

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

Dissertation

Expressionsanalyse des Killer-Inhibitory-Rezeptors CD158b auf CD8
T-Lymphozyten, die spezifisch für Humanes Cytomegalievirus sind

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité
Universitätsmedizin Berlin

von Claudia Frömmel

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. F. Kern
2. Prof. Dr. M. Scholz
3. Prof. Dr. med. vet. W. Hammerschmidt

Datum der Promotion: 22.09.2006

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Immunität.....	1
1.2	Angeborene Immunität	2
1.2.1	Makrophagen und neutrophile Granulozyten.....	2
1.2.2	Natürliche Killer-Zellen	2
1.2.3	Natürliche Killer-Zell-Rezeptoren (NKR)	3
1.3	Erworbene (adaptive) Immunität	6
1.3.1	Das humorale Immunsystem.....	7
1.3.2	Das T-zellvermittelte Immunsystem	7
1.4	Primäre und Sekundäre Immunantwort, immunologisches Gedächtnis.....	13
1.4.1	primäre Immunantwort.....	13
1.4.2	sekundäre Immunantwort.....	14
1.4.3	immunologisches Gedächtnis.....	14
1.4.4	Subsets der Memory-T-Zellen und Oberflächenmarker	16
1.5	Stimulation der zellulären Immunantwort: CMV, bakterielles Toxin (SEB), Phorbolster (PMA).....	17
1.5.1	Humanes Cytomegalievirus (HCMV).....	17
1.5.2	Staphylokokken-Entero-Toxin B (SEB)	18
1.5.3	Unspezifische Stimulation der T-Lymphozyten mittels PMA und OKT3.....	19
1.6	Klinische Relevanz der Expression der NKR auf T-Lymphozyten.....	19
1.7	Aufgabenstellung	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Kurzzeitstimulationsassay.....	22
2.1.1	Probanden und Isolierung von PBMC aus Vollblut.....	22

2.1.2	Stimulation der PBMC mit HCMV-Peptiden, SEB, PMA	24
2.1.3	Stimulation mit Antikörper gegen CD3 (OKT3)	24
2.2	Fixierung, Permeabilisierung und Färbung mit monoklonalen Antikörpern.....	25
2.2.1	Verwendete monoklonale Antikörper (mAK).....	25
2.3	Tetramerfärbung	26
2.4	Messung am Durchflusszytometer.....	27
2.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie.....	27
2.4.2	Auswertung der Messdaten	30
2.5	Klonspezifische PCR*	32
2.5.1	Arbeitsablauf der klonspezifischen PCR.....	32
2.5.2	Vorbereitung der Zellpopulationen	33
2.5.3	Generierung von peptid-spezifischen Klonen durch limitierte Verdünnungsreihe (LDA: limiting dilution assay)	34
2.5.4	PCR-Amplifikation der TCR V β - Regionen und Sequenzierung der T-Zell- Rezeptors	34
2.5.5	Quantitative klonspezifische Analyse	35
2.6	Materialien	37
2.6.1	Medien und Puffer.....	37
2.6.2	Chemikalien	37
2.6.3	Herstellen der Arbeitslösungen	38
2.6.4	Plastikmaterialien	38
2.6.5	Technische Ausrüstung	38
2.6.6	Peptide.....	39
2.6.7	Materialien klonspezifische PCR	39
3	ERGEBNISSE	39

3.1	Ergebnisse der Phänotypisierung der CD8 T-Lymphozyten	39
3.2	Ergebnisse der Kurzzeitstimulationsassays	43
3.2.1	Stimulation mit HCMV-Peptiden.....	43
3.2.2	Stimulation mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)	46
3.2.3	Stimulation mit SEB.....	47
3.2.4	Stimulation mit immobilisierten monoklonalen humanisierten Mausantikörpern gegen CD3 (OKT3)	48
3.3	Ergebnisse der Färbung von CD8 T-Lymphozyten mit HCMV-Tetrameren.....	49
3.4	Ergebnisse der Färbung V β -Familien	52
3.5	Ergebnisse der klonspezifische PCR	54
4	DISKUSSION	61
4.1	Allgemein.....	61
4.2	KIR und HCMV spezifische T-Lymphozyten.....	61
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	Bibliographie	74
7	Abkürzungsverzeichnis	82
8	Danksagung	84
9	Lebenslauf	85
10	Publikationen.....	86
11	Selbständigkeitserklärung	87

1 EINLEITUNG

1.1 Immunität

Unser Körper ist ständig dem Angriff von Krankheitserregern ausgesetzt. Zum Schutz vor Krankheit und Tod durch Infektionen verfügt unser Organismus über ein komplexes, in der Evolution gereiftes und ständig aktives System der Erkennung und Elimination des Pathogens, das Immunsystem. In den letzten Jahren sind große Fortschritte beim Verständnis dieses Systems erzielt worden.

Die Bekämpfung viraler, bakterieller und parasitärer Infektionen erfordert ein fein abgestimmtes Zusammenwirken der einzelnen Komponenten des so genannten angeborenen und erworbenen Immunsystems. Die regulativen Mechanismen sind sehr komplex und zum Teil unerforscht. Die Kommunikation zwischen den zellulären Bestandteilen des Immunsystems wird durch Botenstoffe, wie Cytokine und Chemokine und durch direkten Zell-Zell-Kontakt realisiert. Die Bindung von Cyto- und Chemokinen und auch der Zell-Zell-Kontakt erfolgt über Oberflächenrezeptoren. Die verschiedenen Zellen des Immunsystems zeichnen sich durch einen charakteristischen Besatz an Oberflächenmolekülen aus. Die Analyse des Besatzes kann einerseits zur Charakterisierung und Einteilung (Phänotypisierung) von immunologischen Zellen dienen, es können aber auch Rückschlüsse auf spezifische Funktionen gezogen werden. In dieser Arbeit soll exemplarisch die Expression eines inhibitorischen Rezeptors auf CD8 T-Lymphozyten spezifisch für humanes Cytomegalievirus in Zusammenhang mit funktionellen Aspekten untersucht werden. Diese inhibitorischen Rezeptoren sind ein interessanter Verknüpfungspunkt von angeborener und erworbener Immunität, da diese Rezeptoren auch auf natürlichen Killerzellen exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden drei Methoden der antigenspezifischen Analyse von T-Lymphozyten angewandt, die die Expression und Funktion inhibitorischer Rezeptoren untersuchen: peptidspezifische Kurzzeitstimulation, peptidspezifische Anfärbung mit MHC/Peptid-Tetramer-Komplexen und die klonspezifische PCR.

1.2 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität sichert eine schnelle und unmittelbare Abwehrreaktion von pathogenen Mikroorganismen in der frühen Phase einer Infektion. Ihre zellulären Bestandteile sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten und natürliche Killer-Zellen. Die angeborene Immunität spielt auch eine Schlüsselrolle für die Induktion der späteren antigen-spezifischen, adaptiven Immunantwort.

1.2.1 Makrophagen und neutrophile Granulozyten

Makrophagen und neutrophile Granulozyten tragen an ihrer Oberfläche evolutionär gereifte Rezeptoren, die Oberflächen von Bakterien erkennen und binden können. Diese Bindung löst dann die Phagozytose der Bakterien und die Freisetzung von Cytokinen aus. Die Entzündungsreaktion mit zahlreichen Mechanismen, ausgelöst durch freigesetzte Chemokine und Cytokine, lockt eine Reihe von weiteren Entzündungszellen der angeborenen und erworbenen Immunität an. Makrophagen dienen auch als antigenpräsentierende Zellen (APC).

1.2.2 Natürliche Killer-Zellen

Ein weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen). NK-Zellen sind große lymphatische Zellen mit deutlichen zellulären Granula. Diese cytotoxischen Granula können Tumorzellen und virusinfizierte Zellen abtöten. Des Weiteren können NK-Zellen eine Reihe wirksamer Cytokine (z.B. $\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$) und Chemokine (Familie der MIP-1 und RANTES) [1] freisetzen. Bei der ersten Begegnung mit Antigen können NK-Zellen unmittelbar auf Antigene reagieren, sodass sie schon am Anfang der Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Die Prozesse der Cytolyse werden durch Rezeptoren an der Oberfläche der NK-Zellen reguliert, die sowohl aktivierende als auch inhibierende Signale vermitteln können. Durch Bindung von MHC-I-Molekülen an MHC-I-spezifische Rezeptoren wird die Cytolyse inhibiert oder aktiviert. Mangelnde oder fehlende Expression von eigenen MHC-Molekülen, sowie die Expression eines abberanten oder

fremden MHC-Moleküls (fehlerhafte Expression bei Tumorzellen oder Expression von Spender-MHC-Molekülen auf Spenderorganzellen) führt dazu, dass die entsprechende Zielzelle von NK-Zellen lysiert wird. Dieser Vorgang wurde in der missing-self-Hypothese [2] beschrieben. MHC-I-spezifische Rezeptoren könnten die Grundlage des molekularen Mechanismus' der missing-self-Hypothese sein. Wird nämlich durch Bindung eines adäquaten MHC-Moleküls ein inhibitorisches Signal vermittelt, wird die entsprechende Zielzelle nicht lysiert, fehlt aber dieses Signal, so wird die Zielzelle lysiert. Natürliche Killer-Zellen-Rezeptoren (NKR) [3] sind in der Lage diese inhibitorische Signal zu vermitteln. Diese Rezeptoren kommen auch auf T-Lymphozyten vor, sind Gegenstand der vorgelegten Arbeit und werden deshalb hier ausführlicher behandelt. (siehe auch unten 1.3.2 T-Zellvermitteltes Immunsystem)

1.2.3 Natürliche Killer-Zell-Rezeptoren (NKR)

Die NKR können hinsichtlich ihrer proteinchemischen Struktur in verschiedenen Gruppen klassifiziert werden. Das sind zum einen die immunglobulinähnlichen (Ig-like) Rezeptoren, auch Killer Inhibitory Receptors (KIR) genannt, nach der CD-Nomenklatur CD158a, CD158b1, CD158b2, NKB1 und p140 (Nomenklatur bzw. Genotyp siehe Tab. 2) [4] und zum anderen die Lectin-ähnlichen Rezeptoren CD94/NKG2A. Eine weitere Gruppe von Rezeptoren, deren Expression sich nicht auf NK-Zellen und T-Zellen beschränkt, ist kürzlich unter dem Begriff „Leukozyten-immunglobulinähnliche- Rezeptoren“ (LIR) oder „immunglobulinähnliche Transkripte“ (ILT) zusammengefasst worden. Ihre Liganden sind zum Teil noch unbekannt, oder sie binden meist ein sehr breites Spektrum an MHC-I-Molekülen. Die jeweiligen Liganden sind in Abb.1 dargestellt. Jeder Rezeptortyp bindet unterschiedliche Subklassen von MHC-I-Molekülen. Siehe Tab.1 und Abb.1.

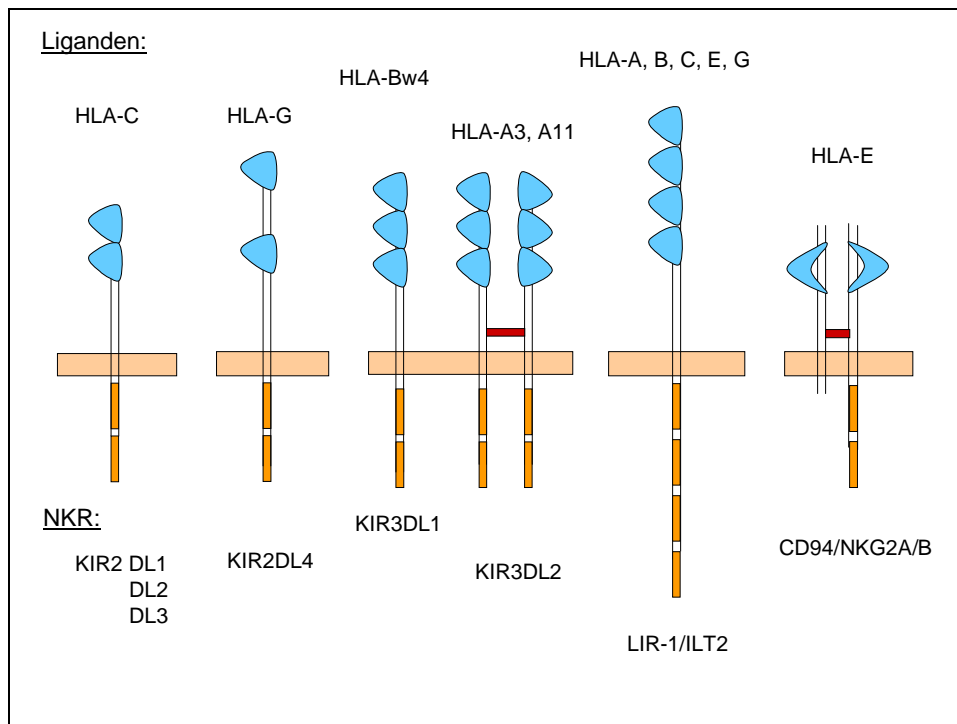


Abb. 1: Schematische Darstellung der molekularen Struktur von Natural Killer Inhibitory Rezeptoren und Nennung ihrer Liganden. Intracytoplasmatische Domänen gelb. Extracytoplasmatische Domänen blau. Disulfidbrücken rot. Abb. abgewandelt nach [5]

Tab. 1: CD158- Killer Inhibitory Rezeptoren und Liganden

KIR	Ligand
CD158b1,2	HLA-Cw 1, 3, 7, 8, 12, 13, 14, 1601, 1603
CD158a	HLA-Cw 2, 4, 5, 6, 15, 1602, 1701

Quelle: [6]

Verschiedene natürliche Killer-Zellen-Rezeptoren werden in variabler und überlappender Weise auf NK-Zellen und einigen T-Lymphozyten (siehe unten) gleichzeitig exprimiert, sodass sich an der Oberfläche jeder Zelle eine Reihe inhibitorischer und stimulierender Rezeptoren befinden. Es ergibt sich somit ein Repertoire von NKR auf NK-Zellen [3], welches eine Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen gewährleistet und die cytolytische Aktivität der NK-Zellen kontrolliert. Auch für die NKR exprimierenden T-Lymphozyten wird ein ähnliches Expressionsverhalten angenommen [3, 7]. Es wird vermutet, dass diesem variablen Muster der NKR-Expression ein stochastischer Prozess zugrunde liegt.

NKR lassen sich wie oben beschrieben in die drei Klassen je nach proteinchemischer Grundstruktur einteilen (Abb.1). Alle inhibitorischen NKR haben einen cytoplasmatische Domäne, die das „Immunrezeptor-tyrosinbasierte inhibitorische Motiv“ kurz ITIM trägt (s.o. Abb.1). Durch dieses Motiv wird die inhibitorische Wirkung vermittelt. Der extracytoplasmatische Teil der NKR unterscheidet sich nach den Subklassen und über diese Domänen erfolgt die Bindung der MHC-I-Moleküle. Die Rezeptoren der Ig-like Superfamilie (KIR) tragen entweder zwei oder drei Ig-like-Domänen extracytoplasmatisch und liegen entweder als Monomer oder als Homodimer vor. Der Rezeptor der C-Lectin-like-Superfamilie (CD94/NKG2A/B) liegt als Heterodimer vor. [8]

Tab. 2: CD-Nomenklatur der Natürliche-Killer-Zellen-Rezeptoren (NKR)

ZUORDNUNG	NAME
ILT/LIR-Familie	
CD85a	ILT5/LIR3
CD85b	ILT8
CD85c	LIR8
CD85d	ILT4/LIR2, MIR10
CD85e	ILT6/LIR4
CD85f	ILT11
CD85g	ILT7
CD85h	ILT1/LIR7
CD85i	LIR6
CD85j	ILT2/LIR1, MIR7
CD85k	ILT3/LIR5
CD85l	ILT9
CD85m	ILT10

KIR-Familie	
CD158z	KIR3DL7/KIRC1
CD158b1, CD158b2	KIR2DL2/p58.2, KIR2DL3/p58.3
CD158a	KIR2DL1/p58.1
CD158c	KIR2DS6/KIRX
CD158d	KIR2DL4
CD158e1, CD158e2	KIR3DL1/p70, KIR3DS1/p70, NKB1
CD158f	KIR2DL5
CD158g	KIR2DS5
CD158h	KIR2DS1/p50.1
CD158i	KIR2DS4/p50.3
CD158j	KIR2DS2/p50.2
CD158k	KIR3DL3/p140
Quelle:	[9] CD antigens 2002, Blood Vol. 99 No10

Die Besonderheiten der Expression von inhibitorischen NKR auf T-Zellen werden in Kapitel 1.3.2.4 erläutert.

1.3 Erworbene (adaptive) Immunität

Zur erfolgreichen Bekämpfung von vielen verschiedenen Krankheitserregern ist ein breites Spektrum an Spezifitäten und Mechanismen, ein wandlungs- und reifungsfähiges System notwendig. Hierbei wird zwischen humoraler Immunantwort und T-zellvermittelter Immunantwort unterschieden.

1.3.1 Das humorale Immunsystem

Das humorale Immunsystem reagiert auf entsprechende Antigene mit der Produktion von Antigenrezeptoren durch B-Lymphozyten und die in ihrer löslichen Form dann die Antikörper sind. Die Antigenrezeptoren und Antikörper besitzen ein breites Spektrum an Spezifität bei der Erkennung von Antigenen und deren Neutralisation. Diese große Zahl an Spezifitäten wird durch Genumlagerungen im Reifungsprozess der Lymphozyten und später durch somatische Mutation erreicht. Es wird aus einer Auswahl bestimmter Gensegmente ein neues einzigartiges Gensegment zusammgelegt. Dieses neue Gensegment kodiert für den variablen Teil des Antikörpers. Durch diesen Genumlagerungsprozess ist eine sehr hohe Anzahl von möglichen Spezifitäten gegeben. Wird ein Antigen spezifisch an den Antikörper gebunden, ist der Abbau des Antigen-Antikörper-Komplexes auf verschiedenen Arten möglich. Bei der Neutralisation von Toxinen werden Toxin-Antikörperkomplexe von Makrophagen phagozytiert und degradiert. Ähnlich erfolgt die Phagozytose von Bakterien, an deren Oberfläche Antikörper gebunden haben. Die Bindung von Antikörpern auf einer Bakterienoberfläche nennt man Opsonierung. Diese Bindung aktiviert das Komplementsystem, welches entweder ebenfalls Makrophagen zur Phagozytose opsonierter Bakterien anregt, oder das Bakterium direkt durch Durchlöcherung der Bakterienmembran abtötet. Auch bei einer Virusinfektion spielt dieser Abwehrprozess eine Rolle, z.B. bei einer Virämie, bei der freie Viren oder Viruspartikel im Blut oder Extrazellularraum vorkommen oder wenn Proteine in der Zellmembran erkannt werden.

1.3.2 Das T-zellvermittelte Immunsystem

T-Lymphozyten spielen in der Erregerabwehr eine zentrale Rolle. T-Zellen sind in der Lage immunologische Prozesse zu steuern und anderen Zellgruppen zu vermitteln und auch selbst direkt Erreger zu eliminieren. T-Lymphozyten erkennen spezifisch Antigen mittels ihres T-Zell-Rezeptors (TCR). Durch spezifische Bindung des TCR kommt es zur Aktivierung der T-Lymphozyten, zur klonalen Expansion und Differenzierung in Effektorzellen. Zur Erkennung von Antigen mittels TCR ist die Präsentation des Antigens von speziellen Rezeptoren, so genannte Major Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) in Form von Antigenfragmenten an der Zelloberfläche von jeder kernhaltigen Körperzelle (MHC Klasse I-

Molekül) oder von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (MHC Klasse II-Molekül) notwendig. Hierbei werden zwei unterschiedliche Arten von T-Zellen aktiviert, die durch die jeweilige Expression von CD4- bzw. CD8-Molekülen charakterisiert sind. Sie werden auch nach ihrer vorherrschenden Funktion T-Helfer-Zellen (CD4+) oder cytotoxische T-Zellen (CD8+) genannt. Durch die Struktur der Antigenbindungsstelle und den vorhandenen Polymorphismus im MHC-Komplex-Gen können eine Vielfalt von möglichen Antigenfragmenten präsentiert werden. In einem gegebenen HLA-Kontext findet jedoch eine Auswahl immundominanter Peptide statt.

1.3.2.1 CD8-T-Zell-Antwort

Jede kernhaltige Körperzelle präsentiert laufend an MHC-I gebundene Fragmente von Proteinen aus der zelleigenen Produktion an ihrer Oberfläche. Proteine werden intrazellulär synthetisiert, und zu einem Teil durch Proteasen (u.a. im Proteasomkomplex) zu Peptiden abgebaut. Die Peptide werden in das endoplasmatische Reticulum (ER) aufgenommen, wo es an dort verankerte MHC-I-Moleküle gebunden wird. Der fertige MHC-I-Peptid-Komplex wird in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert. Die präsentierten Peptidfragmente haben eine Länge von 8-10 Aminosäuren. Virusproteine und Tumorantigene werden als Peptidfragment in Form von MHC-I-Peptid-Komplexen auf diesem Weg an die Oberfläche der infizierten bzw. transformierten Zelle gebracht und dort vom T-Zell-Rezeptor (TCR) erkannt. CD8 T-Lymphozyten sind daher wichtig in der Abwehr von intrazellulären Antigenen, wie Viren und Tumoren. CD8 T-Lymphozyten werden durch die Wechselwirkung von mehreren MHC-I-Peptid-Komplexen und T-Zell-Rezeptoren und einigen co-stimulierenden Molekülen aktiviert. Für eine Aktivierung von naiven T-Lymphozyten ist die Bindung an co-stimulatorische Moleküle wie CD28, CTLA-4, LFA-1, CD2 von entsprechenden Oberflächenmolekülen auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen unerlässlich. Die alleinige Bindung zwischen TCR und MHC-Peptid-Komplexen führt zur Anergie und nicht zu einer Aktivierung. In Abb.2 sind die wichtigsten co-stimulierenden Oberflächenmoleküle und ihre Liganden dargestellt.

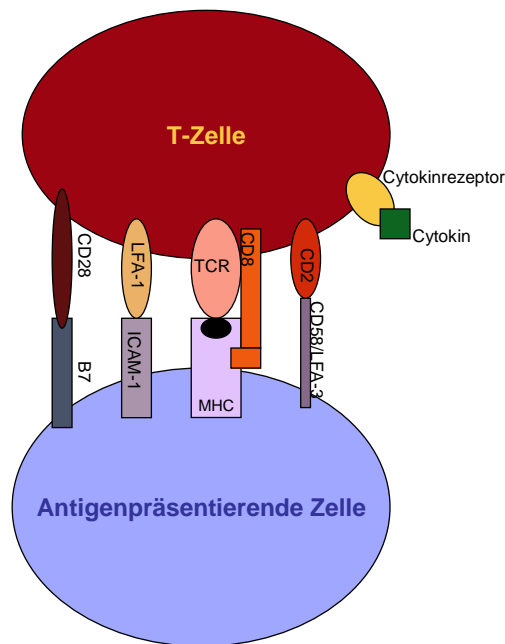


Abb. 2: Darstellung einer Auswahl wichtiger co-stimulatorischer Moleküle auf T-Lymphozyten und ihrer entsprechenden Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen.

Die Aktivierung einer CD8 T-Zelle führt zur Proliferation und Differenzierung mit Synthese von Cytokinen, wie $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, IL-2 und cytotoxischen Proteinen wie Granzymen (Typ A und B) und Perforinen. Ein weiterer cytotoxischer Mechanismus ist, die über Kontakt von den Oberflächenmolekülen Fas und Fas-Ligand vermittelte Induktion des programmierten Zelltods (Apoptose) der infizierten Zelle. Das Cytokin $\text{IFN-}\gamma$ hat auch die Eigenschaft die Virusreplikation zu hemmen und die Elimination des Virus aus der Zelle zu bewirken, ohne diese zu töten.

Bei Erstkontakt mit dem Antigen proliferieren und differenzieren naive T-Lymphozyten zu tausenden so genannter Effektorzellen. Diese sezernieren Effektorcytokine und aktivieren somit weitere Zellgruppen: Lymphozyten, Makrophagen und spezifische Gewebezellen. Mit der klonalen Expansion spezifischer T-Lymphozyten, der Aktivierung weiterer Zellgruppen durch die Cytokine und durch direkte cytotoxische Wirkung der CD8 T-Lymphozyten erfolgt in vielen Fällen eine schnelle Elimination des Pathogens.

1.3.2.2 CD4-T-Zell-Antwort

Die Möglichkeit zellfremde Antigene dem T-zellvermittelten Immunsystem zu präsentieren ist durch die Arbeit professioneller antigenpräsentierender Zellen (APC) gewährleistet. Sie synthetisieren MHC-II-Moleküle, die vom rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) aufgenommen werden. Im ER faltet sich das MHC-Molekül und ist zur Stabilisierung mit der so genannten invarianten Kette assoziiert. Vom rER werden Vesikel abgeschnürt, die so stabilisierte MHC II –Moleküle enthalten. MHC-Moleküle sind ohne gebundenes Peptid instabil und werden durch die invariante Kette vor Kontakt mit antigenen Peptiden in ihrer Struktur erhalten. Die Vesikel verschmelzen dann mit Lysosomen, die Fremdantigene zu Peptiden degradiert haben. In diesen Vesikulolysosomen wird die invariante Kette von den MHC-II-Molekülen abgespalten und Peptide von einer Länge von ca. 12-15 Aminosäuren können gebunden werden. Die fertigen MHC-II-Peptid-Komplexe werden an der Zelloberfläche präsentiert. Dieser Komplex wird von CD4 T-Lymphozyten mit ihrem TCR spezifisch erkannt. APC verfügen über ein Arsenal an co-stimulatorischen Molekülen wie z.B. B7-Moleküle (Interaktion mit CD28 auf der naiven T-Zelle, auf aktivierter Zelle das CTLA-4, inhibierendes Signal), Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, 2, 3 und LFA-3. Alleinige Bindung von TCR und MHC-Peptid-Komplexen führt zur Anergie. (siehe auch vorangehendes Kapitel)

CD4 T-Zellen vermitteln einerseits Hilfe bei der Aktivierung von B-Lymphozyten und der Produktion von Antikörpern der humoralen Immunantwort, sowie den Kontakt und die Aktivierung der CD8 T-Lymphozyten und deren Differenzierung in Effektorzellen.

1.3.2.3 Der T-Zell-Rezeptor (TCR)

Der T-Zell-Rezeptor hat die Aufgabe alle möglichen Antigene in Zusammenhang mit MHC-Molekülen spezifisch zu erkennen und eine entsprechende Aktivierung der T-Zelle auszulösen. Dazu ist, ähnlich wie bei den Antikörpern, eine hohe Variabilität in der antigenerkennenden Region notwendig.

Der T-Zell-Rezeptor ist ein membrangebundenes Protein, ein Heterodimer, bestehend überwiegend aus einer α - und einer β -Kette, seltener aus einer γ - und δ -Kette. Beide Ketten weisen eine konstante und eine variable Region, sowie eine transmembranäre Region und

einen cytoplasmatischen Schwanz auf. Die große Variabilität wird, ähnlich wie bei den Immunglobulinen, durch Umlagerung und Neukombination von Gensegmenten erreicht. Sie stellt eine große Zahl zufälliger Spezifitäten her, die dann durch positive und negative Selektion im Thymus etwas reduziert wird. Die dadurch erzeugte Vielfalt ermöglicht die Antigenerkennung vieler verschiedener, dem Immunsystem unbekannter Pathogene. In jedem Individuum wird nur eine bestimmte Anzahl von Varianten, von geschätzten 10^{13} möglichen, des TCR realisiert [10]. Die große Variabilität betrifft insbesondere die Bereiche, zusammengesetzt aus D- und J-Segmenten, die für die CDR3-Region (complementary determining region), dem Zentrum der Antigenerkennung (Peptid) des TCR, kodieren. Da der Ligand im Übrigen immer ein MHC-Molekül ist und deshalb, zu den möglichen Liganden eines Antikörpers, im Vergleich unveränderlich ist, hat die konstante Region einen unkomplizierten Aufbau. Die angrenzenden Regionen CDR1 und CDR2 werden hauptsächlich aus den V-Segmenten der α - und β -Kette zusammengesetzt. Keine der Ketten des TCR hat eine für die Signaltransduktion ausreichend große cytoplasmatische Domäne. Aus diesem Grund sind mit dem TCR-Heterodimer noch weitere Proteine assoziiert, die wichtig für den Aktivierungsprozess der T-Zellen sind. Das CD3-Molekül ist ein Komplex aus verschiedenen Proteinen, der die Signalweiterleitung in den Intrazellularraum übernimmt. Dazu enthalten die cytoplasmatischen Domänen ITAM-Sequenzen, die cytosolische Tyrosinkinase bei Aktivierung assoziieren und so die Signalkette in Cytoplasma weiterleiten. TCR mit α/β - bzw. γ/δ -Kette und CD3-Molekül bilden zusammen den T-Zell-Rezeptor-Komplex. [11]

Der CD3-Komplex wird von so genannten OKT3-Antikörpern als Antigen erkannt. Auf diesem Weg können alle TCR-CD3-Komplex-tragende T-Zellen aktiviert werden. CD4- und CD8-Moleküle sind Co-Rezeptoren des TCR bei der Erkennung von MHC-Molekülen. CD4 und CD8 haben jeweils Bindungsstellen für MHC-II- bzw. MHC-I-Moleküle und stabilisieren so den Kontakt zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle.

1.3.2.4 NK-Zell-Rezeptoren (NKR) auf T-Zellen

NK-Zell-Rezeptoren werden von einer Subpopulation von T-Lymphozyten exprimiert. Diese sind meist CD8 positiv α/β -TCR+, können aber auch CD4 positive und γ/δ -TCR+ T-Zellen sein [12-15]. Der Anteil KIR tragender T-Zellen an der Gesamtzahl von CD8 T-Lymphozyten schwankt interindividuell von weniger als 1% bis 15%. Ihre biologische

Funktion auf T-Zellen ist noch weitgehend ungeklärt. NKR sind assoziiert mit einer eingeschränkten *in vitro* Immunantwort auf virale [16-19], bakterielle [13, 15] und Tumorantigene [20, 21]. Die Modulation der T-Zellantwort resultiert aus der inhibitorischen Wirkung der NKR bei der TCR-Aktivierung: durch Anheben der Schwelle der T-Zellaktivierung [22, 23], eine veränderte Reorganisation des Cytoskeletts [24] und der Verminderung der Cytokinfreisetzung und Cytotoxizität [5, 23]. T-Zellen, die NKR exprimieren, sind meist CD8 positiv und tragen Marker der terminalen Differenzierung, wie z.B. CD57, CD44, CD29, zeigen darüber hinaus keine Expression von CD28 oder CCR7 und exprimieren zum Teil CD27 [12, 20, 23, 25]. Über die Expression von CD45 RA und CD45 RO gibt es kontroverse Beobachtungen [12, 26]. So beschreiben Mingari et al. zum großen Teil die Expression von CD45 RO auf NKR-positiven T-Lymphozyten, dagegen berichten Arlettaz et al. die Expression beider CD45-Molekül-Varianten und zum Teil eine überwiegende Expression von CD45 RA. CD8⁺ CD158b⁺ T-Zell-Klone produzieren die Cytokine und Effektormoleküle IFN- γ , Granzyme B1 und Perforin [26]. Es handelt sich bei NKR⁺ T-Lymphozyten um T-Zellen, die mit Antigen Kontakt gehabt haben, Zellen mit einem Memory-Effektor-Phänotyp. NKR⁺ T-Lymphozyten sind oligo- oder monoklonal expandiert [12]. Zusammenfassend kann man sagen, dass NKR⁺ T-Zellen antigenerfahrene Zellen sind und das Resultat einer wiederholten chronischen Stimulation sein könnten.

1.3.2.5 Limitierung der T-zellvermittelten Immunantwort

Auf einen Reiz mit Antigen reagieren spezifische T-Lymphozyten mit Expansion und Differenzierung. Begrenzt wird die Zahl der Lymphozyten dadurch, dass viele der gebildeten aktivierten T-Zellen wieder absterben. Ein dabei wichtiger Mechanismus wird aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD) genannt, wobei einige Oberflächenmoleküle, wie z.B. Fas/Fas-Ligand eine Rolle zu spielen scheinen. In knock-out-Mäusen wurde bei Fehlen der Gene für IL-2, IL-2-Rezeptor α,β , Fas, Fas-Ligand, CTLA-4, PD-1 oder TGF- β eine deutliche Hypertrophie der sekundären Lymphorgane beobachtet infolge unkontrollierter Proliferation und Überleben einer großen Zahl aktivierter T-Lymphozyten. Damit eine unkontrollierte Zunahme der Lymphozyten vermieden wird, sterben nach der Aktivierung ca. 90% der T-Lymphozyten wieder ab. Zum einen wird dadurch ein größerer Gewebeschaden verhindert und Kreuzreaktionen vermieden, zum anderen wird bei weiteren Antigenkontakten die Chance erhöht, dass das prozessierte und in die sekundären Lymphorgane transportierte

Antigen der passenden T-Zelle präsentiert wird. Bei Defekten in diesem Mechanismus kommt es durch übermäßigen Proliferation ohne Homöostase zu Lymphadenopathie und schließlich zum Tod durch erhöhte Anfälligkeit für Infektionen [27].

NKR können wahrscheinlich den AICD der T-Lymphozyten verhindern, indem sie z.B. die Aktivierungsschwelle heraufsetzen [28, 29]. Es wurde vermutet, dass die so überlebenden T-Zellen zu Memory-Zellen (Gedächtniszellen) werden und somit die Expression von NKR bei der Genese von Memory-Zellen eine Rolle spielt.

1.4 Primäre und Sekundäre Immunantwort, immunologisches Gedächtnis

1.4.1 primäre Immunantwort

Die primäre Immunantwort folgt auf erstmaligen Kontakt mit einem bestimmten Antigen [27]. Nach der Invasion des Erregers, wird er am Ort der Infektion von der angeborenen Immunabwehr wie Phagozyten (Gewebsmakrophagen, Monozyten im Blut) aufgenommen und lysiert, von NK-Zellen mittels cytotoxischer Sekretion abgetötet. Durch Aufnahme in Phagozyten und deren Migration in die sekundären Lymphorgane wird das adaptive Immunsystem in Gang gesetzt. Um ein Pathogen effektiv zu eliminieren, muss die Primärantwort so intensiv wie möglich ausfallen. Um mit den sich schnell vermehrenden Pathogenen Schritt zu halten, müssen sich antigenspezifische T-Lymphozyten in erhöhter Rate teilen (bis zu 4x in 24h) und eine große Anzahl an Effektorzellen hervorbringen [30, 31]. Diese Zellen sind in der Mehrzahl der Fälle in der Lage das Pathogen aus dem Organismus zu eliminieren. Nach dem Ende der Immunantwort sind viele Effektorzellen redundant und sterben weitgehend ab. (siehe auch Limitierung der T-zellvermittelten Immunantwort Kap. 1.3.2.5)

1.4.2 sekundäre Immunantwort

Auf ein erneutes Eindringen eines Erregers reagiert das Immunsystem mit der sekundären Immunantwort. Die sekundäre Immunantwort ist in der Regel kraftvoller. Sie ist durch ein rasches Bereitstellen von aktivierten und spezifischen Lymphozyten und anderen Zellen des Immunsystems gekennzeichnet und bewirkt eine schnelle und effektive Kontrolle bzw. Elimination des Antigens. Die Grundlage hierfür ist die Ausprägung eines immunologischen Gedächtnisses. Die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses ist antigenspezifisch und spiegelt die Verschränkung von humoraler und zellulärer Immunität wider. Sie besteht häufig ein Leben lang.

1.4.3 immunologisches Gedächtnis

Das humorale Gedächtnis wird durch Memory-B-Zellen (B-Gedächtniszellen) gebildet. Nach dem anfänglichen Kontakt mit dem Antigen entstehen aus einigen der an der primären Immunantwort beteiligten B-Zellen, Memory-Zellen. Die Generierung dieser Zellen ist das Resultat aus klonaler Expansion, Differenzierung und Reifung der Affinität [27]. Die geprägten Memory-B-Zellen sind bei erneutem Antigenkontakt effektiver in der Sekretion von hochaffinen Antikörpern. Neben den Memory-B-Zellen sollen auch langlebige Plasmazellen an der Bildung des immunologischen Gedächtnisses beteiligt sein. Diese langlebigen Plasmazellen sitzen im Knochenmark und sezernieren kontinuierlich Antikörper [32, 33].

Auch auf T-Zell-Ebene ist das immunologische Gedächtnis ausgeprägt. Bei der Primärantwort werden T-Lymphozyten aktiviert, wenn sie eine ausreichende Co-Stimulation erhalten haben und differenzieren und proliferieren zu zahlreichen Effektorzellen. Aus dem Pool der aktivierten T-Lymphozyten entstehen einige langlebige Memory-T-Zellen, während die meisten absterben [30, 34-38]. Die Beseitigung vieler aktivierter T-Lymphozyten scheint ein kontrollierter, hoch effizienter Prozess zu sein, für den mehrere Mechanismen diskutiert werden. Der Ablauf des Prozesses ist entscheidend dafür, wie und wann Memory-Zellen entstehen. Obwohl klar ist, dass Memory-Zellen infolge der primären Immunantwort entstehen, gibt kontroverse Diskussion darüber, ob Memory-Zellen direkt aus den zuvor

vollständig aktivierten Effektorzellen oder aber aus einer eigenen Subpopulation, die nie volle Effektorfunktion erlangt, entstehen [39].

Man kann zwischen zwei phänotypisch (s.u.) verschiedenen Subpopulationen, den Memory-Effektorzellen und den zentralen Memory-Zellen, von sowohl CD4 als auch CD8 T-Lymphozyten unterscheiden. Memory-Effektorzellen zirkulieren im Körper und können nach Antigenkontakt schnell Effektorfunktionen ausüben. So genannte zentrale Memory-Zellen finden sich vor allem in den sekundären Lymphorganen. Bei Antigenkontakt proliferieren sie und stellen somit viele Effektorzellen bereit, die meist nach Abklingen der Immunantwort wieder eliminiert werden [40].

Die Anzahl der generierten Memory-Zellen bestimmter Antigenpezifität hängt von der initialen Stärke der Proliferation der Vorläuferzellen (klonale Burstgröße) bei der Primärantwort ab [41].

Bei einer Überstimulation des Immunsystems, wie z.B. bei hoher Erregerlast und großer Virulenz des Erregers, entstehen keine Memory-Zellen. Die Zellen könnten durch die starke Aktivierung gleich terminal differenzieren und somit möglicherweise gleich dem AICD unterliegen, ohne dass Memory-Zellen entstehen. Daraus könnte geschlossen werden, dass Memory-Zellen aus einer Subpopulation von Effektorzellen entstehen, die durch verkürzten Antigenkontakt nicht in den AICD eintreten. Das könnten Zellen sein, die erst spät am Ort der Infektion ankommen [27]. Die Fähigkeit zu Überleben ist wahrscheinlich von bestimmten Bedingungen des Zell-Zell-Kontakts zwischen APC und T-Zelle abhängig. So sind die co-stimulatorischen Moleküle, wie B7, 41BBL, OX40L, wichtige Faktoren der Differenzierung von T-Lymphozyten. Ihre Blockade führt zu einer verkleinerten klonalen Burstgröße (initiale Größe der Immunantwort) und gleichzeitig weniger Memory-Zellen. CD40, exprimiert auf APC, scheint wichtig für das Überleben der T-Zellen zu sein. Bei fehlender CD40-CD40L-Interaktion kommt es zunächst zur normalen Expansion, dann aber zu vermehrtem Absterben und einer verminderten Anzahl Memory-Zellen [42]. Es gibt Hinweise darauf, dass spezifische Memory-T-Zellen im Endstadium der primären Immunantwort entstehen [43, 44]. Große Schwierigkeiten bereitet die Frage, ob Memory-Zellen aus nur teilweise differenzierten oder aber aus voll differenzierten T-Zellen entstehen, weil die Definition, was eine voll differenzierte T-Zelle auszeichnet, unklar ist. (siehe unten Kap. 1.4.4 Oberflächenmarker). Es gilt als sicher, dass Memory-Zellen aus T-Zellen erst hervorgehen nachdem sie sich mehrfach geteilt haben. Experimente haben gezeigt, dass man *in vitro* Memory-Zellen durch wiederholte Stimulation mit Antigen generieren kann und diese nach adoptiven Transfer *in vivo* in Abwesenheit von Antigen nachweisbar sind [45-49]. Es

konnte auch gezeigt werden, dass Memory-Zellen aus Effektorzellen mit bekanntem Phänotyp (z.B. Perforinexpression und Synthese von IL-2) *in vitro* generiert werden können [50, 51]. Einen weiteren Hinweis, dass Memory-Zellen aus Effektorzellen entstehen, lieferten Jacob und Baltimore [52]. Sie konnten zeigen, dass alle Zellen, die Granzyme B während der Primärantwort exprimierten, also Effektorzellen waren, vorherrschend in der Memory-Population nachgewiesen wurden. Das legt außerdem die Vermutung nahe, dass Memory-Zellen aus bestimmten Effektorzellen hervorgehen.

Wenn im Prinzip alle T-Zellen sterben können, stellt das Überleben als Memory-Zelle einen abweichenden Weg dar, der z.B. durch Interaktion bestimmter Oberflächenmoleküle ausgelöst wird. Wenn eine submaximale, aber initial erfolgreiche Immunantwort dazu führt, dass mehr Zellen überleben, könnten Moleküle, wie inhibitorische Rezeptoren der zugrunde liegende Mechanismus sein. In diesem Zusammenhang könnten die Expression und Funktion der NKR als immunmodulatorische Moleküle auf T-Zellen eine wichtige Rolle spielen.

Die Frage, ob normalerweise alle T-Zellen aufgrund eines eigenen Programms absterben und nur einige durch Regulationsschritte es „erlernt“ haben zu überleben oder ob eigentlich alle überleben sollten, aber in vielen Fällen ein Absterbeprozess initiiert wird, ist bisher nicht im Detail erklärt. U.a. wird angenommen, dass Memory-T-Zellen einen kontinuierlichen oder repetitiven Stimulus brauchen um zu überleben [27]. Damit wird vorausgesetzt, dass das immunologische Gedächtnis durch einen aktiven Prozess kontinuierlicher T-Zell-Stimulation gebildet und erhalten wird.

1.4.4 Subsets der Memory-T-Zellen und Oberflächenmarker

Memory-Zellen von CD4 und CD8 T-Lymphozyten weisen eine starke Heterogenität hinsichtlich ihrer Funktionalität und ihres Oberflächenmolekülbesatzes auf. Funktionell unterscheiden sich Memory- von naiven T-Zellen durch eine schnellere Differenzierung und Proliferation. Sie zeichnen sich durch eine höhere Sensitivität gegenüber der spezifischen Stimulation des TCR aus und sind weniger auf co-stimulatorische Moleküle angewiesen [53]. Sie teilen sich schnell und synthetisieren große Mengen Cytokine [35, 36, 54]. Der Phänotyp von Effektor-/Memory-CD8 T-Zellen wird allgemein mit CD44+, CD56+, CD57+, CD28-, CD27-, CD45 RO+RA- beschrieben. Einzelne Marker, die als klassische Memory-Marker, wie CD45RA/RO, CD62L (L-Selektin) galten, scheinen zum Teil auch in einem späten Stadium der Differenzierung reversibel exprimiert zu sein [27, 55]. Der Verlust des

Homingrezeptors CCR7 gehört zum Phänotyp von Memory-Effektorzellen, während die Expression von CCR7 zentrale Memory-Zellen, die in den sekundären Lymphorganen verbleiben, beschreibt [56]. Allerdings sind nicht nur dieser Oberflächenmarker für das Homingverhalten von Memory-T-Zellen verantwortlich [54]. Auch Marker naiver T-Zellen wie z.B. CD27 werden von Memory-Zellen in unterschiedlicher Stärke exprimiert und CD27 negative T-Zellen gehören eher der Effektorgruppe an.

Memory-Zellen können in zwei große Untergruppen unterteilt werden, die ihren Aktivierungsstatus widerspiegeln: ruhende und aktivierte Memory-Zellen. Die aktivierten Memory-Zellen erinnern an Effektorzellen und heißen deshalb Memory-Effektor-Zellen. Sie exprimieren z.B. CD69 und sezernieren Cytokine. Ebenso unterscheiden sie sich in der Expression von Lymphknoten-homing-Rezeptoren wie CCR7 und CD62L. Ruhende Memory-Zellen finden sich häufig in den sekundären Lymphorganen und im Knochenmark und heißen deshalb auch zentrale Memory-Zellen. Sie tragen zum Teil Merkmale naiver T-Zellen und sind z.B. CCR7+ und CD62L+.

1.5 Stimulation der zellulären Immunantwort: CMV, bakterielles Toxin (SEB), Phorbolster (PMA)

1.5.1 Humanes Cytomegalievirus (HCMV)

HCMV ist ein ubiquitär vorkommendes β -Herpesvirus, welches 60-90% der Bevölkerung meist im Kindes- und Jugendalter infiziert. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang in den Zellen der myeloiden Stammzellreihe mit zahlreichen Phasen der Reaktivierung unter der Kontrolle des Immunsystems [57, 58].

Bei Immunsupprimierten, wie z.B. HIV-Infizierten, Malignompatienten unter Chemotherapie und Organ- und Knochenmarktransplantierten, kann die Infektion mit CMV, sowohl bei der Reaktivierung, als auch bei der Primärinfektion zu einer lebensbedrohlichen Erkrankung werden, während sie bei immunkompetenten Personen keine oder kaum Symptome verursacht. CMV als Pathogen hat in den letzten Jahrzehnten im Hinblick auf die Zunahme von Organtransplantationen, HIV-Infektionen und immunsuppressiver Therapie an Bedeutung gewonnen. Betroffene Patienten sind mangels spezifischer zellulärer

Immunreaktion zur symptomatischen Reaktivierung des latenten Virus und auch für Primärinfektionen prädisponiert. Je stärker die Immunsuppression desto wahrscheinlicher ist eine klinisch bedeutsame CMV-Infektion, wobei Primärinfektionen viel schwerer und gefährlicher verlaufen als Reaktivierungen. Daher sollte bei Bluttransfusionen auf Konserven HCMV-negativer Spender oder leukozytendepletiertes Blut zurückgegriffen werden. Im Tiermodell und durch Untersuchungen an immunsupprimierten Menschen mit persistierenden CMV-Infektion wurde festgestellt, dass zur Kontrolle der Infektion die zelluläre Immunabwehr eine entscheidende Rolle spielt. Insbesondere die cytotoxischen CD8 T-Lymphozyten sind eine wichtige Komponente bei der Immunantwort gegen CMV [59, 60]. Wegen seines ubiquitären Vorkommens und der vielen bekannten Epitope für CD8 und CD4 T-Lymphozyten eignet sich dieses Modell besonders gut zur Erforschung der T-zell-vermittelten Immunität beim Menschen.

1.5.2 Staphylokokken-Entero-Toxin B (SEB)

Das Bakterium *Staphylococcus aureus* produziert eine Reihe von Proteinen, die wesentlich zum Krankheitsbild des befallenen Organismus beitragen und für die Fähigkeit zur Invasion und Verbreitung des Bakteriums nötig sind. Fast alle Stämme sezernieren Enzyme und Toxine, wie Nukleasen, Proteasen, Lipasen, Hyaluronidasen und Hämolysine. Einige Stämme produzieren weitere Exoproteine, wie das Toxic-shock-syndrom-Toxin (TSST-1), Staphylokokken-Entero-Toxine (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI) und die Exfoliativ-Toxine (ETA, ETB). Viele Toxine, so auch das SEB fungieren als sog. Superantigene. Superantigene sind in der Lage viele T-Lymphozyten, CD4+ als auch CD8+, gleichzeitig zu aktivieren. Dies erfolgt über die toxinverursachte Quervernetzung von TCR auf T-Zellen durch Bindung an Teile von V β -Ketten des TCR [61]. Die TCR der aktivierten T-Lymphozyten sollten unterschiedliche Spezifitäten haben und nur durch die Quervernetzung aktiviert sein.

1.5.3 Unspezifische Stimulation der T-Lymphozyten mittels PMA und OKT3

Phorbolmyristatester (Phorbol-Myristat-Acetat =PMA) aktiviert nahezu alle T-Zellen unabhängig ihrer Spezifität. Bei der Stimulation mit PMA und dem Calcium- Ionophor Ionomycin kommt es zu einer Aktivierung von Molekülen der Signaltransduktionskette, die an den TCR gekoppelt ist. In diesen Signaltransduktionsweg sind verschiedene Kinasen, wie Protein-Tyrosin-Kinase (PTK), Protein-Kinase C (PKC), sowie Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), die die Verbindung zwischen den beiden vorher genannten herstellen, involviert. Wichtig für die Aktivierung von T-Zellen ist das Zusammenspiel von aktivierten Kinasen und intrazelluläre Calcium-Mobilisierung. Deshalb werden für die Stimulation Phorbol-Myristat-Acetat (Aktivierung der PKC) und Calcium-Ionophor (Ca-Mobilisierung) zusammen eingesetzt [62, 63]. Die direkte Aktivierung der Signalkette führt zu einer starken Cytokinproduktion und der Aktivierung weiterer Transduktionsketten, die die Proteinsynthese steigern.

Ein ähnlicher Aktivierungsstatus wird durch die Stimulation mit mitogenem OKT3-Antikörper ausgelöst. OKT3 ist ein monoklonaler Antikörper, der sich gegen das CD3-Molekül im TCR-Komplex richtet. Fc-Rezeptor-positive Zellen können so T-Zell-Rezeptoren auf T-Lymphozyten quervernetzen und somit eine starke Aktivierung derselben auslösen. In vielen Fällen führt diese starke Aktivierung zum Absterben der T-Lymphozyten durch AICD. Kann aber auch zur dauerhaften Immunmodulation führen.

1.6 Klinische Relevanz der Expression der NKR auf T-Lymphozyten

NKR+ T-Lymphozyten wurden bei verschiedenen Krankheitszuständen expandiert gefunden. Das betrifft insbesondere HIV und einer Reihe maligner Tumoren. Die Ursache bzw. Wirkung dieser Expansion ist nicht abschließend geklärt. Auch bei gesunden Probanden werden von T-Zellen NKR oft exprimiert. Aus den Beobachtungen ergeben sich wichtige Fragen, ob NKR+ T-Lymphozyten krankheitsverstärkend, ob sie eine entscheidende Rolle bei der Pathophysiologie der Krankheit spielen oder aber ob sie ein Versuch des Immunsystems

sind, bestimmte Nebeneffekte der T-Zellaktivierung zu begrenzen und damit eher einen positiven Effekt auf den Krankheitsverlauf ausüben.

Die Expression von NKR auf T-Lymphozyten in Folge der Immunantwort gegen Virus- und Tumorantigene könnte im Laufe der Infektion / Tumorgenese erworben sein. Die inhibitorische Funktion der NKR würde dann zu einer verminderten Reaktivität spezifischer T-Lymphozyten führen. Dieser regulative Mechanismus, der eine überschießende Immunantwort verhindert, kann einen Escape-Mechanismus des Tumors oder Virus bedeuten. Dabei muss nicht das betreffende Antigen auch der Auslöser der NKR-Expression sein. Am ehesten kann man eine Imbalance zwischen hemmenden und aktivierenden Faktoren annehmen, die sich dann nur im Krankheitsfalle negativ auswirkt und ansonsten ohne klinische Bedeutung bleibt. Bei Patienten, die die Fähigkeit der verstärkten Expression von NKR auf tumorspezifischen T-Zellen haben, kann sich ein Tumor entwickeln und ausbreiten. Andererseits könnte die Expression von KIR und die einhergehende verminderte T-Zell-Aktivierung ein wichtiger physiologischer Mechanismus bei der Begrenzung der Immunantwort sein und so eine überschießende Reaktion mit ausgedehnten Gewebeschäden verhindern. Neben antigenspezifischen T-Zellen sind immer auch eine gewisse Anzahl autoreaktiver Zellen bei der Abwehr von Fremdanitigen beteiligt. NKR-Expression mit inhibitorischer Funktion könnte hier vermehrte Autoimmunität verhindern. Fehlregulationen derselben wären möglicherweise die Ursache für Autoimmunkrankheiten.

Ein weiterer Aspekt ist die Annahme, dass NKR eine wichtige Rolle bei der Generierung des T-Zell-Gedächtnisses einnehmen. Das immunologische Gedächtnis erlaubt eine schnelle und effektive Eliminierung von Pathogenen bei wiederholten Infektionen bzw. Reaktivierungen bei persistierenden Infektionen und die, wie im Fall von CMV, normalerweise ohne Symptome verlaufen. Fehlregulationen wie mangelnde Ausprägung und Herabsetzung der Reaktivität und ein reduziertes immunologisches Gedächtnis führen zu Krankheitsausbrüchen und Rezidiven zum Beispiel bei immunkompromittierten Patienten.

Eine genauere Aufklärung der Funktion der NKR-Expression auf T-Zellen bei Aktivierung mit verschiedenen Stimuli trägt zum besseren Verständnis der Pathophysiologie bei den verschiedenen Krankheitszuständen bei. Weitere Untersuchungen, die die (patho-) physiologische Rolle der NKR im Verlauf einer Infektion aufklären, könnten die Messung der NKR-Expression als Parameter zur Einschätzung chronischer Erkrankungen etablieren. Dabei sollten die Expressionsmuster auf T-Lymphozyten Hinweise auf Krankheitsstadien geben und möglicherweise prognostische Bedeutung erlangen. Besteht eine Imbalance in diesem System durch eine mangelnde oder fehlerhafte Expression von NKR, könnte sie das Entstehen von

Autoimmunität begünstigen. Die künstliche Induktion der NKR-Expression auf T-Lymphozyten bei Autoimmunerkrankungen könnte dann therapeutisch genutzt werden. Ebenso könnte die vermehrte Expression von NKR nach Transplantation auf T-Zellen die Abstoßung von allogenem Gewebe verhindern und periphere Toleranz vermitteln helfen.

1.7 Aufgabenstellung

Um die Bedeutung der NKR-Expression bei der Infektion mit HCMV zu ermitteln, wird in der vorliegenden Arbeit die Expression des NKR CD158b, einem häufigen Vertreter der Ig-like-NKR, auf CD8 T-Lymphozyten frisch isolierter PBMC von gesunden HCMV-positiven Probanden untersucht. Die Hypothese der Studie geht davon aus, dass CD8 T-Lymphozyten spezifisch für HCMV, mit typischem Memory-Effektor-Phänotyp, Killer Inhibitory-Rezeptoren exprimieren und dass diese Einfluss auf ihre Funktion haben. Dazu wurde in dieser Arbeit die Oberflächenexpression von CD158b, sowie dessen Co-Expression mit CD158a, CD27, CD57 untersucht. Zur Evaluierung der Funktion wurden PBMC mit HCMV-Peptiden stimuliert und die Cytokinproduktion der CD8 T-Lymphozyten gemessen. Die Cytokinproduktion wurde dann jeweils zwischen den Subpopulationen CD158b positiver und CD158b negativer T-Zellen verglichen. Zur Eingrenzung des Aktivierungsmechanismus wurden T-Lymphozyten mit weiteren T-Zell-Stimulantien aktiviert. Die Stimulation mit PMA diente als Positivkontrolle. Die Stimulation mit SEB und anti-CD3-Antikörpern sollte einen jeweils anderen Aktivierungsweg bzw. eine andere Spezifität der CD8 T-Lymphozyten überprüfen. Die Resultate wurden mit einem zweiten Verfahren des antigen-spezifischen Nachweises, der Färbung mit fluoreszenzmarkierten HCMV-Peptid-MHC-Tetramer-Komplexen, bestätigt. Da die flowcytometrische Messung Limitationen bei der Analyse kleiner virusspezifischer T-Lymphozyten-Subpopulationen zeigte, wurde mit einer klonspezifischen PCR Material aus PBMC ausgewählter Probanden amplifiziert und mittels Southern-Blot-Technik nachgewiesen. Dieses Verfahren weist sensitiver das Vorhandensein von HCMV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten im peripheren Blut nach. Eine gleichzeitige Aussage über Gesamtphänotyp sowie Funktionalität der T-Lymphozyten ist jedoch dabei nicht möglich.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kurzzeitstimulationsassay

2.1.1 Probanden und Isolierung von PBMC aus Vollblut

Von CMV-seropositiven gesunden Probanden (siehe Tab.3) im Alter zwischen 20 und 55 Jahren wurden aus Citrat-Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation PBMC (peripheral blood mononuclear cells = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) isoliert. In einem 50 ml Filterröhrchen wurden über 15 ml Ficoll-Plaque (Pharmacia, Uppsala Schweden) (Unter den Filter zentrifugiert mit 1min bei 1000g) 30 ml eines Blut / PBS-Gemisches geschichtet. Nach der Zentrifugation 10 min bei 1000g wurde der Ring von PBMC über dem Filter mittels Pasteurpipette geerntet. Danach wurden die PBMC mit PBS in drei Zentrifugationsschritten gewaschen, je 10 min bei 210 g, 180 g bzw. 150 g. Anschließend wurden die PBMC in 4 ml 0,1 %igen BSA-Medium (RPMI 1640) resuspendiert. Die Zählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach Anfärbung eines 10 μ l-Aliquots der Zellsuspension mit 190 μ l 0,5 %iger Trypanblaulösung. Die Zellsuspension wurde durch Zugabe von Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. (10x10⁶ Zellen/ml)

Tab. 3: Probanden

Probanden Nr.	HLA-Typ	Versuch
D1	A2, A3; B7, Bw6; Cw7	KIR, Tetramer
D2	A2; B35, B37; C2,0303	KIR, OKT3, Ao, Vbeta, PCR
D3	A2, A26(10); B60(40), B56(22), Cw1,Cw3	KIR, OKT3, Tetramer, Vβ
D4	A2, A23; B35, B62, Bw6; Cw3	KIR,
D5	A2; B44(12), B50(21), Bw4, Bw6; Cw6,Cw7	KIR, OKT3, Vβ
D6	A1; B8, Bw6; Cw7	KIR, OKT3, Ao
D7	A11, A28; B18, B53, Bw4, Bw6; Cw4, Cw5	OKT3, Ao
D8	Nicht bekannt	OKT3, Ao
D9	A2, A24(9), B7, B13, Bw4, Bw6; Cw6, Cw7	Vbeta, PCR
D10	A2, B7, B60, Bw6, Cw3, Cw7	Vbeta, Tetramer, PCR
D11	A2, A30/31; B8, B60, Bw6; Cw3, Cw7	Vbeta, Tetramer
D12	A1,A2; B52(5), B61(40), Bw4,Bw6; Cw3	Vbeta, Tetramer
D13	A3, A11, B7, Bw6, Cw7	OKT3

Abkürzungen der Versuche:

KIR = Stimulationstest mit CMV-Peptid, SEB, PMA, unstimulierte Kontrolle

OKT3 = Stimulationstest mit OKT3, unstimulierte Kontrolle

Ao = Phänotypisierung durch Oberflächenfärbung der CD 158a bzw. CD158b T-Lymphozyten

Vβ = Färbung CD158b / Vβ-Familien auf CD8 T-Lymphozyten

Tetramer = A2-Tetramerfärbung / CD158b, CD8 T-Lymphozyten

PCR = klonspezifische PCR

2.1.2 Stimulation der PBMC mit HCMV-Peptiden, SEB, PMA

Die Stimulation der PBMC erfolgte in einem sterilen Reagenzröhrchen (8 ml Cellstar™ polysterene tissue culture tubes, Greiner Frickenhausen, Deutschland). Zu 200 µl Zellsuspension (ca. 2×10^6 Zellen) wurden je 200 µl Stimulationslösung [1. Peptidlösung zur Stimulation von PBMC (10 µg/ml Peptid (NLVPMVATV für HLA-A2 und ELRRKMMYM für B8 in 0,1 %igen BSA-Medium und 2,5 % DMSO) 2. SEB-Lösung zur Stimulation von PBMC (20 ng/ml SEB in 0,1%igen BSA-Medium) 3. PMA / Ionomycin zur Stimulation von PBMC (25 ng/ml PMA und 20 µg/ml Ionomycin in 0,1 %igen BSA-Medium)] hinzugefügt. Anschließend wurden die Röhrchen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und H₂O-gesättigter Atmosphäre in einem 5° Neigungswinkel für insgesamt 6h inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgte die Zugabe des Sekretionshemmers Brefeldin A (c=2,5 µg/ml) und 1,6 ml Medium mit 12,5% FCS. Dadurch wurde die Sekretion der Cytokine z.B. IFN-γ verhindert und ermöglichte die intrazelluläre Markierung mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern.

2.1.3 Stimulation mit Antikörper gegen CD3 (OKT3)

Zur Stimulation von T-Lymphozyten mit monoklonalem Antikörper gegen das CD3-Oberflächenmolekül (OKT3) wurde eine 48-well-Platte mit OKT3-Lösung (10 µg/ml in 250 µl) 2h im Brutschrank bei 37°C und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Platte mit kaltem PBS gewaschen. 500 µl der Zellsuspension wurden pro Well hinzugefügt und für 6 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und H₂O-gesättigter Atmosphäre abgedeckt inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgte wie bei den anderen Stimulationsversuchen die Zugabe des Sekretionshemmers Brefeldin A in einer Endkonzentration von 10 µg/ml. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit eiskaltem PBS und EDTA-Lösung aus den Wells abgelöst und in Falconröhrchen überführt.

2.2 Fixierung, Permeabilisierung und Färbung mit monoklonalen Antikörpern

Nach der Inkubation von 6 h wurden die Zellen aus dem Brutschrank entnommen, mit eiskaltem PBS wurde das Röhrchen aufgefüllt und anschließend zentrifugiert (430g, 8 min) und der Überstand dekantiert. Durch die Stimulation hafteten vor allem die aktivierten Zellen an der Röhrchenwand. Diese wurden mittels EDTA-Lösung von der Röhrchenwand gelöst. Dazu wurden die Röhrchen gefüllt mit EDTA-Lösung (2 mmol/l) im Wasserbad (37 °C) inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (430g, 8 min) und Dekantieren wurde die Röhrchenwand manuell mittels Pasteurpipetten mit kalter EDTA-Lösung gespült und erneut gewaschen (PBS, 430g, 8 min). Zunächst erfolgt die Färbung der Oberflächenantigene mit fluoreszenzgelabelten monoklonalen Antikörpern in einem Volumen von 100 µl, 30 min bei 4°C, dunkel. Nicht gebundene Antikörper wurden mit PBS entfernt und die Zellsuspension mit den gebundenen Antikörpern anschließend mit 4 % Paraformaldehyd enthaltendem PBS fixiert. Für die intrazelluläre Cytokinfärbung mittels fluoreszenzgelabelten monoklonalen Antikörpern mussten die Zellen vorher permeabilisiert werden. Die Permeabilisierungslösung (BD-Permeabilizing Solution, Becton Dickinson, Heidelberg) wurde laut Herstellervorschrift angewendet. Zellen wurden danach in PBS mit 0,1 % Natrium-Azid und 0,5 % BSA (Bovines Serumalbumin), gewaschen und intrazellulär mit anti-Cytokin-Antikörpern im Dunkeln, 30 min, bei 4°C gefärbt.

2.2.1 Verwendete monoklonale Antikörper (mAK)

Alle monoklonalen Antikörper waren gegen humane Antigene gerichtet. Die in der Tab. 4 und unten aufgeführten Antikörper wurden verwendet.

Tab. 4: Liste verwendeter monoklonaler Antikörper

	Antigen	Fluorochrome	Hersteller
	CD8	PerCP	Becton Dickinson,
	CD3	APC	Heidelberg,
	IFN- γ	FITC	Deutschland
	Isotyp-Kontrolle	FITC	
	CD158a (KIR2DL1 und KIR2DS1)	PE	Immunotech,
	CD158b1 / b2 / CD158j (KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DS2)	PE	Hamburg, Deutschland
	CD57	FITC	Pharmingen,
	CD27	FITC	Hamburg,
	CD158a	FITC	Deutschland
	CD158b	FITC	

Monoklonale Antikörper gegen die TCR-V β Familien: FITC- oder PE-konjugiert, BV1, BV2, BV3, BV7, BV8, BV9, BV11, BV12, BV13.1, BV13.6, BV14, BV16, BV17, BV18, BV20, BV21.3, BV22, BV23 (Immunotech, Hamburg, Deutschland); monoklonale Antikörper gegen die TCRV β Familien BV5.1, BV5.2, BV5.3 (T-Cell Diagnostics, Woburn, USA) (BV = V β) Orthoclone® OKT3: Monoklonaler humanisierter Maus-Antikörper gegen CD3 des TCR/CD3-Komplexes auf T-Lymphozyten, unkonjugiert (Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland)

2.3 Tetramerfärbung

Eine andere Möglichkeit der Darstellung von HCMV-spezifischen T-Lymphozyten ist die Färbung mit fluoreszenzgelabelten MHC/Peptid-Komplexen, genannt Tetramer-Komplex.

Für die Färbung von PBMC von HLA-A2-positiven Probanden wurden Tetramere mit dem Peptid NLVPMVATV verwendet (HLA*0201/NLVPMVATV), die freundlicherweise von Dr. Louis Picker (Oregon, USA) zur Verfügung gestellt wurden. PBMC wurden bei 20°C für 20 min mit Tetramer-Komplexen inkubiert. Die Färbungen weiterer Oberflächenantigene wurde wie oben beschrieben durchgeführt (30 min, 4°C). Die Messung der Proben erfolgte gleich im Anschluss.

2.4 Messung am Durchflusszytometer

Gefärbte Proben wurden in einem Messvolumen von ca. 0,5-1ml (Zellsuspension in PBS oder BSA/Na-Azid Puffer) am Durchflusszytometer FACScalibur™ gemessen und analysiert. Zur Aufnahme, Kalibrierung und Auswertung der Messungen wurde die Software Cellquest™ verwendet. Die Software PaintAGate™ diente der weiteren Bearbeitung gemessener Daten.

2.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie ist es möglich innerhalb weniger Sekunden mehrere tausend Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren. Der über eine Probennadel aufgenommene Zellsuspensionsstrom wird so verengt, dass die Zellen in einer dünnen Kapillare diese nur noch hintereinander passieren können. Die Einzelzellen werden dann mit einem Laser beleuchtet und hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenzemission analysiert. Die mit fluoreszenzkonjugierten Antikörpern markierten Zellen werden durch einen Argonlaser bzw. Diodenlaser angeregt. Die durch die Anregung emittierten Photonen werden als Fluoreszenzsignal gemessen. Durch ein System von optischen Linsen, Spiegeln, Filtern und Photodetektoren (siehe Abb.3) wird das emittierte bzw. gestreute Licht in ein elektrisches Signal umgewandelt und kann mittels eines Computers ausgewertet werden. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Anzahl der Bindungsstellen fluoreszenzmarkierter Antikörper. Diese ist ein Maß für die Expression des jeweiligen Antigens. Das Gerät FACScalibur kann bis zu vier verschiedenen Fluoreszenzsignale parallel verarbeiten.

FACSCalibur Optical Layout

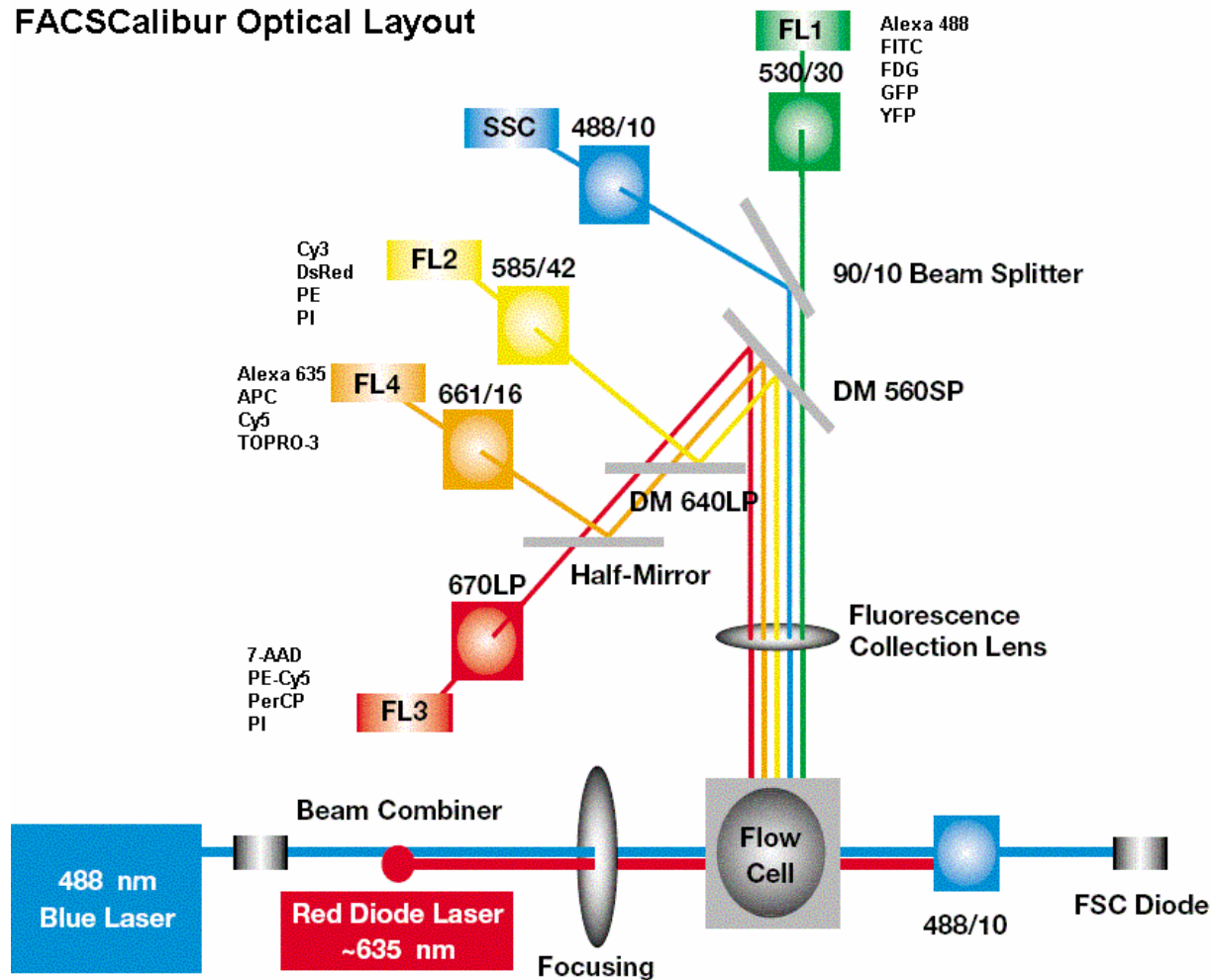


Abb. 3: Darstellung der optischen Einrichtung des Flowcytometers FACSCalibur. Zur Anregung von Fluorochromen bzw. der Streulichterzeugung kommen zwei verschiedene Laser zur Anwendung: ein Argon-Ionenlaser mit einer Wellenlänge von 488nm und ein Diodenlaser mit einer Wellenlänge von 635nm. Vier Photodetektoren für Fluoreszenz FI 1-4 detektieren die jeweilige Emission von Fluorochromen wie. z.B. PerCP, APC, PE, FITC. Zwei Detektoren erfassen Signale des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichtes (SSC).

Quelle: Internetseite des Institute for Stem Cell Research: www.iscr.ed.ac.uk, besucht Februar 2006

2.4.1.1 Messprinzip

Die Zellsuspension wird unter starkem Druck in eine Messküvette gepresst. Dort wird sie mit Laserlicht bestrahlt. Der Lichtstrahl wird beim Durchtritt durch die Zelle nach vorne und zur Seite gestreut bzw. abgeschwächt. Die Abschwächung bzw. das Vorwärtsstreulicht ist ein Maß für die Größe der Zelle (FSC), das Seitwärtsstreulicht ein Maß für die Granularität der Zelle (SSC). Sind Zellen mit entsprechenden Fluorochromen markiert, werden diese durch

den Laser angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge (PerCP 670nm, APC 661nm, FITC 488nm, PE 585nm). Das emittierte Fluoreszenzlicht wird in 90° Winkel aufgenommen und die verschiedenen Spektren mit Hilfe eines Filtersystems analysiert (Abb.3). Dieser Prozess wird am Bildschirm in zweidimensionalen Diagrammen mittels eines Computers sichtbar gemacht.

2.4.1.2 Kalibrierung

Vor jeder Messung erfolgte die Kalibrierung des Systems. Dazu wurde eine ungefärbte Probe gemessen und die vorherige Einstellung gelöscht. Die Lymphozytenpopulation wurde aufgrund ihrer Größe und Granularität identifiziert und dahingehend beurteilt, ob sie in allen Fluoreszenzdiagrammen (FL-1 vs. FL-2, FL-2 vs. FL-3, FL-3 vs. FL-4) die Achsen nicht überschneidet und im unteren linken Quadranten angesiedelt war (Fluoreszenzstärke $< 10^1$). Dann wurden nacheinander Proben mit jeweils nur einem Fluoreszenzfarbstoff gemessen und die Kompensation entsprechend (die Achsen nicht überschneidend, nicht in eine andere Fluoreszenz überstrahlend) einstellt. Die Proben zur Kompensationseinstellung wurden unter identischen Bedingungen wie die übrigen zu messenden Proben gefärbt. Es wurden häufig vorkommende Marker, wie anti-CD3 oder anti-CD4, mit den Fluoreszenzfarbstoffen FITC, PE, PerCP, APC (siehe unter 2.2.1. verwendete Antikörper) benutzt, um den Materialaufwand für die Kalibrierung gering zu halten.

2.4.1.3 Einstellung des Messbereichs

Um die Anzahl der gespeicherten Events (Zellen), die bei der Auswertung von Lymphozyten nicht nötig waren zu minimieren, wurde der Messbereich zum Teil eingegrenzt. Es wurden nur die Daten von Lymphozyten in einem weiten „Lymphozytengate“ im FSC- und SSC-Diagramm gespeichert. Es wurden 1×10^5 bis 3×10^5 Events (Zellen) gemessen und gespeichert.

2.4.1.4 **Qualitätskontrolle**

Bei jedem Stimulationsassay wurde eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt, um den Effekt der Aktivierung zu kontrollieren. Diese Probe wurde wie die anderen mit inkubiert und gefärbt. Dieser Leerwert mit unspezifischer Aktivierung wurde von der stimulierten Probe mit spezifischer Aktivierung abgezogen.

Des Weiteren wurde zu jedem Antikörper eine Isotypkontrolle vom gleichen IgG-Subtyp mit gleichem Konjugat und ohne Spezifität im Humansystem mitgeführt.

2.4.2 **Auswertung der Messdaten**

Zur Auswertung der Messdaten erfolgte computergestützt, mittels der Softwareprogramme CellQuest™ und PaintAGate™ von der Fa. BD, Heidelberg verwendet. Die statistische Analyse wurde mit dem Programmpaket SPSS™ ausgeführt.

2.4.2.1 **Auswertung der Stimulationsversuche**

Durch Eingrenzung der Population in Regionen und deren logische Verknüpfung miteinander (so genannte „Gates“) wurden die relevanten Zellen herausgefiltert und anschließend quantifiziert (Abb. 4). Es wurden die Regionen der Lymphozyten (FSC und SSC= R1), CD3+ (R2) und CD8+ (R4) zu einem Gate (G4) verknüpft. Damit wurden nur CD8+ T-Lymphozyten zur weiteren Analyse verwendet. Auf die jeweiligen Subpopulationen CD158b+ und CD158b- wurde dann Regionen angepasst und mittels Regionenstatistik ausgewertet. Diese Subpopulationen wurden hinsichtlich ihrer Kapazität auf verschiedene Stimuli IFN- γ zu produzieren quantifiziert und verglichen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Regionen-Statistik und der Berechnung der Events in einer Region, bezogen auf die gesamtgegateten Events einer Subpopulation (siehe Berechnungsformeln in Abb. 4 unten). Die Angabe erfolgt in % der CD3+, CD8+, CD158b+ bzw. CD158b- T-Lymphozyten. Einzelereignisse, die in den Punktwolkendiagrammen (dot-plot) dargestellt wurden, nennt man Events. Die enge Regionenfestlegung ist bei jedem Versuch angepasst worden und in der

rechts in Abb.4 dargestellten Gate-Kontrolle überprüft worden, damit keine Population versehentlich ausgeschlossen wurde.

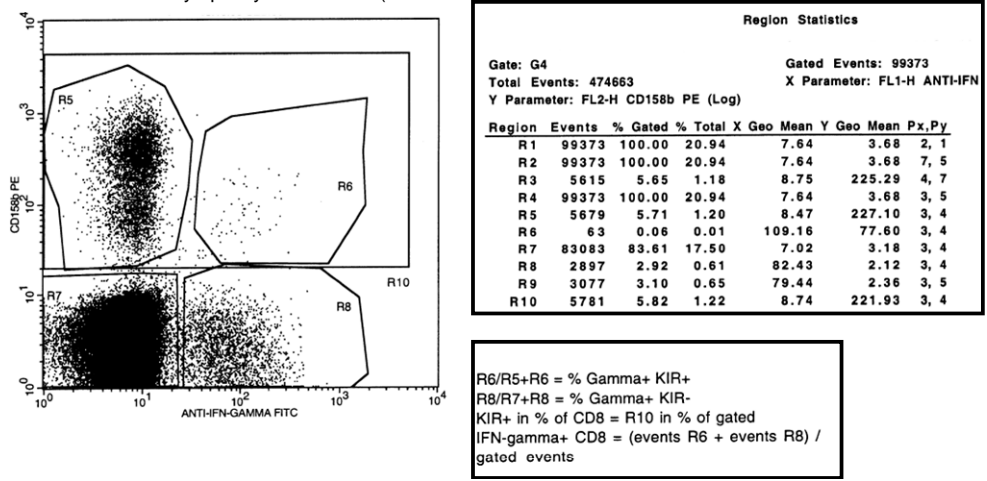
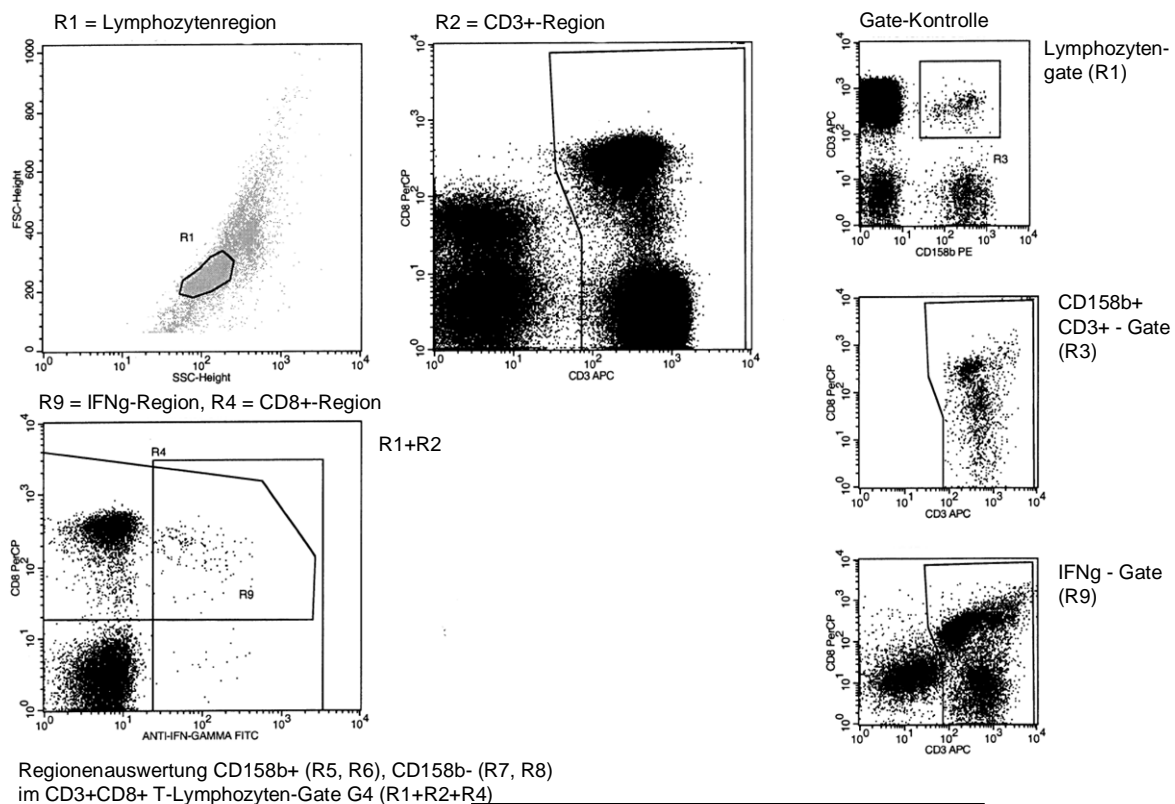


Abb. 4: Prinzip der Setzung der Regionen, sowie deren logische Verknüpfung zu so genannten Gates im Punktwolkendiagramm an einem repräsentativen Versuch. R = Regionen, G = Gates. Rechts neben den einzelnen dot-plots ist das jeweilig dargestellte Gate angegeben. Über den einzelnen dot-plots ist die aus dieser Darstellung gewonnene Region beschrieben, z.B. ist im linken mittleren dot-plot die Darstellung: Gate aus Verknüpfung von R1 und R2, die Regionen R9 und R4 festgelegt worden. Beim letzten dot-plot ist die Gatung und Regionwahl über dem dot-plot angegeben.

2.4.2.2 Auswertung der Phänotypisierung und Tetramerfärbung

Hierbei wurden wie oben beschrieben CD3+CD8+ T-Lymphozyten gated und deren Expression von CD158b, CD57, CD27, die V β -Familien sowie die Bindung der fluoreszenzmarkierten Tetramerkomplexe quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Quadranten-Statistik (Berechnung der Events in einem festgesetzten Quadranten).

2.4.2.3 Limitationen der Methode

Die Entscheidung, wann eine Population als positiv (IFN- γ -produzierend) gewertet wird, ist nicht allein vom Prozentwert abhängig. Ebenso wichtig ist die Beurteilung der Verteilung im optischen Bild einer Population notwendig. Die Häufigkeit IFN- γ -produzierender HCMV-spezifischer T-Zellen bewegt sich zwischen 0,32 % und 3 %. Die Häufigkeit CD158bpositiver T-Zellen liegt zwischen 2,5 % und 35 % der Gesamt-T-Zellen. Die CD158b positive Population, die auch auf einen Stimulus IFN- γ produzieren (doppelt positive), können sehr klein sein. Wenn nur einige Events erfasst werden, können sie optisch als Population nur schwer abgegrenzt werden. Der Fehler durch diesen Effekt wurde durch sorgfältige Regionenwahl und Abgleich gegen die Negativ-Kontrolle minimiert. siehe auch Kap. 3.2.1

2.5 Klonspezifische PCR*

*** in Kooperation mit Dr. Mark Wills vom Department of Medicine, University of Cambridge, Addenbrooks Hospital, Cambridge, Groß Britannien**

2.5.1 Arbeitsablauf der klonspezifischen PCR

- Expansion peptidspezifischer T-Zell-Klone aus PBMC des Probanden mittels Limited - Dilution Assay (LDA) (Dr. Mark Wills, mehrere Wochen)

- Präparation der mRNA aus den T-Zell-Klonen zur Herstellung von cDNA und deren Amplifikation für die Sequenzierung der hypervariablen Region des TCR (Claudia Frömmel, Dr. Mark Wills und das Department of Biochemistry Cambridge University)
- Herstellung von radioaktiv-gelabelten Sonden mit Sequenzen der hypervariablen und der konstanten Region der TCR (Dr. Mark Wills)
- Isolierung von frischen PBMC des Probanden und Cellsorting der CD8+, CD8+ CD158b+ sowie CD8+ CD158b- Populationen (Claudia Frömmel)
- Isolierung der mRNA aus sortierten Zellpopulationen → Herstellung von cDNA (Claudia Frömmel)
- Blotting: Überführen der DNA aus dem Agarose-Gel auf einen Nylonfilter (Claudia Frömmel)
- Hybridisierung der cDNA der sortierten Populationen mit radioaktiv markierten Sonden:
 - a) Sonde mit Sequenz der klonspezifischen hypervariablen Region
 - b) Sonde mit Sequenz der C β -Region
 (Claudia Frömmel)
- Aufnahme und Quantifizierung der Hybridisierungsproben mit der Gamma-Kamera und Dokumentation auf dem Röntgenfilm (Claudia Frömmel und Dr. Mark Wills)
- Quantifizierung relativ zum Standard der C β -Probe und Ausgabe in Prozent der Positivkontrolle (Claudia Frömmel und Dr. Mark Wills)

2.5.2 Vorbereitung der Zellpopulationen

Mittels eines flowcytometrischen Zellsortierers (FACSVantage cell sorter, Becton Dickinson, Oxford, UK) wurden PBMC mit anti-CD8-FITC, CD158b-PE (siehe 2.2.1) gefärbt und dann sortiert. Folgende Populationen wurden gewonnen: Gesamt CD8+ T-Zellen, CD8+ und CD158b+ T-Zellen sowie CD8+ und CD158b- T-Zellen.

2.5.3 Generierung von peptid-spezifischen Klonen durch limitierte Verdünnungsreihe (LDA: limiting dilution assay)

Zunächst wurden CD8 T-Lymphozyten angereichert. PBMC wurden mit anti- CD4, CD16, CD19 FITC-gekoppelten monoklonalen Antikörpern gefärbt. Nach einmaligem Waschen wurden die Zellen mit anti- FITC MACS (Magnetic cell sorting of Leucocytes) Beads inkubiert und über einer MACS-Säule gegeben und die nicht gefärbten Zellen aufgefangen. In einer 96-well-Rundbodenplatte wurden wiederholte Mikrokulturen (n=27) aus den angereicherten CD8+ T-Zellen gebracht, in denen die Zahl von Responder-T-Zellen durch Verdünnung mit RPMI-HuAB zunehmend verringert wurde. Zur Herstellung von Stimulatorzellen wurden autologe PBMC für 1h mit 50µl der Peptid-Stock-Lösung (40µg/ml; Peptide des pp65-Proteins mit Sequenz: NLVPMVATV für HLA-A2 und TPRVTGGGAM für HLA-B7) gepulst und danach mit 2,400 rad bestrahlt. Die Stimulatorzellen wurden in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen pro well zugesetzt. Dann wurde das Medium mit humanem IL-2 in einer Endkonzentration von 5 IU/ml versetzt. Die LDA-Kulturen wurden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. An Tag 5 und Tag 10 wurden erneut RPMI-HuAB und IL-2 zugesetzt. An Tag 14 wurde die Cytotoxizität der Zellen gegen radioaktiv markierte Zielzellen in einen 4h - ⁵¹Cr-Release-Assay in den einzelnen Vertiefungen mittels split-well-Analyse simultan getestet. Die Zielzellen bestanden aus autologen und MHC-differenten (mismatched) lymphoblastoiden B-Zelllinien, die mit pp65-Peptid (40µg/ml) über eine Stunde gepulst wurden oder ungepulsten Zellen in einer Konzentration von 4×10^3 Zellen/well. Vor dem Einsatz im Cr-Release-Assay wurden die Zielzellen 3x gewaschen und gezählt. Die Ergebnisse wurden wie in Publikation [64] beschrieben ausgewertet. Zellen aus Vertiefungen, die unter einer Zelle/well spezifische Cytotoxizität zeigten, wurden für die Etablierung multipler unabhängiger T-Zell-Klone verwendet. (siehe auch [55, 65])

2.5.4 PCR-Amplifikation der TCR Vβ - Regionen und Sequenzierung der T-Zell-Rezeptors

Die gesamte RNA wurde aus jeweils $1-10 \times 10^5$ Zellen (Klone) mittels RNA-Extraktionskit von Quiagen® (West Sussex, UK) gewonnen. Die erste cDNA wurde mit

einem oligo- dT –Primer und reverser Transkriptase des aviären Myeloblastoma-Virus unter Verwendung des Reverse-Transcription-Kit (Promega, Madison, USA) hergestellt. Die PCR erfolgte mit einem Panel von 36 TCR-V β -Familien-spezifischen Primern [55] zusammen mit den entsprechenden C-Region-spezifischen Primern (Genosys Biotechnologies Inc., Cambridge, UK). Jede Reaktion fand in einem Volumen von 50 μ l, 1mmol dNTP (Boehringer Mannheim), 3,75mmol MgCl₂, jeden Primer mit einer Endkonzentration von 1mmol sowie 1U Taq-Polymerase (Promega) enthaltend, statt. Je 2 μ l cDNA wurden für jede Amplifikation benutzt. Die Reaktionsgemisch wurde mit Mineralöl überschichtet und die Amplifikation über 45 PCR-Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 1min Denaturierung bei 94°C, 30 sek. Annealing bei 60°C und 30 sek. Extension bei 72°C auf DNA-cycler (Perkin-Elmer Cetus 9600 Instruments, Norwalk, CT, USA). Zur Überprüfung der PCR-Amplifikation 45 μ l von jedem PCR-Produkt wurden auf einem 1,3 % Agarosegel analysiert. Die Ethidiumbromid-gefärbte DNA wurde unter UV-Bestrahlung (Stratagene Eagle Eye Still Video System), bei der das Ethidiumbromid fluoresziert, sichtbar gemacht. Die Expression der V β -Gene wurden als positiv gewertet, wenn eine ca. 300-400nt starke Bande mittels Ethidiumbromidfärbung sichtbar wurde. Die vervielfältigten Fragmente wurden aufgereinigt (Quiagen, West Sussex, UK). Die C β -Primer, positioniert am 5'Ende der PCR-Amplifikationsprimer, wurden verwendet, um die Klone zwecks Bestimmung der hypervariablen n-D-n Regionen zu sequenzieren (C β seq: AGATCTCTGCTTCTGATG). Die Sequenzierung erfolgte auf einem automatisierten DNA-Sequenzierer (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK).

2.5.5 Quantitative klonspezifische Analyse

Peptid-spezifische CTL-Klone wurden in vitro generiert und die β -Kette des TCR sequenziert [66]. Um einen Klon bestimmter Spezifität in PBMC und anderen phänotypisch definierten T-Zell-Subpopulationen (z.B. CD158b positive T-Zellen) zu quantifizieren, wurden passende Sonden (klonspezifische Sonden) hergestellt. Das sind Oligonukleotide (15-20 nt lang) basierend auf der Sequenz der hypervariable n-D-n Region der TCR- β -Kette der immundominanten cytotoxischen T-Lymphozyten, die radioaktiv (s.u.) markiert sind. Ebenso wurden Sonden basierend auf der konstanten Region des TCR hergestellt (Sequenz: AGATCTCTGCTTCTGATG). Die Oligonukleotide wurden mit [α -³²P]dATP unter Katalyse der T4-Polynukleotid-Kinase gelabelt und nicht gebundenes Label wurde durch G25

Sephadex Spin Column (Amersham, Arlington Heights, USA) aus der Sondenprobe entfernt. Ebenso wurden Sonden mit Sequenzen der konstanten Region des TCR hergestellt. Diese wird zur Quantifizierung des gesamten Amplifikats der TCR-Sequenzen verwendet. Zweifach-V β -familien-spezifische PCR wurde mit cDNA von jeweils Gesamt-CD8+, sowie CD8+ CD158b negativen und CD8+ CD158b positiven Zellen durchgeführt. Das gleiche Verfahren wurde mit bekannten peptid-spezifischen CTL-Klonen (Positivkontrolle) und mit gemischten PBMC von 4 HCMV-negativen Probanden (Negativkontrolle) durchgeführt. Amplifizierte cDNA wurde für die Hybridisierung mit den o.g. Sonden mittels Standard-Technik (SouthernBlot) über Nacht auf Nylon-Filter (Bio-Rad, Richmond, USA) geblotet (Blotting-Puffer 0,6 M NaOH, 0,2 M NaCl). Anschließend wurden die Filter mit 2 x SSC und bei 80°C für 30 min inkubiert. Danach wurden die Filter in 15ml 7% SDS, 0,25M Na₂HPO₄ für eine Stunde bei 10-15°C prähybridisiert. Die Filter wurden dann das ersten Mal mit der klonspezifischen Sonde in Hybridisierungspuffer 7% SDS, 0,25 M Na₂HPO₄, 10% Polyethylenglykol) übernacht hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Filter 3x mit 5% SDS, 20 mM Na₂HPO₄ je 15 min gewaschen.

Die Darstellung und die Quantifizierung erfolgte mit dem Phosphor Imager (Beckman, Fullerton, USA) in counts per minute (cpm) und wurde auf Röntgenfilm dokumentiert. Anschließend wurde die gebundene klonspezifische Sonde durch eintauchen in 0,4 M NaOH während 30 min vom Filter entfernt und danach 2x in SSC-Puffer gewaschen. Die Filter wurden jetzt wie oben beschrieben mit der Sonde der konstanten Region des TCR hybridisiert. Die Unterschiede bei dem radioaktiven Labeling und der Bindung der klonspezifischen bzw. C-Region-spezifischen Sonden konnten durch den Bezug auf die jeweils mitgeführte Positivkontrolle korrigiert werden. Die Proben der konstanten Region der TCR- β -Kette, die die Gesamtheit der Amplifikate des TCR detektieren, sind Grundlage, um die relative Menge der klonspezifischen Sequenzen als Anteil der gesamten amplifizierten TCR-Sequenzen der selben V β -Familie zu berechnen. Der Anteil an klonspezifischer Sequenz in dem Gesamtamplifikat der TCR-V β -Sequenz für eine gegebene CD8+-Population errechnet sich wie folgt: siehe Formel

$$\frac{\text{Testprobe cpm (Klonspezifisches Amplifikat)}}{\text{Positivkontrolle cpm (Klonspezifisches Amplifikat)}} \bigg/ \frac{\text{Testprobe cpm (konstantes Amplifikat)}}{\text{Positivkontrolle cpm (konstantes Amplifikat)}}$$

cpm= counts per minute

Zusätzlich erfolgte die flowcytometrische Quantifizierung des Anteils entsprechend V β -positiver T-Zellen in den CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten. Da die mRNA der CD4 T-Zellen die Gesamtpräparation der TCR mRNA und somit das klonspezifische Ergebnis beeinflusst, wurde der Anteil V β -positiver Zellen in der klonspezifischen PCR auf den Anteil CD8 T-Zellen korrigiert.

2.6 Materialien

2.6.1 Medien und Puffer

- Sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) (Gibco BRL, Berlin, Deutschland)
- RPMI VLE 1640-Kulturmedium (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Fetales Kälberserum (FCS) (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Rinderserumalbumin (BSA) (Serva, Heidelberg)

2.6.2 Chemikalien

- Brefeldin A (BFA) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- EDTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Na-Azid (NaN₃) (Serva, Heidelberg)
- Paraformaldehyd reinst (PFA) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Permeabilisierungslösung (Permeabilizing Solution) (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- DMSO (Dimethylsulfoxid) (Pierce, Bad Königsberg, Deutschland)
- Ficoll-Plaque (Pharmacia, Uppsala, Schweden)

2.6.3 Herstellen der Arbeitslösungen

- BSA-Kulturmedium: RPMI 1640 + BSA (0,1% Endkonzentration, w/v) + L-Glutamin (50mmol/l Endkonzentration) + Penicillin/Streptomycin (1%)
- FCS-Kulturmedium: RPMI 1640 FCS (12,5% Endkonzentration, v/v) + L-Glutamin (50mmol/l Endkonzentration) + Penicillin/Streptomycin (1%)
- Waschpuffer: PBS + NaN_3 (0,1% Endkonzentration, w/v) + BSA (0,5% Endkonzentration, w/v)
- EDTA-Lösung: PBS + EDTA (2mmol/l Endkonzentration)
- Brefeldin A stock-Lösung: 1mg BFA + 2ml Ethanol reinst (0,5mg/ml Endkonzentration)

2.6.4 Plastikmaterialien

Fa. Greiner (Berlin), Fa. Becton Dickinson, Fa. Nunc

2.6.5 Technische Ausrüstung

CO₂-Inkubator (Jouan)

FACScalibur™ Flowzytometer (Becton Dickinson)

Laminar Flow Box (Clean Air)

Mikroskop (Olympus)

Pipetteboy (Tecnomara)

Zentrifuge "Megafuge 1.0" (Heraeus)

Zentrifuge CR422 (Jouan)

2.6.6 Peptide

Die Peptide des pp65 bzw. IE- Proteins des HCMV wurden von der Fa. NMI (Reutlingen) und von Dr. J. Schneider-Mergener (Institut für Medizinische Immunologie, Abteilung Peptid- und Proteinchemie der Charité, Berlin) bereitgestellt.

Sequenzen für HLA2: NLVPMVATV

Sequenzen für HLA-B8: ELRRKMMYM

Die Endkonzentration des Peptids betrug 1 µg/ml.

2.6.7 Materialien klonspezifische PCR

- MACS® Beads und Säule von Miltenyi Biotec (Grait Britain)
- Verwendetes Medium: RPMI-HuAB: RPMI mit 10% humanem AB-Serum, 2 mmol L-Glutamin, 10⁵ IU / l Penicillin, 100mg/l Streptomycin
- Humanes AB-Serum HCMV-negativ, hergestellt vom Blood Transfusion Service, Addenbrooks Hospital, Cambridge, GB
- SCC-Puffer (pH 7,0) : 3mol NaCl, 0,3 mol Na-Citrat
- Geräte: -DNA-cycler von Perkin-Elmer Cetus 9600 Instruments, Norwalk, CT, USA
 - Stratagene Eagle Eye (Still Video System), La Jolla, CA, USA

3 ERGEBNISSE

3.1 Ergebnisse der Phänotypisierung der CD8 T-Lymphozyten

Zunächst wurde die Expression von CD158a und CD158b auf T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut analysiert. Dazu wurden frisch isolierten PBMC von sieben gesunden

Spendern mit monoklonalen Antikörpern gefärbt. CD158a war auf durchschnittlich 0,57% der CD8+ T-Zellen exprimiert. CD158b war auf durchschnittlich 3,44% der CD8+ T-Zellen exprimiert. Bei den einzelnen Probanden zeigten sich verschiedene Stärken der Expression von CD158a und CD158b. Die Spanne reichte von 0,2 % bis 6,5 % Expression von CD158a in der CD8+ T-Zellpopulation. Bei der Expression von CD158b reichte die Spanne von 1 % bis 32 % der CD8+ T-Zellen. Abb. 5

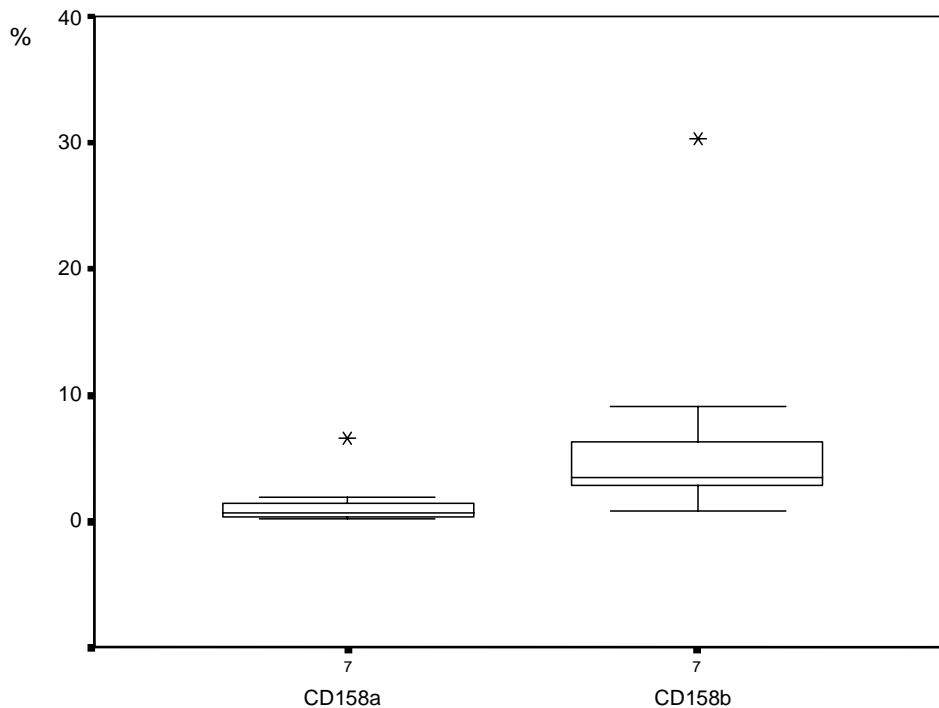


Abb. 5: Box-Plot: Expression der Killer-Inhibitory-Rezeptoren CD158a und CD158b. Dargestellt ist Median, Streuung und Standardabweichung der Expression der KIR in % der CD8 T-Lymphozyten. *=Ausreißer.

Da meistens ein Repertoire verschiedener KIR gleichzeitig exprimiert ist, wurde die Co-Expression von CD158a und CD158b in einem Ansatz untersucht. Wie in Abb. 6 dargestellt ist diese interindividuell verschieden. Dargestellt sind Versuche von drei Probanden bei denen der Anteil der Co-Expression von CD158a und CD158b bei 2-15 % der Gesamtpopulation der CD158b positiven T-Lymphozyten liegt.

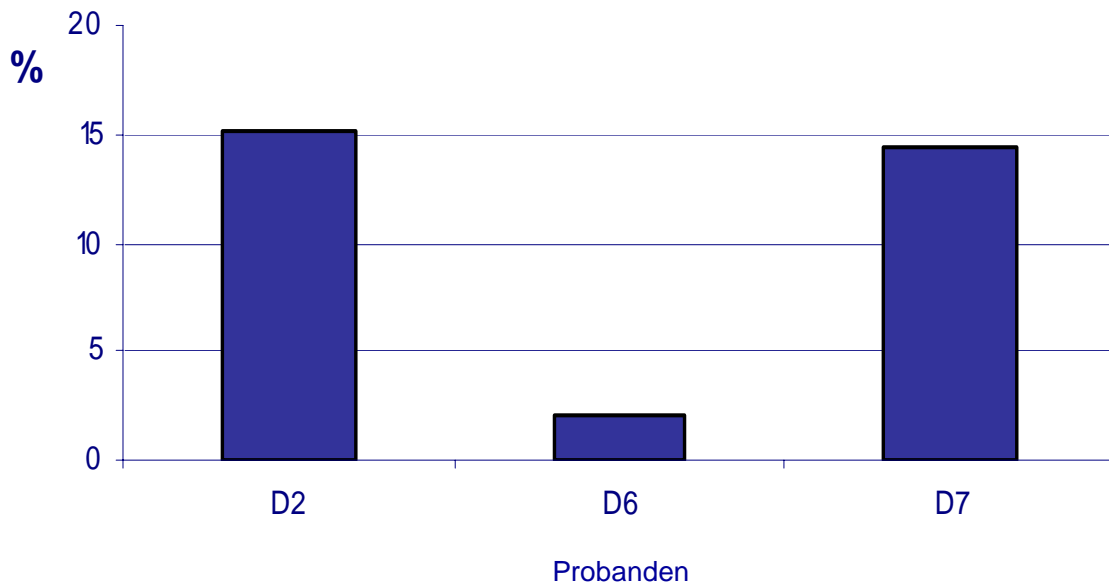


Abb. 6: Co-Expression von CD158a und CD158b bei drei Probanden. Dargestellt ist der Anteil CD158a-positiver an der Population der CD158b-positiven CD8 T-Lymphozyten.

Ebenso wurde die Expression von KIR (CD158b) auf T-Lymphozyten nach dem Inkubationsprozess bzw. in den Stimulationsansätzen mit CMV-Peptiden, SEB und PMA untersucht. Hierbei ergaben sich keine signifikanten ($p > 0,05$) Differenzen zwischen stimulierten und unstimulierten Proben. Bei der Stimulation mit OKT3 in 48-well-Platten wurden stimulierte und unstimulierte Zellen hinsichtlich ihrer Expression untersucht. Auch hier wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen stimulierten und unstimulierten Proben festgestellt.

Zur genaueren Feststellung des Phänotyps CD158b positiver T-Lymphozyten wurde die Co-Expression mit den Markern CD57 und CD27 durchgeführt. Abb.7 zeigt die Co-Expression von CD57 auf CD8+ CD158b+ T-Lymphozyten bei 6 Probanden. CD57 wurde auf 30 % - 94 % der CD158b positiven T-Lymphozyten exprimiert, im Mittel ≈ 67 %.

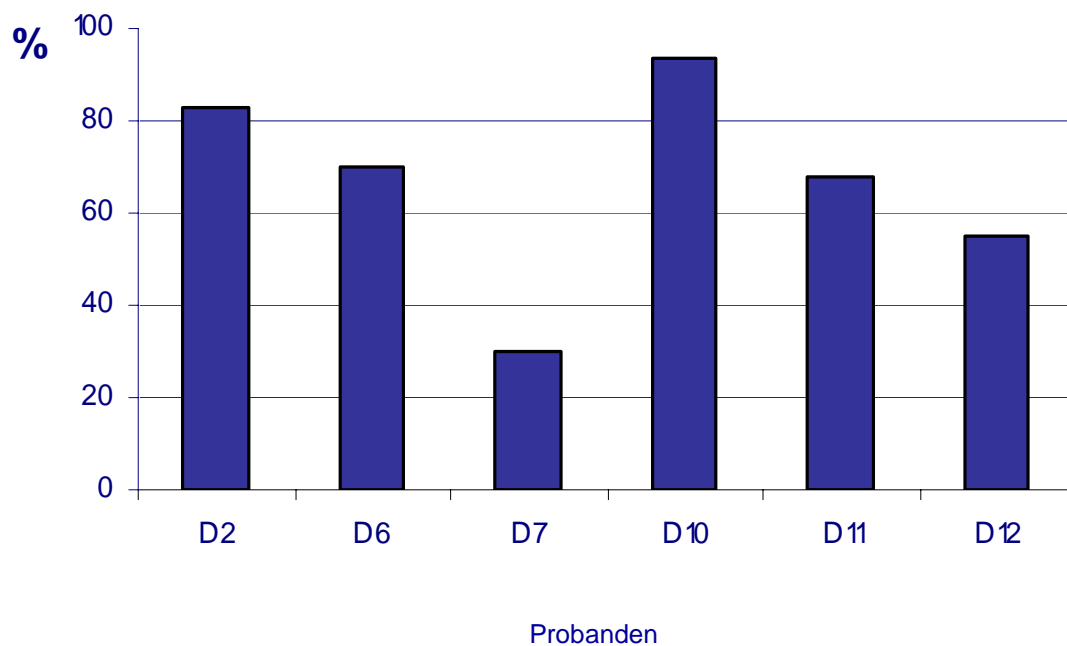


Abb. 7: Co-Expression von CD57 und CD158b auf CD8 T-Lymphozyten bei 6 Probanden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD57 positiven (mittlere und hohe Expression) an den CD158b positiven CD8 T-Lymphozyten.

Abb.8 zeigt die Co-Expression von CD27 auf CD158b+ T-Lymphozyten. CD27 wurde auf 6,5 % - 49 % der CD158b positiven T-Lymphozyten exprimiert, im Mittel ≈ 27 %.

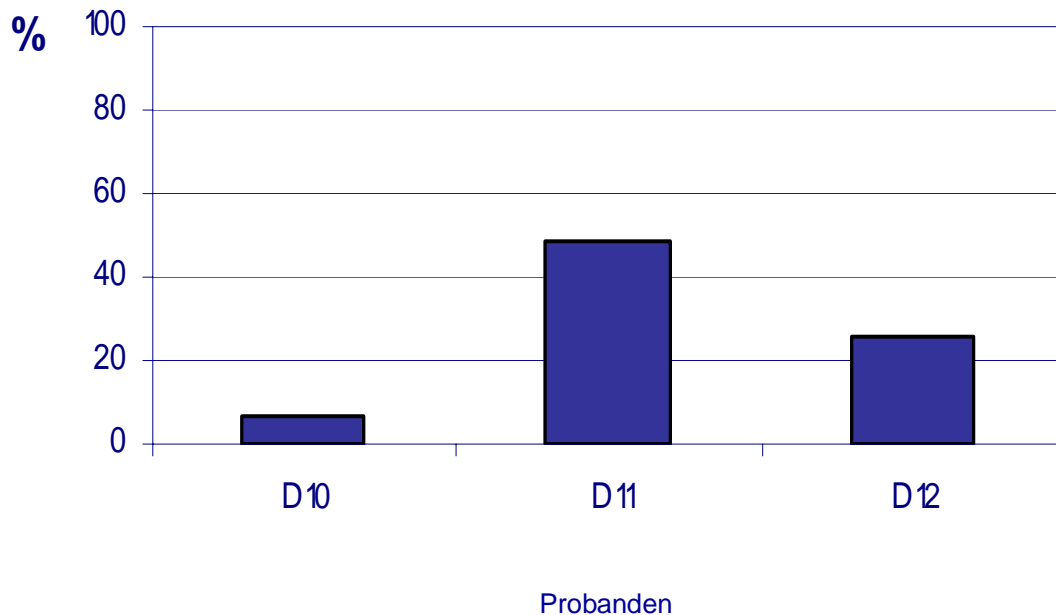


Abb. 8: Expression von CD27 und CD158b auf CD8 T-Lymphozyten bei 3 Probanden. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD27 positiven (mittlere und hohe Expression) an den CD158b positiven CD8 T-Lymphozyten.

Bei den untersuchten Probanden D10, D11, D12 ist das Verhältnis der Co-Expression von CD57 und CD27 invers. CD158b positive T-Lymphozyten exprimieren CD57 und kaum CD27. Es wurden Populationen mit mittlerer und hoher Expression von CD57 und CD27 in die Auswertung eingeschlossen.

3.2 Ergebnisse der Kurzzeitstimulationsassays

3.2.1 Stimulation mit HCMV-Peptiden

PBMC von 6 HCMV-seropositiven gesunden Probanden wurden 6h *ex-vivo* mit Peptiden aus dem HCMV stimuliert. Die Probanden wurden danach ausgewählt, ob sie bei

vorangegangenen Experimenten eine T-Zell-Reaktivität auf HCMV-Peptide gezeigt hatten [67]. Hierbei wurde sich auf die Analyse der CD158b+ T-Lymphozyten konzentriert, da die CD158a+ Population in den meisten Fällen zu klein war. Die Auswertung der Prozentangaben erfolgte wie im Kapitel 2.4.2.1 bei Material und Methoden beschrieben. Abb. 4 zeigt ein repräsentatives Experiment. Die Anzahl HCMV-spezifischer T-Lymphozyten (0,32 - 3,00 %, Median=0,69 %) und die der CD158b+ CD8-T-Lymphozyten (2,5 - 35 %, Median=15 %) war insgesamt gering. Sind eine maximale Anzahl (100%) der HCMV-spezifischen T-Lymphozyten gleichzeitig CD158b positiv, kann die Population nicht größer als die der HCMV-spezifischen sein. Um die Schwierigkeiten bei der Auswertung der Stimulationsversuche zu verdeutlichen, nehme man an, dass z.B. 0,32 % der CD8 T-Lymphozyten (=93253 absolute Events) HCMV-spezifisch (=300 absolute Events) sind, und erwartete 80 % auch CD158b exprimieren. Bei dieser Berechnung wären ca. 240 absolute Events KIR+ und HCMV-spezifisch. Tragen aber nur 5,75 % der HCMV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten KIR, wie der Durchschnitt der Gesamt-CD8 T-Lymphozyten, dann entspricht das einer Populationsstärke von 0,57 % (ca. 20 absolute Events). Daher war es nötig, nicht nur eine Population als vorhanden anzusehen, wenn eine geordnete Punktwolke sichtbar war, auch geringer Stärke, sondern es mussten andere Maßstäbe für die Auswertung angewandt werden. Es wurde ein Minimum von 1500 (absolute Events) CD158b+ T-Zellen festgelegt und die zusätzliche optische Kontrolle einer Anhäufung von Events in Form einer engeren Punktwolke (Population) in der dann mindestens 10 Events enthalten sein mussten. Dabei war zu beachten, dass durch wenige unspezifisch gefärbte tote Zellen die Prozentzahl der so genannten positiven (IFN- γ + und CD158b+) Events erheblich beeinflusst werden kann. Zur Minimierung dieses Fehlers wurde die Prozentzahl der unstimulierten Probe als Leerwert von der stimulierten Probe subtrahiert. Die Untersuchung bei 6 gesunden Probanden ergab, dass signifikant mehr CMV-spezifische CD8 T-Lymphozyten in der CD158b negativen Subpopulation als in der CD158b positiven Subpopulation enthalten sind (Wilcoxon Test, $p=0,028$, $n=6$) (Abb.9).

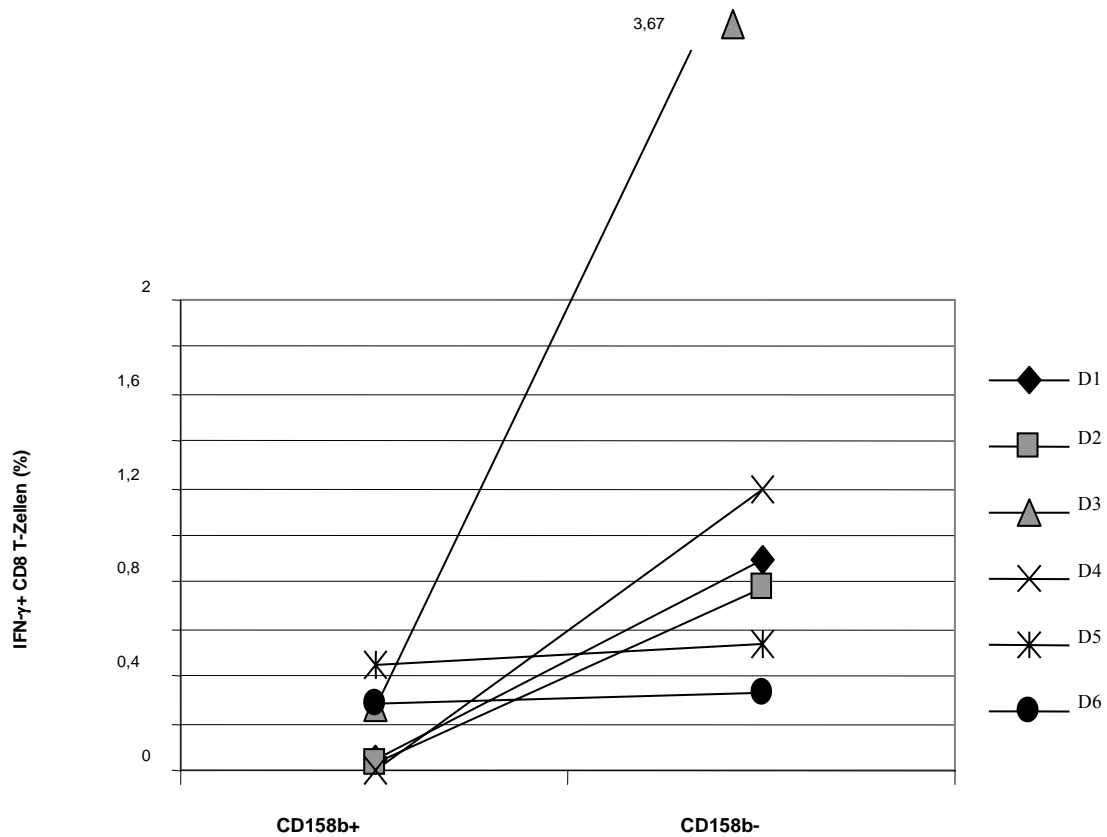


Abb. 9: Verteilung der IFN- γ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten in den Subsets der CD158b positiven und CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten nach Stimulation mit HCMV-Peptiden

Bei zwei Probanden (D6, D5) wurde diese untere Grenze von 10 Events in der CD158b positiven Population überschritten. Es konnte jedoch keine gut umschriebene Punktwolke abgegrenzt werden, und daher wurde am ehesten eine unspezifische Färbung angenommen. Durch genaue Gattung und Auswertung wie in Kapitel 2.4.2.1 konnte dieser Effekt minimiert werden. Es erwies sich aber die Anwendung anderer Methoden zu Detektion von HCMV-spezifischen T-Lymphozyten wie die direkte fluoreszenzgelabelte Tetramerfärbung und der Nachweis HCMV-klonspezifischer Amplifikate als notwendig. (siehe auch Kapitel 3.3 und 3.5)

3.2.2 Stimulation mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA)

Die Stimulation mit dem TCR-unabhängigen Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und dem Ca- Ionophor Ionomycin wurde als Positiv-Kontrolle für die Stimulation verwendet. Die Ergebnisse zeigten im Gegensatz zur Stimulation mit HCMV-Peptiden hierbei, dass die reaktiven T-Lymphozyten in der CD158b positiven Population signifikant stärker vertreten waren als in der CD158b negativen Population (Wilcoxon Test, $p=0,046$, $n=6$) (Abb.10). Die Anzahl reaktiver IFN- γ -produzierender T-Lymphozyten lag zwischen 30,1 % und 92,6% (Median=42,39%) der CD8 T-Lymphozyten.

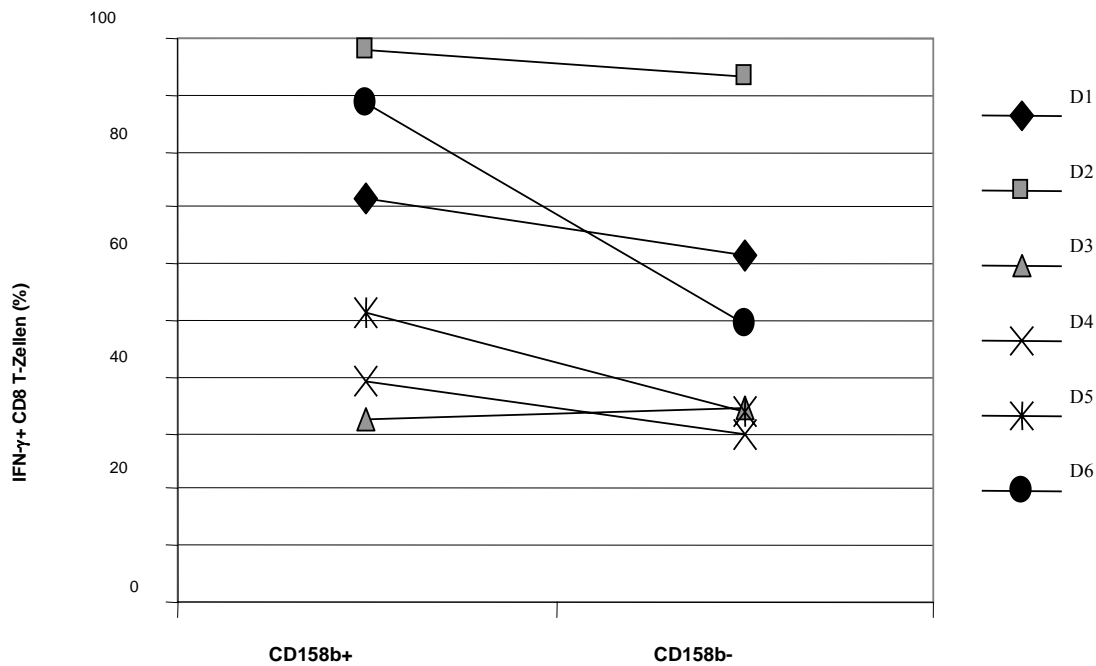


Abb. 10: Verteilung der IFN- γ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten in den Subsets der CD158b positiven und CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten nach Stimulation mit PMA und Ionomycin

3.2.3 Stimulation mit SEB

Zum Vergleich der HCMV-spezifischen Aktivierung mit einem ebenfalls TCR-vermittelten Stimulus für T-Lymphozyten wurde das Bakterientoxin SEB eingesetzt. SEB aktiviert vor allem CD4 aber auch CD8 T-Lymphozyten durch Quervernetzung von T-Zellrezeptoren, indem es spezifisch an bestimmte V β -Ketten bindet. Es zeigte sich bei 5 von 6 Spendern klar, dass mehr SEB-reaktive CD8 T-Lymphozyten in der CD158b negativen Subpopulation als in der CD158b positiven Subpopulation enthalten sind (Abb.11). Bei Proband D5 sind in der Population der CD158b positiven 5,37% der IFN- γ -produzierender CD8 T-Zellen im Gegensatz zu 3,55% in der CD158b negativen. Daher war insgesamt die Differenz nicht statistisch signifikant. (Wilcoxon Test, $p=0,173$, $n=6$) Wie erwartet war die Zahl der reaktiven CD8 T-Lymphozyten in diesem Ansatz höher als bei der HCMV-spezifischen Stimulation (0,90-3,21%, Median=2,83%).

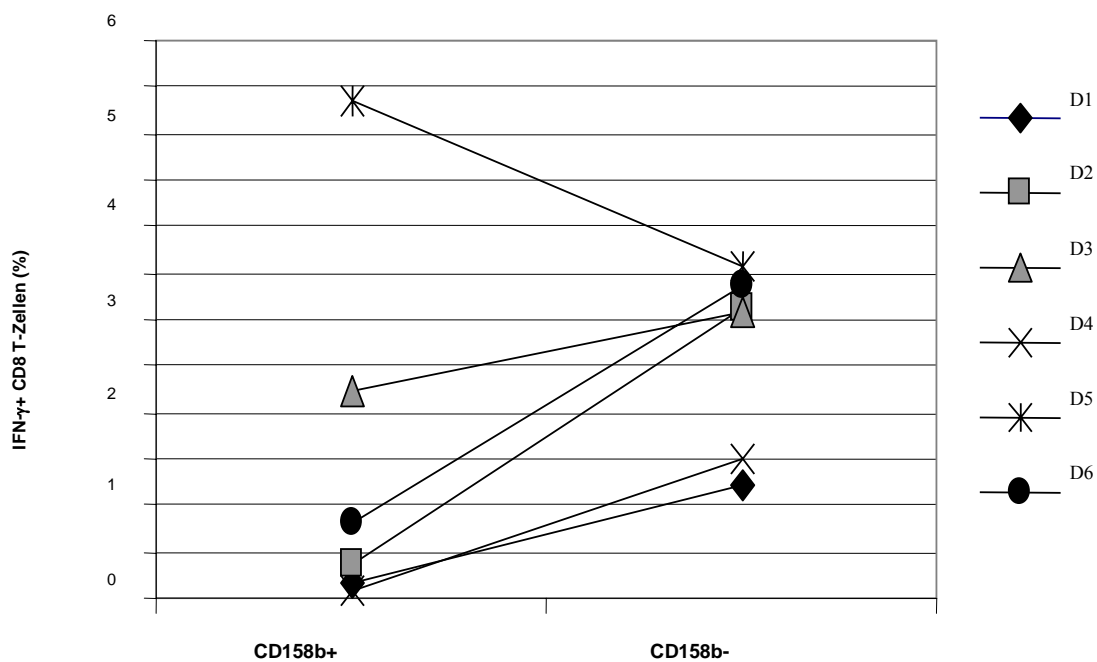


Abb. 11: Verteilung der IFN- γ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten in den Subsets der CD158b positiven und CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten nach Stimulation mit SEB

3.2.4 Stimulation mit immobilisierten monoklonalen humanisierten Mausantikörpern gegen CD3 (OKT3)

Da bei den Versuchen mit den TCR-vermittelten Stimuli HCMV-Peptide und SEB vergleichbare Ergebnisse gefunden wurden, stellte sich die Frage ob CD158b+ T-Lymphozyten generell weniger auf TCR-vermittelte Signale reagieren. Dazu wurden PBMC mit immobilisierten OKT3 inkubiert und wie oben beschrieben die IFN- γ -Produktion gemessen. Überraschenderweise fanden sich signifikant mehr reaktive CD8 T-Lymphozyten in der CD158b positiven Population als in der CD158b negativen Population (Wilcoxon Test, $p=0,046$, $n=7$) (Abb.12). Erneut war die Zahl IFN- γ -produzierender T-Lymphozyten höher als bei der Stimulation mit SEB und HCMV (1,02 - 21,16 %, Median 3,75 %). Insgesamt gab es keine stimulationsabhängige Veränderung der Expression von KIR und anderen Oberflächenmarkern. Bei den Probanden mit relativ geringer Cytokinfreisetzung sind die Unterschiede zwischen CD158b positiven und CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten weniger deutlich. Dort wo eine starke Cytokinproduktion erfolgte sind es eindeutig mehr reaktive T-Zellen in der CD158b positiven Subpopulation.

Damit konnte gezeigt werden, dass die Stimulation mit anti-CD3-Antikörpern bei CD158b positiven T-Lymphozyten zu einer Cytokinproduktion führt, und es sich nicht um eine generelle Arrektivität der T-Lymphozyten auf TCR-vermittelte Signale handelt.

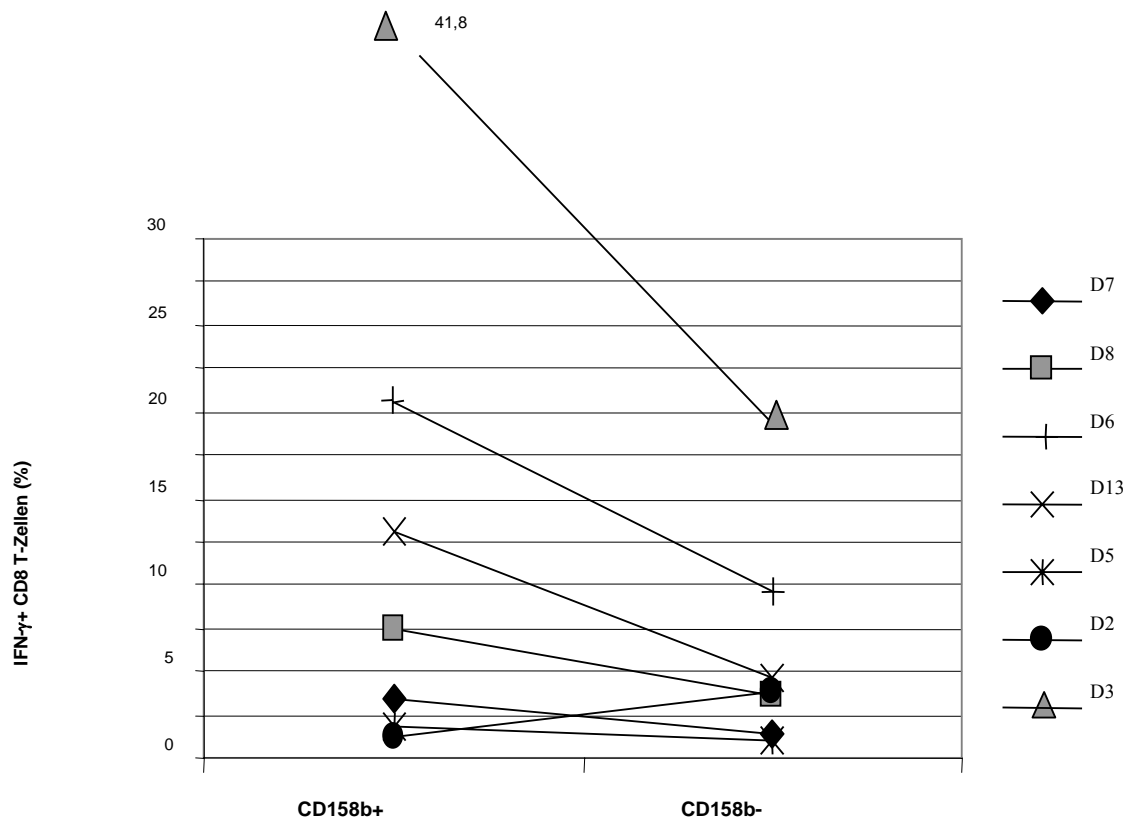


Abb. 12: Verteilung der IFN- γ -produzierenden CD8 T-Lymphozyten in den Subsets der CD158b positiven und CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten nach Stimulation mit OKT3.

3.3 Ergebnisse der Färbung von CD8 T-Lymphozyten mit HCMV-Tetrameren

Hierbei wurde mittels fluoreszenzgelabelten Tetramerkomplex aus MHC-I und HCMV-Peptid die direkte Färbung des spezifischen TCR auf T-Lymphozyten durchgeführt. Dabei sollen auch spezifische T-Lymphozyten, die kein Cytokin freisetzen dargestellt werden. PBMC von 6 gesunden Probanden, die das HLA-Molekül HLA-A2 (*0201) besaßen, wurden mit dem entsprechenden Tetramerkomplex mit dem pp65-Peptid „NLVPMVATV“ gefärbt. (Abb. 13)

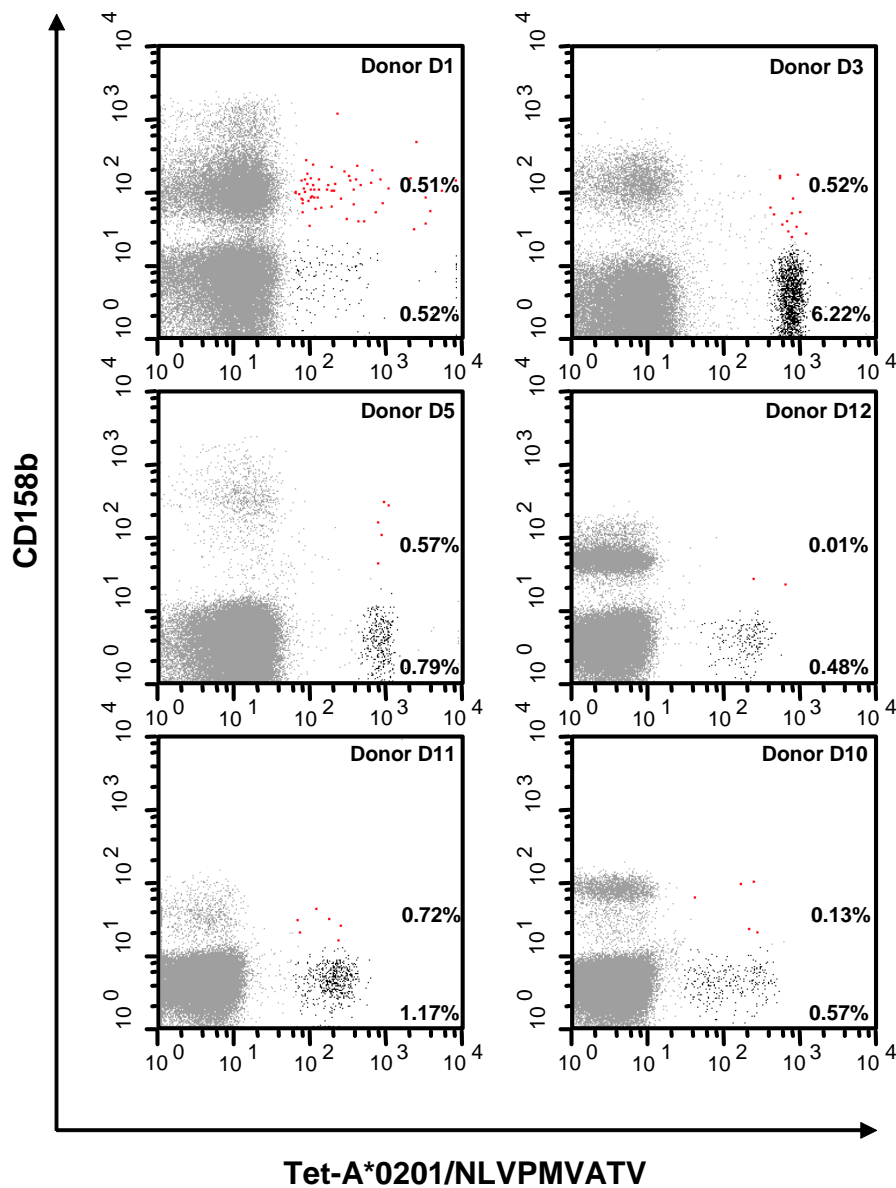


Abb. 13: Ergebnisse der Färbung mit HCMV-spezifischen Tetramer-Komplexen (Tet-A*0201/NLVPMTV) von 8 Probanden. Die X-Achse bezeichnet die Fluoreszenzintensität der Tetramerkomplexe. Die Y-Achse bezeichnet die Expression von CD158b.

Zusammengefasst finden sich tetramerpositive CD8 T-Lymphozyten zum größeren Teil in der CD158b negativen Subpopulation (Wilcoxon Test, $p=0,028$, $n=6$) Abb14. Wie schon bei den Stimulationsversuchen mit HCMV-Peptiden angemerkt, ist die Anzahl spezifischer T-

Zellen sehr gering (0,5-6,74% der CD8 T-Lymphozyten). Eine eindeutige Unterscheidung zwischen spezifisch gefärbten Zellen und unspezifischer Hintergrundfärbung ist daher schwierig. Bei 5 von 6 Probanden stellen sich nicht eindeutig doppelt positive (oberer äußerer Quadrant) Zellpopulationen dar (Negativkontrolle). Bei Proband D1 scheinen die tetramerspezifischen Zellen in beiden Populationen (CD158b positiv und negativ) gleichermaßen vertreten zu sein. Bei Proband D3 ist der Unterschied zwischen CD158b positiver und CD158b negativer Population am größten, wie dies schon bei der peptidspezifischen Stimulation zu beobachten war. Insgesamt ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Ergebnissen der Stimulationsversuche mit HCMV-Peptiden.

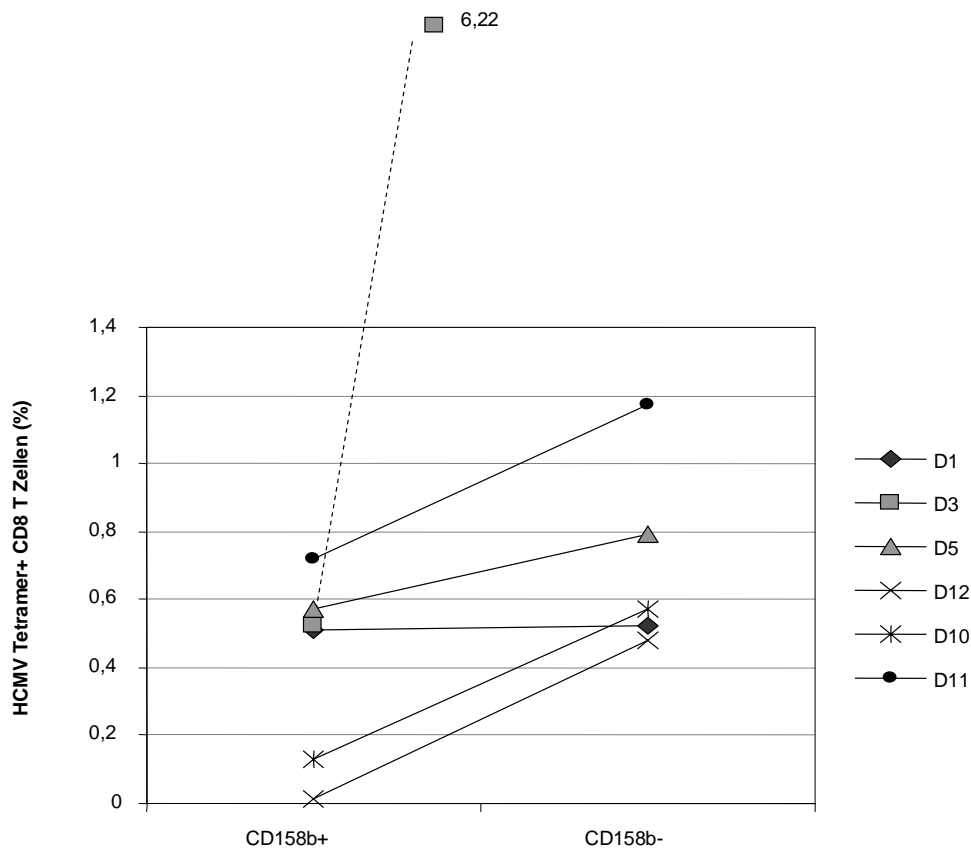


Abb. 14: Verteilung der HCMV-Tetramer-positiven CD8 T-Lymphozyten in den Subsets der CD158b positiven und CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten.

3.4 Ergebnisse der Färbung Vβ-Familien

Die simultane Färbung von CD158b und einer Reihe Antikörpern gegen TCR-Vβ-Segmente von PBMC von 6 gesunden Probanden zeigte, dass das Repertoire der vermehrt exprimierten Vβ-Segmente in der CD158b positiven Subpopulation stark limitiert ist. Es finden sich in der CD158b positiven Population nur eine bis drei stark expandierte Subpopulationen, die jeweils nur eine bestimmte Vβ-Familie exprimieren. (Abb. 15)

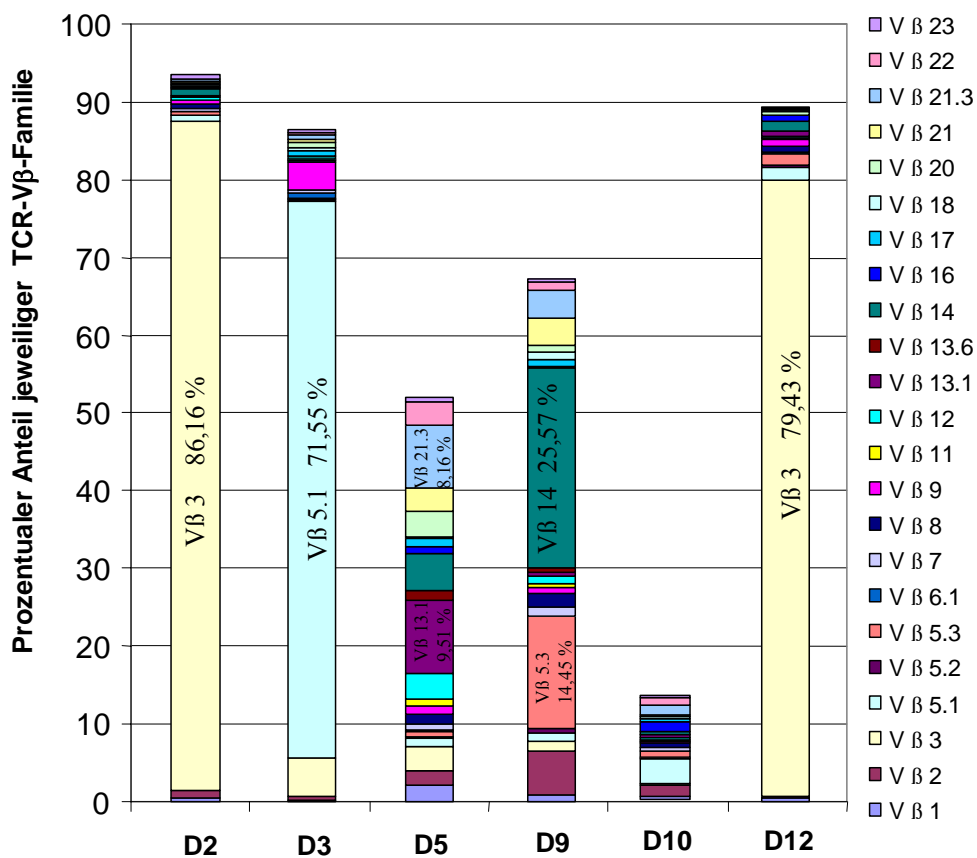


Abb. 15: Prozentuale Aufteilung der Vβ-Familien in der Subpopulation der CD158b-positiven CD8 T-Lymphozyten bei 6 Probanden.

Bei drei der sechs Probanden ist eine Vβ-Familie vorherrschend mit >70%. Bei zwei Probanden gibt es mindestens zwei Vβ-Familien, die sichtbar expandiert sind. Bei einem Probanden (D10) ist mit den von uns verwendeten Antikörpern keine Expansion einer Vβ-

Familie sichtbar. Die von uns dargestellten V β -Familien machen bei diesem Probanden insgesamt weniger als 25% aus und die fehlenden, in diesem Panel nicht vorhandenen, V β -Familien müssen also dem gegenüber vergleichsweise stark expandiert sein, so dass auch hier von einer klonalen Expansion der T-Lymphozyten ausgegangen werden kann. Diese Beobachtung ergibt sich aus der Diskrepanz von den gegenwärtig phänotypisch mit monoklonalen Antikörpern detektierbaren (ca. 70%, n = 22) und den genotypisch ermittelbaren (100%, n = 32) V β -Familien [68]. In Abb.16 ist an einem repräsentativen Experiment die Verteilung der Expansion in jeweils CD158b positiver und CD158b negativer Population herausgestellt.

Expansion der Vbeta 3 Familie in den CD158b+/- Subsets

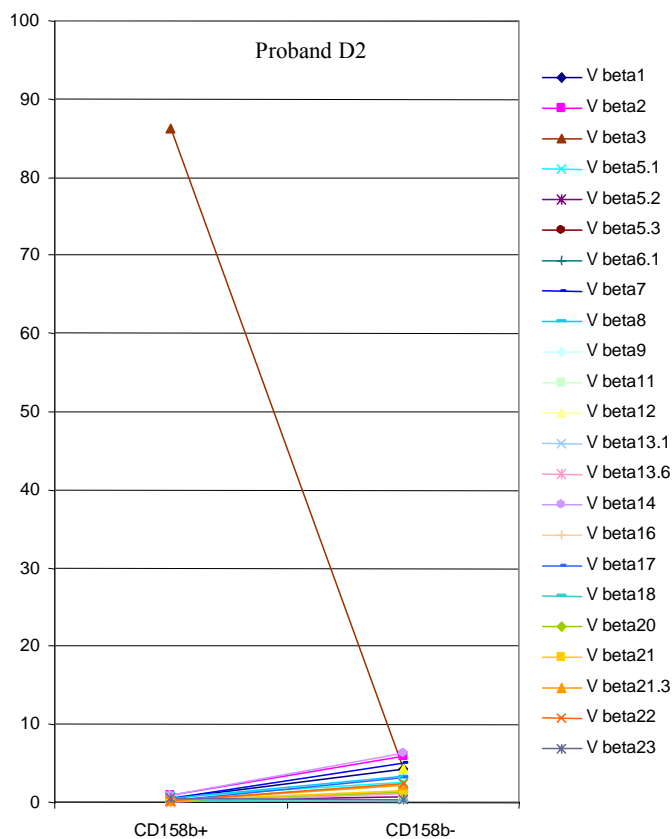


Abb. 16: Darstellung eines repräsentatives Experimentes, Proband D2: Verteilung des prozentualen Anteils jeweiliger V β -Familien in den Subsets der CD158b positiven und CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten. V β -Familie 3 ist mit > 80% in der CD158b positiven Population expandiert. In der CD158b negativen Population findet sich keine überproportional expandierte V β -Familie.

3.5 Ergebnisse der klonspezifische PCR

Um in einer weiteren Methode HCMV-spezifische T-Lymphozyten unter den CD158b positiven zu identifizieren wurden HCMV-spezifische CD8⁺ T-Zell-Klone von zwei Probanden durch die sogenannte Limiting-Dilution Methode (LDA) gewonnen und die hypervariablen Region ihrer TCR sequenziert. Zunächst wurden Klone spezifisch für HCMV aus dem LDA auf ihrer Verwendung bestimmter V β -Familien hin untersucht. Dazu wurde aus den Zellen der jeweiligen Klone die mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben, mit Hilfe V β -spezifischer Primer vervielfältigt und elektrophoretisch aufgetrennt. Dies wurde auf einem Agarose-Gel sichtbar gemacht. Abb.17

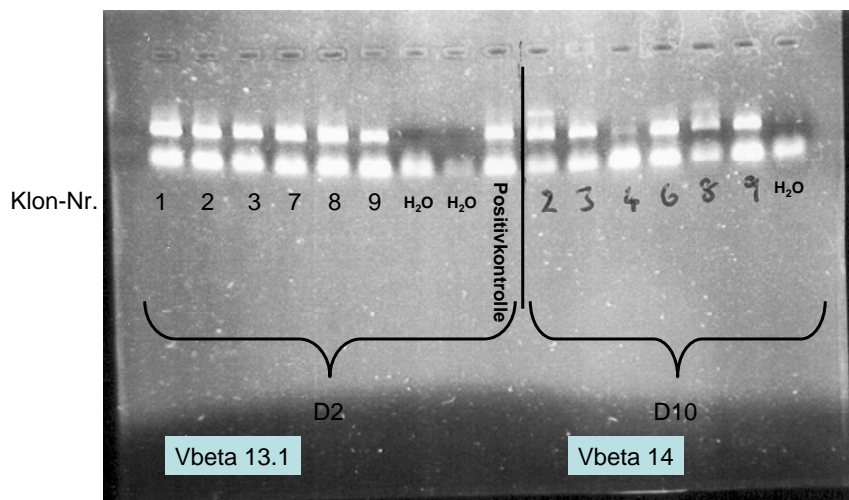


Abb. 17: Nachweis der V β -spezifisch-amplifizierter c-DNA aus jeweils 6 verschiedenen Klonen von Proband D2 und D10. Proband D2 zeigt eine ausreichende Amplifikation in Klon 1, 2, 3, 7, 8 und 9; Proband D10 zeigt eine ausreichende Amplifikation von Klon 2, 3, 6, und 9.

Bei Proband D2 wurden die cDNAs aller aufgetragenen Klone, bei Proband D10 wurden die cDNAs der Klone 2, 3, 6, 9 aufgereinigt und wieder mittels Agarose-Gel überprüft. Abb.18

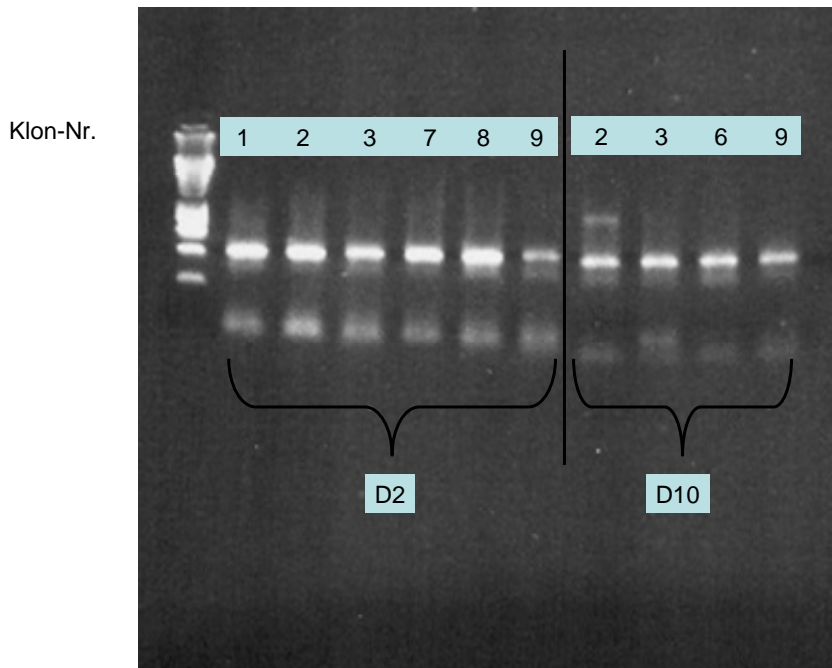


Abb. 18: Nachweis der aufgereinigten c-DNA aus den ausgewählten Klonen von Proband D2 (Klon 1, 2, 3, 7, 8 und 9) und D10 (Klon 2, 3, 6, und 9).

Ein Anteil verdünnter cDNA wurde zur Sequenzierung des TCR verwendet.

Drei peptidspezifische Klone von Proband D10, die alle V β -14 TCR benutzten, wurden isoliert. Alle drei unabhängig voneinander gefundenen Klone hatten eine identische Sequenz der hypervariablen Region exprimiert. Dies bestätigte frühere Beobachtungen von Weekes et al., dass CTL spezifisch für pp65 einer klonalen Selektion unterliegen [66]. Anhand der Sequenz der hypervariablen Region wurden komplementäre Sonden hergestellt (siehe unten). Frische PBMC von D10 und D2 wurden in CD158b positive und CD158b negative T-Zellen sortiert. Die cDNA dieser Subpopulationen wurden nun jeweils einer V β -Familien-spezifischen PCR zugeführt und amplifiziert. Abb.19 zeigt die ethidiumbromidgefärbte cDNA von Proband D10 bei dem in der CD158b+ Subpopulation keine Amplifikation der entsprechenden V β -Familie sichtbar war. In Abb.20 ist das entsprechende V β 13.1-Amplifikat in den Subpopulationen dargestellt und in der CD158b+ Subpopulation zeigte sich eine kaum sichtbare Amplifikation der entsprechenden V β -Familie.

D10 Vbeta 14

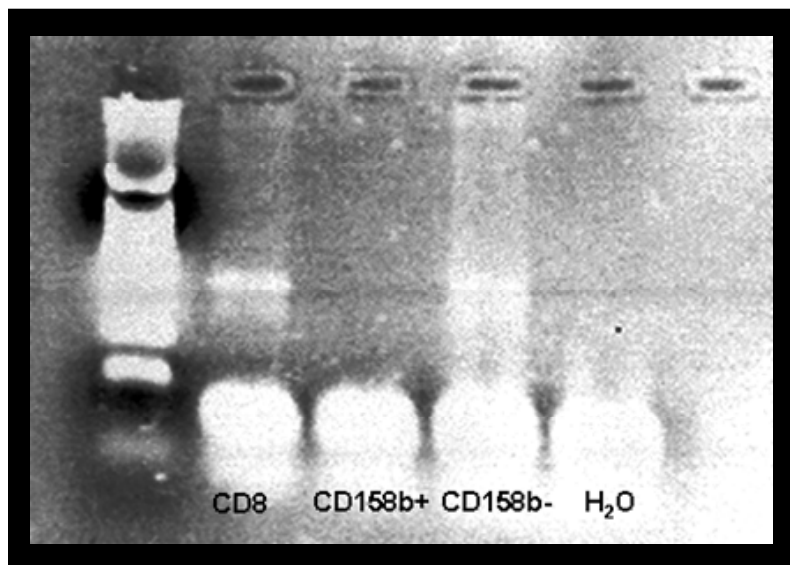


Abb. 19: V β -spezifische Amplifikation der cDNA der Subpopulationen CD8, CD8⁺ und CD158b⁺ sowie CD8 und CD158b⁻ von Proband D10. Abbildung der ethidiumbromidgefärbten DNA.

D2 Vbeta 13.1

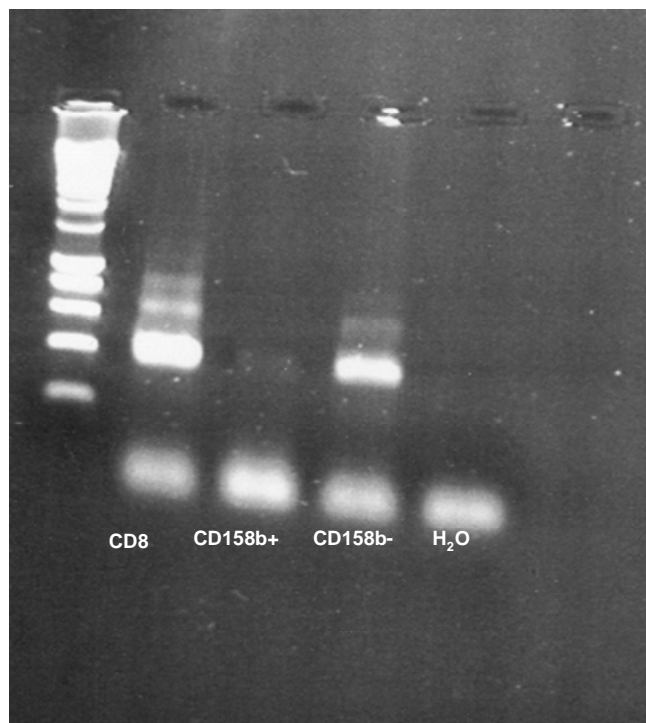


Abb. 20: V β -spezifische Amplifikation der cDNA der Subpopulationen CD8, CD8⁺ und CD158b⁺ sowie CD8 und CD158b⁻ von Proband D2. Abbildung der ethidiumbromidgefärbten DNA.

Die Amplifikate wurden auf Nylonfolter geblottet. Mit den radioaktiv markierten Sonden (komplementär zu der hypervariablen Region aus der Sequenzierung der drei Klone) wurden die Blots inkubiert. Dann wurde der Blot wieder aufgenommen und mit Sonden der β -Kette der konstanten Region des TCR (C β) erneut inkubiert. Dann wurde die Menge des jeweiligen Klones in den Populationen quantifiziert und verglichen. Tab. 5, Tab. 6

Tab. 5: Ergebnisse klonspezifische PCR, Proband D10

D10	counts Klon-spezifisch	counts C-Beta	% Klon in V-Beta ^{*1}
CD8+	2632	11800	0,16
CD158b+	0	358	0
CD158b-	1731	7277	0,17
Positivkontrolle	29778	21301	100
Negativkontrolle	296	16042	1,3

* 1 errechnet nach der Formel:

$$\frac{\text{Testprobe cpm (Klonspezifisches Amplifikat)} / \text{Testprobe cpm (konstantes Amplifikat)}}{\text{Positivkontrolle cpm (Klonspezifisches Amplifikat)} / \text{Positivkontrolle cpm (konstantes Amplifikat)}}$$

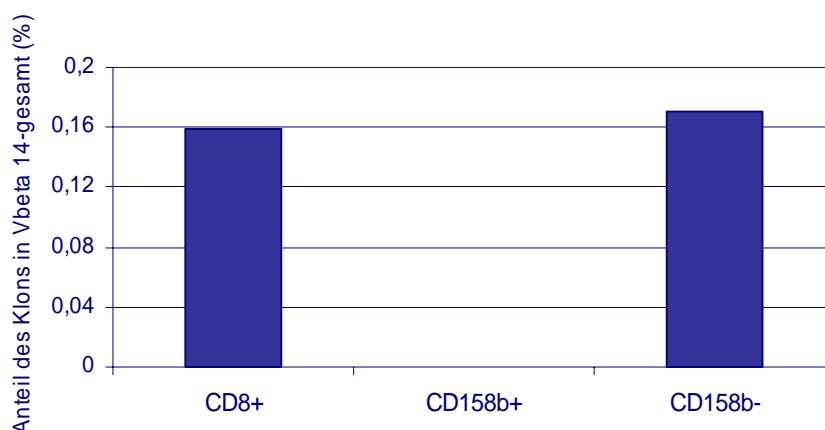


Abb. 21: Anteil klonspezifischer Amplifikate an den Gesamt-V β -Amplifikaten in den Subpopulationen CD8, CD8+ und CD158b+ sowie CD8 und CD158b – von Proband D10.

Tab. 6: Ergebnisse klon spezifische PCR, Proband D2

D2	counts Klon- spezifisch	counts C- Beta	% Klon in V- Beta ^{*1}
CD8+	117924	158723	191,8
CD158b+	1092	13986	20,2
CD158b-	10045	109405	23,7
Positivkontrolle	56500	145876	100
Negativkontrolle	80	6597	3,1

* 1 errechnet nach der Formel:

$$\frac{\text{Testprobe cpm (Klonspezifisches Amplifikat)} / \text{Testprobe cpm (konstantes Amplifikat)}}{\text{Positivkontrolle cpm (Klonspezifisches Amplifikat)} / \text{Positivkontrolle cpm (konstantes Amplifikat)}}$$

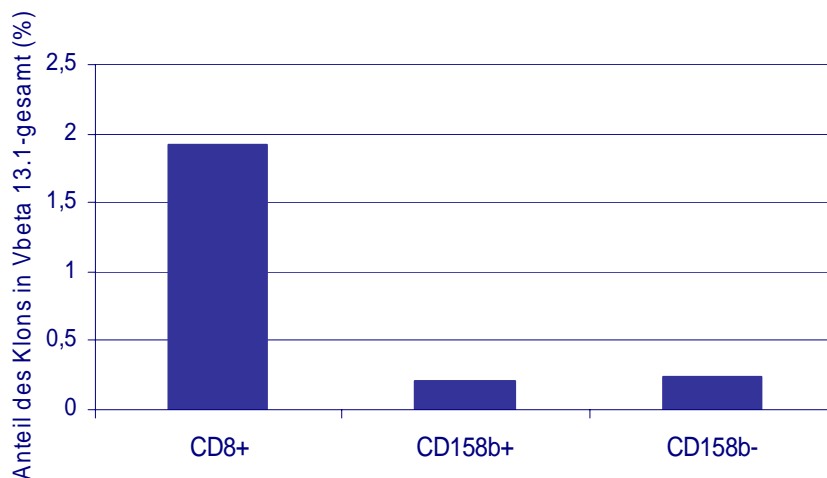


Abb. 22: Anteil klon spezifischer Amplifikate an den Gesamt-V β -Amplifikaten in den Subpopulationen CD8, CD8+ und CD158b+ sowie CD8 und CD158b – von Proband D2

Bei Proband D10 wurden in den V β -spezifischen Amplifikaten aus der CD158b-negativen Population im Gegensatz zu denen aus der CD158b positiven Population PCR-Produkte mit klon spezifischen Sonden detektiert. Diese gaben ein radioaktives Signal ab welches mittels Gamma-Kamera quantifiziert wurde. Diese Ergebnisse wurden auf die

entsprechenden Ergebnisse der Radioaktivität der Sonden für den konstanten Teil der β -Kette des TCR bezogen. In Abb. 21 sowie Tab. 5 sind die Ergebnisse von Proband D10 dargestellt. In Abb. 22 und Tab. 6 sind die Ergebnisse von Proband D2 dargestellt. Bei Proband D2 zeigte sich kein eindeutiger Unterschied zwischen den beiden Populationen CD158b positiv und CD158b negativ. Die Dokumentation auf Röntgenfilm ist in Abb.23 dargestellt.

D10
Vbeta 14

D2
Vbeta 13.1

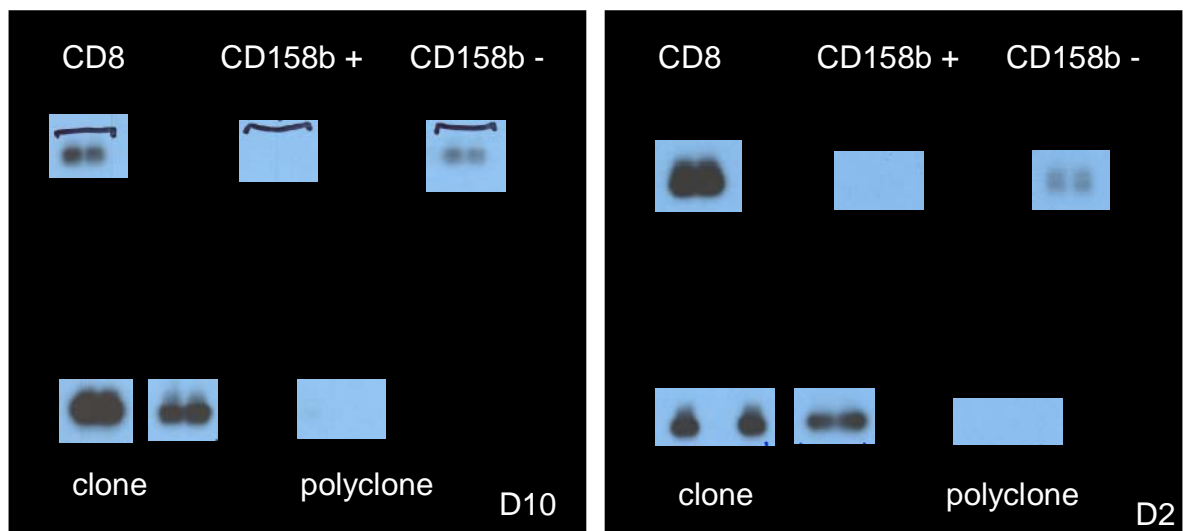


Abb. 23: Ausschnitte des auf Röntgenfilm dokumentierten Ergebnisses des Nachweises klonspezifischer PCR-Produkte in den Subpopulationen CD8, CD8+ und CD158b+ sowie CD8 und CD158b – von Proband D2 und D10. Alle PCR-Produkte wurden in Doppelbestimmung nachgewiesen. Die mit „Clone“ bezeichneten Spots stellen die Positivkontrolle dar, die jeweils zusätzlich in Zweifachbestimmung durchgeführt wurde. Bei D2 liegen die zwei Spots der Doppelbestimmung getrennt. Bei allen übrigen direkt nebeneinander. Die mit „Polyclone“ bezeichneten Spots sind die Negativkontrolle. Durch längere Exposition des Films kommt es zu Überlagerungen der einzelnen Spots.

Bezieht man die Ergebnisse der klonspezifischen PCR auf das Vorhandensein der entsprechenden $V\beta$ -Kette in der Gesamt-CD8-T-Zell-Population (flowcytometrische Daten) so erhält man einen deutlicheren Unterschied zwischen CD158b positiver und CD158b negativer Subpopulation. Tab.7, Abb. 24

Tab. 7: Ergebnisse klonsspezifische PCR, Proband D2, bezogen auf das Vorhandensein von Vβ in der CD8+-Gesamtpopulation

D2	counts	counts C-	% Klon in	% V-beta in	% Klon in
Phänotyp	Klon	Beta	V-Beta ^{*1}	CD8 ^{*2}	CD8
CD8+	117924	158723	191,8	3,9	7,48
CD158b+	1092	13986	20,2	0,66	0,13
CD158b-	10045	109405	23,7	4,1	0,97
Positivkontrolle	56500	145876	100		
Negativkontrolle	80	6597	3,1		

* 1 errechnet nach der Formel

$$\frac{\text{Testprobe cpm (Klonspezifisches Amplifikat)} / \text{Testprobe cpm (konstantes Amplifikat)}}{\text{Positivkontrolle cpm (Klonspezifisches Amplifikat)} / \text{Positivkontrolle cpm (konstantes Amplifikat)}}$$

* 2 Ergebnis der flowcytometrischen Messung

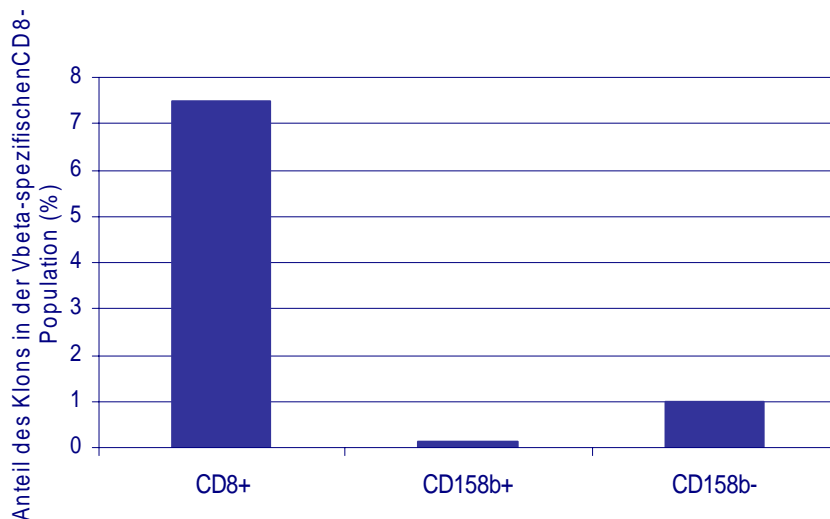


Abb. 24: Korrigierter Anteil klonsspezifischer Amplifikate an den Gesamt-Vβ-Amplifikaten in den Subpopulationen CD8, CD8+ und CD158b+ sowie CD8 und CD158b- von Proband D2.

Zusammen mit den erfassten Daten auf Röntgenfilm konnte für zwei Probanden gezeigt werden, dass auch mit dieser Technik deutlich weniger HCMV-spezifische CD8 T-Zellen in der CD158b positiven Subpopulation gefunden werden.

4 DISKUSSION

4.1 Allgemein

Die T-zellvermittelte Immunität nimmt eine zentrale Stellung in der Abwehr gegen bakterielle und insbesondere virale Erreger ein. Sie ist hinsichtlich ihrer großen Variabilität und damit Flexibilität ein erstaunliches System, mit der Fähigkeit relativ schnell und effektiv das fremde Agens zu eliminieren. Die Möglichkeit der antigenspezifischen Expansion erlaubt den T-Lymphozyten einerseits mit zahlreichen anderen Teilen des Immunsystems zu kommunizieren und andererseits durch cytotoxische T-Lymphozyten pathogene Erreger direkt zu eliminieren. Die T-zellvermittelte Immunität muss deshalb, um überschießende und fehlgesteuerte Immunantworten zu vermeiden, ein fein reguliertes System sein. Ein interessantes Phänomen ist die Ausbildung des immunologischen Gedächtnisses, das bei wiederholten Infektionen mit dem gleichen Erreger für eine effektivere und schnellere Immunantwort sorgt.

4.2 KIR und HCMV spezifische T-Lymphozyten

Welche Funktionen und welche Mechanismen der Expression von NKR auf T-Lymphozyten zugrunde liegen, ist nicht vollständig erklärt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob CD8 T-Lymphozyten aus frisch isolierten PBMC, die spezifisch für HCMV sind, auch KIR tragen bzw. ob diese funktionell relevant sind. Anlass zu dieser Überlegung gaben Erkenntnisse, dass KIR-exprimierende T-Lymphozyten hauptsächlich CD8 T-Lymphozyten sind und meist einen ähnlichen Phänotyp wie antigenerfahrene bzw. Memory- T-Zellen aufweisen mit Expression von CD57, sowie dem Verlust der Expression von CD28 und CD27. Andere Studien haben teils an *in vitro* expandierten T-Zell-Klonen, teils an *ex vivo*-

Untersuchungen, sowohl CD8+ [6, 69] als auch CD4+ [70] T-Lymphozyten spezifisch für verschiedene virale [17] und Tumorantigene [20, 21, 71] NKR-Expression nachweisen können. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Expression und Funktion von HCMV-spezifischen T-Lymphozyten und in verschiedenen methodischen Ansätzen wurde gezeigt, dass HCMV-spezifische T-Lymphozyten in der CD158b positiven Population deutlich unterrepräsentiert sind.

Die Untersuchung der **Expression von KIR** und die Co-Expression mit anderen Oberflächenmolekülen auf HCMV-spezifischen T-Lymphozyten bestätigte zum einen die bekannte interindividuelle Variabilität in der Expression und zum anderen den Charakter antigenerfahrener CD8 T-Lymphozyten bei gesunden Probanden. CD158b wurde auf bis zu 30% der CD8 T-Lymphozyten exprimiert, wobei CD158a nur zu einem weitaus geringeren Prozentsatz auf CD8 T-Lymphozyten bei den hier untersuchten Probanden vorhanden war. Auf bis zu 15 % der CD158b positiven T-Lymphozyten wurde CD158a co-exprimiert. Es zeigten sich aber in der Ausprägung interindividuelle Unterschiede. CD158b ist ein typischer und der mit am häufigsten exprimierte NKR aus der Familie der Ig-like-Rezeptoren beim Menschen.

CD158b positive T-Zellen sind zum überwiegenden Teil CD27 negativ und CD57 positiv. Die Expression von CD57 war im Mittel 63,3 % und die Expression von CD27 war im Mittel 27%. Die Expression von CD57 bzw. der Verlust von CD27 repräsentieren einen Memory-Phänotyp, der nach Stimulation mit Antigen auftritt. Die Expression von CD57 ist mit dem späten Stadium der Enddifferenzierung von CD8 T-Lymphozyten assoziiert. Der Verlust von CD27 ist dagegen ein Marker der frühen Gedächtniszellen und ist zwar im Verlauf der Differenzierung von CD8 T-Lymphozyten vermindert exprimiert, jedoch nicht ganz verschwunden. Die Herunterregulierung des CD27-Moleküls kann den Verlauf der Enddifferenzierung anzeigen. CD27 negative CD8 T-Lymphozyten tragen häufiger CD57 und, wogegen CD27^{intermediate} exprimierende T-Lymphozyten weniger häufig CD57 exprimieren [72]. CD27 negative CD8 T-Lymphozyten sind die am weitesten ausgereifte T-Lymphozyten und zeigen ausgeprägte Effektorfunktionen.

Zunächst wurde die Cytokinproduktion (IFN- γ) CD8+ T-Lymphozyten nach **Stimulation** mit ausgewählten **HCMV-Peptiden** getestet. Dieser Test ist hochspezifisch und gebunden an das Vorhandensein eines passenden TCR in einem gegebenen HLA-Kontext des Probanden [73]. Es wurden Probanden mit serologisch positivem HCMV-Nachweis und bekannter Reaktivität auf HCMV-Peptide ausgewählt [74]. Die Experimente haben gezeigt, dass signifikant mehr HCMV-spezifische T-Lymphozyten in der CD158b negativen und

keine oder eine sehr geringe Zahl in der CD158b positiven Subpopulation der CD8 T-Lymphozyten vertreten sind. Aus dem experimentellen Ansatz der Stimulation von CD8 T-Lymphozyten *ex vivo* ergeben sich zwei Möglichkeiten der Erklärung. NKR inhibieren die Aktivierung von T-Lymphozyten. Die Aktivierung von T-Lymphozyten stellt eine Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen dar [75]. Moleküle, die ITIM-Sequenzen besitzen, so auch NKR, setzen die Schwelle der Zellaktivierung herauf. Diese kann durch verstärkte aktivierende Signale, z.B. Menge des Antigen und stimulierende zum Teil quervernetzte monoklonale Antikörper, wieder durchbrochen werden [76]. Phillips et al. konnten zeigen, dass T-Zellklone reaktiv auf SEB-bedeckte Zielzellen durch die Expression des KIR NKB1 eine verminderte spezifische Cytotoxizität aufweisen [13]. Ferrini et al. fanden ebenfalls eine Abschwächung der „anti-CD3-redirected Lysis“ bei cytotoxischen T-Zellklonen durch Quervernetzung von CD158-Molekülen [14]. Bei dem Modell der *ex vivo*-Stimulation von PBMC, werden die Peptide von Zellen präsentiert, die MHC-I-Moleküle an ihrer Oberfläche tragen. Daher kann die spezifische Aktivierung der CD158b positiven CD8 T-Lymphozyten eben durch CD158b- und MHC-I-Interaktion inhibiert sein. Bei allen Probanden waren die entsprechenden Liganden für CD158b (HLA-Cw1, Cw3, Cw7, Cw8, Cw12, Cw13, Cw14, Cw16) (siehe Tab. 1.2.3) vorhanden. Ebenso können weitere NKR, die hier nicht untersucht wurden, mit ihren Liganden Interaktionen eingegangen sein und die IFN- γ -Produktion inhibiert haben. Die Interaktion kann durch Blockade des MHC-I-Moleküls und des CD158b-Moleküls mit entsprechenden Antikörpern unterbunden werden [12, 15]. Zudem kam es durch die Blockade nicht nur zu einer Retablierung der Cytokinproduktion, sondern auch zu einer vermehrten Cytokinproduktion. Die vollständige Blockade der HLA-I-Moleküle sollte aber auch die Präsentation des spezifischen Antigens durch MHC-I-Moleküle verhindern, und konnte deshalb hier nicht angewendet werden. Ein anderer Grund, warum man keine HCMV-spezifischen CD8 T-Zellen unter den KIR+ findet, kann darin liegen, dass die Subpopulation von HCMV-spezifischen Memory-Effektorzellen keine KIR exprimiert. Dies kann dadurch bedingt sein, dass nur T-Zellen mit bestimmten V β -Familien bei Aktivierung mit HCMV angesprochen werden [66] und selektiv expandieren, während bei KIR+ T-Lymphozyten, möglicherweise andere Antigene andere V β -Familien ansprechen.

Der Vergleich der Stimulation mit **bakteriellem Antigen (SEB)** und HCMV-Peptiden zeigt eine ähnliche Verteilung. Bei den meisten Probanden zeigt sich eine spezifische Cytokinproduktion in der CD158b negativen Population. Es handelt es sich auch hier um einen TCR-vermittelten Stimulus. SEB aktiviert oligoklonale Populationen von vor allem CD4 aber auch CD8 T-Lymphozyten zu einem deutlich größeren Prozentsatz als HCMV-

Einzelpeptide. Interessanterweise finden sich bei einem Probanden (D5) mehr IFN- γ -produzierende CD8 T-Zellen in der Population der CD158b positiven als in der CD158b negativen T-Lymphozyten. Alle Probanden exprimieren entsprechende Liganden für CD158b auf ihrer Oberfläche. Geht man also davon aus, dass die Cytokinproduktion in der CD158b positiven Subpopulation durch KIR-MHC-I-Interaktion inhibiert ist, so gibt es dabei offensichtlich Ausnahmen. D'Andrea et al. [15] stimulierten NKB1 positive mit MHC-I-negativen mit HLA-B*5801-tranfizierten antigenpräsentierenden Zellen co-kultivierten T-Lymphozyten (CD4 und CD8) *in vitro* mit SEB und beobachteten eine verminderte Cytokinproduktion, die durch anti-MHC-I- und anti-NKB1-Antikörper wiederhergestellt bzw. vermehrt werden konnte. Diese *in vitro* an genetisch modifizierten T-Zell-Klonen gefundenen Daten scheinen *in vivo* nur teilweise realisiert zu sein und nicht unbedingt für alle NKR-tragenden CD8 T-Lymphozyten zuzutreffen. Diese Beobachtung machten auch Vely et al. [6] bei KIR+-T-Zell-Klonen, die eine nur partiell verminderte Aktivierung durch EBV-Peptide zeigen. Die Ausprägung der KIR-vermittelten inhibitorischen Effekte muss also von mehreren Faktoren abhängen. Hierbei sind die Avidität der TCR-Liganden-Bindung sowie der generellen Effektor-Zielzell-Interaktion zu nennen. *In vivo*-Untersuchungen in CD158b-transgenen Mäusen zeigten keine verminderte Aktivierung von T-Lymphozyten. Die physiologische Funktion der KIR ist sehr komplex und lässt sich in einer *in vivo*-Situation nicht auf ein vereinfachtes System von Ligandeninteraktionen mit einer spezifischen Wirkung reduzieren [77]. In diesem einen Fall könnten aber auch einfach CD158b-Moleküle von den SEB-reaktiven T-Lymphozyten exprimiert sein und aber keine funktionelle Einschränkung der T-Zellaktivierung bedingen, sondern ein phänotypisches Merkmal einer Subpopulation sein. Auch wäre es denkbar, dass durch die Zugabe von relativ großen Mengen Antigen die Schwelle der inhibitorischen Wirkung überwunden worden sein könnte.

Der Vergleich der Stimulation mit immobilisierten **Antikörper gegen CD3** ergab signifikant mehr reaktive CD8 T-Lymphozyten in der CD158b positiven Subpopulation. CD158b positive T-Lymphozyten sind also nicht *per se* unstimulierbar. Anti-CD3-Antikörper erkennen die CD3 ϵ -Kette des CD3-TCR-Komplexes als Antigen und erreichen durch Quervernetzung eine mitogen-ähnliche Proliferation. Sie bewirken in vielen Fällen den so genannten AICD, eine starke Cytokinausschüttung, sowie eine dauerhafte Anergie. Anti-CD3-Antikörper haben sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkung auf den CD3-TCR-Komplex. Zum einen sollen diese starken aktivierenden Signale durch Quervernetzung der Fc-Teile des Antikörpers durch Fc-Rezeptor-positive Zellen verursacht sein. Zum anderen nimmt man auch eine direkt stimulierende Wirkung der Antikörper-TCR-Bindung an, bei der

es zu Aktivierung von Tyrosinkinase kommt. Auf diesem Weg können alle TCR-CD3-Komplex-tragender T-Zellen aktiviert werden. Eine solche massive Aktivierung des T-Zell-Systems, führt zum Absterben vieler aktivierter T-Zellen und zur Modulation der Immunantwort [78]. Diese Schwächung des Immunsystems wird bei der Verhinderung der Abstoßungsreaktion allogener Organtransplantate therapeutisch genutzt [79]. Die Freisetzung von Cytokin (IFN- γ) nach Stimulation mit OKT3 lag zwischen 1% und 21%. Bei der Stimulation mit OKT3 *in vitro* kann es möglicherweise auch zum Absterben aktivierter T-Lymphozyten gekommen sein. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung unterstützt, dass die zur Messung kommenden Zellen weitaus geringer waren als bei den übrigen Stimulationsversuchen. Es könnten aber durch die Maskierung des CD3-Moleküls weniger T-Lymphozyten für die Auswertung zur Verfügung gestanden haben. Wahrscheinlich aber ist, dass durch die massive Aktivierung gerade diese T-Lymphozyten durch Expression von Adhäsionsmolekülen fester an künstlichen Oberflächen haften und damit falschniedrige Cytokinkonzentrationen gemessen wurden. Ein weiterer Grund für die vergleichsweise geringe Cytokinfreisetzung könnte die mangelnde Quervernetzung durch Fc-tragende Zellen in einem ungenügenden Verhältnis zwischen PBMC und OKT3-Konzentration sein. In unseren Ansatz wurden ca. 5×10^6 PBMC inkubiert, was zu einer ausreichenden Anzahl Fc-tragender Zellen führen sollte.

Die **Stimulation mit PMA** und HCMV-Peptiden zeigte eine deutliche Aktivierung von CD8 T-Zellen in beiden Subsets. Bis zu über 90% der CD8 T-Lymphozyten zeigten eine Aktivierung. Die Stimulation mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) und dem Ca- Ionophor Ionomycin führt zu einer Aktivierung von Molekülen der Signaltransduktionskette die an den TCR gekoppelt ist. In diesen Signaltransduktionsweg sind verschiedene Kinasen, wie Protein-Tyrosin-Kinase (PTK), Protein-Kinase C (PKC), sowie Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen (MAP-Kinasen), die die Verbindung zwischen den beiden vorher genannten herstellen, involviert. Wichtig für die Aktivierung von T-Zellen ist das Zusammenspiel von aktivierten Kinasen und intrazelluläre Ca-Mobilisierung. Deshalb werden für die Stimulation Phorbol-Myristat-Acetat (Aktivierung der PKC) und Calcium-Ionophor (Ca-Mobilisierung) zusammen eingesetzt [62, 63]. Ähnlich wie bei der Stimulation mit anti-CD3 sprechen die Ergebnisse dafür, dass CD158b positive T-Lymphozyten nicht allein aufgrund der Expression von KIR nicht oder vermindert aktivierbar sind. Vielmehr scheint die Interaktion von TCR und Peptid/MHC-Komplex, sowie KIR und MHC-Molekül und weiterer co-stimulatorischer Moleküle für die Aktivierung oder Inhibition bzw. Anergie verantwortlich zu sein.

Bei der direkten Untersuchung der CD8 T-Zellen mittels fluoreszenz-gelabelter mit HCMV-Peptid beladener **MHC-Tetramer-Komplexen** wurde die Cytokinproduktion spezifischer Zellen umgangen. Grundsätzlich werden aber mit beiden Methoden vergleichbare Zahlen virusspezifischer T-Lymphozyten gefunden [80]. Wie auch bei der peptidspezifischen Kurzzeitstimulation fanden sich auch hier signifikant weniger HCMV-spezifische CD8 T-Lymphozyten in der CD158b positiven Subpopulation als in der CD158b negativen Subpopulation. Die Experimente haben gezeigt, dass bei den meisten untersuchten Probanden peptidspezifischen T-Lymphozyten letztlich in der CD158b positiven Population deutlich unterrepräsentiert sind. Nicht klar beweisbar ist, dass gar keine peptidspezifischen T-Zellen dort vertreten sind. Hier zeigte sich die Schwierigkeit der Hintergrundfärbung bzw. der unspezifischen Aktivierung, die bei der Detektion von kleinen Populationen bzw. Häufigkeiten ein erhebliches Problem darstellt. Das Problem der Hintergrundfärbung, die bei der Markierung von Zellen und Oberflächenmolekülen durch monoklonale Antikörper und Tetramer-Komplexen auftritt, wird durch unspezifische Bindung der Antikörper / Tetramerkomplexe an vor allem tote Zellen verursacht. Tote Zellen binden unspezifisch Antikörper und Tetramerkomplexe in jeder möglichen Intensität. Sie zeigen sich in jeder Fluoreszenz in linearer Verteilung. Das ermöglicht deren Identifizierung und somit lässt sich unspezifische Färbung aus den Gates zum großen Teil ausschließen. Liegt die Linie nun genau in der zu erwartenden spezifisch gefärbten Population und ist diese Population sehr klein, wird die Prozentzahl möglicherweise stark durch die unspezifische Färbung beeinflusst. Bei den Stimulationsversuchen ließ sich dieser Effekt weitestgehend durch Subtraktion der unstimulierten (aber ebenso inkubierte) Kontrolle minimieren. Bei Färbung mit Tetramer-Komplexen tritt eine größere Hintergrundfärbung auf, da die Färbeprozedur empfindlicher auf Temperaturschwankungen reagiert [81]. Eine entsprechende Negativkontrolle fehlt, da nicht peptidgeladene MHC-Moleküle instabil sind. Es wäre auch möglich ein Tetramer, das ein irrelevantes Peptid gebunden hat, einzusetzen. Die Färbung mit Tetramer-Komplexen spezifisch für z.B. HIV-Peptide und die Färbung bei HIV-negativen Individuen wurde im Rahmen dieser Studie nicht durchgeführt. Sichtbar wird das Problem bei den Probanden D5 und D11 in Abb.6. Die sowohl CD158b+ und auch Tetramer+ T-Zellen sind in absoluten Zahlen weniger als 10 Events, entsprechen prozentual 0,57% und 0,72% der CD158b positiven CD8 T Lymphozyten. Bei diesen geringen Zahlen ist es nicht möglich mit Sicherheit eine Aussage darüber zu treffen, ob es sich um spezifisch gefärbte Zellen handelt. Ohne vorherige Anreicherung von spezifischen T-Lymphozyten war zu dieser Untersuchung durch die begrenzte Verfügbarkeit des Materials keine weitere Erhöhung der Spezifität

möglich. Die statistische Analyse der Daten weist jedoch auf einen Trend hin. Die Daten sprechen dafür, dass die Expression von CD158b, als häufigen Vertreter der KIR, nicht einfach ein Zeichen der späten Differenzierung in Memory-Effektor-Zellen ist und dass KIR+ T-Lymphozyten eindeutig weniger in der Population der HCMV-spezifischen T-Lymphozyten vertreten sind.

In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, dass die Expression von KIR mit der Expression von TCR mit Nutzung bestimmter **V β -Ketten** assoziiert ist. Dies lässt die Vermutung zu, dass es sich um Zellen handelt, die während der Fokussierung der Immunantwort oder durch Fokussierung der Immunantwort entstanden sind. Es ist bekannt, dass Memory-Zellen, spezifisch für virale, bakterielle und Tumorantigene, sich durch eine restriktive Verwendung von V β -Ketten des TCR auszeichnen [37]. Die CD158b positiven CD8 T-Lymphozyten, der von uns untersuchten Probanden, zeigten eine ebensolche Restriktion. Bei zwei Probanden (D2 und D12) findet sich in der CD158b positiven Population eine starke Expansion von T-Zellen, die V β 3-Kette exprimieren. Beiden Probanden ist die Expression von HLA-A2 und HLA-Cw3 gemeinsam, aber auch andere Probanden haben diese Kombination, sodass man keine direkten und konkreten Schlüsse auf den erforderlichen HLA-Kontext für die Expansion bestimmter V β -Ketten in der KIR positiven Population ziehen kann. Neben V β 3 ist die Vermehrung anderer V β -Familien zu finden: V β 5.1, V β 5.3, V β 13.1, V β 14, und V β 21.3. Bei Proband D10 scheint eine große Lücke zwischen den von uns erfassten V β -Familien und der CD158b-Gesamtpopulation zu sein. Diese Beobachtung ergibt sich aus der Diskrepanz von den gegenwärtig phänotypisch mit monoklonalen Antikörpern detektierbaren (ca. 70%, n = 22) und den genotypisch ermittelbaren (100%, n = 32) V β -Familien [68]. Mit den von uns verwendeten Antikörpern ist keine Expansion einer V β -Familie sichtbar. Aber die bei Proband D10 dargestellten V β -Familien machen insgesamt weniger als 25% der Gesamtpopulation CD158b+ CD T-Lymphozyten aus. Die nicht detektierten V β -Familien müssen also demgegenüber vergleichsweise stark expandiert sein. Es kann auch hier von einer klonalen Expansion der T-Lymphozyten ausgegangen werden.

Die Restriktion auf bestimmte V β -Familien könnte das Ergebnis der Fokussierung der T-Zell-Antwort in einem späten Differenzierungsstadium sein. Dabei stellte die Expression von KIR das phänotypische Merkmal dar. Die KIR positiven HCMV-spezifischen T-Zellen sollten dann eine reduzierte Diversität von T-Zell-Rezeptoren tragen, und demnach oligoklonal expandiert sein. Die mit spezifischer Antigenstimulation erhobenen Daten

sprechen gegen eine solche Hypothese. Es finden sich auch sonst kaum Hinweise auf ein oder das bestimmte Antigen, welches die KIR-Expression auslösen kann. Eine weitere Frage ist, ob die Fokussierung der T-Zell-Antwort aus dem wiederholten Antigenkontakt resultiert und so zu einer oligoklonalen Population führt, die in einem bestimmten Differenzierungsstadium CD158b oder andere NKR exprimiert, oder ob einige Antigene T-Lymphozyten bestimmter V β -Familien aktivieren und diese entweder gleichzeitig CD158b exprimieren oder nicht und wenn nicht, dies dann auch später nicht erwerben können.

Wie und wann genau die NKR-Expression im Laufe der Entwicklung der T-Lymphozyten induziert wird, ist nicht ganz klar. Die Expression von Ig-like-Rezeptoren ist sehr stabil und nicht durch Aktivierungsstatus und *in vitro*-Stimulation mit verschiedenen Cytokinen beeinflusst [6, 82]. Huard et al. berichteten, dass die NKR-Expression durch Bindung von Antigen an den TCR reguliert wird [82]. Wenn das Antigen fehlt, regulierten NKR+ CTL möglicherweise ihre NKR-Oberflächenexpression bis zum Verlust der inhibitorischen Funktion auf der Zelle herunter. Es wurde daher vorgeschlagen, dass diese Zellen spezifisch auf reaktivierte latente Viren reagierten und die NKR-Expression dann wieder hochreguliert wird. Es konnte bisher nur gezeigt werden, dass die Expression vom C-Lektin-Like-Rezeptor, CD94/NKG2A/B, durch Cytokine (IL15, TGF- β) induzierbar ist [83, 84], nicht aber die Expression von Mitgliedern der KIR-Familie. Mingari et al. konnten zeigen, dass IL-15 die Expression von CD94/NKG2A hochreguliert [83]. IL-15 wurde auch als das Cytokin beschrieben, welches bei der Proliferation von CD44 positiven CD8 T-Lymphozyten eine Rolle spielt und den AICD dieser Zellen verhindert. Als Resultat akkumulieren CD44+-Memory-T-Zellen [85]. NKR könnten an diesem Prozess wesentlich beteiligt sein. (siehe unten)

Wills et al. [55] konnten zeigen, dass CD8 T-Lymphozyten, die in Kultur mit CMV-infizierten Fibroblasten proliferieren, besonders die V β -Familien 13.1 und 14 tragen. Bei unseren Untersuchungen waren bei zwei Probanden in der CD158b-Subpopulation V β 13.1 und V β 14 expandiert mit je 9,5% (D3) und 25,5% (D6). Bei Proband D3 fanden sich klar mehr (>10x) HCMV-reaktive CD8 T-Lymphozyten in der CD158b negativen Population. Bei Proband D6 scheinen bei wesentlich geringerer Gesamtantwort die reaktiven Zellen in beiden Population gleich verteilt zu sein. Dies lieferte einen weiteren Hinweis, dass HCMV-reaktive möglicherweise nicht die T-Lymphozyten sind, die vornehmlich KIR exprimieren. Ein weiterer Grund für diese Unterschiede der beiden Studien liegt wahrscheinlich darin, dass jeweils andere Peptide von den T-Zellen der verschiedenen Probanden erkannt wurden.

Deshalb kann hier nur eine Aussage darüber getroffen werden, dass CD158b positive CD8 T-Lymphozyten nicht auf die Stimulation mit den hier verwendeten Peptiden reagieren. Dabei erscheint es verwunderlich, dass ausgerechnet durch die Peptide, die eine vorherrschende Stellung unter den Epitopen einnehmen und oligoklonale und auch klonale T-Zell-Expansion auslösen [74], hier keine Reaktion unter den KIR positiven hervorgerufen wird.

Von zwei ausgewählten Probanden wurden die Subpopulationen KIR+ und KIR- auf das Vorhandensein von **klonspezifischem (HCMV-spezifische Klone) TCR-Transkript** untersucht. Dazu wurde cDNA aus den jeweiligen Subpopulationen mit V β -spezifischen Primern amplifiziert und mit radioaktiv markierten Sonden detektiert und quantifiziert. Bei Proband D10 fanden sich keine klonspezifischen TCR-Transkripte in der CD158b positiven Population, wohl aber in der CD158b negativen. Bei Proband D2 fanden sich bezogen auf den Gesamtanteil von V β 13.1 an den CD8 T-Lymphozyten deutlich weniger Transkripte in der CD158b positiven Population als in der CD158b negativen. Das Verhältnis von HCMV-spezifischen CD8 T-Zellen in den Subpopulationen KIR+ und KIR- ist für Proband D2 zwischen klonspezifischer PCR (0,13% vs. 0,97%) und HCMV-Peptidstimulationsassay (0,03% vs. 0,78%) vergleichbar. Die Sortierung der Subpopulationen erfolgte mit einem flowcytometrisch basierten Zellsortierer. Dieser Vorgang ist genauso mit den oben beschriebenen methodisch bedingten Fehlern behaftet. Eine unspezifische Färbung führt zu einer Beimengung möglicherweise CD158b negativer T-Lymphozyten in die CD158b positive Population. Es wurde auf eine Reinheit der jeweiligen Population von < 90 % geachtet, welches bei größeren Subpopulationen wie CD45 RA / CD45 RO +/- oder CD28 +/- keine Auswirkungen auf die Ergebnisse hatte [55, 86]. Bei wiederum sehr kleinen Populationen wie CD158b +/- ist möglicherweise der Nachweis geringer Mengen klonspezifische PCR-Produkte bei Proband D2 durch methodisch bedingte geringe Vermengung der Subpopulationen bedingt. Diese Versuche lieferten jedoch den deutlichsten Hinweis darauf, dass KIR nur von einer sehr geringen Zahl HCMV-spezifischer T-Lymphozyten exprimiert wird.

Die Ergebnisse aller experimentellen Ansätze zusammen weisen deutlich auf eine unterschiedliche Verteilung von HCMV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten in den Subpopulationen CD158b positiv und CD158b negativ hin. Dies kann nicht allein durch den inhibitorischen Effekt der exprimierten KIR verursacht sein, da sich auch mit anderen Methoden als der peptidspezifischen Stimulation weniger HCMV-spezifische CD8 T-Zellen in der CD158b positiven Population nachweisen ließen. Vielmehr muss man annehmen, dass HCMV-spezifische T-Lymphozyten, die in verschiedenen Modellen erfasst wurden, geringe

oder keine Expression von KIR zeigen. Young et al. berichten die Expression von ILT/LIR, aber nicht von KIR auf HCMV-Tetramer-gefärbten T-Zellen [25]. KIR positive T-Zellen zeigen eine ähnliche Expression von Memory-Markern wie HCMV-spezifische Zellen. Warum sind nur wenige HCMV-spezifische Zellen KIR positiv? Es ist bekannt, dass die Expression von NKR auf T-Zellen nach dem Rearrangement des TCR auftritt [6] und es eine Restriktion bei der Verwendung von TCR-V β -Ketten gibt. Der Phänotyp KIR-positiver T-Zellen entspricht dem antigenerfahrener Memory-T-Zellen. Die in dieser Studie gefundenen Ergebnisse können mit der Hypothese vereinbart werden, dass NKR-Expression ein Übergangsstadium zwischen zentralen und /oder sekundären Effektorzellen darstellt. Somit ließe sich nur ein Teil der HCMV-spezifischen CD8-T-Lymphozyten im peripheren Blut nachweisen. Dazu kommt, dass ein nur geringer Prozentsatz dieser Zellen KIR exprimiert. Hierfür spräche auch die Tatsache, dass NKR positive T-Lymphozyten auch diverse Expressionsmuster von CD45-Molekülen RO / RA zeigen. Bisher wurde angenommen, dass NKR-positiv T-Lymphozyten überwiegend CD45RO und nicht CD45RA exprimieren [12] [25]. Eine kürzlich erschienene Publikation belegte, dass bei 10 verschiedenen Individuen entgegen bisherigen Ergebnissen CD158b positive T-Lymphozyten vor allem CD45 RA exprimieren [26]. Wills et al. konnten zeigen, dass bei HCMV-spezifischen CD8 T-Zell-Klonen *in vivo* eine Umkehrung der CD45 RA/RO-Expression bei der Reifung der Immunantwort stattfindet [55]. Diese Erkenntnisse und die Arbeiten weiterer Autoren, im Folgenden benannt, brachten die Hypothese hervor, dass NKR-Expression insbesondere KIR-Expression eine Rolle bei der Reifung und Differenzierung, sowie der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses der CD8 T-Zell-Immunantwort spielt. Arlettaz et al. [26] untersuchten den Effekt von CD158b auf zeitige Aktivierungssignale von T-Zellen. Sie beobachteten eine reduzierte Aktivierung und eine verminderte Anfälligkeit gegenüber dem AICD bei gleichzeitig verminderter Proliferation. Diese Zunahme überlebender antigenerfahrener Zellen korrespondiert mit der Zahl T-Zellen, die ein unzureichendes Signal zum Eintritt in den AICD und / oder in den Aktivierungsprozess, der zu Zellteilung führt, erhalten haben. Diese überlebenden Zellen unterliegen nicht der massiven Expansion, stellen aber einen geschützten Pool antigenerfahrener T-Zellen dar. Diese Zellen könnten die Grundlage des immunologischen Gedächtnisses bilden. Ugolini et al. [28] beobachteten in einem Mausmodell, mit transgener Expression von humanem CD158b und des entsprechenden Liganden, eine Akkumulation von Memoryzellen. *In vitro* fanden sie, dass die Bindung von NKR an MHC-I-Moleküle den AICD verhindert. Sie nehmen an, dass die überlebenden Zellen die Population von Gedächtniszellen darstellen. Auch Young et al. [69]

zeigten, dass KIR⁺ CD8 T-Zellen kaum dem AICD unterliegen. Sie schlagen das in Abb. 24 dargestellte Modell vor: Zellen, die dem AICD durch ein so genanntes Überlebenssignal, z.B. NKR-Interaktion, entgehen, werden dann zu Gedächtniszellen.

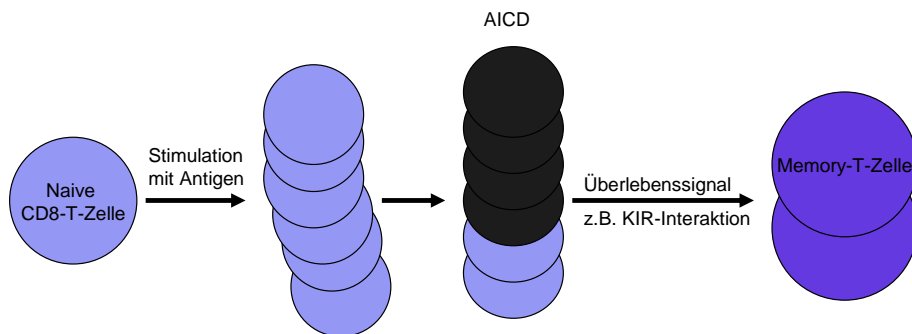


Abb. 25: Schematische Übersicht des Modells der Reifung der Immunantwort und der Ausbildung des immunologischen T-Zell-Gedächtnisses. Lebende Zellen: blau, tote Zellen: schwarz.

Das wirft die Frage auf, warum dann in Memory-Effektor-Populationen, wie hier dargelegt, so wenig bzw. keine NKR bzw. KIR auf spezifischen CD8 T-Lymphozyten nachzuweisen sind. Moser et al. untersuchten die Polyoma-Virus-Infektion in einem Mausmodell und schlagen einen direkten Differenzierungsweg vor, bei dem es zu einer Konversion von NKR⁺ zu NKR⁻ Memory-Zellen kommt, da unter den virusspezifischen CD8 T-Zellen wenige eine Expression des murinen NKR CD94-NKG2A zeigten. Im weiteren Verlauf sollen die NKR positiven T-Zellen zu sekundären Effektorzellen mit cytotoxischen Eigenschaften differenzieren [19]. Es ist kein Mechanismus bekannt, der zum Verlust der Expression von NKR führt, noch ist bisher an spezifischen T-Zellen so etwas gezielt untersucht worden. Es hat sich gezeigt, dass NKR-Expression auf T-Zellen zumindest *in vitro* sehr stabil ist. Nimmt man nun an, HCMV-spezifische T-Zellen, wie hier untersucht, stellen

eine „ältere“ Memory-Population dar, die ihre KIR-Expression eingeübt hat, so sind die wenigen bzw. nicht nachgewiesenen HCMV-spezifischen CD158b positiven T-Lymphozyten nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Infektion in größerer Menge nachweisbar. Dazu wäre es beispielsweise interessant KIR-Expression auf HCMV-spezifischen T-Zellen bei Patienten im Verlauf akuter HCMV-Infektionen, zum einen Primärinfektion, zum anderen Reaktivierung bei immunsupprimierten Patienten zu untersuchen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

HCMV-spezifische CD8 Memory T-Lymphozyten spielen bei der Kontrolle der Virusreplikation und dem Schutz gegenüber HCMV-bedingten Erkrankungen eine wichtige Rolle. Mit der direkten Bestimmung antigenspezifischer CD8 Memory T-Lymphozyten mittels peptidspezifischer Kurzzeitstimulation und anschließender flowcytometrischer intrazellulärer Cytokinbestimmung (IFN- γ) und der direkten Untersuchung virusspezifischer T-Zellen mittels Färbung mit HCMV-Peptid-MHC-Tetramer-Komplexen ergibt sich Möglichkeit der Phänotypisierung unterschiedlicher Subsets, sowie die Nachweis wichtiger Epitope in der Immunantwort gegen HCMV. In dieser Arbeit wurde die Expression des Killer-Inhibitory-Rezeptors CD158b auf spezifischen CD8 T-Lymphozyten gesunder Probanden mit diesen Methoden untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein größerer Teil der CD158b positiven CD8 T-Lymphozyten auf unspezifische mitogen-vermittelte Signale (PMA und OKT3) mehr IFN- γ produziert als unter den CD158b negativen CD8 T-Lymphozyten. Gleichzeitig aber zeigte nur ein kleinerer Teil bzw. nur einige wenige der CD158b positiven CD8 T-Lymphozyten eine Reaktion auf TCR-spezifische Stimuli, die eine oligoklonale Aktivierung bewirken durch Bevorzugung bestimmter V β -Familien (Stimulation mit SEB) oder aber auch klonale Aktivierung durch Viruspeptide. Der direkte Nachweis spezifischer Antigenerkennung durch Tetramer-Komplexe beladen mit Viruspeptiden ergab ebenfalls ein geringeres Auftreten von HCMV-spezifischen CD8 T-Lymphozyten in der CD158b positiven Subpopulation. Die Untersuchung V β -Familien in der CD158b positiven Subpopulation zeigte eine oligoklonale Expansion bestimmter V β -Familien. Diese waren aber nicht identisch

mit denen, die bei gegebenem HLA-Kontext bei der Infektion mit HCMV auftreten. Ebenso wenig konnten HCMV-klonspezifische TCR-Transkripte in CD158b positiven CD8 T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Die Beobachtung wurde, unter Beachtung methodischer Gesichtspunkte, als Merkmal im Verlauf der Generierung von Memory-T-Zellen diskutiert. Es lässt sich aus dieser Arbeit schlussfolgern, dass die Expression von CD158b nicht einfach ein Ausdruck der Antigenerfahrung von T-Zellen ist. Möglicherweise sind KIR in bestimmten Stadien der Entwicklung von Memory-T-Zellen gering exprimiert. Andererseits ist es wahrscheinlich, dass HCMV nicht das Antigen ist, welches bei gesunden Probanden zu einer KIR-Expression führt. Es wäre möglich, dass KIR negative HCMV-spezifische CD8 T-Lymphozyten nur bei Gesunden vorhanden sein, wohingegen bei Patienten mit einer HCMV-Erkrankung spezifische Zellen KIR exprimieren. Die konkrete Funktion des Moleküls auf der Oberfläche von CD8 T-Lymphozyten *in vivo* ist weiterhin unklar. Zur Aufklärung der funktionellen Aspekte *in vivo* sind weitere Untersuchungen nötig. Dabei wäre insbesondere interessant die Expression der NKR im Verlauf von HCMV-Infektionen und HCMV-Erkrankungen z.B. bei immunsupprimierten Patienten zu untersuchen. Hierbei könnten sich große Unterschiede zu den Ergebnissen bei gesunden Probanden ergeben und möglicherweise wesentlich mehr spezifische T-Lymphozyten auch NKR exprimieren. Untersuchungen der intrazellulären Signalkette der Aktivierung in T-Lymphozyten könnten Aufschluss über das Zusammenwirken von inhibitorischen und aktivierenden Signalen, abhängig vom jeweils vorhandenen Stimulus, geben.

6 Bibliographie

1. Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, et al., *Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines*. Annual Review of Immunology, 1999. **17**: p. 189-220.
2. Karre, K., H.G. Ljunggren, G. Piontek, et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. Nature, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
3. Raulat, D.H., R.E. Vance, and C.W. McMahon, *Regulation of the natural killer cell receptor repertoire*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 291-330.
4. Mason, D.Y., P. Andre, A. Bensussan, et al., *CD antigens 2001*. Tissue Antigens, 2001. **58**(6): p. 425-30.
5. Ugolini, S. and E. Vivier, *Regulation of T cell function by NK cell receptors for classical MHC class I molecules*. Curr Opin Immunol, 2000. **12**(3): p. 295-300.
6. Vely, F., M. Peyrat, C. Couedel, et al., *Regulation of inhibitory and activating killer-cell Ig-like receptor expression occurs in T cells after termination of TCR rearrangements*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2487-94.
7. Uhrberg, M., N.M. Valiante, N.T. Young, et al., *The repertoire of killer cell Ig-like receptor and CD94: NKG2A receptors in T cells: clones sharing identical alpha beta TCR rearrangement express highly diverse killer cell Ig-like receptor patterns*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3923-32.
8. Radaev, S. and P.D. Sun, *Structure and function of natural killer cell surface receptors*. Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure, 2003. **32**: p. 93-114.
9. Mason, D., P. Andre, A. Bensussan, et al., *CD antigens 2002*. Blood, 2002. **99**(10): p. 3877-80.
10. Janeway, C.A. and P. Travers, *Immunologie*. 5 ed. 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 597.
11. Bentley, G.A. and R.A. Mariuzza, *The structure of the T cell antigen receptor*. Annual Review of Immunology, 1996. **14**: p. 563-90.
12. Mingari, M.C., F. Schiavetti, M. Ponte, et al., *Human CD8+ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or*

- monoclonally expanded cell populations*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(22): p. 12433-8.
13. Phillips, J.H., J.E. Gumperz, P. Parham, et al., *Superantigen-dependent, cell-mediated cytotoxicity inhibited by MHC class I receptors on T lymphocytes*. Science, 1995. **268**(5209): p. 403-5.
 14. Ferrini, S., A. Cambiaggi, R. Meazza, et al., *T cell clones expressing the natural killer cell-related p58 receptor molecule display heterogeneity in phenotypic properties and p58 function*. European Journal of Immunology, 1994. **24**(10): p. 2294-8.
 15. D'Andrea, A., C. Chang, J.H. Phillips, et al., *Regulation of T cell lymphokine production by killer cell inhibitory receptor recognition of self HLA class I alleles*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 789-94.
 16. De Maria, A. and L. Moretta, *HLA-class I-specific inhibitory receptors in HIV-1 infection*. Hum Immunol, 2000. **61**(1): p. 74-81.
 17. Peacock, C.D., M.Y. Lin, J.R. Ortaldo, et al., *The virus-specific and allospecific cytotoxic T-lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus is modified in a subpopulation of CD8(+) T cells coexpressing the inhibitory major histocompatibility complex class I receptor Ly49G2*. J Virol, 2000. **74**(15): p. 7032-8.
 18. Zajac, A.J., R.E. Vance, W. Held, et al., *Impaired anti-viral T cell responses due to expression of the Ly49A inhibitory receptor*. J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5526-34.
 19. Moser, J.M., J. Gibbs, P.E. Jensen, et al., *CD94-NKG2A receptors regulate antiviral CD8(+) T cell responses*. Nat Immunol, 2002. **3**(2): p. 189-95.
 20. Speiser, D.E., D. Valmori, D. Rimoldi, et al., *CD28-negative cytolytic effector T cells frequently express NK receptors and are present at variable proportions in circulating lymphocytes from healthy donors and melanoma patients*. Eur J Immunol, 1999. **29**(6): p. 1990-9.
 21. Huard, B. and L. Karlsson, *A subpopulation of CD8+ T cells specific for melanocyte differentiation antigens expresses killer inhibitory receptors (KIR) in healthy donors: evidence for a role of KIR in the control of peripheral tolerance*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1665-75.
 22. Guerra, N., F. Michel, A. Gati, et al., *Engagement of the inhibitory receptor CD158a interrupts TCR signaling, preventing dynamic membrane reorganization in CTL/tumor cell interaction*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2874-81.

23. Mingari, M.C., A. Moretta, and L. Moretta, *Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses*. Immunol Today, 1998. **19**(4): p. 153-7.
24. Dietrich, J., M. Cella, and M. Colonna, *Ig-like transcript 2 (ILT2)/leukocyte Ig-like receptor 1 (LIR1) inhibits TCR signaling and actin cytoskeleton reorganization*. J Immunol, 2001. **166**(4): p. 2514-21.
25. Young, N.T., M. Uhrberg, J.H. Phillips, et al., *Differential expression of leukocyte receptor complex-encoded Ig-like receptors correlates with the transition from effector to memory CTL*. J Immunol, 2001. **166**(6): p. 3933-41.
26. Arlettaz, L., S. Degermann, C. De Rham, et al., *Expression of inhibitory KIR is confined to CD8+ effector T cells and limits their proliferative capacity*. European Journal of Immunology, 2004. **34**(12): p. 3413-22.
27. Sprent, J. and C.D. Surh, *Generation and maintenance of memory T cells*. Current Opinion in Immunology, 2001. **13**(2): p. 248-54.
28. Ugolini, S., C. Arpin, N. Anfossi, et al., *Involvement of inhibitory NKRs in the survival of a subset of memory-phenotype CD8+ T cells*. [erratum appears in Nat Immunol 2001 Jul;2(7):658]. Nature Immunology, 2001. **2**(5): p. 430-5.
29. Gati, A., N. Guerra, C. Gaudin, et al., *CD158 receptor controls cytotoxic T-lymphocyte susceptibility to tumor-mediated activation-induced cell death by interfering with Fas signaling*. Cancer Res, 2003. **63**(21): p. 7475-82.
30. Whitmire, J.K., K. Murali-Krishna, J. Altman, et al., *Antiviral CD4 and CD8 T-cell memory: differences in the size of the response and activation requirements*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences, 2000. **355**(1395): p. 373-9.
31. Butz, E.A. and M.J. Bevan, *Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection*. Immunity, 1998. **8**(2): p. 167-75.
32. Manz, R.A., A. Thiel, and A. Radbruch, *Lifetime of plasma cells in the bone marrow*. Nature, 1997. **388**(6638): p. 133-4.
33. Slifka, M.K., R. Antia, J.K. Whitmire, et al., *Humoral immunity due to long-lived plasma cells*. Immunity, 1998. **8**(3): p. 363-72.
34. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
35. Zinkernagel, R.M., *On immunological memory*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences, 2000. **355**(1395): p. 369-71.

36. Dutton, R.W., L.M. Bradley, and S.L. Swain, *T cell memory*. Annual Review of Immunology, 1998. **16**: p. 201-23.
37. Goldrath, A.W. and M.J. Bevan, *Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire*. Nature, 1999. **402**(6759): p. 255-62.
38. Farber, D.L., *T cell memory: heterogeneity and mechanisms*. Clinical Immunology, 2000. **95**(3): p. 173-81.
39. Marsden, V.S., J.W. Kappler, and P.C. Marrack, *Homeostasis of the memory T cell pool*. Int Arch Allergy Immunol, 2006. **139**(1): p. 63-74.
40. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia, *Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance*. Annual Review of Immunology, 2004. **22**: p. 745-63.
41. Hou, S., L. Hyland, K.W. Ryan, et al., *Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size.[see comment]*. Nature, 1994. **369**(6482): p. 652-4.
42. Whitmire, J.K. and R. Ahmed, *Costimulation in antiviral immunity: differential requirements for CD4(+) and CD8(+) T cell responses*. Current Opinion in Immunology, 2000. **12**(4): p. 448-55.
43. Selin, L.K., K. Vergilis, R.M. Welsh, et al., *Reduction of otherwise remarkably stable virus-specific cytotoxic T lymphocyte memory by heterologous viral infections*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **183**(6): p. 2489-99.
44. Sourdive, D.J., K. Murali-Krishna, J.D. Altman, et al., *Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection*. Journal of Experimental Medicine, 1998. **188**(1): p. 71-82.
45. Swain, S.L., *Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells*. Immunity, 1994. **1**(7): p. 543-52.
46. Garcia, S., J. DiSanto, and B. Stockinger, *Following the development of a CD4 T cell response in vivo: from activation to memory formation*. Immunity, 1999. **11**(2): p. 163-71.
47. Cerwenka, A., T.M. Morgan, and R.W. Dutton, *Naive, effector, and memory CD8 T cells in protection against pulmonary influenza virus infection: homing properties rather than initial frequencies are crucial*. Journal of Immunology, 1999. **163**(10): p. 5535-43.
48. Rogers, P.R., C. Dubey, and S.L. Swain, *Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen*. Journal of Immunology, 2000. **164**(5): p. 2338-46.

49. Dai, Z., B.T. Konieczny, and F.G. Lakkis, *The dual role of IL-2 in the generation and maintenance of CD8+ memory T cells*. Journal of Immunology, 2000. **165**(6): p. 3031-6.
50. Opferman, J.T., B.T. Ober, and P.G. Ashton-Rickardt, *Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes*. Science, 1999. **283**(5408): p. 1745-8.
51. Saparov, A., F.H. Wagner, R. Zheng, et al., *Interleukin-2 expression by a subpopulation of primary T cells is linked to enhanced memory/effector function*. Immunity, 1999. **11**(3): p. 271-80.
52. Jacob, J. and D. Baltimore, *Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo.[see comment]*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 593-7.
53. Pihlgren, M., P.M. Dubois, M. Tomkowiak, et al., *Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro*. Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(6): p. 2141-51.
54. Unsoeld, H. and H. Pircher, *Complex memory T-cell phenotypes revealed by coexpression of CD62L and CCR7*. Journal of Virology, 2005. **79**(7): p. 4510-3.
55. Wills, M.R., A.J. Carmichael, M.P. Weekes, et al., *Human virus-specific CD8+ CTL clones revert from CD45ROhigh to CD45RAhigh in vivo: CD45RAhighCD8+ T cells comprise both naive and memory cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7080-7.
56. Williams, M.A. and M.J. Bevan, *T cell memory: fixed or flexible?[comment]*. Nature Immunology, 2005. **6**(8): p. 752-4.
57. Borysiewicz, L.K., S. Graham, J.K. Hickling, et al., *Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity*. European Journal of Immunology, 1988. **18**(2): p. 269-75.
58. Borysiewicz, L.K., J.K. Hickling, S. Graham, et al., *Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses*. Journal of Experimental Medicine, 1988. **168**(3): p. 919-31.
59. Quinnan, G.V., Jr., A.H. Rook, W.R. Frederick, et al., *Prevalence, clinical manifestations, and immunology of herpesvirus infections in the acquired immunodeficiency syndrome*. Annals of the New York Academy of Sciences, 1984. **437**: p. 200-6.
60. Walter, E.A., P.D. Greenberg, M.J. Gilbert, et al., *Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell*

- clones from the donor.[see comment].* New England Journal of Medicine, 1995. **333**(16): p. 1038-44.
61. Dinges, M.M., P.M. Orwin, and P.M. Schlievert, *Exotoxins of Staphylococcus aureus.* Clinical Microbiology Reviews, 2000. **13**(1): p. 16-34.
 62. Lee, G. and M. Gilman, *Dual modes of control of c-fos mRNA induction by intracellular calcium in T cells.* Molecular & Cellular Biology, 1994. **14**(7): p. 4579-87.
 63. Morley, S.J., *Signalling through either the p38 or ERK mitogen-activated protein (MAP) kinase pathway is obligatory for phorbol ester and T cell receptor complex (TCR-CD3)-stimulated phosphorylation of initiation factor (eIF) 4E in Jurkat T cells.* FEBS Letters, 1997. **418**(3): p. 327-32.
 64. Wills, M.R., A.J. Carmichael, K. Mynard, et al., *The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T- cell receptor usage of pp65-specific CTL.* J Virol, 1996. **70**(11): p. 7569-79.
 65. Wills, M.R., G. Okecha, M.P. Weekes, et al., *Identification of naive or antigen-experienced human CD8(+) T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8(+) T cell response.* J Immunol, 2002. **168**(11): p. 5455-64.
 66. Weekes, M.P., M.R. Wills, K. Mynard, et al., *The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo.* Journal of Virology, 1999. **73**(3): p. 2099-108.
 67. Kern, F., N. Faulhaber, C. Frömmel, et al., *Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides.* Eur J Immunol, 2000. **30**: p. 1676-1682.
 68. Langerak, A.W., R. van Den Beemd, I.L. Wolvers-Tettero, et al., *Molecular and flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire for clonality assessment in mature TCRalpha/beta T-cell proliferations.* Blood, 2001. **98**(1): p. 165-73.
 69. Young, N.T. and M. Uhrberg, *KIR expression shapes cytotoxic repertoires: a developmental program of survival.* Trends in Immunology, 2002. **23**(2): p. 71-5.
 70. Snyder, M.R., L.O. Muegge, C. Offord, et al., *Formation of the killer Ig-like receptor repertoire on CD4+CD28null T cells.* J Immunol, 2002. **168**(8): p. 3839-46.

71. Ikeda, H., B. Lethe, F. Lehmann, et al., *Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor*. *Immunity*, 1997. **6**(2): p. 199-208.
72. Kern, F., E. Khatamzas, I. Surel, et al., *Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8(pos.) subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms*. *Eur J Immunol*, 1999. **29**(9): p. 2908-2915.
73. Kern, F., I.P. Surel, C. Brock, et al., *T-cell epitope mapping by flow cytometry*. *Nat Med*, 1998. **4**(8): p. 975-8.
74. Kern, F., T. Bunde, N. Faulhaber, et al., *Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals*. *J Infect Dis*, 2002. **185**(12): p. 1709-16.
75. Renard, V., A. Cambiaggi, F. Vely, et al., *Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes*. *Immunological Reviews*, 1997. **155**: p. 205-21.
76. Vivier, E. and M. Daeron, *Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*. *Immunology Today*, 1997. **18**(6): p. 286-91.
77. Cambiaggi, A., S. Darche, S. Guia, et al., *Modulation of T-cell functions in KIR2DL3 (CD158b) transgenic mice*. *Blood*, 1999. **94**(7): p. 2396-402.
78. Renders, L. and T. Valerius, *Engineered CD3 antibodies for immunosuppression*. *Clin Exp Immunol*, 2003. **133**(3): p. 307-9.
79. Hirsch, R.L., P.C. Layton, L.A. Barnes, et al., *Orthoclone OKT3 treatment of acute renal allograft rejection in patients receiving maintenance cyclosporine therapy*. *Transplantation Proceedings*, 1987. **19**(2 Suppl 1): p. 32-6.
80. Wei, C.H., M. Uhlin, M.G. Masucci, et al., *Tetramer binding and secretion of interferon-gamma in response to antigenic stimulation are compatible with a range of affinities of MHC:TCR interaction and distinct programs of cytotoxic T-lymphocyte activation*. *Human Immunology*, 2002. **63**(10): p. 821-33.
81. Whelan, J.A., P.R. Dunbar, D.A. Price, et al., *Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent*. *Journal of Immunology*, 1999. **163**(8): p. 4342-8.
82. Huard, B. and L. Karlsson, *KIR expression on self-reactive CD8+ T cells is controlled by T-cell receptor engagement*. *Nature*, 2000. **403**(6767): p. 325-8.
83. Mingari, M.C., M. Ponte, S. Bertone, et al., *HLA class I-specific inhibitory receptors in human T lymphocytes: interleukin 15-induced expression of CD94/NKG2A in*

- superantigen- or alloantigen-activated CD8+ T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(3): p. 1172-7.
84. Bertone, S., F. Schiavetti, R. Bellomo, et al., *Transforming growth factor-beta-induced expression of CD94/NKG2A inhibitory receptors in human T lymphocytes*. Eur J Immunol, 1999. **29**(1): p. 23-9.
85. Sprent, J. and C.D. Surh, *T cell memory*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 551-79.
86. Weekes, M.P., A.J. Carmichael, M.R. Wills, et al., *Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones*. Journal of Immunology, 1999. **162**(12): p. 7569-77.

7 Abkürzungsverzeichnis

AICD	activation induced cell death aktivierungsinduzierter Zelltod
APC	antigen presenting cell antigenpräsentierende Zelle
APC	Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin
BSA	bovine serum albumin bovines Serumalbumin
CD	Cluster of Differentiation Oberflächenantigene von Zellen (Bestandteil der Nomenklatur)
cDNA	complementary desoxy ribonucleic acid (zur mRNA) komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR3	complementary determining region
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
FCS	fetal calf serum fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward Scatter Vorwärtsstreulicht (-intensität)
HCMV	Human Cytomegalovirus humanes Cytomegalievirus
HIV	human immunodeficiency virus humanes Immunschwächevirus
HLA	Human Leukocyte Antigen; synonym MHC
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILT	immunglobulin-like Transcripts immunglobulinähnliche Transkripte

ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activating motifs Immunrezeptor-tyrosinbasiertes aktivierendes Motiv
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs Immunrezeptor-tyrosinbasiertes inhibitorisches Motiv
KIR	Killer Inhibitory Receptor
LDA	Limiting Dilution Assay
mAK	monoklonale Antikörper
MHC	Major Histocompatibility Complex Hauptgewebekompatibilitätskomplex
mRNA	messenger ribonucleic acid Boten-Ribonukleinsäure
NKR	Natural Killer Cell Receptor Natürliche Killer-Zellen-Rezeptor
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
OKT3	Klon eines Antikörpers gerichtet gegen das CD3-Molekül auf T-Zellen, synonym anti-CD3-Antikörper
PBMC	peripheral blood mononuclear cells mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase chain reaction Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SSC	Side Scatter Seitwärtsstreulicht (-intensität)
TCR	T cell receptor T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
V β	variable Teil der Betakette des TCR

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die diese Arbeit ermöglicht haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk und Herrn PD Dr. med. Florian Kern für die wissenschaftliche Betreuung und vielseitige und geduldige Unterstützung.

Ebenso möchte ich mich für die hervorragende und förderliche Zusammenarbeit mit Dr. Mark Wills und Mitarbeitern vom Department of Medicine der Universität Cambridge am Addenbrooks Hospital in Cambridge, Großbritannien herzlich bedanken.

Weiteren Dank schulde ich allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Immunologie der Charité in Berlin für die vielfältige Unterstützung und Begleitung meiner Tätigkeit im Institut, insbesondere Christa Liebenthal, Kristin Neuhaus, Ingrid Jäkel und Robert Sabbat.

Ich danke meinem Vater und meiner Mutter, die mich immer mit Liebe, Tatkraft und Toleranz auf all meinen Wegen unterstützen.

Für Ermutigung und Aufmunterung danke ich meinen Freunden Jan Zierrath, Anne Hübsch, Katrin Kliem, Robert Siegmund und Sylvain Perier.

9 Lebenslauf

keine Angaben

10 Publikationen

Kern F, Khatamzas E, Surel IP, Frömmel C, Reinke P, Waldrop SL, Picker LJ, Volk HD
Distribution of human CMV-specific memory T cells among CD8pos. subsets defined by
CD57, CD27 and CD45 isoforms
Eur J Immunol 1999 Sep;29(9):2908-15

Kern F, Faulhaber N, Khatamzas E, Frömmel C, Ewert R, Prosch S, Volk HD, Reinke P
Measurement of anti-human cytomegalovirus T cell reactivity in transplant recipients and its
potential clinical use: a mini-review
Intervirology 1999;42(5-6):322-4

Kern F, Surel IP, Faulhaber N, Frömmel C, Schneider-Mergener J, Schönemann C, Reinke P,
Volk HD
Target structures of CD8 (+) T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton
major immediate-early protein revisited
J Virol 1999 Oct;73(10):8179-84

Kern F, Faulhaber N, Frömmel C, Khatamzas E, Prosch S, Schönemann C, Kretzschmar I,
Volkmer-Engert R, Volk HD, Reinke P
Analysis of CD8+ T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pool of
overlapping pentadecapeptides
Eur J Immunol 2000 Jun;30(6):1676-82

11 Selbständigkeitserklärung

„Ich, Claudia Frömmel, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:
„Expressionsanalyse des Killer-Inhibitory-Rezeptors CD158b auf CD8 T-Lymphozyten, die
spezifisch für Humanes Cytomegalievirus sind“ 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