

Aus der Medizinische Klinik III (Hämatologie, Onkologie und Transfusionsmedizin)
Campus Benjamin Franklin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Phänotypische und funktionelle Charakterisierung
CMV-spezifischer T-Zell-Antworten
im peripheren Blut und Knochenmark**

zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Maren Kristina Knödler
aus Heidelberg

Gutachter/in 1: Prof. Dr. med. C. Scheibenbogen

Gutachter/in 2: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. A. Kaufmann

Gutachter/in 3: Prof. Dr. med. P. Brossart

Datum der Promotion: 16.05.2010

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 T-Zell-vermittelte Immunität	1
1.1.1 Erkennung von Antigenen	2
1.1.2 Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen	2
1.1.3 Das immunologische Gedächtnis	4
1.1.4 Charakterisierung des Differenzierungszustandes.....	5
1.1.5 Chemokine.....	7
1.1.6 Das Kompartiment Knochenmark	9
1.2 CMV-Virus	10
1.3 Nachweismethoden für antigenspezifische T-Zellen.....	11
1.4 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Material	16
2.1.1 Spender	16
2.1.2 Dichtegradient	16
2.1.3 Kulturmedien	16
2.1.4 Puffer	17
2.1.5 Spezielle Reagenzien in der Durchflusszytometrie	17
2.1.6 Zytokine.....	17
2.1.7 Peptide und Tetramere.....	17
2.1.8 FACS-Antikörper	18
2.1.9 Produkte für die magnetische Zellseparation	19
2.2 Methoden	19
2.2.1 Gewinnung von MNZ aus Heparin-Vollblut.....	19
2.2.2 Gewinnung und Isolation von Lymphozyten aus dem KM von Hüftköpfen.....	19
2.2.3 Auftauen der Zellen	20
2.2.4 Zellzahlbestimmung	20

2.2.5	Durchflusszytometrie.....	21
2.2.6	Nachweis von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen	21
2.2.7	Durchflusszytometrische Messung.....	22
2.2.8	Tetramer Analyse	22
2.2.9	Durchführung der T-Zell-Expansion.....	23
2.2.10	Separation CD8+ T-Zellen mittels antikörperbeschichteten magnetischen Partikeln.....	23
2.2.11	Bestrahlung der Zellen.....	24
2.2.12	Expansion der virusspezifischen T-Zellen	24
2.2.13	Statistische Auswertung	24
3	Ergebnisse	26
3.1	HLA-Typisierung von Patienten mit Hüftkopfresektion	26
3.2	Vergleichende Quantifizierung virusspezifischer T-Zellen im pB und KM mittels durchflusszytometrischer Methoden.....	26
3.3	Phänotypische Charakterisierung CMV-spezifischer T-Zellen im pB und KM.....	28
3.4	Phänotypische Charakterisierung EBV-spezifischer CD8+ T-Zellen im pB und KM.....	32
3.5	Vergleichende Expansion CMV-spezifischer T-Zellen aus pB und KM	33
3.6	Differenzielle Expression des Oberflächenantigens CXCR4 auf CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen im pB und KM	35
4	Diskussion.....	38
4.1	Vergleichende Charakterisierung virusspezifischer T-Zell-Antworten im pB und KM	38
4.2	Migrationsmechanismen virusspezifischer T-Zellen.....	39
4.3	Expansionspotential virusspezifischer T-Zellen.....	41
4.4	Perspektiven für adoptive Immuntherapien	43
5	Zusammenfassung	44
6	Literaturverzeichnis	45
7	Abkürzungsverzeichnis	55
8	Abbildungsverzeichnis	57
9	Tabellenverzeichnis	58

Danksagung	59
Curriculum vitae	60
Publikationsliste	61
Selbständigkeitserklärung	64

1. Einleitung

Die Zielsetzung der Arbeit war es zu klären, inwieweit Unterschiede in der Differenzierung und Expansionsfähigkeit CMV-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut (pB) und Knochenmark (KM) bestehen.

1.1 T-Zell-vermittelte Immunität

Die Zellen des Immunsystems haben ihren Ursprung im KM. T-Zellen entstehen aus pluripotenten Stammzellen des KM und gelangen als Vorläuferlymphozyten in den Thymus. In diesem lymphatischen Organ findet die weitere Reifung und Prägung zu immunkompetenten T-Zellen sowie die Bildung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires statt. Dabei werden T-Zellen mittels Kontakt zwischen dem T-Zell-Rezeptor (TZR) und MHC-Molekülen (MHC= Major Histocompatibility Complex) positiv selektioniert. In einem weiteren Selektionsschritt, dem Prozess der negativen Selektion, werden solche T-Zellen eliminiert, die gegen körpereigene, an MHC-Moleküle gebundene Antigene reagieren.

Die Bedeutung der T-Zell-vermittelten Immunität liegt in der Kontrolle intrazellulärer Pathogene wie viralen und bakteriellen Antigenen sowie Tumorantigenen. Der entscheidende erste Schritt einer T-Zell-vermittelten oder adaptiven Immunantwort ist die Aktivierung naiver antigenspezifischer T-Zellen durch antigenpräsentierende Zellen (APZ). Bedingt durch die spezifische Erkennung werden naive T-Zellen (T_n) aktiviert und im Folgenden zur Proliferation und Differenzierung zu Effektor-T-Zellen (T_{eff}) angeregt. Es werden zwei Hauptklassen von T-Zellen mit unterschiedlichen Effektorfunktionen ausgebildet: 1) CD8⁺ zytotoxische T-Zellen erkennen und töten Zielzellen, welche Fremd-Antigene an ihrer Zelloberfläche exprimieren. 2) CD4⁺ T-Helferzellen verstärken die Bildung einer zellulären Immunabwehr und stimulieren die humorale Immunantwort gegen Antigene.

1.1.1 Erkennung von Antigenen

Zellvermittelte Reaktionen basieren auf direkten Wechselwirkungen zwischen T-Zellen und APZ. Zu den APZ zählen Makrophagen, B-Lymphozyten und dendritische Zellen. Der hochvariable TZR spielt bei der Antigenerkennung eine zentrale Rolle und bindet spezifisch an ein bestimmtes Antigen, welches an MHC-Moleküle gebunden ist. MHC-Moleküle sind Glykoproteine (Gp), welche von einer Vielzahl von Genen codiert werden. Auf der Oberfläche von Zellen werden MHC-Moleküle der Klasse I und II exprimiert, wobei CD4⁺ T-Zellen mit den auf APZ exprimierten MHC-II-Komplexen interagieren und CD8⁺ Zellen ubiquitär an MHC-I-Komplexe binden (Zinkernagel und Doherty 1974, Rammensee 1996).

Intrazelluläre Antigene werden zunächst in Proteasomen der Zielzellen in Peptidfragmente gespalten und mit Hilfe des speziellen Transportproteins TAP (Transporter associated with Antigen Processing) in das endoplasmatische Retikulum geschleust (Heemels 1995, Reits 2003). Derartige Peptidfragmente bestehen aus Peptiden von 10-15 Aminosäuren (AS). Spezialisierte MHC-Moleküle verbinden sich mit den Peptidfragmenten und präsentieren die Peptidfragmente an der Zelloberfläche von infizierten Zellen, wo diese von CD8⁺ T-Zellen erkannt werden.

1.1.2 Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen

Die Antigenerkennung allein ist zur primären Aktivierung von T-Zellen nicht ausreichend und führt zur Anergie der T-Zellen mit fehlender Proliferation und Differenzierung (Lanzavecchia und Sallusto 2000 b) und 2001, Appleman 2003). Zusätzlich sind zur Aktivierung von Tn in Teff kostimulatorische Moleküle, wie B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), notwendig (Lanzavecchia 1998 und 1999). Diese befinden sich auf APZ und interagieren mit dem Oberflächenmolekül CD28 auf ruhenden T-Zellen. Zudem ist die Zytokin-Sekretion der Interleukine IL-2 und IL-7 für die Aktivierung von T-Zellen notwendig (Boise 1995), und auch die Dauer der Interaktion zwischen T-Zelle und APZ ist von Bedeutung (Lanzavecchia und Sallusto 2001). Die Sekretion von IL-2 und gleichzeitige IL-2-Rezeptor-Expression auf T-Zellen resultiert in einer Proliferation dieser Zellen und schließlich in einer Differenzierung zu Teff.

Eine Lyse der Zielzellen erfolgt durch die Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Substanzen wie Perforin und Granzym-B. Die direkte Bindung von Fas-Liganden (FasL) an entsprechende Fas-Rezeptoren (FasR) an der Oberfläche der infizierten Zellen induziert deren Apoptose. Die aus T_n differenzierten Teff überleben in der Regel nur kurzzeitig und gehen nach Ablauf einer adaptiven Immunantwort zu Grunde. Dies bezeichnet man als Activation-induced-cell-death (AICD) (Maher 2002). Zu einem kleinen Teil differenzieren aktivierte CD8⁺ T-Zellen in Memory-T-Zellen, die zur Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses führen. Bei einer erneuten Infektion mit dem ursprünglichen Antigen vermitteln Memory-T-Zellen, die sich durch eine besondere Langlebigkeit auszeichnen, eine schnellere und wirksamere Immunreaktion (Zinkernagel 1996, Dutton 1998, Sallusto 2001). Gegenwärtig ist nur in Ansätzen bekannt, welche zellulären und molekularen Mechanismen für die Entstehung von kurzlebigen Teff und langlebigen Memory-T-Zellen, in Folge der Aktivierung aus T_n, verantwortlich sind. Dabei ist noch unzureichend geklärt, ob sich Memory-T-Zellen nur aus Teff oder auch direkt aus T_n differenzieren (Dobrzanski 2000, Kaech 2002, Appay 2004).

In den letzten Jahren wurden mehrere unterschiedliche Differenzierungsmodelle diskutiert. Nach dem ersten klassischen Modell der linearen Differenzierung entstehen Memory-T-Zellen aus einer Population antigenspezifischer Teff, die nach Beseitigung der primären Infektion nicht dem AICD unterliegen, weil sie sich entweder Signalen, die zum programmierten Zelltod führen, entziehen, oder Signale erhalten, welche einen solchen Differenzierungsweg sichern (Kaech und Ahmed 2001). Ein zweites alternatives Modell postuliert eine parallel zur Effektor-T-Zell-Entwicklung verlaufende Differenzierungskaskade von Memory-T-Zellen, die von der Höhe und Dauer der Antigenstimulation beeinflusst wird. Dabei entscheiden Korezeptor-vermittelte Moleküle bzw. Wachstums- und Differenzierungsfaktoren darüber, ob als Folge starker Aktivierungssignale kurzlebige Teff oder, nach Expression schwacher Signale, direkt langlebige Memory-T-Zellen entstehen (Lanzavecchia und Sallusto 2000 b) und Lanzavecchia 2005, Manjunath 2001, Sallusto 2001, Masopust 2004). Welcher Subtyp von Memory-T-Zellen gebildet wird, scheint sowohl von der Stärke der Stimulation des TZR als auch von der Gegenwart polarisierender Zytokinen mitbestimmt zu werden.

Das dritte progressive Differenzierungsmodell beinhaltet die Generierung beider Subpopulationen der heterogenen Memory-Population (Lanzavecchia und Sallusto 2000 a). Diesem Modell nach entwickeln sich Tn mit relativ kurz anhaltender Stimulation des TZR und der Abwesenheit von polarisierenden Zytokinen zu Effektor-Vorläuferzellen, die weiter zu Zentralen-Memory-T-Zellen (central memory, Tcm) differenzieren können. Dagegen entwickeln sich Tn nach einer länger anhaltenden TZR-Stimulation und in Gegenwart polarisierender Zytokine wie IL-12, IL-4 oder hohen Dosen von IL-2 zu Teff, aus welchen dann Effektor-Memory-T-Zellen (effector memory, Tem) hervorgehen können.

1.1.3 Das immunologische Gedächtnis

Bei Memory-T-Zellen handelt es sich im Wesentlichen um persistierende, funktionell ruhende, immunkompetente T-Zellen und damit um die eigentlichen Träger der langanhaltenden, protektiven Immunität. Memory-T-Zellen unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften von Tn. Charakteristisch für Memory-T-Zellen sind die Reaktion auf geringere Antigenkonzentrationen (Zinkernagel 1996) und deren schnelle Proliferation nach Antigenstimulation. Memory-T-Zellen sind weniger abhängig von einer Kostimulation auf APZ (Lanzavecchia und Sallusto 2000 a)) und besitzen die Fähigkeit ein größeres Spektrum an Zytokinen zu produzieren. Die von Memory-T-Zellen ausgehende Sekundärantwort gegen Antigene ist stärker und spezifischer als die primären Reaktionen. In dem Modell von Sallusto et al. können zwei unterschiedliche Subpopulationen von Memory-T-Zellen unterschieden werden: die Tcm und die Tem, welche durch unterschiedliche Migrationseigenschaften und Effektorfunktionen charakterisiert sind (Sallusto 1999, Lanzavecchia und Sallusto 2000 a), Sallusto und Lanzavecchia 2001). Tcm entsprechen präaktivierten T-Zellen mit eingeschränkten Effektorfunktionen, die vorzugsweise in lymphatische Organe wandern und IL-2 produzieren. Die Tcm weisen ein hohes Proliferationspotenzial und eine große Kapazität auf, im Organismus zu persistieren (Sallusto 1999, Kaech 2002, Geginat 2003). Im Gegensatz dazu proliferieren Tem nach Antigen-Stimulation schwach, zeichnen sich dafür aber durch ein unmittelbar hohes Effektorpotenzial aus. Tem

besitzen keinen Homing-Rezeptor und können sich dadurch in peripheren Geweben anreichern (Hamann 1997, Sallusto 2004).

1.1.4 Charakterisierung des Differenzierungszustandes

Mit der Differenzierung von T_n zu T_{eff} und Memory-T-Zellen kommt es zu Änderungen des T-Zell-Phänotyps. Die phänotypische und funktionelle Charakterisierung des Differenzierungszustandes der einzelnen Zellpopulationen ist mittels moderner durchflusszytometrischer Methoden möglich. Die Phänotypisierung erfolgt durch die Bestimmung von unterschiedlichen Oberflächenmolekülen, die für die Interaktion mit APZ sowie für die gerichtete Migration („homing“) in unterschiedliche Gewebe von Bedeutung sind. Im humanen System gehören dazu CD45-Isoformen, CD27 und CD28 sowie CD62 (L-Selektin) und der Chemokinrezeptor CCR7. Die Isoformen von CD45 werden auf T_n, Memory-T-Zellen und T_{eff} unterschiedlich exprimiert. Die hohe Molekulargewicht-Isoform CD45RA existiert vor allem auf T_n und T_{eff}. CD62L und CCR7 sind für den Eintritt in Lymphknoten durch high endothelial venules (HEV) erforderlich und stark auf T_n exprimiert. Ihre Expression auf Memory-T-Zellen ist dagegen heterogen und ermöglicht eine Differenzierung der Memory-Subpopulationen. Die Beurteilung der Funktionalität erfolgt durch die Untersuchung der Expression von Zytokinen, die Beurteilung der Proliferationseigenschaften und den Nachweis von Zytotoxizität (Geginat 2003). Welche einzelnen Parameter und in welcher Kombination jedoch für die Beurteilung der Zellfunktion und Klassifikation der Subpopulationen zu verwenden sind, wird in Studien kontrovers diskutiert. Eine detaillierte Zusammenstellung der Charakteristika der unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen ist in **Tabelle 1.1** wiedergegeben.

Tabelle 1-1: Übersicht über die wichtigsten phänotypischen und funktionellen Parameter von T-Zell-Subpopulationen; nach Hamann 1997 und 1999, Höflich 1998, Sallusto 1999, Lanzavecchia und Sallusto 2000 a), Appay 2002 und 2004

		Naive	Effektor	Memory	
				Zentrale	Effektor
Lymphozytenmarker Aktivierung	CD3+CD8+	+	+	++	
	CD45RA	+	+	-	
	CD45R0	-	-	+	
Aktivierung+Kostimulation	CD27	+	-	+	
	CD28	+	+/-	+	
	CD57	-	++	-	
	CD58	(+)	++	++	
	CD69				
	CD95	-	+	++	
	FasL	-	++	(+)	
Integrine	CD11a	(+)	++	+	
	CD11b	-	++	-	
	CD18	(+)	++	+	
	CD29	+	++	+	
	CD49d	(+)	++	+	
	CD49e	(+)	++	+	
LK-Homing	CD62L	++	(+)	+	-
	CCR7	++	-	+	-
Zytokine	Il 2	+	-	++	+
	IFN γ	-	++	+	++
Zytotoxische Mediatoren	Perforin	-	++	(+)	
	Granzym B	-	++	(+)	

In der vorliegenden Arbeit wurden – basierend auf der Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA, einer die Signalvermittlung über den TZR verstärkenden Tyrosinphosphatase und CCR7, einem Lymphknoten-Homing-Rezeptor – vier Subpopulationen von CD8⁺ T-Lymphozyten klassifiziert (siehe Abbildung 1.1). T_n exprimieren sowohl CD45RA als auch CCR7; im Gegensatz dazu sind Memory-T-Zellen durch die Abwesenheit von CD45RA charakterisiert. Abhängig von der CCR7-Expression auf der Zelloberfläche werden die Memory-T-Zellen unterschieden in T_{cm} (CCR7⁺) und T_{em} (CCR7⁻) (Sallusto 1999 und 2000). Die vierte CD8⁺ T-Zell-Subpopulation, die T_{eff}, wird durch die Expression von CD45RA auf der Zelloberfläche beschrieben, wobei CCR7 nicht nachgewiesen werden kann.

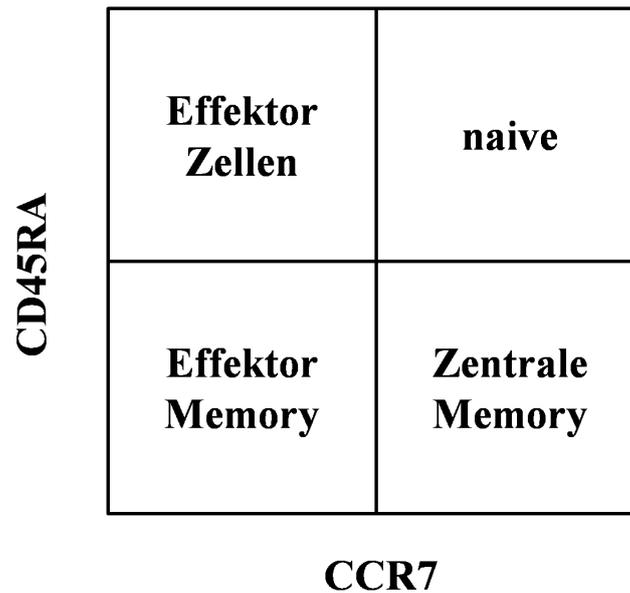


Abbildung 1-1: T-Zell-Subpopulationen

Phänotypische Abgrenzung der einzelnen Subpopulationen durch das Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle CD45RA und CCR7 (Sallusto 1999 und 2000).

1.1.5 Chemokine

Chemokine stellen ein komplexes System chemotaktisch aktiver Zytokine dar, die für ein breites Spektrum an immunologischen und inflammatorischen Effekten im Immunsystem verantwortlich sind. Entscheidend ist die Rolle der Chemokine bei der Regulierung von Migrationsvorgängen immunkompetenter Zellen und der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren durch die Zellen. Die Lymphozytenwanderung in primäre, sekundäre und tertiäre Kompartimente sowie die Zirkulation zwischen sekundären Lymphorganen sind abhängig von Chemokinen. Das komplexe System der Chemokine wird in 4 Gruppen, abhängig von ihrer Primärstruktur und der Anzahl und Anordnung der Cysteine, eingeteilt:

C, CC, CXC, und CX3C Chemokine (Zlotnik and Yoshie 2000). Derzeit sind 28 humane CC, 16 humane CXC, 2 C- und 1 CX3C-Chemokin bekannt. Diese interagieren spezifisch mit korrespondierenden G-Protein-gekoppelten Oberflächenrezeptoren (Chemokin-Rezeptoren), von denen 10 humane CC- und 6 humane CXC-Rezeptoren

sowie der XCR1- und CX3CR1-Rezeptor identifiziert sind (Rossi und Zlotnik 2000). Funktionell und hinsichtlich ihres Expressionsmusters werden die Chemokine in zwei biologisch unterschiedliche Gruppen eingeteilt: die homöostatischen Chemokine und die inflammatorischen Chemokine. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv produziert und sind bei der Leukozytenmigration und der Immunüberwachung wesentlich beteiligt. Dabei unterstützen diese Chemokine den Differenzierungsprozess von T-Zellen und regulieren die Stimulation oder Suppression von hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen (Karpus 1997, Ploix 2001). Im Gegensatz hierzu werden die inflammatorischen Chemokine hauptsächlich in Antwort auf entzündliche Reize gebildet. Ihre primäre Funktion ist die Chemoattraktion zum Ort der Entzündung sowie die Aktivierung spezifischer Leukozyten für verschiedene inflammatorische Reaktionen.

Der Chemokinrezeptor CCR7 dient als Oberflächenmolekül zur Unterteilung der CD8+ T-Zellen in naive, Memory- und Effektor-Subpopulationen (Kobayashi 2004). Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 auf Leukozyten ist vom Aktivierungszustand und vom Differenzierungsstadium der T-Zellen abhängig. CCR7 wird auf CD8+ T_n und T_{cm} exprimiert. CCR7-Oberflächenmoleküle können die in Lymphknoten Gefäßen vorhandenen Chemokine CCL19 und CCL21 erkennen sowie die gewebespezifische Zirkulation hämatopoetischer Zellen über die Blut- und Lymphbahn in lymphatische Organe aktivieren. Darüber hinaus kann damit die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort koordiniert werden (Sallusto 1999).

CXCR4 ist der Rezeptor für das Chemokin CXCL12 (SDF-1) und wird vor allem auf T_n exprimiert. CXCR4 spielt eine zentrale Rolle beim Vorgang der gerichteten Migration („Homing“) von Lymphozyten und bei der Rekrutierung immunkompetenter Zellen insbesondere im KM.

1.1.6 Das Kompartiment Knochenmark

Die T-Zellen des Immunsystems haben ihren Ursprung im KM, ihre Reifung erfolgt im Thymus. Diese Gewebe werden als primäre lymphatische Organe bezeichnet. Die ausgereiften T-Zellen überwachen periphere Gewebe, indem sie zwischen pB und sekundär lymphatischen Organen zirkulieren. Sekundär lymphatische Organe sind die Milz, Lymphknoten und mukosaassoziierte Gewebe. Nach klassischer Lehrmeinung werden die immunologische Prägung von T-Zellen und deren Stabilisierung in den sekundär lymphatischen Geweben ausgelöst. Gegenwärtig wird in Studien auch dem KM, einem primär lymphatischen Organ, eine besondere Bedeutung als sekundär lymphatisches Organ zugeordnet. In tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass im KM primäre T-Zell-Antworten gegen im pB zirkulierende Antigene generiert werden können (Feurer 2003). Antigen-spezifische T-Zellen wandern in zahlreiche lymphatische und nicht-lymphatische Organe aus (Masopust 2001, Wherry 2003). Ob und auf welche immunologischen Kompartimente im humanen System sich spezifischen Subpopulationen verteilen, ist bisher unzureichend geklärt. T_{cm} sind aufgrund ihres Phänotyps (CCR7⁺) stark in Lymphknoten angereichert, während T_{em} eher in nicht-lymphatischen Geweben, im KM oder der Milz vorkommen (Masopust 2001, Wherry 2003, Sallusto 1999). Virusspezifische CD8⁺ T-Zellen gegen CMV und andere chronisch virale Infektionen im pB besitzen fast ausschließlich ein Effektor- und Effektor-Memory-Phänotyp (Appay 2002, Champagne 2001, Ellefsen 2002, Gamadia 2001). Das Fehlen von CCR7⁺ T-Zellen könnte die Folge einer dauerhaften Persistenz des Antigens sein. Ebenso denkbar ist jedoch, dass CCR7⁺ T-Zellen nicht im pB zirkulieren, sondern vornehmlich in anderen Kompartimenten wiederzufinden sind. Allerdings konnten im Gegensatz zum pB in Lymphknoten nur niedrige Frequenzen CD8⁺ CMV-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden.

Das KM bildet ein wichtiges Kompartiment für die Akkumulation, Proliferation und Persistenz von Memory-T-Zellen (Becker 2005, Di Rosa 2005, Mazo 2005). In Tiermodellen wurde gezeigt, dass virusspezifische Memory-T-Zellen präferenziell im KM akkumulieren und proliferieren (Kuroda 2000, Marshall 2001, Masopust 2001). Auch für tumorspezifische Memory-T-Zell-Antworten scheint das KM ein bedeutendes Kompartiment zu sein. Einerseits finden sich bei einer Vielzahl unterschiedlicher

Krebserkrankungen tumorspezifische Memory-T-Zellen im KM angereichert (Feurer 2001 a) und b)), andererseits erscheint das KM als bevorzugtes Kompartiment vereinzelter ruhender Tumorzellen (Schirmacher 2002).

In wie weit das menschliche KM ein Reservoir für virusspezifische Memory-T-Zellen ist und welche Rolle es für die Langzeitimmunität spielt ist bislang noch nicht geklärt.

1.2 CMV-Virus

Das humane Cytomegalievirus (CMV) ist ein β -Herpesvirus, auch Humanes Herpesvirus 5 (HHV5) genannt. Sein doppelsträngiges DNA-Genom ist von einer Kapsel, dem Tegument, einer aus verschiedenen Proteinen bestehenden Matrix, und einer Virushülle umgeben. Der Mensch ist das einzige Reservoir für das humane CMV; dessen Übertragung von Mensch zu Mensch erfolgt. In den meisten entwickelten Ländern steigt die Verbreitung des humanen CMV nach dem Säuglingsalter an; bereits 10-20% der Kinder sind vor dem Erreichen der Pubertät infiziert. Bei Erwachsenen liegt die Prävalenz der virusspezifischen Antikörper (Ak) zwischen 40-100% (Kern 1998). Die Prävalenz steigt mit dem Lebensalter; bei ungefähr 50% der jüngeren Erwachsenen und bei 90% der älteren Bevölkerung ist das humane CMV nachweisbar (Olsson 2000). Die Primärinfektion mit CMV verläuft meist symptomlos. Eine vollständige Elimination des Virus durch das Immunsystem ist jedoch nicht möglich. Die Folge ist ein Latenzstadium mit lebenslanger Persistenz des CMV im Wirtsorganismus, wobei nur wenige virale Gene exprimiert und keine infektiösen Viruspartikel produziert werden. Die viralen Genome verbleiben in Endothelzellen und Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems. Die Infektion mit CMV verursacht bei immunkompetenten Menschen im Allgemeinen selten eine Erkrankung, obwohl es häufig zu molekular nachweisbarer Reaktivierung des Virus kommt. Diese Tatsache zeigt, dass das Immunsystem das Virus effektiv kontrollieren kann. Durch endogene oder exogene Faktoren kann es zur Reaktivierung des Virus und somit zu einer erneuten Virusproduktion kommen. Bei Verlust oder funktioneller Störung der T-Zell-Immunität, wie es beispielweise bei Patienten unter Immunsuppression der Fall ist, kann es zu einer symptomatischen Infektion kommen. Besonders betroffen sind Transplantatempfänger

und HIV (Humanes Immundefizienz-Virus)-infizierte Patienten. Trotz moderner Diagnose- und Therapieverfahren stellt die CMV-Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten ein großes Problem dar und kann zu lebensgefährlichen Komplikationen führen. Im Anschluss an eine Stammzelltransplantation ist die CMV-Infektion eine der Hauptursachen für Morbidität und Mortalität. Eine mögliche Problemlösung stellt die spezifische Immuntherapie mittels Transfer von CMV-reaktiven T-Zellen dar. Um diese Therapiestrategie zu realisieren, müssten die virusspezifischen T-Zellen schnell herstellbar sein und im Empfängerorganismus möglichst langanhaltende Effektorfunktionen ausüben. Möglicherweise eignen sich Memory-T-Zellen besonders für adoptive Therapien, da Memory-T-Zellen Proliferationspotenzial besitzen, langlebig sind und zu Teff differenzieren können.

1.3 Nachweismethoden für antigenspezifische T-Zellen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, mit dem Zellen quantifiziert und phänotypisch charakterisiert werden können. Die unterschiedliche Lichtstreuung und Lichtbeugung der einzelnen Zellen gibt Aufschluss über die Größe sowie Granularität der Zellen. Des Weiteren können Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Moleküle mittels Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern markiert und durch Fluoreszenzstrahlung nachgewiesen werden. In einem Flüssigkeitsstrom fließen einzelne Zellen durch den Laserstrahl und induzieren eine Lichtstreuung, die zellgebundene Farbstoffe zur Fluoreszenz anregt. Sowohl das gestreute Licht als auch die Fluoreszenz werden durch einen Photomultiplier detektiert.

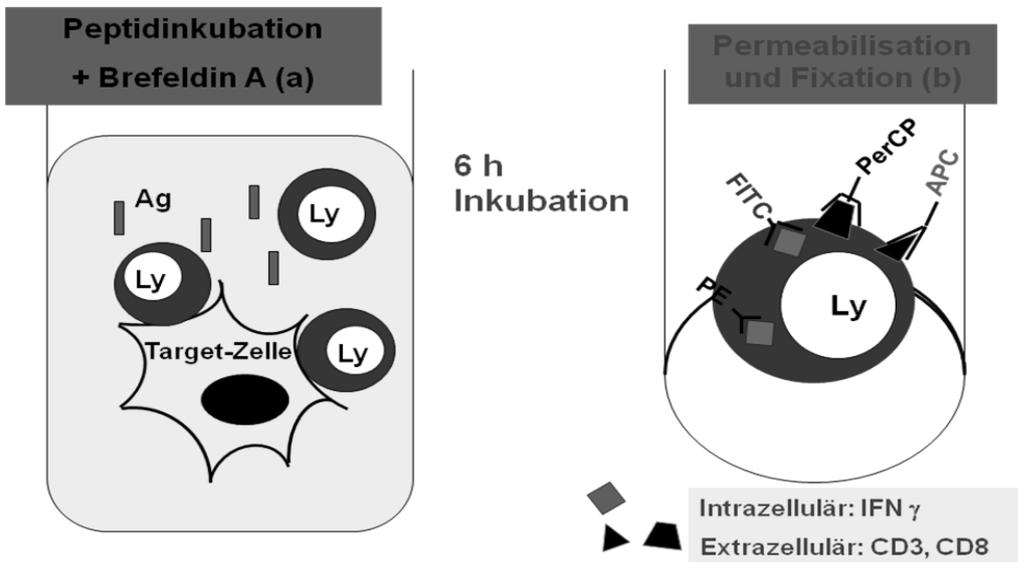
Für den direkten Nachweis von virusspezifischen T-Zellen stehen inzwischen verschiedene Methoden zur Verfügung. Eine Möglichkeit des Nachweises bietet das Prinzip der intrazellulären Durchflusszytometrie (IZ-DZ). Dieses beruht auf der antigenspezifischen Zytokinfreisetzung, wobei das Zytokin nach Zugabe eines Sekretionshemmers intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum und im Vesikelnetz der Zelle akkumuliert. Nach der Färbung extrazellulärer Epitope mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern zur Phänotypcharakterisierung der

T-Zellen erfolgt eine Fixierung, um die Proteine innerhalb der Zellen und in den Zellmembranen zu vernetzen. Die nachfolgende Permeabilisierung ermöglicht fluoreszierenden Antikörpern, in die intrazellulären Kompartimente zu gelangen und an das entsprechende Zytokin zu binden.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit des direkten Nachweises antigenspezifischer T-Zellen aufgrund ihrer Rezeptorspezifität. Mit Hilfe von Tetrameren lässt sich die Antigen-spezifität von T-Zellen durch direkte Färbung des TZR nachweisen. Tetramere sind Komplexe aus einem MHC-Komplex samt β 2-Mikroglobulin, dem fraglichen Antigen und einem fluoreszierenden Farbstoffmolekül (Altmann 1996). Durch die Konjugation der MHC-Peptid-Komplexe mit Fluoreszenzfarbstoffen werden T-Zellen mit definierter Spezifität durchflusszytometrisch visualisiert. Bei dieser Methode können auch funktionell inaktive T-Zellen erfasst werden. Durch die simultane Färbung extrazellulärer Epitope können die T-Zellen weitergehend phänotypisch charakterisiert werden.

Durchflusszytometrie

A. Intrazelluläre Zytokinfärbung



B. Tetramerfärbung (Hickling J.K. Measuring of human T lymphocyte function, ER Mol Med. 1998)

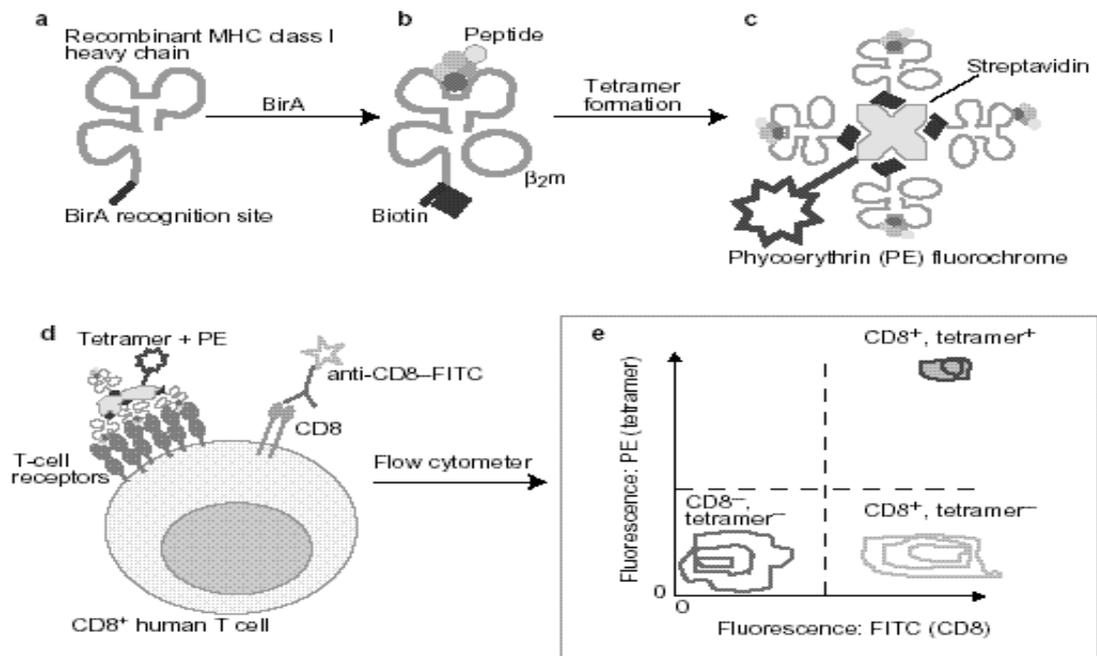


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung durchflusszytometrischer Methoden zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen

A IZ-DZ: Peptidinkubation der MNZ unter BFA (Brefeldin A) (a). Dadurch werden die spezifisch produzierten Zytokine intrazellulär gespeichert. Nach 6 Stunden erfolgt die Färbung extrazellulärer Epitope und intrazellulärer Zytokine (b).

B Tetramer: MHC Klasse I mit Biotin-Erkennungsstelle (a). Peptid-MHC Klasse I Komplex (b). Tetramer: Vier Peptid-MHC Klasse I Komplexe, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung kovalent miteinander verknüpft sind. Die Visualisierung des Komplexes im Durchflusszytometer erfolgt über eine PE-Konjugation (c). Die Tetramere werden durch T-Zellen gebunden, die Rezeptoren der passenden Spezifität exprimieren. Anschließend werden die extrazellulären Epitope gefärbt (d). Darstellung der durchflusszytometrischen Daten im Diagramm und Ermittlung der Tetramer-positiven Population (e).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, CMV-spezifische T-Zell-Antworten im pB und KM zu vergleichen.

Im Einzelnen sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen bearbeitet werden: Gibt es Unterschiede zwischen den Kompartimenten pB und KM bezogen auf:

1. Die Frequenzen virusreaktiver T-Zellen, die mittels intrazellulärer Zytokindetektion und Tetramer-Analyse bestimmt wurden.
2. Die phänotypische Charakterisierung der Differenzierungstypen in naive, Memory- und Effektor-T-Zellen durch die Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA und CCR7 sowie CD27 und CD28.
3. Das Proliferationspotenzial durch die Analyse der Proliferationskapazität mittels in-vitro Expansionsversuchen mit IL-2 und IL-7.
4. Das Migrationspotenzial charakterisiert durch die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Spender

Für die vergleichende Analyse von pB und KM wurden uns von 20 Patienten mit Hüftkopfersatz der Orthopädischen Klinik, Vivantes Klinikum Neukölln (Berlin), nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung 20 Hüftkopfresektate und die entsprechenden buffy-coats aus der Eigenblutspende zur Verfügung gestellt. Von diesen erwiesen sich nach initialer HLA-Typisierung 13 HLA-A*0201 positiv und somit im Rahmen dieser Studie geeignet zur Charakterisierung virusspezifischer T-Zell-Antworten mittels funktioneller Durchflusszytometrie.

Für die Durchführung vorliegender Analysen liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, vor.

2.1.2 Dichtegradient

Zur Isolierung von Lymphozyten aus pB und KM wurde Ficoll-Hypaque-Lösung mit der Dichte 1,077 (Seromed Biochrom, Berlin) verwendet.

2.1.3 Kulturmedien

Iscove's modified DMEM (Seromed Biochrom) diente nach Zugabe von 10% AB-Serum (PAA, Linz, Österreich), 1 mMol L-Glutamin, 100 U/I Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und 20 ml Heps als Kulturmedium für Lymphozyten. Dieses Medium wird im Folgenden als Standardmedium bezeichnet.

Iscove's modified DMEM (Seromed Biochrom) diente nach Zugabe von 10% AB-Serum (PAA, Linz, Österreich), 1 mMol L-Glutamin, 100 U/I Penicillin, 100 mg/l Streptomycin und IL2 (2µl/1ml) als T-Zell-Medium für Expansionsversuche.

RPMLI, versetzt mit 10% Fetalem Kälberserum (FCS), 1mMol L-Glutamin, 100 U/ Penicillin und 100 mg/l Steptomycin (alles Seromed Biochrom), wurde als Kulturmedium für Zelllinien verwendet.

Zum Einfrieren der isolierten, mononukleären Zellen (MNZ) diente AB-Serum mit Zusatz von 50% Iscove`s modified DMEM (Seromed Biochrom) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt).

2.1.4 Puffer

Als Phosphatpuffer wurde Dulbecco`s phosphate buffered saline (Seromed Biochrom) ohne Zusatz von Magnesium und Kalzium eingesetzt; nachfolgend PBS genannt.

Als Waschpuffer in der intrazellulären Zytokinfärbung und als Separationspuffer für Expansionsanalysen wurde PBS, versetzt mit 2% Endoglobulin, verwendet.

2.1.5 Spezielle Reagenzien in der Durchflusszytometrie

BDLyse (Becton Dickinson, Heidelberg) wurde als Lyse Reagenz in der IZ-DZ eingesetzt.

Zum Permeabilisieren der Zellen diente FACSPerm (Becton Dickinson, Heidelberg).

2.1.6 Zytokine

Zur T-Zell-Stimulation wurden Interleukin-2 (IL-2, 30 U/ml) und Interleukin-7 (IL-7, 10 ng/ml) in den Konzentrationen 1 µg/ml und 10 µg/ml verwendet (R&D System, Wiesbaden).

2.1.7 Peptide und Tetramere

Alle in den T-Zell-Assays eingesetzten Peptide wurden in DMSO (Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 5 mg/ml gelöst und mit PBS auf eine Konzentration von 100 µg/ml verdünnt.

Die virusspezifischen Tetramere (Proimmune, Oxford, UK), korrespondierend zu den EBV (Ebstein-Barr-Virus)- und CMV-Epitopen, wurden in einer Verdünnung mit PBS von 1:10 in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

Die folgende Tabelle 2.1 gibt Antigen, AS-Sequenz, AS-Position, HLA-Bindungsmotiv und Referenz wieder.

Tabelle 2-1: Peptide und Tetramere

Antigen	AS-Sequenz	Position	HLA-Bindungsmotiv	Referenz
INFLUENZA	GILGFVFTL	58-66	A2	Bendarek 1991
HIV	ILKEPVHGV	476-484	A2	Appay 2002
EBV	GLCTLVAML	280-288	A2	Appay 2002
CMV	NLVPMVATH	495-503	A2	Appay 2002
CMV-Tetramer	NLVPMVATH	495-503	A2	Appay 2002
EBV-Tetramer	GLCTLVAML	280-288	A2	Appay 2002

2.1.8 FACS-Antikörper

Zur Analyse der HLA-Expression der Spenderzellen dienen Maus-anti-Human-IgG monoklonale Antikörper (mAk) gegen HLA-A2 und HLA-A1. FITC (Fluorescein-Isothycyanat)-markierte monoklonale Ziege-anti-Maus IgG-mAk oder IgM-mAk wurden als sekundäre Antikörper verwendet.

Die Färbung extrazellulärer Epitope auf den Lymphozyten wurde mit folgenden monoklonalen Maus-anti-Human-Antikörper durchgeführt: CD3-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), CD8-Allophycocyanin (APC), CD8-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), CD45RA-Allophycocyanin (APC) und CCR7-Phycoerythrin (PE), CD27- Phycoerythrin (PE) und CD28- Allophycocyanin (APC). Alle Antikörper wurden von Becton Dickinson bezogen.

Die Anreicherung intrazellulärer Zytokine wurde mittels eines IFN γ -FITC-Ak untersucht (Becton Dickinson).

2.1.9 Produkte für die magnetische Zellseparation

Die Isolierung CD8⁺ T-Zellen wurde mit Hilfe des Macs-CD8⁺-Separations-Kit durchgeführt (alle Produkte von Milteny, Bergisch Gladbach). In diesem Separations-Kit sind MS Columns, Pre-System-Filter, CD8-IsolationsKit-2, untouched und Separationspuffer enthalten.

2.2 Methoden

2.2.1 Gewinnung von MNZ aus Heparin-Vollblut

Der buffy-coat der Spender wurde im Verhältnis 1:2 mit sterilem PBS (Seromed Biochrom) verdünnt. 35 ml des verdünnten Blutes wurden vorsichtig über 15 ml Ficoll Hypaque (Seromed Biochrom) in 50 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und anschließend 30 min bei Raumtemperatur mit 2000 U/min ohne Bremse zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten entsprechend ihrer Dichte auf dem Boden des Röhrchens, während die MNZ, die vor allem aus Lymphozyten und Monozyten bestehen, als zart sichtbare Interphase auf der Ficoll-Phase und unter der PBS-Plasma-Phase verblieben. Die Interphasen wurde vorsichtig abpipettiert und die MNZs wurden anschließend zweimal mit PBS (Seromed Biochrom) bei 2000 U/min gewaschen. In Portionen von $1-2 \times 10^7$ MNZs in je 1 ml Einfriermedium wurden die Zellen in Röhrchen aufbewahrt und anschließend in speziellen Einfrierboxen (Nunc, Wiesbaden) bei -80°C eingefroren. Nach ca. 48 h wurden die Röhrchen bei -196°C in flüssigem Stickstoff überführt und bis zur Verwendung gelagert.

2.2.2 Gewinnung und Isolation von Lymphozyten aus dem KM von Hüftköpfen

Nach operativer Entfernung der Hüftköpfe wurden diese noch am gleichen Tag weiterverarbeitet. Zunächst wurde unter sterilen Bedingungen aus den Hüftkopfresektaten mit Hilfe eines scharfen Löffels und einer Knochenmarkpunktionssnadel KM gewonnen und in eine Petrischale überführt. Anschließend wurde das KM sorgfältig zerkleinert, in ein 50 ml Röhrchen aufgenommen und bei Raumtemperatur 15 min in sterilem PBS schüttelnd inkubiert. Die Suspension wurde 10 min bei 2000 U/min zentrifugiert und dann in sterilem PBS

resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Filtration durch einen 100 µm Nylonfilter (Cell-Strainer, Falcon, Becton Dickinson). Der Filtration schloss sich ein weiterer Waschschrift mit sterilem PBS an. Anschließend wurden daraus über Ficoll-Präparation die MNZ gewonnen. Die Weiterbearbeitung der MNZ aus dem KM erfolgte ebenso wie bei der bereits beschriebenen Gewinnung von MNZ aus buffy-coats.

2.2.3 Auftauen der Zellen

Das Auftauen der Zellen erfolgte steril. Die MNZ wurden durch Resuspension mit Standardmedium zügig erwärmt und sofort in 25 ml dieses Mediums überführt. Nach anschließendem Waschvorgang bei 2000 U/min wurden die Zellen in ein Volumen von 2 ml Standardmedium aufgenommen und in einem 4 ml hydrophobem Zentrifugenröhrchen mit losem Deckel über Nacht im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die Durchführung der entsprechenden Versuche erfolgte am nächsten Tag.

2.2.4 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in der Neubauer-Zählkammer (Sigma). Kleine Mengen der jeweiligen Zellsuspension wurden 1:2 mit Trypanblau (Sigma)/PBS-Lösung verdünnt, um die Vitalität der Zellen zu bestimmen. Dieser Farbstoff drang nur in tote Zellen, färbte diese blau und ermöglichte die Differenzierung zwischen vitalen und nichtvitalen Zellen. Unter dem Mikroskop wurden vier Großquadrate der Zählkammer mit je 0,1 µl ausgezählt.

Folgende Formel diente zur Berechnung der Gesamtzahl in der Ausgangslösung:

Gesamtzahl der Ausgangslösung = 0,25 x gezählte Zellzahl x 10⁴ x Verd. x Vol.

(Verd. = Verdünnungsfaktor, Vol. = Volumen der Ausgangslösung in ml)

2.2.5 Durchflusszytometrie

2.2.6 Nachweis von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Molekülen

Nach dem Auftauen der MNZ und Inkubation über Nacht bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ wurde die Zellsuspension in 2 Ansätzen zu je 2 x 10⁶ MNZ/400 ml Kompletmedium aufgeteilt. Ein Ansatz wurde mit CMV/EBV-Peptid in einer Konzentration von 10 µg/ml, der andere als Negativkontrolle mit gleicher Konzentration des HIV-Peptid und bei 37 °C, gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Nach einer Stunde wurden jedem Stimulationsansatz 1600 µl Standardmedium und 20 µg BFA (Sigma, Deisenhofen) hinzugefügt, sodass die Endkonzentration von BFA jeweils 10 µl/ml betrug. Nach weiteren 5 h Inkubation wurde der Stimulationsprozess durch Waschen mit kaltem PBS und 10 min Inkubation mit 1 ml 1 mMol EDTA (Ethylendiamintetra-Acetat) bei Raumtemperatur gestoppt. Nach einer Waschung der Zellen mit kaltem PBS + 2% Endoglobulin bei 1700 U/min und 4 °C wurden die extrazellulären Epitope mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten mAK für 15 min auf Eis im Dunkeln gefärbt. Folgende Antikörpermengen wurden eingesetzt: 20 µl Anti-CD8-PERCP, 15 µl Anti-CD45-APC, 10 µl Anti-CCR7-PE, 20 µl Anti-CD27-PE, 20 µl Anti-CD28-APC. Anschließend wurden die MNZ durch 5 min Waschen bei 1700 U/min und 4 °C mit BDlyse-Reagenz (1:10 mit PBS verdünnt) fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch 10 min Inkubation mit FACSPERM (1: 10 mit PBS verdünnt) bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss. Nach 2 x Waschen für jeweils 5 min mit kaltem PBS + 2% Endoglobulin bei 1700 U/min und 4°C wurden die intrazellulären Zytokine mit 20 µl Anti-IFN γ -FITC durch Inkubation für 30 min im Dunkeln auf Eis gefärbt. Nachdem die Proben mit kaltem PBS + 2% Endoglobulin bei 1700 U/min und 4°C gewaschen wurden, erfolgt die abschließende Fixierung der Färbung mit je 100 µl PBS + 1% Formalin. Zusätzlich wurden ungefärbte und Proben mit isotypenspezifischen IgG2a-mAk des entsprechenden Farbstoffs gefärbte Proben angefertigt, um die Eigenfluoreszenz der Zellen und die unspezifische Ak-Bindung zu ermitteln. Mit jeweils nur einem der spezifischen Ak gefärbten Proben wurde die Kompensation der Fluoreszenzen am Durchflusszytometer eingestellt.

2.2.7 Durchflusszytometrische Messung

Die Proben wurden im Vier-Farben-FACSCalibur-Durchflusszytometer (Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen und ausgewertet: nach sorgfältiger Resuspension und Verdünnung mit PBS wurden aus jeder Probe mit einer Geschwindigkeit von ca. 1000 Zellen/Sekunde 250000 MNZ eingelesen. Vor jeder zu messenden Probenserie erfolgte die Einstellung der Fluoreszenzintensität der Laser am Durchflusszytometer nach Messung der ungefärbten und mit Isotypen gefärbten Proben. Das Signal dieser Proben entspricht der Eigenfluoreszenz bzw. dem Signal der unspezifisch gebundenen Ak. Einzelfärbungen dienen zur Kompensationseinstellung.

Die Daten wurden folgendermaßen ausgewertet: Im Forward-Scatter-Side-Scatter-Diagramm wurde die Lymphozytenregion entsprechend der Lymphozytenpopulation definiert. Weiterhin waren die gesuchten reaktiven Lymphozyten durch Expression von CD8 und INF γ definiert. Die Darstellung der Lymphozyten im CD8/INF γ -Diagramm zeigte eine doppelt-positive Population. Die so definierten Zellen wurden dann in einem Diagramm dargestellt, das die Expression von CD45RA gegen CCR7 bzw. entsprechende andere Parameter, die mit vier Farben gefärbt wurden, darstellt. Die Frequenz der reaktiven T-Lymphozyten wurde als Prozentzahl der CD8+INF γ + Zellen ausgedrückt. Nach Subtraktion der Frequenz der INF γ produzierenden Zellen in der Negativkontrolle (HIV-stimulierte Probe) von der in der spezifisch stimulierten Probe erhielt man die Anzahl der antigenspezifischen T-Zellen. Eine T-Zell-Antwort wurde als positiv gewertet, wenn in der stimulierten Probe mindestens doppelt so viele INF γ sezernierende Zellen wie in die Negativkontrolle gezählt wurden.

2.2.8 Tetramer Analyse

Die Zellen wurden gewaschen, sorgfältig dekantiert und dann pro Ansatz 1×10^6 MNZ mit 10 μ l fluoreszenzmarkiertem MHC-Tetramer-Komplex (HLA-A2 CMV/EBV-Tetramer; Proimmune) 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die MNZ gewaschen und weitere 20 min bei 4°C mit fluoreszenzmarkierten Oberflächen-Antikörpern (BD Bioscience) inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen im Vier-Farben-FACSCalibur-Durchflusszytometer bzw. LSRII-Durchflusszytometer zur Fünf-Farben-Analyse der CXCR4-Expression (Becton

Dickinson, Heidelberg) unter Verwendung der CellQuest Software von Becton Dickinson analysiert.

2.2.9 Durchführung der T-Zell-Expansion

2.2.10 Separation CD8⁺ T-Zellen mittels antikörperbeschichteten magnetischen Partikeln

Für Expansionsanalysen wurden aus den aus dem pB und KM gewonnenen MNZ zunächst CD8⁺ T-Lymphozyten isoliert. Die Separation der CD8⁺ T-Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen entsprechend den Angaben des Herstellers mittels eines magnetischen Zellisolationssystem (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach). Dieses bestand aus kolloidalen paramagnetischen Partikeln, die mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle beschichtet waren. Die zu trennenden MNZ wurden mit spezifischen antikörperbeschichteten Partikeln (Ak-Cocktail) vermischt und über eine Säule mit einem Material gegeben, welches unter einem Magnetfeld die paramagnetischen Partikel festhielt. Dabei wurden die Zellen gebunden, welche an die markierten Antikörper gebunden waren. Dagegen wurden Zellen ohne passendes Oberflächenmolekül ausgewaschen.

Dazu wurden die entsprechenden Zellen mit Separationsmedium aufgetaut und 10 min bei 4°C mit 2000 U/min zentrifugiert. Die frisch aufgetauten Zellen wurden für weitere 10 min, versetzt mit 20 µl des Ak-Cocktails (bestehend aus spezifischen Antikörpern gegen nicht-CD8⁺-T-Zellen) und 80 µl Puffer (PBS + 5% Endoglobulin) pro 10⁷ MNZ, bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Spenderzellen zweimal für 5 min gewaschen und zusammen mit 20 µl alpha-Hapten und 80 µl Puffer pro 10⁷ MNZ 15 min inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation wurden die Zellen in 500 µl Pufferlösung aufgenommen und über einen Zellfilter über die zuvor gespülte und in den Magneten eingespannte Separationssäule gegeben. Nicht haftende Zellen wurden mit der Pufferlösung mehrfach abgespült, bevor die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt wurde; negativ angereicherte Zellen wurden eluiert und in eine Kulturflasche zusammen mit Standardmedium aufgenommen. Die isolierten CD8⁺ T-Zellen wurden nochmals zentrifugiert, in Medium aufgenommen und bei 37°C und 5% CO₂ aufbewahrt.

2.2.11 Bestrahlung der Zellen

Die eluierte CD8-negative Zellfraktion wurde mit 30 Gy bestrahlt, T2-Zellen der HLA-A2+ Zelllinien wurden mit 100 Gy bestrahlt.

2.2.12 Expansion der virusspezifischen T-Zellen

Nach der Bestrahlung wurde die Zellzahl der beiden Zellfraktionen bestimmt und diese im Verhältnis CD8- : CD8+ = 2:1 gemischt. Für die Antigenbeladung wurde dem Zellgemisch virusspezifisches Peptid (10 µg/ml= 100 µl/ml) und zusätzlich die Zytokine IL-2 (30 U/ml= 1 µl/ml) und IL-7 (10 ng/ml= 10 µl/ml) hinzugefügt. Die Lösung wurde mit Medium aufgefüllt und vor der Inkubation in 96-Well-Platten (pro well 200 µl) verteilt. Alle 2-3 Tage wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig abgenommen und gegen frisches T-Zell-Medium (einschließlich IL-2) ausgetauscht. Das Wachstum der Zellen wurde vor jedem Mediumwechsel unter dem Lichtmikroskop bewertet, und bei hoher Zelldichte wurden die einzelnen Wells im Verhältnis 1:2 aufgeteilt. Nach 7-tägiger Expansionsphase wurden die mit CMV-Peptid beladenen Zellen erneut stimuliert. Bestrahlte allogene HLA-A2+ T-Zellen, versetzt mit virusspezifischem Peptid und β2-Mikroglobulin, wurden im Verhältnis 5:1 mit den Peptid-beladenen CD8+-Zellen vermischt, in Medium mit IL-2 (30 U/ml= 3 µl/ml) und IL-7 (10 ng/ml= 10 µl/ml) aufgenommen und wieder mit 200 µl/well auf 96-Well Platten verteilt. Insgesamt erfolgte eine Expansion der spezifischen T-Zellen über 10 Tage.

Zuvor und nach Beendigung der Expansionsphase wurden die CMV-spezifischen T-Zellen mit durchflusszytometrischen Methoden phänotypisch untersucht. Die Frequenzen der spezifischen CD8+ T-Zellen/ 1×10^6 CD8+ T-Zellen vor und nach der Expansionsphase wurden bestimmt, um das Expansionspotential zu errechnen.

2.2.13 Statistische Auswertung

Die Signifikanzberechnung der vergleichenden Untersuchung virusspezifischer T-Zell-Frequenzen und phänotypischer Subpopulationen im pB und KM erfolgte mit dem Wilcoxon-Test, einem Rangreihentest für abhängige Stichproben, der keine Normalverteilung voraussetzt. Die Korrelation zwischen den CMV-spezifischen

T-Zell-Frequenzen in der IZ-DZ und Tetramer-Analyse wurde mittels Pearsons Korrelationskoeffizienten unter Verwendung der SPSS-Software berechnet. Alle anderen vergleichenden Evaluationen in der vorliegenden Arbeit sind explorativ. Aufgrund wiederholter Testungen sind die Ergebnisse dieser p-Werte als deskriptiv zu betrachten.

3 Ergebnisse

3.1 HLA-Typisierung von Patienten mit Hüftkopfresektion

In dieser Studie fand eine Beschränkung auf die Analyse von Patienten mit dem HLA-A*0201-Typ statt. Zunächst wurden 20 Patienten mit Hüftkopfresektion mittels FACS-Analysen HLA-typisiert. Davon zeigten 13 (65%) Patienten den HLA-A2 Typ und wurden für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ausgewählt.

3.2 Vergleichende Quantifizierung virusspezifischer T-Zellen im pB und KM mittels durchflusszytometrischer Methoden

Die T-Zell-Reaktivität der HLA-A*0201 positiven Patienten (n= 13) gegen das CMV-pp65 Peptid wurde mit der intrazellulären INF γ -Färbung (IZ-DZ) nachgewiesen. Es wurden nur Patienten ausgewählt, die in der IZ-DZ eine positive T-Zell-Antwort zeigten. 7 der 13 Patienten, darunter 5 Frauen und 2 Männer wiesen im pB eine signifikante T-Zell-Reaktivität gegen CMV auf. Das Alter der Patienten lag zwischen 64 und 81 Jahren (Durchschnittsalter: 72 Jahre).

Im nächsten Schritt wurde die Anzahl der CMV-reaktiven T-Zellen der 7 Patienten mit der IZ-DZ und Tetramer-Analyse parallel im pB und KM ermittelt. Im pB und KM waren ähnliche Frequenzen CMV-spezifischer CD3⁺ CD8⁺ T-Zellen nachweisbar. Mit der Tetramer-Nachweismethode zeigten sich im pB Frequenzen CMV-spezifischer T-Zellen zwischen 0,16% und 7,54% und im KM zwischen 0,12% und 3,90%. Der Median betrug 1,54% im pB und 1,68 % im KM. Niedrigere Frequenzen wurden mittels IZ-DZ detektiert (pB: p= 0,009; KM: p= 0,06). Die Anzahl der CMV-reaktiven Zellen abzüglich der Werte der Negativkontrolle (HIV-Peptid stimulierte MNZ) lag bei diesen 7 Patienten im pB zwischen 0,13% und 7,25% CD3⁺CD8⁺ T-Zellen und im KM zwischen 0,18% und 2,20%. Der Median betrug 0,93% im pB und 0,81% im KM. Die einzelnen T-Zell-Antworten aller 7 Patienten sind der Abbildung 3-1 zu entnehmen.

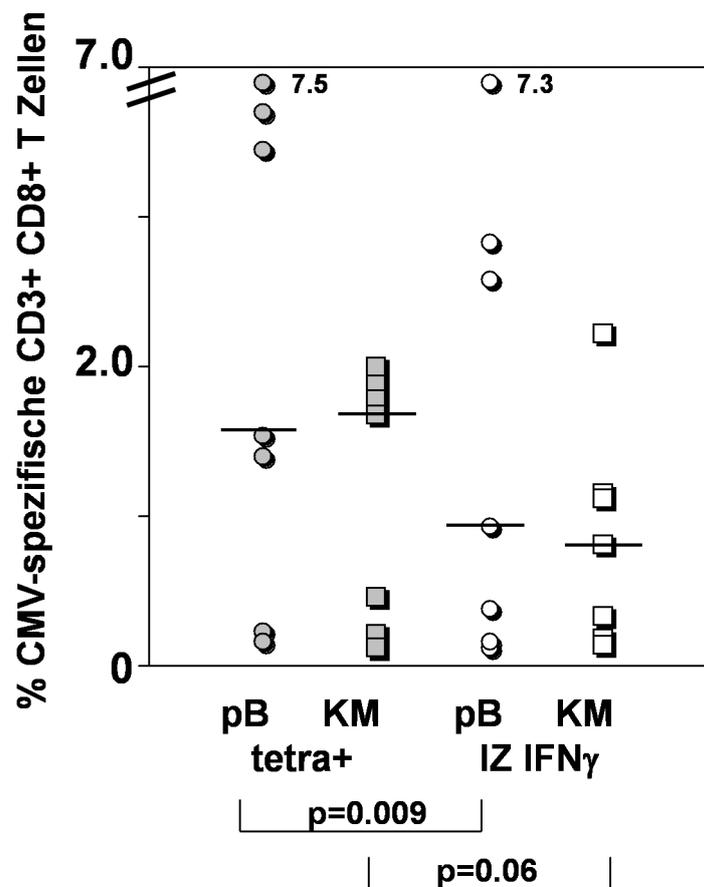


Abbildung 3-1: Evaluation CMV-spezifischer CD3+ CD8+ T-Zellen im pB und KM

Die Frequenzen CMV-spezifischer T-Zellen im pB und KM wurden als Prozent INF γ -produzierende und Tetramer-positiv CD3+CD8+ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Der Prozentsatz CMV-reaktiver T-Zellen, gemessen mit der Tetramer-Analyse, ist in den beiden linken Balken (pB/KM) und gemessen mit der IZ-DZ in den beiden rechten Balken (pB/KM) dargestellt. Die Anzahl der INF γ -produzierenden Zellen in der mit HIV-Peptid stimulierten Negativkontrolle wurde von der Frequenz der mit CMV-Peptid stimulierten Proben abgezogen.

Die Korrelation zwischen der intrazellulären INF γ -Analyse und der Tetramer-Analyse wurde mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten nach Pearson bestimmt. Die Ergebnisse der beiden Nachweismethoden korrelieren im pB ($p=0,01$; $r=0,968$) und im KM ($p=0,05$; $r=0,697$) signifikant (keine Abbildung).

3.3 Phänotypische Charakterisierung CMV-spezifischer T-Zellen im pB und KM

Die Differenzierungsphänotypen der CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden bei allen 7 Patienten mittels Tetramer-Analyse und IZ-DZ, basierend auf der Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA und CCR7, im pB und KM bestimmt. 4 unterschiedliche Subpopulationen ließen sich voneinander abgrenzen: T_n (CD45RA⁺/CCR7⁺), T_{cm} (CD45RA⁻/CCR7⁺), T_{em} (CD45RA⁻/CCR7⁻) und T_{eff} (CD45RA⁺/CCR7⁻).

Bei der Tetramer-Analyse zeigte sich, dass im pB virusspezifische T_{eff} und T_{em} überwiegen und nur wenige T_{cm} und T_n nachgewiesen werden konnten. Die Frequenz virusspezifischer T_{eff} in der Gesamtheit der untersuchten Patienten lag im pB bei einem Median von 48% (Intervall: 30% - 94%) und die Frequenz der T_{em} bei einem Median von 45% (Intervall: 4% - 58%). Der geringe Anteil CMV-spezifischer T_{cm} ergab im pB einen Median von 3% (Intervall: 0% - 13%) und von 5% (Intervall: 2% - 30%) T_n. Im Gegensatz dazu besaßen im KM ca. ¼ der CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen einen T_{cm}-Phänotyp. Der Median der virusspezifischen T_{cm} betrug im KM 26% (Intervall: 6% - 43%). Der statistische Vergleich CMV-positiver T_{cm}-Zell-Antworten in pB und KM zeigte CMV-spezifische T_{cm} im KM (Tetramer-Analyse: p<0,01). Dadurch bedingt konnte im KM eine signifikante Reduktion der CMV-spezifischen T_{eff} (Tetramer-Analyse p<0,01) nachgewiesen werden. Der Median CMV-spezifischer T_{eff} betrug 32% (Intervall: 6% - 84%) im KM (siehe Abbildung 3-2 und 3-3).

Die CMV-Tetramer-reaktiven T-Zellen der 7 HLA-A*0201-positiven Patienten wurden zusätzlich phänotypisch mittels der Oberflächenmarker CD27 und CD28 analysiert. Im pB war die Mehrzahl der CMV-spezifischen T-Zellen CD27⁻/CD28⁻, und nur wenige CD28⁺/CD27⁺ T-Zellen wurden verzeichnet. Der mediane Anteil der CD28⁺/CD27⁺ T-Zellen betrug 4% (Intervall: 1% - 43%). Im KM dagegen ließ sich eine signifikant vermehrte Population CD27⁺/CD28⁺ T-Zellen nachweisen mit einer medianen Reaktivität von 22% (Intervall: 1% - 67%) bei gleichzeitig verringertem Anteil CD27⁻/CD28⁻ T-Zellen. Die doppelt positiven T-Zellen (CD27⁺/CD28⁺) entsprechen der Subpopulation der T_{cm} und korrelieren mit den vorangegangenen Phänotyp-Assays,

die eine signifikante Vermehrung von CMV-spezifischen CD45RA-/CCR7+ Tcm im KM nachweisen (siehe Abbildung 3-3) (Monteiro 2006).

Sowohl im pB als auch im KM zeigten sich mittels IZ-DZ und Tetramer-Analyse ähnliche Subpopulationsverteilungen CMV-spezifischer T-Zellen. Ein Vergleich beider Methoden in Bezug auf den Differenzierungsstatus zeigte, dass im KM die Zahl der INF γ -freisetzenden Tcm durchschnittlich unter den Frequenzen der Tetramer-positiven CMV-spezifischen Tcm liegt. Außerdem wurden höhere Frequenzen an INF γ -produzierenden Tem als an Tetramer-positiven Tem im KM verzeichnet. Die Daten legen nahe, dass CMV-spezifische Tem eine höhere Kapazität zur Zytokinproduktion besitzen als Tcm.

Der Differenzierungsstatus der Gesamt CD8+ T-Zellen der Patienten wurde in Analogie zu den CMV-spezifischen T-Zellen über die Expression der Oberflächenmoleküle CD45RA und CCR7 im pB und KM ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Anreicherung CMV-spezifischer Tcm im KM nicht durch eine generelle Vermehrung von Tcm in diesem Kompartiment bedingt ist. Ein Vergleich der absoluten Anzahl an Tcm in pB und KM zeigte keinen signifikanten Unterschied ($p=0,27$). Die mediane Anzahl der Gesamt Tcm betrug im pB 5 % (Intervall: 1% - 14%) und im KM 11% (Intervall: 4% -20%) der CD8+ T-Zellen. Im KM wurden im Vergleich zum pB signifikant mehr Tem gefunden ($p<0,01$). Die Frequenzen der Tem im KM lagen bei 24% - 70% (Median: 60%) und im pB bei 14% - 60% (Median: 39%). Die Anzahl an Teff fiel im KM (Median: 31%, Intervall: 16% bis 44%) signifikant geringer aus als im pB (Median: 45%, Intervall: 35% bis 60%; $p=0,01$). Die Abbildung 3-3 c gibt die Subpopulationsverteilung der Gesamt CD8+ T-Zellen wieder.

Zusammenfassend lässt sich mit den vorliegenden Ergebnissen zeigen, dass CMV-spezifische Tcm präferenziell im KM vorhanden sind und nur wenige Tcm im pB zirkulieren.

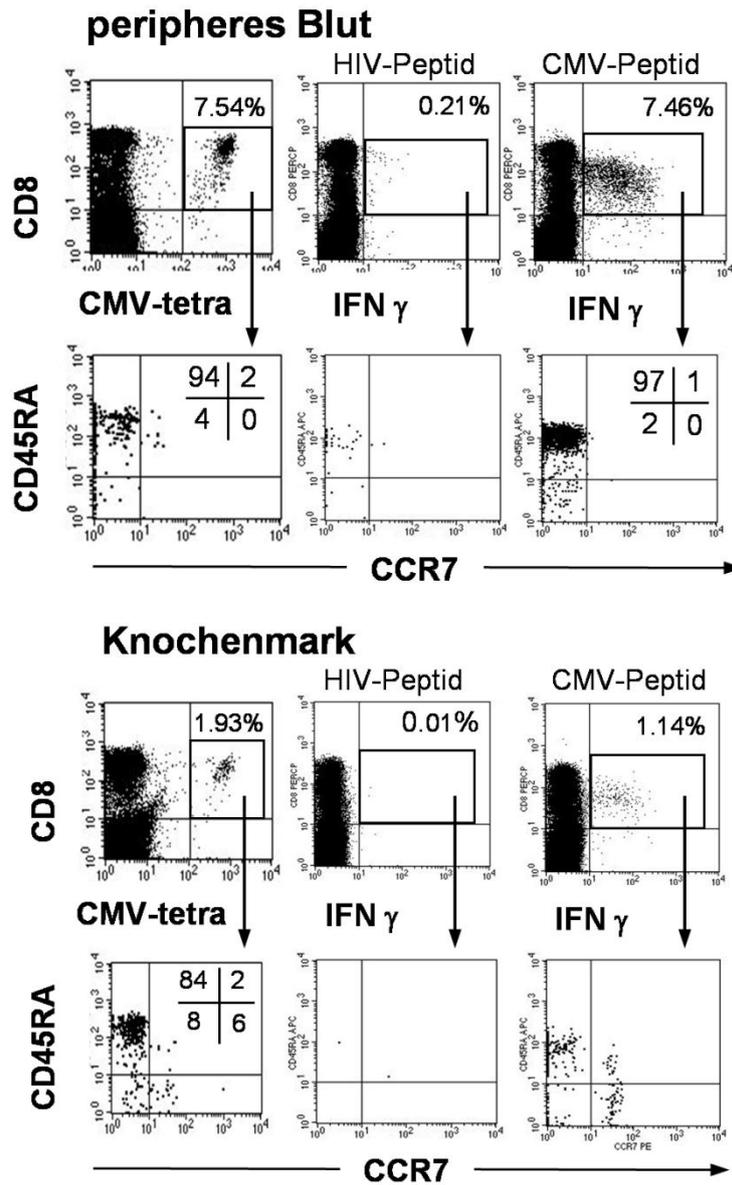


Abbildung 3-2: Phänotypcharakterisierung (CD45/CCR7) CMV-spezifischer T-Zellen am Beispiel eines einzelnen Patienten

Die Abbildung zeigt die Phänotypcharakterisierung CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen von einem zusammengehörigen pB/KM-Paar. Die obere Reihe zeigt die CMV-reaktiven T-Zellen im CD8/Tetramer- bzw. CD8/INF γ -Diagramm dargestellt. Die untere Reihe zeigt die CD45RA/CCR7 Expression gateder CD8⁺ Tetramer-positiver bzw. CD8⁺ INF γ -positiver T-Zellen. Die linke Spalte zeigt dies für die Tetramer-Analyse und die beiden rechten Spalten für die IZ-DZ, wobei die mittlere Spalte die Negativkontrolle der intrazellulären INF γ -Analyse darstellt.

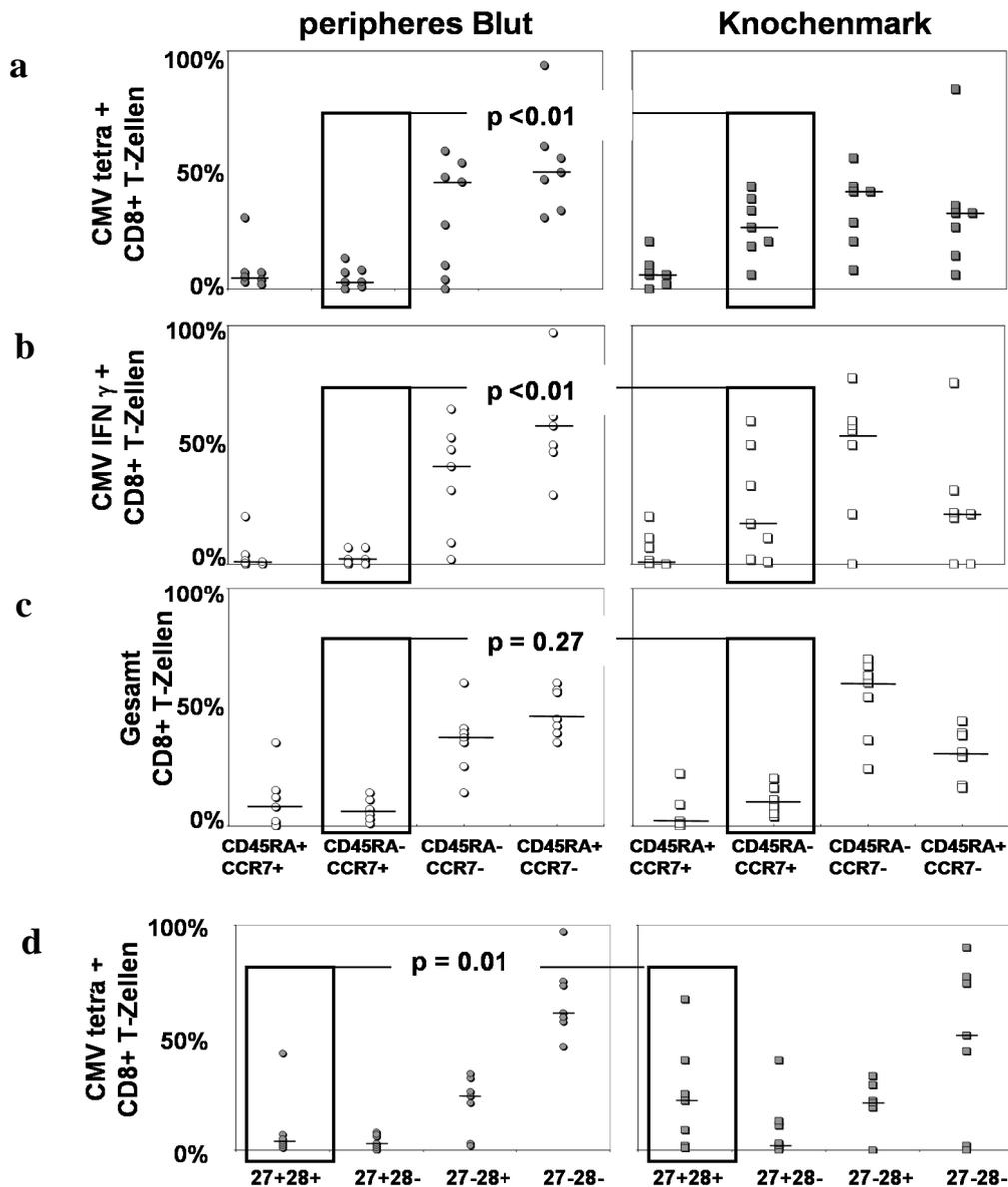


Abbildung 3-3: Phänotypcharakterisierung CMV-spezifischer T-Zellen aller Patienten

In der Abb. wird die prozentuale Verteilung der CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen auf die einzelnen Subpopulationen parallel im pB (linke Abb., graue und weiße Kreise) und KM (rechte Abb., graue und weiße Quadrate) dargestellt. Folgende Subpopulationen werden unterschieden: CD45RA+CCR7+ (Tn), CD45RA-CCR7+ (Tcm), CD45RA-CCR7- (Tem) und CD45RA+CCR7- (Teff) T-Zellen.

Die Abb. a zeigt die intrazelluläre IFN γ -Analyse, die Abb. b die Tetramer-Analyse. Die allgemeine Verteilung der Subpopulationen innerhalb der Gesamtheit der CD8+ T-Zellen ist in der Abb. c dargestellt. In der Abb. d wird die prozentuale Verteilung der

CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf die einzelnen CD27/CD28 Subpopulationen parallel im pB und KM dargestellt.

3.4 Phänotypische Charakterisierung EBV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im pB und KM

Um zu untersuchen, ob diese charakteristische Verteilung spezifischer T_{cm} auch bei anderen chronischen Virusinfektionen vorkommt, wurden bei zwei zusätzlichen HLA-A*0201-positiven Patienten T-Zell-Antworten gegen EBV in pB und KM untersucht. Mit der Tetramer-Analyse zeigten sich Frequenzen der EBV-spezifischen CD3⁺CD8⁺ T-Zellen von 0,31% - 0,39% in pB sowie 0,35% - 0,91% in KM. Die mit EBV-Peptid stimulierten MNZ zeigten niedrigere Frequenzen INF_g-sezernierender T-Zellen mit Werten von 0,10% - 0,04% im pB und <0,1% und 0,13% im KM. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass ein größerer Teil der EBV-Tetramer reaktiven T-Zellen kein INF_γ produziert.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen bei CMV-Patienten zeigte die phänotypische Charakterisierung eine vermehrte Anzahl EBV-spezifischer T_{cm} im KM vergleichend zum pB; dagegen war die Population an EBV-spezifischen T_{eff} im KM im Vergleich zum pB vermindert. Mittels beider durchflusszytometrischer Methoden zeigten sich übereinstimmende Ergebnisse (siehe Abbildung 3-4).

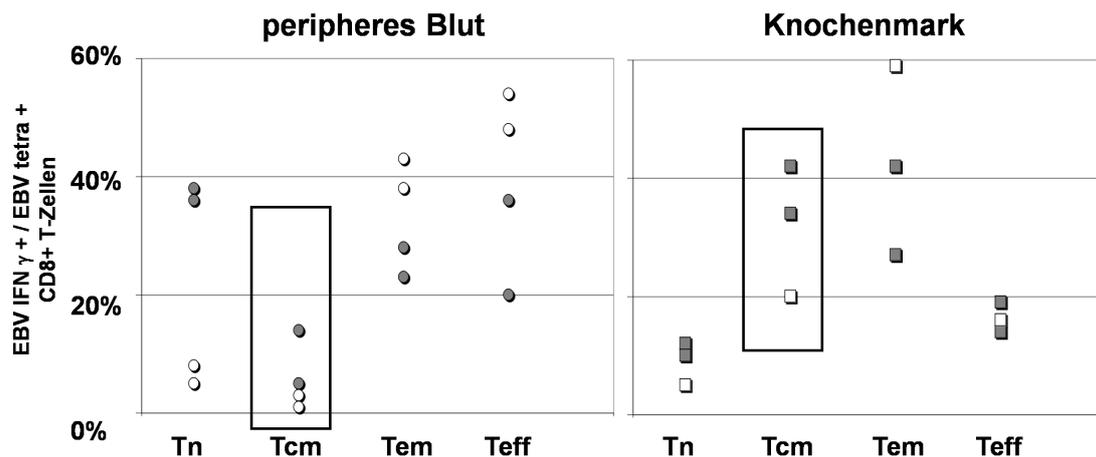


Abbildung 3-4: Phänotypcharakterisierung EBV-spezifischer CD8+ T-Zellen

Die Abb. zeigen die prozentuale Verteilung EBV-spezifischer CD8+ T-Zellen der einzelnen Subpopulationen, basierend auf der CD45RA und CCR7 Expression, parallel im pB (linke Abb., Kreise) und KM (rechte Abb., Quadrate). Bei beiden Spendern erfolgte die Phänotypcharakterisierung mittels IZ-INF γ - (weiße Felder; im KM nur ein Spender) und Tetramer-Nachweismethode (graue Felder). Weniger als 0,1% EBV-reaktive INF γ freisetzende T-Zellen wurden bei einem Patienten gemessen, was eine weitere phänotypische Charakterisierung unmöglich machte.

3.5 Vergleichende Expansion CMV-spezifischer T-Zellen aus pB und KM

In der Literatur ist beschrieben, dass Tcm ein größeres Proliferationspotenzial als Tem besitzen (Sallusto 1999). In-vitro Expansionversuche mit IL-2 und IL-7 wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die höhere Frequenz an Tcm im KM die Proliferationskapazität CMV-spezifischer T-Zellen beeinflusst. Die Frequenz CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen im pB und KM wurde mittels Tetramer-Analysen bestimmt. Verglichen mit der ursprünglichen Zellzahl zu Beginn der Untersuchung konnten nach zehn Tagen in-vitro Expansion signifikant mehr CMV-reaktive CD8+ T-Zellen aus dem KM (Median 128-fach, Intervall: 8 bis 173-fach) als aus dem pB (Median 72-fach, Intervall: 5 bis 176-fach) expandiert werden (n=6; p=0,01). Die Abbildung 3-5 zeigt den prozentualen Anteil CD8+ CMV-spezifischer T-Zellen zu Beginn und nach Beendigung der zehntägigen Expansionsphase.

Dagegen zeigte die Untersuchung der Proliferationskapazität der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen ähnliche Werte in den beiden Kompartimenten. Die mediane Proliferationskapazität lag im pB bei 2,4-fach (Intervall: 1,1 - 5,0-fach) und bei 3,2-fach (Intervall: 2,7 - 4,1-fach) im KM (keine Abb.).

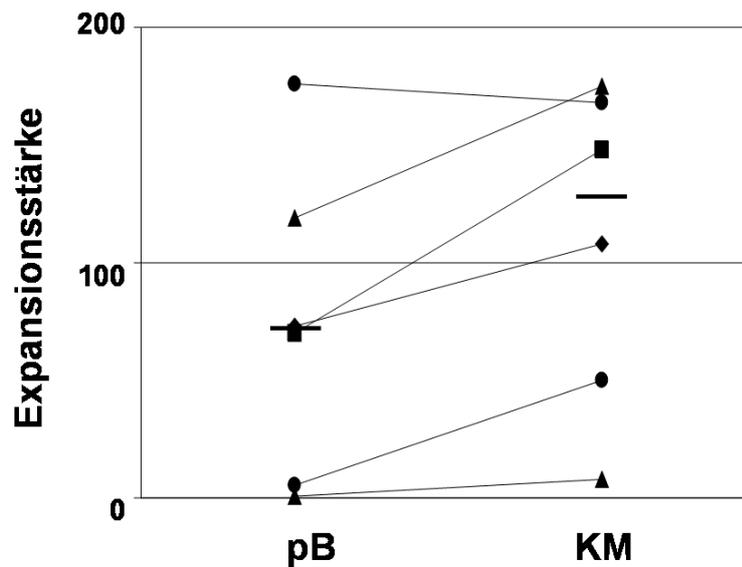


Abbildung 3-5: Vergleichende Expansion CMV-spezifischer T-Zellen aus pB und KM

Expansion CMV-spezifischer T-Zellen aus dem pB im Vergleich zum KM bei 6 Patienten. CMV-spezifische T-Zellen sind effizienter aus dem KM (rechte Zeichen) als aus dem pB (linke Zeichen) zu expandieren ($n=6$, $p=0,01$). Die Frequenzen und Mediane der spezifischen CD8⁺ Tetramer-positiven T-Zellen nach 10 Tagen in-vitro Stimulation werden dargestellt.

Mittels Kombinationsfärbung der Oberflächenmarker CD45RA und CCR7 wurden die Differenzierungsphänotypen der expandierten CD8⁺ CMV-spezifischen T-Zellen im pB und KM bestimmt. Sowohl im pB als auch KM zeigten sich nach Expansion vor allem T-Zellen vom Effektor-Memory Phänotyp. Während sich im pB fast ausschließlich CMV-spezifische Tem fanden, wurde im KM außerdem die Expansion CMV-spezifischer Tcm nachgewiesen. Die Abb. 3-6 zeigt den prozentualen Anteil der einzelnen Subpopulationen nach Beendigung der Expansionsphase im Streudiagramm.

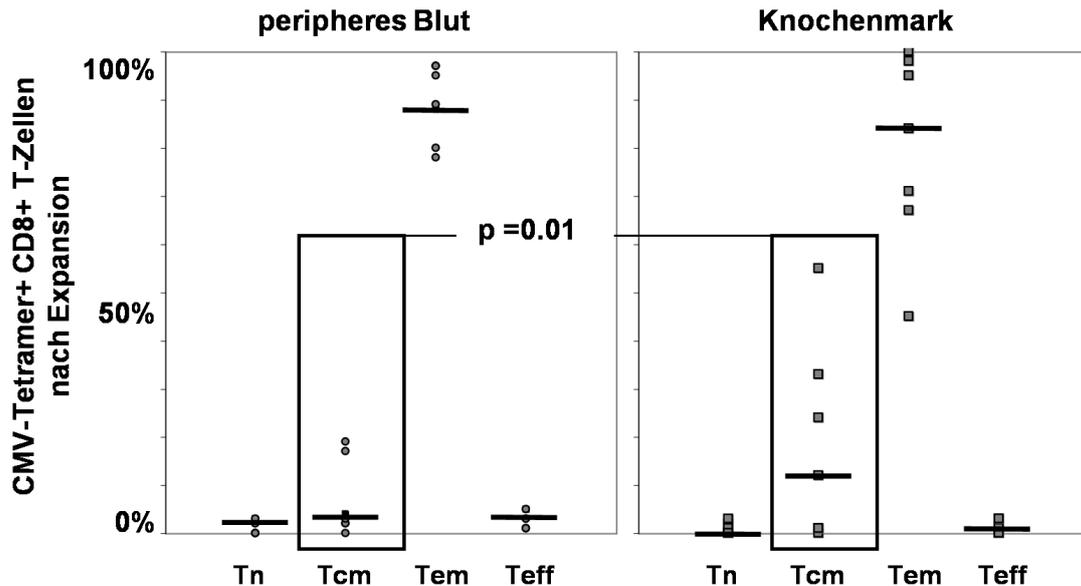


Abbildung 3-6: Phänotypcharakterisierung nach in-vitro Expansion mit IL-2, IL-7

Diese Abb. zeigt die Verteilung der CD8+ CMV-spezifischen T-Zell-Subpopulationen, basierend auf der CD45RA/CCR7 Expression. Angegeben sind die Frequenzen der einzelnen Subpopulationen als Prozentsatz der CD8+ Tetramer-positiven T-Zellen nach Expansion im pB (linke Abb.) und KM (rechte Abb.).

3.6 Differenzielle Expression des Oberflächenantigens CXCR4 auf CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen im pB und KM

Die Expression des Chemokinrezeptors CXCR4, der eine wichtige Rolle im Migrationsprozess in das Kompartiment KM spielt, wurde auf CMV-spezifischen T-Zellsubpopulationen im pB und KM mittels Fünf-Farbenanalyse verglichen. CXCR4 ließ sich auf fast 90 % aller CMV-spezifischer T-Zell-Subpopulationen im pB und KM nachweisen. Dabei zeigte sich im KM ein ca. 2-4-fach höheres CXCR4 Expressionslevel als im pB (siehe Abbildung 3-7). In beiden Kompartimenten waren die Expressionslevel höher auf CMV-spezifischen Tn und Tcm, im Vergleich zu Tem und Teff ($p=0,03$ für Tcm im Vergleich zu Tem). Dies wird in der Abbildung 3-8 an einem individuellen Patienten wiedergegeben.

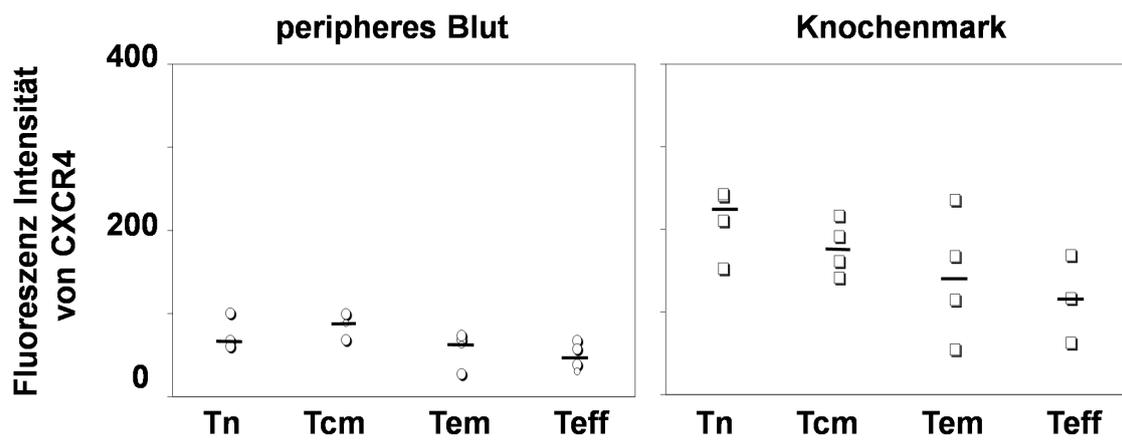


Abbildung 3-7: CXCR4 Expression auf den einzelnen Subpopulationen im pB und KM

Darstellung der CXCR4-Expressionslevel auf den Subpopulationen CMV-spezifischer $\text{INF}\gamma^+$ CD8^+ T-Zellen in pB (weiße Kreise) und KM (weiße Quadrate) bei vier Patienten. Die Mediane der CXCR4-Fluoreszenzintensitäten werden als schwarze Balken dargestellt.

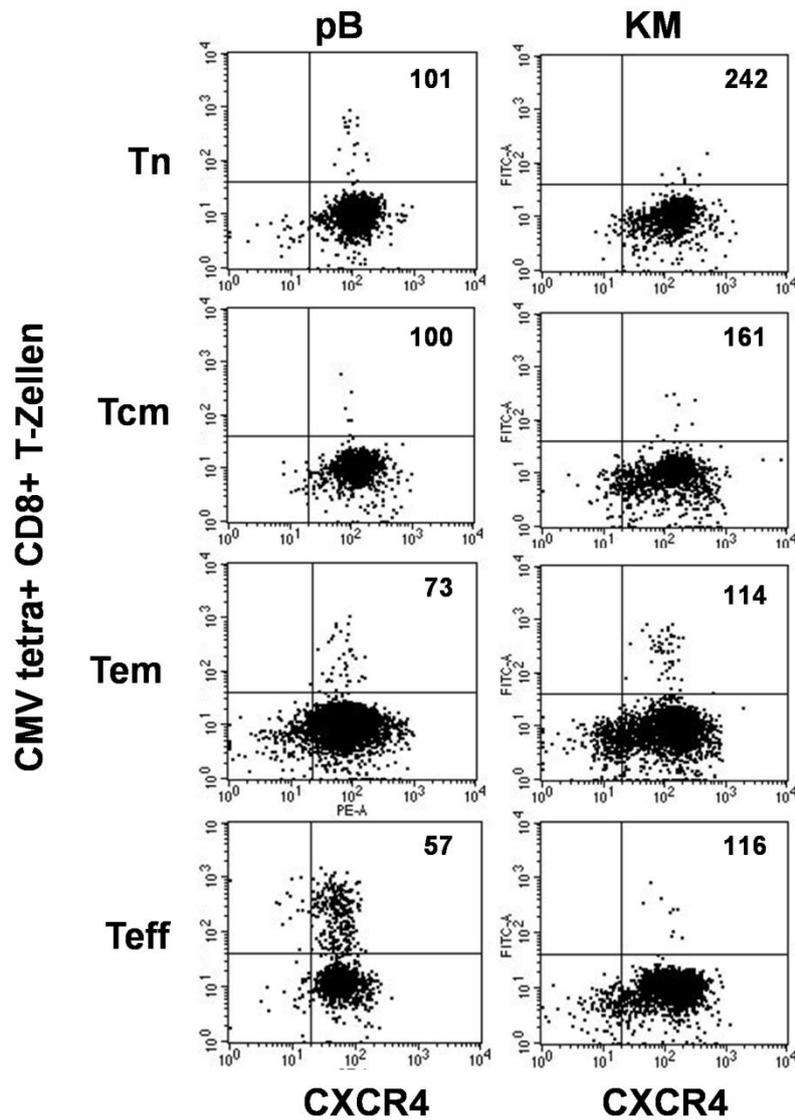


Abbildung 3-8: CXCR4 Expression auf den einzelnen Subpopulationen im pB und KM am Beispiel eines repräsentativen Patienten

Diese Darstellungen zeigen die CXCR4-Expressionslevel einzelner Subpopulationen CMV-spezifischer CD3+CD8+ T-Zellen im pB und KM eines repräsentativen Patienten. Die linke Spalte präsentiert die CXCR4/Tetramer-Diagramme der einzelnen CD45RA/CCR7-Subpopulationen im pB, die rechte Spalte die CXCR4/Tetramer-Diagramme im KM. Die medianen Fluoreszenzintensitäten der CXCR4 Expression auf Tetramer-positiven T-Zellen werden als Zahlen angegeben.

4 Diskussion

4.1 Vergleichende Charakterisierung virusspezifischer T-Zell-Antworten im pB und KM

Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es, die T-Zell-Antworten gegen virale Epitope im pB und KM vergleichend zu untersuchen. Neben der Quantifizierung erfolgte die phänotypische Charakterisierung der Differenzierung virusspezifischer T-Zellen über die Oberflächenexpression der Marker CD45RA und CCR7 sowie CD27 und CD28 mittels Durchflusszytometrie.

Die phänotypische Charakterisierung CMV-spezifischer T-Zellen zeigte eine deutliche Vermehrung von T_{cm} im KM. Dies konnte bei 2 weiteren Patienten ebenso für EBV-spezifische T_{cm} nachgewiesen werden. Dagegen waren CMV-spezifische IFN γ -produzierende Zellen im pB überwiegend differenzierte T_{eff} und es fanden sich nur wenige T_{cm} und T_{em}. Der Phänotyp CMV-spezifischer T-Zellen im pB ist in Übereinstimmung mit bisher beschriebenen CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen CMV (Chen 2001, Wherry 2003). Auch bei anderen chronischen Virusinfektionen wurden im pB überwiegend CCR7-negative Zellen nachgewiesen (Ellefsen 2002). Die hier erzielten Ergebnisse gliedern sich gut in die Daten vorangegangener Arbeiten ein, die den Nachweis von Memory-T-Zellen im KM in verschiedenen Tiermodellen beschreiben (Prince und Cerny 1999, Kuroda 2000, Di Rosa 2002 und 2003, Becker 2005, Mazo 2005). Das Vorhandensein virusspezifischer T_{cm} im KM entspricht der Vorstellung verschiedener Autoren, dass das KM als immunologisches Kompartiment von Bedeutung ist, um eine dauerhafte Gedächtnisleistung aufrechtzuerhalten (Mazo 2005). So konnten in der Studie von Mazo nach adoptivem T-Zelltransfer gezeigt werden, dass T_{cm} bevorzugt ins KM migrieren und in diesem Kompartiment persistieren (Mazo 2005). Ebenso sind die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung mit tumorgerichteten Immunantworten vergleichbar, für die der Nachweis spezifischer Memory-T-Zellen im KM gelang (Feurer 2001a) und b), Letsch 2003 und 2006). In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe konnten bei Melanompatienten

nach Vakzinierung mit Melanompeptiden Tyrosinase- und Melanom-reaktive T-Zellen im KM in gleichen oder höheren Frequenzen als im pB nachgewiesen werden. Die weitere Charakterisierung dieser Zellen zeigte eine deutliche Vermehrung von Memory-T-Zellen im KM gegenüber dem pB. Im KM waren tyrosinasespezifische T_{cm} und T_{em} sowie melanomspezifische T_{cm} nachweisbar. Auch bei Mammakarzinom-Patientinnen konnten im KM Anreicherungen tumorspezifischer Memory-T-Zellen detektiert werden; dabei zeigte sich prozentual eine Erhöhung der CD8⁺ Memory-T-Zellen, welche im pB fehlten (Feurer 2001 a)). In einer weiteren Studie konnten diese Ergebnisse bestätigt werden, indem bei der Mehrzahl der untersuchten Patientinnen tumorreaktive T-Zellen aus dem KM, nicht aber aus dem pB expandierbar waren (Feurer 2001 b)).

In Mausmodellen konnten spezifische T-Zell-Antworten gegen virale Epitope während akuter und chronischer Infektionen im KM gefunden werden (Kuroda 2000, Marshall 2001, Masopust 2001). Auch wenn bei diesen Untersuchungen die Frequenzen im KM niedriger ausfielen als im pB, wurden im KM ca. 2-mal höhere Memory-Antworten detektiert werden (Masopust 2001).

4.2 Migrationsmechanismen virusspezifischer T-Zellen

Die Untersuchung der Verteilung von Memory-T-Zellen innerhalb der virusspezifischen T-Zellpopulation aus pB und KM ergab, dass T_{cm} signifikant im KM angereichert waren. Anhand der vorliegenden Ergebnisse stellt sich die Frage, ob spezifische Memory-T-Zellen im KM in-situ durch direkte Antigenstimulation gebildet werden oder ob diese sekundär über das pB einwandern. Dass T_{cm} KM-Tropismus besitzen, zeigten vorangegangene Ergebnisse, in denen postuliert wird, dass das Migrationsverhalten von T_{cm} sich von dem anderer T-Zell-Subpopulationen unterscheidet (Sallusto 1999, Weninger 2001, Wherry 2004). Das KM ist das einzige identifizierte Immunorgan, welches wesentlich in die Rekrutierung von T_{cm} involviert zu sein scheint.

Die unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen befinden sich entsprechend ihrem Reifestadium in verschiedenen Kompartimenten (Di Rosa 2002). Insgesamt kann man

aus diesen Ergebnissen ableiten, dass das Knochenmark ein Hauptreservoir für T_{cm} bildet. Die Bedeutung des KM als Reservoir virusspezifischer Memory-T-Zellen könnte verschiedene Ursachen haben. Das Vorkommen von homöostatische Zytokine, Il-15 produzierende mesenchymalen Zellen und antigenpräsentierende Zellen scheint das Vorhandensein und die Proliferation von Memory-T-Zellen im KM zu beeinflussen (Becker 2005, Parretta 2005). Ein weiterer Grund der Akkumulation von spezifischen Memory-T-Zellen in bestimmten Kompartimenten könnte das unterschiedliche Homing-Verhalten der spezifischen T-Zellen sein. Eine Vielzahl experimenteller Daten stützt diese Hypothese, dass die Ansammlung von spezifischen Memory-T-Zellen im KM nicht zufällig auftritt, sondern einem organisierten, gerichteten Prozess folgt (Pabst 1989). Die Bedeutung und funktionelle Relevanz von Chemokinen und deren Rezeptoren für das Migrationsverhalten von spezifischen T-Zellen in bestimmte lymphatische Organe und nicht-lymphatische Organe ist bekannt. Derzeit noch nicht ausreichend beantwortet ist jedoch die Frage, auf welche Moleküle die Migration spezifischer T-Zellen in das KM zurückgeführt werden kann. In einer vorangegangenen Studie konnte der Adhäsionsmechanismus von murinen T_{cm} im KM identifiziert werden (Mazo 2005). Es zeigte sich, dass adoptiv transferierte T_{cm} verglichen mit T_{em} effektiver an Gefäßwänden des KM hafteten. Die Oberflächenkonzentration von L-Selektin (CD62L) spielte dabei eine bedeutende Rolle für die Funktion des Rollens an KM-Gefäßwänden. Außerdem wird die Migration von T_{cm} ins KM durch das Chemokin SDF-1 unterstützt, welches im KM hoch exprimiert vorzufinden ist und sich an den CXCR4-Rezeptor auf T-Zellen bindet (Mazo 2005).

Um die Bedeutung des Markers CXCR4 bei der Migration von CMV-spezifischen Memory-T-Zellen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie dessen Expression auf Memory-T-Zellen im pB und KM vergleichend analysiert. Der Chemokinrezeptor CXCR4 wird auf Memory- und Effektor-T-Zellen sowohl im pB als auch im KM exprimiert. Diese Daten bestätigen zahlreiche Befunde aus der Literatur, bei denen CXCR4 einen wichtigen Homing-Rezeptor für das Knochenmark darstellt (Geminder 2001, Zeelenberg 2003). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass CXCR4 auf einem Großteil der CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen exprimiert ist. Die CXCR4 Expressionslevel lagen im KM 2-3-fach höher verglichen

zum pB. Vor allem bestand eine höhere Expression von CXCR4 auf CMV-spezifischen Tcm verglichen mit Tem. Interessanterweise benötigen hämatopoetische Stammzellen hohe CXCR4 Level, um die vorübergehende Adhäsion an Gefäßwänden im KM zu schaffen (Kucia 2005). Die differenzielle Expression von L-Selektin, das auf CMV-spezifischen Tn und Tcm höher exprimiert wird, könnte die präferenzielle Akkumulation von CMV-spezifischen Tcm im KM erklären (Sallusto 2004). In einer weiteren Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von L-Selektin CXCR4 hoch reguliert und die SDF-1 induzierte Runterregulation von CXCR4 inhibiert (Ding 2003). Folglich spielt der L-Selektin/CXCR4 Signalweg möglicherweise eine relevante Rolle für die bevorzugte Migration von CMV-spezifischen Memory-T-Zellen ins KM.

Interessanterweise konnten in der vorliegenden Studie keine Unterschiede in Bezug auf die Gesamtzahl CD8+ Tcm im pB und KM festgestellt werden. Möglicherweise sind es vor allem aktivierte spezifische T-Zellen mit bevorzugter Migration und Proliferation im Knochenmark. In der Studie von Zang et al. konnten ebenso wie in der hier vorliegenden Arbeit ähnliche Frequenzen CMV-Tetramer-positiver CD8+ T-Zellen in beiden Kompartimenten beobachtet werden (Zhang 2006). In diesem Zusammenhang ist eine Studie von Interesse, die zeigt, dass eine Sekundärimpfung zur Mobilisierung von ansässigen nicht-vakzinespezifischen Plasmazellen führt. Ein Nachweis dieser Zellen würde zeigen, dass der Raum im KM für Memory-T-Zellen prinzipiell begrenzt ist und verschiedene Zellpopulationen um Nischen im Knochenmark konkurrieren (Odendahl 2005). Es wäre von Interesse herauszufinden, ob ähnliche Phänomene bei CMV-spezifischen T-Zellen vorkommen.

4.3 Expansionspotential virusspezifischer T-Zellen

Für die Entwicklung potenzieller immuntherapeutischer Strategien auf der Basis von spezifischen T-Zellen ist deren Expansionspotential in vitro und Langlebigkeit in vivo von zentraler Bedeutung. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass sowohl zum Schutz gegen Viren als auch gegen Tumoren antigenspezifische Tcm-Zellen die eigentlichen Träger der protektiven und therapeutischen Immunität sind (Seaman 2004,

Wherry 2003, Zaph 2004). Diese Subpopulation der Memory-T-Zellen ist fähig, eine schnelle und effektive Sekundärantwort zu vermitteln; aktivierte Effektor-T-Zellen können innerhalb weniger Stunden rekrutiert werden (Wherry 2003, Gourley 2004). Weiterhin konnte bei Tcm der Maus eine hohe Proliferationskapazität sowohl in in-vitro- als auch in-vivo-Studien nachgewiesen werden (Geginat 2003, Kaech 2002, Sallusto 1999).

Eine zentrale Frage war, ob virusspezifische T-Zellen effizienter aus dem KM expandiert werden können. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit können zeigen, dass signifikant mehr CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen aus dem KM im Vergleich zum pB expandiert werden können. Möglicherweise korreliert die höhere Proliferationskapazität CMV-spezifischer T-Zellen im KM mit dem Vorhandensein von Tcm in diesem Kompartiment. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die gesteigerte Expansionsfähigkeit von T-Zellen aus der Bereitstellung von Zytokinen, wie beispielsweise IL-7 und IL-15 (Paretta 2005), Stromazellen (Belz 2006, Zammit 2005) und antigenpräsentierenden Zellen im KM resultiert (Feurerer 2003). Daneben postuliert Cavanagh die mögliche Beeinflussung der Proliferationskapazität durch dendritische Zellen. Eine besondere Eigenschaft von zirkulierenden dendritischen Zellen sind die Migration und deren Persistenz im KM, einem Kompartiment, in dem dendritische Zellen eine schnelle Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen induzieren (Cavanagh 2005). Interessanterweise migrieren differenzierte dendritische Zellen nicht in Lymphknoten, was möglicherweise ein Erklärungsmodell für die verminderte Anzahl an CMV-spezifischen Tcm in Lymphknoten ist (Ellefsen 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch keine weiteren Untersuchungen zur Klärung dieser Phänomene durchgeführt.

Die phänotypische Charakterisierung der expandierten CMV-spezifischen T-Zell-Populationen zeigte im pB einen einheitlichen CD45RA⁺CCR7⁻ Effektor-Memory-Phänotyp. Im KM konnte neben Tem-Zellen ebenfalls die Expansion CMV-spezifischer Tcm-Zellen nachgewiesen werden.

4.4 Perspektiven für adoptive Immuntherapien

Antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen sind von großer Bedeutung für die Immunabwehr von intrazellulären Pathogenen und Tumoren. Bei immunsupprimierten Patienten kann die Reaktivierung chronischer Virusinfektionen mit intrazellulären Erregern wie CMV und EBV zu schweren Erkrankungsbildern führen. Adoptiv transferierte spezifische CD8⁺ T-Zellen sind in diesem Kontext eine attraktive Therapiemöglichkeit. Dafür sollten die Zellen schnell herstellbar sein, den Transfer gut überstehen und möglichst lange im Empfängerorganismus schützende Effektorfunktionen ausüben. Ergebnisse bisheriger Studien haben gezeigt, dass die meisten in-vitro-Expansionsmethoden Teff generieren, die in-vitro effektive Killerzellen sind, aber in-vivo nur eine suboptimale Effektivität gezeigt haben (Dudley 2002, Yee 2002). Einer der Gründe für diese Ineffektivität von Teff mag die kurze Überlebensdauer in-vivo sein. Teff können sich nicht in langlebige Zellen umwandeln, Teff scheinen „terminal differenziert“ zu sein. Im Gegensatz dazu sind Tcm weitaus robuster in-vivo, weniger apoptoseanfällig und besitzen ein höheres Proliferationspotenzial. Darüber hinaus besitzen Tcm-Zellen die Fähigkeit, IL-2 zu produzieren, sind sensitiver gegenüber den Einflüssen homöostatischer Zytokine und scheinen somit die ideale Zellpopulation für adoptive Transferstrategien zu sein (Gattinoni 2005 und 2006, Lanzavecchia und Sallusto 2005). An Mausmodellen wurde bereits in präklinischen Experimenten gezeigt, dass sich Tcm besonders gut für den adoptiven Zelltransfer eignen.

Daher könnten die in dieser Untersuchung vorliegenden Ergebnisse Eingang in zukünftige adoptive Transferkonzepte finden. Insgesamt demonstrieren die Ergebnisse dieser Arbeit, dass CMV-spezifische T-Zellen aus dem KM eine wertvolle Ressource für adoptive Immuntherapien darstellen könnten, wenn man das hohe Proliferationspotenzial von CMV-spezifischen T-Zellen im KM betrachtet.

Aktuelle Studien beschäftigen sich mit verbesserten Konditionen, um effizienter Tcm zu expandieren. Der Einsatz von Zytokinen wie IL-15 und IL-21 (Zeng 2005) und die Depletion regulatorischer T-Zellen verspricht die schnellere Expansion höherer Frequenzen spezifischer T-Zellen für effizientere adoptive T-Zell-Therapien (Asemisen 2006).

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden CMVpp65-spezifische T-Zell-Antworten bei Patienten mit Hüftkopfresektion im pB und KM phänotypisch und funktionell mittels IZ-DZ und Tetramer-Färbungen analysiert und verglichen. In den pB- und KM-Paaren zeigte sich hinsichtlich der Frequenzen an CD8⁺ CMV-spezifischen T-Zellen kein Unterschied. Im pB wurden vor allem CMV-spezifische T-Zellen vom Effektor- und Effektor-Memory-Phänotyp detektiert; nur ein geringer Anteil CMV-spezifischer Tcm konnte im pB nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu waren ca. ¼ CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im KM CD45RA-CCR7⁺ Tcm (Tetramer-Analyse und IZ-DZ). Dies ist nicht auf eine generelle Vermehrung von Tcm im KM zurückzuführen, da der Anteil der Tcm an der Gesamtfraktion CD8⁺ T-Zellen im pB und KM gleich war.

Die funktionelle Analyse CMV-spezifischer T-Zellen nach Stimulation mit IL-2 und IL-7 im pB und KM zeigte eine signifikant effizientere Proliferationskapazität CMV-spezifischer T-Zellen aus dem KM als aus dem pB (KM: Median 128-fach, pB: Median 72-fach; $p=0,001$ $n=6$). Die phänotypische Charakterisierung der expandierten CMV-spezifischen T-Zellen zeigte sowohl im KM als auch im pB in der überwiegenden Mehrheit Tem. Im KM konnten allerdings nach Expansion auch einige CMV-spezifische Tcm nachgewiesen werden.

Die Expressionsanalysen des Chemokinrezeptors CXCR4 auf CMV-spezifischen T-Zellen ergaben eine mehrfach höhere CXCR4 Expressionsstärke im KM. Weiterhin ließ sich eine stärkere CXCR4 Expression insbesondere auf Tcm nachweisen, was ein Hinweis dafür ist, dass CXCR4 bei der Akkumulation von CMV-spezifischen Tcm im KM eine Rolle spielt.

Schlussfolgernd scheint das KM ein wichtiges Kompartiment für CMV-spezifische Tcm mit dem Potenzial für lang anhaltende protektive Immunität zu sein. Desweiteren unterstreichen diese Ergebnisse die Bedeutung des KM als ein sekundäres immunologisches Organ. Möglicherweise ist das KM auch ein Kompartiment mit besonderer Eignung zur Generierung spezifischer T-Zellen für adoptive Immuntherapien.

6 Literaturverzeichnis

Altmann JD, Moss PA, Goulder PF, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ und Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274: 94-96.

Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, et al. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infection. *Nat Med* 2002; 8:379-385.

Appay V and Rowland-Jones SL. Lessons from the study of T-cell differentiation in persistent human virus infection. *Semin Immunol* 2004; 16:205-212.

Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev* 2003, 192:161-80.

Asemissen AM., Keilholz U., Tenzer S., Müller M., Walter S., Stevanovic S., Schild H., et al. Identification of highly immunogenic HLA-A*01-binding T cell epitope of WT1. *Clin. Cancer Res.* 2006; 12:7476-7482.

Becker TC, Coley SM, Wherry EJ, Ahmed R. Bone Marrow is a preferred site for homeostatic proliferation of memory CD8 T cells. *J Immunol* 2005; 174:1269-1273.

Belz G.T., Wilson N.S., Smith C.M., Mount A.M., Carbone F.R., Heath W.R. Bone Marrow-derived cells expand memory CD8⁺ T cells in response to viral infections of the lung and skin. *Eur. J. Immunol.* 2006; 36:327-333.

Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, Porter G, Tamhankar S, Williamson AR, Zweerink HJ. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol.* 1991; 147:4047-53.

Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindsten T, Thompson CB. CD28-Costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995; 3:87-98.

Cavanagh LL; Bonasio R, Mazo IB, Halin C, Cheng G, van der Velden AW, Cariappa A, et al. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nat Immunol* 2005; 6:1029-1037.

Champagne P, Ogg GS, King AS, Knabenhans C, Ellefsen K, Nobile M, Appay V, et al. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 2001; 410:106-111.

Chen G, Shankar P, Lange C, Valdez H, SKolnik PR, WU L, Manjunath N, Lieberman J. CD8 T cells specific for human immunodeficiency virus, Epstein-Barr virus, and cytomegalovirus lack molecules for homing to lymphoid sites of infection. *Blood* 2001; 98:156-164.

Ding Z., Issekutz T.B., Downey G.P., Waddell T.K., L-selectin stimulation enhances functional expression of surface CXCR4 in lymphocytes: implications for cellular activation during adhesion and migration. *Blood* 2003; 101: 4245-4252.

Di Rosa F, Santoni A. Bone marrow CD8 T cells are in a different activation state than those in lymphoid periphery. *Eur J Immunol* 2002; 32:1873-80.

Di Rosa F and Santoni A. Memory T cell competition for bone marrow seeding. *Immunology* 2003; 108:296-304.

Di Rosa F and Papst R. The bone marrow: a nest for migratory memory T cells. *Trends Immunol* 2005; 26:360-6.

Dobrzanski MJ, Reome JB und Dutton RW. Type 1 and type 2 CD8⁺ effector T cell subpopulations promote long-term tumor immunity and protection to progressively growing tumor. *J Immunol* 2000; 164:916-925.

Dudley M.E., Wunderlich J.R., Yang J.C., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Sherry R.M., et al., A phase I study of nonmyeloablative chemotherapy and adoptive transfer of autologous tumor antigen-specific T lymphocytes in patients with metastatic melanoma. *J. Immunother.* 2002; 25:243-251.

Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:201-23.

Elefsen K, HARari A, Champagne P, Bart PA, Sekaly RP, Pantaleo G. Distribution and functional analysis of memory antiviral Cd8 T cell responses in HIV-1 and cytomegalovirus infections. *Eur J Immunol* 2002; 32:3756-3764.

Feurer M, Rocha M, Bal L, Umansky V, Solomayer EF, Bastert G, Diel IJ, Schirmacher V. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* 2001 a); 92:96-105.

Feurerer M, Beckhove P, Bai L, Solomayer EF, Bastert G, Diel IJ, Pedain C, Oberniedermayr M, Schirmacher V, Umansky V. Therapy of human tumors in NOD/SCID mice with patient-derived reactivated memory T cells from bone marrow. *Nat Med* 2001 b); 7:452-458.

Feurer M., Beckhove P., Garbi N., Mahnke Y., Limmer A., Hommel M., Hammerling G.J., et al., Bone marrow as a priming site for T-cell responses to blood-borne antigen. *Nat Med* 2003; 9:1151-1157.

Gamadia LE, Rentenaar RJ, Baars PA, Remmerswaal EB, Surachno S, Weel JF, Toebes M, et.al. Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood* 2001; 98:754-761.

Gattinoni L, Finkelstein SE, Klebanoff CA, Antony PA, Palmer DC, Spiess PJ, Hwang LN, Yu Z, Wrzesinski C, Heimann DM, Surh CD, Rosenberg SA, Restifo NP. Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2005; 202:907-12.

Gattinoni L, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:383-93. Review.

Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 2003; 101:4260-4266.

Geminder H, Sagi-Assif O, Goldberg L, Meshel T, Rechavi G, Witz IP, Ben-Baruch A. A possible role for CXCR4 and its ligand, the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1, in the development of bone marrow metastases in neuroblastoma. *J Immunol* 2001; 167:4747-57.

Gourley TS, Wherry EJ, Masopust D, Ahmed R. Generation and maintenance of immunological memory. *Semin Immunol* 2004; 16:323-33.

Hamann D, Baars P A, Rep M H, Hooibrink B, Kerkhof-Garde S R, Klein M R und van Lier R A. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ cells. *J Exp Med* 1997; 186:1407-1418.

Hamann D, Kostense S, Wolters K C, Otto S A, Baars P A, Miedema F und van Lier R A. Evidence that human CD8+CD45RA+CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol* 1999; 11:1027-1033

Heemels MT, Ploegh H. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu Rev Biochem* 1995; 64:463-491.

Hickling JK. Measuring human T-lymphocyte function. *Expert Rev Mol Med* 1998; 1998:1-20.

Höflich C, Docke WD, Busch A, Kern F, Volk HD. CD45RA(bright)/CD11a(bright) CD8⁺ T cells: effector T cells. *Int Immunol* 1998, 10:1837-1845.

Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol* 2001; 2:415-22.

Kaech SM, Wherry EJ und Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nature Immunol Rev* 2002; 2:251-262.

Karpus WJ, Lukacs NW, Kennedy KJ, Smith WS, Hurst SD, Barrett TA. Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production, *J Immunol* 1997; 158:4129-36.

Kern F, Sural I P, Brock C, Freistedt B, Radtke H, Scheffold A, Blasczyk R, Reinke P, Schneider-Mergener J, Radbruch A, Walden P, Volk H D. T-cell epitope mapping by flow cytometry, *Nat Med* 1998; 4:975-978.

Kucia M., Reza R., Miekus K., Wanzeck J., Wojakowski W., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak J., Ratajczak M.Z., Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005; 23:879-894.

Kuroda MJ, Schmitz JE, Seth A, Veazey RS, Nickerson CE, Lifton MA, Dailey PJ, Forman MA, Racz P, Tenner-Racz K, Letvin NL. Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocytes and cell-associated viral RNA levels in distinct lymphoid compartments of SIVmac-infected rhesus monkeys. *Blood*. 2000; 96:1474-9.

Lanzavecchia A. From antigen presentation to T-cell activation. *Res Immunol* 1998; 149:626.

Lanzavecchia A, Lezzi G und Viola A. From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior. *Cell* 1999; 96:1-4.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte Responses: Intermediates, Effectors, and Memory Cells. *Science* 2000; 290:92-97. a)

Lanzavecchia A, Sallusto F. From synapses to immunological memory: the role of sustained T cell stimulation. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:92-8. b)

Lanzavecchia A, Sallusto F. Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* 2001. 2:487-92.

Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2005; 17:326-32.

Letsch, A., Keilholz, U., Assfalg, G., Mailaender, V., Thiel, E., Scheibenbogen, C. The bone marrow contains melanoma-reactive CD8+ effector T cells and compared to peripheral blood enriched numbers of melanoma-reactive CD8+ memory cells. *Cancer Res.* 2003; 63:5583-5586.

Letsch A., Keilholz U., Kern F., Asemissen A.M., Thiel, E., Scheibenbogen, C. Specific central memory T cells in the bone marrow of patients immunized against tyrosinase peptides. *J. Immunother.* 2006; 29:201-207.

Maher S, Toomey D, Condrón C und Bouchier-Hayes D. Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol Cell Biol* 2002; 80:131-137.

Manjunath N, Shankar P, Wan J, Weninger W, Crowley MA, Hieshima K, Springer TA, Fan X, Shen H, Lieberman J, von Andrian UH. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest.* 2001; 108:871-8.

Marshall DR, Turner SJ, Belz GT, Wingo S, Andreansky S, Sangster MY, Riberdy JM, Liu T, Tan M, Doherty PC. Measuring the diaspora for virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98:6313-8.

Masopust D, Vezys V, Marzo AL, Lefrançois L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 2001; 291:2413-7.

Masopust D, Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. The role of programming in memory T-cell development. *Curr Opin Immunol.* 2004; 16:217-25.

Mazo, I.B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K. Bone Marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8(+) T cells. *Immunity* 2005; 22: 259-270.

Monteiro M, Evaristo C, Legrand A, Nicoletti A, Rocha B. Cartography of gene expression in CD8 single cells: novel CCR7- subsets suggest differentiation independent of CD45RA expression. *Blood* 2007; 109:2863-2870.

Odendahl M., Mei H., Hoyer B.F., Jacobi A.M., Hansen A., Muehlinghaus G., Berek C., et al., Generation of migratory antigen-specific plasma blasts and mobilization of resident plasma cells in a secondary immune response. *Blood* 2005; 105:1614-1621.

Olsson J, Wikby A, Johansson B, Löfgren S, Nilsson BO, Ferguson FG. Age-related change in peripheral blood T-lymphocyte subpopulations and cytomegalovirus infection in the very old: the Swedish longitudinal OCTO immune study. *Mech Ageing Dev.* 2000; 121:187-201.

Pabst R, Binns RM. Heterogeneity of lymphocyte homing physiology: several mechanisms operate in the control of migration to lymphoid and non-lymphoid organs in vivo. *Immunol Rev.* 1989; 108:83-109.

Parretta E., Cassese G., Barba P., Santoni A., Guardiola J., Di Rosa F., CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow. *J. Immunol.* 2005; 174:7654-7664.

Ploix C, Lo D, Carson MJ. A ligand for the chemokine receptor CCR7 can influence the homeostatic proliferation of CD4 T cells and progression of autoimmunity. *J Immunol.* 2001 Dec 15;167(12):6724-30.

Price PW, Cerny J. Characterization of CD4+ T cells in mouse bone marrow. I. Increased activated/memory phenotype and altered TCR Vbeta repertoire. *Eur J Immunol.* 1999; 29:1051-6.

Rammensee HG. Antigen presentation - recent developments. *Int Arch Allergy Immunol* 1996, 110:299-307.

Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P, Janssen H, Calafat J, Drijfhout JW und Neefjes J. Peptide diffusion, protection, and degradation innuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 2003; 18:97-108.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:217-42.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M und Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-712.

Sallusto F, Langenkamp A, Geginat J, Lanzavecchia A. Functional subsets of memory T cells identified by CCR7 expression. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2000; 251:167-71.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Exploring pathways for memory T cell generation. *J Clin Invest* 2001; 108:805-806.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central Memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:745-763.

Seaman MS, Peyerl FW, Jackson SS, Lifton MA, Gorgone DA, Schmitz JE, Letvin NL. Subsets of memory cytotoxic T lymphocytes elicited by vaccination influence the efficiency of secondary expansion in vivo. *J Virol* 2004; 78:206-215.

Schirmacher V, Feuerer M, Beckhove P, Ahlert T, Umansky V. T cell memory, anergy and immunotherapy in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2002; 7:201-8. Review.

Weninger W, Crowley MA, Manjunath N, von Andrian UH. Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells. *J Exp Med.* 2001; 194:953-66.

Wherry EJ, Teichgraber V, Becher TC, Masopust D, Kaeck SM, Antia R, von Andrian UH, Ahmed R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 2003; 4:225-234.

Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol.* 2004; 78:5535-45.

Yee C., Thompson J.A., Byrd D., Riddell S.R., Roche P., Celis E., Greenberg P.D. Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99:16168-16173.

Zammit D.J., Cauley L.S., Pham Q.M., Lefrancois L., Dendritic cells maximize the memory CD8 T cell response to infection. *Immunity*. 2005; 22:561-570.

Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med* 2004; 10:1104-1110.

Zhang X, Dong H, Lin W, Voss S, Hinkley L, Westergren M, Tian G, Berry D, Lewellen D. Human bone marrow: a reservoir “enhanced effector memory” CD8+ T cells with potent recall function. *J Immunol* 2006; 177:6730-6737.

Zeelenberg IS, Ruuls-Van Stalle L, Roos E. The chemokine receptor CXCR4 is required for outgrowth of colon carcinoma micrometastases. *Cancer Res.* 2003; 63:3833-9.

Zeng R., Spolski R., Finkelstein S.E., Oh S., Kovanen P.E., Hinrichs C.S., Pise-Masison C.A., et al., Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function. *J. Exp. Med.* 2005; 201:139-148.

Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251:547-548.

Zinkernagel R, Bachmann M, Kundig T, Oehen S, Pirchet H, Hengartner H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:333-367.

Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-27.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AICD	Activation-induced-cell-death
Ak	Antikörper
APZ	antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BFA	Brefeldin A
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalie-Virus
HEV	high endothelial venules
HH5	Humanes Herpesvirus 5
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
FACS	Fluorescens associated cell sorter (Durchflusszytometrie)
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluorescence activated cell sorter
GAM	Goat anti mouse
Gp	Glykoprotein
HEV	high endothelial venules
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	humanes Leukozyten Antigen
INF γ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
IZ-DZ	intrazelluläre Zytokinfärbung in der Durchflußzytometrie

KM	Knochenmark
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNZ	mononukleäre Zellen
pB	peripheres Blut
PBS	phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
TAP	Tranporter associated with Antigen Processing
TZR	T-Zell-Rezeptor
Tcm	central-Memory, Zentrale-Memory-T-Zellen
Tem	effektor Memory, Effektor-Memory-T-Zellen
Teff	Effektor-T-Zellen
Tn	naive T-Zellen
Verd	Verdünnungsfaktor
Vol	Volumen

Maße und Einheiten

Gy	Gray
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mMol	Millimol
ng	Nanogramm
U/min	Umdrehungen/Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: T-Zell-Subpopulationen	7
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung durchflusszometrischer Methoden zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen.....	13
Abbildung 3-1: Evaluation CMV-spezifischer CD3+CD8+ T-Zellen im pB und KM.....	27
Abbildung 3-2: Phänotypcharakterisierung (CD45/CCR7) CMV-spezifischer T-Zellen am Beispiel eines einzelnen Patienten.....	30
Abbildung 3-3: Phänotypcharakterisierung CMV-spezifischer T-Zellen aller Patienten	31
Abbildung 3-4: Phänotypcharakterisierung EBV-spezifischer CD8+ T-Zellen im pB und KM.....	33
Abbildung 3-5: Vergleichende Expansion CMV-spezifischer T-Zellen aus pB und KM.....	34
Abbildung 3-6: Phänotypcharakterisierung nach in-vitro Expansion mit IL-2, IL-7.....	35
Abbildung 3-7: CXCR4 Expression auf den einzelnen Subpopulationen im pB und KM.....	36
Abbildung 3-8: CXCR4 Expression auf den einzelnen Subpopulationen im pB und KM am Beispiel eines repräsentativen Patienten	37

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Übersicht über die wichtigsten phänotypischen und funktionellen Parameter von T-Zell-Subpopulationen; nach Hamann 1997 und 1999, Höflich 1998, Sallusto 1999, Lanzavecchia und Sallusto 2000 a), Appay 2002 und 2004.....	6
Tabelle 2-1: Peptide und Tetramere.....	18

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Carmen Scheibenbogen für die Überlassung meines Promotionsthemas und Frau Dr. Anne Letsch für die Betreuung meiner Dissertation. Sie beide haben die Entstehung dieser Arbeit begleitet, sie haben mit ihrem Denken als Wissenschaftlerinnen geholfen, mit Anregungen und Fragen. Diese Arbeit verdankt seine Entstehung aber auch der Zusammenarbeit und der so motivierenden Vitalität von Anne-Marie und Il-Kang.

Die besondere Mischung aus Arbeit, Leben und Freundschaft machte diese Zeit zu einem spannend-schönen Erlebnis.

Für technische Tipps und methodische Hinweise sowie meine Einarbeitung sorgte zudem Sandra Bauer – Danke für diese wertvolle Hilfe.

Dir liebe Julika ganz besonderen Dank für Deine sprachliche Unterstützung, Deine Hilfe und vor allem Deine Freundschaft.

Meine Freundinnen und Kolleginnen Anja, Hanne und Ulrike sowie Sibylle und Salomé haben mich auf unterschiedlichste Weise unterstützt und begleitet - ohne Euch wären die schwierigen Tage schwieriger und die schönen Tage weniger schön gewesen.

Meinen Eltern und meinem Bruder Jan danke ich von Herzen für Eure Ermutigung, Euren Glauben und vor allem Eure Liebe und Einzigartigkeit.

Euch allen möchte ich danken.

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Publikationsliste

CMV-specific central memory T cells reside in bone marrow.

Letsch A ¹, Knoedler M ¹, Na IK, Kern F, Asemissen AM, Keilholz U, Loesch M, Thiel E, Volk HD, Scheibenbogen C. Eur J Immunol. 2007;37(11):3063-8.

¹These two authors contributed equally to this work.

Phase II trial of second-line bendamustine chemotherapy in relapsed small cell lung cancer patients.

Schmittel A, Knödler M, Hortig P, Schulze K, Thiel E, Keilholz U. Lung Cancer. 2007 Jan;55(1):109-13. Epub 2006 Nov 13.

Sunitinib treatment for patients with advanced clear-cell renal-cell carcinoma after progression on sorafenib.

Zimmermann K, Schmittel A, Steiner U, Asemissen AM, Knoedler M, Thiel E, Miller K, Keilholz U. Oncology. 2009;76(5):350-4. Epub 2009 Mar 24.

Association of EGFR polymorphism, skin toxicity, and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) receiving cetuximab-docetaxel treatment

Konrad Klinghammer, Maren Knödler, Alexander Schmittel, Volker Budach, Ulrich Keilholz, Inge Tinhofer. Clinical Cancer Research, 2009 submitted.

Selbständigkeitserklärung

Ich, Maren Knödler, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Phänotypische und funktionelle Charakterisierung CMV-spezifischer T-Zell-Antworten im peripheren Blut und Knochenmark“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten erstellt habe.

Berlin, den 29.09.2009

.....
Maren Knödler