

**Periphere T-Zellen bei Patienten nach Organtransplantation:
Die Transplantatschädigung und die Kontrolle der
Zytomegalievirusinfektion**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach
Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dr. med. Florian Kern

geboren am 24. Juli 1963
in Herrsching am Ammersee

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: Juni 2001
Tag des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 26.03.2002

Gutachter: 1) Prof. Dr. med. H.W. Doerr, Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
2) Prof. Dr. med. F. Emmrich, Universität Leipzig

Meiner Familie gewidmet

und

all denen,

die niemals namentlich in Erscheinung treten,

ohne deren Zutun aber

es keinen Fortschritt gäbe

Vorwort

Die vorliegende Schrift umfasst 9 Originalarbeiten. Die Arbeiten sind in der Folge ihres Erscheinens geordnet und im Literaturverzeichnis zu diesem Vorwort in der gleichen Reihenfolge nochmals mit aufgeführt [1-9]. Dies gilt auch für 3 beigefügte Übersichtsarbeiten [10-12]. Weiterhin umfasst das Literaturverzeichnis Publikationen anderer Gruppen, welche für die Entstehung der eigenen Arbeiten wegweisend oder besonders bedeutsam waren und deshalb in diesem Vorwort nochmals besondere Erwähnung finden. Diese werden in der Reihenfolge Ihrer Erwähnung aufgeführt (ab Referenz 13). Die für das Verständnis der Originalarbeiten darüber hinaus wesentliche Literatur ist in den jeweiligen Literaturverzeichnissen der Arbeiten zu finden.

1. Definition einer 'neuen' Effektor/Memory-Subpopulation von CD8-T-Zellen

Die ersten 4 Originalarbeiten [1-4] sind mit der phänotypischen und funktionellen Charakterisierung von peripheren T-Lymphozyten befasst. Bei Transplantationspatienten gibt die frühzeitige Erkennung einer Aktivierung von T-Zellen einen Hinweis auf das Auftreten immunologischer Komplikationen wie Transplantatschädigung oder Virusinfektion. Die Aktivierung von T-Lymphozyten kann durchflußzytometrisch erfasst werden. Dabei werden Antigene auf der Zelloberfläche oder intrazellulär mit fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Ausgangspunkt aller 3 Arbeiten war die Beobachtung einer Vielfalt CD4- und CD8-positiver T-Zellpopulationen im Hinblick auf die Expression von verschiedenen Oberflächenmolekülen wie beispielsweise von Aktivierungsantigenen, Adhäsionsmolekülen oder sogenannten Gedächtnis-Markern (Memory-Markern). Ziel der Forschung in Zusammenhang mit dem klinischen Monitoring war die Identifikation von Oberflächenantigenen oder Konstellationen davon, welche gestatteten, Aussagen über die Befindlichkeit des zellulären Immunsystems zu machen, um etwa aussagen zu können, ob es

mit einer viralen Infektion oder der Abstoßung des Transplantates beschäftigt war. Dabei spielte die Infektion mit dem Zytomegalievirus (CMV) eine besondere Rolle, da dieses bei Transplantationspatienten sehr häufig zu Komplikationen führt. Unser besonderes Augenmerk galt zunächst dem Marker LFA-1 (Leukozyten-Funktions-Antigen-1, CD11a/CD18), einem Adhäsionsmolekül aus der Gruppe der Integrine [1]. Die Expression dieses Oberflächenmoleküls war sehr auffällig, weil es (insbesondere auf CD8-T-Zellen) nur in genau 2 Ausprägungen vorzukommen schien, nämlich stark ('bright') oder schwach ('dim'). So zeigten sich in der Durchflußzytometrie in der Histogrammdarstellung von LFA-1 auf CD8-T-Zellen 2 deutlich getrennte Gipfel.

Die Feststellung dieser auffälligen Zweiteilung war Anlass, die Expression weiterer Marker auf den beiden durch die LFA-1-Expression definierten Subpopulationen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, daß die Expression der klassischen 'Memory'-Marker CD45RA und CD45RO auf T-Zellen (wiederum insbesondere auf CD8-T-Zellen) deutlich inhomogen war, denn in der LFA-1-bright-Population kamen sowohl CD45RA-stark-positive als auch -negative Zellen vor. Da LFA-1 nach allgemeiner Vorstellung nur auf solchen Zellen stark exprimiert war, welche bereits einmal Antigenkontakt gehabt hatten, also nicht mehr 'naiv' waren, CD45RA dagegen nur auf solchen Zellen, die noch keinen Antigenkontakt hatten, ergab sich hier ein klarer Widerspruch.

Ähnlich waren die Ergebnisse zu CD28, einem wichtigen kostimulatorischen Molekül auf T-Zellen. Auch hier gab es praktisch nur bei den Zellen mit hoher LFA-1-Expression CD28-positive und CD28-negative, alle CD8-T-Zellen mit schwacher LFA-1-Expression waren CD28-positiv. Azuma und Mitarbeiter hatten 1993 beschrieben, daß CD28-negative CD8-T-Zellen eine höhere LFA-1-Expression zeigten als CD28-positive, daß sie zytotoxisches Potential besaßen, ferner ihre Proliferation auf mitogene Reize stark vermindert und auch durch Zugabe von Interleukin-2 nicht zu steigern war [13]. Innerhalb der LFA-1-bright-Fraktion der CD8-T-Zellen gab es also offensichtlich mindestens 2 deutlich unterschiedliche Funktionszustände, die unterschiedlichen Phänotypen entsprachen. Entsprechend unseren Ergebnissen war die

im Mittel höhere Expression von LFA-1 auf CD28-negativen T-Zellen dadurch zu erklären, daß diese ausschließlich in der Fraktion mit hoher LFA-1-Expression vorkamen.

Ein weiterer interessanter Marker, CD57, verhielt sich nahezu umgekehrt zu CD28 [1]. Während in der LFA-1-dim-Population der CD8-T-Zellen ausschließlich CD57-negative Zellen zu finden waren, kamen in der LFA-1-bright-Population sowohl CD57-negative als auch -positive Zellen vor. CD57 war von großem Interesse beim Monitoring von Transplantationspatienten, weil eine auffällige Ausbreitung (Expansion) dieses Subsets nach Zytomegalievirusinfektion sowohl bei Gesunden [14] als auch bei Patienten nach Nierentransplantation beschrieben worden war [15]. Ferner war in unserer interdisziplinären Arbeitsgruppe beobachtet worden, daß auch klinisch asymptomatische CMV-Infektionen mit einer Funktionsverschlechterung der transplantierten Niere einhergehen können [16].

Es lag also nahe, die Expansion von CD57-positiven CD8-T-Zellen mit der Funktionsverschlechterung von Nierentransplantaten in Verbindung zu bringen. Dabei entwickelte sich in der Arbeitsgruppe die Hypothese, daß es sich bei diesen Zellen um aktivierte CD8-T-Zellen handelte, die nicht für den Transplantatspender spezifisch waren (möglicherweise aber für CMV), und, welche aufgrund Ihrer Oberflächenmoleküle (Adhäsionsmoleküle) befähigt waren, in das Transplantat einzuwandern und dort, ohne für dieses Gewebe eigentlich spezifisch zu sein, eine Gewebeschädigung herbeizuführen. Um einer Antwort auf diese Frage näher zu kommen, wurden die Untersuchungen durchgeführt, welche in *'The enigma of CD57+CD28- T-cell expansion – anergy or activation?'* beschrieben sind [2]. Zunächst wurde die Expression der Marker CD57 und CD28 im direkten Bezug zueinander auf CD8-T-Zellen untersucht. Durchflußzytometrische Analysen zeigten, dass die gleichzeitige Expression beider Marker auf CD8-T-Zellen nur zu einem sehr kleinen Prozentsatz (3%) vorkam. Nahezu alle CD57-positiven CD8-T-Zellen waren CD28-negativ (33%), während praktisch alle CD28-positiven CD8-T-Zellen CD57-negativ waren (49%). Nur etwa 15% der CD8-T-Zellen waren CD28- und CD57-negativ. Was zur Funktion der CD28-negativen CD8-T-

Zellen von Azuma bekannt war, sollte auch auf CD57-positive CD8-T-Zellen zutreffen, die im Wesentlichen als Subset der CD28-negativen CD8-T-Zellen zu betrachten sind.

Interessanterweise brachten einige Autoren die Expansion CD57-positiver/CD28-negativer CD8-T-Zellen, insbesondere bei HIV-Patienten, mit der Entwicklung von Anergie in Verbindung [17]. Dies geschah hauptsächlich aufgrund der Beobachtung, daß diese Zellen auf mitogene Reize nicht mehr proliferierten und nach wenigen Tagen in Kultur abstarben.

Um die funktionelle Kapazität dieser Zellen nun näher zu untersuchen, nahmen wir bei Nierentransplantationspatienten mit positivem immunzytologischem Nachweis einer CMV-Antigenämie (also dem Nachweis viraler Proteinsynthese in Zellen des peripheren Blutes) und deutlicher Expansion der CD57-positiven CD8-T-Zellen eine durchflußzytometrische Sortierung (FACS) der CD8-T-Zellen mit starker Expression von LFA-1 (bright) in die jeweiligen durch die Expression von CD28 und CD57 bestimmten Subsets vor. Die so gewonnenen CD28-positiven oder -negativen und CD57-positiven oder -negativen CD8-T-Zellen wurden dann vergleichend mittels einer semiquantitativen Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) auf Ihren Gehalt an Messenger-RNA (mRNA) für proinflammatorische Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor-alpha, Interferon-gamma, Interleukin-1-beta) und die Interleukin-2-Rezeptor-Alpha-Kette IL-2Rp55 untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass es keinen wesentlichen Unterschied zwischen den Subsets bezüglich der Genexpression der untersuchten Zytokine gab, wohl aber für IL-2Rp55. Dieses Molekül ist für die Vermittlung der proliferativen Effekte von Interleukin-2 wichtig, war aber nur in CD28-positiven Zellen exprimiert.

Dieses Ergebnis bestätigte also einerseits die Ergebnisse von Azuma (fehlende Proliferation auf mitogene Reize/Interleukin-2), stärkte aber andererseits die Zweifel, daß es sich bei den CD57-positiven/CD28-negativen CD8-T-Zellen um einen anergen Zelltyp handelte. Da auch bei Nierentransplantationspatienten ohne CMV-Antigenämie CD57-positive CD8-

T-Zellen zu beobachten waren (wenn auch in geringerer Quantität) war es von Interesse, derartige Untersuchungen zur Zytokin-mRNA an Patienten nach Nierentransplantation mit und ohne CMV-Antigenämie zu wiederholen und dabei das Spektrum an untersuchten Zytokinen zu erweitern [3]. Dabei zeigte sich zunächst, daß bei klinisch unauffälligen asymptomatischen Patienten nach Nierentransplantation bei gleicher Methodik in peripheren CD8-T-Zellen keine mRNA für proinflammatorische Zytokine nachzuweisen war. Eine weitere Differenzierung in CD8-T-Zell-Subsets war also hier nicht sinnvoll. Deshalb wurde eine Sortierung der CD8-T-Zellen in CD57-positive und CD57-negative Zellen nur bei Patienten mit positivem CMV-Antigennachweis durchgeführt. Ferner wurde nach der LFA-1-Expression (dim oder bright) sortiert. Zusätzlich zu den früher untersuchten Zytokinen wurde auch die Expression von Granzyme-A untersucht, einem sekretorischen Zytotoxizitätsfaktor, ferner die Expression von Interleukin-2, Interleukin-4, Interleukin-8 und Interleukin-10.

Das wichtigste Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass Zytokin-mRNA praktisch nur in Zellen mit hoher LFA-1-Expression zu finden war, und dies nur bei Patienten mit CMV-Antigenämie (also im Zustand der Aktivierung). Unterschiede in der Zytokin-Expression zwischen CD57-positiven und CD57-negativen CD8-T-Zellen wurden wie schon zuvor nicht gefunden und die früheren Ergebnisse hinsichtlich der Expression der Interleukin-2-Rezeptor-Alpha-Kette p55 [2] wurden im Prinzip bestätigt. Granzyme-A war in Zellen mit hoher LFA-1-Expression stärker exprimiert als in Zellen mit niedriger LFA-1-Expression und mRNA für Granzyme-A war auch bei gesunden Kontrollprobanden zu finden. Wenn auch die Level von Granzyme-A-mRNA bei den untersuchten Patienten etwas höher waren als bei Gesunden, so war der Unterschied in der Expression zwischen den genannten Subsets (LFA-1-bright und LFA-1-dim) bei den Patienten deutlich geringer.

Daraus entstand die Arbeitshypothese, dass die LFA-1-bright/CD57-positiven (CD28-negativen) CD8-T-Zellen, welche bei Patienten nach Nierentransplantation unter bestimmten Umständen expandieren, zwar einen terminal differenzierten Effektorotyp darstellten, aber mit einem (gegenüber

den CD8-T-Zellen mit geringer LFA-1-Expression) nur marginal gesteigerten zytotoxischen Potential [3]. Im Gegensatz zu den CD57-negativen/CD28-positiven CD8-T-zellen mit hoher LFA-1-Expression zeigte sich keine oder kaum Expression von IL-2Rp55, was die mangelnde Sensitivität dieser Zellen gegenüber IL-2 erklärte. Da die Expression von CD57 im Zusammenhang mit lange andauernder Stimulation bzw. Antigen-Persistenz steht [18], vermuteten wir, daß diese Zellen, insofern sie für CMV spezifisch waren, das Virus nicht erfolgreich eliminieren konnten, aber infolge der persistierenden Stimulation expandierten.

Zusätzlicher Aufschluß zur Bedeutung der CD57-positiven/CD28-negativen T-Zellen ergab sich aus funktionellen Untersuchungen an CD8-T-Zellen mit hoher LFA-1-Expression und hoher bzw. fehlender Expression von CD45RA (LFA-1-bright/CD45RA-bright bzw. LFA-1-bright/CD45RA-dim) [4]. Dabei wurde gezeigt, daß das CD8-T-Zell-Subset mit hoher Expression von LFA-1 und CD45RA weitgehend mit dem CD57-positiven bzw. dem CD28-negativen Subset überlappt (60% bzw. 70% Überlappung). Untersucht wurde weiter die Expression von CD45RA auf CD8-T-Zellen nach Aktivierung, die Neigung zu aktivierungs-induzierter Apoptose, die Größe und Granularität der Zellen, sowie ihre Perforin und Zytokin-Expression [4]. Es fand sich, daß dieses Subset eine höhere Perforin-Expression aufwies, einen höheren Anteil an CD57-positiven/CD28-negativen CD8-T-Zellen besaß und größer und granulärer war als das Subset mit hoher LFA-1- aber schwacher CD45RA-Expression.

Dies sprach ebenfalls eindeutig für einen aktivierten Effektor-Zell-Typ. Der zwischen der CMV-Infektion und der Expansion von CD57-positiven CD8-T-Zellen hergestellte Zusammenhang konnte aber letztlich nur indirekt belegt bzw. erklärt werden. Es bestand keine technische Möglichkeit, gleichzeitig die Spezifität von CD8-T-Zellen *und* ihren Phänotyp zu bestimmen, ohne die Zellen zu klonieren, was mit hoher Wahrscheinlichkeit zu kulturbedingten Artefakten und einem veränderten Phänotyp geführt hätte.

2. Die Entwicklung von Nachweissystemen für CMV-spezifische Effektor-T-Zellen und die durchflußzytometrische Epitopkartierung

Einen Durchbruch im Hinblick auf den Nachweis CMV-spezifischer CD4-T-Zellen erzielte 1997 die Arbeitsgruppe von Louis Picker in Dallas [19]. Ihnen war es gelungen, durch ex vivo-Stimulation von frisch isolierten peripheren mononukleären Zellen (PBMC) mit einem CMV-Lysat (aus infizierten Fibroblasten) und anschließender Detektion von intrazellulär angehäuften Zytokinen CMV-spezifische CD4-T-Zellen im peripheren Blut ‚sichtbar‘ zu machen. Dank der Möglichkeiten der modernen Mehrparameter-Durchflußzytometrie gelang es, gleichzeitig den Phänotyp dieser Zellen zu untersuchen.

Diese Publikation war ein echter Meilenstein, letztlich auch für die Untersuchung des Phänotyps CD8-positiver antigenspezifischer T-Zellen. Denn, basierend auf dem gleichen technischen Prinzip gelang es uns 1998, mittels synthetischer Peptide als Stimulanzen CMV-spezifische CD8-T-Zellen in gleicher Weise sichtbar zu machen [5]. Proteine kamen zur direkten CD8-T-Zell-Stimulation deshalb nicht in Frage, weil dazu die Präsentation von Peptiden auf MHC-I-Molekülen erforderlich war, die Phagozytose/Endozytose der zugegebenen Proteine aber im Wesentlichen nur zur Präsentation auf MHC-II-Molekülen führt [20].

Wir etablierten die neue Methode an einem Modell bestehend aus einem vom CMV-pp65-Protein abgeleiteten 15 Aminosäuren langen Peptid welches ein Epitop enthielt, das zytotoxische CD8-T-Zellen induzieren konnte und auf dem HLA-Molekül HLA-A2*0201 präsentiert wurde. Wir verwendeten ferner periphere mononukleäre Zellen (PBMC) einer CMV-seropositiven Blutspenderin, die HLA-A*0201-positiv war. Das eigentliche minimale CD8-T-Zell-Epitop war bekannt und laut Mark Wills in Cambridge 10 AS lang [21]. Da die meisten CD8-T-Zell-Epitope aber 9 AS Länge aufweisen [20], wurden 7 Peptide von jeweils 9 Aminosäuren Länge synthetisiert, welche mit jeweils 8 Aminosäuren Überlappung zwischen benachbarten Peptiden die gesamte

Länge von 15 AS abdeckten [5]. M. Wills hatte nicht versucht, das 10 AS lange Epitop weiter zu reduzieren.

Wir stimulierten die PBMC unserer Spenderin sowohl mit allen Peptiden auf einmal als auch mit den einzelnen Peptiden oder dem 15 AS langen Peptid allein. Es zeigte sich, daß die Mischung aus den 7 Peptiden zu einer deutlichen CD8-T-Zell-Stimulation führte, die in Analogie zu der von Waldrop beschriebenen Methode über den Nachweis von intrazellulärem Interferon-gamma erkennbar war. Dies fand sich aber bei nur genau einem der einzelnen Peptide wieder. Das 15 AS lange Peptid führte ebenfalls zur Stimulation. Dies wurde an weiteren geeigneten Probanden bestätigt.

Der gleiche Aufbau wurde für ein HLA-B7-präsentiertes Epitop aus dem gleichen Protein erfolgreich wiederholt. Damit war nicht nur gezeigt, daß diese Methode zur Untersuchung von CMV-spezifischen CD8-T-Zellen geeignet war, sondern darüber hinaus auch zur Identifikation von CD8-T-Zell-Epitopen.

Dieses Verfahren wurde in der nachfolgenden Zeit eingesetzt, um einerseits den Phänotyp und die Frequenz von CMV-spezifischen CD8-T-Zellen bei gesunden CMV-positiven Personen und bei verschiedenen Patientengruppen zu bestimmen [6], andererseits, um die Rolle eines weiteren CMV-Proteins, des IE-1 oder 'Major Immediate Early' Proteins für die T-Zell-Antwort zu analysieren und dabei neue Epitope zu kartieren [7].

Was den Phänotyp betraf, zeigte sich, daß tatsächlich ein Großteil der CMV-spezifischen auf die Stimulation mit Peptiden reagierenden CD8-T-Zellen einen CD57-positiven Phänotyp aufwies. Im Mittel (Median) waren 75% der IFN-gamma-positiven und 77% der TNF-alpha-positiven CMV-spezifischen CD8-T-Zellen CD57-positiv. Vergleichbare Verteilungen fanden sich bei Patienten nach Nierentransplantation [6]. Damit hatte sich unsere Arbeitshypothese zumindest zum Teil bestätigt. Außerdem zeigte sich, daß sowohl CD45RO-positive CD8-T-Zellen (überwiegend CD45RA-negativ oder

-schwach) als auch CD45RO-negative CD8-T-Zellen (überwiegend CD45RA-positiv) zu dieser Effektor-Zytokinsynthese beitragen.

Die Frequenzen der CMV-spezifischen CD8-T-Zellen lagen, wie schon zuvor bemerkt [5] überraschend hoch, zum Teil im Bereich von Prozenten, wurden aber in dieser Größenordnung noch vielfach bestätigt [8, 9]. Auch die von Waldrop et al. 1997 beschriebenen Frequenzen von CD4-positiven CMV-spezifischen T-Zellen lagen in dieser Größenordnung [19]. Der Unterschied zu den CD8-T-Zellen war aber, daß zur Stimulation von CD4-T-Zellen virale Lysate eingesetzt worden waren, bei den CD8-T-Zellen dagegen einzelne Peptide aus einzelnen ausgewählten Proteinen. So war nicht ausgeschlossen, daß die Frequenzen gegen CMV als Ganzes bei den CD8-T-Zellen noch wesentlich höher liegen könnten.

Schließlich konnten die Frequenzen gegen CMV-gerichteter CD8-T-Zellen in ihrer Größenordnung auch mit der neu entwickelten 'Tetramer'-Technologie bestätigt werden. Dabei werden rekombinant hergestellte MHC-I-Moleküle mit Peptiden komplexiert und biotinyliert und anschließend an fluoreszenzmarkierte Streptavidin-Moleküle gebunden. Da am Streptavidin 4 Bindungsstellen für Biotin existieren, entstehen tetramere Komplexe. Diese können dann mit ausreichender Avidität direkt an die T-Zellen mit der entsprechenden Spezifität binden und sie so mit einem Fluorochrom markieren. Die Auswertung erfolgt ebenfalls durchflußzytometrisch. Diese elegante Technik wurde erstmals 1996 von J. Altman beschrieben [22]. Solche Tetramere stehen aber bis heute nur begrenzt zur Verfügung. Ein Vorteil dieser Technik ist, dass antigenspezifische T-Zellen unabhängig von Ihrer Funktion angefärbt werden können, ein Nachteil, dass über ihre Funktion eben nichts ausgesagt wird. Ferner müssen bereits Epitope und die dazu gehörigen HLA-Moleküle bekannt sein, damit man entsprechende Tetramere herstellen kann. Das Tetramer für HLA-A*0201/NLVPMVATV (ein Peptid aus dem CMV-pp65-Protein) wurde uns dankenswerterweise von Immunotech/Marseille über Prof. Jan Gratama in Rotterdam zu Verfügung gestellt. Die damit gemessenen Frequenzen CMV-spezifischer CD8-T-Zellen entsprachen fast genau

den Frequenzen, die wir über die CD8-T-Zellstimulation ermittelt hatten (eigene noch unveröffentlichte Daten).

Die T-Zellstimulation nach unserer Methodik mit Peptiden und die Anfärbung der spezifischen T-Zellen mit Tetrameren ergänzen sich indessen bestens. So kann zum Beispiel die Reaktivität peripherer T-Zellen einer bestimmten gegebenen Spezifität getestet werden, und man kann dabei genau zeigen, welcher Anteil dieser Zellen Zytokine produziert und welcher nicht. Appay und Mitarbeiter konnten dank der Kombination beider Methoden zeigen, daß die bei HIV-Patienten zirkulierenden HIV-spezifischen T-Zellen, obwohl sie zur Synthese proinflammatorischer Zytokine fähig waren, deutlich weniger Perforin enthielten als die CMV-spezifischen T-Zellen [23].

Unsere Entdeckung, dass das IE-1-Protein des humanen CMV eine erhebliche Rolle als T-Zell-Antigen spielte, war eigentlich nicht so überraschend [7]. Zum einen waren Proteine aus der analogen IE-Region des murinen CMV-Genoms (MCMV) schon viel früher im Maus-System als Antigen beschrieben worden [24] und zum anderen hatte bereits 1991 Nicholas Alp beschrieben, dass auch im humanen System das CMV-IE-1 Protein von T-Zellen erkannt wurde [25]. Niemand hatte jedoch einen wirklich systematischen, dem Stand der Technik entsprechenden Versuch unternommen, im humanen CMV nach Epitopen im IE-1-Protein zu suchen. In unserer Arbeitsgruppe wurden mehrere neue Epitope definiert, darunter beispielsweise eines, welches im Zusammenhang mit HLA-B7 präsentiert wird, und ein weiteres, welches im Zusammenhang mit HLA-B8 und/oder HLA-A1 zur Präsentation kommt. Die entscheidende Entdeckung dabei war vielleicht, daß einige Personen eine starke T-Zellantwort gegen das IE-Protein haben, aber kaum eine Antwort gegen das pp65-Protein und umgekehrt. Die von Mark Wills postulierte Dominanz von pp65 für die zytotoxische T-Zellantwort [21] war damit in Frage gestellt.

3. Der Einsatz von Peptidpools (Peptidbibliotheken) zur Charakterisierung der T-Zellantwort gegen komplette virale Proteine

Um die CD8-T-Zell Antwort gegen das humane CMV zu untersuchen lag immer noch kein den Möglichkeiten bei den CD4-T-Zellen vergleichbares System vor, da dort ganze Proteine oder Gemische daraus als Antigen eingesetzt werden konnten, bei den CD8-T-Zellen aber nur einzelne Peptide. Erst die Zusammenstellung und Testung komplexer Peptidgemische, welche in ihrer Gesamtheit die komplette Aminosäuresequenz eines ganzen Proteins repräsentierten, änderte diese Situation ein wenig [8]. Dabei stellten wir komplexe Mischungen für das pp65-Protein (138 Peptide von 15 Aminosäuren Länge) und das IE-1-Protein (120 Peptide von 15 Aminosäuren Länge) her. Die Überlappung zwischen den benachbarten Peptiden betrug bei den ersten Mischungen mindestens 9 Aminosäuren, bei späteren Mischungen wenigstens 11 Aminosäuren. Die Länge der Überlappungen war entscheidend dafür, daß keine möglichen Epitope unberücksichtigt blieben. Dazu musste die Überlappung mindestens der Epitoplänge abzüglich einer Aminosäure entsprechen [8]. Da aber bei CD4-T-Zellen die Epitope etwas länger sein können als bei CD8-T-Zellen, ist eine Überlappung von 11 Aminosäuren zu bevorzugen. Der Einsatz dieser komplexen Gemische eignete sich zur Messung von CD8-Zell-Antworten gegen ganze Proteine, wobei die Summe der Frequenzen gegen einzelne Peptide gerichteter CD8-T-Zellen praktisch gleich der Frequenz der gegen die Mischung als ganzes gerichteten CD8-T-Zellen war [8]. Aufgrund der Beschaffenheit der verwendeten Peptide (Länge und Überlappung) galt das Gleiche für CD4-T-Zellen entsprechend (Manuskript eingereicht). Weiterhin brauchte man den HLA-Typ der untersuchten Patienten/Probanden nicht zu kennen bzw. zu berücksichtigen, um die Antwort quantitativ und phänotypisch analysieren zu können. Damit hatten wir ein ideales Mittel gefunden, um beispielsweise bei Patienten nach Organtransplantation die CD8- und CD4-T-Zell-Antwort gegen CMV auf der Ebene zweier kompletter CMV-Proteine und im Verlauf über mehrere Monate zu untersuchen (Manuskript in Vorbereitung). Eine Korrelation dieser Daten mit der CMV-Viruslast soll Aufschluß geben, ob sich

CMV-induzierte Komplikationen über ein solches Monitoring vorhersagen lassen. Diese Möglichkeit wird unter anderem in den Übersichtsarbeiten weiter diskutiert [10-12].

Schließlich wurde dieses neue Testsystem auch auf das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) übertragen [9]. Dazu wurden 95 bekannte CD8-T-Zell-Epitope aus verschiedenen HIV-Proteinen ausgewählt und die entsprechenden Peptide wurden synthetisiert. Dabei bestätigte sich die zuvor bereits gewonnene Erkenntnis [7], dass eine Person, die einen bestimmten HLA-Typ besitzt, nicht notwendigerweise eine erkennbare T-Zell-Antwort gegen ein bekanntes, auf diesem HLA-Molekül präsentiertes, Peptid besitzen muss. Zum Beispiel wird das aus dem HIV-Gag-Protein stammende Peptid SLYNTVATL auf HLA-A*0201 präsentiert. Nicht alle HLA-A*0201- und HIV-positiven Patienten besitzen indes eine T-Zell-Reaktivität dagegen [9]. Das gleiche war für das aus dem CMV-pp65-Protein stammende und ebenfalls auf HLA-A*0201 präsentierte Peptid NLVPMVATV zu beobachten. Bei einigen HLA-A*0201-positiven Probanden existierte eine dominante CD8-T-Zell-Antwort dagegen, bei anderen war sie kaum erkennbar und es gab eine viel stärkere Antwort gegen ein anderes Epitop [7]. Eine wichtige Erkenntnis war, dass die Reaktivität gegen ein bestimmtes Epitop zwar aus dem HLA-Typ mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit abgeleitet, aber im Einzelfall nicht sicher vorhergesagt werden kann [8, 9]. An einem Beispiel erklärt heißt das, dass die meisten CMV-positiven HLA-A*0201-positiven Probanden eine deutliche T-Zell-Antwort gegen HLA-A*0201 besitzen werden, dass aber einzelne ohne eine solche Antwort darunter sein können. Mit anderen Worten, die Messung der Reaktivität gegen ein einzelnes Epitop ist kein brauchbares Surrogat für die Messung der Reaktivität gegen ein ganzes Virus. Dies unterstreicht einerseits die Bedeutung der Verwendung komplexer Peptidmischungen zur Stimulation, um alle in einem Protein vorhandenen Epitope zu testen, andererseits die Wichtigkeit der Einbeziehung nicht nur eines Proteins in derartige Untersuchungen.

4. Ausblick

Derzeit arbeiten wir an einem Projekt (DFG Forschergruppe, FOR 299), welches zum Ziel hat, alle für die T-Zell-Antwort gegen CMV wichtigen Proteine zu identifizieren. Mit etwa 200 ORFs (open reading frames = offene Leserahmen) verfügt dieses große Virus über eine Vielzahl von Proteinen, welche als Zielstrukturen von T-Zellen in Frage kommen. Dabei werden mittels halbautomatischer hochparalleler Spotsynthese (Synthese an einem festen Zelluloseträger) Peptidbibliotheken für alle CMV-Proteine hergestellt und an CMV-positiven Spendern zur T-Zellstimulation in Analogie zu den beschriebenen Mischungen für das pp65- und das IE-1-Protein eingesetzt. Erst die Identifikation aller relevanten Zielstrukturen wird uns ermöglichen, die Anzahl der CMV-spezifischen CD8-T-Zellen realistisch abzuschätzen. Auch bei den CD4-T-Zellen existieren Zweifel, ob die Verwendung viraler Lysate zur Stimulation alle CMV-spezifischen CD4-T-Zellen erfassen kann, da diese Lysate lediglich die zu einer bestimmten Zeit in einer CMV-infizierten Fibroblastenkultur (also nur in einem Zelltyp) exprimierten Proteine erfasst. Die Bestimmung aller für die CD4-T-Zellantwort gegen CMV wichtigen Proteine könnte diese Frage klären.

Ein durch das Immune Tolerance Network in Chicago (University of Chicago/National Institutes of Health) gefördertes Projekt wird untersuchen, wie sich Immuntoleranz-Induktions-Protokolle auf die T-Zellantwort gegen CMV auswirken (am Beispiel des pp65 und des IE-1-Proteins). Zusätzliche interdisziplinäre Studien an der Charité und am Herzzentrum untersuchen ebenfalls das Wechselspiel zwischen Immunsuppression (unter besonderer Berücksichtigung von Toleranzinduktionsprotokollen), T-Zellantwort und CMV. Alle erwähnten Studien werden von der Identifizierung neuer relevanter T-Zell-Zielstrukturen des humanen CMV profitieren.

Institut für Medizinische Immunologie

Campus Charité Mitte

Juni 2001

Literaturverzeichnis

(1.-9. = eigene Originalarbeiten; 9.-12. = eigene Reviews; ab 13. = Arbeiten anderer Gruppen)

1. **Kern F**, Docke WD, Reinke P, Volk HD. Discordant expression of LFA-1, VLA-4alpha, VLA-beta 1, CD45RO and CD28 on T-cell subsets: evidence for multiple subsets of 'memory' T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 1994;104:17-26.
2. **Kern F**, Ode-Hakim S, Vogt K, Hoflich C, Reinke P, Volk HD. The enigma of CD57+CD28- T cell expansion--anergy or activation? *Clin Exp Immunol* 1996;104:180-4.
3. **Kern F**, Ode-Hakim S, Nugel H, Vogt K, Volk HD, Reinke P. Peripheral T cell activation in long-term renal transplant patients: concordant upregulation of adhesion molecules and cytokine gene transcription. *J Am Soc Nephrol* 1996;7:2476-82.
4. Hoflich C, Docke WD, Busch A, **Kern F**, Volk HD. CD45RA(bright)/CD11a(bright) CD8+ T cells: effector T cells. *Int Immunol* 1998;10:1837-45.
5. **Kern F**, Surel IP, Brock C, Freistedt B, Radtke H, Scheffold A, Blasczyk R, Reinke P, Schneider-Mergener J, Radbruch A, Walden P, Volk HD. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 1998;4:975-8.
6. **Kern F**, Khatamzas E, Surel I, Frommel C, Reinke P, Waldrop SL, Picker LJ, Volk HD. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol* 1999;29:2908-15.
7. **Kern F**, Surel IP, Faulhaber N, Frommel C, Schneider-Mergener J, Schonemann C, Reinke P, Volk HD. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* 1999;73:8179-84.

8. **Kern F**, Faulhaber N, Frommel C, Khatamzas E, Prosch S, Schonemann C, Kretzschmar I, Volkmer-Engert R, Volk HD, Reinke P. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 2000;30:1676-82.
9. Betts MR, Casazza JP, Patterson BA, Waldrop S, Trigona W, Fu TM, **Kern F**, Picker LJ, Koup RA. Putative immunodominant human immunodeficiency virus-specific CD8(+) T-cell responses cannot be predicted by major histocompatibility complex class I haplotype. *J Virol* 2000;74:9144-51.
10. **Kern F**, Faulhaber N, Khatamzas E, Frommel C, Ewert R, Prosch S, Volk H, Reinke P. Measurement of anti-human cytomegalovirus T cell reactivity in transplant recipients and its potential clinical use: a mini-review. *Intervirology* 1999;42:322-4.
11. Reinke P, Prosch S, **Kern F**, Volk HD. Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transplant Infectious Disease* 1999;1:157-164
12. Scheffold A, **Kern F**. Recent developments in flow cytometry. *J Clin Immunol* 2000;20:400-7.
13. Azuma M, Phillips JH, Lanier LL. CD28- T lymphocytes. Antigenic and functional properties. *J Immunol* 1993;150:1147-59.
14. Gratama JW, Kluin-Nelemans HC, Langelaar RA, den Ottolander GJ, Stijnen T, D'Amaro J, Torensma R, Tanke HJ. Flow cytometric and morphologic studies of HNK1+ (Leu 7+) lymphocytes in relation to cytomegalovirus carrier status. *Clin Exp Immunol* 1988;74:190-5.
15. Labalette M, Salez F, Pruvot FR, Noel C, Dessaint JP. CD8 lymphocytosis in primary cytomegalovirus (CMV) infection of allograft recipients: expansion of an uncommon CD8+ CD57- subset and its progressive replacement by CD8+ CD57+ T cells. *Clin Exp Immunol* 1994;95:465-71.

16. Reinke P, Fietze E, Ode-Hakim S, Prosch S, Lippert J, Ewert R, Volk HD. Late-acute renal allograft rejection and symptomless cytomegalovirus infection. *Lancet* 1994;344:1737-8.
17. Borthwick NJ, Bofill M, Gombert WM, Akbar AN, Medina E, Sagawa K, Lipman MC, Johnson MA, Janossy G. Lymphocyte activation in HIV-1 infection. II. Functional defects of CD28- T cells. *Aids* 1994;8:431-41.
18. d'Angeac AD, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Reme T, Salmon M. CD57+ T lymphocytes are derived from CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J Immunol* 1994;24:1503-11.
19. Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest* 1997;99:1739-50.
20. Rammensee HG, Bachmann J, Stefanovic S. MHC Ligands and binding motifs Georgetown, Texas: Landes Bioscience, 1997
21. Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, Jin X, Weekes MP, Plachter B, Sissons JG. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 1996;70:7569-79.
22. Altman JD, Moss PAH, Goulder PJR, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [published erratum appears in *Science* 1998 Jun 19;280(5371):1821]. *Science* 1996;274:94-6

23. Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med* 2000;192:63-75.
24. Koszinowski UH, Keil GM, Schwarz H, Schickedanz J, Reddehase MJ. A nonstructural polypeptide encoded by immediate-early transcription unit 1 of murine cytomegalovirus is recognized by cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med* 1987;166:289-94.
25. Alp NJ, Allport TD, Van Zanten J, Rodgers B, Sissons JG, Borysiewicz LK. Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early 1 protein. *J Virol* 1991;65:4812-20.

Danksagung

Viele Personen haben auf sehr unterschiedliche Weise zur Entstehung der hier zusammengestellten Arbeiten beigetragen.

Ohne die Zusammenarbeit mit Frau Professor Petra Reinke am Anfang meiner Zeit an der Charité, als Arzt im Praktikum, hätte ich mich vielleicht nie für die Organtransplantation und das Zytomegalievirus interessiert, und ohne die anschließende Zeit bei Herrn Professor Hans-Dieter Volk im Institut für Medizinische Immunologie wäre niemals eine Forschungsrichtung für mich daraus geworden. Beiden möchte ich für die andauernde Zusammenarbeit seit meinem Beginn an der Charite danken, für die wichtigen Anregungen einerseits und die gewährte Freiheit andererseits.

Ich danke auch den Kollegen und Kolleginnen am Institut für Medizinische Immunologie für Ihre Hilfsbereitschaft und viele fruchtbare Diskussionen. Dies gilt auch für unsere technischen Mitarbeiter, ohne deren große Versiertheit und Selbständigkeit vieles sehr viel schwieriger gewesen wäre.

Weiterhin möchte ich meinen Kooperationspartnern in den letzten Jahren danken, darunter besonders Herrn Dr. Louis Picker, Herrn Dr. Rudolf Volkmer-Engert und Frau Dr. Constanze Schönemann.

Herrn Professor Peter Walden sei besonderer Dank für seinen Rat in Fragen der Peptidpräsentation und der Durchführung von Zytotoxizitätstests.

Ohne den teilweise unermüdlichen Einsatz meiner Doktoranden wären viele Projekte unverwirklicht geblieben: Antje Rosenbach, Elham Khatamzas, Ingolf Surel, Claudia Frömmel, Nicole Faulhaber, Felix Kiecker, Torsten Bunde, Lydia Tesfa und Bodo Hoffmeister.

Einer Person möchte ich aber ganz besonders danken: meiner Frau Christina. Ihre Unterstützung war und bleibt für mich unersetzlich.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- dem Bewerber die geltende Habilitationsordnung bekannt ist,

Berlin, den 20.6.2001

Florian Kern