

## 2. Eigene Arbeiten

### 2.1 EBV-spezifische T-Zellantworten in gesunden EBV+ Trägern

Die EBV-spezifische T-Zellantwort gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene bei EBV-positiven Trägern wurde untersucht. Ziel der Arbeit war es, die Frage zu beantworten, gegen welche EBV-Antigene die protektive Immunität bei EBV-positiven Spendern gerichtet ist.

#### 2.1.1 EBV-spezifische CD8 T-Zellantworten in gesunden EBV+ Trägern

IFN- $\gamma$  produzierende T Zellen aus dem peripheren Blut von gesunden EBV-positiven Trägern wurden mittels „enzyme-linked immunospot (ELISPOT)“ quantifiziert. Hierfür wurden PBMC mit 6 verschiedenen rekombinanten Vaccinia Virus Konstrukten, die jeweils ein EBV-Protein enkodierten, infiziert und die Zahl der IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen enumeriert. Wir konnten eine starke CD8 T-Zellantwort gegen ein oder mehrere der EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C Antigene in 14/18 Blutspendern feststellen. Die Sensitivität des ELISPOT-Assays konnte durch die Verwendung von DC als APC signifikant erhöht werden. Trotz der Verwendung von DC als APC konnten gegen die sogenannten subdominanten EBV-Antigene, LMP1, LMP2 und EBNA1, nur niedrig frequente T-Zellantworten detektiert werden.

*Subklewe M., Chahroudi A., Bickham K., Larsson M., Kurilla M.G., Bhardwaj N., Steinman R.M.: Presentation of EBV latency antigens to CD8+, IFN- $\gamma$  secreting, T lymphocytes. Eur J Immunol. 1999, 29 (12): 3995-4001.*

#### 2.1.2 EBV-spezifische CD4 T-Zellantworten in gesunden EBV+ Trägern

Das CD4 T-Zellrepertoire gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene wurde in gesunden EBV-positiven Trägern analysiert. Aufgrund der zu erwartenden niedrigeren Frequenz von CD4 T Zellen wurden die spezifischen T-Zellantworten nach mehrtägiger Stimulation mit Hilfe von rekombinanten Vaccinia Virus infizierten DC analysiert. Die Auswertung von 10 EBV-positiven Trägern zeigte, dass sich die CD4 T-Zellantwort zum überwiegenden Teil komplementär zur CD8 T-Zellantwort verhielt. CD4 T-Zellantworten waren insbesondere gegen EBNA1, LMP1 und EBNA3B zu messen. Interessanterweise konnten wir eine konsistente CD4 T-Zellantwort gegen EBNA1 detektieren. Somit verhindert

die interne Gly-Ala Wiederholungsregion von EBNA1 nur die endogene Präsentation auf MHC Klasse I.

*Munz C., Bickham K.L., Subklewe M., Tsang M.L., Chahroudi A., Kurilla M., Zhang D., O'Donnell M., Steinman R.M.: Human CD4+ T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 1. J Exp Med 2000, 191: 1649-1660.*

## **2.2 EBV-spezifische T-Zellantworten in Patienten mit PTLD**

### **2.2.1 EBV-spezifische CD8 und CD4 T-Zellzahlen, absolute CD8 und CD4 T Zellzahlen und EBV Last in organtransplantierten Patienten mit PTLD**

Die CD4 und CD8 T-Zellantwort gegen verschiedene latente und lytische EBV-Antigene in organtransplantierten Patienten mit PTLD wurde analysiert und mit absoluten CD4 und CD8 T-Zellzahlen und der absoluten EBV Last korreliert. Als Vergleichsgruppe wurden Patienten nach Organtransplantation mit EBV-Reaktivierung aber ohne PTLD und gesunde EBV-positive Träger analysiert. Im Vergleich zu den Untersuchungen in gesunden EBV-positiven Trägern verwendeten wir MCH Klasse I-Peptid-Tetramere und den IFN- $\gamma$  Sekretions-Assay für die Detektion von EBV-spezifischen CD8 T Zellen. Diese Methode ist im Vergleich zum ELISPOT-Assay für IFN- $\gamma$  zum einem noch sensitiver in der Quantifizierung von Antigen-spezifischen T Zellen und zum anderen ermöglicht diese Methode die Quantifizierung von nicht-funktionellen T Zellen. Wir konnten keinen Unterschied in der absoluten CD8 T Zellzahl zwischen den verschiedenen Gruppen detektieren. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der absoluten EBV-spezifischen CD8 T Zellen niedriger bei Patienten mit PTLD im Vergleich zu Patienten mit EBV-Reaktivierung ohne PTLD. Wir konnten weiterhin feststellen, dass die absoluten CD4 T-Zellwerte signifikant niedriger in Patienten mit PTLD waren, und dies mit einer erhöhten EBV Last korrelierte. Zu unserer Überraschung konnten wir normale bis erhöhte Zahlen von EBNA1-spezifischen CD4 T Zellen in Patienten mit PTLD detektieren. Unsere Daten sind mit der Arbeitshypothese vereinbar, dass für die Zahl und Funktion von EBV-spezifischen CD8 T Zellen, die absolute CD4 Zellzahl entscheidend ist. Die Rolle der EBNA1-spezifischen CD4 T Zelle scheint von einer geringeren Bedeutung für die Protektion von EBV-assoziierten Erkrankungen.

*Sebelin-Wulf K., Oertel S., Papp-Vary M., Schulzki A., Trappe R., Pezzutto A., Riess H., Subklewe M.: Quantitative analysis of EBV-specific CD4 / CD8 T cell numbers, absolute CD4 / CD8 T cell numbers and EBV load in solid organ transplant recipients with PTLD Transplant Immunology, in press.*

## **2.3 Prognose- und Risikofaktoren für PTLD**

### **2.3.1 EBV Last als Prognosemarker**

Die Wertigkeit der EBV Last als Prognose- und Risikomarker für die Entwicklung und Remissionsdauer einer PTLD werden kontrovers diskutiert. Eine monozentrische, prospektive Studie zur EBV Last in Patienten (n=15) mit EBV-positiver und EBV negativer PTLD wurde durchgeführt. Die Analyse zeigte eine Diskordanz der EBV Last und dem klinischen Verlauf in 2/3 der untersuchten Patienten. Unsere Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die EBV Last kein sicherer Prognoseparameter für den klinischen Verlauf eines einzelnen Patienten mit PTLD darstellt <sup>80</sup>.

*Oertel S., Trappe R.U., Zeidler K., Babel N., Reinke P., Hummel M., Jonas S., Papp-Vary M., Subklewe M., Dörken B., Riess H., Gartner B.: Epstein-Barr viral load in whole blood of adults with posttransplant lymphoproliferative disorder after solid organ transplantation does not correlate with clinical course. Ann Hematology 2006, 85 (7):478-84.*

### **2.3.2 HLA-Haplotyp und Inzidenz von PTLD**

Das Risiko für PTLD hängt von der Intensität der Immunsuppression und dem transplantierten Organtyp ab, aber dies ist als Erklärung nicht ausreichend, denn nur ein Teil der immunsupprimierten Patienten entwickelt eine PTLD. Verschiedene pathogenetische Ko-Faktoren, welche die Immunantwort zusätzlich reduzieren, scheinen für eine PTLD-Entstehung mitverantwortlich zu sein. Für verschiedene Krankheiten konnte eine Assoziation einzelner HLA-Allele oder HLA-Haplotypen festgestellt werden, e.g. beim insulinpflichtigen Diabetes mellitus Typ I (HLA-DR3, HLA-DR4) oder der rheumatoiden Arthritis (HLA-DR4, Subtypen DRB1\*0401,0404,0405,0408) <sup>81-83</sup>. Ursächlich werden Unterschiede in der HLA-abhängigen Präsentation von krankheitsrelevanten Epitopen diskutiert <sup>84</sup>. Alternativ reflektieren krankheitsassoziierte HLA-Häufigkeiten eine Kopplung mit anderen krankheitsassoziierten Genen <sup>85</sup>. Wir stellten daher die Arbeitshypothese auf, dass bestimmte HLA-Allele oder ein bestimmter HLA-Haplotyp das Risiko, an einer PTLD zu erkranken,

beeinflusst. Eine multizentrische, retrospektive Fall-Kontroll-Studie an 155 organtransplantierten Patienten mit PTLD im Vergleich zu 1996 organtransplantierten Patienten ohne PTLD wurde durchgeführt. Die Analyse zeigte, dass HLA-A03 negativ und HLA-B18 und HLA-B21 positiv mit PTLD assoziiert sind. Die MHC Klasse II Analyse zeigte, dass HLA-DR7 hoch signifikant negativ mit PTLD assoziiert ist. Unsere Daten erlauben die These, dass bestimmte HLA-Typen das Risiko für die Erkrankungsinzidenz einer PTLD beeinflussen.

*Subklewe M., Marquis R., Choquet S., Leblond V., Garnier J.L., Hetzer R., Swinnen L., Oertel S., Papp-Vary M., Gonzalez-Barca E., Hepkema B., Schönemann C., May J., Pezzutto A., Riess H.: Association of HLA haplotypes with PTLD after solid organ transplantation. Transplantation 2006; 82 (8):1093-100.*

## **2.4 DC als APC für die Induktion von EBV-spezifischen T-Zellantworten**

Für die Entwicklung von EBV-spezifischen immuntherapeutischen Strategien für Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen, ist die Klärung der Frage bedeutsam, welche APC besonders geeignet für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen sind. Hierbei sind insbesondere B Zellen, die von EBV spezifisch infiziert werden, und DC, als die potentesten Induktoren von primären und sekundären Immunantworten, zu untersuchen und zu vergleichen.

### **2.4.1 DC vs LCL als APC für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen**

Es wurden EBV-Antigen beladene DC im Vergleich zu LCL als APC für die Stimulation und Expansion von EBV-spezifischen T Zellen verwendet. Zur Quantifizierung von DC und LCL stimulierten T Zellen synthetisierten wir mehrere EBV-Peptid-MHC I-Tetramerkomplexe. Wir konnten zeigen, dass DC 10 x effektiver in der Expansion von EBNA3A- und LMP2-spezifischen CD8 T Zellen im Vergleich zu LCL sind. Mit beiden APC konnten wir hoch-affine EBV-spezifische CD8 T Zellklone generieren, welche im Peptidtitrations-Assay und Zytotoxizitäts-Assay die gleiche Affinität aufwiesen. Die deutlich bessere Expansion von EBV-spezifischen T Zellen durch DC korrelierte mit einer höheren Expression von kostimulatorischen und Adhäsions-Molekülen auf DC im Vergleich zu LCL. Mit Hilfe der Durchflußzytometrie quantifizierten wir die Intensität und Dauer der Clusterbildung von APC

und T Zellen. Es trat eine höhere und dauerhaftere Klusterbildung zwischen DC und T Zellen im Vergleich zu LCL und T Zellen auf. Diese Daten unterstützen die präferentielle Verwendung von DC als APC für die Generierung von EBV-spezifischen T Zellen.

*Subklewe M., Sebelin K., Block A., Meier A., Roukens A., Paludan C., J.F. Fonteneau, Steinman R., Munz C.: Dendritic cells expand Epstein Barr Virus specific CD8 T cell responses more efficiently than EBV transformed B cells. Human Immunology 2005; 66: 938-949.*

#### **2.4.2 DC crosspräsentieren EBV-spezifische Antigene**

Vorausgehende Studien konnten zeigen, dass DC im Vergleich zu EBV-infizierten B Zellen effizienter EBV-spezifische T Zellen expandieren. Welche Rolle DC *in vivo* in der Stimulation und Expansion von EBV-spezifischen T Zellen spielen ist unklar. Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen zeigen keine Evidenz, dass EBV DC direkt infiziert. Studien bei anderen infektiösen oder neoplastischen Erkrankungen konnten, trotz fehlender direkter Infektion von DC, eine entscheidende Rolle von DC in der Induktion von spezifischen T Zellen nachweisen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass DC in der Lage sind Antigene zu crosspräsentieren und Antigen-spezifische T Zellen zu stimulieren. Wir haben daher die Fähigkeit von DC getestet, EBV-spezifische Antigene durch Crosspräsentation zu präsentieren. Dieses ist zum einem bedeutsam für die Frage, welche Zellen an der Initiation einer protektiven EBV-spezifischen Immunantwort beteiligt sind, und zum anderen, als attraktive Möglichkeit der effektiven Induktion von EBV-spezifischen T Zellen für immuntherapeutische Strategien. Wir konnten zunächst im Mausmodell zeigen, dass murine DC in der Lage sind, Antigene von humanen LCL effektiv zu crosspräsentieren<sup>86</sup>. In einem weiteren Schritt konnten wir zeigen, dass humane DC in der Lage sind, EBV-spezifische Antigene von apoptotischen und nekrotischen LCL zu crosspräsentieren. Dieses wurde unterstrichen durch die Fähigkeit von DC, EBV-spezifische Antigene auch von allogenen, HLA Klasse I oder II defizienten LCL zu crosspräsentieren. Ein Teil der EBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort zeigte spezifische zytotoxische und IFN- $\gamma$  sezernierende Aktivität gegen EBNA3A und LMP2a. Die durch Crosspräsentation stimulierten T Zellen zeigten eine hohe Affinität gegenüber den spezifischen EBV-Antigenen. Diese Ergebnisse können für die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien genutzt werden, um HLA-unabhängig EBV-spezifische CD8 und CD4 T-Zellantworten zu induzieren.

Zum anderen unterstützen unsere Daten die Hypothese, dass DC eine Rolle in der Induktion von EBV-spezifischen T Zellen *in vivo* spielen. Weiterhin könnte Crosspräsentation von EBV-spezifischen Antigenen durch DC *in vivo* den Nachweis von EBNA1-spezifischen CD8 T Zellen in gesunden EBV-positiven Trägern erklären, denn EBNA1 wird nicht endogen auf MHC Klasse I präsentiert. Zusammenfassend haben diese Ergebnisse sowohl Bedeutung für die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien als auch eine Relevanz für das Verständnis der spezifischen Immuninduktion *in vivo*.

*Subklewe M., Paludan C., Tsang L.M., Mahnke K., Steinman R.M., Munz C.: Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr Virus transformed B cells and expand tumor-reactive CD8+ killer T cells. J Exp Med 2001, Feb 5; 193 (3): 405 – 411.*

## **2.5 DC zur Therapie von EBV-assoziierten Erkrankungen**

### **2.5.1 Generation von DC von gesunden Spendern**

Ziel dieses Projektes war die Optimierung der *ex vivo* Generierung von reifen DC aus Monozyten unter besonderer Berücksichtigung einer möglichen Anwendung dieser DC in einer klinischen Phase I Studie. Potentielle Einsatzmöglichkeiten wären sowohl die aktive Vakzinierung als auch die Stimulation von EBV-spezifischen T Zellen *ex vivo*. Es wurden T Zell-depletierte PBMC einer Probandenprobe unter verschiedenen Bedingungen kulturiert und Quantität und Qualität der gewonnenen DC getestet. Der Schwerpunkt der Arbeit konzentrierte sich auf die Austestung verschiedener Protokolle zur finalen Reifung von unreifen DC. Zellmorphologie, Viabilität, Phänotyp, Stabilität nach Reaktivierung sowie Funktions-Assays wurden zur Beurteilung des Reifungs- und Differenzierungsgrades der DC verwendet. Im Vergleich zu verschiedenen Kombinationen von Zytokinen einschließlich LPS, ergab die Anwendung von „Monozyten konditioniertem Medium“, gewonnen aus der adhärenen Fraktion von PBMC, wiederholt die größte Anzahl von reifen DC mit dem größten Potential T Zellen zu stimulieren. Diese Methode erlaubt die Generierung von DC in einem komplett autologen System, das optimal für den klinischen Einsatz ist<sup>87</sup>.

*Reddy A., Sapp M., Feldman M., Subklewe M., Bhardwaj N.: A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. Blood 1997; 9: 3640 – 3646.*

### 2.5.2 EBV-Antigen beladene DC zur Induktion von EBV-spezifischen T Zellen

Eine Voraussetzung für die Entwicklung von adoptiver T-Zelltherapie für EBV-assoziierte Erkrankungen ist die Austestung von Kulturbedingungen für die Generierung von EBV-spezifischen T Zellen. Ziel war es, zytotoxische T Zellen gegen dominante und subdominante EBV-Antigene zu generieren für den späteren potentiellen adoptiven T-Zelltransfer. Es wurden verschiedene Möglichkeiten der Antigenbeladung von DC und Ko-Kulturierung von DC und T Zellen ausgetestet. Zur Antigenbeladung von DC wurden EBV-Peptide, rekombinanter Vaccinia Virus und inaktivierter rekombinanter Vaccinia Virus (rVV) verwendet. Peptid-gepulste DC konnten eine starke CTL Antwort nach nur 7 Tagen Ko-Kultur bei einem Verhältnis von DC zu T Zellen von 1:60 induzieren. Dieses konnte für verschiedene HLA Klasse I restringierte Peptide von EBNA3A und LMP2a gezeigt werden. Für die Stimulation von autologen T Zellen bei unbekanntem HLA-Typ bzw. noch nicht definierten EBV-Epitopen wählten wir eine alternative Strategie mittels rekombinanter Vaccinia Viren (rVV) aus. Diese attenuierten rVV-Konstrukte enkodierten für jeweils eines der latenten EBV-Proteine. Die Antigene werden von DC endogen prozessiert und ohne HLA-Restriktion präsentiert. Zunächst stellten wir fest, dass unreife DC zwar effizient mit rVV infiziert werden konnten, allerdings die Zellviabilität deutlich reduziert wurde. Im Gegensatz dazu konnten reife DC zwar mit einer geringeren Effizienz infiziert werden, bei einer insgesamt aber höheren Gesamtviabilität<sup>88</sup>. Um das Problem des zytopathischen Effektes von rVV auf DC zu umgehen, untersuchten wir verschiedene Techniken der Inaktivierung von rVV. Mittels UVA und 7-Psoralen konnten wir zeigen, dass reife DC ausreichend mit rVV infiziert werden können, ohne die negativen zytopathische Effekte des rVV aufzuzeigen. Die so infizierten DC konnten potent EBV-spezifische T Zellen stimulieren und expandieren. Die klinische Anwendung dieser DC wäre damit sowohl für die *ex vivo* Expansion von EBV-spezifischen T Zellen als auch im Sinne einer aktiven Vakzinierung mit infizierten DC möglich.

*Subklewe M., Charoudhi A., Schmaljohn A., Kurilla M. G., Bhardwaj N., Steinman R.M.: Induction of Epstein-Barr Virus specific CTL responses using dendritic cells pulsed with EBNA-3A peptide or UV-inactivated, recombinant EBNA-3A vaccinia virus. Blood 1999; 4: 1372-1381*

### 2.5.3 DC von immunsupprimierten Patienten

Unser Ziel ist die Entwicklung von aktiven und passiven EBV-spezifischen Immunisierungsstrategien für Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen. Unsere bisherigen Daten unterstützen die Verwendung von DC zur Induktion von EBV-spezifischen T-Zellantworten. Im Falle von PTLD muss zunächst die Frage beantwortet werden, ob es überhaupt möglich ist, DC von iatrogen immunsupprimierten Patienten zu generieren. Immunsuppressiva werden zur Verhinderung von Transplantatabstoßungen eingesetzt und unterdrücken die zelluläre Immunantwort. Dies führt zu einer erhöhten Inzidenz von opportunistischen Infektionen und viral-assoziierten Malignomen. Der differentielle Effekt von den verschiedenen immunsuppressiven Substanzen auf Lymphozyten ist beschrieben<sup>89</sup>. Die verschiedenen Substanzen inhibieren u.a. die T-Zellaktivierung, T-Zellproliferation und Sekretion von aktivierenden (IL-2, IFN- $\gamma$ ) und pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , PG<sub>2</sub>). Neuere Untersuchungen an DC *ex vivo* zeigen, dass Immunsuppressiva auch einen negativen Effekt auf die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von DC haben<sup>90</sup>. Die Entdeckung neuer DC-Oberflächenmarker („blood dendritic cell antigen“, BDCA1-4) ermöglichte uns die Anreicherung und funktionelle Charakterisierung von im peripheren Blut zirkulierenden DC. Wir haben zirkulierende myeloische DC (BDCA1) von immunsupprimierten Patienten nach Organtransplantation hinsichtlich Phänotyp und Funktion untersucht. Unsere Daten zeigen, dass Immunsuppressiva einen negativen Einfluss auf die Reife von zirkulierenden DC haben. Insbesondere konnten wir eine reduzierte Expression von kostimulatorischen- und Adhäsions-Molekülen auf DC von immunsupprimierten Patienten im Vergleich zu DC von gesunden Probanden feststellen. Nach *in vitro* Stimulation in Kulturmedium ohne immunsuppressive Substanzen konnten wir eine Hochregulation von Oberflächenmarkern sowie Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen feststellen, die der Reaktion von DC von gesunden Blutspendern entsprach. Für den Einsatz von DC zur aktiven und passiven Immuntherapie ist entscheidend, ob reife DC von immunsupprimierten Patienten *ex vivo* generiert werden können zur Stimulation von autologen T Zellen. Wir konnten demonstrieren, dass es möglich ist, reife DC von immunsupprimierten Patienten innerhalb von 7-9 Tagen zu generieren. Darüber hinaus waren diese in der Lage, autologe, EBV-Antigen spezifische T Zellen *ex vivo* zu stimulieren. Die Quantität und Qualität der so gewonnenen T Zellen war identisch mit T Zellen von gesunden EBV-positiven Blutspendern. Selbst in immunsupprimierten Patienten mit PTLD konnten wir *ex vivo* eine große Zahl von

funktionellen EBV-spezifischen T Zellen nach Stimulation mit EBV-Antigen-beladenen DC generieren. Unsere Daten unterstreichen, dass die Verwendung von DC für aktive oder passive immuntherapeutische Strategien in Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen möglich ist.

*Sebelin K., Schulzki A., Kloetzel P.M., Dörken B., Pezzutto A., **Subklewe M.**: Impairment of circulating myeloid DC in immunosuppressed renal/pancreas transplant recipients. Transplantation 2006, 82 (6):779-787.*