

Simone Diesner

Dr. med.

## **Methodenentwicklung zum Nachweis Zytomegalievirus-spezifischer T-Zellen bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation**

Geboren am 13.06.1968 in Rehren A/O

3. Staatsexamen am 29.10.2003 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. Günther Schönrich

Immunsupprimierte Patienten nach Organtransplantationen stellen eine besondere Risikogruppe für das Auftreten von humanen Zytomegalievirus (HCMV)-Infektionen dar. Bei diesen Patienten gehen HCMV-Erkrankungen durch eine eingeschränkte Funktion des Immunsystems, insbesondere eine verzögerte Rekonstitution immunkompetenter T-Zellen mit schweren und lebensbedrohlichen Verläufen einher. HCMV-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) erkennen Virusantigen, das durch MHC-Klasse-I-Proteine auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Sie sind wesentlich an der Eliminierung virusinfizierter Zellen beteiligt und für den Schutz vor HCMV-Reaktivierungen verantwortlich. In vorliegender Arbeit sollte ein immunologisches *in vitro*-Testverfahren entwickelt werden, um besonders gefährdete stammzelltransplantierte Patienten mit fehlender oder eingeschränkter Abwehrfunktion HCMV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen identifizieren zu können. Fünf immunkompetente Blutspender und sechzehn Patienten mit allogener Stammzelltransplantation (PBSCT) nahmen an der Versuchsreihe teil. Aus peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurden Monozyten isoliert, die sich über einen Zeitraum von 7 Tagen mit GM-CSF und IL-4 zu dendritischen Zellen entwickelten. Basierend auf jüngsten Forschungsergebnissen, daß dendritische Zellen permissiv sind für das humane Zytomegalievirus und es bei Infektion dieser Zellen zu einer Präsentation von *endogenem* Virusantigen über den MHC-Klasse-I-Weg kommt, wurden reife dendritische Zellen mit einem klinischen HCMV-Isolat (NEWT) infiziert. Zu einem späteren Zeitpunkt sollte im T-Zell-Stimulationsversuch überprüft werden, ob infizierte DZ durch den Kontakt mit autologen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine spezifische Immunantwort bei HCMV-positiven Probanden oder Patienten induzieren. Die

Detektion und Untersuchung dieser IFN- $\gamma$  positiven HCMV-spezifischen CD8+ T-Zellen erfolgte mit Hilfe durchflußzytometrischer Analysen.

Ein wesentliches Problem der vorliegenden Untersuchungen stellte die eingeschränkte Anzahl mononukleärer Zellen im Patientenblut und deren Kultivierung zu dendritischen Zellen dar. Es wurde nach einer Möglichkeit gesucht, Patienten so wenig wie möglich durch zusätzliche und größere Blutentnahmen zu belasten.

Ausgehend von der Beobachtung, daß nach Stammzelltransplantation das HLA-System des Spenders im Organismus des Patienten eine Etablierung erfährt und somit das Prinzip des autologen Zellkontaktes bewahrt bleibt, wurden bei drei Patienten dendritische Zellen aus der Spender-Leukapherese isoliert, infiziert und für den späteren Stimulationsversuch durch Kryokonservierung bereitgestellt.

In allen Versuchsreihen mit HCMV-positiven Testpersonen stellte sich die Stimulationsfähigkeit HCMV-spezifischer CD8+ T-Zellen nur sehr eingeschränkt dar. Stimulationsversuche bei HCMV-seronegativen Probanden und Patienten zeigten sogar negative Testwerte und wiesen auf eine erhebliche Suppression der unspezifischen T-Zell-Aktivität (Hintergrundstimulation) hin. Diese Beobachtungen könnten vor allem durch die gezielten Immunevasionsmechanismen des Zytomegalievirus bedingt sein.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde dem Testverfahren mit *endogener* Viruspräsentation eine bereits etablierte Methode mit Kreuzpräsentation von Virusantigen (*exogene* Viruspräsentation) gegenübergestellt. Die Testwerte zeigten eine deutlich höhere Stimulation HCMV-spezifischer reaktiver CD8+ T-Zellen bei Kreuzpräsentation von Virusantigen und ließen vermuten, daß bei Präsentation von *exogenem* Virusantigen die Umgehung der viralen Immunevasionsmechanismen eine bedeutende Rolle spielt.

Zusammenfassend läßt sich erkennen, daß die Stimulationsergebnisse dieses Testverfahrens mit einer breiten Streuung einhergehen und eine statistische Auswertung aufgrund der niedrigen Fallzahlen nicht möglich ist. Eine Interpretation der Patienten-Testwerte und deren Korrelation mit klinischen Patientendaten konnte daher nur bedingt vorgenommen werden.

Ungeachtet der vorliegenden Untersuchungsergebnisse könnte antigenbeladenen bzw. infizierten dendritischen Zellen zukünftig eine zunehmende Bedeutung für diagnostische Zwecke zukommen. Auch therapeutisch zur Anreicherung HCMV-spezifischer CD8+ T-Zellen und zur Prophylaxe von HCMV-Komplikationen wäre ihr Einsatz denkbar. Könnte es gelingen, bei Infektion von dendritischen Zellen *in vitro*, die Immunevasionsmechanismen des Virus auszuschalten, wäre auch ein Testverfahren mit Präsentation von *endogenem* Virusantigen eine klinisch interessante und praktikable Methode zur Analyse einer HCMV-spezifischen T-Zell-Aktivität.