

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

**Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-  
Molekülen auf HCMV-infizierten Zellen in  
vivo.**

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

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

**vorgelegt von  
Florin Felicia Gabor  
aus  
Reutlingen  
2002**

Dekan:	Professor Dr. C.D. Claussen
1. Berichterstatter:	Professor Dr. G. Jahn
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. H. Hebart

*Meinen Großeltern gewidmet.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b> .....	5
1.1 Allgemeines über HCMV.....	5
1.2 Pathogenese der HCMV-Infektion.....	6
1.3 Bedeutung des Immunstatus für HCMV-Erkrankungen.....	10
1.4 Immunevasion von HCMV.....	12
1.5 MHC-Klasse-I-Down-Regulierung bei Viren.....	15
<b>2 Fragestellung</b> .....	18
<b>3 Material und Methoden</b> .....	20
3.1 Gewebeschnitte.....	20
3.2 Antikörper.....	20
3.3 Materialien.....	22
3.4 Immunhistochemie.....	22
3.4.1 Gewebepreparation.....	22
3.4.2 Immunhistochemische Einfachfärbung.....	23
3.4.3 Immunhistochemische Doppelfärbung.....	25
3.5 Dokumentation und Auswertung.....	27
<b>4 Ergebnisse</b> .....	29
4.1 HCMV-infizierte Zellen weisen eine deutlich reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf.....	30
4.2 Eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Expression ist in allen Phasen der viralen Replikation nachweisbar, bleibt jedoch teilweise inkomplett.....	37
4.3 Trotz MHC-Klasse-I-Down-Regulierung ist eine inflammatorische Antwort auf HCMV-infizierte Zellen nachweisbar.....	39
4.4 Die Immunreaktion scheint zu einer Begrenzung der HCMV-Infektion im Gewebe zu führen.....	49
<b>5 Diskussion</b> .....	52
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	62
<b>7 Literaturverzeichnis</b> .....	63
<b>8 Danksagung</b> .....	77
<b>9 Lebenslauf</b> .....	78

# 1 Einleitung

## 1.1 Allgemeines über HCMV

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist ein  $\beta$ -Herpesvirus mit strenger Wirtsspezifität, das im menschlichen Organismus eine akute Infektion mit nachfolgender lebenslanger Persistenz des Erregers verursacht. Aus dem Latenzstadium können endogene Reaktivierungen erfolgen (Alford & Britt, 1990, Pass, 2001). Die HCMV-Übertragung geschieht intrauterin, auf hämatogenem Weg oder über Körpersekrete wie Muttermilch, Speichel, Urin und Sekrete aus dem Genitalbereich (Pass, 2001). Die HCMV-Infektion ist weltweit verbreitet. Die Prävalenz steigt stetig nach der Kindheit an. In entwickelten Ländern sind 10 - 20 % aller Kinder sowie 40 – 100 % aller Erwachsener HCMV-seropositiv (de Jong et al., 1998). In Entwicklungsländern und in den unteren sozialen Schichten der entwickelten Länder ist die Durchseuchung mit HCMV höher (de Jong et al., 1998, Pass, 2001).

Während HCMV beim Immunkompetenten zu einer milden Infektion führt (Rinaldo, 1990), die häufig einen mononukleoseartigen Verlauf nimmt (Pass, 2001), verursacht HCMV klinisch schwere und fatale Krankheitsverläufe in immunkompromittierten und immunsupprimierten Patienten, wie Organtransplantat- und Knochenmark-Empfängern oder AIDS-Patienten (Drew & Mintz, 1984, Ho, 1982, Ho, 1990). Die bei diesen Patienten häufigsten Krankheitsbilder sind eine HCMV-Retinitis (Freeman et al., 1987, Heinemann, 1992, Jabs et al., 1989), -Hepatitis (Barkholt et al., 1994, Paya et al., 1989) und -Pneumonie (Ettinger et al., 1993, Heurlin et al., 1991, Ljungman et al., 1994) sowie gastro-intestinale Erosionen und Ulzera (Goodgame, 1993, Hackman et al., 1994, Kaplan et al., 1989, Sinzger et al., 1993b). Schwere Krankheitsverläufe sind darüber hinaus bei Kindern bekannt, die intrauterin infiziert wurden (Alford & Britt, 1990, Jahn et al., 1988). Bei diesen kommt es zu einem Multiorganbefall, bei dem ein Mikrozephalus, eine Hepatosplenomegalie, Petechien sowie Entwicklungsstörungen im Vordergrund stehen (Arvin, 1997, Modrow & Falke, 1997, Pass, 2001). Oft besteht auch eine Assoziation zwischen der HCMV-Infektion und anderen opportunistischen Erregern,

wie *Pneumocystis carinii* und *Aspergillus*. Dies ist eine mögliche Erklärung, weshalb bei der HCMV-Pneumonie oft nur ein begrenzter Erfolg der antiviralen Therapie zu verzeichnen ist, da HCMV in diesen Fällen bloß sekundär an der Entstehung der Pneumonie beteiligt ist (Heurlin et al., 1991, Reis et al., 1995).

Therapeutisch stehen verschiedene antivirale Agentien zur Verfügung, insbesondere Ganciclovir (Einsele et al., 1993, Goodrich et al., 1993, Hebart & Einsele, 1998, Sinzger et al., 1993b, Winston et al., 1993) und Foscarnet (Hebart & Einsele, 1998, Ippoliti et al., 1997, Reusser et al., 1992). Eine antivirale Therapie mit Ganciclovir führt zur Besserung der klinischen Symptomatik sowie zur effektiven Suppression der viralen Replikation (Einsele et al., 1991). Eine präemptive Therapie reduziert die HCMV-Inzidenz nach Knochenmark-Transplantation (Einsele et al., 1993, Goodrich et al., 1993, Winston et al., 1993), vor allem die frühe HCMV-Erkrankung (Einsele et al., 1993). Mit fortschreitender Dauer der antiviralen Therapie steigt das Risiko jedoch signifikant an, an einer späten HCMV-Erkrankung sowie an sekundären nicht viralen Infektionen zu erkranken (Einsele et al., 1993), begünstigt durch eine Neutropenie (Goodrich et al., 1993, Winston et al., 1993). Als weiteres Therapiekonzept wurde über erste Erfahrungen einer adoptiven Immuntherapie mit CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten berichtet, wonach viruspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgreich transfundiert werden können und eine passagere antivirale Immunität gegen HCMV im Empfänger-Organismus vermitteln (Riddell & Greenberg, 1994, Riddell & Greenberg, 1995, Riddell et al., 1992, Walter et al., 1995).

## **1.2 Pathogenese der HCMV-Infektion**

Die Pathogenese der HCMV-Infektion erklärt sich aus der Biologie dieses Virus, insbesondere durch den Replikationsverlauf, den Zelltropismus und die Interaktion mit dem Immunsystem.

Es gibt drei Phasen des viralen Replikations-Zyklus: 2-6 Stunden nach der Infektion werden sehr frühe (IE) Proteine gebildet (Jahn et al., 1984, Mocarski & Courcelle, 2001), die überwiegend als Transaktivatoren viraler und zellulärer Gene wirken. Nach 6-24 Stunden kommt es zur Expression der frühen (E) Proteine, die hauptsächlich als Enzyme und Co-Faktoren an der viralen DNA-Replikation beteiligt sind (Mocarski & Courcelle, 2001). Nach der Replikation der viralen DNA werden

späte (L) Proteine produziert (Mocarski & Courcelle, 2001), die als Struktur-Proteine das Virus-Kapsid aufbauen. Der Replikationszyklus von HCMV verläuft produktiv mit der Freisetzung neuer Viruspartikel, wobei die infizierte Zelle zerstört wird (Mocarski & Courcelle, 2001).

Die Übertragung von HCMV erfolgt über unterschiedliche Wege, so zum Beispiel durch infizierte Körpersekrete, diaplazentar oder hämatogen im Rahmen von Bluttransfusionen (Pass, 2001), wobei die Übertragung entweder durch freie oder durch zellassozierte Viren stattfindet (Alford & Britt, 1993). Bei der zellassozierten Übertragung kommt infizierten Epithelzellen (Dworsky et al., 1983, Reynolds et al., 1973, Stagno et al., 1980) sowie infizierten Leukozyten eine wichtige Rolle zu. Leukozyten könnten als HCMV-Reservoir dienen und bei Transfusionen HCMV übertragen (Keh & Gerber, 1988).

Um im immungeschwächten Wirt die zuvor erwähnten schweren bis tödlichen Krankheitsverläufe hervorrufen zu können (Alford & Britt, 1990, Drew & Mintz, 1984, Ho, 1982), muss HCMV über eine effiziente Ausbreitung im infizierten Organismus verfügen, um von der jeweiligen Eintrittspforte in die entsprechenden Organgewebe zu gelangen. Es sind sowohl für die Disseminierung des Virus, als auch für die Infektion verschiedener Organe eine ganze Reihe an Zielzellen verfügbar, mit deren Hilfe sich HCMV zellassoziert ausbreiten kann.

Einer der Pathogenitätsmechanismen von HCMV besteht darin, hämatogen zu disseminieren (Tegtmeier, 1986, Winston et al., 1980), wobei die infektiösen Viren hauptsächlich zellassoziert (Lang et al., 1977) in Monozyten, Makrophagen (Sinzger et al., 1996) und Granulozyten (Gerna et al., 1992, Grefte et al., 1994, Grefte et al., 1992, Taylor Wiedeman et al., 1991) verbreitet werden. Hierbei vergrößert im Prinzip jeder Zustand, der die Diapedese von Entzündungszellen im Organgewebe fördert, die Chance einer HCMV-Infektion am Ort der Infiltration (Grundy et al., 1998, Sinzger & Jahn, 1996).

Infizierte Endothelzellen wurden in vielen Organen nachgewiesen, wie Gehirn (Wiley & Nelson, 1988b), Herz (Arbustini et al., 1992), Lunge, Gastro-Intestinaltrakt und Plazenta (Sinzger et al., 1995, Sinzger et al., 1993a). Es wurde entdeckt, dass spät infizierte Zellen endothelialen Ursprungs im peripheren Blut akut infizierter Patienten zirkulieren (Grefte et al., 1993a, Percivalle et al., 1993). Infizierte Endothelzellen könnten an der hämatogenen Disseminierung des Virus beteiligt sein (Grefte et al., 1993a, Grefte et al., 1994, Grefte et al., 1993b, Percivalle et al., 1993, Sinzger et al.,

1995), indem sie sich während der späten Phase des viralen Replikationszyklus von der Gefäß-Basalmembran ablösen und so in die Zirkulation gelangen (Grefte et al., 1995). Es wird angenommen, dass diese infizierten Endothelzellen, welche im peripheren Blut zirkulieren, wegen ihrer Größe in Gewebskapillaren hängen bleiben und auf diese Art eine Organinfektion auslösen, indem sie das HCMV-Virus an die Kapillarendothelien an diesem Ort übertragen (Sinzger & Jahn, 1996). Tatsächlich sind Endothelzellen kleiner Gefäße eines der Hauptziele von HCMV (Sinzger et al., 1995). Vereinbar mit dieser Hypothese wurden spät infizierte Riesenzellen mit nukleären Einschlüssen gefunden, die in Kapillaren meist das Lumen verschlossen (Sinzger et al., 1995). Die produktive Infektion dieser Zellen wurde durch die elektronenmikroskopische Entdeckung von Virus-Partikeln bestätigt (Grefte et al., 1993a). Weiterhin besteht eine Korrelation zwischen den zirkulierenden HCMV-infizierten Zellen und der Entstehung einer symptomatischen Organmanifestation bei Patienten nach Transplantation (Grefte et al., 1993b, Percivalle et al., 1993).

Durch die Infektion ubiquitär vorkommender Zellen kann praktisch jedes Organ von HCMV befallen werden (Plachter et al., 1996, Toorkey & Carrigan, 1989). Durch das breite Vorkommen an Zielzellen wird die HCMV-Verbreitung im Organismus erleichtert (Myerson et al., 1984, Toorkey & Carrigan, 1989), wobei sich folgende Pathogeneseprinzipien unterscheiden lassen:

1. Ubiquitär verteilte Zelltypen, wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten, erlauben die HCMV-Replikation in nahezu jedem Organ (Muhlemann et al., 1992, Ng Bautista & Sedmak, 1995, Plachter et al., 1996, Roberts et al., 1989, Sinzger et al., 1995, Sinzger et al., 1993a, Wiley & Nelson, 1988a).
2. Leukozyten (Gerna et al., 1992, Grefte et al., 1994, Grefte et al., 1992, Meyer König et al., 1995) und endotheliale Riesenzellen (Grefte et al., 1993a, Percivalle et al., 1993), die im peripheren Blut zirkulieren, tragen zur hämatogenen Disseminierung bei und
3. der Befall spezialisierter Parenchymzellen, wie Neurone des Gehirns und der Retina sowie glatte Muskelzellen im Gastro-Intestinaltrakt und Hepatozyten (Horn et al., 1992, Plachter et al., 1996, Rummelt et al., 1994, Sano & Izumi, 1991, Schmidbauer et al., 1989, Sinzger et al., 1999, Sinzger et al., 1995, Sinzger et al., 1993b, Wiley & Nelson, 1988a) führt zur Entstehung einer klinischen Manifestation.



Hierbei sind Bindegewebszellen die am häufigsten infizierten Zellen (Sinzger et al., 1995, Sinzger et al., 1993a) und ein ideales Ziel für die virale Replikation, da sie ubiquitär im Stroma vieler Organsysteme verteilt sind (Sinzger et al., 1993a). Infizierte Fibroblasten wurden in der Lunge, dem Gastro-Intestinaltrakt (Sinzger et al., 1995, Sinzger et al., 1993a) und der Plazenta (Sinzger et al., 1993a) entdeckt.

Die von HCMV verursachten Krankheitsbilder werden vermutlich sowohl durch direkte, als auch indirekte Zytotoxizität hervorgerufen. Die direkte virale Zytotoxizität scheint zu den gastro-intestinalen Erosionen, Ulzerationen und Perforationen (Aqel et al., 1991, Kyriazis & Mitra, 1992, Murray et al., 1995, Nabeshima et al., 1992, Shintaku et al., 1991, Sinzger et al., 1993b, Vachon et al., 1995) sowie der HCMV-Retinitis (Rutzen et al., 1995) und HCMV-Hepatitis (Sinzger et al., 1999) beizutragen. Bei den genannten Manifestationen kann eine starke virale Replikation am Infektionsort gefunden werden (Sinzger & Jahn, 1996).

Alternativ wurde darüber spekuliert, ob die HCMV-Pneumonie nicht nur durch die direkte Schädigung der Pneumozyten durch das Virus selbst, sondern auch durch indirekte Zytotoxizität – durch zytotoxische T-Zellen - ausgelöst wird (Grundy et al., 1987). Ähnliche Mechanismen wurden auch für die HCMV-Hepatitis geäußert (Asanuma et al., 1999).

Über die Induktion einer direkten und indirekten Zytotoxizität hinaus scheint HCMV auch über die Modulation von Zytokinen und Adhäsionsfaktoren pathogenetisch zu wirken. Die HCMV-Infektion erhöht verschiedene Zytokin-Konzentrationen im Serum, wie die von IL-1 (Interleukin 1), IL-2 (Interleukin 2) (Jordan et al., 1992), IL-6 (Interleukin 6), TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ ) (Fietze et al., 1994, Humbert et al., 1994, Tilg et al., 1990) und IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) (Tilg et al., 1990). Doch neben der Induktion von IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  kommt es auch zur Induktion von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen (ELAM-1, ICAM-1, VCAM) auf Endothelzellen in vitro, wodurch eine Immunantwort getriggert werden könnte (Sinzger & Jahn, 1996). Auf diese Weise könnten infizierte Endothelzellen an der Modulation der Entzündungsreaktion in befallenen Organen beteiligt sein (Fend et al., 1990, Nakhleh et al., 1991, Shintaku et al., 1991, Tazelaar, 1991, Waldman et al., 1998): zum einen durch Antigen-Präsentation, zum anderen über Leukozyten-Adhäsion (Span et al., 1991, Span et al., 1989), wodurch die Immunantwort zum Ort der Infektion gelenkt würde (Nakhleh et al., 1991). Diese Hypothese wird von der Beobachtung gestützt, dass die HCMV-Infektion von Endothelzellen oft mit einer

perivaskulären Entzündungsreaktion verbunden ist, an welcher T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Zellen, Natürliche Killerzellen und Makrophagen beteiligt sind (Lemstrom et al., 1995, Sedmak et al., 1994). Zur Untermauerung der Hypothese diente gleichfalls der Nachweis einer MHC-Klasse-II-Expression um kleine Arteriolen und Kapillaren herum (Knight et al., 1997, Lemstrom et al., 1995).

Doch trotz dieser gegen HCMV gerichteten Immunreaktion ist HCMV in der Lage, lebenslang im menschlichen Organismus zu persistieren, um nach einem Latenzstadium wieder reaktiviert zu werden (Alford & Britt, 1990, Pass, 2001). Hierbei ist nicht bekannt, ob die latente HCMV-Infektion hauptsächlich in organspezifischen Zellen oder in ubiquitär vorkommenden Zellen wie Makrophagen, Endothelzellen oder anderen Zellentypen stattfindet. Es wurde spekuliert, ob es sich bei infizierten aortalen Endothelzellen als ein dem Immunsystem entzogenes Reservoir handelt, in dem HCMV lebenslang persistieren kann (Fish et al., 1998). Passend zu dieser Überlegung wurde festgestellt, dass Mäuse in Endothelzellen und T-Lymphozyten das latente MCMV (murines CMV) enthalten (Koffron et al., 1995). Ebenfalls könnte das Monozyten-Makrophagen-System ein Ort der HCMV-Persistenz sein (Hahn et al., 1998, Kondo et al., 1996, Söderberg Naucner et al., 1997).

Eine endogene virale Reaktivierung erfolgt häufig aus diesem Latenzstadium heraus (Alford & Britt, 1990, Pass, 2001), wenn das Gleichgewicht zwischen der viralen Replikation und der Kontrolle durch das Immunsystem gestört wird (Sinzger & Jahn, 1996).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Pathogenitätsfaktoren von HCMV dazu führen, dass das Virus ein breites Spektrum an Zielzellen infiziert, mit deren Hilfe es hämatogen disseminiert und damit praktisch in jedes Organ gelangen kann.

### ***1.3 Bedeutung des Immunstatus für HCMV-Erkrankungen***

Bei gesundem Immunsystem verläuft eine HCMV-Infektion meist subklinisch, wohingegen beim immungeschwächten Organismus eine klinisch manifeste HCMV-Erkrankung hervorgerufen werden kann (Sinzger & Jahn, 1996). Während einer HCMV-Infektion ist für den Patienten die Immunreaktion gegen das Virus wichtig, wie Studien belegen, bei denen Seropositive bessere Verläufe nach Transplantation

aufweisen als Seronegative mit Erstinfektion, da sich bei Seropositiven das Immunsystem schon mit HCMV auseinander gesetzt hatte (Kaufman et al., 2001). Eine entscheidende Rolle kommt bei der Eingrenzung der HCMV-Infektion dem zellulären Immunsystem, vor allem den CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) zu, welche virus-infizierte Zellen lysieren (Riddell & Greenberg, 1994, Riddell et al., 1992, Rotzschke et al., 1990). Der Beitrag der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen zur Immunreaktion gegen das Cytomegalovirus wurde widersprüchlich beurteilt (Einsele et al., 1993, Reddehase et al., 1987). Es wurde mehrfach beschrieben, dass eine HCMV-Erkrankung bei immunkompromittierten Patienten mit einem Mangel an spezifisch gegen HCMV gerichteten zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten korreliert (Einsele et al., 1993, Walter et al., 1995). Im Rahmen einer in vivo/ex vivo T-Zell-Depletion als Prophylaxe einer GvHD („Graft versus Host Disease“) nach Knochenmark-Transplantation zeigte sich, dass durch die T-Zell-Depletion eine frühe aktive HCMV-Erkrankung begünstigt wird (Hertenstein et al., 1995). Die spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen kontrollieren die virale Vermehrung (Reusser et al., 1997), wobei sie im analogen murinen Tiermodell vor der virus-verursachten Gewebszerstörung schützen und auf diese Weise vor dem tödlichen MCMV-Krankheitsverlauf (Reddehase et al., 1987). Nach überstandener akuter Infektion kommt es zur Persistenz schützender CD8<sup>+</sup> T-Zell-Infiltrate. Auch persistieren CD8<sup>+</sup> Gedächtniszellen, wodurch eine erneute virale Reaktivierung und damit eine produktive MCMV-Infektion verhindert wird, so dass eine virale Replikation gemäßigt und fokal stattfindet (Podlech et al., 2000). Beim Fehlen spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten kommt es dagegen zur disseminierten Infektion, die einen fatalen Verlauf nimmt (Podlech et al., 2000). Doch auch für HCMV sind in der Literatur Daten zur adoptiven Immuntherapie immunkompromittierter HCMV-infizierter Patienten nach allogener Knochenmark-Transplantation bekannt: Virusspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen können erfolgreich transfundiert werden und zu einer passageren antiviralen Immunität gegen HCMV im Empfänger-Organismus führen (Riddell & Greenberg, 1994, Riddell & Greenberg, 1995, Riddell et al., 1992, Walter et al., 1995). Hierbei ist das Ausmaß der zytotoxischen Aktivität gegen HCMV mit dem des Spenders vergleichbar. Durch einen solchen adoptiven Immuntransfer wurde in einem Kollektiv von vierzehn Patienten nach allogener Knochenmark-Transplantation die Entwicklung einer HCMV-Virämie sowie eine HCMV-Erkrankung verhindert (Walter et al., 1995).

## **1.4 Immunevasion von HCMV**

Die Tatsache, dass klinisch manifeste HCMV-Erkrankungen nahezu ausschließlich im immungeschwächten Wirt auftreten, macht deutlich, dass eine „Pathogenese“ im eigentlichen Sinn für das Virus nur eine Ausnahmesituation darstellt. Für die Epidemiologie von HCMV und damit für das Überleben dieses Virus in der Population ist die meist asymptomatische Infektion immunkompetenter Personen entscheidend (Pass, 2001). So ist beispielsweise der Hauptübertragungsweg von HCMV in der Kindheit die unbemerkte Übertragung von der stillenden Mutter auf ihr Kind mit der Muttermilch im Rahmen einer symptomlosen HCMV-Reaktivierung der latent infizierten Mutter (Hamprecht et al., 2001). HCMV muss also über Mechanismen verfügen, die intakte humorale oder zelluläre Immunantwort des Wirtes zu unterlaufen. Die möglichen viralen Immunevasionsstrategien sind dabei ähnlich vielfältig und komplex wie die Immunantwort des Wirtes.

Die erste Phase der unspezifischen antiviralen Immunität wird insbesondere durch Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und durch die Freisetzung humoraler antiviraler Faktoren wie Interferone, Tumor-Nekrose-Faktor, Zytokine und Chemokine getragen (Janeway et al., 2001). HCMV verfügt über TNF-Rezeptorhomologe (Benedict et al., 1999) und Chemokin-Rezeptorhomologe (Billstrom et al., 1998), um die Wirkung der entsprechenden Faktoren zu blockieren. Im Gegensatz zur Lyse durch zytotoxische T-Lymphozyten lysieren Natürliche Killerzellen hauptsächlich virus-infizierte Zellen, die kein MHC-Klasse-I auf ihrer Zelloberfläche aufweisen. Daher kann eine veränderte MHC-Klasse-I-Molekül-Expression die Zellen gegenüber NK-Zell-vermittelter Lyse sensibler machen (Ljunggren & Karre, 1990). Die zytotoxische Wirkung von NK-Zellen gegen HCMV-infizierte Zellen wird möglicherweise durch die Expression eines MHC-Klasse-I-Homologs (Beck & Barrell, 1988) und antiapoptotischer Genprodukte (Zhu et al., 1995) begrenzt. Den genannten Mechanismen zur Evasion der intakten Immunantwort kommt vermutlich eine besondere Bedeutung im Rahmen der Primärreplikation im Organismus zu.

In der zweiten Phase - der spezifisch gegen HCMV gerichteten adaptiven Immunantwort - hemmen insbesondere antivirale neutralisierende Antikörper und antivirale zytotoxische T-Zellen (CTL) die Virusreplikation (Pass, 2001). Sowohl die starke Neutralisationswirkung der Antikörper von HCMV-seropositiven Personen

(Klein et al., 1999, Schoppel et al., 1998, Urban et al., 1996) als auch die antivirale Effizienz gegen HCMV gerichteter zytotoxischer T-Lymphozyten (Adler et al., 1998, Jin et al., 2000, McLaughlin Taylor et al., 1994, Walter et al., 1995) wurde mehrfach belegt. Wie es HCMV in Anwesenheit so effizienter antiviraler Immuneffektoren dennoch gelingt, eine lebenslange Persistenz im Wirt zu etablieren und sogar Reaktivierungen mit Ausscheidung infektiöser Viren zu erreichen, lässt sich nur mit der partiellen Unterlaufung auch dieser spezifischen Immunreaktionen durch Immunevasionsmechanismen erklären.

Der neutralisierenden Wirkung von Antikörpern scheint HCMV durch eine weitgehend zellassozierte Ausbreitung zu entgehen, bei der die Viren - dem Zugang der Antikörper entzogen - von Zelle zu Zelle weitergegeben werden (Yamane et al., 1983). Ein weiterer Mechanismus besteht darin, dass HCMV ein Protein induziert, welches sich wie ein Fc-Rezeptor verhält, der unspezifisch an Antikörper bindet (Griffiths & Grundy, 1987). Indem diese induzierten Fc-Rezeptoren die Fc-Anteile gebundener Antikörper maskieren, könnte HCMV der Komplementaktivierung durch Antikörperbindung an infizierte Zellen und der nachfolgenden Zell-Lyse entgehen (MacCormac & Grundy, 1996).

Die zytotoxische Aktivität spezifisch gegen HCMV gerichteter CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten beruht auf der Erkennung infizierter Zellen durch den T-Zell-Rezeptor und die nachfolgende Lyse der infizierten Zellen (Rotzschke et al., 1990). Der T-Zell-Rezeptor eines zytotoxischen T-Lymphozyten erkennt ein bestimmtes Oligopeptid aus der Sequenz eines viralen Proteins, wenn dieses von einem bestimmten MHC-Klasse-I-Molekül präsentiert wird, woraus eine HLA-Restriktion und eine Peptidspezifität resultiert. Die Generierung unterschiedlicher zytotoxischer T-Zell-Klone im Rahmen der zellulären Immunantwort führt zu einer breiten gegen unterschiedliche Proteine des Infektionserregers gerichteten Immunantwort. Bei HCMV sind zytotoxische T-Zellen jedoch überwiegend gegen wenige der ca. 140 viralen Proteine gerichtet, insbesondere gegen die Tegumentproteine pp65 und pp150 sowie gegen das Haupt-IE-Antigen und das Glykoprotein gB (Gyulai et al., 2000). Der Anteil HCMV-pp65-spezifischer oder HCMV-IE-Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen im Blut HCMV-seropositiver Personen kann zwischen 0,1 % und 5 % der Gesamtheit aller zytotoxischer T-Lymphozyten betragen (Khan et al., 2002). Doch selbst unter einer so massiven antiviralen Immunantwort kann HCMV im Organismus offensichtlich reaktiviert werden und replizieren. Dies wird erklärt

durch eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation auf infizierten Zellen (Hengel et al., 1998). Eine Verminderung der MHC-Klasse-I-Expression auf HCMV-infizierten Zellen wurde in unterschiedlichen Zellkultursystemen gezeigt (Beersma et al., 1993, Benz et al., 2001, Hengel et al., 1996, Steinmassl & Hamprecht, 1994, Warren et al., 1994, Yamashita et al., 1993). Bei stark verminderter Expression der entsprechenden HLA-Moleküle auf der Oberfläche infizierter Zellen ist die Präsentation viraler Peptide eingeschränkt und die Erkennung und Lyse durch antivirale CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht ausreichend möglich (Warren et al., 1994). Diese Strategie zur Unterlaufung einer antiviralen zytotoxischen T-Zell-Antwort teilt HCMV mit einer Reihe anderer Viren, die im Wirt eine Persistenz etablieren können, beispielsweise die Herpesviren HSV1, HSV2 und EBV, aber auch HIV, humanes Papilloma Virus (HPV) und Adenoviren (Übersicht in (Tortorella et al., 2000)).

Aus der Zusammenschau der verschiedenen potentiellen Immunevasionsmechanismen von HCMV wurde das Konzept eines opportunistischen Erregers entwickelt, dem die Vielzahl unterschiedlicher Immunevasionsstrategien ein Überleben im immunkompetenten Wirt sichert, wobei die Immunantwort aber doch ausreichend scheint, um Krankheitserscheinungen zu verhindern (Hengel et al., 1998). Erst wenn die Balance durch Immunsuppression zugunsten des Virus verschoben wird, würden nach diesem Konzept klinische Manifestationen der HCMV-Infektion entstehen. Bisher ist diese Vorstellung weitgehend hypothetisch. Zwar sind die einzelnen Mechanismen in isolierten Zellkulturansätzen überwiegend experimentell gesichert worden, es ist aber unklar, inwieweit sie in der komplexen in vivo Situation wirksam werden. So ist die Störung der Komplementaktivierung durch Fc-Rezeptoren bisher nur ein hypothetisches Konzept, die blockierende Aktivität von TNF- und Chemokin-Rezeptorhomologen im infizierten Organismus nicht belegt und selbst die MHC-Klasse-I-Down-Regulierung, deren biologische Grundlagen sehr weit aufgeklärt sind, wurde in vivo bisher nicht überprüft. Für das Verständnis der Pathogenese HCMV-assoziiierter Erkrankungen ist es jedoch unabdingbar zu wissen, welchen Anteil gerade das Ausweichen gegenüber der zellulären Immunität durch MHC-Klasse-I-Down-Regulierung an der Ausbreitung von HCMV in Zielorganen wie Lunge und Gastro-Intestinaltrakt hat.

## **1.5 MHC-Klasse-I-Down-Regulierung bei Viren**

Die Erkennung und Lyse infizierter Zellen durch antigenspezifische zytotoxische T-Lymphozyten ist ein wesentlicher Faktor bei der Elimination viraler Pathogene aus dem Organismus. Viren, die für ihre Weiterverbreitung auf eine langdauernde Persistenz im infizierten Wirt angewiesen sind, müssen der zellulären zytotoxischen Immunreaktion daher zumindest teilweise entgehen. Dies gilt beispielsweise für das humane Immundefizienz-Virus (HIV) und für Herpesviren wie das Herpes simplex Virus (HSV), das Epstein Barr Virus (EBV) und HCMV. Eine geeignete Immunevasionsstrategie besteht darin, dass die Antigenpräsentation auf der Oberfläche reduziert wird. Im Einzelnen kann dies auf einer verminderten Bereitstellung viraler Antigen-Peptide, vor allem aber auf einer verminderten Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Oberfläche infizierter Zellen beruhen.

Um von zytotoxischen T-Zellen erkannt zu werden, müssen die MHC-Klasse-I-Moleküle als Heterodimere aus einem hochpolymorphen Schwere-Kette-Glykoprotein und einem nicht polymorphen Leichte-Kette-Protein ( $\beta$ 2-Mikroglobulin) zusammen mit einem antigenen Oligopeptid (Rotzschke et al., 1990) an der Zelloberfläche exprimiert werden. Die neusynthetisierten Schwere-Kette-Proteine assoziieren mit den Leichte-Kette-Proteinen im endoplasmatischen Retikulum (ER). Die meist aus neun Aminosäuren bestehenden Oligopeptide werden im zytosolisch lokalisierten Proteasom aus antigenen Proteinen durch Proteolyse erzeugt und über den TAP-Transporter ins endoplasmatische Retikulum geschleust. Dort binden die Oligopeptide an die präformierten Heterodimere, wodurch diese stabilisiert werden. Die nunmehr trimeren Komplexe werden über das Golgikompartiment an die Zelloberfläche geschleust (Heemels & Ploegh, 1995).

Unterschiedliche Viren stören den komplexen Vorgang der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenexpression an ganz verschiedenen Punkten (Andersson et al., 1985, Beersma et al., 1993, Campbell & Slater, 1994, del Val et al., 1992, Hill et al., 1995, Jones et al., 1995, Maudsley & Pound, 1991, Rinaldo, 1990, Scheppler et al., 1989): während der proteasomalen Proteolyse viraler Antigene zu immunogenen Peptiden, während der Beladung der neu synthetisierten MHC-Klasse-I-Moleküle im endoplasmatischen Retikulum, während des Transportes der beladenen MHC-

Klasse-I-Moleküle zur Zelloberfläche und durch gesteigerten Abbau an der Oberfläche exprimierter MHC-Klasse-I-Moleküle (Tortorella et al., 2000). Das EBNA1-Protein von EBV ist durch eine Glycin-Alanin-Repetition vor der Proteolyse im Proteasom geschützt, was latent mit EBV infizierte Zellen der Erkennung durch zytotoxische T-Zellen entzieht (Levitskaya et al., 1997). Für HCMV wurde eine inhibitorische Wirkung des viralen Tegumentproteins pp65 auf das Proteasom berichtet (Gilbert et al., 1996). ICP47 von HSV hemmt den TAP-assoziierten Transport von Peptiden ins ER auf der zytosolischen Seite (Fruh et al., 1995, Hill et al., 1995), US6 von HCMV wirkt auf ähnliche Weise auf der ER-Seite des Transportes (Ahn et al., 1997). Das Adenovirus-Protein E3/19K (Mahr & Gooding, 1999) und das HCMV-Protein US3 (Ahn et al., 1996) halten MHC-Klasse-I-Moleküle im ER zurück und verhindern so den Transport zur Zelloberfläche. Die HCMV-Proteine US2 und US11 gehen in ihrer Wirkung darüber hinaus. Sie exportieren MHC-Klasse-I-Moleküle aktiv aus dem ER und führen sie einer Degradation im Proteasom zu (Gewurz et al., 2001, Wiertz et al., 1996). Das MCMV-Protein m152 hält MHC-Klasse-I-Moleküle im Kompartiment zwischen ER und dem Golgi-Apparat zurück und verhindert so einen Transport zur Oberfläche (Ziegler et al., 1997). Das MCMV-Protein m04 bindet MHC-Klasse-I-Moleküle schon im ER, wird mit diesen zur Oberfläche transportiert und stört dort möglicherweise die Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor der T-Zellen (Kleijnen et al., 1997). Das dritte inhibitorisch wirkende MCMV-Protein m06 dirigiert MHC-Klasse-I-Moleküle von der Zelloberfläche ins lysosomale Kompartiment, wo sie in der Folge abgebaut werden (Reusch et al., 1999). Auf ähnliche Weise scheint das HIV-Protein nef zu wirken (Piguet & Trono, 1999), wohingegen das HIV-Protein vpu neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle destabilisiert (Kerkau et al., 1997).

Die potentielle Bedeutung, die eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-restringierten Antigenpräsentation hat, wird verdeutlicht durch die Tatsache, dass HIV, MCMV und HCMV jeweils mehrere Proteine für diese Funktion bereitstellen. Auf den ersten Blick scheint dies redundant zu sein. Genauer betrachtet ist diese Vielfalt jedoch möglicherweise nötig, um eine MHC-Klasse-I-restringierte Präsentation viraler Antigene während des gesamten Replikationszyklus zu verhindern.



Dies wird am Beispiel von HCMV besonders deutlich: In der sehr frühen Replikationsphase verhindert das von US3 kodierte Glykoprotein den intrazellulären Transport des MHC-Klasse-I-Moleküls, indem es mit den MHC-Klasse-I-Heterodimeren assoziiert und diese im ER zurückhält (Ahn et al., 1996). Dadurch kann zwar die Antigenpräsentation gestört werden, jedoch um den Preis einer Akkumulation der zurückgehaltenen MHC-Klasse-I-Moleküle im ER. Dies kann zur Störung der Zellfunktionen und letztlich zum Zelltod führen, stellt also keine geeignete Strategie dar, um während des drei Tage dauernden Vermehrungszyklus von HCMV das Überleben der Wirtszelle zu sichern. In der frühen Replikationsphase wird jedoch die US3-Funktion abgelöst durch die Funktionen von US2 und US11, die geeignet sind, das Problem der Akkumulation im ER zu vermeiden. Das US11-Genprodukt wird während der frühen und späten Phase des viralen Replikationszyklus gebildet und ist fähig, die neusynthetisierten MHC-Klasse-I-Schwere-Kette-Proteine aktiv aus dem endoplasmatischen Retikulum ins Zytosol zu transportieren, wo sie von N-Glykanasen und Proteasomen zerstört werden (Ahn et al., 1996, Wiertz et al., 1996). Auf ähnliche Weise wirkt das frühe HCMV-Protein US2, das ebenfalls MHC-Klasse-I-Moleküle einer Degradation im Proteasom zuführt (Gewurz et al., 2001). In der späten Replikationsphase, wenn virale Proteine zunehmend abundant werden, kommt als weiterer Mechanismus die Hemmung des TAP-assoziierten Transports von Peptiden ins ER durch das HCMV-Protein US6 hinzu (Ahn et al., 1997).

Obwohl HCMV über multiple ineinandergreifende Mechanismen zum Unterlaufen einer T-Zell-Erkennung verfügt, wird dieses Virus im immunkompetenten Wirt jedoch durch eine entsprechende spezifische zytotoxische T-Zell-Antwort weitgehend kontrolliert. Möglicherweise erlauben diese Mechanismen nur eine begrenzte Immunevasion, die gerade ausreicht um die Persistenz und limitierte Reaktivierungen zu sichern. Leider ist über die Wirksamkeit der MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in vivo nahezu nichts bekannt. So ist unklar, ob in infizierten Zellen überhaupt eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung auftritt, wie umfassend diese in unterschiedlichen Phasen der viralen Replikation ist, und ob es Gegenregulationen durch die inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  gibt, wie dies in Zellkulturversuchen nahegelegt worden war (Hengel et al., 1995).

## 2 Fragestellung

Obwohl eine ganze Reihe an Pathogenitätsmechanismen von HCMV bereits bekannt ist, so gibt es doch auch noch einige ungeklärte Aspekte. So wurde zwar mehrfach *in vitro* eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle auf infizierten Zellen beschrieben (Barnes & Grundy, 1992, Beersma et al., 1993), doch bisher wurde dieser Mechanismus der Immunevasion noch nicht *in vivo* überprüft. Ähnlich verhält es sich auch mit dem Zeitpunkt, zu dem eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung stattfindet. Zwar wurden mehrere Genloci nachgewiesen, die zu allen Replikationsstadien von HCMV in die MHC-Klasse-I-Expression eingreifen (Jones et al., 1995), doch auch hier liegen bisher nur Zellkulturdaten vor.

Mit dieser Arbeit sollte nun überprüft werden, ob HCMV auch *in vivo* in der Lage ist, MHC-Klasse-I-Moleküle auf infizierten Zellen down zu regulieren. Außerdem interessierte die Frage, in welchen Phasen der viralen Replikation *in vivo* eine Down-Regulierung auftritt und wie ausgeprägt eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung auf infizierten Zellen vorhanden ist.

Aus der Literatur ist bekannt, dass an einer Immunreaktion gegen HCMV vor allem zytotoxische T-Lymphozyten beteiligt sind, indem sie die virus-infizierten Zellen erkennen und lysieren (Rotzschke et al., 1990). Hier stellte sich nun die Frage, ob dies auch *in vivo* der Fall ist bei einer eventuellen gleichzeitigen MHC-Klasse-I-Down-Regulierung. Daher sollte geklärt werden, ob eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle in einer Immunevasion des Virus resultiert oder ob dennoch eine gegen HCMV gerichtete Immunantwort stattfindet.

Diese Überlegungen sollten anhand von verschiedenen HCMV-infizierten Gewebepräparaten aus Biopsie- und Autopsie-Material untersucht werden. Hierbei handelte es sich um Gewebe der Lunge, des Colons und der Hypophyse immunkompromittierter Patienten sowie um Präparate der Plazenta einer kongenitalen HCMV-Infektion. Die Besonderheit der Plazenta lag vor allem darin, dass es sich bei HCMV in diesem Gewebe um das einzige Pathogen handelte und dass im Vorfeld keine antivirale Therapie erfolgt war, so dass sämtliche pathologischen Merkmale von HCMV verursacht waren. Darüber hinaus konnten aufgrund der klaren Gliederung des Gewebes in abgegrenzte Zotten zelluläre Veränderungen sowie eine Immunreaktion direkt auf die HCMV-Infektion

zurückgeführt werden. Hierzu wurde eine immunhistochemische Analyse der formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeschnitte durchgeführt: zum einen wurden sehr frühe, frühe sowie späte Antigene von HCMV dargestellt, zum anderen MHC-Klasse-I simultan oder in Serienschnitten angeführt. In weiteren Gewebeschnitten kamen Leukozyten - insbesondere CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten - zur Darstellung sowie professionell antigenpräsentierende Zellen durch den Nachweis von MHC-Klasse-II-Molekülen.

Insgesamt sollte in der vorliegenden Arbeit die Relevanz des Konzeptes der Immunevasion von HCMV durch eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in vivo untersucht werden.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Gewebeschnitte**

Es wurden formalinfixierte paraffineingebettete Gewebeschnitte von Colon, Lunge und Hypophyse immunkompromittierter Patienten sowie von Plazenta kongenital infizierter Neugeborener verwendet. Alle untersuchten Gewebe waren histologisch als HCMV–infiziert eingestuft worden. Hierbei stammten die Schnitte des Colons von einer 35jährigen Patientin nach Lebertransplantation, die eine HCMV–Colitis und –Vaskulitis ausbildete. Die Lungen–Gewebeschnitte stammten von einem 44jährigen AIDS–Patienten und wiesen eine HCMV–Pneumonie auf, welche mit *Mycobacterium avium*–intracellulare, *Pseudomonas aeruginosa* sowie *Candida albicans* vergesellschaftet war. Die Schnitte der Plazenta stammten von einem in der 32 ½ Woche geborenen kongenital infiziertem Neugeborenen mit HCMV–Villitis. In den Präparaten der Plazenta handelte es sich bei HCMV um das einzige Pathogen. In diesem Fall hatte keine antivirale Chemotherapie stattgefunden. Darüber hinaus wurden hinsichtlich der oben aufgeführten Fragestellung weitere Präparate des Colons und der Lunge zweier AIDS-Patienten sowie Gewebeschnitte der Plazenta untersucht. Teilweise wurden Serienschnitte dieser Gewebe verwendet, um die Ausbreitung der Infektion und deren Folgen für das Gewebe in drei Dimensionen zu erfassen.

Die Gewebeschnitte wurden freundlicherweise von Professor Dr. Dan Sedmak (Columbus, Ohio, USA) und Professor Dr. med. P. H. Wünsch (Nürnberg) zur Verfügung gestellt.

### **3.2 Antikörper**

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführten Primärantikörper verwendet:

Tabelle1: Primärantikörper gegen HCMV–Antigene

Antikörper	Spezifität	Quelle
E13	immediate-early-Antigen IE1/2 (pUL122/123)	Biosoft, Paris, Frankreich
CCH2	early-Antigen p52 (pUL44)	Dako, Hamburg
BS505	early-Antigen p52 (pUL44)	Biotest, Dreieich
28-4	late-Antigen Major Capsid Protein (pUL86)	Dr. William Britt, Birmingham AL, USA (Sanchez et al., 1998)

Tabelle 2: Primärantikörper gegen zelluläre Antigene

Antikörper	Spezifität	Quelle
HC10	MHC-Klasse-I-Moleküle	Dr. Hidde L. Ploegh (Stam et al., 1990)
HLA-DR, CR3/43	MHC-Klasse-II-Moleküle	Dako
LCA	Leukozyten	Dako
CD8	CD8+ Lymphozyten	Dako
FVIII-Related Antigen	Endothelzellen	Dako

Als Sekundärantikörper wurde ein biotینگekoppelter Kaninchen-Antikörper gegen Maus-Immunglobuline (Dako) verwendet.

Die Verdünnungen der Antikörper wurden entsprechend dem Signal-Hintergrund-Verhältnis für jedes Gewebe optimiert.

### **3.3 Materialien**

Folgende Materialien wurden verwendet:

- 0,6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt)
- Lösung zum Aufdecken maskierter Antigene (Target Retrieval Solution (Dako))
- Protease Typ 24 (Sigma, Deisenhofen)
- Kaninchen Normal Serum (Dako)
- Streptavidin-Biotin-Komplex mit Peroxidase (Dako)
- Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB-Tabletten (Sigma))
- Streptavidin-Biotin-Komplex mit Alkalischer Phosphatase (Dako)
- Fast Red (FR-Tabletten (Sigma))
- Mayers Hämalaun (Merck)
- Glycerolgelatine (Merck)
- Polyvar-Mikroskop (Cambridge Instruments, Nussloch)

### **3.4 Immunhistochemie**

#### **3.4.1 Gewebepreparation**

Um den Gewebeschnitt zu entparaffinieren, wurde der Objektträger 30 min lang bei 50 °C erwärmt und sofort anschließend drei mal 15 min in Xylol gewaschen, danach zwei mal 1 min in 100 % Ethanol.

Die endogene Peroxidase wurde für 20 min in einer Lösung aus Methanol mit 0,6 % Wasserstoffperoxid blockiert. Dies war erforderlich, da die Substrat-Chromogenreaktion, mit der die Peroxidase des Streptavidin-Biotin-Komplexes sichtbar gemacht wird, keine Unterscheidung zulässt, ob es sich bei der Anfärbung um das Enzym, welches durch die Immunreaktion das zelluläre Antigen lokalisiert oder ob es sich um bereits im Gewebe vorhandene endogene Peroxidaseaktivität handelt. Hauptsächlich findet sich die endogene Peroxidaseaktivität in roten und weißen Blutkörperchen. In Präparaten, die viele Blutzellen enthalten, wie

beispielsweise Plazenta, war die Blockade der endogenen Peroxidase von grundlegender Bedeutung für eine korrekte Interpretation.

Dann wurde der Gewebeschnitt durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert: je 1,5 min in 90 %, 70 % und 50 % Alkohol, anschließend je 1,5 min in demineralisiertem Wasser und in PBS (phosphate buffered saline).

Je nach folgendem Primärantikörper wurde nun das Gewebe entweder durch eine Protease-Lösung (0,1 % Protease Typ 24 in PBS) oder mittels einer Lösung zum Aufdecken maskierter Antigene vorbehandelt. Dazu wurde 100 – 200 µl der Protease-Lösung je Schnitt auf den Objektträger geschichtet. Nach der Inkubationszeit von 5 min wurde der Gewebeschnitt für 5 min in PBS gewaschen. Alternativ wurde die Lösung zum Aufdecken von Antigenen im Wasserbad auf 95 – 97 °C erhitzt und der Gewebeschnitt darin für 20 min inkubiert. Anschließend ließ man den Schnitt für weitere 20 min abkühlen. Danach wurde ebenfalls für 5 min in PBS gewaschen. Als weitere Möglichkeit, maskierte Antigene aufzudecken, wurde das Präparat im Schnellkochtopf mit 1 mmol/l EDTA bei pH 8,0 erhitzt, bis sich das Überdruckventil hob. Anschließend wurde der Schnitt zusätzlich für 2 min gekocht und danach langsam abgekühlt. Daraufhin wurde für 5 min in PBS gewaschen.

### 3.4.2 Immunhistochemische Einfachfärbung

Nach der Vorbehandlung des Präparats wurden die Gewebsantigene mit Nonimmunserum (Kaninchen Normal Serum mit PBS im Verhältnis 1:10 verdünnt) abgesättigt, um eine unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Dies war erforderlich, da die häufigste Ursache hierfür in der unspezifischen Anlagerung des Primärantikörpers an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente der Präparate besteht. Der nachfolgend zugesetzte Sekundärantikörper bindet sich an den unspezifisch gebundenen Primärantikörper mit nachfolgender Immunperoxidase-Färbung, was eine positive Anfärbung des Präparats zur Folge hat. Am erfolgreichsten kann diese unspezifische Färbung durch Hinzufügen einer neutralen Proteinlösung verhindert werden, die vor Zugabe des Primärantikörpers aufgetragen wird. Dieses Protein lagert sich an die elektrisch geladenen Stellen und verhindert auf diese Weise eine Adsorption des Primärantikörpers. Hierfür wurde der

Gewebeschnitt mit 100 – 200 µl verdünnten Nonimmunserums je Schnitt für 20 min inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Serum abgekippt und der Überschuss sorgfältig abgewischt.

Anschließend wurde der monoklonale Anti-HCMV-Antikörper in PBS verdünnt und 100 – 200 µl des Primärantikörpers gegen virales Antigen je Schnitt auf den Objektträger geschichtet und bei 37 °C in der feuchten Kammer für 90 min inkubiert. Hinterher wurde der Gewebeschnitt für 5 min in PBS gewaschen.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinkoppelter Antikörper gegen Maus-Immunglobuline, entsprechend verdünnt in einer Lösung aus Nonimmunserum, verwendet (Abb. 1). Der Gewebeschnitt wurde mit 100 – 200 µl des Sekundärantikörpers je Schnitt für 60 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde für 5 min in PBS gewaschen.

Dann wurde der Streptavidin-Biotin-Komplex mit Peroxidase oder alternativ mit Alkalischer Phosphatase entsprechend den Herstellerangaben hergestellt. Hierbei wurde die Fähigkeit des Glykoproteins Streptavidin genutzt, 4 Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden. An das Biotin des Sekundär- oder Brückenantikörpers, der an den ersten Antikörper gebunden hat, lagert sich der Peroxidase-beziehungsweise Alkalische-Phosphatase-konjugierte Streptavidin-Biotin-Komplex über die freien Stellen des Streptavidinmoleküls an (Abb. 1). Der Objektträger wurde mit 100 – 200 µl des Streptavidin-Biotin-Komplexes je Schnitt für 20 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Gewebeschnitt für 5 min in PBS bei Peroxidase oder bei Alkalischer Phosphatase in TRIS-Puffer (0,05 mol/l TRIS-HCL, pH 7,6) gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde das Enzym Peroxidase und damit das gesuchte Antigen mit einem geeigneten Chromogen sichtbar gemacht. Dazu wurde die Färbelösung mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB) mittels DAB-Tabletten entsprechend Herstellerangaben hergestellt. Der Gewebeschnitt wurde mit 100 – 200 µl der DAB-Lösung je Schnitt für 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde für 5 min in PBS gewaschen. Für die Färbung der Alkalischen Phosphatase wurde der Objektträger mit 100 – 200 µl einer Fast-Red-Lösung je Schnitt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit wurde für jeden Gewebeschnitt einzeln ermittelt. Hinterher wurde für 5 – 10 min in fließendem Leitungswasser gewaschen, anschließend für 1 min in Aqua demin.



Für 0,5 – 1 min wurde der Objektträger mit Hämalaun gegengefärbt, danach für 10 min in fließendem Leitungswasser und für 1 min in Aqua demin. gewaschen. Nun wurde der Objektträger mit Kaisers Glycerolgelatine eingedeckt.

### 3.4.3 Immunhistochemische Doppelfärbung

Bei der Immunhistochemie-Doppelfärbung handelt es sich um eine Methode zur simultanen Darstellung von viralen Antigenen und Zellmarkerproteinen in formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeschnitten.

Nach der Gewebepreparierung wurden die Gewebsantigene mit Nonimmunserum abgesättigt. Hierfür wurde der Gewebeschnitt mit 100 – 200 µl verdünnten Nonimmunserums je Schnitt für 20 min inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Serum abgekippt und der Überschuss sorgfältig abgewischt.

Anschließend wurde der monoklonale Anti-HCMV-Antikörper in PBS verdünnt und 100 – 200 µl des Primärantikörpers gegen virales Antigen je Schnitt auf den Objektträger geschichtet und bei 37 °C in der feuchten Kammer für 90 min inkubiert. Hinterher wurde der Gewebeschnitt für 5 min in PBS gewaschen.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinkoppelter Antikörper gegen Maus-Immunglobuline, entsprechend verdünnt in einer Lösung aus Nonimmunserum, verwendet. Der Gewebeschnitt wurde mit 100 – 200 µl des Sekundärantikörpers je Schnitt für 60 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Danach wurde für 5 min in PBS gewaschen.

Der Objektträger wurde mit 100 – 200 µl des Streptavidin-Biotin-Komplexes mit Peroxidase je Schnitt für 20 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde der Gewebeschnitt für 5 min in PBS gewaschen.

Für die Peroxidasefärbung wurde der Gewebeschnitt mit 100 – 200 µl der DAB-Lösung je Schnitt für 5 – 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde für 5 min in PBS gewaschen.

Im nächsten Schritt wurde der Objektträger mit 100 – 200 µl des Nonimmunserums je Schnitt für 20 min inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde das Serum abgekippt und der Überschuss sorgfältig abgewischt.

## Immunhistochemische Doppelfärbung

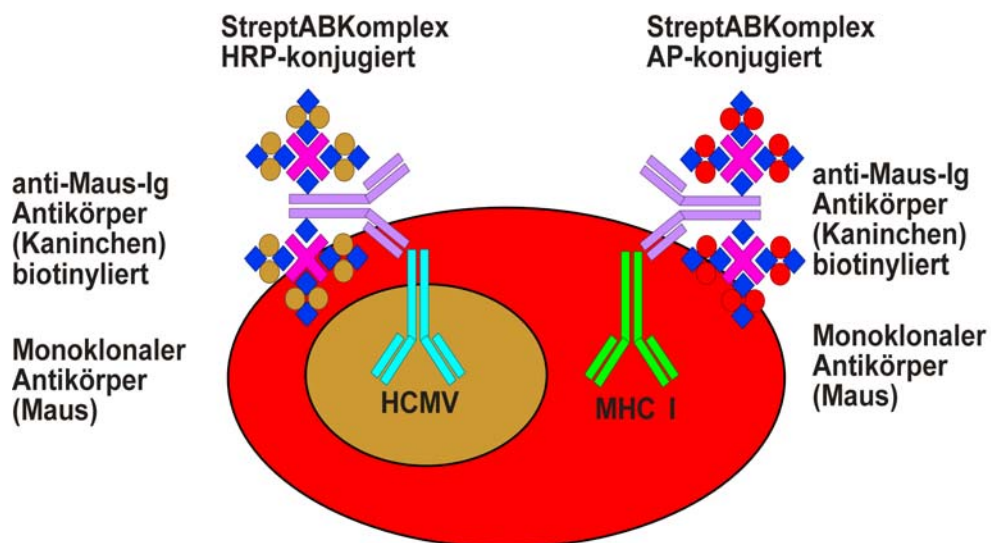


Abbildung 1: Streptavidin-Biotin-Methode

Der Primärantikörper gegen das gesuchte Zellmarkerprotein wurde in TRIS-Puffer (0,05 mol/l TRIS-HCL, pH 7,6) verdünnt und der Gewebeschnitt mit 100 – 200 µl des Primärantikörpers je Schnitt beschichtet. Nach der Inkubationszeit von 90 min bei 37 °C in der feuchten Kammer wurde für 5 min in TRIS-Puffer gewaschen.

Anschließend wurde der Gewebeschnitt mit 100 – 200 µl des Sekundärantikörpers (biotingekoppelter Antikörper gegen Maus-Immunglobuline, entsprechend verdünnt in einer Lösung aus Nonimmunserum (Kaninchen Normal Serum mit TRIS-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt)) je Schnitt inkubiert. Nach der Inkubationszeit von 60 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer wurde der Gewebeschnitt für 5 min in TRIS-Puffer gewaschen.

Nun wurde der Objektträger mit 100 – 200 µl des Streptavidin-Biotin-Komplexes mit Alkalischer Phosphatase für 20 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Dann wurde für 5 min in TRIS-Puffer gewaschen.

Für die Färbung der Alkalischen Phosphatase wurde der Objektträger mit 100 – 200 µl einer Fast-Red-Lösung je Schnitt bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit wurde für jeden Gewebeschnitt einzeln ermittelt. Hinterher wurde für

5 – 10 min in fließendem Leitungswasser gewaschen, anschließend für 1 min in Aqua demin.

Für 0,5 – 1 min wurde der Objektträger mit Hämalaun gegengefärbt, danach für 10 min in fließendem Leitungswasser und für 1 min in Aqua demin. gewaschen. Nun wurde der Objektträger mit Kaisers Glycerolgelatine eingedeckt.

### **3.5 Auswertung und Dokumentation**

Anschließend wurden die immunhistochemisch gefärbten einzelnen Gewebeschnitte sowie Serienschnitte systematisch mittels eines Polyvar-Mikroskops ausgewertet und mit Fotos dokumentiert. Hierfür dienten folgende Fragestellungen:

1. Wie sieht die Verteilung der HCMV-infizierten Zellen in den unterschiedlichen Geweben aus: Liegen die infizierten Zellen vereinzelt, disseminiert oder herdförmig vor?
2. Welche Zelltypen sind HCMV-infiziert? Sind insbesondere Endothelzellen infiziert?
3. Inwiefern sind HCMV-infizierte Zellen räumlich mit Leukozyten assoziiert?
4. Weisen HCMV-infizierte Zellen MHC-Klasse-I-Moleküle auf oder nicht? Wie groß ist hierbei der Anteil MHC-Klasse-I-negativer Zellen an der Gesamtzahl der infizierten Zellen? Gibt es Unterschiede in der MHC-Klasse-I-Expression bezogen auf den Zelltyp, die Gewebeart und im Vergleich zu nicht infiziertem Nachbargewebe?
5. Wie verhält sich die MHC-Klasse-I-Expression im Bezug auf das Stadium der viralen Replikation der infizierten Zelle?
6. Welcher Zusammenhang besteht zwischen MHC-Klasse-I-Expression auf infizierten Zellen und deren Assoziation mit Leukozyten?
7. Weisen HCMV-infizierte Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche auf oder nicht?
8. Liegt ein räumlicher Zusammenhang zwischen HCMV-infizierten Zellen und Zellen mit MHC-Klasse-II-Expression vor? Wieviele der HCMV-infizierten Zellen sind räumlich mit MHC-Klasse-II-positiven Zellen assoziiert?

9. Welcher Zusammenhang besteht zwischen MHC-Klasse-II-Expression und dem Auftreten von Leukozyten?
10. Gibt es einen räumlichen Zusammenhang zwischen der MHC-Klasse-II- und der MHC-Klasse-I-Expression?
11. Wie hoch ist der Anteil CD8-positiver Zellen an den inflammatorischen Infiltraten?
12. Ist eine räumliche Beziehung zwischen CD8-positiven Zellen und infizierten Zellen gegeben?
13. Ist eine zahlenmäßige Korrelation zwischen CD8-positiven Zellen und infizierten Zellen gegeben?

## 4 Ergebnisse

Berichte über eine Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen in Zellkultur durch das humane Cytomegalovirus (HCMV) haben zu der Vorstellung geführt, dass HCMV auf diese Weise einer effizienten zellulären Immunantwort entgehen könne. In vivo Untersuchungen dieser Hypothese fehlten jedoch. In der vorliegenden Arbeit sollten daher folgende Fragen beantwortet werden:

1. Gibt es eine Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen in vivo?
2. In welchen Phasen des viralen Replikationszyklus ist eine solche nachweisbar?
3. Geht eine Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen mit dem Fehlen einer Abwehrreaktion einher?

Untersucht wurden Gewebe von Patienten mit akuter HCMV-Infektion. Dabei handelte es sich um Gewebepreparate der Lunge, des Colons sowie der Hypophyse immunsupprimierter Patienten nach Organtransplantation oder AIDS und der Plazenta von einem Fall kongenitaler HCMV-Infektion. Die Besonderheit der Plazenta liegt zum einen in der klaren Gliederung des Gewebes in abgegrenzte Zottenareale. Dies ermöglicht in besonderer Weise eine Analyse der Kolo-kalisation von HCMV-infizierten Zellen mit Zellen der Immunabwehr. Da zum anderen HCMV in diesen Fällen das einzige Pathogen war und eine antivirale Chemotherapie nicht erfolgte, ist die Assoziation von HCMV-Infektion und Immunzellen klar interpretierbar im Gegensatz zu Gewebeschnitten der Lunge und des Colons, wo die Anwesenheit anderer Pathogene sowie die vorherige Anwendung antiviraler Chemotherapeutika das Bild mitbeeinflusst.

In formalinfixierten paraffineingebetteten Schnitten der genannten HCMV-infizierten Organe wurden durch immunhistochemische Methoden

1. HCMV-Antigene aus der sehr frühen, frühen und späten Phase des viralen Replikationszyklus nachgewiesen,
2. die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf infizierten und nicht infizierten Zellen erfasst,

3. die Infiltration infizierter Gewebeareale durch Zellen der Immunabwehr mittels Nachweis professionell antigenpräsentierender Zellen und Lymphozyten nachgewiesen.

Die Kolo-kalisation eines Infekts mit MHC-Klasse-I-Molekülen wurde einerseits durch Simultanfärbungen des sehr frühen Antigens von HCMV und von MHC-Klasse-I-Molekülen untersucht. Andererseits wurden vergleichende Färbung in Serienschnitten angefertigt, um beurteilen zu können, ob eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Expression beziehungsweise eine Infiltration von Immunzellen in benachbarten Schnitten festgestellt werden kann, da eine Infektion mit ihren Folgen für das Gewebe in drei Dimensionen stattfindet.

Dabei wurde insbesondere beurteilt:

1. Ob sich die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf infizierten Zellen von der Expression auf umgebenden nicht infizierten Zellen unterscheidet.
2. In welchen Phasen der viralen Replikation eine etwaige Veränderung auftritt.
3. Ob eine Infiltration infizierter Gewebeareale mit inflammatorischen Zellen zu beobachten ist.
4. Ob es Anzeichen dafür gibt, dass eine solche Immunantwort mit einer Begrenzung der HCMV-Infektion einhergeht.

#### ***4.1 HCMV-infizierte Zellen weisen eine deutlich reduzierte Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf***

Das sehr frühe Antigen pUL122/123 wird bereits ab 2 h nach Infektion und dann während des gesamten viralen Replikationszyklus exprimiert. Der Nachweis dieses Antigens ist deshalb geeignet, alle infizierten Zellen zu erfassen. Dieses Antigen wurde mit indirekter Immunperoxidasefärbung (Farbstoff DAB) durch Braunfärbung im Kern infizierter Zellen dargestellt. Zur Anfärbung von MHC-Klasse-I-Molekülen in formalinfixiertem Gewebe stand der Antikörper HC10 zur Verfügung, der nach indirekter Immun-Alkalische-Phosphatase-Färbung mit Fast Red zu einer kombiniert

zytoplasmatischen und oberflächenbetonten Rotfärbung führte. Um das gleichzeitige Vorhandensein einer Infektion und der MHC-Klasse-I-Expression darzustellen, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen zum einen des sehr frühen Genprodukts von HCMV, zum anderen der MHC-Klasse-I-Moleküle untersucht. Zusätzlich wurden immunhistochemische Einfachfärbungen des Endothelzellantigens von Serienschnitten angefertigt. So konnten in benachbarten Serienschnitten zum einen infizierte Endothelzellen dargestellt werden, während im nächsten Schnitt dieselben infizierten Zellen auf MHC-Klasse-I-Moleküle untersucht werden konnten.

In nicht infizierten Gewebearealen wiesen nahezu alle Zellen eine mäßige MHC-Klasse-I-Expression auf. In Arealen, in denen ein Infekt vorlag, war dagegen die Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle in der Mehrzahl der HCMV-infizierten Zellen down-reguliert. Die MHC-Klasse-I-Down-Regulierung fand in allen untersuchten Geweben statt, wobei die Down-Regulierung über den gesamten Gewebeschnitt verteilt war und verschiedene Zelltypen, vor allem Zellen des Organstromas, betraf (Abb. 2). Auch waren in allen untersuchten Gewebepräparaten Endothelzellen der Blutgefäße infiziert und einige davon down-reguliert (Abb. 3). Die Reduktion der MHC-Klasse-I-Signale betraf dabei sowohl das Zytoplasma als auch die Oberfläche der entsprechenden Zellen. In den meisten infizierten Zellen bedeutete dies einen völligen Verlust nachweisbarer MHC-Klasse-I-Expression, in einzelnen infizierten Zellen war aber eine gewisse Restexpression nachweisbar. Diese Restexpression wies dann häufig eine Oberflächenbetonung auf. Hingegen fanden sich nur wenige Zellen mit komplett erhaltener MHC-Klasse-I-Expression (Abb. 4). In nicht infizierten Nachbarzellen eines Infektionsherdes fand dagegen eine stärker ausgeprägte MHC-Klasse-I-Expression statt.

Im **Colon** fand sich eine fokale Verteilung der infizierten Zellen. Verschiedene Zelltypen waren infiziert, vor allem der Epithelschicht und der Tela submukosa, aber auch Endothelzellen. Die Dichte der infizierten Zellen nahm deutlich von der

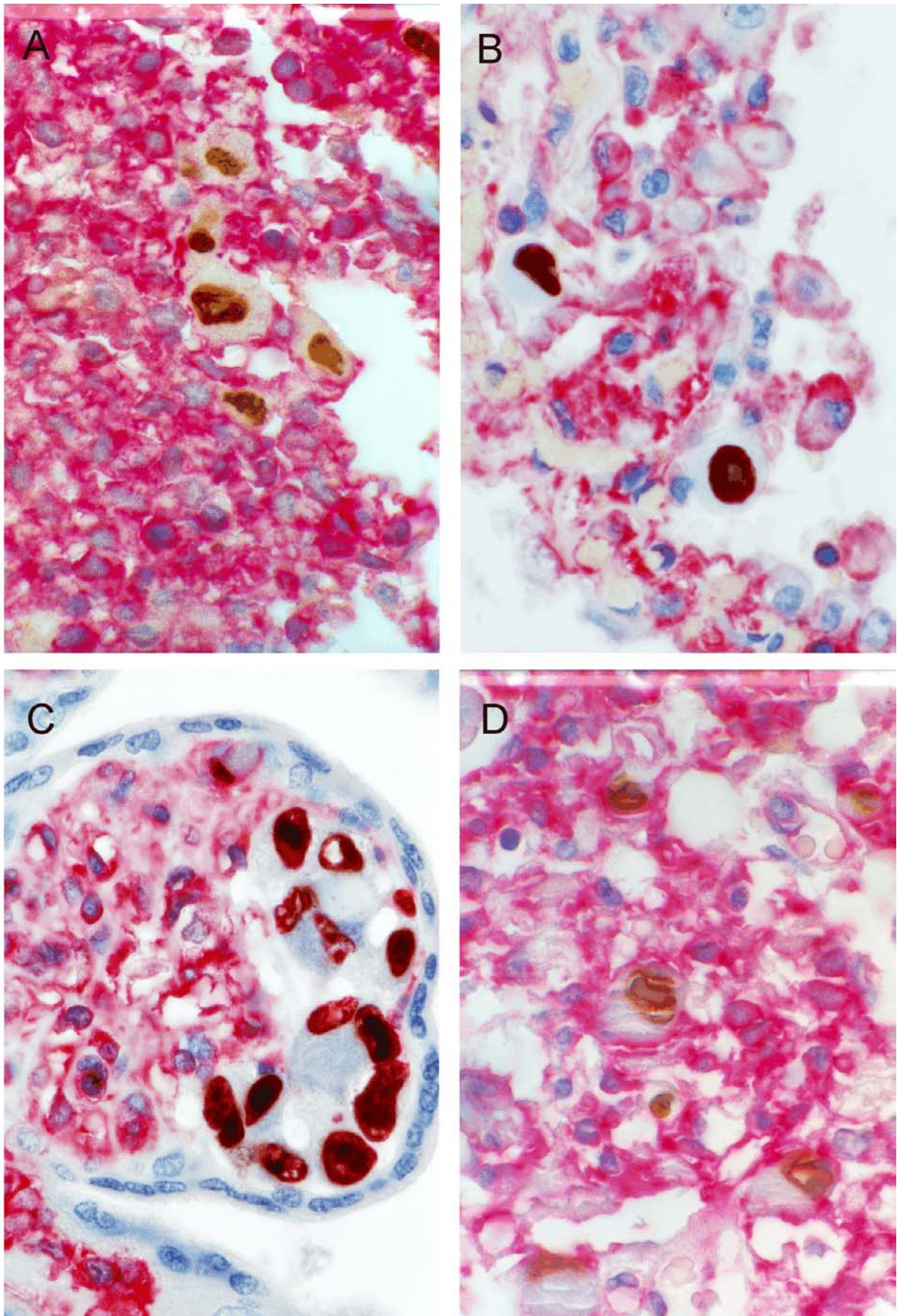


Abbildung 2: MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in HCMV-infizierten Geweben: A: Colon; B: Lunge; C: Plazenta; D: Hypophyse. Simultane Darstellung des sehr frühen Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) und MHC-Klasse-I (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) mittels immunohistochemischer Doppelfärbung; Gegenfärbung mit Hämalaun.



Epithelschicht zur Tela submukosa hin ab, und die Tunica serosa wies nur noch sehr vereinzelte HCMV–infizierte Zellen auf. Teilweise waren solche Infektionsherde deutlich gefäßassoziiert. Im Colon wurde eine starke Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle der HCMV-infizierten Zellen beobachtet. Während die nicht infizierten Zellen MHC-Klasse-I-positiv waren, wiesen ca. 100 % der infizierten Zellen keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche mehr auf. Außerdem war eine verstärkte MHC-Klasse-I–Expression der nicht infizierten Nachbarzellen in stark infizierten Arealen, wie der Epithelschicht und der Tela submukosa, festzustellen, während in kaum befallenen Gebieten, wie der Tunica muskularis und der Tunica serosa, auch nur eine schwache MHC-Klasse-I–Expression zu finden war.

In der **Lunge** wurde eine disseminierte Verteilung der HCMV–infizierten Zellen über das gesamte Gewebe festgestellt, wobei die infizierten Zellen teilweise gefäßassoziiert lagen. Es waren vor allem Zellen des Organstromas infiziert, wie auch Endothelzellen. Hier wurde eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Expression bei ca. 90 % der HCMV-infizierten Zellen gefunden.

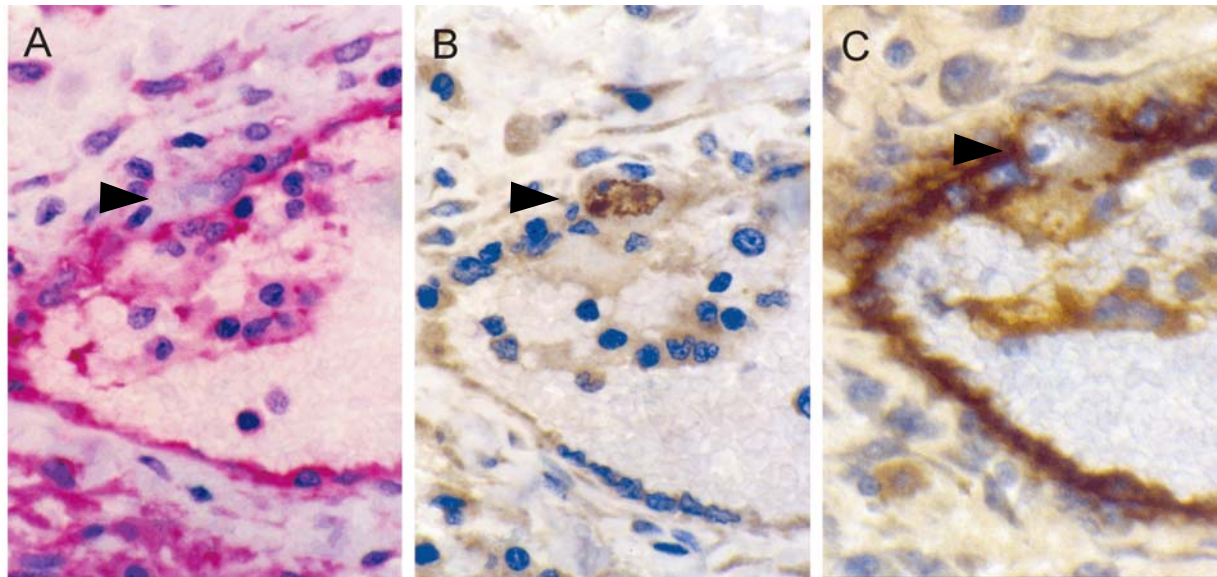


Abbildung 3: MHC-Klasse-I-Down-Regulierung HCMV-infizierter Endothelzelle (Pfeil) im Colon. A: Immunhistochemische Einfärbung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin), B: des späten Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb 28-4, StreptABC-HRP, DAB) sowie C: immunhistochemische Einfärbung des Endothelzell-Antigens (FVIII, braun, Zytoplasma und Zelloberfläche, StreptABC-HRP, DAB) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

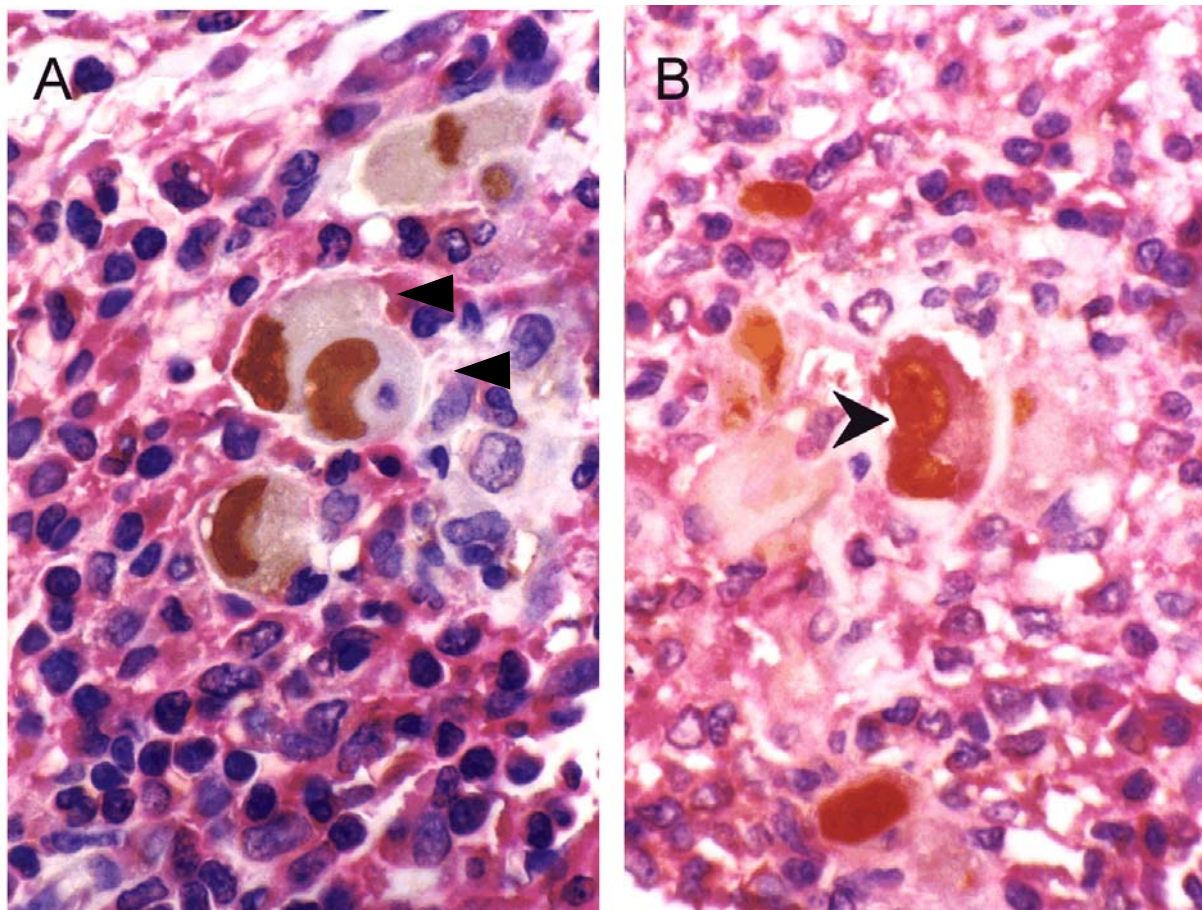


Abbildung 4: A: MHC-Klasse-I-Down-Regulierung (Pfeil nach links) sowie B: MHC-Klasse-I-Expression (Pfeil nach rechts) in HCMV-infizierten Zellen im Colon. Simultane Darstellung des sehr frühen Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) und MHC-Klasse-I (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung; Gegenfärbung mit Hämalaun.

In der **Plazenta** fanden sich sowohl stark infizierte Zotten, als auch Zotten mit mäßigem Infekt, sowie Zotten, die keine Infektion aufwiesen, über den gesamten Gewebeschnitt verteilt. Überwiegend waren Zellen des Organstromas infiziert. Es fanden sich jedoch auch infizierte Endothelzellen. Auch hier war ein erheblicher Anteil der infizierten Zellen gefäßassoziiert. Bei ca. 50 % der infizierten Zellen wurde eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle festgestellt. Die Zellen des Trophoblasten wiesen keine MHC-Klasse-I-Moleküle auf.

In der **Hypophyse** beschränkte sich die HCMV-Infektion auf ein bestimmtes Gewebeareal. Ebenso wie bereits bei den anderen Gewebeschnitten beschrieben, bestand auch hier die Mehrzahl der infizierten Zellen aus Zellen des Organstromas. Teilweise fanden sich gefäßassoziierte infizierte Zellen oder infizierte Endothelzellen.

Ca. 80 % der HCMV-infizierten Zellen waren MHC-Klasse-I-negativ. Hier konnte zusätzlich am Ort der Infektion eine verstärkte MHC-Klasse-I-Expression in nicht infizierten Nachbarzellen festgestellt werden. Ebenso wie im Colon, konnte auch in der Hypophyse in nicht infizierten Gewebearealen nur eine mäßige MHC-Klasse-I-Expression beobachtet werden.

Allen untersuchten Gewebepräparaten war also gemeinsam, dass verschiedene Zelltypen infiziert waren. Es fanden sich infizierte Zellen in der Nähe von Gefäßen, ebenso wie infizierte Endothelzellen. Darüber hinaus wurde im Colon deutlich, dass sich die HCMV-Infektion vom Epithel über die Tela submukosa bis zur Tunica serosa ausbreitete. Insgesamt lässt sich sagen, dass in HCMV-infizierten Zellen eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle festgestellt wurde, allerdings nicht in allen infizierten Zellen. Dies war in allen untersuchten Geweben der Fall, wobei zusätzlich im Colon, in der Plazenta und in der Hypophyse eine Induktion von MHC-Klasse-I in nicht infizierten Nachbarzellen festgestellt werden konnte.

#### ***4.2 Eine Downregulierung der MHC-Klasse-I-Expression ist in allen Phasen der viralen Replikation nachweisbar, bleibt jedoch teilweise inkomplett***

Die Simultanfärbung des sehr frühen Genproduktes von HCMV sowie der MHC-Klasse-I-Moleküle hatte den Befund einer Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen in infizierten Zellen ergeben, wobei jedoch einzelne infizierte Zellen durchaus eine erhaltene MHC-Klasse-I-Expression aufwiesen. Diese warf nun die Frage auf, in welchen Phasen der viralen Replikation die Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen einsetzt. Insbesondere war die Vermutung zu überprüfen, bei den Zellen mit erhaltener MHC-Klasse-I-Expression handelte es sich um Zellen im sehr frühen Infektionsstadium, während mit Fortschreiten der viralen Replikation das Ausmaß der MHC-Klasse-I-Down-Regulierung zunehme. Dies würde bedeuten, dass in einem bestimmten Zeitfenster nach Infektion infizierte Zellen von zytotoxischen T-Zellen erkannt würden, während im späten Stadium der Replikation

die infizierten Zellen einer Lyse durch zytotoxische T-Zellen weniger zugänglich wären. Die Verwendung von Antikörpern gegen sehr frühe, frühe und späte virale

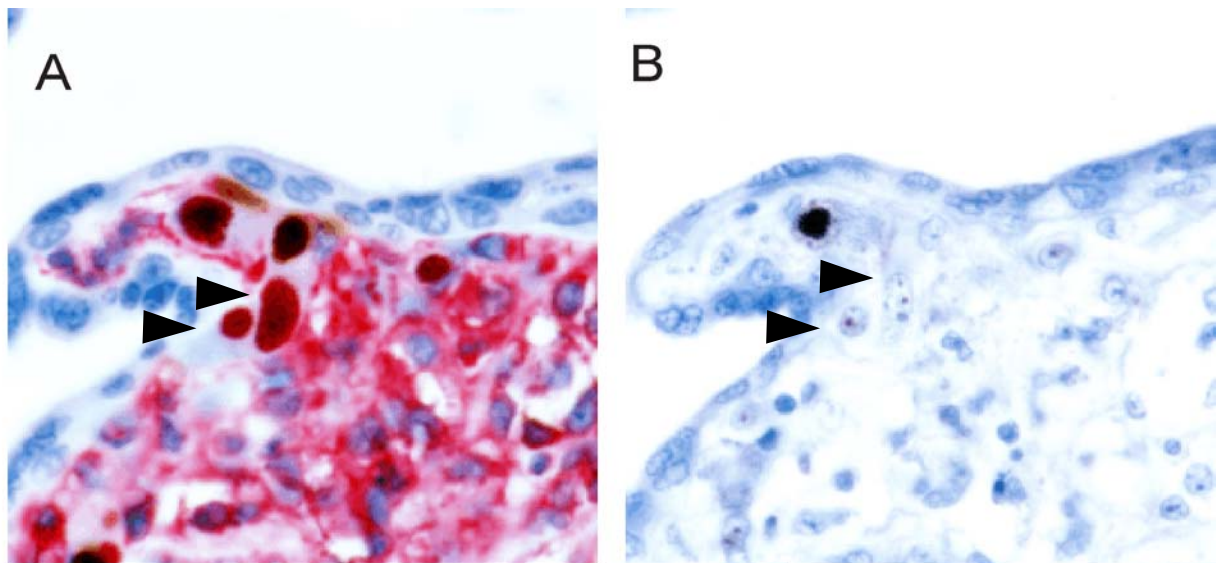


Abbildung 5: MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in sehr früh infizierten Zellen (Pfeile) in der Plazenta. A: Simultane Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und B: immunhistochemische Einfachfärbung des frühen Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb BS505, Strept-ABC-HRP, DAB) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

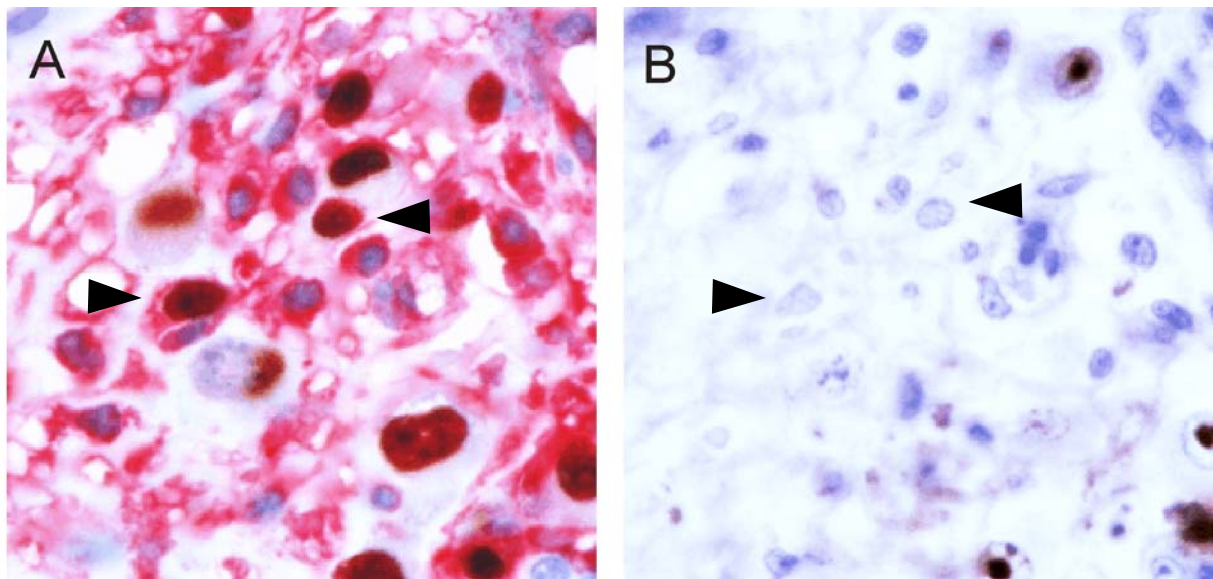


Abbildung 6: MHC-Klasse-I-Expression (Pfeile nach rechts) sowie MHC-Klasse-I-Down-Regulierung (Pfeile nach links) in sehr früh infizierten Zellen in der Plazenta. A: Simultane Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und B: immunhistochemische Einfachfärbung des frühen Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb BS505, Strept-ABC-HRP, DAB) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

Antigene erlaubte es, diese Hypothese zu überprüfen. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sehr frühe Antigene ab 2 h nach Infektion exprimiert werden und dann während der gesamten Replikation nachweisbar bleiben. Frühe Antigene werden mit Beginn der DNA-Replikation in infizierten Zellen exprimiert und bleiben dann ebenfalls für den restlichen Replikationszyklus nachweisbar, wohingegen späte Antigene erst nach erfolgter DNA-Replikation nachweisbar sind. Zellen im sehr frühen Replikationsstadium weisen daher nur sehr frühes Antigen auf, Zellen im frühen Stadium sowohl sehr frühes als auch frühes Antigen und Zellen im späten Stadium alle drei Antigenklassen. Durch vergleichende Untersuchung von Serienschnitten, in denen mittels immunhistochemischer Doppelfärbung das sehr frühe Genprodukt, das frühe Genprodukt und das späte Genprodukt von HCMV sowie gleichzeitig MHC-Klasse-I-Moleküle gefärbt wurden, konnte auf diese Weise das Phänomen der MHC-Klasse-I-Down-Regulierung den einzelnen Phasen der viralen Replikation zugeordnet werden.

Im Prinzip war eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in allen Phasen der viralen Replikation – sehr früh, früh und spät – nachweisbar. Das Fehlen der MHC-Klasse-I-

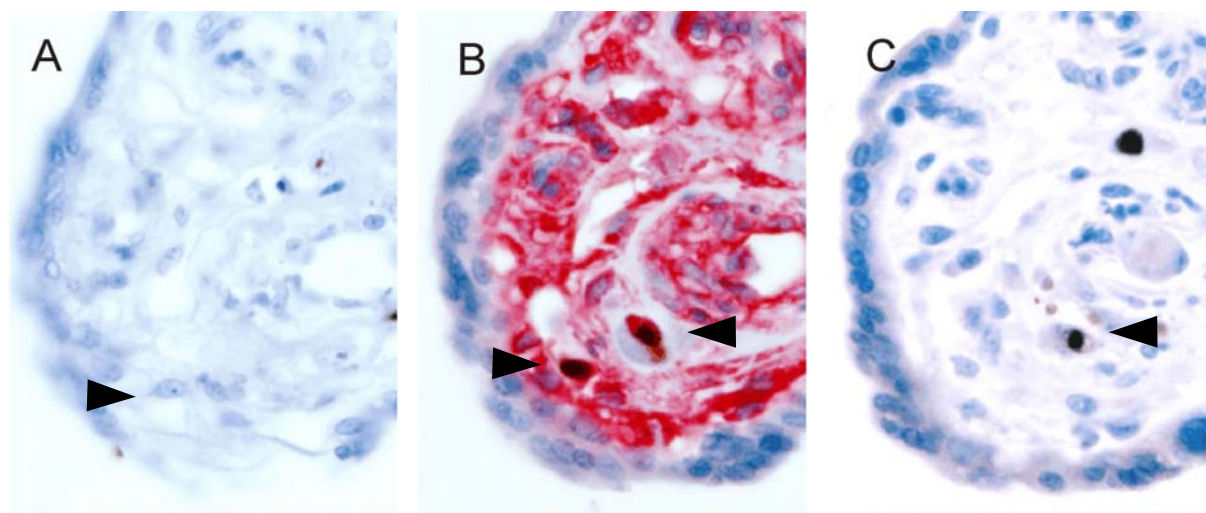


Abbildung 7: MHC-Klasse-I-Expression in sehr früh infizierter Zelle (Pfeil nach rechts) bei gleichzeitiger MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in spät infizierter Zelle (Pfeil nach links) in der Plazenta. A: Immunhistochemische Einfachfärbung des frühen Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb BS505, Strept-ABC-HRP, DAB) sowie B: simultane Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und C: immunhistochemische Einfachfärbung des späten Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb 28-4, Strept-ABC-HRP, DAB) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

Moleküle war hierbei in der späten Phase häufiger und stärker ausgeprägt, als in den sehr frühen und frühen Replikationsstadien. Die Down-Regulierung betraf verschiedene Zelltypen, unter anderem auch Endothelzellen von Blutgefäßen. In allen untersuchten Geweben konnte das Fehlen der MHC-Klasse-I-Expression im gesamten Präparat festgestellt werden. Meistens betraf die Down-Regulierung sowohl das Zytoplasma, als auch die Zelloberfläche. Einige Zellen wiesen jedoch auch weiterhin eine Restexpression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche auf. Allerdings waren nicht alle infizierten Zellen von der Down-Regulierung betroffen. In einer Minderzahl der infizierten Zellen konnte in allen Replikationsphasen - in der sehr frühen häufiger als in späteren Phasen - eine weiterhin bestehende MHC-Klasse-I-Expression festgestellt werden (Abb. 5 - 9). Diese infizierten Zellen mit einer fortbestehenden MHC-Klasse-I-Expression fanden sich in sämtlichen untersuchten Gewebepreparaten, wobei wiederum verschiedene Zelltypen, so auch Endothelzellen betroffen waren.

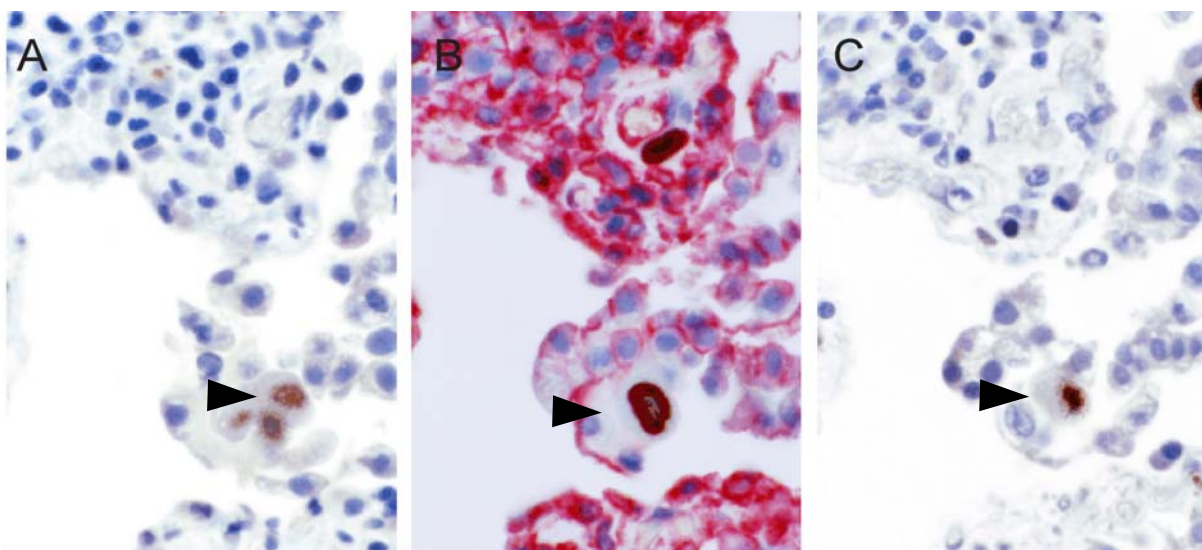


Abbildung 8: MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in spät infizierter Zelle (Pfeil) in der Lunge. A: Immunhistochemische Einfachfärbung des frühen Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb BS505, Strept-ABC-HRP, DAB) sowie B: simultane Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und C: immunhistochemische Einfachfärbung des späten Antigens von HCMV (braun, nukleär, MAb 28-4, Strept-ABC-HRP, DAB) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die MHC-Klasse-I-Down-Regulierung zwar in der späten Replikationsphase stärker ausgeprägt, aber im Prinzip schon in der sehr

frühen Phase nachweisbar ist. Dabei ist eine Restexpression von MHC-Klasse-I teilweise bis ins späte Replikationsstadium nachweisbar.

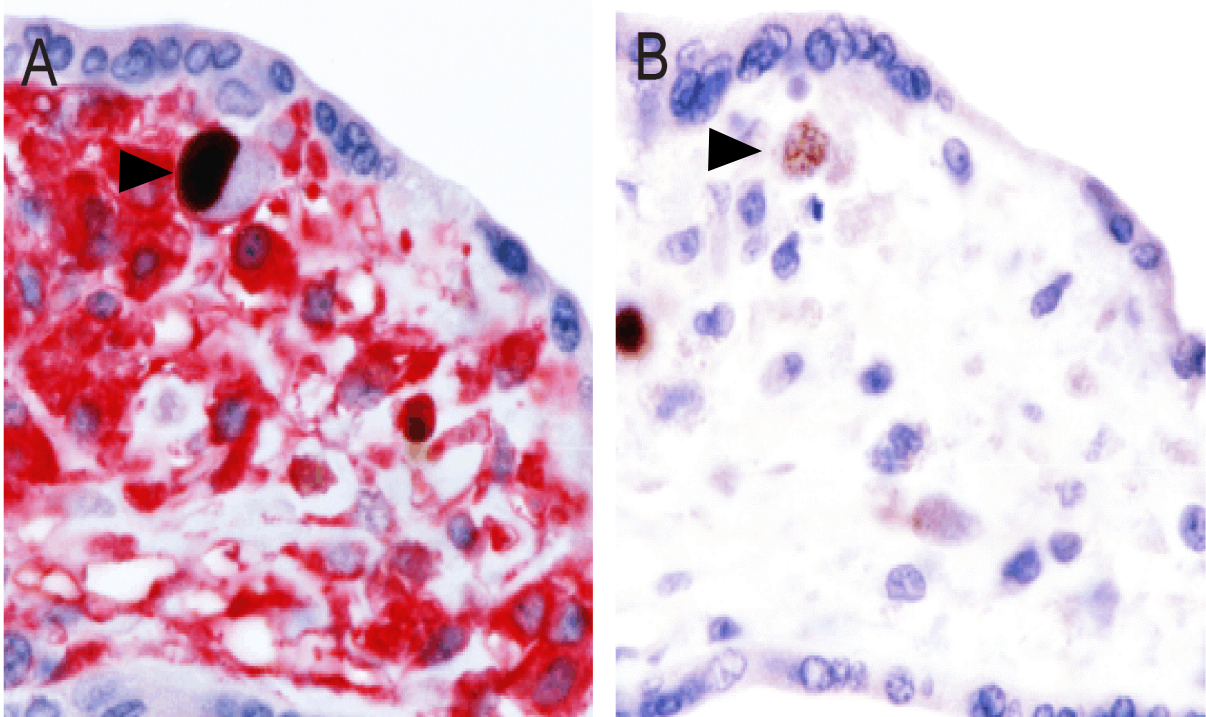


Abbildung 9: MHC-Klasse-I-Restexpression in spät infizierter Zelle (Pfeil) in der Plazenta. A: Simultane Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und B: immunhistochemische Einfachfärbung des späten Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb 28-4, Strept-ABC-HRP, DAB) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

#### **4.3 Trotz MHC-Klasse-I-Downregulierung ist eine inflammatorische Antwort auf HCMV-infizierte Zellen nachweisbar**

Die vorangegangenen Abschnitte hatten erstmals in vivo ein Potential von HCMV zur Immunevasion durch MHC-Klasse-I-Down-Regulierung gezeigt. Damit ist die Frage aufgeworfen, inwiefern sich dies auf die zytotoxische T-Zell-Antwort auswirkt. Zweierlei ist denkbar:

1. Die Fähigkeit der infizierten Zellen zur Antigenpräsentation kann soweit herabgesetzt sein, dass eine Erkennung durch entsprechende spezifische zytotoxische T-Zellen nicht mehr möglich ist.

2. Trotz einer Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen kann die verbliebene Fähigkeit zur Antigenpräsentation ausreichend sein, um zu einer Erkennung und Lyse durch T-Zellen zu führen.

Eine immunhistochemische Analyse in formalinfixierten paraffineingebetteten Gewebeschnitten kann sich dieser Frage nur indirekt nähern. Im Vordergrund stand der Nachweis CD8+ zytotoxischer T-Zellen im infizierten Gewebe. Mithilfe geeigneter Serienschnitte wurde eine Assoziation der infiltrierten CD8+ T-Zellen mit Infektionsherden untersucht bis hin zur Kolo-kalisation zytotoxischer T-Zellen mit einzelnen HCMV-infizierten Zellen. Hierfür wurden immunhistochemische Doppelfärbungen des sehr frühen Genproduktes von HCMV und des Leukozyten-Antigens verwendet. Für die Serienschnitte wurden immunhistochemische Färbungen entweder des Leukozyten-Antigens oder CD8+ Lymphozyten angefertigt. Um das räumliche Zusammentreffen von Leukozyten und MHC-Klasse-I-Molekülen vergleichen zu können, wurden in Serienschnitten immunhistochemische Doppelfärbungen durchgeführt, wobei einmal das sehr frühe Genprodukt von HCMV und MHC-Klasse-I-Moleküle gefärbt wurden, im Nachbarschnitt aber das sehr frühe Genprodukt von HCMV und Leukozyten-Antigen. Zusätzlich wurden bei entsprechenden Serienschnitten CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten dargestellt.

Wiederum hatte die Analyse von infiziertem Plazentagewebe einen besonderen Stellenwert:

1. Einerseits sind im Plazentagewebe keine zusätzlichen Erreger vorhanden, andererseits wurde das Gewebe nicht mit antiviralen Chemotherapeutika vorbehandelt, so dass sämtliche pathologischen Aspekte, wie eine Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle sowie das Vorhandensein inflammatorischer Zellen auf eine HCMV-Infektion zurückzuführen ist.
2. Die Besonderheit der Plazentazotten besteht darin, dass es sich hierbei um räumlich voneinander getrennte und in sich begrenzte Gewebe handelt, so dass eine Infektion mit ihren Folgen deutlich als zusammengehörig erkannt werden kann und durch Auszählungen zu quantifizieren ist.



In stark infizierten Gewebearealen – wie der Epithelschicht und der Tela submukosa des **Colons** – fand sich auch eine vermehrte Leukozyten-Infiltration, wobei sich die Leukozyten um die HCMV-infizierten Zellen gruppierten. In schwächer befallenen Gewebearealen konnte dagegen auch nur eine schwächere Leukozyten-Dichte beobachtet werden, allerdings auch hier in deutlicher Gruppierung der Leukozyten um einzelne Infektionsherde. Ebenso konnte auf Einzelzellebene die räumliche Assoziation inflammatorischer Zellen mit einzelnen infizierten Zellen festgestellt werden (Abb. 10). Es stellte sich heraus, dass die Mehrzahl der inflammatorischen Zellen aus CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten bestand. Hierbei war auffällig, dass in stark infizierten Geweben, wie der Epithelschicht und der Tela submukosa des Colons, eine massive MHC-Klasse-I-Expression der Nachbarzellen festzustellen und gleichzeitig hier eine stärkere Leukozyten-Infiltration anzutreffen war. Einzelne

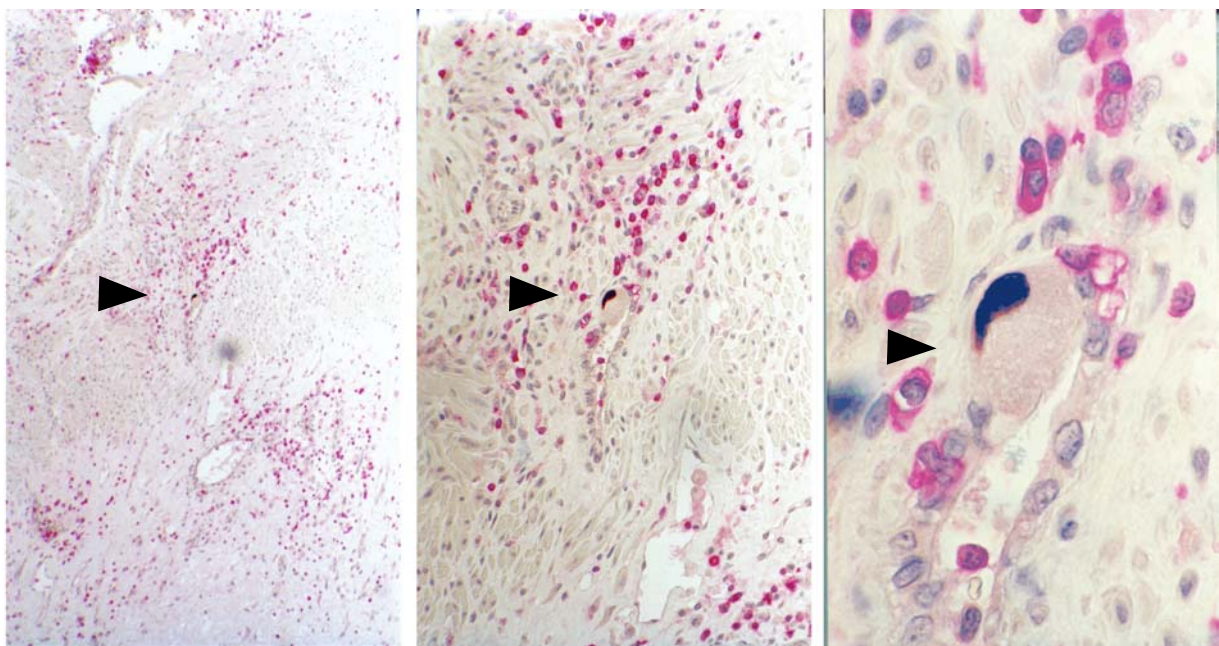


Abbildung 10: Infiltrat inflammatorischer Zellen um HCMV-infizierte Zelle (Pfeil) im Colon. Simultane Darstellung des sehr frühen Antigens von HCMV (braun, nukleär, MA b E13, StreptABC-HRP, DAB) sowie des Leukozyten-Antigens (LCA, rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, StreptABC-AP, Fuchsin) mittels immunohistochemischer Doppelfärbung; Gegenfärbung mit Hämalaun.

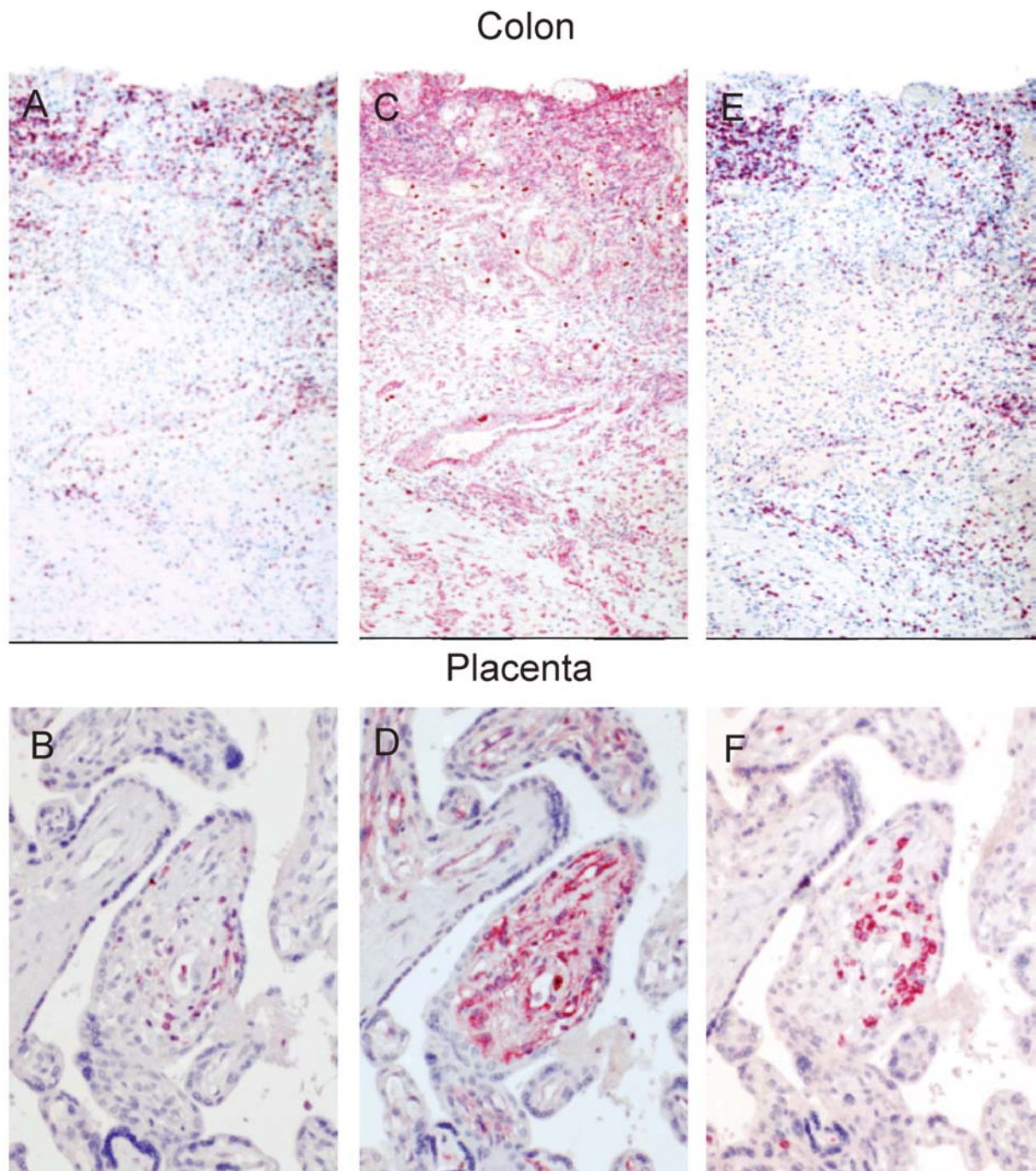


Abbildung 11: Kolokalisation von MHC-Klasse-I-Molekülen und inflammatorischen Zellen in HCMV-infiziertem Gewebe des Colons und der Plazenta. A, B: Immunhistochemische Einfachfärbung des Leukozyten-Antigens (LCA, rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, StreptABC-AP, Fuchsin) sowie C, D: simultane Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, Mab E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und E, F: immunhistochemische Einfachfärbung zytotoxischer T-Lymphozyten (CD8, rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, StreptABC-AP, Fuchsin) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

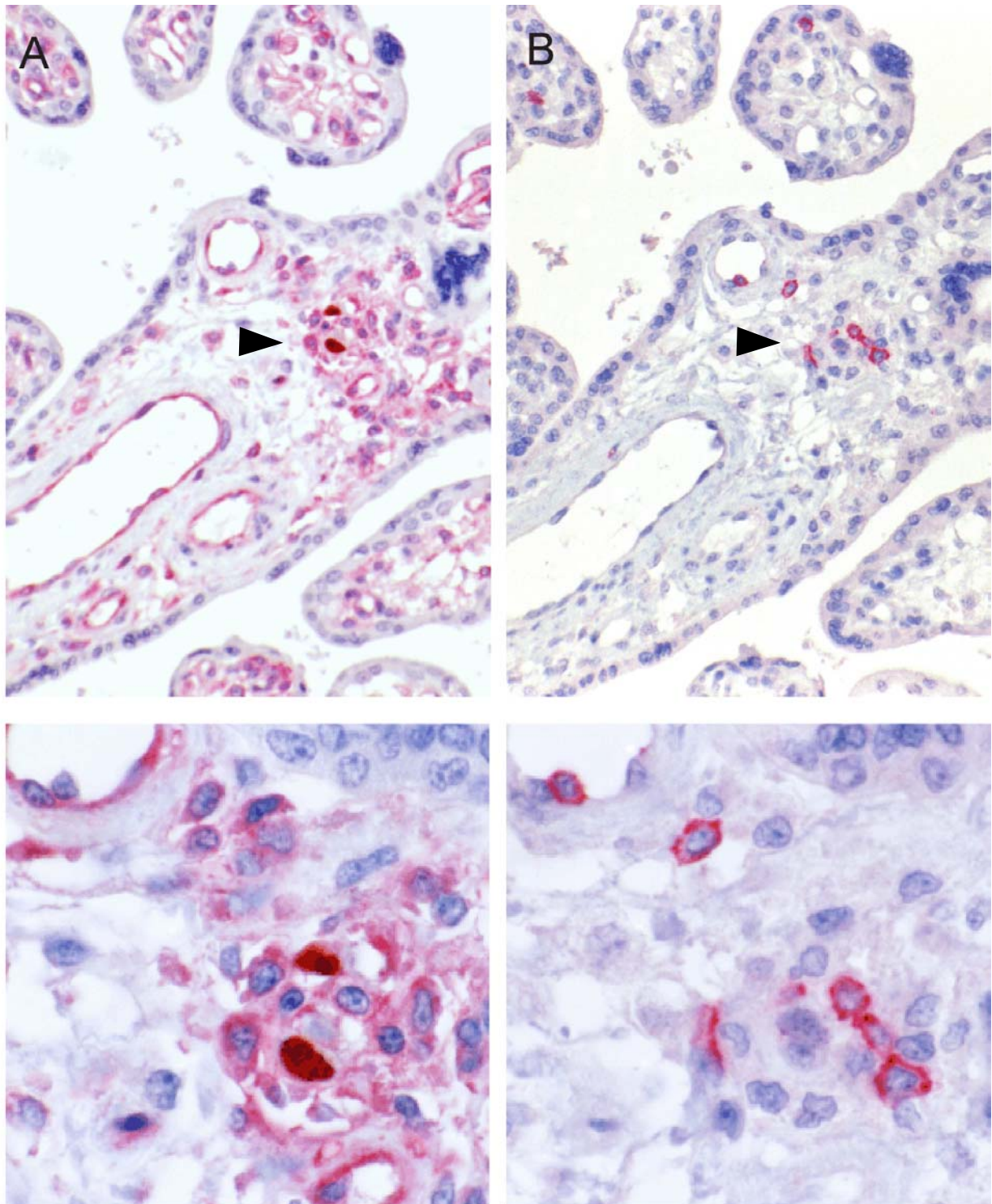


Abbildung 12: Kolokalisation von MHC-Klasse-I-Molekülen und zytotoxischen T-Lymphozyten in HCMV-infiziertem Gewebe der Plazenta (Pfeil). A: Simultane Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HC10, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, Mab E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung und B: immunhistochemische Einfachfärbung zytotoxischer T-Lymphozyten (CD8, rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, StreptABC-AP, Fuchsin) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

infizierte Zellen dagegen wiesen eine vollständige Down-Regulierung an MHC-Klasse-I-Molekülen auf. In weniger stark befallenen Gewebearealen, wie der Tunica muskularis und der Tunica serosa des Colons, fand sich auch eine schwächere MHC-Klasse-I-Expression der nicht infizierten Nachbarzellen und weniger Leukozyten. Auch in diesen Arealen waren die einzelnen infizierten Zellen durch das komplette Fehlen an MHC-Klasse-I-Molekülen gekennzeichnet (Abb. 11, 12).

In der **Plazenta** konnte, wie schon im Colon, eine deutliche Assoziation infiltrierter Immunzellen in infizierten Arealen festgestellt werden, was sich auch über kleinere Infektionsherde bis hin auf Einzelzellebene weiter verfolgen ließ. Wiederum waren an den inflammatorischen Infiltraten hauptsächlich CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten beteiligt. Hier konnte durch Auszählung der infizierten Zotten die Assoziation der HCMV-infizierten Zellen mit Leukozyten festgestellt werden (Tab. 3):

Tabelle 3: Assoziation HCMV-infizierter Zellen mit Leukozyten in Plazentazotten.

	<b>Anteil der Zotten</b>
<b>HCMV positiv Leukozyten-Antigen positiv</b>	ca. 10 %
<b>HCMV positiv Leukozyten-Antigen negativ</b>	0 %
<b>HCMV negativ Leukozyten-Antigen positiv</b>	ca. 50 %
<b>HCMV negativ Leukozyten-Antigen negativ</b>	ca. 40 %

- So wiesen 40 % der Zotten weder einen Infekt, noch ein inflammatorisches Infiltrat auf.
- In 50 % der Zotten konnten Leukozyten nachgewiesen werden, eine HCMV-Infektion lag aber nicht vor.

- In 10 % der Zotten fand sich sowohl ein HCMV-Infekt, als auch ein Leukozyten-Infiltrat.
- In keiner der Zotten konnte eine HCMV-Infektion ohne Leukozyten festgestellt werden.

Demnach waren alle virus-infizierten Zellen von Leukozyten umgeben.

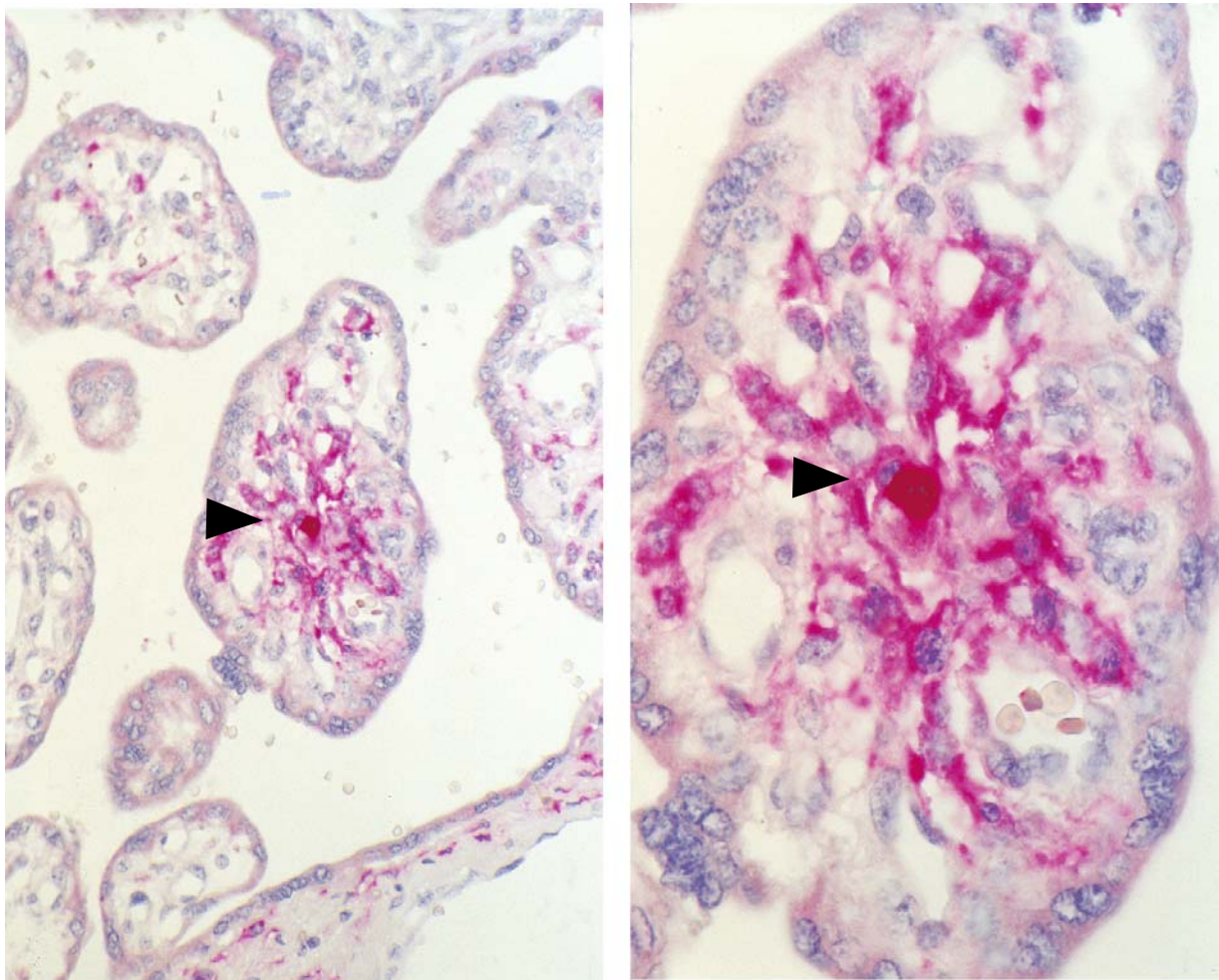


Abbildung 13: MHC-Klasse-II-Expression um HCMV-infizierte Zelle (Pfeil) in der Plazenta. Simultane Darstellung von MHC-Klasse-II-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HLA-DR, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung; Gegenfärbung mit Hämalaun.

Wie schon im Colon beobachtet, fanden sich auch in der Plazenta in stark infizierten Zotten neben einem deutlichen Infiltrat an inflammatorischen Zellen auch eine starke Expression an MHC-Klasse-I-Molekülen. Die einzelnen infizierten Zellen waren

dabei meistens down-reguliert. Trotzdem konnten auch einige infizierte Zellen gefunden werden, die noch eine Restexpression an MHC-Klasse-I aufwiesen.

Zusammenfassend zeigten diese Färbungen, dass eine Infiltration infizierter Areale durch zytotoxische T-Zellen durchaus stattfindet, und auch auf Einzelzellebene ein enger Kontakt zwischen infizierten Zellen und CD8+ T-Lymphozyten erfolgt, der eine spezifische Erkennung und Lyse infizierter Zellen durchaus möglich erscheinen lässt. Insgesamt lässt sich festhalten, dass sich Leukozyten vor allem in der Nähe von HCMV-infizierten Zellen fanden, die selbst oder deren Nachbarzellen MHC-Klasse-I-Moleküle exprimierten.

Ergänzend wurde durch Nachweis HLA-DR/DQ/DP-exprimierender Zellen in der Umgebung von Infektionsherden untersucht, ob eine MHC-Klasse-II-restringierte Antigenpräsentation als Voraussetzung für eine lokal funktionierende T-Zell-Hilfe vorhanden ist. Dies wurde durch immunhistochemische Doppelfärbungen von Serienschnitten dargestellt, bei denen zum einen das sehr frühe Genprodukt von HCMV sowie MHC-Klasse-II-Moleküle gefärbt wurden, zum anderen das sehr frühe Genprodukt von HCMV sowie Leukozyten-Antigen und zusätzlich das sehr frühe Genprodukt von HCMV sowie MHC-Klasse-I-Moleküle. Auf diese Weise wurde in benachbarten Präparaten sowohl die MHC-Klasse-II-Expression in Zusammenhang mit infizierten Zellen, als auch die räumliche Anwesenheit von Leukozyten und MHC-Klasse-I nachgewiesen.

Als Untersuchungsgewebe dienten wiederum die Zotten der **Plazenta**. HCMV-infizierte Zellen selbst wiesen zwar nur selten eine MHC-Klasse-II-Expression auf, es fand sich aber, dass sämtliche Infektionsherde stets von MHC-Klasse-II-exprimierenden Nachbarzellen umgeben waren. Dabei war eine deutliche Gruppierung der MHC-Klasse-II-exprimierenden Zellen um die infizierten Zellen zu erkennen.

Die Assoziation HCMV-infizierten Zellen mit einer MHC-Klasse-II-Expression stellte sich in den Zotten folgendermaßen dar (Tab. 4):

- So waren 60 % der Zotten weder HCMV-infiziert, noch befanden sich MHC-Klasse-II-exprimierende Zellen in der Nähe.

- In 30 % der Zotten fanden sich MHC-Klasse-II-positive Zellen ohne gleichzeitige HCMV-Infektion.
- In 10 % der Zotten lag eine HCMV-Infektion vor, assoziiert mit einer MHC-Klasse-II-Expression.
- Es fanden sich keine Zotten, in denen eine HCMV-Infektion ohne MHC-Klasse-II-Expression vorhanden gewesen wäre.

Tabelle 4: Assoziation HCMV-infizierter Zellen mit MHC-Klasse-II-Expression in Plazentazotten.

	<b>Anteil der Zotten</b>
<b>HCMV positiv MHC-Klasse-II positiv</b>	ca. 10 %
<b>HCMV positiv MHC-Klasse-II negativ</b>	0 %
<b>HCMV negativ MHC-Klasse-II positiv</b>	ca. 30 %
<b>HCMV negativ MHC-Klasse-II negativ</b>	ca. 60 %

In unmittelbarer Umgebung HCMV-infizierter Zellen, die selbst oder deren Nachbarzellen MHC-Klasse-II-Moleküle exprimierten, fanden sich neben einer massiven Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle auf nicht infizierten Nachbarzellen auch vermehrt Leukozyten-Infiltrationen. Teilweise wiesen auch HCMV-infizierte Zellen eine Restexpression an MHC-Klasse-I-Molekülen auf ihrer Oberfläche auf. So konnte beobachtet werden, dass in stark infizierten Plazentazotten sowohl eine massive MHC-Klasse-II-Expression als auch eine Induktion an MHC-Klasse-I sowie große Leukozyten-Ansammlungen zu finden waren, während in weniger stark befallenen Gewebearealen, wie in einzelnen Zotten der Plazenta, eine schwächere MHC-Klasse-II-Expression stattfand und gleichzeitig weniger Leukozyten gefunden

wurden, und auch die MHC-Klasse-I-Expression schwächer ausfiel. In nicht infizierten Zotten der Plazenta konnte in der Mehrzahl der Fälle weder eine MHC-Klasse-II-Expression gefunden werden, noch eine Induktion von MHC-Klasse-I-Molekülen, sondern eine normale Expression der MHC-Klasse-I-Moleküle auf nicht infizierten Zellen. Teilweise fanden sich in nicht infizierten Zotten auch keine infiltrierten inflammatorische Zellen.

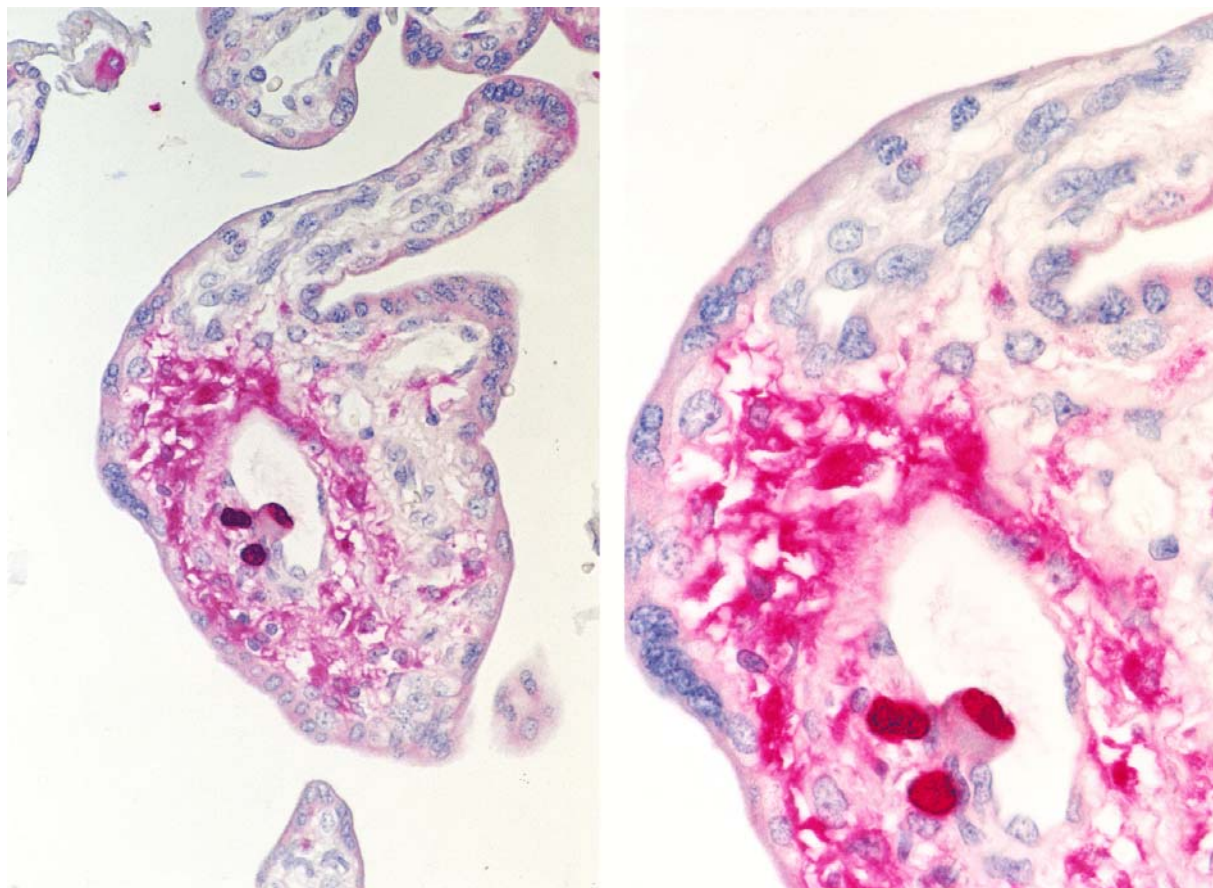


Abbildung 14: MHC-Klasse-II-Expression um HCMV-infizierte Endothelzelle in der Plazenta. Simultane Darstellung von MHC-Klasse-II-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HLA-DR, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung; Gegenfärbung mit Hämalaun.

Zusammenfassend konnte also beobachtet werden, dass alle HCMV-infizierten Zellen auch von MHC-Klasse-II-exprimierenden Nachbarzellen umgeben waren (Abb. 13, 14). Hierbei fanden sich auch vereinzelt HCMV-infizierte Zellen, die gleichzeitig auf ihrer Oberfläche MHC-Klasse-II-Moleküle aufwiesen. Es lässt sich festhalten, dass sich Leukozyten vor allem in der Nähe von HCMV-infizierten Zellen



fanden, die selbst oder deren Nachbarzellen MHC-Klasse-II-Moleküle exprimierten (Abb. 15). Zusätzlich fand sich in infizierten Gewebearealen sowohl eine massive MHC-Klasse-I-, als auch eine deutliche MHC-Klasse-II-Expression.

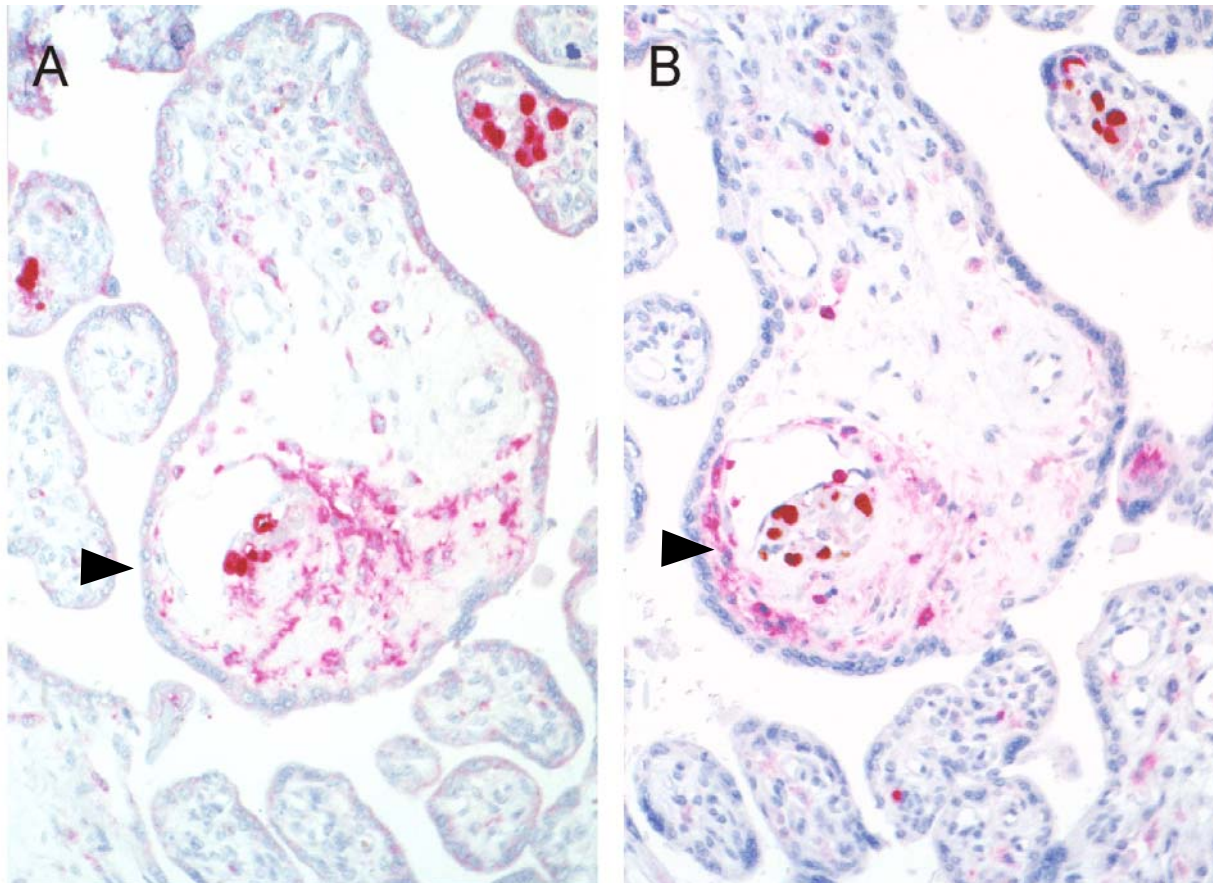


Abbildung 15: MHC-Klasse-II-Expression in Assoziation mit HCMV-infizierten Zellen sowie Leukozyten in der Plazenta (Pfeil). A: Simultane Darstellung von MHC-Klasse-II-Molekülen (rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, MAb HLA-DR, StreptABC-AP, Fuchsin) und sehr frühem Antigen von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) mittels immunhistochemischer Doppelfärbung sowie B: des Leukozyten-Antigens (LCA, rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, StreptABC-AP, Fuchsin) und des sehr frühen Antigens von HCMV in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

#### **4.4 Die Immunreaktion scheint zu einer Begrenzung der HCMV-Infektion im Gewebe zu führen**

Angesichts der räumlichen Assoziation von T-Zell-Infiltrationen mit Infektionsherden stellte sich die Frage, ob sich in dem untersuchten Gewebe Anzeichen für eine funktionelle Effizienz dieser Infiltrate finden lassen. Als indirekte Hinweise auf eine antivirale Wirksamkeit der dargestellten T-Zellen wurden die Fragen untersucht,

1. ob T-Zell-Infiltrate eine Grenze für die Ausdehnung von Infektionsherden bilden und
2. ob eine reziproke Beziehung zwischen der Anzahl infiltrierter Leukozyten und infizierter Zellen in Plazentazotten eine antivirale Aktivität der T-Zellen nahelegt.

Wie bereits zuvor erwähnt, sind Infektionsherde oft von inflammatorischen Infiltraten umgeben, welche tatsächlich auch die Begrenzung dieses Herdes bilden (Abb. 10 – 12).

Andererseits konnten in einigen **Plazentazotten** folgende gegensätzliche Entdeckungen gemacht werden: So konnten in einigen Gebieten mit starkem HCMV-Infekt nur wenige inflammatorische Zellen nachgewiesen werden, während in anderen Arealen mit mäßigem Infekt ein größeres Leukozyten-Infiltrat festgestellt wurde. Hinzu kamen einige Zotten, in denen sich um wenige infizierte Zellen herum eine große Leukozyten-Ansammlung befand (Abb. 16).

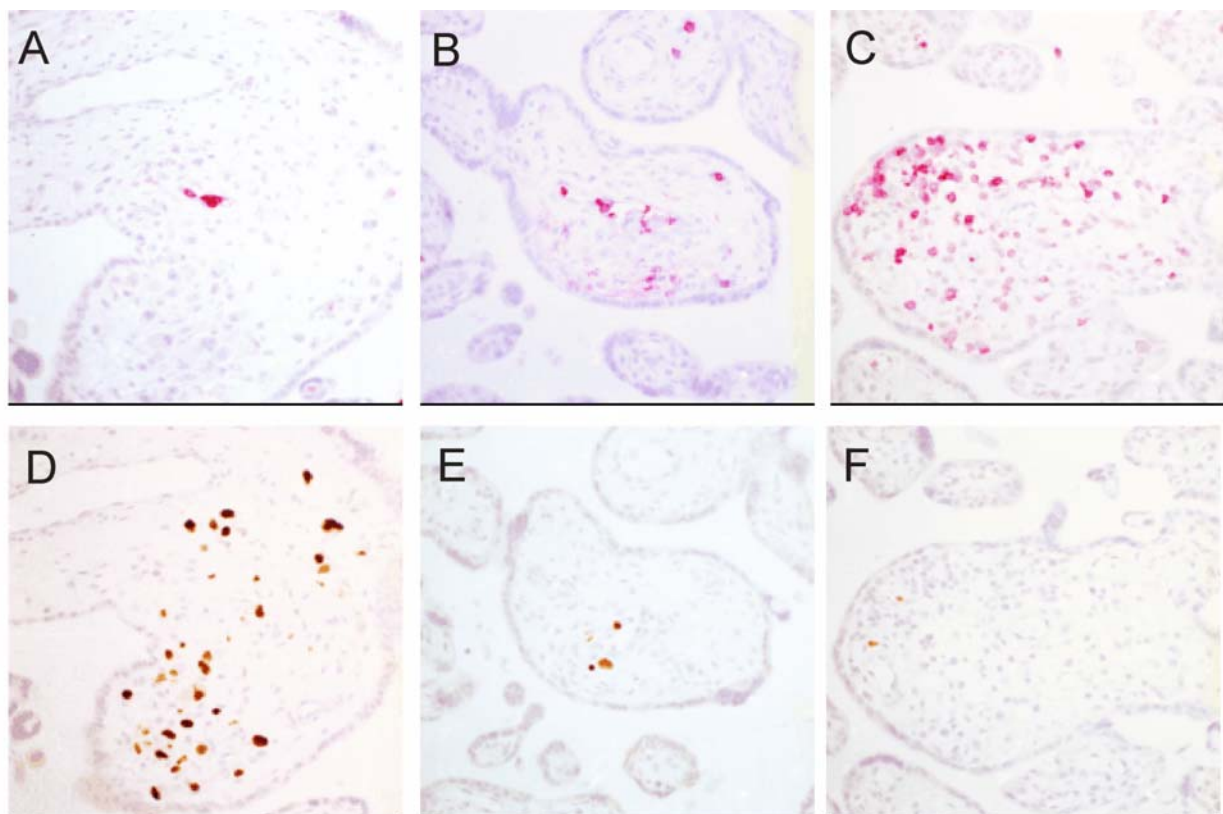


Abbildung 16: Reziproke Assoziation von Leukozyten und HCMV-infizierten Zellen in der Plazenta. A, B, C: Immunhistochemische Einfärbung des Leukozyten-Antigens (LCA, rot, Zytoplasma und Zelloberfläche, StreptABC-AP, Fuchsin) sowie D, E, F: immunhistochemische Einfärbung des sehr frühen Antigenes von HCMV (braun, nukleär, MAb E13, StreptABC-HRP, DAB) in Serienschnitten; Gegenfärbung mit Hämalaun.

Insgesamt ergab sowohl die räumliche Anordnung der Lymphozyten-Infiltrate um Infektionsherde herum, als auch das reziproke Zahlenverhältnis von Leukozyten und infizierten Zellen in der Plazenta einen indirekten Hinweis darauf, dass die CD8+ T-Zell-Antwort auch effizient ist im Sinne einer Begrenzung der Ausbreitung von HCMV im Gewebe.

## 5 Diskussion

Das humane Cytomegalovirus (HCMV) ist in der Lage, lebenslang im menschlichen Organismus zu persistieren (Alford & Britt, 1990, Pass, 2001). Um dies trotz einer bekanntermaßen sehr ausgeprägten humoralen (Roitt et al., 1993) wie zellulären Immunreaktion (Riddell & Greenberg, 1994, Riddell et al., 1992, Rotzschke et al., 1990) zu gewährleisten, muss HCMV in der Lage sein, auf eine oder mehrere Weisen das Immunsystem zu umgehen. Als möglicher Mechanismus einer solchen Immunevasion wurde für HCMV in Zellkultur die Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen bereits gezeigt (Beersma et al., 1993, Benz et al., 2001, Hengel et al., 1996, Steinmassl & Hamprecht, 1994, Warren et al., 1994, Yamashita et al., 1993). Inwieweit dieser Mechanismus jedoch auch in vivo von Bedeutung ist, war unklar. Diese Arbeit zeigt erstmals, dass sich HCMV nicht nur in vitro, sondern auch in vivo der Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Komplexen auf infizierten Zellen als Strategie der Immunevasion bedient. Virus-infizierte Zellen präsentieren mit Hilfe von MHC-Klasse-I-Molekülen Virusantigen und werden so von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt und zerstört (Rotzschke et al., 1990). Die Folge der Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen wäre eine verminderte Antigenpräsentation HCMV-infizierter Zellen und damit eine verminderte T-Zell-Lyse (Warren et al., 1994). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch andererseits auch, dass vor allem bei früh infizierten Zellen eine residuale Expression noch vorhanden ist und infizierte Gewebeareale durchaus mit zytotoxischen T-Zell-Infiltraten assoziiert sind. So verdeutlicht diese Arbeit, dass HCMV in infizierten Zellen zwar eine Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen als Mechanismus der Immunevasion bewirkt, jedoch eine gegen HCMV gerichtete zelluläre Immunantwort in gewissem Umfang dennoch stattfindet.

Der erstmalige Nachweis einer HCMV-induzierten MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in vivo gelang durch immunhistochemische Doppelfärbungsanalysen in Gewebeproben HCMV-infizierter Organe. MHC-Klasse-I-Komplexe finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und bilden einen Teil des zellulären Immunsystems (Renz-Polster & Braun, 2001). Über Präsentation MHC-Klasse-I-gebundener Virusantigene auf der Zelloberfläche können infizierte Zellen von zytotoxischen T-Lymphozyten

erkannt und in der Folge lysiert werden (Rotzschke et al., 1990). Die vergleichende Darstellung von MHC-Klasse-I-Molekülen und Virusantigenen aus der sehr frühen, frühen und späten Phase der viralen Replikation zeigt, dass HCMV in der Lage ist, MHC-Klasse-I-Moleküle in allen viralen Replikationsstadien down zu regulieren und damit das Potential besitzt, einer zytotoxischen T-Zellantwort zu entgehen.

Bereits mehrfach wurde darüber berichtet, dass das humane Cytomegalovirus in vitro über verschiedene Strategien verfügt, dem Immunsystem zu entkommen: Mithilfe transienter Expression in transfizierten Zellen wurden mehrere Genloci von HCMV definiert, die entweder in die MHC-Klasse-I-Synthese eingreifen oder den Transport der MHC-Klasse-I-Moleküle an die Zelloberfläche blockieren. Diese Gene sind bereits zu sehr frühen Replikationsphasen aktiv und werden bis in die späte Phase der Infektion exprimiert (Jones et al., 1995). Unklar war jedoch, inwieweit diese viralen Immunevasionsmechanismen auch in der viel komplexeren in-vivo-Situation wirksam werden. Dies war insbesondere fraglich, da in Zellkultur durch Vorinkubation mit den Zytokinen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Hemmung der MHC-Klasse-I-Expression virus-infizierter Zellen aufgehoben werden kann und die Zellen auf diese Weise die Fähigkeit wiedererlangen, MHC-Klasse-I-Moleküle zu exprimieren (Hengel et al., 1995) – eine Situation, die in Inflammationsherden durchaus vorstellbar wäre. In allen untersuchten Gewebeschnitten fand eine deutliche MHC-Klasse-I-Down-Regulierung infizierter Zellen statt (Abb. 2). Hierbei fiel auf, dass dies in allen Phasen des viralen Replikationszyklus - also sehr früh, früh und spät – beobachtet werden konnte. Diese MHC-Klasse-I-Down-Regulierung war nicht immer komplett vorhanden, da einige Zellen noch eine Restexpression an MHC-Klasse-I-Komplexen auf der Zelloberfläche aufwiesen, während ihr Zytoplasma MHC-Klasse-I-frei war. Andererseits fanden sich auch solche virus-infizierten Zellen, die gleichbleibend MHC-Klasse-I exprimierten (Abb. 4, 5 – 9). In stark infizierten Gewebearealen konnte darüber hinaus bei nicht infizierten Nachbarzellen eine signifikante Induktion von MHC-Klasse-I-Molekülen nachgewiesen werden.

Diese deutlich vorgefundene MHC-Klasse-I-Down-Regulierung in allen viralen Replikationsstadien wäre damit zu erklären, dass HCMV auch in vivo in der Lage wäre, die MHC-Klasse-I-Synthese zu hemmen. Dies würde bedeuten, dass virus-infizierte Zellen nicht länger von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden

könnten und HCMV auf diese Weise den Effektorzellen des Immunsystems entkäme.

Die noch vorhandene Restexpression an MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche infizierter Zellen ließe sich folgendermaßen interpretieren: HCMV hätte bereits in den MHC-Klasse-I-Zusammenbau eingegriffen und neugebildete MHC-Klasse-I-Komplexe zerstört. Auf der Zelloberfläche befänden sich aber noch MHC-Klasse-I-Moleküle, die vor der Infektion synthetisiert worden wären. Im Laufe der Zeit würden diese noch vorhandenen MHC-Klasse-I-Moleküle ebenfalls abgebaut, wie dies bei den komplett MHC-Klasse-I-down-regulierten Zellen bereits stattgefunden hätte.

Vermutlich könnte es durch die Anwesenheit von Leukozyten zu der starken MHC-Klasse-I-Expression am Ort der Infektion kommen. Es wäre denkbar, dass Lymphozyten von virus-infizierten Zellen zum Ort der Infektion gelenkt würden, dort IFN- $\gamma$  sezernierten, was zu jener MHC-Klasse-I-Induktion auf nicht infizierten Nachbarzellen führen würde. Auch in der Literatur ist eine solche MHC-Klasse-I-Induktion auf nicht infizierten Nachbarzellen erwähnt worden. Dies geschieht durch aktivierte Lymphozyten, welche IFN- $\gamma$  sezernieren, was wiederum auf die Gewebszellen wirkt und zu einer Induktion von MHC-Klasse-I führt (Hengel et al., 1994).

Die Beobachtung, dass manche virus-infizierten Zellen weiterhin MHC-Klasse-I-Komplexe exprimieren, könnte demnach auf diese Weise erklärt werden, dass die Zelle erst vor sehr kurzer Zeit infiziert worden wäre. Dies könnte auf Zellen zutreffen, welche sich im sehr frühen Stadium der HCMV-Replikation befänden, so dass das Virus noch keine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung hervorgerufen haben könnte. Die andere Möglichkeit wäre, dass durch im Gewebe vorhandene Zytokine die HCMV-induzierte Hemmung der MHC-Klasse-I-Expression aufgehoben worden wäre. Da allerdings die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  bereits vor der Infektion dieser Zellen sezerniert werden müssten, könnte also eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung erst dann verhindert werden, wenn Leukozyten zum Ort der Infektion vorgedrungen wären. Auf diese Weise blieben die schon vor dem Einwandern der Leukozyten infizierten Zellen, die also noch keinen Kontakt mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  gehabt hätten, weiterhin MHC-Klasse-I-negativ. Dagegen wäre es den frisch infizierten Zellen möglich, weiterhin MHC-Klasse-I zu exprimieren. So könnte HCMV

durch zytotoxische T-Zellen zwar nicht völlig eliminiert, vermutlich aber eine Ausbreitung verhindert werden.

Die Vorstellung, dass das Ausmaß der HCMV-induzierten Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen vom umgebenden Milieu abhängt, wird auch durch den Vergleich der immunhistochemischen Befunde in unterschiedlichen Gewebeproben gestützt: In allen untersuchten Geweben – Colon, Lunge, Plazenta und Hypophyse - fand sich eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung (Abb. 2). Allerdings war diese in den verschiedenen Geweben unterschiedlich stark ausgeprägt. So war in Gewebepreparaten des Colons eine starke MHC-Klasse-I-Down-Regulierung zu beobachten, während in der Plazenta die Hälfte der infizierten Zellen weiterhin MHC-Klasse-I exprimierte. Wie bereits erwähnt, können HCMV-infizierte Zellen *in vitro* durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  ihre MHC-Klasse-I-Expression wiedererlangen (Hengel et al., 1995). Diese MHC-Klasse-I-exprimierenden infizierten Zellen werden daraufhin von zytotoxischen T-Lymphozyten als virus-infiziert erkannt und lysiert (Rotzschke et al., 1990). Die scheinbar vollständige MHC-Klasse-I-Down-Regulierung im Colon ließe sich auch so erklären, dass HCMV-infizierte Zellen, welche noch MHC-Klasse-I-Moleküle auf ihrer Oberfläche aufwiesen oder die MHC-Klasse-I-Expression wiedererlangt hätten, bereits lysiert worden wären, da MHC-Klasse-I-positive Zellen von zytotoxischen T-Zellen zerstört worden wären. Für die Lyse virus-infizierter Zellen durch zytotoxische T-Zellen würde auch sprechen, dass es sich bei der Mehrzahl der im Gewebe nachgewiesenen Leukozyten um CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten handelte. In anderen Geweben, wie in der Plazenta, könnten einige infizierte Zellen ebenfalls ihre MHC-Klasse-I-Expression wiedererlangt haben oder noch MHC-Klasse-I exprimieren, aber noch nicht lysiert worden sein. In diesem Fall würde dies zu dem Bild führen, dass nur ein geringerer Prozentsatz an infizierten Zellen auch eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung aufweisen würde. Auf diese Weise ließe sich die unterschiedlich stark ausgeprägte MHC-Klasse-I-Down-Regulierung je nach infiziertem Gewebe erklären.

Pathogenetisch besonders bedeutsam im Sinne einer erleichterten Virus-Dissemination könnte die Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen in infizierten Endothelzellen sein.

Übereinstimmend mit dieser Hypothese fanden sich in sämtlichen untersuchten Gewebepreparaten infizierte Endothelzellen, von denen einige eine MHC-Klasse-I-Down-Regulierung aufwiesen. Insbesondere zeigten Endothelzellen in der späten produktiven Replikationsphase eine nahezu vollständige Depletion von MHC-Klasse-I-Molekülen. Solche Zellen wären einer zytotoxischen T-Zellantwort mit hoher Wahrscheinlichkeit entzogen und könnten HCMV sowohl in die Zirkulation als auch in das angrenzende Gewebe übertragen. Tatsächlich fanden sich in allen untersuchten Schnitten HCMV-infizierte Zellen in der Nähe von Gefäßen.

Vergleichbare Schlüsse wurden kürzlich aus einem Zellkulturmodell mit HCMV-infizierten aortalen Endothelzellen abgeleitet. Ausgehend von der dauerhaften Infektion der Zellkulturen wurden arterielle Endothelzellen interpretiert als ein dem Immunsystem entzogenes Reservoir, in dem HCMV lebenslang persistieren kann (Fish et al., 1998). Wie in der Literatur bereits erwähnt, könnten HCMV-infizierte Endothelien an einer hämatogenen Disseminierung des Virus beteiligt sein (Grefte et al., 1993a, Grefte et al., 1994, Grefte et al., 1993b, Percivalle et al., 1993, Sinzger et al., 1995), dadurch dass sich spät-infizierte Endothelzellen von ihrer Basalmembran lösen und so in die Zirkulation gelangen (Grefte et al., 1995). Diese abgelösten Zellen könnten nun in den Kapillaren verschiedener Organe hängen bleiben und zur Infektion des Gewebes führen (Sinzger & Jahn, 1996).

Die Lyse infizierter MHC-Klasse-I-down-regulierter Endothelzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten könnte reduziert sein und HCMV auf diese Weise in den Zellen persistieren. Diese so dem Immunsystem entzogenen Endothelzellen könnten in ihrer späten Phase der viralen Replikation in die Zirkulation gelangen. Nachfolgend könnten die Endothelzellen so weitere Organe infizieren, in die sie geschwemmt würden, indem sie das Virus an dortige Endothelien weitergäben. Diese wären wiederum als Grenzschicht zwischen Zirkulation und Gewebe an der Ausbreitung einer HCMV-Infektion in die Organe beteiligt.

Andererseits gibt es eine ganze Reihe von Einwänden gegen die Vorstellung, HCMV könne sich durch Down-Regulierung von MHC-Klasse-I-Molekülen effizient der zellulären Immunantwort entziehen. Immunkompetente Individuen sind meist in der Lage, ihre HCMV-Infektion zu kontrollieren, ohne dass es zu nennenswerten klinischen Manifestationen kommt (Pass, 2001). Als Voraussetzung für die Entstehung symptomatischer Organinfektionen durch HCMV gilt vielmehr eine



vorausgehende Störung der zellulären Immunität (Einsele et al., 1993, Walter et al., 1995), insbesondere im Rahmen von Organ- oder Knochenmarktransplantationen oder einer AIDS-Erkrankung (Drew & Mintz, 1984, Ho, 1982, Ho, 1990). Durch Übertragung zytotoxischer HCMV-spezifischer T-Zellen im Sinne eines adoptiven Immuntransfers kann bei Risikopatienten sogar das Auftreten von HCMV-Erkrankungen verhindert werden (Reddehase et al., 1988, Riddell & Greenberg, 1994, Riddell & Greenberg, 1995, Riddell et al., 1992, Walter et al., 1995). Offensichtlich ist trotz MHC-Klasse-I-Down-Regulierung eine effiziente zytotoxische Antwort gegen HCMV-infizierte Zellen möglich.

Tatsächlich fanden sich in der vorliegenden immunhistochemischen Analyse infizierter Organe mehrfache Hinweise auf eine inflammatorische Reaktion im Bereich HCMV-infizierter Gewebeareale.

Bei den Leukozyten-Infiltraten wurden überwiegend CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen. Die Infektion blieb auf ein bestimmtes Gebiet begrenzt. Dies war besonders eindrucksvoll im Colon zu beobachten, wo sich sowohl die Infektion als auch das inflammatorische Infiltrat auf die Epithelschicht und die Tela submukosa beschränkte. Hierbei fiel auf, dass je stärker die HCMV-Infektion war, sich umso mehr Leukozyten im Gewebe befanden und umso stärker die MHC-Klasse-I-Induktion auf nicht infizierten Nachbarzellen ausfiel (Abb. 11).

Die starke Anwesenheit von Leukozyten wäre so zu interpretieren, dass durch das Vorhandensein von MHC-Klasse-I-Molekülen auf virus-infizierten Zellen oder auf nicht infizierten Nachbarzellen zytotoxische T-Zellen zum Ort der Infektion gelenkt würden, um im weiteren Verlauf eine Immunreaktion gegen HCMV auszulösen.

Die Tatsache, dass die HCMV-Infektion in einigen Organen auf ganz bestimmte Gebiete begrenzt bleibt, ließe sich folgendermaßen erklären: So könnte die Infektion im Colon hauptsächlich auf die Epithelschicht und die Tela submukosa beschränkt bleiben, indem das HCMV-Virus abgesehen von infizierten Kapillarendothelien auch über die Epithelschicht in die Darmwand eingedrungen sein könnte. Durch Antigenpräsentation mit Hilfe von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen würde durch eingewanderte Leukozyten eine gegen HCMV gerichtete Immunreaktion ausgelöst werden. Durch sezerniertes IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  würde zum einen auf nicht infizierten Zellen eine MHC-Klasse-I-Induktion stattfinden, während zum anderen infizierte Zellen wieder in der Lage wären, MHC-Klasse-I zu

exprimieren. Im Verlauf der Immunantwort käme es zur Lyse virus-infizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten.

In besonders eindrucksvoller Weise wird dies durch die reziproke Beziehung von HCMV-Infekt und T-Zell-Antwort in der Plazenta unterstrichen. Während es stark infizierte Areale gab, in denen nur wenige Leukozyten nachgewiesen werden konnten, fanden sich sowohl Zotten mit mäßigem Infekt und größerem Leukozyten-Infiltrat, als auch solche Gebiete, in denen der Infekt klein war und von einer großen Gruppe an inflammatorischen Zellen umgeben war (Abb. 16).

Diese zunächst widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse spiegeln vermutlich unterschiedliche Zeitpunkte im Ablauf des Infektionsgeschehens wider: Zu Beginn einer Infektion könnte sich HCMV ungehindert im Gewebe ausbreiten, da noch keine oder erst sehr wenige inflammatorische Zellen in das infizierte Gebiet vorgedrungen wären. Mit der Zeit aber würden mehr Leukozyten zum Ort der Infektion gelenkt werden und im Laufe einer Immunreaktion infizierte Zellen lysiert werden. Nach und nach würde sich das Bild dahingehend ändern, dass die Entzündungszellen in Zahl zunähmen, während HCMV-infizierte Zellen mehr und mehr zerstört würden. Schließlich könnte man beobachten, dass eine abgelaufene Immunantwort durch Leukozyten, welche den Infekt umschließen würden, zu einer Reduktion der infizierten Zellen geführt hätte. Auf diese Weise könnte zwar keine Elimination erreicht, aber eine Ausbreitung der HCMV-Infektion verhindert werden.

In diesem Zusammenhang wäre folgende Hypothese denkbar, dass infizierte Endothelzellen nicht nur an der Disseminierung einer HCMV-Infektion in das Organ beteiligt wären, sondern auch zu einer gezielten Immunreaktion gegen HCMV beitragen würden: Infizierte Endothelien lenken Leukozyten zum Ort der Infektion. Die Disseminierung der Infektion im Gewebe wird durch eingewanderte inflammatorische Zellen verhindert, so dass die Infektion auf bestimmte Areale begrenzt bleibt.

Gestützt wurde diese Vermutung durch Leukozyten, welche in den untersuchten Präparaten mittels Serienschritten in unmittelbarer Nähe von infizierten Endothelzellen nachgewiesen wurden und sich deutlich um den Ort der Infektion gruppierten (Abb. 3, 10). Es stellte sich heraus, dass die inflammatorischen Infiltrate hauptsächlich aus CD8+ zytotoxischen T-Lymphozyten bestanden.

Aber es wurde auch in der Literatur darüber berichtet, dass durch Antigenpräsentation der Endothelzellen sowie über Leukozyten-Adhäsion (Span et al., 1991, Span et al., 1989) inflammatorische Zellen aus der Zirkulation zum infizierten Organ gelenkt werden können und dort eine Immunantwort auslösen (Nakhleh et al., 1991). Verschiedenen Berichten zufolge, führt dies zu einer perivaskulären Entzündungsreaktion an der verschiedene Immunzellen beteiligt sind, unter anderem auch zytotoxische T-Lymphozyten (Lemstrom et al., 1995, Sedmak et al., 1994). In-vitro-Experimente zeigten, dass Endothelzellen eine T-Zell-Antwort gegen HCMV stimulieren und auf diese Weise als Mediatoren einer Immunantwort dienen (Fend et al., 1990, Nakhleh et al., 1991, Shintaku et al., 1991, Tazelaar, 1991, Waldman et al., 1998).

So wäre also denkbar, dass infizierte Endothelzellen eine wichtige Rolle im Laufe einer gezielten Immunantwort gegen HCMV spielen: Es wäre möglich, dass über eine Restexpression an MHC-Klasse-I infizierte Endothelzellen weiterhin Virusbestandteile präsentierten, woraufhin Immunzellen zum Ort der Infektion gelenkt würden. Zusätzlich könnten über Adhäsionsmoleküle der Endothelzellen Leukozyten eine Einwanderung aus der Zirkulation in das infizierte Organ erleichtert werden. Die auf diese Weise infiltrierte Immunzellen würden sich um den Infektionsherd gruppieren und mittels Lyse eine Ausbreitung der Infektion verhindern.

Eine unterstützende Funktion könnte bei diesem Prozess der MHC-Klasse-II-restringierten Antigenpräsentation mit nachfolgender T-Zell-Hilfe zukommen.

Neben MHC-Klasse-I sind auch MHC-Klasse-II-Komplexe Teil des zellulären Immunsystems. MHC-Klasse-II befindet sich auf antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, Langerhans-Zellen der Haut, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten. Nach Phagozytose von Viren wird Virusantigen an den MHC-Klasse-II-Komplex gebunden präsentiert, woraufhin verschiedene Schritte des zellulären sowie des humoralen Immunsystems aktiviert werden (Modrow & Falke, 1997, Renz-Polster & Braun, 2001).

In den untersuchten Gewebepreparaten wurden in der unmittelbaren Umgebung virus-infizierter Zellen MHC-Klasse-II-exprimierende Zellen nachgewiesen, wobei sich diese deutlich um den Infekt gruppierten (Abb. 13, 14). Darüber hinaus wurden

MHC-Klasse-II-Moleküle auf HCMV-infizierten Zellen entdeckt. Mit Hilfe von Serienschnitten konnte festgestellt werden, dass sich neben MHC-Klasse-II-exprimierenden Zellen sowohl Leukozyten, als auch MHC-Klasse-I-exprimierende Zellen am Ort der Infektion befanden (Abb. 15).

In der Literatur ist beschrieben, dass sich normalerweise nur auf antigenpräsentierenden Zellen, wie dendritischen Zellen, Langerhans-Zellen der Haut, aktivierten Makrophagen und B-Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle befinden, mit deren Hilfe exogen aufgenommenes Antigen nach Prozessierung an T-Helfer-Zellen präsentiert wird (Modrow & Falke, 1997, Renz-Polster & Braun, 2001). Durch die Einwirkung von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  allerdings können auch auf somatischen Zellen, die für gewöhnlich kein MHC-Klasse-II aufweisen, MHC-Klasse-II-Moleküle exprimiert werden und diese Zellen dann antigenpräsentierende Funktionen übernehmen. Hierzu gehören neben anderen auch Endothelzellen. Weiterhin wird durch IFN- $\gamma$  die MHC-Klasse-II-Dichte auf antigenpräsentierenden Zellen erhöht und somit deren Aktivität verstärkt. Darüber hinaus bilden Makrophagen TNF- $\alpha$ , welches auf Endothelzellen wirkt und über die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen so die Gefäßwand für einwandernde Entzündungszellen zum Ort der Infektion durchlässiger macht (Roitt et al., 1993). Aktivierte Lymphozyten sezernieren IFN- $\gamma$ , was wiederum auf die Gewebszellen wirkt und zu einer Induktion von MHC-Klasse-I führt (Hengel et al., 1994).

Die starke MHC-Klasse-II-Expression in unmittelbarer Nähe HCMV-infizierter Zellen ließe sich zum einen damit erklären, dass aktivierte Makrophagen zum Ort der Infektion wanderten. Dort würden sie Viruspartikel und Trümmer infizierter Zellen phagozytieren, woraufhin prozessiertes Virus-Antigen an MHC-Klasse-II gebunden präsentiert würde. Im Laufe der nun angestoßenen Immunantwort würden durch sezernierte Zytokine über Adhäsionsmoleküle, welche von Endothelzellen exprimiert würden, inflammatorische Zellen ins Gewebe gelockt werden. Weiterhin würden die eingewanderten Leukozyten über ihrerseits sezernierte Zytokine zu einer Induktion von MHC-Klasse-I-Molekülen führen. Auf diese Weise könnten nun virus-infizierte Zellen von zytotoxischen T-Zellen erkannt und lysiert werden.

Andererseits könnte man annehmen, dass durch IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  von eingewanderten Leukozyten auch in Gewebszellen MHC-Klasse-II induziert werden könnte. Die Tatsache, dass HCMV-infizierte Zellen MHC-Klasse-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche aufweisen, wäre damit zu erklären, dass es sich um Gewebszellen

handelte, welche durch die Einwirkungen von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  MHC-Klasse-II-Komplexe exprimierten und hinterher von HCMV infiziert worden wären. Die andere Möglichkeit wäre, dass die MHC-Klasse-II-positiven Zellen HCMV-infizierte Makrophagen wären, die als Reservoir von HCMV dienten.

Die Zusammenschau der hier dargestellten Analyse der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Expression und der T-Zell-Infiltration in HCMV-infizierten Organen mit den bekannten Zellkulturdaten zur MHC-Klasse-I-Expression in infizierten Zellen legt folgendes Szenario für die zelluläre Immunantwort auf HCMV im infizierten Gewebe nahe: Die HCMV-Infektion eines Organs führt zur Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Komplexe auf infizierten Zellen. Diese Down-Regulierung wiederum begünstigt die Ausbreitung des Virus im Gewebe. Da die Down-Regulierung der MHC-Klasse-I-Moleküle jedoch nicht komplett ist, sondern teilweise noch eine Restexpression an MHC-Klasse-I auf ansonsten MHC-Klasse-I-down-regulierten infizierten Zellen stattfindet, erfolgt in gewissem Umfang eine Immunreaktion gegen HCMV. Es kommt zur Infiltration inflammatorischer Zellen und über verschiedene von Leukozyten sezernierte Zytokine zu einer MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Induktion. Dies führt nun zu einer effizienteren Antigenpräsentation zumindest auf den neu infizierten Zellen. Höchstwahrscheinlich erreicht diese Immunantwort keine Elimination von HCMV, die ungehinderte Ausbreitung des Virus im Gewebe wird aber verhindert.

## 6 Zusammenfassung

Basierend auf Zellkultur-Daten wurde die Hypothese geäußert, dass es sich bei der MHC-Klasse-I-Down-Regulierung HCMV-infizierter Zellen um eine Strategie der Immunevasion dieses Virus handelte. Um dieses Immunphänomen in vivo zu überprüfen, wurde eine immunhistochemische Analyse verschiedener Gewebeschnitte HCMV-infizierter Organe aus Biopsien und Autopsien durchgeführt. Die untersuchten Organe schlossen Lunge, Colon, Plazenta und Hypophyse ein. Hierbei wurden mittels der Streptavidin-Biotin-Methode mit Peroxidase und Alkalischer Phosphatase sehr frühe, frühe und späte Antigene des HCMV-Replikationszyklus, sowie zelluläre MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle simultan oder in Serienschnitten dargestellt. Analysiert wurde die Kolo-kalisation von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen in Arealen viraler Replikation, sowie die MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Expression in einzelnen infizierten Zellen. Darüber hinaus wurden Leukozyten - speziell CD8+ Lymphozyten - und HCMV-Antigene simultan untersucht, um Zellen der Immunabwehr in Arealen viraler Replikation nachzuweisen. Die MHC-Klasse-I-Expression betreffend, wurden zwei gegensätzliche Phänomene gefunden: In einzelnen infizierten Zellen fand eine signifikante MHC-Klasse-I-Down-Regulierung statt, wohingegen die MHC-Klasse-I-Expression nicht infizierter Nachbarzellen für gewöhnlich hochreguliert war. Diese Down-Regulierung war in der Mehrzahl der infizierten Zellen nahezu vollständig in allen Phasen des viralen Replikationszyklus, während nicht infizierte Nachbarzellen eine starke MHC-Klasse-I-Expression aufwiesen. Trotz dieser signifikant reduzierten MHC-Klasse-I-Signale infizierter Zellen, traten Leukozyten-Infiltrate, welche CD8+ T-Zellen enthielten, und MHC-Klasse-II-exprimierende Zellen in infizierten Gewebearealen auf. Die Ausdehnung der inflammatorischen Infiltrate verhielt sich reziprok zur Ausdehnung der HCMV-infizierten Herde.

Zusammenfassend deuten die Resultate darauf hin, dass in vivo ein direkter viraler inhibitorischer Effekt auf die MHC-Klasse-I-Expression besteht. Die MHC-Klasse-I-Induktion in nicht infizierten Nachbarzellen ist möglicherweise bedingt durch Zytokine, welche von infiltrierenden Zellen der Immunabwehr stammen. Die reziproke Relation infiltrierender Lymphozyten und viraler Replikation weist darauf hin, dass CD8+ T-Zellen daran beteiligt sind, die virale Ausbreitung trotz virus-induzierter MHC-Klasse-I-Down-Regulierung zu begrenzen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adler, S. P., Hempfling, S. H., Starr, S. E., Plotkin, S. A. & Riddell, S. (1998). Safety and immunogenicity of the Towne strain cytomegalovirus vaccine. *Pediatr Infect Dis J* **17**, 200-6.
- Ahn, K., Angulo, A., Ghazal, P., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1996). Human cytomegalovirus inhibits antigen presentation by a sequential multistep process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10990-5.
- Ahn, K., Gruhler, A., Galocha, B., Jones, T. R., Wiertz, E. J., Ploegh, H. L., Peterson, P. A., Yang, Y. & Fruh, K. (1997). The ER-luminal domain of the HCMV glycoprotein US6 inhibits peptide translocation by TAP. *Immunity* **6**, 613-21.
- Alford, C. A. & Britt, W. J. (1990). Cytomegalovirus. In *Virology*, pp. 1981-2010. Edited by D. M. Knipe & B. N. Fields. New York.
- Alford, C. A. & Britt, W. J. (1993). Cytomegalovirus. In *The human herpesviruses.*, pp. 227-255. Edited by Whitley R. J., Roizman B., Lopez C. New York: Raven Press.
- Andersson, M., Paabo, S., Nilsson, T. & Peterson, P. A. (1985). Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell* **43**, 215-22.
- Aqel, N. M., Tanner, P., Drury, A., Francis, N. D. & Henry, K. (1991). Cytomegalovirus gastritis with perforation and gastrocolic fistula formation. *Histopathology* **18**, 165-8.
- Arbustini, E., Grasso, M., Diegoli, M., Percivalle, E., Grossi, P., Bramerio, M., Campana, C., Goggi, C., Gavazzi, A. & Viganò, M. (1992). Histopathologic and molecular profile of human cytomegalovirus infections in patients with heart transplants. *Am J Clin Pathol* **98**, 205-13.
- Arvin, A. M. (1997). Viral infections of the fetus and neonate. In *Viral pathogenesis*, pp. 801-814. Edited by N. Nathanson. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Asanuma, H., Numazaki, K. & Chiba, S. (1999). Analysis of immune cells in a patient with post-transfusion hepatitis caused by human cytomegalovirus. *In Vivo* **13**, 339-41.
- Barkholt, L. M., Ehrnst, A. & Veress, B. (1994). Clinical use of immunohistopathologic methods for the diagnosis of cytomegalovirus hepatitis in human liver allograft biopsy specimens. *Scand J Gastroenterol* **29**, 553-60.
- Barnes, P. D. & Grundy, J. E. (1992). Down-regulation of the class I HLA heterodimer and beta 2-microglobulin on the surface of cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol* **73**, 2395-403.

- Beck, S. & Barrell, B. G. (1988). Human cytomegalovirus encodes a glycoprotein homologous to MHC class-I antigens. *Nature* **331**, 269-72.
- Beersma, M. F., Bijlmakers, M. J. & Ploegh, H. L. (1993). Human cytomegalovirus down-regulates HLA class I expression by reducing the stability of class I H chains. *J Immunol* **151**, 4455-64.
- Benedict, C. A., Butrovich, K. D., Lurain, N. S., Corbeil, J., Rooney, I., Schneider, P., Tschopp, J. & Ware, C. F. (1999). Cutting edge: a novel viral TNF receptor superfamily member in virulent strains of human cytomegalovirus. *J Immunol* **162**, 6967-70.
- Benz, C., Reusch, U., Muranyi, W., Brune, W., Atalay, R. & Hengel, H. (2001). Efficient downregulation of major histocompatibility complex class I molecules in human epithelial cells infected with cytomegalovirus. *J Gen Virol* **82**, 2061-70.
- Billstrom, M. A., Johnson, G. L., Avdi, N. J. & Worthen, G. S. (1998). Intracellular signaling by the chemokine receptor US28 during human cytomegalovirus infection. *J Virol* **72**, 5535-44.
- Campbell, A. E. & Slater, J. S. (1994). Down-regulation of major histocompatibility complex class I synthesis by murine cytomegalovirus early gene expression. *J Virol* **68**, 1805-11.
- de Jong, M. D., Galasso, G. J., Gazzard, B., Griffiths, P. D., Jabs, D. A., Kern, E. R. & Spector, S. A. (1998). Summary of the II International Symposium on Cytomegalovirus. *Antiviral Res* **39**, 141-62.
- del Val, M., Hengel, H., Hacker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P. & Koszinowski, U. H. (1992). Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J Exp Med* **176**, 729-38.
- Drew, W. L. & Mintz, L. (1984). Cytomegalovirus infection in healthy and immune-deficient homosexual men. In *The Acquired Immune Deficiency Syndrome and Infections of Homosexual Men.*, pp. 117-123. Edited by P. Ma & D. Armstrong. New York.
- Dworsky, M., Yow, M., Stagno, S., Pass, R. F. & Alford, C. (1983). Cytomegalovirus infection of breast milk and transmission in infancy. *Pediatrics* **72**, 295-9.
- Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., Fischer, I., Bihler, S., Gerneth, F., Vallbracht, A., Schmidt, H., Waller, H. D. & Muller, C. A. (1993). Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood* **82**, 1672-8.
- Einsele, H., Ehninger, G., Steidle, M., Vallbracht, A., Muller, M., Schmidt, H., Saal, J. G., Waller, H. D. & Muller, C. A. (1991). Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet* **338**, 1170-2.



- Ettinger, N. A., Bailey, T. C., Trulock, E. P., Storch, G. A., Anderson, D., Raab, S., Spitznagel, E. L., Dresler, C. & Cooper, J. D. (1993). Cytomegalovirus infection and pneumonitis. Impact after isolated lung transplantation. Washington University Lung Transplant Group. *Am Rev Respir Dis* **147**, 1017-23.
- Fend, F., Prior, C., Margreiter, R. & Mikuz, G. (1990). Cytomegalovirus pneumonitis in heart-lung transplant recipients: histopathology and clinicopathologic considerations. *Hum Pathol* **21**, 918-26.
- Fietze, E., Prosch, S., Reinke, P., Stein, J., Docke, W. D., Staffa, G., Loning, S., Devaux, S., Emmrich, F., von Baehr, R. & et al. (1994). Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation* **58**, 675-80.
- Fish, K. N., Soderberg Naucner, C., Mills, L. K., Stenglein, S. & Nelson, J. A. (1998). Human cytomegalovirus persistently infects aortic endothelial cells. *J Virol* **72**, 5661-8.
- Freeman, W. R., Henderly, D. E., Wan, W. L., Causey, D., Trousdale, M., Green, R. L. & Rao, N. A. (1987). Prevalence, pathophysiology, and treatment of rhegmatogenous retinal detachment in treated cytomegalovirus retinitis. *Am J Ophthalmol* **103**, 527-36.
- Fruh, K., Ahn, K., Djaballah, H., Sempe, P., van Endert, P. M., Tampe, R., Peterson, P. A. & Yang, Y. (1995). A viral inhibitor of peptide transporters for antigen presentation. *Nature* **375**, 415-8.
- Gerna, G., Zipeto, D., Percivalle, E., Parea, M., Revello, M. G., Maccario, R., Peri, G. & Milanesi, G. (1992). Human cytomegalovirus infection of the major leukocyte subpopulations and evidence for initial viral replication in polymorphonuclear leukocytes from viremic patients. *J Infect Dis* **166**, 1236-44.
- Gewurz, B. E., Gaudet, R., Tortorella, D., Wang, E. W., Ploegh, H. L. & Wiley, D. C. (2001). Antigen presentation subverted: Structure of the human cytomegalovirus protein US2 bound to the class I molecule HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6794-9.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B. & Greenberg, P. D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* **383**, 720-2.
- Goodgame, R. W. (1993). Gastrointestinal cytomegalovirus disease. *Ann Intern Med* **119**, 924-35.
- Goodrich, J. M., Bowden, R. A., Fisher, L., Keller, C., Schoch, G. & Meyers, J. D. (1993). Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med* **118**, 173-8.

- Grefte, A., Blom, N., van der Giessen, M., van Son, W. & The, T. H. (1993a). Ultrastructural analysis of circulating cytomegalic cells in patients with active cytomegalovirus infection: evidence for virus production and endothelial origin. *J Infect Dis* **168**, 1110-8.
- Grefte, A., Harmsen, M. C., van der Giessen, M., Knollema, S., van Son, W. J. & The, T. H. (1994). Presence of human cytomegalovirus (HCMV) immediate early mRNA but not ppUL83 (lower matrix protein pp65) mRNA in polymorphonuclear and mononuclear leukocytes during active HCMV infection. *J Gen Virol* **75**, 1989-98.
- Grefte, A., van der Giessen, M., van Son, W. & The, T. H. (1993b). Circulating cytomegalovirus (CMV)-infected endothelial cells in patients with an active CMV infection. *J-Infect-Dis* **167**, 270-7.
- Grefte, J. M., van der Giessen, M., Blom, N., The, T. H. & van Son, W. J. (1995). Circulating cytomegalovirus-infected endothelial cells after renal transplantation: possible clue to pathophysiology? *Transplant-Proc* **27**, 939-42.
- Grefte, J. M., van der Gun, B. T., Schmolke, S., van der Giessen, M., van Son, W. J., Plachter, B., Jahn, G. & The, T. H. (1992). The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **73**, 2923-32.
- Griffiths, P. D. & Grundy, J. E. (1987). Molecular biology and immunology of cytomegalovirus. *Biochem J* **241**, 313-24.
- Grundy, J. E., Lawson, K. M., MacCormac, L. P., Fletcher, J. M. & Yong, K. L. (1998). Cytomegalovirus-infected endothelial cells recruit neutrophils by the secretion of C-X-C chemokines and transmit virus by direct neutrophil-endothelial cell contact and during neutrophil transendothelial migration. *J Infect Dis* **177**, 1465-74.
- Grundy, J. E., Shanley, J. D. & Griffiths, P. D. (1987). Is cytomegalovirus interstitial pneumonitis in transplant recipients an immunopathological condition? *Lancet* **2**, 996-9.
- Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K., Pincus, S., Toldy, J., Cox, W. I., Meri, C., Plotkin, S. & Berencsi, K. (2000). Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* **181**, 1537-46.
- Hackman, R. C., Wolford, J. L., Gleaves, C. A., Myerson, D., Beauchamp, M. D., Meyers, J. D. & McDonald, G. B. (1994). Recognition and rapid diagnosis of upper gastrointestinal cytomegalovirus infection in marrow transplant recipients. A comparison of seven virologic methods. *Transplantation* **57**, 231-7.

- Hahn, G., Jores, R. & Mocarski, E. S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3937-42.
- Hamprecht, K., Maschmann, J., Vochem, M., Dietz, K., Speer, C. P. & Jahn, G. (2001). Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet* **357**, 513-8.
- Hebart, H. & Einsele, H. (1998). Diagnosis and treatment of cytomegalovirus infection. *Curr Opin Hematol* **5**, 483-7.
- Heemels, M. T. & Ploegh, H. (1995). Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem*, 64463-91.
- Heinemann, M. H. (1992). Characteristics of cytomegalovirus retinitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* **92**, 12s-16s.
- Hengel, H., Brune, W. & Koszinowski, U. H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus--survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* **6**, 190-7.
- Hengel, H., Esslinger, C., Pool, J., Goulmy, E. & Koszinowski, U. H. (1995). Cytokines restore MHC class I complex formation and control antigen presentation in human cytomegalovirus-infected cells. *J Gen Virol* **76**, 2987-97.
- Hengel, H., Flohr, T., Hammerling, G. J., Koszinowski, U. H. & Momburg, F. (1996). Human cytomegalovirus inhibits peptide translocation into the endoplasmic reticulum for MHC class I assembly. *J Gen Virol* **77**, 2287-96.
- Hengel, H., Lucin, P., Jonjic, S., Ruppert, T. & Koszinowski, U. H. (1994). Restoration of cytomegalovirus antigen presentation by gamma interferon combats viral escape. *J Virol* **68**, 289-97.
- Hertenstein, B., Hampl, W., Bunjes, D., Wiesneth, M., Duncker, C., Koszinowski, U., Heimpel, H., Arnold, R. & Mertens, T. (1995). In vivo/ex vivo T cell depletion for GVHD prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT. *Bone Marrow Transplant* **15**, 387-93.
- Heurlin, N., Brattstrom, C., Lonqvist, B., Westman, L., Lidman, C. & Andersson, J. (1991). Aetiology of pulmonary diseases in immunocompromised patients. *Eur Respir J* **4**, 10-8.
- Hill, A., Jugovic, P., York, I., Russ, G., Bennink, J., Yewdell, J., Ploegh, H. & Johnson, D. (1995). Herpes simplex virus turns off the TAP to evade host immunity. *Nature* **375**, 411-5.
- Ho, M. (1982). Human cytomegalovirus infections in immunosuppressed patients. In *Cytomegalovirus, Biology and Infection: Current Topics in Infectious Disease*, pp. 171-204. Edited by W. B. Greenough & T. C. Merigan. New York.

- Ho, M. (1990). Epidemiology of cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis* **12**, 7s701-10.
- Horn, M., Schlote, W., Herrmann, G., Gungor, T. & Jacobi, G. (1992). Immunocytochemical characterization of cytomegalovirus (CMV) infected giant cells in perinatal acquired human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Acta Histochem Suppl*, 42115-22.
- Humbert, M., Roux Lombard, P., Cerrina, J., Magnan, A., Simonneau, G., Dartevelle, P., Galanaud, P., Dayer, J. M. & Emilie, D. (1994). Soluble TNF receptors (TNF-sR55 and TNF-sR75) in lung allograft recipients displaying cytomegalovirus pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med* **149**, 1681-5.
- Ippoliti, C., Morgan, A., Warkentin, D., van Besien, K., Mehra, R., Khouri, I., Giralt, S., Gajewski, J., Champlin, R., Andersson, B. & Przepiorka, D. (1997). Foscarnet for prevention of cytomegalovirus infection in allogeneic marrow transplant recipients unable to receive ganciclovir. *Bone Marrow Transplant* **20**, 491-5.
- Jabs, D. A., Enger, C. & Bartlett, J. G. (1989). Cytomegalovirus retinitis and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Ophthalmol* **107**, 75-80.
- Jahn, G., Knust, E., Schmolla, H., Sarre, T., Nelson, J. A., McDougall, J. K. & Fleckenstein, B. (1984). Predominant immediate-early transcripts of human cytomegalovirus AD 169. *J Virol* **49**, 363-70.
- Jahn, G., Pohl, W., Plachter, B. & Hintzenstern, J. (1988). Kongenitale Cytomegalovirus-Infektion mit letalem Ausgang. [Congenital cytomegalovirus infection with fatal outcome]. *Dtsch Med Wochenschr* **113**, 424-7.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. (2001). Immunobiology, 5th edition edn. Garland, New York.
- Jin, X., Demoitie, M. A., Donahoe, S. M., Ogg, G. S., Bonhoeffer, S., Kakimoto, W. M., Gillespie, G., Moss, P. A., Dyer, W., Kurilla, M. G., Riddell, S. R., Downie, J., Sullivan, J. S., McMichael, A. J., Workman, C. & Nixon, D. F. (2000). High frequency of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-effector cells in HLA-A\*0201-positive subjects during multiple viral coinfections. *J Infect Dis* **181**, 165-75.
- Jones, T. R., Hanson, L. K., Sun, L., Slater, J. S., Stenberg, R. M. & Campbell, A. E. (1995). Multiple independent loci within the human cytomegalovirus unique short region down-regulate expression of major histocompatibility complex class I heavy chains. *J Virol* **69**, 4830-41.
- Jordan, S. C., Marchevski, A., Ross, D., Toyoda, M. & Waters, P. F. (1992). Serum interleukin-2 levels in lung transplant recipients: correlation with findings on transbronchial biopsy. *J Heart Lung Transplant* **11**, 1001-4.

- Kaplan, C. S., Petersen, E. A., Icenogle, T. B., Copeland, J. G., Villar, H. V., Sampliner, R., Minnich, L. & Ray, C. G. (1989). Gastrointestinal cytomegalovirus infection in heart and heart-lung transplant recipients. *Arch Intern Med* **149**, 2095-100.
- Kaufman, D. B., Leventhal, J. R., Gallon, L. G., Parker, M. A., Koffron, A. J., Fryer, J. P., Abecassis, M. M. & Stuart, F. P. (2001). Risk factors and impact of cytomegalovirus disease in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Transplantation* **72**, 1940-5.
- Keh, W. C. & Gerber, M. A. (1988). In situ hybridization for cytomegalovirus DNA in AIDS patients. *Am J Pathol* **131**, 490-6.
- Kerkau, T., Bacik, I., Bennink, J. R., Yewdell, J. W., Hunig, T., Schimpl, A. & Schubert, U. (1997). The human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Vpu protein interferes with an early step in the biosynthesis of major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *J Exp Med* **185**, 1295-305.
- Khan, N., Cobbold, M., Keenan, R. & Moss, P. A. H. (2002). Comparative Analysis of CD8+ T Cell Responses against Human Cytomegalovirus Proteins pp65 and Immediate Early 1 Shows Similarities in Precursor Frequency, Oligoclonality, and Phenotype. *J Infect Dis* **185**, 1025-34.
- Kleijnen, M. F., Huppa, J. B., Lucin, P., Mukherjee, S., Farrell, H., Campbell, A. E., Koszinowski, U. H., Hill, A. B. & Ploegh, H. L. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein, gp34, forms a complex with folded class I MHC molecules in the ER which is not retained but is transported to the cell surface. *EMBO J* **16**, 685-94.
- Klein, M., Schoppel, K., Amvrossiadis, N. & Mach, M. (1999). Strain-specific neutralization of human cytomegalovirus isolates by human sera. *J Virol* **73**, 878-86.
- Knight, D. A., Waldman, W. J. & Sedmak, D. D. (1997). Human cytomegalovirus does not induce human leukocyte antigen class II expression on arterial endothelial cells. *Transplantation* **63**, 1366-9.
- Koffron, A. J., Mueller, K. H., Kaufman, D. B., Stuart, F. P., Patterson, B. & Abecassis, M. I. (1995). Direct evidence using in situ polymerase chain reaction that the endothelial cell and T-lymphocyte harbor latent murine cytomegalovirus. *Scand J Infect Dis Suppl*, 9961-2.
- Kondo, K., Xu, J. & Mocarski, E. S. (1996). Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocyte-macrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11137-42.
- Kyriazis, A. P. & Mitra, S. K. (1992). Multiple cytomegalovirus-related intestinal perforations in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Report of two cases and review of the literature. *Arch Pathol Lab Med* **116**, 495-9.

- Lang, D. J., Ebert, P. A., Rodgers, B. M., Boggess, H. P. & Rixse, R. S. (1977). Reduction of postperfusion cytomegalovirus-infections following the use of leukocyte depleted blood. *Transfusion* **17**, 391-5.
- Lemstrom, K., Koskinen, P., Krogerus, L., Daemen, M., Bruggeman, C. & Hayry, P. (1995). Cytomegalovirus antigen expression, endothelial cell proliferation, and intimal thickening in rat cardiac allografts after cytomegalovirus infection. *Circulation* **92**, 2594-604.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. & Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 12616-21.
- Ljunggren, H. G. & Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* **11**, 237-44.
- Ljungman, P., Biron, P., Bosi, A., Cahn, J. Y., Goldstone, A. H., Gorin, N. C., Link, H., Messina, C., Michallet, M., Richard, C. & et al. (1994). Cytomegalovirus interstitial pneumonia in autologous bone marrow transplant recipients. Infectious Disease Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplant* **13**, 209-12.
- MacCormac, L. P. & Grundy, J. E. (1996). Human cytomegalovirus induces an Fc gamma receptor (Fc gammaR) in endothelial cells and fibroblasts that is distinct from the human cellular Fc gammaRs. *J Infect Dis* **174**, 1151-61.
- Mahr, J. A. & Gooding, L. R. (1999). Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev*, 168121-30.
- Maudsley, D. J. & Pound, J. D. (1991). Modulation of MHC antigen expression by viruses and oncogenes. *Immunol Today* **12**, 429-31.
- McLaughlin Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D. & Riddell, S. R. (1994). Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* **43**, 103-10.
- Meyer Konig, U., Serr, A., von Laer, D., Kirste, G., Wolff, C., Haller, O., Neumann Haefelin, D. & Hufert, F. T. (1995). Human cytomegalovirus immediate early and late transcripts in peripheral blood leukocytes: diagnostic value in renal transplant recipients. *J Infect Dis* **171**, 705-9.
- Mocarski, E. S. J. & Courcelle, C. T. (2001). Cytomegaloviruses and their replication. In *Fields' virology*, 4 edn, pp. 2629-2674. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Modrow, S. & Falke, D. (1997). *Molekulare Virologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

- Muhlemann, K., Miller, R. K., Metlay, L. & Menegus, M. A. (1992). Cytomegalovirus infection of the human placenta: an immunocytochemical study. *Hum Pathol* **23**, 1234-7.
- Murray, J. G., Evans, S. J., Jeffrey, P. B. & Halvorsen, R. A. (1995). Cytomegalovirus colitis in AIDS: CT features. *AJR Am J Roentgenol* **165**, 67-71.
- Myerson, D., Hackman, R. C., Nelson, J. A., Ward, D. C. & McDougall, J. K. (1984). Widespread presence of histologically occult cytomegalovirus. *Hum Pathol* **15**, 430-9.
- Nabeshima, K., Sakaguchi, E., Inoue, S., Eizuru, Y., Minamishima, Y. & Kono, M. (1992). Jejunal perforation associated with cytomegalovirus infection in a patient with adult T-cell leukemia-lymphoma. *Acta Pathol Jpn* **42**, 267-71.
- Nakhleh, R. E., Bolman, R. M., 3rd, Henke, C. A. & Hertz, M. I. (1991). Lung transplant pathology. A comparative study of pulmonary acute rejection and cytomegaloviral infection. *Am J Surg Pathol* **15**, 1197-201.
- Ng Bautista, C. L. & Sedmak, D. D. (1995). Cytomegalovirus infection is associated with absence of alveolar epithelial cell HLA class II antigen expression. *J Infect Dis* **171**, 39-44.
- Pass, R. F. (2001). Cytomegalovirus. In *Fields' virology*, 4 edn, pp. 2675-2706. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Paya, C. V., Hermans, P. E., Wiesner, R. H., Ludwig, J., Smith, T. F., Rakela, J. & Krom, R. A. (1989). Cytomegalovirus hepatitis in liver transplantation: prospective analysis of 93 consecutive orthotopic liver transplantations. *J Infect Dis* **160**, 752-8.
- Percivalle, E., Revello, M. G., Vago, L., Morini, F. & Gerna, G. (1993). Circulating endothelial giant cells permissive for human cytomegalovirus (HCMV) are detected in disseminated HCMV infections with organ involvement. *J Clin Invest* **92**, 663-70.
- Piguet, V. & Trono, D. (1999). The Nef protein of primate lentiviruses. *Rev Med Virol* **9**, 111-20.
- Plachter, B., Sinzger, C. & Jahn, G. (1996). Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* **46**, 195-261.
- Podlech, J., Holtappels, R., Pahl Seibert, M. F., Steffens, H. P. & Reddehase, M. J. (2000). Murine model of interstitial cytomegalovirus pneumonia in syngeneic bone marrow transplantation: persistence of protective pulmonary CD8-T-cell infiltrates after clearance of acute infection. *J Virol* **74**, 7496-507.

- Reddehase, M. J., Jonjic, S., Weiland, F., Mutter, W. & Koszinowski, U. H. (1988). Adoptive immunotherapy of murine cytomegalovirus adenitis in the immunocompromised host: CD4-helper-independent antiviral function of CD8-positive memory T lymphocytes derived from latently infected donors. *J Virol* **62**, 1061-5.
- Reddehase, M. J., Mutter, W., Munch, K., Buhning, H. J. & Koszinowski, U. H. (1987). CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol* **61**, 3102-8.
- Reis, M. A., Costa, R. S. & Ferraz, A. S. (1995). Causes of death in renal transplant recipients: a study of 102 autopsies from 1968 to 1991. *J R Soc Med* **88**, 24-7.
- Renz-Polster & Braun (2001). *Basislehrbuch Innere Medizin*, 2. Auflage edn. München: Urban & Fischer Verlag.
- Reusch, U., Muranyi, W., Lucin, P., Burgert, H. G., Hengel, H. & Koszinowski, U. H. (1999). A cytomegalovirus glycoprotein re-routes MHC class I complexes to lysosomes for degradation. *EMBO J* **18**, 1081-91.
- Reusser, P., Attenhofer, R., Hebart, H., Helg, C., Chapuis, B. & Einsele, H. (1997). Cytomegalovirus-specific T-cell immunity in recipients of autologous peripheral blood stem cell or bone marrow transplants. *Blood* **89**, 3873-9.
- Reusser, P., Gambertoglio, J. G., Lilleby, K. & Meyers, J. D. (1992). Phase I-II trial of foscarnet for prevention of cytomegalovirus infection in autologous and allogeneic marrow transplant recipients. *J Infect Dis* **166**, 473-9.
- Reynolds, D. W., Stagno, S., Hosty, T. S., Tiller, M. & Alford, C. A. (1973). Maternal cytomegalovirus excretion and perinatal infection. *N Engl J Med* **289**, 1-5.
- Riddell, S. R. & Greenberg, P. D. (1994). Therapeutic reconstitution of human viral immunity by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocyte clones. *Curr Top Microbiol Immunol* **34**, 1899-34.
- Riddell, S. R. & Greenberg, P. D. (1995). Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases. *Annu Rev Immunol*, 13545-86.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E. & Greenberg, P. D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**, 238-41.
- Rinaldo, C. R. (1990). Immune suppression by herpesviruses. *Annu Rev Med*, 41331-8.
- Roberts, W. H., Sneddon, J. M., Waldman, J. & Stephens, R. E. (1989). Cytomegalovirus infection of gastrointestinal endothelium demonstrated by simultaneous nucleic acid hybridization and immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* **113**, 461-4.



- Roitt, I., Brostoff, J. & Male, D. (1993). Immunology.
- 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**, 252-4.
- Rummelt, V., Rummelt, C., Jahn, G., Wenkel, H., Sinzger, C., Mayer, U. M. & Naumann, G. O. (1994). Triple retinal infection with human immunodeficiency virus type 1, cytomegalovirus, and herpes simplex virus type 1. Light and electron microscopy, immunohistochemistry, and in situ hybridization. *Ophthalmology* **101**, 270-9.
- Rutzen, A. R., Ortega Larrocea, G., Dugel, P. U., Chong, L. P., Lopez, P. F., Smith, R. E. & Rao, N. A. (1995). Clinicopathologic study of retinal and choroidal biopsies in intraocular inflammation. *Am J Ophthalmol* **119**, 597-611.
- Sanchez, V., Angeletti, P. C., Engler, J. A. & Britt, W. J. (1998). Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. *J Virol* **72**, 3321-9.
- Sano, N. & Izumi, K. (1991). Hepatic cytomegalovirus involvement in autopsy cases. *Acta Pathol Jpn* **41**, 668-72.
- Scheppler, J. A., Nicholson, J. K., Swan, D. C., Ahmed Ansari, A. & McDougal, J. S. (1989). Down-modulation of MHC-I in a CD4+ T cell line, CEM-E5, after HIV-1 infection. *J Immunol* **143**, 2858-66.
- Schmidbauer, M., Budka, H., Ulrich, W. & Ambros, P. (1989). Cytomegalovirus (CMV) disease of the brain in AIDS and connatal infection: a comparative study by histology, immunocytochemistry and in situ DNA hybridization. *Acta Neuropathol (Berl)* **79**, 286-93.
- Schoppel, K., Schmidt, C., Einsele, H., Hebart, H. & Mach, M. (1998). Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* **178**, 1233-43.
- Sedmak, D. D., Guglielmo, A. M., Knight, D. A., Birmingham, D. J., Huang, E. H. & Waldman, W. J. (1994). Cytomegalovirus inhibits major histocompatibility class II expression on infected endothelial cells. *Am J Pathol* **144**, 683-92.
- Shintaku, M., Inoue, N., Sasaki, M., Izuno, Y., Ueda, Y. & Ikehara, S. (1991). Cytomegalovirus vasculitis accompanied by an exuberant fibroblastic reaction in the intestine of an AIDS patient. *Acta Pathol Jpn* **41**, 900-4.
- Sinzger, C., Bissinger, A. L., Viebahn, R., Oettle, H., Radke, C., Schmidt, C. A. & Jahn, G. (1999). Hepatocytes are permissive for human cytomegalovirus infection in human liver cell culture and In vivo. *J Infect Dis* **180**, 976-86.

- Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A. S., The, T. H. & Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* **76**, 741-50.
- Sinzger, C. & Jahn, G. (1996). Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* **39**, 302-19.
- Sinzger, C., Muntefering, H., Loning, T., Stoss, H., Plachter, B. & Jahn, G. (1993a). Cell types infected in human cytomegalovirus placentitis identified by immunohistochemical double staining. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **423**, 249-56.
- Sinzger, C., Plachter, B., Grefte, A., The, T. H. & Jahn, G. (1996). Tissue macrophages are infected by human cytomegalovirus in vivo. *J Infect Dis* **173**, 240-5.
- Sinzger, C., Plachter, B., Stenglein, S. & Jahn, G. (1993b). Immunohistochemical detection of viral antigens in smooth muscle, stromal, and epithelial cells from acute human cytomegalovirus gastritis. *J Infect Dis* **167**, 1427-32.
- Söderberg Naucner, C., Fish, K. N. & Nelson, J. A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* **91**, 119-26.
- Span, A. H., Mullers, W., Miltenburg, A. M. & Bruggeman, C. A. (1991). Cytomegalovirus induced PMN adherence in relation to an ELAM-1 antigen present on infected endothelial cell monolayers. *Immunology* **72**, 355-60.
- Span, A. H., Van Boven, C. P. & Bruggeman, C. A. (1989). The effect of cytomegalovirus infection on the adherence of polymorphonuclear leucocytes to endothelial cells. *Eur J Clin Invest* **19**, 542-8.
- Stagno, S., Reynolds, D. W., Pass, R. F. & Alford, C. A. (1980). Breast milk and the risk of cytomegalovirus infection. *N Engl J Med* **302**, 1073-6.
- Stam, N. J., Vroom, T. M., Peters, P. J., Pastoors, E. B. & Ploegh, H. L. (1990). HLA-A- and HLA-B-specific monoclonal antibodies reactive with free heavy chains in western blots, in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections and in cryo-immuno-electron microscopy. *Int Immunol* **2**, 113-25.
- Steinmassl, M. & Hamprecht, K. (1994). Double fluorescence analysis of human cytomegalovirus (HCMV) infected human fibroblast cultures by flow cytometry: increase of class I MHC expression on uninfected cells and decrease on infected cells. *Arch Virol* **135**, 75-87.
- Taylor Wiedeman, 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**, 2059-64.

- Tazelaar, H. D. (1991). Perivascular inflammation in pulmonary infections: implications for the diagnosis of lung rejection. *J Heart Lung Transplant* **10**, 437-41.
- Tegtmeier, G. E. (1986). Cytomegalovirus infection as a complication of blood transfusion. *Semin Liver Dis* **6**, 82-95.
- Tilg, H., Vogel, W., Aulitzky, W. E., Herold, M., Konigsrainer, A., Margreiter, R. & Huber, C. (1990). Evaluation of cytokines and cytokine-induced secondary messages in sera of patients after liver transplantation. *Transplantation* **49**, 1074-80.
- Toorkey, C. B. & Carrigan, D. R. (1989). Immunohistochemical detection of an immediate early antigen of human cytomegalovirus in normal tissues. *J Infect Dis* **160**, 741-51.
- Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J. & Ploegh, H. L. (2000). Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol*, 18861-926.
- Urban, M., Klein, M., Britt, W. J., Hassfurth, E. & Mach, M. (1996). Glycoprotein H of human cytomegalovirus is a major antigen for the neutralizing humoral immune response. *J Gen Virol* **77**, 1537-47.
- Vachon, G. C., Brown, B. S., Kim, C. & Chessin, L. N. (1995). CMV gastric ulcer as the presenting manifestation of AIDS. *Am J Gastroenterol* **90**, 319-21.
- 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* **160**, 3143-51.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D. & Riddell, S. R. (1995). Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* **333**, 1038-44.
- Warren, A. P., Ducroq, D. H., Lehner, P. J. & Borysiewicz, L. K. (1994). Human cytomegalovirus-infected cells have unstable assembly of major histocompatibility complex class I complexes and are resistant to lysis by cytotoxic T lymphocytes. *J Virol* **68**, 2822-9.
- Wiertz, E. J., Jones, T. R., Sun, L., Bogoy, M., Geuze, H. J. & Ploegh, H. L. (1996). The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* **84**, 769-79.
- Wiley, C. A. & Nelson, J. A. (1988a). Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Am-J-Pathol* **133**, 73-81.
- Wiley, C. A. & Nelson, J. A. (1988b). Role of human immunodeficiency virus and cytomegalovirus in AIDS encephalitis. *Am J Pathol* **133**, 73-81.

- Winston, D. J., Ho, W. G., Bartoni, K., Du Mond, C., Ebeling, D. F., Buhles, W. C. & Champlin, R. E. (1993). Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Intern Med* **118**, 179-84.
- Winston, D. J., Ho, W. G., Howell, C. L., Miller, M. J., Mickey, R., Martin, W. J., Lin, C. H. & Gale, R. P. (1980). Cytomegalovirus infections associated with leukocyte transfusions. *Ann Intern Med* **93**, 671-5.
- Yamane, Y., Furukawa, T. & Plotkin, S. A. (1983). Supernatant virus release as a differentiating marker between low passage and vaccine strains of human cytomegalovirus. *Vaccine* **1**, 23-5.
- Yamashita, 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**, 727-36.
- Zhu, H., Shen, Y. & Shen, T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* **69**, 7960-70.
- Ziegler, H., Thale, R., Lucin, P., Muranyi, W., Flohr, T., Hengel, H., Farrell, H., Rawlinson, W. & Koszinowski, U. H. (1997). A mouse cytomegalovirus glycoprotein retains MHC class I complexes in the ERGIC/cis-Golgi compartments. *Immunity* **6**, 57-66.

## 8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich herzlich bei allen, die mich bei der Vorbereitung und Ausführung dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Professor Dr. med. Gerhard Jahn für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit, die hervorragenden Ressourcen des Institutes für Medizinische Virologie zu nutzen.

Herrn Dr. med. Christian Sinzger für die sehr gute Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für seine konstruktive Beratung bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Herrn Professor Dr. med. Dan Sedmak und Herrn Professor Dr. med. P. H. Wünsch für die hilfreiche Bereitstellung der Gewebeschnitte, die für die Durchführung dieser Arbeit unerlässlich waren.

## 9 Lebenslauf

Geboren	14. 02. 1975
Geburtsort	Reutlingen
Staats- angehörigkeit	deutsch
<hr/>	
1981 – 1985	Alexander-von-Humboldt-Schule in Lima/Peru (Grundschule)
1986 – 1994	Carlo-Schmid-Gymnasium in Tübingen
1994	Abitur am Carlo-Schmid-Gymnasium in Tübingen
1994 – 2001	Medizinstudium an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
1997	Famulatur in der Abteilung für Chirurgie der Universitätsklinik Tübingen
1998	Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin sowie Pädiatrie am staatlichen Krankenhaus Dumaguete/Philippinen
1998	Praxisfamulatur in Dermatologie in Tübingen
1999	Famulatur in der Abteilung für Innere Medizin sowie Pädiatrie am staatlichen Krankenhaus in Arequipa/Peru
1998 – 2000	Experimentelle Arbeit zur Promotion am Institut für Medizinische Virologie in Tübingen
2000 – 2001	Praktisches Jahr am Kreiskrankenhaus Sigmaringen
13. 11. 2001	3. Staatsexamen in Medizin