

**Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department) Tübingen**

Abteilung I

Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Untersuchungen zur Aktivität Natürlicher Killerzellen
gegenüber Zytomegalievirus-infizierten Targetzellen:
Zytotoxizität in Hinblick auf die Expression von
Oberflächenmolekülen**

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

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

**vorgelegt von
Andreas Griesinger
aus Pforzheim**

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Lang

2. Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

DIESE ARBEIT IST MEINEN ELTERN GEWIDMET



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	Seite
1.1	<i>Hämatologische Stammzelltransplantation (HSCT)</i>	1
1.1.1	Historischer Hintergrund	1
1.1.2	Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen	2
1.1.2.1	Knochenmark	2
1.1.2.2	Peripheres Blut	2
1.1.2.3	Plazentarestblut	3
1.1.3	Allogene PBSCT / KMT	4
1.1.4	Konditionierung	4
1.1.5	Komplikationen der allogenen SCT	5
1.2	<i>Das humane Zytomegalievirus</i>	6
1.2.1	Historischer Hintergrund	6
1.2.2	Morphologie und Genomorganisation	7
1.2.3	HCMV mimicry versus NK-Zell vermittelter Zytotoxizität	8
1.2.3.1	Immune-Escape-Mechanismen	8
1.2.3.1.1	MHC-Klasse-1-Molekül-Komplex	8
1.2.3.1.2	HLA-E	10
1.2.3.2.3	HLA-G	11
1.2.3.1.4	NKG2D-Liganden	11
1.2.3.2	Immune-Recognize-Mechanismen	12
1.2.3.2.1	Adhäsionsmoleküle	12
1.2.4	Epidemiologie	13
1.2.5	Klinik und Pathogenese	13
1.2.6	HCMV nach SCT	15

1.2.7	Reaktivierung des latenten HCMV	15
1.2.8	HCMV-Therapie	16
1.2.8.1	Ganciclovir	17
1.2.8.1.1	Wirkmechanismus	17
1.2.8.1.2	Indikation und Dosierung	18
1.2.8.1.3	Arzneimittelnebenwirkung	19
1.2.8.1.4	Ganciclovirresistenz durch Mutation in der UL97-Region	19
1.2.8.2	Foscarnet	20
1.2.8.2.1	Wirkmechanismus	20
1.2.8.2.2	Indikation und Dosierung	20
1.2.8.2.3	Arzneimittelnebenwirkung	21
1.2.8.2.4	Virostatikaresistenz durch Mutation in der UL54-Region	21
1.2.8.3	Cidofovir	21
1.2.8.3.1	Wirkmechanismus	21
1.2.8.3.2	Indikation und Dosierung	22
1.2.8.3.3	Arzneimittelnebenwirkung	22
1.2.9	Anti-hCMV-Immunglobulin	22
1.2.10	Interleukin-2	23
1.2.11	Interleukin-15	25
1.3	NK-Zellen	27
1.3.1	Historischer Hintergrund	27
1.3.2	KIR und LIR	28
1.3.3	NK-Zell-Regulation	29
1.3.4	Zytolytische Mechanismen von NK-Zellen	30
1.3.5	NK-Zell Rekonstitution nach hSCT	31
1.4	Fragestellung	31

2	Material	
2.1	Zellen	32
2.1.1	Adhaerente Zelllinien	32
2.1.2	Non-adhaerente Zelllinien	32
2.2	Viren	33
2.2.1	Laborstamm AD-169	33
2.2.2	HCMV aus biologischen Materialien	34
2.2.2.1	WT-MR (hCMV Wildtypstamm multiresistent)	34
2.2.2.2	WT-GCVR1 (hCMV Wildtypstamm Ganciclovirresistent)	35
2.2.2.3	WT-GCVR2 (Isolat 3)	35
2.2.2.4	WT-GCVR3 (Isolat 6)	36
2.2.2.5	WT-GCVS1 (hCMV Wildtypstamm Ganciclovirsensitiv)	36
2.2.2.6	WT-GCVS2	36
2.3	Lösungen und Medien für die Zellkultur	37
2.4	Reagentien für die Immunperoxidase-Färbung	38
2.5	Ficoll-Seperation	38
2.6	Lösungen für die CD⁵⁶⁺-Zellseperation mittels MACS	38
2.7	LDH-Assay	39
2.8	Europium-Assay	40

2.9	<i>Lösungen für die Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse</i>	40
2.9.1	Quantitative FACS-Analyse	41
2.9.2	Intrazelluläre Färbung	41
2.9.3	MACS-Kontroll-FACS & MHC-Klasse-1-Kinetik	42
2.10	<i>Verbrauchsmaterial</i>	42
2.11	<i>Kleingeräte</i>	43
2.12	<i>Großgeräte</i>	43
2.13	<i>Blutprodukte von Patienten und Probanden</i>	44
3	Methoden	
3.1	<i>Zellkulturen</i>	46
3.1.1	Züchtung und Passagierung von Suspensionskulturen	46
3.1.2	Züchtung und Passagierung adhaerenter Monolayerkulturen	46
3.1.3	Konservierung von Suspensionskulturen und adhaerenten Monolayerkulturen	48
3.2	<i>Virusisolate</i>	49
3.2.1	Züchtung von hCMV-Isolaten auf adhaerenten Monolayerkulturen	49
3.2.1.1	Primäre Virusisolate	49

3.2.1.2	Muttermilch	49
3.2.2	Konservierung von hCMV-Isolaten auf adhaerenten Monolayerkulturen	50
3.2.3	AD-169-Aufarbeitung	50
3.2.3.1	Virusanzucht	50
3.2.3.2	Gefriertanalyse	51
3.2.3.3	Titerbestimmung (TCID ₅₀)	51
3.2.3.4	AD-169-Plaqueassay	53
3.3	<i>Bestimmung der Gesamtzellzahl und Vitalität durch Färbung mit Trypanblau</i>	54
3.4	<i>Kultureller Immediate-Early-Antigen- Immunperoxidasetest</i>	54
3.5	<i>Modifizierter Kokultur-Assay nach Prix et al. [1998]</i>	56
3.6	<i>Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut</i>	59
3.7	<i>Anreicherung Natürlicher Killerzellen</i>	60
3.8	<i>Adhaerenter Laktatdehydrogenase-Zytotoxizitäts- Assay</i>	63
3.9	<i>Europium-Zytotoxizitäts-Assay</i>	65
3.9.1	Versuchsdurchführung non-adhaerenter BATDA-release-Assay	67
3.9.2	Versuchsdurchführung adhaerenter BATDA-release-Assay	69
3.9.3	ADCC (antibody-dependent cell-mediated-cytotoxicity)	69

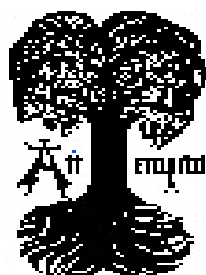
3.10	<i>Durchflusszytometrie</i>	71
3.10.1	Direkte Immunfluoreszenzfärbung	74
3.10.2	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (Quantitative Durchflusszytometrie)	74
3.10.3	Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung	77
3.10.4	Aquisition und Analyse der durchflusszytometrischen Daten	78
3.11	<i>Statistik</i>	79
4	Ergebnisse	
4.1	<i>Etablierung adhaerenter BATDA-release-Assay und non-adhaerenter BATDA-release-Assay</i>	80
4.2	<i>Vergleich LDH-Assay, adhaerenter BATDA-release- Assay und non-adhaerenter BATDA-release-Assay</i>	80
4.3	<i>Non-adhaerenter BATDA-release-Assay: Vergleich verschiedener Zelllinien</i>	83
4.4	<i>Non-adhaerenter BATDA-release-Assay: ADCC</i>	85
4.4.1	Zytotoxische Aktivität gegen AD-169-infizierte Targetzellen	86
4.4.2	Zytotoxische Aktivität gegen WT-MR-infizierte Targetzellen	91
4.4.3	Zytotoxische Aktivität gegen WT-GR1-infizierte Targetzellen	94

4.4.4	Zytotoxische Aktivität gegen WT-S1-infizierte Targetzellen	96
4.4.5	Zytotoxische Aktivität gegen WT-GR3-infizierte Targetzellen	99
4.5	<i>Oberflächenexpression</i>	103
4.5.1	Qualitative MHC-Klasse-1-Oberflächenexpression	103
4.5.2	Quantitative Oberflächenexpression	109
4.5.2.1	HLA-ABC (MHC-Klasse-1)	109
4.5.2.2	Nicht-klassische MHC-Klasse I(b)-Moleküle	110
4.5.2.2.1	HLA-E	110
4.5.2.2.2	HLA-G	111
4.5.2.3	Adhäsionsmoleküle	112
4.5.2.3.1	CD ⁵⁴⁺ (ICAM-1)	112
4.5.2.3.2	CD ⁵⁸⁺ (LFA-3)	113
4.5.2.4	NKG2D-Liganden	113
4.5.2.4.1	MICA/B	114
4.5.2.4.2	MICA	114
4.5.2.4.3	MICB	115
4.5.2.4.4	ULBP1	116
4.5.2.4.5	ULBP2	116
4.5.2.4.6	ULBP3	117
4.6	<i>Zusammenhang zwischen dem non-adhaerenten BATDA-release-Assay und der Oberflächenexpression hCMV-infizierter Targetzellen</i>	118
5	Diskussion	
5.1	<i>Einführung</i>	119

5.2	<i>Methodenkritik</i>	120
5.2.1	Zellkultur	120
5.2.2	Abtrypsinieren	121
5.2.3	Immunomagnetische Zellanreicherung	122
5.2.4	Zytotoxizitätsassays	122
5.2.5	Durchflusszytometrie	124
5.3	<i>Oberflächenmoleküle</i>	125
5.3.1	Qualitative und Quantitative HLA-ABC- Expression auf hCMV-infizierten Fibroblasten	125
5.3.2	Nichtklassische MHC-Klasse-1(b)-Moleküle	127
5.3.2.1	HLA-G	127
5.3.2.2	HLA-E	128
5.3.3	Adhäsionsmoleküle	128
5.3.3.1	ICAM-1	128
5.3.3.2	LFA-3	130
5.3.4	NKG2D-Liganden	131
5.4	<i>Immunrekonstitution</i>	133
5.5	<i>Zytotoxizität von NK-Zellen gegen hCMV-infizierte Fibroblasten</i>	134
5.5.1	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen AD-169-infizierte HFF	134
5.5.2	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen WT-S1-infizierte HFF	137
5.5.3	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen WT-MR-infizierte HFF	138

5.5.4	Zytotoxizität von NK-Zellen gegen WT-GR1- und WT-GR3-infizierte HFF	138
5.6	<i>Interleukine</i>	140
5.6.1	Klinische Anwendung von Interleukin-2	140
5.6.2	Nebenwirkung der Interleukin-2 Therapie / Zusätzlich zu beachtende Gesichtspunkte bei der Anwendung von IL-2	141
5.6.3	Klinische Anwendung von Interleukin-15	142
5.7	<i>Anti-hCMV Immunglobulin (Cytoglobin[®]-5%)</i>	143
5.7.1	ADCC mit Cytoglobin [®] -5%	143
5.7.2	Klinische Anwendung von Cytoglobin [®] -5 %	144
5.7.3	Nebenwirkung der Therapie mit Cytoglobin [®] -5 % / Zusätzlich zu beachtende Gesichtspunkte bei der Anwendung von Cytoglobin [®] -5 %	146
5.8	<i>Schlussfolgerungen für die klinische Anwendung</i>	146
6	Zusammenfassung	148
7	Literaturverzeichnis	151
8	Anhang	
8.1	<i>Kasuistik 1 (WT-MR)</i>	195

8.2	<i>Kasuistik 2 (WT-GR1)</i>	196
8.3	<i>Kumulative Inzidenz der mittels PCR ermittelten hCMV-Virämie bei Patienten nach CD³⁴⁺-Stammzelltransplantation</i>	197
9	Publikationen	198
10	Danksagung	199
11	Lebenslauf	200



Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ABC	Antibody Binding Capacity
ACV	Aciclovir
AD-169	Zytomegalievirus-Laborstamm
ADCC	antibody-dependent cell-mediated-cytotoxicity
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
anti-hCMV IgG	Antikörper gegen Zytomegalieviren
AS	Aminosäure
BAE	Background Antibody Equivalent
BG	Background
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation
CDV	Cidofovir
CID	Cytomegale Einschusserkrankung
hCMV	humanes Zytomegalievirus
mCMV	muriner Zytomegalievirusstamm
CPE	Zytopathischer Effekt
CTL	spezifische zytotoxische CD ⁸⁺ T-Lymphozyten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBMT	Europäischen Abteilung für Blut- und KMT
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer (Durchflusszytometer)
Fc	konstantes Fragment von Immunglobulin
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisocyanat
FSC	Forward Scatter
GCV	Ganciclovir

G-CSF	Granulozyten-Coloniestimulierender Faktor
GCV-MP	GCV-Monophosphat
GCV-TP	GCV-Triphosphat
gp	Glykoprotein
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukämie
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
wtGR	Ganciclovirresistenter hCMV-Wildtyp-Stamm
dGTP	2'-Deoxyguanosin 5'-Triphosphat
mAk	monoklonale Antikörperdichte
mFI	mittlere Fluoreszenzintensität
mHC	minor Histocompatibility Antigene
HFF	humane Vorhautfibroblasten
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSCT	hämatologische Stammzelltransplantation
hHV	humanes Herpesvirus
ICAM-1	intercellular adhesion molecule, CD ⁵⁴⁺
ID ₅₀	inhibitorische Dosis 50%
IE	Immediate early
IEA	Immediate early antigen
IFN	Interferon
IL-2	Interleukin-2
IL-15	Interleukin-15
IR	invertierte repeats
IU	internationale Einheiten
ITAM	immune receptor tyrosine-based activatory motif
ITIM	immune receptor tyrosine-based inhibitory motif
KAR	killer cell activating receptor
KIR	killer cell inhibitory receptor
KM	Knochenmark
KMT	Knochenmarktransplantation
LAK-Zellen	Lymphokin-aktivierte Killerzellen

LFA-3	Lymphocyte Function-Associated Antigen-3, CD ⁵⁸⁺
LGL	large granular lymphocytes
LIR	lectin-like receptors
MACS	Magnetic activated cell sorter
ML	Maximallyse
MEM	minimal essential Medium
MHC	major histocompatibility complex
MIC	MHC class 1-related chains
MNC	Mononukleäre Zellen
wtMR	Multiresistenter hCMV-Wildtyp-Stamm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OKT-3	Anti-T-Zell-Antikörper
p / pp	Protein / Phosphoprotein
PBMNC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PBSCT	periphere Blutstammzelltransplantation
PE	Phycoerythrin
PFA	Foscarnet (Phosphonoameisensäure)
PRB	Plazentarestblut
wtS	Sensitiver hCMV-Wildtyp-Stamm
SCT	Stammzelltransplantation
SLE	Spontanlyse der Effektorzellen
SLT	Spontanlyse der Targetzellen
SSC	Side Scatter
TAP	Transporter associated with antigen processing
Tc	zytotoxische T-Zelle
TIL	tumor-infiltrating lymphocytes
TR	terminale repeats
UAW	unerwünschte Arzneimittelnebenwirkung
UL	unique long region
ULBP	UL16-binding proteins
US	unique short region

1 Einleitung

1.1 Hämatologische Stammzelltransplantation (HSCT)

1.1.1 Historischer Hintergrund

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen stellt für viele kongenitale oder erworbene schwere Störungen des hämatopoetischen Systems sowie für chemosensitive oder radiosensitive Tumore die grundlegende Therapie dar [Forman S.J. et al., 1998; Goldman J.M. et al., 1998; Lennard A.L. & Jackson G.H., 2000].

Nachdem erste Versuche einer Knochenmarktransplantation (KMT) an Mäusen und Hunden aufgrund einer Abstoßung oder Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD), eine immunologische Reaktion des transplantierten Markes gegen den „fremden“ Wirt, fehlschlugen, brachte die Entdeckung des humanen Leukozyten-Antigen-(HLA-)Systems in den 70er Jahren die entscheidende Wende. 1968 wurde erstmals bei 2 Patienten mit einem angeborenen schweren kombinierten Immundefekt eine allogene KMT erfolgreich durchgeführt [Levey R.H. et al., 1971].

Seither erhielten bis zum Jahr 1987 weltweit mehr als 22.000 Patienten eine KMT. In den folgenden Jahren wurden die Transplantationen zunehmend mit aus Blut, in geringerem Maße auch aus Nabelschnurblut, gewonnenen Stammzellen (PBSC) durchgeführt. Nach der Europäischen Abteilung für Blut- und KMT (EBMT) wurden allein 1999 in Europa von insgesamt 21.430 HSCT 18.720 als Ersttransplantationen durchgeführt (31% allogene, 69% autologe).

Während 1991 mehr als 90% der autologen und sämtliche allogene Transplantationen Verpflanzungen von KM waren, wurden 1999 im autologen zu 95% und im allogenen Bereich zu 45% (im Jahre 2000 zu 80%) Blutstammzellen transplantiert [Ottinger H.D., 2000].

1.1.2 Gewinnung von hämatopoetischen Stammzellen

1.1.2.1 Knochenmark

KM wird in Allgemeinnarkose durch multiple Aspirationen aus dem Bereich der Spina iliaca posterior superior entnommen [Thomas E.D. & Storb R., 1970]. Für ein sicheres Anwachsen des Transplantats sind $2-5 \times 10^8$ kernhaltige Knochenmarkzellen/kg Körpergewicht erforderlich, weshalb beim erwachsenen Spender etwa 1.000 ml mit ca. 1×10^{10} MNC und einem Gehalt von ca. 0,5 - 1 % ($50 - 100 \times 10^6$) CD^{34+} Stammzellen gewonnen werden. Falls keine Major- (Empfängerplasma Isohämagglutinine gegen Spendererythrozyten) oder Minor- (Spenderplasma Isohämagglutinine gegen Empfängererythrozyten) Inkompatibilität besteht, erhält der Empfänger unmittelbar nach der Entnahme die intravenöse Transfusion des Markes.

1.1.2.2 Peripheres Blut

Normalerweise finden sich im KM 10 bis 50mal mehr pluripotente Stammzellen und Vorläuferzellen als im peripheren Blut [Gerard L. et al., 1992]. Die Mobilisierung mittels hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (z.B. G-CSF) allein oder in Kombination mit einer Chemotherapie ermöglichte nach anschließender Leukophorese des peripheren Blutes die ausreichende Sammlung von PBSC [Handgretinger R. et al., 1992; Bensinger W.I. et al., 1993; Caspar C.B. et al., 1993; Lang P. et al., 1993]. Bei der Aphaese eines gesunden Spenders konnten ab einem Gehalt von mehr als 10×10^6 CD^{34+} Stammzellen pro μ l Blut $1 - 8 \times 10^{10}$ nukleäre Zellen gewonnen werden, die etwa $100 - 400 \times 10^6$ CD^{34+} Stammzellen enthielten [Bundesärztekammer, 1997; Schumm M. et al., 1999]. Im Vergleich mit der KMT entsprach dies einer 10 bis 20fach höheren Menge an gesammelten Zellen [Handgretinger R. et al., 1999]. Hierdurch war die Möglichkeit einer In-vitro-Manipulation von Transplantaten sowohl im autologen als auch im allogenen Bereich gegeben (z.B. Purgung oder In-vitro-Stammzellexpansion) [Schmitz N., 1998; Hebib N.C. et al., 1999].

Zusätzlich wuchs das Transplantat sicherer und schneller an [Korbling M. et al., 1995; Bacigalupo A. et al., 1996b; Bensinger W.I. et al., 1996; Ottinger H.D. et al., 1996; Beelen D.W. et al., 1997; Schmitz N. et al., 2000].

Die etwa 10fach höhere Konzentration an T-Zellen in Blutstammzelltransplantaten führte einerseits beabsichtigt zu einem ausgeprägten Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (GvL) [Goldman J.M. et al., 1988; Elmaagacli A.H. et al., 1999], andererseits ergab sich die Gefahr einer erhöhten Inzidenz der akuten Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (GvHD).

Während die zurzeit größte Studie, eine multizentrische Studie der EBMT, bei gleichbleibender Mortalität eine erhöhte Inzidenz der akuten GvHD Grad II-IV (55% vs. 39%) nach PBSCT im Vergleich zur KMT dokumentiert [Schmitz N. et al., 2000], fanden Studien aus Seattle und Essen keinen Unterschied in der Inzidenz der akuten GvHD nach der Durchführung beider Methoden [Bensinger W. et al., 1999; Simpson D.R. et al., 2000]. Alle Studien zeigten jedoch ein erhöhtes auftreten einer chronischer GvHD nach PBSCT (EBMT: 74% versus 53%). Außerdem führte die schnellere hämatologische Rekonstitution gelegentlich bei Minor-ABO-Inkompatibilität zu einer bedrohlichen akuten Hämolyse.

1.1.2.3 Plazentarestblut

Plazenta- oder Nabelschnurrestblut (PRB) enthält ca. 1 - 2% ($5 - 10 \times 10^6$) CD³⁴⁺ Zellen, die sich allerdings durch ihre Unreife und damit höhere expansive Potenz von den Stammzellen Erwachsener unterscheiden [Kassai M. & Masauzi N., 1998]. Die relative Immaturität der Lymphozyten im PRB könnte das Risiko und die Schwere der GvHD reduzieren und damit größere HLA-Unterschiede zwischen Spender und Empfänger erlauben. Dennoch wurden im Jahre 2000 in Deutschland lediglich 3 Transplantationen mit Nabelschnurblut durchgeführt [Ottinger H.D. et al., 2000].

1.1.3 Allogene PBSCT / KMT

Die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen erfolgt vorzugsweise von einem HLA-identischen Spender (25% der Fälle). Steht ein solcher nicht zur Verfügung, so wird mittels Spenderdatenbanken ein Fremdspender mit major Histocompatibilitance (**MHC**) gesucht, das heißt mit Übereinstimmung der transplantationsrelevanten Antigene HLA-A, -B und -DR. Dabei liegt die Wahrscheinlichkeit für einen Kaukasier weltweit innerhalb von 2 - 3 Monaten einen unverwandten Stammzellspender zu finden bei über 80% [Ottinger H. et al., 1995].

Als letzte Option steht die Transplantation von haploidentischen Familienspendern [Peters C. et al., 1999]. Hierbei begünstigen größere Mengen an transplantierten Stammzellen, sogenannte Megadosen, das Anwachsen des Transplantats und induzieren Toleranz [Rachamin N. et al., 1998; Handgretinger R. et al., 2001a]. Die vielfach höhere Anzahl an PBSC mit entsprechend relativ kurzer Aplasiephase in Kombination mit einer fast totalen T-Zelldepletion ($< 0,05\%$ T-Zellen/kg KG) und Anti-T-Zell-Antikörpergabe (OKT-3) schützen dabei vor der Abstoßung und einer schweren GvHD. Weiterhin ist im Vergleich zur PBSCT mit HLA-identischen Fremdspendern eine Immuntherapie durch T-Zellspende noch zu einem beliebigen späteren Zeitpunkt möglich. Nachteilig ist eine deutliche längere Immundefizienz nach der haploidentischen Transplantation bei Erwachsenen aufgrund der nur noch eingeschränkt vorhandenen Thymusfunktion [Handgretinger R. et al., 2001b].

1.1.4 Konditionierung

Bei der allogenen und autologen SCT umfasst die Konditionierungstherapie eine hochdosierte Radiochemotherapie oder eine kombinierte Chemotherapie, die bei bösartigen Erkrankungen eine zytotoxische Wirkung auf die Grundkrankheit erzielen soll.

Die Transplantation allogener Stammzellen erfordert zusätzlich eine starke immunablativ Komponente, um eine Transplantatabstoßung zu verhindern [Santos G.W. et al., 1983; Clift R.A. et al., 1990]. Während bei der autologen SCT zur Steigerung der antineoplastischen Wirkung eine intensivierete Konditionierungstherapie angestrebt wird, werden bei allogenen SCT zunehmend Konditionierungstherapien mit reduzierter Intensität eingesetzt. Letzteres stützt sich auf die GvL-Reaktion, welche durch eine verkürzte Durchführung der GvHD-Prophylaxe oder Donorlymphozytengabe induziert werden soll.

Toxische Komplikationen der Konditionierungstherapie sind ein organbezogenes oder generalisiertes „Capillary-leak-Syndrom“, vermehrte Infektionen, Mukositis, hepatische Venenverschlusskrankheit, hämorrhagische Zystitiden, Schädigungen von Herz, Nieren und Lunge. Die Spättoxizität zeigt sich in einer Ovarialinsuffizienz [Kolb H.J. & Bender-Gotze C., 1990], Wachstumsstörungen [Sanders J.E. et al., 1989], Katarakte [Thomas O. et al., 2001] und Sekundärmalignomen (die Inzidenz von soliden Tumoren ist um den Faktor 8,3 höher als in der Normalbevölkerung [Socie G. et al., 1999]).

1.1.5 Komplikationen der allogenen SCT

Aufgrund eines Mismatches der minor Histocompatibility Antigene (mHC) [Elkins W.L. et al., 1987; Goulmy E., 1997; Dickinson A.M. et al., 2002] kann sich auch bei dem Transfer alloreaktiver HLA-identischer immunkompetenter T-Lymphozyten eines Spenders eine akute (innerhalb der ersten 100 Tage nach SCT; eingeteilt in vier Schweregrade [Przepiorka D. et al., 1995]) oder chronische (ab dem 3. Monat nach SCT) GvHD entwickeln. Dabei sind in erster Linie Haut, Leber und Gastrointestinaltrakt betroffen [Elkins W.L. et al., 1987]. Als Prophylaxe dient sowohl die sechsmonatige Gabe von Cyclosporin A (Serumspiegel 150 - 250 µg/ml) und Methotrexat (15 mg/m² d+1 und 10 mg/m² am d+3, +6 und +11) als auch eine in vitro T-Zelldepletierung des Transplantats.

Zudem halten die Defekte im zellulären und humoralen Immunsystem nach einer hSCT über ein Jahr lang an [Maury S. et al., 2001; Storek J. et al., 2001]. Diese anhaltende mangelhafte Immunsystemfunktion führt zu einem ansteigenden Risiko an Infektionen [Storek J. et al., 1997], Rezidiven der Grunderkrankung [Maraninchi D. et al., 1987] oder einer Entwicklung von Sekundärtumoren [Curtis R.E. et al., 1997].

In dieser Arbeit soll auf die Infektionen durch humane Zytomegalieviren näher eingegangen werden.

1.2 Das humane Zytomegalievirus

1.2.1 Historischer Hintergrund

Das humane Zytomegalievirus (hCMV), auch als humanes Herpesvirus 5 (hHV 5) bezeichnet, gehört zusammen mit dem Muromegalovirus (mCMV) und den Roseoloviren (hHV 6, hHV 7) zur Familie der Herpesviridae, Subfamilie Betaherpesvirinae. Der Name leitet sich von der Eigenschaft ab, zur Vergrößerung der infizierten Zelle zu führen und charakteristische Einschlusskörperchen zu bilden. Dieser anatomisch-pathologische Effekt wurde 1881 erstmals von Ribbert als „Protozoen-artige Gebilde“ in Nierenepithelzellen von an Syphilis erkrankten Totgeburten entdeckt und 23 Jahre später beschrieben [Ribbert H. 1904]. Goodpasture und Talbert vermuteten 1921 eine virale Infektion [Goodpasture E.W. & Talbot F.B., 1921], die der von Tyzzer beschriebenen Hautläsionen durch Varizella-Zoster-Viren vergleichbar wäre [Tyzzer E.E., 1906]. 1950 wurde von Wyatt aufgrund der Morphologie für diese Form der kongenitalen letalen Infektion die Bezeichnung „Cytomegale Einschlusserkrankung“ (CID) vorgeschlagen [Wyatt J.P. et al., 1950]. Die Isolierung des Virus gelang in den Jahren 1956/57 unabhängig in drei Laboratorien: Smith isolierte in St. Louis von der Glandula submandibularis eines 7 Monate alten Kindes mit Nebennierenrinden-Karzinom sowie der Niere eines ein Monat alten Kindes mit generalisierter CID zwei „AD“-Virusstämme

[Smith M.G., 1956]. Gleichzeitig gelangen es Rowe et al. in Bethesda zufällig mittels Adenoidkulturen tonsillektomierter Kinder drei hCMV-Stämme anzuzüchten, darunter der noch heute verwendete Laborstamm AD-169 [Rowe W.P. et al., 1956]. Weller et al. isolierten das Virus von drei Patienten mit CID [Weller T.H. et al., 1957] und bezeichneten es als „Cytomegalovirus“ [Weller T.H. et al., 1960].

1.2.2 Morphologie und Genomorganisation

Das hCMV enthält als Genom eine doppelsträngige lineare DNA mit einer Größe von ca. 230.000 Basenpaaren, umschlossen von einem ikosaedrischen Kapsid (100-110 nm Durchmesser, 162 Kapsomeren). Den äußeren Abschnitt bildet die Virushülle, die aus einer von der Zelle stammenden Lipid-Doppelschicht und mindestens acht eingelagerten Virussubtypspezifischen Glykoproteinen besteht. Zwischen Kapsid und Virushülle befindet sich eine als Matrix oder Tegument bezeichnete Proteinschicht, die den Replikationszyklus reguliert. Je nach Wirtszelle hat das Virion einen Durchmesser von etwa 120 bis 300 nm.

Das Genom des Laborstammes AD-169 ist vollständig sequenziert (229.354 bp) und enthält 208 offene Leserahmen (ORF) [Weston K. & Barrel B.G. 1986; Chee M.S. et al. 1990; Mocarski E.S. 1993].

Es setzt sich aus einem 175 kb langen (unique long = UL) und einem 38 kb kurzen (unique short = US) Segment zusammen und bildet vier äquimolare Genomisomere. Diese entstehen über terminale (TR) und invertierte repeats (IR), welche während der Replikation durch Spaltung und homologe Rekombination an der internen α -Sequenz die Inversion der UL- oder der US-Region ermöglichen. Dabei kann die α -Sequenz sowohl an den Genomtermini als auch in der Junktion amplifiziert werden.

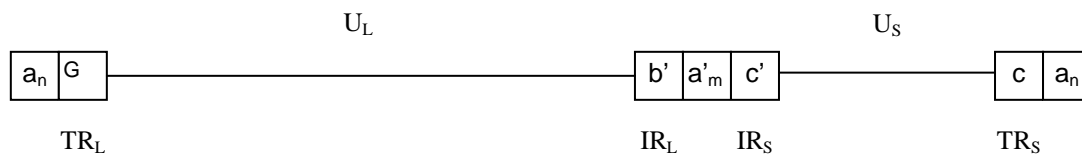


Abb.1: **Schema des hCMV-Genoms:** 5'-a_La_nb-U_L-b'a'_mc'-U_S-ca_na_S-3'. Das Genom besteht aus einem langen (L) und einem kurzen (S) Segment. Jede unique (U) Sequenz ist von terminalen repetitiven (TR) Sequenzen sowie internen invertierten Repeats (IR) umgeben.

Die offenen Leserahmen (26% seines Genoms) sind innerhalb jeder Region fortlaufend nummeriert, vorangestellt wird der Zusatz p für Protein, gp für Glykoprotein und pp für Phosphoprotein. Sie kodieren bei AD-169 für 208 Proteine. Davon sind 189 einmalig vorhanden, während 7 Proteine in den Repeatregionen in zwei Kopien vorliegen. Im Vergleich zum Laborstamm AD-169 enthalten klinische hCMV-Isolate, trotz unveränderter Genomgröße (230 bis 235 kbp), 22 zusätzliche offene Leserahmen (UL133 - 154) die für 225 Gene kodieren [Cha T.A. et al., 1996]. Auch bei den Laborstämmen Toledo (+19 ORF) und Towne (+4 ORF) sprechen zusätzliche offene Leserahmen für einen Genverlust durch Deletion und Neuordnung der U_L/b'-Region während der Laborpassage.

1.2.3 HCMV mimicry versus NK-Zell vermittelter Zytotoxizität

1.2.3.1 Immune-Escape-Mechanismen

1.2.3.1.1 MHC-Klasse-1-Molekül-Komplex (HLA-ABC)

Sind Körperzellen von Viren befallen, die den zelleigenen Proteinbiosyntheseapparat in ihren Dienst stellen, werden körperfremde, virale Peptidfragmente präsentiert, die eine Identifikation und Eliminierung derartiger Zellen durch das Immunsystem möglich machen. So werden vom hCMV-Genom kodierte Proteine in Proteasomen fragmentiert, mittels TAP-1/TAP-2-Transportkomplex (transporter associated with antigen processing) in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) geschleust, von den dort synthetisierten MHC-Klasse-1-Proteinen gebunden und mit ihnen durch das trans-Golgi-

Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert. Die Erkennung des Komplexes durch spezifische zytotoxische CD⁸⁺ T-Lymphozyten (CTL) führt dann zur Zerstörung der Wirtszelle über Fas- oder Perforinabhängige Mechanismen. Das hCMV hat einige Mechanismen entwickelt, dieser Erkennung des Immunsystems zu entgehen:

- Das Tegumentprotein **ppUL83** (pp65) phosphoryliert das im Replikationszyklus zum ‚immediate-early‘ (IE) Zeitpunkt exprimierte Gen UL122 zu pUL122 und verhindert damit dessen Verdauung im Proteasom [Gilbert M.J. et al., 1996].
- **pUS3** hält drei bis sechs Stunden nach dem Infektionszeitpunkt zusammengesetzte MHC-Klasse-1-Moleküle im ER zurück und verhindert somit den Transport zur Zelloberfläche [Ahn K. et al., 1996; Jones T.R. et al., 1996].
- **pUS2** und **pUS11** verdrängen 24 - 48 Stunden nach der Infektion entstehende HLA-A- und HLA-B-Moleküle vom ER zurück in das Zytosol. Dort werden die schweren Ketten deglykosyliert und durch Proteasomen schnell proteolytisch abgebaut [Jones T.R. & Muuzithras V.P., 1991; Wiertz E.J.H.J. et al., 1996a,b].
- **pUS6** blockiert zu einer späteren Phase des hCMV-Replikationszyklus den TAP-Transporter und verhindert dadurch den Zusammenbau der Peptide, welche vom MHC-Klasse-1-Komplex aufgenommen werden sollten [Ahn K. et al., 1997; Hengel H. et al., 1997; Lehner P.J. et al., 1997; Hewitt E.W. et al., 2001].

Für die Herunterregulierung der MHC-Klasse-1-Moleküle [Barnes P.D. & Grundy J.E., 1992; Del Val M. et al., 1992; Beersma M.F.C. et al., 1993; Yamashita Y. et al., 1993; Fruh K. et al., 1997] ist hauptsächlich die im Replikationszyklus ‚early‘ (E) exprimierte Genregion US2-11 verantwortlich

[Falk C.S. et al., 2002]. Sie ermöglicht die hCMV-Replikation ohne Störung durch hCMV spezifische CTL. Zellen ohne individualspezifische MHC-Identifikation (Tumorzellen, virusinfizierte Zellen) können jedoch von einer Lymphozytenpopulation erkannt werden, welche sich basal im Zustand der Aktivierung befindet und durch fehlende inhibitorische MHC-Klasse-1-Rezeptoren (KIR = ‚Killer cell Inhibitory Receptors‘) aktiviert werden: NK-Zellen (‚Missing self-Hypothese‘ [Kärre K., 1985]).

Um sich gegen diese Killerzellvermittelte Zytotoxizität zu schützen, kodiert das hCMV für das MHC-Klasse-1-Homolog **gp UL18**. Dieses bindet wirtseigenes β_2 -Mikroglobulin [Beck S. & Barrell B.G., 1988; Browne H. et al., 1990] und präsentiert endogene Peptide [Fahnestock M.L. et al., 1995]. Über die Bindung an CD94/NKG2A [Reyburn H.T. et al., 1997] oder LIR-1 [Cosman D. et al., 1997] soll dadurch eine Resistenz gegenüber einer NK-Zell-vermittelten Lyse entstehen. Das **gp144** ist ebenfalls ein β_2 -Mikroglobulin assoziiertes MHC-Klasse-1-Homologon [Farrell H.E. et al., 1997; Reyburn H.T. et al., 1997].

1.2.3.1.2 HLA-E

Das nicht-klassische MHC-Klasse-1(b)-Molekül HLA-E, welches im Unterschied zu den klassischen MHC-Komplexen keinen Tc-Zell-Liganden darstellt, bindet polymorphe Signalpeptide der schweren HLA-ABC-Molekülkette und präsentiert sie den KIRs CD94-NKG2A (CD^{159a+}) und CD94-NKG2C [Braud V.M. et al., 1998; Lee N. et al., 1998; Brooks A.G. et al., 1999; Vales-Gomez M. et al., 1999]. Dieser Mechanismus signalisiert NK-Zellen eine intakte HLA-Maschinerie. Um eine gesunde Zelle zu imitieren, enthält das Leitsegment der hCMV Genomregion **UL40** ein vom TAP-Transporter unabhängiges Peptid mit neun Aminosäuren, welches dem des menschlichen MHC-Klasse-1-Proteins gleicht [Tomasec P. et al., 2000]. Eine Überexpression von UL40 induziert die Hochregulierung des HLA-E auf der Oberfläche infizierter Zellen und schützt sie damit vor einem NK-Zell-Angriff [Tomasec P. et al., 2000; Ulbrecht M. et al., 2000; Wang E.C. et al., 2002].

1.2.3.1.3 HLA-G

HLA-G, ein weiteres nicht klassisches MHC-Klasse-1(b)-Molekül, wird auf eine bisher unbekannte Weise vom hCMV auf infizierten Zelloberflächen hochreguliert und dient über die Bindung an KIR2DL4/p49 als inhibitorischer NK-Zell-Ligand [Ponte M. et al., 1999; Rajagopalan S. & Long E.O., 1999; Onno M. et al., 2000; Pazmany L. et al., 2000].

1.2.3.1.4 NKG2D-Liganden

Das ‚early‘ replizierte hCMV Glycoprotein **UL16** bindet eine neu entdeckte Familie MHC-Klasse-1-verwandter Zelloberflächenproteine: ULBPs (UL16-binding proteins) [Cosman D. et al., 2001]. Sie werden im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse-1-Molekülen über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an der Zellmembran verankert, haben keine α_3 -Domäne und sind nicht mit β_2 -Mikroglobulin assoziiert [Cosman D. et al., 2001].

Lösliche, rekombinante Formen von ULBP 1, 2 und 3 [Steinle A. et al., 2001; Sutherland C.L. et al., 2002] binden NK-Zellen über den heterodimeren NKG2D (C-Typ-Lektin) / DAP10-Komplex [Bauer S. et al., 1999; Diefenbach A. et al., 2000]. Sie steigern die NK-Zellvermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, die Produktion von Zytokinen (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TNF- β) sowie die Freisetzung der Chemokine Makrophagen-Inflammatorisches-Protein (MIP)-1 α , MIP-1 β und I-309 [Cosman D. et al., 2001; Kubin M. et al., 2001].

MICA und MICB (MHC-class-1-related chains A/B) sind weitere NKG2D Liganden. Die Expression dieser hochpolymorphen Glykoproteine [Bahram S., 2000] ist in vivo auf epitheliale Tumore und infizierte Zellen beschränkt [Groh V. et al., 1996 & 1999; Tieng V. et al., 2002]. Daher betrachtet man sie als Gefahrensignale bei Zellstress [Groh V. et al., 1996 & 1998]. Im Gegensatz zu klassischen MHC-Klasse-1-Molekülen assoziieren MIC-Proteine nicht mit β_2 -Mikroglobulin oder Antigenpeptiden [Groh V., 1996].

Obwohl der NKG2D-Rezeptor und das gpUL16 keine grundlegend strukturellen Ähnlichkeiten aufweisen, hält das UL16 kodierte Glykoprotein in vitro lediglich ULBP 1, ULBP 2 und MICB, nicht jedoch ULBP 3 und MICA [Cosman D. et al., 2001; Welte S.A. et al., 2003], im ER zurück und blockiert so die NKG2D-vermittelte NK-Zell-Effektor-Funktion. Diese Selektivität könnte eine N-terminale Glykosylierung an der Position 8 im Zentrum der β -Faltblattstruktur [Li P. et al., 1999] erklären, die nur ULBP 1, 2 und MICB aufweisen.

1.2.3.2 Immune-Recognize-Mechanismen

1.2.3.2.1 Adhäsionsmoleküle

Viren können auch direkt über die virale Infektion der Wirtszelle oder indirekt über Zytokine die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle beeinflussen. So konnte eine zunehmende Expression an LFA-3 (Lymphocyte Function-Associated antigen-3, CD⁵⁸⁺) zum early bzw. immediate early Zeitpunkt des Replikationszyklus bei hCMV-infizierten Zellen nachgewiesen werden [Grundy J.E. & Downes K.L., 1993; Craigen J.L. & Grundy J.E., 1996]. Über Bindung an CD²⁺ wird die Zelle damit empfindlich für die NK-Zell-Lyse [Lanier L.L. et al., 1997; Fletcher J.M. et al., 1998].

In vitro Studien konnten zeigen, dass monoklonale Antikörper gegen den LFA-1/CD^{11a+}-Liganden CD⁵⁴⁺ (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) die NK-Zellvermittelte Lyse hCMV-infizierter Fibroblasten blockieren [Leong C.C. et al., 1998]. Die gesteigerte Expression an ICAM-1 nach einer hCMV-Infektion [Grundy J.E. & Downes K.L., 1993; Craigen J.L. & Grundy J.E., 1996], sowie der Integrinligand LFA-1 [Schmidt R.E. et al., 1985; Timonen T. et al., 1988] scheinen damit eine wichtige Funktion in der NK-Zellvermittelten Immunantwort zu übernehmen. Denkbar wäre, dass virusinfizierte Zellen Zytokine (TNF- α , Lymphotoxin- α , Lymphotoxin- β , IFN- α , IFN- β) freisetzen und dadurch die beobachtete Hochregulation der Adhäsionsmoleküle bewirken.

1.2.4 Epidemiologie

Die Prävalenz spezifischer Antikörper gegen das ubiquitär vorkommende hCMV weist eine große Variationsbreite in Abhängigkeit vom sozioökonomischen Status und der Häufigkeit intimer Kontakte auf [Krech U., 1973]. Während in den Industriestaaten die Durchseuchungsraten zwischen 40 - 70 % liegen, erreicht die Seroprävalenz im Erwachsenenalter in vielen Teilen von Afrika, Südamerika und Japan nahezu 100 % [Lamberson H.V. & Dock N.L., 1992].

Als natürliche Übertragungswege kommen Schmierinfektion, Sexualkontakt und Stillen in Frage. Dementsprechend treten zwei Phasen der Durchseuchung auf: Ein erster Gipfel wird in der frühen Kindheit bis zum 5. - 6. Lebensjahr erreicht (Übertragung: kongenital [Stagno S. et al., 1986; Demmler G.J., 1991; Yow M.D. & Demmler G.J., 1992], durch Muttermilch [Minamishima I. et al., 1994] oder über Kindertagesstätten & Schulen [Onorato I.M. et al., 1985; Grillner L. & Strangert K., 1986]), ein zweiter geringerer Gipfel tritt im jungen Erwachsenenalter (16 - 30 Jahre) auf [Handsfield H.H. et al., 1985; Mocarski E.S. Jr., 1994]. Zusätzlich sind aufgrund von Bluttransfusionen, Transplantationen oder Samenspenden iatrogene hCMV-Übertragungen möglich. Das hCMV stellt die häufigste infektiöse Komplikation nach einer allogenen SCT dar [Meyers J.D. et al., 1986].

1.2.5 Klinik und Pathogenese

Die Primärinfektion verläuft nach einer Inkubationszeit von 4 - 8 Wochen beim Immungesunden meist asymptomatisch. In seltenen Fällen treten über 2 - 3 Wochen andauerndes Fieber, Myalgie, zervikale Lymphadenopathie und eine milde Hepatitis auf. Klinisch sind die Symptome nicht von einer Epstein-Barr-Virus assoziierten Mononukleose zu unterscheiden [Klemola E. & Kaariainen L., 1965]. Seltene Komplikationen sind Pneumonien, Myokarditis, aseptische Meningitis und immunologische Veränderungen. Nach einer hämatogenen Ausbreitungsphase (Virämie) folgt die Virusreplikation überwiegend

zellgebunden in duktalem Epithelien der Speicheldrüsen, jedoch auch in Nierenepithelzellen und Genitalorganen [Petz L.D. & Swisher S.N., 1996].

Mit 1% Infektiositätsrate zählen Erkrankungen durch das hCMV zu den häufigsten kongenital erworbenen Virusinfektionen [Stagno S. 1999]. In den USA beträgt die Inzidenz ungefähr 0,2 - 2,2 % aller Lebendgeburten [Onorato I.M. et al., 1985; Stagno S. et al., 1986]. Kongenitale Infektionen resultieren zumeist aus einer primären Infektion der Mutter, was in 35 - 50 % der Fälle zur Transmission des Virus auf den Fötus führt [Griffiths P.D. & Baboonian C., 1984]. Bei 8 - 10 % der Säuglinge resultiert daraus eine klinisch manifeste hCMV-Erkrankung mit Petechien, Ikterus, Hepatosplenomegalie, Chorioretinitis und zum Teil bleibenden neurologischen Störungen, an deren Folgen etwa 11 - 20 % der Erkrankten versterben [Broppana S.B. et al., 1992].

Charakteristisch für Herpesviren ist die Latenz, die zur lebenslangen Persistenz des Virus im Organismus führt. Als zelluläre Latenzreservoirs werden in erster Linie CD³⁴⁺ hämatopoetische Progenitorzellen und CD¹³⁺/CD¹⁴⁺ Monozyten im peripheren Blut diskutiert [Tayler-Wiedman J. et al., 1991; Movassagh M. et al., 1996; Zhuravskaya T. et al., 1997; Larsson S. et al., 1998].

Unter den Empfängern von allogenen Stammzelltransplantaten ist die Inzidenz an hCMV-Infektionen hoch (36 % bei seronegativen Patienten; 69 % bei seropositiven Patienten). Bei 15 % tritt eine hCMV-Pneumonie mit einer Todesfallrate von 15 % auf [Meyers J.D. et al., 1986]. Bowden et al. erzielten eine Reduktion posttransplantierter hCMV-Infektionen von 8/25 (33 %) nach Erhalt ungescreenter Blutprodukte auf 1/32 (3,1 %) bei Gabe von hCMV-seronegativ gescreenten Blutprodukten [Bowden R.A. et al., 1986]. Dieser Nutzen hCMV seronegativer Blutprodukte konnte in weiteren Studien bestätigt werden [Mackinson S. et al., 1988], gilt jedoch nicht für seropositive SC-Empfänger bzw. Spender. Ohne Ganciclovirprophylaxe oder präemptiver Therapie würden 20 - 30 % der Patienten nach allogener SCT eine hCMV-Endorganerkrankung entwickeln [Boekh M. & Ljungman P., 1998].

1.2.6 HCMV nach SCT

Interessanterweise verursacht das hCMV in verschiedenen Patientengruppen unterschiedliche klinische Erscheinungsbilder [Ljungman P. et al., 1990; Wingard J.R., 1993; Britt W.J. & Alford C.A., 1996]. Während AIDS-Patienten eine hCMV-Retinitis und gastrointestinale Erkrankungen aufweisen, manifestiert sich die Virusinfektion bei Patienten nach SCT eher mit Fieberspitzen, Leukopenie, Hepatitis, interstitielle Pneumonie und beeinträchtigter Empfängerfunktion.

Leichte Symptomatik	Schwere Symptomatik
Fieber	Intersitielle Pneumonie
Atypische Lymphozytose	Hepatitis
Leukopenie	Disseminierte Infektion
Myalgie	Retinitis
Arthralgie	Gastrointestinale Hämorrhagien und Ulzerationen

Tab.1: Darstellung der wichtigsten klinischen Zeichen einer symptomatischen hCMV-Infektion bei Transplantatempfängern.

1.2.7 Reaktivierung des latenten HCMV

Latenz ist definiert über die Unfähigkeit infektiöses Virus zu entdecken, trotz der Präsenz viraler DNA. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine fehlende Virusproduktion oder eine Blockade der Virusausbreitung durch das Immunsystem. Dabei würde im ersten Fall eine Reaktivierung durch eine Änderung im Transkriptionsprogramm verursacht werden, z.B. durch die Produktion von TNF- α und NF κ B nach allogener SCT, während nach der zweiten Theorie ein Versagen des Immunsystems die latente Phase beenden würde [Kurz S. et al., 1997]. Dabei konnten Tierexperimente nachweisen, dass eine hCMV-Reaktivierung allein durch immunsuppressive Therapien (Ganzkörperbestrahlung, Depletion von T-Zellen oder T-Zelluntergruppen (z.B. durch die Gabe von OKT-3), Verwendung zytotoxischer Medikamente wie Cyclophosphamid und Azathioprin) ausgelöst wird [Mayo D.R. et al., 1977;

Mayo D. et al., 1978; Bevan I.S. et al., 1996; Fishman J.A. & Rubin R.H., 1998; Polic B. et al., 1998].

Andererseits spielt auch eine allogene Stimulation durch bisher unbekannte Mechanismen [Dowling J.N. et al., 1977; Soderberg-Naucler C. et al., 1977; Schmader K.E. et al., 1992], sowie die Stimulation durch die Zytokine TNF- α , IFN- γ und zu einem geringeren Grad GCSF und IL-4 [Docke W.D. et al., 1994; Fietze E. et al., 1994; Hahn G. et al., 1998; Prösch S. et al., 1998] eine entscheidende Rolle bei der Reaktivierung des hCMV. So wird zum Beispiel durch die Bindung von TNF- α an den TNF- α Rezeptor 1 (p55) eine Signaltransduktionskaskade zur Aktivierung des eukaryotischen Transkriptionsfaktors NF κ B induziert. Das im Zellkern lokalisierte aktivierte NF κ B bindet im IE 1/2-Enhancer an ein Motiv mit Wiederholungsfolgen aus 18 bp und steigert die Transkriptionsaktivität des IE 1/2-Promoters [Prösch S. et al., 1995 & 1998]. Somit könnten therapeutisch Proteasomeninhibitoren die hCMV-Replikation während einer sehr frühen Phase der Virusreplikation blockieren.

1.2.8 HCMV-Therapie

Bisher wurden aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität einer hCMV-Erkrankung bei immundefizienten Patienten viele verschiedene Chemotherapeutika, u.a. Leukozyten-Interferon, Viderabin, Iododeoxyuridin, Fluorodeoxyuridin, Cytosin-Arabinosid und Adenin-Arabinosid erprobt. Sie zeigten jedoch nur einen geringen klinischen Nutzen und / oder eine hohe Toxizität [Plotkin S.A. et al., 1981; Ho M., 1982; Meyers J.D. et al., 1983; Alfred C.A., 1984; Chou S. et al., 1984].

Die Nukleobasenanaloga Ganciclovir (GCV) und Cidofovir (CDV), sowie der nichtnukleotidische Inhibitor Foscarnat (PFA) zeigen alle eine spezifische Wirkung gegen das hCMV. Das 2'-Desoxyguanosinanalogon Aciclovir (ACV, Zovirax[®]) (9- (2-hydroxyethoxy-methyl) guanine) ist zwar besser verträglich, aber schlechter wirksam gegen das hCMV: in vitro ca. um den Faktor 25 bis

100 [Wade J.C. et al., 1982; Balfour H.H. Jr. et al., 1989; Balfour H.H. Jr., 1990].

1.2.8.1 Ganciclovir

1.2.8.1.1 Wirkmechanismus

GCV (Cymeven[®]), 2-Amino-9- [2-hydroxy-1 (hydroxymethyl) ethoxymethyl] 9H-purin-6 (1H) -on, ist ein 2'-Desoxyguanosinanalogen, welches seine antivirale Aktivität erst durch die Phosphorylierung zum aktiven GCV-Triphosphat (GCV-TP) erhält. Sowohl durch zelluläre Kinasen als auch über die virale Thymidinkinase, ein intrazelluläres early-late exprimiertes UL97 Genprodukt [Michel D. et al., 1996], erfolgt die Phosphorylierung zum Monophosphat (GCV-MP) [Littler E. et al., 1992; Sullivan V. et al., 1992]. Durch zelleigene Nucleotidylphosphotransferasen wird GCV-MP anschließend in das GCV-TP umgewandelt. Im Gegensatz zu Aciclovir wird GCV somit auch in den nicht-infizierten Zellen, insbesondere in Knochenmarkzellen, mäßig phosphoryliert und blockiert bei der Gabe höherer Konzentrationen als Triphosphat die menschliche DNA-Polymerase α [Estes J.E. & Huang E.S., 1977].

GCV-TP verdrängt schließlich dGTP kompetitiv von der DNA-Polymerase und wird stattdessen unter Abspaltung von Diphosphat in die virale DNA eingebaut. Durch das Fehlen des Kohlenstoffs in der 2'-Stellung im GCV-Molekül ist nach Einbau des GCV in die DNA aufgrund thermodynamischer Instabilität die für die Kettenverlängerung notwendige 3'-5'-Verknüpfung nicht mehr möglich, sodass es zum Kettenabbruch kommt. Der therapeutische Nutzen von GCV beruht auf:

- Eine hCMV-Infektion stimuliert den Stoffwechsel der virusproduzierenden Zellen, womit im Vergleich zu nichtinfizierten Zellen eine etwa 10fach stärkere Phosphorylierung resultiert [Biron K.K. et al., 1985].

- Hemmwirkung auf die hCMV-DNA-Polymerase schon bei niedrigen Konzentrationen, während die menschliche Polymerase erst mit höheren Dosierungen gehemmt wird.
- Ganciclovir wird langsamer von unspezifischen intrazellulären Phosphatasen abgebaut als Aciclovir.

1.2.8.1.2 Indikation und Dosierung

Antivirale Strategie	Definition	GCV-Dosierung
Prophylaxe	Anti-hCMV-Therapie bei allen allogenen HSCT-Empfängern während der Zeit des Engraftments	Prophylaxe
Modifizierte Prophylaxe - Risikoadaptiert	Anti-hCMV-Therapie bei Hochrisikopatienten (Steroidgabe bei GVHD, T-Zelldepletion)	5 mg/kg i.v. bid oder orale Gabe (1.000 mg 3x/d)
Präemptiv - Risikobasierend	Anti-hCMV-Therapie bei positiver hCMV-PCR (nachgewiesene hCMV Reaktivierung im Blut)	5 mg/kg i.v. bid für 1-2 Wochen, nachfolgend 5 mg/kg/d 5-6 Tage/Woche für 2-5 Wochen
Therapie	Gastroenterologische Symptome, neurologische Symptome, interstitielle Pneumonie, Retinitis	10 mg/kg/d i.v. 3 Wochen bei Retinitis: anschließende Erhaltungstherapie 5 mg/kg/d i.v. oder 1.000 mg 3x/d p.o.

Tab.2: Gebrauch von Ganciclovir zur Verhütung einer hCMV-Erkrankungen nach hämatologischer SCT.

1.2.8.1.3 Arzneimittelnebenwirkung

Durch die geringe Selektivität werden auch nichtinfizierte, schnell proliferierende Gewebe geschädigt. Die daraus resultierende Myelotoxizität mit vorwiegend Neutro-, seltener Thrombopenie und bei langfristiger Verabreichung auch Anämie bei 30 % der Transplantatempfänger schränkt die prophylaktische Gabe nach PBSCT vor Eintreten des Engraftments ein [Boeckh M. et al., 1996; Salzberger B. et al., 1997]. In dieser Phase wird auf PFA ausgewichen, um einer hCMV-induzierten Myelosuppression [Tsinontides A.C. & Bechtel T.P., 1996] und / oder einer hCMV-Erkrankung entgegenzuwirken. Außerdem scheint GCV die spezifische CD⁸⁺ T-Zell-Antwort auf das hCMV zu verzögern [Li C.R. et al., 1994]. Li et al. erklären dies über eine direkte Wirkung des GCV auf die T-Zell-Proliferation oder indirekt über den Einfluß des GCV auf die effektive hCMV-Replikation.

1.2.8.1.4 Ganciclovirresistenz durch Mutation in der UL97-Region

Längere Anwendung von GCV, eine hohe Viruslast bei suboptimalen Konzentrationen antiviraler Therapie und eine schwere Immunsuppression prädisponieren zur Entstehung resistenter Virusstämme [Emery V.C. & Griths P.D., 2000; Limaye A.P. et al., 2000].

Sowohl Mutationen im UL97-Gen als auch im UL54-Gen können eine GCV-Resistenz verursachen, wenngleich UL97-Mutationen weitaus häufiger als Ursache einer GCV-Resistenz genannt werden (>90 %) (siehe Abb.2). Bisher wurden lediglich 7 Fälle einer GCV-Resistenz nach pädiatrischer SCT publiziert [Wolf D.G. et al., 1998; Prix L. et al., 1999; Eckle T., 1999 & 2002].

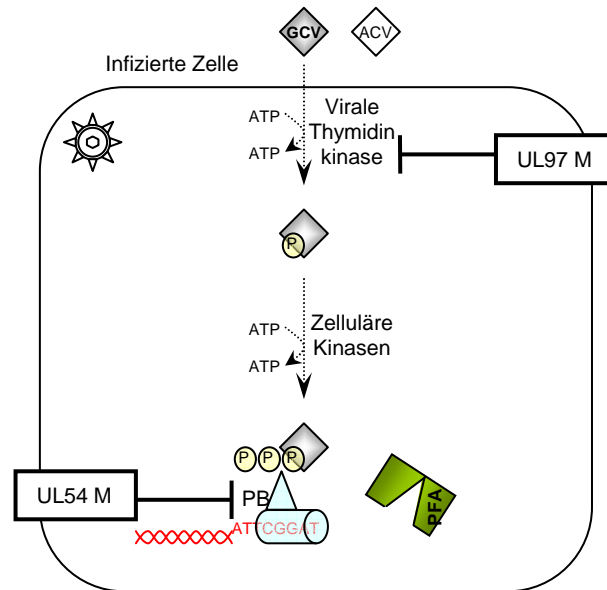


Abb.2: **Metabolismus von GCV in hCMV-infizierten Zellen.** Das UL97-Genprodukt monophosphoryliert GCV. Das GCV-Triphosphat hemmt die hCMV-kodierte DNA-Polymerase und führt zum Kettenabbruch. UL97-Mutationen können die Einführung der Phosphorsäurereste verhindern und verleihen GCV-Resistenz. Mutationen in der viralen Polymerase verhindern entweder die Bindung von Triphosphatanaloga oder die Anknüpfung des Pyrophosphatanalogen PFA.

1.2.8.2 Foscarnet

1.2.8.2.1 Wirkmechanismus

PFA (Foscavir[®]), Trinatriumphosphonoformiat, hemmt reversibel und nicht-kompetitiv virale DNA-Polymerasen und teilweise reverse Transkriptasen, indem es mit der Bindungsstelle für Pyrophosphat (PB) interferiert [Huang E.S., 1975; Eriksson B. et al., 1982]. Zusätzlich ist PFA gegen andere Viren der Herpesgruppe und gegen HIV aktiv, wird jedoch wegen schwerer Arzneimittelnebenwirkungen nicht zugelassen. Die menschliche DNA-Polymerase α ist etwa um den Faktor 100 unempfindlicher als die Polymerasen der genannten Viren.

1.2.8.2.2 Indikation und Dosierung

PFA kann zur präemptiven Therapie mit 60 mg / kg i.v. bid als GCV-Ersatz verwendet werden [Ljungman P. et al., 1996]. Als Alternativpräparat bei klinischen Anzeichen einer GCV-Resistenz [Jacobson M.A., 1991b] oder

starken myelotoxischen UAW von GCV sollte es jedoch eher als Reservepräparat zurückgehalten werden. Alternativ kann auch GCV und PFA alternierend verabreicht werden [Bacigalupo A. et al., 1996a].

1.2.8.2.3 Arzneimittelnebenwirkung

Wie GCV wird auch PFA nahezu vollständig unverändert glomerulär und tubulär eliminiert. Dabei muss bei PFA aufgrund seiner Nephrotoxizität [Walmsley S.L. et al., 1988; Jacobson M.A. et al., 1988 & 1989; Aschan J. et al., 1992; Reusser P. et al., 1992; Bacigalupo A. et al., 1994] auf eine ausreichende Hydrierung geachtet werden [Deray G. et al., 1990a&b]. Weiterhin treten Elektrolyt-entgleisungen, vor allem eine transiente Hypokalzämie bei unverändertem Gesamtserumkalziumspiegeln, auf [Youle M.S. et al., 1988; Jacobson M.A. et al., 1991b]. Weiterhin ist eine Therapie mit PFA assoziiert mit Penisulzera [Gilquin J. et al., 1990; Van der Pijl J.W. et al., 1990], kongestiven Herzschäden und gastrointestinalen Blutungen.

1.2.8.2.4 Virostatikaresistenz durch Mutation in der UL54-Region

CDV und PFA werden im Gegensatz zu GCV UL97 unabhängig aktiviert. Resistenzen entstehen somit immer durch Mutationen im viralen DNA-Polymerase Gen, welche jedoch auch GCV-Resistenzen verursachen können (siehe Abb.2).

1.2.8.3 Cidofovir

1.2.8.3.1 Wirkmechanismus

CDV (Vistide®), (S)- [2- (4 Amino-1,2-di-hydro-2-oxo-pyrimidin-1-yl)-1-(hydroxymethyl) ethoxy]-methylphosphorsäure, ist als Analogon zu Cytidinmonophosphat vermutlich als Diphosphat [Xiong X. et al., 1997] aktiv gegen HSV-1, HSV-2, TK-negative HSV-1, VZV, hCMV, EBV, HCV, ADV und humanes

Papillomavirus. Es ist ungefähr 100 mal selektiver und potenter als Foscarnet gegenüber das hCMV [Arabia F.A. & Sacks S.L., 1996]. Die Metabolisierung zum aktiven Metaboliten ist virusunabhängig, weshalb CDV auch gegen GCV-resistente UL97-Mutanten eingesetzt werden kann. Der irreversible Einbau über die hCMV-Polymerase verlangsamt, beziehungsweise stoppt die Elongation im Replikationszyklus.

1.2.8.3.2 Indikation und Dosierung

Aufgrund der Nephrotoxizität bleibt CDV ein Medikament zweiter Wahl nach einer HSCT [Ljungman P. et al., 2001].

1.2.8.3.3 Arzneimittelnebenwirkung

Im Hinblick auf die Lebensqualität des Patienten machen die ausgedehnten Applikationsintervalle eine CDV-Therapie äußerst attraktiv. Demgegenüber schränkt die starke, irreversible Nephrotoxizität die Verwendung häufig ein [Jacobson M.A., 1997]. CDV wird unter ausreichender Hydrierung unter gleichzeitiger Gabe von Urikosurika verabreicht. Hierdurch wird die Aufnahme und Akkumulation in den proximalen Tubuluszellen der Niere vermindert. Eine zusätzliche Applikation von anderen nephrotoxischen Medikamenten ist nicht möglich.

1.2.9 Anti-hCMV-Immunglobulin

Trotz negativer hCMV-Kulturen aus Rachenspülwasser und anderen Körperflüssigkeiten überlebten in den Transplantationszentren von Seattle, Minnesota und Los Angeles lediglich 6 von 30 Patienten (20 %) mit hCMV-Pneumonie nach einer Behandlung mit Ganciclovir [Shepp D.H. et al., 1986; Erice A. et al., 1987; Winston D.J. et al., 1988 & 1989]. Eine Kombination des antiinflammatorischen Effekts einer Hochdosiskortisoltherapie und des antiviralen Effekts von Ganciclovir zeigten keine Prognoseverbesserung (1/6 Überleben) [Reed

E.C. et al., 1986]. Studien über Viderabin (Adeninarabinosid), humanes Leukozyten-Interferon, Aciclovir, rekombinantes Leukozyteninterferon, Lymphoblastoid-Interferon, Foscarnet oder Kombinationen dieser Wirkstoffe fielen eher ungünstig aus [Winston P.J. et al., 1987].

Ein Therapieansatz mit hCMV-Immunglobulin, ein polyvalentes Immunglobulinpräparat aus Plasma von mindestens 1.000 Spendern, ergab als Einzeltherapie ebenfalls keine übereinstimmenden Ergebnisse: Während Griffiths et al. in London 9 von 18 Überlebende nach der Behandlung einer hCMV-Pneumonie verzeichneten [Griffiths P.D. et al., 1987], überlebten in Seattle bei Reed et al. lediglich 3 von 14 Patienten [Reed E.C. et al., 1988]. Dagegen zeigte eine Therapie mit hCMV-Immunglobulin (400 mg / kg / bid) bzw. intravenösem polyvalenten Immunglobulin mit darin enthaltenen hCMV-Antikörpern (500 mg / kg / bid) in Kombination mit GCV (7.5-10 mg / kg / d in 2 oder 3 getrennten Dosen) bei 7 Transplantationszentren ein Gesamtüberleben von 54 % (n = 76) [Bratanow N.C. et al., 1987; Aulitzky W.E. et al., 1988; Emanuel D. et al., 1988; Reed E.C. et al., 1988; Schmidt G.M. et al., 1988; Verdonck L.F. et al., 1989; Winston D.J. et al., 1991]. In 5 von 6 Studien schien auch eine prophylaktische Gabe den Schweregrad der hCMV-Infektion abzumildern und die Inzidenz einer hCMV-Pneumonie zu senken [Meyers J.D. et al., 1983; O'Reilly R.J. et al., 1983; Kubanek B. et al., 1985; Bowden R.A. et al., 1988; Winston D.J. et al., 1982 & 1987].

Dennoch gibt es bisher keine kontrollierten klinischen Studien über die alleinige intravenöse Gabe von hCMV-Immunglobulinen oder Ganciclovir bzw. deren Kombination zur Behandlung von hCMV-Erkrankungen nach einer SCT.

1.2.1.10 Interleukin-2

Das 15 bis 18 kD schwere, 153 AS (Chromosom 4q26-27) lange, natürliche Glykoprotein IL-2 (Proleukin[®]) wird von Thymozyten [Xin Z. et al., 1994], $\gamma\delta$ -T-Zellen [Tsukaguchi K. et al., 1995], B-Zellen [Kindler V. et al., 1995], Neuronen

[Shibuya A. et al., 1993] sowie CD⁴⁺ und CD⁸⁺ T-Zellen [Conlon K. et al., 1995] produziert. Die ersten 20 AS des Polypeptids stellen eine Signalsequenz dar, die zur Produktion des Reifungsfaktors abgespalten wird. Dieses Reifungsprotein enthält drei Cysteinreste, von welchen zwei über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind und dadurch biologisch aktiv werden [Smith K.A., 1984]. Die dreidimensionale Struktur konnte mittels Röntgenstrukturanalyse ermittelt werden und ergab ein Protein aus vier Bündel α -Helices ohne β -Faltblattstruktur [Brandhuber B.J. et al., 1987; Bazan J.F., 1992].

Drei verschiedene IL-2-Rezeptorkomplexe existieren: der singuläre IL-2R α (T_{ac} Antigen [= activated T-cell antigen]) bindet IL-2 mit niedriger Affinität ($K_a \sim 10^8 M^{-1}$) ohne signaltransduzierende Kapazität, der heterodimere IL-2R $\beta\gamma_c$ bindet IL-2 mit mittlerer Affinität ($K_a \sim 10^9 M^{-1}$) und transduziert intrazelluläre Signale (NK-Zellen [Voss S.D. et al., 1993; DiSanto J.P. et al., 1994], neutrophile Granulozyten [Djeu J.Y. et al., 1993; Liu J.H. et al., 1994], Monozyten [Espinoza-Delgado I. et al., 1995] und CD⁸⁺ T-Zellen [Vanham G. et al., 1994]) und der heterotrimere IL-2R $\alpha\beta\gamma_c$ bindet IL-2 mit hoher Affinität ($K_a \sim 10^{11} M^{-1}$) und signalisiert ebenfalls (aktivierte T-Zellen [Nakarai T. et al., 1994] und Monozyten [Espinoza-Delgado I. et al., 1995]) [Smith K.A., 1988; Minami Y. et al., 1993; Waldmann T. et al., 1998]. Folgende Zellen exprimieren entsprechende Rezeptorenketten:

α -Kette (CD25)	β -Kette (CD122)	γ_c -Kette
CD4+ & CD8+ T-Zellen	CD56+ NK-Zellen	Monozyten
Unreife Thymozyten	CD4+ & CD8+ T-Zellen	Neutrophile Granulozyten
Endothel	Ruhende NK-Zellen	Thymozyten
Embryonale Fibroblasten		CD4+ und CD8+ T-Zellen
Glioblastom (Oligodendroglia)-Zellen		NK-Zellen
Aktivierte Monozyten		B-Zellen
Kupffer-Zellen		
Makrophagen & Langerhans-Zellen		
Versch. Tumorzellen		

Tab.3: Exprimierende Zelllinien der entsprechenden Interleukin-2-Rezeptorketten.

Zusammen mit IFN- γ und TNF- β wird IL-2 vor allem von CD⁴⁺ TH1-Zellen (zelluläre Immunität) produziert und wirkt als autokriner und parakriner Wachstumsfaktor [Abbas A.K. et al., 1996; Keller R., 1994]. So wird die Proliferation von T-Zellen begünstigt und eine Sensibilisierung für andere Zytokine, die deren funktionelle Differenzierung bewirken, vermittelt [Mossmann T.R. & Coffman R.L., 1989].

IL-2 stimuliert auch das Wachstum von NK-Zellen [Robertson M.J. und Ritz J., 1990] und erhöht ihre zytotoxische Fähigkeit, wodurch sogenannte Lymphokin-aktivierte Killer-(LAK-)Zellen entstehen [Grimm E.A. et al., 1982]. In klinischen Studien zeigt IL-2 durch eine Stimulierung der Proliferation und Aktivität von Tumorangreifenden LAK- und TIL- (tumor-infiltrating lymphocytes) Zellen eine signifikante Antitumoraktivität [Rosenberg S.A., 1987 & 1988; Yang S.C. et al., 1991; Keller R., 1994; Olekowicz L. et al., 1994]. Arzneimittelnebenwirkungen sind dabei vor allem Übelkeit, Erbrechen, Gewichtszunahme, Flüssigkeitsretention, Leber-, Lungen-, Nerven- und Nierenschäden. Subkutane Gaben vermindern das Auftreten von Nebenwirkungen.

Klinisch deutet ein erhöhter Spiegel an ausgeschiedenem IL-2R α im Serum auf eine starke antigene Stimulation, z.B. die akute Abstoßung eines transplantierten Organs, hin [Kirkman R.A. et al., 1985].

1.2.1.11 Interleukin-15

IL-15 ist 14 bis 15 kDA schwer und besteht aus einem 162 AS (Chromosom 4q31) enthaltenden Vorläuferprotein, woraus nach Abspaltung von 48 AS das reife Zytokin entsteht. Es wird von vielen Geweben (Plazenta, Thymus, Skelettmuskel, Niere, Lunge, Herz, Haut, Retina [Grabstein K.H. et al., 1994]) und zahlreichen Zelllinien (Monozyten / Makrophagen [Carson W.E. et al., 1995; Doherty T.M. et al., 1996], Dendritischen Zellen [Blauvelt A. et al., 1996; Jonuleit H. et al., 1997], Knochenmarkstroma [Mrozek E. et al., 1996], T-Zellen [Azimi N. et al., 1998], Astrozyten und Mikroglia [Lee Y.B. et al., 1996])

produziert. Entsprechend der Sekundärstruktur von IL-2, -3, -4, -5, -6, -7 und -9 zählt auch IL-15 zu der Zytokinfamilie mit vier α -Helix-Bündeln [Bamford R.N. et al., 1994; Bazan J.F., 1990].

Frühe Experimente belegten die Beteiligung des IL-2R $\beta\gamma_c$, nicht jedoch von IL-2R α , in der Bindung und Funktion von IL-15 und wiesen auf die Anwesenheit einer zusätzlichen Untereinheit für die hochaffine IL-15 Bindung an den IL-15R-Komplex hin [Bamford R.N. et al., 1994; Carson W.E. et al., 1994; Giri J.G. et al., 1994 & 1995]. Diese IL-15R α -Untereinheit, die bereits in einer Vielzahl von Geweben und Zelllinien (u.a. NK-Zellen) detektiert werden konnte [Anderson D.M. et al., 1995], besitzt eine hochaffine Bindungskapazität für IL-15 ($K_a \sim 10^{11} \text{ M}^{-1}$). Ähnlich wie der IL-2R α spielt sie jedoch keine Rolle in der Signaltransduktion, welche lediglich in Anwesenheit des IL-2/15R $\beta\gamma_c$ stattfindet. Analog mit IL-2 bindet und signalisiert IL-15 in Abwesenheit von IL-15R α über den heterodimeren IL-2/15R γ_c mit mittlerer Affinität ($K_a \sim 10^9 \text{ M}^{-1}$).

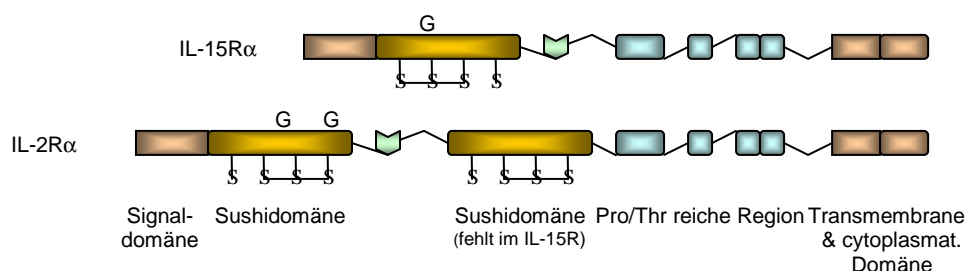


Abb.3: **Struktureller Vergleich zwischen IL-15R α und IL-2R α .** G = N-terminale Glycosilierungsstelle; S = Disulfidbrücken

IL-15 stimuliert die Differenzierung und das Wachstum von NK-Zellen. Durch Umwandlung in LAK-Zellen steigert es die Zytotoxizität der NK-Zellen, aktiviert T-Lymphozyten des peripheren Blutes [Grabstein K. et al., 1994; Giri J.G. et al., 1994 & 1995; Wilkinson P. & Liew F., 1995], TIL [Lewko W.M. et al., 1995] und B-Lymphozyten [Armitage R.J. et al., 1995]. Aufgrund seiner IL-2-ähnlichen biologischen Aktivität müsste IL-15 ein vergleichbares therapeutisches Potential besitzen.

1.3 NK-Zellen

1.3.1 Historischer Hintergrund

NK-Zellen (Natürliche Killerzellen) wurden in den 70er Jahren neben den B- und T-Lymphozyten als dritte eigenständige Lymphozytenpopulation (LGL= large granular lymphocytes) erkannt [Herbermann R.B. et al., 1975; Kiessling R. et al., 1975].

Der Anteil dieser CD^{3-} , CD^{16+} , CD^{56+} , CD^{94+} Zellen an den Lymphozyten des peripheren Blutes liegt bei bis zu 15 % [Trinchieri G., 1989]. Außerdem finden sie sich in soliden Geweben wie der Leber, dem Peritonealraum und der Plazenta. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem der B- und T-Lymphozyten zeigen sie weder ein Rearrangement noch eine Genexpression von Immunglobulinen oder T-Zellrezeptoren und können ohne vorherige Aktivierung oder Immunisierung ihre Effektorfunktion ausführen („first-line-defense“).

Die inhärente zytotoxische Aktivität der NK-Zellen wird durch die Bindung ihrer MHC-Klasse-1-Rezeptoren an den MHC-Klasse-1-Komplex und dem darin präsentierten Signalpeptid anderer Zellen inhibiert („Express yourself or die!“ [Kärre K., 1985]). Während also CTL alterierte Zellen attackieren, die Fremdantigene oder Neoantigene exprimieren und sich durch ihr MHC-Klasse-1-Oberflächenmuster als eigen ausweisen, übernehmen NK-Zellen diejenigen Zellen, die immunologisch unkenntlich geworden sind und ihr MHC-Klasse-1-Erkennungsmuster verloren haben (Tumorzellen) oder diese unter dem Einfluß von Viren reduziert bzw. verändert haben („Missing Self“ [Kärre K., 1985; Ljunggren H.G. & Kärre K., 1990; Parham P., 1997]).

1.3.2 KIR und LIR

Humane NK-Zellen exprimieren zwei unterschiedliche Strukturfamilien an MHC-Klasse-1-Rezeptoren: Killerzell-Immunglobulinähnliche Rezeptoren (KIR / killer-cell inhibitory receptors) und Lektinähnliche Rezeptoren (LIR). Die KIR gehören zur Immunglobulin-Superfamilie und werden durch ein Rearrangement von 14 polymorphen Genen des Leukozyten-Rezeptor-Komplexes auf Chromosom 19q13.4 kodiert [Suto Y. et al., 1998; Wilson M.J. et al., 2000]. Man teilt sie nach der Anzahl ihrer extrazellulären Ig-Domänen in KIR2D (CD158) oder KIR3D (p70 aufgrund des Molekulargewichts) ein [Long E.O. et al., 1996; Andre P. et al., 2001]. Auf der Basis der zytoplasmatischen Kette werden sie außerdem in lange (long) KIR-Ketten mit inhibitorischer Funktion und kurzen (short) KIR-Ketten mit aktivierender Funktion eingeteilt.

Die langkettigen KIR besitzen im intrazytoplasmatischen Teil ein bis zwei sogenannte Immunrezeptor tyrosinreiche inhibitorische Motive (ITIM), welche SH2-enhaltende Tyrosin-Phosphatasen triggern, die wiederum die intrazelluläre Weiterleitung der Signale aus den aktivierenden Rezeptoren blockieren.

Dagegen assoziieren kurzkettige KIR mittels einer positiv geladenen AS (Arginin oder Lysin) mit DAP12 oder auch ‚killer cell activating receptor-associated protein‘ (KARAP), welches sog. Immunrezeptor tyrosinreiche aktivierende Motive (ITAM) enthält, die über die Protein-Tyrosin-Kinasen Syk und ZAP-70 aktivierende Signale transduzieren [Lanier L.L. et al., 1998].

Die LIR werden durch 6 Gene des NK-Genkomplex auf Chromosom 12p12.3-p13 kodiert und als Heterodimere (CD94:NKG2x) oder Momodimere (NKG2D:NKG2D) exprimiert. Dabei besitzt lediglich NKG2A ein ITIM und transduziert inhibitorische Signale, während die übrigen mit dem über ITAM aktivierenden Signalmolekül DAP10 und DAP12 assoziiert sind.

Rezeptor	Signaladapter	Signalalkaskade	Ligand
CD16	FcεRIγ/CD3ζ-ITAM	ZAP70/Syk	IgG
NKp30	FcεRIγ/CD3ζ-ITAM	ZAP70/Syk	?
NKp46	FcεRIγ/CD3ζ-ITAM	ZAP70/Syk	Influenza haemagglutinin, ?
KIR2DS	DAP12-ITAM	ZAP70/Syk	HLA-C, ?
CD94/NKG2C	DAP12-ITAM	ZAP70/Syk	HLA-E
NKp44	DAP12-ITAM	ZAP70/Syk	Influenza haemagglutinin, ?
NKG2D	DAP10-YxxM	PI3K	MIC, ULBP
CD244	SAP	?	CD48

Tab.4: **Aktivierende NK-Zell-Rezeptorkomplexe.** Erläuterung von repräsentativen NK-Zell- Rezeptorkomplexen: CD16 assoziiert mit dem FcεRIγ Adapterprotein, KIR2DS assoziiert mit dem DAP12 Adapterprotein, NKG2D assoziiert mit dem DAP10 Adapterprotein. Daraufhin werden die Immunrezeptor tyrosinreichen aktivierenden Motive (ITAMs) in FcεRIγ und DAP12 bzw. die Phosphatidyinositol 3-Kinase (PI3K) bindenden Motive(YxxM) in DAP10 induziert. Über die Proteinkinasen ZAP70 oder Syk bzw. PI3K erfolgt eine Aktivierung der NK-Zelle zur Targetzellyse.

Rezeptor	Signaladapter	Signalalkaskade	Ligand
KIR2DL	ITIM	SHP-1	HLA-C, HLA-G
KIR3DL	ITIM	SHP-1	HLA-Bw4, HLA-A
CD94/NKG2A(CD159a)	ITIM	SHP-1	HLA-E
CD85j, CD85d	ITIM	SHP-1	HLA-Klasse I

Tab.5: **Inhibierende NK-Zell-Rezeptorkomplexe.** Inhibitorische Rezeptoren besitzen ein Immunrezeptor tyrosinreiches inhibitorisches Motiv (ITIM) in ihrer zytoplasmatischen Domäne, welche die intrazytoplasmatischen Phosphatasen SHP-1 und / oder SHP-2 rekrutieren. CD94/NKG2A (CD159a)-Rezeptoren binden an begrenzte MHC-Klasse-1-Liganden, während CD85j mit einer Region in der α3-Domäne des MHC-Klasse-1-Rezeptorkomplexes reagiert. KIR = Killer cell immunoglobulin-like receptors.

1.3.3 NK-Zell-Regulation

NK-Zellen scheinen keinen multipotenten Rezeptor zur positiven Identifizierung ihrer Targetzellen zu besitzen. Das Grundprinzip der NK-Zell-Regulation beruht eher auf einem dynamischen Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen, wobei die Stärke der jeweiligen Signale darüber entscheidet, ob Aktivierung oder Inhibition erfolgt.

Rezeptoren für Zytokine (IL2-R, IL12-R, IL15-R), Adhäsionsmoleküle (CD⁵⁶⁺/NCAM, CD⁵⁴⁺/ICAM-1, CD⁵⁸⁺/LFA-3) und Aktivierungsmoleküle (CD²⁺, CD¹⁶⁺, CD²⁵⁺, CD⁶⁹⁺) sind an der Feinregulierung der NK-Zellaktivität beteiligt.

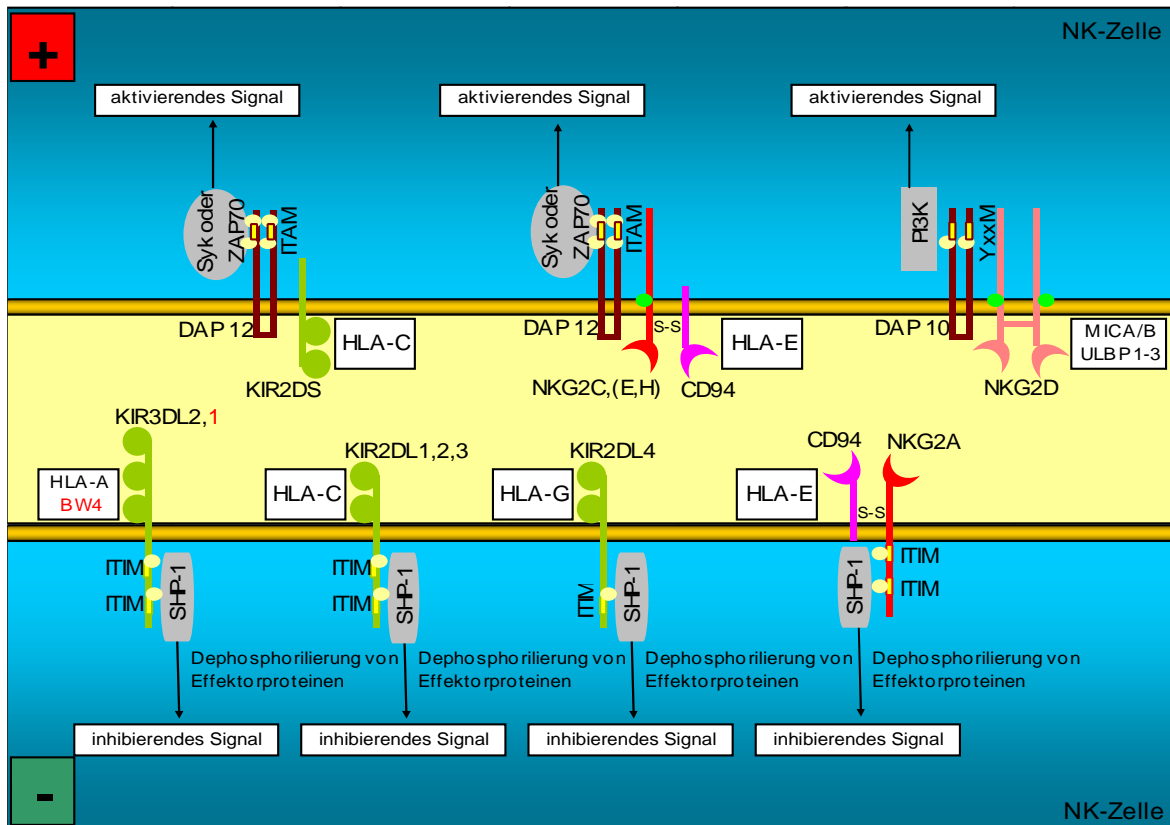


Abb.4: Natürliche Killerzellen werden durch ein Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Signalen reguliert. Diese Signale werden durch aktivierende (Killer-cell Ig-like-receptor (KIR): HLA-C und Lectin-like-receptors (LIR): HLA-E, MICA/B, ULBP1-3) und inhibierende (KIRs: HLA-A/-B/-C/-G und LIR: HLA-E) Transmembranrezeptoren vermittelt. Ihre strukturellen Unterschiede in der extrazellulären Region sind den verschiedenen MHC-Klasse-1-Spezifitäten angepasst, während die Unterschiede der zytosmatischen Rezeptorketten auf der Regulierung von inhibitorischen (-) und aktivierenden (+) Signalkaskaden beruhen.

1.3.4 Zytolytische Mechanismen von NK-Zellen

NK-Zellen haben verschiedene zytolytische Mechanismen. Expressieren Targetzellen sogenannte Apoptoserezeptoren, wie z.B. das CD⁹⁵⁺-Antigen Fas/APO-1, so wird bei Bindung an den spezifischen Fas-Liganden eine intrazelluläre Signalsequenz induziert, die über eine Kaskade von Caspasen den intrazellulären Zelltod induziert [Nagata S., 1996].

Der häufigste Mechanismus der Zellyse durch NK-Zellen ist jedoch die Freisetzung lytischer Granula. Diese enthalten Perforin, ein in der Membran der Wirtszelle porenbildendes Protein, und Granzyme [Smyth M.J. & Trapani J.A., 1995], welche über Perforinporen in die Wirtszelle eindringen und mittels

Caspasenaktivierung den programmierten Zelltod einleiten. Ein dritter, eher untergeordneter Weg der Zytolyse wird über die Freisetzung von löslichem Lymphotoxin LT- α (TNF- β) vermittelt. Auch hierbei wird durch Bindung von Lymphotoxin an TNF-Rezeptoren der Targetzelle die Apoptose eingeleitet. Ferner besitzen NK-Zellen den CD¹⁶⁺-Rezeptor, der dem niedrigaffinen IgG-Rezeptor F γ RIII entspricht, und ihnen neben der natürlichen auch die Fähigkeit der antikörperabhängigen Zytotoxizität verleiht (ADCC = Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity).

1.3.5 NK-Zell Rekonstitution nach hSCT

Während T-Zellen nach einer SCT erst nach bis zu einem Jahr vollständig regenerieren, verläuft die Erholung der NK-Zellen, die bereits am Tag 30 nach der SCT einen ausgeprägten Anstieg aufweisen, vielfach schneller [Janossy G. et al., 1986; Atkinson K., 1990; Lamb L.S. et al., 1998; Small T.N. et al., 1999; Eyrich M. et al., 2001]. Diese frühen NK-Zellen spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des Engraftments und des GvL-Effekts, ohne jedoch eine GvHD zu verursachen [Ruggeri L. et al., 1999]. Somit sind NK-Zellen erstklassige Kandidaten für eine Immuntherapie nach einer SCT.

1.4 Fragestellung

Obwohl nach einer allogenen SCT eine T-Zell-Lücke besteht, zeigte sich in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen eine relativ niedrige Inzidenz an letalen hCMV-Infektionen nach einer hSCT (8%). Aufgrund der schnellen Regeneration der NK-Zellen nach der HSCT stellte sich daher die Frage nach der lytischen Aktivität von NK-Zellen gegenüber hCMV-infizierten Zellen. Dabei wollten wir neben Referenzlaborstämmen auch Wildtyp-hCMV-Stämme testen, um die Faktoren zu ermitteln, welche den Grad der Lyse bestimmen (ADCC, HLA-Oberflächenexpression und Adhäsionsmoleküle).

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Adhaerente Zelllinien

- A) **HFF** (human foreskin fibroblasts) (HLA-A03A03, HLA-B07B07)
Primäre humane Fibroblasten, verwendet zwischen der Passage 10 - 30, die aus Biopsiegewebe nach einer Zirkumzision in der Abteilung für Kinderchirurgie der Universität Tübingen gewonnen wurden und sich in Eagles Minimum Essential Medium kultivieren lassen. Die Fibroblasten wachsen adhaerent und als einschichtiger Zellrasen (Monolayer) in Kulturflaschen oder Glasröhrchen. Zur Routine-Virusanzucht stellen sie nach wie vor das einzige gut permissive Zellkultursystem für primäre klinische Isolate dar.
- B) **MRC-5** (human embryonic lung fibroblasts) *(Bio-Whittaker)*
- C) **MRHF** (human newborn foreskin fibroblasts) *(Bio-Whittaker)*

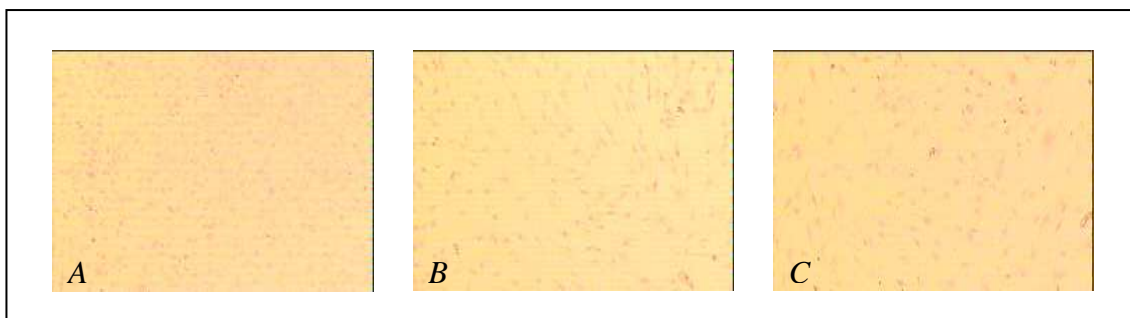


Abb.1: **Phänotyp permanenter fibroblastischer Zelllinien** (H.E. gefärbt, 10fache Vergrößerung). A) HFF (human foreskin fibroblasts), B) MRC-5, C) MRHF.

2.1.2 Non-adhaerente Zelllinien

- D) **K- 562** (human chronic myeloid leukemia in blast crisis) *(DSMZ)*
HLA-negative NK sensitive Zelllinie.

Gilt als Prototyp für Zytotoxizitätsassays.

E)

MHH-CALL-4

(human acute B-cell precursor leukemia)

(DSMZ)

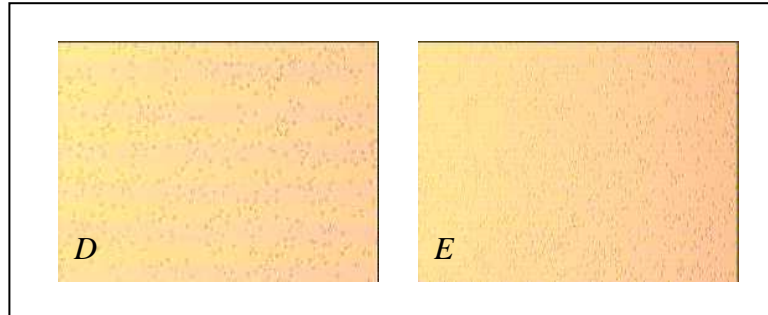


Abb. 2: **Phänotyp permanenter Tumorzelllinien** (H.E. gefärbt, 10 fache Vergrößerung). D) K-562, E) MHH-CALL-4.

2.2 Viren

2.2.1 Laborstamm AD-169

Dieser Fibroblastenadaptierte Laborstamm wurde 1956 in Bethesda von Rowe et al. mittels **Adenoidkulturen** tonsillektomierter Kinder zufällig isoliert und unabhängig davon 1956 in St. Louis von Smith et al. aus der Glandula submandibularis eines 7 Monate alten Kindes mit AdenoCA, sowie der Niere eines 1 Monate alten Kindes mit CID („Cytomegalic Inclusion Disease“) extrahiert [Rowe W.P. et al., 1956, Smith M.G. et al., 1956].

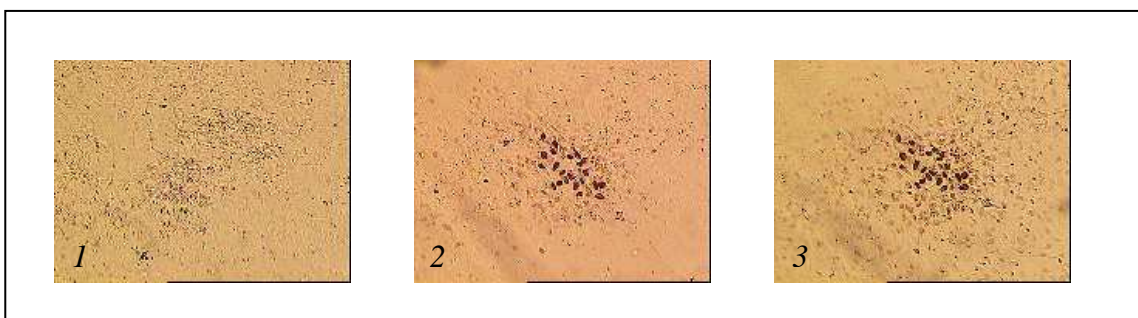


Abb.2: **Zytopathischer Effekt (CPE) von AD-169-infizierten HFF**: Traubenförmige, polymorphzellige Zelldegeneration. (1 nativ, 2 IEA-Kernfärbung, 3 IEA-Kern- und H.E.-Gegenfärbung) [10fache Vergrößerung].

2.2.2 HCMV aus biologischen Materialien

2.2.2.1 WT-MR (hCMV Wildtypstamm multiresistent)

HCMV-Wildtypstamm eines 11 jährigen Jungen mit AML aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen. Der Patient entwickelte eine hCMV-Encephalitis und erhielt 174 Tage kumulativ Ganciclovir als Therapie. Das Viruslysate wurde am Tag 251 nach PBSCT (28.12.2003) vom Urin des Patienten isoliert. Kasuistik des Patienten siehe Anhang.

	UL ⁹⁷ – Mutation	UL ⁵⁴ – Mutation
Aminosäure – Substitution	A 591 V	
Basensubstitution (Wildtyp / Mutante)	C / T	
Schnittstellen	Verlust	
Amplifikat (nested PCR)	Fragmente 108 / 81 beim Wildtyp	
Fragmente Mutante (bp)	189	
Codon (Wildtyp)	590 / 591 GCG GCC	
Restriktionsnuklease	Hae III Nuklease	
Erkennungssequenz	GG'CC	
ID ₅₀	GCV 29µm	PFA 551µm CDV 6,4µm

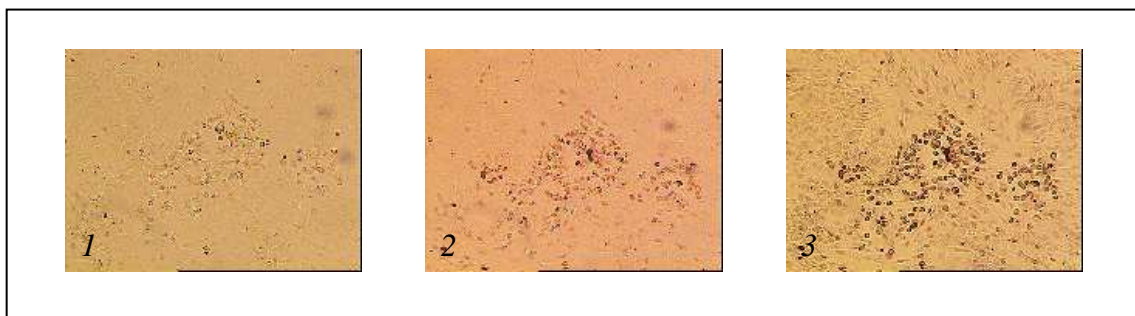


Abb.4: **Zytopathischer Effekt (CPE) von WT-MR-infizierten HFF:** Traubenförmige, polymorphzellige Zelldegeneration. (1 nativ; 2 IEA-Kernfärbung; 3 IEA-Kern- und H.E.-Gegenfärbung) [10fache Vergrößerung].

2.2.2.2 WT-GCVR1 (hCMV Wildtypstamm Ganciclovirresistent)

HCMV-Wildtypstamm eines 7 jährigen Jungen mit angeborenem T-Zelldefekt, Wachstumsretardierung und Agammaglobulinämie unbekannter Genese seit 1995. Der Patient aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen litt unter rezidivierenden hCMV-Infektionen und erhielt 103 Tage kumulativ Ganciclovir als Therapie. Das Viruslysate wurde am Tag 54 nach PBSCT (09.10.1997) vom Urin des Patienten isoliert. Kasuistik des Patienten siehe Anhang.

UL ⁹⁷ – Mutation	
Aminosäure – Substitution	C 603 W
Basensubstitution (Wildtyp / Mutante)	C / G
Schnittstellen	Gewinn
Amplifikat (nested PCR)	Fragmente 104 / 69 / 16 bei der Mutation
Fragmente Wildtyp (bp)	189
Codon (Wildtyp)	603 / 604 TGC TCC
Restriktionsnuklease	Ava II
Erkennungssequenz	G'GWCC
ID ₅₀	GCV 13µm

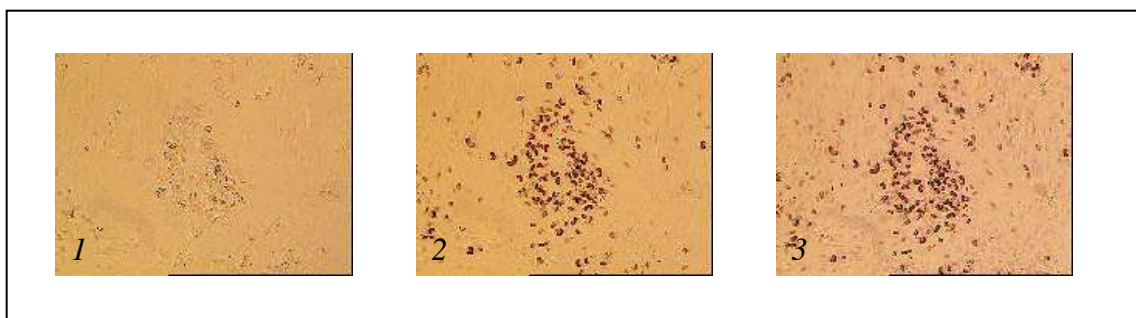


Abb.5: **Zytopathischer Effekt (CPE) von WT-GCVR-infizierten HFF:** Traubenförmige, polymorphzellige Zelldegeneration. (1 nativ; 2 IEA-Kernfärbung; 3 IEA-Kern- und H.E.-Gegenfärbung) [10fache Vergrößerung].

2.2.2.3 WT-GCVR2 (Isolat 3)

UL ⁹⁷ – Mutation	
Aminosäure – Substitution	C 603 W
ID ₅₀	GCV 20,1 µm PFA 153,5 µm CDV 0,7 µm

2.2.2.4 WT-GCVR3 (Isolat 6)

UL ⁹⁷ – Mutation	
Aminosäure – Substitution	L 595 S
ID ₅₀	GCV 16,6 µm PFA 177,9 µm CDV 0,75 µm

2.2.2.5 WT-GCVS1 (hCMV Wildtypstamm Ganciclovirsensitiv)

HCMV-Wildtypstamm, der am Tag 91 post partum (12.02.2001) aus Muttermilch isoliert wurde. Die Muttermilch aus der Abteilung Neonatologie der Universitätsfrauenklinik Tübingen wurde im Rahmen des seit 1995 laufenden Projekts ‚hCMV-Transmission durch Muttermilch bei Frühgeborenen‘ (MM-Studie) zum frühestmöglichen Zeitpunkt post partum auf DNA-laktie, RNA-laktie und Virolaktie in den beiden separierten Milchfraktionen gescreent und bei Bedarf in größeren Volumina angefordert. Nach erfolgter Transmission konnte das Virus am Tag 66 post partum auch im Urin des Reifgeborenen detektiert werden.

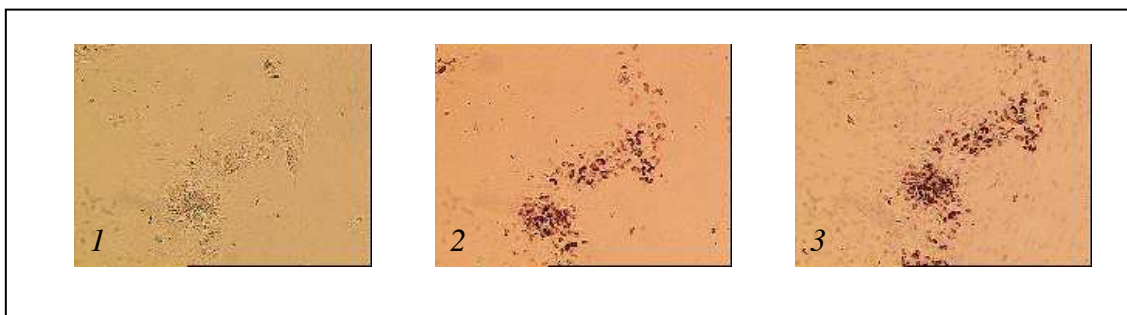


Abb.6: **Zytopathischer Effekt (CPE) von WT-GCVS1-infizierten HFF:** Diffuse polymorphzellige Zelldegeneration (1 nativ; 2 IEA-Kernfärbung; 3 IEA-Kern- und H.E.-Gegenfärbung) [10fache Vergrößerung].

2.2.2.6 WT-GCVS2

HCMV-Wildtypstamm, der am Tag 16 post partum (20.08.2003) aus Muttermilch der Abteilung Neonatologie der Universitätsfrauenklinik Tübingen isoliert wurde. Das zur 24+2 SSW Frühgeborene schied ab Tag 27 post partum im Urin das Virus aus.

2.3 Lösungen und Medien für die Zellkultur

Wachstumsmedium für adhaerente Zelllinien (**Basismedium 1**)

- Eagle Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen (*Gibco*)
- 10% (v/v) Fetales Kälberserum (FCS), komplementinaktiviert
(30' bei 56°C) (*Gibco*)
- 5 ml L-Glutamin (200 nm) (*PAA*)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) (*PAA*)

Wachstumsmedium für non-adhaerente Zelllinien (**Basismedium 2**)

- VLE RPMI 1640 Medium (1 x) mit 2 g/l NaHCO₃ (*Biochrom AG*)
- 10% (v/v) komplementinaktiviertes FCS (*Gibco*)
- 5 ml L-Glutamin (200 nm) (*PAA*)
- 5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml) (*PAA*)
- Hepes Buffer (1M) (*Biochrom AG*)

Dulbecco's Phosphat gepufferte Saline (**PBS**) ohne Ca²⁺ & Mg²⁺ (*PAA*)

Trypsin/EDTA-Lösung (*PAA*)

Trypanblau (0,4%) (*Sigma*)

(3,3'-[3,3-Dimethyl-4,4'-biphenylen-bis-azo]-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-naphthalindisulfonsäure)-tetranatriumsalz)

Einfrriermedium für hCMV-Isolate

- 13 ml Basismedium 1
- 2 ml Glycerin (-87%) (*MERCK*)
- 5 ml komplementinaktiviertes FCS (*Gibco*)

Einfrriermedium für Fibroblasten

- 16,25 ml Basismedium 1
- 3,75 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) (M= 78,13 g/mol) (*AppliChem*)
- 5 ml komplementinaktiviertes FCS (*Gibco*)

Einfrriermedium für Suspensionszellen

- 50 ml humane Albumin-Lösung 5% Ba Wü (*DRK*)
- 20% (v/v) CryoSure-Dimethylsulfoxid (DMSO) (*WAK-CM*)

2.4 Reagentien für die Immunperoxidase-Färbung

- Methanol (MERCK)
- Primärer Antikörper
Anti-pp72 (immediate early, Exon 2) monoklonaler
IgG1k-Maus-Antikörper (Klon E₁₃) (720µg/ml) (ArgeneBiosoft)
- Sekundärer Antikörper
Meerrettich-Peroxidase konjugierter
Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (1,3g/l) (DAKO)
- AEC-Substratlösung
 - 1 Tbl. 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC) (A6926) (Sigma)
 - in 5 ml N, N-Dimethyl-formamid lösen (DMF) (MERCK)
 - AEC-Lösung vor Gebrauch 1:20 mit durch 100%iger
Essigsäure auf 0,1 M eingestellten (MERCK)
Natriumacetatpuffer (ph 4,9) verdünnen und (MERCK)
sterilfiltrieren (0,22 µm)
 - unmittelbar vor Gebrauch 0,1% H₂O₂ (30%)
(Perhydrol[®]) zugeben (MERCK)
- Mayers Hämaunlösung für die Mikroskopie 1:4 in
Pbs_{5%}FCS verdünnt (MERCK)

2.5 Ficoll-Separation

Biocoll Separating Solution (Dichte 1,077) (Biochrom AG)

2.6 Lösungen für die CD⁵⁶⁺-Zellseparation mittels MACS

Liquemin[®] Heparin-Natrium (La Roche)
 Polyglobulin[®] 5% (humanes Immunglobulin G) (Bayer Vital)
 CD⁵⁶⁺ MicroBeads (kolloidale super-paramagnetische MicroBeads
 konjugiert mit monoklonalen CD⁵⁶⁺ Antikörper (Isotyp IgG1) (Miltenyi Biotec)

MACS-Buffer

- 500 ml Pbs Dulbecco's
ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} und Sodumbicarbonat (Gibco™)
- 10 ml EDTA-Puffer 0,25Mol/l pH 8,0 aus der Apotheke der
Universitätsklinik Tübingen
- 10 ml humane Albumin-Lösung 5 Ba Wü (DRK)

2.7 LDH - Assay

Basismedium für LDH-Assay (**Basismedium 3**)

- RPMI 1640, ohne Phenolrot, mit L-Glutamin (PAA)
- 2% (v/v) bovines Serumalbumin (BSA)
sterilfiltriert (0,80 μm) (PAA)

Da BSA im Laufe der Zeit ausflockt, wurde vor jedem Test frisches Basismedium 3 hergestellt.

LDH-Substratmix

- 54 mM L^+ -Laktat ($M_r=90,08$) (Fluka)
- 0,66 mM Jodnitrotetrazoliumchlorid ($M_r=505,71$) (Fluka)
- 0,28 mM N-Methylphenazonium-methyl-sulfat ($M_r=306,34$) (Fluka)
- 1,3 mM $\text{NAD}^+ \times 3 \text{H}_2\text{O}$ ($M_r=663,34$) (Boehringer-Mannheim)
- 200 mM TRIS (hydroxymethyl)-Aminomethan
(mit 2N HCl auf pH 8,2 einstellen) ($M = 121,14 \text{ g/mol}$) (MERCK)

Triton® X-100 (luftsensitiv!) (Fluka)

HCl 1N (Roth)

2.8 Europium-Assay

Lymphokine

- IL-2 (Proleukin[®]) *(Chiron)*
- Rekombinantes humanes IL-15 *(R&D Systems)*
- Cytoglobin[®] 5 % *(Bayer Vital)*

1ml enthält: 50 mg Protein mit einem IgG-Anteil von mindestens 98 % und mindestens 100 IE

Antikörpern gegen Zytomegalieviren

(nach Referenzpräparat des Paul-Ehrlich-Institutes)

(Maximaler IgA-Gehalt: 0,21 mg/ml)

IgG ₁	IgG ₂	IgG ₃	IgG ₄
64,6%	28,6%	5,7%	1,1%

- DELFI[®]A BATDA-Ligand in Dimethylsulfoxid gelöst *(PerkinElmerTM Life Sciences)*
- DELFI[®]A Europium-Lösung (lichtsensitiv!) *(PerkinElmerTM Life Sciences)*
- Delfia[®] Lysis Buffer (0,03% Digitonin, 19% DMSO) *(PerkinElmerTM Life Sciences)*

2.9 Lösungen für die Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse

- FACS-FlowTM *(BD)*
- (Natrium- & Kaliumchlorid, Di-Natrium-EDTA, Natrium- & Kaliumphosphat)

2.9.1 Quantitative FACS - Analyse

Qifikit®

(DAKO)

Primärantikörper

Maus-Isotyp-Kontrolle IgG1

(Immunotech)

Anti-Human HLA Klasse I-Antigen (Klon W6/32) (Maus IgG_{2aκ})

(DAKO)

Anti-Human CD⁵⁴⁺ purified (LeuTM-54) (Klon LB-2) (Maus IgG_{2bκ})

(BD)

Anti-Human CD⁵⁸⁺ (Klon BRIC 5) (Maus IgG2a)

(Chemicon)

Anti-Human HLA-G (Klon MEM-G/9) (Maus IgG1)

(Acris)

Anti-Human HLA-E (Klon MEM-E/02) (Maus IgG1)

(Abcam)

NKG2D-Liganden mAB Set

(A. Steinle^{x1})

- MICA/B (BAMO-1 = IE9) (Maus IgG1)
- MICA (AMO-1 = IH12) (Maus IgG1)
- MICB (BMO-1 = VIG6) (Maus IgG1)
- ULBP1 (AUMO-1 = IC5) (Maus IgG1)
- ULBP2 (BUMO-1 = ID11) (Maus IgG1)
- ULBP3 (CUMO-1 = IE10) (Maus IgM)

^{x1}Abteilung für Immunologie, Institut für Zellbiologie,
Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Tübingen, Deutschland

Sekundärantikörper

FITC-konjugiertes F(ab')₂ Ziege gegen Maus

Immunglobulinfragment

(DAKO)

2.9.2 Intrazelluläre Färbung

FIX & PERM Zellpermeabilisationskit

(CALTAG)

Primärantikörper

Anti-pp72 (immediate early, Exon 2) monoklonaler

IgG1k-Maus-Antikörper (Klon E13) (720µg/ml)

(ArgeneBiosoft)

SekundärantikörperFITC-konjugiertes F(ab')₂ Ziege gegen

Maus Immunglobulinfragment (DAKO)

Mausserum sterilfiltriert (0,80 µm) (Sigma)

HLA-ABC-PE (Klon G46-2.6) (Maus IgG1κ) (BD)

Simultest™ Kontrollreagenz γ₁γ_{2a} (Maus IgG₁ FITC/IgG_{2a} PE) (BD)**2.9.3 MACS-Kontroll-FACS & MHC-Klasse-1-Kinetik**Anti-Human CD³⁺-FITC (Klon SK7) (MausIgG1κ) (BD)Anti-Human CD⁵⁶⁺-PE (Klon NCAM16.2) (MausIgG_{2b}κ) (BD)Simultest™ Kontrollreagenz γ₁γ_{2a} (Maus IgG₁ FITC/IgG_{2a} PE) (BD)**2.10 Verbrauchsmaterial**MACS Typ LS⁺ Separationssäule (Miltenyi Biotec)

FACS-Analyseröhrchen (5 ml Rundboden) (BD)

Sterile Plastikpipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml) (Costar)

Falcon®-Röhrchen (15 ml, 50 ml) (BD)

Cell-Strainer (BD)

384-Well-Mikrotiterplatten (Nunc™)

96-Well-Mikrotiterplatten steril (BD)

96-Well-Mikrotiterplatten (U-Form, F-Form) (Greiner)

Gewebekulturschalen 175 cm² (Nunc™)Gewebekulturschalen 25 & 75 cm² (BD)

Pipettenspitzen mit Filter (0,5-1000 µl) (Biozym)

Kryogefäße (2 ml) (Greiner)

Sterilfilter (0,22 µm, 0,45 µm, 0,80 µm) (Minisart®) (Sartorius)

Handschuhe (Safeskin)

Spritzen steril (1ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml) (Braun)

Butterfly 21 (Abbott)

Kanülen Sterican® (20G, 22G, 24G) (Braun)

2.11 Kleingeräte

Heizblock	Virologie	(Memmert)
	Kinderklinik	(Köttermann)
Vortex:	Heidolph Reax top	(Multimed)
	Vortex-Genie2	(Scientific Ind.)
	VF2	(Janke&Kunkel)
Ultraschallentgaser	Sonorex, Super RK 106	(Bandelin)
Sonifier	Cell Disrupter B-12	(BransonSP)
Sonoplus		(Bandelin)
VarioMACS		(Miltenyi Biotec)
Pipettiergerät	Pipettboy	(Tecnomara)
Lichtmikroskop	Standard 25	(Zeis)
Inversionsmikroskop	Axiovert 100	(Olympus)
Neubauer-Zählkammer		(Brandt)
Deckglas		(Menzel)
Eppendorf Research 300	Multikanalpipette	(Eppendorf)

2.12 Großgeräte

Sterile Werkbank	Hera safe	(Heräus)
Brutschrank: Non-adhaerente Zellen:	Hera cell	(Heräus)
Adhaerente Zellen (uninfiziert):	Inkubator C200	(Labotect)
Adhaerente Zellen (infiziert):	Inkubator C200	(Labotect)
Abzug		(Waldner)
Blutanalysegerät: Cellcounter	Advia® 120	(Bayer)
Zentrifuge: Rotixa 50 RS & Rotixa RP		(Hettich)
Megafuge 1.0 R		(Heräus)
Verstellbare Pipetten (Pipetman)		(Gilson)
Milenia Kinetic Analyzer (ELISA-Reader)		(DPC)
Victor 1420 Multilabel Counter		(PerkinElmer™ Life Sciences)

Software Wallac 1420 Workstation	(PerkinElmer TM Life Sciences)
Angeschlossene Hardware	(Compaq)
FACSCalibur	(BD)
Auswertungsprogramm CellQuest	(BD)
Angeschlossene Hardware	(Apple)
Elektronik Kamera Typ FAC 811-i 12V 3.5 VA	(Grundig)
Phaser® 740L Farblaserdrucker	(Tektronix®)
HP Laser Jet 1200	(HP®)

2.13 Blutprodukte von Patienten und Probanden

Peripheres Blut von gesunden Probanden und allogenen stammzelltransplantierten Patienten der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen.

Proband	KIR-Phänotyp	CMV-Serologie	CD ⁵⁶⁺	
			vor MACS	nach MACS
1	CD158b	neg	15,21%	83,74%
2	CD158b	neg	21,27%	97,70%
3	CD158a	neg	21,77%	97,83%
4	CD158ab	neg	38,19%	98,84%
5	CD158ab	neg	23,13%	99,59%
6	CD158ab	neg	37,02%	97,70%
7	CD158ab	neg	30,27%	96,01%
8	unbekannt	neg	14,23%	97,82%

Tab.8: **Gesunde Probanden für den non-adhaerenten Europium-release-Assay.**

Obwohl die Reinheit der Pbmnc (Tabelle 8) bzw. der CD⁵⁶⁺-Anreicherung mittels magnetischem Zellsortierer (MACS) (Tabelle 9) nicht 100 % NK-Zellen entspricht, kann eine T-Zell-Antwort des Tests aufgrund negativer hCMV-Serologie [keine Sensibilisierung] bzw. ungleichem MHC-Klasse-1-Status der HFF (A03 B07) mit dem Patientenblut [keine Bindung des T-Zellrezeptors] ausgeschlossen werden. Die Konditionierung der Patienten erfolgte parallel zu einer Bestrahlung mit insgesamt 12 Gy an 3 Tagen (TBI) über eine Kombination von Cyclophosphamid (C), Busulfex (B), Fluderabin (F), Leucovorin (L), Melphalan (M), Methotrexat (Mtx), Thiotepa (T) oder VP16 (V). BAL= Bronchoalveoläre Lavage.

Patient	Alter	Diagnose	Konditionierung	HLA-Status		Donor	CMV-Serologie	hCMV-Verlauf	Test am d nach TX	Pbmc: CD ⁵⁶⁺
				Akzeptor	Donor		Akzeptor	Donor		
Ap1/G2	22	Prä B-ALL	VT	A02/A03 B07/B18	A02/A03 B07/B18	aFS, nv	neg POS	POS	195/146	27,50%/33,60%
Ap2	12	Myelodysplast. Syndrom	BM	A02/A03 B08/B44	A02/A03 B08/B44	aFSin, nv	neg neg	neg	88	3,37%
Ap3	12	AML-M2	VF	A25/A26 B14/B35	A25/A68 B14/B53	Schwester	neg neg	neg	82	62,30%
Ap4	13	Aplastische Anämie	CF	A01/A24 B08/B15	A01/A24 B08/B15	aFS, nv	neg POS	POS	213	42,70%
Ah1/S1	11	Großz. Anapl. Lymphom	CLMtx	A24/A33 B07/B14	A24/A33 B07/B14	aFSin, nv	neg neg	neg	202	19,80%
Ah2	18	Non Hodgkin Lymphom	VF	A02/A23 B27/B44	A23/A02 B44/B18	Mutter	POS POS	POS	156	27,00%
Ah3	8	cALL-L2	VF	A02/A03 B07/B31	fehlt	Mutter	neg neg	neg	94	23,60%
Ah4	11	cALL-L2	VF	A01/A02 B08/B40	A02/A02 B40/B13	Vater	neg neg	neg	42	17,10%
Ah5	38	T-ALL	CF	A25/A30 B18/B39	A25/A03 B18/B07	Schwester	neg neg	neg	127	38,80%
Ah6	12	AML-M5b (monocytär)	C	A24/A02 B44/B40	A02/A24 B44	aFS, nv	POS POS	neg	143	50,70%
Ah7/G3/ M2	9	Prä T-ALL	VF	A01/A68 B14/B44	A01/A24 B44	Verwandter	neg neg	neg	102/116/199	34,20%/27,50% 12,20%
G1	12	Myelodysplast. Syndrom	CBM	A01/A26 B08/B27	A01/A26 B08/B27	aFS, nv	POS POS	BAL 1x POS	251	12,20%
M1/S2	7	AML (M4)	CBM	A03 B35	A03 B35	aFS, nv	POS	POS	93/97	39,90%/37,10%
L1	10	AML (M0)	CBM	A02/A24 B18/B3508	A02/A24 B18/B3508	Schwester	POS POS	POS	74	27,86%

Tab.7: Patienten der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen nach allogener Transplantation (TX) für den non-adhaerenten Europium-release-Assay. Erläuterung siehe Tab.8

3 Methoden

3.1 Zellkulturen

3.1.1 Züchtung und Passagierung von Suspensionskulturen

Die in flüssigem Stickstoff in Dampfphase gelagerten Zellen wurden, um der Entstehung von Eiskristallen vorzubeugen, in einem 37 °C warmen Wasserbad unter Schütteln möglichst schnell aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml 37 °C warmen Basismedium 2 aufgenommen und zur Entfernung des DMSO zweimal gewaschen (400 g, 10 min, 37 °C, 208 r / mm, Beschleunigung und Bremse 9). Nach Bestimmung der lebenden Zellen mittels Neubauer-Zählkammer wurden diese zur Kultivierung in den üblichen Dichten (K-562: 0,1-0,5 · 10⁶ Zellen / ml; MHH-CALL-4: 1 · 10⁶ Zellen / ml) in 25 cm² Zellkulturflaschen ausgesät.

Die Zelllinien wurden bei 37 °C in wassergesättigter Atmosphäre (90 % Luftfeuchtigkeit) mit einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Eine Subkultivierung erfolgte, wenn der Farbindikator im Zellkulturmedium durch einen Farbumschlag eine Anreicherung des Mediums mit sauren Stoffwechselprodukten der Zellen anzeigte, jedoch die für die entsprechende Zelllinie optimale Zelldichte (K-562: 1 · 10⁶ Zellen/ml nach 2-3 Tagen; MHH-CALL-4: 2 · 10⁶ Zellen / ml nach einer Woche) noch nicht überschritten wurde. Dazu wurden die Zellen alle 1 bis 2 Tage mikroskopisch beurteilt. Bei einem Überschreiten der zelltypspezifischen optimalen Dichte fand eine Teilung der Zellen im Verhältnis 1:1 unter Zugabe des gleichen Volumens an frischen Basismedium 2 statt.

3.1.2 Züchtung und Passagierung adhaerenter Monolayerkulturen

In flüssigem Stickstoff bei -195 °C kryokonserviert gelagerte Fibroblasten der Passagezahl 3 bis 7 wurden bei Handwärme aufgetaut, sogleich in 5 ml Basismedium 2 aufgenommen und abzentrifugiert (400 g, 10 min, 37 °C). Das

Zellpellet wurde in 6 ml Basismedium 2 resuspendiert und auf eine 25 cm² Zellkulturschale gegeben.

Nach Inkubation der Zellen (37 °C, 5 % CO₂, 90 % Luftfeuchtigkeit) und regelmäßigem Mediumwechsel (alle fünf Tage), bis zur Ausbildung eines konfluenten Monolayers, wurde der Mediumüberstand abpipettiert und der Zellrasen mit 4 ml Magnesium- und Calciumfreien PBS gewaschen. Diese Behandlung hatte den Zweck, tote Zellen und das Serum, welches die Trypsinwirkung abschwächende Proteaseinhibitoren enthält, möglichst vollständig zu entfernen und die für die Zell-Zell- und Zell-Glas-Haftung notwendigen Calciumionen auszuwaschen. Nach zweiminütiger Inkubation mit 2 ml Trypsinlösung bei 37 °C und 5 % CO₂ lösten sich die Zellen unter leichtem Klopfen vollständig von der Zellkulturschale ab. Dieser Prozess wurde durch Zugabe des gleichen Volumens an Basismedium 2 gestoppt. Um Schädigung und Tod der Zellen zu vermeiden, sollten sie so kurz wie möglich mit proteolytischen Enzymen versetzt werden, da auch lebenswichtige Membranproteine verdaut werden. Es erfolgte ein anschließender Waschschrift (400 g, 10 min, 37 °C). Schließlich wurden die Zellen in 30 ml Basismedium 2 auf eine 175 cm² Zellkulturschale überführt.

Erneute Adhaerenz der Zellen zeigte sich im Mikroskop nach ungefähr vier Stunden. Eine Erneuerung des Basismediums 2 am darauffolgenden Tag beseitigte Zellfragmente. Die Zellen auf 175 cm² Kulturschalen wurden unter regelmäßigem Mediumwechsel bis zur Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Weiterzüchtung bis zur Passage 10 - 30 erfolgte durch Zweiteilung konfluenten Monolayer, indem der Zellrasen mit ca. 10 ml PBS gewaschen und mit 5 ml Trypsin abgelöst wurde. Ein Mediumwechsel erfolgte am Tag nach der Teilung, dann alle 5 - 7 Tage.

Die Zellkulturen wurden durch tägliche mikroskopische Kontrollen auf eventuelle Kontaminationen durch Bakterien, Hefen oder Pilze überprüft. Auch eine Trübung des Mediums ließ auf eine Kontamination schließen.

Mikroskopisch nicht sichtbare Mykoplasmen ließen sich zusätzlich durch einen ELISA-Test (Mykoplasmen-Detektionskit der Firma Boehringer Mannheim) nachweisen.

Ab Passage 10 bis zur Passage 30 wurden die Fibroblasten zur Infektion verwendet.

3.1.3 Konservierung von Suspensionskulturen und adhaerenten Monolayerkulturen

Fibroblasten niedriger Passagenzahl (< 10) und nicht adhaerente Tumorzelllinien wurden zum Teil wieder zur Konservierung eingefroren. Dazu wurde die Zellsuspension nach Trypsinierung bzw. Entnahme auf $2 - 3 \cdot 10^7$ Zellen / ml kalten Basismedium 1 bzw. 2 eingestellt und langsam 1 Volumen kaltes ‚Einfriermedium für Fibroblasten‘ bzw. ‚Einfriermedium für Suspensionszellen‘ zugegeben. Das in diesen Spezialmedien enthaltene Dimethylsulfoxyd wirkt als Stabilisator indem es die Bildung großer Eiskristalle verhindert. Es bewirkt die Entstehung vieler kleiner Eisnadeln, die bis zu relativ niedrigen Temperaturen gegeneinander beweglich bleiben, wodurch Membranen oder Zellbestandteile höherer Konsistenz ihnen leichter ausweichen können.

Beim Einfriervorgang durften sich die Kristalle einerseits nicht zu schnell bilden, damit ihnen Lysosomen und andere Zellstrukturen ausweichen konnten, andererseits sollten sie aber auch nicht zu langsam entstehen, da sie sonst zu groß würden.

Weiterhin war zu beachten, dass Zellen Salzlösungen enthalten, aus denen beim Abkühlen unter 0°C zunächst einmal Wasser ausfriert. Da konzentrierte Salzlösungen flüssig bleiben, existiert oberhalb der eutektischen Temperatur der Salzlösung ($\text{NaCl } -21,3^\circ\text{C}$, $\text{CaCl}_2 -54^\circ\text{C}$) immer noch eine, wenn auch nur sehr kleine, flüssige Phase in dem Eisblock, die Anlass zu Umlagerungen und zum Wachstum von Eiskristallen geben könnte. Unter solchen Bedingungen

wachsende Eiskristalle sind besonders gefährlich, weil die vom Eis fixierten Zellstrukturen ihnen nicht mehr ausweichen können. Um eine Abkühlung von 0 °C bis unterhalb der eutektischen Temperatur des Kochsalzes mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 °C / min zu gewährleisten, wurden daher 1 ml Alliquote in Kryogefäße mit Zellstoff umwickelt und für 15 min bei -20 °C, dann bei -70 °C eingefroren. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

3.2 Virusisolate

3.2.1 Züchtung von hCMV-Isolaten auf adhaerenten Monolayerkulturen

3.2.1.1 Primäre Virusisolate

Primäre Virusisolate immunsupprimierter Patienten wurden in den diagnostischen Laboratorien der Abteilung Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität Tübingen gewonnen. Hierzu wurde 2 ml Urin 1 : 2 mit HANKS neutralisiert und sterilfiltriert. Nach einer 45-minütigen Inkubation auf Röhrchenzellkulturen (37 °C, 5 % CO₂) wurde der Überstand abgesaugt und 2 ml Basismedium 1 zugegeben. Ein zytopathischer Effekt (CPE) zeigte sich bei massiver Virusausscheidung nach 1 - 2 Tagen, meist aber erst nach 3 - 10 Tagen, gelegentlich erst nach 6 Wochen.

3.2.1.2 Muttermilch

Durch zentrifugieren (10 min; 400 g; 37 °C) wurde die Muttermilch in drei Phasen aufgetrennt: wasserunlösliche Lipidschicht (Milchfett), wässriger zellfreier Überstand (Molke) und Milchzellpellet (Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten und korpuskuläre Bestandteile) [Hamprecht K. et al., 1998]. Für die kulturelle Virusanzüchtung wurde die Interphase entnommen und zuerst niedrigtourig (10 min, 400 g, 37 °C), der resultierende Überstand dann

hochtourig (10 min, 3200 g, 37 °C) zentrifugiert. Zur Gewinnung der vollständig zellfreien Molkefraktion musste der Überstand noch mit einem 0,22 µm Filter sterilfiltriert und schließlich auf Röhrenchzellkulturen gegeben werden.

Zur weiteren Passagierung der Isolate wurden die infizierten HFF von der Röhrenchwand mit 0,5 - 1 ml Trypsin abgelöst und die Zellsuspension in 6 ml Basismedium 1 auf einen subkonfluenten uninfizierten Zellrasen in eine 25 cm² Zellkulturschale pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Brutschrank über Nacht. Anschließend wurde der Zellrasen mit 4 ml PBS gewaschen und 6 ml frisches Basismedium 1 zugegeben. Mediumwechsel erfolgte alle 3 Tage. Die Zellkultur wurde bis zur Ausbildung eines mikroskopisch sichtbaren CPE inkubiert. Die infizierten Zellen wurden auf 25 cm² Zellkulturschalen weiterpassagiert und schließlich bei ausreichendem CPE (>90 %) für die Versuche eingesetzt. Der Überstand der Zellkulturen zeigte keine Infektiosität, d.h. dass sich die hCMV-Isolate im Gegensatz zum Laborstamm AD-169 nicht über das Kulturmedium, sondern nur von Zelle zu Zelle bei direktem Kontakt ihrer Membranen ausbreiten.

3.2.2 Konservierung von hCMV-Isolaten auf adhaerenten Monolayerkulturen

Analog der Konservierung von adhaerenten Monolayerkulturen wurden hCMV-Stämme bei -70 °C eingefroren. Als Stabilisator wurde anstelle von DMSO Glycerin verwendet (,Einfriermedium für hCMV-Isolate').

3.2.3 AD-169 - Aufarbeitung

3.2.3.1 Virusanzucht

Die Primärisolate wurden mehrmals auf 175 cm² Zellkulturflaschen passagiert. Bei Erreichen von 80 - 90 % CPE wurden drei 175 cm² Zellkulturflaschen abtrypsinisiert, die infizierten Fibroblasten pelletiert (400 g, 5 min, 10 °C), in 10 ml

Basismedium 1 resuspendiert und zur Gewinnung von zellfreiem Virus der Gefriertanalyse überführt.

Aus dem Zellkulturüberstand konnte ebenfalls zellfreies Virus isoliert werden. Hierzu wurden verbleibende Zellen und Zelltrümmer bei 3200 g über 10 Minuten unter Kühlung (4 °C) abzentrifugiert und der resultierende Überstand bei -70 °C aliquotiert (1,8 ml) eingefroren. Aus einem Aliquot („AD-Ü“) erfolgte dann die Titerbestimmung.

3.2.3.2 Gefriertanalyse

Die Zellpellets wurden gepoolt in einem Volumen von 10 ml Basismedium 1 zweimal auf -70 °C eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C jedesmal wieder aufgetaut. Nach abzentrifugieren des Zelldebris bei 3200 g für 5 Minuten wurde der virushaltige Überstand portioniert (500 µl) bei -70 °C eingefroren. Aus einem Aliquot („AD-P“) erfolgte dann die Titerbestimmung.

3.2.3.3 Titerbestimmung (TCID₅₀)

Aus je einem Aliquot des Lysates und des Kulturüberstandes wurde die Infektiosität bestimmt. Dies erfolgte durch TCID₅₀-Bestimmung nach Spearman-Kärber. Die TCID₅₀ beschreibt die Materialmenge, die bei Verimpfung auf eine Reihe von Reagentien in 50 % von ihnen eine Infektion auslöst. Hierzu wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit $2,5 \cdot 10^4$ HFF in 100 µl Basismedium 1 pro Well präpariert und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die zu testenden Viruspräparationen bei Handwärme aufgetaut und logarithmisch in Basismedium 1 von 10^{-1} bis 10^{-8} verdünnt. Das Medium der Mikrotiterplatte wurde abgenommen und durch jeweils 100 µl Virusverdünnung ersetzt. Pro Verdünnungsstufe wurden 8 Wells infiziert. Die Virusadsorption erfolgte 1 Stunde im Brutschrank mit anschließendem zentrifugieren der Mikrotiterplatten bei 400 g für 30 Minuten (Shell vial assay [Paya C.V. et al., 1987]). Danach wurde das Medium durch 200 µl frisches

Basismedium 1 ersetzt und die Mikrotiterplatte im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) fünf Tage lang inkubiert.

Die infizierten Zellen wurden anschließend durch den Immediate-Early-Antigen-Immunperoxidase-Test visualisiert. Danach folgte das Auszählen der infizierten Wells, wobei jedes Well mit ≥ 1 gefärbten Zellkern als positiv gewertet wurde (Alles-oder-Nichts-Reaktion). Die TCID₅₀ berechnet sich nach folgendem Schema [Mazaron M.C. et al., 1992]:

Klassengrenze	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸
E ₁₃₊ -Wells	8/8	8/8	8/8	8/8	3/8	0/8	0/8	0/8
Klassenmitte	-1,5	-2,5	-3,5	-4,5	-5,5	-6,5	-7,5	
Zunahme	0	0	0	5	3	0	0	
Produkte	0	0	0	-22,5	-16,5	0	0	

In diesem Beispiel waren bei der Verdünnungsstufe 10⁻⁵ in drei der acht Wells, welche mit dieser Verdünnungsstufe infiziert waren, noch vereinzelt Zellkerne mittels Immediate-Early-Antigen-Immunperoxidase-Test positiv angefärbt. Bei der nächsthöheren Verdünnungsstufe 10⁻⁶ zeigte keines der acht Wells eine positive Kernfärbung an. In der Klassenmitte -5,5 (= arithmetisches Mittel der Exponenten der beiden darüber angeordneten Klassengrenzen) ergab sich somit von 10⁻⁶ nach 10⁻⁵ eine Zunahme von 3. Die Produkte wurden unter Beachtung der Vorzeichen aus Klassenmitte und Zunahme gebildet.

Die TCID₅₀ berechnete sich wie folgt (n = Anzahl der Wells pro Verdünnungsstufe):

$$\text{Log TCID}_{50} \text{ pro } 100 \mu\text{l} = \frac{\sum \text{Produkte}}{n} = \frac{-39}{8} = -4,875 \text{ (Titerexponent)}$$

$$\text{TCID}_{50} \text{ pro } 100 \mu\text{l} = 10^{-4,875} \text{ (Titer)}$$

Da die Infektion der Wells in Volumina von 100 μl durchgeführt wurde, berechnete sich die TCID₅₀ auf ein Volumen von 100 μl . Die TCID₅₀ pro ml entspräche im Beispiel demnach 10^{-5,875}. Für das Viruslysat („AD-P“) ergab sich

eine TCID₅₀ von 10^{-6,125}. Dies entsprach einer Verdünnung von 1:1,3 Millionen. Der Kulturüberstand („AD-Ü“) zeigte mit einer TCID₅₀ von 10^{-6,875}, entsprechend einer Verdünnung von 1:7,5 Millionen, einen höheren Virustiter.

3.2.3.4 AD-169-Plaqueassay

Um die optimale Inkubationszeit und Virusverdünnung von zellfreiem Virus für den adhaerenten BATDA-release-Assay und den adhaerenten Laktatdehydrogenase-Zytotoxizitäts-Assay zu bestimmen, wurden mit Fibroblasten beimpfte Mikrotiterplatten 3 bzw. 5 Tage mit den aufgearbeiteten AD-169-Viruspräparaten in absteigenden Verdünnungsstufen inkubiert.

Hierzu wurden nichtinfizierte HFF von einer 175 cm² Zellkulturschale abtrypsiniert, abzentrifugiert (400 g, 5 min, 37 °C), gezählt und mit Basismedium 1 auf 20.000 HFF / 100 µl (5.000 HFF / 100 µl) eingestellt. Nach Beimpfen einer flachbödigen 96-Well-Mikrotiterplatte (384-Well-Lochplatte) mit 100 µl / Well erfolgte eine vierstündige Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) um ein Anhaften der Zellen an die Wellböden zu ermöglichen. Anschließend wurde das Überstandsmedium abgenommen und aus je einem Aliquot des Lysates („AD-P“) und des Kulturüberstandes („AD-Ü“) 100 µl Viruslysatverdünnung / Well in den Verdünnungsstufen 1.000 · TCID₅₀, 100 · TCID₅₀, 10 · TCID₅₀, sowie 1 · TCID₅₀ zugegeben.

Um die Infektion der Zellen zu beschleunigen, wurde das Inokulum auf die Zellen aufzentrifugiert (400 g, 30 min, 37 °C) (Shell vial assay [Paya C.V. et al., 1987]). Das Überstandsmedium wurde abgenommen und 200 µl / Well (120 µl / Well) frisches Basismedium 1 zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 3 bzw. 5 Tagen im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) wurde die Infektion mittels Methanol gestoppt und eine Immediate-Early-Antigen-Immunperoxidasefärbung angeschlossen.

Das Viruslysate zeigte dabei eine höhere Infektiosität als der Kulturüberstand. Die Infektionsdosis zwischen 100 und 1.000-facher TCID₅₀ wies sowohl nach 3, wie auch nach 5 Tagen eine nahezu hundertprozentige Infektion auf. Eine vergleichbare Infektion wurde in den 384-Well-Lochplatten nach fünf Tagen mit einer 100 (MRC-5 und MRHF) bzw. 200-fachen (HFF) TCID₅₀ erreicht.

3.3 Bestimmung der Gesamtzellzahl und Vitalität durch Färbung mit Trypanblau

Die Zellzählung erfolgte mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer, welche durch ein Raster aus 4 Großquadranten, die sich aus weiteren 16 Kleinquadranten zusammensetzen, gekennzeichnet ist. Ein Aliquot Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Vitalfarbstoff Trypanblau gemischt und in die vorbereitete Zählkammer pipettiert. Trypanblau (3,3'-[3,3-Dimethyl-4,4'-biphenylen-bis-azo]-bis(5-amino-4-hydroxy-2,7-naphthalindisulfon-säure)-tetranatriumsalz) wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen (Trypanblau-negative Zellen), während sich das Zytoplasma und der Kern toter oder geschädigter Zellen dunkelblau anfärbt (Trypanblau-positive Zellen).

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl pro ml wurde die Anzahl der vitalen und der gefärbten Zellen in einem Großquadrat, das aus $(4 \cdot 4) = 16$ Kleinquadraten besteht, mit dem Verdünnungsfaktor 2 und dem Kammerfaktor 10^4 multipliziert. Wurde die Gesamtzellfraktion zuvor in einem geringeren oder größeren Volumen mit Basismedium resuspendiert, musste zusätzlich dieser Verdünnungs- oder Konzentrationsfaktor mitberücksichtigt werden.

3.4 Kultureller Immediate-Early-Antigen-Immunperoxidasetest

Dieses auch in der Virusdiagnostik etablierte Nachweisverfahren eines frühen viralen Proteins wurde eingesetzt, um Aufschluss über den vorliegenden Infektiositätsgrad einer viralen Infektion von HFF in Kultur zu erhalten.

Ein Primärantikörper detektiert hierbei das hCMV-spezifische Immediate early antigen (IEA) pp72 (UL122) im infizierten Zellkern [Mazeron M.C., 1984] und wird von einem mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten (POD), gegen den Primärantikörper gerichteten, Sekundärantikörper erkannt. Unter Zugabe von 3-Amino-9-ethylcarbocoll (AEC), H_2O_2 und H_2O wird das dreiwertige Eisen im Porphyrinring der Meerrettich-Peroxidase reduziert, wobei AEC selbst oxidiert wird. Das dabei entstehende unlösliche Präzipitat Azamethin resultiert in einem Farbumschlag zu rotbraun. Die Anzahl der infizierten HFF-Zellen, die das IE 1 (Exon 2) Antigen im Zellkern exprimieren, kann somit unter dem Lichtmikroskop bestimmt werden.

Versuchsdurchführung:

Permeabilisierung und Fixierung der Zellen

Das Medium wurde abgenommen und 200 μ l des bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagerten Methanols zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen pro Well zugegeben. Nach 20minütiger Inkubation der Mikrotiterplatte unter $4\text{ }^\circ\text{C}$ Kühlung wurde das Methanol entfernt und ein Waschschrift mit $\text{PBS}_{5\% \text{ FCS}}$ angeschlossen.

Bindung des primären Antikörpers (Klon E₁₃) [Mazaron M.C. et al., 1992]

Pro Well wurden 100 μ l des monoklonalen IgG1k-Maus-Antikörpers gegen das hCMV IE-Antigen pp72 (ORF: UL 122) 1:500 in $\text{PBS}_{5\% \text{ FCS}}$ verdünnt zugegeben und im Brutschrank ($37\text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$) inkubiert. Nach einstündiger Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und nicht gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit $\text{PBS}_{5\% \text{ FCS}}$ entfernt.

Bindung des sekundären Antikörpers

100 μ l des aus Kaninchenserum gewonnenen, mit Meerrettich-Peroxidase (POD) konjugierten, Anti-Maus-IgG-Antikörpers wurde in einer 1 : 500-Verdün-

nung mit PBS_{5% FCS} auf die Zellen pipettiert und ungebundener Antikörper nach einer Stunde durch wiederum zweimaliges Waschen mit PBS_{5% FCS} entfernt.

Detektion der infizierten Zellkerne

AEC-Stammlösung (10 mg AEC gelöst in 2,5 ml N,N-Dimethylformamid) wurde 1 : 20 mit 0,1 M Natrium-Acetatpuffer (pH 4,9) verdünnt und anhand eines 0,20 µm Filters sterilfiltriert. Direkt vor Gebrauch wurden 1 / 1.000 Volumenteilchen H₂O₂ (33 %) zugegeben. Pro Well wurden dann 100 µl dieser Substratlösung zugegeben und die Indikatorreaktion 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert.

Hämalaun / Hämatoxilin-Gegenfärbung (optional)

Jedem Well wurde 150 µl Hämalaun-Färbelösung (1 : 4 mit PBS_{5% FCS} verdünnt und mittels 0,45 µm Filters sterilfiltriert) zugegeben und die Mikrotiterplatte für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS_{5% FCS} gestoppt.

Die gefärbten Mikrokulturen konnten in PBS_{5% FCS} bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

Als Negativkontrolle wurden stets nichtinfizierte Fibroblasten mitgeführt.

3.5 Modifizierter Kokultur-Assay nach Prix et al. [1998]

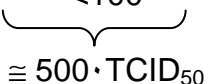
Zur Bestimmung der optimalen Virusverdünnung von zellassoziertem Virus für den adhaerenten BATDA-release-Assay und den adhaerenten Laktatdehydrogenase-Zytotoxizitäts-Assay wurden mit Fibroblasten beimpfte Mikrotiterplatten 5 Tage lang mit hCMV-Isolaten und AD-169-infizierten Fibroblasten in verschiedenen Verdünnungsstufen inkubiert.

Die hCMV-infizierte Fibroblastenkultur wurde nach Erreichen des erforderlichen CPEs abtrypsinisiert und vom Basismedium 1-Trypsin-Gemisch abzentrifugiert (400 g, 5 min, 37 °C). Anschließend wurde die infizierte Zellsuspension gezählt und mit Basismedium 1 auf 100.000 Zellen pro 100 µl eingestellt. Parallel hierzu wurden nichtinfizierte Fibroblasten von einer 175 cm² Zellkulturschale abtrypsinisiert, abzentrifugiert (400 g, 5 min, 37 °C) und auf 20.000 (5.000) Fibroblasten pro 100 µl verdünnt. Mit dieser Zellsuspension wurden dann für jedes zu testende Virusisolat 9 Aliquots à 5 ml hergestellt.

Beim Mischen der Kokulturen wurden zu den 9 Aliquots jeweils 250, 125, 50, 37,5, 25, 20, 15, 10 und 5 µl der auf 100.000 Zellen / 100 µl eingestellten hCMV-infizierten Zellsuspension zugegeben. Somit erhielt man in den 9 Aliquots eine Konzentration von 5.000, 2.500, 1.000, 750, 500, 400, 300, 200 und 100 infizierte Zellen pro 100 µl. Für die 384-Well-Lochplatten wurden aufgrund der geringeren Anzahl an Targetzellen Konzentrationen von 5.000, 2.500, 1.000, 500, 250, 100, 50 und 25 infizierte Fibroblasten pro Well gewählt.

Jeweils 100 µl der gemischten Zellsuspensionen wurden zur Kokultivierung in die Wells einer flachbödigen 96-Well-Mikrotiterplatte sowie einer 384-Well-Lochplatte pipettiert. Mit jeder der 9 Aliquots wurden 8 Wells beimpft. Nach vierstündiger Adsorption der Zellen an den Wellböden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ wurde das Überstandsmedium abgenommen und durch frisches Basismedium 1 ersetzt. Nach 5 Tagen Inkubation erfolgte die Auswertung.

Es zeigte sich folgende optimale Infektionsdosis zur Erlangung von > 90 % Infektiosität:

96 Well Platte	<i>AD 169</i>	<i>WT-MR</i>	<i>WT-GCVR1</i>	<i>WT-GCVS1</i>
	<i>(Infizierte Zellen pro Well)</i>			
HFF	100-300	100-300	1 000	1 000
MRHF	<100	<100	1 000	1 000
MRC – 5	<100	<100	1 000	1 000
				

384 Well Platte	AD 169 · TCID ₅₀	WT-MR	WT-GCV _R	WT-GCV _S
		(Infizierte Zellen pro Well)		
HFF	200	100	50	50
MRHF	100	100	250	250
MRC – 5	100	100	250	250

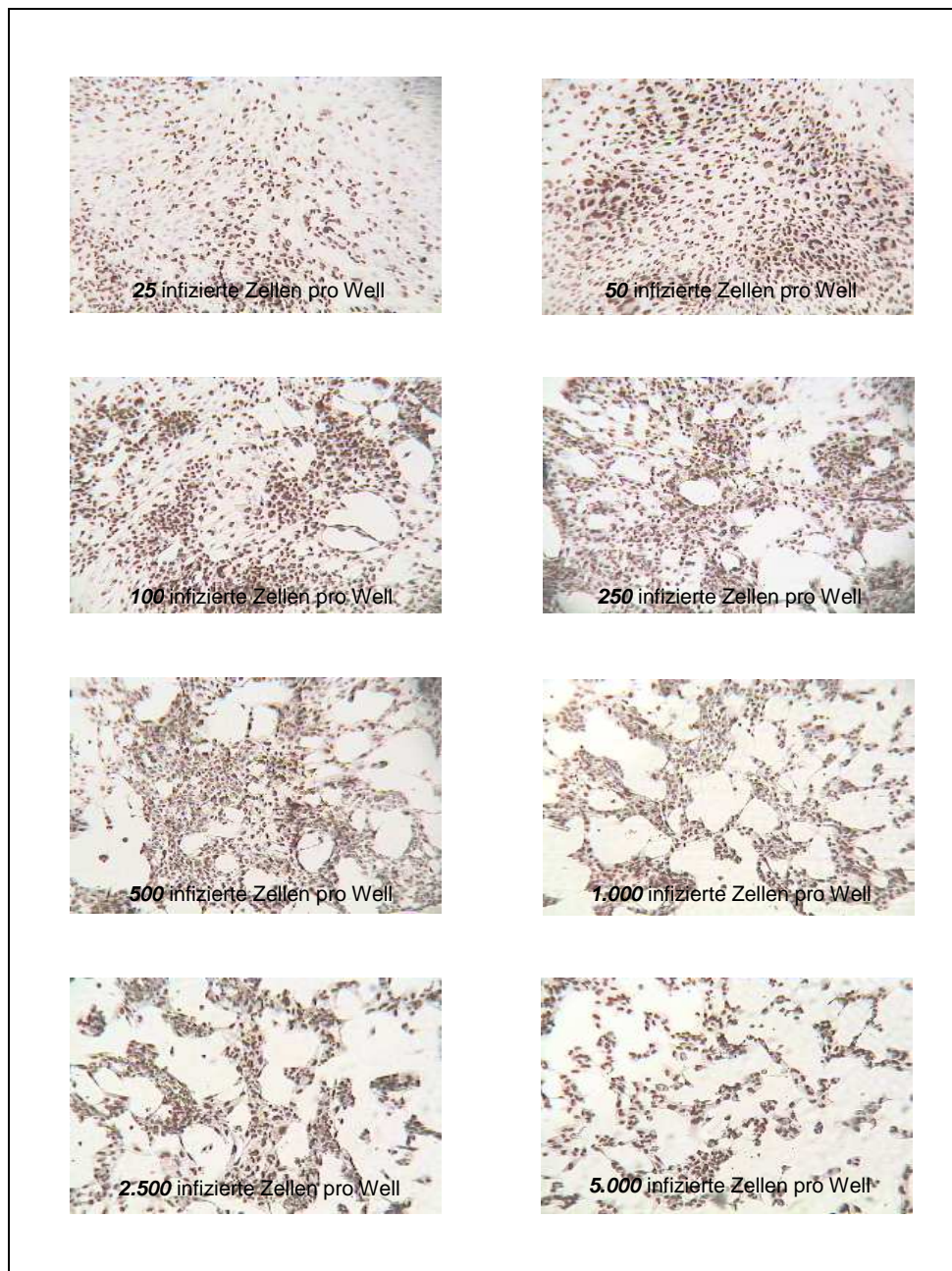


Abb. 7: **Modifizierter Kokkultur-Assay nach Prix et al. am Beispiel des Virusisolates WT-GCVR1 auf HFF_{P28}** (384-Well-Mikrotiterplatte) [IEA-Kernfärbung und H.E.-Gegenfärbung]. Die optimale Konzentration für einen vollständig infizierten Zellrasen lag hier bei 50 infizierten Zellen pro Well. Unterhalb dieser Konzentration zeigte sich eine Infektiositätsrate < 100 %, während eine Infektion mit mehr als 50 infizierten Zellen pro Well eine Zunahme des zytopathischen Effektes mit zunehmender Zellablösung und schließlich Zellverklumpung ergab.

3.6 Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Hintergrund:

Aufgrund ihrer Dichte können mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Pbmnc) mittels Dichtezentrifugation über einen Stufengradienten aus Ficoll-Hypaque (Dicht von 1,007 g / l) von den anderen Blutbestandteilen isoliert werden [Böyum A., 1968].

Versuchsdurchführung:

Nach Zugabe von 10 IE / ml Liquemin-Heparin-Natrium bei Entnahme des peripheren Blutes wurde zur Separation der Zellen im Verhältnis 1 : 1 mit PBS verdünnt. Das Vollblut-PBS-Gemisch wurde vorsichtig in einem 50 ml Falcon[®]-Röhrchen auf 15 ml Ficoll-Hypaque (Zimmertemperatur) aufgeschichtet. Nach anschließendem zentrifugieren (21 °C, 400 g, 30 min, 175 r / mm, Beschleunigung und Bremse 0) flottierten die Zellen mit geringer Dichte (T- und B-Lymphozyten, Monozyten und mononukleäre Vorläuferzellen) über dem Ficoll-Hypaque, während Erythrozyten und polymorphkernige Leukozyten bzw. Granulozyten durch das Ficoll-Hypaque durchzentrifugiert wurden und am Gefäßboden ein Pellet bildeten. Die mononukleäre Fraktion in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Hypaque konnte nun mit einer Pipette abgezogen werden.

Um noch evt. vorhandenes zytotoxisch wirkendes Ficoll-Hypaque zu entfernen, wurde die Pbmnc-Fraktion mit PBS gewaschen (37 °C (bzw. 7 °C für die MACS-Anreicherung), 500 g, 10 min, 208 r / mm, Beschleunigung und Bremse 5). Nach dekantieren des Überstandes wurden die Pbmnc in einem 15 ml Falcon[®]-Röhrchen gepoolt und 100 µl für die Bestimmung der Zellzahl entnommen. Hiermit konnte der Anteil an Lymphozyten mittels Advia[®]-Zählgerät des Hämatologischen Routinelabors der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen quantitativ erfasst werden.

Zur Immunphänotypisierung wurden ca. 100.000 Zellen für die Durchflusszytometrie entnommen. Danach erfolgte ein zweiter Waschschrift (37 °C (bzw. 7 °C für die MACS-Anreicherung), 400 g, 10 m in, 208 r / mm, Beschleunigung und Bremse 5). Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen in Basismedium 2 oder MACS-Puffer resuspendiert.

3.7 Anreicherung Natürlicher Killerzellen

Hintergrund:

Mit Hilfe immunomagnetischer Substanzen können bestimmte Zellen über „Magnetic-activated-cell-sorting“ (MACS) als Antigen-positive-Fraktion angereichert bzw. über die Antigen-negative-Fraktion depletiert werden. Dazu markiert man die anzureichernden Zellen mit einem monoklonalen Antikörper, der an Epitope bindet, die für die spezifische Zellsorte charakteristisch sind. Diese spezifischen Antikörper sind mit kleinen Metallpartikeln (Eisenoxid) konjugiert.

Zur Isolierung wird eine spezielle Säule verwendet, die mit einer paramagnetischen Eisenmatrix gefüllt ist und sich in einem starken Magnetfeld befindet. Lässt man das Zellgemisch über die Trennsäule laufen, werden die magnetisch markierten Zellen in der Säule zurückgehalten, während die Zellen ohne magnetischen Zusatz die Säule hindernislos passieren (Negativfraktion). Entfernt man danach die Säule aus dem Einflussbereich des Dauermagnetfeldes, lassen sich die markierten Zellen als Positivfraktion aus der Säule eluieren.

Für die Anreicherung von NK-Zellen eignen sich gegen CD⁵⁶⁺ gerichtete Micro-Beads. Dieses Adhäsionsmolekül (neural cell adhesion molecule, NCAM) wird hauptsächlich von Natürlichen Killerzellen und einigen T-Zellsubpopulationen exprimiert [Geiselhart A., 1997].

Versuchsdurchführung:

Die aus dem venösen Vollblut gewonnenen mononukleären Zellen wurden zunächst mit MACS-Puffer auf eine Dichte von 100 Millionen Lymphozyten / ml eingestellt. MACS-Puffer setzt sich aus PBS-Puffer ohne Mg^{2+} und Ca^{2+} mit 10 ml EDTA (Äthylendiamin-Tetraacetat-Lösung separiert die Zellen dadurch, dass es mit den für deren Haften notwendigen Ca^{2+} -Ionen Chelate bildet) und 10 ml humanem Serumalbumin (Nährstoffzusatz) zusammen und wird zur Beseitigung eventuell vorhandener Gasteilchen, die den Säulenlauf behindern könnten, 15 Minuten ultraschallbehandelt.

Um den Zellstoffwechsel zu inhibieren und damit einer Anreicherung und Zerklumpung der Zelloberflächenmoleküle auf einer Seite der Zellen („Capping“ [Taylor R.B. et al., 1971]) entgegenzuwirken, wurden alle nun folgenden Arbeitsschritte unter Eiskühlung bei ca. 4°C durchgeführt .

Zum Absättigen unspezifischer Bindungen folgte eine lichtgeschützte, 10minütige Inkubation mit 50 µl / ml humanem Polyglobulin® 5% auf einem Tischschüttelgerät (Stufe 3). Anschließend wurden pro 10^7 Zellen 20 µl CD^{56+} Micro-Beads zugegeben. Bei einer Zelldichte von 100 Millionen / ml entsprach dies 200 µl Beads für 1 ml Zellsuspension. Unter Lichtabschluß schloss sich dann für 30 Minuten eine Inkubation auf dem Tischschüttelgerät (Stufe 3) an, wobei alle 10 Minuten zusätzlich kurz von Hand geschüttelt wurde. Um nichtgebundenen Antikörper zu entfernen, wurde 2 mal mit MACS-Puffer gewaschen (7 °C, 400 g, 10 min, 208 r / mm, Beschleunigung und Bremse 5) und zum Säulenlauf in 7 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Nach installieren der bei 4 °C gekühlten Trennsäule im VarioMACS und spülen der Säule mit 7 ml MACS-Puffer wurde die gut suspendierte Zellsuspension aufgetragen. Unmarkierte Zellen wurden nach dem vollständigen Durchlauf der Zellfraktion durch 5-maliges nachspülen mit 2 ml MACS-Puffer entfernt. Dann wurde die Trennsäule aus dem Permanentmagneten entnommen und die noch

in der Säule befindlichen CD^{56+} Zellen mit 6 ml MACS-Puffer durch zügiges, kräftiges durchspülen mittels Stempel eluiert.

Zur Bestimmung des Lymphozytenanteils mittels Advia[®]-Zählgerät des Hämatologischen Routinelabors der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen wurden 200 μ l der Zellsuspension entnommen. Zusätzlich wurden zur Beurteilung der Reinheit an Natürlichen Killerzellen ca. 100.000 Zellen für die Durchflussszytometrie abgenommen. Nach Pelletierung der Zellen (21 °C, 400 g, 10 min, 208 r / mm, Beschleunigung und Bremse 5) wurden die Zellen mit Basismedium 2 auf die gewünschte Anzahl an Lymphozyten eingestellt.

Stimulation der NK-Zellen:

Die angereicherten NK-Zellen wurden in einer Dichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml in Basismedium 2 resuspendiert und in drei Proben aufgeteilt: ohne Zugabe von Interleukin, mit 40 U / ml Interleukin 2 (IL-2) und mit 1 ng / ml Interleukin 15 (IL-15). Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5% CO_2 wurden die Effektorzellen einmal in Basismedium 2 (LDH-Assay: Basismedium 3) gewaschen und auf die erforderliche Zelldichte eingestellt.

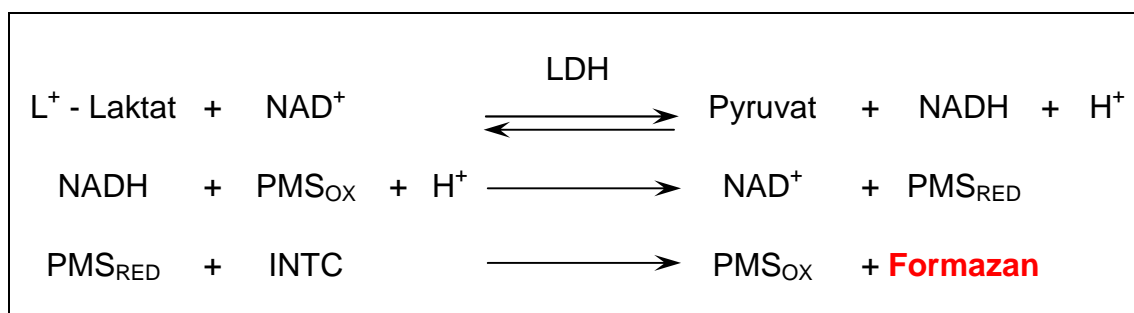
Um zu verdeutlichen, dass sich die zu messende Zellyse auf die zugegebenen Effektorzellen zurückführen lässt, wurden die Effektorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen zu einer gleichbleibenden Anzahl an Targetzellen pipettiert (E / T-Verhältnis). Da beim Testansatz 100 μ l (ADCC: 60 μ l) Effektorzellen pro Well eingesetzt wurden und die Zahl der Targetzellen durchgehend 5.000 betrug, musste für ein E / T-Verhältnis von 20 : 1 die Ausgangskonzentration der Effektoren $1 \cdot 10^6$ (ADCC: $1,67 \cdot 10^6$) Zellen / ml betragen. Hiervon wurde eine Verdünnungsreihe über die Stufen 1 : 1 (entsprechend 20 Effektorzellen / 1 Targetzelle), 1 : 2 (10 / 1), 1 : 4 (5 / 1) und 1 : 8 (2,5 / 1) erstellt.

3.8 Adhaerenter Laktatdehydrogenase-Zytotoxizitäts-Assay

Hintergrund:

Der von Korzeniewski und Callewaert [Korzeniewski C. & Callewaert D.M., 1983] ausgearbeitete kolorimetrische LDH-Zytotoxizitätstest zur quantitativen Erfassung der natürlichen zellvermittelten Antitumorzytotoxizität benutzt als Messkriterium der Zytolyse die am Ende der Tumor-Effektorzell-Kokultur registrierbare LDH-Freisetzung aus der Tumorzelle.

Für die Indikatorreaktion wird die LDH-katalysierte NAD^+ -Reduktion an ein Redoxsystem gekoppelt. Dadurch wird das Gleichgewicht dieser Reaktion, welches weit auf der Seite von L^+ -Laktat und NAD^+ liegen würde, auf die Seite von Pyruvat und NADH verschoben. NAD^+ wird unter diesen Bedingungen quantitativ zu NADH reduziert, welches wiederum Phenazinmethosulfat (PMS) reduziert. In einer weiteren Redoxreaktion bildet das gelbe Jodnitrotetrazoliumchlorid (INTC) unter Ringöffnung des Tetrazoliumsalzes das intensiv rot gefärbte Formazansalz, das dann als Meßgröße dient.



Versuchsdurchführung:

Adhaerente Targetzellen wurden fünf Tage in 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten mit $2 \cdot 10^4$ Zellen / Well (384-Well-Mikrotiterplatte: $5 \cdot 10^3$ Zellen / Well) bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert (MOCK-Kontrolle). Im Gegensatz zu Tumorzelllinien blieb, aufgrund der Kontaktinhibition bei Fibroblasten, diese Targetzellkonzentration konstant. Ebenso wurde zellfreies Viruslysate (AD-169) in entspre-

chender TCID₅₀-Verdünnung via Shell vial assay auf die Targetzellen aufzentrifugiert (3.2.3.3 Shell vial assay [Paya C.V. et al., 1987]), bzw. zellassoziertes Wildtypvirus mit einer Infektiositätsdosis für > 90 % Infektiosität via Kokultur-Assay mit den Fibroblasten vermengt (3.5) und im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde der Kulturüberstand entfernt und die Monolayer zweimal mit 200 µl / Well Basismedium 3 faktorfrei gewaschen. In einem Endvolumen von 200 µl / Well erfolgte dann die Kokultivierung der adhaerenten Targetzellen mit den verschiedenen Verdünnungsstufen der Effektorzellen. Die Kontrolle der spontanen LDH-Freisetzung aus den Target- und Effektorzellen während der vierstündigen Inkubation wurde durch separate Inkubation beider Zellpopulationen in 200 µl Basismedium 3 (SLT, SLE) ermittelt. Als Background (BG) diente 200 µl zellfreies Basismedium 3. Die Maximallyse (ML) wurde mit 100 µl Basismedium 3 pro Targetzell-enthaltenen Well angesetzt. Für alle Proben wurden 3-fach Ansätze vorbereitet, für BG, ML und SLT jeweils mindestens 6-fach-Bestimmungen.

Zu Testbeginn wurden die Mikrotiterplatten zur Annäherung der Effektor- und Targetzellen 2 - 3 Minuten mit 100 g bei 37 °C angezentrifugiert und über vier Stunden bei 5 % feuchter CO₂-Atmosphäre unter 37 °C inkubiert. 15 Minuten vor Beendigung dieser Inkubationszeit wurde die ML der Targetzellen durch Zugabe von 100 µl Triton[®] X-100 (2 %) unter Resuspension der Zellen und anschließender 5 - 10-minütiger Inkubation im Brutschrank vorgenommen.

Zur Messung der freigesetzten LDH-Aktivität in zellfreien Kokulturüberständen wurden die Mikrotiterplatten nach Ablauf der Tritonlyse fünf Minuten unter 400 g bei 37 °C zentrifugiert und jeweils 100 µl Zellkultur überstand aus den jeweiligen Testansätzen in korrespondierende Vertiefungen einer flachbödigen 96-Well-Mikrotiterplatte überführt. Im Gegensatz zur intervallartigen Bestimmung der LDH-Aktivität nach Korzeniewski und Callewaert wurde eine Endpunktbestimmung durchgeführt. Hierzu wurden zu den zellfreien Kokulturüberständen in Ein-Sekunden-Intervallen jeweils 100 µl frisch angesetzte und sterilfiltrierte

(0,45 µm) LDH-Substratlösung zugesetzt. Danach wurden die Mikrotiterplatten lichtgeschützt 6-8 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Farbstoffbildung wurde im gleichen Ein-Sekundentakt durch Zugabe von 50 µl 1 N HCl gestoppt. Die photometrische Auswertung der Platten erfolgte in einem Mikrotiterplattenspektrophotometer gegen den Reagentienleerwert bei 490 nm mit der Referenzwellenlänge 630 nm. Während der Messungen wurde der BG-Wert automatisch von den Messdaten abgezogen. Der Prozentsatz an Zytotoxizität errechnete sich durch die Formel:

$$(3.1) \quad \% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}_{\text{SLT} + \text{SLE}}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}_{\text{SLT}}} \cdot 100$$

Der Prozentsatz der Spontanlyse wurde berechnet durch die Formel:

$$(3.2) \quad \% \text{ Spontane Lyse} = \frac{\text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse}} \cdot 100$$

In die Berechnungen gingen jeweils die Mittelwerte aus den Mehrfachbestimmungen ein. Der Grad an Infektiosität konnte mittels Immediate-Early-Antigen-Immunperoxidasetest (3.4) an den BG-Wells ermittelt werden.

3.9 Europium-Zytotoxizitäts-Assay

Hintergrund:

Die Methode des von K. Blomberg et al. [Blomberg K. et al., 1996] veröffentlichten BATDA-Release-Assay beruht auf dem Nachweis eines intrazellulären fluoreszenzverstärkenden Liganden im Zellüberstand, der nur von lysierten Zellen freigesetzt wird. Dazu werden die Targetzellen zuerst mit bis(acetoxymethyl)2,2':6'2'-terpyridine-6.6'-dicarboxylate (BATDA) inkubiert. Dieser Acetoxymethylester des fluoreszenzverstärkenden Liganden 2,2':6',2''-

terpyridine-6,6''-dicarboxylic acid (TDA) diffundiert als hydrophobe Verbindung leicht durch die Zellmembran. Durch intrazelluläre Esterasen werden die Esterbindungen des Liganden hydrolysiert. Dadurch entsteht die hydrophile Verbindung TDA, welche die Zellmembran nicht mehr passieren kann und in den Targetzellen akkumuliert. Die so markierten Targetzellen werden dann zusammen mit den Effektorzellen, z.B. CD⁵⁶⁺ NK-Zellen, inkubiert.

Werden Targetzellen von den zytotoxischen Effektorzellen lysiert, tritt der hydrophile Ligand TDA in den Überstand über und bildet mit Europiumlösung einen stark fluoreszierenden und stabilen Chelatkomplex (EuTDA). Die Menge des freigesetzten Liganden lässt sich über eine zeitverzögerte Fluoreszenz bei 615 nm im Fluorometer messen. Dabei kann die Zytotoxizität der Effektorzellen, ausgedrückt durch den prozentualen Anteil an lysierten Targetzellen, nur errechnet werden, indem das Ergebnis auf die Anzahl der maximal lysierbaren Zellen bezogen wird. Im Test müssen deshalb folgende Werte zusätzlich bestimmt werden:

- Maximallyse (ML): Sie bezeichnet den Wert, der maximal erreicht werden kann, wenn alle Targetzellen lysiert werden.
- Spontanlyse (SL): Dieser Wert kommt dadurch zustande, dass Targetzellen auch ohne Einfluß von Effektorzellen absterben und den Liganden freisetzen.

Die prozentuale spezifische Lyse errechnet sich nach folgender Formel:

$$(3.3) \quad \% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{\text{Messwert} - \text{Spontanlyse}}{\text{Maximallyse} - \text{Spontanlyse}} \cdot 100$$

3.9.1 Versuchsdurchführung non-adhaerenter BATDA-release-Assay

Die adhären wachsenden Fibroblasten wurden mit 5 ml PBS gespült und durch Zugabe von 1 - 2 ml Trypsin-EDTA unter leichtem Klopfen von den 25 cm² Kulturflaschen abgelöst. Um das Trypsin wieder von den Zellen zu entfernen, erfolgte eine einmaliges zentrifugieren der Zellsuspension für 5 Minuten bei 200 g (Bremse und Beschleunigung 5 bei 37 °C). Anschließend wurde zur Erholung der resuspendierten Targetzellen eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ durchgeführt.

Nach Entnahme von 20 µl Zellsuspension für den kulturellen Immediate-Early-Antigen-Immunperoxidasetest (3.4) wurden die Targetzellen zur Markierung auf $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml Basismedium 2 eingestellt und mit 2,5 µl BATDA-Ligand pro $1 \cdot 10^6$ Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 15 Minuten inkubiert. Zum Entfernen des Ligandenüberschusses wurden die Zellen fünfmal mit auf 37 °C angewärmten Basismedium 1 gewaschen (200 g, 5 min, Bremse und Beschleunigung 5, 37 °C). Nach Aufnahme der Targetzellen in das Ursprungsvolumen erfolgte die Bestimmung des Anteils an vitalen Zellen mittels Neubauer-Zählkammer. Schließlich wurde die Zellsuspension auf eine Endkonzentration von $5 \cdot 10^4$ vitale Zellen / ml Basismedium 1 eingestellt. Ein Teil dieser Zellen wurde erneut zentrifugiert (200 g, 5 min, Bremse und Beschleunigung 5, 37 °C) und der Überstand für die Backgroundbestimmung (BG) verwendet.

Der Test wurde in einer U-Boden-Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) angesetzt, wobei Background, Spontanlyse und Maximallyse jeweils vierfach bestimmt wurden. Dabei ergab sich der BG aus 100 µl gewonnenen Überstandes und 100 µl Basismedium 1 pro Well. Für den Ansatz der Maximallyse wurden 100 µl Ultraschalllysierte Targetzellen und 100 µl Basismedium 1 / Well verwendet (US). Ein zweiter Ansatz ergab sich aus 100 µl Targetzellen mit 20 µl Lysis Buffer und 80 µl Basismedium 1 pro Well (ML). Die Spontanlyse (SL) wurde durch eine Inkubation von 100 µl Targetzellsuspension und 100 µl Basis-

medium 1 / Well ohne Zugabe von Effektorzellen bestimmt. Um eine durch Komplement vermittelte Lyse auszuschließen, wurde für eine ADCC zusätzlich eine Spontanlyse von 100 µl Targetzellen mit 40 µl Cytoglobin® 5% und 60 µl Basismedium 1 ermittelt (SL_{Cy}).

Schließlich wurde die benötigte Anzahl an Wells mit 100 µl Targetzellen beladen. Sollte eine ADCC durchgeführt werden, wurde in die entsprechenden Wells 40 µl Cytoglobin® 5 % pipettiert und in den 96-Well-Mikrotiterplatten bei 37 °C und 5 % CO₂ für 20 Minuten inkubiert, um eine Bindung der hCMV-spezifischen Antikörper zu ermöglichen. Danach wurden zu den Targetzellen jeweils 100 µl der isolierten Effektorzellen (ADCC: 60µl) in entsprechender Verdünnung hinzugegeben. Um Messfehler zu minimieren fand von jeder Verdünnungsstufe eine Dreifachbestimmung statt.

Damit Target- und Effektorzellen rasch in Kontakt kamen, wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte kurz anzentrifugiert (100 g, 2 min, Bremse und Beschleunigung 3, 37° C) und anschließend 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Um den Überstand zu gewinnen, wurden die Zellen der 96-Well-Mikrotiterplatte bei 200 g (5 min, Bremse und Beschleunigung 5, 37 °C) pelletiert. Eine entsprechende Anzahl an Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit Flachboden wurde anschließend mit 200 µl Europiumlösung und 20 µl Überstand aus dem entsprechenden Well der Testansatzplatte beladen. Eine Inkubation für 20 Minuten auf einem Schüttler (Stufe 5) gewährleistete, dass Europium den Liganden komplett binden konnte. Die erzeugte Fluoreszenz wurde mit dem Fluorometer bei 615 nm ermittelt. Von den gemessenen Counts wurden Mittelwerte gebildet und entsprechend Formel 3.3 in Prozentzahlen umgerechnet. Um die Güte des Tests abzuschätzen, wurde eine Spontanlyse des Assays errechnet:

$$(3.4) \quad \% \text{ Spontanlyse des Assays} = \frac{\text{Spontanlyse - Background}}{\text{Maximallyse - Background}} \cdot 100$$

Diese sollte nicht mehr als 30 % betragen.

3.9.2 Versuchsdurchführung adhaerenter BATDA-release-Assay

Entsprechend dem LDH-Assay wurden adhaerente Targetzellen mit MOCK, zellfreiem Viruslysat oder zellassoziertem Wildtypvirus infiziert und fünf Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte mittels Multikanalpipette eine rasche Zugabe von 0,05 µl / Well BATDA-Ligand mit nachfolgender 30-minütiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Der Ligandenüberschuss konnte durch fünfmaliges Waschen mit 200 µl Basismedium_{10%FCS} / Well und anschließendem Abklopfen entfernt werden. Zur Schonung des Zellrasens sollte dabei auf eine ausreichende Polsterung geachtet und keine Pipette verwendet werden. Die Effektorzellen wurden in den verschiedenen E:T-Ratios zu einem Endvolumen von 200 µl / Well in Triplikaten hinzugegeben. Die Kontrollen setzten sich aus dem BG mit 200 µl Basismedium 1 / Target- und Effektorzellfreiem Well, der SL mit 200 µl Basismedium 1 / Well, sowie der ML mit resuspendierten Targetzellen in 20 µl Lysis Buffer und 180 µl Basismedium 1 pro Well zusammen. Anschließend wurden die Effektorzellen auf die Targetzellen zentrifugiert (100 g, 2 min, Bremse und Beschleunigung 3, 37 °C) Nach einer zweistündigen Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ wurde entsprechend dem non-adhaerenten-BATDA-release-Assay fortgefahren.

3.9.3 ADCC (antibody-dependent cell-mediated-cytotoxicity)

Die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ist eine Variante der zellulären Zytotoxizität bei der Targetzellen in Gegenwart targetzellspezifischer Antikörper durch Effektorzellen zerstört werden. Letztere binden sich über den schwach affinen Fc_γ-Rezeptor (Fc_γRIII: CD¹⁶⁺) an die auf der Targetzelloberfläche befindlichen Antigen-Antikörper-Komplexe. Der vom Serumkomplement unabhängige zytotoxische Effekt ist 1965 von E. Möller [Möller E., 1965] erstmals beobachtet und besonders von den Arbeitsgruppen um Mac Lennan und Perlmann untersucht worden [Callewaert D.M. et al., 1978; Pearson G.A., 1978; Perlmann P. et al., 1975].

Die ADCC-wirksamen Antikörper gehören meistens der IgG-Klasse (IgG1 oder IgG3) an, in einigen Fällen sind jedoch auch IgM- oder IgE-Antikörper effektiv [Capron A. et al., 1977; Lamon E.W. et al., 1977]. Unabdingbare Voraussetzung für die Aktivität von Effektorzellen in der ADCC ist der Besitz von Fc-Rezeptoren und eine zytotoxische Kapazität. Normale B-Lymphozyten besitzen zwar Fc-Rezeptoren, reagieren aber nicht zytotoxisch. Andererseits sind spezifische T-Killerzellen mangels Fc-Rezeptoren nicht in der Lage antikörperbedeckte Targetzellen zu lysieren. So kann es bei bestimmten genetischen Defekten, zum Beispiel bei Patienten mit einem Chediak-Higashi-Syndrom oder „beige“-Mäusen, zum Verlust der zytotoxischen Aktivität Fc-Rezeptor-positiver Leukozyten kommen [Roder J.C. & Dowe A.K., 1979; Roder J.C. et al., 1980].

Sowohl Lymphozyten, als auch Monozyten, Granulozyten und Eosinophile können ADCC-aktiv sein [Cerottini J.C. & Brunner K.T., 1974; Mac Lennan I.C.M. et al., 1976; Zigelboim J. et al., 1976]. Besonders wirksam sind die nach Aufarbeitung mittels Ficoll-Hypaque isolierten nicht adhaerenten, nicht phagozytierenden mononukleären Zellen, die wegen ihres Fehlens an T- und B-Zellmarkern als „Null-Lymphozyten“ oder „Null-Zellen“ bezeichnet werden. Für die ADCC wirksamen Nullzellen wurde der Begriff „Killer (K)-Zellen“ geschaffen [Editorial comment, 1973; Perlmann P. et al., 1975; Perlmann H. et al., 1976]. Die mit diesen Zellen eng verwandten NK-Zellen stellen die Hauptmediatoren der ADCC dar. Dabei hat das IgG eine Erkennungsfunktion, d.h. Zielzellen die Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden haben, werden präferentiell abgetötet.

Als Targetzellen sind prinzipiell sämtliche Zelltypen in Gegenwart spezifischer Antikörper durch eine ADCC zerstörbar, somit auch Bakterien und Parasiten [Butterworth A.E. et al., 1977].

In vivo spielt die ADCC möglicherweise bei der Transplantatabstoßung, bei der Tumorabwehr, sowie bei Autoimmunkrankheiten eine bedeutende Rolle.

Versuchsdurchführung:

Zum Nachweis der lytischen Reaktion wurde der non-adhaerente BATDA-release-Assay angewendet.

3.10 Durchflusszytometrie

Das Ziel der Durchflusszytometrie ist die Charakterisierung von Oberflächenantigenen und die Kontrolle der Reinheit isolierter Zellpopulationen nach CD⁵⁶⁺-Anreicherung oder Ficoll-Hypage-Aufarbeitung.

Bei der analytischen Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) werden die in Suspension vorliegenden Zellen über eine Stahlkapillare mittels Überdruck in die Messküvette des FACS-Gerätes gepumpt. In dieser vibrierenden Fließkammer werden die Zellen so stark beschleunigt, dass sie den Analysepunkt einzeln aneinandergereiht passieren (hydrodynamische Fokussierung). Dort trifft ein Argon-Laserstrahl mit einer Wellenlänge von 488 nm auf die Zellen und registriert dabei gleichzeitig Fluoreszenz- und Streulichtsignale. Diese Information wird von Photomultiplikatoren erfasst und in elektrische Impulse umgewandelt. Zur graphischen Visualisierung weist ein Analog-Digital-Konverter jeder Signalspannung eine Zahl von 0 bis 1024 zu. Die Fluoreszenzsignale werden logarithmisch verstärkt und auf einer vier Dekaden umfassenden Skala (0,1 bis 1.000) auf dem Bildschirm dargestellt.

Über die Erfassung der Lichtstreuung wird die Zellmorphologie ermittelt. Dabei werden die Streulichtsignale in zwei Kategorien gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (forward light scatter, FSC) ist hierbei ein Maß für die Größe (Querschnittsfläche) der einzelnen Zellen. Durch das im 90° Winkel gemessene Seitwärtsstreulicht (side light scatter, SSC) erhält man eine Aussage über die Granularität beziehungsweise das Kern-Plasma-Verhältnis (Refraktionsindex) der gemessenen Zellen. Auf diese Weise lassen sich verschiedene Zelltypen durch ihre charakteristische Darstellung im Diagramm FSC gegen SSC

abgrenzen. So stellen sich beispielsweise Granulozyten als große Zellen mit hoher Plasma / Kern-Relation und granuliertem Zytoplasma dar, während Lymphozyten als kleine Zellen mit hohem Kernanteil auftreten.

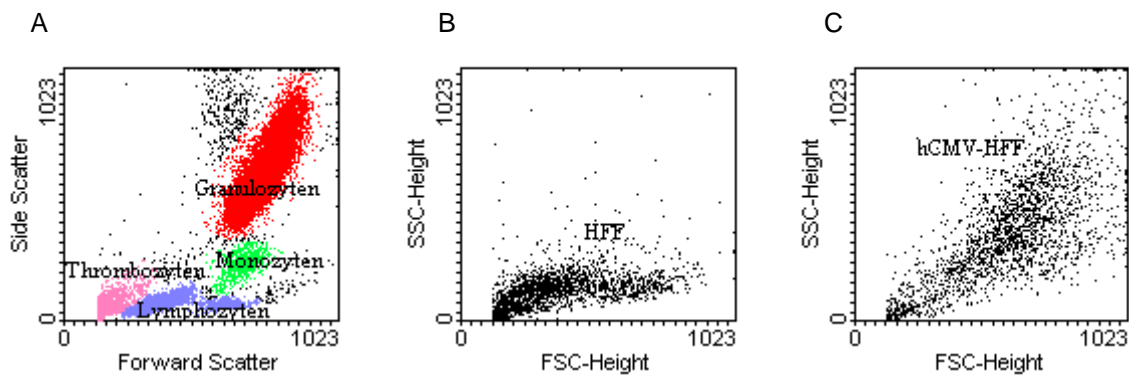


Abb.7: **Morphologie von Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Lymphozyten im Durchflusszytometer** (A). Während nichtinfizierte Fibroblasten (HFF) eher klein und ungranuliert erscheinen (B), stellen sich hCMV infizierte Fibroblasten (hCMV-HFF) im Durchflusszytometer als große granuliert Zellen dar (C).

Um die Oberflächeneigenschaften der Zellen untersuchen zu können, werden sie mit monoklonalen Antikörpern markiert. Diese Antikörper sind bereits an fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt (direkte Immunfluoreszenz) oder werden nach Bindung des antigenspezifischen Primärantikörpers in einem zweiten Schritt mit einem Fluorochrommarkierten Sekundärantikörper markiert (indirekte Immunfluoreszenz).

Der Fluoreszenzfarbstoff absorbiert Energie des einfallenden monochromatischen Laserlichtes und gibt ‚ungenutzte‘ Energie wieder in Form von Wärme und elektromagnetischen Schwingungen ab. Diese geringere Energie wird in Form von Photonen längerer Wellenlänge emittiert, welche durch Photomultiplikatoren quantifiziert werden. Die gebundene Farbstoffmenge ist proportional der Anzahl der Bindungsstellen, womit die emittierte Fluoreszenzintensität ein Maß für diese Bindungsstellen darstellt.

Es stehen verschiedene Farbstoffe zur Verfügung, die alle bei einer spezifischen Wellenlänge (488 nm bei FITC [Fluorescein-Isothiocyanat, rot, Emissionswellenlänge von 530 +/- 30 nm, Emissionsmaximum bei 525 nm], PE

[Phycoerythin, grün, Emissionswellenlänge von 585 +/- 42 nm, Emissionsmaximum bei 575 nm] und PerCP [Peridinin Chlorophyll Protein]) angeregt werden, jedoch unterschiedliche Fluoreszenz-Emissionsgipfel aufweisen und somit gleichzeitig eingesetzt werden können.

Versuchsdurchführung (Vorbereitung der Zellproben):

Adhaerent wachsende Zellkulturen wurden zunächst abtrypsiniert, pelletiert (400 g, 5 min, 37 °C), um Einzelzellen zu erhalten in Basismedium sorgfältig resuspendiert und mittels Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Dabei wurde die Inkubation mit Trypsin möglichst kurz gehalten, um einer proteolytischen Schädigung von zu untersuchenden Oberflächenmolekülen entgegenzuwirken.

Bei non-adhaerent wachsenden Zellen (Pbmnc oder CD⁵⁶⁺ angereicherte NK-Zellen) konnte die Anzahl an Lymphozyten durch das Advia[®]-Zählgerät des Hämatologischen Routinelabors der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen bestimmt werden.

Die zu messende Zellsuspension wurde dann auf eine Konzentration von $1 \cdot 10^6$ Zellen / ml eingestellt und je FACS-Röhrchen 100 µl dieser Zellverdünnung vorgelegt. Um eine gleichmäßige Färbung auf der gesamten Zelloberfläche zu gewährleisten, demgemäß ‚Patching‘- (reaktives Zerklumpen der Zelloberflächenproteine bei Kreuzvernetzung mit Immunglobulinmolekülen) und ‚Capping‘- (an das Patching anschließende durch den Zellstoffwechsel verursachte haubenförmige Anreicherung der Klumpen auf einer Zellseite) Phänomene zu vermeiden, erfolgte ein Waschgang mit fixierendem FACS-Flow (4 °C, 208 r / mm, 400 g, 10 min, Beschleunigung 9, Bremse 7) und eine Inkubation bzw. Aufbewahrung der Proben bei ca. 4 °C im Eisbad [Taylor R.B. et al., 1971].

Entsprechend dem gewünschten Testansatz wurde eine direkte (3.10.1), indirekte (3.10.2) oder intrazelluläre (3.10.3) Immunfluoreszenzfärbung angeschlossen.

3.10.1 Direkte Immunfluoreszenzfärbung

Nach Zugabe der gewünschten Kombination von jeweils 5 µl fluoreszierender monoklonaler Antikörper und kurzem Vortexen der FACS-Röhrchen, wurde für 30 min bei 4 °C lichtgeschützt inkubiert. Um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen, wurden die einzelnen FACS-Röhrchen mit FACS-Flow™ aufgefüllt, abzentrifugiert (4 °C, 208 r / mm, 400 g, 10 min, Beschleunigung 9, Bremse 7) und der Überstand dekantiert. Nach resuspendieren der gefärbten Zellen erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Einstellungen des FACS-Scan wurden stets mit einer Negativkontrolle (Simultest™Control) und mehreren Positivkontrollen vorgenommen. Die während den Messungen aufgenommenen Daten wurden anschließend in Zwei-Parameter-Dot-Plot-Fenstern dargestellt. Hier erschien jedes detektierte Ereignis entsprechend ihrer zwei gemessenen Fluoreszenzen als Punkt (vgl. Abb. 7).

3.10.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung (Quantitative Durchflusszytometrie)

Mittels QIFIKIT® der Firma DAKO ist im Vergleich zur herkömmlichen Durchflusszytometrie eine quantitative Aussage über die Antigendichte auf der Zelloberfläche möglich. Außerdem erlaubt diese quantitative Messungsmethode aufgrund der Berechnung eines auf Kalibrierungsbeads bezogenen absoluten Wertes einen Vergleich verschiedener Messungen.

Die Zellen, deren Antigenexpression bestimmt werden sollen, werden mit einem gegen das entsprechende Antigen gerichteten Mausantikörper inkubiert. Anschließend werden die Zellproben, Einstellungs- und Kalibrierungsbeads mit einem FITC-konjugierten Ziege-gegen-Maus gerichteten Sekundärantikörper markiert und im Durchflusszytometer gemessen. Die Einstellungsbeads dienen dabei der Verstärkereinstellung des FITC-Kanals. Sie wird so gewählt, dass sich eine unmarkierte Beadpopulation im Bereich 10^0 und 10^1 darstellt. Eine zweite Population mit einer hohen Anzahl an Mausantikörpern sollte dabei noch

deutlich im Analysenfenster zur Darstellung kommen. Diese Einstellungen müssen nun für alle weiteren Messungen beibehalten werden.

Die Antikörperbindungsfähigkeit der Zellproben wird über eine Kalibrierungskurve ermittelt, die über das geometrische Mittel von im Durchflusszytometer gemessenen Kalibrierungsbeads mit fünf bekannten Antikörperdichten erstellt wird. Durch rechnerischen Vergleich lassen sich dann Aussagen über die Antigendichte der im Anschluss untersuchten Zellproben machen.

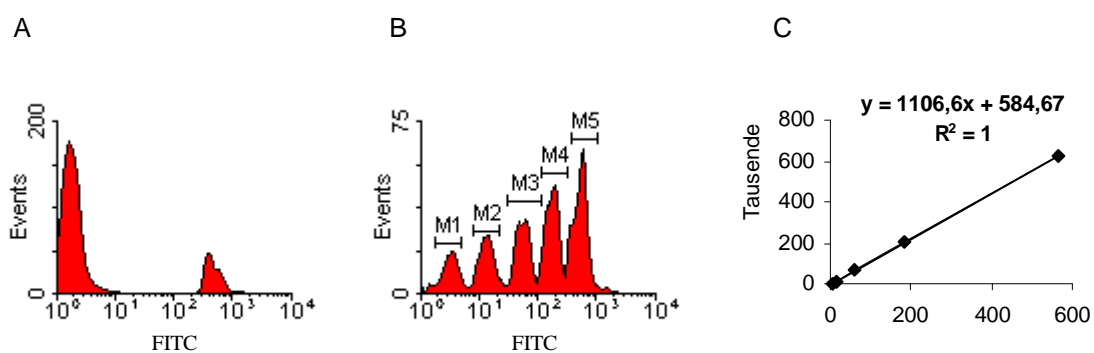


Abb.8: Set-Up-Beads im Histogramm zur Einstellung des Verstärkerkanals (A). Anschließend können die fünf unterschiedlichen Populationen der Calibration-Beads gemessen und im Histogramm dargestellt werden (B). Nach Zuordnung der geometrischen Mittel jeder Population mit ihren entsprechenden Antikörperdichten kann eine Kalibrierungskurve erstellt werden, nach deren Geradengleichung (im Beispiel: $y = 1106,6x + 584,67$) nachfolgend gemessene Antikörperdichten ermittelt werden können (C).

Versuchsdurchführung:

Die Zellproben wurden mit einer gesättigten Konzentration des entsprechenden unkonjugierten, primären, monoklonalen Mausantikörpers versetzt. Als Kontrollantikörper diente das FITC-konjugierte Ziege-gegen-Maus Immunglobulinfragment F(ab')₂. Nach kurzem Vortexen der FACS-Röhrchen wurde für 45 Minuten bei 4 °C unter Lichtabschluss inkubiert. Kurz vor Ablauf der Inkubationszeit wurden jeweils 100 µl der gut resuspendierten Einstellungsbeads (Set-Up-Beads) und Kalibrierungsbeads (Calibration-Beads) in zwei FACS-Röhrchen zugegeben. Diese wurden zusammen mit den Zellprobenröhrchen mit FACS-Flow™ aufgefüllt, abzentrifugiert (4 °C, 208 r / mm, 400 g, 10 min, Beschleunigung 9, Bremse 7) und dekantiert. Nach diesem Waschschrift ließ sich der gebundene Primärantikörper bzw. die Beads durch einen zweiten, FITC-

markierten Ziege-gegen-Maus gerichteten Antikörper nachweisen, dessen F(ab')₂-Immunglobulinfragment gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet war. Hierzu wurden 100 µl 1 : 20 mit FACS-Flow™ verdünnten Sekundärantikörper den jeweiligen FACS-Röhrchen zugegeben. Nach einer lichtgeschützten Inkubation für 45 Minuten bei 4 °C folgte ein weiterer Waschschrift mit FACS-Flow™ (4 °C, 208 r / mm, 400 g, 10 min, Beschleunigung 9, Bremse 7). Anschließend wurden die Zellproben durch Vortexen der FACS-Röhrchen resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen.

Mittels Set-Up-Beads wurde zuerst die Verstärkung des FITC-Kanals eingestellt. Hier kam die unmarkierte Beadpopulation in einem logarithmischen Histogramm zwischen 10⁰ und 10¹ zur Darstellung. Aufgrund der Autofluoreszenz der Fibroblasten wurden auch diese in die Voreinstellungen miteinbezogen. Somit konnte gewährleistet werden, dass sowohl die Zellproben, als auch die unmarkierten und hochmarkierten Beads auf der Skala des Histogramms zur Darstellung kamen. Anschließend wurde bei unveränderter Geräteeinstellung die Fluoreszenzintensität der Calibration-Beads und der Zellproben gemessen. Die Messergebnisse wurden in Form von Ein-Parameter-Histogrammen dargestellt, in denen die gemessene Fluoreszenz gegenüber der Anzahl der Zellen aufgetragen wurde (Abb. 8). Das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität konnte dann der zugehörigen Histogrammstatistik entnommen werden.

Um die vereinzelt Werte der Fluoreszenzintensität zu erhalten, mussten die fünf Populationen der Calibration-Beads im Histogramm markiert werden. Die resultierenden geometrischen Mittel (mFi = mittlere Fluoreszenzintensität) wurden dann in einem Koordinatensystem der entsprechenden monoklonalen Antikörperdichte (mAk), die chargenspezifisch der Packungsbeilage des Kits zu entnehmen war, zugeordnet. Über eine Ausgleichsgerade ließ sich die Hauptform der Geradengleichung $y = mx + b$ ($\mathbf{mAk} = m \times \mathbf{mFi} + b$) anzeigen. Indem die entsprechende mFi der untersuchten Zellproben in diese Formel eingesetzt wurde, konnte somit deren mAk berechnet werden.

Um die sich proportional zur mAk verhaltenden Antigendichte der Fibroblasten (Specific Antibody Binding Capacity) zu bestimmen, musste nun noch die Antikörperdichte der Negativkontrolle (BAE = Background Antibody Equivalent) von der Anzahl der pro Zelle gebundenen Primärantikörper der jeweiligen Zellprobe (ABC = Antibody Binding Capacity) abgezogen werden:

$$(3.5) \quad SABC = ABC - BAE$$

3.10.3 Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

Hintergrund:

Durch ein 2-Komponenten-Kit zur Fixierung und Permeabilisierung von Zellen können intrazelluläre Antigene, z.B. zytoplasmatische oder nukleäre Enzyme, Onkoproteine, Cytokine, Immunglobuline und CD-Marker nachgewiesen werden.

Über die permeabilisierte Zellmembran kann so zum Beispiel das 76 kD schwere immediate early antigen (IEA) pp72 (UL122), welches frühestens zwei Stunden nach der hCMV-Infektion im infizierten Zellkern nachweisbar ist, über eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung mit einem FITC-konjugierten Ziege-gegen-Maus gerichteten Antikörper markiert werden. Eine anschließende MHC-Klasse-1-Zelloberflächenfärbung ermöglicht dabei eine qualitative Aussage dieser Expression an hCMV-infizierten E13 positiven Zellen versus einer MOCK-infizierten E13 negativen Zellfraktion.

Versuchsdurchführung:

Die Zellproben wurden mit 50 µl Paraformaldehyd (Reagenz A von Fix & Perm) resuspendiert und mittels 15-minütiger Dunkelinkubation bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend folgte ein Waschschriff mit FACS-Flow™ (21 °C, 208 r / mm, 400 g, 5 min, Beschleunigung 5, Bremse 5). Die Zellsuspension wurde

dann für weitere 15 Minuten mit 50 µl Saponinhaltiger Lösung (Reagenz B von Fix & Perm) bei Raumtemperatur lichtgeschützt permeabilisiert und mit 2 ml FACS-Flow™ pro FACS-Röhrchen gewaschen (21 °C, 208 r / mm, 400 g, 5 min, Beschleunigung 5, Bremse 5). Nach Zugabe von 5 µl monoklonalen IgG1_k Maus-Antikörper gegen das hCMV IE-Antigen pp72 (ORF: UL122) wurden die resuspendierten Zellproben 45 Minuten bei 4 °C unter Lichtabschluss inkubiert.

Nach der Entfernung überschüssiger Primärantikörper (21 °C, 208 r/mm, 400 g, 5 min, Beschleunigung 5, Bremse 5) erfolgte die Bindung des FITC-markierten Ziege-gegen-Maus Antikörpers, dessen F(ab')₂-Immunglobulinfragment gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet war, durch Vermischen der Zellproben mit 5 µl Sekundärantikörper und lichtgeschützter Inkubation bei 4 °C für 15 Minuten. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen mit 2 ml FACS-Flow™ aufgefüllt, pelletiert (21 °C, 208 r / mm, 400 g, 5 min, Beschleunigung und Bremse 5) und der Überschuss dekantiert. Eventuell ungebundene Antikörper, die durch diesen Waschvorgang nicht restlos entfernt werden konnten, wurden durch 10 µl sterilfiltriertes Mausserum (0,80 µm) abgesättigt. Nach einer 15-minütigen Dunkelinkubation bei 4 °C folgte eine direkte Immunfluoreszenzfärbung mit 5 µl HLA-ABC-PE. Dazu wurde die Zellsuspension weitere 15 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Restlicher Antikörper konnte mit FACS-Flow durch zentrifugieren (21 °C, 208 r/mm, 400 g, 5 min, Beschleunigung und Bremse 5) und dekantieren entfernt werden. Nachdem die gefärbten Zellen wieder resuspendiert wurden, erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer mittels Zwei-Parameter-Dot-Plot-Fenstern.

3.10.4 Aquisition und Analyse der durchflusszytometrischen Daten

Von jeder Probe wurden 20.000 Ereignisse gemessen. Die Aquisition und Analyse der durchflusszytometrischen Daten erfolgte unter Verwendung der Herstellersoftware CellQuest Version 3.18 von Becton-Dickinson und WinMDI.

3.11 Statistik

Alle durchgeführten Versuche wurden mindestens zweimal, in der Regel jedoch dreimalig, wiederholt (Ausnahme: LFA-3-Blockade (Erstversuch zur Fortsetzung der Forschungsarbeit) und ADCC eines Patienten gegen wtGR3 infizierte Targetzellen (zu wenig Probenmaterial anderer Patienten aufgrund ihrer Aplasie)). Um das umfangreiche Datenmaterial leichter zugänglich zu machen, wurden die Daten in der Regel als arithmetischer Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) graphisch dargestellt.

Um die statistische Signifikanz der Unterschiede einzelner Ergebnisse zu berechnen, wurde der Wilcocksen-Ranx-Test für paarige Stichproben parametrischer Verteilungen sowie der gepaarte T-Test angewendet. Statistische Signifikanz wurde bei p-Werten von $< 0,05$ angenommen.

Die statistische Evaluation der Rohdaten entstand in Zusammenarbeit mit dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen mit Hilfe eines kommerziellen Statistikprogrammes (NCSS 6.0.21). Die rechnerische Auswertung und graphische Darstellung der Daten erfolgte über die Programme Excel[®], Word[®] und PowerPoint[®] (Microsoft[®] Office 2000 und Office Home and Student 2007, USA).

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung adhaerenter BATDA-release-Assay und non-adhaerenter BATDA-release-Assay

Da der BATDA-release-Assay für die verwendeten adhaerenten Targetzellen noch nicht etabliert war, mussten die Maximallyse und der Ligandeneinbau in Vorversuchen analysiert werden. Es zeigte sich, dass die Maximallyse unter Verwendung von Triton X 100, Ultraschall und Delfia[®] Lysis Buffer gleich effektiv war. Daher wurde die Maximallyse in den nachfolgenden Versuchen, dem ursprünglichen Protokoll entsprechend, mit Delfia[®] Lysis Buffer durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Ultraschalllyse mitgeführt.

Der Ligandeneinbau wurde für die zwei Testsysteme bei drei Targetzelllinien (HFF, MRHF und MRC-5) unter Verwendung von vier unterschiedlichen Konzentrationen der DELFIA[®] BATDA-Liganden zu fünf verschiedenen Inkubationszeiten auf 96-Well- und 384-Well-Mikrotiterplatten ermittelt. Die Konzentration mit der geringsten Spontanlyse wurde bei einer Markierung der Targetzellen mit 2,5 µl DELFIA[®] BATDA-Ligand pro $1 \cdot 10^6$ Zellen mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten im non-adhaerenten Europium-Assay und 0,05 µl / Well DELFIA[®] BATDA-Ligand bei 30minütiger Inkubation im adhaerenten Europium-Assay erreicht.

4.2 Vergleich LDH-Assay, adhaerenter BATDA-release-Assay und non-adhaerenter BATDA-release-Assay

Zur Analyse des am Besten geeigneten Testverfahrens wurde der 4-Stunden-LDH-Assay mit dem adhaerenten 2-Stunden-Europium-Assay und dem non-adhaerenten 2-Stunden-Europium-Assay auf ihre Zelllyse durch stimulierte CD⁵⁶⁺-NK-Zellen bei jeweils drei gesunden Probanden verglichen. Als Targetzellen dienten mit dem klinischen Virusisolat WT-MR infizierte primäre humane Fibroblasten (HFF), sowie nichtinfizierte Kontrollen. Datenpunkte wurden durch

eine Mittelwertberechnung der Einzelwerte festgelegt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung vom Mittelwert wider. Die prozentuale Spontanlyse war im adhaerenten BATDA-release-Assay (MOCK: MW = $33,41 \pm 3,31$; wtMR: MW = $27,07 \pm 10,69$) höher als beim non-adhaerenten BATDA-release-Assay (MOCK: MW = $8,52 \pm 9,23$; wtMR: MW = $12,83 \pm 2,70$). Der LDH-Assay zeigte die geringste spontane Lyseaktivität (MOCK: MW = $3,35 \pm 4,56$; wtMR: MW = $1,15 \pm 0,58$).

Anhand der graphischen Auswertung der ermittelten Daten wird deutlich, dass die prozentual gemessene spezifische Lyse im non-adhaerenten BATDA-release-Assay in allen Versuchen im Durchschnitt am höchsten lag (MOCK: MW IL2 = $33,17 \pm 14,73$; MW IL15 = $65,42 \pm 28,88$; wtMR: MW IL2 = $23,56 \pm 20,27$; MW IL15 = $52,53 \pm 23,25$), gefolgt vom adhaerenten BATDA-release-Assay (MOCK: MW IL2 = $23,64 \pm 4,32$; MW IL15 = $45,81 \pm 4,10$; wtMR: MW IL2 = $8,78 \pm 2,42$; MW IL15 = $21,22 \pm 15,44$) und dem LDH-Assay mit der geringsten Lyseeigenschaft (MOCK: MW IL2 = $4,08 \pm 3,39$; MW IL15 = $8,12 \pm 6,60$; wtMR: MW IL2 = $1,33 \pm 1,31$; MW IL15 = $5,86 \pm 7,19$). Insgesamt zeigte sich bei allen drei Testmethoden bei den WT-MR-infizierten HFF eine geringere prozentuale spezifische Lyse im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle.

Da die durch Trypsin bedingte Membranschädigung der Targetzellen wegfällt, stellt der LDH-Assay und der adhaerente Europium-release-Assay im Vergleich zum non-adhaerenten BATDA-release-Assay ein zellschonenderes Testverfahren dar. Andererseits wurde bei Experimenten mit adhaerenten Targetzellen eine höhere Effektorzahl benötigt, da nach der Hypothese der Kontaktinhibition [Casella et al., 2000] bei einer 96-well-Mikrotiterplatte die Fibroblastenproliferation erst ab einer Zelldichte von ca. 20.000 HFF / Well stagniert. Die Einführung von 384-well-Mikrotiterplatten ermöglichte, entsprechend non-adhaerenter Testverfahren, eine Untersuchung mit lediglich 5.000 Targetzellen pro Well. Dennoch konnte die Zellzahl / Well nicht sicher konstant gehalten werden, da infizierte Fibroblasten bei hoher Infektiositätsrate ihre Adhärenz verlieren.

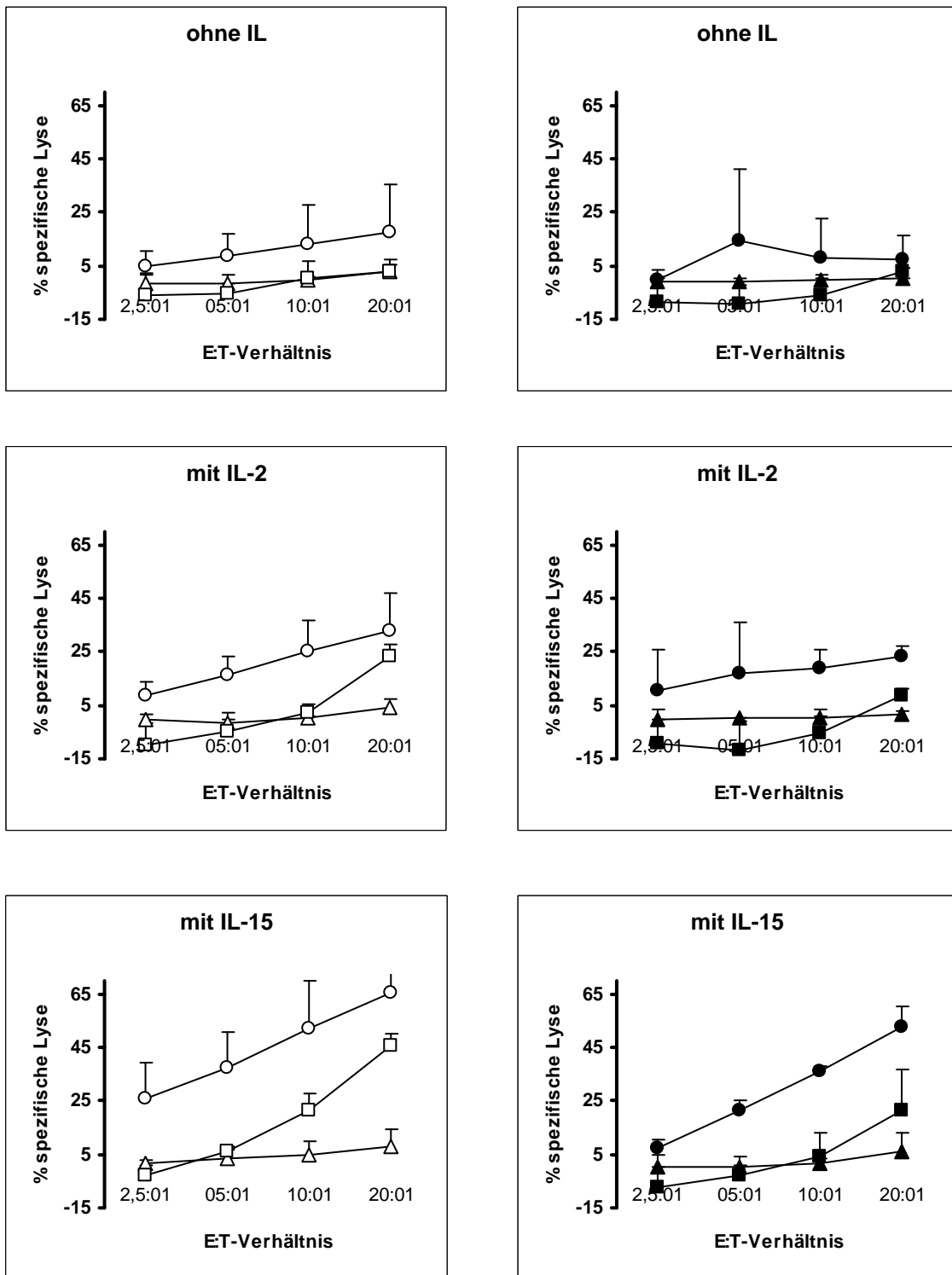
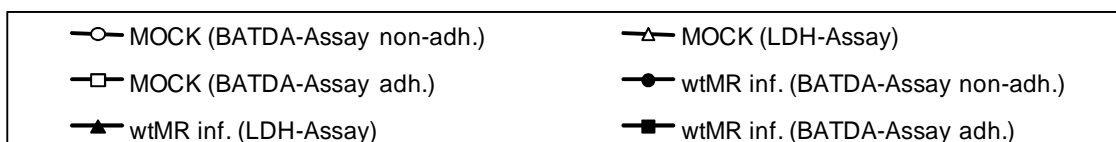


Abb.9: Zytotoxische Aktivität von angereicherten NK-Zellen drei gesunder Probanden gegen MOCK- (links) und WT-MR- (rechts) infizierte HFF. Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen. Spezifische Lyseaktivität in absteigender Reihenfolge: non-adhaerenter BATDA-release-Assay > adhaerenter BATDA-release-Assay > LDH-Assay. Alle drei Testverfahren zeigen bei WTMR infizierten HFF eine signifikant niedrigere NK-Zellaktivität im Vergleich zur Kontrollzelllinie (p = 0,5).



Im Vergleich mit den drei Testmethoden wurde für nachfolgende Experimente der non-adhaerenten BATDA-release-Assay bevorzugt. Als Maßnahme für eine zellschonendere Dissoziation wurde eine kürzere Einwirkdauer von Trypsin (1 min), eine 20minütige ‚Erholungsinkubation‘ und ein paralleler Kontrollansatz mit MOCK-infizierten HFF gewählt. Auf die Möglichkeit, den Zellbestand mit einem Schaber vollständig vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen, wurde aufgrund mechanischer Zerstörung der Fibroblasten und fehlender Einzelzellsuspension verzichtet.

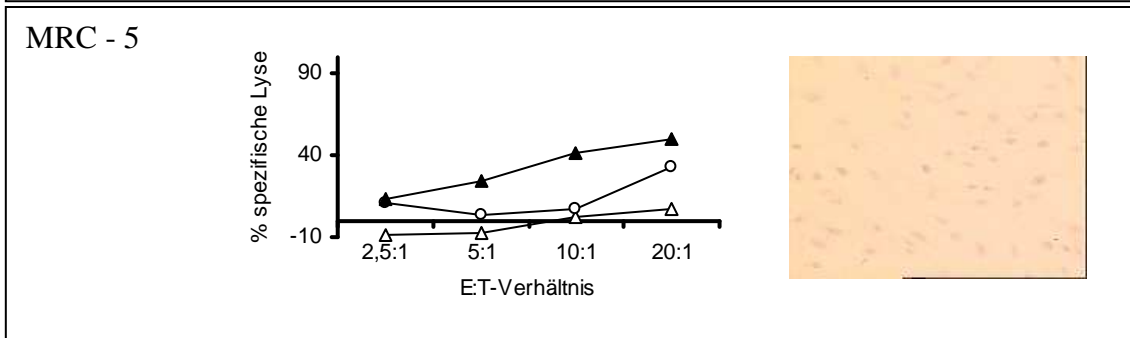
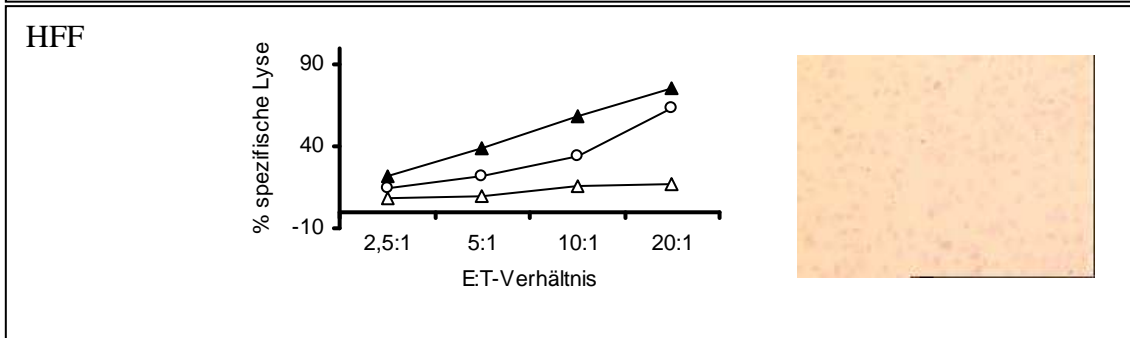
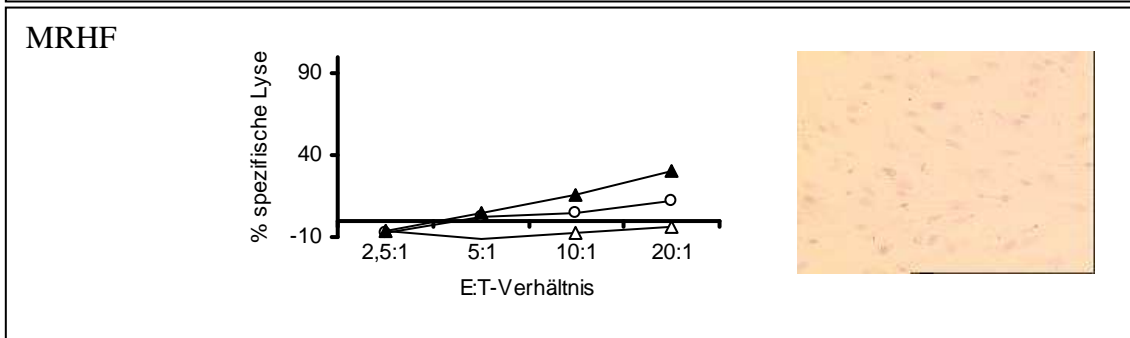
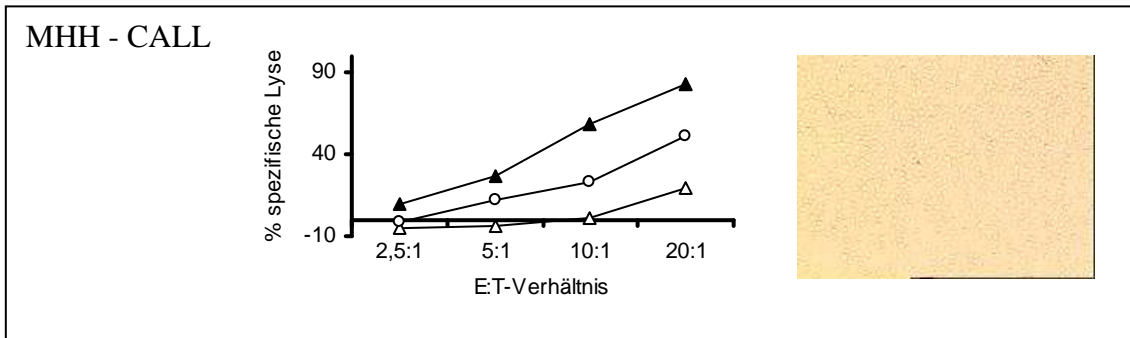
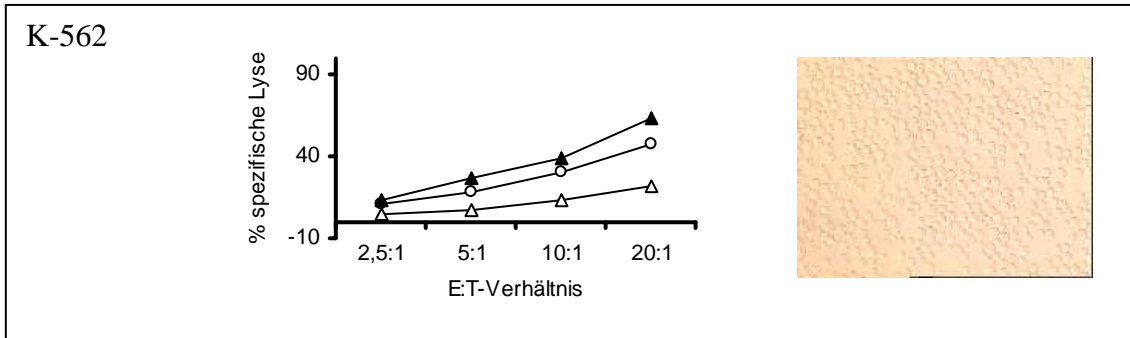
Die stichprobenhafte Überprüfung mit einer Supravitalfärbung unmittelbar nach dem abtrypsinieren der Targetzellen ergab eine Vitalität von 96,84 % (HFF) bzw. 92,83 % (virusinfizierte HFF).

4.3 Non-adhaerenter BATDA-release-Assay: Vergleich verschiedener Zelllinien

Zur Ermittlung der geeigneten Targetzellen für den non-adhaerenten BATDA-release-Assay wurden verschiedene Zelllinien miteinander verglichen. Die für Europium-Assays bisher standardisierten nicht adhaerenten leukämischen Zelllinien K-562 (human chronic myeloid leukemia in blast crisis) und MHH-CALL-4 (human acute B-cell precursor leukemia) konnten nicht verwendet werden, da sie kein Target für eine humane Zytomegalievirusinfektion darstellen. Daher wurden die zur routinemäßigen Zytomegalievirusanzucht bereits etablierten Fibroblastenkulturen HFF (human foreskin fibroblasts), MRC-5 (human embryonic lung fibroblasts) und MRHF (human newborn foreskin fibroblasts) hinsichtlich ihrer Permission durch primäre klinische Virusisolate verglichen.

Folgende Seite:

Abb.10: **Zytotoxische Aktivität von angereicherten NK-Zellen gegen die Zelllinien K-562, MHH-CALL, MRHF, HFF und MRC-5.** Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen. Die spezifische Lyseraten der Zelllinien HFF, K-562 und MHH-CALL entsprechen einander. Dagegen weisen die Zelllinien MRC-5 und MRHF eine niedrigere NK-Zell-Aktivität auf.



—△— ohne IL
—○— mit 40U IL2
—▲— mit 1ng/ml IL15

Die Zelllinien MRC-5 und MRHF erwiesen sich als äußerst schwer zu infizierende Targetzellen mit einem sehr langsamen Viruswachstum. Außerdem zeigte sich bei den infizierten MRC-5-Zellen ab einem höheren Infektiositätsgrad ein Verlust der Adhaerenz.

Nach Abbildung 10 zeigt die Lysierbarkeit durch Natürliche Killerzellen bei nichtinfizierten HFF eine vergleichbare Zytotoxizität wie bei den nicht adhaerenten Zelllinien K-562 und MHH-CALL-4. Nichtinfizierte MRC-5 und MRHF wiesen dagegen eine geringere spezifische Lyserate auf. Die Spontanlysen der verschiedenen Zelllinien entsprachen einander.

Um die zytotoxische NK-Zell-Aktivität nichtinfizierter versus hCMV-infizierter Targetzellen vergleichen zu können, sowie ihre Abhängigkeit durch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle aufzuzeigen, wurde als primäres Ziel eine möglichst hochgradige hCMV-Infektion angestrebt. Daher wurden für die nachfolgenden Versuche humane Vorhautfibroblasten (HFF) als Targetzellen verwendet.

4.4 Non-adhaerenter BATDA-release-Assay: ADCC

Die Funktionalität der Natürlichen Killerzellen wurde nach der CD⁵⁶⁺-„Magnetic-activated-cell-sorting“(MACS)-Anreicherung in einem zweistündigen nicht-adhaerenten BATDA freisetzenden Zytotoxizitätstest gegen nichtinfizierte HFF untersucht. Gleichzeitig wurde die lytische Potenz der NK-Zellen gegenüber Fibroblasten verglichen, die mit folgenden Virusstämmen fünf Tage inkubiert wurden:

- AD-169 (Laborstamm)
- WT-MR1 (Multiresistenter Virusstamm)
- WT-GR1 (Ganciclovirresistenter Virusstamm)
- WR-S1 (sensitiver Virusstamm aus Muttermilch isoliert)
- WT-GR2 (Ganciclovirresistenter Virusstamm)

Als Ausgangszellen für die MACS-Anreicherung dienten über eine Ficoll-Dichte-zentrifugation (siehe 3.6) gewonnene pBMNC freiwilliger Spender. Zusätzlich wurde die zytotoxische Potenz von PBMNC stammzelltransplan- tierter Kinder der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen ermittelt. Die Reinheit der NK-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Um die Stimulierbarkeit durch Interleukine zu testen, fand eine Inkubation der Effektorzellen über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in Basismedium 2 statt. Dabei wurde einem Teil der Zellen 40 U / ml IL-2 bzw. 1 ng / ml IL-15 zugesetzt. Um die spezifische Lyse zu erhöhen, konnte durch Zugabe von 50 µg / ml 5 %-igen Cytoglobulin[®] (anti-hCMV IgG) der Mechanismus der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC nach 3.9.3) ausgenutzt werden.

Aufgrund der niedrigen Effektorzellzahl fand die Versuchsdurchführung in einem Effektor : Target-Verhältnis von 20 : 1 bis 2,5 : 1 statt. Um den Infektiositätsgrad zu kontrollieren, wurden von den infizierten Fibroblasten nach der in Kapitel 3.4 beschriebenen Methode Präparate angefertigt. Die Infektiositätsrate lag bei den Versuchsansätzen stets über 95 %.

4.4.1 Zytotoxische Aktivität gegen AD-169-infizierte Targetzellen

Während unstimulierte NK-Zellen fünf gesunder Probanden bei AD-169-infizierten Fibroblasten keine signifikante lytische Aktivität aufwiesen, zeigte sich durch Zugabe von anti-hCMV IgG mit einer 18 %-igen spezifischen Lyserate bei einem E:T-Verhältnis von 20:1 ($p = 0,00$) eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität im Vergleich zu nichtinfizierten Fibroblasten.

Eine Inkubation der NK-Zellen mit IL-2 erhöhte diese spezifische Lyserate auf 30 % ohne ($p = 0,001$) bzw. 38 % mit Zusatz von anti-hCMV IgG ($p = 0,00$). Eine Stimulation der NK-Zellen mit IL-15 ergab mit 58 % spezifischer Lyse eine deutliche Zunahme der zytotoxischen Aktivität gegen AD-169-infizierte HFF ($p =$

0,047), wobei durch die Zugabe von anti-hCMV IgG mit 75 % die höchste spezifische Lyse erreicht wurde ($p = 0,00$) (Abb. 11).

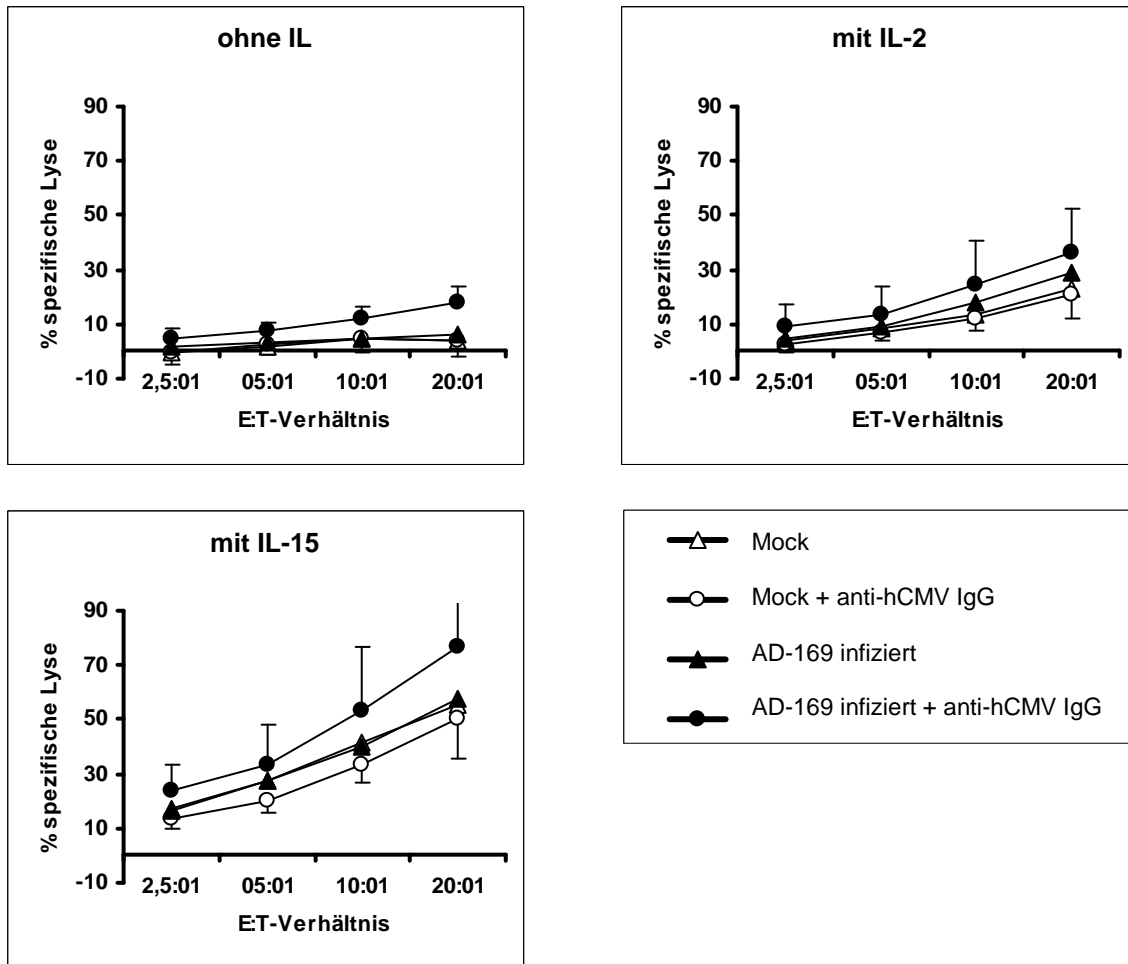


Abb.11: Zytotoxische Aktivität und ADCC von angereicherten NK-Zellen acht gesunder Probanden gegen AD-169- und MOCK-infizierte HFF. Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität von jeweils fünf Probanden ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen. Im Vergleich mit unstimulierten Effektorzellen wird die spezifische Lyserate durch IL-2 + anti-hCMV IgG, IL-15 + anti-hCMV IgG und durch die alleinige Zugabe von anti-hCMV IgG gesteigert ($p < 0,05$ in jedem Fall, gepaarter T-Test). AD-169 infizierte Targetzellen haben gegenüber MOCK-infizierten Fibroblasten eine signifikant höhere spezifische Lyserate ($p < 0,05$, gepaarter T-Test).

Nachfolgend wurde die lytische Aktivität der PBMNC von 11 verschiedenen Patienten nach allogener SCT gegen AD-169- und MOCK-infizierte Targetzellen getestet. Die Patienten wiesen folgende Diagnosen auf: akute Leukämie ($n = 6$), Lymphom ($n = 2$), myelodysplastisches Syndrom ($n = 2$) und schwere aplastische Anämie ($n = 1$).

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv betrug die mittlere Anzahl an CD^{56+} -Zellen $295 \pm 274 / \mu l$ am 30. Tag nach der Transplantation (Abbildung 12). Dagegen war zum gleichen Zeitpunkt die Population der T-Lymphozyten mit $25 \pm 55 / \mu l$ im Vergleich zu gesunden Probanden deutlich vermindert. Sie stieg erst im Verlauf der Rekonstitution wieder an, während der relative Anteil an NK-Zellen abnahm (1 Jahr nach der Transplantation: $367 \pm 314 / \mu l$ CD^{56+} -Zellen, $939 \pm 717 / \mu l$ CD^{3+} -Zellen).

Somit stellen die NK-Zellen in der Frühphase der Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation die dominierende Lymphozytenpopulation dar.

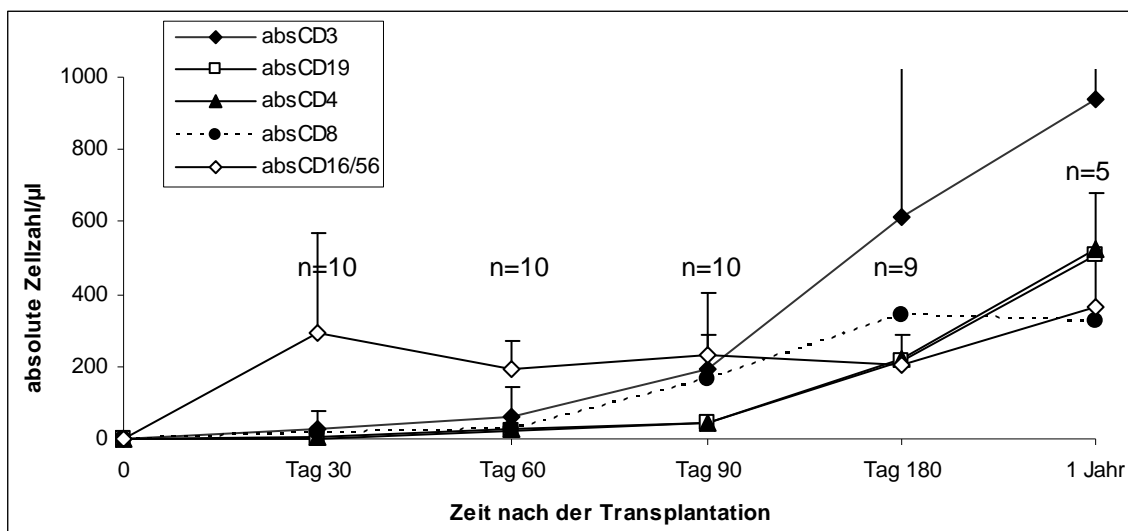


Abb. 12: **Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation:** Die CD^{56+} -NK-Zellen sind am 30. Tag nach der SCTX erhöht und nehmen nach einem Jahr relativ zur Lymphozytenzahl wieder ab. Die CD^{3+} -T-Zellen sind am 30. Tag postTX noch relativ vermindert und rekonstituieren erst nach einem Jahr vollständig. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 10$ Patienten. Nummern (n) oberhalb der Datenpunkte: Anzahl der Patienten für die Entstehung dieser Datenpunkte.

Im Vergleich mit MOCK-infizierten Targetzellen wurden AD-169-infizierte Fibroblasten durch unstimulierte Effektorzellen von 64 % der Patienten (7 / 11) deutlich höher lysiert ($p = 0,00$) (Abb. 13a). Eine Inkubation der PBMNC mit IL-2 oder IL-15 erhöhte bei diesem Anteil der Patienten die spezifische Lyse zusätzlich ($p = 0,00$) (Abb. 13b & c). Zudem konnte hier durch Zugabe von anti-hCMV IgG die spezifische Lyseaktivität weiter gesteigert werden ($p = 0,00$).

Indessen lag die spezifische Lyseaktivität der anderen Patientengruppe (4 / 11; 36 %) stets unter 10 % (Abb. 13d-e). Die PBMNC beider Patientengruppen wiesen den gleichen Anteil an CD⁵⁶⁺ NK-Zellen auf und zeigten keinen Unterschied in der Zeitspanne zwischen Stammzelltransplantation und Versuchsdurchführung (Tab. 9).

	NK-Aktivität	
	niedrig (n=4)	hoch (n=7)
Patientenalter	12,5	11
CMV-Status		
- D-R-	2	5
- D+R+	2	0
- D-R+	0	1
- D+R-	0	1
Versuchszeitpunkt postTX	144 (82-213)	127 (42-202)
CD56 ⁺ NK-Zellen (%)	36 (27-62)	27 (17-50)

Tab.9: **Eigenschaften der Patientengruppen mit niedriger und hoher NK-Zell-Aktivität.** D = Donor; R = Recipients; Versuchszeitpunkt post TX = Mediane Anzahl der Tage nach allogener Stammzelltransplantation bei Bestimmung der NK-Zell-Aktivität (p = 0,9); CD⁵⁶⁺ NK-Zellen = mediane Prozentzahl an CD⁵⁶⁺CD¹⁶⁺ Lymphozyten zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente (p = 0,2).

Folgende Seite:

Abb.13: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von mononukleären Zellen allogener stammzelltransplantierten Patienten gegen AD-169- und MOCK-infizierte HFF.** Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind MNC von Patienten mit hoher (7 / 11; links) und niedriger (4 / 11; rechts) zytolytischer Aktivität. Sie sind unstimuliert, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimuliert. Im Vergleich mit unstimulierten Effektorzellen wird die spezifische Lyserate durch IL-2 + anti-hCMV IgG, IL-15 + anti-hCMV IgG und durch die alleinige Zugabe von anti-hCMV IgG gesteigert (p < 0,05 in jedem Fall, gepaarter T-Test). AD-169 infizierte Targetzellen haben gegenüber MOCK-infizierten Fibroblasten eine signifikant höhere spezifische Lyserate (p < 0,05, gepaarter T-Test).

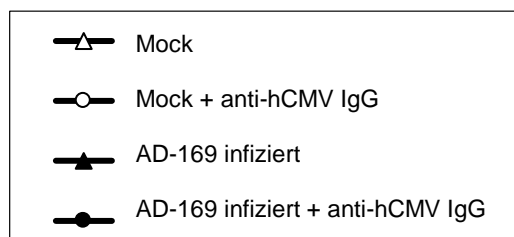
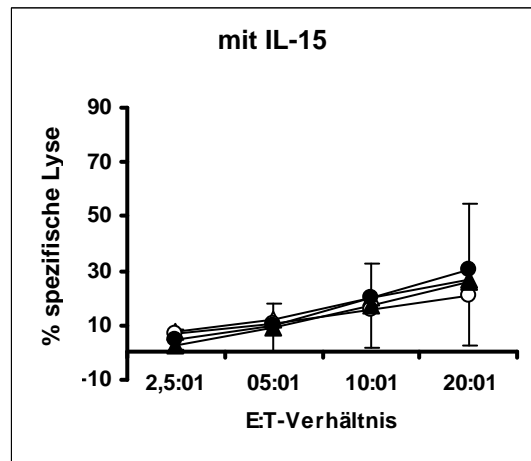
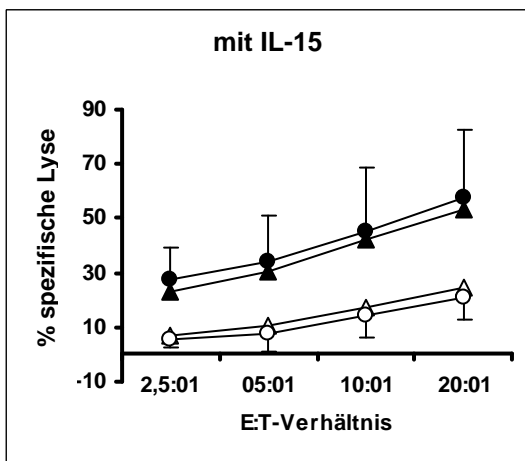
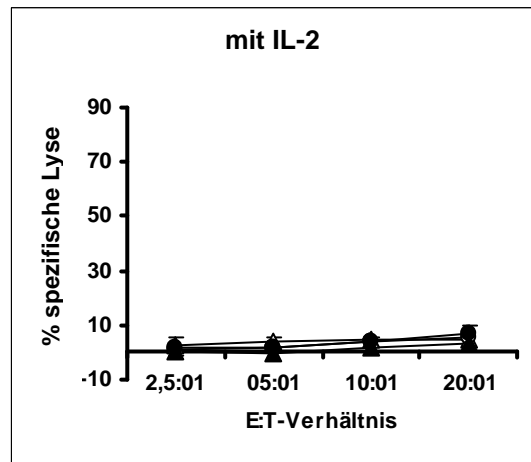
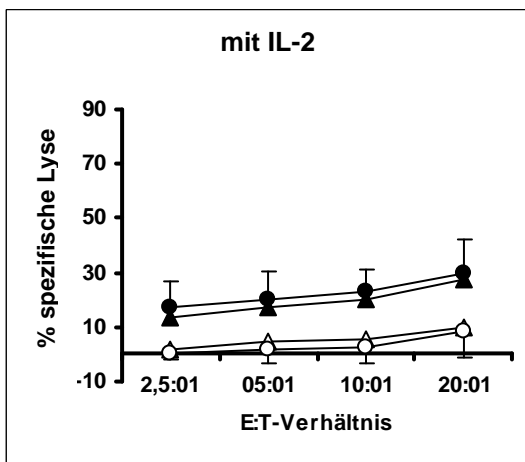
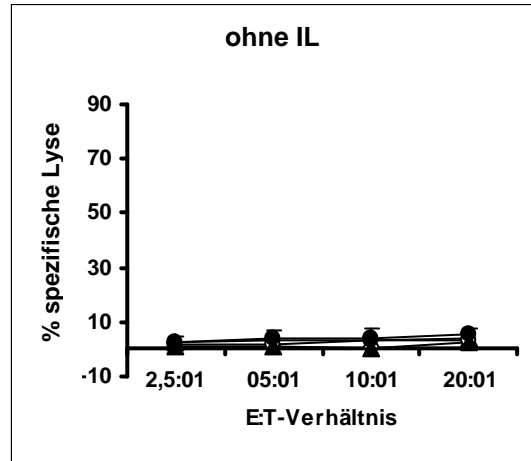
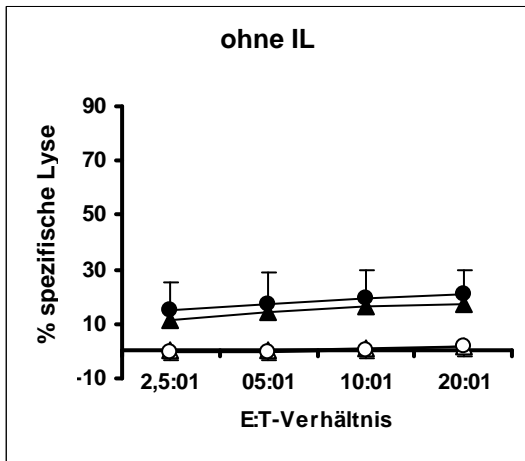


Abbildung 14 vergleicht die spezifische „Netto Lyse“ beider Patientengruppen. Diese errechnete sich als Differenz der spezifischen Lyse AD-169-infizierter Targetzellen abzüglich der spezifischen Lyse nichtinfizierter Targetzellen bei einem E : T-Verhältnis von 20:1.

Durch Inkubation mit 50 µg / ml Cytoglobulin[®] zeigte sich bei allen Testansätzen eine gesteigerte lytische Aktivität.

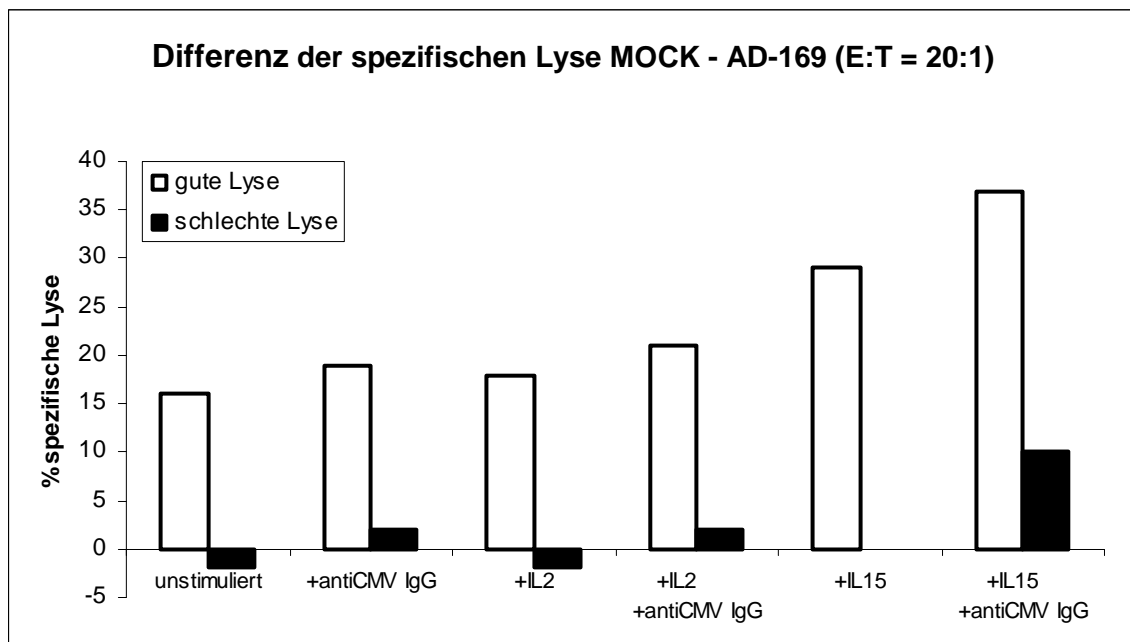


Abb.14: Vergleich der Patientengruppen mit hoher (7 / 11) und niedriger (4 / 11) zytotoxischer Aktivität. Dargestellt ist die Differenz zwischen der spezifischen Lyse AD-169-infizierter Targetzellen und MOCK-infizierter Targetzellen bei einem E : T-Verhältnis von 20 : 1 („Netto-Lyse“ = AD -169 Lyse - MOCK Lyse).

4.4.2 Zytotoxische Aktivität gegen WT-MR-infizierte Targetzellen

Die Effektorzellen fünf gesunder Probanden gegen WT-MR-infizierte Fibroblasten zeigten im Vergleich mit MOCK-infizierten Targetzellen eine deutlich geringere zytotoxische Aktivität (Abb. 15).

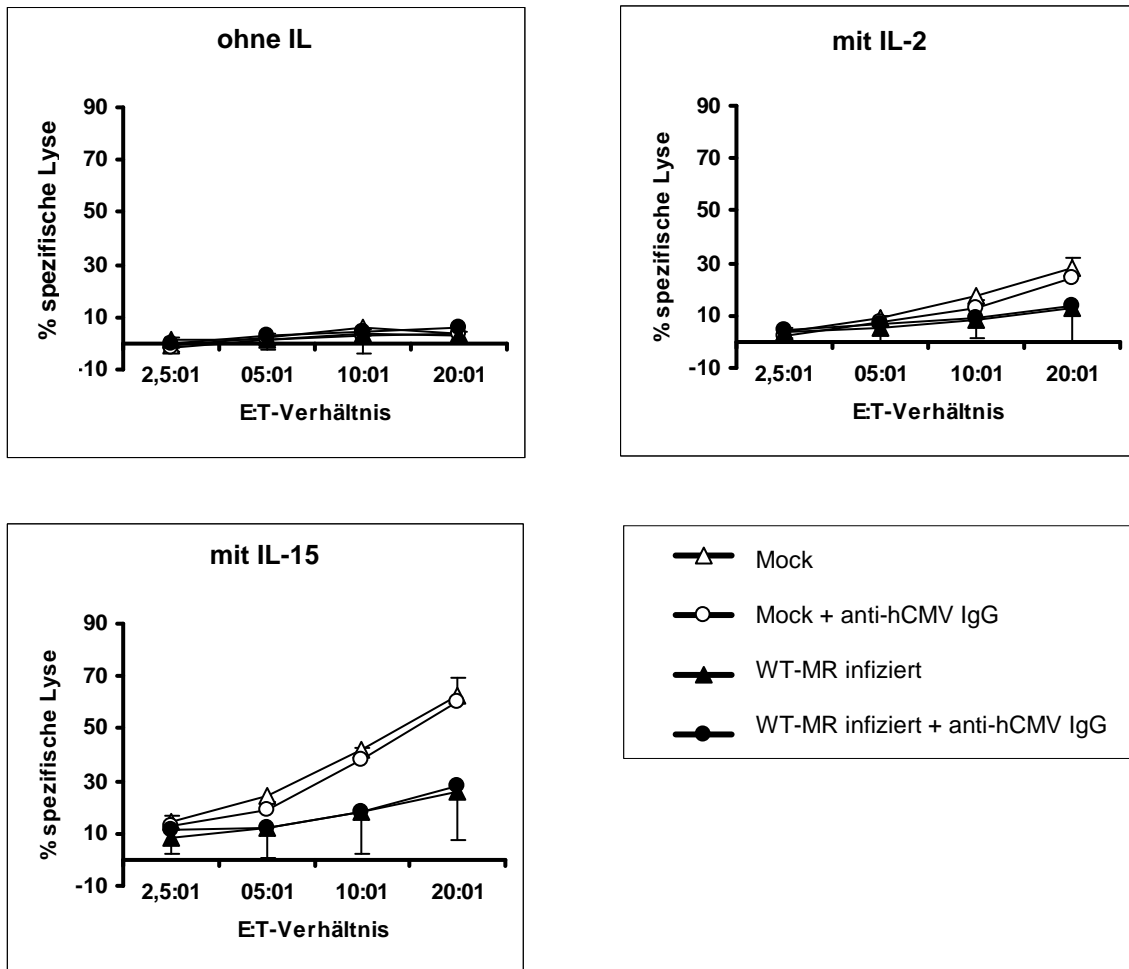


Abb.15: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von angereicherten CD⁵⁶⁺ NK-Zellen fünf gesunder Probanden gegen WT-MR- und MOCK-infizierte Targetzellen.** Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen.

Die zytotoxische Potenz der PBMNC zweier Patienten mit akuter Leukämie nach allogener SCT (Abb. 16) gegen WT-MR-infizierten HFF war ebenfalls deutlich geringer als bei MOCK-infizierten Fibroblasten (Abb. 17).

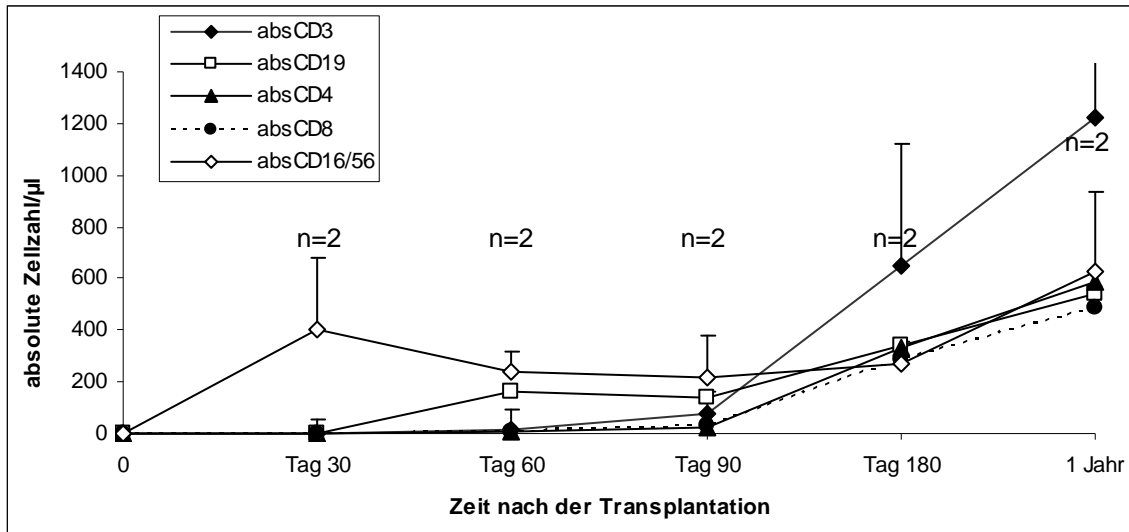
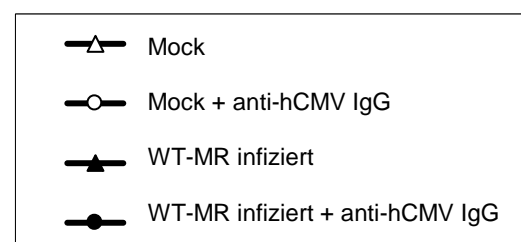
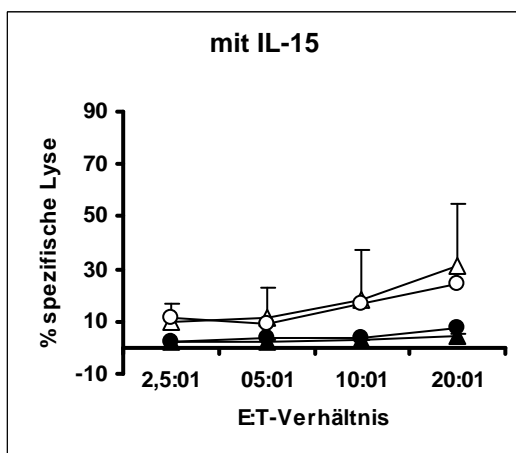
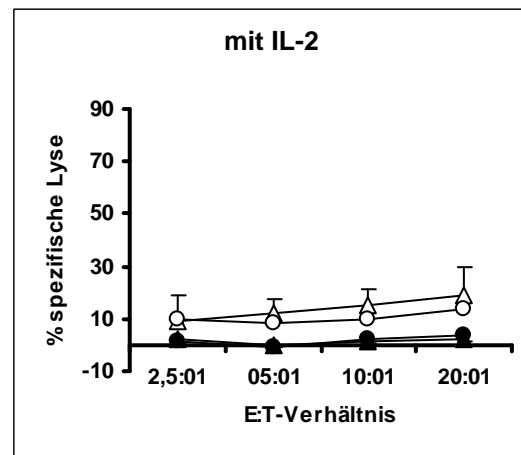
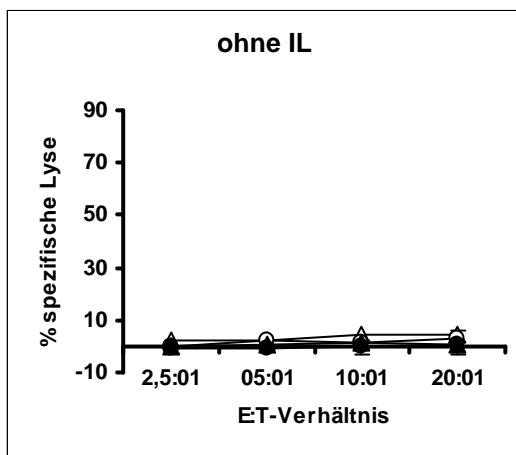


Abb 16: **Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation:** Die CD⁵⁶⁺-NK-Zellen sind am 30. Tag nach der SCTX erhöht und nehmen nach 1 Jahr relativ zur Lymphozytenzahl wieder ab. Die CD³⁺-T-Zellen sind am 30. Tag postTX noch relativ vermindert und rekonstituieren erst nach einem Jahr vollständig. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 2 Patienten. Nummern (n) oberhalb der Datenpunkte: Anzahl der Patienten für die Entstehung dieser Datenpunkte.



Patientenalter	8
CMV-Status	
- D-R-	1
- D+R+	0
- D-R+	1
- D+R-	0
Versuchszpkt. postTX	146 (93-199)
CD56 ⁺ NK-Zellen (%)	26 (12-40)

Vorige Seite:

Abb.17: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von mononukleären Zellen allogenen stammzelltransplantierten Patienten gegen WT-MR- und MOCK-infizierte HFF.** Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimuliert, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimuliert.

4.4.3 Zytotoxische Aktivität gegen WT-GR1-infizierte Targetzellen

Ebenso wiesen die NK-Zellen von fünf gesunden Probanden gegenüber WT-GR1-infizierten Targetzellen im Vergleich mit MOCK-infizierten Fibroblasten eine geringere lytische Aktivität auf.

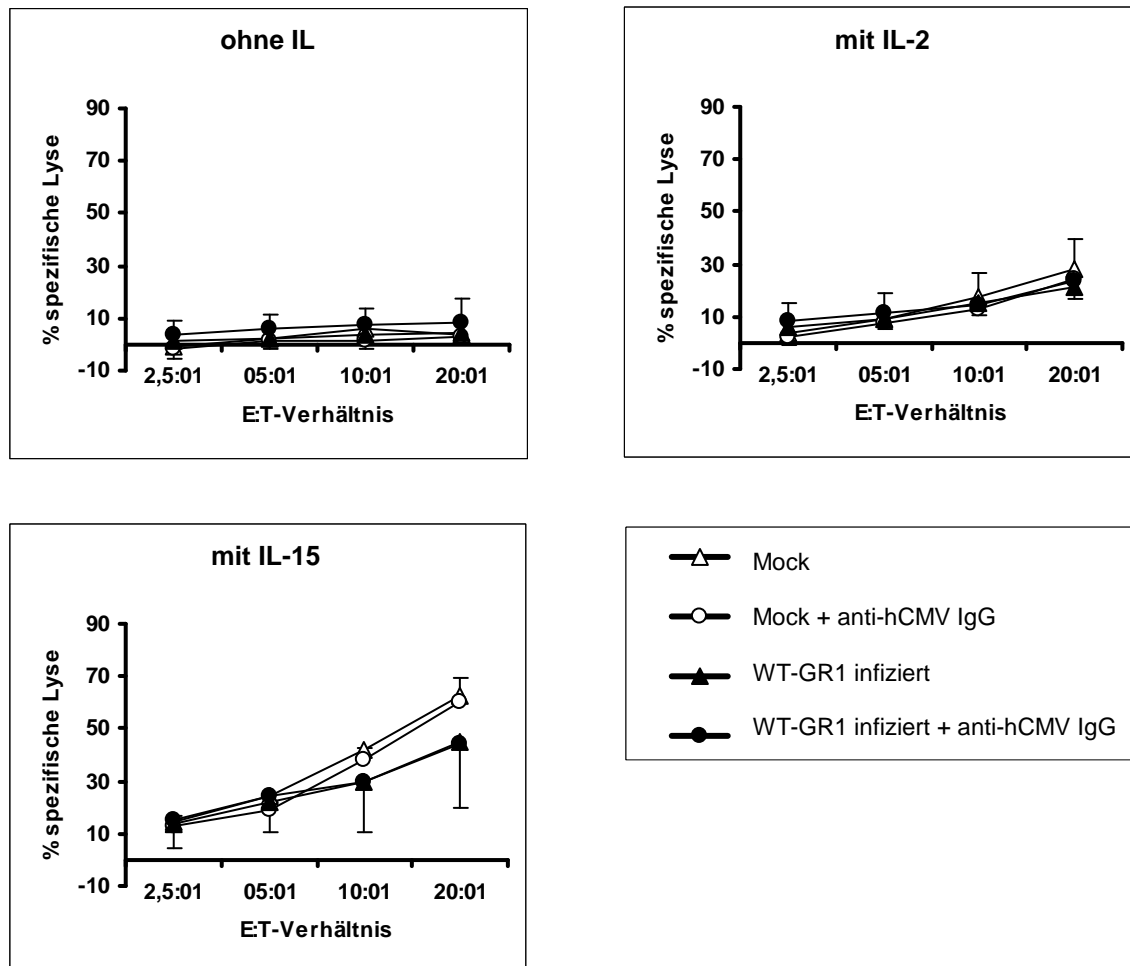


Abb.18: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von angereicherten CD⁵⁶⁺ NK-Zellen fünf gesunder Probanden gegen WT-GR-1- und MOCK-infizierte Targetzellen.** Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen.

Entsprechend zeigten die PMNC von drei Patienten mit akuter Leukämie ($n = 2$) und myelodysplastischen Syndrom ($n = 1$) nach allogener SCT (Abb. 19) im Versuch mit WT-GR1-infizierten HFF eine geringere spezifische Lyserate als bei nichtinfizierten Targetzellen (Abb. 20).

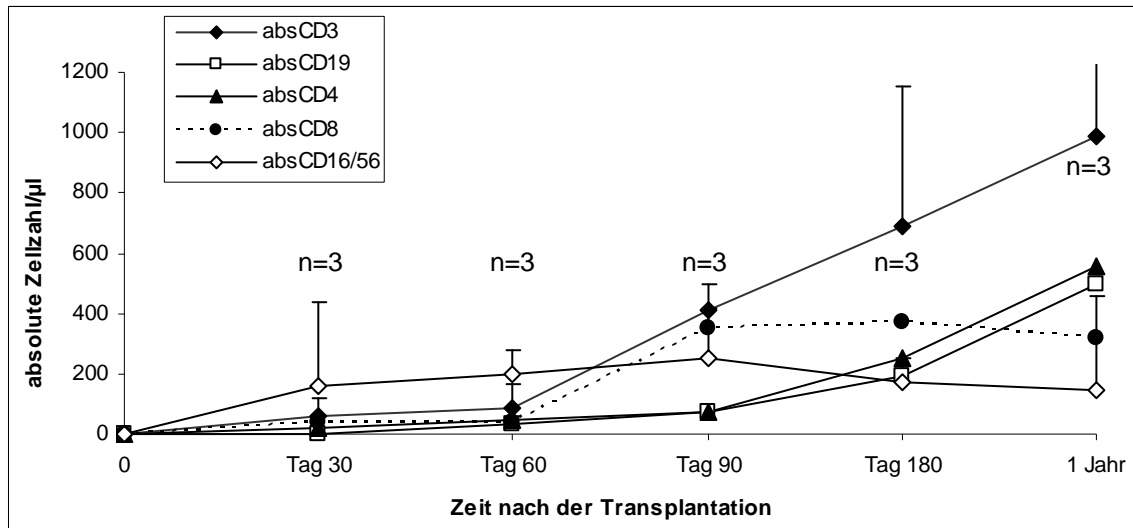


Abb.19: **Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation:** Die CD^{56+} -NK-Zellen sind am 30. Tag nach der SCTX erhöht und nehmen nach einem Jahr relativ zur Lymphozytenzahl wieder ab. Die CD^{3+} -T-Zellen sind am 30. Tag postTX noch relativ vermindert und rekonstituieren erst nach einem Jahr vollständig. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von $n = 3$ Patienten. Nummern (n) oberhalb der Datenpunkte: Anzahl der Patienten für die Entstehung dieser Datenpunkte.

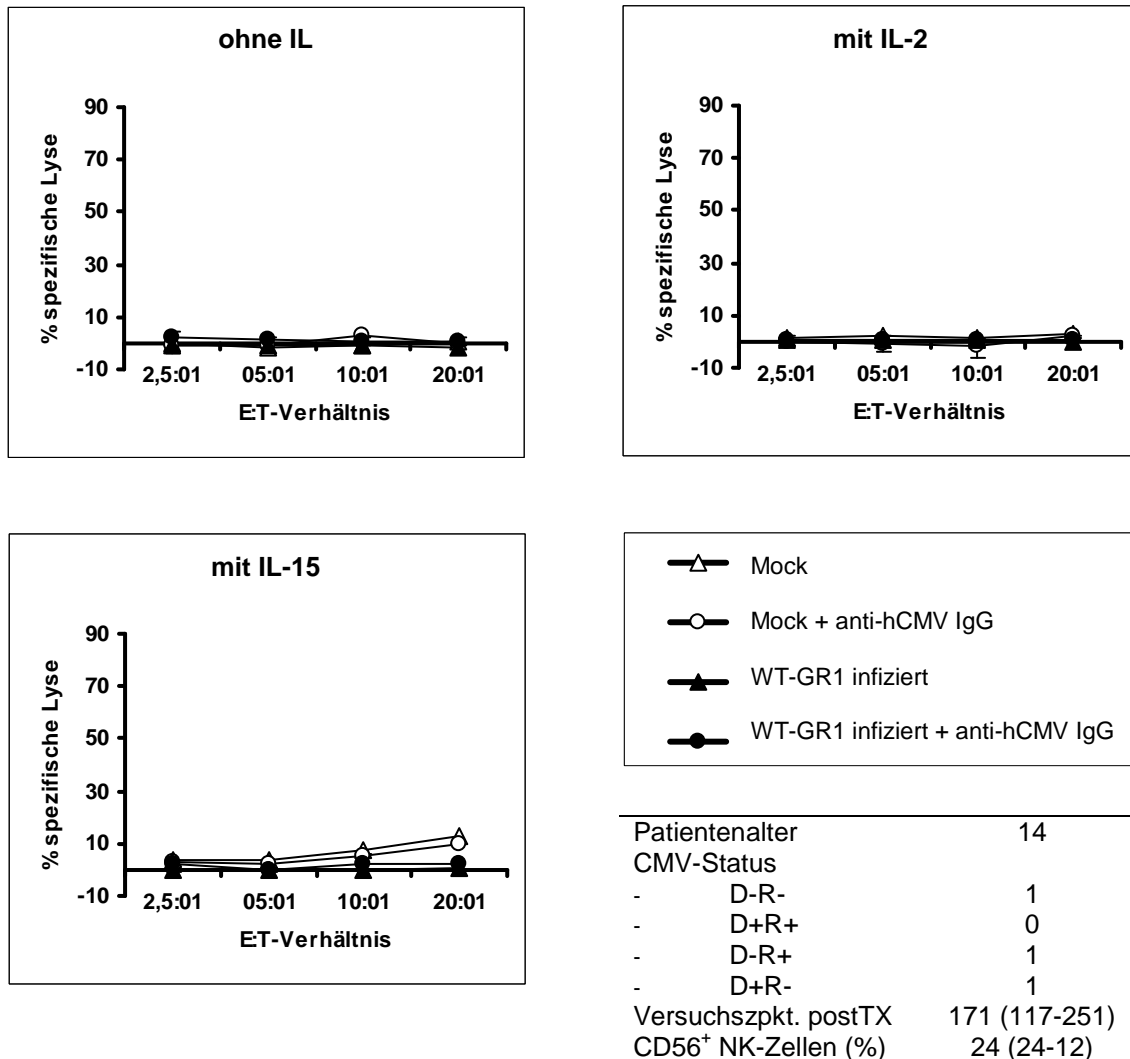


Abb.20: Zytotoxische Aktivität und ADCC von mononukleären Zellen allogener Stammzelltransplantierte Patienten gegen WT-GR1- und MOCK-infizierte HFF. Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimuliert, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimuliert.

4.4.4 Zytotoxische Aktivität gegen WT-S1-infizierte Targetzellen

Das spezifische Lyseverhalten der NK-Zellen fünf gesunder Probanden gegen WT-S1-infizierte HFF war hier ebenfalls geringer als bei nichtinfizierten Targetzellen.

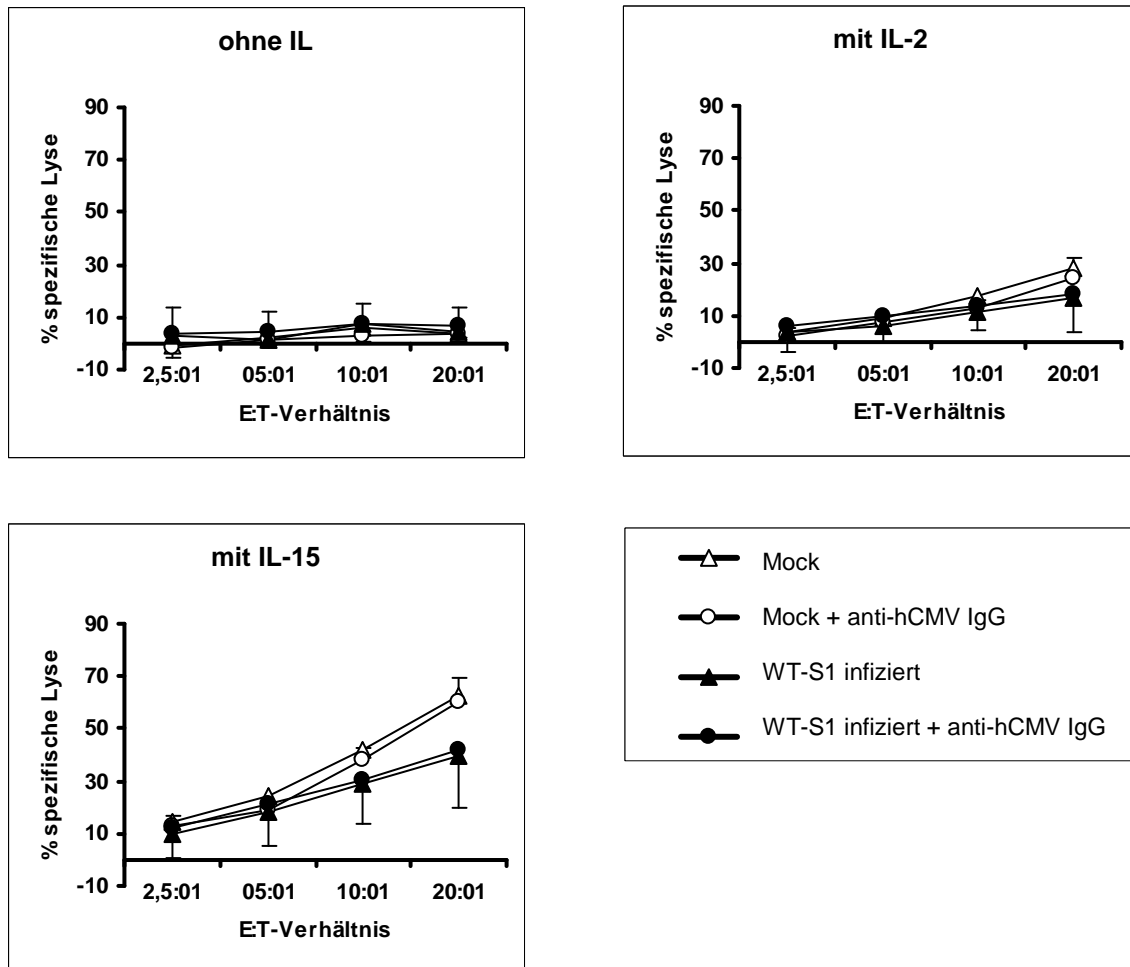


Abb.21: Zytotoxische Aktivität und ADCC von angereicherten CD⁵⁶⁺ NK-Zellen fünf gesunder Probanden gegen WT-S1- und MOCK-infizierte Targetzellen. Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen.

Die PBMNC zweier Patienten mit akuter Leukämie (n = 1) und Lymphom (n = 1) nach allogener SCT (Abb. 22) zeigten ebenfalls geringere Lyseraten gegen WT-S1-infizierte Fibroblasten im Vergleich zur MOCK-Kontrolle (Abb. 23).

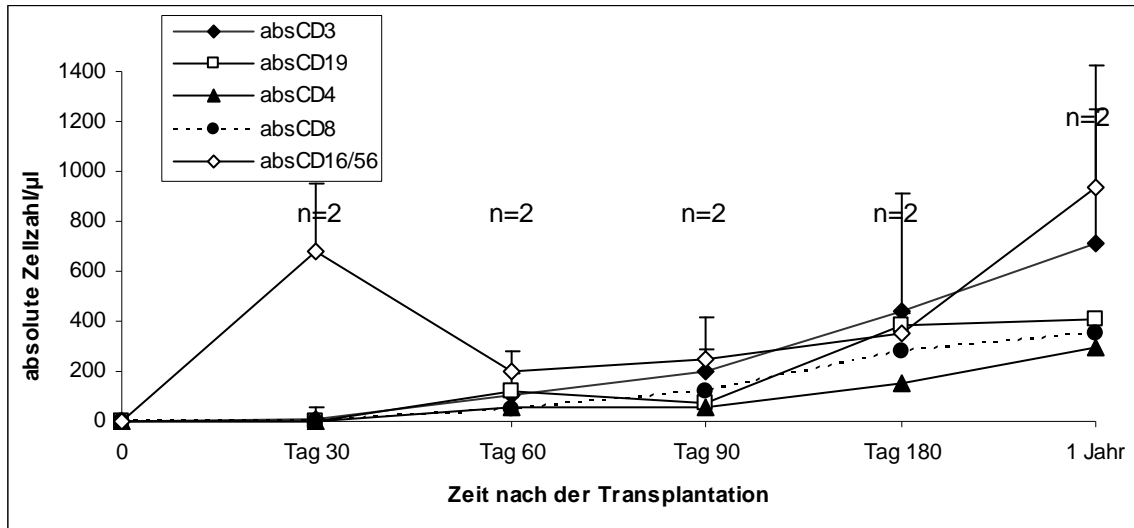
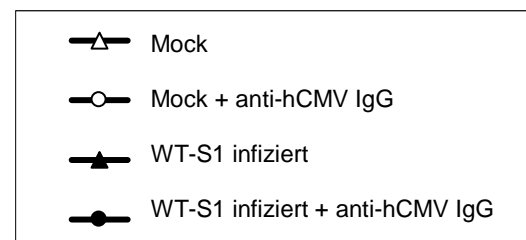
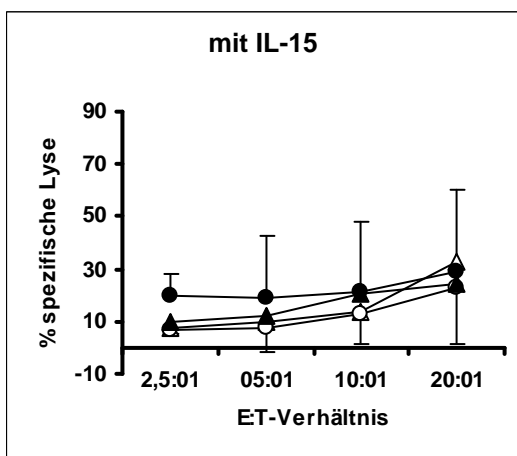
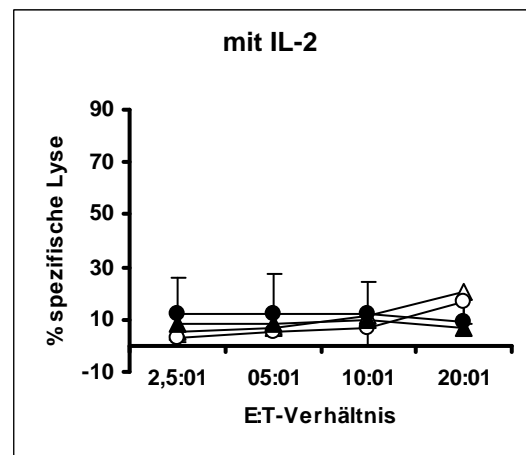
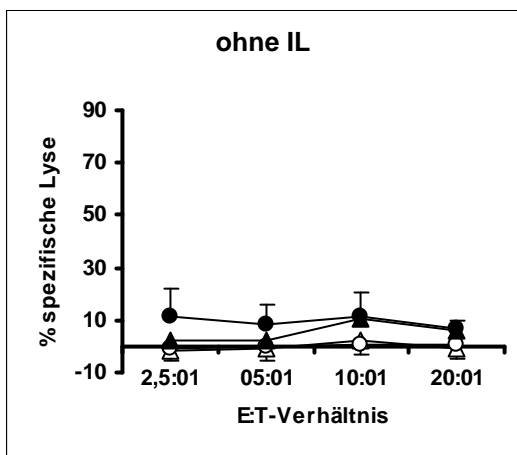


Abb 22: **Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation:** Die CD⁵⁶⁺-NK-Zellen sind am 30. Tag nach der SCTX erhöht und nehmen nach einem Jahr relativ zur Lymphozytenzahl wieder ab. Die CD³⁺-T-Zellen sind am 30. Tag postTX noch relativ vermindert und rekonstituieren erst nach einem Jahr vollständig. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 2 Patienten. Nummern (n) oberhalb der Datenpunkte: Anzahl der Patienten für die Entstehung dieser Datenpunkte.



Patientenalter	9,5
CMV-Status	
- D-R-	1
- D+R+	0
- D-R+	1
- D+R-	0
Versuchszpkt. postTX	149,5 (97-202)
CD56 ⁺ NK-Zellen (%)	28 (20-37)

Vorige Seite:

Abb.23: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von mononukleären Zellen allogenen stammzelltransplantierten Patienten gegen WT-S1- und MOCK-infizierte HFF.** Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimuliert, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimuliert.

4.4.5 Zytotoxische Aktivität gegen WT-GR3-infizierte Targetzellen

Im Vergleich zur geringen lytischen Aktivität unstimulierter NK-Zellen gegen HFF (15 % bei einem E:T-Verhältnis von 20:1) wiesen WT-GR3-infizierte Fibroblasten mit 22 % eine etwas höhere spezifische NK-Zell-Lyse auf, die durch Zugabe von anti-hCMV IgG auf 47 % deutlich gesteigert wurde ($p = 0,038$) (vs. MOCK: 32 %).

Eine Inkubation der NK-Zellen mit IL-2 steigerte diese spezifische Lyserate auf 33 % ($p = 0,158$) (vs. MOCK: 22 %) und erreichte bei zusätzlicher Gabe von anti-hCMV IgG mit signifikanten 65 % ($p = 0,00$) (vs. MOCK: 41 %) die höchste NK-Zell-Aktivität.

Ferner konnte durch die Zugabe von anti-hCMV IgG die zytotoxische Aktivität von IL-15-stimulierten NK-Zellen gegen WT-GR3-infizierte Targetzellen von 55 % ($p = 0,006$) (vs. MOCK: 38 %) auf 60 % ($p = 0,00$) (vs. MOCK: 46 %) spezifische Lyse erhöht werden (Abb. 24).

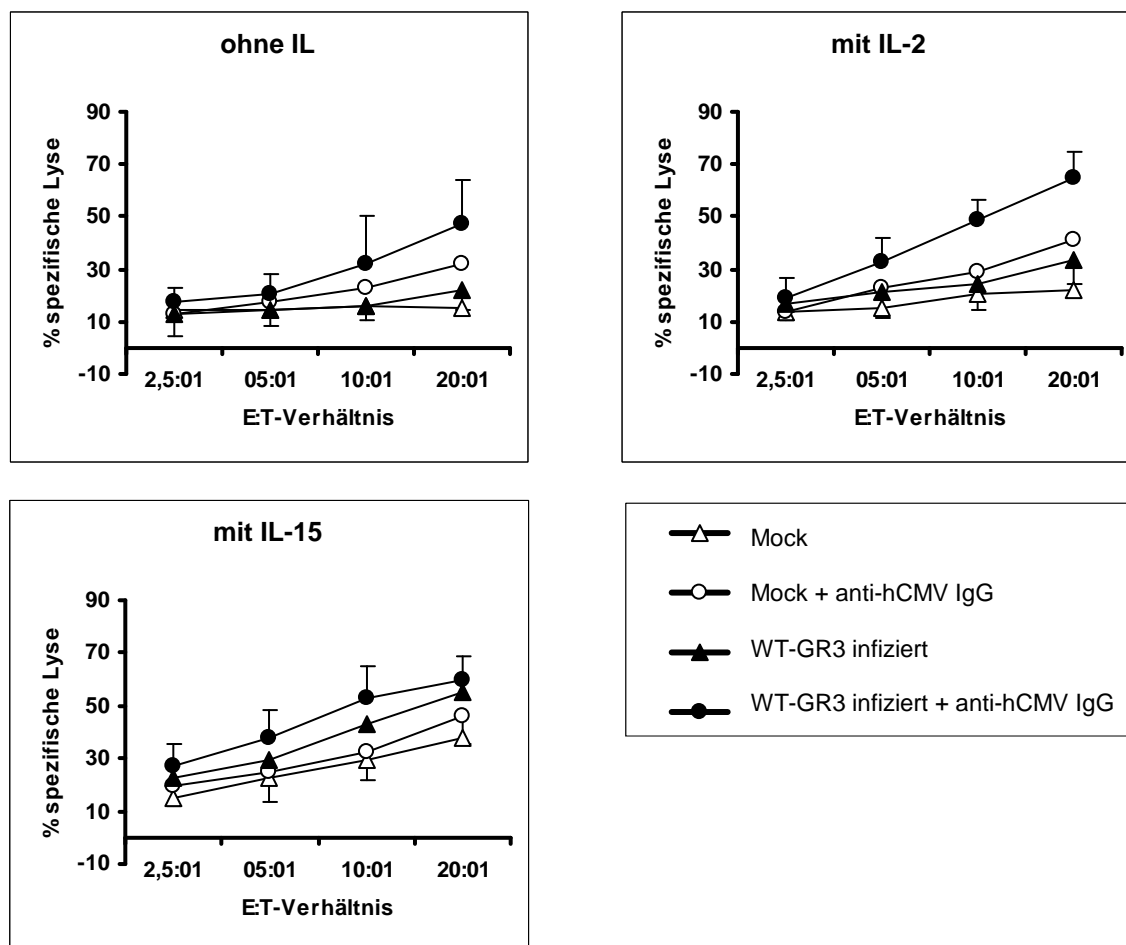


Abb.24: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von angereicherten CD⁵⁶⁺ NK-Zellen fünf gesunder Probanden gegen WT-GR3- und MOCK-infizierte Targetzellen.** Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen.

Als Grund für diese unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber NK-Zellen scheint im Hinblick auf die gemessene Oberflächenexpression (4.5) die Expression von LFA-3-Molekülen auf der Zelloberfläche infizierter Fibroblasten ausschlaggebend zu sein.

Durch eine 30-minütige Inkubation mit 1 µg / ml CD⁵⁸⁺ Antikörper wurden diese Moleküle auf der Oberfläche der WT-GR3-infizierten HFF maskiert. Dadurch sank die Empfindlichkeit gegenüber den NK-Zellen. Eine Vorinkubation der Effektorzellen mit IL-15 ergab ungeachtet einer LFA-3-Blockade eine leicht erhöhte NK-Zell-vermittelte Lyserate bei WT-GR3-infizierten Fibroblasten (Abb. 25).

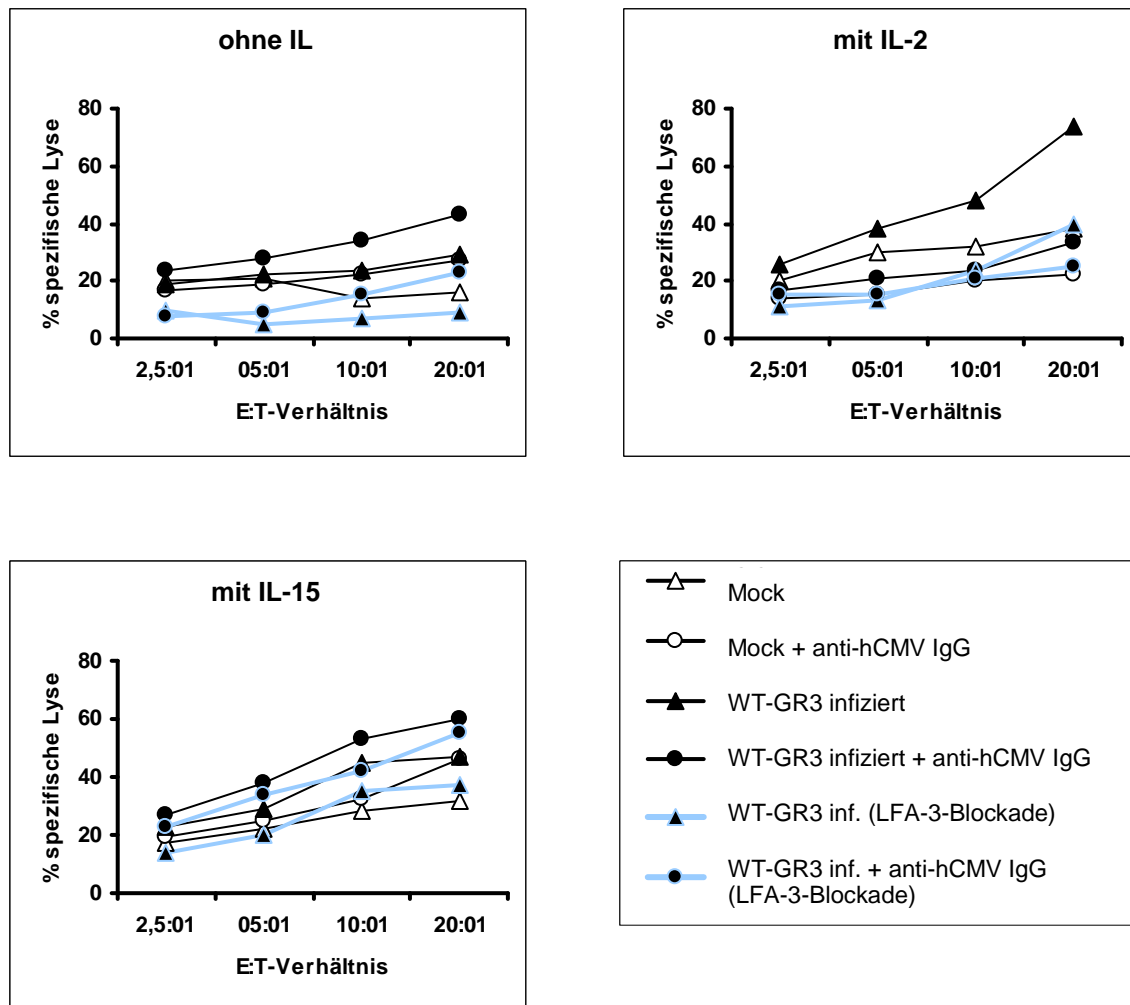


Abb.25: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von angereicherten CD⁵⁶⁺ NK-Zellen eines gesunden Probanden gegen WT-GR3- und MOCK-infizierte Targetzellen.** Eine Senkung der NK-Zell-Empfindlichkeit wurde durch Maskierung der LFA-3-Moleküle mittels Zugabe von 1 µg / ml CD⁵⁶⁺ Antikörper erreicht (blau). Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität ohne bzw. mit anti-hCMV IgG Vorinkubation (ADCC, 50 µg / ml) in verschiedenen Effektor:Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimulierte, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1ng / ml IL-15 stimulierte NK-Zellen.

Indessen zeigten die PBMNC eines Patienten mit AML nach einer allogenen Stammzelltransplantation ungeachtet einer Inkubation mit IL-2 oder IL-15 im Vergleich zu MOCK-infizierten Targetzellen keine höhere spezifische Lyseaktivität (Abb. 26 und 27).

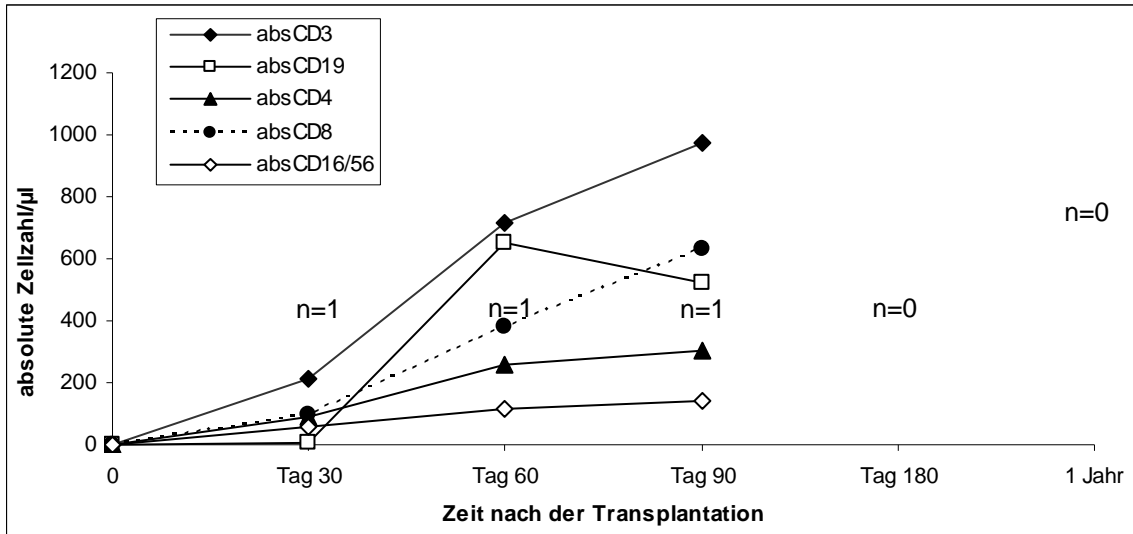
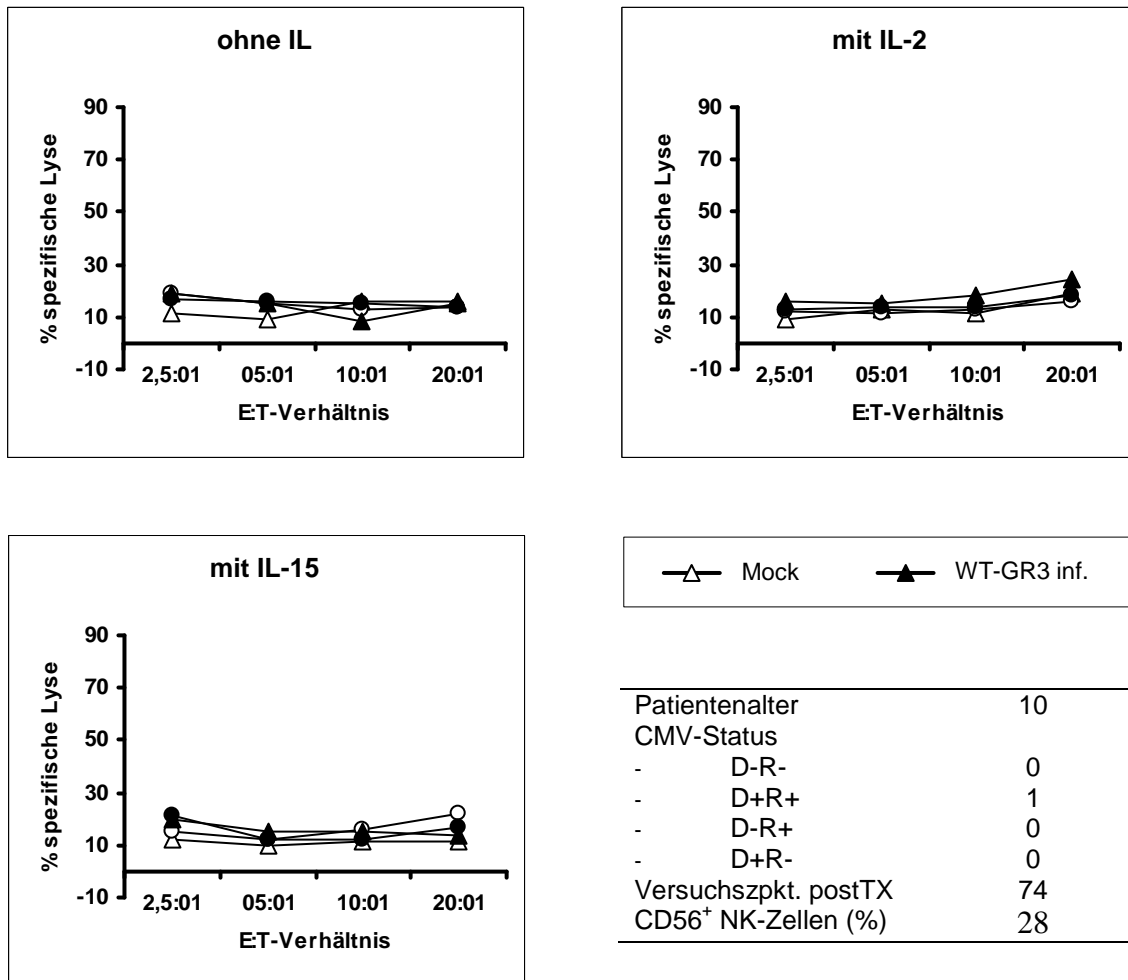


Abb. 26: **Immunrekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation.** Gezeigt sind die Werte von n = 1 Patient. Nummern (n) oberhalb der Datenpunkte: Anzahl des Patienten für die Entstehung dieser Datenpunkte.



Patientenalter	10
CMV-Status	
- D-R-	0
- D+R+	1
- D-R+	0
- D+R-	0
Versuchszpkt. postTX	74
CD56 ⁺ NK-Zellen (%)	28

Abb.27: **Zytotoxische Aktivität und ADCC von mononukleären Zellen eines allogenen stammzelltransplantierten Patienten gegen WT-GR3- und MOCK-infizierte HFF.** Dargestellt ist die mittlere spezifische Lyseaktivität in verschiedenen Effektor : Target-Zell-Verhältnissen. Die Effektorzellen sind unstimuliert, mit 40 IE / ml IL-2 oder mit 1 ng / ml IL-15 stimuliert.

4.5 Oberflächenexpression

4.5.1 Qualitative MHC-Klasse-1-Oberflächenexpression

Der monoklonale Antikörper W6/32 bindet an die Genloci A, B und C des humanen Leukozytenantigens (HLA), welche mit Immunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIRs) und C-Typ-Lektinähnlichen Rezeptoren (CD⁹⁴⁺ / NKG2) interagieren.

Dabei vermitteln ‚killer cell immunoglobulin-like receptors‘ (KIRs) mit einem langen intrazellulären Anteil, über 1 - 2 ITIMs (‚immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motifs‘) eine Hemmung der NK-Zelle, während die kurzen Isoformen dieser Rezeptoren über ein ITAM enthaltendes DAP12-Protein (KARAP ‚killer cell activating receptor-associated protein‘) ein aktivierendes Signal erzeugen. Da jedoch die Affinität zum Liganden bei den inhibierenden Isoformen höher liegt, halten die inhibierenden Rezeptoren die NK-Zellen unter Kontrolle.

Die Lektinähnliche Rezeptorgruppe unterscheidet sich zwar in ihrer Struktur und Spezifität von den KIRs, hemmt jedoch NK-Zellen in gleicher Weise.

Um den Einfluss des humanen Zytomegalievirus auf die MHC-Klasse-1-Expression infizierter Targetzellen zu erfassen, wurde über einen Zeitraum von sechs Tagen mit dem monoklonalen Antikörper W6/32 die HLA-ABC-Rezeptordichte auf infizierten Fibroblasten gemessen. Als Vektor diente dabei der Laborstamm AD-169, sowie die Wildtypvirusstämme WT-MR, WT-GR und WT-S. Zum Vergleich wurden nichtinfizierte HFF mitgeführt.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse der direkten Immunfluoreszenzfärbung (3.10.1, Abb. 29) wurden entsprechend ihrer Häufigkeitsverteilung als Histogramm dargestellt. Diese Darstellung ermöglichte die Bestimmung des Peak Chanals. Der Peak Chanal bezeichnet die Fluoreszenzintensität, die von den meisten Zellen einer definierten Population emittiert wird.

Zusätzlich wurde mit einem 2-Komponenten-Kit zur Fixierung und Permeabilisierung von Zellen über die permeabilisierte Zellmembran das 76 kD schwere immediate early antigen (IEA) pp72 (UL122) sekundär mit einem FITC-konjugierten Ziege-gegen-Maus Antikörper markiert und eine anschließende MHC-Klasse-1-Zelloberflächenfärbung durchgeführt (3.10.3, Abb. 30). Die MHC-Klasse-1-Expression von hCMV-infizierten E13 positiven Zellen versus MOCK-infizierten E13 negativen Fibroblasten wurde als Dot Plot-Darstellung abgebildet.

Über den kulturellen Immediate-Early-Antigen-Immunperoxidasetest (3.4) konnte der Infektiositätsgrad ermittelt werden. Dieses Verfahren erfasste die sehr frühen (immediate early, pp72 (UL122)), im Zellkern liegenden, vorwiegend als Transaktivatoren der frühen (early) Gene dienenden, Antigene in einer immunhistochemischen Doppelfärbung als braune Kernfärbung. Eine Hämalaun / Hämatoxilin-Gegenfärbung ermöglichte als blaue Zellfärbung eine bessere Erkennbarkeit der Fibroblasten. In Abb. 28 ist die steigende Anzahl an infizierten Fibroblasten über einen Zeitraum von 6 Tagen dargestellt.

Abb. 29 demonstriert die rückläufige Anzahl an MHC-Klasse-1-Molekülen bei virusinfizierten Targetzellen im Vergleich zu MOCK-infizierten HFF innerhalb dieser 6 Tage. Da die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen ist, d.h. ein höherer Wert entspricht einer stärkeren MHC-Klasse-1-Rezeptordichte im Vergleich zu einem niedrigeren Wert, zeigt die Verlagerung des Peak Chanals für den gebundenen monoklonalen Antikörper W6/32 (schwarz) in Richtung Negativkontrolle (grau) eine Abnahme der HLA-ABC-Moleküle im Laufe der Infektion, während nichtinfizierte Fibroblasten eine konstante Bindungskapazität des Antikörpers aufweisen. Vergleicht man die Rezeptordichte an MHC-Klasse-1-Molekülen am 6. Tag nach der Infektion, so weisen Fibroblasten die mit dem Laborstamm AD-169 infiziert wurden einen niedrigeren Peak Chanal als Wildtypvirusinfizierte Targetzellen auf. Dies spricht für eine stärkere Herunterregulierung der HLA-ABC-Oberflächenmoleküle durch den Laborstamm.

Auch die intrazelluläre Färbung in Abb. 30 demonstriert eine zunehmende Herunterregulierung von MHC-Klasse-1-Molekülen bei infizierten Fibroblasten über den Zeitraum von 6 Tagen (Ordinatenachse). Zusätzlich gibt die Abszissenachse durch eine Positivfärbung des monoklonalen pp72 Immediate-Early-Antigens, über eine sekundäre Bindung an ein FITC-konjugiertes Ziege-gegen-Maus F(ab')₂-Immunglobulinfragment, die zunehmende Anzahl an infizierten Fibroblasten wider. Die doppelt positiv gefärbten Zellen bestätigen somit eine HLA-ABC-Abnahme bei virusinfizierten Targetzellen. Auch hier zeigen mit dem Laborstamm AD-169-infizierte Targetzellen über einen niedrigeren Ordinatenwert am 6. Tag nach der Infektion eine stärkere MHC-Klasse-1-Inhibition im Vergleich zu Wildtypvirusinfizierten Fibroblasten.

Folgende Seiten:

Abb.28-30: **Herunterregulierung der MHC-Klasse-1-Expression bei infizierten Fibroblasten (AD-169, WT-MR, WT-GR1, WT-S1) im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrollzelllinie.** Abbildung 28 verdeutlicht mittels IEA-Kern- und H.E.-Gegenfärbung die Zunahme der untersuchten infizierten Targetzellen im Laufe von sechs Tagen. Die Histogrammdarstellung in Abbildung 29 zeigt bei infizierten Fibroblasten eine Verlagerung des Peak Chanals für den gebundenen monoklonalen Antikörper W6/32 (schwarz) in Richtung Negativkontrolle (grau). Dies entspricht einer Abnahme der HLA-ABC-Moleküle im Vergleich zur HLA-ABC-Expression auf MOCK-infizierten Zellen (HFF).

Diese Herunterregulierung wird auch an der Dot-Plot-Darstellung der intrazellulären Färbung in Abbildung 30 deutlich. Hier wird die steigende Anzahl an infizierten Fibroblasten an der Positivfärbung mit intrazellulär gebundenem anti-hCMV-IEA-Antigen (Abszisse / X-Achse) sichtbar. Diese positiv gefärbten Zellen bei hCMV-infizierten Fibroblasten (blau) zeigen an der Ordinate / Y-Achse eine Erniedrigung der MHC-Klasse-1-Rezeptordichte im Vergleich zur MOCK-infizierten Kontrolle (gelb).

Sowohl die quantitative, als auch die qualitative Analyse zeigen die deutlichste HLA-ABC-Herunterregulierung bei AD-169-infizierten Targetzellen.

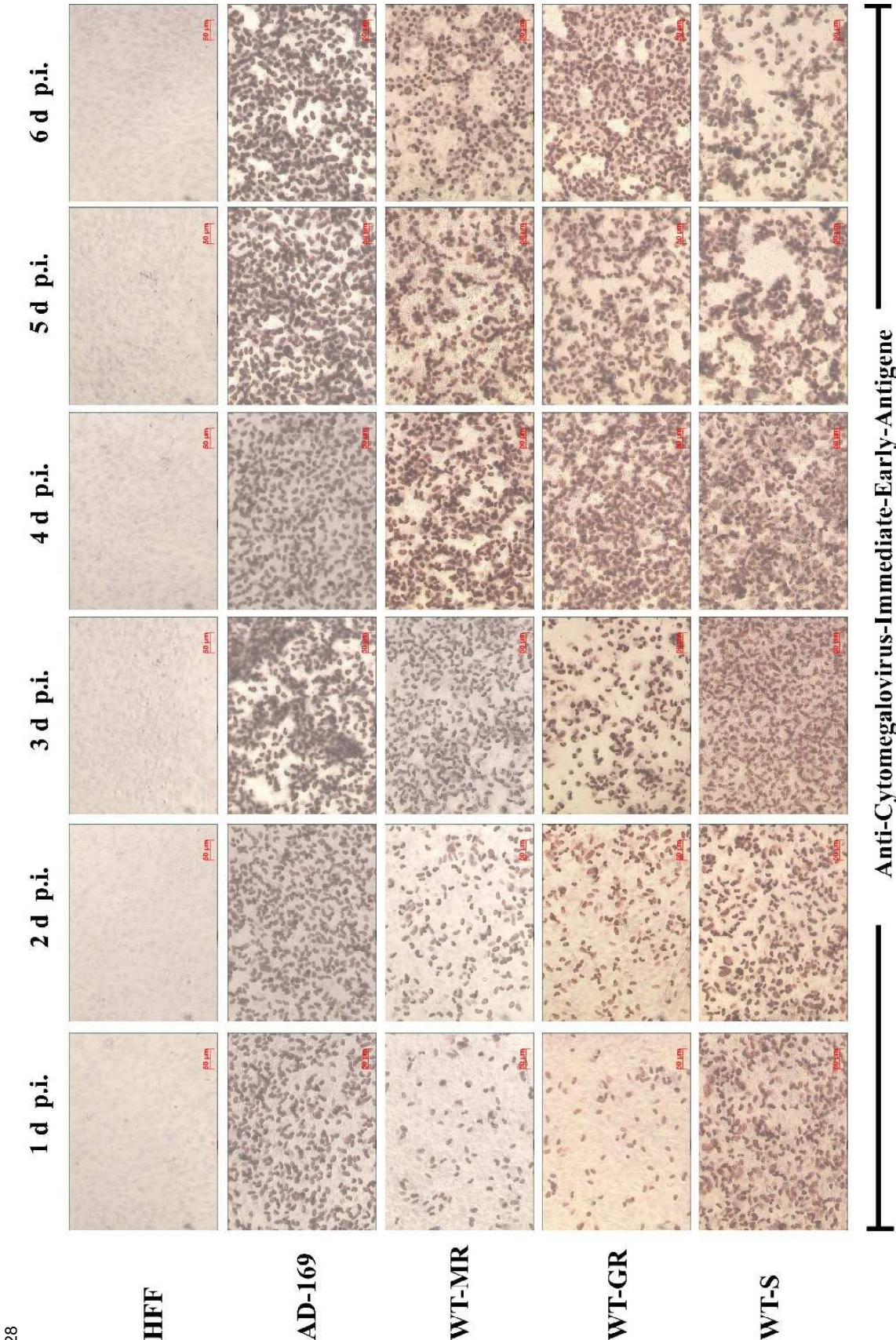
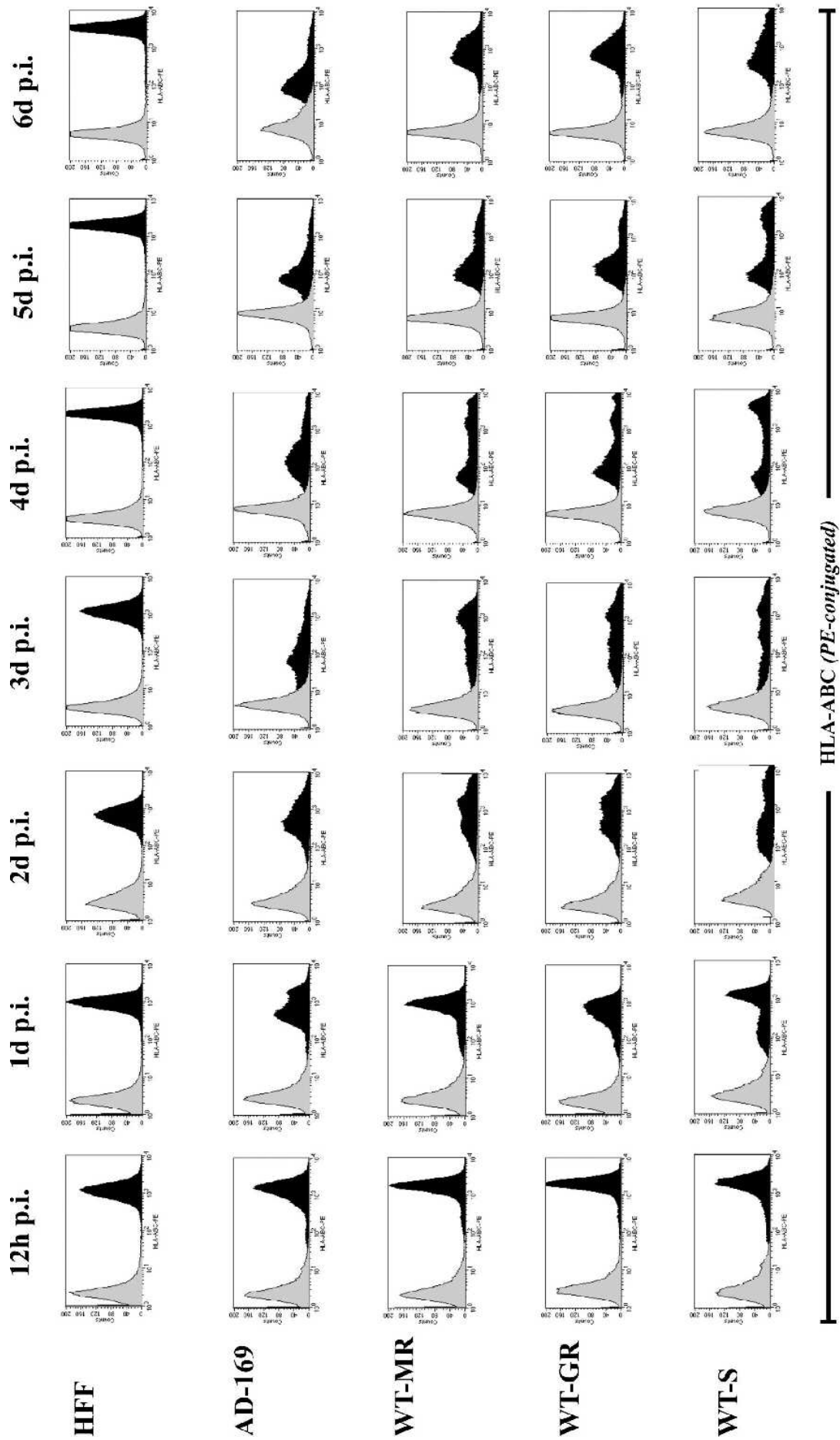


Abb. 28

Abb. 29



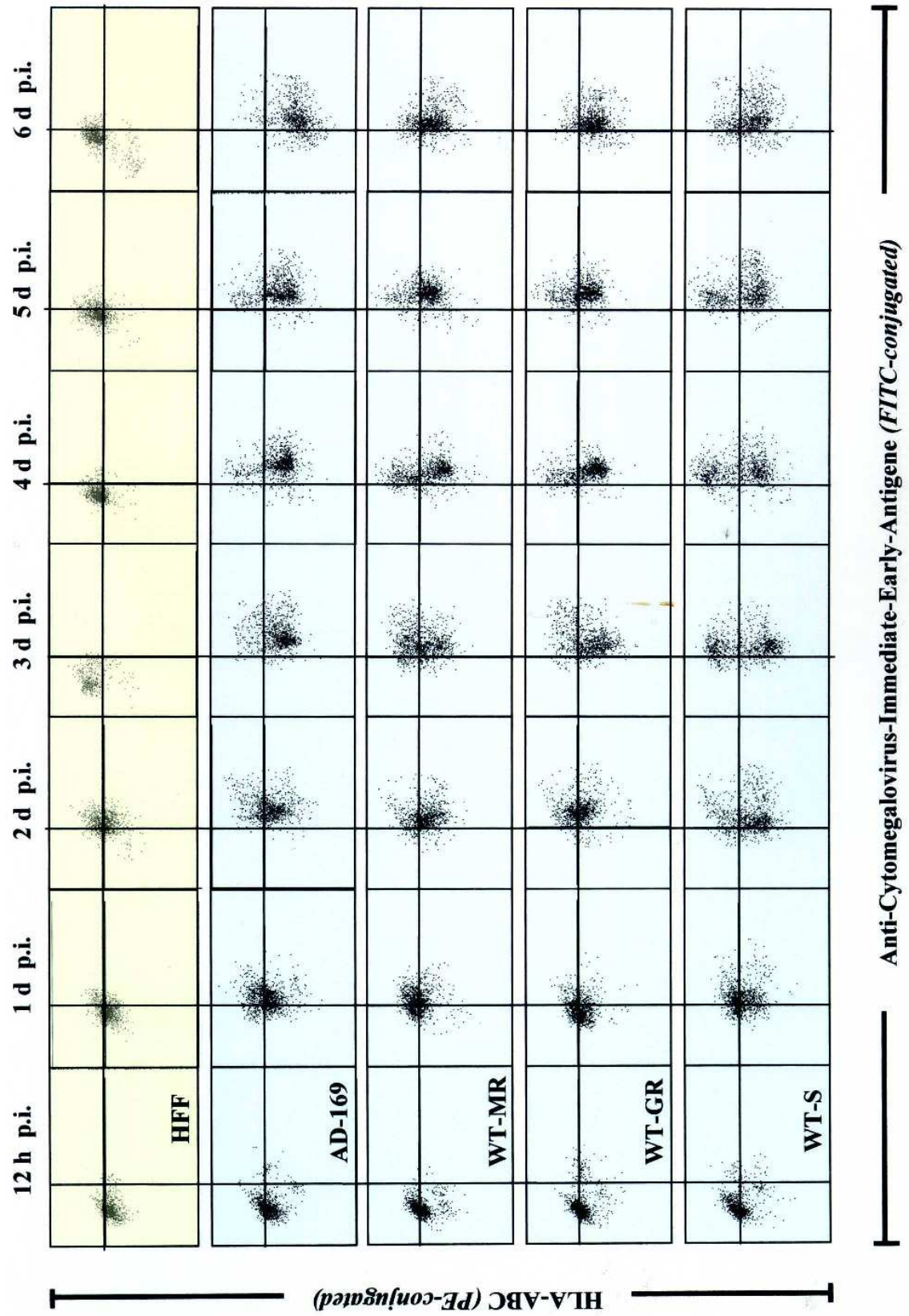


Abb. 30

4.5.2 Quantitative Oberflächenexpression

Um den Einfluß von verschiedenen Oberflächenmolekülen auf die NK-Zell-Empfindlichkeit infizierter Fibroblasten zu ermitteln, wurden die unterschiedlichen Expressionsgrade klassischer und nichtklassischer MHC-Klasse-1-Moleküle, Adhäsionsmoleküle und NKG2D-Liganden mittels quantitativer durchflusszytometrischer Analyse (QIFIKIT[®] der Firma DAKO) auf infizierten Fibroblasten mit dem hCMV-Laborstamm AD-169, den Virustatikasensitiven hCMV-Wildtypstämmen WT-S1-2, den Ganciclovirresistenten hCMV-Wildtypstämmen WT-GR1-3 und den gegen Virustatika multiresistenten hCMV-Wildtypstamm WT-MR im Vergleich zu nicht-infizierten Fibroblasten (HFF) ermittelt (3.10.2).

4.5.2.1 HLA-ABC (MHC-Klasse-1)

Die spezifische Antikörper-Bindungskapazität nichtinfizierter Fibroblasten betrug $1.108.759,98 \pm 538.742,27$ ($n=8$). Eine Infektion mit dem humanen Zytomegalievirus führte zu einer signifikanten Abnahme der MHC-Klasse-1-Expression auf Virus-infizierten Zellen. Dabei wiesen Fibroblasten, die mit dem Laborstamm AD-169 infiziert waren die geringste Antikörperbindungskapazität auf (ABC: AD-169 = $69.674,45 \pm 46.313,14$; WT-S1 = $233.728,70 \pm 83.241,48$; WT-MR = $219.594,26 \pm 125.259,66$; WT-GR1 = $191.245,90 \pm 102.417,16$; WT-S2 = $86.529,21 \pm 35.207,02$; WT-GR2 = $173.045,98 \pm 97.052,34$; WT-GR3 = $85.205,07 \pm 10.796,22$).

WT-GR1 und WT-GR2 zeigten die gleiche Mutation im UL97 Genort (Aminosäuresubstitution: C603W). Da beide die nahezu gleiche Oberflächenexpression an HLA-ABC aufwiesen, könnte diese Herunterregulierung mutationsbedingt sein. $N = 3 - 6$; $p = 0,003 - 0,029$.

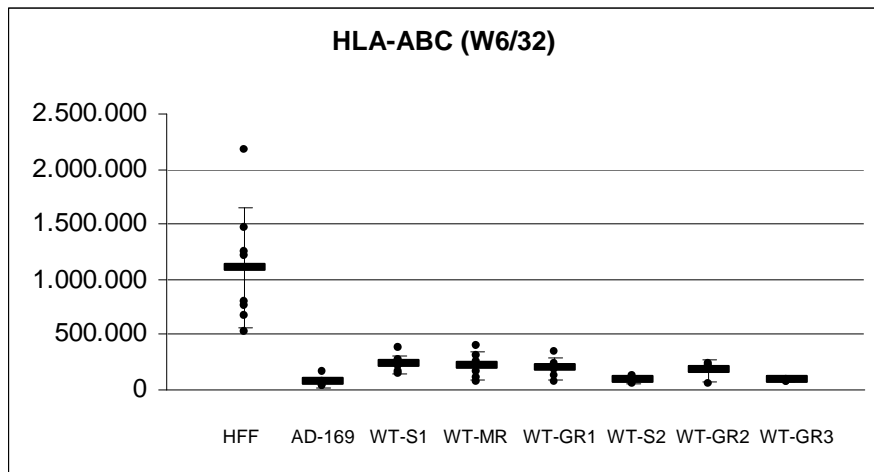


Abb.31: **Quantitative MHC-Klasse-1-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.2 Nicht-klassische MHC-Klasse-1(b)-Moleküle

4.5.2.2.1 HLA-E

Der monoklonale Antikörper MEM-E/02 bindet an HLA-E. Dieses trägt als Peptid Leader-Sequenzen anderer MHC-Klasse-1-Moleküle, die den heterodimeren Molekülkomplexen CD⁹⁴⁺ / NKG2A, C, E und H präsentiert werden. Hierüber wird über eine DAP12-vermittelte Signalkaskade ein aktivierendes NK-Zellsignal erzeugt. Daraus ergibt sich ein sensibler Mechanismus, der die regelrechte Biosynthese der MHC-Klasse-1-Moleküle überwacht.

Gegenüber nichtinfizierten Targetzellen konnte bei allen hCMV-infizierten Fibroblasten eine Expressionssteigerung der HLA-E-Moleküle gemessen werden (ABC: HFF = 358,10 ± 1.655,63 [n= 7]; AD-169 = 3.390,76 ± 2.363,25; WT-S1 = 3.423,29 ± 1.523,19; WT-MR = 5.204,86 ± 2.509,83; WT-GR1 = 4.361,33 ± 2.831,74; WT-S2 = 7.045,66 ± 1890,75; WT-GR2 = 10.865,23 ± 2.449,08; WT-GR3 = 8.619,85 ± 3.228,05). N = 3 - 4; p = 0,000 - 0,036; p(AD-169) = 0,130; p(WT-MR) = 0,063; p(WT-GR) = 0,078.

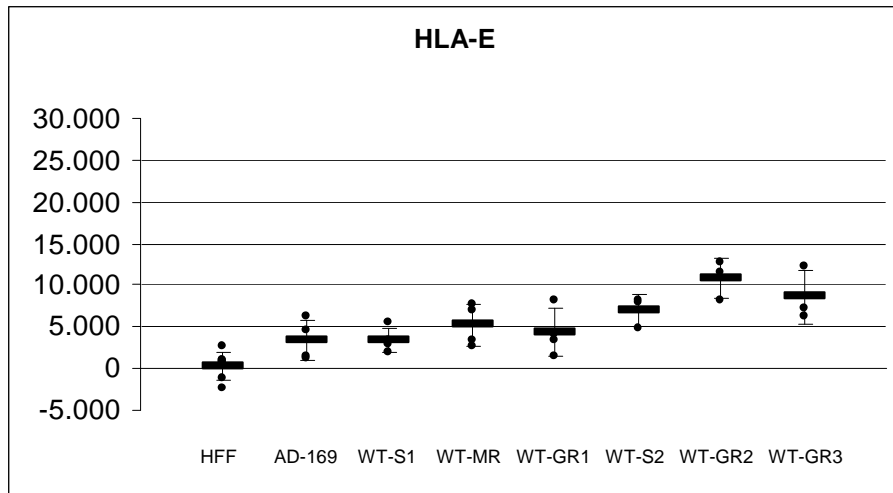


Abb.32: **Quantitative HLA-E-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.2.2 HLA-G

Über den monoklonalen Antikörper MEM-G/9 konnte HLA-G detektiert werden, welches durch den KIR2DL4 / p49-Rezeptor erkannt wird und die Hemmung der Proliferation und Zytotoxizität aktivierter NK-Zellen vermittelt.

Im Vergleich mit nichtinfizierten Fibroblasten konnte bei allen hCMV-infizierten Targetzellen eine höhere HLA G-Expression ermittelt werden. (ABC: HFF = $88,94 \pm 1.271,75$ [n= 7]; AD-169 = $6.435,57 \pm 3.262,69$; WT-S1 = $779,24 \pm 951,01$; WT-MR = $7.412,03 \pm 9.966,05$; WT-GR1 = $5.167,82 \pm 2.665,70$; WT-S2 = $13.644,24 \pm 13.569,47$; WT-GR2 = $9.860,76 \pm 3.299,88$; WT-GR3 = $8.574,29 \pm 2.112,56$). N = 3 - 4; p = 0,000 - 0,045; p(WT-MR) = 0,241; p(WT-S2) = 0,216.

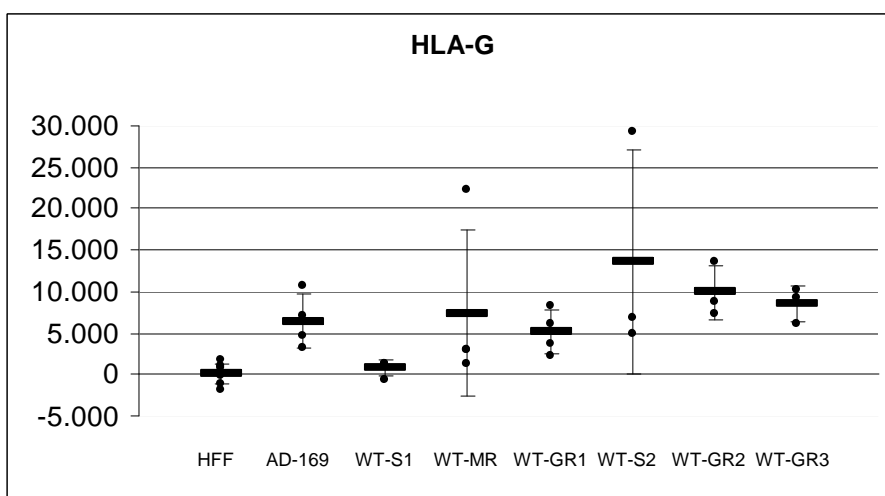


Abb.33: **Quantitative HLA-G-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.3 Adhäsionsmoleküle

Als einen weiteren möglichen Einflussfaktor für der NK-Zell-Suszeptibilität infizierter Fibroblasten wurde die quantitative Expressionsdichte von Adhäsionsmolekülen ermittelt.

4.5.2.3.1 CD⁵⁴⁺ (ICAM-1)

Das 90 kD große Glykoprotein CD⁵⁴⁺ (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) gilt als Ligand für den LFA-1 / CD^{11a+}-Rezeptor von zytotoxischen T-Zellen. Es aktiviert die NK-Zell-vermittelte Lyse.

Über den monoklonalen Antikörper LB-2 konnte bei hCMV-infizierten Fibroblasten im Vergleich zur MOCK-Infektion bei allen Virusstämmen eine generalisierte Expressionszunahme des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 ermittelt werden (ABC: HFF = 67.942,98 ± 19.319,36 [n= 6]; AD-169 = 504.362,46 ± 123.554,99; WT-S1 = 583.903,04 ± 128.611,05; WT-MR = 724.239,20 ± 342.901,76; WT-GR1 = 492.798,40 ± 86.690,48; WT-S2 = 448.804,38 ± 46.236,86; WT-GR2 = 694.118,28 ± 43.050,44; WT-GR3 = 384.121,87 ± 24.080,88). N = 3; p = 0,001 - 0,02; p(WT-MR) = 0,077.

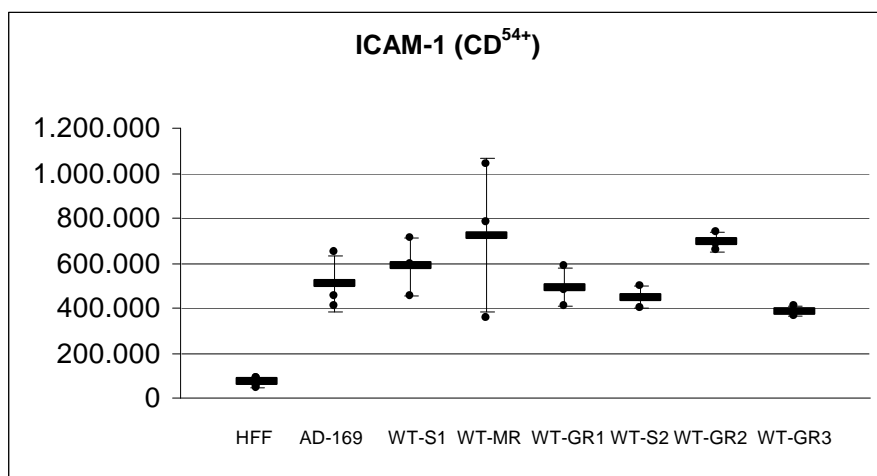


Abb.34: **Quantitative ICAM-1-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.3.2 CD⁵⁸⁺ (LFA-3)

Der monoklonale Antikörper BRIC erkennt das 560 kD schwere Polypeptid LFA-3 (Lymphocyte Function-Associated antigen-3, CD⁵⁸⁺), das u.a. auch auf B-Zellen, T-Zellen und Monozyten exprimiert wird und über eine Bindung mit CD²⁺ die NK-Zell-Suszeptibilität steigert.

Eine signifikant erhöhte spezifische Bindungskapazität des Antikörpers BRIC wurde ausschließlich bei einer Infektion der Targetzellen mit dem Laborstamm AD-169 und dem Ganciclovirresistenten Wildtypstamm WT-GR3 nachgewiesen (ABC: HFF = $37.707,16 \pm 9.005,14$ [n = 6]; AD-169 = $157.330,58 \pm 36.790,08$; WT-S1 = $26.077,73 \pm 16.579,70$; WT-MR = $22.653,15 \pm 12.512,97$; WT-GR1 = $25.682,40 \pm 14.801,63$; WT-S2 = $15.709,33 \pm 2.626,28$; WT-GR2 = $33.280,68 \pm 1.385,73$; WT-GR3 = $129.193,45 \pm 3.961,50$). N = 3; p = 0,025 (AD-169) bzw. 0,002 (wtGR3).

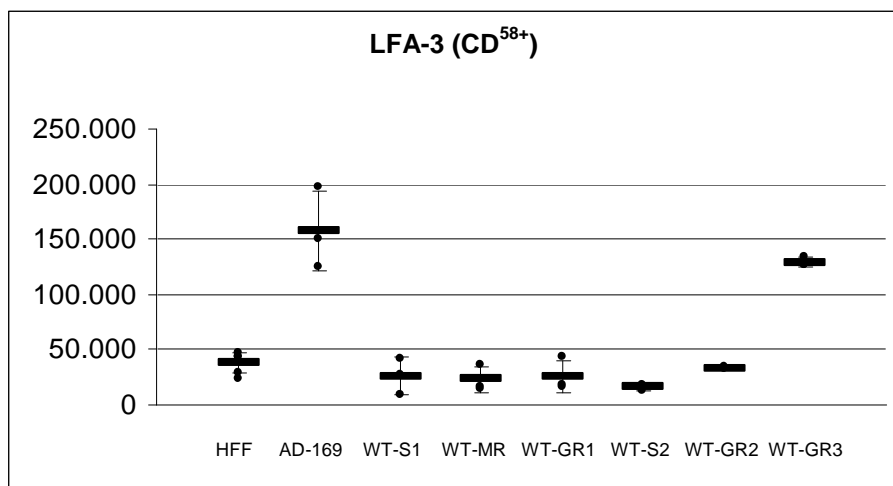


Abb.35: **Quantitative LFA-3-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.4 NKG2D-Liganden

Zur Beurteilung der Rolle des NKG2D / NKG2D-Liganden-Systems bei der NK-Zell-Aktivierung gegen hCMV-infizierte Targetzellen wurde die quantitative Bestimmung der NKG2D-Liganden auf virusinfizierten Fibroblasten durchgeführt.

4.5.2.4.1 MICA/B

Die zellstressinduzierbaren **MHC-Klasse-1-Chain-Related Antigene** MICA und MICB sind Liganden für den monodimeren NKG2D-Rezeptorkomplex. Dieser ist mit einem DAP10-Protein assoziiert, welches über ITAMs eine Aktivierung von NK-Zellen bewirkt.

Der monoklonale Antikörper BAMO-1 / IE9 band gleichzeitig MIC A und B und diente somit als Kontrolle für die jeweiligen Einzelmessungen der Rezeptoren. Mit Ausnahme der Virustatikasensitiven hCMV-Wildtypstämme konnte bei allen infizierten Targetzellen eine Mehrexpression an MICA und B gemessen werden.

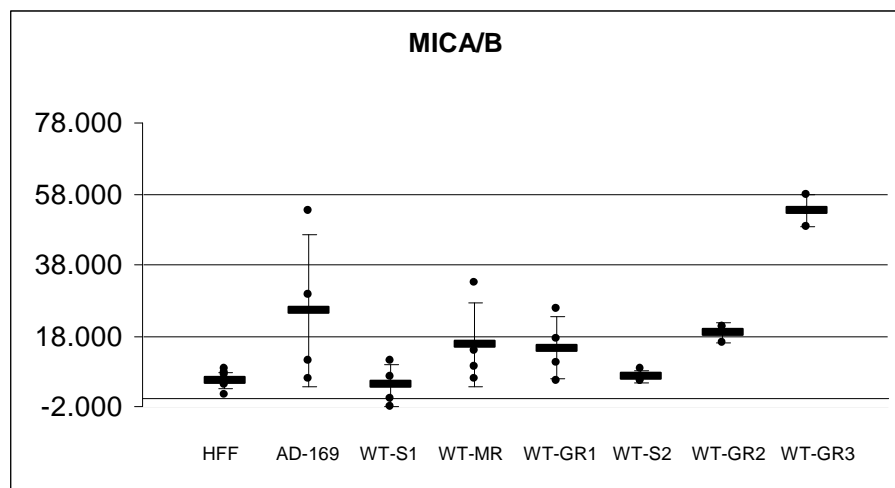


Abb.36: **Quantitative MICA / B-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.4.2 MICA

Der monoklonale Antikörper AMO-1 / IH12 detektierte selektiv den MICA-Rezeptor. Dieser wurde, mit Ausnahme der Virustatikasensitiven Wildtypstämme WT-S1 und WT-S2, von allen untersuchten Virusstämmen hochreguliert (ABC: HFF = 3.071,69 ± 5.378,78 [n = 7]; AD-169 = 24.178,55 ± 27.170,66; WT-S1 = 2.665,54 ± 4.737,50; WT-MR = 16.187,39 ± 19.464,85; WT-GR1 = 14.545,51 ± 13.402,54; WT-S2 = 5.767,18 ± 816,38; WT-GR2 = 17.863,99 ± 2.345,67; wtGR3 = 52.138,74 ± 2.562,21). N = 3 - 4.

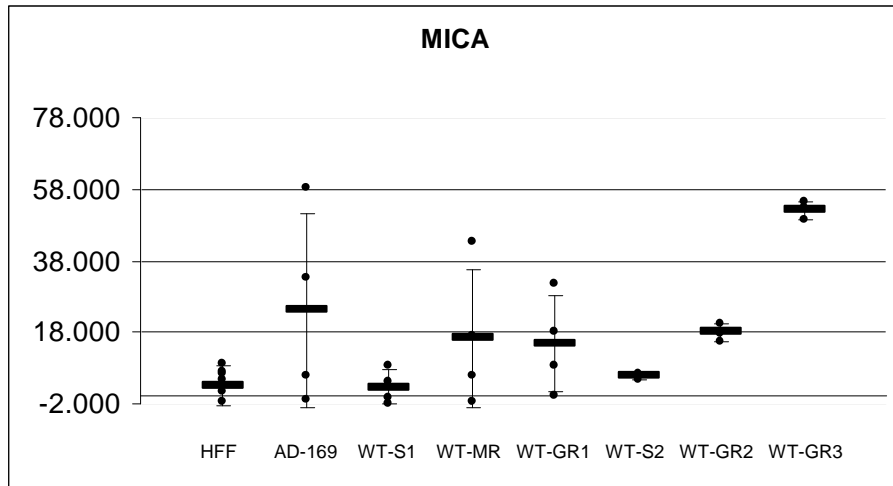


Abb.37: **Quantitative MICA-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.4.3 MICB

Über den monoklonalen Antikörper BMO-1 / VIG6, der selektiv an MICB-Rezeptoren band, konnte bei Targetzellen, die mit dem Laborstamm AD-169 oder dem multiresistenten hCMV-Wildtypstamm WT-MR infiziert waren, eine aktive Inhibition an MICB-Oberflächenmolekülen nachgewiesen werden (ABC: HFF = $2.327,50 \pm 2.064,12$ [n= 7]; AD-169 = $16,42 \pm 1.441$; WT-MR = $35,51 \pm 1.327,22$ [n= 4]). Eine Infektion der Targetzellen mit anderen hCMV-Wildtypstämmen ergab im Vergleich zu nichtinfizierten Fibroblasten eine unveränderte MICB-Expressionsdichte (WT-S1 = $1.125,39 \pm 1.479,78$; WT-GR1 = $1.819,35 \pm 490,32$; WT-S2 = $1.266,33 \pm 827,12$; WT-GR2 = $5.469,40 \pm 2.775,26$; WT-GR3 = $2.418,59 \pm 2.586,36$). N = 3 - 4.

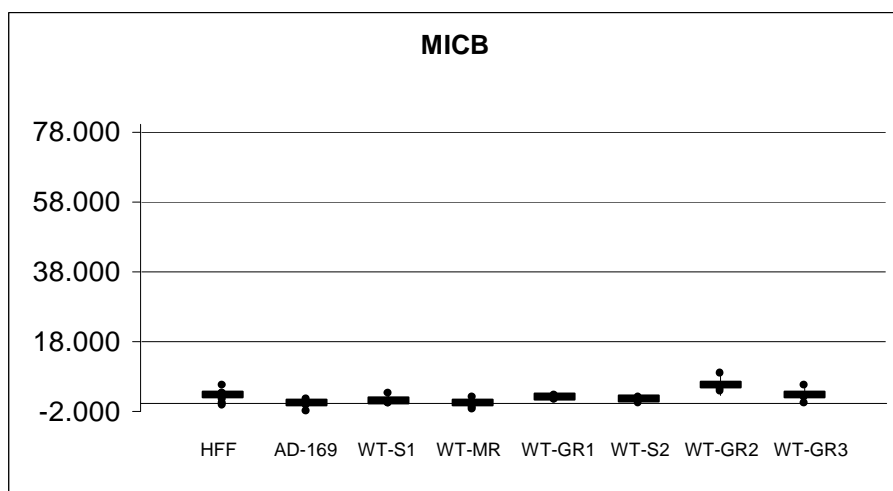


Abb.38: **Quantitative MICB-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.4.4 ULBP1

Die zweite Ligandenfamilie für den monodimeren NKG2D-Rezeptorkomplex wurde erstmals durch ihre Fähigkeit der Bindung des hCMV-Proteins **UL16** (ULBP) entdeckt. Dabei wird die Signaltransduktion ebenfalls über eine DAP10-Protein assoziierte Phosphatidylinositol (PI)-3 Kinase vermittelt, welche schließlich den Zelltod induziert. Es sind drei verschiedene UL bindende Proteine bekannt, die fast ubiquitär exprimiert werden.

Der monoklonale Antikörper AUMO-1 / IC5, der das ULBP1-Molekül detektierte, zeigte lediglich bei Fibroblasten, die mit dem sensitiven hCMV-Virusstamm WT-S1 infiziert waren, eine signifikante Expressionssteigerung auf $46.444,78 \pm 20.923,31$ ($n = 4$; $p = 0,017$) gebundene Antikörper pro Zelle im Vergleich zu nichtinfizierten HFF ($ABC = 3.096,59 \pm 3.198,40$; $n = 7$). Eine Infektion mit dem Laborstamm AD-169 oder anderen Wildtypstämmen ergab keinen Effekt auf die ULBP1-Expression der Fibroblasten ($n = 3 - 4$).

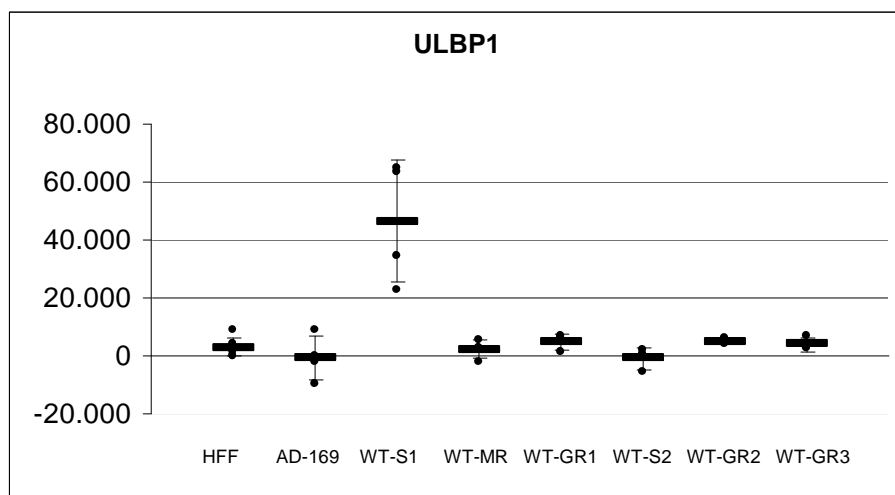


Abb.39: **Quantitative ULBP1-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.4.5 ULBP2

Die Messung der quantitativen Expressionsdichte mittels BUMO-1 / ID11, dem monoklonalen Antikörper für das ULBP2, wies keinen Unterschied zwischen infizierten ($ABC = 2.490,46 \pm 1.419,15$; $n = 7$) versus nichtinfizierten Targetzellen auf. $N = 3 - 4$.

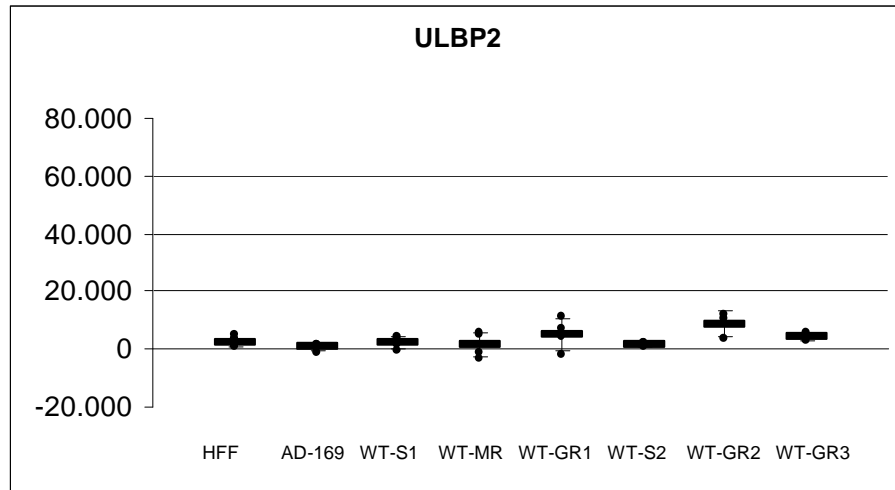


Abb.40: **Quantitative ULBP 2-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.5.2.4.6 ULBP3

Die Infektion mit humanem Zytomegalievirus führte zu einer generalisierten Hochregulierung bzw. einer Neuinduktion des UL bindenden Proteins 3, welches über den monoklonalen Antikörper CUMO-1 / IE10 gebunden wurde (ABC: HFF = $1.558,36 \pm 2.534,60$ [n = 7]; AD-169 = $12.513,95 \pm 7.010,85$; WT-S1 = $11.860,06 \pm 2.063,52$; WT-MR = $9.114,31 \pm 5.269,94$; WT-GR1 = $10.327,61 \pm 3.825,30$; WT-S2 = $7.429,65 \pm 1.708,24$; WT-GR2 = $22.840,88 \pm 3.328,61$; WT-GR3 = $11.333,10 \pm 3.651,11$). N = 3 – 4; p = 0,00 - 0,76.

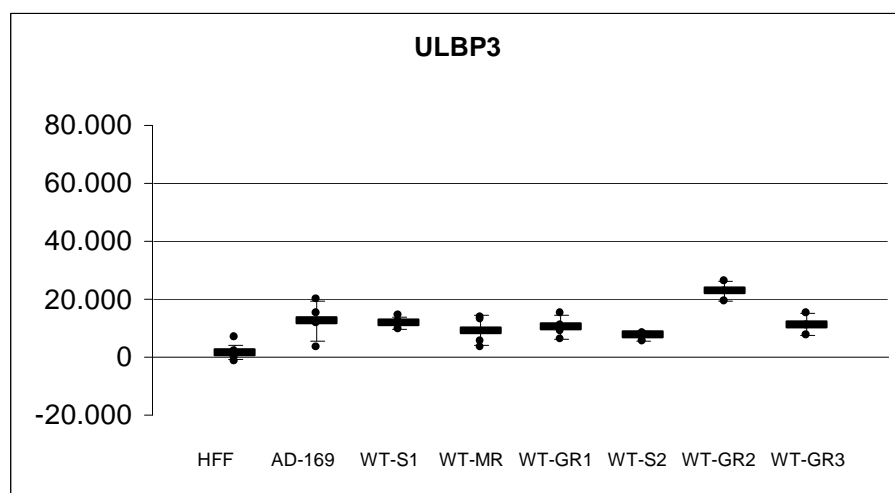


Abb.41: **Quantitative ULBP3-Expression nichtinfizierter (HFF) und Virusinfizierter Targetzellen fünf Tage nach der Infektion.** Die Punkte stellen die einzelnen Messwerte dar, während die Mittelwerte als Querbalken abgebildet sind.

4.6 Zusammenhang zwischen dem non-adhaerenten BATDA-release-Assay und der Oberflächenexpression hCMV infizierter Targetzellen

Nachfolgende Tabelle zeigt einen Zusammenhang zwischen der NK-Zell-Suszeptibilität von Fibroblasten nach der Infektion mit verschiedenen Virusstämmen im Vergleich zur jeweiligen quantitativ gemessenen Oberflächenmolekülexpression.

Im Gegensatz zu den Virusstämmen mit geringer Lyseaktivität, zeigten Virusstämme die eine hohe NK-Zell-Suszeptibilität aufwiesen eine Mehrexpression der LFA-3-Moleküle. AD-169-infizierte Targetzellen wiesen als zusätzliches Merkmal für eine gesteigerte Aktivierung der NK-Zellen eine starke Inhibierung der MHC-Klasse-1-Moleküle und eine Retention der MICB-Moleküle auf, wobei letzteres auch bei den Lyseresistenten WT-MR-infizierten Fibroblasten nachgewiesen wurde.

		Virusstämme	HLA-ABC	HLA-E	HLA-G	ICAM-1	LFA-3	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
NK-Suszeptibilität	Hoch	AD-169	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↓	↔	↔	↑
	Hoch	WT-GR3	↓	↑	↑	↑	↑	↑	↔	↔	↔	↑
		WT-GR2	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↔	↔	↔	↑
	Niedrig	WT-GR	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↔	↔	↔	↑
	Niedrig	WT-MR	↓	↑	↑	↑	↓	↑	↓	↔	↔	↑
	Niedrig	WT-S	↓	↑	↑	↑	↓	↔	↔	↑	↔	↑
		WT-S2	↓	↑	↑	↑	↓	↔	↔	↔	↔	↑

Tab.10: Zusammenfassung der NK-Suszeptibilität von Fibroblasten nach der Infektion mit verschiedenen Virusstämmen im Vergleich zur quantitativ gemessenen Oberflächenmolekülexpression der MHC-Klasse-1-Moleküle, MHC-Klasse-1b-Moleküle, Adhäsionsmoleküle und NKG2D-Liganden. Zeichenerklärung: ↓ Expressionsabnahme, ↑ Expressionssteigerung, ↔ unveränderte Expression im Vergleich zu nichtinfizierten Fibroblasten. Dickgedruckte Symbole stehen für eine besonders ausgeprägte Änderung der Expressionsdichte gegenüber den anderen Virusstämmen.

5 Diskussion

5.1 Einführung

Durch fehlende Immunität und / oder Immunsuppression bei gleichzeitiger Reaktivierung des latenten Virus stellt die hCMV-Infektion eine der häufigsten Infektionskomplikationen nach einer allogenen Stammzelltransplantation dar. Vor allem die indirekte T-Zell-Depletion bei allogener Stammzelltransplantation, die in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen zum Schutz einer GvHD mittels CD³⁴⁺-Anreicherung durchgeführt wird [Lang P. et al., 1999; Schumm M. et al., 1999], verursacht aufgrund der verzögerten Immunrekonstitution ein vermehrtes Auftreten viraler Infektionen [Ljungman P., 2001].

Klinisch manifestiert sich die hCMV-Erkrankung als Pneumonie. Seltener treten gastrointestinale Ulzera oder eine Retinitis auf [Stocchi R. et al., 1998]. Indirekt hat die Infektion pathogenetische Bedeutung im Zusammenhang mit der akuten / chronischen Abstoßungsreaktion und bakteriellen Superinfektionen bzw. opportunistischen Infektionen [Fishman J.A. & Rubin R.H., 1998].

Zur Verhinderung der Ausbreitung des Virus dienen zunächst unspezifische Mechanismen wie NK-Zellen oder Interferone, später auch MHC-Klasse-1 restringierte CD⁸⁺ zytotoxische T-Zellen und MHC-Klasse-2 restringierte T-Helfer-Lymphozyten [Van der Meer J.T.M. et al., 1996; Pamphilon D.H. et al., 1999]. Bisher ist nicht vollständig geklärt, welche Rolle dabei die immunmodulierenden Eigenschaften des hCMV, wie z.B. die Herunterregulierung der MHC-Klasse-1-Moleküle auf infizierten Zellen, spielen.

NK-Zellen stellen nach allogener Stammzelltransplantation die ersten nachweisbaren Lymphozyten in der frühen Rekonstitutionsphase dar und sind in wesentlich höheren Anteil vertreten als bei gesunden Normalkontrollen [Jacobs R. et al., 1992]. Damit repräsentieren sie als „first line of defense“ die größte und wichtigste Zellpopulation in den ersten Wochen nach der Transplantation und gelten als dominierende Abwehrzellen gegen hCMV-infizierte Zellen [Biron

C.A. et al., 1997]. So entwickelte ein Patient mit angeborenem NK-Zell-Mangel eine außergewöhnliche Anfälligkeit gegenüber Herpesvirusinfektionen, einschließlich hCMV-Infektionen [Biron C.A. et al., 1989]. Weiterhin wurde bei Mäusen mit genetischer Suszeptibilität gegenüber murinen CMV-Infektionen (Genregion CMV-1) ein Genort entdeckt, der mit NK-Zell-Funktionen assoziiert ist und bei einer Depletion der NK-Zellen eine ansteigende Viruslast hervorruft [Scalzo A.A. et al., 1990 & 1992; Brown M.G. et al., 1999]. So spielt die Entwicklung von Abwehrmechanismen gegenüber einem NK-Zell-Angriff eine entscheidende Rolle für das Überleben des humanen Zytomegalievirus.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, welchen Einfluß die durch die hCMV-Infektion veränderte Expression an Oberflächenmolekülen auf die NK-Zell-Lyse hat und wie diese spezifische Lyseaktivität zu therapeutischen Zwecken gesteigert werden kann.

5.2 Methodenkritik

5.2.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden aus Biopsiegewebe nach Zirkumzision (Abt. für Kinderchirurgie der Universität Tübingen) gewonnene primäre humane Fibroblasten zwischen der Zellpassage 10 - 30 verwendet. Diese ermöglichten nach fünf Tagen Inkubationszeit eine hochgradige hCMV-Infektionsrate, wodurch spezifisch nichtinfizierte versus hCMV-infizierte Targetzellen verglichen werden konnten. Aufgrund des ungleichen MHC-Klasse-1-Status der HFF mit dem Patienten- / Probandenblut (keine Bindung des T-Zellrezeptors) bei negativer hCMV-Serologie (keine Sensibilisierung) kann bei nachfolgenden zweistündigen Zytotoxizitätsassays eine T-Zell-Antwort trotz Unreinheit der Pbmnc bzw. der CD⁵⁶⁺-MACS-Anreicherung ausgeschlossen und auf NK-Zellen spezifiziert werden. Zusätzlich ist bekannt, dass NK-Zellen die Haupteffektorzellen bei kurzdauernden Zytotoxizitätsassays darstellen.

Die für die BATDA-release-Assays bisher standardisierten nichtadhaerenten leukämischen Zelllinien K-562 (human chronic myeloid leukemia in blast crisis)

und MHH-CALL-4 (human acute B-cell precursor leukemia) stellten kein Target für humane Zytomegalievirusinfektionen dar.

Auch die zur routinemäßigen Zytomegalievirusanzucht bereits etablierten Fibroblastenkulturen MRC-5 (human embryonic lung fibroblasts) und MRHF (human newborn foreskin fibroblasts) konnten aufgrund ihrer schweren Permission mit nur langsamen Viruswachstum, sowie dem bei den MRC-5-infizierten Targetzellen beobachteten Adhaerenzverlust bei höherem Infektiositätsgrad, keine Alternative zu den HFF darstellen.

Die Lysierbarkeit durch nichtinfizierte HFF war vergleichbar mit der Zytotoxizität gegenüber K-562 und MHH-CALL-4, wohingegen nichtinfizierte MRC-5 und MRHF eine geringere spezifische Lyserate aufwiesen. Die Spontanlysen der verschiedenen Zelllinien entsprachen einander.

5.2.2 Abtrypsinieren

Ziel des Abtrypsinierens war die Gewinnung einer Einzelzellsuspensionen zur Durchführung des non-adherenten BATDA-release-Assays und durchflusszytometrischer Analysen. Dabei wurde zum Ablösen der Fibroblasten vom Zellkulturschalenboden die Inkubationsdauer mit Trypsin-EDTA auf eine Minute reduziert, da bei einer längerdauernden Einwirkung von proteolytischen Enzymen lebenswichtige Membranproteine verdaut würden, mit resultierender Schädigung und schließlich dem Tod der Zellen. Anschließend erfolgte eine 20minütige ‚Erholungsinkubation‘. Die stichprobenhafte Überprüfung mit einer Supravitalfärbung unmittelbar nach abtrypsinieren der Targetzellen ergab eine Vitalität von 96,84% (HFF) bzw. 92,83% (virusinfizierte HFF). Eine Beeinträchtigung der nachfolgenden Versuchsansätze mit infizierten Einzelfibroblasten aufgrund eventuell angedauerter Oberflächenmoleküle war aufgrund der standardisiert gleichen Behandlung mit Trypsin bei den nichtinfizierten Kontrollfibroblasten zu vernachlässigen.

Ein möglicherweise zellschonenderes Verfahren wäre es gewesen, den Zellbestand mit einem Zellschaber vollständig vom Boden der Zellkulturschale zu

lösen. Da dabei Zellen mechanisch zerstört wurden und keine vollständige Dissoziation der Zellen erreicht werden konnte, stellte dieses Verfahren keine Alternative zur Trypsinbehandlung dar. Weitere Methoden der Separierung wäre der Einsatz anderer Proteasen wie Papain oder Kollagenase.

5.2.3 Immunomagnetische Zellanreicherung

Die Anreicherung erfolgte aus peripherem Vollblut freiwilliger Spender nach Isolierung der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes (Pbmnc) mittels Dichtezentrifugation über einen Stufengradienten aus Ficoll-Hypaque [Böyum A., 1968]. Bei der immunomagnetischen Zelltrennung mittels magnetischen Mikrokugeln handelte es sich um eine hinreichend beschriebene und evaluierte Standardmethode zur Isolierung von Lymphozytensubpopulationen [Molday R.S. et al., 1977; Friemel H., 1991; Geiselhart A. et al., 1997]. Die Effektivität der Isolierung von markierten Zellen aus einem Zellgemisch liegt bei 99% [Geiselhart A. et al., 1997]. Der Anteil an CD⁵⁶⁺-Zellen lag in dieser Arbeit bei 96,84%. Nach H. Friemel und S. Miltenyi et al. wird die Vitalität und das Proliferationsverhalten durch dieses Verfahren nicht beeinträchtigt [Miltenyi S. et al., 1990; Friemel H., 1991].

5.2.4 Zytotoxizitätsassays

Alternativ zum ⁵¹Chromfreisetzungstest wurde der von K. Bloomberg et al. beschriebene nichtradioaktive BATDA-release-Assay verwendet [Blomberg K. et al., 1986ab]. Hierbei handelt es sich um ein Verfahren, welches die Zerstörung von Targetzellen durch Effektorzellen quantitativ erfasst. Diese Bestimmung wird mittels photometrischer Messung der Fluoreszenz des freigesetzten TDA-Europium-Komplexes aus lysierten Zellen ermittelt.

Im Vergleich zum ⁵¹Chromfreisetzungstest ist dieses Testverfahren aufgrund der schnelleren Durchführung und einfacheren Handhabung überlegen. Einschränkungen erfahren beide Tests durch die spontane Freisetzung von TDA bzw. ⁵¹Chrom. Diese Spontanlyserate ist Targetzellspezifisch und abhängig vom Vitalitätszustand der Zellen. Da bei einer hohen Spontanlyse

das Messfenster sehr klein wird und geringe zytotoxische Aktivitäten nicht miterfasst werden, ist durch schonende Testdurchführung eine Spontanlyserate unter 30% anzustreben. Dieser Wert konnte bei den durchgeführten Versuchen fast immer deutlich unterschritten werden. Eine zusätzliche Testkontrolle stellte die in Abhängigkeit vom eingesetzten Effektor / Targetzell-Verhältnis zu erwartende nachlassende spezifische Lyserate dar.

Aufgrund der Trypsinbedingten Membranschädigung der Targetzellen wurden weitere zellschonendere Testverfahren verglichen. Dabei ergab die Neuetablierung eines adhaerenten BATDA-release-Assays im Vergleich zum non-adhaerenten Test sowohl eine geringere Spontanlyserate als auch eine geringere prozentuale spezifische Lyse. Dies hatte den Vorteil eines großen Messfensters mit einer hohen Sensitivität des Testverfahrens.

Der von C. Korzeniewski und D.M. Callewaert [Korzeniewski C. & Callewaert D.M., 1983] ausgearbeitete kolorimetrische adhaerente LDH-Zytotoxizitätsassay, welcher als Messkriterium der Zytolyse die am Ende der Tumor-Effektorzell-Kokultur registrierbare LDH-Freisetzung aus der Tumorzelle nutzt, lieferte die geringste spontane Lyseaktivität und auch die niedrigste prozentuale spezifische Lyse.

Experimenten mit adhaerenten Targetzellen hatten den Nachteil einer benötigten höheren Effektorzahl, da nach der Hypothese der Kontaktinhibition [Casella G.T. et al., 2000] bei einer 96-well-Mikrotiterplatte die Fibroblastenproliferation erst bei einer Zelldichte von ca. 20.000 HFF / Well stagnierte. Dieses Manko konnte, entsprechend den non-adhaerenten Testverfahren, durch die Einführung von 384-Well-Mikrotiterplatten auf lediglich 5.000 Targetzellen pro Well minimiert werden. Dennoch wurde die Zellzahl / Well nicht sicher konstant gehalten, da infizierte Fibroblasten bei einer hohen Infektionsrate ihre Adhaerenz verloren haben.

Um eine spezifische NK-Zell-Aktivität gegen hCMV-infizierte versus nicht-infizierte Targetzellen aufzuzeigen, wurde eine möglichst hochgradige hCMV-Infektion angestrebt. Daher erwies sich der non-adhaerenten BATDA-release-

Assay für nachfolgende Versuche als am geeignetsten, wobei als Maßnahmen für eine zellschonendere Dissoziation eine kürzere Einwirkdauer von Trypsin und eine 20minütige ‚Erholungsinubation‘ eingesetzt wurden. Zusätzlich minimierte ein paralleler Kontrollansatz mit MOCK-infizierten HFF die zufällige Fehlerwahrscheinlichkeit.

Aufgrund der nach allogener Stammzelltransplantation in Aplasie befindlichen Patienten konnten die Zytotoxizitätsassays lediglich zu einem geringen Prozentsatz mit Effektorzellen von Patienten durchgeführt werden.

5.2.5 Durchflusszytometrie

Die analytische Durchflusszytometrie stellt ein einfaches und schnelles Verfahren zur immunologischen und morphologischen Charakterisierung von Zellen dar. Der Vorteil dieser Methode besteht in der Untersuchung einer großen Zellzahl auf verschiedene Oberflächenantigene innerhalb kurzer Zeit. Die Farbstoffe FITC (Fluorescein-Isothiocyanat, Absorptionsmaximum 495 nm, Emissionsmaximum 519 nm) und PE (Phycoerythin, Absorptionsmaximum 480 & 565 nm, Emissionsmaximum 578 nm) gehören zur diagnostischen und wissenschaftlichen Routine. Eine Markierung der Zellen mit diesen Fluorochrommarkierten Antikörpern erfolgte mit standardisierten Protokollen.

Einflussfaktoren für die durchflusszytometrischen Analysen waren die Autoimmunfluoreszenz, unspezifische Bindungen der Antikörper und ungleichmäßige Färbungen der Einzelzellen. Ersteres wurde durch mitführen einer Negativkontrolle (Simultest™Control) berücksichtigt. Unspezifische Bindungen konnten bei der Bestimmung von Oberflächenmolekülen bei infizierten Fibroblasten durch einen Parallelansatz mit nichtinfizierten HFF vernachlässigt werden. Um eine gleichmäßige Färbung auf der gesamten Zelloberfläche zu gewährleisten, folglich ‚Patching‘- (reaktives Zerklumpen der Zelloberflächenproteine bei Kreuzvernetzung mit Immunglobulinmolekülen) und ‚Capping‘- (an das Patching anschließende durch den Zellstoffwechsel verursachte haubenförmige Anreicherung der Klumpen auf einer Seite der Zelle) Phänomene zu vermeiden, erfolgte ein Waschgang mit fixierendem

FACS-Flow, sowie die Inkubation bzw. Aufbewahrung der Proben bei ca. 4 °C im Eisbad [Taylor R.B. et al., 1971].

Um genauere Aussagen über den Expressionsgrad eines Antigens zu erhalten, wurde zusätzlich die quantitative Durchflusszytometrie mittels Quifikit® der Firma Dako angewendet. Hierbei bot eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung, sowohl von den zu untersuchenden Fibroblasten als auch von den mitgeführten Beads, mit dem selben Sekundärantikörper den Vorteil, dass die Zahl der Fluorochrommoleküle pro Antikörper zur Berechnung der gebundenen Antikörper / Zelle nicht bekannt sein musste. Als Voraussetzung, daß alle Oberflächenmoleküle vollständig erfasst wurden, sollte eine Zugabe der Antikörper im Überschuß, d.h. das genaue Einstellen der Zellen auf eine bestimmte Zellzahl, erfolgen [Smith K.B. & Ellis S.A., 1999]. Das Quifikit® der Firma Dako gilt im Vergleich mit verschiedenen Methoden für die quantitative Durchflusszytometrie als eine der genauesten in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Daten zwischen verschiedenen Geräten und Laboratorien [Schwartz A. et al., 1998; Serke S. et al., 1998].

Zur Detektion infizierter HFF wurde ein neues Protokoll zur intrazellulären Messung des hCMV IE-Antigens pp72 erstellt. Dazu wurde das standardisierte FIX & PERM Zellpermeabilisationskit der Firma Caltag angewandt. Die Ermittlung der durchflusszytometrischen Einstellungen erfolgte experimentell.

5.3 Oberflächenmoleküle

5.3.1 Qualitative und Quantitative HLA-ABC-Expression auf hCMV infizierten Fibroblasten

Die auf Chromosom 6 kodierten Genloci A, B und C des humanen Leukozytenantigens präsentieren intrazelluläre endogene, virale oder tumor-assoziierte Antigene in Form von Nonamerpeptiden [Dunlop M.B. et al., 1977; Rammensee H.G. et al., 1995]. So werden z.B. virale Proteine von Proteasomen fragmentiert, mittels TAP-1- / TAP-2-Transportkomplex in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums geschleust und von den dort

synthetisierten MHC-Klasse-1-Komplexen über das trans-Golgi-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert. Eine Erkennung durch zytotoxische CD⁸⁺ T-Lymphozyten (CTL) führt zur Fas- oder Perforinabhängigen Zerstörung der Wirtszelle [Rotzschke O. et al., 1990].

Als Strategie der Immunevasion wurden für das hCMV bereits mehrere mögliche Mechanismen zur Herunterregulierung der MHC-Klasse-1-Moleküle durch virale Proteine (pUS3, pUS2, pUS6, pUS11, ppUL83) aufgezeigt [Jones T.R. & Muuzithras V.P., 1991; Ahn K. et al., 1996; Gilbert M.J. et al., 1996; Jones T.R. et al., 1996; Wiertz E.J.H.J. et al., 1996 a,b; Ahn K. et al., 1997; Hengel H. et al., 1997; Lehner P.J. et al., 1997; Hewitt E.W. et al., 2001]. Auch in dieser Arbeit ergaben sowohl die qualitativ kinetischen Untersuchungen, als auch die quantitativen durchflusszytometrischen Analysen bei einer zunehmenden Infektion durch das hCMV eine abnehmende HLA-ABC Expressionsdichte. Targetzellen, die mit dem Laborstamm AD-169 infiziert waren, zeigten dabei kontinuierlich eine stärkere MHC-Klasse-1-Inhibition im Vergleich zu Wildtypvirusinfizierten Fibroblasten.

Eine gleiche Anzahl an HLA-ABC-Moleküle bei WT-GR1 und WT-GR2-infizierten Fibroblasten könnte mutationsbedingt sein, da die Ganciclovirresistenz bei beiden Virusstämmen durch eine Aminosäuresubstitution bei C 603 W entstand.

Die noch stärker vorhandene Restexpression bei den Wildtypstämmen ließe sich damit erklären, dass einige Fibroblasten erst vor kurzer Zeit infiziert worden sind. Damit befänden sie sich in einem sehr frühen Stadium der hCMV-Replikation, in dem noch keine Herunterregulierung der MHC-Klasse-1-Moleküle stattfinden konnte. Die stärkere Inhibition der MHC-Klasse-1-Moleküle bei mit dem Laborstamm AD-169-infizierten Fibroblasten wäre demnach auf eine erhöhte Infektiosität und einer damit resultierend schnelleren Virusausbreitung zurückzuführen.

Die nach H. Hengel et al. beschriebene Möglichkeit einer Induktion von MHC-Klasse-1-Molekülen über Interferon- γ sezernierende aktivierte Lymphozyten

lässt sich durch das Versuchsmodell ausschließen [Hengel H. et al., 1995]. Bei diesem Model blieben in vivo die bereits vor dem Einwandern der Leukozyten infizierten Zellen, die also noch keinen Kontakt mit Interferon- γ und TNF- α gehabt hatten, HLA-ABC negativ, während frisch infizierte Zellen weiterhin MHC-Klasse-1-Moleküle exprimieren könnten.

Vorstellbar wäre auch ein nur unvollständiger Eingriff in den Proteinbiosyntheseapparat der Wirtszelle durch das hCMV. Damit besäße der Laborstamm AD-169 aufgrund einer anderen Genomorganisation im Vergleich zu Wildtypvirusstämmen multiplere Möglichkeiten zur Inhibierung der MHC-Klasse-1-Moleküle. Durch die Restexpression an MHC-Klasse-1-Molekülen könnten infizierte Targetzellen weiterhin Virusbestandteile präsentieren und dadurch Immunzellen an den Ort der Infektion lenken. Dies könnte eine Ausbreitung der Infektion verhindern.

Im Jahre 1990 postulierten H.G. Ljunggren und K. Kärre die Missing self-Hypothese, bei der NK-Zellen durch die fehlende Interaktion mit den inhibitorischen Immunglobulinähnlichen Rezeptoren (KIRs) und C-Typ-Lektin-ähnlichen Rezeptoren (CD94 / NKG2) alle Zielzellen lysieren können, die keine MHC-Klasse-1-Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren. Demzufolge wäre der Laborstamm AD-169 aufgrund seiner erhöhten Infektiosität und / oder mutationsbedingt multiplere Eingriffsmöglichkeiten in die MHC-Klasse-1-Synthese bzw. dessen Transport an die Zelloberfläche mit resultierender stärkerer MHC-Klasse-1-Inhibition suszeptibler für eine NK-Zell-vermittelte Lyse im Vergleich zu den Wildtypvirusstämmen [Ljunggren H.G. & Kärre K., 1990].

5.3.2 Nichtklassische MHC-Klasse-1(b)-Moleküle

5.3.2.1 HLA-G

Das nichtklassische MHC-Klasse-1(b)-Molekül HLA-G wurde auf infizierten Targetzellen von allen hCMV-Stämmen hochreguliert. Dies führt durch die Bindung an den KIR2DL4 / p49-Rezeptor zur Hemmung der Proliferation und Zytotoxizität aktivierter NK-Zellen [Ponte M. et al., 1999; Rajagopalan S. & Long

E.O., 1999; Onno M. et al., 2000; Pazmany L. et al., 2000]. So entwickeln HLA-G-Transfektanten von der für NK-Zellen normalerweise sensiblen Targetzelllinie 721.221 eine Resistenz gegenüber einer Lyse sowohl durch NK-Zelllinien als auch durch NK-Zellklone [Pazmany L. et al., 1996]. Ebenso scheinen Trophoblastzellen, welche zum Schutz des fetalen Gewebes vor zirkulierenden maternalen T-Lymphozyten MHC-Klasse-1 und -2 negativ sind, trotz der gesteigerten Ansammlung an CD⁵⁶⁺ NK-Zellen in der menschlichen Dezidua, über eine Expression von HLA-G der NK-Zell-bedingten Lyse zu entgehen [Starkey M. et al., 1988; King A. et al., 1989].

5.3.2.2 HLA-E

HLA-E stellt ein weiteres nichtklassisches MHC-Klasse-1(b)-Molekül dar, welches polymorphe Signalpeptide anderer MHC-Klasse-1-Moleküle trägt. Um den NK-Zellen eine regelrechte Biosynthese der MHC-Klasse-1-Moleküle zu signalisieren, werden diese den heterodimeren Molekülkomplexen (KIRs) CD⁹⁴⁺-NKG2A (CD^{159a}) und CD⁹⁴⁺-NKG2C präsentiert [Braud V.M. et al., 1998; Lee N. et al., 1998; Brooks A.G. et al., 1999; Vales-Gomez M. et al., 1999]. Zur Imitierung einer gesunden Zelle, enthält das Leitsegment der hCMV-Genomregion UL40 ein dem menschlichen MHC-Klasse-1-Protein gleichendes Peptid mit neun Aminosäuren, welches aufgrund der pUS6-vermittelten Blockade des TAP-Transporters durch das hCMV, unabhängig vom TAP-Transporter interagiert [Tomasec P. et al., 2000]. Eine Überexpression an gpUL40 induziert die Hochregulierung von HLA-E auf der Oberfläche infizierter Zellen und schützt sie damit vor einem NK-Zell-Angriff [Tomasec P. et al., 2000; Ulbrecht M. et al., 2000; Cerboni C. et al., 2001; Wang E.C. et al., 2002]. Auch in dieser Arbeit zeigten sämtliche hCMV-infizierte Fibroblasten gegenüber nichtinfizierten Targetzellen eine gesteigerte Expression der HLA-E-Moleküle.

5.3.3 Adhäsionsmoleküle

5.3.3.1 ICAM-1

Bei allen Virusstämmen konnte im Vergleich zur MOCK-Infektion eine

generalisierte Expressionssteigerung des zur Immunglobulinsuperfamilie gehörenden interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (CD⁵⁴⁺) ermittelt werden. Damit ist über den LFA-1 (CD¹⁸⁺) / CD^{11a+}- und Mac-1 (CD¹⁸⁺) / CD^{11b+}-Rezeptor eine Aktivierung zytotoxischer T-Zellen möglich. Über ein festes Anhaften mit nachfolgender Extravasation und Migration der Leukozyten in das Gewebe wird hierdurch einer Ausbreitung der hCMV-Infektion entgegengewirkt.

In vitro Studien zeigten zusätzlich, dass monoklonale Antikörper gegen CD⁵⁴⁺ die NK-Zell-vermittelte Lyse hCMV-infizierter Fibroblasten blockieren [Leong C.C. et al., 1998]. Der Hochregulierung von ICAM-1 bei hCMV-infizierten Endothelzellen [Sedmark et al., 1994; Shahgasempour et al., 1997; Waldmann et al., 1998], Fibroblasten [Grundy et al., 1993; Grundy & Downes, 1993; Ito et al., 1995; Craigen & Grundy, 1996] und anderen Zellen [Ibrahim et al., 1993; van Dorp et al., 1993; Larcher et al., 1997; Stuart et al., 1997] wird damit eine wichtige Funktion in der NK-Zell-vermittelten Immunantwort zugeschrieben. Teilweise konnte im Vergleich mit nichtinfizierten Kontrollkulturen eine zehnfach erhöhte ICAM-1-Expression bei hCMV-infizierten Endothelzellkulturen nachgewiesen werden.

Während verschiedene Arbeitsgruppen eine dominierende Rolle in der CD⁵⁴⁺-Expression in Bezug auf den Zellkontakt zwischen NK- und Tumorzellen sehen [Chaperot L. et al., 1996; Maki G. et al., 1998], ergaben andere Studien keinen Einfluß von CD^{11a+}, CD⁵⁴⁺, CD⁵⁸⁺ [Quillet-Mary A., 1991], bzw. CD⁵⁴⁺, CD¹⁰²⁺ [Akella R. & Hall R.E., 1992], bzw. CD^{11a+}, CD⁵⁴⁺, CD⁵⁶⁺ [Palucka A.K., 1991] im Hinblick auf die NK-Zell-Suszeptibilität verschiedener Tumorzellen und Tumorzelllinien. Diese Diskrepanz ist vermutlich auf die Verwendung verschiedener Targetzelllinien zurückzuführen, da sich zunehmend abzeichnet, dass die Signale für eine NK-Zell-Lyse zellspezifisch variieren. So zeigte sich in Gewebeschnitten von hCMV-infizierten Lebertransplantaten eine Mehrexpression an ICAM-1 und VCAM-1 [Einsele et al., 1994; Lautenschlager et al., 1996], während Myokardbiopsien nach einer hCMV-Infektion keine veränderte ICAM-1-Expression aufwiesen [Koskinen, 1993; Allen et al., 1996].

Ferner berichten mehrere Studien über eine hCMV-bedingte Entwicklung einer progressiven Gefäßsklerose nach Herztransplantation und eine hCMV-vermittelte akute Transplantatabstoßung nach Lungen- und / oder Herztransplantation [von Willebrand et al., 1986; Grattan et al., 1989; Mc Donald et al., 1989; Loebe et al., 1990; Everett et al., 1992; Waldmann, 1998; Valantine, 1999; Tong et al., 2002]. Korrelierend hierzu zeigt sich sowohl bei der akuten Transplantatabstoßung [Herskowitz et al., 1994; Park et al., 2000; Tanio et al., 1994; Zhang et al., 2000] als auch bei der progressiven Gefäßsklerose nach einer Transplantation [Denton et al., 2000; Labarrere et al., 1997] eine vermehrte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1.

5.3.3.2 LFA-3

Bereits mehrere Arbeitsgruppen wiesen eine gesteigerte Expression der LFA-3-Moleküle (Lymphocyte Function-Associated Antigen-3, CD⁵⁸⁺) zum early / immediate early Zeitpunkt des Replikationszyklus bei hCMV-infizierten Fibroblasten nach [Grundy J.E. & Downes K.L., 1993; Craigen J.L. & Grundy J.E., 1996]. Damit wird durch eine Bindung mit CD²⁺ die NK-Zell-Suszeptibilität verstärkt [Lanier L.L. et al., 1997; Fletcher J.M. et al., 1998]. So waren es J.M. Fletcher et al. möglich, durch die Zugabe eines CD²⁺-spezifischen Antikörpers die NK-Zell-Lyse bei hCMV-infizierten Fibroblasten partiell zu blockieren. Dem Adhäsionsmolekül LFA-3 wird damit eine wichtige Funktion in der Interaktion zwischen NK-Zellen und virusinfizierten Zellen zugeschrieben.

F. Komatsu und M. Kajiwara belegten in einer Studie über den Einfluß unterschiedlicher Adhäsionsmoleküle bei verschiedenen Zelllinien auf die Zytotoxizität von NK-Zellen, LAK-Zellen und der Zelllinie NK-92, dass sich die spezifische Lyse IL-2-stimulierter NK-Zellen gegenüber entsprechenden Zelllinien durch eine CD⁵⁸⁺-Blockade, nicht jedoch durch die Blockade von CD⁵⁴⁺ oder CD¹⁰²⁺, senken ließ [Komatsu F. & Kajiwara M., 1998]. Dabei schienen Tumorzellen eine gewisse Expression an CD⁵⁸⁺ und CD⁵⁴⁺ zum Andocken der NK-Zellen zu benötigen [Gwin J.L. et al., 1996].

Fletcher et al. entdeckten eine starke Korrelation zwischen der Anfälligkeit zur NK-Zell-Lyse und der Zelloberflächenexpression an LFA-3 bei hCMV-infizierten Fibroblasten [Fletcher J.M. et al., 1998]. So waren die mit den CD⁵⁸⁺-herunterregulierenden Virusstämmen Towne, Davis, Toledo und CIFE infizierten Targetzellen refraktär für eine NK-Zelllyse, während Fibroblasten, die mit den LFA-3-hochregulierenden hCMV-Stämmen AD-169 und CIF infiziert waren, eine erhöhte NK-Zell-Suszeptibilität aufwiesen. Dabei veranschlagte die Arbeitsgruppe mit 29.000 bis 71.000 LFA-3-Molekülen pro Targetzelle eine Mindestanzahl an benötigten CD⁵⁸⁺-Molekülen für eine mögliche Lyse durch NK-Zellen.

In dieser Arbeit wären mit $157.330,58 \pm 36.790,08$ CD⁵⁸⁺-Moleküle / Zelle AD-169-infizierte HFF und mit $129.193,45 \pm 3.961,50$ CD⁵⁸⁺-Moleküle / Zelle WT-GR3-infizierte HFF empfindlich gegenüber NK-Zellen, während mit den Virusstämmen WT-S1, WT-S2, WT-GR1, WT-GR2 und WT-MR infizierte Targetzellen, die keine Hochregulierung an LFA-3-Molekülen zeigten, NK-Zell-resistent blieben. Die normale Expressionsdichte an LFA-3-Molekülen bei nichtinfizierten HFF betrug $37.707,16 \pm 9.005$ Moleküle.

5.3.4 NKG2D-Liganden

Der C-Typ-Lektinähnliche Rezeptor NKG2D wird von NK-Zellen, CD⁸⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert. Er interagiert mit den MHC-Klasse-1-ähnlichen MIC- und ULBP-Molekülen und bildet mit dem Adaptor DAP 10 einen aktivierenden Immunrezeptorkomplex [Bauer S. et al., 1999; Wu J. et al., 1999; Diefenbach A. et al., 2000]. Dieser steigert über die p85 Untereinheit der Phosphatidylinositol-3-Kinase die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen, die Produktion von Zytokinen (IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , TNF- β), sowie die Freisetzung der Chemokine Makrophagen-Inflammatorisches-Protein (MIP)-1 α , MIP-1 β & I-309 und kostimuliert CD⁸⁺ T-Zellen [Bauer S. et al., 1999; Wu J. et al., 1999 & 2000; Cosman D. et al., 2001; Groh V. et al., 2001; Kubin M. et al., 2001].

Als NKG2D-Liganden fungieren beim Menschen die Moleküle MICA und MICB (MHC class-1-related chains A / B) und die ULBP1 - 4 (UL16-binding proteins). Während MICA und MICB im Vergleich zu den klassischen MHC-Klasse-1-Molekülen nicht mit β_2 -Mikroglobulin oder Antigenpeptiden interagieren [Groh V., 1996], sind ULBP1-4 im Gegensatz zu den klassischen MHC-Klasse-1-Molekülen über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an der Zellmembran verankert, besitzen keine α_3 -Domäne und assoziieren ebenfalls nicht mit β_2 -Mikroglobulin [Bauer S. et al., 1999; Cosman D. et al., 2001; Steinle A. et al., 2001]. Die Expression der MHC-kodierten MICA- und MICB-Moleküle ist in vivo auf epitheliale und hämatopoetische Tumore, sowie virusinfizierte Zellen beschränkt [Groh V. et al., 1996 & 1999; Salih H. et al., 2002; Tieng V. et al., 2002]. Daher betrachtet man sie als Gefahrensignale bei Zellstress, die abnorme Zellen via NKG2D für zytotoxische Lymphozyten markieren [Groh V. et al., 1996 & 1998; Vance R.E., 2000; Vivier E. et al., 2002]. Die Expression der ULBP1 - 3 wurde bisher lediglich bei Zelllinien beschrieben. Ihre Funktion ist noch weitgehend unklar [Cosman D. et al., 2001].

In dieser Arbeit zeigten hCMV-infizierte Targetzellen im Vergleich zu nichtinfizierten Fibroblasten eine generalisierte Expressionszunahme von ULBP3. Auch MICA wurde, ausgenommen die Virustatikasensitiven Wildtypstämme WT-S1 und WT-S2, konstant hochreguliert. Mit Ausnahme der selektiven Hochregulierung von ULBP1-Molekülen bei dem Virustatika-sensitiven Wildtypstamm WT-S1 blieb die Oberflächenexpression an ULBP1, ULBP2 und MICB nach Virusinfektion unverändert. Targetzellen, die mit dem Laborstamm AD-169 oder dem multiresistenten hCMV Wildtypstamm WT-MR infiziert waren, zeigten sogar eine aktive Inhibition an MICB-Oberflächenmolekülen. Diese Blockade der NKG2D-vermittelten NK-Zell-Effektorfunktion durch das früh replizierte lösliche hCMV Glycoprotein UL16, welches die Moleküle ULBP1, ULBP2 und MICB im Endoplasmatischen Retikulum zurückhält, wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben [Cosman D. et al., 2001; Welte S.A. et al., 2003].

Da der NKG2D-Rezeptor und das gpUL16 keine grundlegend strukturellen Ähnlichkeiten aufweisen, postulierten C.L. Sutherland et al. zwei Modelle für die

Wirkung des gpUL16: intrazelluläres Zurückhalten von NKG2D-Liganden oder maskieren von NKG2D-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche. Für die unbeeinträchtigte Expressionssteigerung an ULBP3 und MICA auf virusinfizierten Zellen scheint weniger eine bestimmte DNA-Sequenz verantwortlich zu sein (MICA und MICB haben ca. 85% identische Aminosäuren, jedoch nur 25% identische Aminosäuren im Vergleich zu ULBPs, welche wiederum zueinander nur ca. 55% identische Aminosäuren aufweisen), als vielmehr ein gemeinsames Strukturelement einiger NKG2D-Liganden. So könnte eine lediglich bei ULBP1, ULBP2 und MICB entdeckte N-terminale Glykosilierung an Position 8 im Zentrum der β -Faltblattstruktur die selektive Bindung des gpUL16 erklären [Li P. et al., 1999]. Da einige MICA-Varianten und ULBP3 im Vergleich zu MICB, ULBP1 und ULBP2 nur eine niedrige Affinität für die Bindung des NKG2D-Rezeptors aufweisen [Steinle A. et al., 2001; Sutherland C.L. et al., 2002], scheint die gemessene Hochregulierung nur noch einen geringen Einfluss auf die NK-Zellfunktion zu haben.

5.4 Immunrekonstitution

Eine Analyse des zeitlichen Auftretens von hCMV-Erkrankungen nach der Transplantation bei 107 untersuchten Kindern der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen ergab einen Median am Tag 25,5 [Anhang 11.3]. Zu diesem Zeitpunkt stellen bei dem untersuchten Patientenkollektiv nach allogener Stammzelltransplantation die CD⁵⁶⁺ Natürlichen Killerzellen die dominierende Lymphozytenpopulation dar und bilden somit die erste lymphozytäre Abwehr gegen solche Infektionserreger [Jacobs R. et al., 1992; Handgretinger R. et al., 2001; Lang P. et al., 2003]. Die T-Lymphozyten steigen erst im Verlauf der Rekonstitution wieder auf ihre Normwerte an, während der relative Anteil an NK-Zellen abnimmt.

5.5 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen hCMV-infizierte Fibroblasten

5.5.1 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen AD-169 infizierte HFF

Während unstimulierte NK-Zellen fünf gesunder Probanden keine signifikante lytische Aktivität aufweisen, zeigte sich bei AD-169-infizierten Fibroblasten durch Zugabe von anti-hCMV IgG, Zytokinstimulation und die Kombination beider Verfahren eine deutliche Zunahme der lytischen Aktivität. Vergleichend zeigten Effektorzellen von $\frac{2}{3}$ der untersuchten Patienten nach allogener Stammzelltransplantation gegen AD-169-infizierte HFF eine signifikant erhöhte spezifische Lyseaktivität, die ebenfalls durch die Inkubation mit anti-hCMV IgG und / oder Zytokinstimulation gesteigert wurde. Ein Grund für diese erhöhte NK-Zell-Suszeptibilität ist unseres Erachtens die im Vergleich zu den WT-S1-, WT-S2-, WT-GR1 bis 3- und WT-MR-infizierten Targetzellen deutlich erhöhte Restriktion an MHC-Klasse-1-Komplexen auf der Zelloberfläche. Dagegen berichten einige Arbeitsgruppen, dass die Reduktion von MHC-Klasse-1-Molekülen auf der Zelloberfläche nicht mit der NK-Zell-Aktivität korreliert und eine MHC-Klasse-1-Blockade auf hCMV-infizierten Targetzellen keine Erhöhung der spezifischen Lyse bewirkte [Fletcher J.M. et al., 1998; Tomasec P. et al., 2000].

Während auch die NK-Zell-resistenten Wildtypvirusstämme WT-S1, WT-GR1 und WT-MR ICAM-1, MICA und ULBP3 verstärkt exprimierten, schien die selektiv bei AD-169- und WT-GR3-infizierten HFF gemessene Hochregulierung von LFA-3 entscheidend für die Aktivierung von NK-Zellen zu sein. Wie bereits erwähnt, konnte auch bei J.M. Fletcher et al. durch Zugabe eines CD²⁺-spezifischen Antikörpers bzw. bei F. Komatsu und M. Kajiwara über eine CD⁵⁸⁺-Maskierung auf hCMV-infizierten Targetzellen die spezifische Lyse der NK-Zellen teilweise blockiert werden [Fletcher J.M. et al., 1998; Komatsu F. & Kajiwara M., 1998]. Ebenso waren bei J.M. Fletcher et al. die LFA-3 negativen Targetzellen resistent gegenüber einer NK-Zell-Lyse, während Fibroblasten, die mit den LFA-3-hochregulierenden Stämmen AD-169 und CIF infiziert wurden,

eine gesteigerte NK-Zell-Reaktivität aufwiesen. Als Ursache für die beobachtete Hochregulierung der Adhäsionsmoleküle wäre eine Zytokinfreisetzung der virusinfizierten Zellen denkbar. Dabei ist es noch unklar, ob die CD²⁺-LFA 3-Interaktion lediglich eine erhöhte Adhärenz zwischen der NK-Zelle und der Targetzelle bewirkt oder ob diese Bindung ein zusätzliches kostimulatorisches Signal zur Aktivierung der NK-Zelle darstellt.

Die partiell hochregulierten NKG2D-Liganden schienen nur einen geringen Einfluß auf die NK-Zell-Aktivität zu haben. Dies kann über die niedrige Affinität einiger MICA-Varianten und ULBP3 im Vergleich zu MICB, ULBP1 und ULBP2 für die Bindung des NKG2D-Rezeptors erklärt werden [Steinle A. et al., 2001; Sutherland C.L. et al., 2002].

Trotz einheitlicher Oberflächenexpression der Targetzellen zeigte ein Drittel der NK-Zellen des untersuchten Patientenkollektivs keine signifikante Zytotoxizität gegen AD-169-infizierte Fibroblasten. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass die NK-Zellen einiger Patienten empfindlicher für die hCMV-vermittelten inhibitorischen Signale sind. So könnte die im Vergleich zu nichtinfizierten Fibroblasten unveränderte Expression an ULBP1 und ULBP2, die Hochregulierung von HLA-E und HLA-G, sowie die MICB-Inhibierung eine kumulative Signalwirkung zur Hemmung bestimmter NK-Zellen bedeuten. Andererseits wäre auch eine Funktionsstörung der NK-Zellen in der Frühphase nach einer allogenen Stammzelltransplantation denkbar.

Unabhängig von der NK-Zell-Aktivität entwickelte allerdings keiner der Patienten dieser Studie eine hCMV-Infektion. Die ausbleibende Reaktivierung des hCMV in der Patientengruppe mit niedriger NK-Zell-Aktivität kann durch ihre Seronegativität erklärt werden. So waren lediglich zwei der untersuchten Patienten, beide mit hoher NK-Zell-Aktivität, hCMV positiv. Daher bleibt die klinische Relevanz der NK-Zell-Wirkungsgrade noch spekulativ, wenngleich ein hoher Aktivitätslevel Vorteilhaft sein könnte.

Ferner zeigte eine Stimulation der NK-Zellen mit 40 IE / ml IL-2 bei AD-169-infizierten Targetzellen eine deutliche Zunahme der spezifischen Lyse. Nach

W.E. Carson et al. wird dabei der hochaffine IL-2-Rezeptor ausschließlich von CD56^{bright} Zellen, das heißt NK-Zellen mit einer hohen Expressionsdichte des CD56⁺ Antigens auf ihrer Oberfläche, exprimiert [Carson W.E. et al., 1997]. Diese Zellpopulation ist nach der allogenen Stammzelltransplantation deutlich vermehrt [Jacobs R. et al., 1992]. Außerdem konnte eine erhöhte IL-2 Konzentration im Serum hCMV-infizierter Patienten nachgewiesen werden [Jordan et al., 1992]. Dieser natürliche Stimulationsweg scheint somit durch klinische Gaben von IL-2 potenziert zu werden.

Eine Inkubation der Effektorzellen mit IL-15 erreichte nochmals eine höhere NK-Zellaktivierung im Vergleich zur Stimulation mit IL-2. Bereits mehrere Studien wiesen daraufhin, dass IL-15 ein wichtiger Faktor in der Differenzierung, dem Überleben und der Funktion der NK-Zellen darstellt [Cavazzana-Calvo M. et al., 1996; Leclercq G. et al., 1996; Mrozek E. et al., 1996; Carson W.E. et al., 1994 & 1997; Mingari M.C. et al., 1997]. E. Mrozek et al. sehen im IL-15 sogar den bedeutendsten physiologischen Wachstumsfaktor in der NK-Zell-Reifung [Mrozek E. et al., 1996]. Mäuse mit einer Deletion des IL-2 / 15R β -Rezeptors, ein gemeinsamer Ligand für IL-2 und IL-15, zeigten eine drastische Reduktion der peripheren NK1.1+CD3⁺ Zellen und eine fehlende NK-Zell-Aktivität in vitro [Suzuki H. et al., 1997]. IL-15R α -Rezeptor deletierte Mäuse wiesen multiple Defekte in den Rezeptoren des angeborenen Immunsystems auf, einschließlich einer fehlenden NK-Zell-Präsenz in der Milz und einer mangelnden NK-Zell-Zytotoxizität [Lodolce J.P. et al., 1998]. Dementsprechend konnte über eine exogene Gabe von IL-15 bei gesunden Mäusen eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität, sowie eine Zunahme der prozentualen und absoluten Anzahl an NK-Zellen in der Milz erreicht werden [Munger W. et al., 1995; Evans R. et al., 1997; Kennedy M.K. et al., 2000]. Von T.A. Fehniger et al. erzeugte transgene Mäuse mit einer Überexpression an murinem IL-15 zeigten eine auffallend frühe Expansion der NK-Zellen [Fehniger T.A. et al., 2001].

Im Vergleich zum IL-2 induziert IL-15 die Proliferation der CD56^{bright} NK-Zellen ebenfalls dosisabhängig, benötigt zur Aktivierung des IL-2 / 15R β -Rezeptors

allerdings lediglich Konzentrationen im nanomolaren Bereich [Carson W.E., 1994]. In dieser Arbeit wurde eine Stimulation mit 1 ng / ml durchgeführt.

Im Hinblick auf virale Infektionen konnte bereits eine durch das Herpesvirus 6 & 7 vermittelte NK-Zell-Aktivierung mittels Zugabe eines Antikörpers gegen den IL-2 / 15R β -Rezeptor blockiert werden [Flamand L., 1996; Atedzoe B.N., 1997]. Somit scheint IL-15 eine Schlüsselrolle in der angeborenen Immunabwehr gegen virale Infektionen zu spielen. Eine Immuntherapie mit IL-15 könnte dabei eine sinnvolle Ergänzung zur konventionellen antiviralen Therapie darstellen.

Die kumulative Inzidenz der mittels PCR-Analyse erfassten hCMV DNA-ämie am 100. Tag nach der Transplantation von T-Zell-depletierten CD³⁴⁺-Stammzellpräparaten betrug in einer Kohorte von 100 Patienten unseres Transplantationszentrums lediglich 29 %. Im Vergleich zu Studien mit transplantierten nicht-depletierten Stammzellen bei Kindern war die Inzidenz damit nicht deutlich erhöht (24 %) [Matthes-Martin S., 2003], während Erwachsene nach Gabe von nichtdepletierten Stammzellen eine hCMV-Antigenämie zwischen 48 % und 87 % aufweisen [Takenaka K., 1997; Osarogiagbon R.U., 2000]. Damit hat die T-Zelldepletion durch CD³⁴⁺-Anreicherung keinen negativen Einfluß auf die hCMV DNA-ämie. Ursächlich hierfür scheint neben der prophylaktischen Gabe von Acyclovir auch die in dieser Arbeit demonstrierte antivirale Aktivität der NK-Zellen zu sein.

5.5.2 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen WT-S1-infizierte HFF

Der aus Muttermilch isolierte Virustatikasensitive hCMV-Stamm WT-S1 zeigte nach einer Infektion von Fibroblasten ein geringeres spezifisches Lyseverhalten durch NK-Zellen, sowohl von gesunden Probanden als auch von allogentstammzelltransplantierten Patienten im Vergleich zu nichtinfizierten Targetzellen. Damit wird die Immunantwort des Wirts durch eine Suppression von HLA-ABC, LFA-3, MICA, MICB und ULBP2, sowie eine Expressionssteigerung von HLA-E und HLA-G wirkungsvoll umgangen. Die Zunahme an ICAM-1, ULBP1 und ULBP3 auf der Zelloberfläche WT-S1-infizierter HFF sind nur ineffektive Abwehrmechanismen der Targetzelle.

5.5.3 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen WT-MR-infizierte HFF

Foscarnet ist ein organisches Pyrophosphat, welches die virale DNA-Polymerase und reverse Transkriptase durch Komplexbildung hemmt. Die menschliche DNA-Polymerase α ist etwa um den Faktor 100 unempfindlicher als die Polymerase des hCMV. Nebenwirkungen sind häufig Niereninsuffizienz und Elektrolytstörungen (insbesondere Hypokalzämie), selten Anämie, Penisulzera und Krampfanfälle. Im Gegensatz zu Ganciclovir werden Cidofovir und Foscarnet UL97-unabhängig aktiviert. Resistenzen entstehen bei allen drei Virustatika durch eine Mutation im viralen DNA-Polymerase-Gen (UL54-Region).

Der untersuchte multiresistente hCMV-Stamm zeigte nach Fibroblasteninfektion gegenüber NK-Zellen gesunder Probanden und stammzelltransplantierter Patienten eine deutlich geringere spezifische Lyse im Vergleich zur nichtinfizierten Kontrolle. Dafür spricht die geringe Expression von LFA-3, MICB, ULBP1 und ULBP2, sowie die erhöhte Produktion von HLA-E und G. Die geringe Anzahl an HLA-ABC-Molekülen, als auch die gesteigerte Expression von ICAM-1, MICA und ULBP3 kann der NK-Zellinhibition nicht effektiv entgegenwirken. Selbst die Behandlung mit Interleukinen oder anti-hCMV IgG blieb wirkungslos.

5.5.4 Zytotoxizität von NK-Zellen gegen WT-GR1- und WT-GR3-infizierte HFF

Ganciclovir erhält seine antivirale Aktivität erst durch eine Phosphorylierung über viruskodierte Phosphotransferasen in hCMV-infizierten Zellen zum Ganciclovir-Monophosphat. Das über zelluläre Nukleotidkinasen entstehende Ganciclovir-Triphosphat hemmt schließlich die virale DNA-Polymerase. Die Therapie mit Ganciclovir gegen hCMV-Isolate bei Knochenmarktransplantierten Patienten ergab eine ca. 50fach erhöhte Aktivität im Vergleich zur Gabe von Acyclovir [Tymms A.S. et al., 1984].

Studien aus Seattle, Minnesota und der Universität von Californien in Los Angeles (UCLA) ergaben trotz einer hCMV-Eliminierung aus Rachensekret und anderen Körperflüssigkeiten bei Ganciclovirbehandelten Patienten mit einer hCMV-Pneumonie lediglich eine Überlebensrate von 20 % (6 von 30) [Shepp D.H. et al., 1986 ; Erice A. et al., 1987; Winston D.J. et al., 1988]. Auch die Kombination eines antiinflammatorischen Effektes über die Gabe von hochdosiertem Cortisol und dem antiviralen Effekt von Ganciclovir ergab kein besseres Ergebnis (nur 1 von 6 Patienten überlebte) [Reed E.C. et al., 1986]. Eine zweiwöchige Behandlung mit Ganciclovir bei einer durch das hCMV verursachten Gastroenteritis zeigte ebenfalls keinen Zusammenhang mit klinischer oder endoskopischer Verbesserung im Vergleich zu einer Placebo-Gruppe oder Supportivtherapie [Reed E.C. et al., 1990].

Dagegen konnte durch die prophylaktische Gabe von anti-hCMV IgG bei hCMV-seropositiven Patienten nach Knochenmarkstransplantation eine Gesamtinzidenz von 32 % bei hCMV-Infektionen und 9 % bei hCMV-Pneumonien erreicht werden [Winston D.J. et al., 1988 & 1990]. Dies entspricht der Hälfte der zu erwartenden Inzidenzen und ist deutlich geringer im Vergleich zu den Inzidenzen an hCMV-Infektionen (59 % versus 75 % Placebo) und hCMV-Pneumonien (19 % versus 31 % Placebo) bei Patienten, die prophylaktisch hohe Gaben an Acyclovir bekamen [Meyers J.D. et al., 1988]. So könnte eine Kombinationsbehandlung von Virostatika mit anti-hCMV IgG möglicherweise synergistisch wirken und eventuell die benötigte Ganciclovirdosis limitieren. Letzteres wäre im Hinblick auf die Arzneimittelnebenwirkungen wie reversible Neutropenie, Niereninsuffizienz, Fieber, Kopfschmerzen, Phlebitis, Hautausschlag und zentralnervöse Störungen von Vorteil.

Ein zunehmendes Problem bei längerer Anwendung von Ganciclovir, schwerer Immunsuppression oder hoher Viruslast bei suboptimalen Konzentrationen antiviraler Therapie ist die Entstehung von resistenten Virusstämmen [Emery V.C. & Griths P.D., 2000; Limaye A.P. et al., 2000]. In dieser Arbeit wurden zwei Virusstämme mit UL⁹⁷-Genmutation und einer dadurch resultierenden Ganciclovirresistenz hinsichtlich ihrer NK-Zell-Suszeptibilität nach Fibroblasteninfektion kontrolliert. Während in der vorliegenden Arbeit NK-Zellen gegen WT-

GR1-infizierte HFF bei Probanden und Patienten im Vergleich zu nichtinfizierten Targetzellen eine geringere lytische Aktivität aufwiesen, die selbst durch eine Zugabe von anti-hCMV IgG oder eine Vorinkubation mit Interleukinen nicht verbessert werden konnte, zeigten WT-GR3-infizierte Fibroblasten eine höhere NK-Suszeptibilität, die durch eine Inkubation der NK-Zellen mit IL-2 oder IL-15 deutlich gesteigert wurde. Eine zusätzliche Gabe von anti-hCMV IgG führte bei diesem Virusstamm zu einer weiteren Erhöhung der spezifischen Lyserate. Für diese Anfälligkeit gegenüber NK-Zellen scheint die bereits von J.M. Fletcher et al. beschriebene Hochregulierung von LFA-3 ausschlaggebend zu sein [Fletcher J.M. et al., 1998]. Entsprechend verlieh die Maskierung der CD⁵⁸⁺-Moleküle den WT-GR3-infizierten HFF eine Resistenz gegen die NK-Zell-vermittelte Lyse, die durch die Inkubation mit IL-15 durchbrochen wurde.

Weitere Faktoren, die für eine NK-Zell-Lyse WT-GR3-infizierter Targetzellen sprechen, sind die inhibierten HLA-ABC-Moleküle und die Hochregulierung von ICAM-1, MICA und ULBP3. Diese Eigenschaften wurden jedoch auch bei den wenig sensiblen WT-GR1-infizierten Targetzellen beobachtet.

Beide Wildtypstämme nutzen als Mechanismus der Umgehung des Immunsystems eine gesteigerte Expression der HLA-G- und HLA-E-Moleküle, sowie eine unveränderte Dichte an MICB, ULBP1 und ULBP2 auf infizierten Fibroblasten. Diese Schutzmechanismen scheinen durch die Hochregulierung von LFA-3 durchbrochen zu werden. Dennoch spielen, im Hinblick auf die geringe Lyseaktivität der NK-Zellen eines stammzelltransplantierten Patienten gegen WT-GR3-infizierte HFF, noch weitere unbekannte Faktoren eine Rolle in der Vermittlung einer NK-Zell-Lyse.

5.6 Interleukine

5.6.1 Klinische Anwendung von Interleukin-2

Interleukin-2 wird im Rahmen der onkologischen Therapie bisher nur beim metastasierten Melanom und beim Nierenzellkarzinom routinemäßig eingesetzt. Klinische Studien zeigten bei diesen Tumoren unter systemischer Gabe von

hochdosiertem IL-2 eine Tumor-Response-Rate von 15 - 20 % [Rosenberg S.A., 1988; Dutcher J. et al., 1989; Parkinson D.R., 1990; Negrier S., 1998]. Dabei wurde in ca. 4 - 6 % der Fälle eine komplette Remission beobachtet.

Patienten mit Morbus Hodgkin, Non-Hodgkin-Lymphom, nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom, Ovarialkarzinom und kolorektalem Karzinom wiesen geringere Responderaten auf.

D.F. Bajorin et al. und L.D. Ziegler et al. nutzten die gesteigerte NK-Zell-Aktivität in Kombination mit der ADCC über die Gabe von niedrigdosiertem IL-2 mit monoklonalen Antikörpern in der Therapie des metastasierten Melanoms und fortgeschrittener Karzinome [Bajorin D.F., 1990; Ziegler L.D., 1992].

Zudem führte eine niedrigdosierte IL-2 - Gabe bei HIV positiven Patienten zu einer deutlichen Stimulation des Immunsystems, gemessen an einer erhöhten Konzentration zirkulierender NK-Zellen, CD⁴⁺ T-Zellen und Monozyten [Jacobson E.L., 1996; Kovacs J.A., 1996; Hengge et al., 1998, Davey et al., 2000; Lalezari et al., 2000; Losso et al., 2000; Abrams et al., 2002; ESPRIT-Studie, SILCAAT-Studie].

Außerdem scheint die Überlebenszeit von CD⁴⁺ und CD⁸⁺ T-Zellen deutlich verlängert zu werden. Die Viruslast, aber auch provirale DNA und damit der Einfluss auf latent infizierte Zellen, blieb dabei durch die IL-2-Gaben unbeeinflusst [Stellbrink, 1998 & 2002].

5.6.2 Nebenwirkung der Interleukin-2 Therapie / Zusätzlich zu beachtende Gesichtspunkte bei der Anwendung von IL-2

Klinische Studien evaluierten verschiedene Administrationsraten der IL-2 - Gabe (intravenös, subkutan). S. Negrier et al. führten beim fortgeschrittenen Nierenzellkarzinom eine intravenöse Therapie mit $1,8 \cdot 10^6$ IU (entsprechend 0,1 mg) IL-2 über 24 Stunden durch [Negrier S. et al., 1998]. Aufgrund der pharmakokinetischen Eigenschaften von IL-2 kann bei einem Verteilungsvolumen V_D von 0,09 - 0,18 l / kg und einer initialen Eliminationshalbwertszeit

$t_{1/2}$ von 6 - 13 Minuten ein Plasmaspiegel von ca. 50 - 200 pg / ml erwartet werden. Bei dieser Dosisrate erlitten 68 % der Patienten eine vasopressor-resistente Hypotonie, 43 % Fieber, 34 % Übelkeit und Erbrechen und zwischen 11 und 15 % einen Anstieg der Transaminasen, neurologische, renale oder pulmonale Symptome [Negrier S. et al., 1998]. Diese Begleitreaktionen sind bedingt durch die sekundäre Freisetzung von Zytokinen ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6) und endothelial produziertes NO [Shahidi H. & R. Kilbourn, 1998].

Vor allem die kardiovaskuläre Toxizität mit mehrfach beschriebenen Myokardinfarkten stellt die am stärksten dosislimitierende Nebenwirkung dar [Margolin K. et al., 1989; Nora R. et al., 1989; Parkinson D.R., 1990; Dutcher J.P. et al., 1998].

M. Klempner et al. beschrieben ein vermehrtes Auftreten von Bakteriämien bei Patienten mit systemischer IL-2-Therapie aufgrund eines erworbenen reversiblen Defektes der Neutrophilen-Chemotaxis [Klempner M. et al., 1990].

R. Wood et al. geben als maximal tolerierbare Dosis an subkutan injizierbaren rekombinanten Interleukin-2 bei Kindern $3,0 \cdot 10^6$ IU / d an [Wood R. et al., 1993]. Hierbei kommt es aufgrund von Zytokinfreisetzung zu Reizungen an der Injektionsstelle und grippeähnlichen Beschwerden mit Fieber, Schüttelfrost, Gelenk- & Muskelschmerzen [Katlama C. et al., 2002].

Pegyliertes (polyethylen glykol-modifiziertes) IL-2 ist vermutlich schwächer wirksam und insgesamt nicht besser verträglich als das standardisiert verwendete Interleukin-2 [Carr A. et al., 1998]. Im Vergleich zur intravenösen Applikation scheint die subkutane Gabe von IL-2 bei einem niedrigeren Nebenwirkungsprofil gleich effektiv zu wirken [Bartlett J.A. et al., 1998; Witzke O. et al., 1998].

5.6.3 Klinische Anwendung von Interleukin-15

Bisher ist keine Therapie mit IL-15 beschrieben.

5.7 Anti-hCMV Immunglobulin (Cytoglobin[®]-5%)

5.7.1 ADCC mit Cytoglobin[®]-5%

NK-Zellen sind als einzige Lymphozyten befähigt neben der natürlichen zellulären Zytotoxizität auch eine antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) auszuüben. Dabei werden Targetzellen in Gegenwart targetzell-spezifischer Antikörper zerstört. Der niedrigaffine IgG-Rezeptor Fc γ RIII (CD¹⁶⁺), ein multimerer Komplex aus einer Ligandenbindenden α -Kette (CD^{16a+}) und mehreren Transmembranketten aus der TCR-Molekülfamilie, initiiert dabei die intrazelluläre Signaltransduktion nach Bindung an den Fc-Abschnitt von an Antigenen der Targetzellen gebundenen IgG-Antikörpern [Bonnema J.D. et al., 1996]. Dies hat sowohl eine akzessorische Funktion für die natürliche Zytotoxizität als auch eine direkte Initialfunktion für die Zytolyse.

In dieser Arbeit wurden entsprechend der klinischen Applikationsdosis 50 μ g / ml Cytoglobin[®] 5 % (anti-hCMV IgG) für die Durchführung der ADCC verwendet. Diese gepoolten Antikörper liegen in einer elektrophoretischen Reinheit von mindestens 98 % IgG mit einem Monomergehalt zwischen 99 und 100 % vor. Die IgG-Subklassenverteilung entspricht annähernd dem WHO-Standard der Subklassenverteilung bei intravenös verabreichten Immunglobulinen. Eine möglichst physiologische Verteilung der Subklassen ist von Vorteil, da die Expression der einzelnen IgG-Subklassen antigenspezifisch ist, das heißt Antikörper bestimmter Spezifitäten gehören vorwiegend, jedoch nicht ausschließlich, jeweils einer Subklasse an. So rufen z.B. virale Antigene eine Immunantwort in den Subklassen IgG1 und IgG3 hervor [Schleibner S. et al., 1992].

In dieser Arbeit brachte eine Inkubation mit hCMV-IgG bei Fibroblasten, die mit den NK-Zell-suszeptiblen Virusstämmen AD-169 und WT-GR3 infiziert waren, unabhängig von der Zytokinstimulation einen weiteren leichten Anstieg der Targetzelllyse. Da MOCK-infizierte Targetzellen unbeeinflusst blieben, wies dieser Effekt eine hohe statistische Signifikanz auf. Damit scheint die ADCC die

Immune-Escape-Mechanismen des hCMV auszugleichen, indem sie die inhibierenden Effekte der NK-Zell-Rezeptoren umgeht.

5.7.2 Klinische Anwendung von Cytoglobin®-5%

Ergebnisse über eine alleinige Anwendung von anti-hCMV IgG zur Behandlung der hCMV-bedingten Pneumonie nach Knochenmarktransplantation sind widersprüchlich: Während bei P.D. Griffiths et al. nach alleiniger hCMV-IgG-Therapie 9 von 18 Patienten überlebten [Griffiths P.D. et al., 1987], berichten E.C. Reed et al. lediglich über 3 von 14 überlebende Patienten [Reed E.C. et al., 1988].

Im Gegensatz dazu ergab eine Kombinationsbehandlung mit Ganciclovir (7,5 - 10 mg / kg / d) und anti-hCMV-IgG bzw. polyvalentem anti-hCMV-IgG bei behandelten Patienten aus sieben Transplantationszentren mit einem Gesamtüberleben von 54 % eine deutlich verbesserte Überlebensrate [Saxon A. et al., 1986; Bratanow N.C. et al., 1987; Aulitzky W.E. et al., 1988; Emanuel D. et al., 1988; Reed E.C. et al., 1988; Verdonck L.F. et al., 1989; Winston D.J. et al., 1991]. Dabei zeigten Arbeitsgruppen, die beatmete Patienten aus ihrer Studie ausschlossen, ein durchschnittlich höheres Überleben (50 - 85 %) [Saxon A., 1986; Bratanow N.C. et al., 1987; Emanuel D. et al., 1988; Reed E.C. et al., 1988] im Vergleich zu Studien ohne Ausschlusskriterien (0 % - 38 %) [Aulitzky W.E. et al., 1988; Verdonck L.F. et al., 1989; Winston D.J. et al., 1991].

Somit scheint die Kombinationstherapie bei frühzeitiger Diagnosestellung, z.B. durch eine routinemäßig durchgeführte bronchoalveoläre Lavage [Schmidt G.M. et al., 1988], effizienter zu sein. J.D. Grundy et al. sehen als Ursache der hCMV-Pneumonie eine abnorme Immunantwort nach der Knochenmarkstransplantation, die durch die intravenöse Gabe von Immunglobulinen blockiert wird [Grundy J.E. et al., 1987]. Auch murine hCMV-Infektionen zeigen eine verbesserte Heilungsrate bei einer Kombinationstherapie im Vergleich zur alleinigen Gabe eines Medikaments [Wilson E.J. et al., 1987].

Zusätzlich zeigten klinische Studien, dass die prophylaktische Gabe von anti-

hCMV-IgG mit einem milderem Krankheitsverlauf der hCMV-Infektion einhergehen [Neiman P.E. et al., 1977; Winston D.J. et al., 1979]. Fünf von sechs klinischen Studien sahen in Bezug auf die schwere der hCMV-Infektion und einer sinkenden Inzidenz an hCMV-Pneumonien einen Vorteil in der Gabe einer passiven Immunprophylaxe [Araullo-Cruz T.P. et al., 1978; Shanley J.D. et al., 1981; Shanley J.D. & Pesanty E.L., 1985; Rubin R.H. et al., 1986; versus Starr S.E. & Allison A.C., 1977]. Die Studie von S.E. Starr und A.C. Allison, bei der kein Nutzen in der prophylaktischen Gabe von anti-hCMV IgG festgestellt wurde, zeigt jedoch eine deutlich geringere Inzidenz an hCMV-Pneumonien in der Kontrollgruppe (5 %) im Vergleich zu den Gegenstudien (Inzidenz hCMV - Pneumonie 20 - 33 %), wodurch statistisch gesehen nur eine eingeschränkte Gelegenheit zur Feststellung des schützenden Effektes von anti-hCMV IgG gegeben war [Bowden R.A. et al., 1986]. Auch Tierstudien demonstrierten eine Modifikation des Krankheitsverlaufs durch eine passive Immunprophylaxe [Starr S.E. & Allison A.C., 1977; Araullo-Cruz T.P. et al., 1978; Shanley J.D. et al., 1981; Shanley J.D. & Pesanty E.L., 1985; Rubin R.H. et al., 1986].

Zudem scheint die Inzidenz einer GvHD durch die Gabe von intravenösem Immunglobulin gesenkt zu werden [Sullivan K.M. et al., 1988; Winston D.J. et al., 1991].

Studien von D.J. Winsten et al. und K.M. Sullivan et al. ergaben ein verminderes Auftreten an interstitiellen Pneumonien nach Gabe von anti-hCMV IgG bei hCMV-seropositiven Patienten [Sullivan K.M. et al., 1988; Sullivan K.M. et al., 1990; Winston D.J. et al., 1991]. Dagegen konnten O. Ringden et al. keinen präventiven Effekt im Hinblick auf hCMV-bedingte Pneumonien finden, wobei auch hier die niedrige Inzidenz an Pneumonien in der Kontrollgruppe möglicherweise den Nachweis eines signifikanten Unterschiedes verhinderte [Ringden O. et al., 1987]. Die Reduktion einer interstitiellen Pneumonie durch die Gabe von anti-hCMV IgG scheint nach Multivarianzanalysen aus Seattle möglicherweise mit einer Modifikation der GvHD in Beziehung zu stehen [Sullivan K.M. et al., 1990].

Letztendlich ist die Wirkung von intravenösem Immunglobulin nach einer Transplantation von hochangereicherten CD³⁴⁺ Stammzellen noch nicht bewiesen und sollte in nachfolgenden klinischen Studien noch analysiert werden.

5.7.3 Nebenwirkung der Therapie mit Cytoglobin[®]-5 % / Zusätzlich zu beachtende Gesichtspunkte bei der Anwendung von Cytoglobin[®]-5 %

In der klinischen Anwendung von Cytoglobin[®]-5 % können als Begleitreaktionen Schüttelfrost, Kopfschmerzen, Fieber, Übelkeit & Erbrechen, Hypotonie, allergische Reaktionen, sowie Gelenk- und Rückenschmerzen auftreten. Besonders bei Patienten mit ausgeprägtem IgG-Mangel oder angeborenem IgA-Mangel kann es in seltenen Fällen zu Überempfindlichkeitsreaktionen mit plötzlichem Blutdruckabfall bis zum anaphylaktischen Schock führen.

Besonders Patienten mit bestehender Niereninsuffizienz, Diabetes mellitus, Hypovolämie, Adipositas, gleichzeitiger Behandlung mit Nierenschädigenden Arzneimitteln und einem Alter über 65 Jahre stellen Risikogruppen für ein akutes Nierenversagen bei intravenöser Verabreichung von Immunglobulinen dar. Auch eine Übertragung von Infektionskrankheiten wie HIV, HCV, HBV, HAV und Parvovirus B19 können nicht vollständig ausgeschlossen werden. In Einzelfällen traten reversible aseptische Meningitiden, Hämolysen und thromboembolische Ereignisse auf [Bayer Vital].

5.8 Schlussfolgerungen für die klinische Anwendung

Infektionen verursachen einen Großteil der Morbidität und Mortalität nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Sowohl durch die fehlende Immunität und / oder Immunsuppression als auch durch eine Reaktivierung des latenten Virus treten bei Empfängern von allogenen Stammzelltransplantaten häufig hCMV-bedingte Pneumonien auf, seltener gastrointestinale Ulzera, Retinitiden, Hepatitiden und Enzephalitiden. Indirekt hat das hCMV darüber hinaus

pathogenetische Bedeutung bei akuten und chronischen Abstoßungsreaktionen und bakteriellen Superinfektionen. Dabei wurde ein gehäuftes Auftreten von Resistenzmutationen bei Kindern mit kombiniertem Immundefekt nach T-Zell-depletierter KMT / SCT beschrieben. Deshalb ist eine zusätzliche antivirale Immuntherapie zur Behandlung einer hCMV-Infektion erstrebenswert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Gabe von klinischen Dosen an Interleukin-2, Interleukin-15 und / oder Cytoglobin[®]-5 % bei einigen Patienten eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität gegen Targetzellen hervorruft, die mit LFA-3 hochregulierenden Virusstämmen infiziert waren. Damit wäre neben einer direkten Applikation der Zytokine und Immunglobuline auch eine adaptive Immuntherapie durch Gabe von angereicherten IL-2- oder IL-15-stimulierten NK-Zellen denkbar. Letztendlich müssen klinischen Studien den Vorteil dieser Therapiestrategien belegen.

Im Sinne einer Primärprävention ist neben der Versorgung mit hCMV-seronegativen oder Leukozytendepletierten Blutprodukten zusätzlich die prophylaktische Gabe von anti-hCMV IgG, besonders im Hinblick auf das niedrige Nebenwirkungsprofil, möglich. Für diese Indikation zeigt Ganciclovir wegen der resultierenden Myelosuppression mit dem vermehrten Auftreten bakterieller und fungaler Infektionen keinen Vorteil. Eine Foscarnetprophylaxe ist bislang nicht zugelassen und weist darüber hinaus in Kombination mit Cyclosporin A, Aminoglykosiden und Amphotericin B eine erhöhte Nephrotoxizität auf.

Grundsätzlich sollte durch den Einsatz hochsensitiver Nachweismethoden (quantitative PCR, Antigentest) und die frühzeitige Einleitung einer antiviralen Therapie bei positivem Virusnachweis ohne klinische Krankheitszeichen die Inzidenz der hCMV-Erkrankung gesenkt werden.

6 Zusammenfassung

In der Hämatologischen und Onkologischen Forschungsabteilung der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin Tübingen wurde in Kooperation mit dem Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Universität Tübingen die NK-Zell-Aktivität gegen hCMV-infizierte Fibroblasten untersucht. Dies ist hinsichtlich der nach allogener Stammzelltransplantation zu einem frühen Zeitpunkt auftretenden hCMV-Erkrankungen (Median am Tag 25,5) bei gleichzeitig beobachteter deutlich gesteigerter Populationsdichte an CD⁵⁶⁺ NK-Zellen in der frühen Rekonstitutionsphase sinnvoll.

Es wurde zunächst der von C. Korzeniewski und D. M. Callewaert ausgearbeitete kolorimetrische adhaerente LDH-Zytotoxizitätsassay mit den von K. Bloomberg et al. beschriebenen und in dieser Arbeit für Fibroblasten etablierten adhaerenten und non-adhaerenten BATDA-release-Assays verglichen. Da infizierte Fibroblasten bei hoher Infektiositätsrate ihre Adhärenz verlieren, erwies sich der nicht adhaerente Zytotoxizitätstest im Hinblick auf eine konstante Zellzahl bei möglichst hochgradiger hCMV-Infektion als ideales Testverfahren für die nachfolgenden Studien.

Die zytotoxische Funktionalität angereicherter NK-Zellen gesunder Probanden gegen AD-169-infizierte Fibroblasten war gering und zeigte nach Effektorzellstimulation mit niedrigdosiertem IL-2 oder IL-15, dem Einsatz der ADCC mittels anti-hCMV IgG (Cytoglobin[®] 5 %) und der Kombination beider Verfahren einen deutlichen Anstieg. Im Vergleich hierzu war die NK-Zell-Aktivität bei $\frac{2}{3}$ der untersuchten Patienten nach allogener Stammzelltransplantation gegen AD-169-infizierte Targetzellen signifikant erhöht und konnte ebenfalls durch die Inkubation mit anti-hCMV IgG und / oder Zytokinstimulation gesteigert werden. Diese antivirale Eigenschaft korreliert mit der über PCR detektierten niedrigen Inzidenz an hCMV-DNAämie (29 % am Tag 100) bei den seit 1995 in unserer Abteilung transplantierten Patienten mit CD³⁴⁺ angereicherten Stammzellpräparaten. Allerdings konnte bei $\frac{1}{3}$ des untersuchten Patientenkollektivs keine

signifikante NK-Zell-Zytotoxizität gegen AD-169-infizierte Fibroblasten gemessen werden.

Desweiteren wurden klinische Virusisolate nach Fibroblasteninfektion auf ihre NK-Suszeptibilität untersucht. Gegenüber nichtinfizierten Targetzellen wiesen NK-Zellen sowohl von Patienten nach allogener Stammzelltransplantation als auch von gesunden Probanden bei WT-S1-, WT-MR-, WT-GR1- und WT-GR2-infizierten HFF eine geringere lytische Aktivität auf, die selbst durch eine Zugabe von anti-hCMV IgG oder eine Vorinkubation mit Interleukinen nicht gesteigert werden konnte. Lediglich eine Infektion der Targetzellen mit dem Virusisolat WT-GR3 resultierte in einer gesteigerten NK-Suszeptibilität im Vergleich zu nichtinfizierten Fibroblasten. Diese konnte durch eine Inkubation der Effektorzellen mit IL-2 oder IL-15, die Gabe von anti-hCMV IgG und die kombinierte Anwendung von Interleukinen mit einer ADCC deutlich gesteigert werden.

Als Grund für die erhöhte NK-Zell-Aktivität konnte über qualitative kinetische durchflusszytometrische Untersuchungen und quantitative Analysen mittels Quifikit[®] im Gegensatz zu den WT-S1-, WT-GR1- und WT-MR-infizierten Targetzellen eine deutlich stärkere Restriktion von MHC-Klasse 1-Komplexen auf der Zelloberfläche AD-169- und WT-GR3-infizierter Fibroblasten gemessen werden. Die beiden letztgenannten wiesen zusätzlich eine Expressionssteigerung der LFA-3 Moleküle auf. Eine Maskierung dieser CD⁵⁸⁺ Moleküle verlieh den WT-GR3-infizierten HFF eine Resistenz gegen die NK-Zell-vermittelte Lyse. Weitere hCMV-vermittelte Veränderungen zur Umgehung des Immunsystems wie die gesteigerte Expression der HLA-G und HLA-E Moleküle und eine unveränderte Dichte der MICB-, ULBP1- und ULBP2-Moleküle konnten auf fast allen infizierten Fibroblasten nachgewiesen werden. Die durch nahezu alle Virusstämme vermittelte Hochregulierung an ICAM-1, MICA und ULBP-3 scheint nur einen geringen Einfluss auf die NK-Zellfunktion zu haben.

Somit kann folgendes Modell für die NK-Zell-Suszeptibilität der jeweiligen infizierten Targetzellen aufgestellt werden: Voraussetzung für eine effektive Lyse dürfte nach Literaturlage die Herunterregulierung der MHC-Klasse 1-

Moleküle sein. Allerdings ist nach den vorliegenden Ergebnissen eine zusätzliche Hochregulierung von LFA-3 entscheidend. Die Expression einer hohen Anzahl an LFA-3-Molekülen scheint dabei eine mögliche Wirkung der untersuchten NKG2D-Liganden zu überbieten.

Neben einer genaueren Charakterisierung hCMV-infizierter Fibroblasten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Gabe von klinischen Dosen an Interleukin-2, Interleukin-15 und / oder Cytoglobin[®] 5 % bei gesunden Probanden und einigen Patienten nach allogener Stammzelltransplantation eine gesteigerte NK-Zell-Aktivität gegen Targetzellen hervorruft, die mit LFA-3-hochregulierenden Virusstämmen infiziert waren. Klinisch wäre somit neben der Gabe von antiviralen Substanzen auch der Einsatz immunmodulierender Agenzien in der Therapie bzw. Prophylaxe hCMV-bedingter Infektionen denkbar. Weiterführende Studien sollten den Nutzen dieser neuen therapeutischen Strategien klären.

7 Literaturverzeichnis

- A**bbas, A.K., Lichtmann, A.H., Pober, J.S. (1996). Immunologie. Hans Huber Verlag; 289-315.
- Abrams, D.I., Bebhuk J.D., Denning E.T., Davey R.T., Fox L., Lane H.C., Sampson J., Verheggen R., Zeh D., Markowitz N.P. (2002). Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS. Randomized, open label study of the impact of two doses of subcutaneous recombinant interleukin-2 on viral burden in patients with HIV-1 infection and CD⁴⁺ cell counts of $\geq 300 / \text{mm}^3$: CPCRA 059. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*; **29**: 221-31.
- Ahn K., Angulo A., Ghazal P., Peterson P.A., Yang Y., Früh K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA*; **93**: 10990-10995.
- Ahn K., Gruhler A., Galocha B., Jones T.R., Wiertz E.J.H.J., Ploegh H.L., Peterson P.A., Früh K. (1997). The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity*; **6**: 613-621.
- Akella, R. and Hall, R.E. (1992). Expression of the adhesion molecules ICAM-1 and ICAM-2 on tumor cell lines does not correlate with their susceptibility to natural killer cell mediated cytotoxicity: Evidence for additional ligands for effector cell beta integrins. *Eur. J. Immunol.*; **22**: 1069-1074.
- Alfred, C.A. (1984). Chronic intrauterine and perinatal infections. In: Galusso, G.J., Merigan, T.C., Buchanan, R.A. (eds.). *Antiviral agents and viral diseases of man*, 2nd edn. Raven, New York; 433-486.
- Allen, M.D., King, C., Mac Donald, T.O. and Himes V. (1996). VCAM-1 and E-Selectin expression during cytomegalovirus infection in post-transplant myocardial biopsies. *Clin. Transplant.*; **10**: 528-37.
- Alrabiah, F.A., Sacks, S.L. (1996). New antiherpesvirus agents, their targets and therapeutic potential *Drugs*; **52**: 17-32.
- Anderson, D.M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A. (1995). Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL-15RA and IL-2RA genes. *J. Biol. Chem.*; **270**: 29862-29869.
- Andre, P., Biassoni, R., Colonna, M., Cosman, D., Lanier, L.L., Long, E.O., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Parham P., Trowsdale, J.,

- Vivier, E., Wagtmann, N., Wilson, M.J. (2001). New nomenclature for MHC receptors. *Nat. Immunol.*; **2**: 661.
- Araullo-Cruz, T.P., Ho, M., Armstrong, J.A. (1978). Protective effect of early serum from mice after cytomegalovirus infection. *Infect. Immun.*; **21**: 840-842.
- Armitage, R.J., Mac Duff B.M., Eisenman J., Paxton R., Grabstein K.H. (1995). IL-15 has stimulatory activity for the induction of B cell proliferation and differentiation. *J. Immunol.*; **154**(2): 483-90.
- Aschan, J., Ringdén, O., Ljungman, P., Lönnqvist, B., Ohlman, S. (1992). Foscarnet for treatment of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients. *Scan. J. Infect. Dis.*; **24**: 143-150.
- Atedzoe, B.N., Ahmad, A., Menezes, J. (1997). Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J. Immunol.*; **159**: 4966-4972.
- Atkinson, K. (1990). Reconstitution of the haematopoietic and immune systems after marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*; **5**: 209-226.
- Aulitzky, W.E., Tilg, H., Niederweiser, D., Hack, M., Meister, B., Huber, C. (1988). Human monoclonal antibodies neutralizing cytomegalovirus (CMV) for prophylaxis of CMV disease: Report of a phase 1 trial in bone marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.*; **158**: 488-489.
- Azimi, N., Brown, K., Bamford, R.N., Tagaya, Y., Siebenlist, U., Waldmann, T.A. (1998). Human T cell lymphotropic virus type 1 TAX protein transactivates interleukin-15 gene transcription through an NF-kappaB site. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*; **95**: 2452-2457.
- B**acigalupo, A., Tedone, E., Van Lint, M.T., Trespi, G., Longren, M., Sanna, M.A., Moro, F., Frassoni, F., Occhini, D., Gualandi, F. (1994). CMV prophylaxis with foscarnet in allogeneic bone marrow transplant recipients at high risk of developing CMV infections. *Bone Marrow Transplant.*; **13**: 783-788.
- Bacigalupo, A., van Lint, M.T., Tedone, E., Moro, F., Sanna, M.A., Longren, M., Trespi, G., Frassoni, F., Occhini, D., Gualandi, F. (1994). Early treatment of CMV infections in allogeneic bone marrow transplant recipients with foscarnet or ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.*; **13**: 753-758.
- Bacigalupo, A., Bregante, S., Tedone, E. (1996a). Combined foscarnet-ganciclovir treatment for cytomegalovirus infections after allogeneic hemaopoietic stem cell transplantation. *Transplantation*; **62**: 376-380.

- Bacigalupo, A., Van Lint, M.T., Valbonesi, M., Lercari, G., Carlier, P., Lamparelli, T., Gualandi, F., Occhini, D., Bregante, S., Valeriani, A., Piaggio, G., Pitto, A., Benvenuto, F., Figari, O., De Stefano, G., Caimo, A., Sessarego, M. (1996b). Thiotepa cyclophosphamide followed by granulocyte colony-stimulating factor mobilized allogeneic peripheral blood cells in adults with advanced leukemia. *Blood*; **88**: 353-357.
- Bahram, S. (2000). MIC genes: From genetics to biology. *Adv. Immunol.*; **76**: 1-60.
- Bajorin, D.F., Chapman, P.B., Wong, G., Coit, D.G., Kunicka, J., Dimaggio, J., Cordon-Cardo, C., Umacher, C., Dantes, L., Templeton, M.A. (1990). Phase I evaluation of a combination of monoclonal antibody R24 and interleukin-2 in patients with metastatic melanoma. *Cancer Research*; **50**: 7490-7495.
- Balfour, H.H. Jr., Chace, B.A., Stapleton, J.T., Simmons, R.L., Fryd, D.S. (1989). A randomized placebo controlled trial of oral acyclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in recipients of renal allografts. *N. Engl. J. Med.*; **320**: 1381-1387.
- Balfour, H.H. Jr. (1990). Management of cytomegalovirus disease with antiviral drugs. *Rev. Infect. Dis.*; **12(7)**: 849-860.
- Bamford, R.N., Grant, A.J., Burton, J.D., Peters, C., Kurys, G., Goldman, C.K., Brennan, J., Roessler, E., Waldmann, T.A. (1994). The interleukin (IL)-2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine activated killer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*; **91**: 4940-4944.
- Barnes, P.D., Grundy, J.E. (1992): Downregulation of the class I HLA heterodimer and β_2 microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*; **73**: 2395.
- Bartlett, J.A., Berend, C., Petroni, G.R., Ottinger, J., Tyler, D.L., Pettinelli, C., Weinhold, K.J. (1998). Coadministration of zidovudine and interleukin-2 increases absolute CD⁴⁺ cells in subjects with Walter Reed stage 2 human immunodeficiency virus infection: Results of ACTG protocol 042. *Journal of Infectious Diseases*; **178(4)**: 1170-1173.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Philips, J.H., Lanier, L.L., Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress inducible MICA. *Science*; **285**: 727-729.
- Bayer, Cytoglobin® Gebrauchs- und Fachinformation.

- Bazan, J.F. (1990). Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today*; **11**: 350-354.
- Bazan, J.F. (1992). Unraveling the structure of IL-2. *Science*; **257(5068)**: 410-413.
- Beck, S., Barrell, B.G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class I antigens. *Nature*; **331**: 269.
- Beelen, D.W., Ottinger, H.D., Elmaagacli, A.H., Scheulen, B., Basu, O., Kremens, B., Havers, W., Grosse-Wilde, H., Schaefer, U.W. (1997). Transplantation of filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells from HLA-identical sibling or alternative family donors in patients with hematologic malignancies: A prospective comparison on clinical outcome, immune reconstitution, and hematopoietic chimerism. *Blood*; **90**: 4725-4735.
- Beersma, M.F.C., Bijlmakers, M.J.E., Ploegh, H.L. (1993). Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *Journal of Immunology*; **151**: 4455-4464.
- Bensinger, W.I., Price, T.H., Dale, D. (1993). The effects of daily recombination human granulocyte colony-stimulating factor administration on normal granulocyte donors undergoing leukapheresis. *Blood*; **81**: 1883-1888.
- Bensinger, W.I., Clift, R., Martin, P., Appelbaum, F.R., Demirer, T., Gooley, T., Lilleby, K., Rowley, S., Sanders, J., Storb, R., Bruckner, C.D. (1996). Allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in patients with advanced hematologic malignancies: A retrospective comparison with marrow transplantation. *Blood*; **88**: 2794-2800.
- Bensinger, W., Martin, P., Clif, R. (1999). A prospective randomised trial of peripheral blood stem cells or bone marrow for patients undergoing allogeneic transplantation for hematological malignancies. *Blood*; **94(1)**: 1637a.
- Bevan, I.S., Sammons, C.C., Sweet, C. (1996). Investigation of murine cytomegalovirus latency and reactivation in mice using viral mutants and the polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.*; **48**: 308-320.
- Biron, C.A. (1997). Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.*; **9(1)**: 24-34.
- Biron, C.A., Byron, K.S., Sullivan, J.L. (1989). Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *N. Engl. J. Med.*; **320(26)**: 1731-5.

- Biron, K.K., Stanat, S.C., Sorrell, J.B., Fyfe, J.A., Keller, P.M., Lambe, C.U., Nelson, D.J. (1985). Metabolic activation of the nucleoside analog 9-((2-hydroxy-1(hydroxymethyl)ethoxy)methyl)guanine in human diploid fibroblasts infected with human CMV. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*; **82**: 2473-2477.
- Blauvelt, A., Asada, H., Klaus-Kovtun, V., Altman, D.J., Lucey, D.R., Katz, S.I. (1996). Interleukin-15 mRNA is expressed by human keratinocytes, Langerhans cells and blood-derived dendritic cells and is downregulated by ultraviolet B radiation. *J. Invest. Dermatol.*; **106**: 1047-1052.
- Blomberg, K., Granberg, C., Hemmila, I., Lovgren, T. (1986). Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. I. A novel non radioactivemethod based on timeresolved fluorescence. *J. Immunol. Methods*; **86(2)**: 225-229.
- Blomberg, K., Granberg, C., Hemmila, I., Lovgren, T. (1986): Europium-labelled target cells in an assay of natural killer cell activity. II. A novel non radioactivemethod based on timeresolved fluorescence. Significance and specificity of the method. *J. Immunol. Methods*; **92, 1**: 117-123.
- Blomberg, K., Hautala, R., Lovgren, J., Mikkala, V.M., Lindqvist, C., Akerman, K. (1996). Time resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J. Immunol. Methods*; **193**:199-206.
- Boeckh, M., Gooley, T.A., Myerson, D., Cunningham, T., Schoch, G., Bowden, R.A. (1996). Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: A randomized double-blind study. *Blood*; **88**: 4063 -4071.
- Boeckh, M., Ljungman, P. (1998). Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. In: Paya, C. (ed.), *Transplant Infections*. Philadelphia, P.A.: Lippencott-Raven; 215-227.
- Böyum, A. (1968). Separation of leucocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*; **21(97)**: 7.
- Bonnema, J.D., Leibson, P.J. (1996). Signal transduction during NK cell activation; in Moretta (ed.): *Molecular Basis of NK Cell Recognition and Function*. Chem. Immunol.. Basel, Karger; **64**: 28-43.
- Bowden, R.A., Sayers, M., Flournoy, N., Newton, B., Banaji, M., Thomas, E.D., Meyers, J.D. (1986). Cytomegalovirus immunoglobulin and seronegative blood products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*; **314**: 1006-1010.

- Bowden, R.A., Dobbs, S., Kopecky, K.J., Crawford, S., Meyers, J.D. (1988). Increased cytotoxicity against cytomegalovirus-infected target cells by bronchoalveolar lavage cells from bone marrow transplant recipients with cytomegalovirus pneumonia. *J. Infect. Dis.*; **158**: 773-779.
- Bowden, R.A., Sayers, M., Flournoy, N., Newton, B., Banaji, M., Thomas, E.D., Meyers, J.D. (1986). Cytomegalovirus immune globulin and seronegative blood products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*; **314**: 1006-1010.
- Brandhuber, B.J., Boone, T., Kenney, W.C., Mc Kay, D.B. (1987). Three-dimensional structure of interleukin-2. *Science*; **238(4834)**: 1707-1709.
- Bratanow, N.C., Ash, R.C., Turner, P.A., Smith, R., Haasler, G., Chitambar, C., Hansen, R., Casper, J. (1987). Successful treatment of serious cytomegalovirus (CMV) disease with 9 (1,3-dihydroxy-2propoxymethyl) guanine (ganciclovir, DHPG) & intravenous immunoglobulin (IVIG) in bone marrow transplant (BMT) patients. *Exp Hematol*; **15**: 541.
- Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Mc Michael, A.J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD⁹⁴⁺ / NKG2A, B and C. *Nature*; **391(6669)**: 795-799.
- Britt, W.J., Alford, C.A. (1999). Cytomegalovirus. In: Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds.). *Fields Virology*, Philadelphia, Lippincott-Raven; 2493-2523.
- Brooks, A.G., Borrego, F., Posch, P.E., Patamawenu, A., Scorzelli, C.J., Ulbrecht, M., Weiss, E.H., Coligan, J.E. (1999). Specific recognition of HLA-E, but not classical, HLA class I molecules by soluble CD⁹⁴⁺ / NKG2A and NK cells. *J. Immunol.*; **162**: 305-313.
- Broppana, S.B., Pass, R.F., Britt, W.J., Stagno, S., Alford, C.A. (1992). Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: Neonatal morbidity and mortality. *Pediatr. Infect. Dis. J.*; **11**: 93-99.
- Brown, M.G., Zhang, J., Du, Y., Stoll, J., Yokoyama, W.M., Scalzo, A.A. (1999). Localization on a physical map of the NKC-linked Cmv1 locus between Ly49b and the Prp gene cluster on mouse chromosome 6. *J. Immunol.*; **163(4)**: 1991-1999.
- Browne, H., Smith, G., Beck, S., Minson, T. (1990). A complex between the MHC class I homologue encoded by human cytomegalovirus and β_2 -microglobulin. *Nature*; **347**: 770.

- Bundesärztekammer unter Mitwirkung des Paul-Ehrlich-Institutes (1997). Richtlinien zur Transplantation peripherer Blutstammzellen. Deutsches Ärzteblatt 94, **23**: A1584-1592.
- Butterworth, A.E., David, J.R., Franke, D., Mahmoud, A.A.F., David, P.H., Sturrock, R.F., Houba, V. (1977). Antibody-dependent cell-mediated damage to 51Cr labeled Schistosomule of *Schistosoma mansoni*: Damage by purified eosinophiles. *J. Exp. Med.*; **145**: 136-150.
- C**allewaert, D.M., Johnson, D.F., Kearney, J. (1978). Spontaneous cytotoxicity of cultured human cell lines mediated by normal peripheral blood lymphocytes. III. Kinetic parameters. *J. Immunol.*; **121**: 710-717.
- Capron, A., Dessaint, J.P., Joseph, M., Rousseaux, R., Capron, M. (1977). Interaction between IgG complex and macrophages in the rat. A new mechanism of macrophage activation. *Eur. J. Immunol.*; **7**: 315-322.
- Carson, W.E., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A. (1997). CD⁵⁶⁺bright natural killer cell subsets: Characterization of distinct functional responses to interleukin-2 and the c-kit ligand. *Eur. J. Immunol.*; **27**: 354-360.
- Carr, A., Emery, S., Lloyd, A., Hoy, J., Garsia, R., French, M., Stewart, G., Fyfe, G., Cooper, D.A. (1998). Outpatient continuous intravenous interleukin-2 or subcutaneous, polyethylene glycol-modified interleukin-2 in HIV-infected patients: A randomized, controlled, multicenter study. *J. Infect. Dis.*; **178**: 992-999.
- Carson, W.E., Fehniger, T.A., Haldar, S., Eckhert, K., Lindemann, M.J., Lai, C.F., Croce, C.M., Baumann, H., Caligiuri, M.A. (1997). A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. *J. Clin. Invest.*; **99**: 937-943.
- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K., Caligiuri, M.A. (1994). Interleukin (IL)-15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J. Exp. Med.*; **180**: 1395-1403.
- Carson, W.E., Ross, M.E., Baiocchi, R.A., Marien, M.J., Boiani, N., Grabstein, K., Caligiuri, M.A. (1995). Endogenous production of interleukin-15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon-gamma by natural killer cells in vitro. *J. Clin. Invest.*; **96(6)**: 2578-2582.
- Casella, G.T., Wieser, R., Bunge, R.P., Margitich, I.S., Katz, J., Olson, L., Wood, P.M. (2000). Density dependent regulation of human Schwann cell proliferation. *Glia*; **30(2)**: 165-177.

- Casper, C.B., Seger, R.A., Burger, J., Gmur, J. (1993). Effective stimulation of donors for granulocyte transfusions with recombinant methionyl granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*; **81**: 2866-2871.
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bev, S., de Saint Basile, G., De Coene, C., Selz, F., Le Deist, F., Fischer, A. (1996). Role of interleukin-2 (IL-2), IL-7, and IL-15 in natural killer cell differentiation from cord blood hematopoietic progenitor cells and from γ_c transduced severe combined immunodeficiency X1 bone marrow cells. *Blood*; **88**: 3901-3909.
- Cerboni, C., Mousavi-Jazi, M., Wakiguchi, H., Carbone, E., Karre, K., Soderstrom, K. (2001). Synergistic effect of IFN-gamma and human cytomegalovirus protein UL40 in the HLA-E-dependent protection from NK cell - mediated cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.*; **31(10)**: 2926-2935.
- Cerottini, J.C., Brunner, K.T. (1974). Cell-mediated cytotoxicity, allograft rejection and tumor immunity. *Adv. Immunol.*; **18**: 67-132; Editorial comment (1973): *Advances in immunopathology. Nature, New. Biol.*; **243**: 225.
- Cha, T.A., Tom, E., Kemle, G.W., Duke, G.M., Mocarski, E.S., Spaete, R.R. (1996). Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *Journal of Virology*; **70**: 78-83.
- Chaperot, L., Jakob, M., Le Vacon, F., Giroux, C., Molens, J., Sotto, J., Bensa, J., Plumas, J. (1996). Relationships between susceptibility to LAK cell-mediated lysis, conjugate formation and expression of adhesion molecules in B-cell derived non-hodgkin's lymphomas. *Leukemia and Lymphoma*; **28**: 133-143.
- Chee, M.S., Bankier, A.T., Beck, S., Bohni, R., Brown, C.M., Cerny, R., Horsnell, T., Hutchison, C.A., Kouzarides, T., Martignetti, J.A., Preddie, E. (1990). Analysis of the protein coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD-169. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*; **154**: 125-169.
- Chou, S., Dylewski, J.S., Gaynon, M.W., Egbert, P.R., Merigan, T.C. (1984). Alpha interferon administration in cytomegalovirus retinitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **25**: 25-28.
- Clift, R.A., Buckner, C.D., Appelbaum, F.R. (1990). Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: A randomised trial of two irradiation regimens. *Blood*; **76**: 1867-1871.
- Conlon, K., Osborne, J., Morimoto, C., Ortaldo, J.R., Young, H.A. (1995). Comparison of lymphokine secretion and mRNA expression in the CD^{45RA+} and CD^{45RO+} subsets of human peripheral blood CD⁴⁺ and CD⁸⁺ lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*; **25(3)**: 644-648.

- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L., Hsu, M.L. (1997). A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules. *Immunity*; **7**: 273.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16, and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*; **14**: 123.
- Craigien, J.L., Grundy, J.E. (1996). Cytomegalovirus induced up-regulation of LFA-3 (CD⁵⁸⁺) and ICAM-1 (CD⁵⁴⁺) is a direct viral effect that is not prevented by ganciclovir or foscarnet treatment. *Transplantation*; **62**: 1102-1108.
- Curtis, R.E., Rowlings, P.A., Deeg, H.J., Shriner, D.A., Socie, G., Travis, L.B., Horowitz, M.M., Witherspoon, R.P., Hoover, R.N., Sobocinski, K.A., Fraumeni, J.F. Jr., Boice, J.D. Jr. (1997). Solid cancers after bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*; **336(13)**: 897-904.
- D**avey, R.T. Jr., Murphy, R.L., Graziano, F.M., Boswell, S.L., Pavia, A.T., Cancio, M., Nadler, J.P., Chaitt, D.G., Dewar, R.L., Sahner, D.K., Duliege, A.M., Capra, W.B., Leong, W.P., Giedlin, M.A., Lane, H.C., Kahn J.O. (2000). Immunologic and virologic effects of subcutaneous interleukin-2 in combination with antiretroviral therapy: A randomized controlled trial. *JAMA*; **284**: 183-189.
- Del Val, M., Hengel, H., Häcker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P., Koszinowski, U.H. (1992). Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptideloading major histocompatibility complex class I molecules into the medial Golgi compartment. *Journal of Experimental Medicine*; **172**: 729-783.
- Demmler, G.J. (1991). Infectious Diseases Society of America and Centers for Disease Control. Summary of a workshop on surveillance for congenital cytomegalovirus disease. *Rev. Infect. Dis.*; **13**: 315-329.
- Denton, M.D., Davis, S.F., Baum, M.A., Melter, M., Reinders, M.E.J., Exeni, A., Samsonov, D.V., Fang, J., Ganz, P., Briscoe, D.M. (2000). The role of the graft endothelium in transplant rejection: Evidence that endothelial activation may serve as a clinical marker for the development of chronic rejection. *Pediatr. Transplantation*; **4**: 252-260.
- Deray, G., Katlama, C., Dohin, E. (1990a). Prevention of foscarnet nephrotoxicity. *Ann. Intern. Med.*; **113**: 332.
- Deray, G., Martinez, F., Katlama, C., Levaltier, B., Beaufilss, H., Danis, M., Rozenheim, M., Baumelou, A., Dohin, E., Gentilini, M. (1990b).

- Foscarnet nephrotoxicity, mechanism, incidence and prevention. *Am. J. Nephrol.*; **9**: 316-321.
- Dickinson, A.M., Wang, X.N., Sviland, L., Vyth-Dreese, F.A., Jackson, G.H., Schumacher, T.N.M., Haanen, J.B.A.G., Mutis, T., Goulmy, E. (2002). In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nature medicine*; **8(4)**: 410-414.
- Diefenbach, A., Jamieson, A.M., Liu, S.D., Shastri, N., Raulet, D.H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol.*; **1**: 119.
- DiSanto, J.P., Certain, S., Wilson, A., Mac Donald, H.R., Avner, P., Fischer, A., de Saint Basile, G. (1994). The murine interleukin-2 receptor gamma chain gene: organization, chromosomal localization and expression in the adult thymus. *Eur. J. Immunol.*; **24(12)**: 3014-3018.
- Djeu, J.Y., Liu, J.H., Wei, S., Rui, H., Pearson, C.A., Leonard, W.J., Blanchard, D.K. (1993). Function associated with IL-2 receptor-beta on human neutrophils. Mechanism of activation of antifungal activity against *Candida albicans* by IL-2. *J. Immunol.*; **150(3)**: 960-970.
- Docke, W.D., Prosch, S., Fietze, E., Kimel, V., Zuckermann, H., Klug, C., Syrbe, U., Kruger, D.H., von Baehr, R., Volk, H.D. (1994). Cytomegalovirus reactivation and tumor necrosis factor. *Lancet*; **343**: 268-269.
- Doherty, T.M., Seder, R.A., Sher, A. (1996). Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J. Immunol.*; **156**: 735-741.
- Dowling, J.N., W.u, B.C., Armstrong, J.A, Ho, M. (1977). Enhancement of murine cytomegalovirus infection during graft-vs.-host reaction. *J. Infect. Dis.*; **135**: 990-994.
- Dunlop, M.B., Doherty, P.C., Zinkernagel, R.M., Blanden, R.V. (1977). Cytotoxic T cell response to lymphocytic choriomeningitis virus. Properties of precursors of effector T cells, primary effector T cells and memory T cells in vitro and in vivo. *Immunology*; **33(3)**: 361-368.
- Dutcher, J.P., Creekmore, S., Weiss, G.R., Margolin, K., Markowitz, A.B., Roper, M., Parkinson, D., Ciobanu, N., Fisher, R.I., Boldt, D.H. (1989). A phase II study of interleukin-2 and lymphokine activated killer (LAK) cells in patients with metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol.*; **7**: 477-485.
- Eckle, T., Prix, L., Jahn, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Selle, B., Hamprecht, K. (1999). Drug-resistant human cytomegalovirus infection in

- children after allogeneic stem cell transplantation may have different clinical outcomes. *Blood*; **96(9)**: 3286-3289.
- Eckle, T., Lang, P., Prix, L., Jahn, G., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Selle, B., Niethammer, D., Hamprecht, K. (2002). Rapid development of ganciclovir-resistant cytomegalovirus infection in children after allogeneic stem cell transplantation in the early phase of immune cell recovery. *Bone Marrow Transplantation*; **30**: 433-439.
- Einsele, H., Waller, H.D., Weber, P., Frickhofen, N., Dette, S., Horny, H.P., Roos, A., Roos, H., Hebart, H., Schmidt, H. (1994). Cytomegalovirus in liver biopsies of marrow transplant recipients: Detection methods, clinical, histological and immunohistological features. *Med. Microbiol. Immunol.*; **183**: 205-216.
- Elkins, W.L., Pierson, G.R., Storb, R. (1987). Study of a human minor alloantigen in relation to clinical graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transpl.*; **1**: 397-403.
- Elmaagacli, A.H., Beelen, D.W., Opalka, B., Seeber, S., Schaefer, U.W. (1999). The risk of residual molecular and cytogenetic disease in patients with Philadelphia-chromosome positive first chronic myelogenous leukemia is reduced after allogeneic peripheral blood stem cells compared with bone marrow. *Blood*; **94**: 384-389.
- Emanuel, D., Cunningham, I., Jules-Elysee, K., Brochstein, J.A., Kerman, N.A., Laver, J., Stover, D., White, D.A., Fels, A., Polsky, B., Castro-Malaspina, H., Peppard, J.R., Bartus, P., Hammerling, U., O'Reilly, R.J. (1988). Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. *Ann. Intern. Med.*; **109**: 777-782.
- Emery, V.C., Griths, P.D. (2000). Prediction of cytomegalovirus load and resistance patterns after antiviral chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **97**: 8039-8044.
- Erice, A., Jordan, M.C., Chase, B.A., Fletcher, C., Chinnock, B.J., Balfour, H.H. (1987). Ganciclovir treatment of cytomegalovirus disease in transplant recipients and other immunocompromised hosts. *JAMA*; **257**: 3082-3087.
- Eriksson, B., Oberg, B., Wahren, B. (1982). Pyrophosphate analogues as inhibitors of DNA polymerases of cytomegalovirus, herpes simplex virus and cellular origin. *Biochim. Biophys. Acta.*; **696**: 115-123.
- Espinoza-Delgado, I., Bosco, M.C., Musso, T., Gusella, G.L., Longo, D.L., Varesio, L. (1995). Interleukin-2 and human monocyte activation. *J. Leukoc. Biol.*; **57(1)**: 13-19.

<http://www.espritstudy.org>

Estes, J.E., Huang, E.S. (1977). Stimulation of cellular thymidine kinases by human cytomegalovirus. *J. Virol.*; **24**: 115-123.

Evans, R., Fuller, J.A., Christianson, G., Krupke, D.M., Troutt, A.B. (1997). IL-15 mediates anti-tumor effects after cyclophosphamide injection of tumor bearing mice and enhances adoptive immunotherapy: The potential role of NK cell subpopulations. *Cell. Immunol.*; **179**: 66-73.

Everett, J.P., Hershberger, R.E., Norman, D.J., Chou, S., Ratkovec, R.M., Cobanoglu, A., Ott, G.Y. Hosenpud, J.D. (1992). Prolonged cytomegalovirus infection with viremia is associated with development of cardiac allograft vasculopathy. *J. Heart Lung Transplant.*; **11**: 133-137.

Eyrich, M., Lang, P., Lal, S., Bader, P., Handgretinger, R., Klingebiel, T., Niethammer, D., Schlegel, P.G. (2001). A prospective analysis of the pattern of immune reconstitution in a pediatric cohort following transplantation of positively selected human leucocyte antigen-disparate haematopoietic stem cells from parental donors. *British Journal of Haematology*; **114**: 422-432.

Fahnestock, M.L., Johnson, J.L., Feldman, R.M., Neveu, J.M., Lane, W.S., Bjorkman, J.P. (1995). The MHC class I homolog encoded by human cytomegalovirus binds. *Immunity*; **3**: 583.

Falk, C.S., Mach, M., Schendel, D.J., Weiss, E.H., Hilgert, Hahn, G. (2002). NK cell activity during human cytomegalovirus infection is dominated by US2-11 mediated HLA class I downregulation. *J. Immunol.*; **169**: 3257-3266.

Farell, H.E., Valley, H., Lynch, D.M., Fleming, P., Shellam, G.R., Scalzo, A.A., Davis-Poynter, N.J. (1997). Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature*; **386 (6624)**: 510-514.

Fehniger, T.A., Suzuki, K., Ponnappan, A., Van Deusen, J.B., Cooper, M.A., Florea, S.M., Freud, A.G., Robinson, M.L., Durbin, J., Caligiuri, M.A. (2001). Fatal leukemia in interleukin-15 transgenic mice follows early expansions in NK and memory-phenotype CD⁸⁺ T cells. *J. Exp. Med.*; **193(2)**: 219-231.

Fietze, E., Prosch, S., Reinke, P., Stein, J., Docke, W.D., Staffa, G., Loning, S., Devaux, S., Emmrich, F., von Baehr, R. (1994). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation*; **58**: 675-680.

- Fishman, J.A., Rubin, R.H. (1998). Infection in organ-transplant recipients. *N. Engl. J. Med.*; **338**: 1741.
- Flamand, L., Stefanescu, I., Menezes, J. (1996). Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J. Clin. Invest.*; **97**: 1373-1381.
- Fletcher, J.M., Prentice, H.G., Grundy, J.E. (1998). Natural killer cell lysis of cytomegalovirus (CMV)-infected cells correlates with virally induced changes in cell surface lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA 3) expression and not with the CMV-induced downregulation of cell surface class 1 HLA. *The Journal of Immunol.*; **161**: 2365-2374.
- Forman, S.J., Blume, K.G., Thomas, E.D. (eds.) (1998). *Hematopoietic Cell Transplantation*, 2nd ed., London, Blackwell Scientific.
- Friemel, H. (1991). *Immunologische Arbeitsmethoden*. Gustav Fischer Verlag. Jena.
- Fruh, K., Ahn, K., Peterson, P.A. (1997). Inhibition of MHC class I antigen presentation by viral proteins. *J. Mol. Med.*; **75**: 18.
- G**eiselhart, A., Neu, S., Buchholz, F., Lang, P., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1997). Positiv selection of CD⁵⁶⁺ lymphocytes by magnetic cell sorting. *Natural Immunity*; **15 (5)**: 227-223.
- Gerard, L., Ferry, J.A., Amrein, P.C., Harmon, D.C., Mc Kinsty, R.C., Hoppel, B.E., Rosen, B.R. (1992). Compositional changes in the vertebral bone marrow during treatment for acute leukemia assessment with quantitative chemical shift imaging. *Radiology*; **183**: 39-46.
- Gilbert, M.J., Riddell, S.R., Platcher, B., Greenberg, P.D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*; **383**: 729-722.
- Gilquin, J., Weiss, L., Kazatchkine, M.D. (1990). Genital and oral erosions induced by foscarnet. *Lancet*; **335**: 287.
- Giri, J.G., Ahdieh, M., Eisenman, J., Shanebeck, K., Grabstein, K., Kumaki, S., Namen, A., Park, L.S., Cosman, D., Anderson, D. (1994). Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. *EMBO J.*; **13(12)**: 2822-2830.
- Giri, J.G., Kumaki, S., Ahdieh, M., Friend, D.J., Loomis, A., Shanebeck, K., DuBose, R., Cosman, D., Park, L.S., Anderson, D.M. (1995). Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. *EMBO J.*; **14(15)**: 3654-3663.

- Goldman, J.M., Gale, R.P., Horowitz, M.M., Biggs, J.C., Chamblin, R.E., Gluckman, E., Hoffmann, R.G., Jacobsen, S.J., Marmont, A.M., Mc Glave, P.B., Messner, H.A., Rimm, A.A., Rozman, C., Speck, B., Tura, S., Weiner, R.S., Bortin, M.M. (1988). Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase: Increased risk of relapse associated with T-cell depletion. *Ann. Intern. Med.*; **108**: 806-814.
- Goldman, J.M., Schmitz, N., Niethammer, D., Gratwohl, A. (1998) For the Accreditation Subcommittee of the EBMT. Special report. Allogeneic and autologous transplantation for hematological diseases, solid tumors and immune disorders: Current practice in Europe in 1998. *Bone Marrow Transplant.*; **21**: 1-7.
- Goodpasture, E.W., Talbot, F.B. (1921). Concerning the nature of 'protozoan-like' cells in certain lesions of infancy. *Am. J. Dis. Child.*; **21**: 415-425.
- Goulmy, E. (1997). Human minor histocompatibility antigens: New concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol. Rev.*; **157**: 125-140.
- Grabstein, K.H., Eisenman, J., Shanebeck, K et al. (1994). Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. *Science*; **264**: 965-968
- Grattan, M.T., Moreno-Cabral, C.E., Starnes, V.A., Oyer, P.E., Stinson, E.H., Shumway, N.L. (1989). Cytomegalovirus infection is associated with cardiac allograft rejection and atherosclerosis. *JAMA*; **261**: 3561-3566.
- Grillner, L., Strangert, K. (1986). Restriction endonuclease analysis of cytomegalovirus DNA from strains isolated in day care centers. *Pediatr. Infect. Dis.*; **5**: 184-187.
- Griffiths, P.D., Baboonian, C. (1984). A prospective study of primary cytomegalovirus infection during pregnancy: Final report. *Br. J. Obstet. Gynaecol.*; **91**: 307-315.
- Griffiths, P.D., Stirk, P.R., Blacklock, H.A., Milburn, H.J., DuBois, R.M., Prentice, H.G. (1987). Rapid diagnosis and treatment of cytomegalovirus pneumonitis. In: Gale, R.P., Champlin, R.E. (eds.). *Progress in bone marrow transplantation*; 583-587.
- Grimm, E.A., Mazumder, A., Zhang, H.Z., Rosenberg, S.A. (1982). Lysis of natural killer resistant fresh solid tumor cells by interleukin-2 activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J. Experim. Med.*; **1955**: 1823-1841.

- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., Spies, T. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **93**: 12445-12450.
- Groh, V., Steinle, A., Bauer, S., Spies, T. (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells. *Science*; **279**: 1737-1740.
- Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M.S., Riddell, S.R., Spies, T. (2001). Costimulation of $CD^{\alpha\beta}$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.*; **2**: 255-280.
- Groh, V., Rhinehar, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K.H., Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **96**: 6879-6884.
- Grundy, J.E., Downes K.L. (1993). Up-regulation of LFA-3 and ICAM-1 on the surface of fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Immunology*; **78**: 405-412.
- Grundy, J.E., Pahal, G.S., Akbar, A.N. (1993). Increased adherence of CD^{2+} peripheral blood lymphocytes to cytomegalovirus-infected fibroblasts is blocked by anti-LFA-3 antibody. *Immunology*; **78**: 413-420.
- Grundy, J.E., Shanley, J.D., Griffiths, P.D. (1987). Is cytomegalovirus interstitial pneumonitis in transplant recipients an immunopathological condition? *Lancet*; **2**: 996-998.
- Gwin, J.L., Gercel-Taylor, C., Taylor, D.D., Eisenberg, B. (1996). Role of LFA-3, ICAM-1 and MHC class 1 on the sensitivity of human tumor cells to LAK cells. *Journal of Surgical Research*; **60**: 129-136.
- H**ahn, G., Jores, R., Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*; **95**: 3937-3942.
- Hamprecht, K., Vochem, M., Baumeister, A., Boniek, M., Speer, C.P., Jahn, G. (1998). Detection of cytomegalovirus DNA in human milk cells and free milk whey by nested PCR. *J. Virolo. Meth.*; **70**: 167-176.
- Handgretinger, R., Klingebiel, T., Bader, B., Faleyras, C., Siedner, R., Wendt, S., Dopfer, R., Niethammer, D. (1992). Stem cell mobilisation, collection and transplantation in patients with pediatric tumors. *Cancer Research Therapy and Control*; **3**: 43-48.

- Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader P., Schlegel, P.G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R.J., Niethammer, D. (2001). Megadose transplantation of purified peripheral blood CD³⁴⁺ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant.*; **27**: 777.
- Handgretinger, R., Schumm, M., Lang, P. (1999). Transplantation of megadoses of purified haploidentical stem cells. *Ann. NY Acad. Sci.*; **872**: 351-361.
- Handgretinger, R., Klingebiel, T., Lang, P., Schumm, M., Neu, S., Geiselhart, A., Bader, P., Schlegel, P.G., Greil, J., Stachel, D., Herzog, R.J., Niethammer, D. (2001a). Megadose transplantation of purified peripheral blood CD³⁴⁺ progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant.*; **2001**: 777-783.
- Handgretinger, R., Lang, P., Schumm, M., Pfeiffer, M., Gottschling, S., Demirdelen, B., Bader, P., Kuci, S., Klingebiel, T., Niethammer, D. (2001b). Immunological aspects of haploidentical stem cell transplantation in children. *Ann. NY Acad. Sci.*; **2001**: 340-357.
- Handsfield, H.H., Chandler, S.H., Caine, V.A., Meyers, J.D., Corey, L., Medeiros, E., Mc Dougall, J.K.. (1985). Cytomegalovirus infection in sex partners: evidence for sexual transmission. *J. Infect. Dis.*; **151**: 344-348.
- Hebib, N.C., Deas, O., Rouleau, M., Durrbach, A., Charpentier, B., Beaujean, F., Vernant, J.P., Senik, A. (1999). Peripheral blood T cells generated after allogeneic bone marrow transplantation: Lower levels of bcl-2 protein and enhanced sensitivity to spontaneous and CD⁹⁵⁺-mediated apoptosis in vitro. Abrogation of the apoptotic phenotype coincides with the recovery of normal naive / primed T-cell profiles. *Blood*; **94**: 1803-1813.
- Hengel, H., Esslinger, C., Pool, J., Goulmy, E., Koszinowsky, U.H. (1995). Cytokines restores MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *J. Gen. Virol.*; **76**: 2987-2997.
- Hengge, U.R., Goos, M., Esser, S., Exner, V., Dotterer, H., Wiehler, H., Borchard, C., Muller, K., Beckmann, A., Eppner, M.T., Berger, A., Fiedler, M. (1998). Randomized, controlled phase II trial of subcutaneous interleukin-2 in combination with highly active antiretroviral therapy (HAART) in HIV patients. *AIDS*; **12**: F225-F234.
- Herbermann, R.B., Nunn, M.F., Larvin, D.H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of murine lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. Cancer*; **16**: 230.

- Herskowitz, A., Mayne, A.E., Willoughby, S.B., Kanter, K., Ansari, A.A., (1994). Patterns of myocardial cell adhesion molecule expression in human endomyocardial biopsies after cardiac transplantation induced ICAM-1 and VCAM-1 realterd to implantation and rejection. *Am. J. Pathol.*; **145**: 1082-1094.
- Hengel, H., Koopmann, J.O., Flohr, T., Muranyi, W., Goulmy, E., Hämmerling, G.J., Koszinowski, U.H., Momburg, F. (1997). A viral ER-resident glycoprotein inactivates the MHC-encoded peptide transporter. *Immunity*; **6**: 623-632.
- Hewitt, E.W., Gupta, S.S., Lehner, P.J. (2001). The human cytomegalovirus gene product US6 inhibits ATP binding by TAP. *EMBO J.*; **20**: 387.
- Ho, M. (1982). Treatment and prevention of CMV infection. In: Greenough, W.B. III, Merigan, T.C. (eds.). *Cytomegalovirus, biology and infection: Current topics in infectious disease*, Plenum, New York; 205-213.
- Huang, E.S. (1975). Human cytomegalovirus: Specific inhibition of virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by phosphonoacetic acid. *J. Virol.*; **16**: 1560-1565.
- Ibrahim, L. Dominguez, M., Yacoub, M. (1993). Primary human adult lung epithelial cells in vitro: Response to interferon-gamma and cytomegalovirus. *Immunology*; **79**: 119-124.
- Ito, M., Watanabe, M., Ihara, T., Kamiya, H., Sakurai, M. (1995). Increased expression of adhesion molecules (CD⁵⁴⁺, CD²⁹⁺ and CD⁴⁴⁺) on fibroblasts infected with cytomegalovirus. *Microbiol. Immunol.*; **39**: 129-133.
- Jacobs, R., Stoll, M., Stratmann, G., Leo, R., Link, H., Schmidt, R.E. (1992). CD¹⁶⁺ CD⁵⁶⁺ natural killer cells after bone marrow transplantation. *Blood*; **79**: 3239-3244.
- Jacobson, E.L., Pilaro, F., Smith, K.A. (1996). Rational interleukin-2 therapy for HIV positive individuals: Daily low doses enhance immune function without toxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; **93**: 10405-10410.
- Jacobson, M.A. (1997). Treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *N. Engl. J. Med.*; **337**: 105-114.
- Jacobson, M.A., Crowe, S., Levy, J., Aweeka, F., Gambertoglio, J., Mc Manus, N., Mills, J. (1988). Effect of Foscarnet therapy on infection with human immunodeficiency virus in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*; **158(4)**: 862-865.

- Jacobson, M.A., O'Donnell, J.J., Mills, J. (1989). Foscarnet treatment of cytomegalovirus retinitis in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **33**: 736-741.
- Jacobson, M.A., Gambertoglio, J.G., Aweeka, F.T., Causey, D.M., Portale, A.A. (1991a). Foscarnet-induced hypocalcemia and effects of foscarnet on calcium metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; **72**: 1130-1135.
- Jacobson, M.A., Drew, W.L., Feinberg, J., O'Donnell, J.J., Whitmore, P.V., Miner, R.D., Parenti, D. (1991b). Foscarnet therapy for ganciclovir-resistant cytomegalovirus retinitis in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.*; **163**: 1348-1351.
- Janossy, G., Prentice, H.G., Grob, J.P., Ivory, K., Tidman, N., Grundy, J., Favrot, M., Brenner, M.K., Campana, D., Blacklock, H.A. (1986). T lymphocyte regeneration after transplantation of T cell depleted allogeneic bone marrow. *Clin. Exp. Immunol.*; **63(3)**: 577-586.
- Jones, T.R., Muzithras, V.P. (1991). Fine mapping of transcripts expressed from the US6 gene family of human cytomegalovirus strain AD-169. *Journal of Virology*; **65**: 2024-2036.
- Jones, T.R., Wiertz, E.J.H.J., Sun, L., Fish, K.N., Nelson, J.A., Ploegh, H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*; **93**: 11327-11333.
- Jonuleit, H., Wiedemann, K., Muller, G., Degwert, J., Hoppe, U., Knop, J., Enk, A.H. (1997). Induction of IL-15 messenger RNA and protein in human blood-derived dendritic cells: A role for IL-15 in attraction of T-cells. *J. Immunol.*; **158**: 2610-2615.
- Jordan, S.C., Marchevski, A., Ross, D., Toyoda, M., Waters, P.F. (1992). Serum interleukin-2 levels in lung-transplant recipients: Correlations with findings in transbronchial biopsy. *J. Heart Lung Transplant.*; **11**: 1001-1004.
- K**ärre, K. (1985). Role of target histocompatibility antigens in regulation of natural killer activity: A reevaluation and a hypothesis. In: Herberman, R.B., Callewaert, D.M. (eds.). *Mechanisms of cytotoxicity by NK cells*. Orlando, Academic. Press.; 81-92.
- Kärre, K. (1995). Express Yourself or Die: Peptides, MHC Molecules, and NK Cells. *Science*; **267**: 978-979.
- Kassai, M., Masauzi, N. (1998). The characteristics of umbilical cord blood (UCB) and UCB transplantation. *Semin. Thromb. Hemost.*; 491-495.

- Katlama, C., Carcelain, G., Duvivier, C., Chouquet, C., Tubiana, R., De Sa, M., Zagury, L., Calvez, V., Autran, B., Costagliola, D. (2002). Interleukin-2 accelerates CD⁴⁺ cell reconstitution in HIV-infected patients with severe immunosuppression despite highly active antiretroviral therapy: The ILSTIM study - ANRS 082. *AIDS*; **16**: 2027-2034.
- Keller, R. (1994). *Immunologie und Immunpathologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart. New York.
- Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., Brasel, K., Morrissey, P.J., Stocking, K., Schuh, J.C., Joyce, S., Peschon, J.J. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD⁸⁺ T cell lineages in IL-15 deficient mice. *J. Exp. Med.*; **191**: 771-780.
- Kernan, N.A., Flomenberg, N., Dupont, B., O'Reilly, R.J. (1987). Graft rejection in recipients of T-cell-depleted HLA-nonidentical marrow transplants for leukemia. Identification of host-derived antidonor allocytotoxic T lymphocytes. *Transplantation*; **43**: 842-847.
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H. (1975). 'Natural' killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*; **5**: 112-120.
- Kindler, V., Matthes, T., Jeannin, P., Zubler, R.H. (1995). Interleukin-2 secretion by human B lymphocytes occurs as a late event and requires additional stimulation after CD⁴⁰⁺ cross-linking. *Eur. J. Immunol.*; **25(5)**: 1239-1243.
- King, A., Wellings, V., Gardner, L., Loke, Y.W. (1989). Immunocytochemical characterization of the unusual large granular lymphocytes in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Human Immunology*; **24**: 792-805.
- Kirkman, R.L., Barrett, L.V., Gaulton, G.N., Kelley, V.E., Ythier, A., Strom, T.B. (1985). Administration of an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody prolongs cardiac allograft survival in mice. *J. Exp. Med.*; **162(1)**: 358-362.
- Klemola, E., Kaariainen, L. (1965). Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *BMJ*; **2**: 1099-1102.
- Klempner, M., Noring, R., Mier, J., Atkins, M. (1990). An acquired chemotactic defect in neutrophils from patients receiving interleukin-2 immunotherapy. *New England Journal of Medicine*; **322**: 959.

- Kolb, H.J., Bender-Gotze, C. (1990). Late complications after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia. *Bone Marrow Transplant.*; **6**: 61-72.
- Komatsu, F., Kajiwar, M. (1998). Relation of natural killer cell line NK-92-mediated cytotoxicity with the surface markers of major histocompatibility complex class 1 antigens, adhesion molecules and fas of target cells. *Oncology Research*; **10**: 438-489.
- Korbling, M., Przepiorka, D., Huhn, Y.O., Engel, H., van Besien, K., Giralt, S., Andersson, B., Kleine, H.D., Seong, D., Deisseroth, A.B. (1995). Allogeneic blood stem cell transplantation for refractory leukemia and lymphoma: Potential advantage of blood over marrow allografts. *Blood*; **85**: 1659-1665.
- Korzeniewski, C., Callewaert, D.M. (1983). A enzyme release assay for natural cytotoxicity. *J. Immunol. Meth.*; **54**: 313.
- Koskinen, P.K. (1993). The association of the induction of vascular cell adhesion molecule-1 with cytomegalovirus antigenemia in human heart allografts. *Transplantation*; **56**: 1103-1108.
- Kovacs, J.A., Vogel, S., Albert, J.M., Falloon, J., Davey, R.T., Walker, R.E., Polis, M.A., Spooner, K., Metcalf, J.A., Baseler, M., Fyfe, G., Lane, H.C. (1996). Controlled trial of interleukin-2 infusions in patients with the human immunodeficiency virus. *The New England Journal of Medicine*; **335(18)**: 1350-1356.
- Krech, U. (1973). Complement-fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world. *Bull. World Health Organ.*; **49(1)**: 103.
- Kubaneck, B., Ernst, P., Ostendorf, P., Schafften, U., Wolf, P.H. (1985) Preliminary data of a controlled trial of intravenous hyperimmune globulin in the prevention of cytomegalovirus in bone marrow recipients. *Transplant. Proc.*; **17**: 468-469.
- Kubin, M., Cassiano, L., Chalupny, J., Chin, W., Cosman, D., Fanslow, W., Mullberg, J., Rousseau, A.M., Ullrich, D., Armitage, R. (2001). ULBP1,2,3, novel MHC class I-related molecules which bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur. J. Immunol.*; **31**: 1428.
- Kurz, S., Steffens, H.P., Mayer, A., Harris, J.R., Reddehase, M.J. (1997). Latency versus persistence or intermittent recurrences: Evidence for a latent state of murine cytomegalovirus in the lungs. *J. Virol.*; **71**: 2980-2987.

- Labarrere, C.A., Nelson, D.R., Faulk, P.W. (1997). Endothelial activation and development of coronary artery disease in transplanted human hearts. *JAMA*; **278**: 1169-1175.
- Lalezari, J.P., Beal, J.A., Ruane, P.J., Cohen, C.J., Jacobson, E.L., Sundin, D., Leong, W.P., Raffanti, S.P., Wheeler, D.A., Anderson, R.D., Keiser, P., Schrader, S.R., Goodgame, J.C., Steinhart, C.R., Murphy, R.L., Wolin, M.J., Smith, K.A. (2000). Low-dose daily subcutaneous interleukin-2 in combination with HAART in HIV+ patients: A randomized controlled trial. *HIV Clin. Trials*; **1**: 1-15.
- Lamb, L.S. Jr, Gee, A.P., Henslee-Downey, P.J., Geier, S.S., Hazlett, L., Pati, A.R., Godder, K., Abhyankar, S.A., Turner, M.W., Lee, C., Harris, W.G., Parrish, R.S. (1998). Phenotypic and functional reconstitution of peripheral blood lymphocytes following T cell-depleted bone marrow transplantation from partially mismatched related donors. *Bone Marrow Transplant.*; **21**: 461-471.
- Lamberson, H.V., Dock, N.L. (1992). Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion*; **32**: 196.
- Lamon, E.W., Shaw, M.W., Goodson, S. Lidin, B., Walia, A.S., Fuson, E.W. (1977). Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the Moloney sarcoma virus system: Differential activity of IgG and IgM with different subpopulations of lymphocytes. *J. Exp. Med.*; **145**: 302-313.
- Lang, P., Handgretinger, R., Niethammer, D., Schlegel, P.G., Eyrich, M., Klingebiel, T. (2003). Transplantation of highly purified CD³⁴⁺ progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood*; **101**: 1630.
- Lang, P., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Herter, M., Dopfer, R., Niethammer, D. (1993). Einsatz von G-CSF bei der Stammzellmobilisation für die autologe KMT bei Kindern. *Monatszeitschrift für Kinderheilkunde*; **141**: 192-196.
- Lang, P., Schumm, M., Taylor, G., Klingebiel, T., Neu, S., Geiselhart, A., Kuci, S., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1999). Clinical scale isolation of highly purified peripheral CD³⁴⁺ progenitors for autologous and allogeneic transplantation in children. *Bone Marrow Transplant.*; **24**: 583-589.
- Lanier, L.L., Corliss, B., Phillips, J.H. (1997). Arousal and inhibition of human NK cells. *Immunol. Rev.*; **155**: 145.
- Lanier, L.L., Corliss, B.C., Wu, J., Leong, C., Phillips, J.H. (1998). Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature*; **391**: 703-707.

- Larcher, C., Recheis, H., Sgonc, R., Gottinger, W., Huemer, H.P., Irschick, E.U. (1997). Influence of viral infection on expression of cell surface antigens in human retinal pigment epithelial cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*; **235**: 709-716.
- Larsson, S., Soderberg-Naucler, C., Moller, E. (1998). Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD¹³⁺-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: Implications for prevention of CMV transmission. *Transplantation*; **65**: 411.
- Lautenschlager, L., Hockerstedt, K., Taskinen, E., von Willebrand, E. (1996). Expression of adhesion molecules and their ligands in liver allografts during cytomegalovirus (CMV) infection and acute rejection. *Transpl. Int.*; **9(1)**: 213-215.
- Leclercq, G., Debacker, V., De Smedt, M., Plum, J. (1996). Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T / natural killer progenitor cells. *J. Exp. Med.*; **184**: 325-336.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M., Geraghty, D.E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD⁹⁴⁺ / NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **95(9)**: 5199-5204.
- Lee, Y.B., Satoh, J., Walker, D.G., Kim, S.U. (1996). Interleukin-15 gene expression in human astrocytes and microglia in culture. *Neuroreport*; **7**: 1062-1066.
- Lehner, P.J., Karttunen, J.T., Wilkinson, G.W.G., Cresswell, P. (1997). The human cytomegalovirus US6 glycoprotein inhibits transporter associated with antigen processing-dependent peptide translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*; **94**: 6904-6909.
- Lennard, A.L., Jackson, G.H. (2000) Stem cell transplantation. *BMJ*; **321**: 433-437.
- Leong, C.C., Chapman, T.L., Bjorkman, P.J., Formankova, D., Mocarski, E.S., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1998). Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: The role of endogenous class I MHC and a viral class I homolog. *J. Exp. Med.*; **187**: 1681-1687.
- Levey, R.H., Gelfand, E.W., Klemperer, M.R., Sanderson, A.R., Bachelor, J.R., Berkel, A.I., Rosen, F.S. (1971). Bone-marrow transplantation in severe combined immunodeficiency syndrome. *Lancet*; **2**: 571-575.
- Lewko, W.M., Smith, T.L., Bowman, D.J., Good, R.W., Oldham, R.K. (1995). Interleukin-15 and the growth of tumor derived activated T-cells. *Cancer Biother.*; **10(1)**:13-20.

- Li, C.R., Greenberg, P.D., Gilbert, M.J., Goodrich, J.M., Riddell, S.R. (1994). Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: Correlation with CMV disease and effect of gancyclovir prophylaxis. *Blood*; **83**: 1971-1979.
- Limaye, A.P., Corey, L., Kalle, D.M., Davis, C.L., Boeckh, M. (2000). Emergence of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease among recipients of solid organ transplants. *Lancet*; **356**: 645-649.
- Li, P., Willie, S.T., Bauer, S., Morris, D.L., Spies, T., Strong, R.K. (1999). Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity*; **10**: 577-584.
- Littler, E., Stuart, A.D., Chee, M.S. (1992). Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir. *Nature*; **358**: 160-162.
- Liu, J.H., Wei, S., Ussery, D., Epling-Burnette, P.K., Leonard, W.J., Djeu, J.Y. (1994). Expression of interleukin-2 receptor gamma chain on human neutrophils. *Blood*; **84(11)**: 3870-3875.
- Ljunggren, H.G., Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today*; **11(7)**: 237-244.
- Ljungman, P. (2001). Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *BMT*; **21(2)**: 72-74.
- Ljungman, P., Niederwieser, D., Pepe, M.S., Longton, G., Storb, R., Meyer, J.D. (1990). Cytomegalovirus infection after marrow transplantation for aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.*; **6**: 295-300.
- Ljungman, P., Öberg, G., Aschan, J. (1996). Foscarnet for pre-emptive therapy of CMV infection detected by a leukocyte-based nested PCR in allogeneic bone marrow transplant patients. *Bone Marrow Transplant.*; **18**: 565-568.
- Ljungman, P., Deliliers, G.L., Platzbecker, U., Matthes-Martin, S., Bacicalupo, A., Einsele, H., Ullmann, J., Musso, M., Trenchel, R., Ribaud, P., Bornhäuser, M., Cesaro, S., Crooks, B., Dekker, A., Gratecos, N., Klingebiel, T., Tagliaferri, E., Ullmann, A.J., Wacker, P., Cordonnier, C. (2001). Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*; **97**: 388-392.

- Lodolce, J.P., Boone, D.L., Chai, S., Swain, R.E., Dassopoulos, T., Trettin, S., Ma, A. (1998). IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity*; **9**: 669-676.
- Loebe, M., Schuler, S., Zais, O., Warnecke, H., Fleck, E., Hetzer, R. (1990). Role of cytomegalovirus infection in the development of coronary artery disease in the transplant heart. *J. Heart Transplant.*; **9**: 707-711.
- Long, E.O., Colonna, M., Lanier, L.L. (1996). Inhibitory MHC class I receptors on NK cell recognition. *Immunol. Today*; **11**: 237-244.
- Losso, M.H., Belloso, W.H., Emery, S., Benetucci, J.A., Cahn, P.E., Lasala, M.C., Lopardo, G., Salomon, H., Saracco, M., Nelson, E., Law, M.G., Davey, R.T., Allende, M.C., Lane, H.C. (2000). A randomized, controlled, phase II trial comparing escalating doses of subcutaneous interleukin-2 plus antiretrovirals versus antiretrovirals alone in HIV-infected patients with CD⁴⁺ cell counts of 350 / mm³. *J. Infect. Dis.*; **181**: 1614-1621.
- M**ackinson, S., Burnett, A.K., Crawford, R.J., Cameron, S., Leask, B.G., Sommerville, R.G. (1988). Seronegative blood products prevent primary cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *J. Clin. Pathol.*; **41**: 948-950.
- Mac Lennan, I.C.M., Campbell, A.C., Gale, D.G.L. (1976). Quantitation of K cells. In: Bloom, B.R., David, J.R. (eds.). *In vitro Methods in cell-mediated and tumor immunity*, Academic Press, New York; 511-522.
- Maki, G., Krystal, G., Dougherty, G., Taki, F., Klingemann, H.G. (1998). Induction of sensitivity to NK-mediated cytotoxicity by TNF-alpha treatment: Possible role of ICAM-3 and CD⁴⁴⁺. *Leukemia*; **12**: 1565-1572.
- Maraninchi, D., Gluckman, E., Blaisse, D., Guyotat, D., Rio, B., Pico, J.L., Leblond, V., Michallet, M., Dreyfus, F., Ifrah, N. (1987). Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet*; **2**: 175-178.
- Margolin, K.A., Rayner, A.A., Hawkins, M.J., Atkins, M.B., Dutcher, J.P., Fisher, R.I., Weiss, G.R., Doroshow, J.H., Jaffe, H.S., Roper, M. (1989). Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy of solid tumors: Analysis of toxicity and management guidelines. *J. Clin. Oncol.*; **7**: 486-498.
- Matthes-Martin, S., Lion, T., Aberle, S.W., Fritsch, G., Lawitschka, A., Bittner, B., Frommlet, R., Gardner, H., Peters, C. (2003). Pre-emptive treatment of CMV DNAemia in paediatric stem cell transplantation: The impact of recipient and donor CMV serostatus on the incidence of CMV disease and CMV related mortality. *Bone Marrow Transplant.*; **31**: 803.

- Maury, S., Mary, J.Y., Rabian, C., Schwarzinger, M., Toubert, A., Scieux, C., Carmagnat, M., Esperou, H., Ribaud, P., Devergie, A., Guardiola, P., Vexiau, P., Charron, D., Gluckman, E., Socie, G. (2001). Prolonged immune deficiency following allogeneic stem cell transplantation: Risk factors and complications in adult patients. *Br. J. Haematol.*; **115**(3): 630-641.
- Mayo, D., Armstrong, J.A., Ho, M. (1978). Activation of latent murine cytomegalovirus infection: Cocultivation, cell transfer and the effect of immunosuppression. *J. Infect. Dis.*; **138**: 890-896.
- Mayo, D.R., Armstrong, J.A., Ho, M. (1977). Reactivation of murine cytomegalovirus by cyclophosphamide. *Nature*; **267**: 721-723.
- Mazeron, M.C., Colimon, R., Roseto, A., Perol, Y. (1984). Détection de cytomegaloviremia using monoclonal antibodies. *Develop. Biol. Stand.*, Karger, S., Basel; **57**: 287-291.
- Mazaron, M.C., Jahn, G., Plachter, B. (1992). Monoclonal antibody E-13 (Mc Ab 810) to human cytomegalovirus recognizes an antigen encoded by exon 2 of the major immediate - early gene. *J. Gen. Virol.*; **73**: 2699-2703.
- Mc Donald, K., Rector, T.S., Braulin, E.A., Kubo, S.H., Olivari, M.T. (1989). Association of coronary artery disease in cardiac transplant recipients with cytomegalovirus infection. *Am. J. Cardiol.*; **64**: 359-362.
- Meyers, J.D., Flournoy, N., Thomas, E. (1986). Risk factors for cytomegalovirus infection after human bone marrow transplantation. *J. Infect. Dis.*; **153**: 478-488.
- Meyers, J.D., Mc Guffin, R.W., Neiman, P.E., Singer, J.W., Thomas, E.D., (1980). Toxicity and efficacy of human leukocyte interferon for treatment of cytomegalovirus pneumonia after marrow transplantation. *J. Infect. Dis.*; **141**: 555-562.
- Meyers, J.D., Leszczynski, J., Zaia, J.A., Flournoy, N., Newton, B., Syndman, D.R., Wright, G.G., Levin, M.J., Thomas, E.D. (1983). Prevention of cytomegalovirus infection by cytomegalovirus immunoglobulin after marrow transplantation. *Ann. Intern. Med.*; **98**: 442-446.
- Meyers, J.D., Reed, E.C., Shepp, D.H., Thornquist, M., Dandliker, P.S., Vicary, C.A., Flournoy, N., Kirk, L.E., Kirsey, J.H., Thomas, E.D., Balfour, H.H. (1988). Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*; **318**: 70-75.
- Michel, D., Pavic, I., Zimmermann, A., Haupt, E., Wunderlich, K., Heuschmid, M., Mertens, T. (1996). The UL97 gene product of human

- cytomegalovirus is an early-late protein with a nuclear localization but is not a nucleoside kinase. *J Virol*; **70**: 6340-6346.
- Miltenyi, S., Müller, W., Weichel, W., Radbruch, A. (1990). High gradient magnetic cellseperation with MACS. *Cytometry*; 231-238.
- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., Taniguchi, T. (1993). The IL-2 receptor complex: Its structure, function and target genes. *Annu. Rev. Immunol*; **11**: 245-268.
- Minamishima, I., Ueda, K., Minematsu, T., Minamishima, Y., Umwmoto, M., Take, H., Kuraya, K. (1994). Role of breast milk in acquisition of cytomegalovirus infection. *Microbiol. Immunol.*; **38**: 549-552.
- Mingari, M.C., Vitale, C., Cantoni, C., Bellomo, R., Ponte, M., Schiavetti, F., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L. (1997). Interleukin-15 induced maturation of human natural killer cells from early thymic precursors, selective expression of CD⁹⁴⁺ / NKG2A as the only HLA class I-specific inhibitory receptor. *Eur. J. Immunol.*; **27**: 1374-1380.
- Mocarski, E.S. (1993). Cytomegalovirus biology and replication. In: Roizman, B., Whitley, R.J., Lopez, C. (eds.). *The Human Herpesvirus*, Raven Press, New York; 173-226.
- Mocarski, E.S. Jr. (1994). Cytomegaloviruses. In: Webster, R.G., Granoff, A. (eds.). *Encyclopedia of Virology*. Volume 1. Academic. Press., London; 292.
- Möller, E. (1965). Contact-induced cytotoxicity by lymphoid cells containing foreign isoantigens. *Science*; **147**: 873-879.
- Molday, R.S., Yen, S.P.S., Rembaum, A. (1977). Application of magnetic microsperes in labelling and separation of cells. *Nature*; **268**: 467-488.
- Mossmann, T.R., Coffman, R.L. (1989). *Annu. Rev. Immunol.*; **7**: 145.
- Movassagh, M., Gozlan, J., Senechal, B., Baillou, C., Petit, J.C., Lemoine, F.M. (1996). Direct infection of CD³⁴⁺ progenitor cells by human cytomegalovirus: Evidence for inhibition of hematopoiesis and viral replication. *Blood*; **88(4)**: 1277.
- Mrozek, E., Anderson, P., Caligiuri, M.A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD⁵⁶⁺ natural killer cells from CD³⁴⁺ hematopoietic progenitor cells. *Blood*; **87**: 2632-2640.
- Munger, W., De Joy, S.Q., Jeyaseelan, R. Sr., Torley, L.W., Grabstein, K.H., Eisenmann, J., Paxton, R., Cox, T., Wick, M.M., Kerwar, S.S. (1995). Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a

- new T cell growth factor: Comparison with interleukin-2. *Cell. Immunol.*; **165**: 289-293.
- N**agata, S. (1996). Fas ligand and immune evasion: Expression of a death factor by tumor cells may explain their escape from immune attack. *Nat. Medicine*; **2**: 1306-1307.
- Nakarai, T., Robertson, M.J., Streuli, M., Wu, Z., Ciardelli, T.L., Smith, K.A., Ritz, J. (1994). Interleukin-2 receptor gamma chain expression on resting and activated lymphoid cells. *J. Exp. Med.*; **180(1)**: 241-51.
- Negrier, S., Escudier, B., Lasset, C., Douillard, J.Y., Savary, J., Chevreau, C., Ravaud, A., Mercatello, A., Peny, J., Mousseau, M., Philip, T., Tursz, T. (1998). Recombinant human interleukin-2, recombinant human interferon alfa-2a, or both in metastatic renal-cell carcinoma. *Group Francais d'Immunotherapie. New England Journal of Medicine*; **338(18)**: 1272-1278.
- Neiman, P.E., Reeves, W., Ray, G., Flournoy, N., Lerner, K.G., Sale, G.E., Thomas, E.D. (1977). A prospective analysis of interstitial pneumonia and opportunistic viral infection among recipients of allogeneic bone marrow grafts. *J. Infect. Dis.*; **136**: 754-767.
- Nora, R., Abrams, J.S., Tait, N.S., Hiponia, D.J., Silverman, H.J. (1989). Myocardial toxic effects during recombinant interleukin-2 therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*; **81**: 95-63.
- O**leksowicz, L., Strack, M., Dutcher, J.P., Sussman, I., Caliendo, G., Sparano, J., Wiernik, P.H. (1994). A distinct coagulopathy associated with interleukin-2 therapy. *Br. J. Haematol.*; **88(4)**: 892-894.
- Onno, M., Pangault, C., Le Friec, G., Guilloux, V., Andre, P., Fauchet, R. (2000). Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: Specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J. Immunol.*; **164**: 6426.
- Onorato, I.M., Morens, D.M., Martone, W.J., Stansfield, S.K. (1985). Epidemiology of cytomegaloviral infections: Recommendations for prevention and control. *Rev. Infect. Dis.*; **7**: 479-497.
- O'Reilly, R.J., Reich, L., Gold, J., Kirkpatrick, D., Dinsmore, R., Kapoor, N., Condie, R. (1983). A randomized trial of intravenous hyperimmune globulin for the prevention of cytomegalovirus (CMV) infections following marrow transplantation: preliminary results. *Transplant. Proc.*; **15**: 1405-1411.

- Osarogiagbon, R.U., Defor, T.E., Weisdorf, M.A., Erice, A., Weisdorf, D.J. (2000). CMV antigenemia following bone marrow transplantation: Risk factors and outcomes. *Biol. Blood Marrow Transplant.*; **6**: 280.
- Ottinger, H., Schulze-Rath, R., Schmitz, A., Grosse-Wilde, H. (1995). Progress of unrelated bone marrow donor search at the University Hospital of Essen (1991-1994). *Ann. Hematol.*; **71**: 71-75.
- Ottinger, H.D., Beelen, D.W., Scheulen, B., Schaefer, U.W., Grosse-Wilde, H. (1996). Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow. *Blood*; **88**: 2775-2779.
- Ottinger, H.D., Müller, C.R., Goldmann, S.F., Albert, E., Arnold, R., Beelen, D.W., Blasczyk, R., Bunjes, D., Casper, J., Ebell, W., Ehninger, G., Eiermann, T., Einsele, H., Fause, A., Ferencik, S., Finke, J., Hertenstein, B., Heyll, A., Klingebiel, T., Knipper, A., Kremens, B., Kolb, H.J., Kolbe, K., Lenartz, E., Lindemann, M., Müller, C.A., Mytilineos, J., Niederwieser, D., Runde, V., Sayer, H., Schaefer, U.W., Schmitz, N., Schröder, S., Schulze-Rath, R., Schwerdtfeger, R., Siegert, W., Thiele, B., Zander, A.R., Grosse-Wilde, H. (2000). Second German consensus on immunogenetic donor search for allotransplantation of hematopoietic stem cells. *Ann. Hematol.*
- P**alucka, A.K., Porwit, A., Reizenstein, P. (1991). Resistance of leukemic blasts to lymphokine activated killer (LAK)-mediated cytotoxicity is not related to their adhesion properties. *Eur. J. Haematol.*; **47**: 123-127.
- Pamphilon, D.H., Rider, J.R., Barbara, J.A., Williamson, L.M. (1999). Prevention of transfusion transmitted cytomegalovirus infection. *Transfusion. Med.*; **9**: 115.
- Parham, P. (1997). NK cells, MHC class I antigens and missing self. *Immunol. Rev.* (1997); **155**: 1-221.
- Park, S.Y., Kim, H.W., Moon, K.C., Hong, H.K., Lee, H.S. (2000). MRNA expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule 1 in acute renal allograft rejection. *Transplantation*; **69**: 2554-2560.
- Parkinson, D.R., Abrams, J.S., Wiernik, P.H., Rayner, A.A., Margolin, K.A., Van Echo, D.A., Sznol, M., Dutcher, J.P., Aronson, F.R., Doroshow, J.H. 1990. Interleukin-2 therapy in patients with metastatic malignant melanoma: A phase II study. *Journal of Clinical Oncology*; **8(10)**: 1650-1656.

- Paya, C.V., Wold, A.D., Smith, T.F. (1987). Detection of cytomegalovirus infections in specimens other than urine by the shell vial assay and conventional tube cell cultures. *J. Clin. Microbiol.*; **25**: 755-757.
- Pazmany, L., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Reyburn, H.T., Strominger, J.L. (1996). Protection from natural killer cell-mediated lysis by HLA-G expression on target cells. *Science*; **274**: 792-795.
- Pearson, G.A. (1978). In vitro and in vivo investigations on antibody-dependent cellular cytotoxicity. *Current Topics in Microbiol. Immunol.*; **80**: 65-96.
- Perlmann, H., Perlmann, P., Hellström, U., Hammarström, S. (1976). Purification and fractionation of human blood lymphocytes. Characterization of subclasses by their antibody-dependent cytotoxic potential (K cell assay). In: Bloom, B.R., David, J.R. (eds.). *In vitro Methods in cell-mediated and tumor immunity*, Academic Press., New York; 497-509.
- Perlmann, P., Perlmann, H., Larsson, A., Wahlin, B. (1975). Antibody-dependent cytolytic effector lymphocytes (K cells) in human blood. *J. Reticuloend. Soc.*; **17**: 241-250.
- Peters, C., Matthes-Martin, S., Fritsch, G., Holter, W., Lion, T., Witt, V., Hocker, P., Fischer, G., Dieckmann, K., Handgretinger, R., Klingebiel, T., Gadner, H. (1999). Transplantation of highly purified peripheral blood CD³⁴⁺ cells from HLA mismatched parental donors in 14 children: Evaluation of early monitoring of engraftment. *Leukemia*; **13**: 2070-2078.
- Petz, L.D., Swisher, S.N. (eds.) (1996). *Clinical Practice of Transfusion Medicine*. Third Edition, Churchill Livingstone, New York.
- Plotkin, S.A., Friedman, H.M., Fleisher, G.R. (1981). Prevention and treatment of cytomegalovirus infection. In: Nahmias, A., Dowle, W., Schinazi, R. (eds.). *The human herpesviruses: A interdisciplinary perspective*. Elsevier, New York; 403-413.
- Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S., Koszinowski, U.H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J. Exp. Med.*; **188**: 1047-1054.
- Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, L., Mingari, M.C. (1999). Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD⁹⁴⁺ / NKG2A and acquire p49, a HLA-G1-specific receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **96**: 5674-5679.

- Prix, L., Hamprecht, K., Holzhütter, B., Handgretinger, R., Klingebiel, T., Jahn, G. (1999). Comprehensive restriction analysis of the UL97 region allows early detection of Ganciclovir-Resistant human cytomegalovirus in an immunocompromised child. *The Journal of Infectious Diseases*; **180**: 491-495.
- Prix, L., Maierl, J., Jahn, G., Hamprecht, K. (1998). A simplified assay for screening of drug resistance of cell-associated cytomegalovirus strains. *J. Clin. Virol.*; **11**: 29-37.
- Prösch, S., Volk, H.D., Reinke, P., Pioch, K., Docke, W.D., Krüger, D.H. (1998). Human cytomegalovirus infection in transplant recipients: Role of TNF alpha for reactivation and replication of human cytomegalovirus. In: Scholz, M., Rabenau, H.F., Doerr, H.W., Cinatl, J. (eds.). *CMV-related immunopathology*, Karger, Basel, Switzerland; **21**: 29-41.
- Prösch, S., Staak, K., Stein, J., Liebenthal, C., Stamminger, T., Volk, H.D., Krüger, D.H. (1995). Stimulation of the human cytomegalovirus IE enhancer / promoter in HL60 cells by TNF α is mediated via induction of NF- κ B. *Virology*; **208**: 197-206.
- Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klinemann, H.G., Beatty, P., Hows, J., Thomas, E.D. (1995). Meeting report: Consensus conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant*; **15**: 825-828.
- Q**UILLET-MARY, A., Cavarec, L., Kermarrec, N., Marchiol-Fournigault, C., Gil, M.L., Conjeaud, H., Fradelezi, D. (1991). Target lysis by human LAK cells is critically dependent upon target binding properties, but LFA-1, LFA-3 and ICAM-1 are not the major adhesion ligands on targets. *Int. J. Cancer*; **47**: 473-479.
- R**ACHAMIN, N., Gan, J., Segall, H. (1998). Tolerance induction by megadose hematopoietic transplants: Donor-type CD³⁴⁺ stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte culture. *Transplantation*; **65**:1386-1393.
- Rajagopalan, S., Long, E.O. (1999). A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells. *J. Exp. Med.*; **189**: 1093-1100.
- Rammensee, H.G. (1995). Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr. Opin. Immunol.*; **7(1)**: 85-96.
- Reed, E.C., Bowden, R.A., Dandliker, P.S., Lilleby, K.E., Meyers, J.D. (1988). Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplantation. *Ann. Intern. Med.*; **109**: 783-788.

- Reed, E.C., Dandliker, P.S., Meyers, J.D. (1986). Treatment of cytomegalovirus pneumonia with 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxymethyl]guanine and high-dose corticosteroids. *Ann. Intern. Med.*; **103**: 214-215.
- Reed, E.C., Wolford, J.L., Kopecky, K.L., Lilleby, K.E., Dandliker, P.S., Todaro, J.L., Mc Donald, G.B., Meyers, J.D. (1990). Ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus gastroenteritis in bone marrow transplant patients. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.*; **112**: 505-510.
- Reusser, P., Gambertoglio, J.G., Lilleby, K., Meyers, J.D. (1992). Phase-II trial of foscarnet for prevention of cytomegalovirus infection in autologous and allogeneic marrow transplant recipients. *J. Infect. Dis.*; **166**: 473-479.
- Reyburn, H.T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D.M., Pazmany, L., Strominger, J.L. (1997). The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature*; **386**: 514.
- Ribbert, H. (1904). Veber protozoenartige Zellen in der Niere eines syphilitischen Neugeborenen und in der Parotis von Kindern. *Zentralbl. Allg. Pathol.*; **15**: 945-948.
- Ringden, O., Pihlstedt, P., Volin, L., Nikoskelainen, J., Lönnqvist, B., Ruutu, P., Ruutu, T., Tuivanen, A., Wahren, B. (1987). Failure to prevent cytomegalovirus infection by cytomegalovirus hyperimmune plasma: A randomized trial by the Nordic BMT group. *Bone Marrow Transplant.*; **2**: 299-305.
- Robertson, M.J., Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* **76**: 2421-2438
- Roder, J.C., Dowe, A.K. (1979). The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell fraction. *Nature*; **278**: 451-453.
- Roder, J.C., Haliotis, T., Klein, M., Korec, S., Jett, J.R., Ortaldo, J., Herberman, R.B., Katz, P., Fauci, A.S. (1980). A new immunodeficiency disorder in humans involving NK cells. *Nature*; **284**: 553-555.
- Rosenberg, S.A. (1988). The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. A review. *Ann. Surg.*; **208(2)**: 121-135.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzengruber, D.J., Weber, J.S., Parkinson, D.R., Seipp, C.A., Einhorn, J.H., White, D.E. (1994). Treatment of 283 consecutive patients with metastatic melanoma or renal cell cancer using high-dose bolus interleukin-2. *JAMA*; **271(12)**: 907-913.

- Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Muul, L.M., Chang, A.E., Avis, F.P., Leitman, S., Linehan, W.M., Robertson, C.N., Lee, R.E., Rubin, J.T. (1987). A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N. Engl. J. Med*; **316(15)**: 889-897.
- Rotzschke, O., Falk, K., Deres, K., Schild, H., Norda, M., Metzger, J., Jung, G., Rammensee, H.G. (1990). Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*; **348**: 252-254.
- Rowe, W.P., Hartley, J.W., Waterman, S., Turner, H.C., Huebner, R.J. (1956). Cytopathogenic agents resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; **92**: 418-424.
- Rubin, R.H., Wilson, E.J., Barrett, L.V., Medearis, D.N. (1986). The protective effects of hyperimmune anti-murine cytomegalovirus antiserum against lethal viral challenge: The case for passive-active immunization. *Clin. Immunol. Immunopathol.*; **39**: 151-158.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Trosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R.S., Martelli, M.F., Veleradi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*; **94**: 333-339.
- S**alih, H.R., Rammensee, H.G., Steinle, A. (2002). Cutting edges: Down-regulation of MHC class I chain-related gene A on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.*; **169**: 4098-4102.
- Salzberger, B., Bowden, R.A., Hackman, R.C., Davis, C., Boeckh, M. (1997). Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: Risk factors and outcome. *Blood*; **90**: 2502-2508.
- Sanders, J.E., Buckner, C.D., Sullivan, K., Doney, K., Appelbaum, F., Witherspoon, R., Anasetti, C., Storb, R., Thomas, E.D. (1989). Growth and development after bone marrow transplantation. *Progress Clin. Biol. Res.*; **309**: 375-382.
- Santos, G.W., Tutschka, P.J., Brokmeyer, R., Saral, R., Beschorner, W.E., Bias, W.B., Braine, H.G., Burns, W.H., Eifenbein, G.J., Kaizer, H. (1983). Marrow transplantation for acute non-lymphatic leukemia after treatment with busulfan and cyclophosphamide. *N. Engl. J. Med.*; **309**: 1347-1353.
- Saxon, A., Mitsuyasu, R., Stevens, R., Champlin, R.E., Kimata, H., Gale, R.P. (1986). Designed transfer of specific immune responses with bone marrow transplantation. *J. Clin. Invest.*; **78**: 959-967.

- Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Simmons, A., La Vista, A.B., Shellam, G.R. (1990). Cmv-1, a genetic locus that controls murine cytomegalovirus replication in the spleen. *J. Exp. Med.*; **171(5)**: 1469-1483.
- Scalzo, A.A., Fitzgerald, N.A., Wallace, C.R., Gibbons, A.E., Smart, Y.C., Burton, R.C., Shellam, G.R. (1992). The effect of the Cmv-1 resistance gene, which is linked to the natural killer cell gene complex, is mediated by natural killer cells. *J. Immunol.*; **149(2)**: 581-589.
- Schleibner, S., Schneeberger, H., Land, W. (1992). *Zeitschrift für Transplantationsmedizin*, 4. Jahrgang, 71-73.
- Schmader, K.E., Rahija, R., Porter, K.R., Daley, G., Hamilton, J.D. (1992). Aging and reactivation of latent murine cytomegalovirus. *J. Infect. Dis.*; **166**: 1403-1407.
- Schmidt, G.M., Kovacs, A., Zaia, J.A., Horak, D.A., Blume, K.G., Nademanee, A.P., O'Donnell, M.R., Synder, D.S., Forman, S.J. (1988). Ganciclovir / immunoglobulin combination therapy for the treatment of human cytomegalovirus-associated interstitial pneumonia in bone marrow allograft patients. *Transplantation*; **46**: 905-907.
- Schmidt, G.M., Zaia, J., Horak, D., Kovacs, A., Hawkins, D., Nademanee, A., O'Donnell, M.R., Synder, D.S., Stein, A.S., Paarker, P.M., Hill, R., Blume, K.G., Forman, S.J. (1988). Human cytomegalovirus (HCMV) detection in routine bronchoalveolar lavage (BAL) specimen as a predictor for interstitial pneumonia (IP) in allogeneic bone marrow transplantation (BMT) recipients. *Blood*; **72(1)**: 405a.
- Schmidt, R.E., Bartley, G., Levine, H., Schlossman, S.F., Ritz, J. (1985) Functional characterization of LFA-1 antigens in the interaction of human NK clones and targets. *J. Immunol.*; **135**: 1020-1025.
- Schmitz, N. (1998). Therapy of highly malignant non-Hodgkin lymphoma with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation. *Schweiz Rundschau Med. Praxis*; **87**: 863-868.
- Schmitz, N., Beksac, M., Hasenclever, D., Bacigalupo, A., Ruutu, T., Nagler, A., Gluckman, E., Russell, N., Apperley, J., Gorin, N., Szer, J., Bradstock, K., Varet, B., Clark, P., Borkett, K., Gratwohl, A. (2000). A randomised study from the European Group for Blood and Bone Marrow Transplantation comparing allogeneic transplantation for filgrastim-mobilized peripheral blood stem cells with bone marrow transplantation in 350 patients with leukemia. *Blood*; **96(1)**: 2068.
- Schumm, M., Lang, P., Taylor, G., Kuci, S., Klingebiel, T., Bühring, H.J., Geiselhart, A., Niethammer, D., Handgretinger, R. (1999). Isolation of

- highly purified autologous and allogeneic peripheral CD³⁴⁺ cells using the CliniMACS device. *J. Hematother.*; **8**: 209-218.
- Schwartz, A., Marti, G.E., Poon, R., Gratama, J.W., Fernandez-Repollet, E. (1998). Standardizing flow cytometry: A classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry*; **33**: 106-114.
- Sedmak, D.D., Knight, D.A., Vook, N.C., Waldman, J.W. (1994). Divergent patterns of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 expression on cytomegalovirus-infected endothelial cells. *Transplantation*; **58**: 1379-1383.
- Sehn, L.H., Alyea, E.P., Weller, E., Canning, C., Lee, S., Ritz, J., Antin, J.H., Soiffer, R.J. (1999). Comparative outcomes of T-cell-depleted and non-T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia: Impact of donor lymphocyte infusion. *J. Clin. Oncol.*; **17**: 561-568.
- Serke, S., van Lessen, A., Huhn, D. (1998). Quantitative Fluorescence Flow Cytometry: A comparison of the three techniques for direct and indirect immunofluorescence. *Cytometry*; **33**: 179-187.
- Shahgasempour, S., Woodroffe, S.B., Garnett, H.M. (1997). Alterations in the expression of ELAM-1, ICAM-1 and VCAM-1 after in vitro infection of endothelial cells with a clinical isolate of human cytomegalovirus. *Microbiol. Immunol.*; **41**: 121-129.
- Shahidi, H., Kilbourn, R. (1998). The role of nitric oxide in interleukin-2 therapy induced hypotension. *Cancer and Metastasis Reviews*; **17**: 119-126.
- Shanley, J.D., Jordan, M.C., Stevens, J.G. (1981). Modification by adoptive humoral immunity of murine cytomegalovirus infection. *J. Infect. Dis.* **143**: 231-237.
- Shanley, J.D., Pesanty, E.L. (1985). The relation of viral replication to interstitial pneumonitis in murine cytomegalovirus lung infection. *J. Infect. Dis.*; **151**: 454-458.
- Shepp, D.H., Dandliker, P.S., De Miranda, P., Burnette, T.C., Cederberg, D.M., Kirk, L.E., Meyers, J.D. (1986). Activity of 9-[2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy-methyl]guanine in the treatment of cytomegalovirus pneumonia. *Ann. Intern. Med.*; **103**: 368-373.
- Shibuya, A., Kojima, H., Shibuya, K., Nagayoshi, K., Nagasawa, T., Nakauchi, H. (1993). Enrichment of interleukin-2-responsive natural killer progenitors in human bone marrow. *Blood*; **81(7)**: 1819-1826.

- Simpson, D.R., Couban, S., Bredeson, C., Irwin, R., Walker, I., Tsiporah, B., Shore, T., Howson-Jan, K., Browett, P., Panzarella, T., Messner, H., Barnett, M., Jeffrey, H., Lipton, J. (2000). Canadian Bone Marrow Transplant Study Group (CBMTG) (2000) Canadian randomised study comparing peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) in patients undergoing matched sibling transplants for myeloid malignancies. *Blood*; **96(1)**: 2067.
- Small, T.N., Papadopoulos, E.B., Boulad, F., Black, P., Castro-Malaspina, H., Childs, B.H., Collins, N., Gillio, A., George, D., Jakubowski, A., Heller, G., Fazzari, M., Kernan, N., Mac Kinnon, S., Szabolcs, P., Young, J.W., O'Reilly, R.J. (1999). Comparison of immune reconstitution after unrelated and related T-cell-depleted bone marrow transplantation: Effect of patient age and donor leukocyte infusions. *Blood*; **93**: 467-480.
- Smith, K.B., Ellis, S.A. (1999). Standardisation of a procedure for quantifying surface antigens by indirect immunofluorescence. *J. Immunol. Methods*; **228**: 29-36.
- Smith, K.A. (1984). Interleukin-2. *Ann. Rev. Immunol.*; **2**:319-333.
- Smith, K.A. (1988). Interleukin-2: Inception, impact and implications. *Science*; **240**: 1169-1176.
- Smith, M.G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; **92**: 424-430.
- Smyth, M.J., Trapani, J.A. (1993). Granzymes: Exogenous proteinases alterations of distribution and activity of human natural killer (NK) cells. *J. Clin. Immunol.*; **13**: 344-351.
- Socie, G., Stone, J.V., Wingard, J.R., Weisdorf, D., Henslee-Downey, P.J., Bredeson, C., Cahn, J.Y., Passweg, J.R., Rowlings, P.A., Schouten, H.C., Kolb, H.J., Klein, J.P. (1999). Long-term survival and late deaths after allogeneic bone marrow transplantation. Late Effects Working Committee of the international Bone Marrow Transplant Registry. *N. Engl. J. Med.*; **341**: 14-21.
- Soderberg-Naucler, C., Fish, K.N., Nelson, J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*; **91**: 119-126.
- Stagno, S., Pass, R.F., Cloud, G., Britt, W.J., Henderson, R.E., Walton, P.D., Veren, D.A., Page, F., Alford, C.A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus and clinical outcome. *JAMA*; **256**: 1904-1908.

- Stagno, S. (1999). Congenital and perinatal cytomegalo infections. *Intervirolo.*, **42**: 314-321.
- Starky, M., Sargent, I.L., Redman, C.W.G. (1988). Cell populations in early pregnancy decidua: Characterization and isolation of large granular lymphocytes by flow cytometry. *Immunology*; **65**: 129-134.
- Starr, S.E., Allison, A.C. (1977). Role of T lymphocytes in recovery from murine cytomegalovirus infection. *Infect. Immun.* **17**: 458-462.
- Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K., Spies, T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics*; **53**: 279-287.
- Stellbrink, H.J., van Lunzen, J., Westby, M., O'Sullivan, E., Schneider, C., Adam, A., Weitner, L., Kuhlmann, B., Hoffmann, C., Fenske, S., Aries, P.S., Degen, O., Eggers, C., Petersen, H., Haag, F., Horst, H.A., Dalhoff, K., Mocklinghoff, C., Cammack, N., Tenner-Racz, K., Racz, P. (2002). Effects of interleukin-2 plus highly active antiretroviral therapy on HIV-1 replication and proviral DNA (COSMIC trial). *AIDS*; **16**:1479-1487.
- Stellbrink, H.J., Hufert, F.T., Tenner-Racz, K., Lauer, J., Schneider, C., Albrecht, H., Racz, P., van Lunzen, J. (1998). Kinetics of productive and latent HIV infection in lymphatic tissue and peripheral blood during triple-drug combination therapy with or without additional interleukin-2. *Antiviral Therapy*; **3(4)**: 209-214.
- Stocchi, R., Ward, K.N., Fanin, R., Baccharani, M., Apperley, J.F. (1998). Management of human cytomegalovirus infection and disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Hematologica*; **84**: 71.
- Storek, J., Joseph, A., Espono, G., Dawson, M.A., Douek, D.C., Sullivan, K.M., Flowers, M.E., Martin, P., Mathioudakis, G., Nash, R.A., Storb, R., Appelbaum, F.R., Maloney, D.G. (2001). Immunity of patients surviving 20 to 30 years after allogeneic or syngeneic bone marrow transplantation. *Blood*; **98**: 3505-3512.
- Storek, J., Gooley, T., Witherspoon, R.P., Sullivan, K.M., Storb, R. (1997). Infectious morbidity in long-term survivors of allogeneic marrow transplantation is associated with low CD⁴⁺ T cell counts. *Am. J. Hematol.*; **54**: 131-138.
- Stuart, P.M., Usui, N., Randhawa, R.S., Laycock, K.A., Fleming, T.P., Pepose, J.S. (1997). Differential expression of the cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and E-Selectin in normal and posttransplantation

- myocardium. Cell adhesion molecule expression in human cardiac allografts. *Circulation*; **89**: 1760-1768.
- Sullivan, K.M., Kopecky, K., Jocom, J., Buckner, C.D., Counts, G., Meyers, J.D., Witherspoon, R.P., Storb, R., Thomas, E.D. (1988). Antimicrobial and immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulin in bone marrow transplantation. In: 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology. Washington; 216.
- Sullivan, K.M., Kopecky, K., Meyers, J., Buckner, C.D. (1990). Immunoglobulin prophylaxis in marrow transplantation. 6th International Symposium on Infections in the Immunocompromised Host.
- Sullivan, V., Talarico, C.L., Stanat, S.C., Davis, M., Coen, D.M., Biron, K.K. (1992). A protein kinase homologue controls phosphorylation of ganciclovir in human cytomegalovirus-infected cells. *Nature*; **358**: 162-164.
- Sutherland, C.L., Chalupny, N.J., Schooley, K., van den Bos, T., Kubin, M., Cosman, D. (2002). UL18-binding proteins, novel MHC classI-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J. Immunol.*; **168**: 671-679.
- Suto, Y., Ishikawa, Y., Kasahara, M., Kasai, F., Yabe, T., Akaza, T., Juji, T. (1998). Gene arrangement of the killer cell inhibitory receptor family on human chromosome 19Q13.4 detected by fiber-FISH, *Immunogenetics*; **48**: 235-241.
- Suzuki, H., Duncan, G.S., Takimoto, H., Mak, T.W. (1997). Abnormal development of intestinal intraepithelial lymphocytes and peripheral natural killer cells in mice lacking the IL-2 receptor beta chain. *J. Exp. Med.*; **185**: 499-505.
- T**akenaka, K., Gondo, H., Tanimoto, K., Minamishima, Y., Harada, M., Niho, Y. (1997). Increase incidence of cytomegalovirus (CMV) infection and CMV associated disease after allogeneic bone marrow transplantation from unrelated donors. The Fukuoka Bone Marrow Transplantation Group. *Bone Marrow Transplant.* **19**: 241.
- Tanio, J.W., Basu, C.B., Albelda, S.M., Eisen, H.J. (1994). Differential expression of the cell adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1 and E-Selectin in normal and posttransplantation myocardium. Cell adhesion molecule expression in human cardiac allografts. *Circulation*; **89**: 1760-1768.

- Taylor, R.B., Duffus, W.P.H., Raff, M.C., Petris, S. (1971). Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature*; **233**: 255-239.
- Taylor-Wiedman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.*; **72**: 2059.
- Thomas, E.D., Storb, R. (1970). Technique for human marrow grafting. *Blood*; **36**: 507-515.
- Thomas, O., Mahe, M., Campion, L., Bourdin, S., Milpied, N., Brunet, G., Lisbona, A., Le Mevel, A., Moreau, P., Harousseau, J., Cuilliere, J. (2001). Longterm complications of total body irradiation in adults. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Physics.*; **49**: 125-131.
- Tieng, V., Le Bouguenec, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D., Toubert, A. (2002). Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD⁵⁵⁺ triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **99**: 2977-2982.
- Timonen, T., Patarroyo, M., Gahmberg, C.G. (1988). CD^{11+a-c} / CD¹⁸⁺ and GP84 (LB-2) adhesion molecules on human large granular lymphocytes and their participation in natural killing. *J. Immunol.*; **141**: 1041-1046.
- Tomasec, P., Braud, V.M., Rickards, C., Powell, M.B., Mc Sharry, B.P., Gadola, S., Cerundolo, V., Borysiewicz, L.K., Mc Michael, A.J., Wilkinson, G.W. (2000). Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science*; **287(5455)**: 1031.
- Tong, C.Y., Bakran, A., Peiris, J.S., Muir, P., Herrington, C.S. (2002). The association of viral infection and chronic allograft nephropathy with graft dysfunction after renal transplantation. *Transplantation*; **74**: 576-578.
- Trinchieri, G. (1989). Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* **47**, 187-376.
- Tsinontides A.C., Bechtel T.P. (1996). Cytomegalovirus prophylaxis and treatment following bone marrow transplantation. *Ann. Pharmacother.* **30**: 1277-1290.
- Tsukaguchi, K., Balaji, K.N., Boom, W.H. (1995). CD⁴⁺ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function and cytokine production. *J. Immunol.*; **154(4)**: 1786-1796.

Tyms, A.S., Davis, J.M., Jeffries, D.J., Meyers, J.D. (1984). BWB759U, an analogue of acyclovir, inhibits human cytomegalovirus in vitro. *Lancet*; **2**: 924-925.

Tyzzar, E.E. (1906). The histology of skin lesions in varicella. *Philippine J. Sci.*; **1**: 349-372.

Ubrecht M., Martinozzi, S., Grzeschik, M., Hengel, H., Ellwart, J.W., Pla, M., Weiss, E.H. (2000). Cutting edge: The human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *J. Immunol.*; **164**: 5019.

Valentine, H.A. (1999). Role of CMV in transplant coronary artery disease and survival after heart transplantation. *Transpl. Infect. Dis.*; **1**: 25-30.

Vales-Gomez, M., Reyburn, H.T., Erskine, R.A., Lopez-Botet, M., Strominger, J.L. (1999). Kinetics and peptide dependency of the binding of the inhibitory NK receptor CD⁹⁴⁺ / NKG2-C to HLA-E. *EMBO J.*; **18**: 4250-4260.

Vance, R.E. (2000). Commentary: A Copernican revolution? Doubts about the danger theory. *J. Immunol.*; **165**: 1725-1728.

Van der Meer, J.T.M., Drew, W.L., Bowden, R.A., Galsso, G.J., Griffiths, P.D., Jabs, D.A., Katlama, C., Spector, S.A., Whitley, R.J. (1996). Summary of the International Consensus Symposium on Advances in the Diagnosis, Treatment and Prophylaxis of Cytomegalovirus Infection. *Antiviral. Res.*; **32**: 119.

Van der Pijl, J.W., Frissen P.H., Reiss P., Hulsebosch H.J., van den Tweel J.G., Lange J.M., Danner S.A.. Foscarnet and penile ulceration. *Lancet*. 1990 Feb 3;335(8684):286.

Van Dorp, W.T., van Wieringen, P.A., Marselis-Jonges, E., Bruggeman, C.A., Daha, M.R., van Es, L.A., van der Woude, F. (1993). Cytomegalovirus directly enhances MHC class I and intercellular adhesion molecule-1 expression on cultured proximal tubular epithelial cells. *Transplantation*; **55**: 1367-1371.

Vanham, G., Kestens, L., Vingerhoets, J., Penne, G., Colebunders, R., van den Bruaene, M., Goeman, J., Ceuppens, J.L., Sugamura, K., Gigase, P. (1994). The interleukin-2 receptor subunit expression and function on peripheral blood lymphocytes from HIV-infected and control persons. *Clin. Immunol. Immunopathol.*; **71(1)**: 60-68.

Verdonck, L.F., de Gast, G.C., Dekker, A.W., de Weger, R.A., Schuurmann, H.J., Rozenberg-Arska, M. (1989). Treatment of cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation with cytomegalovirus

- immunoglobulin combined with ganciclovir. *Bone Marrow Transplant.*; **4**: 187-189.
- Vivier, E., Tomasello, E., Paul, P. (2002). Lymphocytes activation via NKG2D: Towards a new paradigm in immune recognition? *Curr. Opin. Immunol.*; **14**: 306-311.
- Von Willebrand, E., Petterson, E., Ahonen, J., Hayry, P. (1986). CMV infection, class II antigen expression and human kidney allograft rejection. *Transplantation*; **42**: 364-367.
- Voss, S.D., Leary, T.P., Sondel, P.M., Robb, R.J. (1993). Identification of a direct interaction between interleukin-2 and the p64 interleukin-2 receptor gamma chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **90(6)**: 2428-2432.
- W**ade, J.C., Hintz, M., Mc Guffin, R., Springmeyer, S.C., Connor, J.D., Meyers, J.D. (1982). Treatment of cytomegalovirus pneumonia with high-dose acyclovir. *Am. J. Med.*; **73(1A)**: 249-256.
- Waldmann, T., Tagaya, Y., Bamford, R. (1998). Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors. *Int. Rev. Immunol.*; **16**: 205-226.
- Waldman, W.J. (1998). Cytomegalovirus as a perturbing factor in Graft / Host equilibrium: Havoc at the endothelial interface. In: Scholz, M., Rabenau, D.H.W. (eds.). *CMV-Related Immunopathology*, Cinatl, Basel, Karger; 54-66.
- Waldman, W.J., Knight, D.A., Huang, E.H. (1998). An in vitro model of T cell activation by autologous cytomegalovirus (CMV)-infected human adult endothelial cells contribution of CMV-enhanced endothelial ICAM-1. *J. Immunol.*, **169**: 3143-3151.
- Walmsley, S.L., Chew, E., Read, S.E., Vellend, H., Salit, I., Rachlis, A., Fanning, M.M. (1988). Treatment of cytomegalovirus retinitis with trisodium phosphonoformate hexahydrate (Foscarnet). *J. Infect. Dis.*; **157(3)**: 569-572.
- Wang, E.C., Mc Sharry, B., Retiere, C., Tomasec, P., Williams, S., Borysiewicz, L.K., Braud, V.M., Wilkinson, G.W. (2002). UL40-mediated NK evasion during productive infection with human cytomegalovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **99**: 7570.
- Weller, T.H., Macauley, J.C., Craig, J.M., Wirth, P. (1957). Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*; **94(1)**: 4-12.

- Weller, T.H., Hanshaw, J.B., Scott, D.E. (1960). Serological differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology*; **12**:130-132.
- Welte, S.A., Sinzger, C., Lutz, S.Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K.L., Eknigk, U., Rammensee, H.G., Steinle, A. (2003). Selektive intracelluläre Retention von virally induzierten NKG2D-Liganden durch das humane Cytomegalovirus UL16-Glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* **33**: 194-203.
- Weston, K., Barrell, B.G. (1986). Sequence of the short unique region, short repeats and part of the long repeats of human cytomegalovirus. *J. Mol. Biol.*; **192**: 177-208.
- Wiertz, E.J.H.J., Jones, T.R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H.J., Ploegh, H.L. (1996a). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*; **84**: 769-779.
- Wiertz, E.J.H.J., Tortorella, D., Bogoy, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T.R., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. (1996b). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature*; **384**: 432-438.
- Wilkinson, P., Liew, F. (1995). *J. Exp. Med.*; **181**: 1255.
- Wilson, E.J., Medearis, D.N., Hansen, L.A., Rubin, R.H. (1987). 9-(1-3-Dihydroxy-2-propoxymethyl)guanine prevents death but not immunity in cytomegalovirus-infected normal and immunosuppressed BALB / c-mice. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **31**: 1017-1020.
- Wilson, M.J., Torkar, M., Haude, A., Milne, S., Jones, T., Sheer, D., Beck, S., Trowsdale, J. (2000). Plasticity in the organization and sequences of human KIR / IL-T gene families. *Proc. Natl. Acad. Sci.*; **97**: 4778-4783.
- Wingard, J.R. (1993). Viral infections in leukemia and bone marrow transplant patients. *Leuk. Lymphoma*; **2**: 115-125.
- Winston, D.J., Gale, R.P., Meyers, D.V., Young, L.S. (1979). UCLA Bone Marrow Transplant Group: Infectious complications of human bone marrow transplantation. *Medicine (Baltimore)*; **58**: 1-31.
- Winston, D.J., Ho, W.G., Bartoni, K., Holland, G.N., Mitsuyasu, R.T., Gale, R.P., Busuttill, R.W., Champlin, R.E. (1988). Ganciclovir therapy for cytomegalovirus infection in recipients of bone marrow transplants and other immunosuppressed patients. *Rev. Infect. Dis.*; **10(3)**: 540-553.
- Winston, D.J., Ho, W.G., Champlin, R.E. (1989). Use of DHPG (ganciclovir) and intravenous immune globulin in bone marrow transplantation. In: Gale,

- R.P., Champlin, R.E. (eds.). Bone Marrow transplantation: Current controversies, Liss, New York, Kluwer, Nurwell; 113-128.
- Winston, D.J., Ho, W.G., Champlin, R.E. (1989). Use of DHPG (ganciclovir) and intravenous immune globulin in bone marrow transplantation. In: Gale, R.P., Champlin, R.E. (eds.). Bone Marrow transplantation: Current controversies, Liss, New York, Kluwer, Nurwell; 553-561.
- Winston, D.J., Ho, W.G., Champlin, R.E. (1990). Cytomegalovirus infections after allogeneic bone marrow transplantation. *Rev. Infect. Dis.*; **12(7)**: 776-792.
- Winston, D.J., Ho, W.G., Champlin, R.E. (1991). Ganciclovir and intravenous immunoglobulin in bone marrow transplants. In: Gale, R.P., Champlin, R.E. (eds.). New strategies in bone marrow transplantation, Wiley-Liss., New York; 337-348.
- Winston, D.J., Ho, W.G., Lin, C.H., Bartoni, K., Budinger, M.D., Gale, R.P., Champlin, R.E. (1987). Intravenous immune globulin for prevention of cytomegalovirus infection and interstitial pneumonia after bone marrow transplantation. *Ann. Intern. Med.*; **106**:12-18.
- Winston, D.J., Pollard, R.B., Ho, W.G., Gallagher, J.G., Rasmussen, L.E., Huang, S.H., Lin, C.H., Gosset, T.G., Merigan, T.C., Gale, R.P. (1982). Cytomegalovirus immune plasma in bone marrow transplant recipients. *Ann. Intern. Med.*; **97**:11-18.
- Winston, P.J., Ho, W.G., Gale, R.P., Champlin, R.E. (1987). Treatment and prevention of interstitial pneumonia after bone marrow transplantation. In: Gale, R.P., Champlin, R.E. (eds.). Progress in bone marrow transplantation. Liss., New York; 525-544.
- Witzke, O., Winterhagen, T., Reinhardt, W., Heemann, U., Grosse-Wilde, H., Kreuzfelder, E., Roggendorf, M., Philipp, T. (1998). Comparison between subcutaneous and intravenous interleukin-2 treatment in HIV disease. *Journal of Internal Medicine*; **244(3)**: 235-240.
- Wolf, D.G., Yaniv, I., Honigman, A., Kassis, I., Schonfeld, T., Ashenazi, S. (1998). Early Emergence of Ganciclovir-Resistant Human Cytomegalovirus Strains in Children with Primary Combined Immunodeficiency. *The Journal of Infectious Diseases*; **178**: 535-538.
- Wood, R., Montoya, J.G., Kundu, S.K., Schwartz, D.H., Merigan, T.C. (1993). Safety and efficacy of polyethylene glycol-modified interleukin-2 and zidovudine in human immunodeficiency virus type 1 infection: A phase I / II study. *Journal of Infectious Diseases*; **167(3)**: 519-525.

- Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Philips, J.H., Lanier L.L. (2000). DAP 10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative receptor complexes in natural killer cells. *J. Exp. Med.*; **192**: 1059-1068.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B.H., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., Philips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*; **285**: 730-731.
- Wyatt, J.P., Saxton, J., Lee, R.S., Pinkerton, H. (1950). Generalized cytomegalic inclusion disease. *J. Pediatr.*; **36**: 271-294.
- X**in, Z., Tang, H., Ganea, D. (1994). Vasoactive intestinal peptide inhibits interleukin (IL)-2 and IL-4 production in murine thymocytes activated via the TCR / CD³⁺ complex. *J. Neuroimmunol.*; **54(1-2)**: 59-68.
- Xiong, X., Smith, J.L., Chen, M.S. (1997). Effect of incorporation of cidofovir into DNA by human cytomegalovirus DNA polymerase on DNA elongation. *Antimicrob. Agents Chemother.*; **41**: 594-599.
- Y**amashita, Y., Shimokata, K., Mizuno, S., Yamaguchi, H., Nishiyama, Y. (1993). Down-regulation of the surface expression of class I MHC antigens by human cytomegalovirus. *Virology*; **193**: 727-736.
- Yang, S.C., Grimm, E.A., Parkinson, D.R., Carinhas, J., Fry, K.D., Mendiguren-Rodriguez, A., Licciardello, J., Owen-Schaub, L.B., Hong, W.K., Roth, J.A. (1991). Clinical and immunomodulatory effects of combination immunotherapy with low-dose interleukin-2 and tumor necrosis factor alpha in patients with advanced non-small cell lung cancer: A phase I trial. *Cancer Res.*; **51(14)**: 3669-3676.
- Youle, M.S., Clabour, J., Gazzard, B., Chanas, A. (1988). Severe hypocalcaemia in AIDS patients treated with foscarnet and pentamidine. *Lancet*; **2**: 1455-1456.
- Yow, M.D., Demmler, G.J. (1992). Congenital cytomegalovirus disease - 20 years is long enough. *N. Engl. J. Med.*; **326**: 702-703.
- Z**hang, X.P., Kelemen, S.E., Eisen, H.J. (2000). Quantitative assessment of cell adhesion molecule gene expression in endomyocardial biopsy specimen from cardiac transplant recipients using competitive polymerase chain reaction. *Transplantation*; **70**: 505-513.
- Zhuravskaya, T., Maciejewskie, J.P., Netski, D.M., Bruening, E., Mackintosh, F.R., St. Jeor, S. (1997). Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: Model of HCMV latency. *Blood*; **90(6)**: 2482.

- Ziegler, L.D., Palazollo, P., Cunningham, J.A., Janus, M., Itoh, K., Hayakawa, K., Hellstrom, I., Hellstrom, K., Nicaise, C., Dennin, R. (1992). Phase I trial of murine monoclonal antibody L6 in combination with subcutaneous interleukin-2 in patients with advanced carcinoma of the breast, colorectum, and lung. *Journal of Clinical Oncology*; **10**: 1470-1478.
- Zigheboim, J., Gale, R.P., Kedar, E. (1976). Polymorphnuclear leukocyte Fc receptors in antibody-dependent cellular-cytotoxicity (ADCC). *Transp.*; **21**: 524-526.

8 Anhang

8.1 Kasuistik 1



Kasuistik der ersten bei einem Kind nachgewiesenen Multiresistenz nach PBSCT (WT-MR)

Ein elf Jahre alter Junge erhielt aufgrund ungünstiger Prognose nach AML-Rezidiv (AML-M4, zytogenetische Deletion 11q23, Hyperleukozytose, ZNS-Befall, Niereninsuffizienz, leukämische Retino- und Choroideopathie mit Glaskörperblutung) im Anschluss an eine myeloablative Therapie, trotz bestehender hCMV-DNAämie in Plasma und Leukozyten, eine HLA-identische PBSCT (Fremdspender). Bei positivem hCMV-Nachweis wurde routinemäßig anschließend mit PFA (3 x 50 mg / kg / d) therapiert. Nach 18 Tagen PFA-Therapie musste wegen beginnender Penisnekrose und Penisblutungen auf GCR (2 x 5 mg / kg / d) umgestellt werden. Am Tag +100 konnte parallel zum Anstieg der Viruslast um eine log-Stufe eine genotypische (A591 V) und phänotypische (ID₅₀: 29µm) GCV-Resistenz festgestellt werden. Daher wurde zur Behandlung einer neu aufgetretenen hCMV-Enzephalitis auf PFA umgestellt. Wegen eines hohen hCMV-DNA-Titers im Plasma wurde am Tag +107 eine Doppeltherapie mit GCV (2 x 5 mg / kg / d) und PFA (3 x 50 mg / kg / d) angestrebt. Am Tag +181 erfolgte aufgrund eines erneuten Virustiteranstieges und der Detektion weiterer UL97-Mutationen (C603 W, M460 I) die Verabreichung von CDV (5 mg / kg / Woche) für 2 Wochen. Trotzdem verbesserte sich die Situation nicht. Am Tag +195 betrug die Viruslast 10⁶ Genomäquivalente / ml (Limiting-dilution nested PCR), sodass mit CDV für weitere 3 Wochen weiterbehandelt wurde. 251 Tage nach PBSCT konnte schließlich ein Virusisolat (**WT-MR**) gewonnen werden, welches multiple UL54 Mutationen aufwies (D515E, L516M, I521T, L802M) und mit einer ID₅₀ von 551 µm / l für PFA nun auch für dieses Medikament resistent war. Da sich die hCMV-Enzephalitis verschlechterte, die Liquorproben jedoch mittels RFLP-Analyse keine UL97-Mutationen aufwiesen, wurde experimentell GCV intrathekal verabreicht (200 und 400 µg). Die Therapie versagte und der Patient verstarb nach einmonatigem Koma am Tag +287.

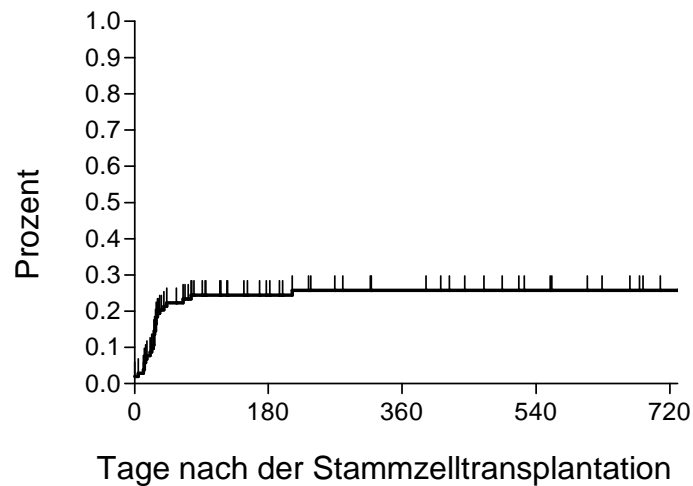
8.2 Kasuistik 2



Kasuistik der ersten bei einem Kind nachgewiesenen Ganciclovirresistenz nach PBSCT (WT-GR1)

Aufgrund zunehmender schwerer Infektionen (u.a. disseminierte hCMV-Infektionen nach bislang dreimaliger GCV-Induktionstherapie [2 x 5 mg / kg / d]) wurde bei einem 7-jährigen Jungen mit unklarem zellulären Immundefekt (T-Zell-Defekt und Agammaglobulinämie) im Anschluss an eine myeloablative Therapie, trotz bestehender hCMV-Leuko- und Plasma-DNAämie, eine haploidente PBSCT (Mutter als Spenderin) durchgeführt. Nachfolgend wurde aufgrund der myelotoxischen Eigenschaften von GCV 30 Tage mit PFA behandelt [3 x 40 mg / kg / d]. Um PFA als Reservevirustatikum einzusparen, stellte man schließlich auf GCV um (22 Tage Induktion mit 2 x 5 mg / kg / d sowie 12 Tage Erhaltungstherapie [5 mg / kg / d]). Am Tag 54 nach PBSCT konnte parallel zum Anstieg des hCMV-Plasmatiters um eine log-Stufe eine geno- und phänotypische GCV-Resistenz nachgewiesen werden: Die Medikamentenkonzentration, welche die virale Plaquebildung um 50 % hemmt (ID_{50}), betrug für dieses Virusisolat mit Resistenzmutation C→W603 (**WT-GR1**) für Ganciclovir 13 μm (Resistenz definiert als $ID_{50} \geq 4 \mu\text{m}$). Das Isolat erwies sich sensitiv gegenüber PFA (ID_{50} : 100 μm [Resistenz bei $ID_{50} \geq 400 \mu\text{m}$]). Da der Patient multiple Probleme aufwies, wurde klinisch die Resistenzentwicklung nicht bemerkt. Die Änderung des Therapieregimes (PFA: 3 x 40 mg / kg / d Induktions- und 1 x 40 mg / kg / d Erhaltungstherapie) führte zum schnellen Rückgang der Plasma-Viruslast. Dennoch verschlechterte sich der Zustand des Patienten, der 168 Tage nach PBSCT aufgrund einer pulmonalen Insuffizienz verstarb.

8.3 Kumulative Inzidenz der mittels PCR ermittelten hCMV-Virämie bei Patienten nach CD³⁴⁺-Stammzelltransplantation



Tab. 11: **Kumulative Inzidenz der hCMV-Virämie bei Patienten nach CD³⁴⁺-Stammzelltransplantation.** Die kumulative Inzidenz der mittels PCR von Leukozyten und Plasma detektierten hCMV-DNA (≥ 1 positiver PCR-Nachweis) von 107 Kindern nach CD³⁴⁺-Stammzelltransplantation in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen ergab am Tag 100 post-TX 29 %. Die Mediane Zeit des ersten hCMV-DNA-Nachweises betrug 25,5 Tage.

9 Publikationen

Aus dieser Arbeit gingen folgende Veröffentlichungen hervor:

Originalarbeiten

P. Lang, A. Griesinger, K. Hamprecht, T. Feuchtinger, M. Schumm, F. Neuhäuser, J. Greil, D. Martin, R. Handgretinger, D. Niethammer (2004) Antiviral activity against CMV-infected fibroblasts in pediatric patients transplanted with CD³⁴⁺-selected allografts from alternative donors. *Human Immunology*, 65, 423-431 (2004).

Kongressbeiträge

A. Griesinger, K. Hamprecht, A. Steinle, F. Speidel, F. Neuhäuser, M. Schumm, D. Niethammer, P. Lang. Antiviral activity of NK-cells from pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation against CMV-infected fibroblasts: impact of MHC I, ICAM 1, LFA 3 and NKG2D ligands. 34th Annual meeting of the German society of immunology, 2003. *Immunobiology* 2003, 208 (1-3), Poster O.32, S.169.

A. Griesinger, K. Hamprecht, M. Schumm, F. Speidel, D. Niethammer, P. Lang. Wildtype hCMV and AD-169 infected fibroblasts show various patterns of MHC class I downregulation and susceptibility to NK cell lysis. Annual meeting of the Gesellschaft für Virologie and joint meeting with 'Società italiana di virologia', Tübingen, 2004. Abstract Band 2004, S. 527.

10 Danksagung

Die experimentelle Grundlage der vorliegenden Arbeit wurde zwischen den Jahren 2001 und 2008 in der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland, und dem Institut für medizinische Virologie und Epidemiologie der Viruskrankheiten der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Deutschland, erarbeitet.

Mein Dank gilt all jenen, die sich für dieses Projekt begeistert haben und mich während des gesamten Entstehungsprozesses unterstützt haben. Meinen wissenschaftlichen Lehrern und Freunden Professor Dr. med. Peter Lang und PD Dr. med. Dr. rer. nat. Klaus Hamprecht für ihre weitreichende und anhaltende Unterstützung meiner wissenschaftlichen Laufbahn und die kritische Auseinandersetzung mit dem Thema. Darüber hinaus danke ich Dr. vet. Michael Schumm für seine fachlich präzisen und wissenschaftlich fundierten Ratschläge. Gleichmaßen bin ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 510) und der Reinhold Beitlich Stiftung für die Förderung der dargestellten Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt ferner den verschiedenen Kollegen für ihre zahlreichen Diskussionen und Anregungen im Laufe der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit. In besonderen möchte ich an dieser Stelle Anni Barbarin-Dorner, Andrea Baumeister, Elfriede Mikeler und Frieder Speidel hervorheben. Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, meinen Geschwistern Meike & Jürgen, meiner Oma Paula und meiner Freundin Sandra für ihre ermutigende Unterstützung und ihr anhaltendes Verständnis. Eure Liebe und Rückendeckung sind mir Inspiration und Zuflucht.

11 Lebenslauf

Name:	Andreas Griesinger
Geburtstag:	24.09.1977
Geburtsort:	Pforzheim
Familienstand:	ledig
Nationalität:	deutsch
Schulbildung:	
1984 - 1988	Grundschule Karl-Friedrich, Pforzheim-Eutingen
1988 - 1994	Realschule Konrad-Adenauer, Pforzheim (Mittlere Reife Juni 1994)
1994 - 1997	Gymnasium Fritz-Erler, Pforzheim (Abitur Juni 1997)
Zivildienst:	
Sept. 1997 bis Sept. 1998	Krankenhaus St. Trudpert Abteilung Urologischer OP
Studium:	
Okt. 1998	Humanmedizin an der Eberhard-Karl-Universität Tübingen
Aug. 2000	Ärztliche Vorprüfung
Aug. 2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sept. 2001 bis Juni 2005	Promotion in der Universitätskinderklinik Tübingen Abteilung Hämatologie und Onkologie bei PD Dr. med. Peter Lang
Aug. 2004	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2003 bis Okt. 2005	Praktisches Jahr im Kreiskrankenhaus Böblingen, Wahlfach Pädiatrie
29.11. 2005	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Studienbegleitende Tätigkeiten:	
Juli 2002 bis Juli 2003	Studentische Hilfskraft am Institut für Medizinische Virologie und Epidemiologie für Viruskrankheiten in Tübingen, Kursbetreuung (Virologie für Mediziner / Virologischer Kurs für Biologen)
Nov. 2002 bis Nov. 2003	Studentische Hilfskraft an der Universitätskinderklinik in Tübingen, Detektion zytostatika-stressaktivierter Gene in CD ³⁴⁺ -Stammzellen mittels Genchips aus isolierter RNA (Altanapharma)
Famulaturen:	
Feb. 2001 bis März 2001	Städtisches Klinikum Pforzheim, Abteilung Innere Medizin
Aug. 2002 bis Sept. 2002	Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen, Abteilung Kardiologie und Hämatologie & Onkologie
März 2003 bis April 2003	Mindanao Medical Center Philippinen, Ambulanz und Notaufnahme der Chirurgie, Inneren Medizin und Pädiatrie
Sept. 2003 bis Okt. 2003	Kinderarztpraxis Dr. Hubert Jauch in Pforzheim
Weiterbildung zum Facharzt:	
Seit Dez. 2005	Assistenzarzt im Klinikverbund Südwest, Klinikum Böblingen, Klinik für Kinder- und Jugendmedizin