

## 4. Diskussion

### 4.1 EBV-spezifische T-Zellantworten in gesunden EBV+ Trägern<sup>91, 92</sup>

Ziel der Analyse von EBV-spezifischen T-Zellantworten in EBV-positiven Trägern war die Identifizierung von protektiven EBV-Target-Antigenen. Das T-Zellrepertoire gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene wurde mit Hilfe des ELISPOT-Assays für IFN- $\gamma$  in 18 gesunden EBV-positiven Trägern quantifiziert. Dies erfolgte nach Infektion von PBMC durch die verschiedenen, EBV-Antigen enthaltenden rVV-Konstrukte. Weitere Publikationen zu diesem Thema basieren auf Langzeitkulturen unter Verwendung von LCL als Stimulator von T-Zellkulturen. A priori könnte dieser Ansatz das T-Zellrepertoire durch die mögliche differentielle EBV-Antigenpräsentation auf LCL beeinflussen. In diesen Studien erfolgte die T-Zellanalyse mittels Limiting dilution assay (LDA) nach Wochen der Re-Stimulation durch LCL und wiederholten Gabe von Zytokinen<sup>93, 94</sup>. Im Gegensatz dazu, wurden in unserer Studie PBMC nach nur 16 Stunden Stimulation, ohne weitere Zugabe von Zytokinen, mit Hilfe des sensitiveren ELISPOT-Assays für IFN- $\gamma$  analysiert<sup>95, 96</sup>. Wir konnten eine dominante CD8 T-Zellantwort gegen die latenten EBV-Antigene EBNA3A, EBNA3B und EBNA3C feststellen. Nur in einer kleinen Zahl von Spendern konnten wir eine T-Zellantwort gegen die EBNA1, LMP1 und LMP2 messen. Trotz methodischer Unterschiede wurde auch in Langzeitkulturen mit LCL als stimulierende APC eine präferentielle T-Zellantwort gegen EBNA 3A, EBNA3B und EBNA3C gefunden<sup>7</sup>.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass für die initiale Generierung von lymphozytären Choriomeningitisvirus (LCMV)-spezifischen CD8 T Zellen keine CD4 T Zellen notwendig sind, dass jedoch für die Persistenz und Funktion von CD8 T Zellen die Anwesenheit von CD4 T Zellen essentiell ist<sup>97</sup>. Der Wirkungsmechanismus der CD4 T Zelle bei Virusinfektionen und Tumorerkrankungen ist Gegenstand laufender Untersuchungen weltweit. Es werden sowohl direkte Mechanismen, e.g. direkte Aktivierung von APC oder auch CD8 T Zellen, als auch indirekte Mechanismen, e.g. Zytokinsekretion durch CD4 T Zellen oder andere aktivierte Zellen, diskutiert<sup>98</sup>. Wir wollten zunächst das CD4 T-Zellrepertoire gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene in EBV-positiven Trägern untersuchen. Aufgrund der niedrigen Frequenz von Antigen-spezifischen CD4 T Zellen wurden autologe T Zellen für 2 Wochen mit EBV-Antigen-rVV infizierten DC stimuliert. Die Analyse des CD4 T-

Zellrepertoires gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene konnte eine konsistente CD4 T-Zellantwort gegen EBNA1 feststellen. Weniger häufig wurden CD4 T-Zellantworten gegen EBNA3B und LMP1 festgestellt. Die weitere Analyse dieser CD4 T Zellen zeigte, dass diese einen Th1 Phänotyp besaßen. Inzwischen hat eine weitere Arbeitsgruppe mehrere HLA Klasse II restringierte T-Zellepitope für EBNA1 und LMP1 identifiziert<sup>99</sup>. Die Identifizierung des CD8 und CD4 T-Zellrepertoires gegen die verschiedenen latenten EBV-Antigene in gesunden EBV-positiven Trägern ist die Voraussetzung für die Bestimmung der protektiven Immunantwort. Die Wertigkeit unserer Daten wurde durch weitere Publikationen bestätigt<sup>100-102</sup>.

Aufbauend auf unsere Daten in gesunden EBV-positiven Trägern haben wir im nächsten Schritt die T-Zellantwort in Patienten mit PTLD analysiert. Es sollte die Arbeitshypothese überprüft werden, ob Patienten mit PTLD eine eingeschränkte EBV-spezifische CD8 und CD4 T-Zellantwort besitzen, mit besonderem Fokus auf die in gesunden EBV-positiven Trägern identifizierten Zielantigene.

#### **4.2 EBV-spezifische T-Zellantworten in Patienten mit PTLD<sup>103</sup>**

Wir analysierten die EBV-spezifische T-Zellantwort und die absoluten CD8 und CD4 T Zellzahlen in Patienten mit PTLD nach Organtransplantation. Als Vergleichsgruppe dienten organtransplantierte Patienten mit EBV-Reaktivierung ohne PTLD und gesunde EBV-positive Träger. Das Ziel dieser Arbeit war die Prüfung der Frage, ob in Patienten mit PTLD ein quantitativer oder qualitativer Defekt der unspezifischen oder EBV-spezifischen T-Zellantwort nachzuweisen ist. Im Vergleich zu den Untersuchungen in gesunden EBV-positiven Trägern verwendeten wir 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. Die absolute CD8 T-Zellzahl war nicht signifikant unterschiedlich in den verschiedenen Patienten- und Kontrollgruppen. Dies ist in Übereinstimmung mit Analysen von Patienten nach Knochenmarktransplantation, in denen ebenfalls keine Unterschiede zwischen Patienten mit und ohne EBV-Reaktivierung

festgestellt werden konnten<sup>104</sup>. Im Gegensatz dazu, konnten wir eine niedrigere Anzahl von EBV-spezifischen CD8 T Zellen in Patienten mit PTLD im Vergleich zu Patienten mit EBV-Reaktivierung feststellen. Die absolute Zahl der EBV-spezifischen CD8 T Zellen war jedoch ähnlich der absoluten Zellzahl in gesunden EBV-positiven Trägern und ähnlich zu Ergebnissen von stabil organtransplantierten Patienten<sup>105, 106</sup>. In organtransplantierten Kindern, in denen ein longitudinales Monitoring der EBV Last und der EBV-spezifischen T-Zellantwort zeigte sich, dass nur Patienten mit Anstieg der EBV Last und fehlendem Anstieg von EBV-spezifischen T Zellen eine PTLD entwickelten<sup>105, 107</sup>. Unsere Ergebnisse sind vereinbar mit der Hypothese, dass die Entwicklung der PTLD begünstigt wird durch einen nicht-adequaten Anstieg von funktionalen EBV-spezifischen CD8 T Zellen.

In zahlreichen Studien konnte die Relevanz von CD4 T Zellen für die Persistenz und Funktion von CD8 T Zellen gezeigt werden<sup>108</sup>. In gesunden EBV-positiven Trägern konnten wir eine konsistente CD4 spezifische T Zellantwort gegen EBNA1 nachweisen. Wir waren daher besonders interessiert an der Frage, ob ein Defekt der spezifischen oder unspezifischen CD4 T-Zellantwort in Patienten mit PTLD nachzuweisen ist. Im Gegensatz zu unserer Erwartung konnten wir eine normale bis erhöhte EBNA1-spezifische CD4 T-Zellantwort nachweisen. Allerdings war die absolute CD4 T-Zellzahl signifikant niedriger in Patienten mit PTLD, und dies korrelierte mit einer erhöhten EBV Last. In der Literatur liegen bisher keine Analysen zur absoluten und EBV-spezifischen CD4 T Zellzahl in Patienten mit PTLD vor. Der Vergleich zu HIV induzierter zellulärer Immunschwäche unterstreicht die Bedeutung der absoluten CD4 T Zellzahl für die Inzidenz von opportunistischen Infektionen und virus-assoziierten Malignomen. AIDS-assoziierte Non-Hodgkin Lymphome (ARL) und EBV-assoziierte primäre ZNS-Lymphome (PBL) in HIV-Patienten treten gehäuft bei niedrigen absoluten CD4 Zellzahlen auf. Interessanterweise ist die Inzidenz von ARL und PBL seit Initiierung von HAART deutlich regredient. Der Vergleich vor und nach Beginn der HAART Therapie zeigt, dass die Fälle von ARL pro 10.000 Personen-Jahre von 86 Fällen zwischen 1993-1994 auf 42 Fälle zwischen 1997-1998 abgesunken sind. Jedoch zeigt die detaillierte Analyse, dass der Anteil der ARL in Relation zur absoluten CD4 Zellzahl gleich geblieben ist<sup>109</sup>. Analysen von absoluten CD4 T Zellen und EBV-spezifischen CD8 T Zellen in HIV infizierten Patienten zeigen, dass ein Verlust von funktionalen EBV-spezifischen CD8 T Zellen mit niedrigen absoluten CD4 T Zellen korreliert. Dies war mit einem Anstieg der EBV Last verbunden<sup>110</sup>.

Unsere Daten unterstützen die Hypothese, dass es aufgrund einer niedrigen absoluten CD4 T Zellzahl zu einem nicht adäquaten Anstieg der absoluten und funktionellen EBV-spezifischen CD8 T-Zellantwort kommt. Die dadurch fehlende zelluläre EBV-spezifische Immunkontrolle ist wahrscheinlich verantwortlich für die Entwicklung der PTLD. Prospektive Studien an größeren Patientenkollektiven sind notwendig, um die Bedeutung unserer Ergebnisse auch im Hinblick auf ein Immunmonitoring von Risikopatienten zu evaluieren. Unser Ziel ist es, die Immunsuppression den relevanten immunologischen Parametern anzupassen, um die Balance zwischen Organfunktion und Entwicklung von opportunistischen Infektionen und viral-assoziierten Erkrankungen zu verhindern <sup>111</sup>.

#### **4.3 Prognose- und Risikofaktoren für die Entstehung von PTLD in Patienten nach Organtransplantation <sup>80, 49</sup>**

Das Risiko für die Entwicklung einer PTLD nach Organtransplantation hängt von der Art des transplantierten Organs und der Intensität der Immunsuppression ab. Zusätzlich spielt der EBV-Status von Empfänger und Spender eine Rolle. Kinder, die häufiger als Erwachsene EBV-negativ zum Zeitpunkt der Transplantation sind, haben ein deutlich höheres Risiko an einer PTLD zu erkranken <sup>112, 51</sup>. Ein Monitoring der EBV Last als potentiell prädiktiven Marker für die Entwicklung einer PTLD ist in vielen Transplantationszentren mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt worden <sup>113-118</sup>. Einige Studien zeigten, dass auch bei einem signifikanten Anstieg der EBV Last keine EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen auftraten <sup>105</sup>. Auch umgekehrt konnten einige PTLD Fälle ohne vorherigen Anstieg der EBV Last diagnostiziert werden <sup>119</sup>. Ein zusätzliches Problem stellt die unterschiedliche Methodik der EBV Lastbestimmung in den verschiedenen Studien dar. Wir konnten in einer prospektiven monozentrischen Studie zeigen, dass auch bei Patienten mit PTLD eine Diskordanz zwischen EBV Last und klinischem Verlauf besteht. Unsere Daten zeigen keine Wertigkeit der Bestimmung der EBV Last als singulären Parameter für die Prognose von Patienten mit PTLD. Die Verbesserung des Immunmonitorings für die frühzeitige Identifizierung von Patienten mit EBV-Reaktivierung / PTLD ist Ziel aktueller Forschungsarbeiten. Erste Studien zeigen, dass eine Kombination von T Zellmonitoring und EBV Last der solitären Bestimmung der EBV Last überlegen ist. Dies ist jedoch ein relativ aufwendiges Verfahren, so dass die Identifizierung von Patienten mit einem höheren Risiko

für die Entwicklung einer PTLD, die ein intensives Immunmonitoring rechtfertigt, wünschenswert wäre. Darüber hinaus ist die Identifizierung von weiteren pathogenetischen Kofaktoren für die Entwicklung einer PTLD erstrebenswert.

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>. Die EBV-spezifischen Epitope der einzelnen MHC Klasse I Moleküle sind sehr fokussiert, jedoch unterschiedlich für die jeweiligen MHC Klasse I Moleküle. Daher war unsere Arbeitshypothese, dass bestimmte HLA-Allele oder ein bestimmter HLA-Haplotyp das Risiko, an einer PTLD zu erkranken, beeinflussen. Eine multizentrische Fall-Kontroll-Studie an 155 organtransplantierten Patienten mit PTLD im Vergleich zu 1996 organtransplantierten Patienten ohne PTLD wurde durchgeführt. Es zeigte sich, dass HLA-A03 und HLA-DR7 negativ und HLA-B18 und HLA-B21 positiv mit PTLD assoziiert sind. Interessanterweise konnte bereits in früheren Studien eine Assoziation von HLA-B18 und anderen EBV-assoziierten Erkrankungen festgestellt werden<sup>120-122</sup>. Auch beim HHV8-assoziierten Kaposi Sarkom konnte eine gehäufte Frequenz von HLA-B18 festgestellt werden<sup>123, 124</sup>. Wir postulieren, dass unsere Ergebnisse mit der Funktionalität des Immunsystems zusammenhängen, auch wenn der Mechanismus unklar ist. Denkbar wäre, dass die verschiedenen EBV-Epitope eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen HLA-Allelen besitzen. Alternativ wäre es möglich, dass HLA-B18 und HLA-B21 supprimierende EBV-Epitope an CD8 T Zellen präsentieren<sup>125, 126</sup>. Möglich ist natürlich auch, dass die von uns gefundenen HLA-Allele mit nicht-klassischen und nicht HLA-erkodierenden Genen in der MHC Region assoziiert sind<sup>127, 128</sup>. Kandidaten dieser Region wären e.g. immunmodulierende Zytokine wie TNF- $\alpha$ , dessen Polymorphismus mit einer Suszeptibilität für Non-Hodgkin Lymphome assoziiert worden ist<sup>129</sup>. Selbstverständlich sind noch andere Erklärungen möglich, wie z.B. pharmakogenetische Ursachen. Prospektive Studien müssen die Wertigkeit der von uns verändert gefundenen HLA-Frequenzen von HLA-B18, HLA-21, HLA-A03 und HLA-DR7 verifizieren und im Zusammenhang mit weiteren Kofaktoren, wie EBV-Status und Art der Immunsuppression analysieren. Diese

Studien werden zeigen, ob es gerechtfertigt ist, HLA-B18 und HLA-B21 positive Patienten einem intensivierten Immunmonitoring zuzuführen.

#### 4.4 DC als APC für die Induktion von EBV-spezifischen T-Zellantworten<sup>130, 131</sup>

Sowohl für das pathogenetische Verständnis als auch für die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien ist die Frage relevant, welche APC für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen geeignet sind. Wir haben hierfür EBV-Antigen beladene DC mit EBV-immortalisierten B Zellen (LCL) als APC für die Stimulation und Expansion von EBV-spezifischen T Zellen verglichen. Wir konnten zeigen, dass DC zehnmal effektiver in der Expansion von funktionalen EBV-spezifischen T Zellen im Vergleich zu LCLs als APC sind. Dies korrelierte mit einer höheren Expression von kostimulatorischen- und Adhäsions-Molekülen auf DC im Vergleich zu LCL. Dies könnte auch die effizientere Klusterbildung zwischen DC und T Zellen im Vergleich zu LCL und T Zellen erklären. Die Verwendung von DC im Gegensatz zu LCL als APC für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen bietet einige Vorteile. Mit Hilfe von DC ist es möglich, den Fokus der stimulierten T Zellen gegen subdominante EBV-Antigene zu richten. Hierzu zählen EBNA1, LMP1 und LMP2, die prominent bei verschiedenen EBV-assoziierten Erkrankungen, wie EBV-positiver M. Hodgkin und EBV-positives Nasopharynxkarzinom exprimiert werden. Zusätzlich ermöglicht die Verwendung von DC die gezielte Stimulation von EBV-spezifischen CD4 und CD8 T Zellen<sup>132</sup>. EBV negative Empfänger von EBV-positiven Spendern haben ein signifikant höheres Risiko für die Entwicklung von EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen. DC haben das Potential primäre EBV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellantworten zu initiieren<sup>133, 134</sup>. *Ex vivo* konnte gezeigt werden, dass nur DC primäre EBV-spezifische CD4 und CD8 T-Zellantworten induzieren können<sup>135</sup>. Im Vergleich gelang dieses mit LCL nur nach Zugabe von IL-12, das hauptsächlich von DC produziert wird. Diese Daten zeigen, dass DC besonders geeignet sind für die Induktion von CD4 und CD8 spezifischen T-Zellantworten *ex vivo*. Die Daten sind vereinbar mit einer möglichen Rolle von DC in der Induktion von primären EBV-spezifischen T-Zellantworten *in vivo*.

Molekularbiologische und immunologische Untersuchungen zeigen keine Evidenz, dass EBV DC direkt infizieren. Allerdings konnte in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden, dass DC durch Crosspräsentation von infektiösen oder tumorassoziierten Antigenen eine entscheidende Rolle bei der Induktion von funktionalen T-Zellantworten spielen<sup>136-139</sup>. Wir haben daher im murinen und humanem Modell getestet, ob DC in der Lage sind, EBV-Antigene von apoptotischen oder nekrotischen LCL an T Zellen zu präsentieren. Im murinen und humanen System konnten wir *ex vivo* zeigen, dass DC EBV-spezifische Antigene von apoptotischen und nekrotischen LCL präsentieren. Dies erfolgte ebenso effektiv unter Verwendung von allogenen, HLA Klasse I und II defizienten LCL. Die EBV-spezifische CD8 T-Zellantwort zeigte spezifische zytotoxische und IFN- $\gamma$  sezernierende Aktivität gegen EBNA3A und LMP2a. Unsere Daten demonstrieren, dass Proteinfragmente von B Zellen und latenten viralen Antigenen über den exogenen Weg auf MHC Klasse I präsentiert werden können. Unsere Daten erlauben die Hypothese, dass die primäre EBV-spezifische T-Zellantwort durch Crosspräsentation von EBV-spezifischen Antigenen durch DC erfolgt. Dieses könnte die zelluläre Immunantwort gegen EBNA1, das aufgrund einer internen Gly-Ala Wiederholungsregion seine endogene Präsentation auf MHC Klasse I verhindert, erklären<sup>140</sup>. Studien *in vivo* sind notwendig, um die Rolle von DC und die Bedeutung von Crosspräsentation von EBV-Antigenen durch DC für die zelluläre Kontrolle der akuten und chronischen EBV-Infektion zu untersuchen. Für die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien stellt die Beladung von DC mit nekrotischen LCL eine attraktive Möglichkeit der EBV-Antigenbeladung dar<sup>141</sup>.

#### 4.5 DC zur Therapie von EBV-assoziierten Erkrankungen<sup>87, 142, 143</sup>

Verschiedene Protokolle zur finalen Reifung von unreifen DC wurden hinsichtlich des Reifungs- und Differenzierungsgrades von DC verglichen. Im Vergleich zu verschiedenen Kombinationen von Zytokinen mit und ohne 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. Eine Kombination eines Zytokincocktails mit PGE<sub>2</sub> lieferte identische Ergebnisse<sup>144</sup>. In den weiteren Untersuchungen wurden diese beiden Methoden gleichwertig eingesetzt. Wir verwendeten unreife und reife DC für verschiedene Methoden der EBV-Antigenbeladung.

Peptid-gepulste DC waren in der Lage, nach kurzer Kulturzeit von 1-2 Wochen große Mengen von funktionellen und hoch-affinen EBV-spezifischen CD8 T Zellen zu stimulieren. Die Verwendung von EBV-Peptiden ist ein attraktiver Ansatz für die Entwicklung von immuntherapeutischen Strategien bei Patienten mit häufigen HLA-Allelen und gleichzeitig bekannten EBV-Epitopen. Allerdings birgt dieser Ansatz die Gefahr eines Immunescape-Mechanismus. Außerdem ist dieser Ansatz bei Patienten mit seltenen HLA-Allelen und folglich nicht bekannten EBV-Epitopen nicht möglich. Daher haben wir eine alternative Strategie mit rekombinanten Vaccinia Viren (rVV) ausgetestet. Diese attenuierten rVV Konstrukte enkodieren für jeweils ein EBV-Antigen und ermöglichen eine HLA-unabhängige EBV-Antigenpräsentation auf MHC Klasse I und II <sup>145</sup>. Aufgrund zytopathischer Effekte dieser Konstrukte auf DC und im Hinblick auf eine mögliche klinische Applikation verwendeten wir mittels UVA und Psoralen inaktivierte rVV für die Infektion von DC. Erfreulicherweise wurden auch mit diesen Konstrukten DC hinreichend infiziert, so dass potente EBV-spezifische CD8 T-Zellantworten induziert werden konnten. Zusammenfassend haben wir Protokolle für die Stimulation von EBV-spezifischen T Zellen mittels EBV-Antigenbeladenen DC entwickelt.

Entscheidend für den potentiellen klinischen Einsatz war die Beantwortung der Frage, ob die Generierung von EBV-spezifischen T Zellen mittels EBV-Antigenbeladener DC auch von immunsupprimierten Patienten möglich ist. Neuere Untersuchungen an DC *ex vivo* haben gezeigt, dass Immunsuppressiva einen negativen Effekt auf die Entwicklung, Differenzierung und Funktion von DC haben <sup>90, 146</sup>. Unsere Untersuchungen konnten einen reduzierten Reifegrad von zirkulierenden myeloischen DC von immunsupprimierten Organempfängern zeigen. Dies ging mit einer reduzierten Expression von kostimulatorischen- und Adhäsions-Molekülen einher. Allerdings war dieser Effekt *ex vivo* reversibel. DC von schwer immunsupprimierten Patienten waren nach Kultur ohne immunsuppressive Substanzen in der Lage, autologe EBV-spezifische T Zellen zu expandieren. Selbst in organtransplantierten Patienten mit PTLD konnten wir EBV-spezifische T Zellen *ex vivo* generieren. In verschiedenen Studien konnte die Sicherheit der klinischen Anwendung von DC zur aktiven und passiven Immunisierung gezeigt werden <sup>147-152</sup>. Unsere Daten liefern die Voraussetzung für die Anwendung von DC für passive und / oder aktive Immuntherapie in Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen, einschließlich in immunsupprimierten Patienten mit PTLD.