

EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

Medizinische Klinik und Poliklinik

Abt. Innere Medizin II
Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie
Leiterin: Prof. Dr. C.A. Müller

72076 Tübingen, 14.04.1997

Otfried-Müller-Str. 10

Telephon 07071/29-83682

Telefax 07071/29-5755

E-mail: claudia.mueller@uni-tuebingen.de

An die

DLR

Projekträger des BMBF

Südstraße 125

D 53175 Bonn

Schlußbericht

zu

Vorhaben: „Funktionelle und molekulare Grundlagen T-zellulärer Abwehrreaktionen bei symptomatischen und asymptomatischen CMV-Infektionen nach KMT“
im Forschungsverbund: „Komplikation der Organtransplantation durch Herpesviren“

FKZ: 01KI9305/5

Ausf. Stelle: Med. Univ. Klinik und Poliklinik, Abt. II Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie, Tübingen

Projektleiter: Prof. Dr. C.A. Müller/PD. Dr. H. Einsele

1. Kurze Darstellung zu

1.1 Aufgabenstellung:

Wesentliches Ziel des Projektes war die Analyse T-zellulärer Immunreaktionen gegen HCMV nach allogener Knochenmark- bzw. Stammzelltransplantation und ihre Korrelation zum Auftreten symptomatischer bzw. asymptomatischer Verläufe der HCMV-Infektion, um hieraus ein besseres Verständnis normaler und pathologischer Rekonstitution der antiviralen Immunität zu erhalten. Hierauf sollten effektivere Strategien zur Prophylaxe und Protektion

der HCMV-Erkrankung nach Transplantation aufgezeigt und erprobt werden. Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- a) Wie korrelieren Defekte der Rekonstitution von spezifischen T-Zellreaktionen gegen HCMV zum Auftreten von symptomatischen bzw. asymptomatischen Verläufen der HCMV - Reaktivierung nach KMT?
- b) Führt eine präemptive Therapie mit Ganciclovir basierend auf einem kontinuierlichen Monitoring der HCMV-Reaktivierung und Rekonstitution der antiviralen T-zellulären Immunantwort mit Hilfe molekularbiologischer bzw. zellbiologischer Verfahren zur Reduktion der HCMV-Erkrankung und Verbesserung der Überlebensrate der Patienten?
- c) Gegen welche antigenen Strukturen von HCMV richten sich die T-Zellreaktionen nach KMT im Vergleich zur Reaktion des Donors vor KMT? Gibt es eine dominante Erkennung spezifischer viraler Proteine während der HCMV-Reaktivierung bzw. Latenz. Welche immunogenen Epitope bieten Protektion?
- d) Zeigen Analysen des T-Zell-Rezeptor-Repertoires spezifischer antiviraler T-Zellen eine oligoklonale oder polyklonale Immunantwort an und bestehen hierin Unterschiede zwischen symptomatischen und asymptomatischen Patienten nach KMT?
- e) Wie korreliert die Infektion mit unterschiedlichen klinischen Varianten zum Auftreten von Erkrankungssymptomen? Gibt es klinische Varianten von HCMV, die häufig zu Symptomen führen?

1.2 Voraussetzungen

Die Arbeitsgruppe konnte zu Beginn des Projektes sensitive molekularbiologische Nachweisverfahren für HCMV vorweisen, mit deren Hilfe sich frühzeitiger als mit herkömmlichen Kulturverfahren HCMV nach der KMT detektieren ließ.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens

In der ersten Phase des Projektes (1993 -1995) konzentrierten sich die Untersuchungen auf Verlaufstudien der Rekonstitution proliferativer antiviraler T-zellulärer Immunreaktionen ab Tag 30 nach KMT bei 50 Patienten, die in Tübingen wegen maligner Erkrankungen der Hämatopoiese von einem Geschwister oder Fremdspender transplantiert worden waren. Die Befunde wurden zum Auftreten von HCMV-Erkrankung und zur HCMV-Reaktivierung, die mit einem spezifischen PCR-Verfahren im Blut nachgewiesen wurde, korreliert.

In der zweiten Phase des Projektes wurde in einer prospektiven Studie die Effektivität einer präemptiven Therapie basierend auf der Charakterisierung von Risiko-Patienten durch den PCR-Nachweis der HCMV-Reaktivierung und einer noch defekten antiviralen Immunrekonstitution evaluiert. Gleichzeitig wurde bei einzelnen Patienten/Spender- Paaren eine genaue Charakterisierung der Spezifität antiviraler T-Zellen durch Klonierung und Analyse mit rekombinanten HCMV-Proteinen bzw. synthetischen Peptiden durchgeführt. Methoden zur Analyse des TCR-Repertoires wurden aufgebaut.

1.4 Stand der Forschung, an den angeknüpft wurde

Zum Zeitpunkt des Beginn des Projektes stellte die HCMV-Erkrankung eine schwerwiegende Komplikation nach allogener KMT mit hoher Mortalitäts- und Morbiditätsrate dar. Prophylaktische Gaben von Gancyclovir in vielen Transplantationszentren hatten zwar eine Reduktion der Frequenz und Schwere der HCMV-Erkrankung bewirkt, jedoch hatte sich die Frühmortalität der Patienten auf Grund der myelotoxischen Nebenwirkungen von Gancyclovir bzw. durch die über den Kulturnachweis bedingten verzögerten HCMV-Diagnostik nicht senken lassen. Es wurde daher nach Parametern gesucht, die eine rechtzeitige Erkennung von Risiko-Patienten für die HCMV-Erkrankung differenzieren ließen und neue Wege einer effektiveren Behandlung aufzeigen konnten.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Für die Durchführung des Projektes war die enge Kooperation mit anderen Projekten im Forschungsverbund (Prof. Mach, Erlangen, Dr. Stamminger, Erlangen, Prof. Jahn, Tübingen), insbesondere zum Austausch von Reagenzien, rekombinanten Proteinen von HCMV eine essentielle Voraussetzung.

2. Eingehende Darstellung der erzielten Ergebnisse

Mit Hilfe molekularbiologischer Nachweisverfahren wurde es möglich, Patientengruppen, für die durch Reaktivierung von HCMV in der Frühphase nach KMT ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung bestand, rechtzeitig und selektiv einer Therapie mit Gancyclovir zuzuführen (1,3,4,5). Durch gleichzeitige PCR-basierte Steuerung auch der Dauer der Behandlung ließ sich eine signifikante Reduktion der HCMV-Erkrankung, aber

auch der Nebenwirkungen der Behandlung erzielen. Damit konnte eine signifikante Erhöhung der Überlebensrate der Patienten gezeigt werden (9). Problematisch blieb, daß bei dieser optimierten Strategie weiterhin ca. 60% der Patienten, die trotz HCMV-Reaktivierung und nachweislicher HCMV-DNAämie nach KMT erfahrungsgemäß keine HCMV-Erkrankung entwickelt hätten, weiterhin einer mit erheblichen Nebenwirkungen einhergehenden Überbehandlung unterzogen wurden. Ferner zeigte sich, daß zwar alle Patienten nach Beendigung einer antiviralen Therapie bei PCR-Negativität kurzfristig erkrankungsfrei blieben, jedoch eine Reihe dieser Patienten (ca. 15%) erst nach Tag 100 eine späte schwere HCMV-Erkrankung entwickelten.

Um hier sowohl eine weitere Eingrenzung der tatsächlichen Risikogruppe für eine HCMV-Erkrankung in der Frühphase nach KMT zu erreichen wie auch Patienten mit Prädisposition für eine spätere HCMV-Erkrankung aufzuzeigen, untersuchten wir in den folgenden Analysen dieses Projektes, ob die Rekonstitution der T-zellulären CMV-spezifischen Immunabwehr in den verschiedenen Patientengruppen nach KMT unterschiedlich verlief. In 30 allogenen KMT-Patienten/Spender-Paaren zeigten sich langanhaltende Defekte in der antigenunspezifischen Proliferation von T-Zellen gegenüber Stimulation mit Phytohemagglutinin, während IL-2 aktivierbare T-Zellen nur in der Frühphase nach KMT eingeschränkt zu sein schienen. HCMV-spezifische proliferative T-Zell-Reaktionen ließen sich frühestens ab Tag 37 nach KMT, bei den meisten Patienten erst nach Tag 100 beobachten. Patienten, die von einem unverwandten Spender transplantiert worden waren, zeigten gegenüber Patienten mit einem Transplantat von einem HLA-identischen Familienspender eine signifikante Verzögerung der Rekonstitution proliferativer HCMV-spezifischer T-Zell-Reaktionen. Ein Teil der Patienten rekonstituierte auch ein Jahr nach KMT keine CMV-spezifische T-Zell-Antwort. Alle Patienten mit HCMV-spezifischer T-Zellproliferation zeigten keine HCMV-Erkrankung, während für alle Patienten ohne HCMV-spezifische T-Zell-Rekonstitution das Risiko, an der HCMV-Infektion zu erkranken, signifikant erhöht war. So entwickelten 50% der Patienten ohne eine frühzeitige HCMV-spezifische proliferative T-Zell-Rekonstitution eine HCMV-Erkrankung in der Spätphase nach KMT (16). Bei einzelnen Patienten ließ sich beobachten, daß erneut auftretende Virämien bei schon bestehenden T-Zell-Reaktionen auch ohne weitere therapeutische Maßnahmen zu keinen Erkrankungserscheinungen führten.

Um zu klären, welche Antigenspezifität die CMV-spezifischen T-Zellen besaßen und ob Unterschiede in der antiviralen Reaktivität vor und nach KMT bei Patienten und ihren Donoren auftraten, wurden die in vitro aktivierbaren HCMV-spezifischen T-Zellen als Linien

oder Klone bei einzelnen Spender/Empfänger-Paaren expandiert und in ihrer Spezifität mit Hilfe 7 rekombinanter HCMV Protein evaluiert. Es wurde beobachtet, daß die Erkennung von rekombinanten Proteinen in Abhängigkeit von der HLA-Genetik variieren konnte. So konnte bei einzelnen Patienten eine bevorzugte Erkennung von Epitopen des Matrix-Proteins pp65 bzw. des Hüllproteins gH gezeigt werden. Entsprechende unterschiedliche Dominanz in der Erkennung von spezifischen Virusproteinen fand sich auch beim jeweiligen Donor. Dies deutet daraufhin, daß die T-Zell-Spezifität für spezifische HCMV-Proteine offensichtlich auch nach KMT verzögert wieder rekonstituiert wird. Genaues Epitop-Mapping der T-Zellklone, die gegen pp65 gerichtet waren, ergab, daß auch die Epitopspezifität nach KMT erhalten bleiben kann. Nahezu alle Klone eines Empfänger/Donor-Paares erkannten hierbei ein Peptid zwischen den Aminosäurepositionen AA512-523 aus dem Matrixprotein pp65, wobei die Erkennung sowohl HLA-DQ als auch HLA-DR restringiert sein konnte. Mit Ausnahme eines Klones exprimierten alle klonierten T-Zellen CD4. Nahezu alle antiviralen CD4+ T-Zellklone zeigten erstaunlicherweise HLA-Klasse II restringierte Zytotoxizität. Ein Teil der T-Zellklone gegen das dominante pp65 Epitop wurde schwach auch durch zwei weitere Sequenzen aus pp65 stimuliert. Dies deutet daraufhin, daß pp65 verschiedene dominante T-Zell-Epitope aufweist, die in ihrer Bindung an HLA-DR/DQ Moleküle sowie an T-Zell-Rezeptormoleküle promiskuitiv sind. Da die Erkennung dieser Epitope für HLA-DQ bzw. -DR Moleküle restringiert ist, die in der Bevölkerung weit verbreitet sind, könnten sich dies Epitope auch zur Vakzinierung bzw. Boosterung spezifischer HCMV-Immunreaktionen eignen.

In weiteren Analysen wurden mit Hilfe spezifischer Primer für die bekannten V α und V β Familien die T-Zell-Rezeptoren der klonierten pp65 spezifischen T-Zellklone untersucht. Sie zeigten keine Einheitlichkeit oder bevorzugte Verwendung spezifischer V α bzw. β Ketten auch bei identischer HLA-Restriktion bzw. Erkennung des gleichen Peptid-Epitops. Identische Aminosäurepositionen in den CDR3 Regionen der TCR von T-Zellen mit Restriktion für das dominante pp65 Epitop, deuteten jedoch auf Einflüsse des Peptids in der Selektion antiviraler T-Zellen hin. Obwohl aus PBL von Spender und Empfänger nach KMT mehrere Klone mit identischer HLA-Restriktion und Epitop-Spezifität generiert worden waren, zeigten sie alle Expression unterschiedlicher TCR-Ketten. Damit konnte bisher nicht gezeigt werden, daß eine Rekonstitution der antiviralen proliferativen T-Zellantwort nach KMT aus Gedächtniszellen des Donors erfolgt. Weitere Untersuchungen zur Frage der Generierung der antiviralen T-Zellantwort aus Gedächtniszellen oder neu rekrutierten Vorläuferzellen sind Gegenstand

eines neuen Antrages. Aus diesen Untersuchungen könnten sich Aussagen zur Verbesserung der antiviralen Immunität durch Boosterung des Donors vor KMT ableiten lassen.

Weitere Analysen auch von virus-spezifischen Eigenschaften, die die Immunabwehr beeinflussen konnten, befaßten sich mit Untersuchungen zum Auftreten von Virusvarianten in Korrelation zur Entwicklung der HCMV-Erkrankung. Es zeigte sich, daß Exon 3 der Immediate Early Region von HCMV bei ca. 50% der symptomatischen Patienten im Vergleich zu ca. 15% der asymptomatischen Patienten nach KMT Punktmutationen aufwies. Ferner ließ sich bei fast allen symptomatischen Patienten die gB -Varianten vom Typ 2-4 bestimmen, während asymptomatische Patienten signifikant häufiger den gB Typ 1 zeigten. Damit scheinen bei Patienten nach KMT neben immunologischen Parametern auch Viruseigenschaften die Virus-Wirt-Interaktion zu beeinflussen.

Insgesamt führten die Untersuchungen zu wesentlichen Verbesserungen im therapeutischen Vorgehen bei der HCMV Infektion bzw. Reaktivierung nach KMT und hierdurch zur erheblichen Reduktion der Mortalität der Patienten vor allem in der Frühphase nach Transplantation. Es konnten bei den Patienten nach KMT verschiedene T-Zell-Epitope von HCMV definiert werden, gegen die nach Auftreten einer Virämie die T-zelluläre Immunantwort rekonstituiert wurde und deren Erkennung offensichtlich mit Protektion einherging. Diese Epitope könnten sich für die Immunsisierung der Donoren vor KMT zur Boosterung einer antiviralen protektiven Immunantwort eignen.

Publikationen im Förderzeitraum aus dem Projekt:

1. H. Einsele, P. Ljungman: New developments in the diagnosis, therapy and prophylaxis of CMV infection in marrow transplant recipients. Bone Marrow Transplantation 12: 85-87, 1993
2. G.A. Müller, N. Braun, H. Einsele, C.A. Müller: Human cytomegalovirus infection in transplantation. Nephron 64:343-353, 1993
3. H. Einsele, G.Ehninger, M. Steidle, I. Fischer, S. Bühler, F. Gerneth, H. Schmidt, H.D. Waller, C.A. Müller: Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with CMV infection after bone marrow transplantation. Blood 82:1672-1678, 1993

4. P. Ljungman, R.de Bock, C. Cordonnier, H. Einsele, D. Engelhard, J. Grundy, A. Locasciully, P. Reusser, R. Ribaud: Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplantation* 12:399-403, 1993
5. G.A. Müller, C.A. Müller, H.Einsele: Cytomegalovirus in transplantation. *Nephrol. Dial.Transpl.* 9:3-4, 1994
6. H. Einsele, G. Ehninger, H.D. Waller, P. Weber, S. Dette, H. Hebart, A. Roos, H. Roos, H. Link, C.A. Müller: Frequency and clinical, histological and immunohistological features of CMV-hepatitis in marrow transplant recipients. *Med. Microbiol. Immunol.* 183:205-216, 1994
7. H. Einsele, G. Ehninger, M. Steidle, P. Weber, S. Dette, P. Horny, H. Hebart, H. Link, C.A. Müller: Acute GvHD and CMV infection of the intestine after allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 14:955-963, 1994
8. P. Ljungman, C. Cordonnier, R.de Bock, H. Einsele, D. Engelhardt, J. Grundy, H. Link, A. Locasciulli, G. Prentice, P. Reusser, P. Ribaud for the Infectious Diseases Working Party of the EBMT. Immunizations after bone marrow transplantation; results of a European survey and recommendations from the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 15:455-460, 1995
9. H. Einsele, G. Ehninger, H. Hebart, U. Schuler, P. Mackes, M. Herter, T. Klingebiel, J. Löffler, S. Wagner, C.A. Müller: PCR-monitoring after BMT to reduce the incidence of CMV disease and the duration and side effects of antiviral therapy. *Blood* 86:815-8220, 1995
10. C.A. Müller, M. Steidle, A. Roos, H. Roos, H. Hebart, H. Einsele: Correlation of interstitial pneumonia with HCMV lung infection and GvHD after BMT. *Med. Microbiol. Immunol.* 185:112-116, 1995
11. A. Ehrnst, H. Einsele: Towards standardization of CMV PCR Assays. *Scand. J. Infect. Dis.* 99:16-18, 1995

12. H. Hebart, C.A. Müller, J. Löffler, G. Jahn, H.D. Waller, H. Einsele: Comparison between PCR from whole blood, plasma-PCR, pp65-antigenemia and virus culture in patients after bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 17:861-868, 1996
13. P. Reusser, A. Ehrnst, H. Einsele, V.C. Emery, H. Hebart, H.G. Prentice, P.Ljungman: The need for external quality control for viral diagnosis; a three centre European study of the PCR for the detection of cytomegalovirus in blood. *J. Clin. Microbiol.* 34:1166-1170, 1996
14. H. Hebart, H. Einsele, R. Klein, I. Fischer, S. Bihler, G. Ehninger, J. Saal, A.P. Berg, L. Kanz, C.A. Müller: Cytomegalovirus induced oligoclonal B-cell activation after allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* in press
15. H. Einsele, H. Hebart, C. Kauffmann, C. Sinzger, G. Jahn, M. Herter, T. Klingebiel, J. Löffler, C. Bokenmeyer, W.Brugger, L. Kanz, C.A. Müller: Short course therapy with PCR ganciclovir based on PCR-monitoring to control CMV infection after BMT. submitted to *Leukemia*
16. H. Krause, H. Hebart, G. Jahn, C.A. Müller, H. Einsele: Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk to develop late-onset CMV disease. *Bone Marrow Transplantation* in press
17. R. Holoher, H. Krause, H. Hebart, M. Mach, W. Lindenmayer, R. Vornhagen, H. Kalbacher, H. Einsele, C.A. Müller: Epitope-mapping of HCMV pp65-specific T cell clones before and after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transpl.* 17, S65 (Abstrakt) 1996
18. C.A. Müller, M. Steidle M, A. Roos, H. Hebart, K. Klingel, R. Kandolf, G. Jahn, H. Einsele: Local human cytomegalovirus infection provides an increased risk for graft-versus-host disease of the skin after allogeneic bone marrow transplantation. *J Infect Diseases* submitted .

19. C.A. Müller, R. Holocher, H. Krause, H. Kalbacher, M. Mach, H. Hebart, W. Lindenmayer, R. Vornhagen, H. Einsele: Epitope specific reconstitution of proliferative T cell reactivity against HCMV after allogeneic BMT (in Vorbereitung).

20. H. Krause: Charakterisierung der HCMV spezifischen T-Zellantwort nach allogener Knochenmarktransplantation. Dissertation 1996. Fakultät für Biologie, Univ. Tübingen

3. Erfolgskontrollbericht

Die in diesem Projekt auch mit anderen internationalen Gruppen erarbeiteten Ergebnisse führten zu einer verbesserten Standardisierung der Diagnostik und Therapie der HCMV-Infektion bzw. -Reaktivierung nach KMT. Durch eine preemptive, über eine molekularbiologische Diagnostik gesteuerte Therapie läßt sich in nahezu allen Fällen eine schwere HCMV-Erkrankung in der Frühphase nach KMT vermeiden.

Dennoch zeigen ca. 20-30% der Patienten eine defekte Rekonstitution der zellulären antiviralen Immunantwort nach KMT. Dies ließ sich in unserer Patientengruppe wie auch in anderen internationalen Studien beobachten. Hieraus resultiert heute eine Zunahme der späten HCMV-Erkrankung („late onset disease“). In der Arbeitsgruppe von Greenberg wurde versucht, durch adoptiven Transfer von cytotoxischen T-Zellen hier eine Prophylaxe zu bieten. Ihre bisherigen Befunde deuten jedoch daraufhin, daß mit dieser T-Zellgabe nicht auf Dauer eine Rekonstitution der antiviralen Immunantwort zu erreichen ist, sondern nur kurzfristig eine Protektion geboten werden kann.

Die in diesem Projekt aufgezeigten T-Zell-Epitope von HCMV-Proteinen könnten sich dazu eignen, neue Strategien der Therapie für Patienten nach KMT zu entwickeln, die nicht in der Lage sind, eine spezifische antivirale Immunantwort wieder aufzubauen. Hierzu zählen die Donorimmunisierung vor KMT, die Generierung von spezifischen antiviralen Helfer-T-Zellen, mit denen sich protektive cytotoxische T-Zellen eventuell in vivo rekrutieren lassen sowie die Gabe von mit viralen Peptiden/Antigenen beladenen dendritischen Zellen für alle Patienten nach KMT, deren primärer Immundefekt in der Generierung von antigenpräsentierenden Zellen liegt. Für solche Strategien ist die Definition von immunogenen Strukturen von HCMV, wie sie hier in diesem Projekt für CD4⁺ T-Zellen erreicht wurde und in anderen Studien für CD8⁺ T-Zellen beschrieben wurde, essentiell. Eine Patentierung dieser Epitope könnte daher von Interesse sein.

Alle in diesem Projekt geplanten Arbeiten wurden entsprechend dem vorgelagerten Zeit- und Finanzierungsplan durchgeführt. Eine klinische Applikation von antiviralen T-Zellen in einem adoptiven Transfer ist weiteren Studien vorbehalten.

4. Kurzfassung des Schlußberichtes

In dem vorliegenden Projekt wurde durch eine optimierte molekularbiologische Diagnostik in Korrelation zur Differenzierung von Risiko-Patienten mit defekter T-Zell-Rekonstitution eine wesentlich gezieltere Anwendung der antiviralen Therapie mit Ganciclovir erreicht und damit die Prognose der Patienten mit HCMV-Infektion nach KMT erheblich gebessert. Ferner wurden durch Definition der Spezifität der T-zellulären Reaktionen bei asymptomatischen Patienten mit Virämie nach KMT immunogene Epitope der HCMV-Proteine pp65 und gH definiert, deren Erkennung offensichtlich zur Protektion beitrug. Solche immunogenen Strukturen können für zukünftige Immunisierungsstrategien wie auch für die in vitro Expansion spezifischer viraler T-Zellen, wie sie für die Langzeitrekonstitution der antiviralen Immunantwort und die Vermeidung später HCMV-Erkrankungen notwendig sind, eingesetzt werden. Durch Definition von Virusvarianten in Korrelation zum Auftreten von Symptomen der HCMV-Erkrankung wurden gezeigt, daß wie auch in Untersuchungen anderer Gruppen die Immunabwehr wahrscheinlich vor allem durch gB Varianten vom Typ 2-4 ungünstig beeinflusst wird. in correlation to the development of symptoms of HCMV disease

In this project application of a very sensitive molecularbiological diagnosis of HCMV-viremia in correlation to the definition of defective reconstitution of antiviral T cell immune responses allowed to early define patients at risk for HCMV disease after BMT and to optimize antiviral therapy with ganciclovir. Thus prognosis of patients with HCMV infection after BMT was significantly improved particularly due to the reduction of early HCMV disease. Specificity of protective T cell immune responses were analyzed in patients with asymptomatic viremia after BMT and shown to be directed against dominant epitopes of the HCMV proteins pp65 and gH in different patients. These immunogenic structures could be used for immunization or ex vivo expansion of antiviral T cells for long term reconstitution of antiviral immunity and protection from late onset HCMV disease. Definition of variants of HCMV showed gB variants type 2-4 as well as frequent point mutations of the immediate early genes to correlate with the development of symptoms of HCMV disease indicating unfavourable influences of the virus on host interactions.