

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Definition eines HLA-Klasse II restringierten

HCMV-Peptids mittels

Epitopvorhersage

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

der

MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der Eberhard Karls Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

Christine Renner

aus Stuttgart

2005

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Hebart
2. Berichterstatter Privatdozent Dr. C. Sinzger

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	4
1.1. Das Humane Zytomegalievirus (HCMV)	4
1.1.1. Eigenschaften	4
1.1.2. Epidemiologie	5
1.1.3. Klinik	5
1.1.4. Diagnostik der HCMV-Infektion	6
1.1.5. Therapie der HCMV-Infektion	7
1.1.6. Adoptive Immuntherapie der HCMV-Infektion	9
1.2. Das Immunsystem	10
1.2.1. Antigenerkennung durch T-Zellen	10
1.2.2. MHC-Komplex und Erkennungsmechanismen	11
1.2.3. Immunantwort gegen HCMV	11
1.3. Zielsetzung	14
2. Materialien und Methoden	15
2.1. Geräte und Materialien	15
2.2. Verbrauchsgegenstände und –materialien	15
2.3. Reagenzien und Chemikalien	16
2.4. Kits	17
2.5. HCMV-Lysat	17
2.6. HCMV-Peptide	18
2.6.1. HLA-DR1-Motivpeptide aus dem pp65 HCMV-Protein	18
2.6.2. HLA-DR3-Motivpeptide aus dem pp65 HCMV-Protein	18
2.7.3. HLA-DR4-Motivpeptide aus dem pp65 HCMV-Protein	19
2.6.4. HLA-DR7-Motivpeptide aus dem pp65 HCMV-Protein	19
2.6.5. HLA-DR11-Motivpeptide aus dem pp65 HCMV-Protein	19
2.6.6. HLA-DR7-Motivpeptide aus dem IE-HCMV-Protein	20
2.7. Peptidaufbereitung	20
2.8. PBMNCs von HLA-DR-typisierten Blutspendern	20
2.9. Allgemeine Zellkulturmethoden	21

2.9.1. Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten (PBMLCs)	21
2.9.2. Zellzählung	21
2.9.3. Einfrieren von Zellen	22
2.9.4. Auftauen von Zellen	22
2.10. Zellstimulation	22
2.11. RNA-Isolierung	23
2.12. Umschreibung von RNA in cDNA	24
2.13. Die konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.13.1. Prinzip	25
2.13.2. Durchführung der PCR	26
2.13.3. Zeit- und Temperaturprofil	27
2.13.4. Analyse der PCR-Amplifikate in der Gelelektrophorese	27
2.14. Real-Time-PCR (Light Cycler®)	28
2.14.1. Prinzip	28
2.14.2. Durchführung	29
2.14.3. Zeit- und Temperaturprofil	30
2.14.4. SYBR Green I Farbstoff	30
2.14.5 FRET-Hybridisierungssonden	31
2.14.6. Auswertung der Fluoreszenzsignale	31
2.14.7. Schmelzkurvenanalyse	32
2.15. HCMV-Proliferationsassay	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Epitopvorhersage	34
3.2. Eingesetzte HCMV-Proteine	35
3.3. Ergebnisse aus PCR und Proliferationsassay	35
3.4. HLA-DR11- HCMV-Peptid aus dem pp65 Matrixprotein	36
3.5. MHC-Restriktion der eingesetzten HCMV-Motivpeptide	37
3.6. Gesamtergebnisse	38
3.7. Exaktere Quantifizierung mittels Light Cycler	44

4. Diskussion	44
4.1. HCMV-Immuntherapie	44
4.2. Definition HLA-Klasse-II-restringierter HCMV-Peptide	46
4.3. MHC-Restriktion viraler Proteine	46
4.4. Länge der von MHC-Klasse-II-Molekülen bindenden Peptide	47
4.5. Immunevasionsmechanismen von HCMV	48
4.6. Bestätigung des DR-11-HCMV-Peptids	48
5. Abkürzungsverzeichnis	49
6. Zusammenfassung	51
7. Literaturverzeichnis	52
8. Lebenslauf	62

1. Einleitung

1.1. Das Zytomegalievirus

1.1.1. Eigenschaften

Im Jahre 1881 wurde die Zytomegalie durch den Pathologen H. Ribbert entdeckt (Ribbert 1904). 1960 prägte dann Weller im Hinblick auf die zellulären Veränderungen den Ausdruck „cytomegalic inclusion disease“ (CID) – Zytomegalie.

HCMV wird auch als humanes Herpesvirus 5 (HHV-5) bezeichnet und gehört zur Familie der Herpesviridae, wobei die Vertreter dieser Familie streng speziesspezifisch sind. Wie alle Herpesviren besitzt HCMV die Fähigkeit, nach der Infektion lebenslänglich im Organismus zu persistieren (Hampel et Mertens, 2001).

Die persistierenden Viren können unter bestimmten Umständen reaktiviert werden, so zum Beispiel bei Tumorerkrankungen, in der Schwangerschaft, sowie bei Unterdrückung des Immunsystems durch HIV oder durch zytostatische und immunsuppressive Medikamente.

Das reife Viruspartikel besteht aus dem Kern (Core), der das Genom als doppelsträngige DNA enthält, dem Kapsid, dem Tegument und der Lipidhülle (Envelope). HCMV besitzt mit 240 kb und einer Kodierungskapazität von mehr als 200 viralen Genprodukten das größte Genom aller humanen Herpesviren.

Das Tegument, zwischen Envelope und Kapsid gelegen, enthält unter anderem das Matrixprotein pp65, das bei einer Infektion sofort in den Kern der Wirtszelle transportiert wird (Chee et al., 1990).

HCMV adsorbiert an bislang unbekannte Zellrezeptoren der Zellmembran und gelangt nach Fusion der Virushülle mit der zellulären Plasmamembran in das Zytoplasma. Kaskadenartig mit strenger zeitlicher Abfolge laufen in der infizierten Zelle dann die folgenden Syntheseschritte ab:

Die alpha-Gen-Expression in der sehr frühen (immediate early, IE) Phase führt zur Bildung viraler Funktionsproteine, den IE-Proteinen, die für die Regulation der Transkription viraler und zellulärer Gene in der HCMV-infizierten Zelle wichtig sind.

In der beta-Gen-Expression in der frühen (early, E) Phase werden Proteine synthetisiert, die für die virale DNA-Replikation erforderlich sind, sowie bereits einige Strukturproteine.

Die gamma-Gen-Expression läßt sich unterteilen in eine frühe (early) Phase mit Synthese u.a. des Phosphoproteins pp65 der späteren Matrix und in eine späte (late) Phase, in der nach Beginn der viralen DNA-Synthese die Strukturproteine des Viruskapsids und die Glykoproteine der Virushülle gebildet werden.

1.1.2. Epidemiologie

HCMV ist weltweit verbreitet, wobei der Mensch einziger Wirt des Virus ist. Die Übertragung bei postnataler Infektion erfolgt bei engen Kontakten (Schmierinfektion, Sexualkontakte) mit HCMV-seropositiven Personen überwiegend über Speichel, Urin und genitale Ausscheidungen. Pränatal erfolgt die Infektion transplazentar (hämatogen), perinatal durch Zervixsekret oder anschließend in der Stillperiode über Muttermilch. Zunehmend bedeutsam werden bei Risikopatienten außerdem die iatrogenen Übertragungen durch transfundiertes Blut oder transplantierte Organe von HCMV-seropositiven Spendern.

Die natürlichen Durchseuchungsgipfel liegen im Neugeborenenalter/Kleinkindesalter und im jungen Erwachsenenalter. Abhängig vom geographischen Gebiet und dem soziohygienischen Status liegen die Durchseuchungsraten weltweit zwischen 40 und 100%.

1.1.6. Klinik

Die postnatale Infektion verläuft in aller Regel unerkannt ohne Symptomatik oder selten mit unspezifischer Symptomatik ähnlich einer infektiösen Mononukleose. Nach kurzer zellassoziierter Virämie repliziert HCMV vorzugsweise in duktalem Epithel, insbesondere in den Azini der Speicheldrüsen. Entsprechend den primären Replikationsorten wird HCMV über Speichel, Urin, Zervixsekret und die Muttermilch

ausgeschieden und übertragen. Die Primärinfektion führt bei Gesunden zur Serokonversion.

Der benigne Verlauf der Primärinfektion ist das Resultat einer effektiven Kontrolle der Virusreplikation durch das Immunsystem des immunkompetenten Organismus.

Zum klinischen Problem wird die HCMV-Infektion nur dann, wenn die natürliche immunologische Kontrolle ausbleibt.

So führt bei der Primärinfektion der Schwangeren die kongenitale HCMV-Infektion nach transplazentarer Übertragung zu Embryopathien. Risikogruppen sind ferner Patienten mit erworbener Immundefizienz (AIDS), Kinder mit genetisch bedingter Immundefizienz sowie Patienten mit therapiebedingter iatrogener Immunsuppression. Dazu zählen Empfänger von Organtransplantaten und insbesondere Patienten nach Knochenmarktransplantation (KMT). HCMV ist der am häufigsten auftretende virale Krankheitserreger bei Transplantatempfängern und einer der wichtigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität bei diesen Personen (Trenschel et al., 2000; Ho, 1994). Nach einer Organtransplantation kommt es in fast allen seropositiven Patienten zu einer Reaktivierung der latenten HCMV-Infektion. Primärinfektionen werden hauptsächlich durch Bluttransfusionen oder durch das transplantierte Organ auf den Empfänger übertragen. Die HCMV-Erkrankung im Rahmen der soliden Organtransplantation ist häufig mit der Abstoßung des transplantierten Organs assoziiert. Seltener sind Organinfektionen wie Hepatitis oder Pneumonitis, die insbesondere nach allogener Stammzelltransplantation beobachtet werden (Winston et al., 1990; Ho 1991). Dabei korreliert das Risiko einer HCMV-Erkrankung mit dem Grad und der Dauer der Immunsuppression.

1.1.7. Diagnostik der HCMV-Infektion

Eine HCMV-Infektion bzw. eine HCMV-assoziierte Erkrankung lässt sich durch Isolierung des Virus in der Kultur und mit Hilfe serologischer und molekularbiologischer Methoden nachweisen. Neben dem klassischen zytopathischen Effekt wird HCMV in der Kultur mit HCMV-spezifischen Antikörpern nachgewiesen (Gleaves et al., 1985). Serologisch erfolgt der Nachweis mittels eines Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA), bei dem IgM (akute Infektion) und IgG (nach Infektion zeitlebens nachweis-

bar) differenziert werden können. Die HCMV-Virämie ist ein ungünstiger prognostischer Marker für das Auftreten einer Erkrankung (Schmidt et al., 1991). Langzeitstudien bei Transplantatempfängern und HIV-infizierten Personen haben gezeigt, dass der Nachweis der Antigenämie über das virale Tegument-protein pp65 in Blutleukozyten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (Boeckh et al., 1992) Aufschluss über den Krankheitsverlauf gibt. Dies gilt auch für den HCMV-DNA-Nachweis mittels der PCR im Blut (Einsele et al., 1993 und 1995; Rasmussen et al., 1997; Spector et al., 1998). Zudem ist es möglich, mit quantitativen Methoden (quantitative PCR) die Wirksamkeit der Behandlung zu überwachen und nötigenfalls die Therapiemodalitäten anzupassen (Einsele et al., 1995; Spector et al., 1998).

1.8. Therapie der HCMV-Infektion

Versuche zur Prävention der HCMV-Infektion durch Vakzination mit attenuierten HCMV-Stämmen wurden bereits in den frühen 70er Jahren unternommen (Plotkin et al., 1975; Plotkin et al., 1989). Wegen der Fähigkeit der Virusinfektion zur Latenzbildung, zum chronischen Verlauf, der Möglichkeit von Superinfektionen mit virulenten Wildvirusstämmen sowie des potentiell onkogenen Charakters von Impfungen steht heute die Entwicklung nichtinfektiöser viraler „Subunit-Vakzinen“ im Vordergrund.

Für die passive Immunisierung stehen Hyperimmunglobulin-Präparate mit hohen Antikörpertitern gegen HCMV zur Verfügung. Bei Organtransplantationen konnte mit Hilfe HCMV-spezifischer Antikörper die Schwere der Krankheit reduziert werden, eine Erkrankung konnte jedoch nicht verhindert werden (Bachmann et al. 1997).

Die kombinierte Gabe von Hyperimmunglobulinen und Ganciclovir führte zu einer Verminderung der Sterblichkeit der interstitiellen Pneumonie früh nach allogener Stammzelltransplantation, doch auf lange Sicht ist die Überlebensrate von Patienten nach HCMV-Erkrankung gering (Emanuel et al., 1988; Reed et al., 1988; Ljungman et al., 1992).

Die antivirale Therapie bei dokumentiertem HCMV-Nachweis bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation erfolgt derzeit routinemäßig mit Ganciclovir oder bei Kontraindikationen gegen Ganciclovir mit Foscarnet.

Ganciclovir ist ein HCMV- bzw. Herpesvirus-spezifischer Guanosin-Antimetabolit, der nach Phosphorylierung durch virale Kinasen als Ganciclovir-Triphosphat in die virale DNA eingebaut wird und zum Abbruch oder einer deutlichen Beschränkung der viralen DNA-Elongation führt. Ganciclovir hat zahlreiche Nebenwirkungen, wovon vor allem die Myelosuppression für Patienten nach Stammzelltransplantation von großer Bedeutung ist.

Nach erfolgloser Behandlung mit Ganciclovir (wegen einer möglichen Unwirksamkeit oder Resistenz) und bei Patienten mit bereits eingeschränkter Knochenmarksfunktion kommt Foscarnet zum Einsatz. Dessen virostatistische Wirkung beruht auf einer allosterischen Hemmung viraler Enzyme wie der DNA-Polymerase und der Reversen Transkriptase. Foscarnet hat ein anderes Nebenwirkungsspektrum als Ganciclovir, hier wird der Einsatz vor allem durch die Nephrotoxizität limitiert (Aschan et al., 1992; Bowden et al., 1991).

Die antiviralen Therapeutika führen jedoch nicht immer zu einer vollständigen Unterdrückung der Virusreplikation, so dass zunehmend Resistenzen gegen diese Virustatika beschrieben wurden (Erice et al., 1997; Alain et al., 1997; Bowen et al., 1998).

Ein Problem bei der bis jetzt routinemäßig durchgeführten Behandlung mit Ganciclovir ist auch das vermehrte Auftreten von späten HCMV-Erkrankungen >Tag 100 nach Transplantation (Einsele et al., 2000). Ein wesentlicher Risikofaktor für das Auftreten einer späten HCMV-Infektion war die längere Behandlung (über 4 Wochen) mit Ganciclovir.

Nach erfolgloser Therapie mit Ganciclovir oder Foscarnet kann als second-line-Therapeutikum Cidovir eingesetzt werden, auf welches in einer Studie (Ljungman et al. 2001) 66% der untersuchten Patienten, die zuvor erfolglos mit herkömmlichen Virustatika behandelt worden waren, ansprachen.

Allgemein ist für die Therapieindikation neben der Klinik die HCMV-Last im Blut entscheidend, da Infektionen oft asymptomatisch sind und eine bestehende Organmanifes-

tation nicht immer leicht als HCMV-Erkrankung zu erkennen ist. Zur Identifikation und zum Therapiemonitoring eignen sich der quantitative HCMV-pp65-Antigennachweis und der quantitative HCMV-DNA-Nachweis mittels PCR in peripheren Blutzellen.

1.1.9. Adoptive Immuntherapie der HCMV-Infektion

In Entwicklung ist die adoptive Behandlung mit HCMV-spezifischen, *in vitro* expandierten T-Zellklonen von seropositiven Donoren (Riddell et al, 1992, Walter et al. 1995, Einsele et al., 2002).

Die Erkenntnis, dass der zellulären Immunantwort eine wesentliche Rolle in der Kontrolle der HCMV-Infektion zukommt, führte zum Konzept des adoptiven Immuntransfers mit HCMV-spezifischen T-Zellen.

Verschiedene Strategien zur Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen sind beschrieben worden. Erfolgreich war beispielsweise die *ex vivo* Induktion HCMV-spezifischer CTLs mittels HCMV-infizierter Fibroblasten als Stimulator-Zellen (Walter et al., 1995), doch für den klinischen Einsatz sind diese Methoden ungeeignet, da die Stimulation von HCMV-Viren ein nicht zu unterschätzendes Infektionsrisiko darstellt.

Die *ex vivo* Induktion HCMV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe dendritischer Zellen, die entweder mit HCMV-Peptiden (Szmania et al., 2001; Kleihauer et al., 2001) oder mit HCMV-Antigen (Peggs et al., 2001, Einsele et al., 2002) gepulst werden, ist ebenfalls erfolgsversprechend. Der Nachteil hierbei liegt in der arbeitsintensiven und zeitaufwendigen *ex vivo* Expansion über mehrere Wochen, was aber auch für die Stimulation mit HCMV-infizierten Fibroblasten zutrifft.

In der T-Zelltherapie der HCMV-Infektion sind in der Vergangenheit vorwiegend CD8⁺ T-Zellen zum Einsatz gelangt, da diese in der Akutphase primär für den Schutz vor einer HCMV-Erkrankung erforderlich sind.

Für eine langdauernde Persistenz der transferierten CD8⁺ T-Zellen scheint die zusätzliche Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen wichtig zu sein. Diese senden Wachstumsfaktoren aus, wie z.B. IL-2, und vermitteln kostimulierende Signale (Schoenberger et al.,

1998; Sarawar et al., 2001), die eine Aufrechterhaltung der zytotoxischen CD8 + T-Zell-Antwort unterstützen.

So konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der infundierten HCMV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen gerade bei den Patienten auftrat, die keine spezifische CD4+ T-Helferantwort zeigten. Der Nachweis einer HCMV-spezifischen T-Helferantwort nach Infusion war mit einer anhaltenden oder zunehmenden HCMV-spezifischen zytotoxischen T-Zellaktivität assoziiert (Walter et al., 1995; Heslop et al., 1996).

1.2. Das Immunsystem

Das Immunsystem reguliert die Abwehr im Körper durch das Zusammenspiel des natürlichen und des adaptiven Immunsystems. Das adaptive Immunsystem zeichnet sich im Gegensatz zum natürlichen durch seine hohe Spezifität und ein „zelluläres Gedächtnis“ aus, für welches sowohl T- als auch B-Lymphozyten verantwortlich zeichnen.

1.2.1. Antigenerkennung durch T-Zellen

Die T-Helferzellen (CD4+ T-Zellen) sezernieren Zytokine, wie zum Beispiel Interferon- γ (IFN γ), nachdem der T-Zellrezeptor das Antigen, das von den HLA-Klasse-II-Molekülen antigenpräsentierender Zellen gebunden wurde, erkannt hat. Die sezernierten Zytokine aktivieren B-Zellen zur Antikörperproduktion, Makrophagen zur Phagozytose und unterstützen CD8+ T-Zellen in ihrer Zytotoxizität.

Zytotoxische CD8+ T-Zellen eliminieren Erreger dagegen auf direktem Wege, nachdem sie von HLA-Klasse-I-Molekülen präsentierte Antigene erkannt haben (Janeway et Travers, 1997).

1.2.2. MHC-Komplex und die Erkennungsmechanismen

Bei dem humanen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), auch HLA („human leukocyte antigen“) Komplex genannt, handelt es sich um eine Region hochpolymorpher Gene, deren Proteine an der Oberfläche verschiedenster Zellen exprimiert werden und welche entscheidend für die Akzeptanz eines Gewebetransplantates - daher der Name - sind. (Zinkernagel et Doherty, 1997).

Die MHC-Moleküle werden in die MHC-Klasse-I (MHC-A, -B,-C) und MHC-Klasse-II Moleküle (MHC-DR, -DP, -DQ) unterteilt. Die Gene der MHC-Klasse-III gehören funktionell nicht zum MHC-System.

Im Gegensatz zu den von Plasmazellen sezernierten Antikörpern, die in der Lage sind, freie, in extrazellulären Räumen vorkommende Antigene zu binden, können T-Zellen nur an MHC-Moleküle gebundene Antigene erkennen. (s.o.)

T-Zellen erkennen mit den antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren einen Komplex aus antigenem, z.B. viralem, Peptid und eigenem MHC-Molekül. Wird dasselbe Fremdpeptid durch Zellen eines anderen MHC-Typs präsentiert, so erkennen die T-Zellen es nicht. Ein anderes Antigen, das von demselben MHC-Molekül präsentiert wird, wird meist durch Zellen mit einem spezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt. Diese Eigenschaft wird MHC-Restriktion genannt.

1.2.3. Immunantwort gegen HCMV

Eine HCMV-Infektion ruft sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervor. Die Interaktion von HCMV mit dem Immunsystem ist überaus komplex, da HCMV selbst immunsuppressiv wirkt und über verschiedene Mechanismen versucht, dem Immunsystem zu entkommen (Mocarski, 2004). So wird z.B. die Expression des MHC-II-Komplexes herunterreguliert (Moutaftsi et al., 2002).

Schon Ende der 70er Jahre gab es erste Hinweise darauf, dass die HCMV-Infektion durch HCMV-spezifische Zellen kontrolliert wird.

Beim Vergleich von Patienten mit nachweislich akuter Mononucleose mit Gesunden fanden Levin et al. 1979 eine deutlich schwächere Proliferationsantwort der Patienten. Meyers et al. (1980) und Quinnan et al. (1982) zeigten in Studien über die proliferativen und zytotoxischen HCMV-spezifischen Zellen eine deutliche Korrelation zwischen der zytotoxischen HCMV-spezifischen T-Zellantwort und dem Verlauf der HCMV-Erkrankung auf.

Ridell et al. beobachteten 1992 mit dem adoptiven Transfer von CD8+ T-Zellklonen bei 3 Transplantationspatienten eine signifikante protektive Wirkung von HCMV-spezifischen CD8-T-Zellen in Bezug auf die Inzidenz schwerer HCMV-Infektionen, und Dolstra et al. konnte 1995 nachweisen, daß eine hohe Inzidenz von CD8-T-Zellen mit einer geringen HCMV-Infektionsrate einhergeht.

Eine 1995 vorgestellte Studie (Walter et al.) bestätigte diese protektive Wirkung; bei HCMV-spezifischen CD4 T-Zell-defizienten Patienten nahm die HCMV-spezifische CTL-Aktivität jedoch bald wieder ab (s.u.).

Als immundominantes Protein für die HCMV-spezifische CTL-Antwort wurde das Tegumentprotein pp65 beschrieben (Wills et al., 1996; McLaughlin-Taylor et al., 1994). Weitere Zielstrukturen einer HCMV CTL-Antwort sind die Proteine IE1, pp150, gB, und gH (Gyulai et al., 2000; Kern et al., 1999; Tabi et al., 2001; Retiere et al., 2000).

In der Analyse der Rolle der HCMV-spezifischen CD4+ T-Zellen fanden von Boland et al. (1993) bei organtransplantierten und Ljungman et al. (1993) bei knochenmarktransplantierten Patienten eine Korrelation zwischen der HCMV-spezifischen proliferativen Antwort und der Bewältigung der HCMV-Infektion, wobei die CD4+ T-Zellantwort die überwiegende proliferative Antwort darstellt.

Bei knochenmarkstransplantierten Patienten konnte in den meisten Fällen eine frühere Rekonstitution der CD4+ T-Zellantwort im Vergleich zur CD8+ T-Zellantwort gefunden werden (Li et al. 1994), wobei die CD4+ T-Zell-Rekonstitution die Voraussetzung für die HCMV-spezifische CTL-Antwort zu sein scheint.

Ljungman et al. zeigte in einer Studie (1993), dass eine fehlende proliferative CD4+ T-Helfer Antwort mit einem erhöhten Risiko für eine interstitielle Pneumonie einhergeht,

und Einsele et al. (1993) erkannte, dass eine persistierende CD4-Lymphopenie generell die Entwicklung einer manifesten HCMV-Erkrankung begünstigt.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass eine alleinige Transfusion von HCMV-spezifischen CD8-T+ Zellen keinen Langzeitschutz bietet, sondern dass dafür HCMV-spezifische CD4+ T-Zellen zusätzlich erforderlich sind (Walter et al., 1995).

Es verdichteten sich in letzter Zeit insgesamt viele Hinweise darauf, dass die T-Helfer-Zellen eine wichtigere Rolle - vor allem bei einer Langzeitrekonstitution der Immunantwort gegen HCMV - als bislang angenommen spielen (Zajac et al., 1998; Komanduri et al., 2001; Sester et al., 2001; Foster et al., 2002).

Mit dem Matrixprotein pp65 wurde ein Hauptantigen sowohl für die T-Zellantwort von CD8+ als auch von CD4+ HCMV-spezifischen-T-Zellen gefunden (McLaughlin-Taylor et al., 1994; Benigna et al., 1995).

Verschiedene Autoren haben jedoch auch, gerade bei gewissen HLA-Restriktionen, die Bedeutung des IE-Proteins als Antigen für die T-Zellantwort (CD4 wie CD8) hervorgehoben (Khan et al., 2001; Davignon et al., 1995). Das von Le Roy et al. 2002 beschriebene Modell der Interaktion von IE-spezifischen CD4+ T-Zellen mit APCs (antigenpräsentierenden Zellen) bestätigt diese Annahme.

1.3. Zielsetzung der Doktorarbeit

Um die antivirale Therapie durch Rekonstitution der defekten antiviralen Immunantwort über Vakkzination oder adoptiven Immuntransfer mit CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu ergänzen oder zu ersetzen (Riddel et al., 1994; Walter et al., 1995), ist es notwendig, die Immunantwort gegen HCMV auf zellulärer und molekularer Ebene genauer zu untersuchen.

Da sich in den letzten Jahre die Hinweise verdichteten, dass den CD4⁺ T-Zellen vor allem in der Langzeitrekonstitution der Immunantwort gegen HCMV eine bedeutende Rolle zukommen, sollte in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit erforscht werden, HLA-Klasse-II restringierte Peptide aus den HCMV-Proteinen pp65 und IE1 zu definieren, welche durch CD4⁺-T Zellen spezifisch erkannt und prozessiert werden.

Die Sequenzen der HCMV-Motivpeptide des Matrixproteins pp65 und des IE1-Proteins wurden nach der Wahrscheinlichkeit ihrer Präsentation in einem Computerverfahren (s. Methoden) vorhergesagt und synthetisiert (Prof. Dr. Stevanovic).

Nach Stimulation mit oben genannten HCMV-Peptiden sollte mit Hilfe des Proliferationsassays die HCMV-spezifische Immunantwort untersucht werden, zusätzlich wurde mittels PCR die spezifische Interferon- γ -Sekretion der CD4⁺ T-Zellen quantifiziert. Interferon- γ wird durch CD4⁺ T-Zellen als Ausdruck ihrer Stimulation sezerniert. Auf diese Weise sollte - im Vergleich mit unstimulierten Zellen - Aufschluss über eine potentielle spezifische Immunantwort von CD-4-T-Zellen gegenüber den eingesetzten HCMV-Klasse-II-spezifischen Epitopen erlangt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Geräte

Mikroskop	Laborlux	Bensheim
Neubauerzählkammer	Superior	Marienfeld
Pipetierhilfe	Pipetboy	Tecnomara Zürich
Sterilbank	Hera Safe	Kendro Laboratory Products
Brutschrank	Heraeus Instruments	Hanau
Zentrifuge	Hettich RotentalAP	Tuttlingen
Ultrazentrifuge	Heraeus, Biofuge13	Hanau
ELISA-Reader	SLT	Crailsheim
Heizwasserbad	Bender& Hobein	Rottenburg
Vortex	Bender& Hobein	Rottenburg
PCR-Prozessor	Perkin Elmer	Foster City, USA
Light Cycler®	Roche Diagnostics	Mannheim
Zentrifugen-Adapter	Roche Diagnostics	Mannheim
Light Cycler® Carousel	Roche Diagnostics	Mannheim
Centrifuge		
Gelkammer	GIBCO BRL	Gaithersburg, USA

2.2. Verbrauchsgegenstände und –materialien

Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg
Plastikpipetten	Dickinson	Heidelberg
Zentrifugenröhrchen	Dickinson	Heidelberg
Kryoröhrchen	Greiner	Nürtingen
1,5ml PCR Gefäße	Biozym	Hessisch Oldendorf
Einmal-Sterilfilter	Minisart Sartorius	Göttingen
24-Loch-Kulturplatte	Greiner	Nürtingen

96-Loch-Flachbodenplatte	Nunc	Roskilde, Dänemark
Polaroid Film	Polaroid Cooperation	St. Ablans, GB

2.3. Reagenzien und Chemikalien

Kulturmedium:

90% RPMI 1640L-Glutamine	Gibco BRL	Grand Island, USA
10% fötales Kälberserum (FCS)	Sigma	München
Refobacin	Merck	Darmstadt

Einfriermedium:

80% fötales Kälberserum (FCS)	Sigma	München
20% Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma	St. Louis, USA

Ampuwa-Wasser	Roche Diagnostics	Mannheim
Agarose	Sigma	Daisenhofen
Blue-juice-Marker 10x gel loading buffer	Gibco BRL	Karlsruhe
DMSO	Merck	Darmstadt
DNA Ladder	Gibco BRL	Karlsruhe
EDTA	BioWhittaker	Rockland, USA
Ficol	Biochrom Ag	Berlin
Gel Star FMC	BioProducts	Rockland, USA
Genatmicin	Merck	Darmstadt
Hybridisierungssonden	Tibmol	Berlin
Ionomycin	Sigma	Schnelldorf
PBS	Gibco BRL	Karlsruhe
Phytohämagglutinin (PHA)	Gibco BRL	Karlsruhe
PMA	Sigma	Schnelldorf
TAE-Puffer 10x	Gibco BRL	Karlsruhe

Tris	USB	Cleveland, USA
0,5 % Trypan Blue Stain	Gibco BRL	Karlsruhe

2.4. Kits

RNeasy Mini Kit	Qiagen	Hilden
cDNA Synthesis Kit for RT-PCR	Roche Diagnostics	Mannheim
PCR ELISA Kit	Roche Diagnostics	Mannheim
Light Cycler® Kit	Roche Diagnostics	Mannheim
Light Cycler® Kapillaren	Roche Diagnostics	Mannheim
Proliferation ELISA, BrdU	Roche Diagnostics	Mannheim

2.5. HCMV-Lysat

HCMV-Antigen	Lysat Biodesign	Saco, USA
--------------	-----------------	-----------

2.6. HCMV-Peptide:

Die in der Doktorarbeit verwendeten HCMV-Peptide aus dem Matrixprotein pp65 und IE 1 wurden von Prof. Dr. Stefan Stevanovic aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Rammensee des interdisziplinären Instituts für Zellbiologie der Universität Tübingen synthetisiert. Sie wurden mittels Fmoc-Festphasensynthese in einem Peptidsynthesizer (Modell 432A; Applied Biosystems) synthetisiert und durch eine HPLC-Anlage (System Gold, Beckmann) analysiert. Die Motivpeptide wurden mittels Computeranalyse ermittelt. In dieser Analyse wurden die HCMV-Peptide nach der theoretischen Wahrscheinlichkeit der Präsentation durch MHC-DR-Moleküle ausgewählt. Die Aufstellung der Matrix für die Vorhersage und Gewichtung ist in: „MHC ligands and peptide motifs“ (Rammensee, 1997) nachzulesen.

Die Epitopvorhersage kann in der Datenbank „SYFPEITHI“ im Internet nachvollzogen werden (<http://www.uni-tuebingen.de/uni/kxi>).

Eingesetzt wurden ausschließlich HLA-DR-restringierte-Antigene; im einzelnen waren dies HLA- DR1,- DR3,- DR4, -DR7 und -DR11.

Im Folgenden sind die eingesetzten Peptide in ihrer Sequenz, ihrer Aminosäureposition sowie des Scores – der vom SYFPEITHI-Programm (s.o.) berechneten Wahrscheinlichkeit der Peptidprozessierung und -präsentation – zusammengestellt.

2.6.1. HLA-DR1 Motivpeptide aus pp65

Nummer	Sequenz	Position	Score
0088	HEHFGLLCPKSIPGL	299-313	24
0089	MSIYVYALPLKMNLI	109-123	26
0099	DIDLLLQRGPQYSEH	352-366	23
0101	RNGFTVLCPKNMIK	269-283	34
0112	LRQYDPVAALFFFD	339-353	32
2084	SVLGPISGHVCLKAV	12-26	30
2087	TSQYRIQGKLEYRHI	370-384	22
2088	VPMVATVQGQNLKYQ	497-511	30

2.6.2. HLA-DR3 Motivpeptide aus pp6

Nummer	Sequenz	Position	Score
0123	HVTLGSDVEEDLTMT	243-257	35
0124	SGNLLMNGQQIFLEV	316-330	29
1772	AALFFFDIDLLLQR	356-371	

2.6.3. HLA-DR4 Motivpeptide aus pp65

Nummer	Sequenz	Position	Score
0113	TPVLPHETRLQLTGI	32-46	26
0114	FAELEGVWQPAAQPK	524-538	26
0102	PLKMLNIPSINVHHY	117-131	24
2082	VSQYTPDSTPCHG	58-72	22

2.6.4. HLA-DR7 Motivpeptide aus pp65

Nummer	Sequenz	Position	Score
0125	SAFVFPTKDVALRHV	184-198	30
0129	PLKMLNIPSINVHHY	117-131	30
0132	IPGLSISGNLLMNGQ	310-324	28
0137	ATKMQVIGDQYVKVY	213-227	28
0139	KAVFSRGDTPVLPHE	24-39	26
2090	HTYFTGSEVENVSVN	79-93	24
1771	MSIYVYALPLKMLNI	109-123	24

2.6.5. HLA-DR11 Motivpeptide aus pp65

Nummer	Sequenz	Position	Score
0143	NDIYRIFAELEGVWQ	518-532	16
0145	TSAFVFPTKDVALRH	183-197	25
0148	HPTFTSQYRIQGKLE	366-380	26
0150	TSGVMTRGRLKAEST	447-461	21
0151	DEELVTTERKTTPRVT	407-421	20

2.6.6. HLA -DR7 Motivpeptide aus dem IE-HCMV-Protein

Nummer	Sequenz	Position	Score
2564	CNEYKVTSDACMMTM	284-298	32
2565	DHIFMDILTTCVETM	269-283	32
2566	LCCYVLEETSVMLAK	312-326	26
256	DPLFPELAEESLKTF	52- 66	24
2568	QTMLRKEVNSQLSLG	37-51	22

2.7. Peptidaufbereitung und eingesetzte Konzentration

Alle Peptide wurden zunächst in 10 µl DMSO/1 mg Peptid gelöst, kräftig gevortext und dann mit 990 µl destilliertem Wasser/1 mg Peptid aufgefüllt, so dass eine Peptidkonzentration von 1 mg/ml resultierte.

Für die Stimulation der PBMCs wurden die HCMV-Peptide sowohl im Proliferationsassay als auch für die RT-PCR in einer Konzentration von 1% eingesetzt.

2.8. PBMNCs HLA-DR typisierter Blutspender

Die PBMNCs wurden aus buffy coats HLA-DR-typisierter, HCMV-seropositiver freiwilliger Spender der Blutbank der Universitätsklinik Tübingen isoliert.

Die in der Doktorarbeit verwendeten buffy coats wurden von der Blutbank der Transfusionsmedizin der Universität Tübingen gestellt und dort hinsichtlich ihres HCMV Serostatus (IgG) mit Abbott AxSYM HCMV IgG Assay getestet sowie HLA-Klasse-II typisiert.

Es wurden 6 buffy coats für HLA-DR1, 5 buffy coats für HLA-DR3, 6 buffy coats für HLA-DR4, 7 buffy coats für HLA-DR7 sowie 6 buffy coats für HLA-DR11, insgesamt also 30 buffy coats, eingesetzt.

2.9. Allgemeine Zellkulturmethoden

2.9.1. Gewinnung von peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMLCs)

Frisches heparinisieretes Blut wurde 1:1 mit PBS plus EDTA verdünnt. Danach wurde 30 ml verdünntes Blut in einem 50 ml Zentrifugationsröhrchen (Falcon) vorsichtig mit 15 ml Ficoll (BIOCOLL) unterschichtet. Anschließend wurde 30 Minuten bei 1300 Upm und 20°C zentrifugiert. Die direkt auf dem Ficoll entstandene Interphase, in welcher sich die mononukleären Zellen (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) angereichert hatten, wurden sodann mit einer sterilen Einwegpipette abgesaugt. Die erhaltene Zellsuspension wurde in einem neuen Falcon-Röhrchen auf 50 ml mit PBS plus EDTA aufgefüllt und bei 1300 Upm für 10 Minuten gewaschen. Danach wurden die Zellen erneut gewaschen und das schließlich gewonnene Pellet verdünnt gezählt (s.u.) und eingefroren (s.u.).

2.9.2. Zellzählung

10 µl Zellsuspension wurde mit 0,5% Trypanblau im Verhältnis 1:10 bzw. 1:50 (je nach Zellkonzentration) durchmischt und 10 µl in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter einem Lichtmikroskop wurden sodann 2 Großkammern dieser Zählkammer ausgezählt, wobei die Formel für die Gesamtzellzahl lautete:

Gezählte Zellen • Verdünnungsfaktor • Volumen der Zellen in µl ÷ 2 = Gesamtzellzahl

2.9.3. Einfrieren von Zellen

Die Zellzahl wurde auf 1×10^7 /ml in der Zellsuspension eingestellt. Das Einfriermedium bestand aus sterilfiltriertem FCS und DMSO in 20%iger Konzentration. Die Einfriersuspension, bestehend aus der genannten Zellsuspension und dem Einfriermedium, wurde im Verhältnis 1:1 in 2 ml Aliquots in Kryoröhrchen überführt und sofort bei -70°C tiefgefroren.

2.9.4. Auftauen von Zellen

Der Auftauvorgang sollte schnell vor sich gehen. Zu diesem Zweck wurden die Kryoröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt, bis der Eisklumpen sich von der Wand gelöst hatte. Der Inhalt wurde in ein 10 ml RPMI enthaltendes 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und 10 Minuten bei 10°C und 1000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgekippt, das Zellpellet in RPMI resuspendiert und die Zellen schließlich gezählt (s.o.).

2.10. Zellstimulation

Für die RNA-Extraktion mit Umschreibung in cDNA und anschließender PCR wurde für die Zellstimulation eine 24-Lochplatte verwendet. Pro Loch wurden 1×10^7 Zellen resuspendiert in 2 ml RPMI 1640 eingesetzt.

Pro Well wurden die jeweiligen HCMV-Antigene sowie die Positivkontrolle PHA in 1%iger Konzentration, absolut also je 20 μl , eingesetzt (s.a. Materialien). Als Negativkontrolle fungierte eine Probe mit Zellsuspension ohne Stimulation. Die Zellen wurden im Anschluß an die Stimulation für 4 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Für den Proliferationsassay, welcher in Triplikaten durchgeführt wurde, wurde eine 96-Lochplatte verwendet, wobei pro Loch 1×10^5 Zellen resuspendiert in 200 μl RPMI 1640 eingesetzt wurden.

Pro Loch wurden auch hier die HCMV-Antigene sowie die Positivkontrolle PHA in 1%iger Konzentration eingesetzt, absolut also je 2 µl. Desweiteren wurde im Proliferationsassay als Kontrolle für die HCMV-spezifische Proliferationsantwort HCMV-Lysat aus infizierten Vorhaut-Fibroblasten eingesetzt.

Die folgende Inkubation im Brutschrank erfolgte für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂.

2.11. RNA-Isolierung

Diese erfolgte mit dem RNeasy Total RNA Kit (Quiagen, Hilden).

Nach vierstündiger Inkubation der PBMCs mit HCMV-Peptiden (s.3.2) wurde zunächst pro Well 1 ml der angesetzten 2 ml Zellsuspension abpipettiert, da die Zellen sich in dieser Zeitspanne bereits auf den Boden abgesenkt hatten. Die verbliebene Zellsuspension wurde jeweils resuspendiert, in ein Eppendorf-Tube überführt und für 5 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Die abzentrifugierten Zellen wurden nach Protokoll der Firma entsprechend weiterbehandelt:

Das entstandene Zellpellet wurde in 600 µl Lysis-Puffer, welcher 1% β-Mercaptoethanol enthielt, lysiert, das so entstandene Zelllysat zur Homogenisierung direkt auf die Quiagen-Shredder-Säule pipettiert und für 2 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Das zentrifugierte Lysat wurde mit 600 µl 70%igem Ethanol gemischt, auf die RNeasy Säule pipettiert und 15 Sekunden bei 14000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 700 µl des mitgelieferten RWI-Puffers beschickt und 15 s bei 14000 Upm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die Säule mit 500 µl des Waschpuffers RPE, der vor Gebrauch nach Herstelleranleitung mit Ethanol aufgefüllt worden war, gewaschen und 15 s bei 14000 Upm zentrifugiert. Nach dem ersten Waschschrift wurde die Säule in ein neues Auffangröhrchen gestellt und erneut mit 500 µl RPE-Puffer für diesmal 2 Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Zuletzt konnte die RNA mit 30 µl RNase- freiem Wasser aus der RNeasy-Säule eluiert werden, indem die in ein 1,5 ml Tube gesetzte Säule 1 Minute bei 14000 Upm zentrifugiert wurde. Die so gewonnene RNA wurde sofort in cDNA umgeschrieben (s.3.4).

2.13. Umschreibung von RNA in cDNA

Die Umschreibung erfolgte mit dem 1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche) mittels reverser Transkription:

Zu Beginn wurde in ein Eppendorf Tube (1,5 ml) 5 µl RNA, 3,2 µl steriles Wasser und 2 µl p(dT)15 - Primer (aus dem Kit) - vorgelegt, dann für 10 Minuten bei 65°C denaturiert und anschließend auf Eis gelegt.

Dazu wurde folgender Reaktionsansatz gegeben:

10X ReactionBuffer	2,0 µl
25 mM MgCl	4,0 µl
dNTP-Mix	2,0 µl
RNAsin	1,0 µl
AMV-RT	0,8 µl

Gesamt	9,8 µl

Der Reaktionsansatz wurde kurz gevortext, zu der denaturierten RNA gegeben und für 60 Minuten bei 42°C inkubiert. Zuletzt wurde, um die AMV-Reverse Transkriptase zu denaturieren, noch 5 Minuten bei 95°C inkubiert und die cDNA -Probe für 5 weitere Minuten auf Eis gelegt. Die so erhaltene cDNA konnte bei -20°C für mehrere Monate aufbewahrt werden oder sofort für die PCR (s.3.5) weiterverarbeitet werden.

2.14. Die konventionelle Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.14.1. Prinzip

Die PCR ist eine äußerst geeignete Methode, kleinste Mengen genetischen Materials nachzuweisen, da vorhandene DNA mit dieser Technik spezifisch angereichert werden kann.

Das Prinzip besteht in der mehrfachen Wiederholung der drei Schritte Denaturieren der DNA, Hybridisieren der Primer (Annealing) und Aufbau eines neuen komplementären DNA-Stranges durch die thermostabile Taq-Polymerase (Saiki et al., 1988).

Doppelsträngige DNA, die die gesuchte Zielsequenz enthält, wird durch Hitzedenaturierung (94°C) in Einzelstränge gespalten. Im nächsten Schritt wird der Ansatz auf 64°C abgekühlt, es kommt zur Anlagerung der Primer (Annealing) an die ihnen komplementäre Basensequenz eines Einzelstranges. Man wählt die beiden Primer so, dass sie die Zielsequenz flankieren und von ihnen aus eine Kettenverlängerung des Plus- und Minus-Stranges in 5'-3'-Richtung möglich ist. Die Primer müssen für diesen Schritt im Überschuß vorhanden sein, damit die zuvor erzeugten Einzelstränge nicht wieder reassoziieren. Die Hybridisierungstemperatur sollte so hoch gewählt werden, dass nur vollständig gepaarte Sequenzen paaren, zugleich sollte sie aber auch so niedrig sein, dass es zu keinem Abschmelzen der neu entstandenen Hybridpaare kommen kann. Im dritten Reaktionsschritt wird die Temperatur auf 72°C erhöht; jetzt beginnt die Taq-Polymerase ihre Aktivität zu entfalten und synthetisiert von den Primern ausgehend in 5'-3'-Richtung einen neuen der Zielsequenz komplementären DNA-Strang. Neben der Zielsequenz liegen nun spezifische komplementäre DNA-Amplifikate vor, die in weiteren Zyklen von Denaturieren, Hybridisieren und Polymerisieren als zusätzliche „Template“-Sequenzen dienen können.

Die Verwendung der Taq-Polymerase hat es ermöglicht, die PCR zu automatisieren, da sie die Denaturierung bei 94°C, im Gegensatz zu anderen DNA-Polymerasen ohne Aktivitätsverlust übersteht.

Mit jedem durchlaufenen Zyklus wird die Zahl der vorhandenen Sequenzen verdoppelt, d.h. nach n Zyklen sollte sich ihre Zahl theoretisch um den Faktor 2^n vermehrt haben. Tatsächlich ist die Amplifikationsrate aber niedriger, da die Reaktionsausbeute pro

Zyklus nicht 100% beträgt und die Wachstumskurve nach ca. 30 Zyklen ein Plateau erreicht. Üblicherweise wird nach 30 Zyklen eine Vervielfältigung um den Faktor 10^6 erzielt.

Ein PCR-Prozessor steuert den Ablauf der einzelnen Reaktionsschritte automatisch. Temperaturen, Inkubationszeiten und Zyklenzahl sind frei programmierbar und werden mit hoher Exaktheit durchgeführt.

2.14.2. Durchführung der PCR

Bis auf die unten aufgeführten Primer (Molbiol, Berlin) wurden zur Durchführung der PCR alle Reagenzien aus dem kommerziell erhältlichen PCR ELISA Kit der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Für die Herstellung des Reaktionsansatzes wurden zunächst 2 μ l cDNA und 8 μ l steriles Aqua dest. in 1,5 ml Mikroröhrchen vorpipettiert. Danach wurde folgender Master-Mix hergestellt:

10x	Reaktionspuffer (s. unten)
0,5 mM	dNTPs (äquimolar gemischt)
12,5 pmol	je Primer
1,5 U	Taq-Polymerase

Reaktionspuffer:

Tris, pH 9,6	100 mM
Natriumchlorid	500 mM
Magnesiumchlorid	100 mM
BSA (bovines Serum-Albumin)	1 mg/ml

Primer:

Interferon- γ mit der Sequenz:

1. hu IFN γ -S : 5'<GCATCCAAAAGAGTGTGGAG

2. hu IFN γ -DAS :5'<GCAGGCAGGACAACCATTAC

Sämtliche Pipettierschritte erfolgten auf Eis, um die Aktivität der Taq-Polymerase möglichst gering zu halten. Außerdem wurde aufgrund der hohen Sensitivität und der dadurch bedingten Kontaminationsgefahr mit Mundschutz, sterilen Handschuhen und eigens dafür vorgesehenen Pipetten gearbeitet.

40 μ l des Mastermixes wurden zu der vorgelegten cDNA-Lösung hinzugegeben, die Mikroröhrchen gut verschlossen und in den programmierbaren Thermocycler gestellt.

2.14.3. Zeit- und Temperaturprofil der Amplifikation mit 18-25 Zyklen:

Initialdenaturierung	4 min bei 95°C
Denaturierung	30 sec bei 95°C
Anlagerung	45 sec bei 54°C
Verlängerung	1 min 30 sec bei 72°C
Terminale Verlängerung	5 min bei 72°C

Anschließend wurden die Amplifikate entweder gleich mittels Gelelektrophorese (s.u) ausgewertet oder konnten bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert werden.

2.14.4. Analyse der PCR-Amplifikate in der Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Amplifikationsprodukte auf Reinheit und Längenspezifität wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe einer Horizontalapparatur in einem 2% Agarosegel. Zur Herstellung des Gels wurden 2 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer suspendiert, der Ansatz in einem

Mikrowellengerät kurz aufgeköcht und 50 ml dieser nun homogenen Agarose-Lösung auf einen Gelträger gegeben. Zwei Kämme dienten dabei dem Formen von Geltaschen. Nach ca. 15 Minuten war das Gel so weit erkaltet und verfestigt, dass es samt Gelträger in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht werden konnte.

Zur Durchführung der Elektrophorese war es erforderlich, den cDNA-Proben vor dem Auftragen Ladebuffer zuzusetzen. Der Ladebuffer diente zum einen dazu, die Dichte der DNA-Lösung zu erhöhen und dadurch ein Absinken der DNA-Lösung in den Geltaschen zu erreichen. Zum anderen ermöglichte der im Laufpuffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau eine Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs, da Bromphenolblau mit den ca. 100 bp langen DNA-Fragmenten wandert und somit die Elektrophoresefront markiert. Es wurden von jeder aus dem Thermocycler kommenden Probe 8 µl cDNA-Lösung entnommen und mit 2 µl 5x Ladebuffer gemischt. Dieses Gemisch wurde abzentrifugiert und in die Geltaschen einpipettiert.

Die Laufzeit der Elektrophorese betrug bei einer Spannung von 110 V ca. 1 Stunde.

Die cDNA-Proben wanderten aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste von der Kathode zur Anode, und zwar umso schneller, je kleiner sie waren.

Nach abgelaufener Elektrophorese wurde das Gel mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm bestrahlt, und die cDNA-Banden fluoreszierten im sichtbaren Bereich blaufarbig. Es konnte jetzt beurteilt werden, ob eine spezifische Amplifikation des gewünschten IFN γ -Gens gelungen war und wenn ja, konnte über die Breite der Bande die ungefähre Menge des Amplifikats abgeschätzt werden.

Zur Dokumentation wurde eine Fotografie des Gels angefertigt.

2.15. Real-Time-PCR (Light-Cycler®)

2.15.1. Prinzip

Mit dem Light Cycler® ist es möglich, in einer relativ kurzen Zeit von 45 bis 60 Minuten eine quantitative oder qualitative Polymerase-Kettenreaktion durchzuführen. In diesem PCR-Gerät wird anstatt eines Thermoblocks Luft zur Schaffung der im PCR-Zyklus geforderten Temperaturen verwendet, die mit Hilfe eines Gebläses gleichmäßig

um die feinen Borglaskapillaren, in denen sich die Proben befinden, verteilt wird. Durch das günstige Verhältnis von Kapillarvolumen zu Kapillaroberfläche und durch das Verwenden von Luft ist eine schnelle und gleichmäßige Temperaturübertragung auf die Probe gewährleistet. Auch kann durch die Kombination dieser beiden Komponenten ein PCR-Zyklus in weniger als 30 Sekunden absolviert werden.

Die Erfassung der PCR-Produktzunahme in der Kapillare erfolgt durch Messung eines Fluoreszenzsignales, welches von mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen markierten, innerhalb der Zielsequenz bindenden, Oligonukleotidsonden ausgesendet wird. Hierfür verfügt der Light Cycler® über ein optisches System bestehend aus drei Messkanälen für die Wellenlängen im Bereich von 530 nm (Kanal 1), 640 nm (Kanal 2) und 710 nm (Kanal 3), welches die Fluoreszenzen aller 32 in einem Karussell angeordneten Kapillaren misst. Die Fluoreszenzdaten werden sofort auf dem Computerbildschirm erfasst und können somit in Echtzeit verfolgt werden.

2.15.2. Durchführung:

Um eine semiquantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde eine Standardreihe mit 6 Standards in den aufsteigenden Konzentrationen von 10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 und 10^5 Kopien/ μ l verwendet.

Im ersten Schritt wurde in die LC-Kapillaren für die Standards je 10 μ l und für die eingesetzten Proben je 2 μ l cDNA-Probe und 8 μ l Aqua bidest vorgelegt:

Danach wurde in jede Kapillare 10 μ l des im Folgenden beschriebenen Master-Mix hinzugegeben:

2,6 μ l	Aqua bidest
2,4 μ l	MgCl ₂
0,5 μ l	Vorwärtsprimer
0,5 μ l	Rückwärtsprimer
1 μ l	Sonde FL
1 μ l	Sonde LC
2 μ l	Light Cycler® Faststart DNA Master SYBR Green I*

* Enthält Taq-Polymerase, Reaktionspuffer, dNTP-Mix (mit dUTP anstelle von dTTP), SYBR Green I – Farbstoff und 10 mM MgCl₂.

Die Taq-Polymerase sowie die Primer waren nach nach Herstellerangaben aufgelöst worden.

Die Primer entstammten gebrauchsfertig dem Light Cycler® Human IFN γ -Primer Set.

Die Kapillaren wurden mit den dafür vorgesehenen Deckeln verschlossen und dem LC-Protokoll entsprechend zentrifugiert und dann in den Light-Cycler® gestellt.

2.15.3. Zeit- und Temperaturprofil

Initialdenaturierung	10 min bei 95°C
Denaturierung	1 s bei 95°C
Anlagerung	15 s bei 57°C
Verlängerung	25 s bei 72°C

2.15.4. SYBR Green I Farbstoff

Der dem Ethidiumbromid ähnliche SYBR Green I Farbstoff bindet nur an doppelsträngige DNA. Bei dieser Bindung wird ein verstärktes Fluoreszenzsignal ausgesendet.

Die Intensität des Signals ist proportional abhängig von der Menge an gebildeter doppelsträngiger DNA und wird am Ende der Elongationsphase eines jeden PCR-Zyklus, in welcher der SYBR Green I Farbstoff in die DNA eingebaut wird, in Kanal 1 bei 530 nm gemessen. In der Schmelzpunktanalyse kann dann aufgrund der Länge der Zielsequenz der Nachweis des gesuchten Amplifikationsproduktes gebracht werden.

Spezifitätsunterschiede entstehen dadurch, dass SYBR Green I auch an Primerdimere bindet.

2.15.5. FRET – Hybridisierungssonden

Der sequenzspezifische Nachweis von IFN- γ -cDNA und deren Quantifizierung fand unter der Verwendung von FRET-Hybridisierungssonden statt. Die beiden Oligonukleotidsonden sind komplementär zu einem ausgewählten Sequenzabschnitt innerhalb der Zielsequenz. Die erste Sonde ist am 3'-Ende mit Fluoreszein markiert und emittiert nach Anregung durch die Light Cycler Lichtquelle (blaues Licht bei 470 nm) grünes Licht mit einer Wellenlänge von 530 nm, welches in Kanal 1 gemessen wird. Die zweite Sonde ist am 5'-Ende mit dem Fluoreszein Light Cycler Red 640 markiert. Lagern sich nun beide Sonden während der Anlagerungsphase in dem ausgewählten Sequenzbereich in kleinem Abstand zueinander an die vorliegende cDNA an, wird das Fluoreszein Light Cycler RED 640 durch das grüne Licht der ersten Sonde angeregt und emittiert rotes Licht, welches bei 640 nm in Kanal 2 gemessen werden kann. In der Verlängerungsphase werden die Sonden abgelöst.

2.15.6. Auswertung der Fluoreszenzsignale

Eine Probe gilt in der Light Cycler® -PCR als positiv, sobald das bei der Amplifikation durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer entstehende Fluoreszenzsignal in die logarithmische Phase übergeht und somit von der Hintergrundfluoreszenz abgrenzbar ist. Dies geschieht zu einem bestimmten Zeitpunkt der Amplifikation. Durch Bestimmung des Punktes, dem sogenannten „Crossing Point“, in der die Fluoreszenzsignalkurve in die logarithmische Phase übergeht, kann die Zyklenzahl, in der sich dies ereignet, festgelegt werden. Je niedriger die Zyklenzahl ist, in der dies der Fall ist, desto höher ist die Ausgangsmenge an cDNA. Durch Vergleich mit einem externen Standard, welcher schrittweise herunterverdünnte IFN γ -cDNA in bekannten Mengen enthält und welcher bei jedem Lauf ebenfalls amplifiziert wird, kann die Quantifizierung der Proben erfolgen. Die Auswertung wird von der mitgelieferten Software des Light Cyclers® automatisch durchgeführt.

2.15.7. Schmelzkurvenanalyse

Am Ende eines Amplifikationslaufes mit dem Light Cycler® schließt sich die sogenannte Schmelzkurvenanalyse an. Hierbei wird die Temperatur im Thermocycler schrittweise von 45°C auf 95°C erhöht. Während dieses Prozesses wird die Fluoreszenz in jeder Probe in bestimmten Intervallen gemessen. Hierbei wird das Abschmelzverhalten der beiden FRET-Hybridisierungssonden dargestellt. Wenn bei steigender Temperatur eine Sonde vom cDNA-Strang abgelöst wird, sinkt die Intensität des Fluoreszenzsignals ab, da der Energietransfer zwischen beiden Sonden abbricht. Beim SYBR Green I Farbstoff Format wird bei Denaturierung der dsDNA der Farbstoff abgelöst, und die Fluoreszenzintensität sinkt ebenfalls ab. Da jede dsDNA ihre spezifische Schmelzkurvenanalyse besitzt (Temperatur, bei der 50% der DNA als Einzelstrang vorliegt), welche von ihrer Länge und ihrem CG-Gehalt abhängt, müssten gleiche Amplifikate auch gleiche Abschmelzpunkte zeigen. Mit dieser Methode kann die abgelaufene Amplifikation im Hinblick auf Spezifität überprüft werden.

2.16. Der HCMV-Proliferationsassay

Für den Proliferationsassay wurde der Cell Proliferation ELISA, BrdU Kit (Roche) verwendet:

Der Assay wurde in 96-Lochplatten jeweils in Triplikaten ausgeführt.

Nach 3-tägiger Stimulation mit den HCMV-Peptiden bzw. HCMV-Lysat und Positivkontrolle (PHA) (s.3.2) wurde pro Loch 20 µl BrdU, welches in RPMI 1640 aufgelöst worden war, zugegeben und die Zellen für weitere 20-24 Stunden im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wird das Pyrimidin-Analogon BrdU anstelle von Thymidin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut, wo es letztlich in einem Immunoassay (ELISA) detektiert werden und so zur quantitativen Beurteilung proliferierender Zellen herangezogen werden kann.

Nach erfolgter Inkubation mit BrdU wurde die 96-Lochplatte für 5 Minuten bei 1200 Upm zentrifugiert und der Überstand anschließend abgekippt. Danach wurden die am Boden der Lochplatte haftenden Zellen mit einem Föhn 10-15 Minuten lang getrocknet,

sodann pro Loch 200 µl FixDenat-Lösung aus dem Kit zugegeben und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch wurde die DNA denaturiert, um auf diese Weise das Andocken an das inkorporierte BrdU durch Anti-BrdU-Antikörper (s.u.) zu ermöglichen.

Nach diesen 30 Minuten wurde das FixDenat abgekippt und pro Loch 100 µl des nach Herstellerangaben in destilliertem Wasser aufgelösten Anti-BrdU-Antikörpers zugegeben und 90-120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde die Lochplatte in 3 Wiederholungen mit Waschpuffer - je 250 µl pro Loch - aus dem Kit gewaschen, der Waschpuffer nach dem letzten Waschen sauber abpipettiert und danach 100 µl Substrat pro Loch hinzugefügt. Während der folgenden 20-25 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur und lichtgeschützter Umgebung ging die Substrat-Reaktion vor sich, in welcher die aus BrdU und Anti-BrdU bestehenden Immunkomplexe von dem Substrat detektiert wurden. Um die Substrat-Reaktion zu stoppen, wurde nach dem letzten Inkubationsschritt in jedes Loch 25 µl H₂SO₄ als Stopplösung zugegeben.

Gleich darauf erfolgte in einem Multi-Well-Spektrometer (ELISA-Reader) die Extinktionsmessung, wobei die resultierte Farbentwicklung und damit die Extinktionsmessung direkt mit der synthetisierten DNA-Menge bzw. Anzahl der in den jeweiligen Mikrokulturen proliferierender Zellen korreliert.

Die Extinktionsmessung erfolgte dabei nach 15 sekündiger „Schüttlung“ im Spektrometer bei einer Wellenlänge von 450 nm und 690 nm Referenzwellenlänge.

3. Ergebnisse

3.1. Epitopvorhersage

Um Aufschluss über die HCMV-spezifische Immunantwort durch CD4⁺T-Zellen zu erhalten, wurde versucht, zu häufigen HLA-Klasse-II-DR Restriktionen passende HCMV-Motivpeptide zu finden.

In diesem Zusammenhang wurden Motivpeptide für die HLA-Restriktionen DR1, DR3, DR4, DR7 und DR11 an gesunden HCMV-seropositiven Blutspendern getestet.

Wie erwähnt, wurden von Herrn Prof. Dr. Stevanovic HCMV-Motivpeptide mittels Computeranalyse ermittelt, welche auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden sollten, von HCMV-spezifischen CD4⁺ T-Helferzellen erkannt zu werden.

Um beurteilen zu können, ob die betreffenden HCMV- Motivpeptide von T-Zellen erkannt wurden, wurde sowohl der Proliferationsassay als auch die PCR zum Nachweis der Interferon- γ - Sekretion (als Ausdruck der Stimulation) eingesetzt.

Das Ziel war es somit, darzulegen, ob die vorgegebenen Peptide bei einer natürlichen HCMV-Infektion prozessiert und präsentiert werden.

Als Positivkontrolle wurde PHA verwendet, welches CD4⁺ T-Zellen unspezifisch stimuliert. Diese Stimulation führt sowohl zu einer Zellproliferation wie auch zur Zytokinsekretion, z.B. von Interferon- γ .

In den Proliferationsassays wurde neben PHA zusätzlich HCMV-Lysat als Positivkontrolle eingesetzt, welches in der Mehrzahl der ausgetesteten buffy coats eine dem PHA zwar nicht ganz ebenbürtige, jedoch im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar gesteigerte Zellproliferation hervorrief.

Da die Vorhersage der HCMV-Motivpeptide auf der Grundlage ihrer MHC-Klasse-II-Restriktion erfolgte, wurden die Peptide im ersten Versuchsdurchgang nur entsprechend ihrer MHC-Restriktion zur Stimulation der PBMCs aus MHC-Klasse-II-typisierten buffy coats eingesetzt. Dabei wurden pro MHC-Restriktion 5-6 buffy coats sowohl in der PCR als auch im Proliferationsassay ausgetestet.

3.2. Eingesetzte HCMV-Proteine

Da die Immundominanz des Matrixproteins pp65 sowohl für CD8⁺ als auch für CD4⁺ T-Zellen bekannt ist, konzentrierte sich die Arbeit in erster Linie auf dieses Protein. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass die immediate-early-Genprodukte zumindest bei gewissen MHC-Restriktionen eine immundominante Funktion besitzen. Aus eigenen Vorarbeiten mit rekombinanten HCMV-Proteinen ergaben sich ebenfalls Anhaltspunkte auf IE1-spezifische-CD4⁺ T-Zellen, so dass auch 5 HCMV-spezifische Motivpeptide aus dem IE1-Protein ausgetestet wurden.

3.3. Ergebnisse aus konventioneller PCR und Proliferationsassay

Bei der konventionellen PCR bestand die Schwierigkeit zunächst darin, die geeignete Zyklenzahl festzulegen, mit der ausreichend Interferon- γ -cDNA der HCMV-spezifisch stimulierten Zellen amplifiziert werden konnte, ohne zugleich die unspezifische Interferon- γ -Replikation (der unstimulierten Zellen) zu sehr in Vordergrund treten zu lassen. Bei der zunächst einprogrammierten Zyklenzahl von 41 war die Interferon- γ -cDNA während der 4-stündigen Inkubationszeit noch so stark amplifiziert worden, dass in der Gelelektrophorese die Interferon-Bande der Negativkontrolle, d.h. der unstimulierten Zellen, genauso gut zur Darstellung kam wie die der Positivkontrolle (PHA).

In mehreren Schritten wurde die Zyklenzahl folglich kontinuierlich von 41 über 36, 30, 27 bis zu 24 Zyklen gesenkt, wobei bei einer PCR- Zyklenzahl von 24 die Bande der Negativkontrolle schließlich nicht mehr sichtbar war, so dass erst bei dieser herabgestuften Zyklenzahl Aussagen über eine spezifische, also die unspezifische Interferon-Sekretion übersteigende, Interferon- γ -Replikation als Reaktion auf die Stimulation mit den HCMV-Peptiden getroffen werden konnten.

Bei allen eingesetzten HCMV-Motivpeptiden der MHC-DR1, DR3, DR4, und DR7-Restriktion konnte jedoch keine spezifische Stimulation der Zellen beobachtet werden, weder im Sinne einer Zellproliferation in den Proliferationsassays, noch über eine vermehrte Interferon- γ -Replikation in der PCR.

3.4. HLA-DR11- HCMV- Peptid aus dem pp65 Matrixprotein

Alleine das in der Literatur bereits charakterisierte HCMV-Motivpeptid der MHC-DR11-Restriktion mit der Nummer 0148 zeigte bei 3 von 5 MHC-DR11-typisierten buffy coats eine spezifische, mit der Positivkontrolle vergleichbare, Zellstimulation an. Beispielhaft sollen die Ergebnisse aus einem buffy coat dargestellt werden:

Im Proliferationsassay war die Zellproliferation auf die Stimulation mit diesem Peptid hin der Positivkontrolle (PHA) nahezu ebenbürtig, der Stimulationsindex war mit ~ 4 positiv.



Bande: 1 2 3 4 5 6 7

Abb. 3.1.: Gelelektrophorese im Anschluss an die konventionelle PCR

Bande 1: Peptid 143, Bande 2: Peptid 145, **Bande 3: Peptid 148**, Bande 4: Peptid 150, Bande 5: 151,
Bande 6: PHA, Bande 7: Negativkontrolle

In der PCR konnte sowohl konventionell (s.Abb.3.1.) als auch mittels Light Cycler® eine HCMV-spezifische Interferon- γ -Sekretion auf die Zellstimulation mit dem 0148-HCMV-DR11 Peptid nachgewiesen werden, welche in den 3 buffy coats ein die unspezifische Interferon-Sekretion deutlich überschreitendes Maß aufwies.

3.5. MHC-Restriktion der eingesetzten HCMV-Motivpeptide

Da bis zu diesem Zeitpunkt von den insgesamt 27 getesteten HCMV-Motivpeptiden lediglich ein einziges spezifisch von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert und damit von CD4⁺ T-Zellen erkannt zu werden schien, wurden die Peptide nicht mehr nur auf entsprechend MHC-typisierte buffy coats eingesetzt, sondern quer durch alle MHC-Restriktionen hindurch. Degenerative Bindung von Peptiden an verschiedenen HLA-Klasse-II-Allelen oder promiskuitive Bindungen, bei der ein Peptid mit verschiedenen HLA-Klasse-II-Allelen von einem T-Zellklon erkannt werden können, wurden in den letzten Jahren bereits beschrieben (O'Sullivan et al, 1991).

Dadurch wurde die potentielle Chance der HCMV-Peptiderkennung durch CD4⁺ T-Zellen um ein Vielfaches erhöht. Doch auch durch diese erweiterten Versuche konnte kein zusätzliches HCMV-Motivpeptid definiert werden, welches spezifisch erkannt worden wäre.

3.6. Gesamtergebnisse

In den folgenden Tabellen sind die Gesamtergebnisse zusammengestellt:

Tabelle 1: HLA-DR1-HCMV-Peptide aus dem pp65 Matrixprotein

	Peptidnummern (s.Kapitel 2)							
HLA- typisierte buffy coats	0088	0089	0101	0102	0112	2084	2087	2088
DR4,11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11,12	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Tabelle 2: HLA-DR3-HCMV-Motivpeptide

	Peptidnummern (s.Kapitel2)		
HLA- typisierte buffy coats	0123	0124	1772
DR4,11	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg
DR11,12	Neg	Neg	Neg
DR3,15	Neg	Neg	Neg
DR3,4	Neg	Neg	Neg
DR3,7	Neg	Neg	Neg
DR4,3	Neg	Neg	Neg
DR4,6	Neg	Neg	Neg
DR4	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg
DR7,6	Neg	Neg	Neg
DR7,1	Neg	Neg	Neg
DR7,3	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg
DR1,8	Neg	Neg	Neg
DR1,7	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg

Tabelle 3: HLA- DR4- HCMV -Motivpeptide aus dem pp65 Matrixprotein

	Peptidnummern (s.Kapitel 2)			
HLA- typisierte buffy coats	0102	0113	0114	2084
DR4,11	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11,12	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,15	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,4	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,7	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,3	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,6	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,6	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,1	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,3	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,8	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,7	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg

Tabelle 4: HLA-DR7- HCMV-Motivpeptide aus dem p65-Matrixprotein

	Peptidnummern (s.Kapitel 2)						
HLA typisierte buffy coats	0125	0129	0132	0137	0139	2030	1771
DR4,11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR11,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Tabelle 5: HLA-DR11-HCMV-Motivpeptide aus dem pp65

	Peptidnummern (s. Kapitel 2)				
HLA- typisierte buffy coats	0143	0145	0148	0150	0151
DR4,11	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
DR11	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
DR11,1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,15	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR3,4	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
DR3,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR4	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,6	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,1	Neg	Neg	Pos	Neg	Neg
DR7,3	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,8	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

Tabelle 6: HLA-DR7 HCMV-Motivpeptide aus dem IE1 Protein

	Peptidnummern (s.Kapitel 2)				
	2564	2565	2566	2567	2568
HLA-typisierte buffy coats					
DR1,7	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR7,13	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg
DR1,7	Neg	Neg	Neg	Neg	neg
DR7,11	Neg	Neg	Neg	Neg	neg

3.7. Exaktere Quantifizierung mittels Light Cycler®

Im Anschluss an die konventionelle PCR und die Proliferationstests wurde nun zur genaueren Quantifizierung die RT-PCR mittels Light Cycler® für all diejenigen Proben eingesetzt, deren Bande in der Gelelektrophorese nicht eindeutig als negativ zu werten war.

Dazu gehörten insbesondere verschiedene DR7-Motivpeptide (s.Tabelle 4).

Allerdings waren im Light Cycler® alle eingesetzten fraglich positiven cDNA-Proben in ihrer sezernierten IFN- γ -Quantität der unstimulierten Negativkontrolle gegenüber nicht erhöht.

Alleine die mit dem HLA-DR11-HCMV-Peptid der Nummer 0148 stimulierten Proben bestätigten in der RT-PCR mit ihrer Interferon- γ -Sekretion, die in ihrer Quantität der Positivkontrolle mit PHA vergleichbar war, dass dieses Peptid von CD4⁺ T-Zellen spezifisch erkannt und prozessiert wird.

4. Diskussion

4.1. HCMV- Immuntherapie

Die HCMV-Infektion stellt nach wie vor eine der häufigsten viralen Infektionen dar (Winston et al., 1990).

10-20% der Kinder vor der Pubertät und 40-80% aller Erwachsenen sind infiziert (de Jong et al., 1998). Diese hohe Infektionsrate stellt insbesondere für Knochenmarksempfänger ein Problem dar: 70% der Patienten, die eine allogene KMT bekommen und entweder HCMV-seropositiv sind oder ein Transplantat von HCMV-seropositiven Spendern erhalten, entwickeln eine HCMV-Infektion; die HCMV-Erkrankung bei diesen Patienten hat eine Mortalität von 70 % (Hebart und Einsele, 1998).

Trotz Einführung neuer antiviraler Therapiestrategien ist die HCMV-Infektion noch immer eine der Haupttodesursachen für Patienten nach allogener Stammzellproliferation (Boeck et al., 1999; Einsele et al., 1995; Ljungman et al., 1992; Einsele et al., 2000).

Da zudem immer häufiger von Virustatika-resistenten HCMV-Isolaten nach Stammzelltransplantation berichtet wird und die Virustatikatherapie zudem mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist, wird intensiv nach Alternativen zur Behandlung und Prävention der HCMV-Erkrankung gesucht.

Eine solche Alternative stellt die adoptive Immuntherapie dar, bei der HCMV-spezifische Zellen des Spenders auf den Empfänger übertragen werden:

In verschiedenen Studien konnte bislang gezeigt werden, dass Transplantatempfängern eine schützende HCMV-spezifische T-Zell-Immunität übertragen werden konnte, indem den Patienten ex vivo generierte, HCMV-spezifische T-Zellen des Spenders infundiert wurden (Walter et al., 1995; Riddell et al., 1992; Einsele et al., 2002).

Wichtig für eine langdauernde Persistenz transferierter CD8⁺ T-Zellen scheint die zusätzliche Anwesenheit von CD4⁺ T-Helferzellen zu sein. Diese senden Wachstumsfaktoren aus, wie z.B. Interleukin2 und vermitteln kostimulierende Signale, z.B. über

CD40/CD40L, was wiederum die Antigenpräsentation und die kostimulatorische Kapazität von APCs deutlich erhöht (Schoenberger et al., 1998; Sarawar et al., 2001).

So konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass eine Abnahme der infundierten HCMV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen gerade bei den Patienten auftrat, die keine HCMV-spezifische CD4+ T Helfer Antwort zeigten (Walter et al., 1995). Im Gegenteil, das Auftreten einer T-Helfer Antwort nach Infusion ging einher mit einer anhaltenden oder zunehmenden HCMV-Antwort der zytotoxischen T-Zellen (Walter et al., 1995; Heslop et al., 1996), und eine anhaltende Immunität wurde dabei nur bei Patienten mit endogener Rekonstitution HCMV-spezifischer CD4+ T-Zellen erzielt.

Verschiedene Strategien zur Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen sind beschrieben worden. Erfolgreich war beispielsweise die ex vivo Induktion HCMV-spezifischer CTLs mittels HCMV infizierter Fibroblasten als Stimulatorzellen (Walter et al., 1995). Für den klinischen Einsatz sind diese Methoden ungeeignet, da die Replikation von HCMV-Viren ein nicht zu unterschätzendes Infektionsrisiko darstellt.

Die ex vivo Induktion HCMV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe dendritischer Zellen, die entweder mit HCMV-Peptiden (Szmania et al., 2001; Kleihauer et al., 2001; Vanucchi et al., 2001) oder mit HCMV-Antigen (Peggs et al., 2001; Einsele et al., 2002) gepulst werden, ist ebenfalls erfolgversprechend. Der Nachteil hierbei liegt jedoch in der arbeitsintensiven und sehr zeitaufwendigen ex vivo Expansion über mehrere Wochen.

Eine weitere Möglichkeit, HCMV-spezifische CD4-T-Zellen zu generieren, ist der Einsatz von HCMV-Lysat. Das Problem für den klinischen Einsatz dabei besteht allerdings darin, dass das HCMV-Lysat nur zu ca. 10% aus viralen Proteinen besteht und in seiner Zusammensetzung sehr variabel und zudem schlecht charakterisiert ist.

Wünschenswert wäre es, HLA-Klasse-II restringierte HCMV-Peptide zu definieren, um somit HCMV-spezifischer CD4+ T-Zellen für einen potentiellen adoptiven CD4+ T-Zell-Transfer generieren zu können.

4.2. Definition HLA-II-HCMV-spezifischer Peptide

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, HCMV-Klasse-II-restringierte Peptide zu definieren, gegen die eine Immunantwort durch HCMV-spezifische CD4⁺ T-Zellen gerichtet ist.

Sie sollten Aufschluß über die HCMV-Peptidspezifische Immunantwort und Epitoperkennung bei HCMV-seropositiven gesunden Blutspendern geben.

Dabei wurde versucht, die MHC-Klasse-II-Restriktion der HCMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu erfassen.

Im Einklang zu der von Kern et al. 2002 durchgeführten Untersuchung, wonach sich die Hauptimmunantwort der HCMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen gegen das pp65 Antigen richtet, wurden zunächst aus diesem Antigen stammende HCMV-MHC-Klasse-II-Peptide getestet.

Allerdings gibt es auch verschiedene Hinweise darauf, dass die immediate early-Genprodukte zumindest bei gewissen MHC-Restriktionen eine immundominante Funktion besitzen, so dass auch aus dem IE-Protein stammende HCMV-Peptide untersucht wurden.

4.3. MHC-Restriktion viraler Peptide

Wie schon erwähnt, werden die MHC-Klasse-II-Moleküle in die Subtypen MHC-DR, -DQ, und -DP unterteilt. Ottenhoff et al. (1986) sowie Pawelec et al. (1990) berichteten über alloreaktive wie auch virusspezifische CD4⁺ T-Zellreaktionen, die eine Dominanz der MHC-DR- über die MHC-DQ-Restriktion aufweisen. Gehrz et al. (1987) fanden bei HCMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellklonen heraus, dass diese zu 70% eine MHC-DR und nur zu 15% eine MHC-DQ oder MHC-DP Restriktion aufweisen.

Spezifische T-Helferzellen für *Mycobacterium leprae* (Ottenhoff et al., 1986) und spezifische T-Zellklone für Rabiesviren (Celis et al., 1998) sollen ebenfalls vor allem MHC-DR restringiert sein. Ebenso wurde eine vorherrschende DR-Restriktion für HCMV - gH-spezifische T-Zellklone gefunden (Liu et al., 1993).

Ein weiteres Indiz für die bevorzugte DR-Restriktion wurde für HCMV mit der DR8-Restriktion eines IE1-Epitops beschrieben (Gautier et al., 1996).

Aus dem Beschriebenen ergab sich, dass in der vorliegenden Arbeit ausschließlich DR-restringierte HCMV-Peptide gesucht werden sollten.

4.4. Länge der von MHC-Klasse-II-Molekülen bindenden Peptide

HCMV-spezifische T-Helfer-Zell-Erkennung beinhaltet die Aufnahme und das Verarbeiten der viralen Proteine über antigenpräsentierende Zellen (APCs) und die Präsentation viraler Antigene in Verbindung mit HLA-Klasse-II-Molekülen (Kourilsky et al., 1989). Die von MHC-Klasse-II-Molekülen präsentierten Peptide zeigen im Gegensatz zu den meist aus 9 Aminosäuren bestehenden MHC-Klasse-I-restringierten Peptiden keine feste Länge.

Chicz et al. fand 1992 MHC-DR1 assoziierte Peptide mit Längenvariationen zwischen 13-17 Aminosäuren, wobei bei den natürlich prozessierten MHC-Klasse-II-restringierten Peptiden das kürzeste Peptid 10 und das längste Peptid 30 Aminosäuren lang war (Chicz. et al., 1993).

Nach diesen Angaben ist anzunehmen, dass die Gesamtlänge der prozessierten Peptide nicht mit der Epitoplänge übereinstimmt. Dies wurde durch Röntgenstrukturanalysen von MHC-DRB1* 0101 mit einem Influenza A-Peptid (Stern et al., 1994) und von MHC-DRB1*0301 mit einem Clip-Peptid (Ghosh et al., 1995) bestätigt, da beide Peptide jeweils über die MHC-Bindungstasche herausragten.

Rammensee et al. (1995) beschrieb eine Vielzahl von Bindungsmotiven vor allem für HLA-DR-Allele, wobei im Vergleich zu den schon zuvor gefundenen Klasse-I-Peptidmotiven die Längenvariabilität und die degenerierte Spezifität der Ankerposition die exakte Definition bestimmter Ankerstrukturen erschwerte.

Dies könnte eine Erklärung dafür darstellen, dass es im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht gelang, neue HLA-Klasse-II-restringierte HCMV-Peptide zu definieren, gegen die eine spezifische CD4+ T-Zellantwort gerichtet ist.

4.5. Immunevasionsmechanismen von HCMV

Als ein weiteres Problem bei der Charakterisierung HLA-Klasse-II-restringierter Motivpeptide müssen sicherlich auch die von verschiedenen Autoren beschriebenen Immunevasionsmechanismen von HCMV sowohl gegen die angeborene, als auch gegen die adaptive Immunantwort in Betracht gezogen werden (Mocarski 2004, Slobedman et al., 2002, Hegde et al., 2002, Cebulla et al., 2002): danach scheint HCMV mit seinem Matrixprotein pp65 sowohl im latenten Stadium als auch bei produktiven Infektionsverläufen in der Lage zu sein, die Präsentation von HCMV-Motivpeptiden zu behindern.

Während Interferone die Transkription der MHC-Gene und damit die Antigenprozessierung und -präsentation verstärken (Ayalon et al., 1998), ist das humane Virusmatrixprotein pp65 zudem in der Lage, HCMV-IE-Proteine zu phosphorylieren, damit sie im Proteasom nicht mehr prozessiert und somit nicht mehr auf den MHC-Molekülen präsentiert werden können (Gilbert et al., 1996).

Ein nicht präsentiertes Viruspeptid wird von den entsprechenden T-Zellen nicht fremd erkannt.

4.6. Bestätigung des DR-11-HCMV-Peptids

Mit den in dieser Arbeit eingesetzten vergleichenden Methoden, der konventionellen PCR mit anschließender Gelelektrophorese, dem Light Cycler® und dem Proliferationsassay, konnte die spezifische Stimulation von CD4⁺ T-Zellen durch das von Khattab et al. bereits beschriebene DR11-HCMV-Peptid mit der Nummer 0148 bestätigt werden. Dies spricht zumindest dafür, dass nicht ein systematischer Fehler bei den Untersuchungen vorlag, welcher für die „negativen“ Ergebnisse verantwortlich sein könnte.

Ein entscheidendes Problem bei dem Versuch, neue HLA-Klasse-II-restringierte HCMV-Peptide zu definieren, könnte insgesamt auch die geringe Vorläuferfrequenz spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Blut der gesunden Spender gewesen sein. Vielversprechender könnte es in Zukunft möglicherweise sein, Peptide kurz nach HCMV-Infektion zu analysieren.

5. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaar
CTL	Zytotoxische T-Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GvHD	Graft versus host disease
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
IE	Immediate Early
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KMT	Knochenmarktransplantation
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
Min	Minuten
PBMC	Periphere Blutmononukleäre Zelle (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase chain reaction
PHA	Phytohämagglutinin
pmol	Piccomol
pp	Phosphoprotein

RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCT	Stammzelltransplantation
SI	Stimulationsindex
TAE	Trisessigsäure-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TRIS	Trihydroxymethylethylendiamin
U	Units
UV	Ultraviolett
U/min	Umdrehungen in der Minute
°C	Grad Celsius

6. Zusammenfassung

Die HCMV-Infektion stellt für Patienten nach allogener Stammzelltransplantation nach wie vor eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Da die medikamentöse Behandlung der HCMV-Infektion mit schweren Nebenwirkungen verbunden ist und zudem immer häufiger von Virustatika-resistenten HCMV-Stämmen berichtet wird, stellt die adoptive Immuntherapie eine wichtige alternative Therapieoption dar.

In der Vergangenheit wurden bislang hauptsächlich CD8⁺ T-Zellen eingesetzt. Es gibt allerdings mehr und mehr Hinweise darauf, dass für eine dauerhafte zelluläre Immunität gegenüber HCMV bzw. für die Aufrechterhaltung einer ausreichend hohen CD8⁺ T-Zell-Anzahl und -funktion CD4⁺ T-Zellen eine entscheidende Bedeutung zukommt, da nur durch das Zusammenspiel von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen eine langanhaltende Persistenz und damit Effektivität der transferierten Zellen möglich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun versucht, aufgrund einer computerbasierten Epitopvorhersage aus einer Vielzahl von Peptiden, HCMV-spezifische HLA-Klasse-II-restringierte Peptide zu definieren, welche in der Lage sein sollten, CD4⁺ T-Zellen spezifisch zu stimulieren.

Die vergleichend eingesetzten Methoden umfassten einen unspezifischen Proliferationsassay, die konventionelle PCR sowie die RT-PCR (Light Cycler®). In der PCR wurde jeweils IFN- γ als Ausdruck einer T-Zell-Stimulation quantifiziert.

Abgesehen von einem bereits bekannten HLA-II-DR11-restringierten HCMV-Peptid, dessen Potenz, CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren, in der durchgeführten konventionellen PCR, dem Proliferationstest sowie dem Light Cycler®-Protokoll bestätigt wurde, konnten keine weiteren, bis dato noch nicht beschriebenen HCMV-Peptide bestimmt werden. Weitere Analysen sollten sich zukünftig auf Patienten mit kurz zurückliegender HCMV-Infektion konzentrieren, da diese sicherlich höhere Frequenzen HCMV-spezifischer T-Zellen aufweisen.

7. Literaturverzeichnis

Alain S., Honderlick P., Grenet D., Stern M., Vadam C., Sanson-Le Pors M.J. and Mazon M.C. 1997. Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation*. 63: 1533.

Aschan J., Ringden O., Ljungman P., Lonnqvist B., and Ohlman S. 1992. Foscarnet for treatment of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients. *Scand. J. Infect. Dis.* 24:143-150

Ayalon O., Hughes E.A., Cresswell P., Lee J., O'Donnell L., Pardi R. and Bender J.R. 1998. Induction of transporter associated with antigen processing by interferon- γ confers endothelial cell cytoprotection against natural-killer-mediated lysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:2443.

Bachmann M.F., Kalinke U., Althage A., Freer G., Burkhart C., Roost H., Aguet M., Hengartner H. and Zinkernagel R.M. 1997. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science.* 276: 2024.

Benigna 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

Boeckh M., Bowden R.A., Goodrich J.M., Pettinger M., and Meyers J.D. 1992. CMV antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 80:1358

Boland G.J., Heue R.J., Ververs C., De Haan M.A.M. and De Gast G.C. 1993. Factors influencing the occurrence of active cytomegalovirus (CMV) infections after organ transplantation. *Clin. Exp. Immunol.* 94: 306-312.

Bowden R.A. 1991. Cytomegalovirus infections in transplant patients: Methods of prevention of primary cytomegalovirus. *Transplant. Proc.* 23: 136.

Bowen E.F., Emery V.C., Wilson P., Johnson M.A., Davey C.C., Sabin C.A., Farmer D. and Griffiths P.D. 1998. Cytomegalovirus polymerase chain reaction viraemia in patients receiving ganciclovir maintenance therapy for retinitis. *AIDS.* 16: 605.

Cebulla C.M., Miller D.M., Zhang Y., Rahill B.M., Zimmermann P., Robinson J.M., Sedmak D.D. 2002. Human Cytomegalovirus disrupts constitutive MHC class II expression. *J. Immunol.* 169: 167-176

Celis E., Karr R.W., Dietzschold B., Wunner W.H., Koprowski H. 1998. Genetic restriction and fine specificity of human T cell clones reactive with rabies virus. *J. Immunol.* 141: 2721-2728.

Chee M. S., Bankier A.T., Beck S., Bohni R., Brown C.M., Cerny R., Horsnell T., Hutchinson III C.A., Kouzardes T., Matignetti J.A., Preddie E., Satchwell S.C., Tomlinson P., Weston K.M. and Barrell B.G. 1990. Analysis of the protein coding content of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 154: 126-169

Chicz R.M., Urban R.G., Gorga J.C., Vignali D.A., Lane W.S. and Strominger J.L. 1993. Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J. Exp. Med.* 178: 27-47.

Chicz R.M., Urban R.G., Lane W.S., Gorga J.C., Stern L.J., Vignali D.A. and Strominger J.L. 1992. Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogenous in size. *Nature* 358: 764-768.

Davignon J.L., Clement D., Alriquet J., Michelson S., Davrinche C. 1995. Analysis of the proliferative T cell response to human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE1): phenotype, frequency and variability. *Scand. J Immunol.* 41:246-55

De Jong M.D., Galsso G.J., Gazzard B., Griffiths P.D., Jabs D.A., Kern E.R. and Spector S.A. 1998. Summary of the II international symposium on cytomegalovirus. *Antiviral Research.* 39: 141.

Diamond D.J., York J., Sun J.Y., Wright C.L., and Forman S.J.1990. Development of a candidate HLA-A*0201 restricted peptide-based vaccine against human CMV infection. *BLOOD.* 90:1751

Dolstra H., Preijers F., van de Will-van Kemenade E., Schattenberg A., Galama J., and 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. Hematol.* 91: 300-307

Emanuel D., Cunningham I., Lues-Elysee K., et al. 1988. Cytomegalovirus pneumonia after bmt successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. *Ann. Intern. Med.* 109:777

Einsele H., Ehninger G., Hebart H., Wittkowski K.M., Schuler U., Jahn G., Mackes P., Herter M., Klingebiel T., Löffler J., Wagner S., and Müller C.A. 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.

Einsele H., Ehninger G., Steidle M., Fischer I., Gerneth F., Vallbracht A., Schmidt H., Waller H.D., and Müller C.A. 1993. Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *BLOOD* 82: 1672-1678.

Einsele H., Hebart H., Kauffmann-Schneider C., et al. 2000. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplantation*. 25:757

Einsele H., Roosnek E., Rufer N., et al. 2002. Infusion of CMV-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *BLOOD* 99:3916

Erice A., Gil-Roda C., Perez J.L., Balfour H.H., Sannerud K.J., Hanson M.N., Boivin G. and Chou S. 1997. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *Inf. Dis.* 175: 1087.

Erlich, H.A., Gelfand D., Sninsky J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* 252: 1643-1651.

Foster A.E., Gottlieb D.J., Sartor M., Herzberg M.S., Bradstock K.F. 2002. Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol of Blood and Marrow Transplant* 8:501-511

Gautier N., Chavant E., Prieur E., Monserrat B., Mazarguil H., Davrinche C., Gairin J.E., Davignon JL. 1996. Characterization of an epitope of human cytomegalovirus protein IE1 recognized by CD4 T-cell clone. *Eur. J. Immunol.* 26: 1110-1117.

Gehrz R.C., Fuad S., Liu Y.N., Bach F.H. 1987. HLA class II restriction of T helper cell response to cytomegalovirus (CMV). *Immunogenetic control of restriction.* *J. Immunol.*138: 3145-3151.

Ghosh P., Amaya M., Mellins E. and Wiley D.C. 1995. The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3. *Nature* 378: 457-462.

Gilbert M.J., Riddell S.R., Platcher B., Greenberg P.D. 1996. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*: 383, 720-722.

Gleaves C.A., Smith T.F., Shuster E.A., and Pearson G.R. 1985. Comparison of standard tube and shell vial culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J.Clin Microbiol.* 21:217

Gyulai Z., Endresz V., Burian K., et al. 2000. CTL responses to human CMV pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J. Infect. Dis.* 181:1537

Hampel W., Mertens, T. 2001. *Med Mikrobiologie*, Fischer.

Hebart H., Kanz L., Jahn G., Einsele H. 1998. Management of Cytomegalovirus infection after solid organ or stem cell transplantation. *Drugs.* 55. 59-72.

- Hegde N.R., Tomazin R.A., Wisner T.W., Dunn C., Boname J.M., Lewinsohn D.M., Johnson D.C. 2002. Inhibition of HLA-DR Assembly, Transport, and Loading by Human CMV Glykoprotein US3: a Novel Mechanism for Evading Major Histocompatibility Complex Class II Antigen Presentation. *J. Virol.* p.10929-10941
- Heslop H.E., NG C.Y., Li C., Smith C.A., et al. 1996. Long term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med.* 2: 551
- Ho M. Cytomegalovirus. 1991. *Biology and infection.* New York: Plenum Publishing Corporation
- Ho M. 1994. Advances in understanding cytomegavirus infection after transplantation. *Transplant Proc.* 26:7
- Janeway, C.A., Travers P. 1997. *Immunologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Kern F., Surel I.P., Faulhaber N., Frommel C., et al. 1999. Target structures of the CD8⁺-T cell response to human CMV: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J. Virol.* 73:8179
- Kern F., Bunde T., Faulhaber N., et al. 2002. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein pp65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individual. *J. Infect Dis.* 185:1709
- Khan N., Cobbold M., Keenan R., and Moss P.A. 2002. Comparative analysis of CD8⁺ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis.* 185:1025
- Khattab B., A.M., Lindemaier W., Fank R., and Link H.1997. Three T-cell epitopes within the c-terminal 265 amino acids of the matrix protein pp 65 of human cytomegalovirus recognized by human lymphocytes. *J Med Virol.* 52: 68.
- Kleihauer A., Grigoleit U., Hebart H., et al. 2001. Ex vivo generation of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells by peptide pulsed dendritic cells. *Brit. J: Haematol.* 113: 231
- Komanduri K.V., Donahoe S.M. Moretto W.J., Schmidt K.D. Gillespie G., Ogg G.S., Roederer M., Nixon D.F., and McCune J.M.2001. Direct measurement of CD4⁺ and CD8⁺ T cell response to CMV in HIV-1-infected subjects. *Virol* 279, 459-470
- Kourilsky P., Claverie, J.M., 1989. MHC-antigen interaction: what does the T cell receptor see? *Adv. Immunol.* 45: 107-193

- Krause H., Hebart H., Jahn G., Muller C.A., and Einsele H. 1997. Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant.* 19: 1111
- Levin M.J., Rinaldo J.R., Leary P.L., Zaia J.A., Hirsch M.S. 1979. Immune response to herpesvirus antigens in adults with acute cytomegaloviral mononucleosis. *J. Inf. Dis.* 140: 851-857.
- 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 response after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV-disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood* 83:1971-1979.
- Linz U., Degenhardt H. 1990. Die Polymerase-Kettenreaktion. *Naturwissenschaften* 77: 515-530.
- Liu Y.-N.C., Curtsinger J., Donahue P.R., Klaus A., Opitz G., Cooper J., Karr R.W., Bach F.H. and Gehrz R.C. 1993. Molecular analysis of the immune response to human cytomegalovirus glykoprotein B.I. Mapping of HLA-restricted helper T-cell epitopes on gp93. *J. Virol.* 74: 2207-2214.
- Ljungman P., Aschan J., Azinique J.N., Brandt L, Ehrnst A., Hammarström V., Klaesson S., Linde A., Lönnqvist. B., Ringden O., Ahren B. and Gahrton G. 1993. Cytomegalovirus viraemia and specific T-helper cell responses are predictors of disease after allogeneic marrow transplantation. *Br J. Hematol.* 83: 118-124.
- Ljungman P., Deliers G.L., Platzebecker U., et al. 2001. Cidofovir for CMV infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow transplantation. *BLOOD* 97: 388
- Ljungman P., Biron P., Bosi A., Cahn J.Y., Goldstone A.H, Gorin N.C., Link H., Messina C., Michallet M., Richard C and et al. 1994. Cytomegalovirus interstitial pneumonia in autologous bone transplant recipient. *Infectious Disease Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. Bone Marrow Transplant* 13, 209-12.
- Ljungman P., Engelhard D., Link H., et al. 1992. Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group. *Clin Infect Dis.* 14: 831
- Ljungman P., Lönnqvist B., Wahren B., Ringden O., and Gahrton G. 1985. Lymphocyte responses after cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients. A one-year follow-up. *Transplantation.* 40:515
- Longmate J., York J., La Rosa C., et al. 2001. Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics.* 52:165

- McLaughlin-Taylor E., Pande H., Forman S.J., Tanamachi B., Li C.-R., Zaia J.A., Greenberg P.D. and Riddell S.R. 1994. Identification of the major late cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Med Virol.* 43: 103-110
- Meyers J.D., Flourney N., Thomas E.D., 1980. Cytomegalovirus infection and specific cell-mediated immunity after marrow transplant. *J. Inf. Dis.* 142: 816-824.
- Miller D.M., Rahill B.M., Boss M.J., Lairmore M.D., Durbin J.E., Waldman W.J. and Sedmak D.D. 1998. Human cytomegalovirus inhibits major histocompatibility complex class II expression by disruption of the JAK/Stat pathway. *J. Exp. Med.* 187: 675.
- Mocarski E.S. 1996. Cytomegalovirus and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M. (eds.) *Fields Virology*, 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia. 2447-2492
- Mocarski E.S. 2004. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cellular Microbiology.* 6(8), 707-717
- Moutaftsi M., Mehl A.M., Borysiewicz L.K., and Tabi Z. 2002. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived cells. *BLOOD.* 99:2913
- O'Sullivan D., Sidney J., Appella E., Walker L., Phillips L., Colon S.M., Miles C., Chestnut R.W. and Sette A. 1991. Characterization of the specificity of peptide binding to four DR haplotypes. *J Immunol.* 145: 1799-1808
- Ottenhoff, T.H., Neuteboom S., Elerink D.G., de Vries R.R. 1986. Molecular localization and polymorphism of HLA class II restriction determinants defines by Mycobacterium leprae-reactive helper T cell clones from leprosy patients. *J. Exp. Med.* 164: 1923-1939.
- Pawelec G., Buhning H.J. 1990. Expression of MHC class II epitopes on human T lymphocyte clones. *Cell. Immunol.* 127: 520-526.
- Peggs K., Verfeurth S., and Mackinnon S. 2001. Induction of cytomegalovirus-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *BLOOD.* 97:994
- Plotkin S., Starr S., Friedman H., Gonczol E., and Weibel R. 1989. Protective effects of Towne cytomegalovirus vaccine against low-passage cytomegalovirus administered as a challenge. *J. Infect. Dis.* 159:860
- Plotkin S., Furukawa T., Zygraich N., and Huygelen. 1975. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infect. Immun.* 12:521

Quinnan J.G.V., Kirmani N., Rook A.H., Manischewitz J.F., Jackson L., Moreschi G., Santos G.W., Saral R. and 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.

Rammensee, H.G., Bachmann J. and Stevanovic S. 1997. MHC ligands and peptide motifs. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

Rammensee, H.G., Friede T., Stevanovic S. 1995. MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41: 178-228

Rasmussen L., Zipeto D., Wolitz R.A., Dowling A., Efron B., and Merigan T.C. 1997. Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. *J. Infect Dis.* 176: 1146

Reddehase M.J., Mutter W., Munch K., Buhring H.J., and Koszinowski U.H. 1987. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* 61, 3102-8.

Reed E.C., Bowden P.S., Dandliker K.E., Lilleby K.E., and Meyers J.D. 1988. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bmt. *Ann. Intern. Med.* 109:783

Retiere C., Prod'homme V., Imbert-Marcille B.M., Bonneville M., et al. 2000. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol.* 72: 3948

Reusser P., Riddell S.R., Meyers J.D., and 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

Ribbert H. 1904. Über protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralblatt für Pathologie.* 15; 945-948.

Riddell S., 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.

Riddell S.R. and Greenberg P.D. 1994. Therapeutic reconstitution of human viral immunity by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocyte clones. *Curr. Top. Microbiolol. Immunol.* 189: 9-34.

Le Roy E., Baron M., Faigle W., Clement D., Lewinsohn D.M., Streblow D.N., Nelson J.A., Amigorena S., and Davignon J.L. 2002. Infection of APC by HCMV controlled

through recognition of endogenous nuclear immediate early protein1 by specific CD4+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 169: 1293-1301.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase. *Science* 239: 487-491.

Sarawar S.R., Lee B.J., Reiter S.K., and Schoenberger S.P. 2001. Stimulation via CD40 can substitute for CD4 T cell function in preventing reactivation of a latent herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 6325

Schoenberger S.P., Toes R.E., van der Voort E.L., Offringa R., and Melief C.J. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 393:480

Schmidt G.M.1991. Treatment of CMV infections and disease in transplantation. *Transplant Proc.* 23 (3 Suppl. 3): 126

Sester M., Sester U., Gärtner B., Heine G., Girndt M., Mueller-Lantzsch N., Meyerhans A., and Köhler H. 2001. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplant* 71. 1287-1294, No. 9.

Slobedman B., Mocarski E.S., Arvon A.M., Mellins E.D., Abendroth A. 2002. Latent cytomegalovirus down-regulates major histocompatibility complex class II expression on myeloid progenitors. *BLOOD.* 100: 2867-2873

Spector S.A., Wong R., Hsia K., Pilcher M., and Stempien M.J. 1998. Plasma cytomegalovirus DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *J.Clin Invest.* 101:497

Stern L., Brown J., Jardetzky K.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L., and 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.

Szamania S., Galloway A., Bruorton M., et al. 2001. Isolation and expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes to clinical scale from a single blood draw using dendritic cells and HLA-tetramers. *BLOOD.* 98: 505

Tabi Z., Mouftafsti M., and Borysiewicz L. K. 2001. Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J Immunol.*166:5695

Trenchel R., Ross S., Husing J., et al. 2000. Reduced risk of persisting cytomegalovirus pp65 antigenaemia and cytomegalovirus interstitial pneumonia following allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplant.* 25:665

Vannucchi A.M., Glinz S., Bosi A., Caporale R., and Rossi-Ferrini P. 2001. Selective ex vivo expansion of cytomegalovirus-specific CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes using dendritic cells pulsed with a human leucocyte antigen A*0201-restricted peptide. *Brit. J Haematol.* 113:479

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.

Wills M., Carmicheal A.J., Mynard K., Jin X., Weekes M.P., Platcher B., Sissons J.G.P. 1996. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: Frequency, specificity and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J.Virol.* p. 7569-7579.

Winston D.J., Ho W.G., Champlin R.E. 1991. Ganciclovir and immunoglobulin in bone marrow transplants. In: Gale R.P., Champlin R.E. (eds). *New strategies in bone marrow transplantation.* Wiley-Liss, New York, pp 337-348.

Winston D.J., Ho W.G., Champlin R.E. 1990. Cytomegalovirus infections after allogeneic bone marrow transplantation. *Rev. Infect. Dis.* 12 Suppl. 7: 776-792.

Zajac A.J., Murali-Krishna K., Blattman J.N., and Ahmed R. 1998. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Curr Opin Immunol.* 10:444-449

Zinkernagel, R.M., and Doherty P.C. 1997. The discovery of MHC restriction. *Immunol. Today.* 18:1

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christine Beatrice Renner

Geburtstag: 03.03.1979

Geburtsort: Stuttgart

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1989-1998 Wilhelms-Gymnasium Stuttgart

1998 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

1998-2000 Vorklinisches Studium an der Universität Jena

2000 Vorärztliche Prüfung in Jena

2000-2004 Klinisches Studium an der Universität Tübingen

2003-2004 Praktisches Jahr an der Universitätsklinik Tübingen mit dem Wahlfach
Diagnostische Radiologie

2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen

2003 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen

2004 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung in Tübingen am 10.11.2004