

Marina Alexandra Schwab

Dr. med.

Etablierung einer Methode zum Nachweis Zytomegalievirus-spezifischer T-Zellen

Geboren am 25.09.1974 in Karlsruhe

Reifeprüfung am 22.04.1994 in Athen, Griechenland

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1994/95 bis WS 2001/2

Physikum am 12.09.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 16.11.2001 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Hygiene

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. G. Schönrich

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) ist für die Transplantationsmedizin einer der bedeutsamsten Erreger. In Patienten mit eingeschränkter Funktion des Immunsystems, insbesondere nach allogener Blutstammzelltransplantation, kann es lebensbedrohliche Komplikationen auslösen. Die Eliminierung virusinfizierter körpereigener Zellen erfolgt durch HCMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen, die durch MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiertes HCMV-Antigen erkennen. Immunkompetente Träger sind deshalb vor schwerwiegenden HCMV-Erkrankungen geschützt, obwohl das Virus nach der Primärinfektion lebenslang im Organismus verbleibt und sporadisch reaktiviert werden kann. Dagegen verursacht in immunsupprimierten Patienten eine verzögerte Rekonstitution HCMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen das Auftreten von lebensbedrohlichen Komplikationen.

Zur Identifizierung besonders gefährdeter Patienten wurde daher in der vorliegenden Arbeit ein immunologisches Prüfverfahren entwickelt. Zu diesem Zweck wurden Leukozyten immunkompetenter HCMV-positiver und negativer Spender verwendet. Dieses Verfahren erlaubt es, die HCMV-spezifische Immunantwort der CD8⁺ T-Zellen von gesunden Spendern und Patienten *in vitro* zu überprüfen.

Prinzipiell beruht das Verfahren darauf, daß aus dem Spenderblut gleichzeitig Monozyten und T-Zellen isoliert werden. Während die T-Zellen vorerst in flüssigem Stickstoff gelagert werden, findet eine weitere *in vitro*-Kultivierung der Monozyten statt. Dabei wird ein Teil der

Monozyten mittels GM-CSF und Interferon- γ in stimulierte Makrophagen, die besonders empfänglich für eine HCMV-Infektion sind, verwandelt. Der andere Teil entwickelt sich währenddessen in Anwesenheit von GM-CSF und Interleukin-4 innerhalb weniger Tage in potente Antigen-präsentierende dendritische Zellen. Die stimulierten Makrophagen werden mit HCMV infiziert und einige Tage später in die Apoptose getrieben. Die in Membranen verpackten Trümmer der apoptotischen infizierten Makrophagen werden besonders gut von dendritischen Zellen aufgenommen. Normalerweise werden solche Antigene in den MHC-Klasse-II-Präsentationsweg eingeschleust und stimulieren dann nur CD4+ T-Zellen. Die Verpackung von Antigenen in apoptotische Trümmer bewirkt jedoch, daß auch MHC-Klasse-I-Moleküle mit viralen Epitopen assoziiert an die Zelloberfläche gelangen (Kreuzpräsentation). Auf diesem Weg werden auch CD8+ T-Zellen stimuliert.

Die Analyse der Immunantwort HCMV-spezifischer CD8+ T-Zellen, die durch den Kontakt mit HCMV-Antigen beladenen dendritischen Zellen *in vitro* induziert wird, erfolgt wenige Stunden später mit Hilfe durchflußzytometrischer Analysen des intrazellulär synthetisierten Interferon- γ .

In den seropositiven immunkompetenten Spendern bewegte sich der Anteil HCMV-spezifischer CD8+ T-Zellen zwischen 1.40%-11.39%. Auch in zwei von drei exemplarisch untersuchten HCMV-positiven Patienten nach allogener Blutstammzelltransplantation konnten reaktive Zellen nachgewiesen werden (0.82%, 11.06%). Dagegen konnten in allen HCMV-negativen Spendern sowie in einem HCMV-positiven Patienten keine HCMV-spezifischen CD8+ T-Zellen detektiert werden.

Autologe HCMV-Antigen-beladene dendritische Zellen könnten nicht nur für diagnostische Zwecke eingesetzt werden, sondern auch um die Zahl HCMV-spezifischer CD8+ T-Zellen in Patienten vor bzw. nach Transplantation zu amplifizieren. In diesem Sinne könnten HCMV-Antigen-beladene dendritische Zellen auch direkte Bedeutung erlangen in der Therapie und Prophylaxe von HCMV-Komplikationen.