

**Aus dem Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der
Viruskrankheiten Tübingen
Direktor: Professor Dr. G. Jahn**

**Entwicklung eines ELISA-basierten Neutralisationstests zur
Untersuchung der CMV-spezifischen Immunantwort
stammzelltransplantierter Patienten
nach adoptivem Immuntransfer**

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

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

**vorgelegt von
Martina Christiane Maria Mangin
aus Tübingen**

2004

Dekan: Professor Dr. med. C. Claussen
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. C. Sinzger
2. Berichterstatter: Professor Dr. H. – G. Rammensee

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

2 Einleitung.....	6
2.1 Struktur von HCMV	6
2.1.1 Der Aufbau des HCMV-Virions.....	6
2.1.2 Der Aufbau des Genoms von HCMV.....	7
2.2 Replikationszyklus	8
2.3 Bedeutung von HCMV als Krankheitserreger	9
2.4 Zelluläre Immunantwort	11
2.5 Humorale Immunantwort.....	12
2.5.1 Proteine die eine humorale Immunantwort induzieren	12
2.5.2 Neutralisierende Antikörper.....	13
2.5.3 Die Kinetik der humoralen Immunantwort	14
2.5.4 Bedeutung der humoralen Immunantwort	15
2.6 Stammzelltransplantation (SZT)	16
2.7 CMV – Infektion nach Stammzelltransplantation (SZT)	16
2.8 Adoptiver Immuntransfer.....	17
2.9 Zielsetzung dieser Arbeit	18
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Untersuchungsmaterial	20
3.1.1 Patienten	20
3.1.2 Neutralisationstest.....	20
3.1.3 Immunzytochemische Färbung	22
3.1.4 ELISA	22
3.2 Methoden.....	23
3.2.1 Kultur von humanen Vorhautfibroblasten (HFF).....	23

3.2.2 Virusanzucht	23
3.2.3 Bestimmung der Neutralisationskapazität durch einen Neutralisationstest.....	24
3.2.4 Fixierung der Fibroblasten.....	26
3.2.5 Immunzytchemische Färbung der Zellkerne HCMV–infizierter Zellen	26
3.2.6 ELISA zum Nachweis CMV-infizierter Zellen	27
4 Ergebnisse	29
4.1 Etablierung eines ELISA-basierten Neutralisationstests	29
4.1.1 Optimierung von Zellkultur-, Infektions- und Neutralisationsbedingungen	29
4.1.2 Etablierung des ELISA	31
4.2. Untersuchung des Verlaufs der Serumkonzentration neutralisierender Antikörper bei Patienten nach allogener SZT und adoptivem Immuntransfer	39
4.3 Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der neutralisierenden Antikörper-Antwort und dem Transfer ausschließlich CD8+ bzw. CD4+ und CD8+ T-Zellen.....	44
4.4 Zusammenhang zwischen gemessener Konzentration neutralisierender Antikörper und dem Nachweis von Virus-DNA durch PCR.....	45
5 Diskussion.....	49
5.1 Entwicklung eines ELISA-basierten Mikroneutralisationstests.....	49
5.2 Bedeutung der Stammspezifität der Neutralisationskapazität.....	52
5.3 Verlauf der Serum-Konzentration neutralisierender Antikörper bei Patienten nach allogener SZT und adoptivem Immuntransfer.....	54
5.4 Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der neutralisierenden Antikörper-Antwort und dem Modus des adoptiven Immuntransfers	55
5.5 Korrelation der gemessenen Neutralisationskapazität mit der HCMV- Virämie	56
6 Zusammenfassung.....	59
7 Literaturverzeichnis	61

2 Einleitung

Das humane Cytomegalievirus (HCMV) zählt zu der Gruppe der β -Herpesviren. Wie bei allen Herpesviren ist auch bei HCMV das Virion aus einem Protein-Core, das das lineare, doppelsträngige DNA-Genom enthält, einem ikosaedrischen Kapsid, dem Tegument (Modrow 1997) und der von Vesikeln des Golgi-Apparates (Mettenleiter 2002) abgeleiteten Hüllmembran, einer Lipid-Doppelschicht, aufgebaut. Ein weiteres charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist ihre Fähigkeit, nach der Erstinfektion latent im Organismus zu verbleiben. Als Vertreter der Gruppe der β -Herpesviren zeigt das HCMV eine hohe Wirtsspezifität und einen relativ langen Vermehrungszyklus (Roizman 1981; Stinski 1983; Ho 1991; Mokarsky 1993).

2.1 Struktur von HCMV

2.1.1 Der Aufbau des HCMV-Virions

Das HCMV-Virion enthält mindestens 30 Polypeptide, deren Größe von 20 bis zu mehr als 300 kDa reicht (Kim et al. 1976; Stinski 1976; Gibson 1983; Baldick and Shenk 1996). Im Inneren liegt das Virus-Core, eine fibrilläre Proteinmatrix, mit der das Genom assoziiert ist. Das Core ist von einem ikosaedrischen Kapsid umgeben, das aus 162 Kapsomeren besteht (Modrow 1997). Das Kapsid wiederum umgibt eine Hüllmembran, in die virale Glykoproteine, wie z.B. die Glykoproteine gB (UL55) (Pereira et al. 1984; Cranage et al. 1986; Spaete et al. 1988), gH (UL75) (Pachl et al. 1989), gM (UL100), gL (UL115) (Spaete et al. 1993) und gO (UL74) (Huber and Compton 1998), eingelagert sind (Britt and Mach 1996). Die Glykoproteine erfüllen wichtige Funktionen bei der Adsorption der Viruspartikel an Zellrezeptoren, bei der Penetration und Aufnahme der Partikel in die Zelle (Keay and Baldwin 1991; Compton et al. 1993; Navarro et al. 1993; Bold et al. 1996; Tugizov et al. 1996; Tugizov et al. 1998), sowie bei der Induktion einer neutralisierenden Immunantwort (Britt and Mach 1996). Zwischen dem Kapsid und der Hüllmembran befindet sich das Tegument, eine nur teilweise strukturierte Proteinmatrix (Chen et al. 1999; Zhou et al. 1999), die bei der Infektion in die Zelle gelangt. Einigen

Tegumentproteinen wird eine regulatorische Funktion während der Frühphase des Replikationszyklus zugeschrieben. So ist das Tegumentprotein pp71 (UL82) ein Transaktivator (Liu and Stinski 1992), der die Expression von immediate-early (IE) Genen induziert, also derjenigen Gene, die als erste nach Infektion exprimiert werden. Dem Tegumentprotein pp65 (UL83) wird dagegen die Funktion einer Proteinkinase zugeschrieben (Britt and Auger 1986; Roby and Gibson 1986; Gallina et al. 1999), allerdings scheint es für die virale Replikation entbehrlich zu sein (Schmolke et al. 1995). Beide Proteine gelten gleichzeitig als wichtige Antigene für die T-Zell Aktivierung (Riddell and Greenberg 1995). Auch das Phosphoprotein pp150, ebenfalls ein Tegumentprotein, hat starke immunogene Eigenschaften (Jahn et al. 1987; Gibson 1996).

2.1.2 Der Aufbau des Genoms von HCMV

Mit ca. 230 kbp trägt HCMV von allen bekannten humanpathogenen Herpesviren das größte Genom. Die lineare, doppelsträngige DNA besteht aus zwei unterschiedlich langen Segmenten einmalig vorkommender Sequenzen, der sogenannten Unique long-(U_L) und der Unique short-Region (U_S). Durch intramolekulare Rekombination an der Verbindungsstelle zwischen U_L und U_S können aus diesen Komponenten vier isomere HCMV-Genomstränge entstehen, die mit gleicher Häufigkeit auftreten. An den Genomenden und an der Verbindungsstelle zwischen U_L und U_S befinden sich Genomregionen, die aus Sequenzwiederholungen bestehen. Sie werden, je nach Lage, als Terminal Repeats (TR) bzw. Internal Repeats (IR) bezeichnet. Die komplexe Zusammensetzung aus einmaligen Segmenten und Wiederholungseinheiten bezeichnet man als Klasse E Genomstruktur (Mokarsky 1993). Das vollständig sequenzierte Genom des Laborstammes AD169 enthält die Information für mehr als 160 Genprodukte, von denen viele bisher noch nicht näher charakterisiert sind (Chee et al. 1990; Jahn and Mach 1990; Davison et al. 2003). Klinische Isolate haben gegenüber den gängigen Laborstämmen ein um 15 kbp größeres Genom mit 19 ORF (Offene Leserahmen) für potentielle Glykoproteine (Ramirez et al. 1979; Stinski et al. 1979; Cha et al. 1996). Diese Genomdifferenz äußert sich u.a. in der unterschiedlichen Virulenz der

verschiedenen Virusstämme (Klein et al. 1999). So führen die Laborstämme AD169 und Towne zwar zur Serokonversion, nicht jedoch zu einer CMV-Erkrankung.

2.2 Replikationszyklus

HCMV repliziert vor allem in Zellen epithelialen, endothelialen und bindegewebigen Ursprungs (Sinzger et al. 1995; Plachter et al. 1996). Die Viren adsorbieren durch ihre Oberflächenproteine an bestimmte Strukturen der Zelloberfläche. Die Membranen der Viruspartikel und der Zelle verschmelzen miteinander (Compton et al. 1992), und das Kapsid gelangt mit dem Tegument in das Zytoplasma. Die Kapside werden zu den Kernporen transportiert, durch die das Genom ins Nucleoplasma entlassen wird. Eine andere Möglichkeit der Infektion ist das Verschmelzen der Membranen infizierter Zellen mit denjenigen nichtinfizierter Zellen, also eine Membranfusion. Auf diesem Weg werden die Kapside von Zelle zu Zelle weitergegeben (Mokarsky 1993; Modrow 1997).

Nach der Infektion kommt es in permissiven Zellen zu einer kaskadenartigen Expression viraler Gene. Die zu Beginn exprimierten immediate-Early (IE)- oder α -Proteine werden von einer Genomregion des U_L -Segmentes kodiert (Michelson FS 1977; Jahn et al. 1984). Die Transkription der IE-Gene des Cytomeglovirus beginnt innerhalb weniger Stunden nach Infektion und benötigt keine de-novo-Proteinsynthese (Stinski 1983; Messerle et al. 1992). Ihre Genprodukte sind überwiegend Transaktivatoren (Stasiak and Mocarski 1992), denen eine regulatorische Funktion bei der Kontrolle der Virusreplikation zukommt (Stinski 1983; Stenberg et al. 1989; Spector 1996; Stenberg 1996). So induzieren sie z.B. die Expression der frühen (delayed-early-) Gene, auch β -Gene genannt (Iskenderian et al. 1996; Romanowski and Shenk 1997), und der späten (late-), bzw. γ -Gene (Stinski 1978; Depto and Stenberg 1989; Colberg-Poley 1996; Greaves and Mocarski 1998). Die Early-Gene kodieren für virale Enzyme und Proteine, die für die Vermehrung der DNA wichtig sind (Pari et al. 1993; Penfold and Mocarski 1997; Ahn et al. 1999). Nach der Initiation der viralen DNA-Replikation werden die späten Proteine gebildet. Ihre Synthese ist

aber nicht streng von der DNA-Replikation abhängig ist (Hones and Roizman 1974). Sie haben hauptsächlich strukturelle Funktionen (Mokarsky 1993).

Der Zusammenbau der verschiedenen Strukturproteine zu Partikelvorstufen findet im Zellkern statt (Rixon 1993; Gibson 1996; Steven A.C. 1997; Roizman B 2001). Im Zytoplasma werden aus diesen Vorstufen über mehrere Zwischenstufen infektiöse Virionen gebildet (Sanchez et al. 2000; Sanchez et al. 2000), die dann über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat zur Zelloberfläche gelangen (Eggers et al. 1992), wo ihre Freisetzung erfolgt (Gibson 1996; Mettenleiter 2002). Diese Art der Virusvermehrung bezeichnet man als lytische Infektion.

Wie alle Herpesviren hat auch das HCMV Mechanismen entwickelt, die es ihm ermöglicht, nach der Erstinfektion im infizierten Organismus in ein Latenzstadium überzugehen. Während die Erstinfektion mit der Produktion infektiöser Viren einhergeht (Zanghellini et al. 1999), sind in der Latenzphase keine Viruspartikel nachweisbar. Die Virus-DNA liegt während der Latenz als extrachromosomales Episom vor (McVoy et al. 1997; Bolovan-Fritts et al. 1999). Sie wird parallel mit dem Zellgenom durch die zelluläre DNA Polymerase repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Die Mechanismen, die für die Unterdrückung der Produktion infektiöser Partikel, für die Aufrechterhaltung der Latenz und für die Reaktivierung zur lytischen Infektion führen, sind noch nicht genau geklärt (Modrow 1997; Soderberg-Naucler et al. 1997; Soderberg-Naucler and Nelson 1999).

2.3 Bedeutung von HCMV als Krankheitserreger

Die Durchseuchungsrate mit HCMV in westlichen Industrieländern beträgt je nach Autor zwischen 50% und 80% (Pass 1985; Mokarsky 1993), wobei die Erstinfektion häufig schon vor der Pubertät erfolgt (Rosenthal et al. 1997). Das Virus wird in Muttermilch, Speichel, Urin, Sperma und Stuhl ausgeschieden (Alford 1993). Die Übertragung erfolgt durch direkten oder indirekten körperlichen Kontakt (Pass 1999), aber auch durch Blut bzw. Blutprodukte (Winston et al. 1980).

Ähnlich wie bei anderen Herpesvirus-Infektionen, kann bei HCMV auf die akute Infektion eine Persistenz der HCMV-Infektion (Mocarski and Courcelle 1999) oder aber eine Latenzphase folgen. Aus dieser Latenzphase heraus kann es lebenslang zur Reaktivierung der Infektion kommen (Drew and Lalezari 1999; Mocarski and Courcelle 1999). Durch die Diversität der Antigene verschiedener Virusstämme treten aber auch Reinfektionen mit HCMV auf (Alford 1993).

Der Immunstatus des Infizierten bestimmt, ob die Infektion asymptomatisch bleibt, oder ob es zu einer Erkrankung mit klinischen Symptomen kommt, die auch einen fatalen Verlauf zeigen kann. Von Bedeutung sind deshalb vor allem kongenitale Erkrankungen von Neugeborenen mit noch nicht voll ausgereiftem Immunsystem und Erkrankungen immunsupprimierter Patienten, z.B. nach Knochenmarktransplantation oder bei einer HIV-Infektion.

Die Primärinfektion verläuft beim gesunden Kind oder Erwachsenen asymptomatisch (Pass and Boppana 1999) oder mononukleose-ähnlich mit Fieber, Leberfunktionsstörung und Lymphzytose (Jordan et al. 1973; Cohen and Corey 1985; Alford 1993).

Bei Neugeborenen ist für die Prognose wichtig, ob es sich um eine perinatale oder eine pränatale Infektion handelt. Die pränatale Infektion zeigt in ca. 10 % der Fälle einen symptomatischen Verlauf der Erkrankung (Mocarski and Courcelle 1999). Mögliche Krankheitszeichen sind Hepatosplenomegalie, Ikterus thrombozytopenische Purpura, sowie zentralnervöse Störungen, wie Mikrozephalie und Gehörschäden (Jahn et al. 1988; Boppana et al. 1992). Die perinatale Übertragung des Virus kann zu ähnlichen, aber häufig abgeschwächten Symptomen führen (Chiba et al. 1975; Kumar et al. 1984).

Morbidität und Mortalität der HCMV-Infektion sind bei immunsupprimierten Patienten, z.B. nach Stammzelltransplantation, Nierentransplantation oder bei einer HIV-Erkrankung, stark erhöht (Drew and Lalezari 1999; Mocarski and Courcelle 1999). Bei Primärinfektion nach Transplantation erfolgt die Übertragung entweder durch das Transplantat selbst, z.B. bei einer Nierentransplantation, oder durch mit HCMV kontaminiertes Blut bzw. Blutprodukte (Yeager et al. 1981; de Graan-Hentzen et al. 1989). Das Risiko

sinkt bei der Verwendung leukozytenarmer Blutkonserven (Gilbert et al. 1989; Bowden et al. 1995). Die hämatogene Dissemination durch infizierte Makrophagen oder zirkulierende Endothelzellen (Grefte et al. 1993; Sinzger et al. 1996) kann zu systemischen Infektionen führen (Sinzger and Jahn 1996). Man findet bedingt durch die organtypischen Viruslokalisationen u.a. Pneumonien, gastrointestinale Ulzerationen, Hepatitiden, Chorioretinitis und Enzephalitiden (Boeckh and Bowden 1995; Ljungman 1996). Die durch CMV ausgelöste interstitielle Pneumonie zeigt besonders schwere Verläufe und ist trotz Behandlung mit einer Letalität von 40% bis 70 % (Ljungman et al. 1994) eine der häufigsten Todesursachen bei Knochenmarktransplantierten. Sie tritt meist 30 -100 Tage nach Transplantation auf (Einsele et al. 2003), oft im Rahmen einer akuten GVHD und einer entsprechenden Verstärkung der Immunsuppression.

2.4 Zelluläre Immunantwort

Protein-Antigene werden von T-Zell-Rezeptoren als kurze Peptidfragmente erkannt, die an einen Haupthistokompatibilitäts-Komplex (MHC) der Klasse I oder II gebunden sind. Peptide, die von endogenen, intrazellulären Proteinen stammen, werden von MHC-Molekülen der Klasse I präsentiert, die eine CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten Antwort induzieren. Peptide, die von exogenen, in die Zelle aufgenommenen Proteinen stammen, werden dagegen von MHC-Molekülen der Klasse II präsentiert, die wiederum für die CD4+ T-Helferzell Antwort verantwortlich sind (Janeway 1997). Virus- und Tumorantigene werden vorwiegend über den endogenen Weg präsentiert (Dazzi and Goldman 1998). Daher ist eine wichtige Rolle der CD8+ T-Zellen bei der Bekämpfung einer HCMV-Infektion wahrscheinlich (Riddell and Greenberg 1997).

Für die dominante Rolle der zellulären Immunantwort spricht ebenfalls, dass es auch bei seropositiven Patienten, also trotz bestehender humoraler Immunantwort, zur Reaktivierung einer HCMV-Erkrankung kommen kann. Auch wurde gezeigt, dass eine Korrelation zwischen der Aktivität zytolytischer T-Lymphozyten und dem Verlauf einer primären HCMV-Infektion bei Transplantationspatienten besteht (Quinnan et al. 1982; Li et al. 1994; Krause

et al. 1997; Reusser et al. 1997). Im Tiermodell, dem murinen Cytomegalievirus (MCMV), schützen aktivierte CD8⁺ T-Lymphozyten gegen eine letale Erkrankung (Reddehase et al. 1987). Die Rolle der CD4⁺ T-Lymphozyten ist noch nicht vollständig geklärt. Sie erscheinen als erstes Anzeichen der Ausbildung einer spezifischen zellulären Immunität ca. sieben Tage nach dem ersten Nachweis von HCMV-DNA im peripheren Blut (Rentenaar et al. 2000). CD4⁺ T-Zellen dominieren die Immunantwort während persistierender Infektionen (Sester et al. 2002). Bei MCMV-Infektionen können CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von CD8⁺ T-Lymphozyten eine Ausbreitung des Virus verhindern (Jonjic et al. 1990). Zusätzlich scheint eine lang andauernde CD4⁺ Lymphozytopenie für eine schlechtere Prognose der CMV-Erkrankung zu sprechen (Einsele et al. 1993; Sester et al. 2001).

Antigene für die T-Zell-Antwort gegen CMV sind z.B. die Tegumentproteine pp65 und pp150, aber auch gB und gH (Riddell et al. 1994). Im Mausmodell ist es gelungen durch Impfung mit einem nichtstrukturellen viralen Protein pp89, einem IE-Protein, eine protektive T-Lymphozyten-Antwort zu induzieren (Koszinowski et al. 1990). Bei HCMV scheinen IE-Antigene allerdings zahlenmäßig keine dominanten Ziele der T-Zell-Antwort zu sein (Riddell et al. 1994).

HCMV hat allerdings auch Mechanismen entwickelt, um die zelluläre Immunantwort zu umgehen. So wird z.B. nach der Expression der frühen viralen Gene in infizierten Zellen die Bildung von MHC-Klasse-I-Molekülen unterdrückt und somit ihr Erkennen durch zytotoxische T-Zellen verhindert (Riddell and Greenberg 1995; Ploegh 1998; Hengel et al. 1999).

2.5 Humorale Immunantwort

2.5.1 Proteine die eine humorale Immunantwort induzieren

Während einer HCMV-Infektion werden Antikörper gegen eine Vielzahl von viralen Proteinen gebildet (Landini and Michelson 1988; Britt 1991). Es können Antikörper gegen Strukturproteine, wie das Haupt-Kapsid-Protein (MCP/UL86) und die Tegumentproteine pp65 (UL83), pp71 (UL82), pp28 (UL99) und pp150

(UL32) nachgewiesen werden (Schoppel et al. 1997; Greijer et al. 1999). Die Glykoproteine gB (UL55), auch gp58/116 genannt, und gH (UL75), auch gp86, sind ebenfalls wichtige Antigene, die zur Induktion der humoralen Immunantwort führen (Rasmussen et al. 1984; Cremer et al. 1985; Meyer et al. 1988; Britt et al. 1990; Britt and Mach 1996; Navarro et al. 1997). Aber auch nichtstrukturelle Proteine, wie z.B. zwei DNA-bindende Phosphoproteine mit einem Molekulargewicht von 49 kDa (p52) bzw. 150 kDa, ein IE-Phosphoprotein von 72 kDa und pUL57, ein kleines Polypeptid, können eine ausgeprägte Antikörperantwort hervorrufen (Alford 1993; Vornhagen et al. 1995)

2.5.2 Neutralisierende Antikörper

Viren binden, um in eine Zelle einzudringen, an bestimmte Oberflächen-Proteine dieser Zelle. Neutralisierende Antikörper können diese Bindung verhindern, indem sie entweder direkt die Bindung des Virus an die Oberflächen-Rezeptoren blockieren oder Veränderungen in der Virus-Struktur verursachen, so dass die Interaktion mit den Rezeptoren oder die Fusion der Virus-Membran mit der Zelloberfläche gestört wird (Janeway 1997). Bei neutralisierenden Antikörpern handelt es sich meist um IgG- und IgA-Antikörper, aber auch IgM-Antikörper können diese Funktion ausüben. Sie sind bei HCMV hauptsächlich gegen die Hüll-Glykoproteine gB, gH und gM gerichtet (Pereira et al. 1984; Britt 1991; Marshall et al. 1992; Li et al. 1995).

Das HCMV verfügt über verschiedene Mechanismen, um die neutralisierende Immunantwort zu umgehen (Mocarski and Courcelle 1999). Diese Mechanismen könnten für das Entstehen einer andauernden produktiven Infektion mitverantwortlich sein. So scheint HCMV die Fähigkeit zu besitzen, die Bildung von Glykoproteinen zu induzieren, die perinukleär und an der Zelloberfläche als F_c-Rezeptor wirken können. Diese Rezeptoren führen zur unspezifischen Bindung der F_c-Region von Immunglobulinen und verhindern so eine Neutralisation (Alford 1993). Zusätzlich wird die Fähigkeit HCMV zu neutralisieren auch von den Unterschieden im Genom der einzelnen HCMV-Stämme beeinflusst (Chou 1989; Urban et al. 1992; Klein et al. 1999). HCMV

wirkt aber auch direkt immunsuppressiv, indem es die proliferative Lymphozytenantwort vermindert und für Defekte der Makrophagen und der antigen-präsentierenden Zellen verantwortlich ist (Mocarsky 1993; Grigoleit et al. 2002).

2.5.3 Die Kinetik der humoralen Immunantwort

Während der Primärinfektion bildet der Organismus IgM-, IgA- und IgG-Antikörper, die mit serologischen Methoden, wie Latex-Agglutinations-Test, Western Blot und ELISA (Kraat et al. 1992) nachgewiesen werden können. Ihr Nachweis wird zur serologischen Diagnostik primärer oder sekundärer HCMV-Infektionen genutzt (Rothe 2000). Vor allem gegen das Glykoprotein gB gerichtete Antikörper spielen hierbei eine Rolle. Sie machen einen Großteil der gegen HCMV gerichteten Antikörper infizierter Patienten aus (Britt et al. 1990). Zusätzlich zeigen sie nach Infektion einen früheren Konzentrations-Anstieg im Vergleich mit gegen andere HCMV-Proteine gerichteten Antikörpern, sie erreichen ein höheres Niveau und persistieren länger (Cremer et al. 1985).

Die Konzentration an IgM-Antikörpern erreicht ihr Maximum schon in der frühen Phase der Infektion. Sie verschwinden 12 – 16 Wochen nach Beginn einer subklinischen Infektion, können aber bei symptomatischen Infektionen über einen längeren Zeitraum persistieren. IgG-Antikörper zeigen die höchsten Konzentrationen innerhalb der ersten ein bis zwei Monate nach Beginn der Infektion. Bei ihnen handelt es sich hauptsächlich um die Unterklassen IgG1 und IgG3. IgG2 und IgG4-Antikörper können nur bei sehr hohen Gesamtkonzentrationen an IgG mit empfindlichen Methoden nachgewiesen werden (Zanghellini et al. 1999).

Sowohl bei akuter Erkrankung, als auch in der Rekonvaleszenz-Phase sind IgA1- und IgA2-Antikörper nachweisbar (Alford 1993).

Für die neutralisierenden Glykoprotein-spezifischen Antikörper zeigte sich allerdings, dass sie bei Primärinfektion mit HCMV erst mit einer Verzögerung von 50 - 100 Tagen gebildet werden, während dies bei einer Reaktivierung des Virus oder bei einer Reinfektion sofort geschieht (Pass et al. 1983; Schoppel et al. 1997; Zanghellini et al. 1999). Das könnte einer der Gründe dafür sein, dass

das Risiko einer Übertragung von HCMV auf den Feten bei einer Primärinfektion höher ist als bei einer Sekundärinfektion (Adler 1995), bzw. dass schwere HCMV-Erkrankungen hauptsächlich bei seronegativen Empfängern seropositiven Knochenmarks auftreten (van Son and The 1989; Adler et al. 1995).

2.5.4 Bedeutung der humoralen Immunantwort

Die Rolle der humoralen Immunantwort bei HCMV-Infektionen ist noch nicht abschließend geklärt. Sie scheint bei MCMV vor allem für den klinischen Verlauf der Erkrankung von Bedeutung zu sein, da hier Antikörper der limitierende Faktor bei der Prävention einer Virus-Dissemination sind (Koszinowski et al. 1990). Dies gilt vor allem nach der Reaktivierung einer CMV-Infektion (Jonjic et al. 1994). Darüber ob nach Transplantation die Abwesenheit von viraler DNA im Blut mit hohen Konzentrationen neutralisierender Antikörper einhergeht herrscht noch keine Einigkeit. Manche Autoren sehen diese Aussage durch ihre Untersuchungen bestätigt (Schoppel et al. 1997; Finny et al. 2001), während andere einen solchen Zusammenhang nicht bestätigen konnten (Volpi et al. 1999; Munoz et al. 2001). Bei der Primärinfektion scheinen Antikörper eine untergeordnete Rolle zu spielen und sind wahrscheinlich auch nicht in der Lage vor einer Reaktivierung zu schützen, dies konnte bisher allerdings nur für MCMV-Infektionen gezeigt werden (Jonjic et al. 1994). Ebenso wenig können Antikörper den Übergang einer aktiven Infektion in die virale Latenz verhindern (Shanley et al. 1981). Im Gegensatz dazu korreliert der Schutz seropositiver Patienten vor einer Reinfektion mit HCMV mit dem Titer von neutralisierenden Antikörpern im Serum (Adler 1995). Der passive Transfer von Antikörpern kann zwar die Inzidenz der HCMV-Infektion nicht senken (Bowden et al. 1991; Adler et al. 1995), scheint aber einen günstigen Einfluß auf den klinischen Verlauf einer HCMV-Erkrankung zu haben (Snydman 1994).

2.6 Stammzelltransplantation (SZT)

Die Stammzelltransplantation wird in immer stärkerem Maße zur Therapie von malignen hämatologischen Erkrankungen, aber auch von nicht-malignen Erkrankungen, wie der aplastischen Anämie und Defekten des Immunsystems eingesetzt. Die transplantierten hämatopoetischen Stammzellen werden hauptsächlich aus dem Knochenmark gewonnen. Aber auch peripheres Blut, Nabelvenenblut oder die fötale Leber sind mögliche Quellen. Vor Durchführung der Transplantation ist eine Hochdosis-Chemotherapie nötig, durch die praktisch das gesamte Knochenmark zerstört wird. So sollen je nach Grunderkrankung möglichst alle Leukämiezellen vernichtet, bzw. bei allogener Transplantation eine Transplantatabstoßung durch das Immunsystem des Empfängers verhindert werden.

Neben der Transplantat–Abstoßung und immunologischen Reaktionen der übertragenen lymphoiden Zellen gegen Gewebe des Empfängers, der sogenannten Graft versus host disease (GVHD), zählen vor allem Infektionen zu den gefürchteten Komplikationen (Harrison 1998).

2.7 CMV – Infektion nach Stammzelltransplantation (SZT)

Durch die Immunsuppression kommt es nach SZT bei 70% der seropositiven Patienten zu einer Reaktivierung einer latenten HCMV-Infektion, während bei 30% der seronegativen Patienten mit seropositiven Spendern eine primäre HCMV-Infektion auftritt (Dazzi and Goldman 1998). Bei KMT tritt der größte Anteil der HCMV-Erkrankungen in den ersten 100 Tagen nach Transplantation auf, da zu diesem Zeitpunkt die Hälfte der Patienten noch keine ausreichende zytotoxische T-Zell-Antwort ausgebildet hat (Reusser et al. 1991).

Die Entwicklung der humoralen Immunantwort verläuft bei immunsupprimierten Patienten ähnlich wie beim Immunkompetenten, während die zelluläre Immunantwort stärker beeinträchtigt ist. Allerdings kann es bei schwerer Erkrankung dazu kommen, dass nur eine sehr schwache humorale Immunantwort ausgeprägt wird (Alford 1993).

HCMV–Infektionen können heute durch frühzeitige antivirale Chemotherapie (z.B. mit Ganciclovir oder Foscarnet) meist gut unter Kontrolle gehalten werden (Goodrich et al. 1991), allerdings zeigt Ganciclovir eine deutliche Hämatotoxizität, durch die es zu Neutropenien, bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen kommen kann (Boeckh and Bowden 1995; Salzberger et al. 1997). Bessere Ergebnisse lassen sich erzielen, wenn Ganciclovir mit Immunglobulinpräparaten kombiniert wird (Bass 1993). Trotz dieser Behandlungsmöglichkeiten bleibt die Therapie der HCMV-Pneumonie schwierig. Man versucht daher heute HCMV bei Risiko-Patienten schon nachzuweisen, bevor sie Zeichen einer HCMV-Erkrankung zeigen, um so früh wie möglich eine Behandlung einleiten zu können (Einsele et al. 1995; Prentice and Kho 1997; Hebart et al. 1998).

Allerdings bleibt die Behandlung der sogenannten „late-onset-Erkrankungen“, die mehr als 120 Tage nach SZT auftreten, weiterhin problematisch (Dazzi & Goldman). Daher liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit drei Monate nach auftreten der Infektion bei nur ca. 30% (Ljungman et al. 1992; Boeckh and Bowden 1995). „Late-onset-Erkrankungen“ sprechen nur sehr schlecht auf die antivirale Chemotherapie an. Man geht heute sogar davon aus, dass „late-onset-Erkrankungen“ durch langfristige Ganciclovir-Therapie begünstigt werden, da hier, ebenso wie bei Patienten mit chronischer GvHD, eine verzögerte Rekonstitution der CMV-spezifischen T-Zell-Antwort beobachtet wird (Li et al. 1994; Krause et al. 1997; Einsele et al. 2000).

Bei Patienten mit ungenügender zellulärer Immunantwort, kann versucht werden, durch einen adoptiven T-Zell-Transfer eine CMV-spezifische Immunantwort aufzubauen.

2.8 Adoptiver Immuntransfer

Die Erkenntnis, dass der zellulären Immunantwort einen wesentliche Bedeutung zukommt, führte zum Konzept des adoptiven Immuntransfers. Dabei handelt es sich um einen Transfer von CMV-spezifischen T-Zellen. Man unterscheidet zwei grundsätzliche Verfahren: Es werden entweder ausschließlich CD8+- Zellen übertragen oder aber CD8+ und CD4+Zellen.

Die Tegumentproteine pp65 und pp150 beinhalten immunodominante Epitope, die während des gesamten viralen Replikationszykluses von CD8+ T-Zellen erkannt werden. Durch Stimulation von Spender-T-Zellen mit pp65-Peptid, werden CD8+-Zellen generiert, die durch eine hohe Spezifität für CMV gekennzeichnet sind (Einsele et al. 2002). Nach Transfer dieser Zellen kann in Lymphozyten aus peripherem Blut virus-spezifische lytische Aktivität nachgewiesen werden, die mit dem Schutz vor einer CMV-Erkrankung und dem Verschwinden einer Virämie einhergeht (Walter et al. 1995; Riddell and Greenberg 1997). Die transferierten Zellklone sind auch 12 Wochen nach Injektion noch nachweisbar, so dass ein dauerhafter Schutz vor einer Reaktivierung des Virus gegeben scheint (Dazzi and Goldman 1998; Einsele et al. 2002).

CD8+ und CD4+ Zellen erhält man dagegen durch Stimulation der Spender-T-Zellen mit CMV-Lysat. Hier geht man davon aus, dass die Persistenz der zytotoxischen T-Zellen durch die mittransferierten CD4+ T-Helfer-Zellen verlängert wird (Matloubian et al. 1994; Walter et al. 1995; Einsele et al. 2002). Dadurch wäre ein besserer Schutz gegen eine spätere Reaktivierung des Virus gewährleistet (Reusser et al. 1991). Ebenso könnte es über die Th2-Subklasse der CD4+ T-Helfer-Zellen zu einer vermehrten Stimulation der humoralen Immunantwort kommen (Riddell and Greenberg 1995). Dadurch kann eventuell, wie oben beschrieben, die Dissemination des Virus vermindert werden.

Bisher wurden nach T-Zell-Transfer keine toxischen Effekte beobachtet (Walter et al. 1995; Einsele et al. 2002).

2.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Zur Bestimmung der Konzentration an neutralisierenden Antikörpern, d.h. der Neutralisationskapazität humaner Seren, wird meist ein Neutralisationstest durchgeführt. Die Auswertung dieses Neutralisationstests erfolgte bisher üblicherweise nach immunzytochemischer Färbung der Zellkerne infizierter Zellen, durch Auszählen der infizierten und nicht-infizierten Zellen am Lichtmikroskop. Dieses Verfahren ist sehr zeitaufwendig und das Ergebnis ist in großem Maße von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers abhängig.

Deshalb sollte ein ELISA entwickelt werden, durch den der Neutralisationstest objektiver und mit wesentlich geringerem Zeitaufwand ausgewertet werden kann. Ähnlich der Vorgehensweise bei der mikroskopischen Auswertung des Neutralisationstests wird auch bei der Auswertung durch einen ELISA virales IE-Antigen nachgewiesen. Dieser Nachweis beruht ebenfalls auf der Bindung HCMV-spezifischer Primärantikörper an IE-Antigen und deren Detektion durch Peroxidase-konjugierter Sekundärantikörper. Der Unterschied besteht jedoch darin, dass beim ELISA als Substrat o-Phenylendiamin zugefügt wird, das nach Umwandlung durch eine Peroxidase in Lösung geht. Die Auswertung erfolgt dann durch Messung der Extinktion.

Nach Etablierung des ELISA-basierten Neutralisationstests sollte seine Anwendbarkeit auf eine aktuelle Fragestellung exemplarisch getestet werden. Dabei sollte geprüft werden, ob (1) der erarbeitete Testablauf die simultane Untersuchung von mehreren Seren eines Verlaufs erlaubt, (2) der Test hinlänglich exakt ist, um Titerveränderungen prinzipiell zu erfassen und (3) sich in den beispielhaft ausgewählten Serumverläufen erste Hinweise auf humorale Effekte eines adoptiven T-Zell-Transfers oder auf einen Zusammenhang zwischen Neutralisationskapazität im Serum und der Klärung der Infektion ergeben. Es wurden beispielhaft die Neutralisationskapazität der Seren von fünf Patienten getestet, jeweils zum Zeitpunkt des T-Zell-Transfers und daraufhin einen Monat, zwei Monate und drei Monate nach Transfer. Sollte der Test den genannten Anforderungen genügen, so stünde für zukünftige Analysen eine Methode zur Verfügung, um die Bedeutung der humoralen Immunantwort in größeren Kollektiven zu analysieren.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

3.1.1 Patienten

Für die Untersuchung wurden Seren 5 knochenmarktransplantiertes Patienten der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen verwendet, die im Rahmen von Routineuntersuchungen entnommen worden waren, sowie Seren freiwilliger Spender, die im IgG-ELISA HCMV-seronegativ bzw. –seropositiv waren. Ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen sowie die informierte Zustimmung der Patienten lagen in der Medizinischen Klinik II jeweils vor.

3.1.2 Neutralisationstest

Zellen und Virusstämme

HFF	Humane Vorhautfibroblasten
AD169	HCMV-Laborstamm
Towne	HCMV-Laborstamm
P-Isolat	HCMV-Patienten-Isolat

Sonstige Materialien und Geräte

Brutschrank	Labotec, Göttingen
Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Falcon ^R 15 ml/150 ml	Becton-Dickinson, Heidelberg
FKS Eggenstein	Gibco BRL Lifetechnologies,
Gentamycin	Serva, Heidelberg
L-Glutamin Eggenstein	Gibco BRL Lifetechnologies,

Medium für HFF:

MEM versetzt mit

Glutamin 350 µg/ml

Gentamycin 100 µg/ml

FKS 5% (v/v)

MEM

Gibco BRL Lifetechnologies,

Eggenstein

Micro-Platte (96 well)

Greiner, Frickenhausen

Minisart Sterilfilter 2µm

Sartorius AG, Göttingen

Nonidet P40 (10%)

Appli Chem, Darmstadt

PBS:

137 mol/l NaCl

2,7 mol/l KCl

7,3 mol/l Na₂HPO₄

1,5 mol/l KH₂PO₄

Sterilbank

Heraeus Instruments, Stuttgart

sterile Einmalspritzen 2 ml

Braun, Melsungen

Sucrose

Sigma, Steinheim

Trypsin-EDTA

Gibco BRL Lifetechnologies,

Eggenstein

Wasserbad Lauda RC 6 CS

Lauda, Lauda-Königshofen

Zellkulturschalen

Greiner, Frickenhausen

Zentrifuge Rotina 48 R

Hettich, Tuttlingen

3.1.3 Immunzytochemische Färbung

DAB	Sigma, Steinheim
ELISA-Reader	Behring, Liederbach
Filme Kodak ISO 100/21°	Kodak, Deutschland
H ₂ O ₂ 30% (Perhydrol)	Merk, Darmstadt
Kamera Minolta X 300 s	Minolta, Langenhagen
Maus Anti-HCMV E13	Biosoft, Paris
<i>erkennt IE1-und IE2-Antigen</i>	
<i>(Plachter et al. 1992)</i>	
<i>→ Primärantikörper</i>	
Mikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Peroxidase-konjugiertes	de Beer medicals, Deissen
Gt Fab´anti-mouse IgG	
<i>→ Sekundärantikörper</i>	
Ritips (unsteril)	Ritter, Schwabenmünchen
Schüttler	

3.1.4 ELISA

Diluent für OPD	Abbott, Wiesbaden
<i>Citrat-Phosphat-Puffer+0,2% H₂O₂</i>	
Maus Anti-HCMV E13	Biosoft, Paris
<i>erkennt IE1-und IE2-Antigen</i>	
<i>(Plachter et al., 1993)</i>	
<i>→ Primärantikörper</i>	
1N H ₂ SO ₄	Abbott, Wiesbaden

OPD (o-Phenylendiamin)-HCL	Abbott, Wiesbaden
Peroxidase-konjugiertes	de Beer medicals, Deissen
Gt Fab´anti-mouse IgG	
→ <i>Sekundärantikörper</i>	
Ritips (unsteril)	Ritter, Schwabenmünchen

3.2 Methoden

3.2.1 Kultur von humanen Vorhautfibroblasten (HFF)

Menschliche Hautfibroblasten (HFF) wurden mit „minimal essential medium“ (MEM), dem 2,4 mmol/l Glutamin, 100 µg/ml Gentamycin und 5 % foetalem Kälberserum zugesetzt waren, im Brutschrank bei 37°C mit 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Ausbildung einer konfluenten Zellschicht konnten die Zellen fortlaufend 1:2 bis 1:3 passagiert werden.

3.2.2 Virusanzucht

Subkonfluente Zellen wurden mit HCMV infiziert, indem infektiöser Überstand einer produktiv infizierten Kultur in einem geringen Volumen Kulturmedium 1h bei 37°C inkubiert wurde. Dabei wurde die Kulturflasche mehrmals geschwenkt, um den Flüssigkeitsfilm neu zu verteilen. Anschließend wurde zur weiteren Kultivierung das Medium auf das übliche Volumen aufgefüllt. 5 – 8 Tage nach Infektion, bei Durchinfizierung der Zellkultur mit einem zytopathogenen Effekt (CPE) von 80 – 90%, konnte der Überstand zur Weiterinfizierung oder zum Anlegen von Virusstocks verwendet werden.

Zum Anlegen eines Virusstocks wurde der Überstand abgenommen und 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert. Hiervon wurde wiederum der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei –80°C aufbewahrt.

3.2.3 Bestimmung der Neutralisationskapazität durch einen Neutralisationstest

3.2.3.1 Vorbereitung des Neutralisationstests

Herstellen einer Zellsuspension mit definierter Zellzahl: Zur Durchführung des Neutralisationstests mußte aus den am Boden der Zellkulturschale adhärierenden Fibroblasten eine Zellsuspension hergestellt werden. Dazu wurden pro Zellkulturschale zuerst 10 ml Trypsin auf die Zellen gegeben. Das Trypsin wurde mit einer sterilen Pipette sofort wieder abgezogen. Daraufhin wurden nochmals 2 ml Trypsin auf den Zellen verteilt. Während einer ca. 5-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C löste das Trypsin die Fibroblasten enzymatisch vom Boden der Kulturschale. Die Ablösung wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach Zugabe von 12 ml MEM wurde die Zellsuspension in ein Falcon^R-Röhrchen überführt und mit 1200 U/min 10 min zentrifugiert. Die Zellen hatten sich nun als Pellet am Boden des Röhrchens abgesetzt. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 2 ml MEM resuspendiert. Das Zählen der Zellen erfolgte mit einer Zählkammer nach Neugebauer. Die Zellzahl pro ml ergab sich durch Multiplikation der mittleren Zellzahl eines Quadrates mit 10^4 . Die gewünschte Zellzahl pro ml erhielt man dann durch entsprechendes Verdünnen mit MEM.

Komplementinaktivierung: Um einen möglichen Einfluß des Komplementsystems auf die Neutralisationskapazität auszuschließen, wurden die Seren zuvor durch 30-minütiges Erhitzen auf 56°C im Wasserbad Komplement-inaktiviert.

Beschichten der Platten mit Gelatine: Zur Gelatinebeschichtung wurden die Gewebekulturplatten für 1 h bei 37 °C mit einer 0,1 %igen Gelatinelösung inkubiert. Anschließend wurde die Gelatine abgesaugt und die Zellen sofort ausgesät.

3.2.3.2 Neutralisationstest

Der Neutralisationstest basiert auf einem Protokoll der Arbeitsgruppe M. Mach, Erlangen.

Um einer möglichen Kontamination vorzubeugen wurden die zu untersuchenden Seren sterilfiltriert.

Von jedem Serum wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, in der Serum und MEM im Verhältnis 1/16, 1/32 usw. bis 1/1028 bzw. 1/2048 vorlagen. Viruspräparationen von HCMV-AD169 (ca. 2×10^5 TCID₅₀) wurde mit der Serumverdünnung vier Stunden lang bei 37°C vorinkubiert, um den CMV-spezifischen Antikörpern die Möglichkeit zu geben das Virus zu neutralisieren.

Nach der Vorinkubation wurden HFF zugegeben (200.000 Zellen pro Ansatz, was einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 1 entspricht). Zellen und Serumverdünnung wurden gut gemischt. Der Ansatz wurde dann auf eine 96-well-Platte ausgesät und über Nacht, ca. 18–20 h, bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. In dieser Zeit wuchsen die Zellen am Boden der Vertiefung an, und das Virus hatte Gelegenheit die Zellen zu infizieren.

Nach Übertragen des Ansatzes auf die Mikrotiter-Platte sollte die Platte nur noch mit äußerster Vorsicht bewegt werden, um ein optimales Anwachsen der Fibroblasten auf der Platte zu garantieren.

Von jeder Verdünnungsstufe wurden Vierfachwerte angelegt. Zur Bestimmung der maximalen Infektion erfolgte ein Ansatz ohne Zugabe von Serum, so dass das Virus die Zellen ungehindert infizieren konnte. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz, der weder Serum noch Virus enthielt.

Grob orientierend konnte dann die Infektion schon optisch an der Abkuglung der infizierten Zellen kontrolliert werden.

Die Infektion wurde durch Fixierung der Zellen mit Paraformaldehyd oder Aceton gestoppt.

3.2.4 Fixierung der Fibroblasten

mit Aceton: Zur Vorbereitung wurden die Zellen mit PBS (200 µl/Well) gewaschen. Die Fixierung erfolgte durch 5-minütige Zugabe von 80%-igem Aceton (200 µl/Well) bei Raumtemperatur (RT). Danach wurden die Zellen mindestens 30 min luftgetrocknet. Vor Beginn der Färbung erfolgte nochmals ein dreimaliges Waschen mit PBS.

mit Paraformaldehyd: Die Fixierung erfolgte durch 10-minütige Zugabe von 1% Paraformaldehyd (200 µl/Well) bei Raumtemperatur. Nach Waschen in PBS wurden die Zellen 5 min bei Raumtemperatur in 200 µl/Well PBS mit 0,5% Igepal, 10% Sucrose und 1% FKS permeabilisiert. Daraufhin wurden die fixierten Zellen zuerst in PBS mit 1% FKS, dann mit reinem PBS gewaschen.

3.2.5 Immunzytchemische Färbung der Zellkerne HCMV-infizierter Zellen

Die Färbung beruht auf der Bindung CMV-spezifischer Primärantikörper, die gegen das im Zellkern 24 h nach Infektion exprimierte IE-Antigen gerichtet sind, und Detektion dieser Antikörper durch Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper. Durch die nach Zugabe von DAB, einem Chromogen, erfolgte Farbstoffbildung erscheinen die Zellkerne infizierter Zellen braun gefärbt.

Die fixierten Zellen wurden erst mit 100 µl/Well Anti-HCMV Antikörper E13 (1/1000 verdünnt) 45 min bei 37°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 200 µl/Well PBS erfolgte dann die Inkubation mit 100 µl /Well Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper (1/500 verdünnt), ebenfalls 45 min bei 37°C.

Nach Wiederholen des Waschvorgangs mit PBS wurden die Zellen für 5 min bei 37°C mit DAB inkubiert, das durch die Peroxidase zu einem unlöslichen, braunen Farbstoff umgesetzt wurde.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch mikroskopischen Nachweis infizierter Zellen und nichtinfizierter Zellen. Zur Bestimmung der relativen Neutralisationskapazität wurde von dem Prozentsatz der infizierten Zellen im maximalen Infekt der

Prozentsatz der infizierten Zellen der jeweiligen Serumverdünnungsstufe subtrahiert. Der erhaltene Wert stand für die Verminderung des maximalen Infektes durch das Vorhandensein neutralisierender Antikörper, als Maß für die Neutralisationskapazität der Serumverdünnung. Die relative Neutralisationskapazität ergab sich dadurch, dass die Neutralisationskapazität auf den maximal möglichen Infekt bezogen wurde. Um die Neutralisationskapazität der einzelnen Seren vergleichen zu können, wurde die ND_{50} bestimmt, also diejenige Serumverdünnung, bei der 50% der maximal infizierbaren Zellen infiziert wurden bzw. eine relative Neutralisationskapazität von 0,5 vorlag.

3.2.6 ELISA zum Nachweis CMV-infizierter Zellen

Ebenso wie die Immunzytochemische Kernfärbung beruht auch der ELISA auf der Bindung von CMV-spezifischen Primärantikörpern gegen IE-Antigen und Detektion durch Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper. Als Substrat wird hier jedoch o-Phenylendiamin (OPD-Lösung) verwendet, das nach Umwandlung durch die Peroxidase als gelber Farbstoff in Lösung geht. Wiederum wurden die fixierten Zellen erst mit 100 μ l/Well Anti-HCMV Antikörper E13 beschichtet. Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Antikörper zu gewährleisten wurde die Mikrotiter-Platte kurz in einen Schüttler gestellt. Daraufhin erfolgte eine Inkubation von 45 min bei 37°C. Nach dreimaligem Waschen mit 200 μ l/Well PBS erfolgte dann die Zugabe von 100 μ l/Well Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper. Die Platte wurde nochmals geschüttelt und der Ansatz 45 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 100 μ l/Well OPD-Lösung inkubiert. Die Entwicklung wurde optisch kontrolliert und mit 250 μ l/Well 1N H_2SO_4 abgestoppt, wenn die Ansätze mit maximaler Infektion durch den in Lösung gegangenen Farbstoff eine tiefgelbe Färbung hatten. Dies war normalerweise nach ca. 20 min der Fall. Nach Zugabe von H_2SO_4 fand ein Farbumschlag nach Orange statt.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgte durch Messen der Extinktion (OD) im ELISA-Reader (Behring) bei einer Wellenlänge von 492 nm. Parallel zum Vorgehen beim klassischen Auswertungsverfahren des Neutralisationstests wurde die relative Neutralisationskapazität folgendermaßen bestimmt:

Aus den Vierfachwerten der jeweiligen Serumverdünnungsstufen wurde der Mittelwert errechnet. Werte, die in Wells gemessen wurden, deren Zellen sich während des Fixierungsverfahrens teilweise gelöst hatten, wurden nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Als Ausreißer wurden solche Werte definiert, die um mehr als 10% vom Mittelwert abwichen.

Da die Extinktion schon allein durch die im Well befindlichen Zellen etwas erhöht war, wurden die gemessenen Werte jeweils um diese Hintergrundextinktion korrigiert. Das heißt, von der OD jeder Serumverdünnungsstufe wurde die OD des Ansatzes ohne Serum und ohne Virus abgezogen.

Durch Subtraktion der Hintergrund-korrigierten OD der jeweiligen Serumverdünnung von der korrigierten OD des maximalen Infektes (OD_{max}) erhielt man die Neutralisationskapazität ($OD_{max}-OD$).

Die relative Neutralisationskapazität wurde bestimmt, indem der erhaltene Wert zur OD_{max} ins Verhältnis gesetzt wurde ($OD_{max}-OD/OD_{max}$).

Zum Vergleich der einzelnen Seren wurde wiederum die ND_{50} bestimmt.

Zur Optimierung des ELISAs wurden folgende Testparameter variiert:

- die Fixierung mit 80% Aceton bzw. Paraformaldehyd
- die Beschichtung der Mikrotiter-Platten mit Gelatine
- die Konzentration von Primär- und Sekundärantikörper:
- das Verhältnis von Antikörpervolumen zum Volumen des Wasch-Puffers
- die Virusmenge pro Ansatz
- die Zellzahl pro ml
- die Inkubationszeiten und Dauer des Wasch-Schrittes

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung eines ELISA-basierten Neutralisationstests

Ziel war es, einen für die Untersuchung umfangreicher Serumverläufe geeigneten Mikro-Neutralisationstest zur Bestimmung der Neutralisationskapazität von Seren HCMV-infizierter Patienten zu etablieren. Als Grundlage diente ein Protokoll für einen immunzytochemiebasierten Mikro-Neutralisationstest, der misst, in welchem Umfang Antikörper im Serum die Infektiosität von HCMV vermindern. Die konventionelle Auswertung dieses Mikro-Neutralisationstests am Lichtmikroskop ist jedoch sehr zeitaufwendig und in nicht unbedeutendem Maße von der Erfahrung des Auswertenden abhängig. Deshalb sollte unter Beibehaltung des prinzipiellen Ablaufes ein alternatives Testverfahren entwickelt werden, das auf einem ELISA basiert, um so das Testergebnis objektiver und mit deutlich geringerem Zeitaufwand auswerten zu können.

Ähnlich wie die lichtmikroskopische Auswertung nach immunzytochemischer Kernfärbung beruht auch die Auswertung des Tests durch ELISA auf der Bindung HCMV-spezifischer Primärantikörper an IE-Antigen und deren Detektion durch Peroxidase-konjugierte Sekundärantikörper. Das beim ELISA als Substrat zugefügte o-Phenylendiamin geht, anders als bei der immunzytochemischen Kernfärbung, nach Umwandlung durch eine Peroxidase in Lösung. Die Auswertung kann daher durch Messen der Extinktion im ELISA-Reader erfolgen.

4.1.1 Optimierung von Zellkultur-, Infektions- und Neutralisationsbedingungen

In Vorversuchen wurde die Durchführung des eigentlichen Neutralisationstests optimiert. Ziel dieser Vorversuche war es, eine möglichst gleichmäßige Fibroblastenschicht und Infektion der Zellen zu gewährleisten, da nur so ein aussagekräftiges Ergebnis des ELISA zu erwarten war.

Zellzahl: Zur optimalen Durchführung des Neutralisationstests war ein

gleichmäßiger, dichter Zellrasen am Boden der Wells notwendig. Getestet wurde die Zugabe von 6.000 bis 20.000 Zellen / Well. Erfasst wurden dann die jeweilige Zelldichte und die Gleichmäßigkeit des Zellrasens nach der anschließenden Fixierung. Ein ausreichend dichter Zellrasen wurde durch die Zugabe von ca. 20.000 Zellen/Well erreicht, eine geringere Zellzahl führte bei der nachfolgenden Fixierung der Zellen zu einer verstärkten Zellablösung.

Vorinkubation von Serum und Virus: Es wurden Vorinkubationszeiten von 30 min bis zu 12 h getestet. Gemessen wurde der Anteil der infizierten Zellen an der Gesamtzahl der Zellen / Well. Eine Vorinkubation von zu untersuchendem Serum und Virus über ca. 4 h erwies sich als notwendig, um den eventuell im Serum vorhandenen neutralisierenden Antikörpern die Möglichkeit zu geben, das Virus zu neutralisieren. Bei einer verkürzten Inkubationszeit von 30 min fand keine vollständige Neutralisation statt.

Gelatinebeschichtung der Mikrotiterplatten: Die Beschichtung der Mikrotiterplatten mit Gelatine sollte zu einer besseren Haftung der Fibroblasten am Boden der Wells, und damit zu einem besseren Fixierungsergebnis führen. In unseren Versuchen zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Zellhaftung zwischen Gelatine-beschichteten Platten und Platten, die nicht beschichtet wurden. Auf die Gelatinebeschichtung wurde deshalb verzichtet.

Fixierung der Fibroblasten: Um eine optimale Fixierung der Fibroblasten und eine möglichst gleichmäßige Färbung der Zellkerne zu erreichen wurden unterschiedliche Fixierungsverfahren miteinander verglichen.

Es wurden folgende Fixierungen durchgeführt:

- Fixierung mit 80% Aceton
- Fixierung mit 80% Aceton nach vorherigem Lufttrocknen der Fibroblasten
- Fixierung mit Paraformaldehyd

Das Fixierungsergebnis wurde optisch am Lichtmikroskop kontrolliert.

Mit der Fixierung durch Paraformaldehyd wurde sowohl die gleichmäßigste Zellhaftung als auch die deutlichste Färbung der Zellkerne erreicht.

4.1.2 Etablierung des ELISA

Die Auswertung des Neutralisationstests durch einen ELISA basiert auf demselben Prinzip wie die immunzytochemische Färbung. Der Unterschied liegt darin, dass der Farbstoff, mit dem die Expression von IE-Antigen im Zellkern, also die Infektion der Zelle, nachgewiesen wird, nicht zellgebunden bleibt, sondern in Lösung geht. Die Auswertung erfolgt somit direkt durch Messen der Extinktion im ELISA-Reader.

4.1.2.1 Optimierung des ELISA

Ein wichtiger Parameter für die Auswertung und die Beurteilung des ELISA ist das Verhältnis von Extinktion bei maximaler Infektion zur Extinktion der Negativ-Kontrolle, das heißt derjenigen Extinktion, die schon allein durch die Fibroblasten verursacht wird. Je größer die Differenz zwischen beiden Werten ist, desto genauer kann die ND_{50} bestimmt werden, durch die die Neutralisationskapazität der zu untersuchenden Seren charakterisiert wird.

Bei dem hier verwendeten ELISA-Photometer besitzen Messwerte im OD-Bereich von ca. 0,5 bis 2,0 die größte Aussagekraft.

Um ein möglichst gutes Signal-Hintergrund-Verhältnis und Messwerte im OD-Bereich zwischen 0,5 und 2,0 zu erreichen, wurde jeweils die optimale Konzentration an Primärantikörper, Sekundärantikörper und Virus bestimmt, ebenso die optimale Inkubationszeit.

Antikörperkonzentration: Die Durchführung des ELISA mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen zeigte, dass die Konzentration des Primärantikörpers E13 kaum Auswirkung auf die Extinktion hatte. Die Ergebnisse bei E13-Konzentrationen von 1/500, 1/1000 und 1/2000 zeigten nur geringe Unterschiede. Deutlicher waren die Unterschiede bei Veränderungen der Konzentration an Sekundärantikörpern. Bei einer Konzentration von 1/500 lag schon die Hintergrund-Extinktion bei ca. 2,1, während die Extinktion bei maximaler Infektion oberhalb des Messbereiches lag. Eine Konzentration von 1/2000 führte zu einem maximalen Signal von 0,9, das heißt, der optimale Messbereich wurde nicht voll ausgenutzt. Das beste Ergebnis wurde mit einer Sekundärantikörper-Konzentration von 1/1000 erreicht: hier lag sowohl eine

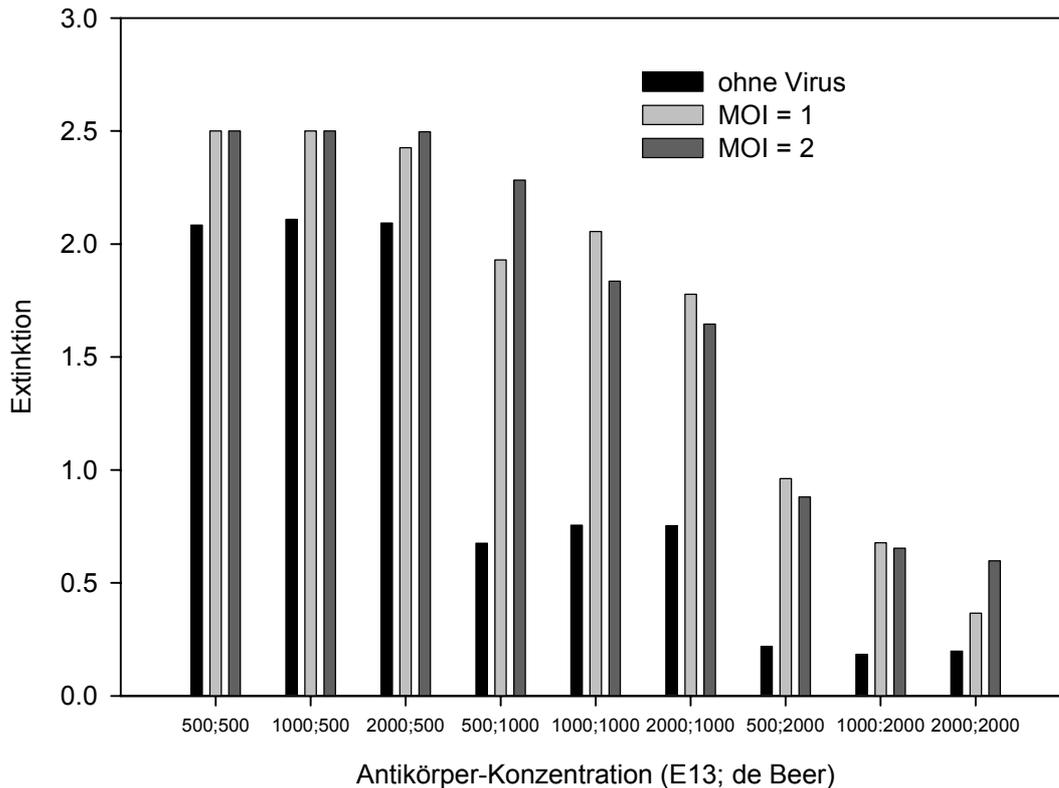


Abb. 1: Optimierung von Virus- und Antikörperkonzentration. Zur Optimierung des ELISA wurde die im ELISA-Photometer gemessene Extinktion bei Verwendung 5%-iger und 10%-iger Virussuspension verglichen. Als weiterer Parameter zur Optimierung des ELISA wurden verschiedene Konzentrationen an Primärantikörper E13 und HRP-konjugiertem anti-mouse Ig (de Beer), als Sekundärantikörper getestet. Aus der Abbildung geht hervor, dass die Verwendung von Virussuspension unterschiedlicher Konzentration nur geringe Auswirkung auf das Messergebnis hatte. Auch die Konzentration an Primärantikörper hatte kaum Auswirkung auf die Extinktion. Die Sekundärantikörper-Konzentration zeigte das beste Ergebnis bei einer Konzentration von 1/1000: hier lag sowohl eine deutliche Differenz zwischen maximalem Signal und Hintergrund, als auch eine volle Ausnutzung des optimalen Messbereiches vor.

deutliche Differenz zwischen maximalem Signal und Hintergrund, als auch eine volle Ausnutzung des optimalen Messbereiches vor (Abb. 1)

Viruskonzentration: Die Verwendung von Virussuspension mit einer MOI von 1 oder einer Virussuspension mit einer MOI von 2 zeigte keinen Unterschied im erhaltenen Signal (Abb. 1)

Inkubationszeit: Zu Beginn wurde der ELISA mit Inkubationszeiten von jeweils 1 h für Primär- und Sekundärantikörper und Waschzeiten von je 2 h durchgeführt. Die Inkubationszeit konnte auf 45 min, die Dauer des Waschschrittes auf ca. 5 min reduziert werden, ohne dass es zu einer Verschlechterung der Messergebnisse kam. (Daten nicht gezeigt)

Nach Optimierung der einzelnen Parameter wurde der ELISA zur Bestimmung der Neutralisationskapazität wie folgt durchgeführt: Die Virussuspension ($2 \times 10^5 \text{TCID}_{50}$) und die jeweilige Serumverdünnung wurden 4 h bei 37°C vorinkubiert. Nach der Vorinkubation erfolgte die Zugabe von HFF (200.000 pro Ansatz entsprechend einer moi von 1). Die Zellen wurden dann auf eine 96-well-Platte ausgesät (20.000 Zellen/Well) und 18 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Von jeder Verdünnungsstufe wurden Vierfachwerte angelegt. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert. Zur Durchführung des eigentlichen ELISA erfolgt daraufhin die Zugabe des Primärantikörpers E13, einem anti-HCMV-Antikörper, in einer Verdünnung von 1/2000. Nach 45 min Inkubation und dreimaligem Waschen mit PBS für jeweils 5 min wurde der HRP-konjugierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1/1000 zugegeben. Nach nochmaliger 45-minütiger Inkubation und dreimaligem Waschen mit PBS für 5 min wurden die Zellen 20 min lang bei Raumtemperatur in Dunkeln mit OPD-Lösung inkubiert. Die Entwicklung wurde optisch kontrolliert und mit 1N H_2SO_4 -Lösung abgestoppt. Dabei fand ein Farbumschlag nach Orange statt. Anschließend wurde die Extinktion im ELISA-Photometer bestimmt. Der ELISA wurde mit dem konventionellen Neutralisationstest verglichen. Beim konventionellen Neutralisationstest erfolgte nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper und dem Waschen mit PBS die Zugabe von DAB, einem Chromogen durch das die Zellkerne infizierter Zellen braun gefärbt erscheinen. Zur Auswertung wurden die infizierten und nichtinfizierten Zellen am Lichtmikroskop ausgezählt. Im Vergleich zum konventionellen Neutralisationstest, bei dem die Waschschritte jeweils 45 min benötigen und die Auswertung am Lichtmikroskop mindestens weitere $2 \frac{1}{2}$ h in Anspruch nimmt, ergibt sich eine Zeitersparnis von ca. 4 h. Der ELISA erlaubt also eine automatisierte, und damit objektivere, Auswertung des Neutralisationstests und geht mit einer deutlichen Zeitersparnis einher (Abb. 2)

Testablauf

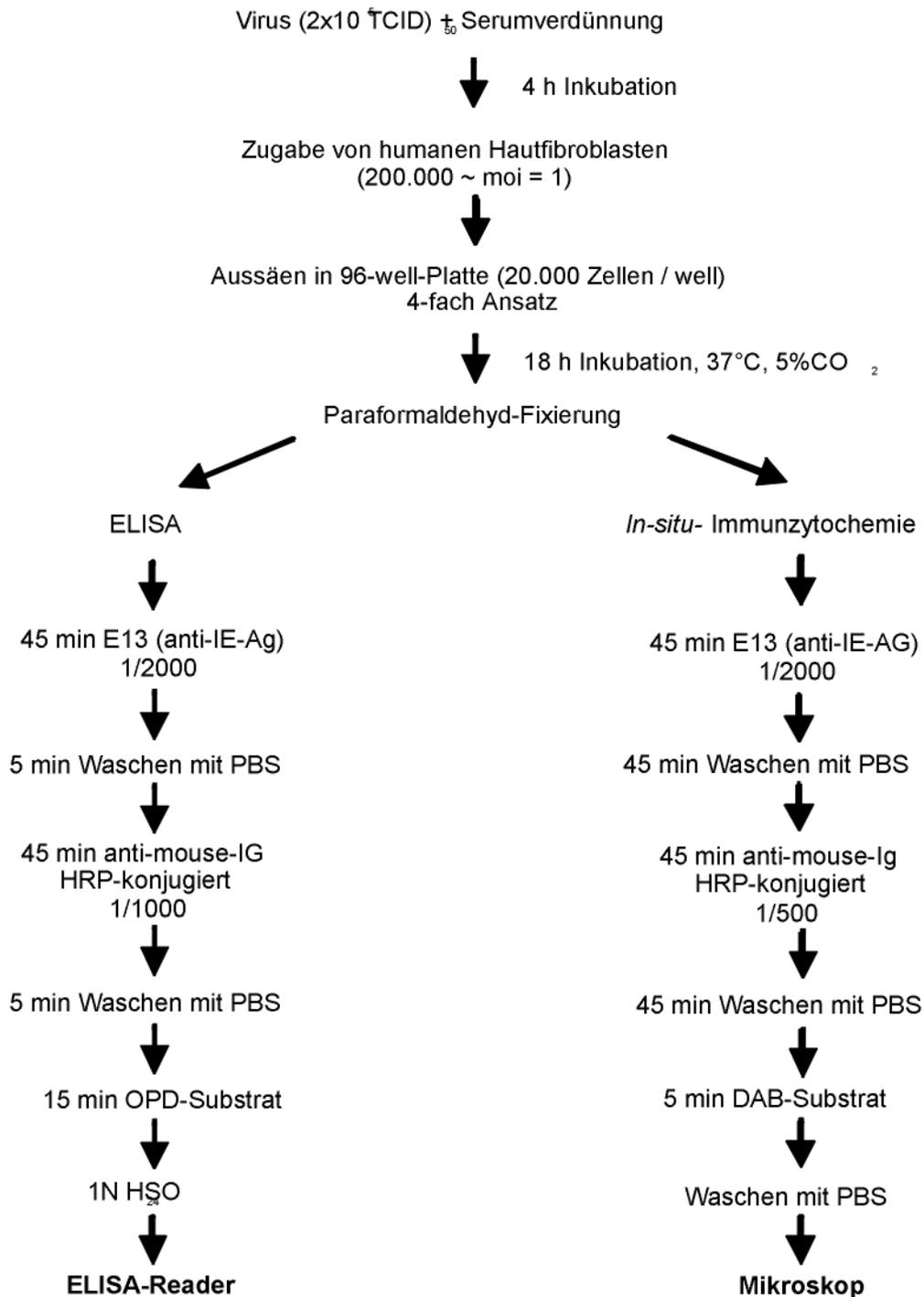


Abb. 2: Vergleichende Darstellung des Ablaufs des ELISA -basierten Mikroneutralisationstests und des durch immunzytochemische Färbung ausgewerteten Mikroneutralisationstests

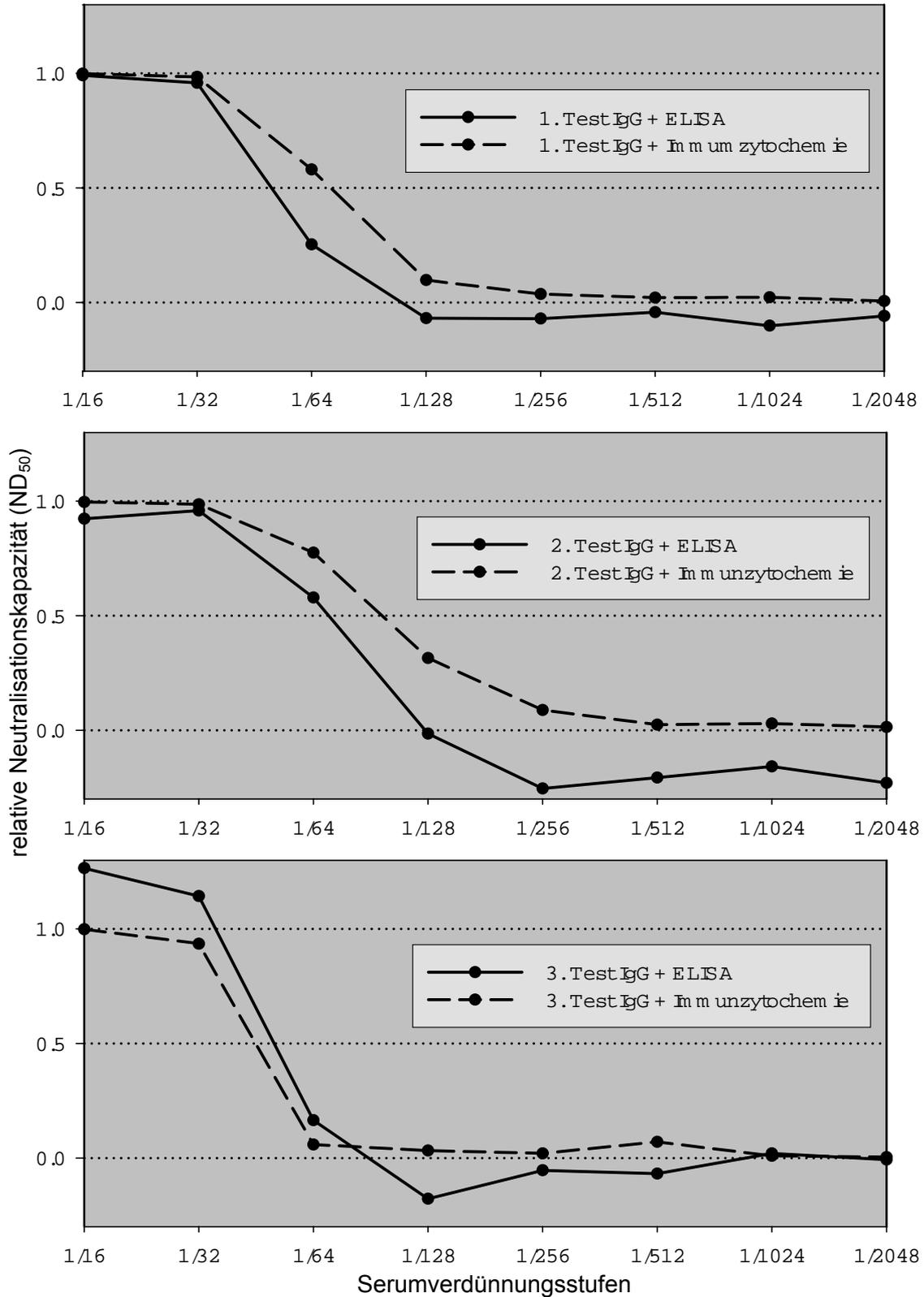


Abb. 3: Vergleichende Darstellung der Messergebnisse von ELISA-NT und Immunzytochemie-NT bei Testung HCMV-IgG positiver Seren. Es wurde die jeweilige Serumverdünnungsstufe gegen die gemessene relative Neutralisationskapazität aufgetragen.

4.1.2.2 Korrelation von ELISA-NT und immunzytochemischer Färbung

Ob die durch den ELISA gewonnenen Ergebnisse mit den durch die herkömmliche immunzytochemische Kernfärbung erhaltenen Ergebnissen übereinstimmen, sollte folgendermaßen gezeigt werden:

Die Neutralisationskapazität je eines im IgG-ELISA negativen und eines im IgG-ELISA positiven Serums wurde in drei unabhängigen Experimenten durch die beiden Verfahren vergleichend untersucht: Mit jedem Serum wurden jeweils zwei Tests durchgeführt: ein Test für die Auswertung durch immunzytochemische Kernfärbung und ein Test für die Auswertung durch den ELISA.

Eine direkte Gegenüberstellung des Verlaufs der mit immunzytochemischer Kernfärbung bzw. mit ELISA bestimmten relativen Neutralisationskapazität je eines HCMV-positiven (Abb. 3) und eines HCMV-negativen Serums (Abb. 4) zeigt eine gute Übereinstimmung beider Verfahren. Wird die relative Neutralisationskapazität gegen die Serumverdünnungsstufen aufgetragen, zeigt sich in beiden Auswertungsverfahren eine sigmoide Dosis-Wirkungs-Kurve (Abb. 3). Eine relative Neutralisationskapazität von 1 bedeutet, dass keine Zellen infiziert wurden. Die Konzentration der neutralisierenden Antikörper reichte aus, um alle Viren zu neutralisieren. Mit zunehmender Verdünnung sinkt die Konzentration der neutralisierenden Antikörper, die relative Neutralisationskapazität geht gegen Null.

Die durch den ELISA bestimmte ND_{50} und die durch die immunzytochemische Kernfärbung bestimmte ND_{50} lagen für das HCMV-positive Serum jeweils bei einer Verdünnungsstufe von 1/64. Die einzige Abweichung zeigte sich bei der immunzytochemischen Färbung im 2. Test: die ND_{50} lag hier bei 1/128, was einer Abweichung von einer Titerstufe entspricht.

Für das HCMV-negative Serum ließ sich wie zu erwarten mit keiner der beiden Methoden die ND_{50} bestimmen, da schon bei einer Verdünnungsstufe von 1/16 keine Neutralisation erreicht wurde (Abb. 4). Die relative Neutralisationskapazität war in jeder Verdünnungsstufe kleiner als 0,25.

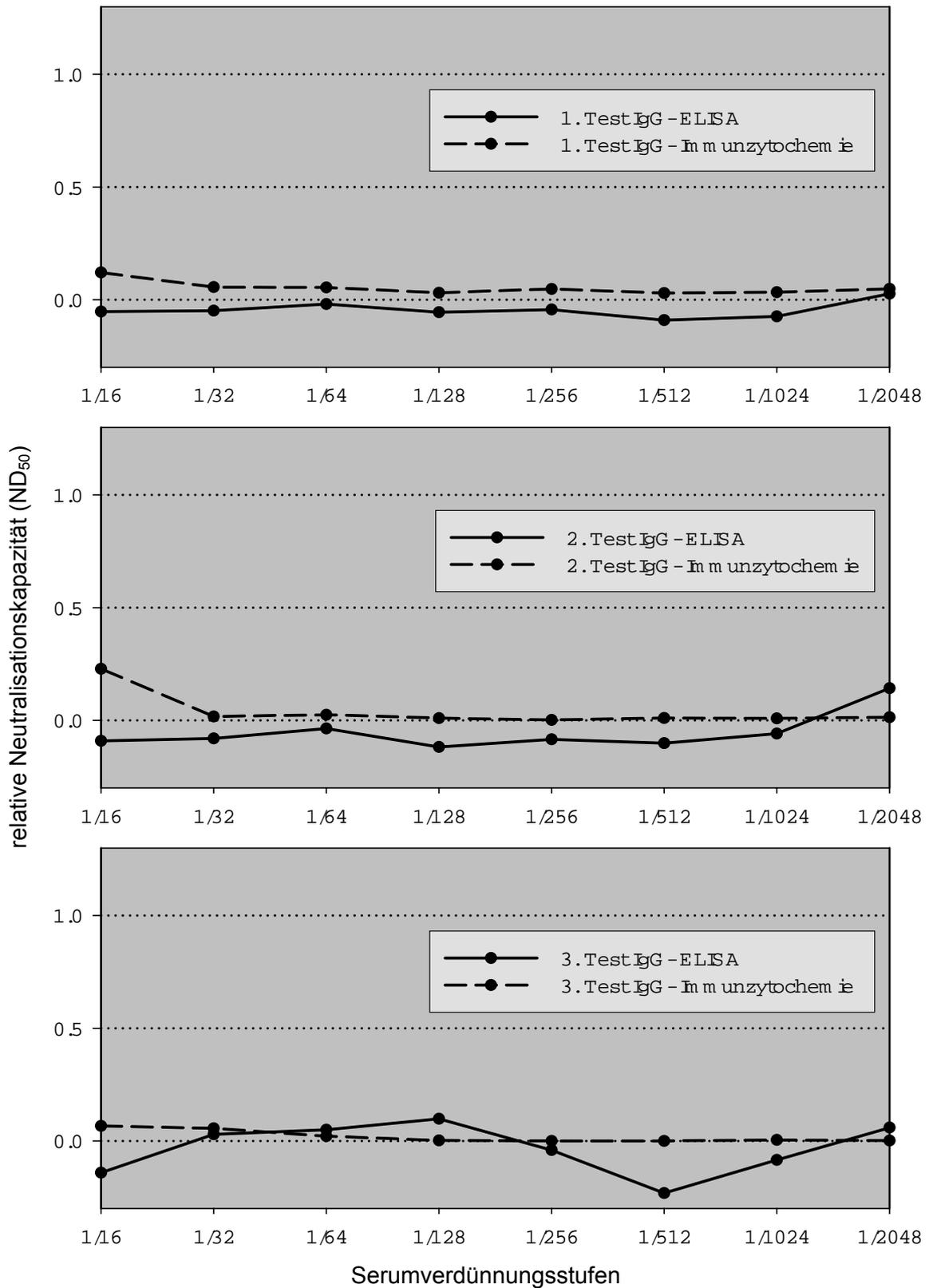


Abb. 4: Vergleichende Darstellung der Messergebnisse von ELISA-NT und Immunzytochemie-NT bei Testung HCMV-IgG negativer Seren. Es wurde die jeweilige Serumverdünnungsstufe gegen die gemessene relative Neutralisationskapazität aufgetragen.

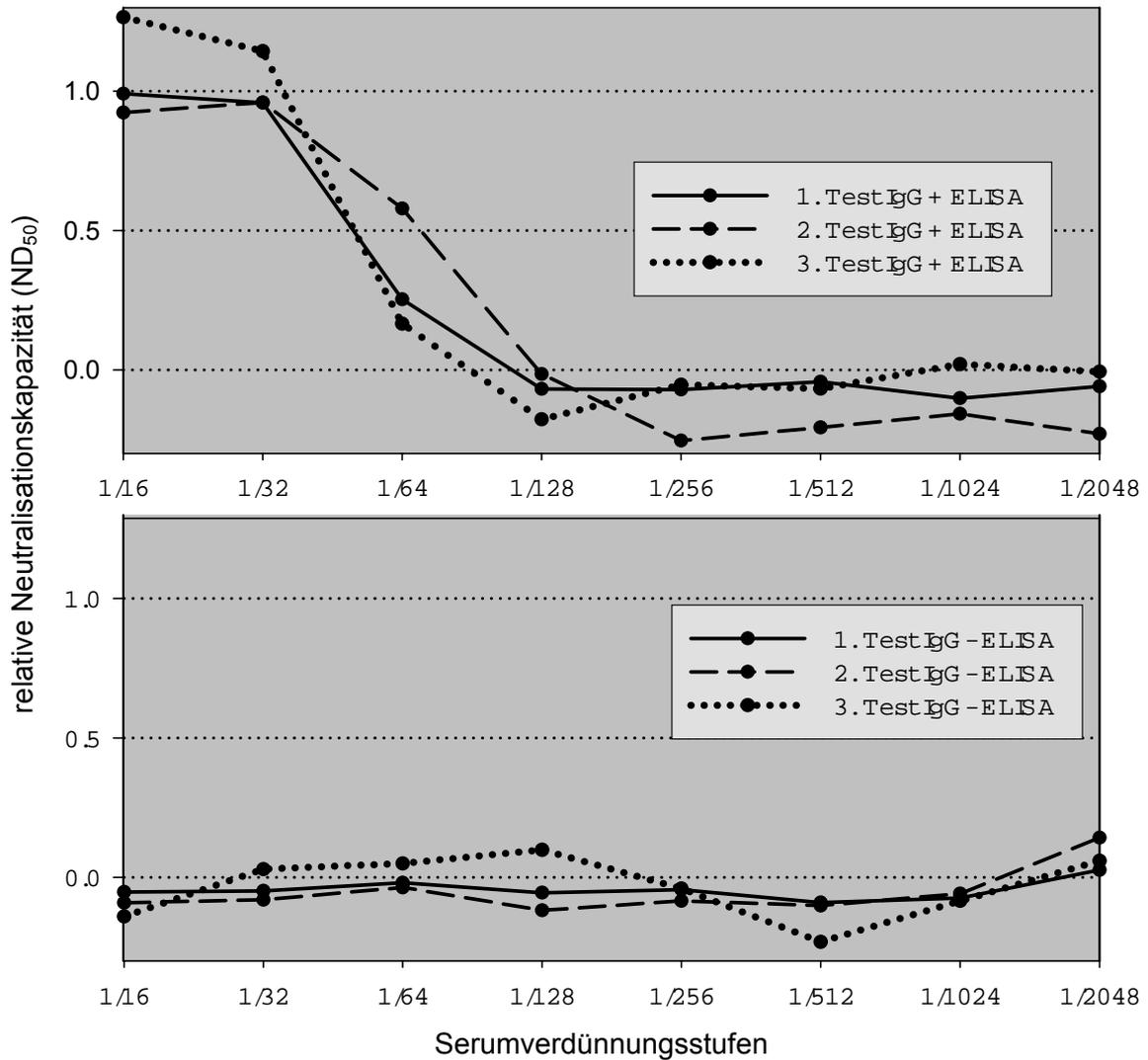


Abb. 5: Reproduzierbarkeit des ELISA. Um zu prüfen, ob die mit dem ELISA-NT gewonnenen Ergebnisse reproduzierbar sind, wurden jeweils die ELISA-NT-Ergebnisse der unabhängigen Testungen des HCMV-IgG positiven und des HCMV-IgG negativen Serums verglichen.

4.1.2.3 Reproduzierbarkeit des ELISA-NT

Um zu prüfen, ob die mit dem ELISA gewonnenen Ergebnisse reproduzierbar sind, wurden die drei unabhängigen Testungen des HCMV-negativen und HCMV-positiven Serums miteinander verglichen (Abb. 5). Das HCMV-negative Serum zeigte bei jeder Testung und in jeder Verdünnungsstufe eine relative Neutralisationskapazität kleiner 0,2. Die ND₅₀ des HCMV-positiven Serums lag bei jeder Durchführung des Tests bei einem Titer von 1/64. Der ELISA-NT zeigte bei Überprüfung der Intertest-Variabilität also eine vollkommene

Übereinstimmung in unabhängigen Testungen eines Serums. Die Methode erscheint daher geeignet die Neutralisationskapazität humaner Seren für HCMV verlässlich zu bestimmen.

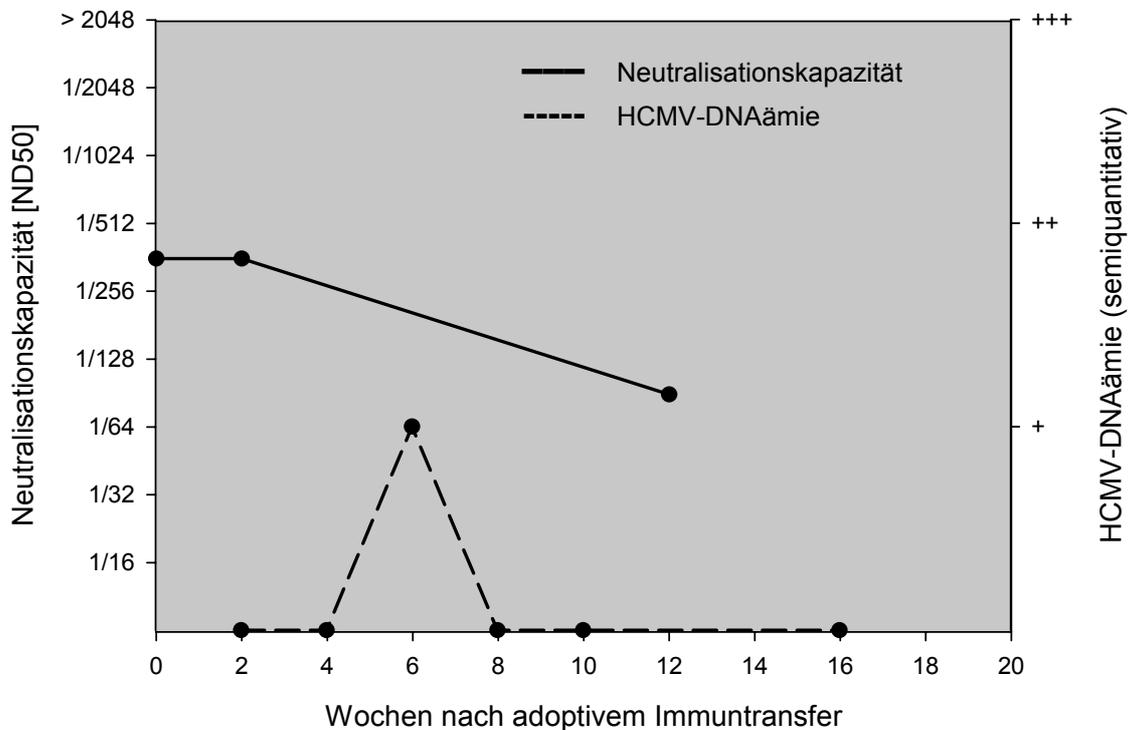


Abb. 6: Gegenüberstellung von HCMV-DNAämie und Verlauf der relativen Neutralisationskapazität bei Patient 1. Die relative Neutralisationskapazität und die HCMV-DNAämie wurden gegen die Anzahl der Wochen nach adoptivem Immuntransfer aufgetragen. Während die Neutralisationskapazität abfiel, war die PCR für HCMV-DNA nach sechs Wochen deutlich positiv. Ab der achten Woche nach Immuntransfer war keine virale DNA mehr nachweisbar.

4.2. Untersuchung des Verlaufs der Serumkonzentration neutralisierender Antikörper bei Patienten nach allogener SZT und adoptivem Immuntransfer

Mit dem ELISA-NT wurde nun der Verlauf der Serum-Konzentration neutralisierender Antikörper bei Patienten nach allogener SZT und adoptivem Immuntransfer untersucht. Von jedem Patienten wurden jeweils vier Proben untersucht, ausgenommen Patient 1, von dem nur drei Proben vorlagen. Die erste Blutentnahme erfolgte jeweils kurz nachdem die Patienten einen adoptiven Immuntransfer erhalten hatten. Die weiteren Entnahmen folgten

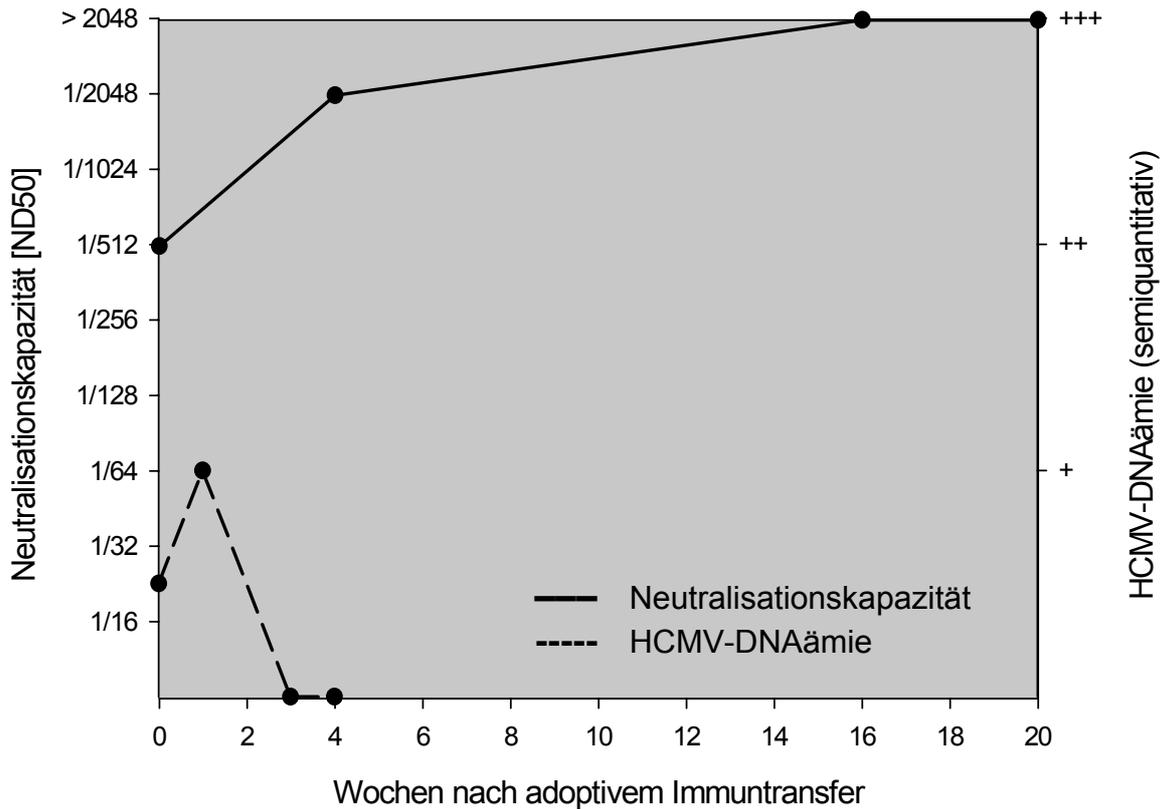


Abb. 7: Gegenüberstellung von HCMV-DNAämie und Verlauf der relativen Neutralisationskapazität bei Patient 2. Die relative Neutralisationskapazität und die HCMV-DNAämie wurden gegen die Anzahl der Wochen nach Immuntransfer aufgetragen. Die Neutralisationskapazität zeigte einen ansteigenden Verlauf. Die Viruslast stieg in der ersten Woche nach Transfer leicht an, sank aber ab der dritten Woche unter die Nachweisgrenze.

jeweils im Abstand von einigen Wochen. Der Neutralisationstest wurde mit dem HCMV-Stamm AD169 bei einer Infektionsmultiplizität von 1 durchgeführt. Als Maß für die relative Neutralisationskapazität diente die ND_{50} , d.h. diejenige Verdünnungsstufe bei der noch so viele neutralisierende Antikörper enthalten waren, dass das Virus gerade 50 % der Zellen infizieren konnte.

Von Patient 1 konnten nur drei Proben untersucht werden. Die Abnahmen erfolgten kurz nach Durchführung des adoptiven Immuntransfers, zwei Wochen und zwölf Wochen nach T-Zell-Transfer. Zum Zeitpunkt des adoptiven Immuntransfers zeigte das untersuchte Serum eine ND_{50} zwischen 1/256 und 1/512. Nach zwei Wochen lag die ND_{50} ebenfalls bei 1/256 bis 1/512, nach weiteren zehn Wochen sank die relative Neutralisationskapazität um zwei Titerstufen auf 1/64 bis 1/128 (Abb. 6)

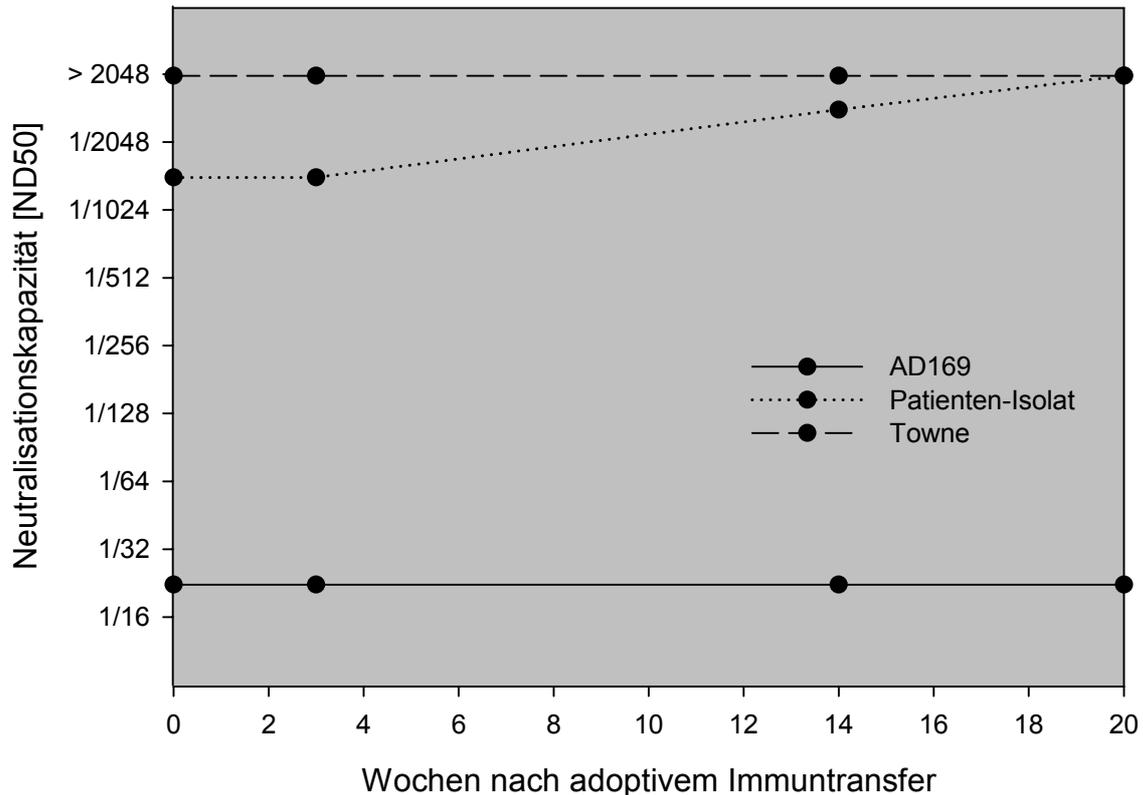


Abb. 8: Vergleich der gemessenen Neutralisationskapazität der Seren von Patient 3 bei Testung mit AD169, Towne und den patienteneigenen Virusisolat. Die ND_{50} wurde gegen die Anzahl der Wochen nach adoptivem Immuntransfer aufgetragen. Bei Durchführung des Neutralisationstest mit Towne-Virus und dem patienteneigenen Virusisolat ergaben sich deutlich höhere Werte für die Neutralisationskapazität als bei Verwendung von AD169.

Patient 2 wies bei Therapiebeginn eine ND_{50} von 1/512 auf. Die relative Neutralisationskapazität stieg nach vier Wochen um zwei Titerstufen auf eine ND_{50} von 1/2048 an. Im weiteren Verlauf konnte nach 16 Wochen eine nochmalige Erhöhung der ND_{50} auf über 1/2048 gezeigt werden. Auch nach 20 Wochen zeigte sich kein Rückgang der relativen Neutralisationskapazität. Die ND_{50} lag weiterhin bei über 1/2048. (Abb. 7)

Die relative Neutralisationskapazität gegen AD169 der Proben von Patient 3 zeigte im Untersuchten Zeitraum keinerlei Schwankungen. Die ND_{50} lag zum Zeitpunkt des adoptiven Immuntransfers wie auch 20 Wochen später bei 1/16 bis 1/32, d.h. das Serum enthielt nur wenige neutralisierende Antikörper gegen HCMV-AD169.

Um zu klären, ob Patient 3 insgesamt nur eine schwach ausgeprägte

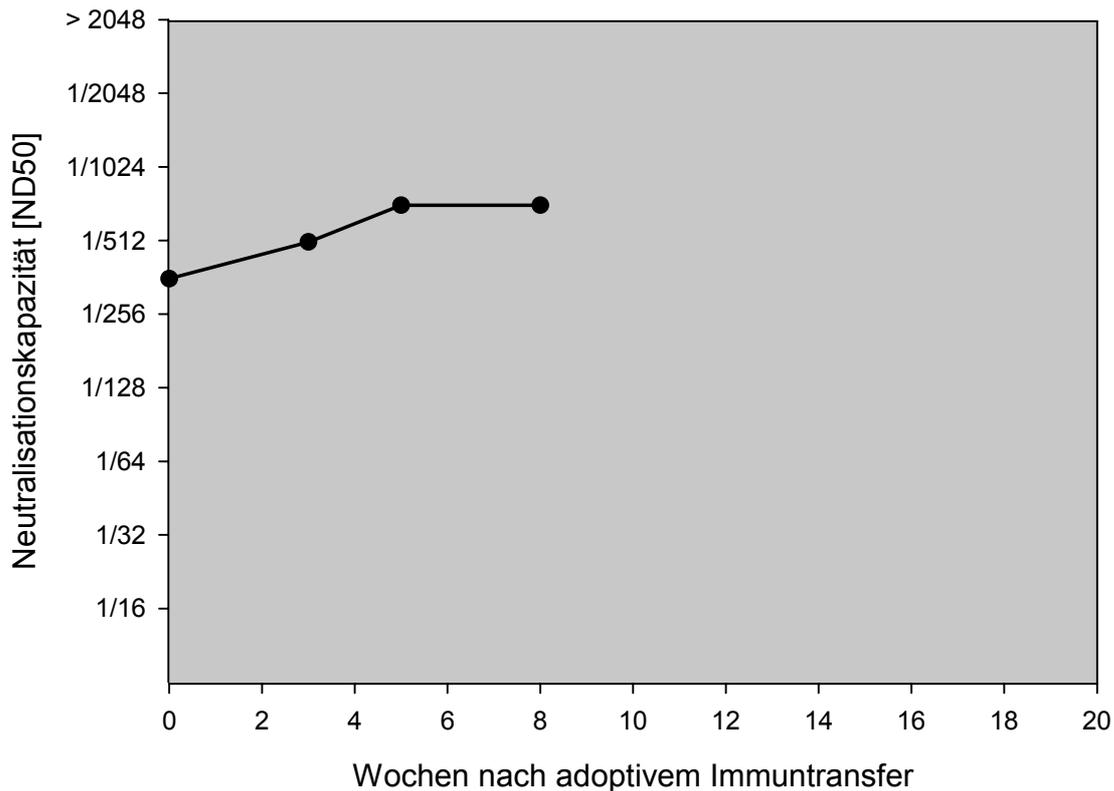


Abb. 9: Verlauf der relativen Neutralisationskapazität nach adoptivem Immuntransfer bei Patient 4. Die relative Neutralisationskapazität gegen die Anzahl der Wochen nach adoptivem Immuntransfer aufgetragen. Der Verlauf der ND_{50} zeigte einen Anstieg um eine Titerstufe nach drei Wochen, bzw. um zwei Titerstufen nach fünf und acht Wochen.

neutralisierende Antikörperantwort zeigte, oder ob sich die neutralisierende Immunantwort des Patienten gegen einen anderen Virus-Stamm richtete, wurde der Neutralisationstest mit Virus vom Towne-Stamm und mit dem klinischen Virus-Isolat des Patienten wiederholt. Wie oben beschrieben lag die ND_{50} bei Testung mit HCMV-AD169 durchgehend bei einer Verdünnungsstufe von 1/16 bis 1/32. Wurde der Mikro-Neutralisationstest dagegen mit Virus vom Towne-Stamm durchgeführt zeigte sich zu jedem Abnahmezeitpunkt eine ND_{50} von über 1/2048. Bei Testung mit dem patienten-eigenen Virus-Isolat lag die relative Neutralisationskapazität zu Beginn zwischen 1/1024 und 1/2048. Derselbe Wert wurde drei Wochen nach Therapiebeginn gemessen. Im weiteren Verlauf stieg die ND_{50} nach 14 Wochen auf 1/2048, nach weiteren sechs Wochen auf über 1/2048 an. (Abb. 8) Diese Unterschiede in der Neutralisationskapazität gegen verschiedene Virusstämme zeigen, dass es notwendig ist in Testungen der Neutralisationskapazität humaner Seren Virus vom AD169-Stock und von

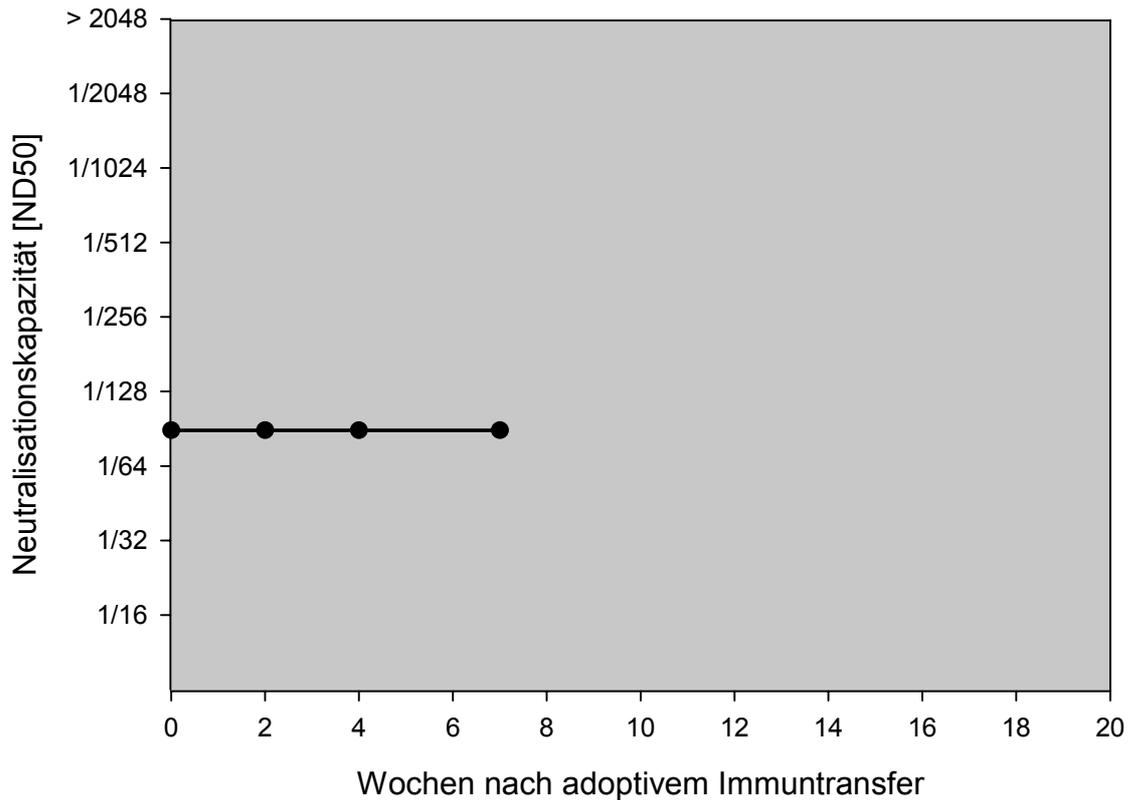


Abb. 10: Verlauf der relativen Neutralisationskapazität nach adoptivem Immuntransfer bei Patient 5. Die relative Neutralisationskapazität wurde gegen die Anzahl der Wochen nach adoptivem Immuntransfer aufgetragen. Bei Patient 5 zeigte sich keine Schwankung der relativen Neutralisationskapazität.

Towne-Stock einzubeziehen.

Bei den Patienten 4 und 5 handelte es sich um Kontrollpatienten im Rahmen einer Phase-1-Studie zur Abschätzung der Nebenwirkungen des Therapie: diese Patienten zeigten keine aktive CMV-Infektion, waren aber seropositiv und hatten ebenfalls einen adoptiven Immuntransfer erhalten.

Der Verlauf der relativen Neutralisationskapazität der Seren von Patient 4 zeigte einen Anstieg um eine Titerstufe von einer ND_{50} von 1/256 bis 1/512 bei Immuntransfer auf 1/512 nach drei Wochen, bzw. auf 1/512 bis 1/1024 in den Wochen fünf und acht nach Therapiebeginn. (Abb. 9)

Patient 5 zeigt keine Schwankung im Verlauf der relativen Neutralisationskapazität. Die ND_{50} lag sowohl bei T-Zell-Transfer, als auch nach zwei, nach vier und nach sieben Wochen jeweils bei 1/64 bis 1/128. (Abb. 10)

Der Verlauf der Serumkonzentration an neutralisierenden Antikörpern nach

allogener SZT und adoptivem Immuntransfer zeigt also sehr unterschiedliche Verläufe. Aus der hier vorliegenden Arbeit ergibt sich also kein Hinweis darauf, dass die Neutralisationskapazität durch einen adoptiven Immuntransfer beeinflusst wird.

4.3 Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der neutralisierenden Antikörper-Antwort und dem Transfer ausschließlich CD8+ bzw. CD4+ und CD8+ T-Zellen

Ein adoptiver T-Zell-Transfer kann entweder ausschließlich mit CD8+ T-Zellen oder aber mit einer Kombination von CD8+ und CD4+ T-Zellen durchgeführt werden. Die Patienten 2, 4 und 5 wurden mit monospezifischen CD8+ T-Zellen, die gegen das Virusprotein pp65 gerichtet sind, therapiert, während der Transfer bei den Patienten 1 und 3 mit polyspezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen, die gegen Gesamt-HCMV-Antigen gerichtet sind, durchgeführt wurde.

CD4+ T-Zellen, vor allem die Subklasse der T_H2-Zellen, können über eine Aktivierung von antigenspezifischen B-Zellen die Bildung spezifischer Antikörper induzieren.

Ein direkter Vergleich des Verlaufs der Neutralisationskapazität der Seren der einzelnen Patienten sollte zeigen, ob durch zusätzliche Übertragung CD4+ T-Zellen eine stärkere Induktion der neutralisierenden Antikörper-Antwort erreicht werden kann.

Die Gegenüberstellung in Abbildung 11 lässt erkennen, dass von denjenigen Patienten, die einen Transfer monospezifischer CD8+ T-Zellen erhalten hatten, Patient 5 eine konstante relative Neutralisationskapazität von 1/64 bis 1/128 zeigte, während die Neutralisationskapazität bei den Patienten 2 und 4 nach T-Zell-Transfer um drei bzw. eine Titerstufe stieg. In der Gruppe der Patienten, denen polyspezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen übertragen wurden, zeigte Patient 1 einen Abfall der relativen Neutralisationskapazität um zwei Titerstufen. Patient 3 zeigte wie oben erwähnt die Besonderheit, dass die gemessene Neutralisationskapazität gegen HCMV-AD169 durchgehend im sehr niedrigen Bereich von 1/16 bis 1/32 lag. Wurde dagegen der Titer an neutralisierenden

Antikörpern gegen Virus vom Towne-Stamm bestimmt, so lag dieser konstant bei über 1/2048. Auch die Neutralisationskapazität gegen das patienteneigenen Virus-Isolat lag im hohen Bereich und stieg von 1/1024 bis 1/2048 auf über 1/2048 an. Bei dem einzigen Patienten, der nach dem adoptiven T-Zell-Transfer einen Abfall der relativen Neutralisationskapazität zeigte, handelte es sich um einen Patienten der Gruppe, die sowohl CD4+ als CD8+ T-Zellen erhalten hatte. Es ließ sich also bei den von uns beispielhaft untersuchten Patienten kein Hinweis auf eine verstärkte Induktion der neutralisierenden Antikörperantwort durch den zusätzlichen Transfer CD4+ T-Zellen finden.

4.4 Zusammenhang zwischen gemessener Konzentration neutralisierender Antikörper und dem Nachweis von Virus-DNA durch PCR

Von Interesse war auch, ob der Verlauf der relativen Neutralisationskapazität Auswirkung auf den Verlauf der HCMV-Infektion der Patienten hat.

Der Verlauf der relativen Neutralisationskapazität der Patienten wurde mit der jeweiligen durch PCR bestimmten Viruslast als Maß für die Aktivität der HCMV-Erkrankung verglichen. Der Vergleich konnte nur bei den Patienten 1, 2 und 3 durchgeführt werden, da es sich bei den Patienten 4 und 5 um Kontrollpatienten handelte, bei denen keine aktive HCMV-Infektion vorlag.

Patient 1 zeigte in den ersten 13 Wochen nach adoptivem T-Zell-Transfer eine leichte Abnahme der relativen Neutralisationskapazität von Werten zwischen 1/512 bis 1/256 auf 1/128 bis 1/64. Im selben Zeitraum wurden semiquantitative PCR-Untersuchungen zum Nachweis voraler DNA im Blut des Patienten durchgeführt. Im ersten Monat nach T-Zell-Transfer war keine Virus-DNA nachweisbar. Nach 6 Wochen war ein deutliches Ansteigen der Viruslast erkennbar, die allerdings unmittelbar danach wieder abfiel. Schon zwei Wochen später ließ sich keine Virus-DNA mehr nachweisen. (Abb. 6)

Bei insgesamt leicht zurückgehender relativer Neutralisationskapazität kam es bei Patient 1 also kurzfristig zu einer Zunahme der Viruslast. Das Virus konnte aber trotz weiterer Abnahme der Neutralisationskapazität eliminiert werden.

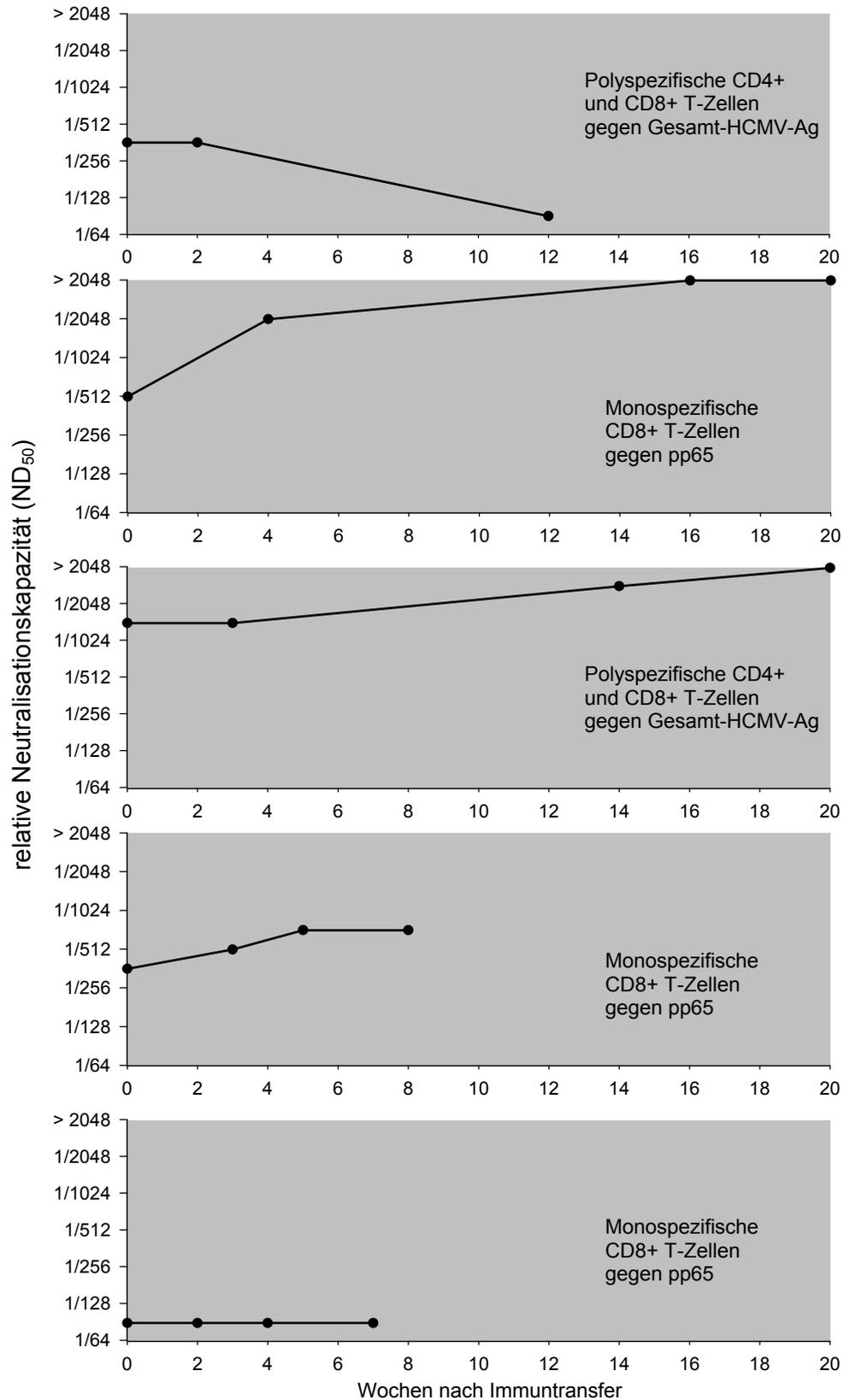


Abb. 11: Gegenüberstellung des durchgeführten adoptiven T-Zell-Transfers und des Verlaufs der relativen Neutralisationskapazität

Patient 2 lässt einen anderen Verlauf erkennen. Die relative Neutralisationskapazität stieg in den 20 Wochen nach Transfer von 1/512 auf über 1/2048 an. Zum Zeitpunkt des T-Zell-Transfers war beim Patienten HCMV-DNA nachweisbar. Die Viruslast stieg in der ersten Woche nach Transfer noch leicht an, sank dann aber ab der dritten Woche unter die Nachweisgrenze. (Abb. 7)

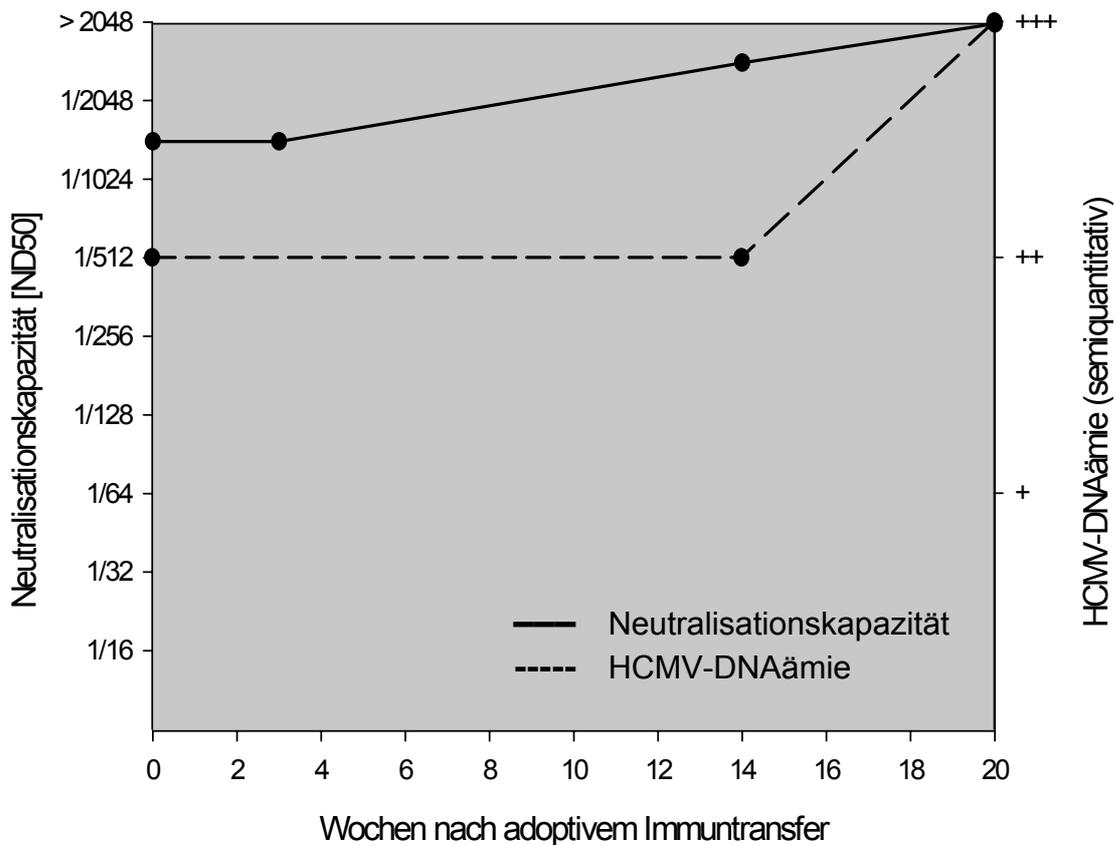


Abb. 12: Gegenüberstellung von HCMV-DNAämie und Verlauf der relativen Neutralisationskapazität bei Patient 3. Der Verlauf der relativen Neutralisationskapazität und der HCMV-DNAämie wurde gegen die Wochen nach adoptivem Immuntransfer aufgetragen. Trotz einer sehr hohen Neutralisationskapazität zeigt sich ein Anstieg der HCMV-DNAämie.

Die Zunahme der relativen Neutralisationskapazität ging bei Patient 2 also mit einem Rückgang der Viruslast einher.

Wie oben beschrieben war die neutralisierende Antikörperantwort bei Patient 3 vor allem gegen Virus vom Towne- Stamm bzw. gegen das patienteneigene

Virus-Isolat gerichtet. Die Neutralisationskapazität gegen HCMV-AD169 war nur sehr gering ausgeprägt, während gegen das Virus vom Towne- Stamm durchgehend eine relative Neutralisationskapazität von über 1/ 2048 vorlag. Die Neutralisationskapazität gegen das Patienteneigene Virus- Isolat stieg von Werten zwischen 1/1024 und 1/2048 nach 20 Wochen ebenfalls auf über 1/2048 an. Trotz dieser sehr hohen relativen Neutralisationskapazität zeigte die PCR zum Zeitpunkt des adoptiven T-Zell-Transfers eine hohe Viruslast, die im Verlauf der nächsten 20 Wochen noch deutlich anstieg. (Abb. 12)

Obwohl eine stark ausgeprägte neutralisierende Antikörperantwort vorlag, konnte das Virus nicht eliminiert werden. Die Anzahl der Viruskopien nahm sogar zu.

Eine sehr hohe Neutralisationskapazität scheint im Einzelfall also keinen wirksamen Schutz vor einer Replikation von HCMV zu bieten.

5 Diskussion

5.1 Entwicklung eines ELISA-basierten Mikroneutralisationstests

Die humorale Immunantwort spielt sowohl in der Diagnostik (Maine et al. 2001) als auch in der Prophylaxe von HCMV-Infektionen (Snydman 1994) eine bedeutende Rolle.

Der diagnostische Nachweis von Antikörpern gegen HCMV kann durch verschiedene Methoden erfolgen, so zum Beispiel durch einen Latex-Agglutinationstest, durch antikörperspezifischen ELISA, MEIA (microparticle enzyme immunoassay) oder Western Blot (Gonczol et al. 1986; Kraat et al. 1992; Plachter et al. 1992).

Neutralisierende Antikörper sind im Vergleich zu Antikörpern, die durch andere Techniken nachgewiesen werden, erst relativ spät im Serum HCMV-Infizierter nachzuweisen (Stalder and Ehrensberger 1980). Sie sind deshalb kein optimaler Parameter für die Sero-Diagnose einer akuten HCMV-Infektion, sind aber gut zur Differenzierung von Primärinfektion und der Reaktivierung einer Infektion geeignet (Eggers et al. 1998). Die Entwicklung einer neutralisierenden Immunantwort gegen HCMV könnte ein Indikator dafür zu sein, wie gut ein Individuum gegen die Übertragung einer HCMV-Infektion geschützt ist (Farrell and Shellam 1991; Adler 1996) bzw. wie schwer eine solche Erkrankung verläuft (Schoppel et al. 1998). Vor allem im Rahmen von Studien zur Therapie von HCMV-Infektionen nach Transplantation oder Studien zu einer Impfung gegen das Virus ist der Titer an neutralisierenden Antikörpern eines Patienten von Interesse. Ein weiteres Gebiet, auf dem der Nachweis neutralisierender Antikörper große Bedeutung hat ist die mütterliche HCMV-Infektion während einer Schwangerschaft (Tanaka et al. 1991; Fowler et al. 1992; Adler et al. 1995; Boppana et al. 2001).

Der Nachweis neutralisierender Antikörper erfolgt meist durch den konventionellen Mikro-Neutralisationstest (Braun and Schacherer 1988).

Das konventionelle Verfahren zeichnet sich durch eine hohe Spezifität aus und erlaubt eine Quantifizierung der Neutralisationskapazität von Seren. Von

Nachteil sind allerdings das zeitaufwendige Auswertungsverfahren, das die Untersuchung größerer Probenserien erschwert und der subjektive Faktor beim Auszählen der Zellen am Mikroskop.

Um das beim konventionellen Mikro-NT notwendige mikroskopische Ablesen des CPE durch ein automatisiertes Verfahren zu ersetzen, wurde ein ELISA-basierter Mikro-NT entwickelt, der verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse mit relativ geringem Zeitaufwand direkt als Extinktionswert liefert.

Um möglichst gute Ausgangsbedingungen für die Durchführung des ELISA zu schaffen, wurden in Vorversuchen das Fixierungsverfahren, die Viruskonzentration und die jeweilige Konzentration an Primär- und Sekundärantikörpern optimiert. Eine Beschichtung der Mikrotiter-Platten mit Gelatine führte nicht zu einer besseren Haftung der Zellen am Boden der Wells und wurde deshalb im Folgenden nicht durchgeführt. Die Fixierung mit Paraformaldehyd zeigte sich dem Fixierungsverfahren mit 80% Aceton überlegen. Die Paraformaldehyd-Fixierung führte sowohl zu einem gleichmäßigeren Fixierungsergebnis mit geringerer Zellablösung, als auch zu einem besseren Ergebnis der nachfolgenden immunzytochemischen Färbung. Ein gleichmäßiges Fixierungsergebnis ist wichtig, da bei ungleichmäßiger Verteilung der Fibroblasten die Auswertung durch den ELISA nicht mehr aussagekräftig ist. Während bei der mikroskopischen Auswertung das Verhältnis infizierter Zellen zu nicht-infizierten Zellen gleich bleibt, sinkt bei der Auswertung durch den ELISA die Extinktion und ergibt somit zu niedrige Werte. Eine Änderung der eingesetzten Viruskonzentration scheint nur geringe Auswirkungen auf die Auswertbarkeit des ELISA zu haben. Dies stimmt mit Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein, die zeigten, dass die Neutralisationskapazität menschlicher Seren nicht von der Viruskonzentration abhängt: Unabhängig von der Viruskonzentration neutralisiert eine bestimmte Konzentration an Antikörpern einen bestimmten Prozentsatz Virus (Klein et al. 1999). In den durchgeführten Neutralisationstests wurde Virus in einer MOI von 1 zugefügt. Bei der Optimierung der Antikörperkonzentrationen zeigte sich, dass die Konzentration an Primärantikörpern wiederum nur eine untergeordnete Rolle spielt, während die Konzentration an Sekundärantikörpern entscheidend

ist. Das beste Ergebnis wurde mit einer Sekundärantikörper-Konzentration von 1/1000 erreicht. Wurde die Konzentration erhöht, stieg die Hintergrund-Extinktion stark an, wurde sie dagegen vermindert, konnte der optimale Messbereich nicht voll ausgenutzt werden. Der konventionelle Neutralisationstest wurde mit Inkubationszeiten von 1 h für Primär- und Sekundärantikörper und darauf folgenden Waschzeiten von je 2 h durchgeführt. Im Gegensatz dazu erfolgt der ELISA-basierte Neutralisationstest mit Inkubationszeiten von je 45 min und Waschzeiten von jeweils ca. 5 min. Zur Durchführung des ELISA-basierten Neutralisationstests werden also ca. 4 h weniger benötigt als zur Durchführung des konventionellen Neutralisationstests.

Um zu überprüfen, ob die mit ELISA bzw. immunzytochemischer Färbung gewonnenen Ergebnisse übereinstimmen und ob der ELISA-basierte Neutralisationstest reproduzierbar ist, wurden beide Tests mehrfach parallel mit jeweils einem sicher positiven und einem sicher negativen Serum durchgeführt. Die Ergebnisse beider Tests stimmen überein: nur in einer Testung ergab sich im konventionellen Neutralisationstest ein um eine Titerstufe höheres Ergebnis als im ELISA-basierten Neutralisationstest. Ein Vergleich der ELISA-NT-Ergebnisse jeweils für das HCMV-positive bzw. HCMV-negative Serum zeigte, dass die Ergebnisse durchgehend übereinstimmen. Der ELISA-basierte Neutralisationstest ist also gut reproduzierbar und liefert im Vergleich mit dem konventionellen Neutralisationstest übereinstimmende Ergebnisse.

Vor kurzem wurde ein ELISA-basierter Mikro-Neutralisationstest für Antikörper gegen HCMV beschrieben (Gupta et al. 1996). Auch die dort durchgeführte Methode beruht auf einer Auswertung des konventionellen Mikro-Neutralisationstest durch einen ELISA. Beim zugrunde liegenden Neutralisationstest erfolgte eine Inkubation von Virus mit Antikörpern und Fibroblasten über sieben Tage. Zur mikroskopischen Auswertung des Neutralisationstests wurde die Endpunktbestimmung gewählt; die Auswertung erfolgte durch ELISA mit dem Nachweis eines späten Antigens. Dieses Antigen ist wie das in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene IE-Antigen im Zellkern infizierter Zellen lokalisiert. Es wurde diejenige Verdünnungsstufe bestimmt, bei der die Infektion auf 50 % der maximalen Infektion reduziert wurde.

Konventioneller Mikro-Neutralisationstest und ELISA-basierter Neutralisationstest wurden auf Korrelation mit dem IgG-ELISA überprüft. Das späte Antigen wurde dem IE-Antigen vorgezogen, da beim Nachweis des IE-Antigens eine hohe Hintergrundextinktion die Auswertung erschwerte (Tomiyama et al. 1993). Dies bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit nicht, so dass für den Neutralisationstest nur eine Inkubationszeit von ca. 20 h benötigt wurde. Darüber hinaus konnte auch der angewandte ELISA mit wesentlich kürzeren Inkubationszeiten durchgeführt werden. Das Ergebnis ist also sechs Tage früher verfügbar.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass der ELISA-basierte Mikro-Neutralisationstest zu Ergebnissen führt, die gut mit dem konventionellen Mikro-NT korrelieren.

Der ELISA-basierte Mikro-NT hat folgende Vorteile gegenüber dem konventionellen Mikro-Neutralisationstest:

- höhere Objektivität durch die Messung der Extinktion im ELISA-Reader
- der geringere Zeitaufwand zur Durchführung des Auswertungsverfahrens und die dadurch gegebene Möglichkeit eine größere Anzahl an Seren zu untersuchen
- die Möglichkeit, das Auswertungsverfahren zu automatisieren, da mit entsprechender Software aus den vom ELISA-Reader gelieferten Ergebnissen die ND_{50} berechnet werden könnte

5.2 Bedeutung der Stammspezifität der Neutralisationskapazität

Die Testung des Serums von Patient 3 mit Viruspräparationen von HCMV-AD169 ergab einen sehr geringen Wert für die relative Neutralisationskapazität. Diese niedrige Neutralisationskapazität stand im Widerspruch zu seiner im IgG-ELISA nachgewiesenen Seropositivität. Um zu überprüfen, ob Patient 3 stammspezifische neutralisierende Antikörper gegen andere Virusstämme auswies oder tatsächlich kaum neutralisierende Antikörper gebildet hatte, wurde der Neutralisationstest zusätzlich mit Virus vom Towne-Stamm und mit dem patienteneigenen Virus-Isolat durchgeführt. Das Serum zeigte sowohl gegen

das Towne-Virus als auch gegen das patienteneigene Virus-Isolat eine um sechs bis sieben Titerstufen höhere Neutralisationskapazität als gegen AD169.

Diese Eigenschaft des Serums von Patient 3 lässt sich durch die Stamm-spezifische Neutralisation von HCMV erklären. HCMV-Isolate zeigen eine große antigenetische Heterogenität (Chandler and McDougall 1986; Rasmussen et al. 2003). Meist besteht eine, allerdings stark variierende, Kreuzreaktivität zwischen Seren die Antikörper gegen verschiedene Virusstämme enthalten. Es gibt jedoch Fälle in denen es nicht zur Neutralisation kommt (Klein et al. 1999). Verschiedene Stämme werden durch die induzierten Antikörper unterschiedlich gut neutralisiert, wobei ein Patienten-Serum das Virus-Isolat desselben Patienten meist am besten neutralisiert (Klein et al. 1999). Allerdings kann bei einigen Patienten zur selben Zeit mehr als ein Virusstamm nachgewiesen werden (Adler et al. 1995). Daraus resultieren während einer natürlichen Infektion neutralisierende Antikörper mit einem großen Spektrum an Stamm-Spezifität.

Für die Stamm-spezifische Neutralisationskapazität werden unterschiedliche Glykoproteine verantwortlich gemacht. Unterschiede im Aufbau des Glykoproteins gB, und damit in seinen antigenen Eigenschaften, scheinen eine wichtige Rolle bei der Induktion unterschiedlicher Titer an neutralisierenden Antikörpern zu spielen (Marshall et al. 1992). Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass Antikörper gegen das Glykoprotein gH Stamm-Spezifität aufweisen (Urban et al. 1992).

Darüber ob die Neutralisationskapazität von der Menge an nicht-infektiösen Partikeln, den sogenannten NIEPs und Dense Bodies (Irmiere and Gibson 1985; Mocarski and Courcelle 1999), abhängt, die ein Stamm freisetzt, bestehen unterschiedliche Ansichten. Manche Autoren sprechen den nicht-infektiösen Partikeln Bedeutung zu, da diese ebenfalls neutralisierende Antikörper induzieren können (Klages et al. 1989). Andere Autoren gehen davon aus, dass der Stamm-spezifische Unterschied in der Neutralisationskapazität unabhängig von der Konzentration nicht-infektiöser viraler Defektpartikel ist (Klein et al. 1999).

Die Stamm-spezifische Neutralisation spielt eventuell eine wichtige Rolle für den klinischen Verlauf von HCMV-Infektionen. Da die Neutralisationskapazität gegen heterologe Viren stark variiert, kann ein ungenügender Schutz vor Reinfektion resultieren (Klein et al. 1999). So ist nach Nierentransplantation der Verlauf einer HCMV-Infektion schwerer, wenn die Reinfektion nicht mit einem endogenen Stamm, sondern mit einem fremden Stamm erfolgt (Grundy et al. 1988). Ein weiterer Hinweis darauf, dass die Stamm-Spezifität wichtig für den klinischen Verlauf ist, liegt darin, dass die Überlebensrate von HCMV-infizierten Patienten nach SZT mit bestimmten gB-Genotypen korreliert (Fries et al. 1994).

Auch für die Impfstoff-Entwicklung muss die Stamm-spezifische Neutralisation berücksichtigt werden. Um einen humoralen Impfschutz zu garantieren, müssen genügend hohe Titer an neutralisierenden Antikörpern induziert werden. Ein Vergleich zwischen der Impfung mit einem Wildtyp-Virus und der Impfung mit Virus vom Towne-Stamm zeigte, dass beide Impfungen eine ähnliche mittlere lymphoproliferative Antwort erzeugten, dass aber durch das Towne-Virus 10-20fach niedrigere Titer an neutralisierenden Antikörpern induziert wurden (Adler et al. 1995).

Für die Durchführung des Neutralisationstests bedeutet die Stammspezifität der Neutralisationskapazität, dass der Test mit mindestens zwei unterschiedlichen Virusstämmen durchgeführt werden sollte, um keine falsch negativen Ergebnisse zu erhalten.

5.3 Verlauf der Serum-Konzentration neutralisierender Antikörper bei Patienten nach allogener SZT und adoptivem Immuntransfer

Nach der Etablierung des ELISA-basierten Neutralisationstests wurde der Verlauf der Serumkonzentration an neutralisierenden Antikörpern bei Patienten nach allogener SZT und adoptivem Immuntransfer untersucht. Dabei zeigten sich bei den einzelnen Patienten sehr unterschiedliche Verläufe. Während Patient 2 einen geringen Anstieg der Neutralisationskapazität um ca. zwei Titerstufen zeigt, ist bei den Patienten 3, 4 und 5 keine signifikante Änderung der Neutralisationskapazität zu erkennen. Bei Patient 1 sinkt die

Neutralisationskapazität nach dem T-Zell-Transfer sogar um zwei Titerstufen. (Abbildungen 12, 13 und 14). Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich also kein Hinweis auf eine Erhöhung der Neutralisationskapazität durch einen adoptiven Immuntransfer.

Es fällt auf, dass nicht nur der Verlauf sondern auch das Niveau der Serumkonzentration an neutralisierenden Antikörpern sehr unterschiedlich ist. So liegt die ND_{50} bei Patient 2 zwischen 1/512 und $< 1/2048$, während sie bei Patient 5 nur bei 1/64 bis 1/128.

Hinweise darauf, was diesen unterschiedlichen Verläufen zugrunde liegt, könnte sich aus dem Zusammenhang mit der jeweiligen Transfermodalität, also ob ausschließlich CD8+ oder eine Kombination aus CD8+ und CD4+ T-Zellen übertragen wurde, mit dem Vorliegen einer HCMV-Infektion bzw. der beim jeweiligen Patienten vorliegenden Viruslast ergeben. Dies soll in den folgenden Kapiteln näher betrachtet werden.

5.4 Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der neutralisierenden Antikörper-Antwort und dem Modus des adoptiven Immuntransfers

Die Therapie einer HCMV-Erkrankung durch adoptiven Immuntransfer erfolgte entweder durch den Transfer monospezifischer, gegen pp65 gerichteter CD8+ T-Zellen, oder aber durch die Übertragung polyspezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen, die gegen Gesamt-HCMV-Antigen gerichtet sind (Einsele et al. 2002). Da die zu den CD4+ T-Zellen zählenden T_H2 -Zellen über eine Aktivierung antigenspezifischer B-Zellen die Bildung von Antikörpern induzieren, wäre denkbar, dass ein zusätzlicher Transfer von CD4+ T-Zellen zu einer Steigerung der neutralisierenden Antikörper-Antwort führt. Aus theoretischen Erwägungen würde man erwarten, dass CD4+ T_H2 über die Produktion von IL-4 und IL-5 die antigenspezifische Antikörperproduktion durch B-Zellen induzieren (Coffmann 1988; Paul 1991)

Durch die Untersuchung des Verlaufs der Neutralisationskapazität nach adoptivem T-Zell-Transfer sollte geprüft werden, ob es Hinweise auf eine

Beeinflussung der neutralisierenden Antikörper-Antwort durch Stimulation über mittransfundierte CD4+ T-Zellen gibt.

Das Ausmaß der neutralisierenden Antikörper-Antwort wird jedoch offenbar durch den zusätzlichen Transfer von CD4+ T-Zellen nicht beeinflusst.

Die Gruppe der Patienten, die monospezifische CD8+ T-Zellen erhielten, zeigt konstante bzw. ansteigende Verläufe der relativen Neutralisationskapazität. Im Gegensatz dazu sind bei der Gruppe der Patienten, denen polyspezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen übertragen wurden, konstante bzw. abfallende Verläufe zu beobachten. Bei den von uns untersuchten Patienten konnte also kein Hinweis darauf gefunden werden, dass ein zusätzlicher Transfer von CD4+ T-Zellen mit einer Steigerung der neutralisierenden Antikörper-Antwort einhergeht.

Dass bei den zwei hier untersuchten Patienten ein Anstieg der neutralisierenden Antikörperantwort ausblieb, steht nur scheinbar im Widerspruch dazu, dass ein zusätzlicher Transfer CD4+ T-Zellen die antivirale Wirkung des adoptiven T-Zell-Transfers deutlich steigert (Einsele et al. 2002). Bei der Bekämpfung einer HCMV-Infektion kommt der zellulären Immunantwort eine dominante Rolle zu (Quinnan et al. 1982; Krause et al. 1997; Reusser et al. 1997). Die Autoren gehen davon aus, dass der positive Effekt der CD4+ T-Zellen auf einem dauerhafteren Erhalt der zellulären Immunantwort gegen HCMV als bei alleinigem Transfer CD8+ Zellen beruht.

Die Annahme, der positive Effekt mittransfundierter CD4+ T-Zellen beruhe im Wesentlichen auf der Verstärkung der cytotoxischen T-Zellantwort, wird durch die vorliegende Arbeit gestützt, denn in den untersuchten Verläufen war eine Steigerung der Neutralisationskapazität nach Transfer von CD4+ T-Zellen ausgeblieben.

5.5 Korrelation der gemessenen Neutralisationskapazität mit der HCMV-Virämie

Der Verlauf der DNAämie spiegelt nach allgemeiner Auffassung die Virusreplikation im Organismus wider. So wird beispielsweise der Rückgang der

Virämie als Kriterium für den Erfolg einer antiviralen Chemotherapie angesehen. In ähnlicher Weise sollte sich gegebenenfalls auch der antivirale Effekt einer gesteigerten Neutralisationskapazität im Verlauf der Virämie widerspiegeln. Durch einen Vergleich des Verlaufs der relativen Neutralisationskapazität mit dem Verlauf der Viruslast nach adoptivem Immuntransfer sollte gezeigt werden, ob eine Erhöhung der Neutralisationskapazität mit einer effizienteren Klärung der Infektion mit HCMV einhergeht. Diese Annahme konnte durch unsere Untersuchungen nicht bestätigt werden:

Eine Erhöhung der relativen Neutralisationskapazität ging in den untersuchten Fällen nicht mit einer schnelleren Elimination von HCMV einher.

Vergleicht man bei den Patienten 1, 2 und 3 jeweils den Verlauf der relativen Neutralisationskapazität mit dem Verlauf der durch PCR nachgewiesenen Viruslast als Maß für die Aktivität der HCMV-Infektion, so ist kein Zusammenhang zwischen der Konzentration neutralisierender Antikörper und einem Sinken der Viruslast erkennbar. Patient 1 eliminierte das Virus trotz sinkender Neutralisationskapazität, bei Patient 2 sank die Viruslast bei steigender neutralisierender Immunantwort und Patient 3 zeigte eine deutliche Zunahme der Viruslast obwohl eine sehr hohe Neutralisationskapazität gegen das patienteneigene Virus-Isolat bestand.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Aussagen anderer Arbeitsgruppen, so zeigt sich dass die Bedeutung der Entwicklung einer neutralisierenden Antikörper-Antwort für den Verlauf einer HCMV-Infektion noch nicht abschließend geklärt ist. So kann zumindest bei MCMV ein hoher Titer an Antikörpern zwar nicht eine primäre Infektion verhindern und auch nicht vor einer Reaktivierung (Jonjic et al. 1994) oder den Übergang einer aktiven Infektion in die virale Latenz (Shanley et al. 1981) schützen, prophylaktisch verabreichte HCMV-Hyperimmunglobuline scheinen aber einen günstigen Einfluß auf den klinischen Verlauf einer HCMV-Erkrankung zu haben (Snydman 1994). Einige Veröffentlichungen gehen davon aus, dass sowohl nach Nierentransplantation (Finny et al. 2001) als auch nach

Stammzelltransplantation (Schoppel et al. 1997; Schoppel et al. 1998) die Abwesenheit viraler DNA im Blut mit hohen Konzentrationen neutralisierender Antikörper einhergeht. Andere Autoren können in ihren Arbeiten keinen Zusammenhang zwischen einem hohen Titer an neutralisierenden Antikörpern und der klinischen Manifestation einer HCMV-Infektion (Volpi et al. 1999) bzw. der Entwicklung und der Überwindung einer HCMV-Erkrankung (Munoz et al. 2001) erkennen. Allerdings räumen Volpi et al. ein, dass verschiedene Faktoren für ihr Ergebnis mitverantwortlich sein könnten. So ist beispielsweise denkbar, dass die Antwort neutralisierender Antikörper auf Virus vom AD 169-Stamm nicht die neutralisierende Aktivität gegen autologe, d.h. patienteneigene, Stämme widerspiegelt (Chou 1989; Klein et al. 1999). Dies unterstreicht die Notwendigkeit beide Antigenvarianten in einen Neutralisationstest einzubeziehen, wie es auch die Analyse von Patient 3 in der vorliegenden Arbeit gezeigt hat. Ebenso könnten auch Unterschiede zwischen den einzelnen HCMV-Stämmen selbst für den Verlauf der Erkrankung eine Rolle spielen (Rasmussen et al. 1997; Torok-Storb et al. 1997).

Die Rolle der neutralisierenden Antikörper für den Verlauf einer HCMV-Infektion ist noch nicht ausreichend geklärt. Mit dem hier entwickelten NT-ELISA wird ein Verfahren verfügbar, das es erlaubt, in zukünftigen Studien auch umfangreiche Serumverläufe verlässlich und mit vertretbarem Aufwand zu untersuchen. Zwar war es nicht Ziel dieser Arbeit, die Korrelation von neutralisierenden Antikörpern mit klinisch-virologischen Verläufen in einem Patientenkollektiv statistisch zu analysieren. Vielmehr ging es darum, an Einzelverläufen die Anwendbarkeit beispielhaft zu überprüfen. Dennoch zeigen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Einzelfälle aber deutlich, dass in der speziellen Situation von SZT- und KMT-Patienten nach adoptivem Immuntransfer zur Behandlung einer schweren HCMV-Infektion die Höhe und der Verlauf der Konzentration an neutralisierenden Antikörpern für die Elimination des Virus keine dominierende Rolle spielen.

6 Zusammenfassung

Zur Bestimmung der Konzentration an neutralisierenden Antikörpern in Patientenseren wurde ein ELISA-basierter Mikroneutralisationstest etabliert.

Ausgangspunkt dieser Methodenetablierung war ein einem konventioneller Neutralisationstest, bei dem die Auswertung durch immunzytochemische Färbung und Auszählen der infizierten Zellen am Lichtmikroskop erfolgt. Dieses Verfahren ist sehr zeitaufwendig und das Ergebnis ist in großem Maße von der Erfahrung des jeweiligen Untersuchers abhängig. Der in dieser Arbeit entwickelte Enzym-Immuno-Assay (ELISA)-basierte-Neutralisationstest ermöglicht eine objektivere Auswertung, da eine automatische Bestimmung der Extinktion durch den ELISA-Reader erfolgt, und ist mit einem wesentlich geringeren Zeitaufwand verbunden.

Nach Etablierung des ELISA-basierten Neutralisationstests wurde seine Anwendbarkeit auf eine aktuelle Fragestellung beispielhaft getestet. Es wurde geprüft, ob der ELISA-Neutralisationstest simultane Verlaufsuntersuchungen mehrerer Seren erlaubt, ob er exakt genug ist, um Titerveränderungen zu erfassen und ob die exemplarisch untersuchten Serumverläufe erste Hinweise auf humorale Effekte eines adoptiven Immuntransfers oder auf einen Zusammenhang zwischen Neutralisationskapazität im Serum und der Klärung der Infektion ergeben. Hierzu wurde untersucht, ob es nach einem adoptivem T-Zell-Transfer, der zur Therapie einer HCMV-Infektion nach allogener SZT durchgeführt wurde, zu einer Steigerung der relativen Neutralisationskapazität kam, wenn ein zusätzlicher Transfer von CD4+ T-Zellen erfolgte. Ebenso war interessant, ob eine hohe Neutralisationskapazität auch mit einem geringeren DNAämie einhergeht. Diese Fragen wurden funktionell, durch Messung der Neutralisationskapazität von Patientenseren im Verlauf, untersucht. Es wurden beispielhaft die Neutralisationskapazität der Seren von fünf Patienten getestet, jeweils zum Zeitpunkt des T-Zell-Transfers und daraufhin einen Monat, zwei Monate und drei Monate nach Transfer. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen konnte kein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen dem zusätzlichen Transfer von CD4+ T-Zellen und dem Ausmaß der

neutralisierenden Immunantwort gefunden werden. Das Serum eines der hierbei untersuchten Patienten unterschied sich von den übrigen dadurch, dass es gegen HCMV-AD169 praktisch keine neutralisierende Aktivität zeigte. Bei Testung des Serums mit Virus vom HCMV-Towne-Stamm und dem patienteneigenen Virus-Isolat konnte allerdings eine sehr hohe Neutralisationskapazität nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft lässt sich durch die stammspezifische Neutralisation von HCMV erklären. Es ist also unerlässlich, sowohl, HCMV AD169 als auch HCMV Towne in die Testung der Neutralisationskapazität von Patienten einzubeziehen, um falsch negative Testergebnisse zu vermeiden. Für die These, dass eine Erhöhung der relativen Neutralisationskapazität mit einer besseren Elimination der HCMV-Infektion einhergeht, gab es in der hier vorliegenden Arbeit keinen Anhaltspunkt. Die Unfähigkeit zur Beseitigung einer Virämie bei sehr hohen Titern neutralisierender Antikörper spricht – selbst in einem Einzelfall – gegen einen bedeutenden Beitrag der humoralen Immunantwort in dieser klinischen Situation.

Es wurde also ein ELISA-basierter Neutralisationstest entwickelt, der objektiv und mit relativ geringem Zeitaufwand die simultane Untersuchung mehrerer Seren im Verlauf ermöglicht. Der Test ist hinreichend exakt um Titerveränderungen zu erfassen. Die durchgeführten Testungen zeigen, dass der ELISA-basierte Neutralisationstest auf aktuelle Fragestellungen anwendbar ist. Somit steht für zukünftige Analysen eine Methode zur Verfügung, um die Bedeutung der humoralen Immunantwort in größeren Kollektiven zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

- Adler, S. (1995). "Immunoprophylaxis against cytomegalovirus disease." Scand J Infect Dis Suppl **99**: 105-9.
- Adler, S. (1996). "Current prospects for immunization against cytomegalovirus disease." Infect Agents Dis **5**(1): 29-35.
- Adler, S., S. Starr, S. Plotkin, S. Hempfling, J. Buis, M. Manning and A. Best (1995). "Immunity induced by primary human cytomegalovirus infection protects against secondary infection among women of childbearing age." J Infect Dis **171**(1): 26-32.
- Ahn, J., W. Jang and G. Hayward (1999). "The human cytomegalovirus ie2 and ul112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (pods or nd10)." J Virol **73**(12): 10458-71.
- Alford, C., Britt WJ (1993). Cytomegalovirus. New York, Raven Press.
- Baldick, C. and T. Shenk (1996). "Proteins associated with purified human cytomegalovirus particles." J Virol **70**(9): 6097-105.
- Bass, E., Powe NR, Goldman SN, Graziano SL, Griffiths RI, Kickler TS, Wingard JR (1993). "Efficiency of immune globulin in preventing complications of bone marrow transplantation: A meta-analysis." Bone Marrow Transplantation **12**: 273-282.
- Boeckh, M. and R. Bowden (1995). "Cytomegalovirus infection in marrow transplantation." Cancer Treat Res **76**: 97-136.
- Bold, S., M. Ohlin, W. Garten and K. Radsak (1996). "Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein b-mediated cell-cell fusion." J Gen Virol **77**(Pt 9): 2297-302.
- Bolovan-Fritts, C., E. Mocarski and J. Wiedeman (1999). "Peripheral blood cd14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome." Blood **93**(1): 394-8.
- Boppana, S., R. Pass, W. Britt, S. Stagno and C. Alford (1992). "Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: Neonatal morbidity and mortality." Pediatr Infect Dis J **11**(2): 93-9.
- Boppana, S., L. Rivera, K. Fowler, M. Mach and W. Britt (2001). "Intrauterine transmission of cytomegalovirus to infants of women with preconceptional immunity." N Engl J Med **344**(18): 1366-1371.
- Bowden, R., L. Fisher, K. Rogers, M. Cays and J. Meyers (1991). "Cytomegalovirus (cmv)-specific intravenous immunoglobulin for the prevention of primary cmv infection and disease after marrow transplant." J Infect Dis **164**(3): 483-7.
- Bowden, R., S. Slichter, M. Sayers, D. Weisdorf, M. Cays, G. Schoch, M. Banaji, R. Haake, K. Welk, L. Fisher and a. et (1995). "A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (cmv) seronegative blood

- products for the prevention of transfusion-associated cmv infection after marrow transplant." Blood **86**(9): 3598-603.
- Braun, W. and C. Schacherer (1988). "Rapid (24h) neutralization assay for the detection of antibodies to human cytomegalovirus using a monoclonal antibody to an hcmv early nuclear protein." J Virol Methods **22**(1): 31-40.
- Britt, W. (1991). "Recent advances in the identification of significant human cytomegalovirus-encoded proteins." Transplant Proc **23**(3 Suppl 3): 64-9, discussion 69.
- Britt, W. and D. Auger (1986). "Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity." J Virol **59**(1): 185-8.
- Britt, W. and M. Mach (1996). "Human cytomegalovirus glycoproteins." Intervirology **39**(5-6): 401-12.
- Britt, W., L. Vugler, E. Butfiloski and E. Stephens (1990). "Cell surface expression of human cytomegalovirus (hcmv) gp55-116 (gb): Use of hcmv-recombinant vaccinia virus-infected cells in analysis of the human neutralizing antibody response." J Virol **64**(3): 1079-85.
- Cha, T., E. Tom, G. Kemble, G. Duke, E. Mocarski and R. Spaete (1996). "Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains." J Virol **70**(1): 78-83.
- Chandler, S. and J. McDougall (1986). "Comparison of restriction site polymorphisms among clinical isolates and laboratory strains of human cytomegalovirus." J Gen Virol **67**(Pt 10): 2179-92.
- Chee, M., A. Bankier, S. Beck, R. Bohni, C. Brown, R. Cerny, T. Horsnell, C. Hutchison, T. Kouzarides, J. Martignetti and a. et (1990). "Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain ad169." Curr Top Microbiol Immunol **154**: 125-69.
- Chen, D., H. Jiang and M. Lee (1999). "Three-dimensional visualization of tegument/capsid interactions in the intact human cytomegalovirus." Virology **260**: 10-16.
- Chiba, S., S. Hori, N. Kawamura and T. Nakao (1975). "Primary cytomegalovirus infection and liver involvement in early infancy." Tohoku J Exp Med **117**(2): 143-51.
- Chou, S. (1989). "Neutralizing antibody responses to reinfesting strains of cytomegalovirus in transplant recipients." J Infect Dis **160**(1): 16-21.
- Coffmann, R. S., B.; Lebman, D.; Hiraki, D., Christiansen, J., Shrader, B., Cherwinski, H.; Savelkoul, H.; Finkelman, F.; Bond, M. (1988). "The role of helper t cell products in mouse b cell differentiation and isotype regulation." Immunol. Rev. **102**: 5-28.
- Cohen, J. and G. Corey (1985). "Cytomegalovirus infection in the normal host." Medicine (Baltimore) **64**(2): 100-14.

- Colberg-Poley, A. (1996). "Functional roles of immediate early proteins encoded by the human cytomegalovirus ul36-38, ul115-119, trs1/irs1 and us3 loci." *Intervirology* **39**(5-6): 350-60.
- Compton, T., R. Nepomuceno and D. Nowlin (1992). "Human cytomegalovirus penetrates host cells by ph-independent fusion at the cell surface." *Virology* **191**(1): 387-95.
- Compton, T., D. Nowlin and N. Cooper (1993). "Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate." *Virology* **193**(2): 834-41.
- Cranage, M., T. Kouzarides, A. Bankier, S. Satchwell, K. Weston, P. Tomlinson, B. Barrell, H. Hart, S. Bell, A. Minson and a. et (1986). "Identification of the human cytomegalovirus glycoprotein b gene and induction of neutralizing antibodies via its expression in recombinant vaccinia virus." *EMBO J* **5**(11): 3057-63.
- Cremer, N., C. Cossen, G. Shell and L. Pereira (1985). "Antibody response to cytomegalovirus polypeptides captured by monoclonal antibodies on the solid phase in enzyme immunoassays." *J Clin Microbiol* **21**(4): 517-21.
- Davison, A., A. Dolan, P. Akter, C. Addison, D. Dargan, D. Alcendor, D. McGeoch and G. Hayward (2003). "The human cytomegalovirus genome revisited: Comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome." *J Gen Virol* **84**(Pt 1): 17-28.
- Dazzi, F. and J. Goldman (1998). "Adoptive immunotherapy following allogeneic bone marrow transplantation." *Annu Rev Med* **49**: 329-40.
- de Graan-Hentzen, Y., J. Gratama, G. Mudde, L. Verdonck, J. Houbiers, A. Brand, F. Sebens, L. A. van, T. The, R. Willemze and a. et (1989). "Prevention of primary cytomegalovirus infection in patients with hematologic malignancies by intensive white cell depletion of blood products." *Transfusion* **29**(9): 757-60.
- Depto, A. and R. Stenberg (1989). "Regulated expression of the human cytomegalovirus pp65 gene: Octamer sequence in the promoter is required for activation by viral gene products." *J Virol* **63**(3): 1232-8.
- Drew, W. and J. Lalezari (1999). "Cytomegalovirus: Disease syndromes and treatment." *Curr Clin Top Infect Dis* **19**: 16-29.
- Eggers, M., E. Bogner, B. Agricola, H. Kern and K. Radsak (1992). "Inhibition of human cytomegalovirus maturation by brefeldin a." *J Gen Virol* **73**(Pt 10): 2679-92.
- Eggers, M., C. Metzger and G. Enders (1998). "Differentiation between acute primary and recurrent human cytomegalovirus infection in pregnancy, using a microneutralization assay." *J Med Virol* **56**(4): 351-358.
- Einsele H, H. Bertz, J. Beyer, M.G. Kiehl, V. Runde, H.J. Kolb, E. Holler, R. Beck, R. Schwerdfeger, U. Schumacher, H. Hebart, H. Martin, J. Kienast, A.J. Ullmann, G. Maschmeyer, W. Kruger, D. Niederwieser, H. Link, C.A. Schmidt, H. Oettle und T. Klingebiel (2003). " Infectious complications after

allogeneic stem cell transplantation: epidemiology and interventional therapy strategies--guidelines of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society of Hematology and Oncology (DGHO)" Ann Hematol **82 Suppl 2**: S175-85.

- Einsele, H., G. Ehninger, H. Hebart, K. Wittkowski, U. Schuler, G. Jahn, P. Mackes, M. Herter, T. Klingebiel, J. Loffler and a. et (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**(7): 2815-20.
- Einsele, H., G. Ehninger, M. Steidle, I. Fischer, S. Bihler, F. Gerneth, A. Vallbracht, H. Schmidt, H. Waller and C. Muller (1993). "Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation." Blood **82**(5): 1672-8.
- Einsele, H., H. Hebart, C. Kauffmann-Schneider, C. Sinzger, G. Jahn, P. Bader, T. Klingebiel, K. Dietz, J. Loffler, C. Bokemeyer, C. Muller and L. Kanz (2000). "Risk factors for treatment failures in patients receiving pcr-based preemptive therapy for cmv infection." Bone Marrow Transplant **25**(7): 757-63.
- Einsele, H., G. Rauser, U. Grigoleit, H. Hebart, C. Sinzger, S. Riegler and G. Jahn (2002). "Induction of cmv-specific t-cell lines using ag-presenting cells pulsed with cmv protein or peptide." Cytotherapy **4**(1): 49-54.
- Einsele, H., E. Roosnek, N. Rufer, C. Sinzger, S. Riegler, J. Loffler, U. Grigoleit, A. Moris, H. Rammensee, L. Kanz, A. Kleihauer, F. Frank, G. Jahn and H. Hebart (2002). "Infusion of cytomegalovirus (cmv)-specific t cells for the treatment of cmv infection not responding to antiviral chemotherapy." Blood **99**(11): 3916-22.
- Farrell, H. and G. Shellam (1991). "Protection against murine cytomegalovirus infection by passive transfer of neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies." J Gen Virol **72**(1): 149-156.
- Finny, G., M. Rao, M. Mach, R. Juneja, P. Thomas, C. Jacob, D. Manayani, P. Abraham, M. Abraham and G. Sridharan (2001). "Characterization of antibody response to human cytomegalovirus in indian renal transplant patients." Indian J Med Res **113**: 221-7.
- Fowler, K., S. Stagno, R. Pass, W. Britt, T. Boll and C. Alford (1992). "The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status." N Engl J Med **326**(10): 663-667.
- Fries, B., S. Chou, M. Boeckh and B. Torok-Storb (1994). "Frequency distribution of cytomegalovirus envelope glycoprotein genotypes in bone marrow transplant recipients." J Infect Dis **169**(4): 769-74.
- Gallina, A., L. Simoncini, S. Garbelli, E. Percivalle, G. Pedrali-Noy, K. Lee, R. Erikson, B. Plachter, G. Gerna and G. Milanese (1999). "Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein." J Virol **73**(2): 1468-78.

- Gibson, W. (1983). "Protein counterparts of human and simian cytomegaloviruses." Virology **128**(2): 391-406.
- Gibson, W. (1996). "Structure and assembly of the virion." Intervirolgy **39**(5-6): 389-400.
- Gilbert, G., K. Hayes, I. Hudson and J. James (1989). "Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal cytomegalovirus infection study group." Lancet **1**(8649): 1228-31.
- Gonczol, E., G. Furlini, J. Ianacone and S. Plotkin (1986). "A rapid microneutralization assay for cytomegalovirus." J Virol Methods **14**(1): 37-41.
- Goodrich, J., M. Mori, C. Gleaves, M. C. Du, M. Cays, D. Ebeling, W. Buhles, A. B. De and J. Meyers (1991). "Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation." N Engl J Med **325**(23): 1601-7.
- Greaves, R. and E. Mocarski (1998). "Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant." J Virol **72**(1): 366-79.
- Grefte, A., N. Blom, d. G. M. van, S. W. van and T. The (1993). "Ultrastructural analysis of circulating cytomegalic cells in patients with active cytomegalovirus infection: Evidence for virus production and endothelial origin." J Infect Dis **168**(5): 1110-8.
- Greijer, A., d. C. J. van, S. Stevens and J. Middeldorp (1999). "Molecular fine-specificity analysis of antibody responses to human cytomegalovirus and design of novel synthetic-peptide-based serodiagnostic assays." J Clin Microbiol **37**(1): 179-88.
- Grigoleit, U., S. Riegler, H. Einsele, S. K. Laib, G. Jahn, H. Hebart, P. Brossart, F. Frank and C. Sinzger (2002). "Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells." Br J Haematol **119**(1): 189-98.
- Grundy, J., S. Lui, M. Super, N. Berry, P. Sweny, O. Fernando, J. Moorhead and P. Griffiths (1988). "Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: Reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus." Lancet **2**(8603): 132-5.
- Gupta, C., J. Leszczynski, R. Gupta and G. Siber (1996). "An enzyme immunoassay based micro-neutralization test for titration of antibodies to human cytomegalovirus (cmv) and its correlation with direct elisa measuring cmv igg antibodies." Biologicals **24**(1): 41-9.
- Harrison, T. (1998). Principles of internal medicine. New York, Mc Graw-Hill.
- Hebart, H., L. Kanz, G. Jahn and H. Einsele (1998). "Management of cytomegalovirus infection after solid-organ or stem-cell transplantation. Current guidelines and future prospects." Drugs **55**(1): 59-72.

- Hengel, H., U. Reusch, A. Gutermann, H. Ziegler, S. Jonjic, P. Lucin and U. Koszinowski (1999). "Cytomegaloviral control of mhc class i function in the mouse." Immunol Rev **168**: 167-76.
- Ho, M. (1991). Cytomegalovirus: Biology and infection. New York, Plenum.
- Honess, R. and B. Roizman (1974). "Regulation of herpesvirus macromolecular synthesis. I. Cascade regulation of the synthesis of three groups of viral proteins." J Virol **14**(1): 8-19.
- Huber, M. and T. Compton (1998). "The human cytomegalovirus ul74 gene encodes the third component of the glycoprotein h-glycoprotein I-containing envelope complex." J Virol **72**(10): 8191-7.
- Irmiere, A. and W. Gibson (1985). "Isolation of human cytomegalovirus intranuclear capsids, characterization of their protein constituents, and demonstration that the b-capsid assembly protein is also abundant in noninfectious enveloped particles." J Virol **56**(1): 277-83.
- Iskenderian, A., L. Huang, A. Reilly, R. Stenberg and D. Anders (1996). "Four of eleven loci required for transient complementation of human cytomegalovirus DNA replication cooperate to activate expression of replication genes." J Virol **70**(1): 383-92.
- Jahn, G., E. Knust, H. Schmolla, T. Sarre, J. Nelson, J. McDougall and B. Fleckenstein (1984). "Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus ad 169." J Virol **49**(2): 363-70.
- Jahn, G., T. Kouzarides, M. Mach, B. Scholl, B. Plachter, B. Traupe, E. Preddie, S. Satchwell, B. Fleckenstein and B. Barrell (1987). "Map position and nucleotide sequence of the gene for the large structural phosphoprotein of human cytomegalovirus." Journal of Virology **61**(5): 1358-1367.
- Jahn, G. and M. Mach (1990). "Human cytomegalovirus phosphoproteins and glycoproteins and their coding regions." Curr Top Microbiol Immunol **154**: 171-85.
- Jahn, G., W. Pohl, B. Plachter and J. Hintzenstern (1988). "[congenital cytomegalovirus infection with fatal outcome]." Dtsch Med Wochenschr **113**(11): 424-7.
- Janeway, C. T., P. (1997). Immunobiology, the immune system in health and disease. New York, Current Biology Ltd., Garland Publishing Inc.
- Jonjic, S., I. Pavic, P. Lucin, D. Rukavina and U. Koszinowski (1990). "Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of cd8+ t lymphocytes." J Virol **64**(11): 5457-64.
- Jonjic, S., I. Pavic, B. Polic, I. Crnkovic, P. Lucin and U. Koszinowski (1994). "Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus." J Exp Med **179**(5): 1713-7.
- Jordan, M., W. Rousseau, J. Stewart, G. Noble and T. Chin (1973). "Spontaneous cytomegalovirus mononucleosis. Clinical and laboratory observations in nine cases." Ann Intern Med **79**(2): 153-60.

- Keay, S. and B. Baldwin (1991). "Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment." J Virol **65**(9): 5124-8.
- Kim, K., V. Sapienza, R. Carp and H. Moon (1976). "Analysis of structural proteins of purified murine cytomegalovirus." J Virol **17**(3): 906-15.
- Klages, S., B. Ruger and G. Jahn (1989). "Multiplicity dependent expression of the predominant phosphoprotein pp65 of human cytomegalovirus." Virus Res **12**(2): 159-68.
- Klein, M., K. Schoppel, N. Amvrossiadis and M. Mach (1999). "Strain-specific neutralization of human cytomegalovirus isolates by human sera." J Virol **73**(2): 878-86.
- Koszinowski, U., V. M. Del and M. Reddehase (1990). "Cellular and molecular basis of the protective immune response to cytomegalovirus infection." Curr Top Microbiol Immunol **154**: 189-220.
- Kraat, Y., R. Hendrix, M. Landini and C. Bruggeman (1992). "Comparison of four techniques for detection of antibodies to cytomegalovirus." J Clin Microbiol **30**(2): 522-4.
- Krause, H., H. Hebart, G. Jahn, C. Muller and H. Einsele (1997). "Screening for cmv-specific t cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset cmv disease." Bone Marrow Transplant **19**(11): 1111-6.
- Kumar, M., G. Nankervis, A. Cooper and E. Gold (1984). "Postnatally acquired cytomegalovirus infections in infants of cmv-excreting mothers." J Pediatr **104**(5): 669-73.
- Landini, M. and S. Michelson (1988). "Human cytomegalovirus proteins." Prog Med Virol **35**: 152-85.
- Li, C., P. Greenberg, M. Gilbert, J. Goodrich and S. Riddell (1994). "Recovery of hla-restricted cytomegalovirus (cmv)-specific t-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: Correlation with cmv disease and effect of ganciclovir prophylaxis." Blood **83**(7): 1971-9.
- Li, L., K. Coelingh and W. Britt (1995). "Human cytomegalovirus neutralizing antibody-resistant phenotype is associated with reduced expression of glycoprotein h." J Virol **69**(10): 6047-53.
- Liu, B. and M. Stinski (1992). "Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream atf and ap-1 cis-acting elements." J Virol **66**(7): 4434-44.
- Ljungman, P. (1996). "Cytomegalovirus infections in transplant patients." Scand J Infect Dis Suppl **100**: 59-63.
- Ljungman, P., P. Biron, A. Bosi, J. Cahn, A. Goldstone, N. Gorin, H. Link, C. Messina, M. Michallet, C. Richard and a. et (1994). "Cytomegalovirus interstitial pneumonia in autologous bone marrow transplant recipients. Infectious disease working party of the european group for bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **13**(2): 209-12.

- Ljungman, P., D. Engelhard, H. Link, P. Biron, L. Brandt, S. Brunet, C. Cordonnier, L. Debusscher, L. A. de, H. Kolb and a. et (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**(4): 831-5.
- Maine, G., T. Lazzarotto and M. Landini (2001). "New development in the diagnosis of maternal and congenital cmv infections." Expert Rev Mol Diagn **1**(1): 19-29.
- Marshall, G., G. Rabalais, G. Stout and S. Waldeyer (1992). "Antibodies to recombinant-derived glycoprotein b after natural human cytomegalovirus infection correlate with neutralizing activity." J Infect Dis **165**(2): 381-4.
- Matloubian, M., R. Concepcion and R. Ahmed (1994). "Cd4+ t cells are required to sustain cd8+ cytotoxic t-cell responses during chronic viral infection." J Virol **68**(12): 8056-63.
- McVoy, M., D. Nixon and S. Adler (1997). "Circularization and cleavage of guinea pig cytomegalovirus genomes." J Virol **71**(6): 4209-17.
- Messerle, M., B. Buhler, G. Keil and U. Koszinowski (1992). "Structural organization, expression, and functional characterization of the murine cytomegalovirus immediate-early gene 3." J Virol **66**(1): 27-36.
- Mettenleiter, T. (2002). "Herpesvirus assembly and egress." J Virol **76**(4): 1537-47.
- Meyer, H., A. Bankier, M. Landini, C. Brown, B. Barrell, B. Ruger and M. Mach (1988). "Identification and procaryotic expression of the gene coding for the highly immunogenic 28-kilodalton structural phosphoprotein (pp28) of human cytomegalovirus." J Virol **62**(7): 2243-50.
- Michelson FS, H. F., Guillon JC (1977). "Immediate early antigens in human cytomegalovirus infected cells." nature **270**: 615-617.
- Mocarski, E. and C. Courcelle (1999). Cytomegaloviruses and their replication. New York, Raven Press.
- Mocarsky, E. (1993). Cytomegalovirus biology and replication. New York, Raven Press.
- Modrow, S. F., D. (1997). Herpesviren. Berlin, Spektrum, Akad. Verl.
- Mokarsky, E. (1993). Cytomegalovirus biology and replication. New York, Raven Pres.
- Munoz, I., A. Gutierrez, C. Gimeno, A. Farga, J. Alberola, C. Solano, F. Prosper, J. Garcia-Conde and D. Navarro (2001). "Lack of association between the kinetics of human cytomegalovirus (hcmv) glycoprotein b (gb)-specific and neutralizing serum antibodies and development or recovery from hcmv active infection in patients undergoing allogeneic stem cell transplant." J Med Virol **65**(1): 77-84.
- Navarro, D., E. Lennette, S. Tugizov and L. Pereira (1997). "Humoral immune response to functional regions of human cytomegalovirus glycoprotein b." J Med Virol **52**(4): 451-9.

- Navarro, D., P. Paz, S. Tugizov, K. Topp, V. J. La and L. Pereira (1993). "Glycoprotein b of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells." Virology **197**(1): 143-58.
- Pachl, C., W. Probert, K. Hermsen, F. Masiarz, L. Rasmussen, T. Merigan and R. Spaete (1989). "The human cytomegalovirus strain towne glycoprotein h gene encodes glycoprotein p86." Virology **169**(2): 418-26.
- Pari, G., M. Kacica and D. Anders (1993). "Open reading frames ul44, irs1/trs1, and ul36-38 are required for transient complementation of human cytomegalovirus orilyt-dependent DNA synthesis." J Virol **67**(5): 2575-82.
- Pass, R. (1985). "Epidemiology and transmission of cytomegalovirus." J Infect Dis **152**(2): 243-8.
- Pass, R. (1999). Cytomegalovirus. New York, Raven Press.
- Pass, R. and S. Boppana (1999). Cytomegalovirus. New York, Arnold.
- Pass, R., P. Griffiths and A. August (1983). "Antibody response to cytomegalovirus after renal transplantation: Comparison of patients with primary and recurrent infections." J Infect Dis **147**(1): 40-6.
- Paul, W. (1991). "Interleukin-4: A prototypic immunoregulatory lymphokine." Blood **77**(9): 1859-70.
- Penfold, M. and E. Mocarski (1997). "Formation of cytomegalovirus DNA replication compartments defined by localization of viral proteins and DNA synthesis." Virology **239**(1): 46-61.
- Pereira, L., M. Hoffman, M. Tatsuno and D. Dondero (1984). "Polymorphism of human cytomegalovirus glycoproteins characterized by monoclonal antibodies." Virology **139**(1): 73-86.
- Plachter, B., C. Sinzger and G. Jahn (1996). "Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus." Adv Virus Res **46**: 195-261.
- Plachter, B., L. Wiczorek, B. Scholl, R. Ziegelmaier and G. Jahn (1992). "Detection of cytomegalovirus antibodies by an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant polypeptides of the large phosphorylated tegument protein pp150." J Clin Microbiol **30**(1): 201-6.
- Ploegh, H. (1998). "Viral strategies of immune evasion." Science **280**(5361): 248-53.
- Prentice, H. and P. Kho (1997). "Clinical strategies for the management of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant." Bone Marrow Transplant **19**(2): 135-42.
- Quinnan, G., N. Kirmani, A. Rook, J. Manischewitz, L. Jackson, G. Moreschi, G. Santos, R. Saral and W. Burns (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**(1): 7-13.

- Ramirez, M., M. Virmani, C. Garon and L. Rosenthal (1979). "Defective virions of human cytomegalovirus." Virology **96**(1): 311-4.
- Rasmussen, L., A. Geissler and M. Winters (2003). "Inter- and intragenic variations complicate the molecular epidemiology of human cytomegalovirus." J Infect Dis **187**(5): 809-19.
- Rasmussen, L., C. Hong, D. Zipeto, S. Morris, D. Sherman, S. Chou, R. Miner, W. Drew, R. Wolitz, A. Dowling, A. Warford and T. Merigan (1997). "Cytomegalovirus gb genotype distribution differs in human immunodeficiency virus-infected patients and immunocompromised allograft recipients." J Infect Dis **175**(1): 179-84.
- Rasmussen, L., R. Nelson, D. Kelsall and T. Merigan (1984). "Murine monoclonal antibody to a single protein neutralizes the infectivity of human cytomegalovirus." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(3): 876-80.
- Reddehase, M., W. Mutter, K. Munch, H. Buhning and U. Koszinowski (1987). "Cd8-positive t lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity." J Virol **61**(10): 3102-8.
- Rentenaar, R., L. Gamadia, N. Van der Hoek, F. Van Diepen, R. Boom, J. Weel, P. Wertheim-van Dillen, R. Van Lier and I. Ten Berge (2000). "Development of virus-specific cd4+ t cells during primary cytomegalovirus infection." The Journal of Clinical Investigation **105**(4): 541-548.
- Reusser, P., R. Attenhofer, H. Hebart, C. Helg, B. Chapuis and H. Einsele (1997). "Cytomegalovirus-specific t-cell immunity in recipients of autologous peripheral blood stem cell or bone marrow transplants." Blood **89**(10): 3873-9.
- Reusser, P., S. Riddell, J. Meyers and P. Greenberg (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**(5): 1373-80.
- Riddell, S. and P. Greenberg (1995). "Principles for adoptive t cell therapy of human viral diseases." Annu Rev Immunol **13**: 545-86.
- Riddell, S. and P. Greenberg (1997). "T cell therapy of human cmv and ebv infection in immunocompromised hosts [record supplied by publisher]." Rev Med Virol **7**(3): 181-192
- Riddell, S., B. Walter, M. Gilbert and P. Greenberg (1994). "Selective reconstitution of cd8+ cytotoxic t lymphocyte responses in immunodeficient bone marrow transplant recipients by the adoptive transfer of t cell clones." Bone Marrow Transplant **14 Suppl 4**: S78-84.
- Rixon, F. (1993). "Structure and assembly of herpesviruses." Semin. Virol. **4**: 135-144.
- Roby, C. and W. Gibson (1986). "Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus." J Virol **59**(3): 714-27.

- Roizman B, C. L., Deinhardt F (1981). "Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy. The herpes virus study group, the international committee on taxonomy of viruses." Intervirology **16**: 201-217.
- Roizman B, K. D. (2001). Herpes simplex viruses and their replication. Philadelphia, Pa, Lippincott-Raven.
- Romanowski, M. and T. Shenk (1997). "Characterization of the human cytomegalovirus irs1 and trs1 genes: A second immediate-early transcription unit within irs1 whose product antagonizes transcriptional activation." J Virol **71**(2): 1485-96.
- Rosenthal, S., L. Stanberry, F. Biro, M. Slaoui, M. Francotte, M. Koutsoukos, M. Hayes and D. Bernstein (1997). "Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2 and cytomegalovirus in adolescents." Clin Infect Dis **24**(2): 135-9.
- Rothe, K. H., K.; Lang, D.; Vornhagen, R.; Hinderer, W., Sonneborn, H.; Plachter, B.; Jahn, G. (2000). "Diagnostic differentiation of primary versus secondary / recurrent infection of human cytomegalovirus by using a recombinant gb elisa." Biotest Bulletin **6**: 147-158.
- Salzberger, B., R. Bowden, R. Hackman, C. Davis and M. Boeckh (1997). "Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: Risk factors and outcome." Blood **90**(6): 2502-8.
- Sanchez, V., K. Greis, E. Sztul and W. Britt (2000). "Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: Characterization of a potential site of virus assembly." J Virol **74**(2): 975-86.
- Sanchez, V., E. Sztul and W. Britt (2000). "Human cytomegalovirus pp28 (ul99) localizes to a cytoplasmic compartment which overlaps the endoplasmic reticulum-golgi-intermediate compartment." J Virol **74**(8): 3842-51.
- Schmolke, S., H. Kern, P. Drescher, G. Jahn and B. Plachter (1995). "The dominant phosphoprotein pp65 (ul83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture." J Virol **69**(10): 5959-68.
- Schoppel, K., B. Kropff, C. Schmidt, R. Vornhagen and M. Mach (1997). "The humoral immune response against human cytomegalovirus is characterized by a delayed synthesis of glycoprotein-specific antibodies." J Infect Dis **175**(3): 533-44.
- Schoppel, K., C. Schmidt, H. Einsele, H. Hebart and M. Mach (1998). "Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients." J Infect Dis **178**(5): 1233-43.
- Sester, M., U. Sester, B. Gartner, G. Heine, M. Girndt, N. Mueller-Lantzsch, A. Meyerhans and H. Kohler (2001). "Levels of virus-specific cd4 t cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation." Transplantation **71**(9): 1287-94.

- Sester, M., U. Sester, B. Gartner, B. Kubuschok, M. Girndt, A. Meyerhans and H. Kohler (2002). "Sustained high frequencies of specific cd4 t cells restricted to a single persistent virus." J Virol **76**(8): 3748-55.
- Shanley, J., M. Jordan and J. Stevens (1981). "Modification by adoptive humoral immunity of murine cytomegalovirus infection." J Infect Dis **143**(2): 231-7.
- Sinzger, C., A. Grefte, B. Plachter, A. Gouw, T. The and G. Jahn (1995). "Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues." J Gen Virol **76**(Pt 4): 741-50.
- Sinzger, C. and G. Jahn (1996). "Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis." Intervirology **39**(5-6): 302-19.
- Sinzger, C., B. Plachter, A. Grefte, T. The and G. Jahn (1996). "Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo." J Infect Dis **173**(1): 240-5.
- Snydman, D. (1994). "Cytomegalovirus prophylaxis strategies in high-risk transplantation." Transplant Proc **26**(5 Suppl 1): 20-2.
- Soderberg-Naucler, C., K. Fish and J. Nelson (1997). "Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors." Cell **91**(1): 119-26.
- Soderberg-Naucler, C. and J. Nelson (1999). "Human cytomegalovirus latency and reactivation - a delicate balance between the virus and its host's immune system." Intervirology **42**(5-6): 314-21.
- Spaete, R., K. Perot, P. Scott, J. Nelson, M. Stinski and C. Pachl (1993). "Coexpression of truncated human cytomegalovirus gh with the ul115 gene product or the truncated human fibroblast growth factor receptor results in transport of gh to the cell surface." Virology **193**(2): 853-61.
- Spaete, R., R. Thayer, W. Probert, F. Masiarz, S. Chamberlain, L. Rasmussen, T. Merigan and C. Pachl (1988). "Human cytomegalovirus strain townes glycoprotein b is processed by proteolytic cleavage." Virology **167**(1): 207-25.
- Spector, D. (1996). "Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes." Intervirology **39**(5-6): 361-77.
- Stalder, H. and A. Ehrensberger (1980). "Microneutralization of cytomegalovirus." J Infect Dis **142**(1): 102-5.
- Stasiak, P. and E. Mocarski (1992). "Transactivation of the cytomegalovirus icp36 gene promoter requires the alpha gene product trs1 in addition to ie1 and ie2." J Virol **66**(2): 1050-8.
- Stenberg, R. (1996). "The human cytomegalovirus major immediate-early gene." Intervirology **39**(5-6): 343-9.
- Stenberg, R., A. Depto, J. Fortney and J. Nelson (1989). "Regulated expression of early and late mRNAs and proteins from the human cytomegalovirus immediate-early gene region." J Virol **63**(6): 2699-708.

- Steven A.C., S. P. G. (1997). Herpes virus capsid assembly and envelopment. New York, N.Y., Oxford University Press.
- Stinski, M. (1976). "Human cytomegalovirus: Glycoproteins associated with virions and dense bodies." J Virol **19**(2): 594-609.
- Stinski, M. (1978). "Sequence of protein synthesis in cells infected by human cytomegalovirus: Early and late virus-induced polypeptides." J Virol **26**(3): 686-701.
- Stinski, M. (1983). Molecular biology of cytomegaloviruses. New York, Plenum Press.
- Stinski, M., E. Mocarski and D. Thomsen (1979). "DNA of human cytomegalovirus: Size heterogeneity and defectiveness resulting from serial undiluted passage." J Virol **31**(1): 231-9.
- Tanaka, A., H. Moriuchi, K. Hirota and Y. Numazaki (1991). "Neutralizing antibody response to cytomegalovirus in seropositive pregnant women." J Med Virol **34**(2): 85-88.
- Tomiyama, T., T. Sugano, S. Tani, K. Hosoda and Y. Matsumoto (1993). "A microneutralization enzyme immunoassay for antibody to human cytomegalovirus." J Immunol Methods **159**(1-2): 71-9.
- Torok-Storb, B., M. Boeckh, C. Hoy, W. Leisenring, D. Myerson and T. Gooley (1997). "Association of specific cytomegalovirus genotypes with death from myelosuppression after marrow transplantation." Blood **90**(5): 2097-102.
- Tugizov, S., E. Maidji and L. Pereira (1996). "Role of apical and basolateral membranes in replication of human cytomegalovirus in polarized retinal pigment epithelial cells." J Gen Virol **77**(Pt 1): 61-74.
- Tugizov, S., E. Maidji, J. Xiao, Z. Zheng and L. Pereira (1998). "Human cytomegalovirus glycoprotein b contains autonomous determinants for vectorial targeting to apical membranes of polarized epithelial cells." J Virol **72**(9): 7374-86.
- Urban, M., W. Britt and M. Mach (1992). "The dominant linear neutralizing antibody-binding site of glycoprotein gp86 of human cytomegalovirus is strain specific." J Virol **66**(3): 1303-11.
- van Son, W. and T. The (1989). "Cytomegalovirus infection after organ transplantation: An update with special emphasis on renal transplantation." Transpl Int **2**(3): 147-64.
- Volpi, A., F. Pica, G. Gentile, A. Capobianchi, M. Frascetti and P. Martino (1999). "Neutralizing antibody response against human cytomegalovirus in allogeneic bone marrow-transplant recipients." J Infect Dis **180**(5): 1747-8.
- Vornhagen, R., W. Hinderer, H. Sonneborn, G. Bein, L. Matter, T. The, G. Jahn and B. Plachter (1995). "The DNA-binding protein pul57 of human cytomegalovirus is a major target antigen for the immunoglobulin m antibody response during acute infection." J Clin Microbiol **33**(7): 1927-30.

- Walter, E., P. Greenberg, M. Gilbert, R. Finch, K. Watanabe, E. Thomas and S. Riddell (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**(16): 1038-44.
- Winston, D., W. Ho, C. Howell, M. Miller, R. Mickey, W. Martin, C. Lin and R. Gale (1980). "Cytomegalovirus infections associated with leukocyte transfusions." Ann Intern Med **93**(5): 671-5.
- Yeager, A., F. Grumet, E. Hafleigh, A. Arvin, J. Bradley and C. Prober (1981). "Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants." J Pediatr **98**(2): 281-7.
- Zanghellini, F., S. Boppana, V. Emery, P. Griffiths and R. Pass (1999). "Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: Virologic and immunologic features." J Infect Dis **180**(3): 702-7.
- Zhou, Z., D. Chen, J. Jakana, F. Rixon and W. Chiu (1999). "Visualization of tegument-capsid interactions and DNA in intact herpes simplex virus type 1 virions." J Virol **73**(4): 3210-8.

Dank

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. Jahn für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die Möglichkeit die Räumlichkeiten und materiellen Ressourcen des Instituts für Medizinische Virologie zu nutzen, Herrn PD Dr. Christian Sinzger für die erstklassige Betreuung sowohl während der praktischen Durchführung als auch während des Schreibens, Kerstin Laib-Sampaio und Dr. Susanne Riegler, ohne deren Unterstützung im Labor diese Arbeit wahrscheinlich doppelt soviel Zeit beansprucht hätte, Herrn Prof. Dr. med. Einsele und Herrn PD Dr. H. Hebart für die freundliche zur Verfügungstellung der Patienten-Seren und der klinischen Daten, und ganz besonders meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Freunden, deren Unterstützung diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht hat.

Lebenslauf*Persönliche Daten*

Name	Martina Christiane Maria Mangin
Geburtstag	02.04.1977
Geburtsort	Tübingen
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Maria-Luise und Hanspeter Mangin

Schulbildung

1983-1987	Grundschule: Uhlandschule Wannweil
1987-1996	Isolde-Kurz-Gymnasium, Reutlingen Abschluß: Hochschulreife

Hochschulbildung

1996-1998	Vorklinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
1998	Vorärztliche Prüfung in Tübingen
1998-2003	Klinisches Studium in Tübingen
2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Studienaufenthalt in Göteborg (Schweden)
2002	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2002-2003	Praktisches Jahr in Wattwil (Schweiz), Stuttgart und Bristol (England)
13. 5. 2003	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufliche Tätigkeit

seit 07/2003	Ärztin im Praktikum an der Abteilung für Innere Medizin des Robert-Bosch-Krankenhauses, Stuttgart
--------------	---