

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+  
T-Zellen im peripheren Blut

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Gianna Isabel Schulz

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. C. Scheibenbogen  
2. Prof. Dr. med. G. Schönrich  
3. Prof. Dr. med. M. Zeis

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	4
1.1 Regulation von Immunantworten .....	4
1.1.1 Regulatorische T-Zellen.....	5
1.1.2 CD8+ regulatorische T-Zellen.....	7
1.2 Antivirale Immunantworten.....	10
1.2.1 Virus-spezifische regulatorische T-Zellen.....	11
1.2.2 Das Influenza-Virus .....	13
1.2.3 Das Cytomegalie-Virus .....	13
1.2.4 Das Epstein-Barr-Virus .....	14
1.3 Nachweismethoden antigen-spezifischer T-Zellen.....	15
1.3.1 Nachweis antigen-spezifischer T-Zellen über intrazelluläre Zytokinproduktion .....	16
1.4 Zielsetzung der Arbeit .....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material .....	19
2.1.1 Spender .....	19
2.1.2 Dichtegradient.....	19
2.1.3 Medien .....	19
2.1.4 Puffer .....	20
2.1.5 Peptide und Stimulanzen .....	20
2.1.6 Antikörper in der Durchflusszytometrie.....	21
2.1.7 Spezielle Reagenzien in der Durchflusszytometrie .....	21
2.1.8 Instrumente und Software.....	22
2.2 Methoden .....	22
2.2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus heparinisiertem Vollblut .....	22
2.2.2 Auftauen der Zellen .....	23
2.2.3 Zellzahlbestimmung.....	23
2.2.4 Zellkultur .....	23
2.2.5 Durchflusszytometrie .....	24
2.2.5.1 Färbung intrazellulärer Zytokine.....	24
2.2.5.2 Durchflusszytometrische Messung .....	25

2.2.6 Statistik .....	27
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
3.1 HLA-Typisierung der Spender.....	28
3.2 Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen ex vivo .....	29
3.3 Nachweis IL-10 produzierender virus-spezifischer T-Zellen nach in vitro Expansion .....	30
3.4 Korrelation IL-10 und IFN $\gamma$ produzierender T-Zellen.....	40
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>41</b>
4.1 Methoden .....	41
4.2 Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen .....	43
4.3 Expansion virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen .....	45
4.4 IL-10 produzierende CD8+ T-Zellen im Kontext.....	46
4.5 Schlussfolgerungen.....	48
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>49</b>
<b>6 Literatur .....</b>	<b>51</b>
<b>7 Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
<b>8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>62</b>
8.1 Abbildungen .....	62
8.2 Tabellen .....	63
<b>9 Lebenslauf.....</b>	<b>64</b>
<b>10 Danksagung .....</b>	<b>655</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Regulation von Immunantworten

Das Immunsystem des Menschen ist hoch entwickelt und seine schützende Funktion von größter Bedeutung. Die ineinander greifenden humoralen und zellulären Komponenten bilden in ihrer Gesamtheit ein komplexes Netz an Abwehrmechanismen. Man unterscheidet eine unspezifische und eine spezifische Immunabwehr, welche eng miteinander verknüpft sind. Die unspezifische Abwehr besteht von Geburt an und wird deshalb auch als angeborene oder natürliche Immunität bezeichnet. Zu den zellulären Repräsentanten der unspezifischen Abwehr gehören neutrophile Lymphozyten, Makrophagen und Natürliche Killerzellen. Zu der spezifischen Abwehr werden zum einen die humorale Abwehr, bestehend aus von B-Lymphozyten produzierten Antikörpern und zum anderen die zelluläre Abwehr, bestehend aus T-Lymphozyten gezählt. Die Protagonisten des zellulären Anteils haben ihren Ursprung im Knochenmark und werden auch als erworbene oder adaptive Immunität bezeichnet, da sie die Fähigkeit zur Erkennung von Pathogenen erst nach der Geburt während ihrer Reifung in verschiedenen lymphatischen Organen entwickeln. Der adaptive Teil des Immunsystems und im Speziellen die T-Zellen sorgen für eine spezifische Abwehr einer Vielzahl infektiöser Pathogene. Dies wird primär durch das riesige Repertoire an T-Zellrezeptoren ermöglicht, dessen nahezu unbegrenztes Potential zur Generation spezifischer Rezeptoren durch somatische Rekombination ein effizientes Gegengewicht zu kurzen Reproduktionszyklen und hohen Mutationsraten infektiöser Mikroorganismen bildet.

Die große Diversität birgt jedoch das Risiko einer Reaktion der T-Zellen auf körpereigene Antigene (Janeway 2002). Das erkannte schon Paul Ehrlich vor 100 Jahren und vermutete richtig, dass es Kontrollinstanzen geben muss, die dem entgegenwirken (Ehrlich 1910). Denn nicht nur die Gefahr der Autoimmunität verlangt

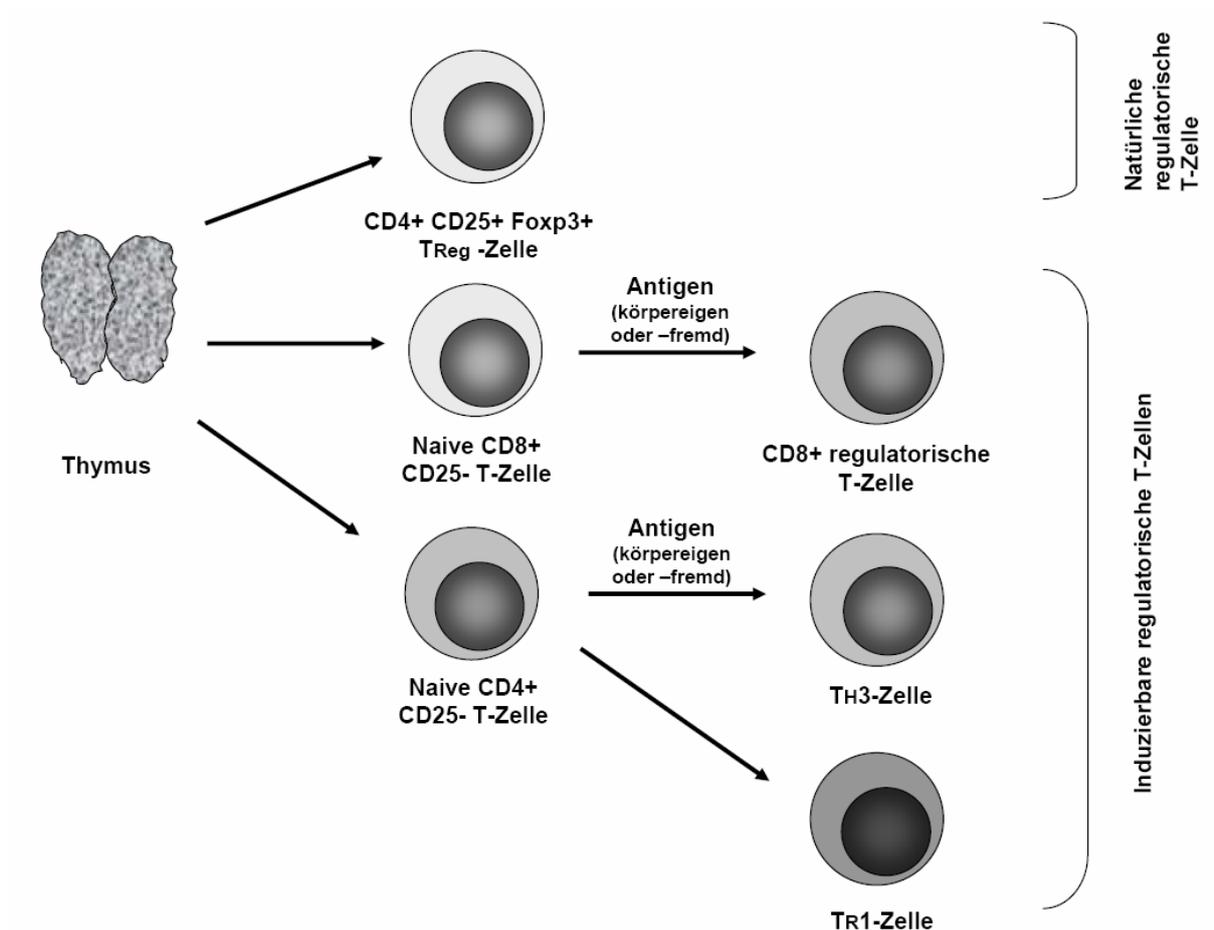
nach einer Kontrolle des Immunsystems. Auch überschießende und unangemessen andauernde Immunantworten bedürfen einer Restriktion, da die damit einhergehende Aktivierung von Killer-Zellen und die Produktion proinflammatorischer Moleküle nicht nur invadierenden Pathogenen und Tumorzellen, sondern auch gesunden Körperzellen schadet. Um einer Schädigung des Organismus vorzubeugen und einen Zustand der immunologischen Homöostase zu ermöglichen, ist eine effektive Regulation von eminenter Bedeutung (Cohn 2004). Diese wird erreicht zum einen schon durch die klonale Selektion der T-Zellen im Thymus und zum anderen die Regulation ihrer Aktivität in der Peripherie (Jiang 2006), welche mittels intrinsischer Mechanismen und durch so genannte regulatorische oder Suppressor-T-Zellen.

### **1.1.1 Regulatorische T-Zellen**

Das Konzept regulatorischer T-Zellen (Tregs) ist nicht neu. Bereits 1970 machte Gershon die Entdeckung, dass T-Zellen an der Immunantwort nicht nur verstärkend teilhaben, sondern auch einen dämpfenden Effekt haben können (Gershon 1970). Nach Transfer antigen-geprimter T-Zellen zeigten sie und andere eine Induktion von Immuntoleranz (Gershon 1970, Kilshaw 1975). Diese Fähigkeit wurde sowohl bei T-Helferzellen als auch bei zytotoxischen T-Zellen beschrieben (Green 1983). Trotz ihrer besonderen funktionellen Charakteristika teilen Tregs auch viele Eigenschaften der klassischen T-Zellen. Sie exprimieren die gleichen Oberflächenantigene, wie CD3, CD4, CD8 und funktionelle T-Zellrezeptoren, was die Unterscheidung zwischen Tregs und klassischen T-Zellen erschwert. Die daraus resultierende Erfolglosigkeit bei der Suche nach spezifischen Markern zur Identifizierung regulatorischer T-Zellen und der molekularen Grundlage der Suppression führte zu einem Abflauen des Interesses in den 1980ern. Erst mit der Etablierung neuer molekularer Techniken gewann die Forschung wieder an Aufwind. Mitte der 90er wurden die regulatorischen T-Zellen durch Shimon Sakaguchi wieder entdeckt. Er war der erste, der nachweisen konnte, dass eine kleine Population CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche CD25 koexprimieren, in Mäusen als Tregs fungieren (Sakaguchi 1995). Das Mitwirken regulatorischer T-Zellen bei der Suppression autoimmunologischer Reaktionen konnte bis heute in zahlreichen in vitro und in vivo Studien gezeigt werden (Sakaguchi 2004). Zusätzlich sind regulatorische T-

Zellen in die Kontrolle der Immunantwort auf Infektionen, Allergene und Transplantate involviert und akkumulieren im Milieu maligner Tumoren, wo sie möglicherweise die antitumorale Immunantwort regulieren (Zou 2005). Durch ihre Beteiligung an der Immunantwort auf viele oft auch lebensbedrohliche Erkrankungen wurden regulatorische T-Zellen als attraktives Ziel für therapeutische Ansätze identifiziert und das wissenschaftliche Interesse an ihnen explodierte regelrecht. Über die Jahre wurde zahlreichen Populationen an T-Zellen regulatorische Aktivität zugeschrieben.

Eingeteilt werden die Tregs in natürlich vorkommende CD4+ Tregs und induzierbare Tregs, die sowohl CD4 positiv als auch CD8 positiv sein können (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1-1: Untergruppen regulatorischer T-Zellen.** Darstellung der Entwicklung der unterschiedlichen Untergruppen; nach Mills 2004.

Jede dieser Untergruppen besitzt distinkte Rezeptoren und Effektormechanismen und jede übt ihren Einfluss in unterschiedlichen Stadien der Immunantwort aus (Zhou 2005). Natürliche CD4+ regulatorische T-Zellen sind vorwiegend während der frühen Phase der Erstantwort aktiv und wirken vermutlich auf das Ausmaß oder die Art der Immunantwort. Im Gegensatz dazu differenzieren sich die CD8+ Suppressor-T-Zellen während der primären Immunantwort zu Effektorzellen und fungieren erst bei der sekundären Antwort und der Gedächtnisphase als Regulatoren des Immunsystems (Jiang 2004).

### **1.1.2 CD8+ regulatorische T-Zellen**

Die erste T-Zellpopulation, der in den 70er Jahren regulatorische Fähigkeiten zugeschrieben wurde, gehörte zu den CD8+ T-Zellen (Green 1983, Reinherz 1980). Wie bereits erwähnt kam, es auf Grund fehlender Möglichkeiten der adäquaten molekularen Charakterisierung in den 70er Jahren zu einer Stagnation der Forschung um CD8+ T-Zellen. In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl von Untertypen beschrieben, welche allerdings häufig nur in wenigen experimentellen Modellen und nur ein oder zwei Laboratorien charakterisiert wurden (Tabelle 1.1). Eine einheitliche Charakterisierung dieser sehr heterogenen Zellgruppe, sei es über Oberflächenantigene, spezifische Zytokinprofile oder Suppressionsmechanismen, hat sich noch nicht herauskristallisiert. Grob kann man die verschiedenen Subtypen in natürlich vorkommende und induzierte oder in antigen-spezifisch und antigen-unspezifisch supprimierende Populationen unterteilen.

**Tabelle 1-1: Subpopulationen CD8+ regulatorischer T-Zellen.** Charakteristika CD8+ Subpopulationen, Art der Generierung und des von ihnen bewirkten Regulationsmechanismus. Bei den CD8+ $\alpha\alpha$  T-Zellen handelt es sich um Zellen, deren CD8-Molekül nicht wie normalerweise der Fall aus einer  $\beta$ - und einer  $\alpha$ -Kette zusammengesetzt ist, sondern aus zwei  $\alpha\alpha$ -Ketten besteht; nach Tang 2005.

Subset	Generierung	Regulationsmechanismus
<i>CD8+ CD28-</i>	Stimulation mit aktivierten APCs	Inhibition der Aktivität von APCs
<i>DC2-induziert</i>	Priming mit CD40L aktivierten DC2s	Produktion von IL-10
<i>CD8+<math>\alpha\alpha</math></i>	Spontan, im Verlauf einer Infektion	Zytotoxizität über Qa-1
<i>CD8+ CD25+</i>	Natürlich vorkommend	CTLA-4, TGF $\beta$
<i>CD8+ CD122+</i>	Natürlich vorkommend	Produktion von IL-10

Eine der ersten Populationen CD8+ regulatorischer T-Zellen wurde über ein murines Model der experimentellen autoimmunologischen Enzephalitis (EAE) identifiziert (Jiang 2004, Sarantopoulos 2004). In diesem Model erfolgte die Suppression strikt antigenspezifisch, als Reaktion auf körpereigene Peptide gebunden an MHC-Qa1 (Sarantopoulos 2004, Hu 2004). Ähnliche Zellen wurden auch im Menschen beschrieben (Li 2001). Andere Gruppen charakterisierten weitere Populationen, die autoimmunologische Reaktionen inhibieren (Tennakoon 2006, Bisikirska 2005). Unter diesen eine Population FoxP3 und CD25 exprimierender T-Zellen, die nicht beschränkt auf körpereigene Antigene agierten, sondern auch auf Fremdpathogene reagierten (Jarvis 2005).

Gilliet et al. beschrieben eine Population CD8+ T-Zellen, welche sich nach Stimulation von T-Zellen mit plasmazytoiden Dendritischen Zellen (DCs) entwickelte und die proliferative Antwort naiver CD8+ T-Zellen mittels IL-10 antigenspezifisch inhibierte. Das Hinzufügen von monoklonalen Antikörpern gegen IL-10 während der Koinkubation der DCs mit den CD8+ T-Zellen verhinderte die Entwicklung dieser IL-10 produzierenden Population (Gilliet 2002). Auch Wei et al. zeigten, dass plasmazytoide DCs IL-10 produzierende CD8+ T-Zellen induzieren können. Nach Aktivierung der

Zellen durch tumor-assoziierte Peptidantigene aus dem Ovarialkarzinom konnten sie antigen-spezifische IL-10 produzierende T-Zellen nachweisen, welche die Antwort tumorantigen-spezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen supprimierten (Wei 2005).

Eine nicht antigen-spezifische Population, die sich ebenfalls durch eine Produktion von IL-10 auszeichnete, zeigte die Gruppe um Rifa'i. Diese Untergruppe wies zudem eine hohe Expression von CD122, der  $\beta$ -Kette des IL-2 Rezeptors auf (Rifa'i 2004). Sie inhibieren die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen in vitro direkt ohne die Vermittlung von antigen-präsentierenden Zellen (APCs). Das von ihnen produzierte IL-10 scheint für die Proliferationsinhibition und Suppression der IFN $\gamma$  Produktion verantwortlich zu sein, da das Hinzufügen von Antikörpern gegen IL-10 selbige aufhob (Endharti 2005).

Die Stimulation peripheren Blutes mit SEB (Staphylokokken Enterotoxin B) führte zur Induktion CD5<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese produzieren IL-10 und TGF- $\beta$ , bewirken eine Suppression aber über Zell-Zellkontakt vermittelte Mechanismen (Mahic 2008).

Filaci et al. generierten eine weitere Untergruppe nicht antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen, welche APCs und die korrespondierenden antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen supprimieren. Diese entstanden in vitro aus CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-Zellen in der Anwesenheit von IL-10 produzierenden Makrophagen. Ein neutralisierender Antikörper gegen IL-10 hob den inhibitorischen Effekt dieser Zellen auf (Filaci 2004).

In ihren regulatorischen Eigenschaften gleichen die CD8<sup>+</sup> Tregs ihrem CD4<sup>+</sup> Gegenpart. Die durch sie ausgelöste Suppression erfolgt über Zell-Zellkontakt abhängige Mechanismen oder über die Sekretion antiinflammatorischer Zytokine, wie TGF- $\beta$  oder Interleukin-10 (IL-10) (Billerbeck 2008). IL-10 hat ein komplexes Wirkungsspektrum. Es reguliert eine Vielfalt an Funktionen hämatopoetischer Zellen, vorrangig T-Zellen und NK-Zellen, und hat dabei überwiegend antiinflammatorische Effekte (Mosmann 1989). Diese werden vor allem indirekt durch seine Wirkung auf das Makrophagen-Monozyten-System vermittelt. Sie beinhalten eine Verminderung der Expression von MHC Klasse II (Major Histocompatibility Complex II) sowie eine Inhibition der Produktion proinflammatorischer Zytokine und kostimulatorischer Moleküle, was insgesamt zu einer verminderten T-Zellaktivierung führt (Couper 2008). In dieser Arbeit wurde für die Abgrenzung regulatorischer von klassischen T-Zellen der Nachweis über die für sie spezifische Produktion von IL-10 genutzt.

Diese und andere Studien demonstrieren, dass es sich bei den CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen um eine sehr heterogene Zellpopulation handelt, die Immunantworten auf körpereigene und körperfremde Antigene über verschiedene Mechanismen inhibieren.

## 1.2 Antivirale Immunantworten

Eine Infektion mit einem Virus setzt komplexe Mechanismen zur Abwehr des Eindringlings in Gang. In vorderster Front steht dabei zunächst die unspezifische Abwehr, bestehend aus Neutrophilen, dem Komplementsystem und Natürlichen Killerzellen. Auch die Interferone, multifunktionale Proteine, die sowohl in die Abwehr von Viren als auch in die Regulation von Zellwachstum und die Regulation anderer immunologischer Prozesse involviert sind, spielen eine Rolle (Malmgaard 2004). Gelingt es einem Virus seine Zielzelle zu infizieren, tritt der adaptive Teil des Immunsystems in Form zytotoxischer T-Zellen und T-Helferzellen in Aktion. T-Helferzellen sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Sie sind in die Induktion zytotoxischer T-Zellen sowie in die Aktivierung von Makrophagen involviert und stimulieren die Proliferation und Antikörperproduktion der B-Zellen. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen zerstören hoch selektiv infizierte Zellen, die sie an spezifischen Peptiden auf der Zelloberfläche erkennen. Jede Körperzelle präsentiert Peptide aus dem Zellinneren mit Hilfe von MHC (Major Histocompatibility Complex) Klasse I Molekülen auf ihrer Oberfläche. Die MHC der Klasse I sind heterodimere Proteine, die sich ausschließlich auf kernhaltigen Zellen befinden. Nach Infektion einer Zelle mit einem Virus werden dessen Bestandteile in der Zelle prozessiert und ebenfalls mit Hilfe der MHC I Moleküle auf der Oberfläche der Zelle dargestellt. Die präsentierten Viruspeptide sind 8 - 10 Aminosäuren lang und stammen meist aus der Hülle des Virus (Bjorkman 1999). Durch ihre Präsentation wird der aktuelle Zustand jeder Zelle nach außen abgebildet und macht ihn für das Immunsystem erkennbar. CD8<sup>+</sup> T-Zellen binden über ihren T-Zellrezeptor an diese MHC-Peptid-Komplexe und erkennen so spezifisch infizierte Körperzellen. Eine erfolgreiche Aktivierung führt unter Einfluss von IL-2, eines Wachstumsfaktors, zur Proliferation und Differenzierung der T-Zellen

(Williams 2006). Nach einem reaktiven Proliferationsgipfel geht ein Großteil der Effektorzellen unter. Die verbliebenen differenzieren sich zu Memory-T-Zellen, eine Population, die während der Abwesenheit des spezifischen Pathogens unter dem Einfluss von Zytokinen im Zustand homöostatischer Proliferation gehalten wird (Kaech 2003). Bei erneuter Konfrontation mit dem Antigen benötigen die spezifischen, zytotoxischen T-Zellen keine Kostimulation mehr. Nach Erkennen der Viruspeptide bewirken sie eine Selbstzerstörung (Apoptose) der Zielzelle. Zeitgleich kommt es zur Produktion von IFN $\gamma$ , einem wichtigen Zytokin im Rahmen einer Infektbekämpfung. IFN $\gamma$  versetzt Zellen in einen „antiviralen Zustand“, indem es zellinterne Mechanismen in Gang setzt, welche in einer Behinderung der Virusreplikation resultieren. Zudem steigert es die Effizienz der Antwort des adaptiven Immunsystems durch Stimulation sowohl der Expression von MHC I und II als auch der Antigenprozessierung. Makrophagen und NK werden aktiviert und in ihrer antiviralen Aktivität gefördert (Malmgaard 2004). Da IFN $\gamma$  auch von CD8+ T-Zellen produziert wird, kann es als Marker für die Reaktivität dieser Zellen auf Viruspeptide verwendet werden (Young 1996, Bach 1997).

### **1.2.1 Virus-spezifische regulatorische T-Zellen**

Bei jeder Infektion werden zunächst Effektor-T-Zellen aktiv. Vermutlich kommt es auch zur Aktivierung entsprechender virus-spezifischer regulatorischer T-Zellen, welche im günstigsten Fall eine überschießende Reaktion des Immunsystems auf den Erreger verhindern ohne die Effektivität der Eradikation zu beeinflussen. Einige Viren schaffen es jedoch der Immunantwort des Wirts zu entgehen und eine chronische Infektion oder Persistenz herbeizuführen. Dies kann durch verschiedene Mechanismen verursacht werden, wie zum Beispiel durch die Manipulation der unspezifischen Immunantwort durch das Virus oder Einschränkungen in der virus-spezifischen T-Zellantwort. Eine effektive T-Zellantwort ist unabdingbar für eine Kontrolle der Infektion und eine vollständige Eliminierung des Virus. Zu einer nicht ausreichenden Antwort der T-Zellen kann es unter anderem durch die Wirkung regulatorischer T-Zellen kommen (Billerbeck 2008). Deren Beteiligung an der antiviralen Immunantwort wurde schon vielfach gezeigt. Das erste Mal beobachtet wurde sie bei Mäusen mit persistierender Infektion

durch das Friend-Virus (Hasenkrug 2007). Die Funktion der CD8+ T-Zellen, welche eine entscheidende Rolle bei der Elimination viraler Pathogene spielt, schlägt fehl bei chronischen Infektionen mit diesem Virus. Die Gruppe um Hasenkrug konnte nachweisen, dass Tregs in die Suppression der Antwort der CD8+ T-Zellen auf das Virus beteiligt sind (Iwashiro 2001). Die Aktivierung von Tregs im Rahmen von Immunantworten gegen Viren wurde von anderen Gruppen an weiteren Beispielen illustriert. So zeigten Haeryfar et al. die Beteiligung von Tregs bei der Reaktion auf die Infektion mit Influenza A-Viren und Vaccina-Viren in Mäusen (Haeryfar 2005). Auch beim Menschen konnten virus-spezifische Tregs nachgewiesen werden. Billerbeck et al. zeigten, dass CD8+ Tregs bei der Chronifizierung von Hepatitis C Infektionen eine Rolle spielen (Billerbeck 2007). Einmal aktiviert können Tregs die Proliferation von T-Zellen in der Umgebung unabhängig von der Spezifität der T-Zelle und des Vorhandenseins eines Pathogens hemmen. Dieses Phänomen bezeichnet man auch als „Bystander Suppression“ und wird nur durch zytokin-sezernierende Tregs ausgelöst. Aber auch eine antigen-spezifische, meist über Zell-Zellkontakt vermittelte Suppression, kann durch Tregs induziert werden (Tang 2008).

Nur wenige Informationen gibt es bisher über Unterschiede in der Aktivität regulatorischer T-Zellen während akuter und chronischer Infektionen. Obwohl es nach aktuellem Stand der Forschung deutlich ist, dass Tregs eine Rolle bei persistierenden und chronischen Infektionen spielen, sind die genauen Mechanismen auf Grund der Komplexität des Geschehens bisher unklar. Es ist zudem unklar, ob die veränderte Funktion dieser Zellen in infizierten Organismen Ursache oder Folge der persistierenden Infektion ist. Während eine Defizienz der Tregs, sei sie funktionell oder quantitativ, zu einer virus-assoziierten Schädigung körpereigenen Gewebes führen könnte, würde es im Umkehrschluss bei gesteigerter Frequenz und Aktivität der Tregs zur Suppression der antiviralen Immunantwort kommen, welche dann unter Umständen die vollständige Eliminierung des Virus verhindern würde.

Um mehr Klarheit über die Auswirkungen der Aktivität regulatorischer T-Zellen während akuter im Unterschied zu chronischen Infektionen zu gewinnen, sollen in dieser Arbeit die T-Zellantworten auf einen Erreger akut verlaufender Infektionen, das Influenza-Virus (Flu), und auf Erreger chronischer bzw. persistierender Infektionen, Cytomegalie-Virus (CMV) und Epstein-Barr-Virus (EBV), untersucht werden.

### **1.2.2 Das Influenza-Virus**

Die Influenza-Viren bilden innerhalb der Myxoviren die eigene Familie der Orthomyxoviren. Sie besitzen eine single-strand RNA bestehend aus 6 - 8 Segmenten. Influenza-Viren kommen weltweit vor und sind verantwortlich für saisonale Grippepandemien, von denen jährlich in etwa 25 - 30 % der Weltbevölkerung betroffen sind (Nguyen-Van-Tam 1997). Auf Grund der hohen Infektionsraten und der geringen Letalität der Infektion findet sich ein hoher Anteil für das Virus sensibilisierter Personen in der Bevölkerung. Daher wurde dieses Virus als besonders geeignet für die Untersuchung der T-Zellreaktion im Verlauf akuter Infektionen befunden und in dieser Arbeit verwendet.

Die Infektion mit den Influenza-Viren betrifft zunächst vor allem den oberen Respirationstrakt. Betroffen sind die Epithel in Mund-, Nase- und Rachenbereich. Es findet dann eine Ausbreitung auf die eigentlichen Zielzellen, die Flimmerepithelzellen des unteren Respirationstrakts, mit Zerstörung derselben statt (Kaufmann 2001). Bedrohlich sind meist nicht die virale Infektion mit den Influenza-Viren, sondern bakterielle Sekundärinfektionen, die besonders bei immundefizienten Patienten einen foudroyanten Verlauf haben können. Im immunkompetenten Organismus sind für die Eliminierung des Virus vor allem zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich. Sie erkennen das an MHC Klasse I gebundene Neuraminidase-Protein. Im peripheren Blut gesunder Probanden lassen sich influenza-spezifische T-Zellen anhand ihrer Produktion von INF $\gamma$  mit einer mittleren Frequenz von 0,39 % der mononukleären Zellen nachweisen (He 2003).

### **1.2.3 Das Cytomegalie-Virus**

Das Humane Cytomegalie-Virus ist ein Herpesvirus der  $\beta$ -Untergruppe, auch Humanes Herpesvirus 5 genannt (HHV5). Die Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch meist über virushaltigen Speichel und beginnt bereits im Säuglingsalter. Unter Erwachsenen findet man virus-spezifische Antikörper mit einer Prävalenz von 50 - 90 %, sodass ausreichende Zahlen reaktiver Probanden unter gesunden Blutspendern gefunden werden können (Scholz 2003, Kern 1998).

Nach der Primärinfektion, welche von virus-spezifischen CD8+ T-Zellen dominiert wird, entwickelt sich ein Latenzstadium gekennzeichnet durch ein Gleichgewicht zwischen viraler Replikation und zellulärer Immunantwort mit einer lebenslangen Persistenz des Virus im Organismus (Sester 2002, Appay 2002, Harari 2004). Als zelluläres Reservoir fungieren dabei vorwiegend Monozyten des peripheren Blutes (Scholz 2003). Die Primärinfektion verläuft beim Immunkompetenten meist inapparent (Harari 2004). Auch die sporadische Reaktivierung des CMV läuft meist symptomlos ab, da das Immunsystem das Virus effektiv kontrollieren kann. Es fällt eine ausgeprägte T-Zellantwort mit starker Reaktion auf einzelne Epitope und der Entwicklung einer großen Fraktion an CD8+ Memory-T-Zellen auf (Gillespie 2000). Crucian et al. konnten im peripheren Blut gesunder Spender IFN $\gamma$  produzierende CMV-spezifische T-Zellen mit einer Frequenz von 0,2 % der mononukleären Zellen nachweisen (Crucian 2001). Ein Verlust der immunologischen Kontrolle über das CMV wird assoziiert mit einer eingeschränkten Funktion der CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen (Reusser 1991). Es kommt zu einem CMV-Syndrom mit Fieber, Leukopenie, Hepatosplenomegalie, Myalgien und Retinitis (Hummel 2002). So kann die Infektion mit dem CMV oder die Reaktivierung des selbigen im Rahmen einer Immunsuppression durch Chemotherapie, nach Organtransplantation oder durch HIV-Infektion einen letalen Verlauf nehmen.

#### **1.2.4 Das Epstein-Barr-Virus**

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zu den  $\gamma$ -Herpesviren und wird auch als Humanes Herpesvirus 4 (HHV4) bezeichnet. Das Virus ist weltweit verbreitet, und auch in diesem Fall liegt eine hohe Prävalenz virus-spezifischer Antikörper in den Industriestaaten vor, die im Alter von 2 Jahren schon etwa 44 % beträgt. Bis zur Pubertät steigt sie auf etwa 75 % an, um dann im Erwachsenenalter 93 - 100 % zu erreichen (Miller 1990). Die Übertragung erfolgt in der Regel oral durch Speichel-Schleimhautkontakt. Während der Primärinfektion befällt und repliziert sich das Virus in B-Lymphozyten. Im Verlauf der Primärinfektion kommt es zu einer ausgeprägten T-Zellproliferation (Klenerman 2005). Es entstehen EBV-spezifische T-Zellen, welche die Ausbreitung des Virus im Organismus begrenzen (Kimura 2006). Diese lassen sich auch im peripheren Blut gesunder Probanden mit Frequenzen von 0,4 % der mononukleären Zellen nachweisen

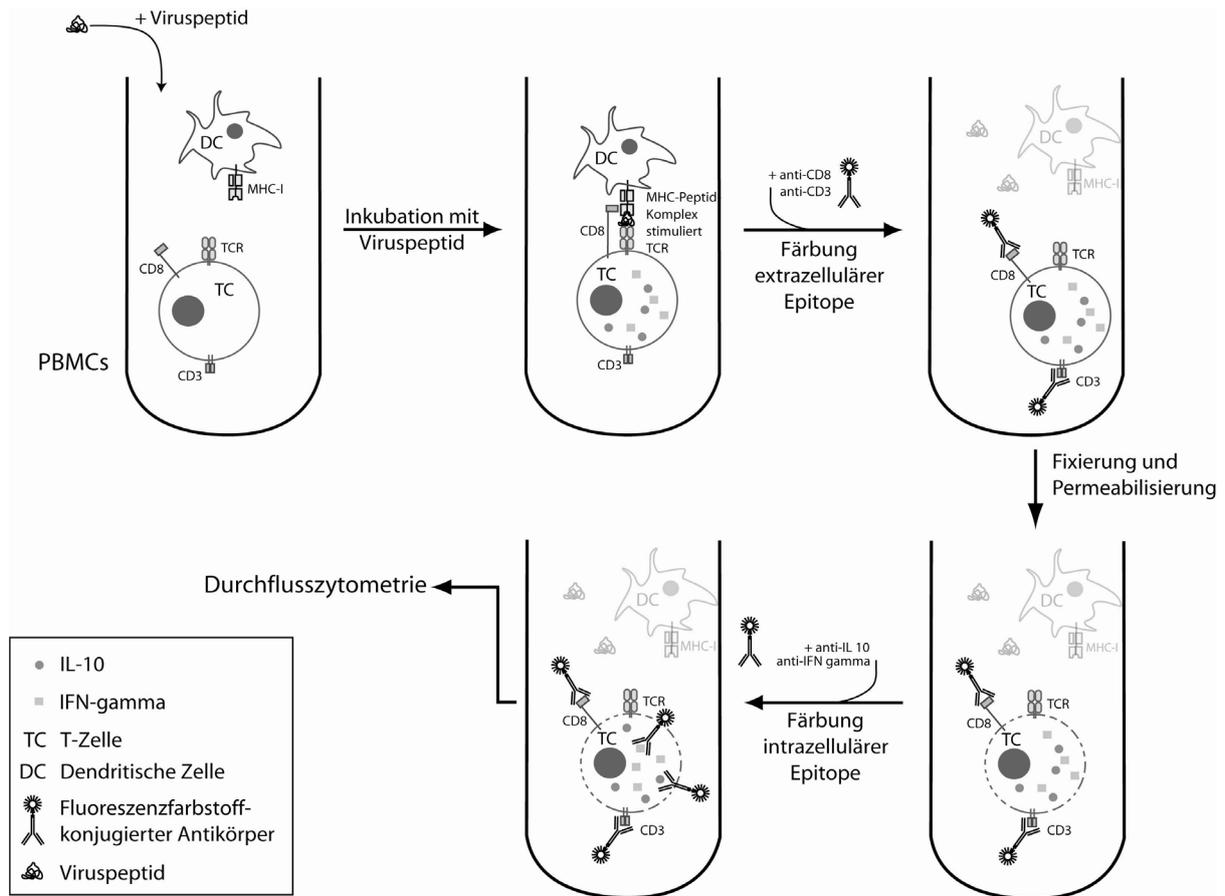
(Crucian 2001). Die Infektion mit dem EBV bleibt beim Immunkompetenten häufig asymptomatisch oder manifestiert sich als infektiöse Mononukleose, welche sich nach Entwicklung des spezifischen T-Zellklones spontan zurückbildet (Cohen 2000). In einigen Fällen kommt es jedoch zu einer chronisch aktiven Infektion charakterisiert durch chronische oder wiederkehrende mononukleoseartige Symptomatik mit Fieber, Hepatitis, Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und Panzytopenie kommen (Alfieri 1984, Scholley 1988, Kimura 2006). Im Zustand einer geschwächten Immunität kann es zu einer unkontrollierten Vermehrung des Virus mit Entstehung immortalisierter Zelllinien kommen, was die Entwicklung lymphoproliferativer Erkrankungen wie den Morbus Hodgkin und B-Zelllymphome ermöglicht (Cohen 1999).

### 1.3 Nachweismethoden antigen-spezifischer T-Zellen

Lymphozyten und damit auch T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche charakteristische Moleküle, welche als Marker zur Identifizierung dieser Zellen verwendet werden können. An viele dieser Marker binden spezifische monoklonale Antikörper (mAKs). Diese können zur Unterscheidung von verschiedenen Zellpopulationen genutzt werden. Für die Quantifizierung antigen-reaktiver T-Zellen sind Methoden nötig, die reaktive Lymphozyten mit hoher Sensitivität detektieren, da diese häufig in sehr niedrigen Frequenzen von unter  $1 / 1 \times 10^5$  vorkommen. Über die Jahre wurden immer sensitivere Methoden entwickelt, mit welchen auch ex vivo der Nachweis antigen-spezifischer T-Zellen sowie eine direkte Quantifizierung und eine phänotypische Charakterisierung der zellulären Immunantwort auf Viren möglich ist. Zu diesen gehören unter anderen auch und der Nachweis intrazellulärer Zytokine per Durchflusszytometrie.

### **1.3.1 Nachweis antigen-spezifischer T-Zellen über intrazelluläre Zytokinproduktion**

Ein funktioneller Nachweis der antigen-reaktiven T-Zellen erfolgte in dieser Arbeit durch die intrazelluläre Färbung der von ihnen produzierten Zytokine (Abbildung 1.2). Mit dieser Methode kann man auch ex vivo und ohne vorherige Expansion reaktive Zellen aus dem peripheren Blut mit Frequenz von nur  $1 / 1 \times 10^4$  -  $1 / 1 \times 10^5$  nachweisen (Suni 1998, Keilholz 2002). Ein weiterer Vorteil ist die Möglichkeit der simultanen Bestimmung von Subtypen durch zeitgleiche Färbung von charakteristischen Oberflächenmolekülen (Prussin 1997, Kern 1998). Nach Kontakt mit dem Virusantigen werden von den antigen-spezifischen Zellen Zytokine synthetisiert. Um feststellen zu können, welche Zellen das Zytokin produzieren, muss eine Freisetzung des selbigen in den extrazellulären Raum vermieden werden. Dies wird durch die Zugabe eines Sekretionshemmers wie Brefeldin A erreicht, welcher die Zytokine intrazellulär im endoplasmatischen Retikulum und im Vesikelnetz der Zelle akkumulieren lässt. Nachdem die extrazellulären Epitope zur phänotypischen Charakterisierung der T-Zellen mit den Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern gefärbt wurden, folgt eine Fixierung. Diese vernetzt die Proteine innerhalb der Zelle und in den Zellmembranen, sodass diese auch bei der Permeabilisierung in der Zelle verbleiben. Durch die Permeabilisierung können die fluoreszierenden Antikörper in die intrazellulären Kompartimente eindringen und an die entsprechenden Zytokine binden. Anschließend gelingt der Nachweis der antigen-reaktiven T-Zellen auf Einzelzellniveau durch die Durchflusszytometrie.



**Abbildung 1-2: Intrazelluläre Zytokinfärbung.** Während der Inkubation der PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) mit den Viruspeptiden werden diese den T-Zellen (TC) durch Dendritische Zellen (DC) präsentiert. Dies führt zur Aktivierung der T-Zellen und zur Produktion von IL-10 und IFN $\gamma$ . Die Sekretion der Zytokine wird durch die hier nicht dargestellte Hinzugabe von Brefeldin A inhibiert. Nach Markierung der Oberflächenmarker CD8 und CD3 mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern werden auch die intrazellulären Zytokine gefärbt.

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Zielsetzung der Arbeit war es zu klären, ob sich im peripheren Blut gesunder Spender Influenza-, CMV- und EBV-spezifische IL-10 produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen lassen. Antigen-spezifische T-Zellen sollten sowohl ex vivo als auch nach in vitro Expansion detektiert werden. Die Frequenzen virus-spezifischer IL-10

produzierender T-Zellen sollten ferner mit denen IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen verglichen werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Spender**

Für die Analyse der T-Zell-Reaktionen wurden Spender aus der Kartei gesunder Blutspender der Transfusionsmedizin am Campus Benjamin Franklin ausgewählt. Diese wurden mit Hilfe des Mikrolymphozytotoxizitäts-Testes auf ihren HLA-Typ untersucht. Von denen nach Testung HLA-A\*0201-positiven wurden 21 Spender verwendet. Ihre Reaktivität auf Influenza A MP 58-66, HCMV pp65 495-503 und EBV BMLF-1 259-267 wurde im Vorfeld mit Hilfe durchflusszytometrischer Methoden evaluiert.

#### **2.1.2 Dichtegradient**

Die Lymphozyten werden unter Verwendung von Ficoll-Hypaque-Lösung der Firma Seromed Biochrom (Berlin) mit einer Dichte von 1,077 aus dem Vollblut isoliert.

#### **2.1.3 Medien**

Zur Kultivierung der Lymphozyten wird Iscove-Medium (Seromed Biochrom) unter Zusatz von 10 % AB-Serum (Valley Biomedical Prod & SRV inc., Winchester, USA), 1 mMol L-Glutamin, 100 U / l Penicillin und 100 mg / l Streptomycin, sämtliche von Seromed Biochrom, verwendet. Im Folgenden wird dieses Medium als Kulturmedium bezeichnet.

Als Einfriermedium für die isolierten mononukleären Zellen (MNZ) dient Iscove-Medium unter Zusatz von 40 % AB Serum und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt).

#### **2.1.4 Puffer**

Der eingesetzte Puffer ist Dulbecco's phosphate buffered saline, nachfolgend PBS genannt, ohne Zusatz von Magnesium oder Kalzium (PAA, Linz, Österreich).

Bei der intrazellulären Zytokinfärbung wird als Waschpuffer PBS versetzt mit 2 % Flebogamma (Human Immunglobulin G, Baxter, München) verwendet.

#### **2.1.5 Peptide und Stimulanzen**

Alle Peptide werden in Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 5 mg / ml gelöst und mit PBS weiter auf eine Konzentration von 100 µg / ml verdünnt. In Tabelle 2.1 werden Antigen, Aminosäure (AA)-Sequenz, AA-Position und Referenzen aufgeführt. Als Stimulanzen in der Positivkontrolle dienen PMA (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und Ionomycin (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Als Negativkontrolle werden Peptide des HI-Virus (Thermo Hybaid BioSciences, Ulm, Deutschland) verwendet.

**Tabelle 2-1: Peptide und Aminosäuresequenzen.**

<b>Antigen</b>	<b>AA-Sequenz</b>	<b>Position</b>	<b>HLA-Bindungsmotiv</b>	<b>Referenz</b>
<i>Influenza</i>	GILGFVFTL	58 - 66	A2	Bendarek 1991
<i>CMV</i>	NLVPMVATV	495 - 503	A2	Appay 2002
<i>EBV</i>	GLCTLVAML	280 - 288	A2	Appay 2002
<i>HIV</i>	ILKEPVHGV	476 - 484	A2	Appay 2002

### 2.1.6 Antikörper in der Durchflusszytometrie

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

Für die Färbung extrazellulärer Epitope der Lymphozyten werden monoklonale Maus-anti-Human-Antikörper verwendet, welche mit folgenden Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind: CD3-Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP) und CD8-Allophycocyanin (APC) (Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).

Die Expression intrazellulärer Aktivitätsmarker wird ebenfalls mit fluoreszierenden Antikörpern untersucht: Anti-IFN $\gamma$ -FITC und Anti-IL-10-PE (Becton Dickinson Pharmingen, Heidelberg, Deutschland).

### 2.1.7 Spezielle Reagenzien in der Durchflusszytometrie

Als Lyse-Reagenz wurde bei der Durchflusszytometrie das von Becton Dickinson angebotene Produkt BDLyse<sup>®</sup> eingesetzt. Zum Permeabilisieren der Zellen diente FACSPerm<sup>®</sup>, ebenfalls von Becton Dickinson.

### **2.1.8 Instrumente und Software**

Die FACS-Färbung wird an dem Vier-Farben-Durchflusszytometer FACS Calibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) unter Verwendung der dazugehörigen Software Cell Quest Pro von Becton Dickinson durchgeführt.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus heparinisiertem Vollblut**

Zur Gewinnung der mononukleären Zellen wird das heparinisierte Vollblut der Spender 1 : 2 mit sterilem PBS verdünnt. 35 ml des verdünnten Vollblutes werden dann über 15 ml Ficoll Hypaque in 50 ml Falcon Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) geschichtet. Bei der Zentrifugation, 20 min bei 20 °C mit 2000 rpm ohne Bremse, sedimentieren die Erythrozyten und Granulozyten entsprechend ihrer Dichte an den Boden des Röhrchens. Die mononukleären Zellen, vor allem Lymphozyten und Monozyten, verbleiben als feine Interphase zwischen der untenliegenden Ficoll-Phase und der obenliegenden Plasma-PBS-Phase. Mit Hilfe einer Pipette wird diese Interphase vorsichtig abgenommen und im Folgenden 10 min bei 20 °C und 1400 rpm mit PBS gewaschen. Die Zellen werden dann in einer Konzentration von  $1 - 2 \times 10^7 / \text{ml}$  in Kryoröhrchen überführt und in die Einfrierbox gestellt, welche 100 % Isopropanol enthält. In diesen Einfrierboxen (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) erfolgt das Einfrieren bei - 80 °C für mindestens 24 Stunden bevor die Zellen für eine dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff mit einer Temperatur von - 196 °C überführt werden.

### 2.2.2 Auftauen der Zellen

Das Auftauen erfolgt steril. Die Zellen werden zügig mit einer Pipette mit 37 °C warmen Kulturmedium resuspendiert und dann in 20 ml des gleichen Mediums überführt. Es folgen 10 min Zentrifugation bei 20 °C und 1400 rpm. Danach werden die Zellen in einem hydrophoben 15 ml Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) in 3 ml Kulturmedium aufgenommen. Sie werden über Nacht mit losem Deckel im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert und am nächsten Tag für die entsprechenden Versuche eingesetzt.

### 2.2.3 Zellzahlbestimmung

Die Zählung der Zellen erfolgt in einer Neubauer-Kammer (Assistent, Deutschland). Ein Aliquot der Zellsuspension wird 1 : 2 mit Trypanblau (Gibco, Auckland, Neuseeland) / PBS-Lösung versetzt, welche eine Differenzierung zwischen vitalen und avitalen Zellen erlaubt, da der Farbstoff die avitalen Zellen blau färbt. Diese werden nicht mitgezählt. 10 µl Zellsuspension werden in vier Großquadranten der Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Nach folgender Formel wird die Gesamtzellzahl berechnet:

$$\begin{aligned} & \text{Gesamtzahl der Ausgangslösung} \\ & = \text{gezählte Zellzahl} \times 0,25 \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Vol} \end{aligned}$$

(Vol = Volumen der Ausgangslösung in ml).

### 2.2.4 Zellkultur

Die in den Versuchen nach 72 h Expansion eingesetzten MNZ werden in 6-Well-Platten mit 2 ml Kulturmedium pro Well bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zu der Zellsuspension wird an Tag 1 25 IE / ml IL-2 (Chiron UK) hinzugefügt. Die in den Versuchen nach 7 bzw. 10tägiger Expansion eingesetzten MNZ werden in

96-Well-Platten mit je  $2 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu$ l Kulturmedium pro Well und ebenfalls bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. An Tag 1 wird die Zellsuspension mit 50 IE / ml IL-2 und 10 ng / ml IL-7 (R&D System, Wiesbaden) versetzt und IMP 58-66 in einer Konzentration von 10  $\mu$ g / ml hinzugefügt. Der Mediumwechsel erfolgt alle zwei bis drei Tage bzw. bei Farbumschlag des dem Medium zugesetzten Indikators als Zeichen eines starken Mediumverbrauchs. Dabei wird die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches Kulturmedium unter erneutem Zusatz von IL-2 ersetzt. Vor jedem Mediumwechsel wird das Wachstum der Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Bei hoher Zelldichte erfolgt ein Aufteilen der Zellen auf weitere Wells. Der Zusatz von IL-7 erfolgt nur am Tag 1 sowie bei 10tägiger Expansion an Tag 7.

## **2.2.5 Durchflusszytometrie**

### *2.2.5.1 Färbung intrazellulärer Zytokine*

Das verwendete Protokoll zur intrazellulären Zytokinfärbung entspricht dem von Kern 1998 publizierten unter Berücksichtigung der Herstellerangaben und verwendeten Reagenzien (Kern 1998). Nach dem die MNZ aufgetaut und eine Nacht bzw. je nach Expansionsdauer auch 72 Stunden, 7 oder 10 Tage im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert wurden, wird die Zellsuspension aufgeteilt in 5 Aliquots zu je  $2 \times 10^6$  MNZ / 600  $\mu$ l Kulturmedium. Drei der Aliquots werden mit je einem der drei zu untersuchenden Viruspeptide, IMP 58-66, HCMV, EBV, in einer Konzentration von 10  $\mu$ g / ml versetzt. Eins der beiden verbleibenden Aliquots fungiert als Negativkontrolle und wird mit HIV-Peptid, ebenfalls in einer Konzentration von 10  $\mu$ g / ml, stimuliert. Das fünfte Aliquot, die Positivkontrolle, wird dafür zum einen mit PMA in einer Konzentration von 100 ng / ml und zum anderen mit Ionomycin in einer Konzentration von 1  $\mu$ g / ml versetzt. Es folgt eine zweistündige Inkubationsphase im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchtigkeit). Alle fünf Proben werden dann mit je 1400  $\mu$ l Kulturmedium auf je 2 ml aufgefüllt. Es werden 30  $\mu$ l Brefeldin A aus einer Stocklösung 500  $\mu$ g / ml (BFA, Sigma) hinzugefügt, sodass eine Endkonzentration von 7,5  $\mu$ g / ml erreicht wird. Nach weiteren sechzehn Stunden im Brutschrank wird der

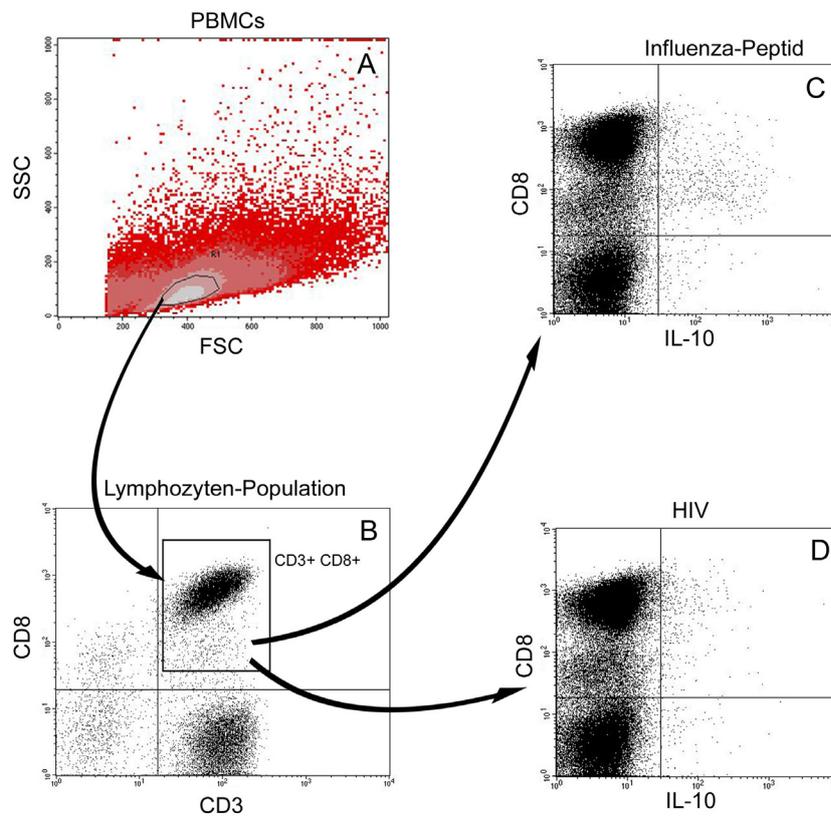
Stimulationsprozess durch zehnminütiges Waschen mit kaltem PBS plus 2 % Flebogamma bei 4 °C und 1400 rpm und anschließender zehnminütiger Inkubation mit 1 ml 1 mMol EDTA in PBS bei 37 °C gestoppt. Nach dem Stoppen werden die Zellen 10 Minuten mit kaltem PBS versetzt mit 2 % Flebogamma bei 4 °C und 1400 rpm gewaschen. Dann werden die extrazellulären Epitope mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem mAk bei fünfzehnminütiger Inkubation auf Eis und im Dunkeln gefärbt. Pro Aliquot werden 5 µl Anti-CD8-APCmAk und 10 µl Anti-CD3-PerCPmAk verwendet. Anschließend werden die MNZ durch zehnminütiges Waschen in mit PBS 1 : 10 verdünntem BDlyse<sup>®</sup>Reagenz bei 4 °C und 1400 rpm fixiert. In einer zehnminütigen Inkubationsphase mit 1 : 10 in Aqua dest verdünntem FACSPERM<sup>®</sup> bei Raumtemperatur und unter Lichtverschluss erfolgt die Permeabilisierung der Zellen. Nach einmaligem Waschen für 10 Minuten mit kaltem PBS + 2 % Flebogamma bei 4 °C und 1400 rpm werden die intrazellulären Aktivitätsmarker mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten mAks während einer dreißigminütigen Inkubationsphase im Dunkeln und auf Eis gefärbt. Es werden 20 µl Anti-IFN $\gamma$ -FITC-mAk und 20 µl Anti-IL-10-PE-mAk pro Aliquot verwendet. Die Proben werden erneut mit kaltem PBS + 2 % Flebogamma für 10 Minuten bei 4 °C und 1400 rpm gewaschen und abschließend mit je 200 µl PBS + 1 % Formalin fixiert.

#### *2.2.5.2 Durchflusszytometrische Messung*

Mit dem Durchflusszytometer werden die Proben gemessen und ausgewertet. Dazu werden die Proben sorgfältig resuspendiert und mit PBS verdünnt. Mit einer Geschwindigkeit von ca. 1800 Zellen pro Sekunde werden 250000 PBMC aus jeder Probe eingelesen. Von jedem Spender wird eine Serie von einer mit HIV-Peptid stimulierten, einer mit IMP 58-66 stimulierten, einer mit CMV stimulierten, einer mit EBV stimulierten und einer mit PMA / Ionomycin stimulierten Probe eingelesen und ausgewertet. Vor jeder zu messenden Proben-Serie wird zunächst die Einstellung der Fluoreszenzintensität der Laser am Durchflusszytometer vorgenommen. Dies erfolgt mit Hilfe der mit HIV-Peptid stimulierten Proben, da das Signal dieser Proben der Eigenfluoreszenz bzw. dem Signal unspezifisch gebundener AK entspricht. Die Intensität dieser Fluoreszenzsignale wird am Gerät auf einen Wert unter  $10^1$  eingestellt. Die Einstellung der Kompensation erfolgt während der Messung der Einzelfärbungen.

Die gewonnenen Daten werden folgendermaßen ausgewertet: die Lymphozytenregion wird im Forward-Scatter-Side-Scatter-Diagramm entsprechend der Lymphozytenpopulation definiert. Die gesuchten reaktiven Lymphozyten sind außerdem durch die Expression von CD3 und CD8 definiert. Bei der Darstellung der Lymphozyten im CD3 / CD8-Diagramm wird die doppelt-positive Population im oberen rechten Quadranten gezeigt. Die so definierten Zellen werden in einem Diagramm mit IFN $\gamma$ - bzw. IL-10-Expression gegen CD8 dargestellt, bzw. entsprechende andere Parameter, die mit der vierten Farbe gefärbt sind. Die Frequenz der reaktiven T-Lymphozyten wird als Prozentzahl der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen angegeben. Man erhält die Anzahl der Antigen-spezifischen T-Zellen indem man die Frequenz der IFN $\gamma$  produzierenden Zellen der mit HIV-Peptid stimulierten Negativkontrolle von denen mit den drei weiteren Viruspeptiden stimulierten Proben subtrahiert. Eine Antwort wurde als positiv gewertet, wenn in der stimulierten Probe mindestens doppelt so viele zytokin-sezernierende Zellen wie in der Negativkontrolle gezählt wurden und der prozentuale Wert der reaktiven T-Zellen mindestens 0,05 betrug.

In Abbildung 2.1 ist die Auswertung der T-Zellantwort anhand der durchflusszytometrischen Daten dargestellt.



**Abbildung 2-1: Beispiel für die Auswertung der T-Zellantwort mittels Durchflusszytometrie.**  
**A.** Darstellung der PBMCs im FSC-SSC-Diagramm und Definition der Lymphozytenpopulation.  
**B.** Abbildung und Auswahl der CD3+ CD8+ Lymphozyten. **C.** und **D.** Ermittlung der IL-10 positiven Population hier beispielhaft für die Reaktion nach Stimulation mit dem Influenza-Peptid.

## 2.2.6 Statistik

Die Signifikanz der Unterschiede in den virus-spezifischen T-Zellantworten nach den verschiedenen Expansionszeiten wurde mit dem Wilcoxon-Test, einem Rangreihentest für zwei abhängige Stichproben, der keine Normalverteilung voraussetzt, berechnet. Die Korrelation zwischen den Frequenzen IL-10 produzierender T-Zellen und den Frequenzen IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen wurde unter Verwendung der SPSS-Software mittels Spearman's Korrelationskoeffizienten berechnet. Alle weiteren Evaluationen in der vorliegenden Arbeit sind deskriptiv.

## 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es bei gesunden Spendern virus-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen über die Produktion von IL-10 nachzuweisen. Für den T-Zell-Nachweis wurden mononukleäre Zellen (MNCs) des peripheren Blutes *in vitro* mit Peptiden des Influenza-Virus (Influenza A MP, Flu), des Cytomegalie-Virus (HCMV pp65, CMV) und des Epstein-Barr-Virus (EBV BMLF-1, EBV) stimuliert. Die Assays wurden direkt *ex vivo*, sowie nach 3, 7 und 10 Tagen *in vitro* Expansion durchgeführt.

Der Nachweis antigen-induzierter Zytokinsynthese und die Charakterisierung spezifischer T-Zellen wurde mittels intrazellulärer Zytokindetektion von IL-10 und IFN $\gamma$  und darauf folgender Quantifizierung der antigen-spezifischen T-Zellen mittels Durchflusszytometrie geführt.

### 3.1 HLA-Typisierung der Spender

Nach Aufklärung und Einwilligung wurde das Blut der Spender mit Hilfe von FACS-Analysen HLA-typisiert. Da HLA-A\*0201 in der europäischen Bevölkerung überproportional häufig vorkommt und alle drei Viruspeptide HLA-A\*0201 bindend sind, wurden die Spender auf Expression von HLA-A\*0201 selektiert.

## 3.2 Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen ex vivo

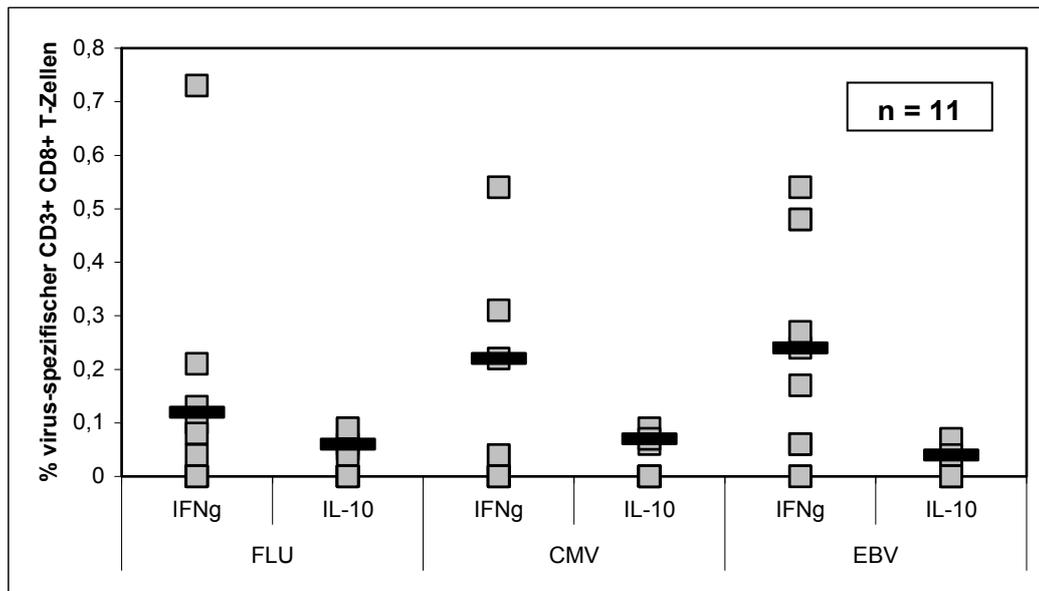
Vor der Verwendung in den Testserien wurde die Reaktivität der T-Zellen der HLA-A\*02.01 positiven Spender auf Influenza A MP, HCMV pp65 und EBV BMLF-1 mit Hilfe der Durchflusszytometrie nachgewiesen. Es wurden 18 Spender auf Grund der ermittelten großen Zahl virus-spezifischer T-Zellen für die weitere Untersuchungen ausgewählt, von denen 11 ( $n = 11$ ) für die ex vivo Assays verwandt wurden. Als Marker für die regulatorischen T-Zellen wurde die Produktion von IL-10 als Antwort auf den Kontakt mit Antigenen verwendet.

Auf das Influenza-Peptid reagierten 5 von 11 Spendern mit IL-10 Produktion und 6 mit der Produktion von IFN $\gamma$ . Die Frequenz der IL-10 produzierenden T-Zellen, abzüglich der Werte der Negativkontrolle, lagen zwischen 0,04 % und 0,09 % der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Median lag bei 0,06 % und die Standardabweichung bei 0,02 %. Die Frequenz der IFN $\gamma$  produzierenden T-Zellen war deutlich höher mit Zahlen zwischen 0,04 % und 0,73 % der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen, einem Median von 0,12 % und einer Standardabweichung von 0,26 % (Abbildung 3.1).

Als Reaktion auf das CMV-Peptid produzierten nur 3 von 11 Spendern IL-10, 5 produzierten IFN $\gamma$ . Die Frequenzen IL-10 produzierender T-Zellen der einzelnen Spender glich der Reaktion auf das Influenza-Peptid mit Werten zwischen 0,06 % und 0,09 %, einem Median von 0,07 % und einer Standardabweichung von 0,02 %. Auch die Produktion von IFN $\gamma$  wies vergleichbare Werte von 0,04 % bis 0,54 % mit einem Median von 0,22 % und einer Standardabweichung von 0,21 % der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf (Abbildung 3.1).

Auch als Reaktion auf das EBV-Peptid reagierten nur 3 von 11 Spendern mit der Produktion von IL-10, dagegen aber 9 von 11 mit einer IFN $\gamma$  Produktion. Die Frequenz der IL-10 produzierenden T-Zellen, abzüglich der Werte der Negativkontrolle, lagen zwischen 0,03 % und 0,07 % der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Der Median lag bei 0,04 % und die Standardabweichung bei 0,02 %. Für die Produktion von IFN $\gamma$  bewegen sich die Werte zwischen 0,06 % und 0,54 %, mit einem Median von 0,24 % und einer Standardabweichung von ebenfalls 0,2 % (Abbildung 3.1).

Die Ergebnisse zeigen, dass bereits ex vivo virus-spezifische IL-10 produzierende CD3+ CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden können. Bei einer Gesamtzahl von 11 Spendern ( $n = 11$ ) wurden im Mittel 4 positiv auf IL-10 getestet. Die Zahlen der IL-10 produzierenden T-Zellen als Reaktion auf die einzelnen Peptide unterschieden sich nicht signifikant.



**Abbildung 3-1: Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen ex vivo.** Gegenüberstellung der Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen von 11 Spendern ( $n = 11$ ) in % der CD8+ T-Zellen als Antwort auf die drei Viruspeptide (Influenza A MP, HCMV pp65, EBV BMLF-1) an Tag 0. Formal negative Antworten wurden gesammelt als 0 % dargestellt. Die Anzahl der Spender mit formal negativer Antwort auf das Influenza-Peptid beträgt  $n_{\text{IFN}\gamma} = 5$  und  $n_{\text{IL-10}} = 6$ ; auf das CMV-Peptid  $n_{\text{IFN}\gamma} = 6$  und  $n_{\text{IL-10}} = 8$ ; auf das EBV-Peptid  $n_{\text{IFN}\gamma} = 2$  und  $n_{\text{IL-10}} = 8$ .

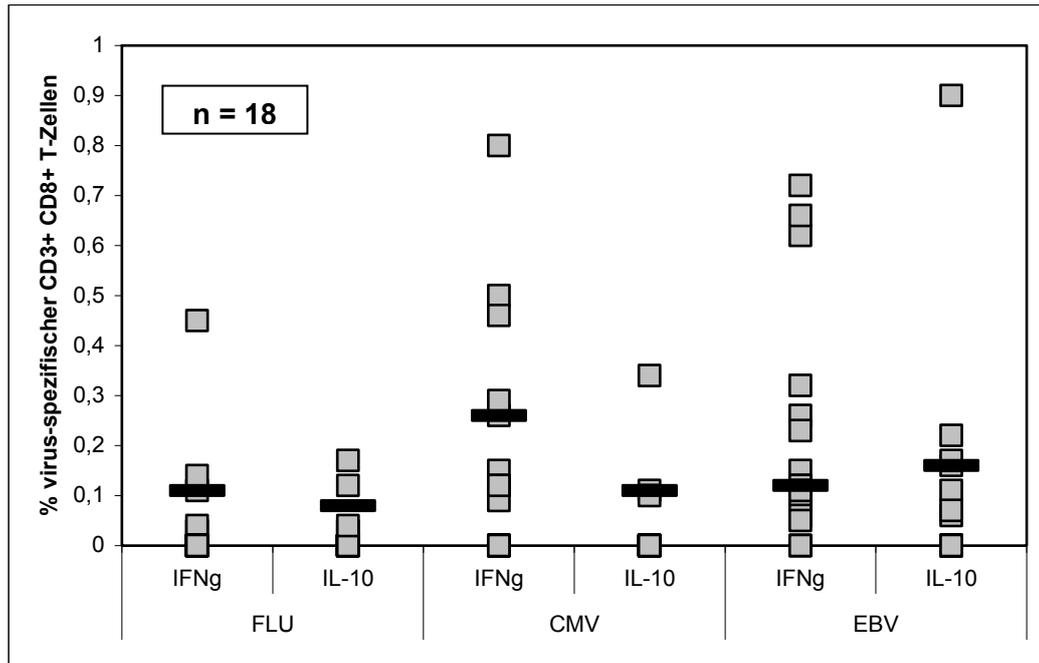
### 3.3 Nachweis IL-10 produzierender virus-spezifischer T-Zellen nach in vitro Expansion

Nach erfolgreichem Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender T-Zellen ex vivo wurde zusätzlich bestimmt, ob ein Vorexpanion zu einem sensitiveren Nachweis der Zellen führt. Die PBMCs wurden für 3, 7 und 10 Tage kultiviert und im Anschluss jeweils

über die Produktion von IL-10 und IFN $\gamma$  auf virus-spezifische T-Zellen geprüft. Die Zellen 18 Spender ( $n = 18$ ) wurden über 3 Tage expandiert. Insgesamt reagierten mehr Spender positiv als ex vivo und auch die Frequenzen reaktiver T-Zellen waren deutlich höher. So reagierten auf das Influenza-Peptid 4 von 18 Spendern mit der Produktion von IL-10. Die Werte, abzüglich der Negativkontrolle, bewegten sich zwischen 0,03 % und 0,17 % der CD3 $^+$  CD8 $^+$  T-Zellen. Der Median lag bei 0,08 % und die Standardabweichung betrug 0,07 % (Abbildung 3.2). Auch die Frequenzen IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen konnte nach Expansion sensitiver nachgewiesen werden. Bei den 5 positiv reagierenden Spendern lagen sie zwischen 0,03 % und 0,45 %, mit einem Median von 0,11 % und einer Standardabweichung von 0,17 % (Abbildung 3.2).

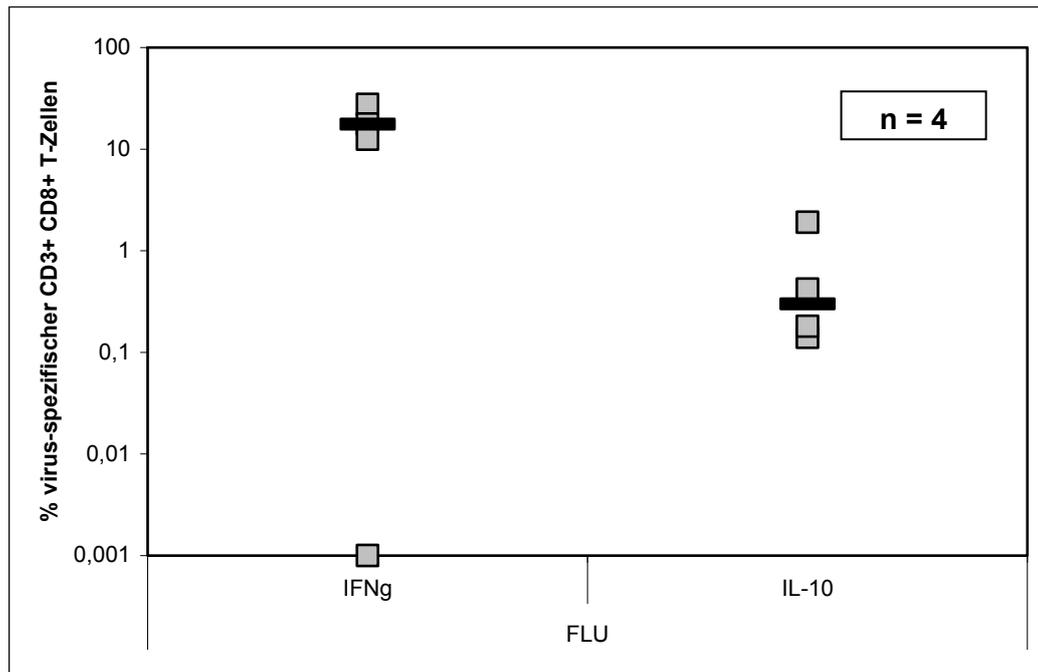
Auf das CMV-Peptid reagierten nur 3 Spender mit der Produktion von IL-10. Aber auch in diesem Fall waren die Frequenzen der IL-10 produzierenden T-Zellen mit Werten zwischen 0,1 % und 0,34 %, einem Median von 0,11 % und einer Standardabweichung von 0,14 % höher als ex vivo (Abbildung 3.2). Mit der Produktion von IFN $\gamma$  reagierten 9 von 18 Spendern mit Werten zwischen 0,09 % und 0,8 %, einem Median von 0,26 % und einer Standardabweichung von 0,24 % (Abbildung 3.2).

Besonders ausgeprägte Reaktionen konnten als Antwort auf das EBV-Peptid nachgewiesen werden. Es reagierten 7 von 18 Spendern positiv und es wurden dabei IL-10 produzierende T-Zellen mit Frequenzen von 0,06 % bis 0,9 % der CD3 $^+$  CD8 $^+$  T-Zellen (Abbildung 3.2). Der Median betrug 0,16 % und die Standardabweichung 0,30 %. Auch die Zahl der IFN $\gamma$  produzierenden T-Zellen war bei den 15 positiv reagierenden Spendern verhältnismäßig hoch mit Werten zwischen 0,05 % und 0,72 %. Der Median lag bei 0,12 % und die Standardabweichung betrug 0,23 % (Abbildung 3.2). Die Daten zeigen, dass schon eine Vorexpanktion von 3 Tagen für einen sensitiveren Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8 $^+$  T-Zellen ermöglicht.



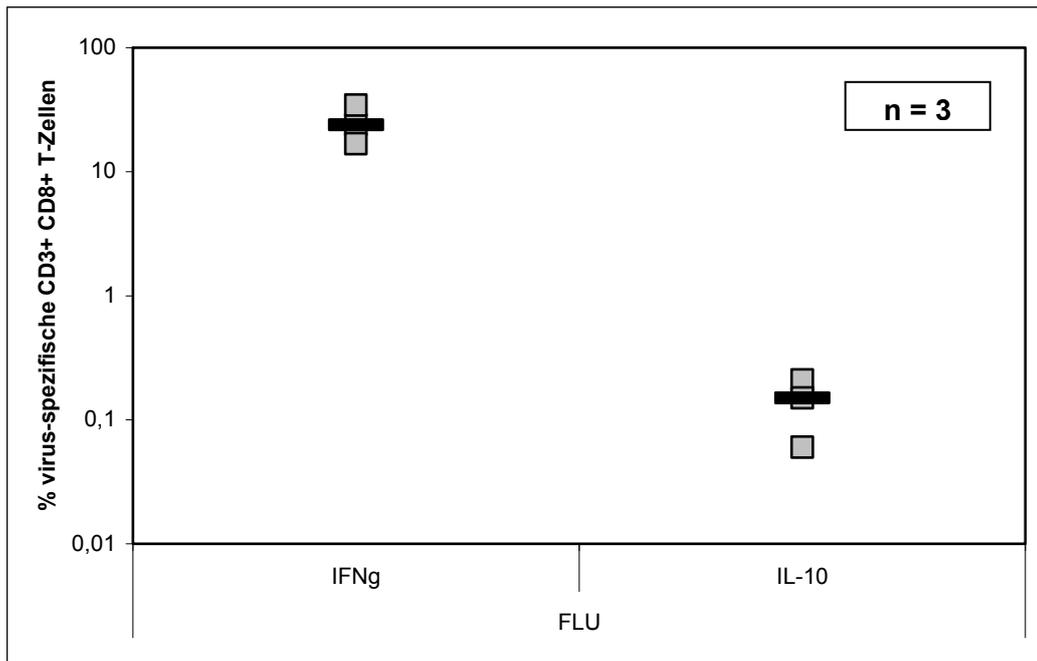
**Abbildung 3-2: Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen an Tag 3.** Gegenüberstellung der Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen von 18 Spendern ( $n = 18$ ) in % der CD8+ T-Zellen als Antwort auf die drei Viruspeptide (Influenza A MP, HCMV pp65, EBV BMLF-1) an Tag 3. Formal negative Antworten wurden gesammelt als 0 % dargestellt. Die Anzahl der Spender mit formal negativer Antwort auf das Influenza-Peptid beträgt  $n_{\text{IFN}\gamma} = 13$  und  $n_{\text{IL-10}} = 14$ ; auf das CMV-Peptid  $n_{\text{IFN}\gamma} = 9$  und  $n_{\text{IL-10}} = 15$ ; auf das EBV-Peptid  $n_{\text{IFN}\gamma} = 3$  und  $n_{\text{IL-10}} = 11$ .

Die Expansion über 7 und 10 Tage wurde nur mit dem Influenza-Peptid durchgeführt. Nach einer Expansion über 7 Tage lag die Anzahl der auf das Peptid reagierenden T-Zellen deutlich höher als ex vivo und Tag 3. Alle 4 Spender ( $n = 4$ ) zeigten eine Produktion von IL-10. Es wurden Frequenzen zwischen 0,14 % und 1,91 % der CD3+ CD8+ T-Zellen nachgewiesen (Abbildung 3.3). Der Median betrug 0,3 % und die Standardabweichung lag bei 0,84 %. Auch die Zahl der IFN $\gamma$  produzierenden Zellen hat nach 7 Tagen Expansion stark zugenommen. Es wurden Frequenzen von 12,5 % bis 27,61 % mit einem Median von 17,64 % und einer Standardabweichung von 7,68 % nachgewiesen (Abbildung 3.3).



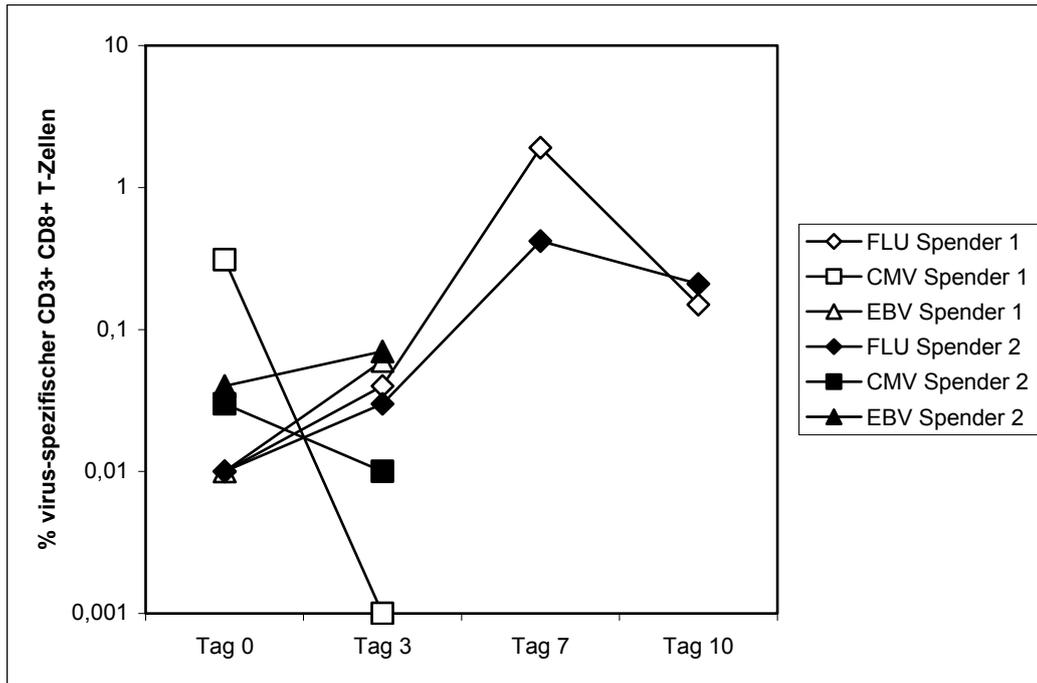
**Abbildung 3-3: Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen an Tag 7.** Gegenüberstellung der Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen von 4 Spendern ( $n = 4$ ) in % der CD8+ T-Zellen als Antwort auf das Influenza-Peptid (Influenza A MP) an Tag 7. Formal negative Antworten wurden gesammelt als 0,001 % dargestellt. Die Anzahl der Spender mit formal negativer Antwort auf das Peptid beträgt  $n_{\text{IFN}\gamma} = 1$  und  $n_{\text{IL-10}} = 0$ .

Auch nach 10 Tagen Expansion lassen sich hohe Frequenzen reaktiver T-Zellen nachweisen. Alle drei Spender ( $n = 3$ ) reagierten auf das Influenza-Peptid sowohl mit der Produktion von IL-10 als auch der von IFN $\gamma$ . Die Anzahl der IFN $\gamma$  produzierenden CD8+ Zellen konnte im Vergleich zu der nach 7 Tagen gemessenen Reaktion noch einmal auf Frequenzen zwischen 16,78 % und 34,45 % mit einem Median von 23,90 % und einer Standardabweichung von 8,89 % gesteigert werden (Abbildung 3.4). Die Zahl der IL-10 produzierenden virus-spezifischen T-Zellen hingegen nahm nach 7 Tagen ab und es konnten an Tag 10 nur noch geringere Frequenzen von 0,06 % bis 0,21 % der CD3+ CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 3.5 und 3.4). Der Median lag bei 0,15 % die Standardabweichung bei 0,08 %.



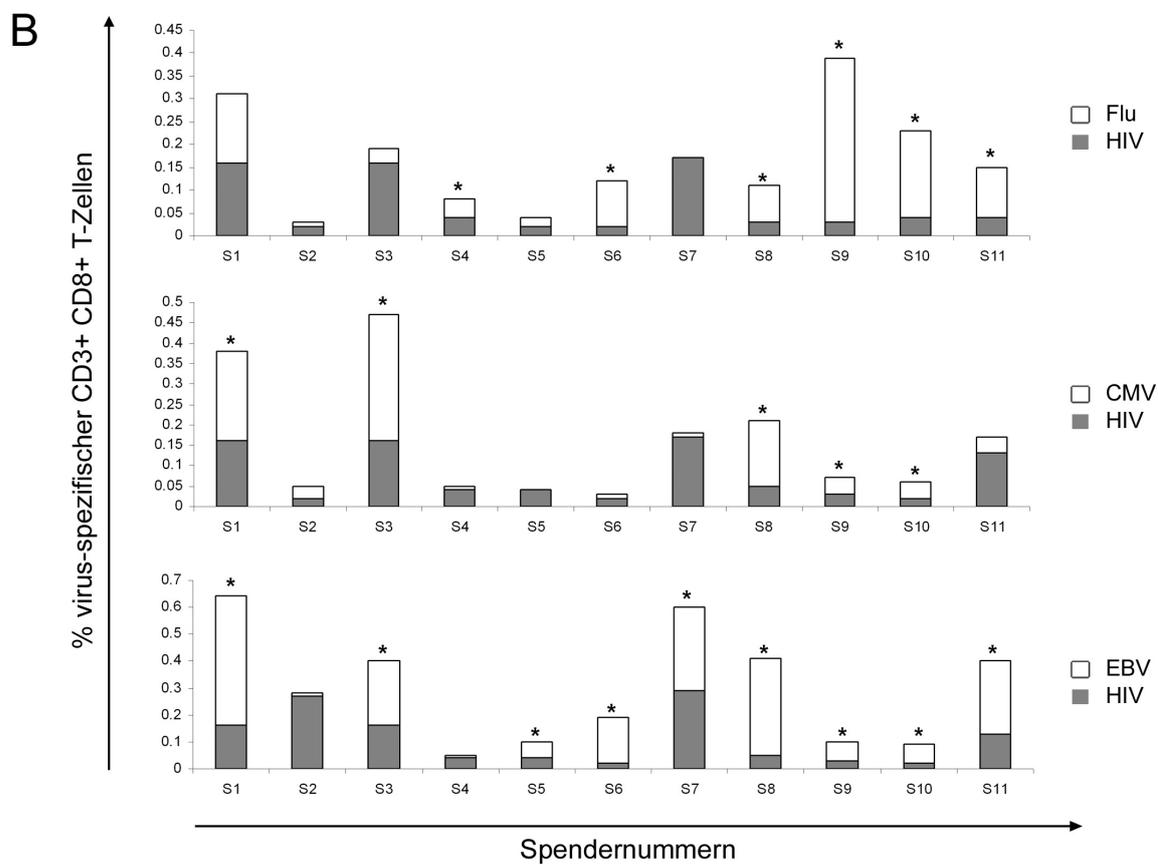
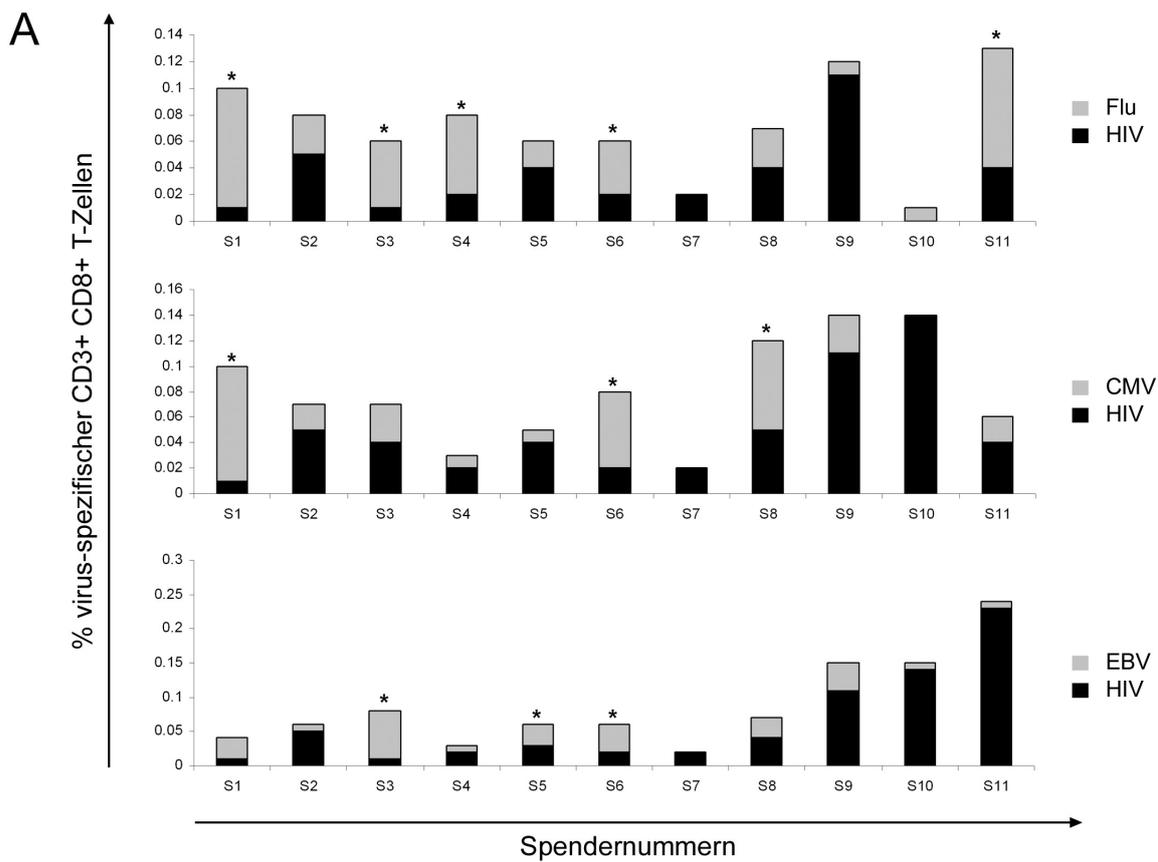
**Abbildung 3-4: Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen an Tag 10.** Gegenüberstellung der Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen von 3 Spendern ( $n = 3$ ) in % der CD8+ T-Zellen als Antwort auf das Influenza-Peptide (Influenza A MP) an Tag 10. Formal negative Antworten wurden gesammelt als 0 % dargestellt. Die Anzahl der Spender mit formal negativer Antwort auf das Peptid beträgt  $n_{\text{IFN}\gamma} = 0$  und  $n_{\text{IL-10}} = 0$ .

In Abbildung 3.5 wird die Produktion von IL-10 anhand zweier Spender im Verlauf beginnend mit dem Nachweis ex vivo bis hin zu Tag 10 exemplarisch dargestellt. Nach Stimulation mit Influenza-Peptiden ist der Anstieg der Frequenzen mit einem Höhepunkt an Tag 7 und folgendem Abfall der Werte an Tag 10 deutlich zu erkennen. Eine Ausnahme bilden hier die Frequenzen nach Stimulation mit CMV, die bei diesen beiden Spendern an Tag 3 niedrigere Werte als ex vivo aufweisen.



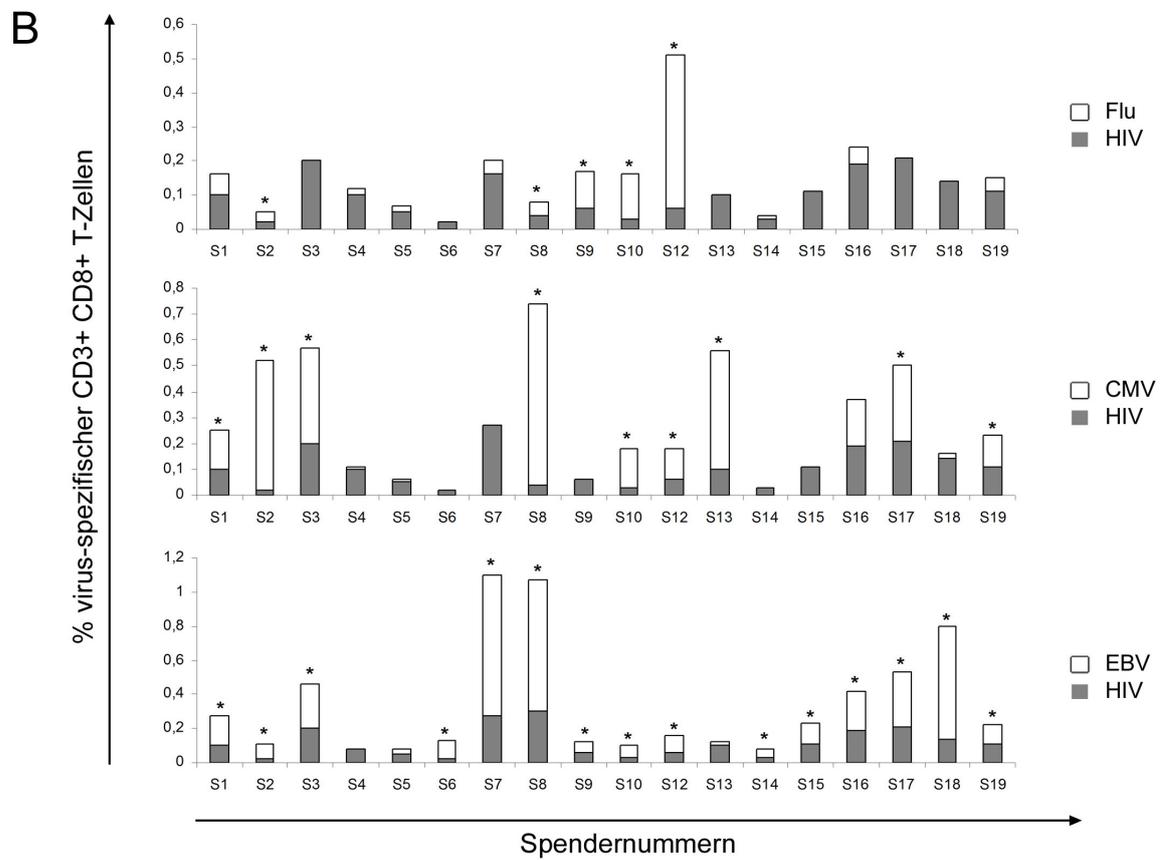
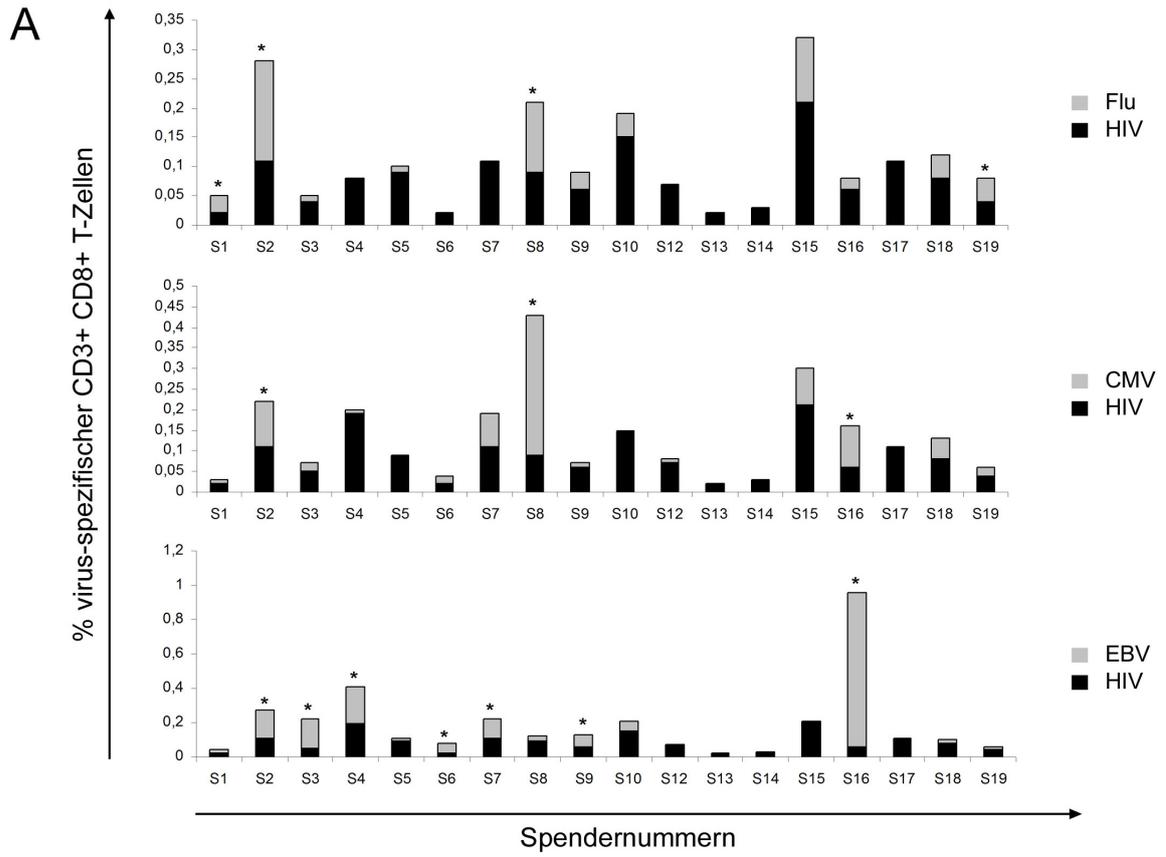
**Abbildung 3-5: Frequenzen IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen im Verlauf.** Entwicklung der nachgewiesenen Frequenzen virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen nach unterschiedlicher VorexpanSION dargestellt anhand zweier der Werte zweier Spender. Über 7 und 10 Tage wurde nur mit dem Influenza-Peptid (Influenza A MP, Flu) stimuliert. Formal negative Antworten wurden als 0,001 % dargestellt.

Die Signifikanz der Unterschiede in den virus-spezifischen T-Zellantworten nach den verschiedenen Expansionszeiten wurde mit dem Wilcoxon-Test berechnet. Ein p-Wert von kleiner als 0,05 ( $p = 0,01$ ) wurde nur beim Vergleich der Antworten nach Stimulation mit EBV ex vivo und an Tag 3 erreicht. Die Rohdaten aller Spender zu allen Zeitpunkten sind in den Abbildungen 3.6 bis 3.9 zusammengefasst.

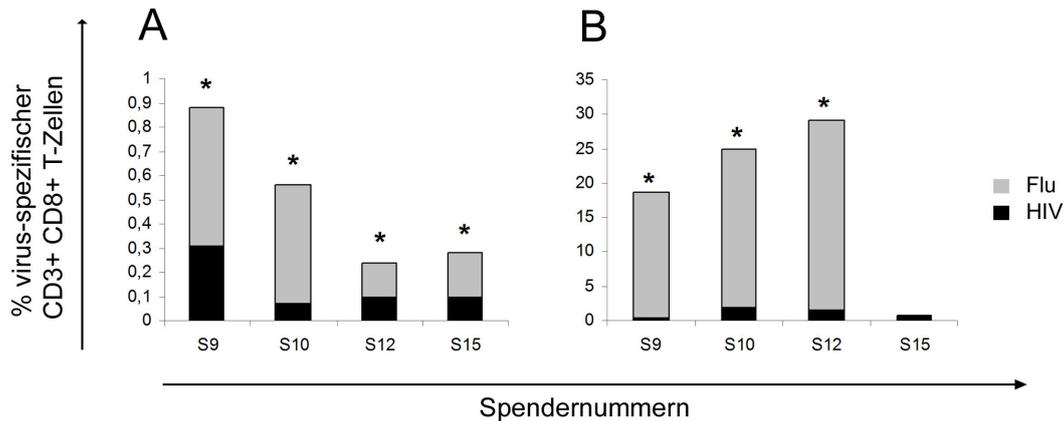


◀ **Abbildung 3-6: Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3+ CD8+ T-Zellen nach ex vivo Stimulation.** Gezeigt sind die Frequenzen **A.** IL-10 produzierender T-Zellen und **B.** IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen nach Stimulation mit dem entsprechende Viruspeptid (helle Balken) im Vergleich zur Reaktion auf die Negativkontrolle mit HIV-Peptiden (dunkle Balken). Da die Reaktion auf die Negativkontrolle in einigen Fällen gleich oder größer als die auf die anderen drei Viruspeptide ausfiel, ist der helle Balken teilweise gänzlich durch den dunklen verdeckt. Positiv Reaktionen sind mit einem Stern (\*) markiert.

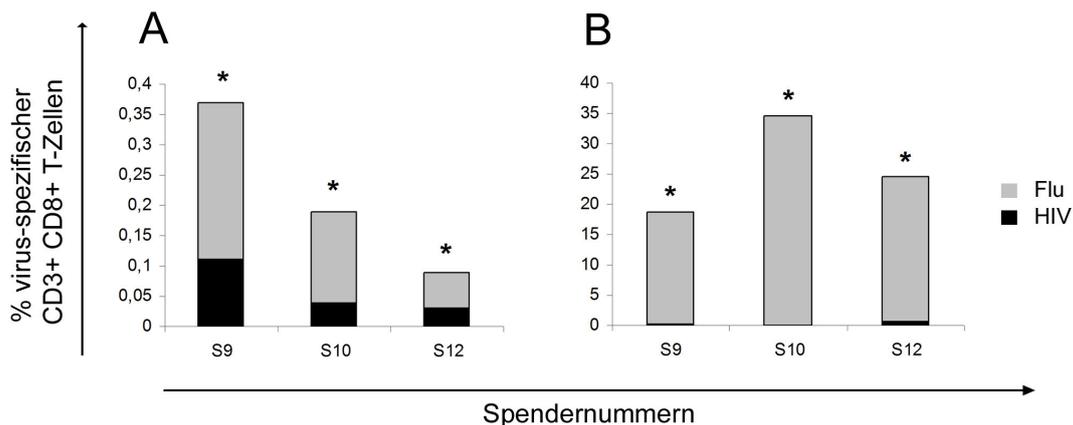
---



◀ **Abbildung 3-7: Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3+ CD8+ T-Zellen an Tag 3.** Gezeigt sind die Frequenzen **A.** IL-10 produzierender T-Zellen und **B.** IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen nach Stimulation mit dem entsprechende Viruspeptid (helle Balken) im Vergleich zur Reaktion auf die Negativkontrolle mit HIV-Peptiden (dunkle Balken). Da die Reaktion auf die Negativkontrolle in einigen Fällen gleich oder größer als die auf die anderen drei Viruspeptide ausfiel, ist der helle Balken teilweise gänzlich durch den dunklen verdeckt. Positiv Reaktionen sind mit einem Stern (\*) markiert.



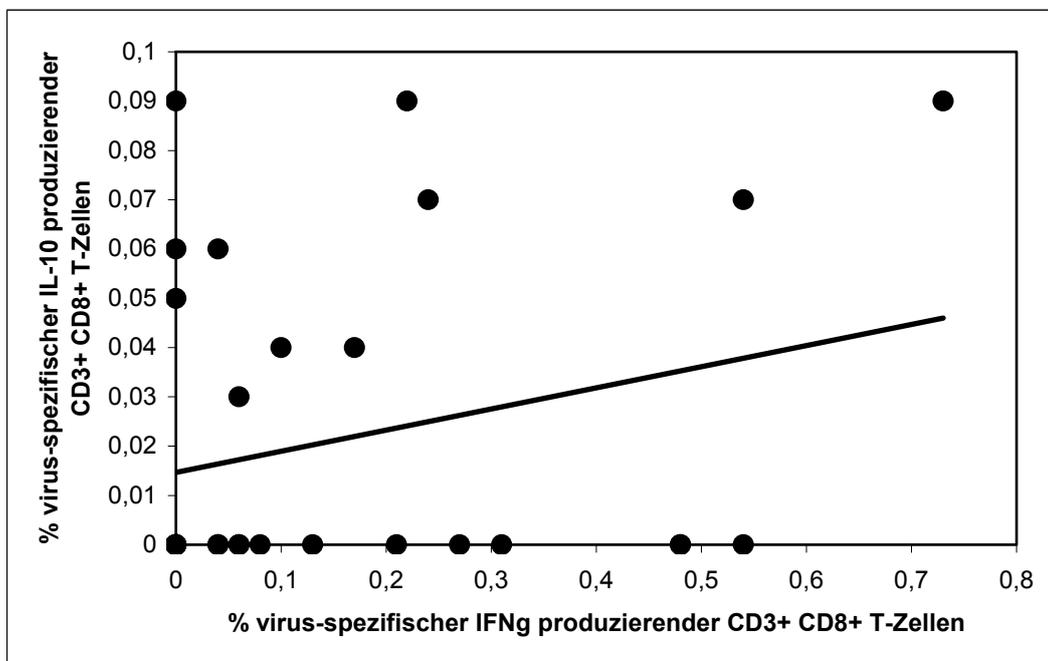
**Abbildung 3-8: Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3+ CD8+ T-Zellen an Tag 7.** Gezeigt sind die Frequenzen **A.** IL-10 produzierender T-Zellen und **B.** IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen nach Stimulation mit dem Influenza-Peptid (Flu, helle Balken) im Vergleich zur Reaktion auf die Negativkontrolle mit HIV-Peptiden (dunkle Balken). Da die Reaktion auf die Negativkontrolle in einigen Fällen gleich oder größer als die auf das Influenza-Peptide ausfiel, ist der helle Balken teilweise gänzlich durch den dunklen verdeckt. Positiv Reaktionen sind mit einem Stern (\*) markiert.



**Abbildung 3-9: Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3+ CD8+ T-Zellen an Tag 10.** Gezeigt sind die Frequenzen **A.** IL-10 produzierender T-Zellen und **B.** IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen nach Stimulation mit dem Influenza-Peptid (Flu, helle Balken) im Vergleich zur Reaktion auf die Negativkontrolle mit HIV-Peptiden (dunkle Balken). Da die Reaktion auf die Negativkontrolle in einigen Fällen gleich oder größer als die auf das Influenza-Peptide ausfiel, ist der helle Balken teilweise gänzlich durch den dunklen verdeckt. Positiv Reaktionen sind mit einem Stern (\*) markiert.

### 3.4 Korrelation IL-10 und IFN $\gamma$ produzierender T-Zellen

Die Korrelation zwischen IL-10 produzierenden und IFN $\gamma$  produzierenden T-Zellen wurde mit dem Korrelationskoeffizient nach Spearman berechnet. Die Ergebnisse korrelierten weder ex vivo (Flu:  $r = 0,281$ ; CMV:  $r = 0,048$ ; EBV:  $r = - 0,192$ ) noch an Tag 3 (Flu:  $r = 0,06$ ; CMV:  $r = 0,005$ ; EBV:  $r = 0,15$ ), Tag 7 (Flu:  $r = - 0,4$ ) oder Tag 10 (Flu:  $r = - 0,5$ ) signifikant und waren teilweise sogar gegenläufig. Dies spiegelt sich auch in Abbildung 3.10 wieder.



**Abbildung 3-10: Korrelation der Frequenzen IL-10 produzierender und IFN $\gamma$  produzierender CD8+ T-Zellen.** Verwendet wurden die Daten nach Stimulation mit den drei Viruspeptiden ex vivo und nach einer Expansion von drei Tage. Die Grade gibt den Trend der Entwicklung an.

## 4 Diskussion

Ein wichtiger Teil des Immunsystems ist die spezifische Abwehr von Pathogenen durch T-Zellen. Ihre Spezifität für ein Antigen erlaubt die gezielte und effektive Elimination des selbigen. In einigen Fällen viraler Infektionen ist die spezifische T-Zellantwort jedoch nicht ausreichend und es kommt zu einer latenten Persistenz des Virus oder einer chronisch aktiven Infektion. Ursache dafür kann unter anderem die Aktivität regulatorischer T-Zellen sein, zu deren Aktivierungs- und Funktionsmechanismen noch viele Fragen offen sind. Dies gab Anlass dazu, nach der Stimulation mit den Peptiden des Influenza-Virus, des CMV und des EBV auch die Präsenz regulatorischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen über ihre Produktion von IL-10 nachzuweisen. Die aus dem Blut gesunder Spender gewonnenen PBMCs wurden *in vitro* mit den Viruspeptiden inkubiert. Mittels intrazellulärer Zytokinfärbung und folgender durchflusszytometrischer Analyse wurden die Zellen phänotypisch charakterisiert und auf ihre Reaktion mit Produktion von IL-10 und vergleichend IFN $\gamma$  überprüft.

### 4.1 Methoden

Nach der Gewinnung der Blutproben gesunder Spender wurden aus diesen die peripheren mononukleären Blutzellen isoliert und bei - 196 °C konserviert. Zur experimentellen Verwendung der Proben wurden diese aufgetaut, mit den entsprechenden Viruspeptiden stimuliert und über variable Zeiträume hinweg expandiert. Die Antwort der Effektor-T-Zellen wurde anhand der Zytokinproduktion gemessen. Für die Detektion und Messung solcher Zytokinantworten antigenspezifischer Zellen wurde die intrazelluläre Zytokinfärbung in Kombination mit einer durchflusszytometrischen Analyse genutzt.

Die traditionell für die Analyse von Zytokinprofilen verwendeten Kulturen isolierter PBMCs stellen ein stabiles Milieu da, das gerade für die hier untersuchte kleine Zellpopulation optimale Versuchsbedingungen bietet. Sie werden nach Gewinnung durch das Gefrieren in flüssigem Stickstoff konserviert, sodass das gleiche Zellmaterial für eine Vielzahl von Assays genutzt werden kann.

Die in dieser Arbeit verwendete Methode der intrazellulären Zytokinfärbung mit anschließender Analyse per Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das sich zum Nachweis virus-spezifischer T-Zellen vielfach bewährt hat. Für funktionelle Assays wie diesen werden längere Stimulationszeiten benötigt, um die spezifische zu untersuchende Population zu amplifizieren. Bei längerer Kultivierungsdauer kann es zu vermehrtem Zelltod kommen, assoziiert mit einer Zunahme an Debris und Freisetzung von Substanzen aus lysierten Zellen, welche die T-Zellen in ihrer Funktion und Proliferationsfähigkeit einschränken. Tote Zellen können zudem unspezifisch anti-Zytokin-Antikörper binden und so die Ergebnisse verfälschen (Pala 2000). Trotz der vergleichsweise hohen Sensitivität der Methode gelingt der schwierige Nachweis kleiner Zellpopulationen daher nicht immer. Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch eine akkurate Bestimmung des Hintergrundes bei der durchflusszytometrischen Messung, um ein Untergehen kleiner Populationen in selbigem zu verhindern. Dies kann unterstützt werden durch ein gründliches Entfernen freier Antikörper und ein sorgfältiges Gating, also eine präzise Auswahl der Populationen während der Analyse am FACS-Gerät. Das Gating ist für die Minimierung der Variabilität der Ergebnisse sehr wichtig. Es ist oftmals individuellen Schwankungen unterworfen, was eine Standardisierung der Auswertung erschwert. Insgesamt erlaubt die intrazelluläre Zytokinfärbung kombiniert mit einer Mehrkanaldurchflusszytometrie eine detailreiche Analyse mit klarer Unterscheidung variabler Anzahlen phänotypischer Marker im selben Assay und auf Einzelzellniveau sowie den Nachweis der Produktion von zwei oder mehr Zytokinen in einer einzelnen Zelle. Zusammenfassend handelt es sich daher um die aktuell effizienteste Methode zur Charakterisierung von Immunfunktionen.

## 4.2 Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen

Das Ziel dieser Arbeit war die Detektion antigen-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen im peripheren Blut. Der Nachweis antigen-spezifischer T-Zellen kann durch simultane Detektion von Oberflächenmarkern und des jeweiligen Zytokinprofils erfolgen. In dieser Arbeit wurden die spezifischen T-Zellen über Oberflächenmarker CD3, CD8 und die Produktion von IL-10 sowie vergleichend IFN $\gamma$  nachgewiesen. Interferon  $\gamma$  ist ein immunregulatorisch wirkendes Zytokin. Es wird unter anderen von CD8+ Effektor-T-Zellen produziert, die durch die Stimulation mit den Viruspeptiden aus spezifischen Gedächtniszellen reifen (Halwani 2006). Der Nachweis der IFN $\gamma$  produzierenden CD8+ Zellen zeigt zum einen, dass die verwendeten Zellen in einem guten funktionellen Zustand sind und zum anderen, dass eine virus-spezifische Effektorantwort vorhanden ist, was auch das Auftreten der regulatorischen T-Zellen wahrscheinlich macht. Interleukin 10 wird von vielen Zellen sowohl myeloischen als auch lymphoiden Ursprungs und so auch verschiedenen Subsets CD4+ und CD8+ T-Zellen produziert (Moore 2001). Dabei sind antigen-präsentierende Zellen und T-Zellen sowohl Hauptproduzenten als auch wichtigste Zielstrukturen dieses Zytokins, das in vielfältiger Weise in die Funktionen hämatopoetischer Zellen eingreift und überwiegend suppressive Wirkung hat (Mosmann 1989). Antigen-spezifische T-Zellen, die nach Aktivierung eine Produktion von IL-10 aufweisen, waren in dieser Arbeit von speziellem Interesse, da diese zu den regulatorischen T-Zellen gehören (Sakaguchi 2005, Shevach 2006).

Der Nachweis dieser IL-10 produzierenden CD8+ T-Zellen war das Hauptziel dieser Arbeit. Ex vivo konnten sowohl nach Stimulation mit Peptiden des Influenza-Virus als auch mit CMV und EBV IL-10 produzierende CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen anderer Gruppen, denen der Nachweis virus-spezifischer Tregs ebenfalls gelang, wenn auch zum Teil mit anderen Versuchskonstellationen. Dhodapkar et al. injizierten zwei Versuchspersonen DCs geprimed mit Influenza-Peptiden. Sie beobachteten eine antigen-spezifische Inhibition der Effektorzellfunktion und konnten zudem IL-10 produzierende CD8+ Tregs nachweisen. Diese wurden an Tag 7 nach Immunisierung mit den DCs aus dem peripheren Blut der Versuchspersonen gewonnen und waren in der Lage, die

Effektorzellen *in vitro* zu inhibieren (Dhodapkar 2002). Auch Billerbeck et al. zeigten eine Population Influenza-spezifischer CD8<sup>+</sup> Tregs nach Peptid-Stimulation peripheren Blutes. In nicht publizierten Daten konnten sie auch EBV- und CMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen. Eine Produktion von IL-10 durch diese Tregs konnte zwar nicht gezeigt werden, aber die durch sie bewirkte Suppression von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Effektorzellen blieb nach Blockade des Interleukins aus (Billerbeck 2007). Popescu et al. untersuchten die Fähigkeit von DCs in Transplantationspatienten *in vitro* EBV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zu reaktivieren. Es gelang ihnen nicht nur dies, sondern auch die Aktivierung und Expansion EBV-spezifischer CD8<sup>+</sup> Tregs über 10 Tage. Diese produzierten jedoch sowohl IL-10 als auch IFN $\gamma$  (Popescu 2007).

Der Nachweis IFN $\gamma$  produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen gelang *ex vivo* reproduzierbar. Die Frequenzen dieser Zellen waren stets höher als die der IL-10 produzierenden Zellen und entsprachen mit 0,03 % bis 0,73 % der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen denen von anderen Gruppen gezeigten Werten (Kern 2000, Asemisen 2001, Kuzushima 1999). Interessanterweise konnten andere Gruppen zeigen, dass die regulatorischen Populationen im Verlauf einer Immunantwort parallel zu der Variation der konventionellen T-Zellen expandieren und schrumpfen (Haribhai 2007). Während die regulatorischen T-Zellen im immunologischen Ruhezustand einen sehr geringen Anteil an der Gesamtanzahl von T-Zellen einnehmen, beweisen sie *in vivo* bei Aktivierung eine erhebliche proliferative Kapazität und überschreiten teilweise sogar die Zahl der klassischen T-Zellen, was in dieser Arbeit *in vitro* nicht gezeigt werden konnte (Billerbeck 2008, Haribhai 2007).

Insgesamt kann die Existenz virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen als gesichertes wissenschaftliches Erkenntnis gelten. Ihre suppressiven Fähigkeiten wurden in dieser Arbeit jedoch nicht analysiert, sodass ihre Funktion als regulatorische T-Zellen vorerst auf den in der Literatur beschriebenen Daten anderer Gruppen basiert. Um die Bedeutung der nachgewiesenen Population IL-10 produzierender T-Zellen besser einordnen zu können, wäre es daher sinnvoll in zukünftigen Versuchsreihen neben dem Nachweis ihrer antigen-spezifischen Reaktion auch einen direkten Nachweis ihrer suppressiven Funktion zu erbringen.

### 4.3 Expansion virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen

Zusätzlich zum ex vivo Nachweis virus-spezifischer CD8+ T-Zellen wurde untersucht, ob eine Expansion dieser Zellen in vitro möglich ist und ob diese einen sensitiveren Nachweis ermöglicht. Für diese Fragestellung wurden die Zellen über 3, 7 und 10 Tage expandiert.

Eine Expansion der IL-10 produzierenden gelang in dieser Arbeit. Die Frequenzen spezifischer T-Zellen für alle drei Viren steigerten sich mit Dauer der Expansion. Dies spiegelt sich sowohl im höheren prozentualen Anteil IL-10 produzierender Zellen wieder als auch an einem höheren Anteil positiv reagierender Spender. Während sich die Anzahl reaktiver IL-10 produzierender Zellen ex vivo und an Tag 3 nur wenig unterschied, fand sich an Tag 7 ein Maximum. An Tag 10 sanken die Zahlen wieder. Der prozentuale Anteil IFN $\gamma$  produzierender Zellen war auch nach unterschiedlicher Expansionsdauer stets höher als der IL-10 produzierender Zellen. Sie zeigten an Tag 7 eine deutliche Proliferation, die ihr Maximum jedoch erst an Tag 10 erreichte. Der beschriebene Verlauf entspricht den Erwartungen, da aktivierte Lymphozyten im Allgemeinen innerhalb von 24 Stunden zwei bis vier Zellteilungen durchlaufen. So macht eine Expansion einen sensitiveren Nachweis möglich. Die Anzahl spezifischer T-Zellen an Tag 10 entspricht dann zwar nicht der realen Zahl dieser Zellen im peripheren Blut, aber die gemessenen Frequenzen korrelieren mit der Anzahl der initial vorhandenen Zellen. Ähnliche Ergebnisse sowohl für das Verhältnis von IFN $\gamma$  produzierenden und IL-10 produzierenden Zellen als auch für die Verlaufskinetik zeigten auch Godoy-Ramirez et al. (Godoy-Ramirez 2004). Das Absinken der Zahl IL-10 produzierender T-Zellen an Tag 10 kommt vermutlich durch ein vermehrtes Zellsterben in der sensiblen Population IL-10 produzierender regulatorischer T-Zellen nach Tag 7 zustande. In weiterführenden Experimenten könnte mit Hilfe zum Beispiel von CFSE-labeling (Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester) eine präzisere Aussage über das Ausmaß der Proliferation und der Apoptose von Zellen gemacht werden. Trotz dieser eindeutigen Ergebnisse ist die Aussagekraft eingeschränkt, da in in dieser Arbeit in den Expansionsversuchen nur eine sehr begrenzte Anzahl von Spenderproben verwendet wurde. Um eine valide Aussage treffen zu können, müssten weitere Versuchsreihen mit einer größeren Spenderzahl durchgeführt werden.

#### 4.4 IL-10 produzierende CD8+ T-Zellen im Kontext

Die immunologischen Szenarien, in denen regulatorische T-Zellen eine Rolle spielen, sind vielfältig. Grundsätzlich sind sie zuständig für die Aufrechterhaltung der immunologischen Homöostase des Organismus, indem sie überschießende Reaktionen des Immunsystems verhindern. Auch im Rahmen viraler Infektionen kontrollieren sie das Ausmaß der antiviralen Immunantwort und limitieren so den durch inflammatorische Prozesse entstehenden Gewebeschaden (Aandahl 2008). Die durch Tregs verursachte Limitation der antiviralen Immunantwort birgt jedoch die Gefahr einer unvollständigen Elimination des Pathogens, wodurch es zur Chronifizierung und zur Persistenz viraler Infektionen kommen kann.

Ausgehend von der Annahme, dass auch die IL-10 produzierenden regulatorischen T-Zellen an der Chronifizierung viraler Infektionen beteiligt sind, kann ein Unterschied in der Anzahl regulatorischer T-Zellen je nach Virus vermutet werden. Hypothetisch müssten sich für akut verlaufende Infektionen, wie der Infektion mit Influenza-Viren, endend in einer vollständigen Ausheilung weniger spezifische Tregs nachweisen lassen als für chronische verlaufende Infektionen, wie sie durch das EBV und das CMV verursacht werden. Diese Hypothese konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Ergebnisse nach Stimulation mit dem Influenza-Virus und die nach Stimulation mit dem EBV und dem CMV unterschieden sich nicht signifikant.

Trotz allem kann die Beteiligung IL-10 produzierender CD8+ Tregs am immunologischen Geschehen einhergehend mit chronischen Infektionen nicht von der Hand gewiesen werden. Sie ist in der Literatur vielfach beschrieben. Klassisches Beispiel einer chronischen Infektion ist die HIV-Infektion. Aus dem Blut HIV positiver Spender können nach HIV-spezifischer Stimulation IL-10 produzierende CD8+ Tregs isoliert werden (Elrefaei 2006). Die Zahl dieser Zellen steigt mit Fortschreiten der Erkrankung und ist assoziiert mit einer verminderten Zytolyseaktivität der Effektor-T-Zellen desselben Patienten. Der zu Grunde liegende molekulare Mechanismus dieser Suppression ist noch nicht vollständig geklärt, scheint aber auf Zell-Zell-Kontakt abhängiger Interaktion zu basieren (Elrefaei 2006, Elrefaei 2007).

Ein weiterer Fall einer chronischen Infektion, in deren Zusammenhang schon mehrfach IL-10 produzierende CD8+ Tregs beschrieben wurden, ist die Infektion mit dem

Hepatitis C-Virus (HCV). Bei Patienten mit chronischer Infektion durch das HCV konnten diese sowohl im peripheren Blut als auch in der Leber nachgewiesen werden (Billerbeck 2007). Während eine akute Infektion durch das HCV mit einer lebhaften virus-spezifischen T-Zell-Antwort einhergeht, zeichnet sich eine persistierende HCV-Infektion durch eine verminderte und dysfunktionelle HCV-spezifische T-Zellantwort aus (Billerbeck 2008). Abel et al. konnten intrahepatische HCV-spezifische IL-10 positive CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor allem in Gebieten milder Fibrose und unspezifischer Inflammation nachweisen. Besonders hohe Frequenzen dieser Zellen fanden sie bei Patienten mit niedriger Aktivität der chronischen Entzündung. Sie scheinen vor einer schweren nekrotischen Hepatitis zu schützen (Abel 2006). Accapezzato et al. zeigten ebenfalls intrahepatisch eine Population IL-10 produzierender CD8<sup>+</sup> Tregs, welche die Aktivität zytotoxischer Effektorzellen spezifisch für das gleiche HCV-Peptid inhibieren. Die Bedeutung des IL-10 für den suppressiven Effekt verdeutlichten sie durch die Zugabe von Antikörper gegen IL-10, welche die Suppression reduzierten. Die Inhibition HCV-spezifischer T-Zellantworten durch Tregs wirkt also zum einen protektiv, indem sie das Ausmaß der immunologischen Antwort und damit den resultierenden Leberzellschaden beschränkt. Zum anderen begünstigt sie die Persistenz des Virus und damit die Entstehung einer chronischen Hepatitis (Accapezzato 2004).

Die erfolgreiche Detektion virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8<sup>+</sup> regulatorischer T-Zellen überschneidet sich mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Fraglich ist jedoch, ob es sich in den unterschiedlichen Studien jeweils um die gleiche Population an Tregs handelt. Zudem fehlen aktuell immer noch charakteristische Marker, die eine eindeutige Identifizierung der Populationen ermöglichen. Auch IL-10 ist kein spezifischer Marker für eine bestimmte Untergruppe. Unklar ist außerdem, ob die regulatorischen Effekte der Zellen tatsächlich durch IL-10 bewirkt werden oder ob nicht vielmehr andere Mechanismen, wie zum Beispiel Zellkontakt abhängige Regulation, eine wichtigere Rolle spielen. So bleiben trotz des immensen Wissenszuwachses seit der Entdeckung der regulatorischen T-Zellen viele wichtige Fragen, von der genauen Charakterisierung der regulatorischen CD8<sup>+</sup> Subpopulationen bis zu den konkreten Mechanismen der Suppression, weiter unbeantwortet.

## 4.5 Schlussfolgerungen

Der Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in dieser Arbeit gelungen. Spezifische T-Zellen für das Influenza-Virus, das CMV und das EBV waren im peripheren Blut gesunder Spender vorhanden und ließen sich in vitro aktivieren. Auch eine Expansion der virus-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen war erfolgreich und ermöglichte einen sensitiveren Nachweis, da auch in vitro offensichtlich als Reaktion auf einen viralen Stimulus eine Proliferation der Zellen stattfindet. Unterschiede in der Anzahl reagierender Tregs auf das akute Infektionen verursachende Influenza-Virus und die chronische verlaufende Infektionen verursachenden CMV und EBV konnten nicht gezeigt werden. Der Nachweis suppressiver Fähigkeiten der IL-10 produzierenden Population wurde in dieser Arbeit nicht geführt und bietet Grundlage für zukünftige Studien dieser T-Zellen, deren Bedeutung für das immunologische Gleichgewicht essentiell ist, deren Phänotypen und Funktionsmechanismen bis heute aber nicht vollständig geklärt sind.

## 5 Zusammenfassung

Die Infektion von Zellen mit einem Virus führt zu einer Effektor-T-Zellantwort, welche die Viren meist rasch und effektiv eliminiert. Diese T-Zellantwort unterliegt der Kontrolle durch regulatorische T-Zellen, die in einer Vielzahl von Szenarien wie chronischen Infektionen, Autoimmunerkrankungen, Immunreaktionen auf Tumoren und Transplantate eine Rolle spielen und die in den vergangenen Jahren besonderes Interesse auf sich zogen. Ziel dieser Arbeit war es zu klären, ob es im Rahmen der Immunantwort gegen das Influenza-Virus, gegen CMV und EBV neben der Aktivierung virus-spezifischer Effektor-T-Zellen auch zur Induktion virus-spezifischer IL-10 produzierender regulatorischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen kommt. T-Zellen aus dem peripheren Blut gesunder HLA-A2.1 positiver Spender wurde zunächst ex vivo mittels durchflusszytometrischer intrazellulärer Zytokinfärbung auf virus-spezifische T-Zellantworten untersucht. Zusätzlich wurde getestet, ob über 3, 7 und 10 Tage eine Expansion und damit einhergehende Sensitivierung des Nachweisverfahrens möglich ist.

Ex vivo ließen sich virus-spezifische IL-10 produzierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation auf alle drei Viruspeptide nachweisen. 5 von 11 Spendern reagierten positiv auf das Influenza-Virus und je 3 auf das CMV und das EBV, wobei die Frequenzen virus-spezifischer T-Zellen zwischen 0,04 % und 0,09 % (Flu), 0,06 % und 0,09 % und 0,03 % und 0,07 % (EBV) der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen lagen. Nach Expansion der Zellen stieg die Frequenz IL-10 produzierender T-Zellen auf Maximalwerte von 1,91 % an Tag 7 an. Auch virus-spezifische Effektor-T-Zellen ließen sich über ihre Produktion von IFN $\gamma$  reproduzierbar nachweisen. Ihre Zahlen lagen im Mittel stets höher als die der IL-10 produzierenden Zellen und stiegen auch noch an Tag 10 auf Werte von bis zu 34,45 % der CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Es fand sich keine Korrelation der Frequenzen virus-spezifischer IL-10 und IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen. Die Reaktionen auf die drei Viren, das Influenza-Virus als Repräsentant einer akuten Virus Infektion und CMV und EBV als Stellvertreter für chronisch verlaufende Infektionen, unterschieden sich entgegen den Vermutungen nicht wesentlich.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sich im peripheren Blut gesunder Spender virus-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen lassen. Dabei kann durch die

Bestimmung des Zytokinprofils reaktiver Zellen zwischen Effektorzellen und vermutlich regulatorischen IL-10 produzierenden Zellen unterschieden werden. Auch eine Expansion beider Populationen für einen sensitiveren Nachweis ist gelungen.

## 6 Literatur

Accapezzato, D., Francavilla, V., Paroli, M. et al. Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8<sup>+</sup> T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* 2004;113:963-972.

Alfieri, C., Ghibu, F., Joncas, J.H. Lytic, nontransforming Epstein-Barr virus (EBV) from a patient with chronic active EBV infection. *Can Med Assoc J* 1984;131:1249-1252.

Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M. et al. Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379-385.

Asemissen, A.M., Nagorsen, D., Keilholz, U. et al. Flow cytometric determination of intracellular or secreted IFN $\gamma$  for the quantification of antigen reactive T cells. *J Immunol Meth* 2001;251:101-108.

Bach, E.A., Aguet, M., Schreiber, R.D. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Ann Rev immunol* 1997;15:563-591.

Bednarek, M.A., Suma, S.Y., Gammon, M.C. et al. The minimum peptide epitope from the influenza matrix protein. *J Immunol* 1991;147:4047-4053.

Billerbeck, E., Blum, H.E., Thimme, R. Parallel expansion of human virus-specific FoxP3<sup>-</sup> effector memory and *de novo*-generated FoxP3<sup>+</sup> regulatory CD8<sup>+</sup> T cells upon antigen recognition in vitro. *J Immunol* 2007;179:1039-1048.

Billerbeck, E., Thimme, R. CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in persistent human viral infections. *Human Immunol* 2008;69:771-775.

- Bisikirska, B., Colgan, J., Luban, J. TCR stimulation with modified anti-CD3 mAb expands CD8<sup>+</sup> T cell population and induces CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs. *J Clin Invest* 2005;115:2904-2913.
- Bjorkman, P.J., Parham, P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 1999;59:253-288.
- Cohen, J.I. The biology of Epstein-Barr virus: lessons learned from the virus and the host. *Curr Opin Immunol* 1999;11:365-370.
- Cohen, J.I. Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 2000;343:481-492.
- Cohn, M. Whither T-suppressors: if they didn't exist would we have to invent them? *Cell Immunol* 2004;227:81-92.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 2008;180:5771-5777.
- Crucian, B.E., Stowe, R.P., Pierson, D.L., Sams, C.S. Routine detection of Epstein-Barr virus specific T-cells in the peripheral blood by flow cytometry. *J Immunol Meth* 2001;247:35-47.
- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M. Antigen-bearing immature dendritic cells induce peptide-specific CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in vivo in humans. *Blood* 2002;100:174-177.
- Ehrlich, P. *Collected Studies on Immunity*. 1910, J. Wiley & Sons, New York.
- Elrefaei, M., Barugahare, B., Ssali, F., Mugenyi, P., Cao, H. HIV-specific IL-10-positive CD8<sup>+</sup> T cells are increased in advanced disease and are associated with decreased HIV-specific cytotoxicity. *J Immunol* 2006;176:1274-1280.

- Elrefaei, M., Ventura, F.L., Baker, C.A., Clark, R., Bangsberg, D.R., Cao, H. HIV-specific IL-10-positive CD8<sup>+</sup> T cells suppress cytolysis and IL-2 production by CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2007;178:3265-3271.
- Endharti, A.T., Rifa'i, M., Shi, Z. et al. Cutting edge: CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> regulatory T cells produce IL-10 to suppress IFN-g production and proliferation of CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* 2005;175:7093-7097.
- Filaci, G., Fravega, M., Negrini, S. et al. Nonantigen specific CD8<sup>+</sup> T suppressor lymphocytes originate from CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Human Immunol* 2004;65:142-156.
- Gershon, R.K., Kondo, K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunol* 1970;18:723-737.
- Gillespie, G.M., Wills, M.R., Appay, V. et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8<sup>+</sup> lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 2000;74:8140-8150.
- Gilliet, M., Liu, Y.-J. Generation of CD8<sup>+</sup> T regulatory cells by CD40 ligand activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 2002;195:695-704.
- Godoy-Ramires, K., Franck, K., MahdaviFar, S., Andersson, L., Gaines, H. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J Immunol Meth* 2004;292:1-15.
- Green, D.R., Flood, P.M., Gershon, R.K. Immunoregulatory T-cell pathways. *Annu Rev Immunol* 1983;1:439-463.
- Haeryfar, S.M., DiPaolo, R.J., Tschärke, D.C., Bennis, J.R., Yewdell, J.W. Regulatory T cells suppress CD8<sup>+</sup> T cell responses induced by direct priming and cross-priming and moderate immunodominance disparities. *J Immunol* 2005;174:3344-3351.

- Halwani, R., Doroudchi, M., Yassine-Diab, B. et al. Generation and maintenance of human memory cells during viral infection. *Springer Semin Immun* 2006;28:197-208.
- Harari, A., Zimmerli, S.C., Pantaleo, G. Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses. *Human Immunol* 2004;65:500-506.
- Haribhai, D., Lin, W., Relland, L.M. Regulatory T cells dynamically control the primary immune response to foreign antigen. *J Immunol* 2007;178:2961-2972.
- Hasenkrug, K.J., Dittmer, U. Immune control and prevention of chronic Friend retrovirus infection. *Front Biosci* 2007;12:1544-1551.
- He, X.-S., Mahmood, K., Maecker, H.T. et al. Analysis of the frequencies and of the memory T cell phenotype of human CD8<sup>+</sup> T cells specific for Influenza A viruses. *J Inf Dis* 2003;187:1075-1084.
- Hu, D., Ikizawa, K., Lu, L. Analysis of regulatory CD8<sup>+</sup> T cells in Qa-1-deficient mice. *Nat Immunol* 2004;5:516-523.
- Hummel, M., Abecassisa, M.M. A model for reactivation of CMV from latency. *J Clin Virol* 2002;25(Suppl 2):123.
- Iwashiro, M., Peterson, K., Messer, R.J., Stromnes, I.M., Hasenkrug, K.J. CD4<sup>+</sup> T cells and gamma interferon in the long-term control of persistent Friend retrovirus infection. *J Virol* 2001;75:52-60.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. *Immunologie*. 5. Aufl., 2002, Spektrum Akad. Verl., Heidelberg Berlin.
- Jarvis, L.B., Matyszak, M.K., Duggleby, R.C. Autoreactive human peripheral blood CD8<sup>+</sup> T cells with a regulatory phenotype and function. *Eur J Immunol* 2005;35:2896-2908.

- Jiang, H., Chess, L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 2004;114:1198-1208.
- Jiang, H., Chess, L. Regulation of immune responses by t cells. *N Engl J Med* 2006;16:1166-1176.
- Kaech, S.M., Tan, J.T., Wherry, E.J., Konieczny, B.T., Surh, C.D., Ahmed, R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8+ T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 2003;4:1191-1198.
- Kaufmann, A., Salentin, R., Meyer, R.G. Defense against influenza A virus infection: Essential role of the chemokine system. *Immunobiol* 2001;204:603-613.
- Keilholz, U., Weber, J., Finke, J.H. et al. Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy. *J Immunother* 2002;25:97-138.
- Kern, F., Faulhaber, N., Frömmel, C. et al. Analysis of CD8+ T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 2000;30:1676-1682.
- Kern, F., Surel, I.P., Brock, C. et al. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nature Med* 1998;4:975-988.
- Kilshaw, P.J., Brent, L., Pinto, M. Suppressor T cells in mice made unresponsive to skin allografts. *Nature* 1975;255:489-491.
- Kimura, H. Pathogenesis of chronic active Epstein-Barr virus infection: ist his an infectious disease, lymphoproliferative disorder, or immunodeficiency? *Rev Med Virol* 2006;16:251-261.
- Klenerman, P., Hill, A. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat. Immunol.* 2005;6:873-879.

- Kuzushima, K., Hoshino, Y., Fujii, K. et al. Rapid determination of Epstein-Barr virus-specific CD8<sup>+</sup> T cell frequencies by flow cytometry. *Blood* 1999;94:3094-3100.
- Li, J., Goldstein, I., Glickman-Nir, E. Induction of TCR Vbeta-specific CD8<sup>+</sup> CTLs by TCR Vbeta-derived peptides bound to HLA-E. *J Immunol* 2001;167:3800-3808.
- Mahic, M., Henjum, K., Yaqub, S. Generation of highly suppressive adaptive CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells by continuous antigen stimulation. *Eur J Immunol* 2008;38:640-646.
- Malmgaard, L. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24:439-454.
- Miller, G. Epstein-Barr virus: biology, pathogenesis, and medical aspects. In: Fields, B.N., Knipe, D.M. *Virology*. 2nd ed., New York, 1990;p.1912-1258.
- Mills, K.H. Regulatory T cells: Friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 2004;4:841-855.
- Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., O'Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19: 683-765.
- Mosmann, T.R., Coffman, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
- Nguyen-Van-Tam, J.S., Hampson, A.W. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. *Vaccine* 2003;21:1762-1768.
- Pala, P., Hessel, T., Openshaw, P.J. Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000;243:107.

- Popescu, I., Macedo, C., Abu-Elmagd, K. et al. EBV-specific CD8<sup>+</sup> T cell reactivation in transplant patients results in expansion of CD8<sup>+</sup> type-1 regulatory T cells. *Am J Transplant* 2007;7:1215-1223.
- Prussin, C. Cytokine flow cytometry: understanding cytokine biology at the single-cell level. *J Clin Immunol* 1997;17:195-204.
- Reinherz, E.L., Schlossman, S.F. The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell* 1980;19:821-827.
- Reusser, P., Riddell, S.R., Meyers, J.D. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991;78:1373.
- Rifa'i, M., Kawamoto, Y., Nakashima, I., Suzuki, H. Essential roles of CD8<sup>+</sup>CD122<sup>+</sup> regulatory T cells in the maintenance of T cells homeostasis. *J Exp Med* 2004;200:1123-1134.
- Sakaguchi, S. Naturally arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Ann Rev Immunol* 2004;22:531-562.
- Sakaguchi, S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005;6:345-52.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
- Sarantopoulos, S., Lu, L., Cantor, H. Qa-1 restriction of CD8<sup>+</sup> suppressor T cells. *J Clin Invest* 2004;114:1218-1221.

- Scholz, M., Doerr, H.W., Cinatl, J. Human cytomegalovirus retinitis: pathogenicity, immune evasion and persistence. *Trends Microbiol* 2003;11:171.
- Schooley, R.T. Chronic fatigue syndrome: a manifestation of Epstein-Barr virus infection? *Curr Clin Top Infect Dis* 1988;9:126-146.
- Sester, M., Sester, U., Gärtner, B.C. Dominance of virus-specific CD8 T cells in human primary cytomegalovirus infection. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2577-2584.
- Shevach, E.M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity* 2006;25:195-201.
- Suni, M.A., Picker, L.J., Maino, V.C. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1998;212, 89-98.
- Tang, Q., Bluestone, J.A. The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: A jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008;9:239-244.
- Tang, X., Smith, T.R., Kumar, V. Specific control of immunity by regulatory CD8<sup>+</sup> T cells. *Cell Mol Immunol* 2005;2:11-19.
- Tennakoon, D.K., Mehta, R.S., Ortega, S.B. Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 2006;176:7119-7129.
- Wei, S., Kryczek, I., Zou, L. et al. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8<sup>+</sup> regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* 2005;65:5020-5026.
- Williams, M.A., Tyznik, A.J., Bevan, M.J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8<sup>+</sup> memory T cells. *Nature* 2006;441:890-893.
- Young, H.A. Regulation of interferon-gamma gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16:563-568.

Zhou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 2005;5:263-274.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

AB	humanes AB-Serum
APCs	Antigen Presenting Cells
AA	Amino Acid
BFA	Brefeldin A
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carbo xyfluorescein Succinimidyl Ester
CMV	Cytomegalie-Virus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DCs	Dendritic Cells
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetra-Acetat
FACS	Fluorescens Associated Cell Sorter
FITC	Fluorescence Activated Cell Sorter
Flu	Influenza-Virus
HA	Hämagglutinin-Glykoproteine
HCV	Hepatitis C-Virus
HHV	Humanes Herpes Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF $\gamma$	Interferon-gamma
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex
MNC	Mononuklear Cells
NA	Neuraminidase-Glykoproteine
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
RNA	Ribonucleic Acid
Tregs	regulatorische T-Zellen
Vol	Volumen

### **Maße und Einheiten**

mg	Milligramm
mMol	Millimol
ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
rpm	rounds per minute
h	hour
IE	internationale Einheiten
min	Minute

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungen

<i>Abbildung 1-1:</i> Untergruppen regulatorischer T-Zellen. nach Mills 2004.....	6
<i>Abbildung 1-2:</i> Intrazelluläre Zytokinfärbung.....	17
<i>Abbildung 2-1:</i> Beispiel für die Auswertung der T-Zellantwort mittels Durchflusszytometrie.....	27
<i>Abbildung 3-1:</i> Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$ produzierender T-Zellen ex vivo.....	30
<i>Abbildung 3-2:</i> Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$ produzierender T-Zellen an Tag 3.....	32
<i>Abbildung 3-3:</i> Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$ produzierender T-Zellen an Tag 7.....	33
<i>Abbildung 3-4:</i> Frequenzen IL-10 und IFN $\gamma$ produzierender T-Zellen an Tag 10.....	34
<i>Abbildung 3-5:</i> Frequenzen IL-10 produzierender CD8 $^{+}$ T-Zellen im Verlauf.....	35
<i>Abbildung 3-6:</i> Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T-Zellen nach ex vivo Stimulation.....	36
<i>Abbildung 3-7:</i> Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ T-Zellen an Tag 3.....	38

*Abbildung 3-8:* Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3+ CD8+ T-Zellen an Tag 7.....39

*Abbildung 3-9:* Rohdaten der Frequenzen virus-reaktiver CD3+ CD8+ T-Zellen an Tag 10.....39

*Abbildung 3-10:* Korrelation der Frequenzen IL-10 produzierender und IFN $\gamma$  produzierender CD8+ T-Zellen.....40

## 8.2 Tabellen

*Tabelle 1-1:* Subpopulationen CD8+ regulatorischer T-Zellen. nach Tang 2005.....8

*Tabelle 2-1:* Peptide und Aminosäuresequenzen.....21

## **9 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 10 Danksagung

Ich möchte Frau Prof. Dr. Carmen Scheibenbogen für das Überlassen des Themas und ihre Unterstützung danken. Sie brachte mir viel Geduld entgegen und sorgte mit wertvollen Ratschlägen für das Gelingen dieser Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Dr. med. Annemarie Asemissen, die mir mit ihrem Wissen und ihrer konstruktiven Kritik sehr geholfen hat.

Bei Frau Sandra Bauer möchte ich mich für viele praktische Tipps und Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente bedanken.

Besonders danke ich auch Herrn York Posor für seine Geduld und für seine hilfreichen Korrekturen während der Entstehung dieser Arbeit.

Nicht zu letzt gilt mein Dank meinen Eltern für ihre unermüdliche und großzügige Unterstützung.

## Erklärung

Ich, Gianna Schulz, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Nachweis virus-spezifischer IL-10 produzierender CD8+ T-Zellen im peripheren Blut“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift