

5. Zusammenfassung

Die Expression von viralen Proteinen auf Tumorzellen im Falle der EBV-assoziierten Malignome, wie Burkitt Lymphom, M. Hodgkin, Post-Transplantations-Lymphom (PTLD) und Nasopharynx-Karzinom, repräsentiert eine ideale Voraussetzung für die Entwicklung von effektiven Immuntherapieansätzen, wie Vakzinierung oder adoptiven Zelltransfer. Hierfür ist die Identifizierung von EBV-Antigenen, die Zielstrukturen von protektiven CD4 und CD8 T-Zellantworten in gesunden EBV-positiven Trägern sind, notwendig. Einige dieser T-Zell-Erkennungsantigene sind in dieser Arbeit identifiziert worden. Weiterhin wurde evaluiert, welche antigenpräsentierenden Zellen für die Induktion von definierten, EBV-Antigen-spezifischen T Zellen am besten geeignet sind.

In gesunden EBV-positiven Trägern fanden wir eine dominante CD8 T-Zellantwort gegen ein oder mehrere der EBNA3 Antigene. In einer kleinen Zahl von Spendern konnten wir auch eine CD8 T-Zellantwort gegen die sogenannten subdominanten EBV-Antigene LMP1, LMP2 und EBNA1 detektieren, die beim M. Hodgkin und beim Nasopharynx-Karzinom exprimiert sind. Die CD4 T Zellantwort war präferentiell gegen EBNA1 gerichtet, das in allen EBV-assoziierten Malignomen exprimiert wird. Somit inhibiert die interne Glycin / Alanin Wiederholungsregion von ENBA1 nur die endogene Präsentation auf MHC Klasse I. Die Hälfte der untersuchten EBV-positiven Spender zeigte zusätzlich eine CD4 T-Zellantwort gegen LMP1 und EBNA3B.

PTLD ist die häufigste Neoplasie nach Knochenmark- oder Organtransplantation. Die dauerhafte Immunsuppression begünstigt eine EBV-induzierte B-Zellproliferation und eine mögliche maligne Transformation. In Patienten mit PTLT haben wir mittels des Zytokinsekretionsassays und der MHC-Klasse I Tetramertechnik CD8 T Zellen quantifiziert und mit der CD4 T-Zellantwort korreliert, um zu prüfen, ob CD4 Zellen für die Persistenz spezifischer CD8 Zellen notwendig sind. Tatsächlich war die absolute Zahl der EBV-spezifischen CD8 T Zellen niedriger in Patienten mit PTLT im Vergleich zu Patienten mit EBV-Reaktivierung ohne PTLT. Auch die absolute CD4 T Zellzahl war signifikant niedriger und korrelierte mit einer erhöhten EBV Last. Dagegen konnten wir normale bis erhöhte Zahlen von EBNA1-spezifischen CD4 T Zellen in Patienten mit PTLT detektieren. Unsere Daten unterstreichen die Bedeutung der absoluten CD4 T Zellzahl für die Funktion von EBV-

spezifischen CD8 T Zellen und der daraus resultierenden Kontrolle der chronischen EBV-Infektion.

Da bei verschiedenen Krankheiten, bei denen das Immunsystem eine wichtige pathogenetische Rolle spielt, eine Assoziation einzelner HLA-Allele oder HLA-Haplotypen mit Krankheitsinzidenz bzw. mit dem Krankheitsverlauf bekannt ist, untersuchten wir in einer multizentrischen, retrospektiven Fall-Kontroll Studie die HLA-Frequenzen von 155 organtransplantierten Patienten mit PTLD im Vergleich zu 1996 organtransplantierten Patienten ohne PTLD. Die Analyse zeigte, dass HLA-A03 und HLA-DR7 negativ und HLA-B18 und HLA-B21 positiv mit dem Auftreten einer PTLD assoziiert sind. Eine erhöhte Frequenz von HLA-B18 wurde bereits beim M. Hodgkin, beim Nasopharynx-Karzinom und HHV-8-assoziierten Kaposisarkom beschrieben. Die Ursache könnte eine reduzierte Affinität von HLA-B18 für die Bindung von γ -Herpesvirus-assoziierten Epitopen sein. Als Resultat schlagen wir ein intensiviertes Immunmonitoring von HLA-B18 und HLA-B21 positiven Patienten nach Organtransplantation vor, um die Früherkennung eines entstehenden Lymphoms zu ermöglichen.

Um zu klären, welche APC für die Induktion von EBV-spezifischen T Zellen am besten geeignet sind, verglichen wir EBV-infizierte B Zelllinien (LCL) mit EBV-Antigen-beladenen dendritischen Zellen (DC) zur Stimulation und Expansion von funktionellen EBV-spezifischen T Zellen. DC waren im Vergleich zu LCL zehnmal effektiver in der Expansion von EBNA3A- und LMP2a-spezifischen T Zellen. Mit beiden APC konnten wir hoch-affine, zytotoxische CD8 T-Zellklone generieren. DC haben den Vorteil, den Fokus der stimulierten T Zellen spezifisch gegen subdominante EBV-Antigene, exprimiert e.g. beim M. Hodgkin, richten zu können.

DC werden nicht direkt von EBV infiziert. Wir konnten aber zeigen, dass humane DC in der Lage sind EBV-Antigene von apoptotischen und nekrotischen LCL an T Zellen zu crosspräsentieren. Die CD8 T-Zellantwort zeigte spezifische zytotoxische und IFN- γ sezernierende Aktivität gegen EBNA3A und LMP2a. Möglicherweise spielen DC bei der Induktion der primären EBV-spezifischen Immunantwort *in vivo* eine wichtige Rolle. Unsere

Daten unterstützen die Verwendung von DC für die Entwicklung von aktiven und passiven Vakzinierungsstrategien.

Die Generierung von DC aus Monozyten *in vitro* für die optimale Stimulation und Expansion von EBV-spezifischen T Zellen wurde durch verschiedene Versuche optimiert. EBV-Peptid-beladene DC konnten nach nur 7 Tagen ohne die Zugabe von Zytokinen eine deutliche Expansion von Peptid-spezifischen, zytotoxischen T Zellen erreichen. Sehr effektiv für die Induktion potenter zytotoxischen T Zellen waren rekombinante Vaccinia Virus Konstrukte, die jeweils für ein komplettes latentes EBV-Protein kodierten und mit UVA und Psoralen inaktiviert wurden.

Zirkulierende myeloische DC (BDCA1+) von immunsupprimierten organtransplantierten Empfängern wurden angereichert und analysiert. Sie waren deutlich unreifer als die von gesunden Spendern, konnten aber nach Ausreifung *in vitro* effektiv autologe EBV-spezifische T Zellen expandieren. Unsere Ergebnisse unterstützen die Anwendung von DC für aktive und passive Immunisierungsstrategien bei Patienten mit EBV-assoziierten Erkrankungen. Auf der Grundlage unsere Daten planen wir die klinische Anwendung von EBV-Antigen gepulsten DC für die Expansion von EBV-spezifischen T Zellen für den adoptiven Transfer in Patienten mit PTLD und Patienten mit EBV-positivem M. Hodgkin.