwendigen Epitopmapping-Methoden (Parker 1994; Brusic 1998a; Brusic 1998b; Rammensee 1999). Allerdings sind diese Vorhersagen nicht immer adäquat und klären die immunorelevanten Epitope für den Einzelnen nicht ausreichend auf. Die praktische Erfahrung hat gezeigt, dass selbst Patienten mit gleichem HLA-Typ unterschiedliche T-Zellantworten und -frequenzen für einzelne Epitope haben, die Antwort eines Patienten sich im Lauf der Zeit verändern kann, und Peptide übersehen werden können (Kern 1998; Ayyoub 2002). Eine praktischere Alternative zur Epitop-Determination für die adoptive Immuntherapie sind überlappende **Peptidbibliotheken**.

1.3.4 Überlappende Peptidbibliotheken von pp65 als Basis für die T-Zellgenerierung

Überlappende Peptidbibliotheken (Overlapping peptid pools/OPPs) eines Proteins bestehen aus einer Mischung von Einzelpeptiden, die sich um eine bestimmte Anzahl von Aminosäuren überlappen. Maecker et al. untersuchten 2001 die Effizienz von Peptidgemischen zur Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe von Flowzytometrie (FACS). Obwohl 8-12 AS eine optimale Länge für CD8⁺ Antworten sind, zeigte sich eine **Länge von 15 AS** als noch effektiv. Mit dieser Länge konnten dabei zusätzlich CD4⁺ Antworten erreicht werden, und durch vergleichende Tests von OPPs mit Gesamtprotein zeigte sich, dass diese äquivalent und quantitativ repräsentativ waren. Eine Länge von 15 AS kann also sowohl MHC-I als auch MHC-II-Moleküle direkt mit Antigen besetzen. Mit einer Peptidbibliothek, die aus einer großen Anzahl an 15-mer Peptiden besteht, konnten deswegen CD4⁺ und CD8⁺ Antworten hervorgerufen und adäquat quantifiziert werden.

Durch eine **Überlappung** dieser Peptide um **9-11 AS** können alle potentiell immunogenen Epitope in einem einzigen Peptidpool (OPP) zusammengefasst werden. Dadurch eröffnet sich die Möglichkeit, ohne die Kenntnis einzelner immunrelevanter Epitope und einzelner HLA-Typen T-Zellantworten zu messen, zu charakterisieren und T-Zellen zu stimulieren. Bisher wurden solche OPPs zur Analyse von CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten eingesetzt (Betts 2000; Kern 2000; Betts 2001; Maecker 2001; Kern 2002). In dieser Arbeit soll der OPP von pp65 erstmals zur Selektion von T-Zellen für eine weitere Kultivierung in vitro verwendet werden.

Der OPP des pp65 von HCMV besteht deshalb aus 15-mer Peptiden, die sich um jeweils 11 AS überlappen (**Abb. 4**). Durch die 562 AS lange Proteinsequenz von pp65 ergeben sich daraus insgesamt 138 verschiedene Peptide. Jedes Peptid ist in dem OPP in gleicher Konzentration vorhanden.

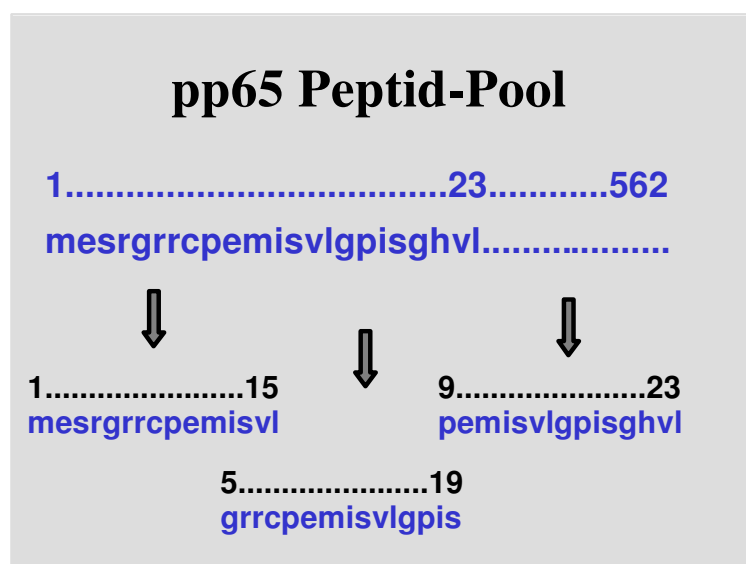


Abbildung 5: Der Peptidpool (OPP) von pp65

Die gesamte Aminosäurenlänge des pp65-Proteins wurde in sich um je 11 AS überlappende 15-mer Peptide eingeteilt. Die Buchstaben in der Abbildung bezeichnen je 1 Aminosäure entsprechend der internationalen Nomenklatur.

Überlappende Peptidpools haben viele Vorteile. Eine Stimulation ist sehr zeiteffizient: In wenigen Stunden Ex-Vivo-Stimulation der PBMCs kann eine ausreichende IFN- γ -Sekretion der antigenspezifischen T-Zellen erreicht werden. Im Gegensatz zu Stimulation mit einzelnen Peptiden kann eine Antwort gegen multiple Epitope erreicht werden, und es ist kein Wissen und keine Erforschung immunrelevanter T-Zellepitope für verschiedene HLA-Typen nötig. Auch bei niedrigen T-Zellfrequenzen wird eine IFN- γ -Sekretion spezifischer T-Zellen erreicht (Kern 1998).