

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz
Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie
Leiterin: Frau Prof. Dr. C. Müller**

**Klonale Analyse der Spezifität und des Verlaufs
HLA-Klasse II restringierter T-Zellen
gegen Humanes Cytomegalie Virus (HCMV) nach
Knochenmarktransplantation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Diana Maria Thunemann
aus
Reutlingen**

2002

Dekan:	Professor Dr. C. D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. C. Müller
2. Berichterstatter:	Professor Dr. G. Jahn

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Das Zytomegalievirus	1
1.1.1. Begriffsbestimmung zum Zytomegalievirus	1
1.1.2. Geschichte und Taxonomie	1
1.1.3. Virusstruktur	3
1.2. Epidemiologie und Pathogenese	4
1.2.1. Die pränatale HCMV-Infektion	4
1.2.2. Die perinatale HCMV-Infektion	5
1.2.3. Die iatrogene /“normale“ Infektion in Kindheit und späterem Alter	5
1.2.4. Infektion bei immunsupprimierten Personen	6
1.2.4.1. Die HCMV-Infektion bei AIDS-Patienten	7
1.2.4.2. Die HCMV-Infektion bei Organtransplantierten	7
1.2.4.3. HCMV-Infektion bei Knochenmark- und Stammzelltransplantierten	7
1.3. Diagnose	8
1.3.1. Gewebekulturverfahren	9
1.3.2. Zellkulturverfahren („shell vial-Methode“)	9
1.3.3. Serologie	9
1.3.4. Antigenämie-Test	10
1.3.5. Qualitative oder quantitative PCR (Polymerase-Chain-Reaction)	10
1.3.6. Reverse Transkriptase-PCR	10
1.4. Die Immunantwort	11
1.4.1. Die zelluläre Immunantwort	11
1.4.2. Die humorale Antwort	13
1.5. Prävention und Behandlung	14
1.5.1. Expositionsprophylaxe	14
1.5.2. Immunprophylaxe	14
1.5.2.1. Passive Immunisierung	14
1.5.2.2. Aktive Immunisierung	14
1.5.2.3. Genetisch hergestellte Subunit-Vakzine	15
1.5.3. Adoptiver T-Zell-Immuntransfer	15
1.5.4. Antivirale Chemotherapie	16
1.6. Zielsetzung der Arbeit	18
2. FALLBESCHREIBUNG	19
3. MATERIAL UND METHODEN	20
3.1. Material und Bezugsquellen	20

3.1.1. Geräteliste	20
3.1.2. Verbrauchsmittel	21
3.1.3. Verwendete Proteine und Peptide	23
3.1.4. Zellen und Zelllinien	25
3.2. Herstellung von Lösungen und Medien	27
3.3. Zellkulturmethoden	28
3.3.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus venösem Blut	28
3.3.2. Zellzählung	29
3.3.3. Einfrieren der Zellen	30
3.3.4. Auftauen der Zellen	30
3.3.5. Primäre Sensibilisierung bzw. Restimulation von HCMV- spezifischen T-Zellen aus PBL	31
3.3.6. Klonierung von T-Zellen mit Hilfe der „Limiting Dilution“- Technik	31
3.3.7. Herstellung von Stimulatorzellen	34
3.3.8. Kultivierung von EBV-transformierten B-Zell-Linien	34
3.3.9. Proliferationsassays	34
3.3.10. HCMV-spezifischer Proliferationsassay mit PBL	35
3.3.11. FACS-Analyse	36
3.4. Immunchemische Methoden	37
3.4.1. Proteinquantifizierung mit Micro BCA Assay	37
4. ERGEBNISSE	39
4.1. Etablierung HCMV-spezifischer T-Zellklone und T-Zelllinien	39
4.1.1. Etablierung von HCMV-spezifischen T-Zelllinien aus PBL des KMT- Empfängers und -Spenders	39
4.1.2. Etablierung HCMV spezifischer T-Zellklone des KMT-Empfängers	40
4.2. Charakterisierung der HCMV-Antigenspezifität der etablierten T-Zell-Klone/-Linien	41
4.2.1. Spezifizierung der HCMV-Antigenreaktivität der etablierten T-Zell-Klone/-Linien mit rekombinanten Proteinen von HCMV	45
4.2.2. Charakterisierung der HLA-Restriktion der HCMV-Gesamtantigen reaktiven T-Zell-Klone/-Linien	50
4.2.3. Spezifizierung der HCMV-Antigenreaktivität der etablierten Klone/Linien mit Fragmentproteinen von gH und synthetischen Peptiden	55
4.2.4. Epitopmapping der T-Zellklone/-Linien mit Spezifität für pPN86 und pSN86 gH-Fragmentproteine	60
4.3. Ergebnisse der FACS-Untersuchung	63
5. DISKUSSION	65
5.1. HCMV-spezifische T-Zell-Klone/-Linien	65

5.2. Beurteilung der Klonalität untersuchter T-Zell-Klone/-Linien	68
5.3. Charakterisierung der Antigenpezifität der HCMV- reaktiven T-Zell-Klone/-Linien	69
5.3.1. HLA-Restriktion	69
5.3.2. Reaktivität mit spezifischem HCMV-Protein	71
5.3.3. Charakterisierung der Epitopspezifität der etablierten T-Zell-Klone/-Linien	72
6. ZUSAMMENFASSUNG	76
7. LITERATURVERZEICHNIS	78
8. LEBENS LAUF	92

ABKÜRZUNGEN

A	Absorption
AA	Amino Acid
AD	adenoid
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zellen
Bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	complementary Desoxyribonucleid Acid
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Counts per Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonucleid Acid/Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum
GvHD	Graft-versus-Host Disease
Gy	Gray
HCMV	Humanes Cytomegalie Virus
HFF	Human Foreskin Fibroblasts (Menschliche Vorhautfibroblasten)
HS	Humanserum
HLA	Human Leucocyte Antigen
IFN	Interferon
IgG/IgM	Immunglobuline G/M
IL	Interleukin
IP	interstitielle Pneumonie

KBq	Kilobequerel
kD	Kilodalton
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
l	Liter
M	Molar
mA	Milliampere
MAK	Monoklonaler Antikörper
Mbq	Megabequerel
MCMV	Murines Cytomegalovirus
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
NaAc	Natriumacetat
ng	Nanogramm
NIEPS	Non Infectious Particles
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PBL	Periphere Blut Lymphozyten
PBMC	Periphere mononukleäre Zellen
PBSCT	Peripheral Blood Stem Cell Transplantation
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PHA	Phytohämagglutinin
RNA/RNS	Ribonucleid Acid/Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SCT	Stammzelltransplantation
SI	Stimulationsindex
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor

U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifuge
%(v/v)	Volumenanteil
%(w/v)	Gewichtsanteil
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

1. Einleitung

1.1. Das Zytomegalievirus

1.1.1. Begriffsbestimmung zum Zytomegalievirus

Gebräuchliche Synonyme für die zellulären Veränderungen beziehungsweise assoziierte Erkrankungen im Zusammenhang mit dem Zytomegalievirus (lateinische Schreibweise Cytomegalie (CMV) oder Humanes Cytomegalievirus (HCMV)), sind die Speicheldrüsenviruskrankheit (salivary gland disease) oder Einschlusskörperchenkrankheit/CID (Cytomegalic Inclusion Disease). Der Name Zytomegalie setzt sich zusammen aus den griechischen Worten kytos = Zelle und mega(l) = groß, lang, mächtig.

1.1.2. Geschichte und Taxonomie

Der Pathologe H. Ribbert hielt 1881 mehrere Vorträge über „Gebilde“ im Nierenpräparat einesluetischen/syphilitischen Totgeborenen und in Speicheldrüsen nicht-luetischer Kinder, die als „kompensatorische, hypertrophische Veränderungen“ erschienen und von ihm als „eine Umwandlung der Organzelle“ aufgefasst wurden [23]. 1904 entdeckten Jesionek und Kiolenoglou die „zytomegalen Kernkörper in menschlichen Gewebszellen“ in Nieren-, Lungen- und Leberpräparaten einesluetischen Totgeborenen [51]. Die Gebilde glichen „stark gequollenen Zellen“, die die 3- bis 4-fache Grösse einer Epithelzelle einnahmen. „Der Kern war meistens polständig und bestand aus einem scharf hervortretenden, mit Eosin rötlich gefärbten zentralen Kernkörper, umgeben von einem hellen Hof“, schalenförmig vom Zelleib durch die Kernmembran abgegrenzt. Im hellen Hof fielen „mehrere kreisrunde Körperchen“ auf [23,100]. In den folgenden Jahren entstanden unterschiedliche Meinungen über Herkunft und Entwicklung (heterotope Zellen, Mazerationserscheinungen, degenerierte Körperzellen, parasitäre Zellen wie z. B. Amöben, Sporoziten) dieser ungewöhnlichen, bis dahin gänzlich unbekanntenen Zellformationen. Jesionek bezeichnete sie fortan als

„protozoenartige Gebilde“ [51]. Routinemäßige mikroskopische Untersuchungen der pathologischen Gewebsveränderungen führten im frühen 20. Jahrhundert in mehreren Ländern unabhängig voneinander zur Entdeckung ähnlicher Gebilde. Aufgrund eines häufigen Vorkommens in Speicheldrüsen entwickelte sich in der angelsächsischen Literatur der Begriff „salivary gland disease“. Goodpasture gelang 1921 der Beweis, dass die „Gebilde“ von Gewebszellen abstammen und bezeichnete die Umwandlung als „Zytomegalie“ (Cytomegalia). Jakubowicz (vom Meyenburger Züricher pathologischem Institut) äusserte 1930 nach zahlreichen Untersuchungen die Vermutung einer eigenständigen Erkrankung, die nicht im Zusammenhang mit der Syphilis stehe. Mit Einführung der Wassermann-Reaktion (älteste Methode der Syphilisserologie) zeigte sich, dass die „protozoenartigen Gebilde“ nicht mit der Syphilis in Verbindung standen. Fortan wurden immer mehr Krankheiten und Symptomenkomplexe (u. a. Leberzirrhose, Hydrops congenitus, angeborenes Hämoblastom, Purpura neonatorum, Hydrozephalus bzw. Mikrozephalus congenitus) in Verbindung mit der Zytomegalieinfektion gebracht. Mouchet interpretierte schon 1911, dass es sich bei den „Gebilden“ eigentlich um eine „Umbildung der von intrazellulären Parasiten befallenen Epithelien und deren spätere Abstoßung handelte“. Lipschütz wies 1921 ähnliche Kerneinschlüsse bei Infektion mit Herpes-Viren nach und vermutete, dass der vermeintliche „intrazelluläre Parasit“ eine zellspezifische Reaktion auf ein HCMVirus sei. Wyatt gab der Erkrankung 1950 den Namen „cytomegalic inclusion disease“, die aufgrund „der unterschiedlichen Verbreitungsmuster der Gebilde“ zu oben genannter Vielfalt von Erkrankungen führen könnte [23].

1956/57 konnte der endgültige Beweis der Virusätiologie durch Weller et al., Smith, Rowe et al. durch Isolierung des menschlichen CMV aus Rachenmandeln, Speicheldrüsen und Urin erbracht werden. Rowe isolierte u. a. auch den bekannten HCMV-Laborstamm AD169, welcher in der vorliegenden Dissertation verwendet wurde [100,101]. Die HCMV-Erkrankung stellte also ein eigenständiges Krankheitsbild dar. Wegen gemeinsamer genetischer, struktureller und biologischer Eigenschaften sowie typischer intranukleärer Einschlüsse wurde das HCMV der Gruppe der humanen Herpesviren zugeordnet.

Zu den humanen Herpesviridae zählen [59]:

- Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1). Erkrankung: Ekzema herpeticum, Herpes neonatorum, Enzephalitis.
- Herpes simplex Virus Typ 2 (HSV-2). Erkrankung: Herpes genitalis, -neonatorum
- Varizella-Zoster Virus (VZV). Erkrankung: Windpocken, Gürtelrose, Meningo-enzephalitis, Pneumonie
- Epstein-Barr Virus (EBV). Erkrankung: Pfeiffersches Drüsenfieber/infektiöse Mononukleose, polyklonales B-Zell-Lymphom, Burkitt-Lymphome, lymphoblastoides Nasopharynx-Karzinom
- Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6). Erkrankung: Dreitagefieber/Exanthema subitum
- Humanes Herpesvirus 7 (HHV-7). Erkrankung: Klinik noch nicht sicher bekannt

Mit erfolgreicher in vitro Vermehrung des HCMV begann die Erforschung und Überwachung der klinischen Auswirkungen einer Zytomegalie-Infektion bei verschiedenen Personenkreisen (1.2.).

1.1.3. Virusstruktur

Die Herpesviren werden in alpha-, beta- und gamma-Herpesviren aufgeteilt und zwar nach:

- Art der Zielzellen für die produktive und latente Infektion
- Geschwindigkeit der Virusvermehrung
- Grad der Virusfreisetzung

Das Zytomegalievirus wird der Untergruppe der β -Herpesviren zugerechnet. Es besteht aus einer/m doppelsträngigen DNS/Genom und einem Proteinkapsid (= Nukleokapsid) sowie einer Virushülle (Lipoproteinhülle/Matrix/Tegument). Die DNS weist mit 150×10^6 Dalton = 240 Kilobasenpaaren das größte Molekulargewicht unter den humanen Herpesviren auf und codiert etwa 200 Proteine. Sie liegt im sogenannten „core“ (engl. Kern, Innerstes) des Viruspartikels und wird von dem Proteinkapsid umschlossen, das die Form eines Ikosaeders (20-Flächners) besitzt und aus 150

hexagonalen und 12 pentagonalen, röhrenförmigen Kapsomeren gebildet wird. Das Nukleokapsid wird von einer locker strukturierten Matrix umhüllt, in der sich Phosphoproteine befinden. Diese dienen zur Verbindung mit der Virushülle. Die Virushülle besteht aus einer Lipiddoppelmembran mit virusspezifischen Glykoproteinen [56]. Die Bezeichnung „Cytomegalie“ ist charakteristisch für die zytologischen Veränderungen, in den vom HCMV befallenen Zellen. Bei Infektion der Zellen kommt es zu intranukleären Einschlüssen, die den Zellkern wie „aufgeblasen“ erscheinen lassen und letztendlich die ganze Zelle vergrößern.

1.2. Epidemiologie und Pathogenese

Infektionen mit Cytomegalie-Viren sind weltweit verbreitet. Durchseuchungsalter und -grad schwanken jedoch stark. Ca. 50 % der Erwachsenen in den Industrieländern und schon etwa 90 % der Kinder in der Dritten Welt sind HCMV-infiziert [68,104]. Die Übertragung findet nur von Mensch zu Mensch statt. Das Virus kommt in Blut, Blutprodukten, Milch, Speichel, Genitalsekreten, Urin und Stuhl vor.

Es können folgende symptomatische HCMV-Infektionen unterschieden werden [59]:

- pränatale/kongenitale/diaplazentare HCMV-Infektion
- perinatale HCMV-Infektion
- iatrogene HCMV-Infektion/“normale“ Infektion
- Infektion bei immunsupprimierten Personen

1.2.1. Die pränatale HCMV-Infektion

Eine Übertragung des HCMV kann von der schwangeren Mutter auf den Embryo oder Feten (diaplazentar) erfolgen. Diese kann sowohl bei Erst- /Primärinfektion als auch bei Reinfektion der Schwangeren geschehen, wobei der Infektionsstatus der Mutter eine entscheidende Rolle für die Frequenz und Prognose der Infektion beim Embryo oder Fetus spielt. Es liegen Angaben vor [40], dass bei Erstinfektion der Mutter bis zu 30 %, bei einer Reinfektion der Mutter jedoch nur 2 - 10 % der Embryos oder Feten infiziert werden. Die mütterlichen Antikörper haben somit auf die Manifestation der Erkrankung

einen wesentlichen Einfluss. Bei einer Primärinfektion der Mutter beträgt der Anteil der symptomatischen Infektionen bei den Neugeborenen etwa 5 - 10 %, bei Reinfektion weniger als 1 %. Im Unterschied zu anderen intrauterinen Virusinfektionen scheint der Zeitpunkt der HCMV-Infektion während einer Schwangerschaft keinen Einfluss auf die Schwere und den Verlauf der embryonalen oder fetalen Infektion auszuüben.

Infektionen des Embryos oder Fetus können inapparent bis schwer verlaufen oder nur durch einzelne HCMV-typische Symptome in Erscheinung treten. Das voll ausgeprägte Krankheitsbild einer HCMV-Infektion zeigt sich unmittelbar nach der Geburt. Die am häufigsten vorkommenden Symptome sind Petechien, Hepatosplenomegalie und Ikterus. Außerdem sind Mikrozephalie mit oder ohne zerebrale Verkalkungen, intrauterine Wachstumsverzögerungen, spastische Paralysen, Lymphadenopathie und Anämie nicht selten. Frühgeburten durch HCMV-Infektion sind möglich. Als Spätfolgen können Innenohrschwerhörigkeit, Sprachstörungen und neurologische Zeichen eines frühkindlichen Hirnschadens mit geistiger Retardierung, Epilepsie und Retinitis auftreten [54,106].

1.2.2. Die perinatale HCMV-Infektion

Die Übertragung von HCMV findet während der Geburt durch Mikrotransfusionen von mütterlichem Blut oder Virusausscheidung im Genitaltrakt der Mutter und/oder nach der Geburt über das Stillen statt [43]. Perinatal infizierte Säuglinge zeigen nur selten einen apparenten Verlauf einer HCMV-Infektion.

1.2.3. Die iatrogene /"normale" Infektion in Kindheit und späterem Alter

Eine Übertragung von HCMV geschieht spontan durch Schmier- oder Tröpfcheninfektion (Urin, Genitalsekrete, Speichel) oder parenteral (Blut, Blutprodukte, Organtransplantate). Die Inkubationszeit beträgt 20 - 60 Tage, die Erkrankung selbst dauert 2 - 6 Wochen. Bei Patienten mit intakter Immunabwehr jenseits der Neugeborenenphase kann sich die Infektion in seltenen Fällen durch ein sogenanntes Mononukleose-Syndrom äussern, das spontan oder nach Bluttransfusion (mit Leukozyten) und ohne

Nachweis heterophiler Antikörper auftritt. Sexuell aktive junge Erwachsene sind dabei am häufigsten betroffen [45]. Symptome wie langandauerndes Fieber, eventuell mit Schüttelfrost, starke Müdigkeit und Krankheitsgefühl kennzeichnen diese Krankheit [54]. Myalgien, Kopfschmerzen und Splenomegalie sind häufig. Im Gegensatz zur infektiösen Mononukleose (EBV-Infektion) treten eine exsudative Pharyngitis und zervikale Lymphadenopathie eher selten auf. Ebenfalls selten kann es zu einem Röteln ähnlichen Ausschlag, einer interstitiellen oder Segmentpneumonie, Myokarditis, Pleuritis, Arthritis, Enzephalitis oder einem Guillan-Barré-Syndrom kommen. Charakteristische Laborbefunde sind eine Lymphozytose im peripheren Blut mit mehr als 10 % atypischen Lymphozyten. Die Gesamtzahl der Leukozyten kann erniedrigt, normal oder aber auch deutlich erhöht sein. Es kann zu einer Steigerung von Serumtransaminasen und der alkalischen Phosphatase kommen. Immunologische Veränderungen sind im Sinne des Vorliegens von Kryoglobulinen, Rheumafaktoren, Kältehämagglutininen und antinukleären Antikörpern häufig. Komplikationen wie hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie gelegentlich auf. Spätfolgen der HCMV-Infektion sind selten. Die Ausscheidung von Viren findet noch Monate bis Jahre nach der Infektion statt. Zu Krankheitsrezidiven mit Fieber, Krankheitsgefühl und Dysfunktionen des vegetativen Nervensystems (z.B. Schweißausbrüche oder plötzliche Gesichtsröte) kommt es nur bei wenigen Patienten [45].

1.2.4. Infektion bei immunsupprimierten Personen

Diese betrifft Feten (1.2.1.), HIV- (human immuno-deficiency virus) infizierte Personen und Patienten nach Organ- oder Knochenmark-/Stammzell-Transplantationen [54]. Das Krankheitsbild ist bei den unterschiedlichen Patientengruppen mit Immundefizienz aus noch unbekanntem Gründen nicht einheitlich.

1.2.4.1. Die HCMV-Infektion bei AIDS-Patienten

Eine Primärinfektion oder Reaktivierung mit HCMV findet bei AIDS-Patienten in der Regel fast ausnahmslos statt. Typische Krankheitsbilder bei einer HCMV-Infektion sind die Retinitis, die Kolitis und die Enzephalitis [13,25,48,91].

1.2.4.2. Die HCMV-Infektion bei Organtransplantierten

Eine HCMV-Infektion findet sich in mehr als der Hälfte der Organtransplantierten [76]. HCMV scheint das häufigste und wichtigste virale Pathogen zu sein, das Komplikationen wie Fieber, Leukopenie, Retinitis, interstitielle Pneumonie, Ösophagitis, Gastritis, Kolitis und Hepatitis hervorruft [115]. Am häufigsten ist das transplantierte Organ Ort der Manifestation einer HCMV-Infektion. Das größte HCMV Infektionsrisiko mit Gefahr der Abstossung des Transplantates besteht zwischen dem ersten und vierten Monat nach Transplantation.

1.2.4.3. HCMV-Infektion bei Knochenmark- und Stammzelltransplantierten

Durch die starke Immunsuppression der KMT/SCT-Patienten nach der Konditionierungstherapie und in der ersten Phase nach Transplantation kann es zu Primärinfektion oder Reaktivierung des endogenen HCMV kommen, was bei mindestens 50 % der Patienten nach allogener KMT der Fall ist [72,92,93]. In dieser Situation tritt bei fehlender Prophylaxe die interstitielle Pneumonie (HCMV-IP) mit ca. 15 % als häufigste und zugleich auch gefährlichste Manifestation der HCMV-Infektion auf und verläuft ohne wirksame Therapie bei 84 - 88 % der Patienten letal [35,75]. Das Risiko einer Infektion ist zwischen der 5. und 13. Woche nach Transplantation am grössten und steht im Zusammenhang mit verschiedenen Risikofaktoren wie zum Beispiel der Art der Immunsuppression, Graft-versus-Host-Reaktion, höherem Lebensalter, Seropositivität vor der Transplantation [3,39].

Allgemein gilt:

- dass ein HCMV-negativer Empfänger durch Transplantation mit einem HCMV-negativen Spender ein sehr geringes Risiko einer HCMV-Infektion besitzt,
- dass seropositive Transplantatempfänger durch HCMV-Stämme anderen Genotyps des Spenders infiziert werden können,
- dass eine Primärinfektion in der Regel einen wesentlich schwereren Verlauf hat als eine Reinfektion.

Derzeit wird eine HCMV-Erkrankung nach Kriterien des 4. Internationalen Cytomegalovirus Workshops in Paris definiert [66]:

- HCMV-Pneumonie: Dyspnoe/Atemnot, interstitielle Infiltrate auf einer Röntgenaufnahme der Lunge, positive HCMV-Kultur von Bronchiallavagen.
- HCMV-Enteritis: gastrointestinale Symptome (u. a. Erbrechen, Durchfall, Ulzera), histologischer oder immunhistologischer Nachweis von HCMV.
- HCMV-Hepatitis: gestörte Leberfunktion, typische histologische Veränderungen durch HCMV und Detektion von HCMV in der Leberbiopsie.

Persistierende Virämie und multipler Organbefall mit charakteristischen Befunden wie progressive Lungeninfiltrate, Panzytopenie, Hyperamylasämie und Hypotonie sowie Superinfektionen mit Bakterien, Pilzen und Protozoen führen häufig zum tödlichen Ausgang einer HCMV-Infektion.

1.3. Diagnose

Die derzeit wichtigsten indirekten (Antikörper) oder direkten (Viren) Nachweismethoden einer HCMV- Infektion sind folgende:

- Gewebekultur
- Zellkulturverfahren („shell vial-Methode“)
- Antikörper-Serologie
- Antigenämie-Test
- Polymerase-Chain-Reaction (PCR)

- Reverse Transkriptase-PCR

1.3.1. Gewebekulturverfahren

Hier wird durch direkte mikroskopische Beobachtung ein spezifischer zytopathischer Effekt (CPE) in der Gewebekultur (Überschichtung mit Urin, Bronchiallavage-Sekret) beobachtet, der bei genügend gebildetem kompletten Virus zu sehen ist. Bei hoher Virusmenge tritt der CPE schon nach wenigen Tagen, bei geringer Virusmenge erst nach 2 - 4 Wochen auf. Bei diesem Verfahren ist eine bakterielle Sterilität des Untersuchungsmaterials wichtig, oftmals aber nicht möglich. Von Nachteil ist auch die längere Kultivierungszeit, die nötig ist, um eine positive oder negative Aussage zu treffen.

1.3.2. Zellkulturverfahren („shell vial-Methode“)

Durch Virusisolierung kann der direkte Nachweis einer viralen Infektion stattfinden. Mit der „shell vial-Methode“ können schon geringe Virusmengen in kürzerer Zeit nachgewiesen werden. Hierbei werden Fibroblasten-Kulturen mit dem darübergeschichteten Patientenmaterial zentrifugiert. Bei Virusinfektion des Patientenmaterials wird dadurch der Eintritt der Viren in die Zellen gefördert. Nach etwa 2 - 3 Tagen kann der Nachweis der HCMV Infektion durch Bestimmung von Immediate Early Antigen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern erbracht werden [38,82].

1.3.3. Serologie

- Komplementbindungsreaktion (KBR): Sie stellt ein klassisches serodiagnostisches Verfahren v. a. für den Nachweis einer aktiven Infektion im 1. Lebensjahr dar.
- Enzym-Immuno-Assays (ELISA): Dieser dient durch Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern, die gegen HCMV Antigene gerichtet sind, zur Feststellung des Infektionsstatus von Empfänger und Spender (primäre/sekundäre Infektion).

- Immunfluoreszenztests (IFT): Bei diesem Testverfahren findet ebenfalls eine Erfassung und Differenzierung von IgG und IgM Antikörpern gegen HCMV statt. Die Tests sind zuverlässig, aber zum Teil aufwendiger als der ELISA-Test.

1.3.4. Antigenämie-Test

Unter Verwendung monoklonaler Antikörper wird das virale Tegumentprotein pp65 in polymorphkernigen Granulozyten von Patienten mit akuter HCMV-Infektion detektiert [112]. Das pp65-Vorkommen in den Leukozyten korreliert stark mit einer akuten HCMV-Infektion. Dieser Test kann für die Steuerung der antiviralen Therapie angewendet werden, denn die Anzahl der pp65-positiven Zellen im Blut erlaubt eine relativ sichere Aussage über die Virusbelastung und Wahrscheinlichkeit der Entwicklung einer symptomatischen HCMV-Infektion bei einem Patienten, vor allem nach Organtransplantation [6].

1.3.5. Qualitative oder quantitative PCR (Polymerase-Chain-Reaction)

Die Detektion viraler DNS in Leukozyten oder im Serum/Plasma dient als früher Nachweis einer akuten Infektion [30,108] und kann ebenfalls zur Steuerung der antiviralen Therapie eingesetzt werden [28]. Über die Quantifizierung der viralen DNS in Leukozyten bzw. im Serum/Plasma sollen auch prognostische Aussagen über den Verlauf der Infektion eines Patienten sowie eine kontrollierte Steuerung der antiviralen Therapie möglich sein [67].

1.3.6. Reverse Transkriptase-PCR

Diese Methode sollte zur Unterscheidung einer aktiven gegenüber einer latenten Infektion durch Bestimmung spezifischer viraler mRNS in Leukozyten dienen. Erste Versuche zeigten keine wesentliche Verbesserung gegenüber anderen Nachweismethoden [31].

1.4. Die Immunantwort

1.4.1. Die zelluläre Immunantwort

1978 veröffentlichten Levin et al. erste Ergebnisse über HCMV-spezifische T-Zellantworten in Proliferationstests bei Vergleich von Gesunden und allogent transplantierten KMT-Patienten [61]. Dadurch bestätigten sich schon länger bestehende Vermutungen über Art und Weise immunologischer Abwehrmechanismen gegenüber dem HCMVirus. Bei Patienten nach KMT war eine HCMV-spezifische proliferative T-Zellantwort längere Zeit nicht nachweisbar und entwickelte sich bei einigen erst im weiteren Verlauf nach KMT. Weitere Studien über proliferative und zytotoxische T-Zell-Antworten gegenüber HCMV nach KMT wurden von Meyers et al. (1982) sowie Quinnan et al. (1980) durchgeführt [72,87]. Sie stellten fest, dass die HCMV-Erkrankung nach KMT eher mit einem Defekt der zytotoxischen HCMV-spezifischen T-Zellantwort und weniger mit einer reduzierten proliferativen Antwort korrelierte.

Fortschritte in der Klärung der zellulären Immunabwehr gegenüber HCMV wurden durch Reddehase et al. (1987, 1989) im Tiermodell des murinen CMV (MCMV) erzielt [94,95]. In bestrahlten immunsupprimierten und MCMV-infizierten Tieren zeigten CD8⁺T-Zellen im adoptiven Immuntransfer protektive Wirkung gegenüber den sonst tödlichen Folgen einer primären MCMV-Erkrankung und ergaben einen therapeutischen Effekt bei einer Reinfektion. In Bezug auf die Antigen-spezifität dieser CD8⁺-zytotoxischen T-Zellen beobachteten Reddehase et al. (1989) eine dominante Reaktion gegenüber einem Nonapeptid, das aus dem IE-Genprodukt pp89 stammte [95]. Jonjic et al. (1989) wiesen in anderen Tests mit MCMV-infizierten, jedoch CD4⁺-depletierten Mäusen, ebenfalls eine Protektion durch CD8⁺T-Zellen nach, die allerdings verspätet auftrat [52]. Als Residuum blieb ausserdem eine persistierende, asymptomatische Infektion der Speicheldrüsen zurück. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass auch CD4⁺T-Zellen zur Eliminierung des murinen CMV befähigt sind [53]. Bei Versuchen mit CD8⁺T-Zell-depletierten Mäusen und adoptiv transferierten CD4⁺T-Zellen wurde das Virus mit gleicher Zeitkinetik wie bei gesunden Mäusen bekämpft. Auch in β_2 -

Mikroglobulin-defizienten Mäusen stellte sich eine protektive Wirkung von CD4⁺T-Zellen ein [86].

Dass auch humane CD8⁺T-Zellen eine protektive Wirkung gegenüber HCMV besitzen, wiesen Ridell et al. (1992) und Dolstra et al. (1995) sowie vor kurzem auch Einsele et al. (2002) bei Patienten mit adoptiven Transfer von CD8⁺T-Zellklonen nach [24,29,99]. Die virale Erkennungsstruktur der HCMV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen war das Tegumentprotein pp65. Nach McLaughlin-Taylor et al. (1994) stellt es ein virales Strukturprotein dar, gegen das beim Menschen protektive T-Zell-Immunreaktionen dominant gerichtet zu sein scheinen [70]. In anderen Studien konnte allerdings auch eine CD8⁺T-Zell-Reaktion in klinisch Gesunden ausgemacht werden, die gegen Glykoprotein gB gerichtet war [11]. Eine Studie von Walter et al. (1995) mit dem humanen CMV bestätigte die protektive Wirkung von CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen vor einer HCMV-Erkrankung nach adoptiven T-Zell-Immuntransfer [116]. Er stellte aber auch eine relativ frühzeitige erneute Abnahme der HCMV-spezifischen T-Zellzytotoxizität bei Fehlen HCMV-spezifischer CD4⁺T-Zellen fest. In weiteren Studien wurde beobachtet, dass eine persistierend niedrige oder ein progressiver weiterer Abfall der CD4⁺ T-Zellzahl ein prognostisch ungünstiger Faktor für die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung und deren Verlauf darstellte [27,74].

Boland et al. (1992) und Ljungman et al. (1993) beschrieben bei Knochenmark-beziehungsweise Organtransplantierten die Rolle der HCMV-spezifischen CD4⁺-Zellen, wobei sie eine Korrelation der HCMV-spezifischen proliferativen Antwort und Bewältigung der HCMV-Infektion feststellten [10,66]. Li et al. (1994) sahen bei den meisten knochenmarktransplantierten Patienten eine gleichzeitige oder sogar frühere Rekonstitution der CD4⁺T-Zellantwort im Vergleich zur CD8⁺T-Zellantwort [62]. Für die Wiederherstellung der CD8⁺T-Zellantwort schien die Rekonstitution der CD4⁺-Helferzellen obligatorisch zu sein. Bei der Suche nach HCMV-Antigenen, die von CD4⁺-Helfer-T-Zellen erkannt werden können, zeigte sich, dass sowohl T-Zell-Epitope aus dem Matrixprotein pp65, Glykoprotein gB als auch Glykoprotein gH HCMV-reaktive CD4⁺-T-Zellen stimulieren können [8].

Dass die Übertragung der zellulären (und humoralen) Immunität von KMT-Spender auf KMT-Empfänger einen wichtigen Faktor für den Verlauf einer HCMV-Infektion darstellt, stellten Boland et al. (1992) fest [10].

1.4.2. Die humorale Antwort

In einer durchgeführten Impfstudie konnte gezeigt werden, dass eine starke Korrelation zwischen dem Schutz vor Reinfektion mit HCMV und im Organismus vorhandenen neutralisierenden Antikörpern besteht [1]. Für die humorale Antwort gegen HCMV scheinen die viralen Envelope-Proteine hauptsächliches Ziel für entsprechende Antikörper zu sein. Britt et al. (1990) und Marshall et al. (1992) stellten in Versuchen mit menschlichen Seren eine vielfache neutralisierende Antikörper-Antwort auf das Glykoprotein gB fest [14,69]. Auch andere HCMV-Proteine scheinen häufig Antikörper zu induzieren, die sich in ihrer neutralisierenden Wirkung gegenüber HCMV addieren können. So induziert auch das Glykoprotein gH während der Infektion eines ansonsten gesunden Menschen sowohl eine humorale als auch eine zelluläre immunologische Antwort [8,90,109]. Urban et al. (1992) identifizierten im gH-Protein eine immundominante Antigen-Sequenz (AD86) für die Bindung von Antikörpern, die den Aminosäurenbereich 34 bis 43 umfasste [109]. In anderen Versuchen wurde festgestellt, dass bis zu 58 % der gesamten humoralen Immunantwort gegen HCMV in menschlichen Seren gegen das gH-Glykoprotein gerichtet war [110]. Eine hohe Seropositivität (>80 %) gegen gH (AD169 und Towne) des HCMVirus konnten auch Schoppel et al. (1997) in ihren Versuchsergebnissen ausmachen [103].

Boland et al. (1992) wiesen nach, dass der Verlauf der HCMV-Infektion eines KMT-Empfängers sowohl von der Übertragung der zellulären als auch der humoralen Immunitätslage gegenüber HCMV des KM-Spenders abhängig war [10]. Wies der Spender einen seropositiven HCMV-Titer auf, so kam es bei dem KMT-Patienten zu einer schnelleren Rekonstitution der HCMV-spezifischen Immunantwort als bei Seronegativität.

1.5. Prävention und Behandlung

1.5.1. Expositionsprophylaxe

Seronegative immunsupprimierte Patienten sollten bei notwendigen Transfusionen nur Blut von seronegativen Spendern oder Blut, das gefroren, aufgetaut und deglyzerolisiert wurde, erhalten. Bei Transplantationen werden daher für den seronegativen immunsupprimierten Empfänger möglichst Organe oder Knochenmark von seronegativen Spendern verwendet. Durch die hohe Prävalenz von HCMV in der Bevölkerung ist dies jedoch nicht immer leicht zu realisieren, weshalb es vor allem bei der SCT/KMT bei Vorhandensein nur eines einzigen HLA-kompatiblen Spenders, zu einer ungünstigen HCMV-Konstellation kommen kann.

1.5.2. Immunprophylaxe

1.5.2.1. Passive Immunisierung

Für eine passive Immunprophylaxe stehen Immunglobuline mit HCMV-spezifischen Antikörpern zur Verfügung. Diese können HCMV-seropositiven immunsupprimierten Patienten prophylaktisch verabreicht werden [96]. Inwieweit diese Prophylaxe allerdings eine HCMV Erkrankung verhindern kann, ist heute sehr umstritten. Über prophylaktische Gabe von monoklonalen Antikörpern bei HCMV-seropositiven KMT-Empfängern berichteten Aulitzky et al. (1991) [5].

1.5.2.2. Aktive Immunisierung

Plotkin et al. (1975) entwickelten einen abgeschwächten Lebendimpfstoff (Towne 125) aus mit HCMV-infizierten Urin, der bei seronegativen Transplantatempfängern die Schwere einer HCMV-Erkrankung reduzierte [83-85]. Sehr problematisch gestaltete sich jedoch die rasch abnehmende Immunität nach aktiver Impfung.

1.5.2.3. Genetisch hergestellte Subunit-Vakzine

Das Vakzine beinhaltet gereinigte Oberflächen-Glykoproteine des HCMV, die als Antigene dienen und Ziele für neutralisierende Antikörper darstellen. [22]. Bernstein et al. (2002) berichteten über Impfungen mit einem gB-Protein Subunit Vakzine, die sowohl zu Lymphzytenproliferationen als auch zu hohen HCMV Antikörpertitern führten, weitere Studien werden derzeit durchgeführt [9,21]. Über ähnliche Ergebnisse war schon in früheren Publikationen berichtet worden. [36,79].

1.5.3. Adoptiver T-Zell-Immuntransfer

Untersuchungen am homologen murinen Virus MCMV führten zur Aufdeckung grundlegender Mechanismen der zellulären Abwehr von HCMV. Durch Experimente des adoptiven Immuntransfers zeigten Reddehase et al. (1987), dass $CD8^+$ T-Zellen nach Transfer in bestrahlte, infizierte Mäuse protektive Wirkung besitzen [94]. Über eine Behandlung von KMT-Patienten mit $CD8^+$ HCMV-spezifischen in vitro expandierten T-Zellklonen von seropositiven Spendern berichteten Riddell et al. (1992) und Walter et al. (1995) [99,116]. Die Patienten vertrugen die Gabe der T-Zellen ohne Nebenwirkungen und entwickelten auch keine Erkrankung. Ob für diese Patienten aber vorab ein Risiko bestanden hatte, an HCMV zu erkranken, war nicht nachzuvollziehen. Die Anzahl der benötigten T-Zellklone war jedoch sehr hoch und wurde unter grossem Aufwand gezogen. Ausserdem kam es wohl zu einem schnellem Abfall der $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen bei erniedrigter $CD4^+$ spezifischer T-Zellantwort. Deshalb wären zusätzlich HCMV-spezifische $CD4^+$ T-Lymphozyten erforderlich gewesen [116]. Ebenfalls wurde über Transfusionen von HCMV-spezifischen T-Zellen berichtet, die eine Option bei HCMV-Virämie nach SCT darstellen. Bei allen Patienten war eine mindestens vierwöchige antivirale Therapie erfolglos gewesen [29]. Im Gegensatz zu Ridell et al. (1992) und Walter et al. (1995) wurden jedoch nur Patienten mit fehlender HCMV-spezifischer $CD4^+$ -T-Zellantwort in die Therapie mit $CD4^+$ -spezifischen in vitro expandierten T-Zellen von den seropositiven Spendern einbezogen [99,116]. Bei den meisten Patienten waren fünf bis 31 Tage nach $CD4^+$ -T-Zellgabe kein HCMV in der

PCR mehr nachweisbar. Einsele et al. führten diesen schnellen antiviralen Effekt eher auf die CD4⁺-T-Zellgabe als auf die vorhergehende antivirale Chemotherapie zurück. Die Patienten entwickelten eine normale immunologische Antwort mit antigenspezifischen Zellen, die vergleichbar mit der von gesunden Personen war. Vermutlich kommt es nach Gabe und mit Hilfe von HCMV spezifischen CD4⁺-T-Zellen zu einer Expansion HCMV-spezifischer CD8⁺-zytotoxischer T-Zellen. Derzeit finden weitere Untersuchungen bei gemeinsamer Gabe von CD4⁺- und CD8⁺-HCMV-spezifischer T-Zellen bei immundefizienten an HCMV erkrankten Personen statt [29].

1.5.4. Antivirale Chemotherapie

In der Klinik stehen verschiedene Substanzen zur Behandlung der HCMV-Erkrankung zur Verfügung: die Guaninnukleosidanaloga Ganciclovir und Aciclovir, die zu einem Abbruch der viralen DNS-Neusynthese durch Hemmung der viralen DNS Polymerase führen sowie die Phosphoameisensäure Foscarnet, welche ebenfalls virus-spezifische Enzyme, wie zum Beispiel DNS-Polymerasen und reverse Transkriptasen hemmt. Alle Substanzen wirken virostatistisch und unterdrücken eine aktive HCMV-Infektion, führen jedoch nicht zu einer Viruseliminierung [22]. Studien über die Wirkung neuerer Virostatika wie Cidofovir oder Lobucavir werden derzeit durchgeführt [2].

Ganciclovir wird zum Teil prophylaktisch bei Knochenmark- oder Organempfängern mit hohem Infektionsrisiko verabreicht. Knochenmarkempfänger mit HCMV-Pneumonie sprechen allerdings nicht immer auf alleinige Gabe von Ganciclovir an. Bei AIDS-Patienten mit Ganciclovirbehandlung aufgrund einer HCMV-induzierten Retinitis oder Kolitis ist es klinischen Studien zufolge bei 70 - 90 % der Patienten zu einer Reduktion der Symptome gekommen. Nach prophylaktischer Gabe von Ganciclovir bei KMT-Patienten kam es zwar zur Reduktion der Rate an HCMV-Infektionen und -Erkrankungen, jedoch wurde gleichzeitig eine Zunahme nicht-viraler Erkrankungen durch myelosuppressive Nebenwirkungen beobachtet [118]. Die Thrombo- und Granulozytopenie kann durch gleichzeitige Gabe von Granulozytenkoloniestimulierenden Faktor (G-CSF) oder Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) gemindert werden.

Derzeit wird eine Frühintervention („preemptive therapy“) zur antiviralen Therapie vorgeschlagen. So sollte bei frühesten Anzeichen einer HCMV-Infektion, die durch HCMV-DNA in der PCR oder Antigenämie-Test festgestellt wird, mit einer antiviralen Therapie begonnen werden [26]. Die Dauer der medikamentösen Therapie ist derzeit in den einzelnen Spezialkliniken noch unterschiedlich. Bei einer Langzeittherapie nehmen die spät auftretenden HCMV-Erkrankungen jedoch zu, bei Fortbestehen der Immundefizienz muss mit erneuter Reaktivierung des HCMVirus sowie mit letal verlaufenden bakteriellen und fungalen Infektionen gerechnet werden [26,44,62]. Eine vollständige Unterdrückung des HCMV ist bei den eingesetzten antiviralen Therapeutika nicht immer gegeben, so dass es während der Therapie zu Resistenzen, vor allem bei HIV, aber auch bei allen anderen immunsupprimierten Personen kommen kann [12,33]. 1989 wurde erstmals über primäre oder erworbene Ganciclovir- und/oder Foscarnet-resistente HCMV-Stämme bei immunsupprimierten Patienten mit progressiver HCMV-Erkrankung berichtet [32,55]. Durch molekularbiologische Untersuchungen bei Ganciclovir-resistenten HCMV-Isolaten liess sich eine Mutation im Gen von UL97, welches die virale Phosphotransferase kodiert und für die anfängliche Phosphorylierung von Ganciclovir verantwortlich ist, feststellen. Diese Mutation zeigte ebenfalls eine Kreuzresistenz gegenüber Cidofovir [18,33].

Bedeutendste Nebenwirkungen von Foscarnet sind Nierenfunktionsstörungen sowie Elektrolytentgleisungen, von Cidofovir Nierenversagen und Neutropenie.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Für die Lösung bestehender klinischer und viraler Probleme der derzeitigen virostatistischen Therapie von HCMV-Infektionen nach Knochenmark-/Stammzelltransplantation könnte die Entwicklung neuer immunotherapeutischer Ansätze hilfreich sein. Hierzu ist weiterhin ein besseres Verständnis der Zusammensetzung und Spezifität von protektiven zellulären Immunreaktionen gegen HCMV in Gesunden sowie in Patienten nach SCT/KMT notwendig.

Die vorliegende Arbeit befasste sich daher mit der Rekonstitution der T-zellulären Immunantwort gegen HCMV nach Knochenmarktransplantation. Wesentliche Ziele waren, auf klonaler Ebene der T-Zellen aufzuzeigen, wogegen der Patient nach KMT im Vergleich zum gesunden KMT-Donor reagiert. Hierbei ging es um die Zusammensetzung und Spezifität HLA-Klasse II restringierter HCMV-spezifischer T-Zellen und um die Definition von neuen HLA-Klasse II restringierten T-Zellepitopen von HCMV, die zur Aktivierung von CD4⁺ HCMV spezifischen T-Zellen führen. Ferner sollte untersucht werden, ob sich darin dominante Reaktionen und Unterschiede zu Patienten mit anderer Immungenetik beziehungsweise zu Gesunden erkennen lassen.

2. Fallbeschreibung

Patient M.W. *1942

6/89	Diagnose eines Plasmozytoms (IgG-Kappa) mit ausgedehnter Infiltration des Knochenmarks, Hypergammaglobulinämie, Viskositätssyndrom, multiple Raumforderungen in Schädel, Achsenskelett, Rippen, Beckenbereich, Oberschenkel beidseits.
6/89 - 12/89	Chemotherapie (5 Serien Melphalan/Prednisolon)
12/89 – 9/90	Chemotherapie (6 Serien nach LEE-Protokoll) - Remission
1/93	Chemotherapie (2 Serien Alkeran/Decortin)
3/93	Chemotherapie nach VAD-Schema wegen anhaltend hohem Gesamt-Eiweiss, erniedrigtem Hämoglobin und dissemi-nierten Osteolysen.
17.08.93	KMT (allogen) Tag 0
(+0 Tag)	Spender Bruder M. E. Virusserologie: HMTV-IgG ELISA positiv, HCMV-IgM ELISA negativ. Empfänger M.W. Virusserologie: HCMV-IgG ELISA positiv, HCMV-IgM ELISA negativ.
+14 Tage	Take nach KMT (Granulozyten >500/ μ l).
+14 bis +43 Tage	PCR-HCMV-DNA immer negativ.
+44 bis +51 Tage	PCR-HCMV-DNA positiv.
+68 Tage	KBR-HCMV Titeranstieg von 1:10 auf 1:80 (+82 Tage nach KMT). ELISA HCMV-IgG positiv, -IgM negativ. Virusanzüchtung für HCMV: wiederholt unauffällig. 14 d Behandl. mit Ganciclovir i. v.
+90 Tage	PCR-HCMV-DNA negativ
+93 bis +98 Tage	Stationär wegen V. a. akute Darm-GvHD und Hickman-Katheder-Infektion.
+115 Tage	Entfernung des Hickman-Katheder wegen Katheder-Infektion.
+145 Tage	HCMV-Virämie (PCR) ohne klinische Erscheinungen
1994 - 96	Kontrolluntersuchungen ohne Auffälligkeiten

3. Material und Methoden

3.1. Material und Bezugsquellen

3.1.1. Geräteliste

Gerät	Gerätename	Herstellerfirma
Bestrahlungsquelle	Gammacell 1000	Atomic Energy, Canada
Brutschrank	NUAIRE US Autoflow	Zapf Instrumente, Sarstedt
Computer	Peacock	SLT, Crailsheim
Cytozentrifugen	Centra GP8R	IEC, Frankfurt
Cytozentrifugen	Rotixa/KS	Hettich, Tuttlingen
Drucker	Desk-Jet 500 C	Hewlett Packard
Sterilfiltrationseinheit	Minisart-N	Sartorius, Göttingen
-70°-Gefrierschrank	Forma Scientific	Labotect, Göttingen
Glasfilter	GF92	Schleicher & Schüll, Dassel
Horizontalwippe	WS5	E. Bühler, Tübingen
Membranfilter	ME27	Schleicher & Schüll, Dassel
Mikroskop	Diavert	Leitz, Bensheim
Mikroskop	LaborluxS	Leitz, Bensheim
Photometer	LS 500	Dr. Lange, Berlin
Photometer	Gene Quant II	Pharmacia, Freiburg
Pipetten	0,5-10µl, 10-100µl	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	200-1000µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettomat	Pipetus mit Ultipor	Bachofer, Reutlingen
Pipettomat	Disposable Filter	Bachofer, Reutlingen
Pipetus-Akku	Hofmann	Bender & Hobein, Rottenburg
Kryoröhrchen		Greiner, Nürtingen
Kulturplatten	Terasaki-Platten	Greiner, Nürtingen
Kulturplatten	96-Loch-Flachboden-Platte	Greiner, Nürtingen
Kulturplatten	96-Loch-Rundboden-Platte	Nunc, Roskilde, Dänemark
Kulturplatten	24-Loch-Kulturplatte	Greiner, Nürtingen
Printed Filtermat		AWallaceOy, Turku, Finnland
Software-Programm	Word Perfect 6.0	MicroSoft
Schweissgerät	LKB 1295-012 Heat Sealer	Pharmacia, Freiburg
Sterilbänke	Heraeus LaminAir HBB2448	Heraeus, Fellbach
Sterilbänke	BioGARD Hood	Baker, Göttingen
Stickstoff-Tanks	Chronos Messer	Griesheim, Siegen
Ultraschallgerät	Brenson SonifierW-250	Heinemann, Schwäb.Gmünd
UV-Belichtungskammer	Fluo Link	Biometra, Göttingen
Wärmeschrank	Hybridization Oven	Amersham, Braunschweig
Wasserbad	GFL	Bender & Hobein, Rottenburg

Zell-Erntegerät	LKB 1295-001 cell harvester	Pharmacia, Freiburg
Zentrifuge	Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen		Falcon, Heidelberg

3.1.2. Verbrauchsmittel

Die Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer, BRL, Gibco, Merck, Pharmacia, Fluka, Fresenius, Roth, Serva und Sigma verwendet. Im Allgemeinen wurden sie über die Universitäts-Apotheke Tübingen bezogen.

Fetales Kälberserum (FCS)	Seratech	Griesbach im Rottal
Gentamycin/Refobacin80	Merck	Darmstadt
Hepes Buffer 25mM	Gibco	Eggenstein
Humanserum inaktiviert (gepoolt, CMV-negativ)	Transfusionsmedizin	Pforzheim
IL-2	Biotest	Dreieich
MEM	GibcoBRL	Eggenstein
Penicillin/Streptomycin (10000 Units/10000 µg/ml)	Biochrom	Berlin
Phytohämagglutinin	GibcoBRL	Eggenstein
RPMI 1640 L-Glutamine	GibcoBRL	Eggenstein
RPMI 1640 mit Glutamax	GibcoBRL	Eggenstein
Trypanblau	Biochrom	Berlin
	Sigma	München
FicoLiteH	Linaris	Bettingen
Hanks	PAA	Linz, Austria
Dimethylsulfoxid	Serva	München
L-Glutamine	GibcoBRL	Eggenstein

Thymidin-Desoxyribose Amersham-Buchler Braunschweig
(³H)-TdR (185 Gbq/mmol)

Szintillationsflüssigkeit LKB Beta Plate Scint Pharmacia, Freiburg

Materialien für die FACS-Analyse

Die T-Zellklone wurden mit folgenden monoklonalen Antikörpern (MAK) in der FACS-Analyse untersucht:

Antikörper:

Bezeichnung	Spezifität
OKT3	α/β TCR positive T-Zellen
TT1	CD4 ⁺ Zellen
TT2	CD8 ⁺ Zellen
W6/32.HL	Gemeinsame Determinante der HLA-A,B,C Antigene
W6/32.HK	Inaktive Variante von W6/32.HL

Fluorescein konjugierte Affini-Pure F(ab)₂

Fragmente Ziege anti-Maus IgG und IgM Fa. Dianova, Hamburg.

Puffer und Lösungen:

Intraglobin/PolyglobinN (1:5-Verdünnung Troponwerke, Köln.
mit Waschpuffer)

Waschpuffer bestehend aus:

HANK's balanced Salt Solution 500 ml	PAA, Österreich
Natriumazid 325 mg	Serva, Heidelberg
Bovines Serum Albumin 500 mg	Serva, Heidelberg

Materialien für die Proteinquantifizierung:

Bovine Serum Albumin (BSA)	Pierce, Illinois, USA
Micro Reagent A, B, C	Pierce, Illinois, USA

3.1.3. Verwendete Proteine und Peptide

Die T-Zellklone wurden auf ihre Spezifität für HCMV-Proteine hin getestet. Dies geschah mittels sieben rekombinanter Proteine: gB, gH, IE1, IE2, pp65, p52, pp150 mit Fusionsproteinen/Teilstücken des gH (AD169) Proteins (pAP86, pNH86, pPN86, pSN86) sowie überlappenden Peptiden (gH14 – gH23) entsprechend der spezifischen Aminosäuresequenz von gH (AD169) zwischen AS-Position 264 und 372.

Die rekombinanten Proteine und deren Fusionsproteine pAP86, pPN86, pSN86 sowie pNH86 wurden von Herrn Prof. M. Mach, (Institut für Klinische und Molekulare Virologie, Erlangen-Nürnberg), Herrn Dr. R. Vornhagen (Fa. Biotest), Herr Dr. W. Lindenmaier (Braunschweig) und Frau Dr. rer. nat. Krause (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, GBF) zur Verfügung gestellt. Die Peptide gH14 - 23 synthetisierte Herr Dr. H. Kalbacher (Physiologische Chemie, Tübingen). Das Gesamt-HCMV-Antigen stellte Frau Dr. rer. nat. H. Krause, Medizinische Klinik II, Sektion für Transplantations-Immunologie und Immunhämatologie, Tübingen nach einer Methode von Waner et al. (1977) aus lysierten infizierten Vorhaut-Fibroblasten (Human foreskin fibroblasts, HFF) und deren ultrazentrifugiertem Überstand her [117].

Antigen und Negativkontrolle

	Konzentration:
HCMV-Gesamt Antigen (Isolat infizierter Fibroblasten)	1:200 verdünnt
Fibroblasten-Lysat Negativ-Kontrolle zu HCMV-Antigen)	1:200 verdünnt

Rekombinante Proteine von HCMV und Kontrollen

Baculovirus pp65	(rekombinant)	4 µg/ml
------------------	---------------	---------

Baculovirus gB	(rekombinant)	4 µg/ml
Baculovirus gH (AD169)	(rekombinant)	4 µg/ml
Baculovirus pp150	(rekombinant)	10 µg/ml
CMV IE1 gesamt	(rekombinant, aufgereinigt)	4 µg/ml
CMV IE2 gesamt	(rekombinant, aufgereinigt)	4 µg/ml
p52	(rekombinant, aufgereinigt)	10 µg/ml
pEXStu	(Negativ-Kontrolle p52)	10 µg/ml
Baculovirus-Lysat	(Negativ-Kontrolle zu pp65, gH, gB, pp150)	4 µg/ml

Rekombinante gH (AD169)-Fragmente und Kontrollen

pAP86 (aa 15 - 142)		1 µg/ml
pNH86 (aa 508 - 743)		1 µg/ml
pPN86 (aa 142 - 358)		1 µg/ml
pSN86 (aa 278 - 508)		1 µg/ml
βGalROS (Negativkontrolle zu pAP86, pNH86, pPN86, pSN86)		22,84 mg/ml

Überlappende synthetische Peptide aus dem Aminosäurebereich (AS) 264 – 372 von gH

gH14 (As 264 - 282)	QRDNFILRQTEKHELLVLV
gH15 (As 274 - 292)	EKHELLVLVKKAQLNRHSY
gH16 (As 284 - 302)	KAQLNRHSYKDSDFLDAA
gH17 (As 294 - 312)	KDSDFLDAALDFNYLDLSA
gH18 (As 304 - 322)	DFNYLDLSALLRNSFHRYA
gH19 (As 314 - 332)	LRNSFHRYAVDVLKSGRCQ
gH20 (As 324 - 342)	DVLKSGRCQMLDRRTVEMA
gH21 (As 334 - 352)	LDRRTVEMAFAYALALFAA
gH22 (As 344 - 362)	AYALALFAAARQEEAGTEI
gH23 (As 354 - 372)	RQEEAGTEISIPRALDRQA

Die Peptide wurden nach der von Kropshofer et al. (1992) beschriebenen Methode mit Hilfe eines automatischen Peptidsynthesizers (Zinsser Analytic) hergestellt, HPLC gereinigt und mit Hilfe eines Massenspektrometers auf Reinheit und Spezifität kontrolliert. Sie wurden in einer Endkonzentration von je 10 µg/ml pro Versuch eingesetzt [60].

3.1.4. Zellen und Zelllinien

Periphere mononukleäre Zellen (PBMC)

Die T-Zell-Klone wurden aus PBMC des HCMV-positiven Patienten M. W., am Tag 188 und 325 nach KMT sowie aus PBMC seines HLA-identischen, ebenfalls HCMV-positiven Brudes M. E. (Spender), gewonnen.

Spender M. E. und Empfänger M. W. hatten folgenden HLA-Klasse II Genotypen:

DRB1*1502/*1104x

DQB1*06011/*0301

DPB1*0201/*0401

Als antigenpräsentierende Zellen (APC bzw. Stimulatorzellen) wurden PBMC des Patienten selbst, seines Spenders oder einer HCMV-seronegativen, HLA-klassifizierten Person aus einem Panel gesunder Individuen der Sektion Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie der Medizinischen Klinik, Abteilung II, Tübingen verwendet.

EBV-transformierte B-Zelllinien:

TUBO: HLA-DRB1* 1104/1201, WS-Nr. 9045

E4181324: HLA-DRB1*1502, WS-Nr. 0911

Beide Zell-Linien stammten vom 10. Internationalen Histokompatibilitäts-Workshop. Sie wurden vor ihrem Einsatz für die T-Zellstimulation mit 40 Gray bestrahlt.

Des weiteren wurden gepoolte allogene PBMC von HCMV-seronegativen Personen eingesetzt.

Vor Verwendung als Stimulatorzellen wurden die PBMC's mit 30 Gray bestrahlt. Die Bestrahlung diente zur Verhinderung der Eigenproliferation.

Die für die Testung der HLA-Restriktion verwendeten APC gesunder Personen, wiesen folgende HLA-Klasse-II Phäno-/Genotypen auf:

Patient	1502/1104x	06011/0301
Spender	1502/1104x	06011/0301
1. Sch. S.	0403/1104x	0301 /0302
2. Sch. M.	0103/1201	0301 /0501
3. T. F.	0701/09012	02x /0303x
4. S. S.	1501/07x	0602/03032
5. D. S.	0701/03011	02x /01x
6. R. K	1501/11041	0301 /0602
7. Sch. W.	1401/0801	05031/0402
8. M. M.	0101/1601x	0501/ 0601x
9. K. C.	0404/1301	03032/0603
10. H. S.	0401x/11011	0302/ 0301
11. Schl. S.	0103/1201	0501/ 0301
12. K. B.	0701/0401	02x /0302
13. S. N.	0701/09012	0201/03032
14. H. R.	0401/x	0302/x
15. M. M.	1501/ 03011	0201/0602
16. W. E.	1302/0802x	0604/0402
17. W. S.	0701/0101	03032/0501
18. O. L.	1501/0403	0602/x
19. W. I.	1302/0408	0605x/ 0301
20. R. U.	0301x /0101	0201/0501
21. K. I.	0801x	0201/0402

Fettgedruckt sind die HLA-Allele der PBL-Spender (Panelliste), die mit denen des Patienten/Spenders übereinstimmen.

3.2. Herstellung von Lösungen und Medien

Herstellung von gepooltem Humanserum

HCMV-PCR-negative Humanseren wurden auf HCMV-Antikörper im Institut für Transfusionsmedizin in Pforzheim getestet. Die Chargen wurden zur Hitzeinaktivierung des Komplements für 30 Minuten bei 56°C inkubiert. Eine Überprüfung auf Zytotoxizität oder Mitogenität fand für jedes einzelne Serum in einer gemischten Lymphozytenkultur („mixed lymphocyte culture“) oder einem anderen T-zellulären Proliferationsassay statt. Zudem wurden noch Mykoplasmen-Tests durchgeführt. Alle Humanseren wurden über Glasfilter (0,8 µm Membranfilter) gereinigt und bei -20°C gelagert. Vor Gebrauch musste das gepoolte Serum noch einmal mit einer 0,45 µm Einmal-Sterilfiltrationseinheit (Minisart-N) filtriert werden.

IL-2

IL-2 wurde in Ampullen mit jeweils 1×10^5 Units/ml käuflich von der Fa. Biotest (Dreieich) erworben. Der Ampulleninhalt wurde aliquotiert und bei -70°C gelagert. Das kurzfristig benötigte IL-2 wurde bei +4°C aufbewahrt. Für T-Zellkulturen wurde IL-2 in der gelieferten Konzentration nochmals 1:10 mit Standard-Zellkulturmedium (RPMI 1640 mit 10 % Humanserum) verdünnt.

Phytohämagglutinin

Das T-Zell-Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) bestand aus einem gefriergetrockneten Rohextrakt der M-Form. Jede neue Charge wurde in einem Drei-Tage-T-Zellproliferations-Assay in verschiedenen Konzentrationen getestet. Üblicherweise führten 0,75 %- oder 1 %-ige Ansätze zur maximalen Proliferation von T-Zellkulturen. Das gefriergetrocknete PHA wurde gelöst und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Basismedium für die T-Zellkulturen

Das Basismedium für die T-Zellkultur, das für die primäre Sensibilisierung und Expansion von HCMV-spezifischen T-Zellen aus PBL benötigt wurde, setzte sich aus folgenden Substanzen zusammen: 20 % bzw. 10 % HCMV-negatives Humanserum, 2 % Penicillin/Streptomycin in RPMI 1640.

Isoliertes HCMV-Gesamtantigen

HCMV-Gesamt-Antigen wurde in einer Endverdünnung von 1:200 verwendet.

Kulturmedium für EBV-B-Zelllinien

Die Zelllinien wurden nach dem Auftauen in RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Glutamin kultiviert und expandiert.

Einfriermedium

Alle Zellen wurden in RPMI 1640 mit 10 % DMSO und 20 % FCS eingefroren.

3.3. Zellkulturmethoden

3.3.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus venösem Blut

Aus heparinisiertem Blut des Patienten wurden PBMC mittels einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Verdünntes, gerinnungsunfähig gemachtes Blut (Abbildung 1: links) wurde über Ficoll-Hypaque geschichtet und zentrifugiert. Dabei reicherten sich die mononukleären Zellen (Lymphozyten, einige Monozyten, Vorläuferzellen der dendritischen Zellen) an der Phasengrenze an, die Erythrozyten sowie die meisten polymorphkernigen Leukozyten oder Granulozyten wurden durch den Ficoll-Hypaque Gradienten hindurchzentrifugiert (Abbildung 1: rechts).

Die dort aufgenommenen PBMC wurden nach 3.3.3. eingefroren und bei -186°C im Stickstofftank gelagert.

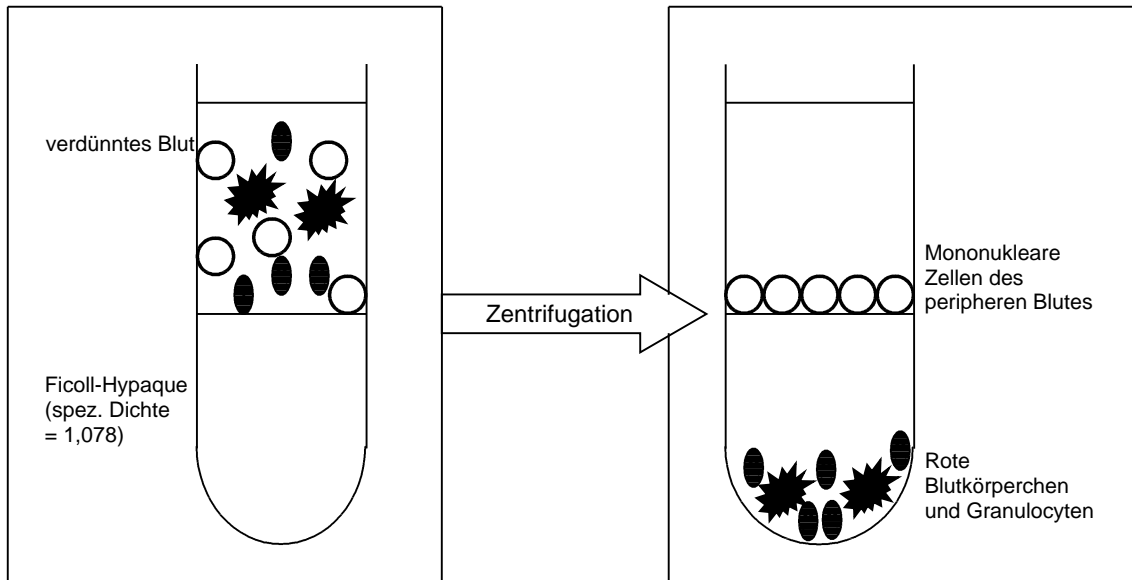


Abb. 1: Isolierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes aus dem Gesamtblut mittels Ficoll-Hypaque-Zentrifugation (modifiziert nach Janeway/Travers, „Immunologie“, 1995) [49]

3.3.2. Zellzählung

Zur Zellzahlbestimmung fand eine Zählkammer nach Neubauer Verwendung. Nach einer Mischung von 0,5 % Trypanblau mit der Zellsuspension im Verhältnis 1:1, wurde die Neubauer-Zählkammer mit einer Pipette befüllt und die Auszählung von zwei Grossquadraten der Zählkammer unter dem Mikroskop durchgeführt. Die Berechnung für die Gesamtzellzahl ergab sich aus:

$$\text{Gezählte Zellzahl} \times 10 \times \text{Volumen der Zellen in } \mu\text{l} = \text{Gesamtzellzahl}$$

3.3.3. Einfrieren der Zellen

Überschüssige Zellen, die für aktuelle Experimente keine Verwendung fanden, wurden erst einmal eingefroren, um sie für spätere Analysen als lebendes Zellmaterial noch zur Verfügung zu haben.

Eine Einstellung der Zellzahl auf $6 \times 10^6/\text{ml}$ erfolgte in möglichst kühlem Einfriermedium. Zu Beginn wurden die Zellen bei 1000 U/Min und 10°C für 10 Minuten zentrifugiert, daraufhin der Überstand verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium auf die entsprechende Zellkonzentration eingestellt. Die Zugabe von Einfriermedium erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurde die Zellen in 40 % FCS/RPMI 1640 bis zur Hälfte des Endvolumens aufgenommen, danach erfolgte eine stufenweise Zugabe von 20 % DMSO in RPMI 1640. Anschliessend wurde jeweils 1 ml Zellsuspension rasch in Kryoröhrchen überführt. Diese lagen dann für 24 Stunden bis maximal eine Woche in Styroporschachteln im -70°C Schrank. Danach erfolgte eine Überführung der Röhrchen in Stickstofftanks bei -186°C .

3.3.4. Auftauen der Zellen

Für weitere Versuche wurden die früher in Kryoröhrchen tiefgefrorenen Zellsuspensionen aus dem Stickstofftank genommen und zum Auftauen solange in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt, bis sich der gefrorene Zellklumpen gerade von der Wand des Kryoröhrchens löste. Die Zellsuspension kam nun in ein mit 1 ml RPMI 1640 vorgelegtes Zentrifugenröhrchen, das Kryoröhrchen wurde mit 1 ml RPMI nachgespült, RPMI wieder aufgenommen und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen gefüllt. Anschließend erfolgte das komplette Auffüllen des Zentrifugenröhrchens mit RPMI. Es fand nun eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 UpM und 10°C statt. Der erhaltene Überstand wurde verworfen. Nach Resuspension des Zellpellets wurden die Zellen in 2 ml RPMI gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschliessend wurden die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe von Trypanblau auf ihre Vitalität geprüft und gezählt. Danach fand die Einstellung der gewünschten Konzentration der Zellen in entsprechenden Basiskulturmedien für T-Zellkulturen (3.2.) statt.

3.3.5. Primäre Sensibilisierung bzw. Restimulation von HCMV-spezifischen T-Zellen aus PBL

Zu Beginn der primären Sensibilisierung von HCMV-spezifischen T-Zellen fand nach Auftauen der Zellen (3.3.4.) ein Einstellen der T-Zellen in RPMI auf 1 Mio. Zellen/ml statt. Es erfolgte die Herstellung des Zellkulturmediums (3.2). Pro Well einer 24-Loch-Platte wurden je 1 ml Basismedium, HCMV-Gesamtantigen sowie 1 ml Zellsuspension (1×10^4 /ml) in RPMI 1640 benötigt. Die Zellen wurden für 10 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde auf Wachstum und Verunreinigung (z. B. Bakterien, Pilze) unter dem Mikroskop kontrolliert. Am sechsten Kultivierungstag wurde in jedes Well 20 U/ml IL-2 zugegeben. Am 10. Tag erfolgte die T-Zell-Klonierung nach der „Limiting dilution“-Technik. Überschüssige, in Kultur gewachsene Zellen, die nicht aktuell Verwendung fanden, wurden für spätere Versuche nach bekanntem Vorgehen (3.3.3.) eingefroren.

3.3.6. Klonierung von T-Zellen mit Hilfe der „Limiting Dilution“- Technik

Die T-Zell-Klonierung von HCMV sensibilisierten bzw. restimulierten T-Zellen des Patienten M. W. und seines Spenders erfolgte mit Hilfe der „Limiting dilution“-Technik. Folgende Standard-Verdünnungen wurden benötigt:

$$4,5 \times 10^4 \text{ Z/ml} = 450 \text{ Zellen/10 } \mu\text{l}$$

$$4,5 \times 10^3 \text{ Z/ml} = 45 \text{ Zellen/10 } \mu\text{l}$$

$$4,5 \times 10^2 \text{ Z/ml} = 4,5 \text{ Zellen/10 } \mu\text{l}$$

$$4,5 \times 10^1 \text{ Z/ml} = 0,45 \text{ Zellen/10 } \mu\text{l}$$

Zuerst erfolgte die Herstellung der benötigten Medien (3.2.). Dazu fand ein Befüllen der Röhren mit RPMI 1640 und 10 %igem Humanserum statt. Für eine Klonierung wurden insgesamt 20 ml benötigt (18 ml RPMI und 2 ml filtrierte Humanserum). Die T-Zellen, die zehn Tage in Kultur gehalten und gezogen waren, kamen zur Zellzählung (mittels einer 1000µl Pipette mit gestopfter Pipettenspitze) in ein kleines Röhren. Zur Bestimmung der Anzahl der Zellen wurden davon 20 µl Zellsuspension entnommen, mit 20 µl 0,5 % Trypanblau gemischt und in eine Neubauerzählkammer gegeben. Daraufhin

erfolgte eine Auszählung der vitalen T-Zellen mit anschliessend primärer Einstellung auf $4,5 \times 10^4$ Z/ml. Folgende Verdünnungen wurden benötigt:

Röhrchen 1: $4,5 \times 10^4$ Z/ml in einem Ansatz von 2 ml, Röhrchen 2 (Verdünnung 1): $4,5 \times 10^3$ Z/ml (= 45 Z/10 μ l) in einem Ansatz von 2 ml, dazu wurden 1800 μ l RPMI 1640/10% Humanserum und 200 μ l Zellsuspension aus Röhrchen 1 gemischt. Röhrchen 3 (Verdünnung 2): $4,5 \times 10^2$ Z/ml (= 4,5 Z/10 μ l) in einem Ansatz von 2 ml, dazu wurden 1800 μ l RPMI 1640/10% HS und 200 μ l Zellsuspension aus Röhrchen 2 gemischt. Röhrchen 4 (Verdünnung 3): $4,5 \times 10^1$ Z/ml (= 0,45 Z/10 μ l) in einem Ansatz von 5 ml, dazu wurden 4500 μ l RPMI 1640/10% HS und 500 μ l Zellsuspension aus Röhrchen 3 gemischt. Die restlichen nicht benötigten Zellen wurden nach bekanntem Schema (3.3.3.) eingefroren.

Zur Sicherung, ob die Verdünnungsmethode korrekt durchgeführt worden war, wurde folgendes Verfahren angewendet: von der Verdünnung 3 (Röhrchen 4) wurden 50 Wells einer Terasaki-Platte mit jeweils 10 μ l beimpft und für eine Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Die hergestellten Zellsuspensionsverdünnungen mussten währenddessen bei ca. +4°C im Kühlschrank gelagert werden. Nach der einstündigen Inkubation fand mit Hilfe des Mikroskops eine Durchmusterung der einzelnen Wells der Terasaki-Platte nach T-Zellen statt. Ziel war es einzelne T-Lymphozyten in 30-37 % der Wells vorzufinden. Wurden bei der Durchmusterung prozentual mehr oder weniger Zellen gezählt, so mussten die einzelnen Verdünnungen nochmals hergestellt, eine neue Terasaki-Platte wiederum beimpft und nach T-Lymphozyten mikroskopiert werden, bis das oben genannte Ziel erreicht wurde.

Erst danach fand eine Beimpfung jeweils einer Terasaki-Platte mit je 10 μ l Zellsuspension der ersten beiden Verdünnungen, des weiteren von fünf Terasaki-Platten mit je 10 μ l Zellsuspension der dritten Verdünnung statt. Dann erfolgte noch eine Zugabe von 1×10^4 bestrahlten Stimulatorzellen/well in 10 μ l RPMI-Medium mit 10 % Humanserum, 2 % Penicillin/Streptomycin, 40 U/ml IL-2 sowie 1:200 verdünntem HCMV-Antigen in jedem Versuchsansatz. Stimulatorzellen waren autologe PBL, die nach Auftauen (3.3.4.) und Aufnahme in Medium (3.2.) auf 1×10^6 Zellen/ml Medium eingestellt worden waren. Die Terasaki-Platten wurden für 10 Tage bei 37°C und 5 % CO₂ in Aluminiumfolie eingeschlagen und im Brutschrank aufbewahrt. Nach diesen 10

Kultivierungstagen erfolgte eine genaue mikroskopische Durchmusterung der Terasaki-Platten nach proliferierenden T-Zell-Klonen. Bei ausreichender Proliferation, die mikroskopisch durch einen dichten Zellrasen zu erkennen war, wurden die Klone in eine 96-Well-Platte transferiert. Dort fand pro Well eine Zugabe von insgesamt 200 μl mit 1×10^5 bestrahlten Stimulator-/Poolzellen, 10 % Humanserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 20 U/ml Interleukin-2, 0,2 % PHA, HCMV-Gesamtantigen in einer Endverdünnung von 1:200 sowie RPMI 1640 statt. Eine weitere Kultivierung fand wie schon vorher im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ statt. Nach Umsetzen der Zellen in die 96-Well-Platte erfolgte alle drei bis vier Tage eine mikroskopische Durchmusterung jedes Wells sowie eine Erneuerung des Mediums. Dabei wurde das über den Zellen befindliche, alte Medium zur Hälfte vorsichtig abpipettiert und durch RPMI 1640 mit 20 U/ml IL-2, 10 % Humanserum und 1 % Penicillin/Streptomycin ersetzt. HCMV-Gesamtantigen und PHA befanden sich dabei nicht in dem erneuerten Medium. Einmal wöchentlich wurden die T-Zellklone mit 1×10^5 Stimulatorzellen/Well in RPMI-Medium mit 10 % Humanserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 20 U/ml IL-2, 0,2 % PHA und HCMV-Gesamtantigen (Endverdünnung 1:200) restimuliert. Zeigte sich bei den mikroskopischen Kontrollen ein mit Zellen vollbewachsenes Well in der 96-Loch-Platte, so kam es zur Überführung dieser Zellen in das Well einer 24-Loch-Platte. In der 24-Loch-Platte befand sich pro Well ein Endvolumen von 2 ml Medium, so dass hier pro Loch 2×10^5 Stimulatorzellen benötigt wurden. Eine Kultivierung der Klone fand so lange statt, bis mindestens vier Löcher einer 24-Loch-Platte voll bewachsen waren. Eine weitere Kultivierung konnte bis um Tag 60 nach Beginn der Klonierung meistens ohne Bedenken durchgeführt werden. Weitere Expansion der T-Zellklone bedeutete, dass für die meisten T-Zellen Alterungsprozesse in den weiteren Teilungen nicht auszuschliessen waren. Die so gezogenen T-Zellklone wurden mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in Kryoröhrchen zwischen Tag 43 und 58 eingefroren (3.3.3.) und im Stickstofftank bei -186 °C aufbewahrt.

Die Klonalität wurde von Frau Dr. med. M. Feurle in ihrer Promotionsarbeit mit Hilfe der T-Zellrezeptoranalyse bei 18 Patienten- und 6 Spender-Klonen überprüft [34].

3.3.7. Herstellung von Stimulatorzellen

Als Stimulatorzellen kamen autologe PBL zur Verwendung. Diese wurden aufgetaut (3.3.4.) und in Kulturmedium aufgenommen und auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Das Kulturmedium setzte sich aus 10 % Humanserum, 1 % Penicillin/Streptomycin, 40 Units/ml IL-2 sowie HCMV-Gesamtantigen (HK116/3) in einer Endverdünnung von 1:200 und RPMI 1640 zusammen.

3.3.8. Kultivierung von EBV-transformierten B-Zell-Linien

Die EBV-transformierten B-Zelllinien TUBO (HLA-DRB1*1104/1201 heterozygot) und E4181324 (HLA-DRB1*1502 homozygot) wurden in ein Zellkulturmedium, bestehend aus 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und RPMI 1640 mit Glutamax kultiviert und nach Bestrahlung als Feederzellen zur T-Zellklon-Vermehrung eingesetzt.

3.3.9. Proliferationsassays

Zur Überprüfung der Spezifität und Funktion der gezogenen T-Zell-Klone wurden Proliferationstests durchgeführt. Die T-Zellklone oder T-Zelllinien wurden zu Beginn eines jeden Versuches nach oben genanntem Verfahren aufgetaut (3.3.4.) und gezählt (3.3.2). Pro Testansatz wurden jeweils 1×10^4 Zellen des T-Zell-Klons/Well in einer 96-Well-Rundbodenplatte, je 5×10^4 bestrahlte antigenpräsentierende Zellen (APC)/Well sowie HCMV-Gesamtantigen in einer Endverdünnung von 1:200 verwendet. Als Kontrollen dienten oben genannte Zellen ohne HCMV-Gesamtantigen jedoch entweder mit Fibroblasten-Lysat (Kontrolle zu HCMV-Gesamtantigen) oder jeweils mit einem der anderen sieben hier eingesetzten rekombinanten HCMV-Proteine (3.1.3.) sowie deren Negativkontrollen. Die Proliferationsassays wurden jeweils in Triplikaten ausgeführt.

Für jeden T-Zellklon wurden Zeitkinetiken mit Inkubationszeiten für 24, 48 und 72 Stunden vor Zugabe von 37 KBq [^3H]-Thymidin durchgeführt. Die mit Zellen beimpften 96-Loch-Rundbodenplatten wurden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und anschliessend mit 37 KBq [^3H]-Thymidin pro Loch unter den gleichen Bedingungen für

weitere 16 Stunden inkubiert. In den meisten Fällen wurden nach 48 Stunden Inkubationszeit die höchsten Proliferationsraten erhalten. Weitere Versuche fanden nur noch mit den für die optimale Proliferation bestimmten Inkubationszeiten statt. Für die Beurteilung der Zellproliferation wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellerntegerätes auf Glasfiberfilter aufgebracht. Die Filter wurden für mindestens drei Stunden luftgetrocknet, um eine gleichmässige Aufnahme der Szintillationsflüssigkeit zu gewährleisten. Nach Tränken in Szintillationsflüssigkeit wurden die Filter eingeschweißt. Die T-Zellproliferation wurde über den [³H]-Thymidineinbau im Beta-Counter in Counts per Minute (cpm) gemessen. Die Ergebnisse wurden als Median- und Mittelwerte der in den jeweiligen Triplettansätzen gemessenen Counts per Minute angegeben.

3.3.10. HCMV-spezifischer Proliferationsassay mit PBL

Der HCMV-spezifische Proliferationsassay wurde in 96-Loch Rundbodenplatten in Triplikaten durchgeführt. Die dafür benötigten PBL wurden aufgetaut (3.3.4.) und gezählt (3.3.2.). Es erfolgte eine Einstellung aller PBL mit RPMI auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml. Für die HCMV-Stimulation wurde aus infizierten Fibroblasten isoliertes HCMV-Antigen (3.2.) in einer Endverdünnung von 1:200 eingesetzt. Zur Kontrolle dienten Inkubationen mit Medium, mit Proteinen aus nicht-infizierten Fibroblasten (Negativkontrollen zur Stimulation mit HCMV-Antigen), IL-2 (50U/ml) und/oder PHA (0,75 % oder 1 % je nach Charge) als positive Kontrollen. Pro Testwell wurden 1×10^5 Zellen eingesetzt.

Nach drei Tagen im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂) wurde der [³H]-Thymidin-Einbau (37 MBq in 20 ml RPMI) gemessen (3.3.9.). Ausgewertet wurden die Triplikate als Stimulationsindex, der sich folgendermaßen errechnet:

$$\frac{\text{Mittelwert der Response der HCMV-stimulierten PBL [cpm]} - \text{Mittelwert der Response auf Medium}}{\text{Mittelwert der Response der durch Fibroblasten-Proteine stimulierten PBL [cpm]} - \text{Mittelwert der Response auf Medium}} = \text{Stimulationsindex}$$

Ähnlich erfolgte auch die Berechnung der Stimulationsindices für die positiven Kontrolltestungen mit PHA und IL-2. Als Negativkontrolle diente in jedem Fall die Stimulation mit dem Fibroblastenlysat sowie dem Kulturmedium.

3.3.11. FACS-Analyse

FACS-Gerät

Die Durchflußzytometrie mit dem FACS-Scan® (Fluorescence-Activated-Cell-Sorter) stellt eine Methode zur Oberflächenantigen-Analyse oder Bestimmung von intrazellulärem Antigen dar, bei der Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften der Zellen nach spezieller Markierung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern erfasst werden. Durch gleichzeitige Bestimmung von relativer Zellgröße und Granularität können einzelne Zellpopulationen differenziert und hinsichtlich der über Antikörper gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe qualitativ und quantitativ beurteilt werden. Zur immunphänotypischen Charakterisierung von T-Zell-Klonen am FACS wurden murine monoklonale Antikörper (MAK) gegen verschiedene T-Zell-Antigene verwendet. Zuerst fand eine Inkubation der T-Zellen mit dem spezifischen MAK gegen T-Zell-Antigen statt. Die Bindung wurde danach durch Zugabe von Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) markierten Ziege-anti-Maus F(ab)₂ Ig-Fragmenten detektiert. Die so markierten Proben wurden mit dem FACS gemessen, die Darstellung der Messergebnisse erfolgte in Histogrammen.

Immunfluoreszenzmarkierung von PBL und T-Zell-Klonen zur FACS-Messung

Die Zellen wurden nach dem Auftauen zunächst in Waschpuffer aufgenommen, gezählt und dann 10 Minuten bei 1000 Upm und 10°C zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes und Resuspension von pro 5×10^5 Zellen wurde mit je 20 µl Intraglobin (Polyglobin N 1:5) auf Eis inkubiert. Hiermit sollte durch Blockade von Fc-Rezeptoren ein unspezifisches Binden der spezifischen Antikörper auf der Zelloberfläche verhindert werden. Anschließend erfolgte eine Aufnahme der Zellen in 10 ml Waschpuffer und eine nochmalige Zentrifugation der Zellsuspension für zehn Minuten bei 1000 Upm und

4°C. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Waschpuffer resuspendiert und auf fünf Löcher einer 96-Loch-Rundbodenplatte in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/Loch verteilt. Zur Zellsuspension in jedem Loch der 96-Well Mikrotiterplatte wurden jeweils 20 µl des zu testenden spezifischen monoklonalen Antikörpers (MAK) pipettiert, die Platte kurz gerüttelt, dann mit Aluminiumfolie abgedeckt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum ein Waschschriff mit Auffüllen jeden Lochs mit 200 µl Waschpuffer und eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 800 Upm und 4°C.

Die Entfernung des Überstandes wurde durch schnelles Umkippen der 96-Loch-Rundbodenplatte erreicht. Danach erfolgte eine Resuspension der Zellen durch erneutes Rütteln der Platte und die Zugabe des 2. Antikörper und zwar je 20 µl des Ziege-anti-Maus-Ig FITC-konjugierten Antikörpers (1:20 mit Waschpuffer verdünnt). Im nächsten Schritt fand eine Inkubation der Platte für weitere 15 Minuten auf Eis unter Lichtschutz statt. Danach erfolgte das erneute Auffüllen der Löcher mit je 200 µl Waschpuffer sowie eine Zentrifugation für zwei Minuten bei 800 Upm und 10°C. Es fand ein nochmaliges Abkippen des Überstandes und wiederum eine Zugabe von 200 µl Waschpuffer statt. Nach Resuspension und Aufnahme mit einer Pipette wurde die Zellsuspension zur Entfernung von eventuell vorhandenen Zellklumpen durch ein Metallnetz in die vorbereiteten und beschrifteten FACS-Röhrchen pipettiert. Die so behandelten Proben wurden mit dem FACScan (Becton Dickinson) gemessen und über ein FACS-spezifisches Computerprogramm ausgewertet.

3.4. Immunchemische Methoden

3.4.1. Proteinquantifizierung mit Micro BCA Assay

Für weitere Versuche wurde nochmals rekombinantes Glykoprotein gH benötigt, welches freundlicherweise das Institut für Klinische und Molekulare Virologie der Universität Erlangen-Nürnberg, Prof. M. Mach, zur Verfügung stellte. Bevor weitere Versuchsansätze mit definierten Mengen an Glykoprotein gH stattfanden, musste eine

Proteinquantifizierung mit dem Micro BCA (Bicinchoninic Acid) Assay (Pierce, Illinois, USA) durchgeführt.

Es wurden 6 Standardlösungen von BSA (Bovine Serum Albumin) hergestellt: 20, 10, 5, 4, 2 und 1 µg/ml (je 1 ml) und drei Verdünnungen der zu vermessenden Proben (1:200, 1:100 und 1:50). Daneben standen noch ein Leerwert, bestehend aus Aqua dest. und frisch zusammengemischtem Working Reagenz (Gemisch aus je 48 Teilen Micro Reagent B (MB), je zwei Teilen Micro Reagent C (MC) und 50 Teilen des Micro Reagent A) zur Verfügung. Es wurden jeweils 500 µl der Standard- und Probenlösungen mit 500 µl Working Reagenz versetzt und 60 Minuten im Wasserbad bei einer Temperatur von 60°C inkubiert. Danach fand eine Abkühlung aller Röhrchen auf Raumtemperatur und eine Vermessung im Photometer bei OD₅₆₂ statt. Aus den gemessenen Werten wurde eine Standardkurve erstellt und somit die Proteinkonzentration von Glykoprotein gH bestimmt.

4. Ergebnisse

4.1. Etablierung HCMV-spezifischer T-Zellklone und T-Zelllinien

4.1.1. Etablierung von HCMV-spezifischen T-Zelllinien aus PBL des KMT-Empfängers und -Spenders

Um HCMV-spezifische T-Zellen im Blut des KMT-Empfängers und Spenders untersuchen zu können, wurde versucht, HCMV-spezifische T-Zellen in vitro mit isoliertem HCMV-Gesamtantigen zu restimulieren und eine Expansion dieser T-Zellen als Zelllinie zu erreichen. HCMV-reaktive T-Zellen wurden dazu über zehn Tage wie unter 3.3.5. beschrieben kultiviert mit HCMV-Gesamtantigen am Tag 0 sowie mit 20 U/ml IL-2 am Tag 6 einmalig stimuliert. Nach 10 Tagen Priming wurde die Reaktivität der PBL's gegen HCMV im Proliferationsassay auf Grund von ³H-Thymidineinbau (3.3.10) gemessen. Tabelle 1 zeigt die verwendeten sensibilisierten T-Zellchargen (PBL) des KMT-Empfängers M. W., die später zur T-Zell-Klonierung verwendet wurden. (Die Bezeichnungen wurden über ein spezielles Probenaufnahme EDV-Programm der Med. Klinik Tübingen, Abt. II, GvH-Data vergeben. BZ bedeutet Blutzellen, BL sind Blutlymphozyten).

Der Stimulationsindex SI war der Quotient aus proliferativer T-Zellantwort nach Aktivierung mit HCMV-Gesamtantigen und proliferativer T-Zellantwort nach Aktivierung mit Fibroblastenkontrollantigenen.

Tabelle 1: Verwendete T-Zellen des KMT-Empfängers M. W.

Nr./Bezeichnung der T-Zellen	Alter des Klons	Stimulationsindex (SI)
81894 BZ1	188 Tage nach KMT	4,0
86638 BL1	325 Tage nach KMT	28,5

Die T-Zellen stammten aus dem Blut des KMT-Empfänger M. W. vom Tag 188 und 325 nach Knochenmarktransplantation. Nach 10-tägiger Kultivierung zeigten PBL des Patienten vom Tag 188 nach KMT eine proliferative T-Zellantwort gegen HCMV-Gesamtantigen mit einem Stimulationsindex von SI 4,0. Der SI der proliferativen T-Zellantwort gegen HCMV-Gesamtantigen in Blutlymphozyten vom Tag 325 nach KMT betrug 28,5.

4.1.2. Etablierung HCMV spezifischer T-Zellklone des KMT-Empfängers

Die mit HCMV-Gesamtantigen restimulierbaren T-Zellen im Blut des Patienten sollten mit Hilfe der Grenzwertverdünnung (Limiting dilution) kloniert und zur Expansion gebracht werden, um sie in ihrer Spezifität einzeln analysieren zu können. Dabei fand ein Verfahren, das in der Arbeitsgruppe von Prof. G. Pawelec von Frau Dr. H. Friccius, Med. Klinik Tübingen, Sektion Transplantationsimmunologie, Abt. II, eingesetzt wurde, Verwendung. Vom KMT Spender lagen schon T-Zellklone vor, die von Frau Dr. rer. nat. H. Krause (Med. Klinik Tübingen, Abt. II) durch die Limiting-Dilution-Technik generiert worden waren.

Aus den etablierten HCMV-spezifischen T-Zelllinien, die aus Blutlymphozyten des KMT-Empfängers M. W. von Tag 188 beziehungsweise Tag 325 nach KMT etabliert worden waren, wurden mit Hilfe der Limiting Dilution Technik T-Zellen kloniert. Bei der nach den Protokollen von Prof. G. Pawelec durchgeführten Klonierung (3.3.6.) wurden 20 T-Zell-Klone/-Linie aus PBL von Tag +188 nach KMT gezogen, eine T-Zellkultur (Nr. 2.1) aus dem Limiting Dilution Ansatz mit $4,5 \times 10^2$ Zellen/ml (= 4,5 Zellen/well) und 19 T-Zellkulturen (Nr. 1.1 - 1.19) aus dem Limiting Dilution Ansatz mit $4,5 \times 10^3$ Zellen/ml. Aus PBL vom Tag +325 nach KMT konnten 73 T-Zell-Klone/-Linien gezogen werden und zwar 14 T-Zellkulturen (4.1 - 4.14) aus dem Limiting Dilution Ansatz mit $4,5 \times 10^1$ Zellen/ml und 59 T-Zellkulturen (3.0 - 3.59) nach Einstellung auf $4,5 \times 10^2$ Zellen/ml. Zur Erfassung von Daten und Verwaltung der Proben, wurden diese mit fünfstelligen Nummern, über das oben genannte GvH-Data Programm, versehen (Die Endbuchstaben BK bedeuten Blut- und T-Zellklon, BN stand

für Blut- und T-Zelllinie). Die Proben, die nicht sofort Verwendung für Tests fanden, wurden eingefroren (3.3.3.).

Von den insgesamt gezogenen 93 T-Zell-Klonen/-Linien wurden 43 für weiterführende Versuche verwendet, da nur von diesen eine ausreichende Anzahl an Zellen für nachfolgende Testungen zur Verfügung standen. Zehn der 43 T-Zell-Kulturen stammten vom Tag 188, 33 vom Tag 325 nach KMT.

4.2. Charakterisierung der HCMV-Antigenspezifität der etablierten T-Zell-Klone/-Linien

Bei den Proliferationsassays (3.3.9.) proliferierten 42 der 43 getesteten T-Zellklone spezifisch auf Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen. Nur eine T-Zellkultur (1.16, 188 Tage nach KMT) zeigte keine Proliferation auf Stimulation mit HCMV-Antigen. Tabelle 2 zeigt die 43 verwendeten Klone des KMT-Empfängers und deren Reaktivität mit HCMV-Gesamtantigen in Counts pro Minute (cpm). HFF als Proteinextrakt aus nicht infizierten Fibroblasten wurde als Negativkontrolle zu HCMV-Antigen getestet. Als HCMV-spezifische Reaktion wurde ein SI von ≥ 3 gewertet.

Die Wahrscheinlichkeit der Klonalität der Zellen nach Limiting Dilution war am grössten, wenn die T-Zellen aus der höchsten Verdünnungsstufe der unklonierten T-Zellpopulation stammten. Da jedoch auch T-Zellkulturen mit einer Verdünnung von $4,5 \times 10^2$ und $4,5 \times 10^3$ Zellen/ml angesetzt und für Testungen eingesetzt wurden, bestand die Möglichkeit einer Generierung von Klongemischen.

Die Klonalität von 18 der erhaltenen und für weitere Versuche bestimmten T-Zell-Kulturen wurden von Frau Dr. med. M. U. Feurle in ihrer Promotionsarbeit mit Hilfe der T-Zellrezeptoranalyse überprüft. Dort liessen sich neben Klongemischen eindeutig auch T-Zellklone feststellen. Tabelle 3 wurde der Promotionsarbeit von M. U. Feurle entnommen und zeigt einen Ausschnitt der Ergebnisse der T-Zell-Rezeptoranalyse [34].

Tabelle 2: Ergebnisse der Proliferationstestungen von T-Zellklonen des Empfängers M. W. aus Blutabnahmen von Tag 188 (1.3 - 1.17) bzw. Tag 325 (3.4 - 4.13) nach KMT auf Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen bzw. Protein aus nicht-infizierten Fibroblasten (HFF als Negativ-Kontrolle) und autologe PBL als Stimulatorzellen

Bezeichnung des T-Zell- Klons/ d. – Linie (BK)	HCMV Gesamtantigen [cpm]	HFF [cpm] Negativkontrolle	Stimulationsindex SI	Alter des Klons in Kultur
1.3 Tag 188	3470	624	5,6	43 Tage
1.4 Tag 188	4153	669	6,2	43 Tage
1.5 Tag 188	4007	733	5,5	43 Tage
1.7 Tag 188	3551	585	6,1	43 Tage
1.8 Tag 188	2125	578	3,7	43 Tage
1.10 Tag 188	4229	617	6,9	43 Tage
1.13 Tag 188	1316	674	2,0	43 Tage
1.14 Tag 188	4567	712	6,4	43 Tage
1.16 Tag 188	743	593	1,6	43 Tage
1.17 Tag 188	3247	527	6,2	43 Tage
3.4 Tag 325	4853	449	10,8	42 Tage
3.5 Tag 325	9691	510	19,0	42 Tage
3.7 Tag 325	8561	422	20,3	42 Tage
3.9 Tag 325	5913	378	15,6	42 Tage
3.10 Tag 325	6225	350	17,8	42 Tage
3.11 Tag 325	10541	420	25,1	42 Tage
3.13 Tag 325	3433	545	6,3	42 Tage
3.15 Tag 325	4349	413	10,5	42 Tage
3.16 Tag 325	2660	571	4,7	42 Tage
3.18 Tag 325	4316	570	7,6	42 Tage
3.23 Tag 325	3296	441	7,7	42 Tage
3.26 Tag 325	3947	478	8,3	42 Tage
3.27 Tag 325	3151	677	4,7	42 Tage
3.28 Tag 325	1293	520	2,5	42 Tage
3.29 Tag 325	2750	477	5,8	42 Tage
3.33 Tag 325	2117	410	5,2	42 Tage
3.35 Tag 325	6451	582	11,1	42 Tage
3.36 Tag 325	18150	310	58,5	42 Tage
3.42 Tag 325	3224	311	10,4	42 Tage
3.45 Tag 325	5983	367	16,3	42 Tage
3.47 Tag 325	4790	384	12,5	43 Tage
3.48 Tag 325	9082	497	18,3	43 Tage
3.49 Tag 325	2673	702	3,8	43 Tage
3.53 Tag 325	6354	750	8,5	43 Tage
3.54 Tag 325	4868	551	8,8	43 Tage
3.56 Tag 325	3758	574	6,5	43 Tage
3.58 Tag 325	5454	645	8,5	43 Tage
3.59 Tag 325	6580	582	11,3	43 Tage
4.3 Tag 325	4584	515	8,9	57 Tage
4.6 Tag 325	1496	409	3,7	57 Tage
4.8 Tag 325	1751	364	4,8	57 Tage
4.12 Tag 325	3986	430	9,3	57 Tage
4.13 Tag 325	2583	414	6,2	57 Tage

Tabelle 3: T-Zell-Rezeptoranalyse HCMV-spezifischer T-Zell-Klone/-Linien des KMT-Empfängers M. W. [34]

T-Zell-Klon/-Linie	α -Ketten	β -Ketten	Klonalität
1.3	AV22AJ28 AV5AJ24	BV13BJ2S3	Klon
1.5	AV8AJ33* AV10AJ24 AV8AJ53	BV13BJ2S3 BV2BJ1S2	Kein Klon
1.7	AV8AJ33 AV10AJ24 AV22AJ28	BV13BJ2S3 JBV2BJ2S2	Kein Klon
1.13	AV22AJ6	BV2BJ1S4	Klon
1.10	AV22AJ28	BV13BJ2S3	Klon
1.17	AV22AJ28	BV13BJ2S3	Klon
3.4	AV8AJ33* A3AJ44 AV6AJ27 AV21AJ30	BV13BJ2S3* BV2BJ1S2 BV8BJ2S3	Kein Klon
3.5	AV8AJ33*	BV13BJ2S3*	Kein Klon/2 α 2 β
3.9	AV8AJ33*	BV13BJ2S3*	Kein Klon/2 α 2 β
3.10	AV8AJ33*	BV13BJ2S3 BV2BJ2S3 BV13BJ1S4	Kein Klon
3.11	AV8AJ33 AV3AJ30	BV13BJ2S3 BV2BJ2S3	Kein Klon/2 α 2 β
3.28	AV8AJ33* AV3AJ40	BV13BJ2S3* BV2BJ1S2	Kein Klon
3.30	AV8AJ33 AV10AJ24	BV13BJ2S3	Klon
3.45		BV13BJ2S3*	
3.53		BV13BJ2S3 BV2BJ2S1	
3.58	AV8AJ33*	BV13BJ2S3* BV2BJ2S2	Kein Klon
3.59		BV13BJ2S3* BV2BJ2S1	
4.12	AV23AJ58 AV5AJ5	BV13BJ2S3 BV2BJ2S7	Kein Klon/2 α 2 β

*mehrere Amplifikate mit konservativen Basenaustauschen in der Verbindungsregion zwischen V- und J-Region.

Mittels der TCR-Rezeptoranalyse lässt sich durch Bestimmung der α - und/oder β -Ketten feststellen, ob ein Klon vorliegt. Als T-Zell-Klone konnten Nr. 1.3, 1.10, 1.13, 1.17 und 3.30 identifiziert werden. Bei den T-Zell-Kulturen 1.5, 1.7, 3.4, 3.10, 3.28 und 3.58 wurde nach dieser Analyse von Klونغemischen ausgegangen. Sehr wahrscheinlich handelt es sich bei 3.5, 3.9, 3.11 und 4.12 ebenfalls um Klونغemische. Bei den T-Zell-

Klonen/-Linien 3.45, 3.53 und 3.59 konnte keine Aussage über Klonalität gemacht werden.

Vom KMT-Spender M. E. wurden elf Klone (11/11) mit ausreichender Zellzahl für weitere Spezifizierungsversuche etabliert. Davon waren sieben Klone (63,6 %) HCMV-spezifisch (82512BK1, 82512BK2, 82512BK3, 82512BK5, 82554BK2, 82554BK5, 82268BN1). Vier Klone (36,3 %) erwiesen sich als nicht reaktiv gegenüber HCMV-Gesamtantigen (82512BK4, 82554BK1, 82554BK4, 82597BN4). Spendereigene T-Zellen standen zur Verwendung als Feeder- bzw. Stimulatorzellen nicht in ausreichenden Massen zur Verfügung. Deswegen wurden als Stimulatorzellen der T-Zellklone HLA-DRB1*1104 bzw. HLA-DRB1*1502-B-Zelllinien verwendet, die in einzelnen HLA-DR Allelen mit dem KMT-Spender bzw. -Empfänger übereinstimmten. Tabelle 4 zeigt die Reaktivität der T-Zellklone (Counts per Minute/cpm) auf Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen und Zugabe von HLA-DRB1*1104 oder -*1502 positiven Stimulatorzellen. HFF-Proteine dienten als Negativkontrolle zur Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen aus infizierten Fibroblasten. Ein $SI \geq 3$ wurde als HCMV-spezifische Reaktion gewertet, die in der Tabelle hervorgehoben ist.

Tabelle 4: Ergebnisse der Proliferationstestungen von T-Zell-Klonen/-Linien des KMT-Spenders M. E. nach Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen und allogenen Stimulatorzellen (TUBO: DRB1*1104, E4181324: DRB1*1502)

Bezeichnung des Klons der T-Zelllinie	HFF (Negativkontrolle) [cpm]	Stimulatorzellen HLA-DRB1*1104 + HCMV-Ag [cpm]	Stimulationsindex (SI) HLA-DRB1*1104	Stimulatorzellen HLA-DRB1*1502 + HCMV-Ag [cpm]	Stimulationsindex (SI) HLA-DRB1*1502
82512BK1	166	642	3,9	214	1,2
82512BK2	132	2658	20,1	443	3,4
82512BK3	157	1694	10,8	135	0,9
82512BK4	188	224	1,2	283	1,5
82512BK5	211	1008	4,8	123	0,6
82554BK1	548	604	1,1	175	0,3
82554BK2	134	1186	8,6	482	3,6
82554BK4	129	142	1,1	109	0,8
82554BK5	134	6012	44,9	144	1,1
82268BN1	896	6956	7,8	3113	3,5
82597BN4	140	298	2,1	171	1,2

4.2.1. Spezifizierung der HCMV-Antigenreaktivität der etablierten T-Zell-Klone/-Linien mit rekombinanten Proteinen von HCMV

Zur genaueren Antigen-Spezifizierung der T-Zell-Klone/-Linien des Patienten M. W. von Tag 188 und Tag 325 nach KMT und dessen Spender M. E. wurden weitere Testungen mit rekombinant hergestellten Proteinen von HCMV durchgeführt. Es fanden sieben verschiedene rekombinante Proteine von HCMV sowie deren Negativkontrollen Verwendung: gH, gB, pp65, pp150, IE1, IE2 und p52 (3.1.3.). Bei den ersten Versuchen wurden als antigen-präsentierende Zellen bestrahlte, autologe mononukleäre Zellen eingesetzt. Für weitere Spezifizierungsversuche fanden später auch bestrahlte EBV-transformierte B-Zelllinien (TUBO, E4181324) oder mononukleäre Zellen Verwendung, die im HLA-Phänotyp, insbesondere HLA-Klasse II Antigenen, zu den Antigenen des Patienten bzw. des Spenders gematched waren. Zehn der 43 HCMV-spezifischen T-Zell-Klone/-Linien des Patienten stammten vom Tag 188 nach KMT, 33 wurden aus PBL vom Tag 325 nach KMT expandiert. 53,5 % (23/43) zeigten eine Erkennung von Glykoprotein gH. Drei T-Zell-Klone/-Linien (6,9 %) stammten von Tag 188 nach KMT (Nr. 1.5, 1.7, 1.14), 20 (48,8 %) von Tag 325 nach KMT (3.5, 3.9, 3.10, 3.15, 3.18, 3.23, 3.27, 3.29, 3.36, 3.45, 3.48, 3.49, 3.53, 3.54, 3.56, 3.58, 3.59, 4.3, 4.8, 4.13). Desweiteren zeigten bei der Testung 9,3 % (4/43) der T-Zell-Klone/-Linien eine Spezifität für das Glykoprotein gB. Drei davon, nämlich Nr. 1.3, 1.10 und 1.17 stammten aus PBL früh nach KMT (Tag +188), ein/e Klon/Linie (Nr. 4.12) von PBL spät nach KMT (Tag +325) In der Abbildung 2 a und b sind T-Zell-Klone/-Linien 1.5 und 3.10 des Empfängers M. W. 188 und 325 Tage nach KMT als Beispiel für T-Zell-Reaktivität gegen die genannten spezifischen Proteine dargestellt. Die Werte sind als Median- bzw. Mittelwerte des Tritiumeinbaus in cpm angegeben. Abbildung 2 a der Stimulationsversuche zeigt das Ergebnis für den/die Glykoprotein gH-spezifischen T-Zell-Klon/-Linie 1.5 von Empfänger M. W., Abbildung 2 b T-Zell-Klon/-Linie 3.10 von M. W. Die Abbildung 3 zeigt die Reaktivität eines/r solchen gB-spezifischen T-Zell-Klons/-Linie. Die Zellklone/-Linien Nr. 3.11 und 4.3, von Tag 325 nach KMT stammend, waren sowohl gH-, als auch pp65-spezifisch (Abbildung 4). Zell-Klon/Linie Nr. 1.8 (188 Tage nach KMT) zeigte nur pp65-Spezifität.

14 der 43 HCMV-spezifischen T-Zell-Klone/Zelllinien (1.4, 1.13, 1.16, 3.4, 3.7, 3.13, 3.16, 3.26, 3.28, 3.33, 3.35, 3.42, 3.47, 4.6; 32,6 %) konnten durch den Einsatz der sieben rekombinanten HCMV-Proteine in ihrer genauen Antigen-spezifität nicht näher charakterisiert werden. Keiner der HCMV-spezifischen T-Zell-Klone/-Linien zeigte eine proliferative Antwort auf Stimulation mit den anderen eingesetzten HCMV-Proteinen IE1, IE2, pp150, p52.

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der getesteten T-Zell-Klone/-Linien, die mit den sieben verschiedenen rekombinanten HCMV-Proteinen stimuliert wurden und mit gH-, gB- und/oder pp65-Proteinen proliferierten. Als positive Reaktion wurden Stimulationsindices von ≥ 2 angesehen. gH-, gB- und/oder pp65-spezifische Zellen sind in der Tabelle hervorgehoben.

Tabelle 5: ^3H -Thymidineinbau der T-Zell-Klonen/-Linien des Empfängers M. W. nach Stimulation mit rekombinanten HCMV-Proteinen (gH, gB, pp65) unter Verwendung von bestrahlten, autologen, mononukleären Zellen als APC.
[cpm] = counts per minute

Bezeichnung der T-Zell-Klone/Linien	gH [cpm]	gB [cpm]	pp65 [cpm]	Negativkontrolle [cpm]	Stimulationsindex (SI) der reaktiven Zellen	Spezifität
1.3	802	6130	680	772	7,9	gB
1.4	590	877	573	596	-	keine
1.5	2043	416	556	648	3,2	gH
1.7	4698	623	1421	456	10,3	gH
1.8	620	457	2169	599	3,6	pp65
1.10	660	2307	536	552	4,2	gB
1.13	646	394	495	537	-	keine
1.14	6926	627	605	644	10,8	gH
1.16	120	822	137	520	-	keine
1.17	375	8574	369	600	15,0	gB
3.4	661	511	585	486	-	keine
3.5	4638	430	573	448	10,4	gH
3.7	412	471	490	284	-	keine
3.9	2132	285	539	322	6,6	gH
3.10	5094	320	499	361	14,1	gH
3.11	3357	558	2361	376	8,9/6,3	gH/pp65
3.13	492	543	491	442	-	keine
3.15	2131	434	584	385	5,5	gH
3.16	630	389	389	433	-	keine
3.18	4117	366	417	478	8,6	gH
3.23	2273	410	451	437	5,2	gH
3.26	755	357	803	419	-	keine
3.27	1136	507	400	455	2,5	gH
3.28	517	526	422	408	-	keine
3.29	1026	426	401	497	2,1	gH
3.33	641	415	474	480	-	keine
3.35	604	409	559	443	-	keine
3.36	4667	288	389	307	15,2	gH
3.42	530	254	314	407	-	keine
3.45	1384	361	770	494	2,8	gH
3.47	585	609	552	447	-	keine
3.48	2038	565	420	562	3,6	gH
3.49	1344	415	379	489	2,7	gH
3.53	6750	486	353	593	11,4	gH
3.54	1254	455	398	360	3,5	gH
3.56	1412	651	403	479	2,9	gH
3.58	1867	390	580	195	9,6	gH
3.59	1936	500	529	466	4,2	gH
4.3	1472	595	4331	590	2,5/7,3	gH/pp65
4.6	408	380	444	409	-	keine
4.8	1039	366	482	427	2,4	gH
4.12	436	2047	483	421	4,9	gB
4.13	1037	414	526	415	2,5	gH

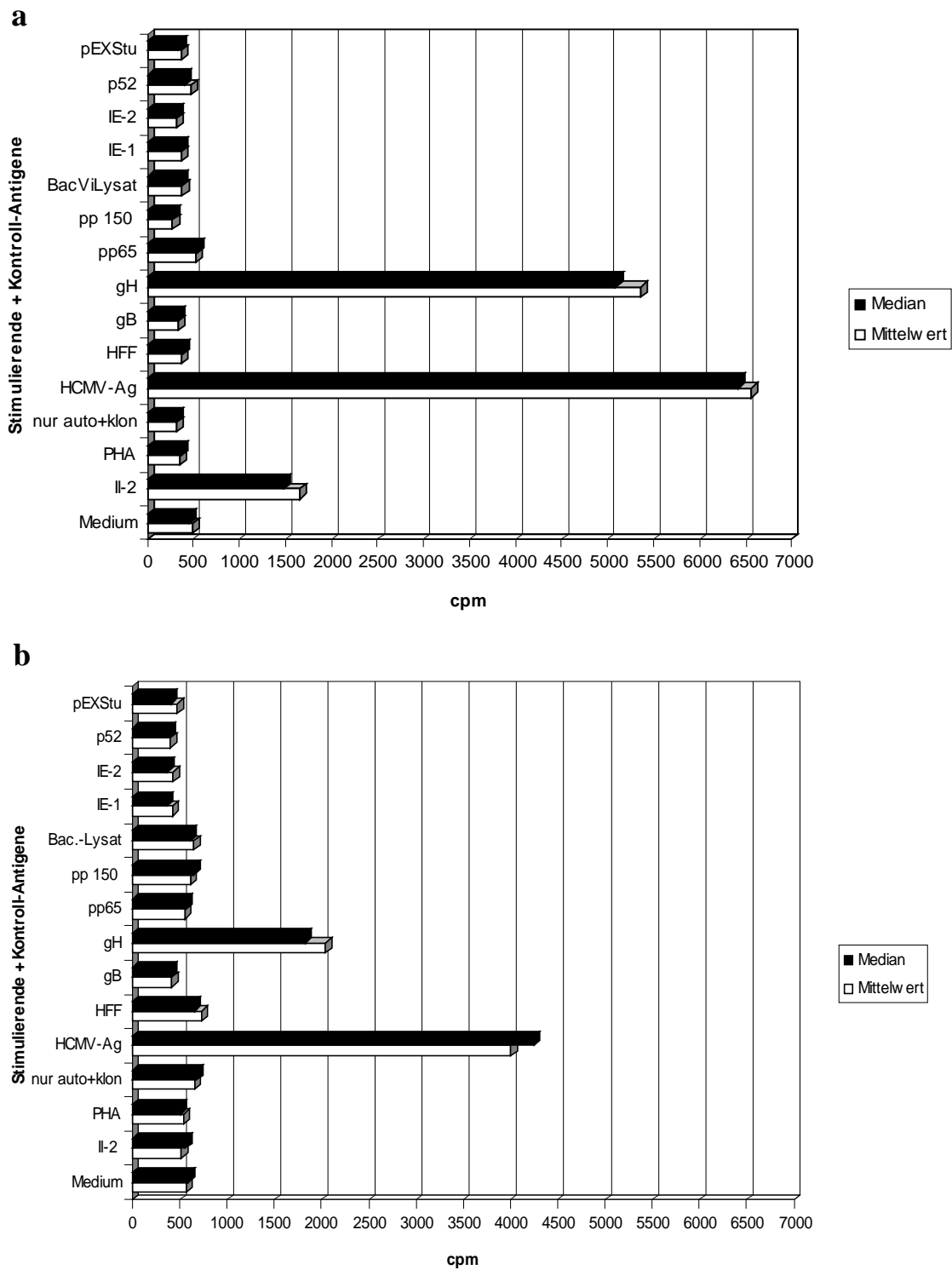


Abb. 2: Proliferative Aktivität (^3H -Thymidineinbau) der T-Zell-Klone 1.5 (188 Tage nach KMT, **a**) und 3.10 (325 Tage nach KMT, **b**) des Empfängers M. W. nach Stimulation mit HCMV-spezifischen den rekombinanten Proteinen gB, gH, pp65, pp150, IE1, IE2, p52) und Kontrollen (pExStu, BacLys, HFF, PHA, IL-2, Medium RPMI 1640) sowie autologen PBL als antigenpräsentierende Zellen.

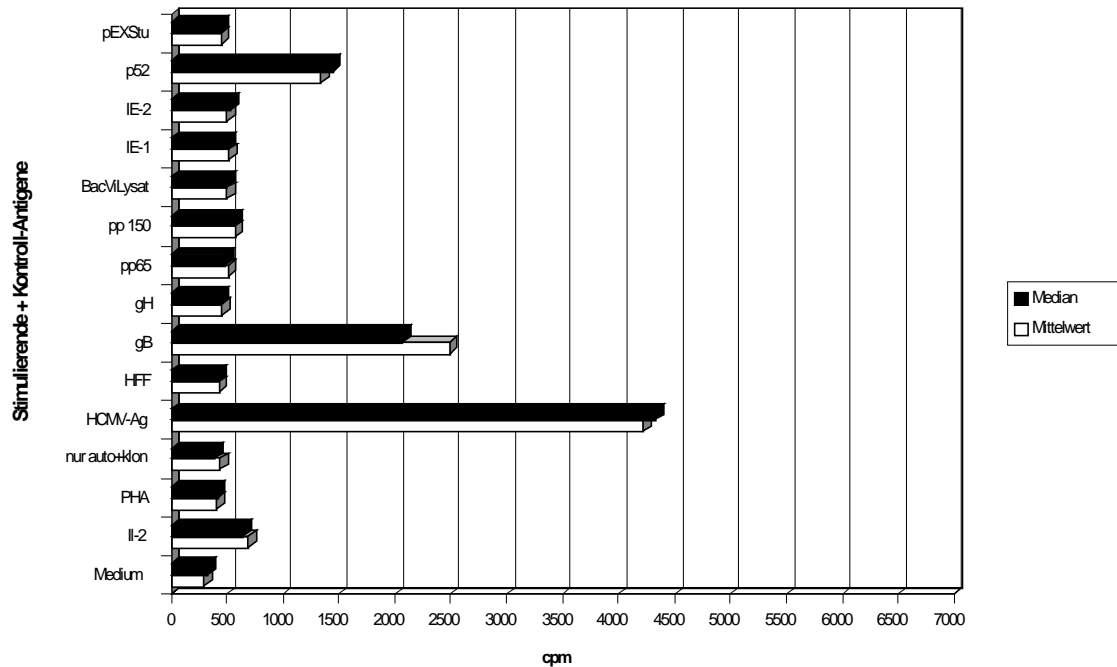


Abb.3: Proliferative Response (^3H -Thymidineinbau) der Glykoprotein gB spezifischen T-Zell-Linie 4.12 (Tag 325 nach KMT) nach Stimulation mit HCMV-spezifischen rekombinanten Proteinen (gB, gH, pp65, pp150, IE1, IE2, p52) und deren Kontrollantigenen (pEXStu, BacViLysat, HFF, PHA, IL-2, RPMI-Medium)

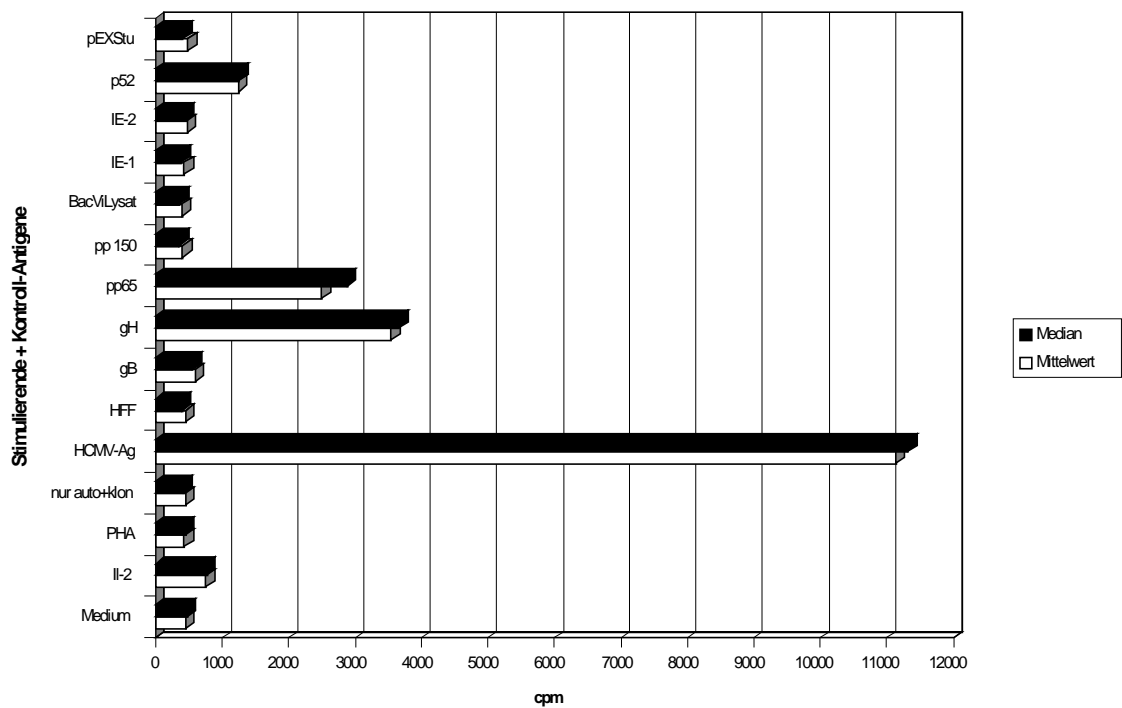


Abb. 4: Proliferative Response (^3H -Thymidineinbau) der Glykoprotein gH und pp65 spezifischen T-Zell-Linie 3.11 (Tag 325 nach KMT) nach Stimulation mit HCMV-spezifischen rekombinanten Proteinen (gB, gH, pp65, pp150, IE1, IE2, p52) und deren Kontrollantigenen (pEXStu, BacViLysat, HFF, PHA, IL-2, RPMI-Medium)

Bei sechs der elf T-Zell-Klone/-Linien des KMT-Spenders M. E. konnten Proliferationen auf Stimulation mit HCMV-Gesamtantigenen nicht genauer mit den eingesetzten rekombinanten HCMV-Proteinen gB, gH, IE1, IE2, pp65, pp150 oder p52 spezifiziert werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

4.2.2. Charakterisierung der HLA-Restriktion der HCMV-Gesamtantigen reaktiven T-Zell-Klone/-Linien

Um herauszufinden, welche HLA-Restriktion die HCMV-Antigen reaktiven T-Zellkulturen aufwiesen, wurden allogene Stimulatorzellen mit differentieller Expression der HLA-Klasse II Antigene des KMT-Spenders/Empfängers eingesetzt. Dazu dienten bestrahlte (30 Gy) EBV-transformierte B-Zelllinien (TUBO: HLA-DRB1*1104/1201; E4181324: HLA-DRB1*1502 homozygot). Folgende Versuche wurden durchgeführt:

- a) Stimulation von 14 T-Zell-Klonen/-Linien mit HCMV-Gesamtantigenen unter Einsatz der EBV-transformierten B-Zelllinie (TUBO) als antigenpräsentierende Zellen
- b) Stimulation von 14 T-Zell-Klonen/-Linien mit HCMV-Gesamtantigenen unter Einsatz der EBV-transformierten B-Zelllinie (E4181324)

Von den 14 eingesetzten T-Zell-Klonen/-Linien (Nr. 1.5, 1.7, 1.14, 3.5, 3.9, 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.23, 3.36, 3.53, 4.8, 4.13) proliferierten fünf (Nr. 1.5, 1.14, 3.5, 3.10, 3.23; 35,7 %) nur auf Stimulation mit der HLA-DRB1*1104/1201 heterozygoten B-Zelllinie und HCMV-Gesamtantigenen. T-Zell-Klon/-Linie 1.7 zeigte proliferative Aktivität auf Stimulation mit der HLA-DRB1*1502-exprimierenden B-Zelllinie und HCMV-Gesamtantigenen. T-Zell-Klon/-Linie 3.11. zeigte Proliferationen auf Stimulation mit beiden B-Zelllinien (HLA-DRB*1104/1201 und HLA-DRB*1502). Sieben Klone (3.9, 3.15, 3.18, 3.36, 3.53, 4.8, 4.13; 50 %) zeigten keinerlei Reaktion. Die Proliferationsdaten der T-Zellklone/-Linien auf Stimulation mit HLA-DRB1*1502- oder HLA-DRB1*1104- exprimierenden Zellen und HCMV-Gesamtantigenen sind in Tabelle 6 aufgezeigt. HFF stellt die Stimulation mit der Negativkontrolle zu HCMV dar. Als positive Reaktion wurden Stimulationsindices von ≥ 2 gewertet. Sie sind in der Tabelle hervorgehoben.

Tabelle 6: Proliferative Aktivität von HCMV-spezifischen T-Zellklonen/-Linien auf Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen und den EBV-transformierten B-Zellen E4181324 (HLA-DRB1*1502 homozygot) und TUBO (HLA-DRB1*1104/1201) als APC

Bez. der Klone d. Empfängers	Genotyp der Stimulatorzellen HLA-DRB1*	HCMV-Gesamtantigen [cpm]	HFF (Negativkontrolle) [cpm]	Stimulationsindex (SI)
1.5	1502	1358	1194	1,1
1.5	1104/1201	2639	1230	2,1
1.7	1502	3474	1251	2,8
1.7	1104/1201	2182	1500	1,5
1.14	1502	1668	1221	1,4
1.14	1104/1201	2362	1198	2,0
3.5	1502	2029	1379	1,5
3.5	1104/1201	2179	1006	2,2
3.9	1502	1867	1202	1,6
3.9	1104/1201	1017	1002	1,0
3.10	1502	1512	1440	1,1
3.10	1104/1201	3612	1038	3,5
3.11	1502	3021	1334	2,3
3.11	1104/1201	4330	1455	3,0
3.15	1502	1124	728	1,5
3.15	1104/1201	1250	888	1,4
3.18	1502	1409	1205	1,2
3.18	1104/1201	1211	904	1,3
3.23	1502	1586	1165	1,4
3.23	1104/1201	2664	1132	2,4
3.36	1502	903	815	1,1
3.36	1104/1201	1663	1135	1,5
3.53	1502	1174	907	1,3
3.53	1104/1201	1094	1120	1,0
4.8	1502	1034	1020	1,0
4.8	1104/1201	1134	1188	1,0
4.13	1502	1351	904	1,5
4.13	1104/1201	1553	1356	1,1

Zu den selben Bedingungen wie im vorhergehenden Test fand die Stimulation von den 14 gH-spezifischen T-Zell-Klonen/-Linien (Nr. 1.5, 1.7, 1.14, 3.5, 3.9, 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.23, 3.36, 3.53, 4.8, 4.13; 50 %) mit gH-Protein unter alternativer Verwendung der EBV-transformierten B-Zelllinien TUBO bzw. E4181324 als antigenpräsentierende Zellen zur Bestimmung der HLA-Restriktion statt. Bei diesem Versuch proliferierten sieben T-Zellklone/-Linien (Nr. 1.5, 1.14, 3.5, 3.9, 3.10, 3.36, 4.13) auf Stimulation mit der HLA-DRB1*1104/1204 heterozygoten B-Zelllinie und gH-Glykoprotein sowie drei T-Zellklone/-Linien (Nr. 1.7, 3.18, 3.23; 21,4 %) auf Stimulation mit der HLA-DRB1*1502 exprimierenden B-Zelllinie und gH-Glykoprotein. Die T-Zellkultur 3.11 proliferierte auf Stimulation beider B-Zelllinien. Die T-Zellkulturen 3.15, 3.53 und 4.8 wiesen keine Proliferationen auf. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Stimulationsindices $\geq 1,5$ wurden als positive Reaktionen gewertet.

Mit Hilfe von PBL mehrerer HLA-typisierter gesunder allogener Spender, die mit dem KMT-Empfänger M. W. sowie dessen Spender M. E. nicht oder nur in spezifischen HLA-Merkmalen übereinstimmten und aus dem HLA-typisierten Panel-Pool (3.1.4.) der Sektion Transplantation und Immunhämatologie, Med. Klinik II, Tübingen stammten, wurde die HLA-Restriktion der gH spezifischen T-Zell-Klone/-Linien weiter spezifiziert. Die Zellen aus diesem Panel-Pool wurden nach Bestrahlung und Zugabe von gH als antigenpräsentierende Zellen verwendet. In diesem Versuch fanden elf der 24 gH-spezifischen T-Zell-Klone/-Linien (1.5, 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.23, 3.36, 3.49, 3.53, 3.58 und 4.8) Verwendung. Die restlichen 13 gH-spezifischen T-Zell-Klone/-Linien konnten nicht untersucht werden, da zu wenig Zellen vorhanden waren.

Tabelle 7: Proliferative Aktivität von T-Zellklonen/-Linien des KMT-Empfängers auf Stimulation mit rekombinantem gH-Protein und EBV-transformierten B-Zellen E4181324 (HLA-DRB1*1502 homozygot) und TUBO (HLA-DRB1*1104/1201) als APC.

Bez. der Klone	Genotyp d. Stimulator-zellen HLA-DRB*	gH [cpm]	Negativ kontrolle zu gH [cpm]	Stimulationsindex (SI)
1.5	1502	1548	1604	1,0
1.5	1104/1201	2745	1221	2,2
1.7	1502	4013	1596	2,5
1.7	1104/1201	2023	1649	1,2
1.14	1502	1483	1636	0,9
1.14	1104/1201	3354	1107	3,0
3.5	1502	1440	1076	1,3
3.5	1104/1201	2632	885	3,0
3.9	1502	1421	1528	0,9
3.9	1104/1201	1516	971	1,6
3.10	1502	1556	1768	0,9
3.10	1104/1201	4970	887	5,6
3.11	1502	3035	1883	1,6
3.11	1104/1201	2530	1467	1,7
3.15	1502	923	1066	0,9
3.15	1104/1201	911	1068	0,9
3.18	1502	1748	1095	1,6
3.18	1104/1201	1146	1142	1,0
3.23	1502	1729	1116	1,5
3.23	1104/1201	1556	1100	1,4
3.36	1502	826	1043	0,8
3.36	1104/1201	2173	1078	2,0
3.53	1502	1020	1100	0,9
3.53	1104/1201	1009	1146	0,9
4.8	1502	976	1134	0,9
4.8	1104/1201	1075	1040	1,0
4.13	1502	888	1043	0,9
4.13	1104/1201	1897	1119	1,7

Vom Patienten M. W. konnten drei gH-spezifische Klone/Linien in ihren Restriktionselementen weiter charakterisiert werden: die T-Zellkulturen 1.5, 3.11, 3.49 erkannten gH-Protein mit einer HLA-DRB1*1104/-DQB1*0301-Restriktion. Die T-Zellkulturen 3.18 und 3.23 erkannten das gH-Protein im Unterschied zu vorherigen Versuchen mit einer HLA-DRB1*1104/-DQB1*0301-Restriktion. Fünf T-Zellkulturen (3.10, 3.15, 3.58, 3.36, 4.8) ergaben kein eindeutiges Ergebnis. Die T-Zellkultur 3.53 wies in diesem Versuch keine Proliferationen auf.

Die drei HLA-DRB1*-1104 restringierten T-Zellklone/-Linien des Empfängers M. W. wiesen in ihrer Reaktivität gegen gH Kreuzreaktionen zu den verwandten HLA-Allelen DRB1*11041 sowie 11011 auf. Zum Teil kam es jedoch bei nicht verwandten HLA-Allelen zu Kreuzreaktionen. Tabelle 8 zeigt die Proliferationsdaten eines/-r ausgewählten T-Zell-Klons/-Linie (3.49) auf Stimulation mit gH und verschiedenen Panelzellen. Die hervorgehobenen Werte zeigen Proliferation des/der T-Zellklons/-Linie nach Stimulation mit gH-Glykoprotein und HLA-DRB1/-DQ unterschiedlich exprimierenden APC's an. Ein Stimulationsindex $\geq 4,0$ zeigt spezifische T-Zellproliferationen.

Die T-Zell-Klone/-Linien des Spenders M. E. konnten wegen allgemein schlechter Proliferation nicht mehr genauer auf ihre HLA-Restriktion überprüft werden. Bei Versuchen zur Feststellung der HCMV-Reaktivität wurden die bereits in den anderen Assays verwendeten EBV-transformierten B-Zelllinien TUBO: HLA-DRB1*1104/1201 und E4181324: HLA-DRB1*1502 verwendet. Dabei fiel auf, dass vier (82512BK1, -3, -5, 82554BK5) der elf T-Zell-Klone/-Linien auf Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen und den HLA-DRB1*1104/1201-positiven heterozygoten EBV-B-TUBO-Zellen als APC proliferierten und drei Linien (82512BK2, 82554BK2, 82268BN1) sowohl auf Stimulation mit der HLA-DRB1*1502-positiven B-Zelllinie E4181324 als auch auf Stimulation der HLA-DRB1*1104/1201-positiven B-Zelllinie TUBO gegenüber gH-Protein Wachstum zeigten. Vier T-Zell-Klone/-Linien (82512BK4, 82554BK1, -4 und 82597BN4) wiesen keine Proliferation auf (Tabelle 4).

Tabelle 8: Proliferation der T-Zelllinie 3.49 des Empfängers M. W. auf Stimulation mit gH-Protein und Verwendung allogener PBL mit unterschiedlichen HLA-DRB1- und HLA-DQB1 Genotypen als antigenpräsentierende Zellen

Nr. des Klons	HLA-Genotyp der stimul. Panelzellen (DRB1*)	HLA-Genotyp der stimul. Panelzellen (DQB1*)	gH [cpm] (stimulierenden Antigen)	Negativkontrolle [cpm] zu gH	Stimulationsindex (SI)
3.49	0403/ 1104x	0301 /0302	1716	236	7,3
3.49	0103/1201	0301 /0501	128	88	1,5
3.49	0701/09012	02x/0303x	145	109	1,3
3.49	1501/07x	0602/03032	271	116	2,3
3.49	0701/09012	02x/0303x	342	95	3,6
3.49	1501/ 11041	0301 /0602	2321	156	14,9
3.49	1401/0801	05031/0402	1748	1432	1,2
3.49	0101/1601x	0501/ 0601x	132	101	1,3
3.49	0404/1301	03032/0603	184	115	1,6
3.49	0401x/ 11011	0302/ 0301	1600	98	16,3
3.49	0103/1201	0501/ 0301	108	97	1,1
3.49	0701/0401	02x/0302	873	199	4,4
3.49	0701/09012	0201/03032	145	106	1,4
3.49	0401/x	0302/x	3757	1996	1,9
3.49	1501/ 03011	0201/0602	557	115	4,8
3.49	1302/0802x	0604/0402	214	98	2,2
3.49	0701/0101	03032/0501	678	314	2,2
3.49	1501/0403	0602/x	631	135	4,7
3.49	1302/0408	0605x/ 0301	142	121	1,2
3.49	0301 x/0101	0201/0501	125	108	1,2
3.49	0801/x	0201/0402	1064	492	2,2

4.2.3. Spezifizierung der HCMV-Antigenreaktivität der etablierten Klone/Linien mit Fragmentproteinen von gH und synthetischen Peptiden

Zur weiteren Spezifizierung der HCMV-Antigenreaktivität der Klone/Linien standen vier klonierte Fragmente des Proteins gH von HCMV zur Verfügung.

- (a) pAP86 As 15 - 142
- (b) pPN86 As 142 - 358
- (c) pSN86 As 278 - 508
- (d) pNH86 As 508 - 743

Die Teilstücke waren als Fusions-/Fragmentproteine mit β -Galaktosidaseresten exprimiert und danach spezifisch aufgereinigt worden [7]. Abbildung 5 zeigt eine schematische Darstellung der verwendeten rekombinanten β -Galactosidase Fusionsproteine (pAP86, pPN86, pSN86, pNH86) des Glykoproteins gH, ihre Aminosäurepositionen und Aminosäuresequenzüberlappungen. Die Zahlen geben die ersten und letzten Aminosäurepositionen eines jeden Fusionsproteins an [7].

Für die Testung der Fragmentspezifität kamen elf der gH-Protein spezifischen T-Zell-Linien/Klone zum Einsatz (Nr. 1.5, 1.7, 3.5, 3.9, 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.23, 3.36, 4.13). Diese elf T-Zell-Klone/-Linien wurden in nachfolgenden Untersuchungen mit verschiedenen gH-Fusionsproteinen (pAP86, pPN86, pSN86 oder pNH86) und HLADRB1*1104- oder HLADRB1*1502-positiven allogenen PBL als Stimulatorzellen aus dem Panel gesunder Personen der Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie der Medizinischen Klinik II, Tübingen, getestet.

Tabelle 9 zeigt die getesteten T-Zell-Klone/-Linien und deren Reaktivität in [cpm] nach Stimulation mit den gH-Fusionsproteinen. Da mit dem gH-Fusionsprotein pNH86 bei keiner T-Zellkultur eine Reaktion zu beobachten war, wurden die Daten in der Tabelle nicht aufgenommen. Positive Werte sind in der Tabelle hervorgehoben.

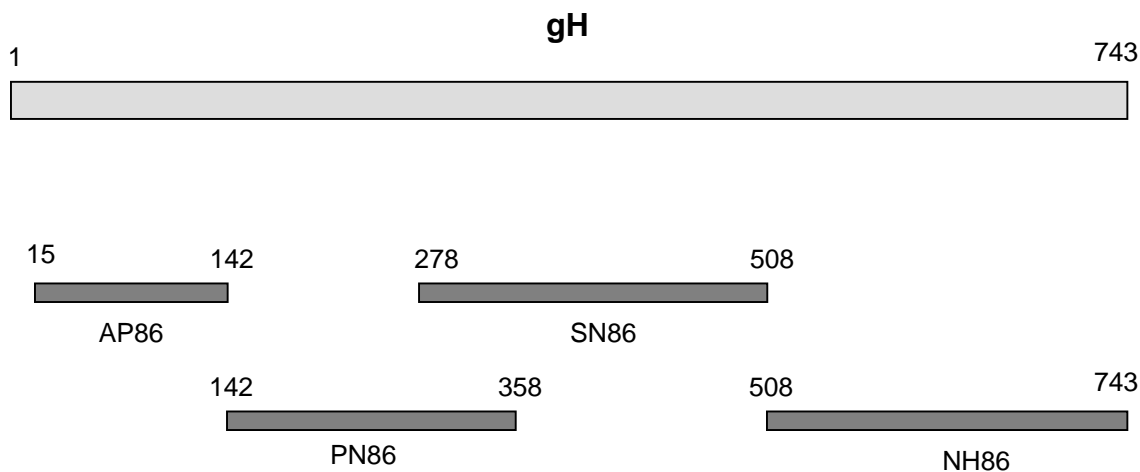


Abb. 5: Glykoprotein gH (hellgrauer Balken): Positionen der eingesetzten β -Galactosidase Fusionsproteine (AP86, PN86, SN86, NH86, dunkelgraue Balken). Die Zahlen geben die jeweils ersten und letzten Aminosäurepositionen jedes Fusionsproteins an.

Tabelle 9: Proliferative Aktivität der gH-spezifischen T-Zellklone/-linien des KMT-Empfängers M. W. mit den stimulierenden gH-Fusionsproteinen (pAP86, pSN86, pPN86) und Kontrollantigen (βGalROS)

Bezeichnung der T-Zell-Klone/-Linie	pAP86 [cpm]	pSN86 [cpm]	pPN86 [cpm]	Kontrolle (βGalRos) [cpm]	HLA-DR*-Typ der eingesetzten Stimulatorzellen (1104 oder 1502)
1.5	541	749	755	535	1104
1.7	6454	229	265	193	1502
3.5	1909	4081	4878	1768	1104
3.9	426	647	875	566	1104
3.10	537	3805	4651	570	1104
3.11	1451	4036	4720	2097	1104
3.15	814	1217	1736	445	1104
3.18	156	153	381	173	1104 ?/1502 ?
3.23	1012	1321	1951	1198	1104
3.36	183	2062	2557	189	1104
4.13	509	1820	2120	700	1104

Von den elf im Proliferationsassay eingesetzten T-Zell-Linien/-Klonen proliferierten sechs (3.5, 3.10, 3.11, 3.15, 3.36, 4.13) (54,5 %) mit den sich im Aminosäurebereich 278 - 358 überlappenden Fusionsproteinen pPN86 und pSN86 und mit den HLA-DRB1*1104-positiven allogenen PBL als Stimulatorzellen. Eine T-Zell-Linie/Klon (Nr. 1.7) zeigte Spezifität für das Fusionsprotein pAP86 bei Vorhandensein von HLADRB1*1502-Stimulatorzellen. Vier T-Zellkulturen (27 %) liessen sich mit keinem der Fusionsproteine stimulieren (1.5, 3.9, 3.18, 3.23), obwohl es bei diesen in vorhergehenden Versuchen zu T-Zell-Proliferationen mit Glykoprotein gH und unspezifischer Stimulation mit IL-2 gekommen war. T-Zell-Klon/-Linie 3.18 hatte zwar mit autologen PBL eine HCMV-Spezifität gezeigt, war aber mit allogenen Stimulatorzellen nicht weiter analysierbar, da die HLA-Restriktion nicht eindeutig festgestellt werden konnte.

Abbildung 6 zeigt die Reaktivität der T-Zelllinie 3.10 des KMT-Empfängers M. W. nach 48 Stunden Inkubation mit Glykoprotein gH, jeweils einem der vier gH-Fusionsproteine (pAP86, pSN86, pPN86 pNH86) und den entsprechenden Negativ-Kontrollantigenen (BacViLysat, βGalROS) mit den Stimulatorzellen (HLA-

DRB1*1104). Die Werte sind wiederum als Median- bzw. Mittelwerte des ³H-Tritiumeinbaus in cpm angegeben.

In Abbildung 7 wird die Reaktivität des/r T-Zell-Klons/-Linie Nr. 1.7 des Empfängers M. W. Tag 188 nach KMT und 48 Stunden Stimulation mit gH- und gH-Fusionsproteinen sowie entsprechenden Negativ-Kontrollantigenen gezeigt. Die Zellen proliferierten auf Präsentation von gH-Proteinen durch HLA-DRB1*1502-positive Stimulatorzellen.

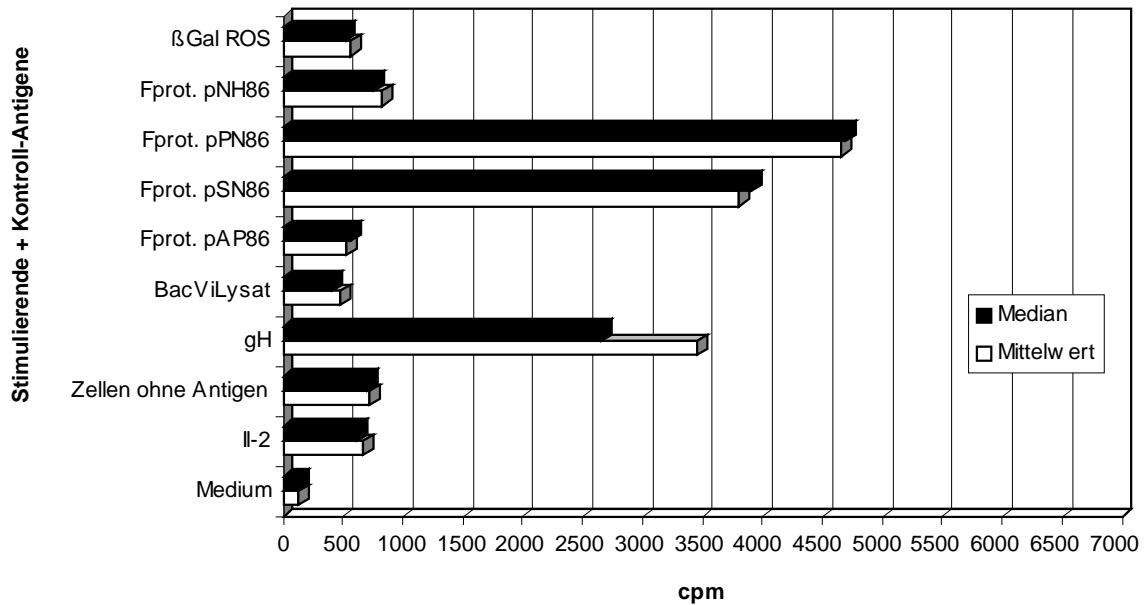


Abb. 6: Proliferative Aktivität der T-Zell-Linie 3.10 des KMT-Empfängers M. W. auf Stimulation mit gH, gH-Fusionsproteinen (pNH86, pPN86, pSN86, pAP86) und Kontrollantigenen (βGalROS, BacViLysat) bei Verwendung von HLA-DRB1*1104-Stimulatorzellen.

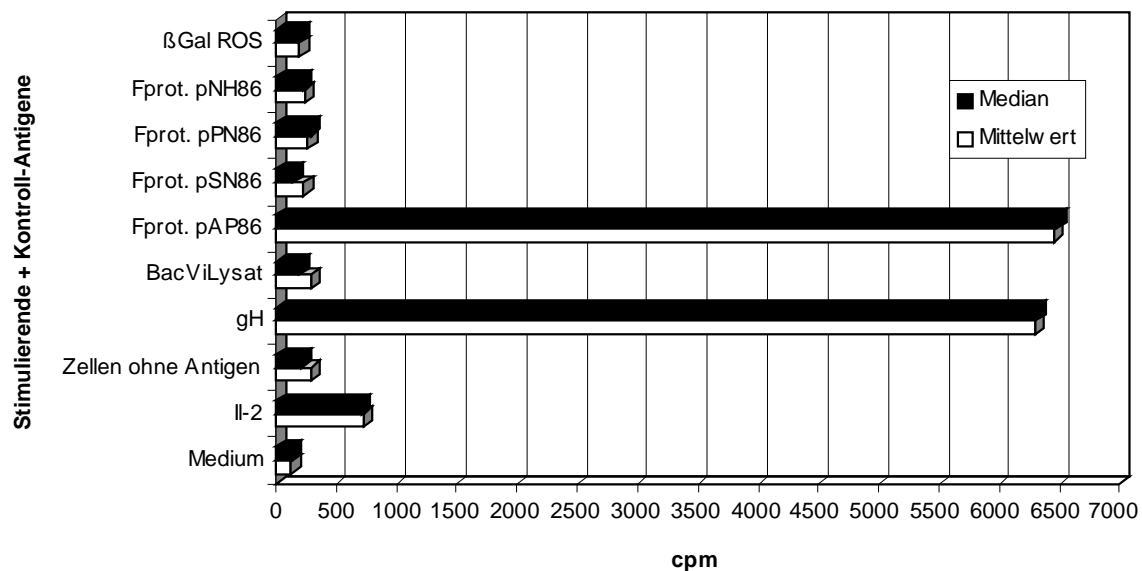


Abb. 7: Proliferative Antwort der T-Zell-Linie 1.7 des KMT-Empfänger M. W. auf Stimulation mit Glykoprotein gH und gH-Fusionsproteinen (pNH86, pPN86, pSN86, pAP86) sowie Kontrollen (βGalROS, BacViLysat) bei Verwendung von HLA-DRB1*1502-Stimulatorzellen.

4.2.4. Epitopmapping der T-Zellklone/-Linien mit Spezifität für pPN86 und pSN86 gH-Fragmentproteine

Die Charakterisierung der genauen Epitop-Spezifität der pPN86 und pSN86 T-Zell-Klone/-Linien (3.5, 3.10, 3.11, 3.36) wurde mit Hilfe synthetischer Peptide durchgeführt. Die T-Zellkulturen 1.5 und 3.9 wurden trotz der niedrigen Stimulationswerte in den Testungen mit gH-Fragmentproteinen nochmals eingesetzt. Aus der Aminosäureüberlappung der beiden Fragmentproteine konnte geschlossen werden, dass ein 81 Aminosäure langer Bereich zwischen Position 278 – 358 des gH-Proteins die relevante Epitopspezifität enthalten musste. Es wurden daher 16 - 19mere Peptide korrespondierend zu dieser Region hergestellt, die sich in der Regel um neun Aminosäuren überlappten. Mit diesen synthetischen Peptiden wurden die vier (3.5, 3.10, 3.11, 3.36) pPN86- und pSN86-spezifische T-Zell-Klone/-Linien sowie die gH-spezifischen Linien 1.5 und 3.9 stimuliert und auf proliferative Reaktivität getestet. Die Klone/Linien 3.5, 3.10, 3.11, 3.9 und 1.5 zeigten eine spezifische Proliferation nur nach Inkubation mit den Peptiden gH15 und gH16. T-Zell-Klon/-Linie 3.36 proliferierte auf keines der eingesetzten gH-Peptide. In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Stimulation mit den Peptiden gH15 und gH16 für die verschiedenen Klone/Linien gezeigt. Die dicken Zahlen zeigen positive Proliferationen an. T-Zell-Klone/-Linien 3.15 und 4.13 konnten mangels Zellen nicht mehr für Versuche eingesetzt werden. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen beispielhaft die Reaktivität der Klone/Linien 3.9 und 3.11 nach Inkubation mit allen getesteten gH-Peptiden (gH14 – 23), Fusionsproteinen (pSN86, pPN86), HCMV-Gesamtantigenen und verschiedenen Kontrollen (β GalROS, HK116/4, Zellen ohne Antigen, IL-2, Medium).

Tabelle 10: Proliferative Aktivität [cpm] der T-Zellklone/-Linien des Empfängers M. W. nach Stimulierung mit den Glykoprotein gH-spezifischen Peptiden gH15 und gH16 sowie dem Kontrollantigen (β GalROS). APC bedeuten antigenpräsentierende Zellen

Nr. der Klone	gH 15 [cpm]	gH 16 [cpm]	Kontrollantigen β GalROS [cpm]	HLA-DRB1*-Genotyp der APC
1.5	1704	1136	509	1104
3.5	3053	2165	1336	1104
3.9	3384	1583	577	1104
3.10	4635	2264	1283	1104
3.11	5293	3470	1679	1104
3.36	343	374	288	1104

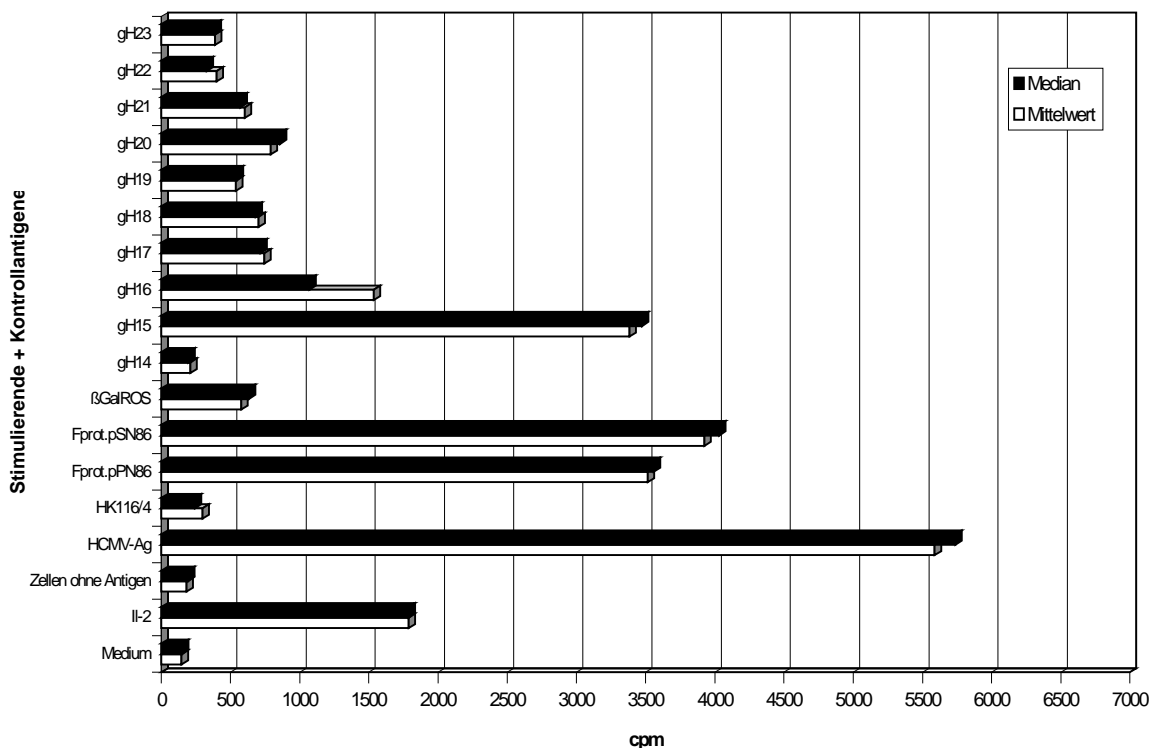


Abb. 8: Proliferative Response der T-Zell-Linie 3.9 des KMT-Empfängers M. W. nach Stimulation mit gH-Peptiden 14 - 23, HCMV-Gesamtantigen, den Fusionsproteinen pSN86, pPN86 und Kontrollen (β GalROS, HK116/4, Zellen ohne Antigen, IL-2, Medium) sowie autologen PBL als antigenpräsentierende Zellen

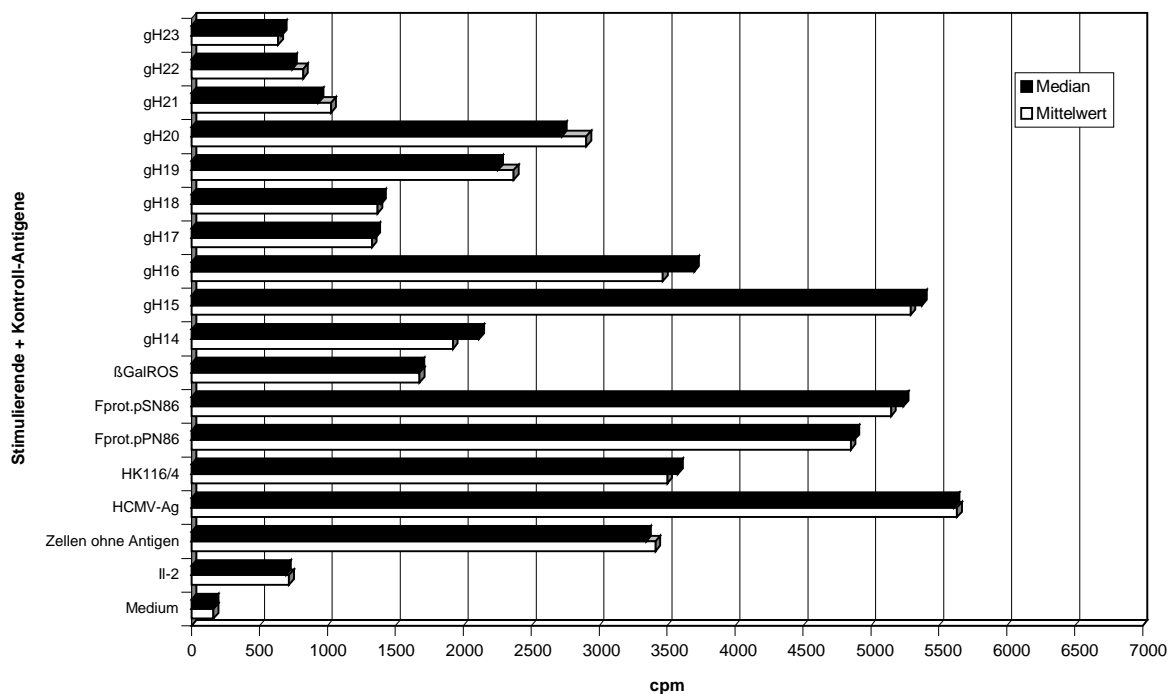


Abb. 9: Proliferative Response der T-Zell-Linie 3.11 des KMT-Patient M. W. nach Stimulation mit gH-Peptiden 14 - 23, pSN86, pPN86, HCMV-Gesamtantigen und Kontrollantigenen (β GalROS, HK116/4, Zellen ohne Antigen, IL-2, Medium) sowie autologen antigenpräsentierenden PBL.

Das gH 15-Peptid umfasst den As-Bereich 274 - 292 EKHELLVLVKKKAQLNRHSY,
gH 16-Peptid den Bereich As 284 - 302 KAQLNRHSYLKDSDFLDAA.

Eine Überlappung beider Peptide findet sich in der neun Aminosäure langen Sequenz KAQLNRHSY (As 284 - 292), die durch Unterstreichung ersichtlich ist. Die für eine mögliche Bindung an HLA-DRB1*1104 als besonders relevant erachteten Aminosäuren der Peptide gH15 und gH16 sind hervorgehoben. Nach F. A. W. Verreck et al. (1996) und Rammensee et al. (1999) müssen Peptiden bestimmte Aminosäurebedingungen genügen, um an HLA-DRB1*1104 binden zu können. Tabelle 11 zeigt die experimentell und über Computerprogramme vorhergesagten Ankerpositionen und die damit verbundenen Aminosäurebedingungen für die Bindung von Nonameren an HLA-DRB1*1104 sowie einen Vergleich möglicher Ankerpositionen in den Peptiden gH 15 und 16.

Tabelle 11: Vergleich von Ankerpositionen in bekannten HLADR1*1104 bindenden Peptiden und den Peptiden gH 15 und 16

Anker-Positionen	i	i + 3	i + 5	i + 8
Peptide mit nachgewiesener Bindung	Hydrophobe AS I, L, V,	M, Y, V, L, A	R, K, V	S, A, G, R, Q
P(274 - 292) gH15	L (278) L (279)	L (281) V (282)	K (283) K (284)	Q (286) L (287)
P(284 - 302) gH16	A (285)	N (288)	H (290)	L (293)

Das Peptid gH15 weist zwei mögliche, um eine Aminosäure verschobene Epitope auf, die an HLA-DRB1*1104 nach den bekannten Bindungskriterien assoziieren könnten. gH16 zeigt in der mit gH 15 überlappenden Sequenz nur einen Teil dieser Epitope, in der übrigen Sequenz keine eindeutige für HLA-DRB1*1104 relevanten Ankerpositionen. Dies erklärt wahrscheinlich die im Vergleich zu gH15 geringere Stimulationskapazität.

4.3. Ergebnisse der FACS-Untersuchung

Eine FACS-Analyse zur immunphänotypischen Charakterisierung der 20 gH-spezifischen T-Zell-Klone/-Linien wurde durchgeführt. Vier der gH-spezifischen Zell-Klone/-Linien standen auf Grund eingeschränkter Expansion in vitro für weitere Versuche nicht mehr zur Verfügung. Bei der Analyse von Oberflächenmolekülen der T-Zell-Klone/-Linien mit dem FACS konnte gezeigt werden, dass es sich fast ausschließlich um CD4⁺-T-Zell-Klone/-Linien (Nr. 3.4, 3.5, 3.9, 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.23, 3.27, 3.29, 3.33, 3.36, 3.48, 3.49, 3.54, 3.56, 3.58, 3.59, 4.8) handelte (95%). Nur einer (Nr. 3.53) der 20 T-Zell-Klone/-Linien exprimierte CD8⁺. Die monoklonalen Antikörper W6/32.HL (gegen schwere Kette von HLA-ABC Antigen), OKT3 (anti-CD3, allgemeiner T-Zellmarker) und WT31 (anti-TCRa/β, T-Zellrezeptor-Nachweis)

zeigten, dass es sich bei allen untersuchten T-Zell-Kulturen des Patienten um reife α/β TCR⁺

T-Zellen handelte. Abbildung 10 zeigt beispielhaft die Histogramme der T-Zell-Klone/Linien 3.10 und 3.15 eine Oberflächenexpression der T-Zellantigene CD3 und CD4, nicht aber von CD8.

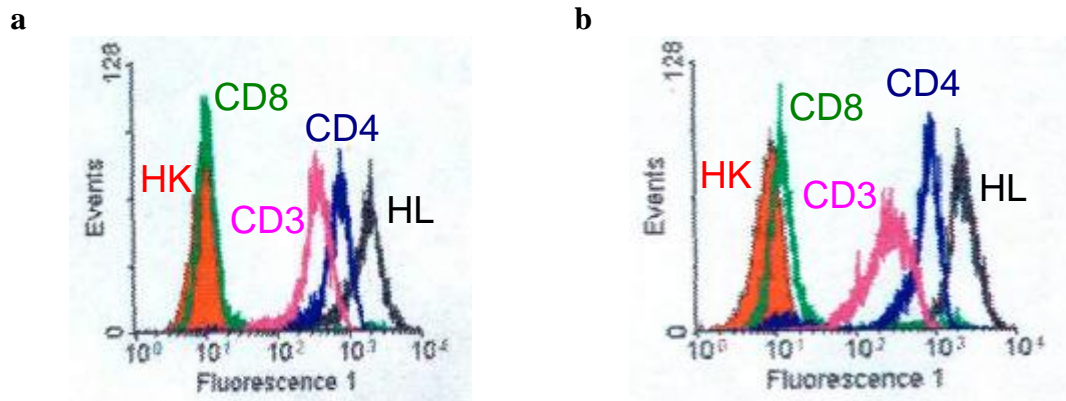


Abb. 10: FACS-Untersuchung der T-Zellklone 3.10 (a) und 3.15. (b) W6/32.HL - positive Kontrolle, W6/32.HK - negative Kontrolle

5. Diskussion

In der vorliegenden Dissertation wurden HCMV-spezifische CD4⁺T-Zell-Klone/-Linien aus PBL eines knochenmarktransplantierten HCMV-seropositiven Patienten zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach KMT generiert. Sie sollten Aufschluss über die HCMV-proteinspezifische Immunantwort und Epitoperkennung zu verschiedenen Zeitpunkten nach KMT im Vergleich zu entsprechend etablierten T-Zellkulturen des KMT-Spender geben. Dabei wurde versucht Epitopspezifitäten sowie MHC-Restriktion der HCMV-spezifischen T-Zellen zu erfassen.

5.1. HCMV-spezifische T-Zell-Klone/-Linien

Die T-Zell-Klone/-Linien wurden aus dem Blut des Patienten M. W. nach KMT, nach etablierten Methoden gezogen [80]. Dabei wurden die T-Zellen zu Beginn (Priming) und bei der Grenzwertverdünnung (Limiting dilution) mit autologen PBL des Patienten M. W. als spezifische Stimulatorzellen (APC's) sensibilisiert bzw. restimuliert. Später wurden unspezifische, HCMV-negative und bestrahlte PBL aus dem Pool von gesunden Spendern der Medizinischen Klinik als APC's verwendet.

Für eine strikte autologe Expansion der T-Zell-Klone standen nicht ausreichende Mengen an PBL des KMT-Empfängers M. W. zur Verfügung, so dass auch HLA-gematchte bzw. gepoolte allogene Zellen als Stimulatorzellen bzw. Feederzellen eingesetzt werden mussten. Dies bedeutet, dass eventuell auftretende Selektionsartefakte der T-Zellen in vitro nicht ausgeschlossen werden können.

Es konnte jedoch mehrfach gezeigt werden, dass die auf diese Weise gewonnenen T-Zellklone ihre Antigen-spezifität beibehielten [20,98,102,105]. Einen teilweisen Ausweg aus der bekannten Problematik hätte die Kultivierung einer autologen, EBV-transformierten B-Zelllinie bieten können.

Allgemein werden durch die jeweiligen Kulturbedingungen T-Zellklone vermutlich artefiziell selektioniert. Sie repräsentieren bei optimalen Bedingungen nur beschränkt die gesamte Breite der T-Zell-Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen im Blut.

Van Binnendijk et al. (1989) berichteten, dass die T-Zellkultivierung und Selektion vermutlich auch durch die Art der jeweiligen APC's beeinflusst wird [111]. So beschrieben sie, dass CD4⁺ zytotoxische T-Zellen nur erhalten werden, wenn Monozyten, nicht aber B-Zellen als APC und Feederzellen Verwendung fanden.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Glycin-extrahierte HCMV-Gesamtantigen von den mit dem Laborstamm AD169 infizierten humanen Vorhautfibroblasten wurde von Frau Dr. rer. nat. H. Krause (Med. Klinik II, Tübingen) nach dem Protokoll von Waner et al. hergestellt [117]. Bei den anschliessend durchgeführten Kontrollversuchen kam es bei allen getesteten HCMV-positiven gesunden Spendern im Gegensatz zu seronegativen Spendern bei mehreren Experimenten zu einer positiven proliferativen Antwort auf dieses Antigen, im Gegensatz zu Versuchen mit den Partikeln (NIEPS, Dense Bodies und Virionen) oder aufgereinigten Virionen. Bei nicht-infizierten Fibroblasten (als Negativ-Kontroll-Antigen) kam es zu keiner Stimulation der PBL der seropositiven Spender. Dieses Ergebnis stimmt mit anderen Publikationen überein [97]. Krause et al. wie auch Reusser et al. gehen deshalb davon aus, dass ein effektiver und spezifischer Nachweis der proliferativen T-Zellantwort mit dem von ihnen im Laborstamm AD169 produzierten HCMV-Gesamtantigen möglich ist [58,97].

Vom Spender M. E. standen 16 T-Zell-Klone/-Linien aus einer unabhängigen Kultivierung durch Frau Dr. rer. nat. H. Krause entsprechend den oben genannten Bedingungen zur Verfügung. Diese T-Zellkulturen waren in ihrer Spezifität nicht weiter charakterisiert worden.

Vom Patienten konnten 20 T-Zell-Klone/-Linien von Tag 188 nach KMT und 62 T-Zell-Klone/-Linien von Tag 325 nach KMT generiert werden. Wegen unzureichender Expansionsfähigkeit liessen sich nur an 43 der 82 generierten T-Zell-Klone/-Linien (10 früh d. h. 188 Tage, 33 spät d. h. 325 Tage nach KMT) weitergehende Studien durchführen. Die geringere Expansion verschiedener T-Zellklone/-Linien könnte durch T-Zellalterung in vitro und damit verbundene fehlende weitere Proliferationskapazität verursacht worden sein. 42 (97,6 %) der 43 getesteten T-Zell-Klone/-Linien (Nr. 1.3,

1.4, 1.5, 1.7, 1.8, 1.10, 1.13, 1.14, 1.17, 3.4, 3.5, 3.7, 3.9, 3.10, 3.11, 3.13, 3.15, 3.16, 3.18, 3.23, 3.26, 3.27, 3.28, 3.29, 3.33, 3.35, 3.36, 3.42, 3.45, 3.47, 3.48, 3.49, 3.53, 3.54, 3.56, 3.58, 3.59, 4.3, 4.6, 4.8, 4.12, 4.13) zeigten durch proliferative Reaktionen eindeutige Spezifität für HCMV-Gesamtantigen.

Die Fähigkeit der Zellen von Tag 188 nach allogener KMT zur Proliferation schien im Vergleich zur Proliferationskapazität der T-Zellen von Tag 325 nach KMT allgemein erniedrigt zu sein. So waren T-Zellen von Tag 188 *in vitro* deutlich schlechter zu expandieren als T-Zellen aus PBL von Tag 325 nach KMT. Grund hierfür könnte eine erniedrigte Produktion und Reaktion auf IL-2, Prozesse der Anergie und vorzeitige Alterung von T-Zellen in der ersten Phase nach KMT sein [4]. So liessen sich auch bei einem Teil der T-Zellkulturen des Empfängers erniedrigte Proliferationen auf Stimulation mit Mitogen oder IL-2 ersehen. Wahrscheinlich lässt sich dadurch auch die erhaltene geringere Anzahl an T-Zellklonen/-Linien von Tag 188 erklären. Während die Regeneration der Reaktion auf Stimulation mit PHA für T-Zellen von sechs Monaten [77,119] bis zu einem Jahr [73] nach KMT dauern soll, scheint sich die Proliferation der T-Zellen auf Inkubation mit IL-2 nach KMT schneller zu rekonstituieren und häufig nach Tag 100 der KMT ein normales Niveau zu erreichen [4]. Beim untersuchten Patienten waren erniedrigte PHA- und IL-2-Stimulationswerte an den unklonierten PBL allerdings sowohl am Tag 188 als auch am Tag 325 nach KMT noch feststellbar.

Sieben (Nr. 82512BK1 82512BK2, 82515BK3, 82512BK5, 82554BK2, 82554BK5, 82268BN1) der elf T-Zell-Klone/-Linien (63,6 %) des **Spenders** M. E. proliferierten auf Stimulation mit HCMV-Gesamtantigen und IL-2, vier T-Zellkulturen (82512BK4, 82554BK1, 82554BK4, 82597BN4; 36,4 %) wiesen keine Proliferation auf. Das *ex-vivo* Durchschnittsalter der T-Zell-Klone/-Linien war hier 40 - 48 Tage. Grund dafür könnte eine T-Zellalterung *in vitro* und eine fehlende weitere Proliferationskapazität gewesen sein.

Ursächlich könnten T-Zell-Klone/-Linien ohne jegliche HCMV-spezifische Proliferation durch die nicht-spezifische Stimulation und Expansion mit Poolzellen auch mit Restriktion für andere Antigen-spezifitäten selektioniert worden sein.

Mittels der oben angewandten Methodik konnten vor allem HCMV-spezifische CD4⁺ T-Zell-Klone/-Linien gewonnen werden. 19 (3.4, 3.5, 3.9, 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.23, 3.27, 3.29, 3.33, 3.36, 3.48, 3.49, 3.54, 3.56, 3.58, 3.59, 4.8) von 20 T-Zell-Klonen/-Linien des Patienten M. W. erwiesen sich in der FACS-Analyse als CD3⁺CD4⁺CD8⁻. Ein Klon (3.53) erwies sich als CD3⁺CD4⁻CD8⁺ T-Zell-Klon.

Ob es sich bei den CD3⁺CD4⁺CD8⁻ T-Zell-Klonen/Linien um CD4⁺-zytotoxische Zellen handelt, wie in anderen Arbeitsgruppen schon mehrfach festgestellt wurde, könnte mit einem Zytotoxizitätsassay geklärt werden [47,53,64,71,86]. Krause und Holoher wiesen mittels eines Zytotoxizitätsassays nach Lichtenfels et al. pp65-spezifische HLA DRB1*0301 restringierte CD4⁺ T-Zellklone nach, die in vitro gezogen worden waren [46,58,63].

Die T-Zell-Klone/-Linien des KMT-Spenders konnten wegen ungenügendem Zellmaterial nicht mehr in eine FACS-Analyse miteinbezogen werden.

5.2. Beurteilung der Klonalität untersuchter T-Zell-Klone/-Linien

Die Klonalität von 18 Patienten- und sechs Spender-T-Zellklonen/-Linien wurden nach Abschluss des experimentellen Teils dieser Promotionsarbeit, in der Dissertation von Frau Dr. M. U. Feurle (Medizinische Universitätsklinik Tübingen) durch T-Zellrezeptoranalysen untersucht [34].

Von den sechs Spender T-Zellkulturen erwiesen sich zwei als T-Zellklone mit jeweils einer TCR α -Kette und einer TCR β -Kette. Drei T-Zellkulturen besaßen zwei oder mehr α - und/oder β -Ketten, deshalb wurde hier von Klongemischen ausgegangen. Bei einem/r T-Zell-Klon/-Linie liess sich mit den verwendeten Primern keine bekannte α -Kette amplifizieren und somit nicht feststellen, ob es sich um einen T-Zell-Klon handelte. Von den 18 Patientenproben die der T-Zellrezeptoranalyse unterzogen wurden, stammten sechs (Nr. 1.3, 1.5, 1.7, 1.13, 1.10, 1.17) vom Tag 188 nach KMT und 12 (Nr. 3.4, 3.5, 3.9, 3.10, 3.11, 3.28, 3.30, 3.45, 3.53, 3.58, 3.59, 4.12) vom Tag 325 nach KMT. Die T-Zellkulturen 1.3, 1.10, 1.13, 1.17 und 3.30 konnten als T-Zell-Klone identifiziert werden. Zehn Empfänger T-Zellklone/-Linien (1.5, 1.7, 3.4, 3.5, 3.9,

3.10, 3.11, 3.28, 3.58, 4.12) besaßen zwei oder mehr α - und/oder β -Ketten, so dass hier von Klöngemischen ausgegangen wurde. Bei den T-Zell-Klonen/-Linien 3.45, 3.53 und 3.59 konnte keine bekannte α -Kette amplifiziert werden.

Die beschränkte Klonalität der T-Zellkulturen war durch die angewandte Limiting-Dilution Technik zu erklären, bei der bei Verdünnungen von $4,5 \times 10^3$ Zellen/ml, $4,5 \times 10^2$ Zellen/ml und $4,5 \times 10^1$ Zellen/ml mehrere anwachsende Zellen pro Well erwartet werden mussten. Dadurch bedingt könnten Klöngemische generiert worden sein.

5.3. Charakterisierung der Antigen-spezifität der HCMV-reaktiven T-Zell-Klone/-Linien

5.3.1. HLA-Restriktion

Die gH-spezifischen T-Zell-Klone/-Linien des Patienten M. W. wurden auf ihre HLA-Restriktion hin untersucht. M. W. und sein HLA-identischer Knochenmarkspender M. E. besaßen den HLA-Phänotyp A2, A24, B7, B13, Cw6, Cw7 sowie DRB1*1502, DRB1*1104, DQB1*0301, DQB1*06011, DPB1*0201x, DPB1*0401.

Die HLA-Restriktion der gH-spezifischen CD4 positiven T-Zell-Klone/-Linien und des CD8 positiven T-Zell-Klons/-Linie 3.53, wurde in Proliferationsassays mit EBV-transformierten B-Zelllinien (TUBO: HLA-DRB1*1104/1201 und E4181324: HLADRB1*1502) sowie APC's aus einem Panel HLA-typisierter Spender untersucht. Fünf der 14 (1.5, 1.14, 3.5, 3.10, 3.23) untersuchten T-Zell-Klone/-Linie waren DRB1*1104 und DQB1* 0301 restringiert, einer (1.7) wies eine HLA-DRB1*1502 Restriktion auf. T-Zellkultur 3.11 proliferierte auf Stimulation mit Zellen, die entweder DRB1*1502 oder *1104 aufwiesen, sieben T-Zell-Klone/-Linien (3.9, 3.15, 3.18, 3.36, 3.53, 4.8, 4.13) reagierten bei keinem der Versuchsansätze, eine Proliferation auf Stimulation mit IL-2 war jedoch wie bei allen anderen bei diesem Versuch eingesetzten T-Zell-Klonen/-Linien festzustellen. Ottenhoff et al. sowie Pawelec et al. berichteten über alloreaktive wie auch virusspezifische CD4⁺ T-Zellreaktionen, die eine Dominanz der HLA-DR- über der HLA-DQ-Restriktion aufwiesen [78,81]. Gehrz et al. fanden bei

HCMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen heraus, dass diese zu 70 % eine HLA-DR und nur zu 15 % eine HLA-DQ oder HLA-DP Restriktion aufwiesen [37]. Ottenhoff et al. und Celis et al. berichten über Mycobacterium leprae spezifische CD4⁺T-Zellen und Rabies Viren spezifische T-Zellklone, die vor allem HLA-DR-restringiert waren [15,78]. Bei FACS-Analysen mit T-Zelllinien waren mehr als 90 % der T-Zellen CD3⁺CD4⁺CD8⁻, desweiteren zeigte sich bei Erkennung von HCMV-Antigen eine Dominanz von HLA-DR gegenüber -DQ und -DP [7]. Liu et al. (1993) stellten bei Experimenten mit HCMV ebenfalls eine vorherrschende DR-Restriktion bei gH-spezifischen T-Zellklonen fest [65]. Curtsinger et al (1994) beschrieben in einer Studie Unterschiede zwischen verschiedenen Individuen in der Immunantwort gegen gB in Abhängigkeit vom HLA-Klasse II Phänotyp [19]. Die B- und T-Immunantwort war hier mit bestimmten HLA-DR-Phänotypen assoziiert. Dies führte je nach HLA-DR Phänotyp zu sogenannten „high respondern“ und „low respondern“ in der T-Zell-Immunantwort gegen gB.

Die überwiegende DR-Restriktion der T-Helferzellen könnte im Zusammenhang mit der quantitativ stärkeren Expression der DR-Moleküle stehen. Möglicherweise spiegelt das die besondere Bedeutung der DR-Restriktion für die Immunantwort wider.

T-Zell-Klon/-Linie 3.53 war in der FACS-Analyse CD3⁺CD8⁺CD4⁻, bei der TCR Rezeptoranalyse konnte keine Aussage über die Klonalität gemacht werden. Eine T-Zellproliferation mit HCMV-Gesamtantigen und Glykoprotein gH fand statt.

Die HLA-Restriktion der Spender T-Zell-Klone/-Linien konnte aufgrund zu geringer Proliferation der Zellen sowie mangels weiterer Proben nicht näher charakterisiert werden.

5.3.2. Reaktivität mit spezifischem HCMV-Protein

Die 43 ausgewählten T-Zell-Klone/-Linien des Patienten M. W. wurden zur Charakterisierung ihrer HCMV-Antigenspezifität mit insgesamt sieben zur Verfügung stehenden rekombinanten HCMV-Proteinen (gB, gH, IE1, IE2, pp65, pp150, p52) getestet. 23 der 43 T-Zell-Klone/-Linien (55,8 %) proliferierten auf Stimulation mit gH-Protein, davon drei T-Zell-Klone/-Linien (1.5, 1.7, 1.14) des Empfängers aus der frühen Blutabnahme nach KMT (Tag 188) und 20 T-Zell-Klone/Linien (3.5, 3.9, 3.10, 3.15, 3.18, 3.23, 3.27, 3.29, 3.36, 3.45, 3.48, 3.49, 3.53, 3.54, 3.56, 3.58, 3.59, 4.3, 4.8, 4.13) von Tag 325 nach KMT. Vier T-Zell-Klone/-Linien (9,3 %) proliferierten auf Inkubation mit gB-Protein, drei (1.3, 1.10, 1.17) von Tag 188 nach KMT und eine T-Zell-Linie (4.12) am Tag 325 nach KMT. Zwei T-Zellkulturen proliferierten mit gH- und pp65-Protein (3.11, 4.3 Tag 325 nach KMT) und eine T-Zell-Linie auf pp65-Protein (1.8 Tag 188 nach KMT).

Bei der *in vitro* Stimulation war das Glykoprotein gH das stärkste Stimulans. Da die T-Zellen mit dem Gesamt-HCMV Antigen expandiert wurden und dieses einen hohen Anteil an gH-Glykoprotein enthält, könnte das der Grund für die dominierende Expansion von gH sein. Dagegen spricht jedoch, dass die gleiche Antigenpräparation bei Krause (1996) und Holocher (1998) zur dominanten Expansion von pp65 reaktiven T-Zellkulturen geführt hat [46,58]. Auch Beninga et al. (1995) erhielten bei gleichem Versuchsaufbau eine deutlich stärkere Proliferation mit Glykoprotein gB [8]. Da die jeweiligen Spender in ihren HLA-Klasse II Genotypen verschieden waren, könnte dies darauf hindeuten, dass die HLA-Klasse II restringierte T-Zellantwort gegen HCMV in ihrer Dominanz gegen spezifische virale Proteine vom HLA-Klasse II Typ abhängt.

Spezifische T-Zellantworten gegen Envelope Glykoproteine wie gH und gB sind nicht ungewöhnlich. Sie wurden unter anderem bei Influenza Virus und HI-Virus beobachtet [8]. Dass Glykoprotein gB eine T-Zellantwort hervorrufen kann, stellten auch Liu et al. (1993) fest [65]. Beninga et al. (1996) analysierten fünf HCMV-seropositive Personen und konnten bei den *in vitro* gegen HCMV-Gesamtantigen etablierten T-Zelllinien eine Glykoprotein gH-spezifische T-Helfer-Zellantwort feststellen [7]. Nach Beninga et al. (1995) lassen sich bei den meisten gesunden Personen in der Persistenz der HCMV-

Infektion CD4⁺T-Zellantworten auf Stimulation mit den HCMV-Proteinen pp65, gB und gH nachweisen [8].

Die Proliferation auf pp65-Tegument-Protein stimmt mit publizierten in vitro Ergebnissen an gesunden Personen überein [113]. Es wurde festgestellt, dass das pp65-Protein eine dem Gesamtvirusantigen entsprechende T-Zell-Proliferationsantwort erreichte und dabei bei allen getesteten in vitro gegen HCMV-Gesamtantigen etablierten T-Zelllinien aller getesteten seropositiven Personen zur Proliferation führte. [8].

Bei 13 T-Zell-Klonen/-Linien (1.4, 1.13, 3.4, 3.7, 3.13, 3.16, 3.26, 3.28, 3.33, 3.35, 3.42, 3.47, 4.6) wurde keine Spezifität für eines der sieben eingesetzten Proteine ermittelt. Es könnten hier andere HCMV-Proteine relevant sein, die in dieser Arbeit nicht verwendet wurden.

Sechs (82512BK2, 82512BK3, 82512BK5, 82554BK2, 82554BK5, 82268BN1) der elf getesteten T-Zell-Klone/-Linien des **Spenders** M. E. reagierten nur auf das HCMV-Gesamtantigen, jedoch nicht auf eines der in dieser Studie eingesetzten sieben spezifischen HCMV-Proteine.

Die T-Zell-Klone/-Linien, die keine Spezifität für eines der im Test eingesetzten rekombinanten Proteine (pp150, p52, Immediate Early 1, Immediate Early 2) aufwiesen, waren möglicherweise gegenüber einem der anderen 200 bekannten HCMV-Proteine reaktiv, die in dieser Arbeit als Proteine nicht zur Verfügung standen [16].

5.3.3. Charakterisierung der Epitopspezifität der etablierten T-Zell-Klone/-Linien

Für Untersuchungen zur genaueren Epitopspezifität der T-Zell-Klone/-Linien wurden vier rekombinante Fragmentproteine (pAP86, pPN86, pSN86, pNH86) von gH eingesetzt, die die Aminosäuresequenz Position 264 bis 372 mit teilweiser Überlappung repräsentierten. Elf (1.5, 1.7., 3.5, 3.9, 3.10, 3.11, 3.15, 3.18, 3.23, 3.36, 4.13) T-Zell-Klone/-Linien wurden mit gH-Protein oder jeweils einem der vier gH-Fusionsproteine

und APC's mit Expression von HLA-DRB1*1101/1104- oder HLA-DRB1*1502 stimuliert.

Sechs (54,5 %) der untersuchten T-Zell-Linien/-Klone (Nr. 3.5, 3.10, 3.11, 3.15, 3.36, 4.13) proliferierten mit den sich im Aminosäurebereich 278 - 358 überlappenden Fusionsproteinen pPN86 und pSN86 und mit APC's (HLA-DRB1*1101/1104) als Stimulatorzellen. Nur eine T-Zell-Linie (Nr. 1.7) zeigte eine andere Spezifität und zwar für das Fusionsprotein pAP86 mit Restriktion für HLA-DRB1*1502-Stimulatorzellen. Vier T-Zellkulturen (27 %) liessen sich trotz offensichtlich ausreichender Proliferation auf IL-2 und Mitogen mit keinem der Fragmentproteine stimulieren (Nr. 1.5, 3.9, 3.18, 3.23).

Beninga et al. (1995, 1996) berichteten über T-Zellproliferationen mit den Fusionsproteinen pAP86, pSN86 und pPN86 und Restriktion für HLA-DR11 in gesunden, latent HCMV infizierten Personen [7,8].

Vier (Nr. 3.5, 3.10, 3.11, 3.36) pSN86- und pPN86-spezifischen T-Zell-Klone/-Linien sowie die T-Zell-Kulturen 1.5 und 3.9 wurden zur genaueren Eingrenzung ihrer Epitop-Spezifität mit gH-Peptiden getestet. Eine Überlappung im Aminosäurebereich 278 - 358 der Fragmentproteine pSN86 und pPN86, liess den Schluß zu, dass die sechs T-Zellkulturen, die sowohl Reaktivität gegen pSN86 als auch pPN86 gezeigt hatten, Spezifität für ein Peptid des überlappenden Aminosäurebereiches dieser beiden Fragmentproteine aufweisen könnte.

Eine Bindungsvorhersage für Peptide des 81 Aminosäuren langen Bereichs von Glykoprotein gH mit Assoziation an HLA-DRB1*1104-Moleküle orientierte sich an den von Verreck et al. (1996) sowie von Rammensee et al. (1999) definierten Ankerpositionen (4.2.4.) [88,114].

Die Peptide gH14 - gH23 (As 264 - 372) der beiden Fragmentproteine pSN86 und pPN86 wurden nun zur weiteren Epitopeingrenzung bei weiteren Versuchen eingesetzt. Fünf der sechs eingesetzten T-Zell-Klone/-Linien (1.5, 3.5, 3.9, 3.10, 3.11) proliferierten mit den Peptiden gH15- und gH16 (As 274 - 292 und 284 - 302). Ein T-Zell-Klon (3.36) proliferierte auf keines der eingesetzten Peptide. Aus den Ergebnissen lässt sich schliessen, dass das Epitop für die DRB1*1104 restringierten gH-spezifischen T-Zellen

den neun Aminosäuren umfassenden Bereich LLVLVKKAQ (AS 278 - 286) von gH15 darstellt, der sich zum Teil überlappend auch in gH16 findet. Beninga et al. (1996) stellten fest, dass sich die immundominanten Domänen vom gH-Glykoprotein offensichtlich in der mittleren Molekülregion zwischen den Aminosäuren 284 und 510 befinden. Dies könnte darauf hindeuten, dass die CD4⁺ T-Zell-Antwort gegen Glykoprotein gH des HCMV dominant gegen dieses spezielle Epitop gerichtet ist [7]. Der Bereich AS 278 – 286 entspricht in etwa den Angaben von Verreck et al. (1996), die bei anderen HLA-DRB1*1104-restringierten Proteinen entsprechende Ankerpositionen gefunden hatten (4.2.4.) [114]. Möglicherweise existiert ein weiteres Epitop für die Bindung an DRB1*1104 in diesem Bereich von gH15, das nur um eine Aminosäure verschoben ist. Dieses könnte mit Hilfe direkter Bindungsstudien ermittelt werden.

HCMV-spezifische T-Helfer-Zell-Erkennung beinhaltet die Aufnahme und das Verarbeiten der viralen Proteine über antigenpräsentierende Zellen (APC's) und die Wiederrepräsentation viraler Antigene in Verbindung mit HLA-Klasse-II-Molekülen [57]. Die MHC-Klasse-II präsentierten Peptide besitzen im allgemeinen keine feste Länge, im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I restringierten Peptiden, die meist aus neun Aminosäuren bestehen. Nach Chicz et al. (1993) wurde für 201 natürlich prozessierte Peptide für MHC-Klasse-II eine durchschnittliche Länge von 13 - 17 Aminosäuren angegeben [17]. Dabei besaß das kürzeste Peptid zehn, das längste Peptid 30 Aminosäuren. Somit lässt sich annehmen, dass die Gesamtlänge der prozessierten Peptide nicht mit der Epitoplänge übereinstimmt. Stern et al. (1994) konnten diese Annahme durch Röntgenstrukturanalysen von HLA-DRB1*0101 mit einem Influenza A-Peptid beziehungsweise von HLA-DRB1*0301 mit einem Clip-Peptid bestätigen, da beide Peptide jeweils über die MHC-Bindungstasche herausragten [107]. Die ersten HLA-MHC Klasse II Peptid-Bindungsmotive wurden für HLA-DR1 und HLA-DR4 gefunden [41,42,50]. Rammensee et al. (1995) beschrieb eine Vielzahl von Bindungsmotiven vor allem für HLA-DR-Allele, wobei im Vergleich in dem schon zuvor gefundenen Klasse I-Motiven, die Längenvariabilität und die degenerierte

Spezifität der Ankerpositionen die exakte Definition bestimmter Ankerstrukturen für MHC-Klasse II erschwerte [89].

6. Zusammenfassung

Nach Knochenmark- oder peripherer Stammzell-Transplantation sind Patienten durch Infektionen mit Bakterien, Viren und Pilzen besonders gefährdet. Das humane Cytomegalievirus (HCMV) stellt immer noch eine der Hauptursachen für die Erkrankungen und Todesfälle nach allogener Knochenmark-/Stammzelltransplantation dar. Frühzeitige Diagnostik einer Cytomegalie-Reaktivierung nach Transplantation und medikamentöse antivirale Therapie sind allgemeine Massnahmen, die ergriffen werden. Weitere Bestrebungen für eine Wiederherstellung einer normalen schützenden Immunantwort, wie bei gesunden seropositiven Personen, sollten erfolgen.

In dieser Arbeit sollten ein KMT Empfänger im Vergleich zu seinem Spender auf Vorkommen von T-Zellen mit proliferativer Aktivität gegenüber HCMV-Protein untersucht werden. Dazu wurden HCMV-spezifische T-Zellen und Klone etabliert. Es fanden zwei Ansätze zur Klonierung peripherer HCMV-spezifischer Zellen des Patienten Verwendung, wobei der erste Etablierungsansatz nach Detektion der ersten proliferativen CD4⁺T-Zellantwort gegen HCMV 188 Tage nach KMT, der zweite nach Anstieg der T-Zellantwort gegen HCMV am Tag 325 nach KMT erfolgte. Der Patient entwickelte kurze Zeit nach KMT zwar eine Virämie (PCR), aber unter antiviraler Behandlung in dieser Zeit keine HCMV-Erkrankung. Eine FACS-Analyse bestätigte, dass es sich fast ausschließlich um CD4 positive spezifische T-Zell-Klone/-Linien handelte. Die nach den Klonierungsansätzen durchgeführten Proliferationsassays zeigten eine hauptsächliche Proliferationsantwort auf die HCMV-Envelope Glykoproteine gH und gB, wobei es bei den früh nach KMT gezogenen T-Zell-Klonen/-Linien sowohl zu gB- als auch zu gH-spezifischen T-Zell-Antworten etwa zu gleichen Teilen kam. Bei den T-Zell-Klonen/-Linien spät nach KMT konnte jedoch hauptsächlich eine gH-spezifische CD4⁺T-Zellantwort festgestellt werden.

Es ließ sich für das gH Protein ein neun Aminosäuren umfassendes Epitop gH16 (AS 278 - 286) definieren, wogegen die meisten gH-spezifischen Klone/Linien dominant gerichtet zu sein schienen. Für dieses Epitop wiesen die T-Zellklone/-Linien eine Restriktion für DRB1*1104 auf.

Die T-Zell-Klone/-Linien des Spenders zeigten in Proliferationsassays meistens ebenfalls eine HCMV-spezifische Reaktion mit Restriktion für HLA-DRB1*1104. Weitere Spezifizierungsversuche mit bekannten HCMV-Proteinen fielen bei allen eingesetzten Spender-T-Zellen negativ aus.

Die Untersuchungen deuten darauf hin, dass im Unterschied zu früher publizierten Beobachtungen einer bevorzugten Reaktion von zytotoxischen CD8 T-Zellen gegen das Matrixprotein pp65 die CD4 T-Zellantwort gegen HCMV dominant auch gegen andere virale Proteine, wahrscheinlich in Abhängigkeit vom HLA-Klasse II Genotyp gerichtet sein kann.

7. Literaturverzeichnis

- [1] **Adler, S.P., Starr, S.E., Plotkin, S.A., Hempfling, S.H., Buis, J., Manning, M.L., Best, A.M.** (1995) Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age. *J. Infect. Dis.* 171: 26-32.
- [2] **Alrabiah, F.A., Sacks, S.L.** (1996) New antiherpesvirus agents. Their targets and therapeutic potential. *Drugs* 52: 17-32.
- [3] **Appleton, A.L., Sviland, L.** (1993) Pathogenesis of GVHD: role of herpes viruses. *Bone Marrow Transplant.* 11: 349-355.
- [4] **Atkinson, K.** (1990) Reconstruction of the haemopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 5: 209-226.
- [5] **Aulitzky, W.E., Schulz, T.F., Tilg, H., Niederwieser, D., Larcher, K., Ostberg, L., Scriba, M., Martindale, J., Stern, A.C., Grass, P., et al.** (1991) Human monoclonal antibodies neutralizing cytomegalovirus (CMV) for prophylaxis of CMV disease: report of a phase I trial in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 163: 1344-1347.
- [6] **Bein, G., Bitsch, A., Hoyer, J., Steinhoff, J., Fricke, L., Machnik, H., Dennin, R., Kirchner, H.** (1993) A longitudinal prospective study of cytomegalovirus pp65 antigenemia in renal transplant recipients. *Transpl. Int.* 6: 185-190.
- [7] **Beninga, J., Kalbacher, H., Mach, M.** (1996) Analysis of T helper cell response to glycoprotein H (gpUL75) of human cytomegalovirus: evidence for strain-specific T cell determinants. *J. Infect. Dis.* 173: 1051-1061.
- [8] **Beninga, J., Kropff, B., Mach, M.** (1995) Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J. Gen. Virol.* 76: 153-160.
- [9] **Bernstein, D.I., Schleiss, M.R., Berencsi, K., Gonczol, E., Dickey, M., Khoury, P., Cadoz, M., Meric, C., Zahradnik, J., Duliege, A.M., Plotkin, S.** (2002) Effect of previous or simultaneous immunization with canarypox expressing cytomegalovirus (CMV) glycoprotein B (gB) on response to subunit gB vaccine plus MF59 in healthy CMV-seronegative adults. *J. Infect. Dis.* 185: 686-690.

- [10] **Boland, G.J., Vlieger, A.M., Ververs, C., De Gast, G.C.** (1992) Evidence for transfer of cellular and humoral immunity to cytomegalovirus from donor to recipient in allogeneic bone marrow transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 88: 506-511.
- [11] **Borysiewicz, L.K., Hickling, J.K., Graham, S., Sinclair, J., Cranage, M.P., Smith, G.L., Sissons, J.G.** (1988) Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J. Exp. Med.* 168: 919-931.
- [12] **Bowen, E.F., Emery, V.C., Wilson, P., Johnson, M.A., Davey, C.C., Sabin, C.A., Farmer, D., Griffiths, P.D.** (1998) Cytomegalovirus polymerase chain reaction viraemia in patients receiving ganciclovir maintenance therapy for retinitis. *Aids* 12: 605-611.
- [13] **Brady, M.T., Demmler, G.J., Reis, S.** (1988) Factors associated with cytomegalovirus excretion in hospitalized children. *Am. J. Infect. Control.* 16: 41-45.
- [14] **Britt, W.J., Vugler, L., Butfiloski, E.J., Stephens, E.B.** (1990) Cell surface expression of human cytomegalovirus (HCMV) gp55-116 (gB): use of HCMV-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response. *J. Virol.* 64: 1079-1085.
- [15] **Celis, E., Karr, R.W., Dietzschold, B., Wunner, W.H., Koprowski, H.** (1988) Genetic restriction and fine specificity of human T cell clones reactive with rabies virus. *J. Immunol.* 141: 2721-2728.
- [16] **Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., 3rd, Kouzarides, T., Martignetti, J.A., et al.** (1990) Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154: 125-169.
- [17] **Chicz, R.M., Urban, R.G., Gorga, J.C., Vignali, D.A., Lane, W.S., Strominger, J.L.** (1993) Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178: 27-47.
- [18] **Chou, S., Marousek, G., Guentzel, S., Follansbee, S.E., Poscher, M.E., Lalezari, J.P., Miner, R.C., Drew, W.L.** (1997) Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J. Infect. Dis.* 176: 786-789.
- [19] **Curtsinger, J.M., Liu, Y.N., Radeke, R., Bryon, M.K., Fuad, S., Bach, F.H., Gehrz, R.C.** (1994) Molecular analysis of the immune response to human cytomegalovirus glycoprotein B (gB). II. Low gB-

- specific T and B cell responses are associated with expression of certain HLA-DR alleles. *J. Gen. Virol.* 75: 301-307.
- [20] **Davis, L., Lipsky, P.E.** (1986) Signals involved in T cell activation. II. Distinct roles of intact accessory cells, phorbol esters, and interleukin 1 in activation and cell cycle progression of resting T lymphocytes. *J. Immunol.* 136: 3588-3596.
- [21] **de Jong, M.D., Galasso, G.J., Gazzard, B., Griffiths, P.D., Jabs, D.A., Kern, E.R., Spector, S.A.** (1998) Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res.* 39: 141-162.
- [22] **Demmler, G.J.** (1992) Acquired cytomegalovirus infections, pp. 1532-1547. *In* Demmler, G.J., Feigin, R.D., Cherry, J.D. (Eds.), *Textbook of Pediatric Infection Disease*. WB Saunders Co, Philadelphia.
- [23] **Diosi, P.** (1997) [Albert Jesionek tracking cytomegalovirus disease]. *Gesnerus* 54: 96-112.
- [24] **Dolstra, H., Preijers, F., Van de Wiel-van Kemenade, E., Schattenberg, A., Galama, J., de Witte, T.** (1995) Expansion of CD8⁺CD57⁺ T cells after allogeneic BMT is related with a low incidence of relapse and with cytomegalovirus infection. *Br. J. Haematol.* 90: 300-307.
- [25] **Drew, W.L.** (1988) Diagnosis of cytomegalovirus infection. *Rev. Infect. Dis.* 10 Suppl 3: S468-476.
- [26] **Einsele, H., Ehninger, G., Hebart, H., Wittkowski, K.M., Schuler, U., Jahn, G., Mackes, P., Herter, M., Klingebiel, T., Löffler, J., et al.** (1995) Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 86: 2815-2820.
- [27] **Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., Fischer, I., Bihler, S., Gerneth, F., Vallbracht, A., Schmidt, H., Waller, H.D., Müller, C.A.** (1993) Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood* 82: 1672-1678.
- [28] **Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., Vallbracht, A., Müller, M., Schmidt, H., Saal, J.G., Waller, H.D., Müller, C.A.** (1991) Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet* 338: 1170-1172.
- [29] **Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.G., Kanz, L., Kleihauer,**

- A., Frank, F., Jahn, G., Hebart, H.** (2002) Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99: 3916-3922.
- [30] **Einsele, H., Steidle, M., Vallbracht, A., Saal, J.G., Ehninger, G., Müller, C.A.** (1991) Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique. *Blood* 77: 1104-1110.
- [31] **Einsele, H., Vallbracht, A., Müller, C.A.** (1990) Comparison of different techniques for detection of cytomegalovirus infection following bone marrow transplantation. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 9: 595-600.
- [32] **Erice, A., Chou, S., Biron, K.K., Stanat, S.C., Balfour, H.H., Jr., Jordan, M.C.** (1989) Progressive disease due to ganciclovir-resistant cytomegalovirus in immunocompromised patients. *N. Engl. J. Med.* 320: 289-293.
- [33] **Erice, A., Gil-Roda, C., Perez, J.L., Balfour, H.H., Jr., Sannerud, K.J., Hanson, M.N., Boivin, G., Chou, S.** (1997) Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J. Infect. Dis.* 175: 1087-1092.
- [34] **Feurle.** (2001) Transfer T-zellulärer Immunität gegen HCMV vom Spender auf den Empfänger bei einer allogenen Knochenmarktransplantation. Medizinische Dissertation. Universität Tübingen.
- [35] **Forman, S.J., Zaia, J.A., Clark, B.R., Wright, C.L., Mills, B.J., Pottathil, R., Racklin, B.C., Gallagher, M.T., Welte, K., Blume, K.G.** (1985) A 64,000 dalton matrix protein of human cytomegalovirus induces in vitro immune responses similar to those of whole viral antigen. *J. Immunol.* 134: 3391-3395.
- [36] **Frey, S.E., Harrison, C., Pass, R.F., Yang, E., Boken, D., Sekulovich, R.E., Percell, S., Izu, A.E., Hirabayashi, S., Burke, R.L., Duliege, A.M.** (1999) Effects of antigen dose and immunization regimens on antibody responses to a cytomegalovirus glycoprotein B subunit vaccine. *J. Infect. Dis.* 180: 1700-1703.
- [37] **Gehrz, R.C., Fuad, S., Liu, Y.N., Bach, F.H.** (1987) HLA class II restriction of T helper cell response to cytomegalovirus (CMV). I. Immunogenetic control of restriction. *J. Immunol.* 138: 3145-3151.

- [38] **Gleaves, C.A., Reed, E.C., Hackman, R.C., Meyers, J.D.** (1987) Rapid diagnosis of invasive cytomegalovirus infection by examination of tissue specimens in centrifugation culture. *Am. J. Clin. Pathol.* 88: 354-358.
- [39] **Gratama, J.W., Zwaan, F.E., Stijnen, T., Weijers, T.F., Weiland, H.T., D'Amato, J., Hekker, A.C., The, T.H., de Gast, G.C., Vossen, J.M.** (1987) Herpes-virus immunity and acute graft-versus-host disease. *Lancet* 1: 471-474.
- [40] **Griffiths, P.D.** (1993) Current management of cytomegalovirus disease. *J. Med. Virol. Suppl.* 1: 106-111.
- [41] **Hammer, J., Belunis, C., Bolin, D., Papadopoulos, J., Walsky, R., Higelin, J., Danho, W., Sinigaglia, F., Nagy, Z.A.** (1994) High-affinity binding of short peptides to major histocompatibility complex class II molecules by anchor combinations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 4456-4460.
- [42] **Hammer, J., Takacs, B., Sinigaglia, F.** (1992) Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries. *J. Exp. Med.* 176: 1007-1013.
- [43] **Hamprecht, K., Jahn, G.** (1994) [Cytomegaloviruses--clinical aspects and therapy]. *Ther. Umsch.* 51: 551-557.
- [44] **Hebart, H., Kanz, L., Jahn, G., Einsele, H.** (1998) Management of cytomegalovirus infection after solid-organ or stem-cell transplantation. Current guidelines and future prospects. *Drugs* 55: 59-72.
- [45] **Hirsch, M.S.** (1995) Zytomegalie-Virusinfektion, pp. 949-952. *In* Isselbacher, Braunwald, Wilson, Martin, Fana, Kasper (Eds.), *Harrisons Innere Medizin*. McGraw-Hill, Inc., Health Professions Division, New York, London, Hamburg, Paris, Sydney, Tokyo.
- [46] **Holocher, R.** (1997) Untersuchung der HCMV-spezifischen Immunantwort anhand von pp65-spezifischen CD4+ T-Zellklonen eines Patienten nach Knochenmarktransplantation und seines Spenders. Medizinische Dissertation. Universität Tübingen.
- [47] **Hou, S., Doherty, P.C., Zijlstra, M., Jaenisch, R., Katz, J.M.** (1992) Delayed clearance of Sendai virus in mice lacking class I MHC-restricted CD8+ T cells. *J. Immunol.* 149: 1319-1325.
- [48] **Jabs, D.A., Enger, C., Bartlett, J.G.** (1989) Cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Ophthalmol.* 107: 75-80.

- [49] **Janeway, C.A., Travers, P.** (1997) Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- [50] **Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Busch, R., Rothbard, J., Strominger, J.L., Wiley, D.C.** (1990) Peptide binding to HLA-DR1: a peptide with most residues substituted to alanine retains MHC binding. *Embo. J.* 9: 1797-1803.
- [51] **Jesionek, A., Kiolemenoglou, B.** (1904) Ueber einen Befund von protozoenartigen Gebilden in den Organen eines hereditär-luetischen Fötus. *Münch. Med. Wschr.* 51: 1905-1907.
- [52] **Jonjic, S., Mutter, W., Weiland, F., Reddehase, M.J., Koszinowski, U.H.** (1989) Site-restricted persistent cytomegalovirus infection after selective long-term depletion of CD4+ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 169: 1199-1212.
- [53] **Jonjic, S., Pavic, I., Lucin, P., Rukavina, D., Koszinowski, U.H.** (1990) Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.* 64: 5457-5464.
- [54] **Klebster, R.G., Granoff, A.** (1994) Cytomegaloviruses, pp. 292-312. *In* Webster, R.G., Granoff, A. (Eds.), *Encyclopedia of virology*. Academic Press, Harcourt Brace and Company Publishers, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto.
- [55] **Knox, K.K., Drobyski, W.R., Carrigan, D.R.** (1991) Cytomegalovirus isolate resistant to ganciclovir and foscarnet from a marrow transplant patient. *Lancet* 337: 1292-1293.
- [56] **Koszinowski, U.H., Del Val, M., Reddehase, M.J.** (1990) Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection, pp. 189-220. *In* McDougall, J.K. (Ed.), *Cytomegaloviruses*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong.
- [57] **Kourilsky, P., Claverie, J.M.** (1989) MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see? *Adv. Immunol.* 45: 107-193.
- [58] **Krause, H.** (1996) Charakterisierung der HCMV-spezifischen T-Zellantwort nach allogener Knochenmarktransplantation. Naturwissenschaftliche Dissertation. Universität Tübingen.
- [59] **Krech, U.** (1994) Zytomegalie, pp. 255-261. *In* Reploh, H., Brandis, H., Ansorg, R. (Eds.), *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. Fischer, Stuttgart, Jena, New York.

- [60] **Kropshofer, H., Max, H., Muller, C.A., Hesse, F., Stevanovic, S., Jung, G., Kalbacher, H.** (1992) Self-peptide released from class II HLA-DR1 exhibits a hydrophobic two- residue contact motif. *J Exp Med* 175: 1799-1803.
- [61] **Levin, M.J., Parkman, R., Oxman, M.N., Rapoport, J.M., Simpson, M., Leary, P.L.** (1978) Proliferative and interferon responses by peripheral blood mononuclear cells after bone marrow transplantation in humans. *Infect. Immun.* 20: 678-684.
- [62] **Li, C.R., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Goodrich, J.M., Riddell, S.R.** (1994) Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83: 1971-1979.
- [63] **Lichtenfels, R., Biddison, W.E., Schulz, H., Vogt, A.B., Martin, R.** (1994) CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based test system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. *J. Immunol. Methods* 172: 227-239.
- [64] **Lindsley, M.D., Torpey, D.J., 3rd, Rinaldo, C.R., Jr.** (1986) HLA-DR-restricted cytotoxicity of cytomegalovirus-infected monocytes mediated by Leu-3-positive T cells. *J. Immunol.* 136: 3045-3051.
- [65] **Liu, Y.N., Curtsinger, J., Donahue, P.R., Klaus, A., Optiz, G., Cooper, J., Karr, R.W., Bach, F.H., Gehrz, R.C.** (1993) Molecular analysis of the immune response to human cytomegalovirus glycoprotein B. I. Mapping of HLA-restricted helper T cell epitopes on gp93. *J. Gen. Virol.* 74: 2207-2214.
- [66] **Ljungman, P., Aschan, J., Azinge, J.N., Brandt, L., Ehrnst, A., Hammarstrom, V., Klaesson, S., Linde, A., Lonnqvist, B., Ringden, O., et al.** (1993) Cytomegalovirus viraemia and specific T-helper cell responses as predictors of disease after allogeneic marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 83: 118-124.
- [67] **Löffler, J.** (1994) Vergleich von PCR, Plasma-PCR und Antigentest zum Nachweis von Cytomegalievirusinfektionen nach Knochenmarktransplantation. Diplomarbeit, Fakultät Biologie, Universität Tübingen.
- [68] **Luthardt.** (1976) Cytomegalie. Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart.
- [69] **Marshall, G.S., Rabalais, G.P., Stout, G.G., Waldeyer, S.L.** (1992) Antibodies to recombinant-derived glycoprotein B after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity. *J. Infect. Dis.* 165: 381-384.

- [70] **McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S.J., Tanamachi, B., Li, C.R., Zaia, J.A., Greenberg, P.D., Riddell, S.R.** (1994) Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Med. Virol. Suppl.* 43: 103-110.
- [71] **Meuer, S.C., Hodgdon, J.C., Cooper, D.A., Hussey, R.E., Fitzgerald, K.A., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L.** (1983) Human cytotoxic T cell clones directed at autologous virus-transformed targets: further evidence for linkage of genetic restriction to T4 and T8 surface glycoproteins. *J. Immunol.* 131: 186-190.
- [72] **Meyers, J.D., Flournoy, N., Thomas, E.D.** (1980) Cytomegalovirus infection and specific cell-mediated immunity after marrow transplant. *J. Infect. Dis.* 142: 816-824.
- [73] **Moller, J., Hofmann, B., Jacobsen, N., Ryder, L.P., Platz, P., Dickmeiss, E., Svejgaard, A.** (1993) Defective T-cell stimulatory pathways in patients after allogeneic bone marrow transplantation (BMT) in man. *Apmis* 101: 480-486.
- [74] **Müller, C.A., Einsele, H.** (1992) Influence of human cytomegalovirus on immune reconstitution after bone marrow transplantation. *Ann Hematol* 64 Suppl: A140-142.
- [75] **Müller, C.A., Hebart, H., Roos, A., Roos, H., Steidle, M., Einsele, H.** (1995) Correlation of interstitial pneumonia with human cytomegalovirus- induced lung infection and graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl)* 184: 115-121.
- [76] **Müller, G.A., Braun, N., Einsele, H., Müller, C.A.** (1993) Human cytomegalovirus infection in transplantation. *Nephron* 64: 343-353.
- [77] **Noel, D.R., Witherspoon, R.P., Storb, R., Atkinson, K., Doney, K., Mickelson, E.M., Ochs, H.D., Warren, R.P., Weiden, P.L., Thomas, E.D.** (1978) Does graft-versus-host disease influence the tempo of immunologic recovery after allogeneic human marrow transplantation? An observation on 56 long-term survivors. *Blood* 51: 1087-1105.
- [78] **Ottenhoff, T.H., Neuteboom, S., Elferink, D.G., de Vries, R.R.** (1986) Molecular localization and polymorphism of HLA class II restriction determinants defined by Mycobacterium leprae-reactive helper T cell clones from leprosy patients. *J. Exp. Med.* 164: 1923-1939.

- [79] **Pass, R.F., Duliege, A.M., Boppana, S., Sekulovich, R., Percell, S., Britt, W., Burke, R.L.** (1999) A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J. Infect. Dis.* 180: 970-975.
- [80] **Pawelec, G.** (1993) Cloning and propagation of human T-lymphocytes, pp. 131-141. *In* IRL press, Oxford.
- [81] **Pawelec, G., Buhring, H.J.** (1990) Expression of MHC class II epitopes on human T lymphocyte clones. *Cell. Immunol.* 127: 520-526.
- [82] **Paya, C.V., Wold, A.D., Smith, T.F.** (1987) Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* 25: 755-757.
- [83] **Plotkin, S.A., Furukawa, T., Zygraich, N., Huygelen, C.** (1975) Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect. Immun.* 12: 521-527.
- [84] **Plotkin, S.A., Higgins, R., Kurtz, J.B., Morris, P.J., Campbell, D.A., Jr., Shope, T.C., Spector, S.A., Dankner, W.M.** (1994) Multicenter trial of Towne strain attenuated virus vaccine in seronegative renal transplant recipients. *Transplantation* 58: 1176-1178.
- [85] **Plotkin, S.A., Starr, S.E., Friedman, H.M., Brayman, K., Harris, S., Jackson, S., Tustin, N.B., Grossman, R., Dafoe, D., Barker, C.** (1991) Effect of Towne live virus vaccine on cytomegalovirus disease after renal transplant. A controlled trial. *Ann. Intern. Med.* 114: 525-531.
- [86] **Polic, B., Jonjic, S., Pavic, I., Crnkovic, I., Dujmovic, M., Zorica, I., Hengel, H., Kucic, N., Lucin, P., Koszinowski, U.H.** (1995) Control of cytomegalovirus infection in MHC class I deficient mice. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 99: 52-53.
- [87] **Quinnan, G.V., Jr., Kirmani, N., Rook, A.H., Manischewitz, J.F., Jackson, L., Moreschi, G., Santos, G.W., Saral, R., Burns, W.H.** (1982) Cytotoxic T-cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 307: 7-13.
- [88] **Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N.P., Bachor, O.A., Stevanovic, S.** (1999) SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.

- [89] **Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanović, S.** (1995) MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228.
- [90] **Rasmussen, L., Matkin, C., Spaete, R., Pahl, C., Merigan, T.C.** (1991) Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J. Infect. Dis.* 164: 835-842.
- [91] **Rasmussen, L., Morris, S., Wolitz, R., Dowling, A., Fessell, J., Holodniy, M., Merigan, T.C.** (1994) Deficiency in antibody response to human cytomegalovirus glycoprotein gH in human immunodeficiency virus-infected patients at risk for cytomegalovirus retinitis. *J. Infect. Dis.* 170: 673-677.
- [92] **Reddehase, M.J.** (1995) Cytomegalievirus-Infektion. Sonderdruck aus "Die gelben Hefte" 3: 95-103.
- [93] **Reddehase, M.J., Dreher-Stumpp, L., Angele, P., Baltesen, M., Susa, M.** (1992) Hematopoietic stem cell deficiency resulting from cytomegalovirus infection of bone marrow stroma. *Ann. Hematol.* 64 Suppl: A125-127.
- [94] **Reddehase, M.J., Mutter, W., Munch, K., Buhning, H.J., Koszinowski, U.H.** (1987) CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. Virol.* 61: 3102-3108.
- [95] **Reddehase, M.J., Rothbard, J.B., Koszinowski, U.H.** (1989) A pentapeptide as minimal antigenic determinant for MHC class I-restricted T lymphocytes. *Nature* 337: 651-653.
- [96] **Reed, E.C., Bowden, R.A., Dandliker, P.S., Gleaves, C.A., Meyers, J.D.** (1987) Efficacy of cytomegalovirus immunoglobulin in marrow transplant recipients with cytomegalovirus pneumonia. *J. Infect. Dis.* 156: 641-645.
- [97] **Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D., Greenberg, P.D.** (1991) Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78: 1373-1380.
- [98] **Riddell, S.R., Greenberg, P.D.** (1990) The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J. Immunol. Methods* 128: 189-201.
- [99] **Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., Greenberg, P.D.** (1992) Restoration of viral immunity in

- immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257: 238-241.
- [100] **Riley, H.D., Jr.** (1997) History of the cytomegalovirus. *South. Med. J.* 90: 184-190.
- [101] **Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C., Huebner, R.J.** (1956) Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 92: 418-424.
- [102] **Santamaria, P., Bryan, M.K., Barbosa, J.** (1990) Long term expansion of cytomegalovirus-specific T cell lines in the absence of antigen or antigen-presenting cells. Use of monosized polystyrene particles coated with agonistic antibodies. *J. Immunol. Methods* 132: 1-11.
- [103] **Schoppel, K., Kropff, B., Schmidt, C., Vornhagen, R., Mach, M.** (1997) The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies. *J. Infect. Dis.* 175: 533-544.
- [104] **Schütt, K.H., Musiol, N.** (1984) Erfahrungen und organisatorische Probleme bei der Spenderselektierung für die Bluttransfusionsdienste, pp. 83-87. *In* Luthardt, T. (Ed.), *Transfusionsbedingte Zytomegalievirusinfektionen*. Steinkopff, Darmstadt.
- [105] **Sinigaglia, F., Matile, H., Pink, J.R.** (1987) Plasmodium falciparum-specific human T cell clones: evidence for helper and cytotoxic activities. *Eur. J. Immunol.* 17: 187-192.
- [106] **Speer, C.** (1994) *Grundzüge der Neonatologie*, Universität Tübingen.
- [107] **Stern, L.J., Brown, J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C., Urban, R.G., Strominger, J.L., Wiley, D.C.** (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368: 215-221.
- [108] **The, T.H., van der Ploeg, M., van den Berg, A.P., Vlieger, A.M., van der Giessen, M., van Son, W.J.** (1992) Direct detection of cytomegalovirus in peripheral blood leukocytes--a review of the antigenemia assay and polymerase chain reaction. *Transplantation* 54: 193-198.
- [109] **Urban, M., Britt, W., Mach, M.** (1992) The dominant linear neutralizing antibody-binding site of glycoprotein gp86 of human cytomegalovirus is strain specific. *J. Virol.* 66: 1303-1311.

- [110] **Urban, M., Klein, M., Britt, W.J., Hassfurther, E., Mach, M.** (1996) Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J. Gen. Virol.* 77: 1537-1547.
- [111] **van Binnendijk, R.S., Poelen, M.C., de Vries, P., Voorma, H.O., Osterhaus, A.D., Uytdehaag, F.G.** (1989) Measles virus-specific human T cell clones. Characterization of specificity and function of CD4+ helper/cytotoxic and CD8+ cytotoxic T cell clones. *J. Immunol.* 142: 2847-2854.
- [112] **van der Bij, W., Schirm, J., Torensma, R., van Son, W.J., Tegzess, A.M., The, T.H.** (1988) Comparison between viremia and antigenemia for detection of cytomegalovirus in blood. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2531-2535.
- [113] **van Zanten, J., Harmsen, M.C., van der Meer, P., van der Bij, W., van Son, W.J., van der Giessen, M., Prop, J., de Leij, L., The, T.H.** (1995) Proliferative T cell responses to four human cytomegalovirus-specific proteins in healthy subjects and solid organ transplant recipients. *J. Infect. Dis.* 172: 879-882.
- [114] **Verreck, F.A., van de Poel, A., Drijfhout, J.W., Amons, R., Coligan, J.E., Konig, F.** (1996) Natural peptides isolated from Gly86/Val86-containing variants of HLA- DR1, -DR11, -DR13, and -DR52. *Immunogenetics* 43: 392-397.
- [115] **Vinters, H.V., Ferreira, J.A.** (1993) Pathology of human cytomegalovirus infection. *In* Becker, Y. (Ed.), *Molecular aspects of human cytomegalovirus diseases*. Springer Verlag, Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest.
- [116] **Walter, E.A., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Finch, R.J., Watanabe, K.S., Thomas, E.D., Riddell, S.R.** (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N. Engl. J. Med.* 333: 1038-1044.
- [117] **Waner, J.L., Budnick, J.E.** (1977) Blastogenic response of human lymphocytes to human cytomegalovirus. *Clin. Exp. Immunol.* 30: 44-49.
- [118] **Winston, D.J., Ho, W.G., Champlin, R.E.** (1991) Ganciclovir and intravenous immunoglobulin in bone marrow transplants, pp. 337-348. *In* Gale, R.P., Champlin, R.E. (Eds.), *New strategies in bone marrow transplantation*. Wiley-Liss, New York.
- [119] **Witherspoon, R.P., Matthews, D., Storb, R., Atkinson, K., Cheever, M., Deeg, H.J., Doney, K., Kalbfleisch, J., Noel, D., Prentice, R.,**

et al. (1984) Recovery of in vivo cellular immunity after human marrow grafting. Influence of time postgrafting and acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 37: 145-150.

Danksagung

Ich danke

Frau Professor C. A. Müller für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung sehr guter Arbeitsbedingungen, die gute Betreuung während der gesamten Zeit meiner experimentellen Tätigkeit im Labor und der Zeit der Zusammenfassung,

Helga Krause für die sehr gute Anleitung und Betreuung zu Beginn meiner Arbeit,

Simone Seybold, Friederike Frank, Jürgen Löffler, Rainer Holocher für ihre grosse Hilfsbereitschaft bei Fragen oder Problemen und für eine immer angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre,

dem gesamten Team des GvH Labors für die vielen Hilfen während der Zeit im Labor,

meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht unterstützt haben und mir diesen Bildungsweg ermöglichten, meinen Geschwistern, meiner Patentante Else Götz,

Oliver Meißner für die unzählbaren Hilfestellungen und Aufmunterungen, der immer da war, wenn ich ihn brauchte,

Richard Traunecker für seine grosse Hilfsbereitschaft,

meinen Freunden und Freundinnen sowie allen ungenannten Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Diana Thunemann
Mühlweg 12
72072 Tübingen

geboren 02. April 1968 in Reutlingen

Bildungsweg

1974 – 1978	Grundschule Leonberg/Württ. und Münsingen/Württ.
1978 – 1987	Besuch des Gymnasiums in Münsingen/Württ.
1987	Allgemeine Hochschulreife
Sept. 1987 - Jun. 1990	Ausbildung zur Arzthelferin
Jun. 1990	Abschlussprüfung (Arzthelferin)
Jun. 1990 – Sept. 1990	Arzthelferin (gynäkol.-geburtshilfl. Praxis)
Okt. 1990 – Apr. 1993	Studium der Biologie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Juni 1992	Vordiplomprüfung Biologie
Apr. 1993	Beginn des Humanmedizin-Studiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
Apr. 1994	Ärztliche Vorprüfung
Apr. 1995	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juli 1996	Beginn des experimentellen Teils der Doktorarbeit an der Medizinischen Klinik II Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie
Apr. 1998	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11. Mai 1999	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Juni 1999	Approbation zur Ärztin
Dez. 1999 – Mai 2001	Ärztin im Praktikum, Zentrum für Hautkrankheiten Bad Cannstatt (Klinik für Dermatologie/Venerologie und Phlebologie, PD Dr. Keller)
Nov. 2001 – Okt. 2002	Weiterbildungsassistentin Hautarztpraxis B. Hornung, Facharzt für Dermatologie/Venerologie, Allergologie, Phlebologie, Umweltmedizin, Marburg/Lahn
Seit Nov. 2002	Weiterbildungsassistentin Hautarztpraxis Dr. Bern, Facharzt für Dermatologie/Venerologie, Phlebologie, Allergologie, Umweltmedizin, Tübingen