

1. Einleitung

1.1 Epstein Barr Virus (EBV)

1.1.1 Entdeckung und Epidemiologie

Der englische Arzt Denis Burkitt beschrieb 1958 erstmals ein Lymphom, das gehäuft bei Kindern in Ost- und Zentralafrika auftrat ¹. Das endemische Auftreten in Afrika ließ eine infektiöse Genese vermuten und der Pathologe Michael Anthony Epstein sammelte 1961 Biopsien, um diese auf einen ursächlichen Erreger zu untersuchen. Drei Jahre später konnte Epstein zusammen mit seinen PhD Studenten Yvonne Barr und Bert Achong mittels Elektronenmikroskopie in Zelllinien aus Burkitt-Lymphomen einen Virus nachweisen ^{2, 3}. Das erste humane tumorassoziierte Virus war entdeckt. 1968 wurde EBV als Erreger der Infektiösen Mononukleose (IM) von Gertrud und Werner Henle identifiziert. Damit wurde erstmalig der Zusammenhang zwischen Infektion und Tumorgenese festgestellt ⁴. In den 80er Jahren konnte EBV in weiteren Neoplasien, einschließlich Non-Hodgkin-Lymphomen / Hodgkin Lymphomen, Nasopharynx-Karzinomen und oraler Haarleukoplakie von AIDS Patienten nachgewiesen werden ⁵⁻⁸.

Epidemiologische Studien zeigen, dass mehr als 90% der adulten Weltbevölkerung EBV infiziert ist. Die Infektion erfolgt in der Regel asymptomatisch im Kleinkind- bzw. im Kindesalter und führt nur in einem geringen Prozentsatz zu einer akuten, klinisch symptomatischen Infektion, der infektiösen Mononukleose (IM).

1.1.2 Molekulare Eigenschaften des EBV

Das EBV (humanes Herpesvirus Typ 4, HHV4) zählt zusammen mit dem Kaposi-Virus (humanes Herpesvirus Typ 8, HHV8) zu der Familie der γ -Herpesviren. Seine doppelsträngige DNA ist von einer ikosaedrischen Kapsel umschlossen, die wiederum von einer Virushülle umgeben ist. Die DNA besteht aus ca. 172 000 Basenpaaren, die für ca. 100 Proteine kodieren. Es können zwei EBV Typen (Typ 1 und 2) unterschieden werden mit insgesamt sehr ähnlichen Genomen. Mit Ausnahme bestimmter Regionen in Afrika und Neu Guinea dominiert der EBV Typ 1. Nach einer initialen lytischen Infektion erfolgt die lebenslang persistierende latente Infektion, bei der maximal neun latente EBV-Proteine

exprimiert werden. Hierzu zählen die sechs nukleären Proteine EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C, und EBNA-LP und die drei Membranproteine LMP1, LMP2a und LMP2b. Zusätzlich werden zwei nicht translatierte Transkripte, EBER1 und 2, sowie Transkripte des Leserahmens BARF0 synthetisiert⁸. EBV führt zu einer spezifischen Infektion von B Zellen durch Bindung eines Glykoproteins der Virushülle an den CD21 Rezeptor der B Zelle. Für die Proliferation und maligne Transformation der infizierten B Zelle sind sechs Proteine essentiell: EBNA1, EBNA2, EBNA3A, EBNA3C, LMP1 und LMP2a. Die Aktivität von LMP1 und LMP2 basiert auf der Interaktion mit einer Reihe von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden. Das Membranproteins LMP1 imitiert eine CD40 Bindung der B Zelle, die zu einer Aktivierung von „TNF-Rezeptor Associated Factors (TRAFs)“ führt, welche wiederum den Transkriptionsfaktor NF-κB aktivieren^{9, 10}. Das Membranprotein LMP2 ist bedeutsam, weil es die Bindung an den B-Zellrezeptor imitiert und somit die Aktivierung vom latenten zum lytischen Replikationszyklus inhibiert¹¹. Das nukleäre Protein EBNA1 bindet das EBV Genom über den Ursprung der latenten Replikation oriP episomal an das zelluläre Genom und sichert so die Replikation des Virus mit der sich teilenden Zelle. Interessanterweise hemmt EBNA1 durch eine interne Glycin / Alanin Wiederholungsregion die eigene Translation und Prozessierung durch das Proteasom, sodass eine endogene Präsentation auf MHC Klasse I verhindert wird^{12, 13}. EBV-infizierte B Zellen können vier verschiedene EBV-Genkombinationen exprimieren. Neben dem lytischen Expressionsprofil können drei verschiedene latente Expressionsprofile unterschieden werden. Eine Zusammenfassung der verschiedenen Proteinexpressionsmuster, ursprünglich auch als Latenz I - III definiert, findet sich in Tabelle 1. Die verschiedenen Transkriptionsprogramme sind ebenfalls bei den unterschiedlichen EBV-assoziierten Erkrankungen wieder zu finden (siehe Abschnitt 1.2).

Tabelle 1: Transkriptionsprogramme der latenten EBV Infektion ^{14, 15}

	Genprodukte	Funktion
Wachstumsprogramm (Latenz III)	EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C, LMP2a und 2b	Aktiviert ruhende B Zellen zu proliferierenden Lymphoblasten
Default Programm (Latenz II)	EBNA1 LMP1, LMP2a und 2b	Liefert notwendige Überlebenssignale für: (i) infizierte, aktivierte B Zellen zur Differenzierung in Gedächtnis B Zellen (ii) Persistenz von infizierten Gedächtnis B Zellen
Latenz Programm (Latenz 0 / I)	Kein Genprodukt (EBNA1, LMP2a)	Ermöglicht Persistenz des Virus in ruhenden, zirkulierenden Gedächtnis B Zellen, welche gleichzeitig für das Immunsystem nicht erkennbar sind

1.1.3 Pathogenese der akuten und chronischen EBV-Infektion

EBV ist ein ubiquitär auftretendes γ -Herpesvirus, dessen Übertragung durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch erfolgt. Der häufigste Weg ist durch Speichelübertragung und konsekutiver Infektion des lympho-epithelialen Gewebes des Oropharynx („kissing disease“). EBV führt zu einer spezifischen Infektion von B Zellen, in dem die Bindung des viralen Hüllproteins gp350/220 an den Cd3 Komplement-Rezeptor CR2 (CD21) der B Zellen eine rezeptorvermittelte Endozytose initiiert ¹⁶. EBV persistiert in infizierten B Zellen und erklärt den Übertragungsmodus einer Primärinfektion durch Blutprodukte, Knochenmark- oder Organtransplantation ¹⁷. Die Inkubationszeit beträgt 8 – 21 Tage. In der Mehrzahl der Fälle erfolgt die Primärinfektion durch Speichelübertragung asymptomatisch im Kleinkindalter. In den Industrienationen hat sich das Alter der Primärinfektion verschoben, sodass die Primärinfektion häufiger im jugendlichen oder erwachsenen Alter erfolgt. Dies führt aus noch nicht bekannten Gründen häufiger als bei Primärinfektion im Kindesalter zu einem Krankheitsbild, das als „infektiöse Mononukleose (IM)“ oder „Pfeiffersches Drüsenfieber“ bezeichnet wird. Die Klinik ist durch

Abgeschlagenheit, Müdigkeit, Fieber, Angina tonsillaris, Dysphagie und einer cervical betonten Lymphadenopathie charakterisiert. Zu den weiteren Komplikationen zählen die Hepatosplenomegalie, Hepatitis, Milzruptur, Myokarditis, aplastische Anämie und Thrombozytopenie. Die IM ist eine selbstlimitierende Erkrankung und klingt in der Regel innerhalb von 4 Wochen ab. Aus der durchgemachten Infektion resultiert eine latente EBV-Infektion, welche in der Regel zu einer Immunität gegenüber Neu- oder symptomatischen Re-Infektionen führt¹⁸.

Die chronische EBV-Infektion ist durch die lebenslange Persistenz von EBV in B Zellen gekennzeichnet. In zeitlich noch nicht genau bekannten Abständen kommt es zu einer Reaktivierung des lytischen Replikationszyklus^{8,19} und zur Produktion von EBV, welches die Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch gewährleistet. Für die Kontrolle der akuten als auch der chronischen (latenten) EBV-Infektion ist die spezifische Immunantwort essentiell. Mit Beginn der klinischen Symptomatik haben die meisten Patienten IgM-Antikörper gegen „viral capsid antigen“ (VCA) und steigende IgG-Titer gegen VCA und „early antigen“ (EA). Im weiteren Verlauf sind IgM / IgG-Antikörper gegen gp350, EBNA2 und EBNA1 nachweisbar. Die Rolle der humoralen Immunantwort in der Kontrolle der akuten und chronischen EBV-Infektion ist unklar. Es wird angenommen, dass zumindest Virus-neutralisierende Antikörper eine generalisierte Virämie verhindern können. Darüber hinaus haben EBV-spezifische Antikörper eine hohe diagnostische Relevanz. Die zelluläre Immunantwort ist entscheidend für die Kontrolle der akuten und chronischen EBV-Infektion. Dieses wird in der Diagnostik durch den Nachweis von einer hohen Anzahl von atypischen mononukleären Zellen im peripheren Blutaussstrich genutzt. Diese Zellen sind in erster Linie CD8 T Lymphoblasten sowie in geringerer Zahl CD4 und NK Zellen. Die Bedeutung der zellulären Immunantwort in der Kontrolle der EBV-Infektion wird deutlich durch die erhöhte Inzidenz von EBV-induzierten, lymphoproliferativen Erkrankungen („post-transplantation-lymphoproliferative disease“, PTLD) in immunsupprimierten Patienten, e.g. Patienten mit HIV-Infektion und Patienten nach Organ – oder Knochenmarktransplantation.

1.2 EBV-assozierte Malignome

EBV ist mit einer Reihe von Malignomen assoziiert, die charakteristische Expressionsprofile der latenten EBV-Proteine aufweisen (siehe Tabelle 2). Das onkogene Potential von EBV wird evident in der erhöhten Inzidenz von lymphoproliferativen Erkrankungen in immunsupprimierten Patienten. Zu dieser Patientengruppe zählen Patienten mit dem seltenen angeborenen x-chromosomalen lymphoproliferativen Syndrom (XLPS), Patienten mit erworbener HIV-Infektion und iatrogen immunsupprimierte Patienten nach Organ- und Knochenmarktransplantation. Zusätzlich beweist die erhöhte Inzidenz von EBV-induzierten lymphoproliferativen Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten die Rolle der zellulären Immunität in der Kontrolle der EBV-Infektion ²⁰.

Tabelle 2: EBV-assozierte Erkrankungen und Profil der Genexpression

Latenz	Genprodukte	Erkrankung
I	EBNA1	Burkitt Lymphom
II	EBNA1 LMP1, LMP2a und 2b	Nasopharynx-Karzinom Hodgkin Lymphom
III	EBNA1, EBNA2, EBNA3A, 3B, 3C LMP2a und 2b	Infektiöse Mononukleose (IM) Posttransplantationslymphome (PTLD) <i>Lymphoblastoide Zelllinie (LCL)</i>

1.2.1 Burkitt Lymphom

Das Burkitt Lymphom (BL) zählt zu den hoch-malignen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphomen und wurde nach seinem Erstbeschreiber Denis Burkitt benannt. Charakterisch liegt eine Translokation des c-myc-Gens von Chromosom 8 in die Nähe der Schwerketten-Gene auf Chromosom 14 vor. In weniger als 20% der Fälle wird c-myc auf die Leichtkettenregion von Chromosom 2 oder 22 umgelagert. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet das BL in drei Typen: das endemische BL, das sporadische BL und das AIDS-assozierte BL. Die drei verschiedenen Typen unterscheiden sich in ihrer Klinik, Assoziation mit EBV und geographischen Besonderheiten. Das endemische BL war der erste Tumor, dessen Genese mit EBV in Zusammenhang gebracht wurde. In fast allen Fällen von untersuchten endemischen BL wurde monoklonale EBV-DNA in episomaler Ringform nachgewiesen ²¹.

Interessanterweise konnten erhöhte Antikörpertiter gegen VCA und EA im Serum von Patienten mit endemischen BL nachgewiesen werden. Eine große prospektive Studie bei Kindern aus Uganda zeigte, dass ein signifikant erhöhter Antikörpertiter mit einem erhöhten Risiko einhergeht, am BL zu erkranken²². Dagegen zeigt die EBV-Assoziation beim sporadischen BL und dem AIDS-assoziierten BL eine hohe Variabilität. Der Nachweis von EBV-DNA variiert zwischen 15 – 88 %²³⁻²⁵. Welche prinzipielle Rolle das EBV in der Pathogenese des BL spielt ist unklar. Die epidemiologischen Daten und der regelmäßige Nachweis von monoklonaler EBV-DNA in BL Zellen sprechen für eine wichtige Rolle des EBV in einem am ehesten multifaktoriellen Prozess. Nahe liegend ist, dass EBV eine Expansion und Proliferation von B Zellen induziert und damit die Wahrscheinlichkeit einer chromosomalen Translokation erhöht. Denkbar ist auch, dass EBV chromosomal veränderten B Zellen einen Überlebensvorteil verschafft. Die zelluläre Immunreaktion gegen EBV versagt im Falle des EBV-positiven BL aus mehreren Gründen: i) Das endemische BL korreliert geographisch mit dem Auftreten von Plasmodium falciparum Malaria. Malaria verursacht eine leichte Immunsuppression, sodass die Immunreaktion gegen EBV-infizierte B Zellen reduziert wird⁷. ii) EBV induziert eine Runterregulation der viralen EBV Proteine, sodass nur das virale Protein EBNA1 exprimiert wird²⁶. iii) BL Zellen sind stark eingeschränkt in der endogenen Prozessierung und Präsentation von Proteinen auf MHC Klasse I, aufgrund einer verringerten Expression von TAP1/TAP2 Genen²⁷. Letzteres scheint nicht ein klassischer Mechanismus eines Immunescape-Phänomens in Folge der EBV-Assoziation zu sein, da auch EBV-negative BL Zellen diese Phänomene aufweisen. Die Veränderungen scheinen eher eine Reflektion der Progenitorzelle des Tumors zu sein. A priori erscheint die Verbesserung der EBV-spezifischen Immunität für die Therapie des BL wenig erfolgsversprechend. Allerdings konnte gezeigt werden, dass die Gabe von IFN- γ zu verschiedenen BL-Zelllinien die Fähigkeit der Antigen-prozessierung und -präsentation wieder herstellen konnte. Selbiges konnte auch durch eine Vektor-vermittelte Expression von LMP1 erreicht werden²⁷. Im BL-Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Vakzinierung mit EBNA1-Peptid-beladenen Dendritischen Zellen (DC) erfolgreich EBNA1-spezifische CD4 T Zellen induzieren konnte. Diese waren in der Lage BL Zellen zu erkennen und Tumorwachstum in der Maus zu verhindern²⁸.

1.2.2 Morbus Hodgkin

Der Morbus Hodgkin („Hodgkin Disease“, HD) ist durch die charakteristischen mononukleären Hodgkin-Zellen und die multinukleären Reed-Sternberg-Riesenzellen gekennzeichnet, die aber nur 1-2% der gesamten Tumorzellmasse ausmachen und von normalen T Zellen, B Zellen, Eosinophilen, Neutrophilen und Plasmazellen umgeben sind. Die Analyse einzelner Reed-Sternberg/HD Zellen zeigt, dass diese von Keimzentrum-B-Zellen abstammen, die häufig keinen funktionalen B-Zellrezeptor (BZR) besitzen ²⁹. In 40-60% aller HD Fälle konnte monoklonale EBV-DNA in den Hodgkin-Reed-Sternberg-Zellen (HRSZ) nachgewiesen werden ³⁰. Möglicherweise können EBV-positive HRSZ durch die Expression von den latenten EBV-Proteinen LMP1, LMP2 und EBNA1 (Latent II) das fehlen des BZR durch Induktion von anti-apoptotischen Signalen ausgleichen ³¹⁻³³. Die Bedeutung des EBV für die Pathogenese des HD wird durch epidemiologische Daten gestützt. Das Alter der EBV-Primärinfektion korreliert mit dem Altersgipfel für HD, e.g. in Entwicklungsländern in denen die EBV-Infektion in der Regel in der frühen Kindheit erfolgt werden im Vergleich zur westlichen Welt mehr kindliche Fälle von HD diagnostiziert. Weiterhin konnten Studien zeigen, dass Individuen mit IM in der Anamnese ein dreifach höheres Risiko für die Entwicklung von HD besitzen ⁸. Darüber hinaus zeigte eine retrospektive Studie, dass in Patienten mit HD im Vergleich zu Patienten ohne HD höhere VCA-Antikörpertiter bereits Jahre vor Diagnose nachweisbar waren ³⁴. In EBV-positiven HD stellt sich die Frage, wieso die zelluläre Immunantwort die EBV-positiven HRSZ nicht erkennt. Untersuchungen an HRSZ konnten keinen Defekt der EBV-Antigenprozessierung und Antigenpräsentation, zumindest für LMP2a in HLA-A2 positiven Spendern, nachweisen ³⁵. Unsere Analysen des T-Zellrepertoires in gesunden EBV-positiven Spendern konnten eine dominante Immunantwort gegen EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C nachweisen und in einem geringeren Maße gegen LMP2a, LMP1 und EBNA1 ³⁶. In EBV-positiven HD Patienten ist es gelungen LMP2a-spezifische T Zellen aus dem peripheren Blut nach 4-8-wöchigen Zellkulturen zu expandieren. Mit diesem Testverfahren (wiederholte Stimulationen *ex vivo*) ist ein Rückschluss auf die Funktionalität dieser Zellen *in vivo* jedoch nur schwer möglich ³⁷. Eine vorläufige Studie an einem kleinen Kohort HLA-A2 positiver HD-Patienten konnte mit Hilfe des ELISPOT-Assays keine LMP2a-spezifischen T Zellen nach 24 Stunden Stimulation nachweisen ³⁸. Die Unfähigkeit der T Zellen von HD Patienten EBV-positive HRSZ zu kontrollieren liegt möglicherweise in einer inhärent schwachen LMP2-spezifischen T-Zellantwort und an einer

lokalen zytokinvermittelten Suppression der T-Zellaktivierung. Dies macht den adoptiven Transfer von aktivierten LMP1- oder LMP2-spezifischen T Zellen zu einer attraktiven Therapieoption. Bisherige Studien konnten zeigen, dass es möglich ist LMP2a-spezifische T Zellen von HD Patienten *ex vivo* zu expandieren³⁹ und mit partiellem Erfolg in Patienten mit refraktären oder rezidierten HD zu transferieren⁴⁰.

1.2.3 Nasopharynx-Karzinom

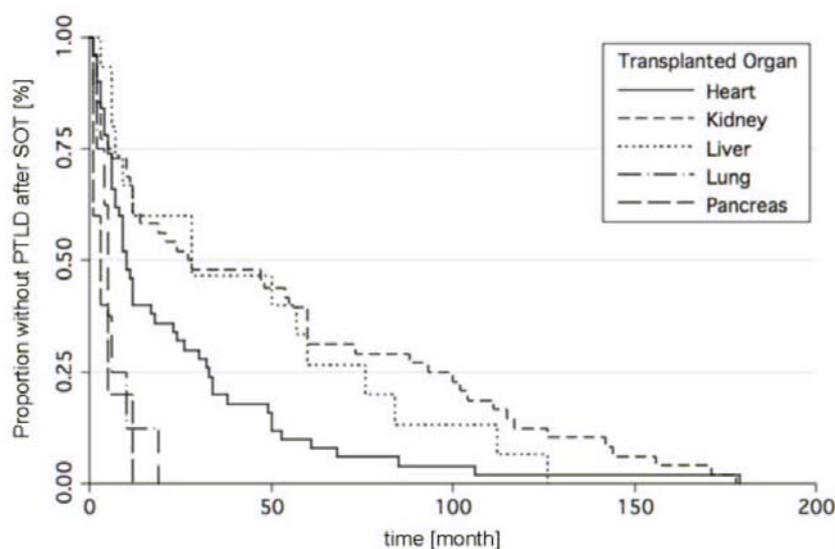
Das Nasopharynx-Karzinom (NPC) tritt gehäuft in Südost-Asien, Nordafrika und bei den Eskimos in Alaska auf. Die Inzidenz in Südchina liegt bei 25/100.000 Personen pro Jahr, während die Inzidenz in Nordamerika und Europa bei 0.5/100.000 Personen pro Jahr liegt. Das nicht-keratinisierende und das undifferenzierte NPC enthalten in fast allen Fällen monoklonale EBV-DNA in den transformierten Epithelzellen, während infiltrierende Lymphozyten für EBV-DNA negativ sind⁴¹. Vermutungen, dass es sich hierbei um einen speziellen Virustyp handelt, der die ungewöhnliche Assoziation von EBV mit einem epithelalem Tumor erklärt, konnten sich bisher nicht bestätigen. Die prinzipielle Rolle von EBV in der Pathogenese des NPC ist unklar. Untersuchungen von Carcinoma *in situ* Proben zeigen Positivität für EBV-DNA, sodass eine epitheliale Infektion vor der malignen Transformation anzunehmen ist⁴². Nasopharyngeale Biopsien von gesunden Individuen in endemischen NPC Regionen zeigen keinen Nachweis von EBV-DNA in Epithelzellen⁴³. Dies lässt vermuten, dass die EBV-Infektion von Epithelzellen ein seltenes Ereignis ist, dass der malignen Transformation vorausgeht. Das Muster der EBV-Genexpression ähnelt dem Expressionsprofil beim HD (Latenz II), wobei jedoch LMP1 und LMP2 weniger stark exprimiert werden. Trotz der Expression dieser viralen Proteine erfolgt keine effektive virale T-Zellantwort. Dies obgleich das NPC HLA Klasse I und II Moleküle, kostimulatorische und Adhäsions-Moleküle exprimiert und eine funktionale Antigen-prozessierungs und –präsentations-maschinerie besitzt. In kleinen Studien konnte in einem Drittel der Patienten eine LMP2a-spezifische T-Zellantwort nachgewiesen werden. In der Hälfte der Patienten konnten sogar EBV-spezifische T Zellen aus Biopsien von NPC isoliert werden⁴⁴. Die Stärkung der EBV-spezifischen T-Zellantwort gegen die subdominanten EBV-Antigene ist eine attraktive immuntherapeutische Strategie für das EBV-assoziierte NPC, welches aufgrund der intakten Antigenprozessierung und Antigenpräsentations-maschinerie eine geeignete Targetzelle darstellt. Zwei Studien an jeweils 10 Patienten mit fortgeschrittenem

NPC konnten die Sicherheit und Aktivität von adoptiv transferierten EBV-spezifischen T Zellen zeigen^{45, 46}. In beiden Studien konnten in über der Hälfte der Patienten ein klinischer Erfolg verzeichnet werden. Eine aktive Vakzinierungsstudie mit LMP2a-Peptid-gepulsten DC konnte einen Anstieg der LMP2a-spezifischen T Zellen in 75% der NPC Patienten induzieren. In zwei dieser Patienten, in denen eine LMP2a-spezifische Immunantwort über 3 Monate anhielt, konnte eine partielle Remission erzielt werden⁴⁷.

1.2.4 PTLD

Post-transplantations Lymphome (PTLD) sind die häufigste Neoplasie nach Knochenmark- und Organtransplantation mit einem hohen Mortalitätsrisiko von ca. 50% innerhalb des ersten Jahres. Die Inzidenz der PTLD variiert in Abhängigkeit vom transplantierten Organ, der Dauer und Stärke der Immunsuppression und dem EBV-Status von Empfänger und Spender. Sie wird in der Literatur bei Nieren- und Leber-Transplantierten mit 0,5-2 % und bei Herz- und Lungen-Transplantierten mit 3-8 % angegeben. Die Inzidenz steigt in Abhängigkeit des transplantierten Organs in folgender Reihenfolge: Nieren-TX, Leber-TX, Herz-TX, Lungen-TX, Herz-Lungen-TX und Darm-TX⁴⁸. Die Zeitspanne bis zur Erstdiagnose der PTLD variiert ebenfalls in Abhängigkeit vom transplantierten Organ.

Abbildung 1: Zeitspanne von Organtransplantation bis zur Erstdiagnose einer PTLD stratifiziert nach dem transplantierten Organ⁴⁹



Die PTLD umfassen ein heterogenes Krankheitsbild, das mit einem breiten Spektrum von histologischen Befunden korreliert, von früh auftretenden EBV-assoziierten polyklonalen Lymphoproliferationen, die dem Erscheinungsbild der infektiösen Mononukleose ähneln, bis hin zu EBV-positiven oder -negativen B-Zell-Lymphomen, selten auch T-Zell-Lymphomen⁵⁰. Hinzu kommt, dass sich die PTLD im Gegensatz zu klassischen NHL in über 70% extranodal manifestiert. Entsprechend ist die klinische Präsentation variabel und die Diagnose schwierig. Für die Pathogenese der PTLD ist in der großen Mehrzahl der Fälle das EBV bedeutsam⁴⁹. Hiervon abzugrenzen sind die Fälle der späten PTLD, die 5 – 10 Jahre nach TX auftreten und immunhistologisch gehäuft EBV-negativ sind. Diese Lymphome erscheinen in ihrer histomorphologischen und klinischen Präsentation den klassischen NHL zu ähneln⁵¹. Die eingeschränkte zelluläre Immunität in immunsupprimierten Patienten führt zu einem Ungleichgewicht zwischen EBV-infizierten B Zellen und zellulärer Immunkontrolle. Dies wird deutlich in der erhöhten Zahl von latent EBV-infizierten B Zellen im peripheren Blut von immunsupprimierten Patienten⁵² und begünstigt die Wahrscheinlichkeit einer unkontrollierten EBV-induzierten B-Zellproliferation. Die EBV-induzierte poli- und oligoklonale B-Zell-Proliferation unterstützt die Akkumulation von zusätzlichen chromosomalen Abberationen, welche potentiell bedeutsam für die Lymphomgenese sind. Chromosomale Alterationen bei PTLD sind bisher nur wenig untersucht. In einem kleinen Patientenkollektiv konnten in ungefähr der Hälfte der EBV-positiven Fälle zusätzliche chromosomale Abberationen nachgewiesen werden⁵³.

Die EBV-induzierte Proliferation und maligne Transformation von EBV-infizierten B Zellen korrespondiert zu der Expression von allen 9 latenten EBV-Antigenen und entspricht der EBV-Antigenexpression von *ex vivo* generierten LCL. EBV-infizierte B Zellen exprimieren, kostimulatorische Moleküle, Adhäsionsmoleküle und MHC Klasse I und II Moleküle. Sie können EBV-spezifische Proteine prozessieren and an CD4 und CD8 T Zellen präsentieren. Die Verbesserung der EBV-spezifischen T-Zellantwort in Patienten mit PTLD ist folglich eine logische Therapieoption. Starzl et al. waren die ersten, die zeigen konnten, dass eine Aufhebung der Immunsuppression bei organtransplantierten Patienten mit PTLD zu einer kompletten Remission führen kann, jedoch mit dem Risiko des Verlustes des transplantierten Organs⁵⁴. Bei Patienten nach Knochenmarktransplantation konnte zunächst die Infusion von Spenderleukozyten und später die Infusion von EBV-spezifischen T-Zelllinien erfolgreich

präventiv in Hoch-Risiko-Patienten eingesetzt werden. In einigen wenigen Fällen konnte der adoptive Transfer von EBV-spezifischen CTL auch therapeutisch erfolgreich eingesetzt werden⁵⁵⁻⁵⁷. In den bisher publizierten klinischen Studien zum adoptiven T-Zelltransfer bei PTLD wurden EBV-immortalisierte B Zellen (LCL) zur Expansion von T-Zelllinien verwendet. Die Methode hat für die klinische Applikation zwei entscheidende Nachteile, welche auch den überwiegend prophylaktischen Einsatz erklären: zum einen den Zeitraum von mindestens acht Wochen für die LCL-Herstellung und T-Zellstimulation, zum anderen die Anwendung von Wildtyp-EBV, einem onkogenen Virus in nicht attenuierter Form, zur Herstellung der LCL. Wünschenswert wäre die Weiterentwicklung eines effizienteren Systems zur Kultivierung und Expansion von antigenspezifischen T Zellen von definierter EBV-Spezifität. Letzteres setzt voraus, dass bekannt ist, welche EBV-Antigene Zielstrukturen der protektiven CD4 und CD8 spezifischen T-Zellantwort sind. Darüber hinaus müssen für die Entwicklung von aktiven und passiven Vakzinierungsstrategien die Frage beantwortet werden, welche APC für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen besonders geeignet sind. Hierfür kommen in erster Linie EBV-infizierte B-Zellen bzw. LCL oder EBV-Antigen beladene Dendritische Zellen (DC) in Frage. DC sind äußerst potente Antigen-präsentierende Zellen (APC), die eine zentrale Rolle in der Initiierung von Immunantworten spielen. Auch konnten bereits Vakzinierungsstudien mit DC in mehreren Phase I Studien vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen erzielen.

1.3 Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen (DC) sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) und werden auch als „Adjuvans der Natur“ bezeichnet. DC umfassen eine heterogene Population, die zum einen potente primäre und sekundäre zelluläre Immunantworten und zum anderen Toleranz vermitteln. Die Plastizität und antigenpräsentierende Potenz von DC ist den Fähigkeiten anderer APC, wie B Zellen und Makrophagen, überlegen⁵⁸.

1.3.1 Morphologie, Differenzierung und Reifung von DC

DC stammen von CD34-positiven Progenitorzellen ab und differenzieren zu verschiedenen Subpopulationen, die ca. 1 - 2 % aller Zellen ausmachen. Es werden aufgrund von Phänotyp und Funktion folgende DC Populationen unterschieden: myeloische DC (CD14-CD11+CD123-) und lymphoide DC (CD14-CD11c-CD123+). Für die Entwicklung und

Kultivierung myeloischer und lymphoider DC werden unterschiedliche Wachstumsfaktoren benötigt, die verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren^{59,60}. Es ist noch unklar, ob die verschiedenen Subpopulationen sich durch unterschiedliche Differenzierungswege auszeichnen („specialized lineage model“) oder ob die verschiedenen Subtypen unterschiedliche Aktivierungsgrade nur einer Vorläuferzelle repräsentieren, deren Funktion durch das umgebende Zytokinmilieu geprägt wird („functional plasticity model“) ^{61, 62}. Myeloische DC (mDC1) repräsentieren die Mehrheit der zirkulierenden DC im peripheren Blut und gelten als direkte Vorläuferzellen von Langerhans Zellen und interstitiellen gewebständigen DC. mDC (=DC im weiteren Verlauf) sind verantwortlich für die Induktion von primären und sekundären Immunantworten, für die Induktion von zytolytischen T Zellen und für die Th1 Polarisierung von CD4 T Zellen. Lymphoide DC produzieren verschiedenen Zytokine, von denen insbesondere IFN- α relevant für die Immunität gegenüber viralen Infektionen ist.

Durch die Zugabe von unterschiedlichen Zytokincocktails ist es möglich unreife und reife myeloische DC *ex vivo* zu generieren. Hierfür werden CD14 positive Monozyten in GM-CSF und IL-4 kulturiert. Phänotypisch sind diese unreifen DC durch eine mittlere Expressionsstärke von MHC Klasse I/II Molekülen und kostimulatorischen Molekülen (CD40, CD80, CD86) charakterisiert. Unreife DC zeichnen sich durch ein hohes Maß an Endozytose und Phagozytoseaktivität aus. Durch Zugabe von Reifungsstimuli, in Form von mikrobiellen oder proinflammatorischen Stimuli (e.g. IL-1 β , IL-6, TNF- α) oder CD40 Ligation, werden reife DC generiert. Diese zeichnen sich durch eine hohe Dichte von MHC Klasse I / II Molekülen, kostimulatorischen Molekülen, Adhäsionsmolekülen (CD54, CD11a, b, c, DC-SIGN) und Chemokinrezeptoren (CCR7) sowie der Expression von reifen DC Markern (CD83, DC-LAMP) aus. Zusätzlich werden Zytokine und Chemokine ausgeschüttet, die T Zellen anziehen, aktivieren und polarisieren. Reife und aktivierte DC sind potente Induktoren von primären und sekundären zellulären Immunantworten.

1.3.2 Antigenpräsentation und Crosspräsentation durch DC

Die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen ist eine Hauptaufgabe von DC. DC nehmen eine „Wächter“-Funktion an den Eintrittspforten des Körpers ein und erfüllen dort ihre Funktion der Antigenaufnahme. Diese führt zur Aktivierung und anschließender Migration

von DC in das lymphatische Gewebe. Hier erfolgt im Anschluss an die Antigenprozessierung die Antigenpräsentation durch DC an T, NK und B Zellen für die Induktion einer spezifischen zellulären Immunantwort. CD4 T Zellen erkennen mittels ihres TZR Proteinfragmente, die über MHC Klasse II Moleküle auf DC präsentiert werden und aus dem vesikulären Kompartiment stammen (exogener oder endosomaler Weg). Lösliche und nicht-lösliche Antigene werden durch Endozytose aufgenommen und zur lysosomalen Spaltung in Endosomen prozessiert. Nach Fusion mit MHC Klasse II Molekül-enthaltenden Vesikeln kommt es zur Präsentation von Peptid-MHC Klasse II Komplexen auf der Oberfläche von reifen DC an CD4 T Zellen. Endogene Proteinfragmente werden nach Prozessierung durch das Proteasom und Bindung an MHC Klasse I Moleküle im endoplasmatischen Retikulum auf der Oberfläche von DC an CD8 T Zellen präsentiert (klassischer endogener oder proteosomaler Weg). Neben den klassischen endogenen und exogenen Wegen der Antigenprozessierung und -präsentation ist weiterhin gezeigt worden, dass exogene Antigene ebenfalls auf MHC Klasse I präsentiert werden können. Diese Variante der MHC Klasse I Beladung wird als Crosspräsentation bezeichnet und ermöglicht eine Stimulation von CD8 T Zellen durch DC beladen mit Proteinfragmenten von infizierten Zellen oder Tumorfragmenten

63-65

1.3.3 Priming, Proliferation und Polarisierung von T Zellen durch DC

Unterschiedliche Wege der Antigenverarbeitung und -präsentation führen zur Aktivierung von MHC Klasse I restringierten oder MHC Klasse II restringierten T-Zellantworten. Die Interaktion des TZR mit dem MHC-Peptid Komplex (Signal 1) führt zu einer inkompletten Aktivierung der T Zelle, und kann bei fehlenden weiteren Stimuli zu T-Zelltoleranz führen. Die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen auf DC (CD80, CD86) mit CD28 auf T Zellen führt zu einer Aktivierung der T Zellen (Signal 2). Zusätzlich verstärken zahlreiche Adhäsions- und akzessorische Moleküle (LFA-1, ICAM-2) die Interaktion zwischen T Zelle und DC. Durch die Interaktion von CD40 / CD40 Ligand zwischen DC und T Zelle werden große Mengen von IL-12 von aktivierten DC sezerniert, was zu einer Differenzierung der CD4 T Zellen in Richtung Th1 führt. CD4 Th1 T Zellen unterscheiden sich von CD4 Th2 T Zellen durch ihr Zytokin-Sekretionsmuster: Th1 Zellen sezernieren in erster Linie IL-2, IL-12, IFN- γ und TNF- β und regulieren damit die Zell-vermittelte Immunantwort. Th2 T Zellen bilden IL-4 und IL-5 und regulieren auf diese Weise die B Zellausreifung und konsekutiv, die

humorale Immunantwort durch Modulation von Ausmaß und Isotyp der Antikörpersynthese^{58, 62}.

1.3.4 DC zur aktiven und passiven Immunisierung

DC sind als „Adjuvans der Natur“ die potentesten APC und im Vergleich zu anderen APC, wie B Zellen oder Makrophagen, besser geeignet für Antigenprozessierung, Antigenpräsentation und Induktion von primären und sekundären Immunantworten. Die Entwicklung von Protokollen für die *ex vivo* Generierung von DC erlaubte in den letzten Jahren die Austestung von verschiedenen Vakzinierungsstrategien. Hierfür werden DC *ex vivo* mit tumorassoziierten Antigenen, e.g. Peptide, Proteine, RNA, virale Vektoren, Liposomen, Exosomen, beladen, um Tumorantigen-spezifischen T-Zellantworten zu induzieren. Antigen-beladene DC wurden in verschiedenen murinen Modellen zur passiven oder aktiven Vakzinierung im Rahmen von prophylaktischen oder therapeutischen Strategien bei Tumoren eingesetzt. Bisher konnte gezeigt werden, dass reife DC, die Tumorantigene präsentieren, im experimentellen Mausmodell Protektion vor Tumoren bewirken sowie bestehende Tumoren in Remission bringen⁶⁶⁻⁷¹. Phase I Studien im Menschen haben die Sicherheit der Anwendung von DC gezeigt und viel versprechende Ergebnisse bei Patienten mit fortgeschrittenen Tumorerkrankungen demonstriert^{72, 73}.

1.4 Zusammenfassende Darstellung des Habilitationsthemas

Das EBV ist ein weltweit verbreitetes humanes γ -Herpesvirus, welches mit einer Reihe von Malignomen assoziiert ist, e.g. Burkitt Lymphom, M. Hodgkin, Post-Transplantations-Lymphom und Nasopharynx-Karzinom. Das onkogene Potential von EBV wird evident in der erhöhten Inzidenz von EBV-positiven Post-Transplantations-Lymphomen in immunsupprimierten Patienten. Aufgrund einer eingeschränkten zellulären Immunität wird eine EBV-induzierte B-Zell-Proliferation und maligne Transformation begünstigt. Die Verbesserung der zellulären Immunität wurde bereits vielversprechend in der Prophylaxe und Therapie von EBV-assoziierten Erkrankungen eingesetzt durch adoptive Immuntherapie mit EBV-spezifischen T-Zelllinien. Für die Weiterentwicklung von immuntherapeutischen Strategien bei EBV-assoziierten Erkrankungen ist es notwendig, die Ziel-Target-Antigene einer protektiven EBV-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantwort zu charakterisieren. Im

nächsten Schritt ist die Evaluierung von geeigneten APC zur Stimulierung und Expansion von funktionalen EBV-Antigen-spezifischen CD4 und CD8 T-Zellantworten für aktive und passive Vakzinierungsstudien notwendig.

Ziel des Forschungsprojektes war es daher, zunächst die T-Zellantwort gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene, die auch bei den verschiedenen EBV-assoziierten Malignomen exprimiert werden, in gesunden EBV-positiven Trägern zu untersuchen. Die Analyse des zytotoxischen CD8 T-Zellrepertoires gegen die verschiedenen EBV-Antigene sollte der Identifizierung von protektiven EBV-Zielantigenen dienen. Daten aus Mausmodellen und aus humanen Studien bei anderen Herpesvirus-erkrankungen weisen darauf hin, dass CD4 T Zellen entscheidend für die Persistenz, Funktion und Effektivität von zytotoxischen CD8 T Zellen sind ⁷⁴⁻⁷⁸. Auch für die Anti-Tumorimmunität gibt es zahlreiche Modelle, bei denen die Notwendigkeit einer CD4 Immunantwort nachgewiesen wurde ⁷⁹. Daher war ein weiteres Ziel unserer Arbeit das CD4 T-Zellrepertoire gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene in gesunden EBV-positiven Trägern zu analysieren. Die Analysen bei gesunden EBV-Trägern sollten die Ausgangsbasis für die Analyse des CD8 und CD4 T-Zellrepertoires bei Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen darstellen. Der Vergleich von T-Zellanalysen zwischen gesunden EBV-positiven Trägern und Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen soll der Identifizierung von essentiellen Targetantigenen dienen und die Rolle der CD4 T-Zellantwort aufklären. Obwohl für Patientengruppen in Abhängigkeit vom transplantierten Organ und der Art der Immunsuppression eine grobe Risikoabschätzung für die Entwicklung einer PTLD möglich ist, wäre es wünschenswert, das individuelle Risiko für die Entwicklung einer PTLD besser abschätzen zu können. Ein interessanter Risikoparameter für die Inzidenz und Prognose der PTLD könnte der individuelle HLA-Typ sein. Für verschiedene Krankheiten konnte eine Assoziation einzelner HLA-Allele oder HLA-Haplotypen festgestellt werden. Wir haben die Assoziation von HLA-Haplotypen bei Patienten nach Organtransplantation mit und ohne PTLD analysiert, um zu prüfen, ob ein bestimmtes HLA-Allel oder ein bestimmter HLA-Haplotyp zu einer individuellen Risikomodifikation führt.

Wichtig für die Entwicklung einer EBV-spezifischen Immuntherapie ist neben der Beantwortung der Frage, welche EBV-Antigene entscheidend für die Protektion durch CD8

und CD4 T Zellen sind, auch die Frage, welche APC für die Initiierung von EBV-spezifischen Immunantworten bedeutsam sind. Aus diesem Grunde haben wir zunächst die APC Qualitäten von DC vs LCL für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen verglichen. Da DC nicht durch EBV direkt infiziert werden können, untersuchten wir weiterhin, ob DC durch Crosspräsentation von EBV-infizierten B Zellen, EBV-spezifische T Zellen induzieren können. Unsere Daten zeigen, dass DC effektiv EBV-spezifische T Zellen stimulieren können, und dass die Stimulation spezifischer und effektiver durch DC im Vergleich zu EBV-infizierten B Zellen erfolgt. Auf dem Boden dieser Ergebnisse haben wir verschiedene Formen der Antigenbeladung von DC untersucht. Es wurden Peptide, Proteine, rekombinanter Vaccinia Virus und inaktivierter rekombinanter Vaccinia Virus getestet, um DC mit spezifischen EBV-Antigenen zu beladen. Für die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien, basierend auf der Verwendung von DC, ist die Frage zu beantworten, ob reife DC auch von immunsupprimierten Patienten generierbar sind. Neuere Untersuchungen *ex vivo* haben gezeigt, dass Immunsuppressiva nicht nur einen negativen Effekt auf Lymphozyten, sondern auch auf die Entwicklung und Funktion von DC haben. Im peripheren Blut zirkulierende DC von immunsupprimierten Patienten wurden hinsichtlich Phänotyp und Funktion untersucht und deren Ausreifung *ex vivo* getestet. Darüber hinaus wurden *ex vivo* generierte DC von immunsupprimierten Patienten mit und ohne PTLD für die Stimulation von autologen EBV-spezifischen T Zellen verwendet, um die Anwendung für einen immuntherapeutischen Ansatz zu testen.

1.4.1 Kurzfassung

Ziel dieser Arbeit war es, die Voraussetzungen für die Entwicklung von EBV-spezifischen immuntherapeutischen Strategien bei Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen zu schaffen. Hierfür wurde die EBV-spezifische T Zellimmunität in gesunden EBV-positiven Spendern und in Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen untersucht. Bekannte und neue Risiko- und Prognosefaktoren für die Entwicklung von PTLD wurden untersucht. Wir verglichen DC mit LCL als APC für die Induktion von EBV-spezifischen Immunantworten. Verschiedene Methoden der EBV-Antigenbeladung von DC wurden im Sinne von biologischen Zusammenhängen und möglicher Anwendung *in vivo* getestet. Abschließend wurden DC von immunsupprimierten Patienten analysiert, und die finale Ausreifung dieser DC wurde *ex vivo* für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen getestet.