

**Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der
Technischen Universität München
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. H. Wagner, Ph. D. (Melbourne))**

Charakterisierung von Memory T-Zellen bei ihrem Übergang von der Effektor- in die Post-Effektorphase

Verena Busch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Busch
2. Univ.-Prof. Dr. G. A. Häcker
3. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel

Die Dissertation wurde am 30.03.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 27.09.2006 angenommen.

II INHALTSVERZEICHNIS

I TITEL.....	1
II INHALTSVERZEICHNIS.....	2
III VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	5
IV MATERIAL- UND GERÄTELISTELISTE.....	7
V REAGENZIENLISTE.....	9
1. EINLEITUNG.....	10
1.1 Immunologisches Gedächtnis.....	10
1.2 Generierung und Charakterisierung von Memory T-Zellen 11	
1.2.1 Generierungswege 11	
1.2.2 Charakterisierungsmerkmale 12	
1.2.2.1 Phänotypische Eigenschaften 12	
1.2.2.2 Funktionelle Eigenschaften 14	
1.2.2.3 Heterogenes Verteilungsmuster 14	
1.3 Untersuchung antigen-spezifischer T-Zellen direkt ex vivo 15	
1.3.1 TCR-transgenes System 15	
1.3.2 Oligoklonale antigen-spezifische T-Zellpopulationen (TCR-V β Marker) 16	
1.3.3 ELISPOT und ICCS 16	
1.3.4 Affinitäts-Matrix 16	
1.3.5 MHC-Multimere 17	
1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> Modellsystem.....	18
1.5. Problemstellung.....	19
2. MATERIAL UND METHODIK.....	21
2.1 Infektion von BALB/c und C57BL/6 mit <i>Listeria monocytogenes</i>	21
2.2 Organentnahme und Isolierung der Lymphozyten 21	
2.2.1 Lymphknoten 21	
2.2.2 Milz 22	
2.2.3 Peripheres Blut 22	
2.2.4 Knochenmark 22	
2.2.5 Lunge 22	
2.2.6 Leber 23	
2.2.7 Intestinum 23	
2.2.7.1 Intraepitheliale Lymphozyten (IEL) 24	
2.2.7.2 Lamina propria Lymphozyten (LPL) 24	

2.3	MHC-Reagenzien.....	28
2.4	Färbung <i>ex vivo</i> gewonnener T-Lymphozyten	28
2.4.1	Tetramerfärbung	28
2.4.2	Intrazelluläre Zytokinfärbung	29
2.5	Durchflußzytometrische Analyse und Auswertung	30
3.	ERGEBNISSE	31
3.1	Kinetiken antigen-spezifischer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellpopulationen nach Infektion mit <i>L.m.-Ova</i>	31
3.2	Kinetik antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach Infektion mit <i>L.m.</i>	33
3.2.1	Testung der Tetramere	33
3.2.2	Kinetik der Anzahl antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz	34
3.2.3	Kinetik der Prozentzahlen antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen in Organen des peripheren und zentralen Kompartiments	35
3.3	Kinetiken verschiedener Oberflächenmarker auf antigen-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in der Milz	40
3.3.1	Marker der Effektor- und Post-Effektorphase	41
3.3.2	Aktivierungs- und Homingrezeptoren	46
3.3.3	Kostimulatorische Moleküle	50
3.3.4	Wachstumsfaktorrezeptoren	52
3.4	Abgrenzung antigen-spezifischer Subpopulationen in der Milz mit Hilfe von CD127	57
3.4.1	Muster zu verschiedenen Zeiten der Expansions- und Kontraktionsphase	57
3.4.2	Stabilität der CD127 hohen Population in der Gedächtnisphase	60
3.5	Kombination der Expression von CD127 und CD62L auf CD8 ⁺ antigen-spezifischen T-Zellen	62
3.6	Expressionsmuster von CD127 in verschiedenen Organen	65
3.6.1	CD127 hohe antigen-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen in lymphatischen Organen	65
3.6.2	CD127 hohe und niedrige antigen-spezifische CD8 ⁺ T-Zellen in anderen Organen	66
3.6.3	Stabilität der CD127 hohen Population	68
3.7	Heterogenität der Zytokinproduktion antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	69
3.8	CD127- und CD62L-Expression in Abwesenheit von CD40L.....	72
4.	DISKUSSION.....	74
4.1	CD8 ⁺ T-Zellen als erste Abwehrlinie bei Reinfektion	75

4.2	Unterteilung antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen mit Hilfe von Oberflächenmarkern	76
4.2.1	Expressionskinetiken „klassischer“ Memory- und Aktivierungsmarker auf antigen-spezifischen Zellpopulationen	77
4.2.2	CD127 und CD62L als Marker für Subpopulationen antigen-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen	79
4.3	CD127 und CD62L als Marker zur Unterscheidung von MTZ und ET	81
4.3.1	Unterschiede im Zytokinmilieu des zentralen und peripheren Kompartiments	81
4.3.2	Korrelation der CD127-Expression mit Migration in verschiedene Kompartimente	82
4.4	Mögliche funktionelle Bedeutung der IL-7R auf Memory T-Zellen	85
4.5	Bedeutung der Aufteilung des T-Zellpools in Memory und Post-Effektor T-Zellen	88
4.6	Linear- versus Post-Effektormodell	89
4.7	Bedeutung der frühen Detektion von Memory T-Zellen in der Immunantwort	91
4.8	Ausblick	92
5.	ZUSAMMENFASSUNG	94
6.	LITERATURVERZEICHNIS	96
8.	LEBENS LAUF	103

III VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

Ab:	Antikörper (antibody)
APC:	Allo ph ycocyanin
APC:	Antigen-präsentierende Zelle (antigen-presenting cell)
β_2m :	Beta-2-Mikroglobulin
BSA:	B ovines Serum Albumin
CD:	cluster of d ifferation
ConA:	C oncanavalin A
CMT:	Zentrale Memory T-Zelle (central memory T-cell)
CTL:	Zytotoxische T-Zelle (cytotoxic T-lymphocyte)
DC:	Dendritische Zelle (dendritic cell)
„DM“:	Verdaulösung (d igestion m ix)
DMSO:	D imethylsulfoxid
DTT:	1-4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Ethylendiamidteracid
EMA:	Ethidium Monazid Bromid
EMT:	Effektor M emory T -Zellen
ET:	Effektor T -Zellen
FACS:	Durchflußzytometrie (fluorescence-activated cell sorting)
FCS:	Fetales Kalbsserum (fetal calf serum)
FITC:	F luorescein i sothiocyant
FL:	F luoreszenz
FSC:	Streuung auf der x-Achse (forward scatter)
HBSS:	H ank's B alanced S alt S olution
HEPES:	2-[4-(2- H ydroxyethyl)-1- P iperazinyl]Ethanesulfonsäure+4-(HO CH ₂ CH ₂)-1,4-N ₂ C ₄ H ₈ -1-CH ₂ CH ₂ -SO ₃ H
ICCS:	Intrazelluläre Zytokinfärbung (intracellular cytokine staining)
IEL:	I ntraepitheliale L ymphozyten des Darms
IFN γ :	I nterferon g amma
IL-7R:	I L- 7 - R ezeptor
i.v.:	i ntravenös
KO:	K nock- o ut (-/-)
LAM:	L eukozyten- A dhäsions m olekül
LCA:	gemeinsames Leukozytenantigen (leukocyte common antigen)

LB:	Luria Bertoni Medium
LD ₅₀ :	Letale Dosis für 50% der Versuchstiere
Lk:	Lymphknoten
<i>L.m.</i> :	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>L.m.-Ova</i> :	<i>Listeria monocytogenes</i> Oval bumin sezernierend
LPL:	Lamina propria Lymphozyten des Darms
mAb:	Monoklonaler Antikörper (monoclonal antibody)
MACS:	Magnetische Zelltrennung (magnetic cell sorting)
MHC:	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MoFlo:	Modular Flow Cytometry
MTZ:	Memory T-Zellen
NaN ₃ :	Natriumazid
OD:	Optische Dichte
PBS:	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (phosphate-buffered saline)
PE:	R-Phycoerythrin
PFA:	Paraformaldehyd
PP:	Peyersche Plaques
rpm:	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT:	Raumtemperatur
SA:	Streptavidin
SSC:	Verteilung auf der y-Achse (sideward scatter)
TCR:	T-Zellrezeptor (T cell receptor)
TNF α :	Tumornekrosefaktor alpha
Tris:	Tris (hydroxymethyl)aminomethane+(HO-CH ₂) ₃ C-NH ₂ +2-Amino-2-(Hydroxymethyl) 1,3-Propanediol
WT:	Wildtyp

IV MATERIAL- UND GERÄTELISTELISTE

Antikörper, monoklonal:	BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA (für BALB/c Hintergrund), Caltag Laboratories, Burlingame, CA 94010, USA (für C57BL/6 Hintergrund)
BALB/c Mäuse:	Harlan, Blackthorn, U.K.
BirA:	Avidity, Colorado, USA
Brefeldin A:	Golgi-Plug™, BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA
Brutschrank:	BBD 6220, Heraeus, Hanau, Deutschland
C57BL/6 Mäuse:	Harlan, Blackthorn, U.K.
CaCl ₂ :	FW 147,0, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
CD40L ^{-/-} Mäuse:	BALB/c Hintergrund, zur Verfügung gestellt von R. Flavell, Yale, USA
Cytofix/Cytoperm™:	BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA
DMSO:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dnase I:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DTT:	Boehringer-Mannheim, Mannheim, Deutschland
<i>E.coli</i> :	Stratagene, La Jolla, USA
EDTA:	Dinatrium-Dihydrat, FW 292,2 und FW 372,2, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethidium Monazid:	EMA, Molecular Probes, Leiden, Niederlande
FACS:	FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FCS:	seromed®, Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Fc-block-Reagenz:	Blockierender Antikörper für Fc-Rezeptor [CD32/CD16], BD Biosciences, ParMingen, San Diego, USA
Flow Jo V 3.4 und 4.2 Software:	Tree Star, San Carlos, USA
Fluoreszenz-markiertes SA:	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Gentamycin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Golgi-Plug:	BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA
HBSS:	w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Heparin:	Liquemin® N 25 000, Roche, Basel, Schweiz

HEPES Puffer:	1M, Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Kollagenase D:	1mg/ml, Roche, Mannheim, Deutschland
Kollagenase Typ IV und VIII:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kühlzentrifuge:	Varifuge 3.0 RS, Heraeus, Hanau, Deutschland
L-Glutamin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
LLO91-99 (GYKDGNEYI):	Affina, Berlin, Deutschland
LLO190-201 (NEKYAQAQPNVS):	Affina, Berlin, Deutschland
<i>L.m.</i> 10403s:	ATCC, Rockville, USA
<i>L.m.-Ova</i> :	zur Verfügung gestellt von Hao Shen, University Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, USA
Membran 100kD:	Millipore, Bedford, USA
MgCl ₂ :	FW 203,3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mikroskop:	Axiovert S 100, Zeiss, Jena, Deutschland
MoFlo:	Cytomation, Freiburg, Deutschland
Nadeln 27G ^{1/2} und 27G ^{3/4} :	Microlance™ 3, BD, Drogheda, Ireland
Nadeln 27G ^{4/5} :	1 Sterican [®] , B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ova 258-264 (SIINFEKL):	Affina, Berlin, Deutschland
PBS:	Instamed PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺ , Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Perm/Wash™ Puffer:	BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA
PFA:	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Photometer:	Ultrosec 3000 pro, Biochrom Ltd., Cambridge, England
RPMI 1640:	w/o L-Glutamin, Gibco Life Technologies, Gaithersburg MD, USA
Sterilbank:	HERA safe, Heraeus, Hanau, Deutschland
Streptavidin:	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Streptomycin:	Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.
Tris-hydrochlorid:	C ₄ H ₁₁ NO ₃ HCl, MW 157,60, Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe, Deutschland
Zellsieb 100µm:	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

V REAGENZIENLISTE

DM:	2mg/10ml RPMI+SC ⁺ Kollagenase TypIV, 0,2mg/10ml RPMI Dnase I
FACS-Färbepuffer:	PBS pH 7,45, 0,5% BSA, 0,02 % NaN ₃
HBSS/DTT 1mM:	1mM DTT in HBSS
HBSS/EDTA 0,1mM:	0,1mM EDTA in HBSS
HBSS/EDTA 1,3mM:	1,3mM EDTA in HBSS
NH ₄ CL-Tris:	0,17M NH ₄ CL in 0,3M Tris [pH 7,5]
PBS pH 8,0:	PBS mit 2µl 0,5M NaEDTA, 1µl 30% NaN ₃ , 0,5µl Leupeptin (2 µg/ml) und 0,5ml Pepstatin (2 µg/ml) pro ml MHC-Molekül-Lösung
PBS/FCS 5%:	PBS mit 5% FCS
PBS/Heparin:	75 U Heparin in 1ml PBS
PFA 4% :	400 ml PBS mit 16g PFA
PFA 2%:	10ml PBS mit 10ml PFA 4%
RP10 ⁺ :	RPMI 1640 mit 10% FCS, L-Glutamin, HEPES [pH 7,5], β-Mercaptoethanol, Penicillin [100 U/ml], Streptomycin [100 mg/ml] und Gentamycin [50 mg/ml]
RPMI mit Zusatz:	1mM MgCl ₂ , 1mM CaCl ₂ und 10% FCS
Tris:	Tris-hydrochlorid pH 7,5

1. EINLEITUNG

1.1 Immunologisches Gedächtnis

„Wer aber klare Erkenntnis des Vergangenen erstrebt und damit auch des Künftigen, das wieder einmal nach der menschlichen Natur so oder ähnlich eintreten wird, der wird mein Werk für nützlich halten und das soll mir genügen.“ stellt der griechische Geschichtsschreiber Thukydides (460 bis ca. 400 v. Chr.) die Intention seines Werkes über den Peloponnesischen Krieg dar {Thukydides, 2000, S.24}. Darin beschreibt er im zweiten Buch den Ausbruch der Pest in Athen im Jahre 430 v. Chr.: „Diese Krankheitsart war furchtbarer als Worte es beschreiben können; sie befahl jeden mit einer Gewalt, die über Menschennatur ging {Thukydides, 2000, S. 147}, „Mitleid hatten doch noch die Geretteten mit den Sterbenden und Leidenden, weil sie alles bereits kannten und selbst nun in Sicherheit waren; denn zweimal befahl sie denselben nicht, zumindest nicht mit tödlichem Ausgang.“ {Thukydides, 2000, S. 148-149}. Mit dieser Beobachtung alleine könnte Thukydides seine Intention schon erfüllt haben, da er als einer der ersten Zeugnis gibt über die vielleicht wichtigste Funktion des Immunsystems, die Vermittlung von Schutz gegen Krankheitserreger durch das immunologische Gedächtnis. Dieses Gedächtnis für die Identität eines Pathogens bleibt auch nach Eliminierung des Erregers aus dem Körper und manchmal sogar lebenslang erhalten. Durch die Beobachtung dieses Prinzips, das nach Thukydides auch andere immer wieder beschrieben haben, entwickelte und verbreitete im 18. Jahrhundert Edward Jenner die Impfung und begründete damit die Immunologie als neue Wissenschaft.

Unser Wissen über das immunologische Gedächtnis geht zwar mittlerweile über die Erkenntnisse von damals weit hinaus, dennoch ist die Frage nach den Mechanismen seiner Ausbildung und Erhaltung noch lange nicht gelöst {Sprent, 2002}.

Das „Immunologische Gedächtnis“ kann definiert werden als die Fähigkeit des Immunsystems Krankheitserreger schneller und effektiver zu bekämpfen, wenn sie dem Immunsystem bereits bekannt sind {Janeway Ch. A. Jr., 1999, S. 402}. Diese Eigenschaft beruht auf der klonalen Expansion präexistenter antigen-spezifischer Lymphozyten. Diese Lymphozyten, die dem adaptiven Immunsystem angehören, unterteilen sich in B- und T-Zellen, die unterschiedliche Aufgaben während der Immunantwort erfüllen. Die T-Zellen unterteilen sich weiter in T-Helfer-(CD4⁺) und T-Killer-(CD8⁺) Zellen, die ebenfalls einen unterschiedlichen Beitrag zur Beseitigung bekannter Pathogene leisten. Wann und durch welche Faktoren diese Memory Zellen entstehen und wie sie sich gegen andere antigen-spezifische und nicht antigen-

spezifische Lymphozyten ihres Kompartiments abgrenzen, ist bis heute Gegenstand der Diskussion.

1.2 Generierung und Charakterisierung von Memory T-Zellen

1.2.1 Generierungswege

Im T-Zellkompartiment unterscheidet man, orientiert an ihrer Entstehung und ihren Aufgaben während der Immunantwort, drei Entwicklungsstadien. Naive T-Zellen finden sich vor Antigenkontakt in den T-Zellbereichen sekundärer lymphatischer Organe und wandern kontinuierlich auf dem Blut- oder Lymphweg durch die verschiedenen Organe des Körpers. Die über APC vermittelte Präsentation von Antigenen eines Pathogens aktiviert in den T-Zellen ein Programm zur Proliferation, Produktion von Zytokinen und Differenzierung in Effektorzellen {Busch, 1998; Badovinac, 2002; Kaech, 2001; Mercado, 2000}. Die aktivierten Effektor T-Zellen verlassen die sekundären lymphatischen Organe auf dem Blutweg, um mit Hilfe von Adhäsionsmolekülen in entzündete Gewebe einzutreten und dort die Infektion zu bekämpfen. Die primäre Antwort endet mit dem Tod der meisten Effektorzellen, eine kleine Population von Memory T-Zellen bleibt allerdings bestehen und vermittelt Schutz gegen zukünftige Infektionen mit demselben Pathogen. T-Zellhilfe in der Periode des initialen Priming ist dabei für den langzeitigen Erhalt von CD8⁺ T Zell-vermittelter protektiver Immunität nötig {Sun, 2003; Janssen, 2003; Shedlock, 2003}. Zu welchem Zeitpunkt diese langlebigen Memory T-Zellen entstehen ist unklar. Ebenso sind die zugrundeliegenden Mechanismen für die effektive Generierung von Memory T-Zellen noch nicht bekannt. Es werden im Wesentlichen zwei Modelle diskutiert: Eine lineare Abstammung von naiven T-Zellen oder eine Differenzierung aus Effektor T-Zellen {Opferman, 1999; Jacob, 1999; Ahmed, 1996}. Im ersten Fall entwickeln sich die Memory T-Zellen direkt aus naiven Vorläufer T-Zellen ohne das Stadium der "klassischen" Effektorzelle zu durchlaufen. Ihre Entwicklung verläuft also parallel zu den Effektorzellen, die eine nur relativ kurze *in vivo* Überlebenszeit besitzen. Das andere Modell suggeriert eine partielle oder vollständige Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektor T-Zellen. Die meisten Effektor T-Zellen werden deletiert. Einige überleben jedoch und bleiben als Memory T-Zellen erhalten.

Aus welchen Vorläuferzellen und zu welchem Zeitpunkt der Immunantwort Memory T-Zellen generiert werden ist unklar.

1.2.2 Charakterisierungsmerkmale

Memory T-Zellen werden anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und ihres funktionellen Verhaltens charakterisiert {Ahmed, 1996; Sprent, 2001; Zinkernagel, 1996; Dutton, 1998; Goldrath, 1999}. Dabei weisen sie sowohl Eigenschaften von naiven T-Zellen als auch von Effektor T-Zellen auf. Eine Abgrenzung zwischen Memory T-Zellen und naiven T-Zellen ist leichter zu treffen als zwischen Effektor und Post-Effektor T-Zellen.

1.2.2.1 Phänotypische Eigenschaften

Der Phänotyp von Memory T-Zellen ist durch bestimmte Oberflächenmarker charakterisiert. Im Allgemeinen werden Memory T-Zellen in solche unterschieden, die im aktivierten Zustand verbleiben und mehr Ähnlichkeiten zu Effektor T-Zellen aufweisen und in solche, die im Ruhezustand sind und mehr naiven T-Zellen ähneln {Sprent, 2001}. Dementsprechend ist eine klare phänotypische Definition, die Memory T-Zellen von Effektor T-Zellen und naiven T-Zellen unterscheidet, schwierig.

Für ihre Fähigkeit, in verschiedene Organe zu gelangen, exprimieren Memory T-Zellen eine Reihe von Oberflächenmarkern. Besonders bedeutend scheinen hierbei CCR5 und CCR7, CD44 und CD62L zu sein. CCR5 wird auf aktivierten CD8⁺ T-Zellen exprimiert und ist mit ihrem Eintritt in entzündetes Gewebe assoziiert {Fukada, 2002}. CCR7 wird vor allem im Humansystem häufig als Memory T-Zellmarker eingesetzt {Sallusto, 1999}. Er wird auch auf naiven T-Zellen exprimiert und vermittelt Homing in die Lymphknoten {Sprent, 2002; Campbell, 2001; Pihlgren, 1996}. CD44 ist der vielleicht verlässlichste Marker für die Abgrenzung von naiven T-Zellen und Memory T-Zellen. Er wird während der Reifung der T-Zellen im Thymus vorübergehend exprimiert, auf Memory T-Zellen ist er ein Homingrezeptor für nicht-lymphatische Gewebe {Janeway Ch. A. Jr., 1999, S. 234 und 408, Dutton, 1998}. CD62L gehört zur Familie der Leukozytenadhäsionsmoleküle {Maruyama, 2000} und ist auf naiven T-Zellen als auch auf einer Subpopulation von Memory T-Zellen zu finden {Busch, 1999; Bevilacqua, 1991}. Durch Bindung an bestimmte Zuckermoleküle, die vaskulären Adressine auf hohen endothelialen Venolen der Lymphknoten und Peyerschen Plaques, ermöglicht CD62L Homing in diese Organe {Bevilacqua, 1991}.

Ly6C ist ein Oberflächenmolekül, das auf aktivierten T-Zellen und Memory T-Zellen im Vergleich zu naiven T-Zellen auf hohem Niveau exprimiert wird {Walunas, 1995}. Auf aktivierten CTL hat Ly6C akzessorische Funktion in der Zytolyse von Zielzellen

{Johnson, 1993}. Ebenso stimuliert es T-Zellproliferation und IL-2-Produktion nach Aktivierung {Dumont, 1987}. Als Adhäsionsmolekül vermittelt es *in vivo* Homing von CD8⁺ T-Zellen {Hanninen, 1997}. Doch trotz vieler Untersuchungen über die Expression von Ly6C und seine Verwendung als Memory Marker auf CD8⁺ T-Zellen, ist seine funktionelle Bedeutung immer noch nicht abschließend definiert {Becker, 2002; Clarke, 2000; Chambers, 1998}.

Für die homöostatische Proliferation und Erhaltung von Memory T-Zellen könnten CD45 und CD122 eine wichtige Rolle spielen. Homöostatische Proliferation beschreibt den Zustand physiologischer Normalität, in dem ein Gleichgewicht zwischen Deletion und Proliferation herrscht, das die Zellzahl in einem nicht-infizierten Individuum konstant hält {Janeway Ch. A. Jr., 1999, S. 408}. CD45 wird auf allen Lymphozyten exprimiert und amplifiziert das Signal des jeweiligen Rezeptors auf B- und T-Zellen {Michie, 1992; Novak, 1994; Young, 1997}. CD45 erfährt auf T-Zellen alternatives Spleißen seiner extrazellulären Domäne in zwei Isoformen. Während die hoch molekulare Isoform CD45RA auf naiven T-Zellen zu finden ist, findet sich die niedrig molekulare Form CD45RO auf aktivierten T-Zellen und auf Memory T-Zellen. CD45RO erleichtert die Antigenerkennung, was zu einer schnelleren Antwort auf Recall Antigene führt. Da CD45RO⁺ T-Zellen mit jeder Zellteilung empfindlicher für Apoptose werden, wodurch sie einerseits das homöostatische Gleichgewicht halten andererseits aber Probleme bei der Langzeiterhaltung von Memory T-Zellen aufweisen, kommt einer weiteren Subpopulation von Memory T-Zellen, die CD45RA⁺ ist, scheinbar eine besondere Rolle für die Erhaltung von T-Zell Memory zu. {Faint, 2001}. CD122, die gemeinsame β -Kette des IL2- und IL15-Rezeptors, ist ein Mitglied der „common γ -chain“ Rezeptorfamilie {Cho, 1999}. Es wird auf ruhenden T-Zell-Populationen exprimiert und ähnlich wie Ly-6C als Memory T-Zellmarker verwendet {Judge, 2002}. Für die Fähigkeit der Population von Memory T-Zellen, ähnlich wie Effektor T-Zellen rasche zytolytische Aktivität zu erreichen, sind dagegen nach Antigenkontakt Aktivierungsmarker wie CD25 und CD69 charakteristisch {Sprent, 2002}. Insgesamt ist eine Reihe von Markern für die Charakterisierung von T-Zellen vorhanden, die bereits Antigenkontakt hatten. Eine klare Abgrenzung, insbesondere zwischen Effektor und Memory T-Zellen, erlauben diese Marker jedoch nicht.

1.2.2.2 Funktionelle Eigenschaften

Die hervorstechende Eigenschaft von Memory T-Zellen ist ihre Fähigkeit, auf Exposition mit bekannten Antigenen eine schnellere und effektivere Antwort zu geben als naive T-Zellen. Um diese Aufgabe zu erfüllen, haben Memory T-Zellen sowohl bestimmte Fähigkeiten von naiven als auch Effektor T-Zellen. Die Fähigkeit von Memory T-Zellen zu homöostatischer Proliferation, schneller Proliferation nach Antigenkontakt und Aquisition von Effektorfunktionen und Vermittlung von protektiver Immunität sind die drei bedeutendsten Charakteristika.

Es wird kontrovers diskutiert, inwiefern die homöostatische Proliferation dabei im Gegensatz zu naiven T-Zellen unabhängig von beständiger Stimulation durch MHC und Antigenkontakt ist {Murali-Krishna, 1999}. Vielmehr scheinen Zytokine, besonders IL-15, bei ihrer Erhaltung eine bedeutende Rolle zu spielen {Becker, 2002; Zhang, 1998}. Nach Antigenkontakt haben Memory T-Zellen darüber hinaus die Fähigkeit zur schnellen Expansion und raschen Produktion von Zytokinen wie $TNF\alpha$ und $IFN\gamma$ {Badovinac, 2000}. Daraus ergibt sich das dritte bedeutende Charakteristikum, die Vermittlung von protektiver Immunität. Protektion kann durch den Transfer von Memory T-Zellen in naive Empfänger passiv übertragen werden. Im Idealfall sind die Empfänger dann gegen Infektionen mit dem Antigen, für das die transferierten Memory T-Zellen spezifisch sind, geschützt.

1.2.2.3 Heterogenes Verteilungsmuster

Wie bereits angedeutet, ist der Memory T-Zellpool heterogen. Memory T-Zellen finden sich nicht nur als zentrale Memory T-Zellen in lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz, sondern auch als periphere Memory T-Zellen in nicht-lymphatischen Organen wie der Lunge {Reinhardt, 2001; Sallusto, 1999}. Diese beiden Populationen unterscheiden sich in ihren funktionellen Eigenschaften {Masopust, 2001}. Während zentralen Memory T-Zellen ähnliche Charakteristika wie naiven T-Zellen zugeschrieben werden, sollen klassische Effektoreigenschaften eher periphere Memory T-Zellen charakterisieren. Die meisten peripheren Memory T-Zellen sollen terminal differenzierte Zellen sein, die zwar rasch Effektorstatus erlangen können, jedoch nicht proliferieren {Masopust, 2001}. Zentrale Memory T-Zellen sollen zwar proliferieren können und so lange Zeit erhalten bleiben, aber keine direkte Effektorfunktion zeigen. Diese beiden Kompartimente scheinen sich untereinander

auszutauschen zu können, allerdings sind diese Zusammenhänge bisher noch nicht genau verstanden.

1.3 Untersuchung antigen-spezifischer T-Zellen direkt *ex vivo*

Die Techniken zur Untersuchung antigen-spezifischer T-Zellen *ex vivo* wurden im Laufe der Jahre immer weiter optimiert. Heute haben wir die Möglichkeit, antigen-spezifische T-Zellen nach verschiedenen Gesichtspunkten zu untersuchen und sichtbar zu machen. Die verschiedenen Methoden setzen dabei an der unterschiedlichen Spezifität von TCR und ihrer Segmente, an der Eigenschaft antigen-spezifischer T-Zellen auf Antigenstimuli Zytokine zu produzieren oder an der Antigenerkennung durch TCR an. Durch verbesserte Techniken wurde es nach und nach möglich, die Population antigen-spezifischer T-Zellen in ihrer Heterogenität und Polyklonalität besser zu erfassen.

1.3.1 TCR-transgenes System

Das Prinzip dieser Methode ist die Unterscheidung CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen anhand der Expression eines definierten TCR. Nach adaptivem Transfer TCR-transgener T-Zellen, die uniform einen identifizierbaren TCR bekannter Peptid/MHC Spezifität exprimieren, kann das Verhalten antigen-spezifischer T-Zellen *in vivo* untersucht werden. Anhand Gegenfärbung ihres TCR oder zusätzlicher genetischer Marker können die transferierten Zellen von endogenen T-Zellpopulationen unterschieden werden. Genetische Marker werden in transgenen Mausmodellen wie zum Beispiel OTI/II zur Unterscheidung von T-Zellpopulationen mit unterschiedlichen TCR verwendet {Pape, 1997}. Diese Methode hat allerdings den Nachteil, daß die transferierten Zellen nur aus T-Zellen mit einem einzigen identischen TCR bestehen und deswegen nur eine Subpopulation der tatsächlichen Memory T-Zellpopulation repräsentieren. Ergebnisse dieser Methoden, die auf der Beobachtung einer monoklonalen Population von Memory T-Zellen basieren, können nicht immer mit der Antwort endogener antigen-spezifischer T-Zellen gleichgesetzt werden, da sich diese meist durch ein hohes Maß an TCR Polyklonalität und funktioneller Heterogenität auszeichnen.

1.3.2 Oligoklonale antigen-spezifische T-Zellpopulationen (TCR-V β Marker)

Diese Methode basiert auf einer MHC I-restringierten selektiven Expansion antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Lymphozyten desselben TCR-V β Gensegments expandieren nach Antigenkontakt. Die expandierte V β ⁺ CD8⁺ Population bietet so die Möglichkeit, antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen während einer *in vivo* Immunantwort zu untersuchen {MacDonald, 1993}. Die isolierten Zellen sind aber nie mit letzter Sicherheit alle antigen-spezifisch, sondern stellen häufig immer noch eine Mischpopulation aus CD8⁺ T-Zellen mit demselben TCR-V β Segment dar. Dieses kann spezifisch für andere Epitope und spezifisch für das gesuchte Epitop sein.

1.3.3 ELISPOT und ICCS

ELISPOT und ICCS visualisieren T-Zellen direkt *ex vivo* in Abhängigkeit ihrer Funktion {Badovinac, 2000; Lalvani, 1997; Miyahira, 1995}. Antigen-spezifische T-Zellen werden bei beiden Methoden über ihre Zytokinsekretion nachgewiesen.

Im ELISPOT Assay werden Zellen auf einen Träger gegeben, der mit Ab gegen Zytokine beschichtet ist. Nach kurzer Stimulation mit Antigen binden die von aktivierten T-Zellen freigesetzten Zytokine an die nächstgelegenen Ab. Die Zellen werden abgewaschen und ein markierter Ab gegen die freigesetzten Zytokine zugegeben. So werden Punkte sichtbar, an denen sich zytokinsezernierende Zellen befunden haben.

Mit der intrazellulären Zytokinfärbung (ICCS) können T-Zellen ebenfalls funktionsabhängig direkt *ex vivo* untersucht werden. Die T-Zellen werden isoliert und *in vitro* mit Peptid stimuliert. Die Sekretion von Zytokinen, zum Beispiel IFN γ und TNF α , die antigen-spezifische T-Zellen als Reaktion auf diese Stimulation produzieren, wird gestoppt und diese direkt intrazellulär detektiert. Bei beiden Methoden können zwar zusätzliche Informationen über die Funktion der T-Zellen gewonnen werden. Da in beiden Fällen jedoch nur die Subpopulation funktionell aktiver T-Zellen dargestellt wird, sind funktionell inaktive T-Zellen grundsätzlich ausgegrenzt.

1.3.4 Affinitäts-Matrix

Diese Methode, auch "cytokine capture assay" genannt, erlaubt die Isolierung von T-Zellen anhand der von ihnen sezernierten Zytokine. Durch Immobilisierung spezifischer

Ab auf der Zelloberfläche wird eine künstliche Affinitätsmatrix für ein bestimmtes Zytokin erzeugt. Zytokinspezifische Ab werden hierbei in der Regel an Ab gegen CD45 gekoppelt, ein Antigen das auf allen hämatopoetischen Zellen vorkommt. Die so erzeugten bispezifischen Ab binden mit ihrem α -CD45 Teil an die Zellen. Antigen-spezifische T-Zellen werden kurzzeitig *in vitro* stimuliert und zur Zytokinsekretion angeregt. Der spezifische Teil der Doppel-Ab bindet das sezernierte Zytokin und immobilisiert es auf der Zelloberfläche. Anschließend wird mit fluoreszenz-markierten oder magnetischen Ab gegen das sezernierte Zytokin gefärbt {Manz, 1995}. Nachfolgend können die Zellen durch FACS oder MACS isoliert werden.

Vorteil dieser Methode ist, daß antigen-spezifische Zellen lebend isoliert werden können. Durch die Wahl der Spezifität der Affinitätsmatrix können Zellen einer definierten Funktion gewonnen werden, zum Beispiel Zellen, die IFN γ sezernieren. Die so isolierten IFN γ sezernierenden T-Zellen sind bereits erfolgreich in der Tumorthherapie an Mäusen eingesetzt worden {Becker, 2001}. Gravierender Nachteil dieser Technik ist sicherlich der grobe Eingriff in die Oberflächenstruktur der Zellen durch das künstliche Anfügen der Affinitätsmatrix. Außerdem können auch antigen-unspezifische Zellen Zytokine binden, die von antigen-spezifischen Zellen in ihrer Umgebung sezerniert wurden. Dies sorgt für ein relativ starkes Hintergrundsignal. Dadurch daß antigen-spezifische Zellen ebenfalls funktionsabhängig über Zytokine detektiert werden, können wie bei den anderen funktionsabhängigen Techniken nicht immer alle Zellen einer antigen-spezifischen Population erfasst werden.

1.3.5 MHC-Multimere

Die einzige Methode antigen-spezifische T-Zellen komplett und unabhängig von ihrer Funktion darzustellen bietet die MHC-Multimer-Technologie {McMichael, 1999; Schneck, 2000; Ogg, 1998; McMichael, 1998; Altman, 1996; Busch, 1998}. MHC-Multimere bestehen aus mehreren MHC-Komplexen, die rekombinant *in vitro* zu MHC-Molekülen gefaltet und mit je einem Epitop definierter Antigen-spezifität beladen werden. Mehrere dieser beladenen MHC-Moleküle sind an ihrem biotinylierten Ende über ein Streptavidinrückgrat verbunden, das fluoreszenzkonjugiert ist. Damit ist es möglich, eine polyklonale Population antigen-spezifischer T-Zellen, die dasselbe Epitop erkennen, darzustellen {Busch, 1998; Altman, 1996}. Leider ist aufgrund des Fehlens von MHC II-Tetrameren im Listerieninfektionssystem, diese Art der Analyse bis heute nur für MHC I-restringierte CD8⁺ T-Zellen möglich.

Während man mit MHC I-Tetrameren polyklonale T-Zellpopulationen phänotypisch untersuchen kann, ist die funktionelle Analyse der isolierten Zellen aufgrund ihrer stark veränderten Physiologie nicht möglich {Knabel, 2002}. Diese Veränderungen der Funktionalität beruhen auf einer temperaturabhängigen Stimulation der T-Zellen durch MHC I/Peptid-Komplexe bei ihrer Bindung an den TCR, der den natürlichen Liganden der T-Zellen darstellt. Dieses Problem kann allerdings durch das Ablösen des MHC-Multimers von den TCR nach der Zellisolierung vermieden werden. Hierzu wird das Streptavidinrückgrat von den MHC I-Molekülen getrennt, die daraufhin aufgrund geringerer Avidität des einzelnen MHC I-Komplexes vom TCR abfallen. Die T-Zellen können nun unter Erhalt ihrer Funktion für weitere Analysen verwendet werden. Mit der MHC-Multimer-Technologie ist also sowohl die Visualisierung polyklonaler Populationen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen als auch deren funktionelle Analyse möglich.

1.4 *Listeria monocytogenes* Modellsystem

Ein geeignetes Modell, um antigen-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ Memory T-Zellen zu untersuchen, ist die Infektion mit dem Gram+, fakultativ intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes*.

Infektion mit diesem Bakterium induziert besonders starke CD8⁺ T-Zellantworten und vermittelt lang schützende Immunität {Kaufmann, 1995}. Der Erreger selbst ist im Unterschied zu vielen chronischen Virusinfektionsmodellen nach einer definierten Zeit nicht mehr im Körper nachweisbar. Chronische Infektionen sind nur in Abwesenheit adaptiver Immunmechanismen beschrieben worden. Dadurch ist dieses Modell besonders gut für die Untersuchung von Memory geeignet. Obwohl für die Protektivität insbesondere CD8⁺ T-Zellen verantwortlich sind, tragen auch *Listerien*-spezifische CD4⁺ Zellen zur Aufrechterhaltung der Immunität bei {Mombaerts, 1993}. Der direkte Vergleich der Immunantworten immundominanter und damit gut detektierbarer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen in diesem System bereitet aber Probleme. Da alle bisher bekannten immundominanten MHC II-Epitope auf dem genetischen H2^b Hintergrund identifiziert wurden, auf dem nur subdominante MHC I-Epitope für Wildtyp-*Listerien* bekannt sind, wird ein Modellantigen verwendet. Das Modellantigen ist in diesem Fall Ovalbumin, das von einem *Listerien*-Stamm rekombinant exprimiert und sezerniert wird {Pope, 2001}. Infektion mit *L.m.-Ova* resultiert in einer immundominanten H2-K^b restringierten Antwort gegen das Epitop SIINFEKL. Mit dieser Technik ist es möglich, die immundominante Antwort gegen das Epitop SIINFEKL für MHC I und das neu

identifizierte Epitop LLO₁₉₀₋₂₀₁ für MHC II zu vergleichen. Für die Untersuchung immundominanter antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen alleine muß nicht auf rekombinante *Listerien* zurückgegriffen werden. Nach Infektion mit natürlichen *L.m.* werden nämlich besonders große CD8⁺ T-Zellpopulationen gegen das immundominante Peptid LLO₉₁₋₉₉ auf dem genetischen H2^d Hintergrund beobachtet. Deren Frequenzen reichen von ca. 2 % nach Erstinfektion bis zu 20 % nach Sekundärinfektion {Busch, 1998}.

Nach i.v. Infektion mit einer subletalen Dosis von *L.m.* oder *L.m.-Ova* können die Mäuse die Infektion in der Regel gut kontrollieren. Nach überstandener Erstinfektion entwickeln sie einen sehr effektiven spezifischen Immunschutz, der dazu führt, daß bei einer erneuten Infektion deutlich höhere Infektionsdosen (10xLD₅₀) kontrolliert werden können {Harty, 1992; Kaufmann, 1995}.

1.5. Problemstellung

Antigen-spezifische Memory T-Zellen sind bis heute nur unzureichend charakterisiert. Eine grundlegende Analyse des Verhaltens von CD8⁺ Memory T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ Memory T-Zellen, ihres Phänotyps und ihrer Entstehung im Verlauf einer Immunantwort sind für das bessere Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen wegweisend. Erstes Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie sich CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen in der Memory-Phase unterscheiden. In den vorliegenden Kinetiken von CD4⁺ und CD8⁺ Memory T-Zellen nach Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *L.m.* wurde sowohl das funktionelle Verhalten als auch das Verteilungsmuster von Memory T-Zellen in verschiedenen Organen des zentralen und peripheren Kompartiments untersucht. Die Hypothese hierbei war, Unterschiede in der Stabilität der CD8⁺ und der CD4⁺ Memory T-Zellpopulation festzustellen und so Hinweise auf ihren unterschiedlichen Beitrag zur Protektivität zu erhalten.

Anhand der Ergebnisse dieses Vergleichs war das zweite Ziel dieser Arbeit, insbesondere CD8⁺ Memory T-Zellen im Hinblick auf ihren Phänotyp, ihre Entstehung und ihr Verteilungsmuster zu charakterisieren.

Eine Analyse der Markerexpression auf CD8⁺ T-Zellen und deren Veränderung über die Zeit sollte Aufschluß darüber geben, wie CD8⁺ Memory T-Zellen phänotypisch von anderen Entwicklungsstadien zu unterscheiden sind. Wenn es gelänge, eine Markerkombination zu finden, die spezifisch die Subpopulation CD8⁺ Memory T-Zellen charakterisiert, müsste in der Beobachtung der Expression dieser Marker über die Zeit auch ein Rückschluß über den Zeitpunkt der Entstehung von CD8⁺ Memory T-Zellen

möglich sein. Ferner kann durch das Verteilungsmuster der Subpopulation von CD8⁺ Memory T-Zellen, die diese Markerkombination exprimiert, in verschiedenen Organen des peripheren und zentralen Kompartiments auf das Migrationsverhalten und die Verteilung von CD8⁺ Memory T-Zellen im Körper geschlossen werden. Durch den Vergleich dieser definierten Subpopulationen in Mäusen, die Defekte in Generierung oder Erhalt von Memory aufweisen, könnten Hinweise auf die Bedingungen für die Etablierung der Memory T-Zellsubpopulationen gefunden werden. Die klare Definition des Phänotyps CD8⁺ Memory T-Zellen, ihres Entstehungszeitpunkts und ihres Verteilungsmusters würde erlauben, die Funktion dieser hochpotenten Zellen genauer zu untersuchen. Diese Charakterisierung hätte somit nicht nur Bedeutung für die Grundlagenforschung, sondern auch für die Diagnostik in der Beurteilung der Immunitätslage und des Erfolgs von Immunisierungen. Der adoptive Transfer dieser hochpotenten CD8⁺ Memory T-Zellen könnte zusätzlich in der Therapie zur Übertragung von Protektivität Anwendung finden.

2. MATERIAL UND METHODIK

2.1 Infektion von BALB/c und C57BL/6 mit *Listeria monocytogenes*

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden die Isolate *L.m.* 10403s (ATCC, Rockville, USA) und rekombinante *L.m.*, die das Modellantigen Ovalbumin sezernieren (zur Verfügung gestellt von Hao Shen, Philadelphia, USA) verwendet. Für Primärinfektionen wurde 6-8 Wochen alten, naiven C57BL/6 Mäusen (Harlan, Blackthorn, U.K.) eine subletale Dosis von 2×10^3 *L.m. Ova* (ca. $0.1 \times LD_{50}$) in 200 ml physiologischer Kochsalzlösung direkt in die Schwanzvene injiziert. Reimmunisierungen wurden i.d.R. 5 Wochen nach der Primärinfektion mit 2×10^5 *L.m.-Ova* (ca. $10 \times LD_{50}$) i.v. durchgeführt.

Analog zu C57BL/6 Mäusen wurden naive BALB/c Mäuse (Harlan, Blackthorn, U.K.) im 6-8 Wochen alten Stadium infiziert, unter Berücksichtigung der höheren Empfindlichkeit gegenüber *L.m.* mit reduzierter Dosis (1×10^3 *L.m.* 10403s oder entsprechend 1×10^5 *L.m.* 10403s nach 5 Wochen zur Reimmunisierung) {Harty, 1992; Kaufmann, 1995}. CD40L -/- Mäuse (BALB/c Hintergrund, zur Verfügung gestellt von Richard Flavell, Yale, USA) stammen aus eigener Zucht unter besonderen pathogenfreien Bedingungen.

2.2 Organentnahme und Isolierung der Lymphozyten

Am gewählten Tag nach Primärinfektion bzw. nach Reimmunisierung, wurden jeweils zwei C57BL/6 oder BALB/c Mäuse mit CO₂ getötet und die Milz (Abbildungsnummer 7), das Knochenmark, peripheres Blut, die intestinalen (Abbildungsnummer 5) und peripheren Lymphknoten (Abbildungsnummern 1a-c), die Leber, die Lunge und der Darm mit sterilem Präparationsbesteck entnommen (Bilder I-V). Dabei wurden Isolierungsprotokolle zum Teil in Anlehnung an „Current Protocols in Immunology“ verwendet {Coligan, 1996}.

2.2.1 Lymphknoten

Die Lymphknoten wurden durch ein Stahlnetz homogenisiert und in 10 ml RP10⁺ (RPMI 1640 mit 10 % FCS, L-Glutamin, HEPES [pH 7,5], β-Mercaptoethanol, Penicillin [100 U/ml], Streptomycin [100 mg/ml] und Gentamycin [50 mg/ml])

aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, ausgezählt und jeweils 6×10^6 Zellen pro Färbeansatz verwendet.

2.2.2 Milz

Die Milz wurde, wie unter 2.2.1 beschrieben, homogenisiert und in 10 ml RP10⁺ aufgenommen. Die Milzzellen wurden anschließend pelletiert (1500 rpm, 7 min, RT) und die Erythrozyten in 5 ml NH₄CL-Tris (0,17 M NH₄CL in 0,3 M Tris [pH 7,5]) für 7 min bei RT lysiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, ausgezählt und jeweils 6×10^6 Zellen pro Färbeansatz verwendet.

2.2.3 Peripheres Blut

Peripheres Blut wurde aus dem Herzen (Bild II, Abbildungsnummer 2) mit einer 27G^{4/5} Nadel (1 Sterican[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) punktiert und in Eppendorf Röhrchen, die mit Heparin (Liquemin[®] N 25 000, Roche, Basel, Schweiz) benetzt wurden, gefüllt. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (7000 rpm, 10 min, RT) und das Plasma entfernt. Das Pellet wurde dann in 300 µl PBS resuspendiert und die Erythrozyten in 10 ml NH₄CL-Tris für 15 min bei RT unter dauerndem Umschwenken lysiert. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (1500 rpm, 7 min, RT), gewaschen, ausgezählt und jeweils 6×10^6 Zellen pro Färbeansatz verwendet.

2.2.4 Knochenmark

Das Knochenmark wurde aus den langen Röhrenknochen der oberen und unteren Extremitäten gewonnen. Dazu wurden die Knochen freigelegt, am Schulter- bzw. Hüftgelenk exartikuliert und nahe der Epiphyse abgetrennt. Das Mark wurde durch Perfusion mit einer 27G^{1/2} Nadel (Microlance[™] 3, BD, Drogheda, Ireland) mit RP10⁺ herausgespült. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und analog zu 2.2.2 aufbereitet.

2.2.5 Lunge

Die Lunge wurde durch eine 27G^{3/4} Nadel (Microlance[™] 3, BD, Drogheda, Ireland) mit PBS/Heparin (75 U/ml) perfundiert. Dazu wurde zuerst die Aorta abdominalis durchtrennt. Die Nadel wurde dann über die Vena cava inferior (Bild II,

Abbildungsnummer 3) eingeführt und bis in den rechten Vorhof vorgeschoben. Nun wurde die Lunge solange perfundiert, bis die aus der Aorta austretende Flüssigkeit klar und das Lungengewebe weißlich erschien. Die Lungenflügel wurden entfernt, in kleine Stücke geschnitten und für 30 min in HBSS/EDTA (HBSS w/o Calcium und Magnesium (Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.) mit 1,3 mM EDTA (Dinatrium-Dihydrat, FW 292,2, Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) bei Raumtemperatur gerührt {Marzo, 2002}. Die Zellen wurden dann in 5% PBS/FCS zweimal gewaschen und durch Verdau mit Kollagenase Typ VIII (Kollagenase Typ VIII Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) in RPMI mit Zusatz (1mM MgCl₂ (FW 203,3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), 1 mM CaCl₂ (FW 147,0, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 5%FCS) bei 37 °C für 30 min verdaut. Anschließend wurden die Zellen über ein Zellsieb (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) mit 100 µm Porengröße homogenisiert, pelletiert und analog zu 2.2.1 aufbereitet.

2.2.6 Leber

Die Leber wurde durch eine 27G^{3/4} Nadel (Microlance™ 3, BD, Drogheda Ireland) mit „DM“ (2mg/10ml RPMI+SC⁺ Kollagenase Typ IV (Kollagenase Typ IV, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 0,2mg/10ml RPMI Dnase I, (Dnase I, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) perfundiert. Dazu wurde die Vena hepatica (Bild III, Abbildungsnummer 4a) durchtrennt und möglichst gleichzeitig die Leber über die Vena portae (Bild III, Abbildungsnummer 4b) perfundiert bis die Leberlappen hell erschienen. Diese wurden dann entnommen, durch ein Stahlnetz homogenisiert und in 10 ml RP10⁺ aufgenommen. Nach Pelletieren (1000 rpm, 10 min, 4°C) erfolgte der Verdau in 10 ml „DM“ für 40 min bei 37 °C. Dann wurde das Volumen auf 40 ml „DM“ aufgefüllt und der Überstand der Zentrifugation (300 rpm, 3 min, 4 °C) dekantiert. Nach Pelletieren der Lymphozyten wurden diese in 10 ml RP10⁺ aufgenommen und analog zu 2.2.1 aufbereitet.

2.2.7 Intestinum

Der Darm wurde distal am Sigma (Bild V, Abbildungsnummer 6a) und proximal am Pylorus (Bild V, Abbildungsnummer 6b) abgetrennt. Die Peyerschen Plaques wurden mit der Schere entfernt. Nach Entfernung des Fetts am Mesenterialansatz wurde der Kot ausgestrichen und der Darm längs aufgeschnitten. In mehreren Waschschritten in HBSS

(Gibco™, Invitrogen Corporation, Paisley, U.K.) wurde der Darm gereinigt und schließlich in kleine Stücke geschnitten.

2.2.7.1 Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)

Die Darmstücke wurden für 20 min bei 37 °C unter Schütteln in 1 mM HBSS/DTT von Fett gereinigt. Nach zwei Waschschritten in HBSS wurden die Zellen mit 0,1 mM HBSS/EDTA (Dinatrium-Dihydrat, FW 372,2, Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) 20 min inkubiert. Danach wurden die IEL durch vortexen für 15 s bei maximaler Umdrehungszahl weiter herausgelöst. Der Überstand wurde abgenommen und der Inkubationsschritt wiederholt. Die Überstände dieser beiden Schritte wurden zusammen 10 min auf Eis inkubiert, der Überstand vom Debris getrennt, pelletiert und in 5 ml RP10⁺ resuspendiert. Diese Inkubationsschritte wurden nochmals wiederholt und die erhaltenen Zellsuspensionen gepoolt. Die verbleibenden Darmstücke wurden 20 min bei Raumtemperatur unter Rühren in RP10⁺ gewaschen, der Überstand abgenommen, pelletiert und zu den bereits erhaltenen Lymphozyten hinzugefügt, die dann analog zu 2.2.1 aufbereitet wurden.

2.2.7.2 Lamina propria Lymphozyten (LPL)

Die Darmstücke wurden nun mit Kollagenase D (1 mg/ml, Roche, Mannheim, Deutschland) in RP10⁺ für 60 min verdaut und anschließend über ein Nylonnetz homogenisiert. Nach Pelletieren (1200 rpm, 7 min, 4 °C) wurden die Zellen in 10 ml RP10⁺ aufgenommen und analog zu 2.2.1 aufbereitet.

2.2.7.3 Peyersche Plaques (PP)

Die PP wurden analog zu den LPLs behandelt (2.2.7.2).

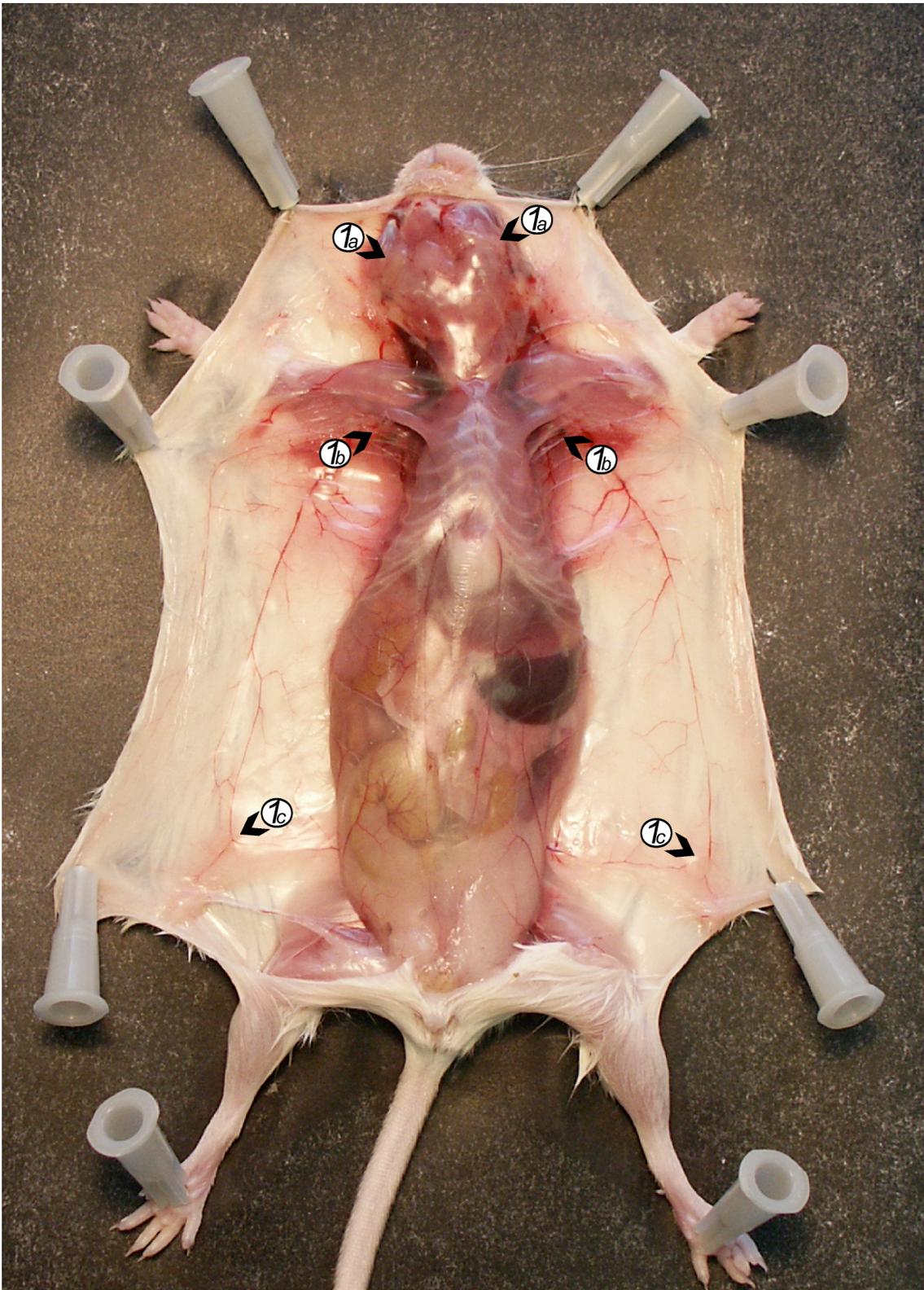


Bild I: Periphere Lymphknoten (1a) submandibulär
(1b) axillär
(1c) inguinal

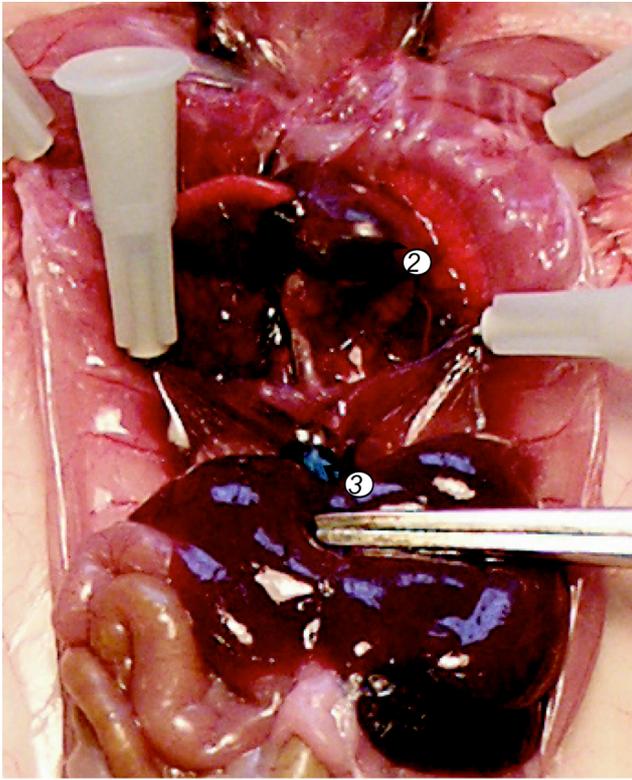


Bild II:

Herz und Lunge (2) Herz
(3) Vena cava inferior

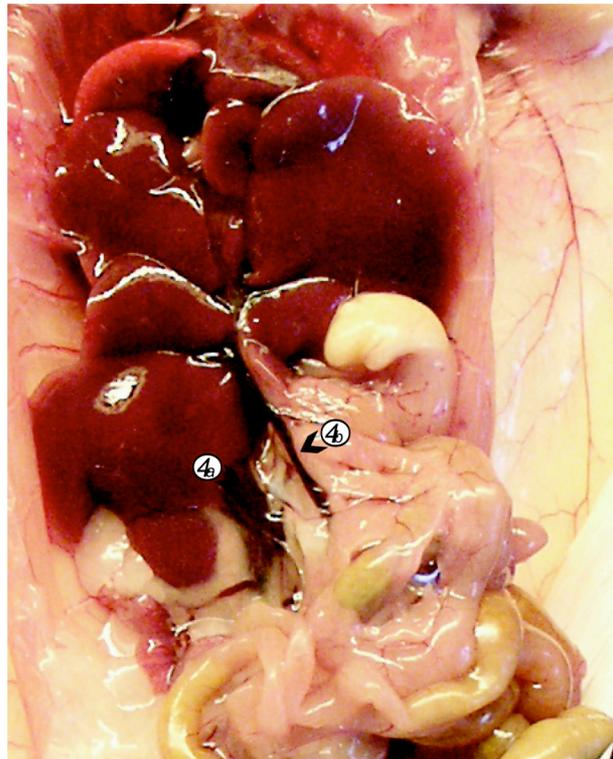


Bild III:

Leber (4a) Vena hepatica
(4b) Vena portae

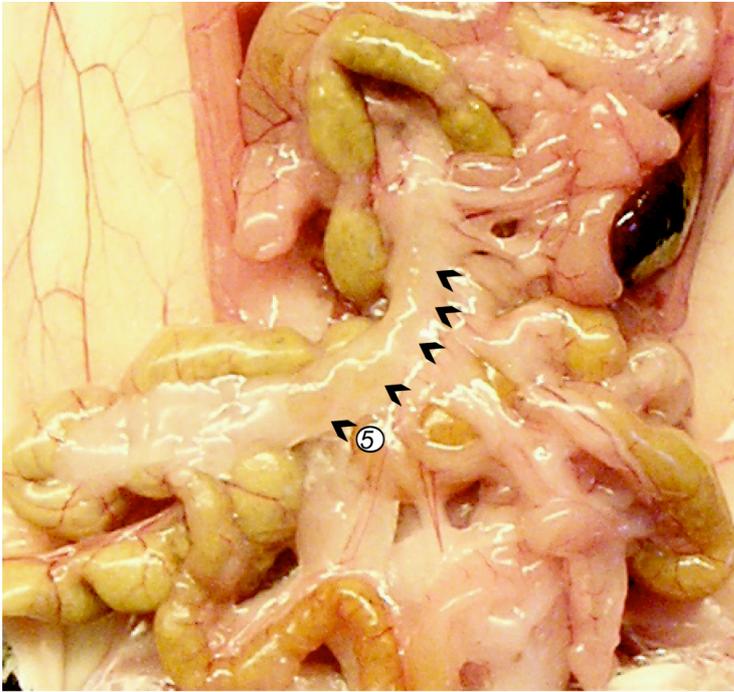


Bild IV:
(5) Intestinale Lymphknoten



Bild V: Darm und Milz
(6a) Colon sigmoideum
(6b) Pylorus
(7) Milz

2.3 MHC-Reagenzien

Nach den bereits etablierten Protokollen {Busch, 1998} wurden die Proteine H2-Kd#45 (H2-Kd ohne Transmembranregion und ohne intrazelluläre Domäne aber mit Biotinylierungssequenz am C-terminalen Ende {Schatz, 1993}, bzw. H2-Kb und Maus β 2m rekombinant in *E.coli* exprimiert, aufgereinigt und *in vitro* zu MHC I-Molekülen gefaltet.

Die für diese Studie verwendeten Peptide waren: LLO₉₁₋₉₉ (GYKDGNEYI) (Affina, Berlin, Deutschland) und Ova₂₅₈₋₂₆₄ (SIINFEKL) (Affina, Berlin, Deutschland).

Die korrekt gefalteten MHC-Moleküle wurden nun durch Zugabe des Enzyms BirA (Avidity, Colorado, USA) spezifisch biotinyliert. Anschließend erfolgte die schrittweise Zugabe von fluoreszenz-markiertem SA (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) in einem molaren Verhältnis von 5:1 SA zu biotinylierten MHC-Molekülen. Die schrittweise Zugabe des SA soll bewirken, daß die MHC-Moleküle immer im Überschuß vorhanden sind und alle 4 Bindungsstellen des zugegebenen SA abgesättigt werden. Hierdurch wird die Ausbildung von Mono-, Di- und Trimeren verhindert. Die in diesen Experimenten verwendeten Fluoreszenzen waren PE oder APC. Überschüssige MHC-Moleküle wurden danach durch Zentrifugation über eine 100 kD-Membran (Millipore, Bedford, USA) entfernt und gleichzeitig der Pufferaustausch zu PBS pH 8,0 (+ 2 μ l 0,5M NaEDTA, 1 ml 30 % NaN₃, 0,5 μ l Leupeptin (2 μ g/ml) und 0,5 μ l Pepstatin (2 μ g/ml) pro ml MHC-Molekül-Lsg.) durchgeführt. Die so generierten Tetramere wurden exakt austitriert und lichtgeschützt bei 4°C aufbewahrt.

2.4 Färbung *ex vivo* gewonnener T-Lymphozyten

Für die *ex vivo* Färbung von T-Zellen wurden die Organe der zu untersuchenden Mäuse wie unter 2.2 beschrieben entnommen. Die Zellen wurden anschließend durch ein Nylonnetz filtriert, um größere Zellklumpen, die das Zytometer verstopfen könnten, zu entfernen.

2.4.1 Tetramerfärbung

Die Färbungen wurden in 96 „well“ Platten mit Rundboden durchgeführt, wobei annähernd 6×10^6 Zellen pro Färbeansatz verwendet wurden. Um unspezifische Bindung von fluoreszenz-markierten mAbs zu verhindern, wurden die Proben vor der

Färbung mit Fc-block-Reagenz (blockierender Antikörper für Fc-Rezeptor [CD32/CD16], BD Biosciences, ParMingen, San Diego, USA) behandelt. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurde die Fc-block-Behandlung mit einer Ethidium Monazid-Färbung (EMA, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) kombiniert {O'Brien, 1995}. Diese hat den Vorteil gegenüber einer Propidiumjodid-Färbung, daß die Zellen nach der Färbung fixiert werden können, da EMA durch Lichtexposition kovalent an die DNA toter Zellen gebunden wird. Die Zellen wurden zunächst im Dunkeln für 20-30 min mit 2 µg/ml EMA inkubiert und anschließend für 10 min Licht ausgesetzt (40 W Lampe, ca. 30 cm Abstand). Danach wurden die Proben gewaschen und die Färbung mit fluoreszenz-konjugierten mAbs für 20 min oder MHC-Multimerreagenzien für 45 min in 50 ml auf Eis und in Dunkelheit durchgeführt. Bei gleichzeitiger Verwendung von mAb und MHC-Multimeren wurde immer für 45 min inkubiert. Alle mAbs und Multimerreagenzien wurden exakt austitriert und in sättigenden Konzentrationen verwendet. Abschließend wurden die Zellen gewaschen, in 2% PFA fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Alle Färbe- und Waschschrte wurden ausschließlich in FACS-Färbepuffer (PBS pH 7.45, 0,5% BSA, 0,02% NaN₃) durchgeführt.

2.4.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Für die intrazellulären Zytokinfärbungen wurden je nach Zellmenge annähernd 1×10^7 oder 2×10^7 Zellen pro Stimulationsansatz verwendet. Die in DMSO gelösten Peptide Ova₂₅₈₋₂₆₄ (SIINFEKL) (Affina, Berlin, Deutschland) und LLO₁₉₀₋₂₀₁ (Affina, Berlin, Deutschland) sowie als Kontrolle DMSO alleine (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) wurden jeweils getrennt in einer Konzentration von 1 µM zur Stimulation verwendet. Je nach Gesamtzellzahl wurden 1×10^7 Zellen in einem Volumen von 1 oder 2 ml in einer 24 „well“ Platte für zwei Stunden bei 37°C stimuliert. Anschließend wurde der Transport aus dem Golgi-Apparat durch Zugabe von Brefeldin A (Golgi-Plug™, BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA) für annähernd acht Stunden bei 37°C geblockt, sodass neu gebildetes Zytokin in der Zelle verblieb. Nach Überführen der Zellen in 15 ml Röhren wurden die Zellen gewaschen, analog zu 2.4.1. mit EMA/Fc-block behandelt und die Zelloberfläche mit fluoreszenz-konjugierten mAbs gefärbt. Dann wurden die Zellen gewaschen und in 100 µl Cytofix/Cytoperm™ (Biosciences ParMingen, San Diego, USA) im Dunkeln für 20 min bei 4 °C fixiert und permeabilisiert. Die mit Perm/Wash™ Puffer (BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA) gewaschenen Zellen wurden dann im Dunkeln für 30 min bei 4 °C mit

fluoreszenz-konjugierten mAbs intrazellulär gefärbt. Die Zellen wurden wiederum in Perm/Wash™ Puffer (BD Biosciences ParMingen, San Diego, USA) und abschließend in FACS-Färbepuffer (PBS pH 7.45, 0,5 % BSA, 0,02 % NaN₃) gewaschen. Nach Fixierung in 1 % PFA erfolgte die durchflußzytometrische Analyse der Zellen.

2.5 Durchflußzytometrische Analyse und Auswertung

Die Proben der Vierfarbenanalyse wurden an einem FACSCalibur (FACSCalibur, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingelesen, die mit mehr als vier Farben an einem MoFlo (Cytomation, Freiburg, Deutschland).

Die Auswertung der Daten wurde mit Flow Jo V 3.4 oder 4.2 Software (Tree Star, San Carlos, USA) durchgeführt.

Im Falle der intrazellulären Zytokinfärbung wurden von allen lebenden Lymphozyten die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen auf ihr intrazelluläres Zytokinprofil mit Hilfe von fluoreszenz-konjugierten mAbs untersucht. Analog dazu wurden mit der Tetramerfärbung alle antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf die Expression von Oberflächenmolekülen analysiert. Es wurden weiterhin absolute und relative Zellzahlen der untersuchten Populationen bestimmt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Kinetiken antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellpopulationen nach Infektion mit *L.m.-Ova*

Um die Kinetiken antigen-spezifischer CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellpopulationen in verschiedenen Organen des peripheren und zentralen Kompartiments zu vergleichen, wurden sie an verschiedenen Zeitpunkten der Primär- und Sekundärimmunantwort nach spezifischer Stimulation mit LLO₁₉₀₋₂₀₁ oder SIINFEKL auf die Expression von IFN γ untersucht. Hierbei zeigte sich, daß an primär und recall Tag 7 in den meisten Organen große Populationen an antigen-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen existieren. Es beherbergen dabei nicht nur Organe des zentralen Kompartiments hohe Zellzahlen von beiden Zelltypen, sondern auch periphere, besonders auffällig hierbei Blut und Lunge (Abbildung 1). Im Verlauf der Immunantwort verhalten sich CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen allerdings unterschiedlich. Während die antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen vor allem peripher bis in die Memory-Phase auf hohem Niveau erhalten bleiben, nehmen die antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in allen untersuchten Organen dramatisch ab (Tabelle 1). Eine Ausnahme bildet nur das Knochenmark, wo die Anzahl der antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen relativ konstant bleibt. Allerdings sind die Frequenzen in diesem Organ generell sehr niedrig. Eine spezielle Akkumulation von CD4⁺ T-Zellen ist in keinem Organ nachweisbar. Insgesamt zeigt sich, daß CD4⁺ T-Zellen bei Infektion rasch auf ein hohes Niveau expandierbar sind, aber im Gegensatz zu CD8⁺ T-Zellen auf diesem Niveau in keinem Organ erhalten bleiben.

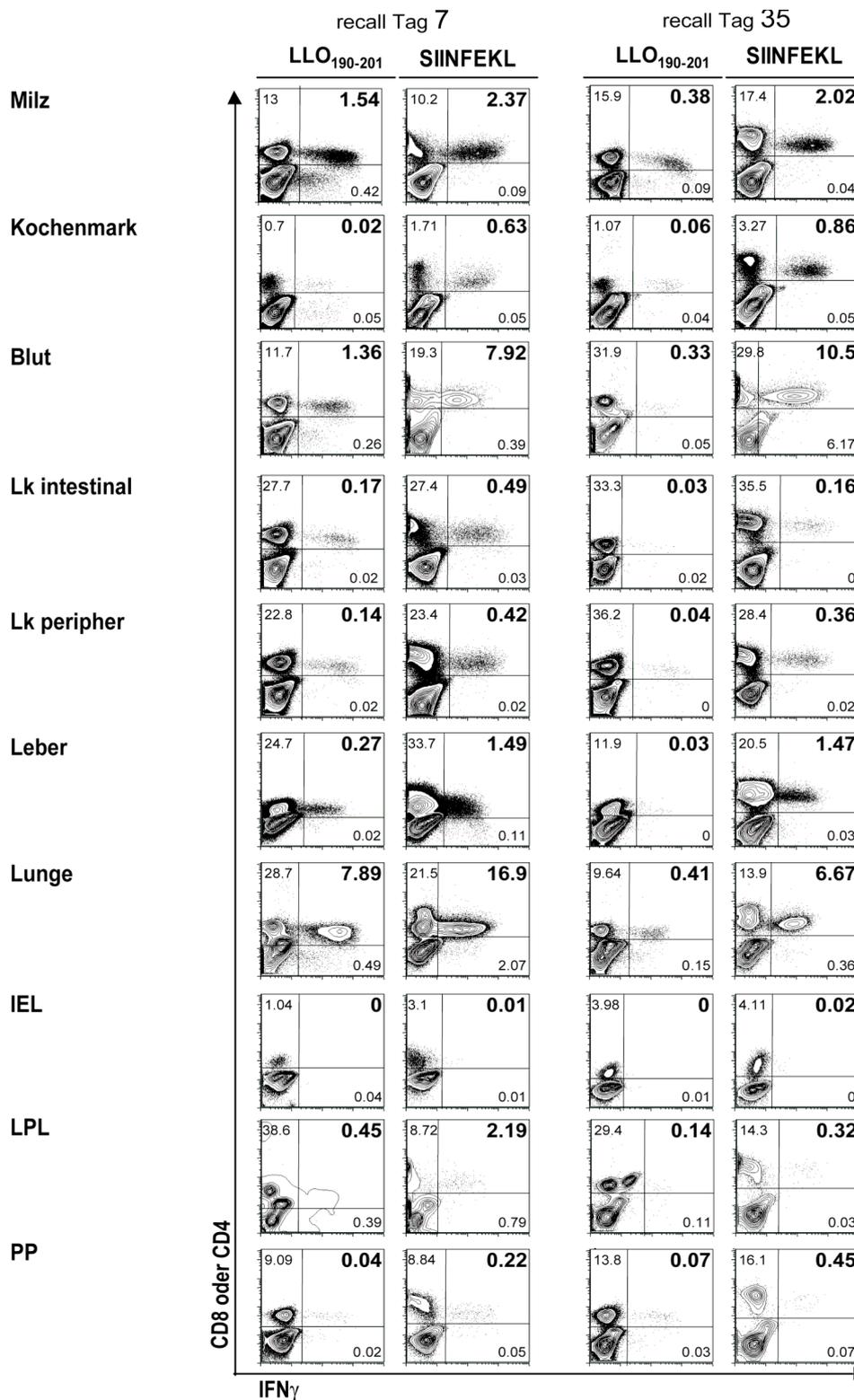


Abbildung 1: Kinetik CD4⁺(LLO₁₉₀₋₂₀₁) und CD8⁺(SIINFEKL) IFN γ -produzierender T-Zellen in verschiedenen Organen nach Infektion mit *L.m.-Ova.*. Dot Plots sind repräsentativ für vier C57BL/6 Mäuse 7 und 35 Tage nach recall Infektion. Zahlen geben den Anteil der Zellen jedes Quadranten an.

SIINFEKL	recall Tag 7	recall Tag 35	% Abnahme
Milz	27.78 (+/- 8.89)	9.85 (+/- 0.58)	64.56
Knochenmark	34 (+/- 7.5)	22.39 (+/- 1.71)	34.15
Blut	35.85 (+/- 7.25)	27.59 (+/- 2.41)	23.05
Lymphknoten	1.57 (+/- 0.13)	0.88 (+/- 0.4)	44.27
Leber	7.79 (+/- 1.53)	6.38 (+/- *)	18.10
Lunge	45.3 (+/- 2.5)	28.94 (+/- 3.66)	36.11

LLO₁₉₀₋₂₀₁	recall Tag 7	recall Tag 35	% Abnahme
Milz	9.79 (+/- 0.85)	1.82 (+/- 0.39)	81.41
Knochenmark	4.83 (+/- 1.47)	5.14 (+/- 0.39)	- 6.42
Blut	7.28 (+/- 3.34)	2.03 (+/- 1.1)	72.12
Lymphknoten	0.66 (+/- 0)	0.12 (+/- 0)	81.35
Leber	1.13 (+/- 0.89)	0.24 (+/- *)	79.20
Lunge	19.34 (+/- 14.12)	3.13 (+/- 1.17)	83.81

Tabelle 1: Mittelwerte der Prozentzahlen IFN γ -produzierender CD4⁺ (LLO₁₉₀₋₂₀₁) und CD8⁺ (SIINFEKL) T-Zellen mit Standardabweichungen. Zahlen sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente von jeweils zwei Mäusen gepoolt an Tag 7 und 35 nach recall Infektion (N=4). Die prozentuale Abnahme über die Zeit entspricht der Formel $100 - (\text{Mittelwert Tag 35} / \text{Mittelwert Tag 7} \times 100)$. * Werte repräsentativ für ein Experiment von jeweils zwei Mäusen gepoolt an Tag 7 und 35 nach recall Infektion (N=2). Lymphknoten entsprechen peripheren Lymphknoten.

3.2 Kinetik antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Infektion mit *L.m.*

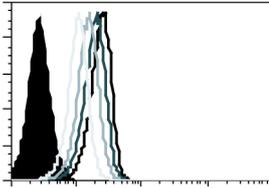
Die selektive Erhaltung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen auf hohem Niveau in allen untersuchten Organen des peripheren und zentralen Kompartiments legt eine besondere Bedeutung dieser Population für das immunologische Gedächtnis nach Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *L.m.* nahe. Deswegen wurde die Kinetik antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in diesen Organen weiter mit Tetrameren untersucht. Die Kinetik in der Milz wurde aufgrund ihrer Mittelstellung zwischen peripherem und zentralem Kompartiment auf mehrere Zeitpunkte ausgedehnt.

3.2.1 Testung der Tetramere

In den folgenden Versuchsreihen wurden die LLO_{91,99} spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch fluoreszenz-konjugierte Tetramere sichtbar gemacht. Die Tetramere wurden zuerst an

einer CD8 positiven T-Zelllinie, deren TCR spezifisch für das Epitop LLO₉₁₋₉₉ in Zusammenhang mit H2-K^d ist, auf ihre Spezifität getestet (Abbildung 2.1). Ihre optimale Konzentration wurde für die T-Zellfärbung zusätzlich an CD8⁺ T-Zellen direkt *ex vivo* ausitiert (Abbildung 2.2).

2.1



2.2

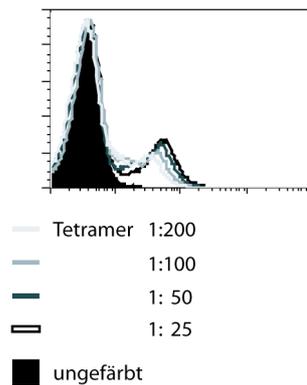


Abbildung 2: Titration der für das Epitop LLO₉₁₋₉₉ spezifischen Tetramere an einer LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zelllinie (2.1) und an CD8⁺ T-Zellen *ex vivo* aus der Milz 5 Tage nach recall Infektion (2.2)

3.2.2 Kinetik der Anzahl antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz

Aufgrund einer Ausbeute von nahezu 100% bei Isolierung von Lymphozyten aus der Milz kann man anhand gezählter Lymphozytenzahlen und Prozentzahlen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen die absoluten Zahlen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen berechnen.

Betrachtet man den Verlauf der absoluten Zahlen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Milz nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*, sieht man eine typische Kinetik mit den Stadien: Expansionsphase, Kontraktionsphase und Memory Phase (Abbildung 3).

Während in der Primärantwort das Maximum der Expansionsphase zwischen Tag 6 und 8 erreicht wird, expandieren die Zellen der Sekundärantwort wesentlich schneller und erreichen ihr Maximum schon an Tag 4 bis 6. Darüber hinaus beträgt die Größe der epitop-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach der Sekundärantwort ein Zehnfaches derjenigen der Primärantwort.

Nach der Kontraktionsphase persistiert ein stabiler Pool von Memory T-Zellen, der im Falle der Reimmunisierung Ausgangspunkt für eine schnelle Expansion ist. Ähnlich wie die maximal expandierte Population nach Sekundärinfektion, ist auch die nachfolgende antigen-spezifische Memory T-Zellpopulation etwa zehnmal größer als nach Primärinfektion.

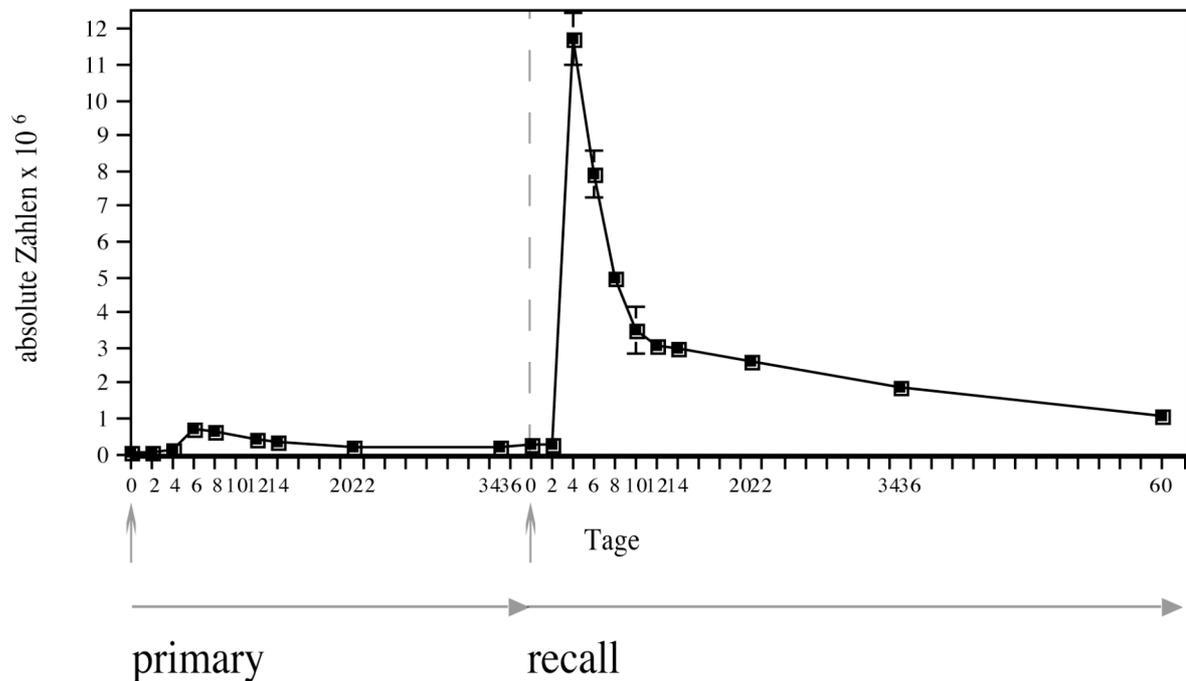


Abbildung 3: Kinetik der absoluten Anzahl LLO₉₁₋₉₉ spezifischer T-Zellen in der Milz nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.* (je zwei BALB/c Mäuse pro Zeitpunkt). Pfeile markieren die Infektionszeitpunkte an primary und recall Tag 0.

3.2.3 Kinetik der Prozentzahlen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in Organen des peripheren und zentralen Kompartiments

Aufgrund der geringeren Ausbeute an Lymphozyten aus den meisten anderen Organen lassen sich nur die relativen Prozentzahlen vergleichen. In der Primärantwort zeigt sich in allen Organen eine mehr (vgl. Lunge) oder weniger (vgl. Leber) starke Kontraktion antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Abbildungen 4). Im Blut und Knochenmark steigen die Frequenzen sogar leicht an. In der Memory Phase sind die Frequenzen dann in fast allen Organen mehr oder weniger stark abgefallen. Nur die peripheren Lymphknoten zeigen einen leichten Frequenzanstieg antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Aufgrund der erhöhten Frequenzen sind Veränderungen besser in der Sekundärantwort zu erkennen (Abbildungen 4). Ausgehend von der oben beschriebenen Kinetik sieht man auch hier in der Milz eine Abfolge von Expansions-, Kontraktions-,

und Memory Phase und der prozentuale Anteil antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen erreicht wieder ein Plateau. Die Frequenzen von recall Effektor und Memory T-Zellen sind in manchen Organen, wie zum Beispiel Leber und Lunge, besonders hoch, in anderen, wie zum Beispiel den Lymphknoten, sieht man eine geringere Zunahme. In Organen des zentralen Kompartiments, wie periphere Lymphknoten und Peyersche Plaques, ähnelt sich der Verlauf nach Zweitimmunisierung. Die Zellen der Peyerschen Plaques scheinen sich auf sehr hohem Niveau zu stabilisieren, die der peripheren Lymphknoten dagegen auf niedrigerem. Einen ähnlichen dreiphasigen Verlauf, mit Stabilisierung auf hohem Niveau in der Memory Phase, sieht man auch in der Leber. Die eher dem peripheren Kompartiment zugehörige Lunge zeigt eine dramatische Zunahme in der Expansionsphase, zu späteren Zeitpunkten aber einen kontinuierlichen Abfall an antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Einen kontinuierlichen Anstieg von antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen über die Expansionsphase hinaus findet man in Blut und Knochenmark. Intestinale Lymphknoten zeigen einen Anstieg ohne sichtbare Kontraktionsphase. Allerdings machen die sehr niedrigen Frequenzen die genaue Beurteilung der Kinetiken in intestinalen Lymphknoten schwierig. Die Lymphozyten aus der Lamina propria und dem Epithel des Darmes zeigen keine wesentlichen prozentualen Veränderungen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen.

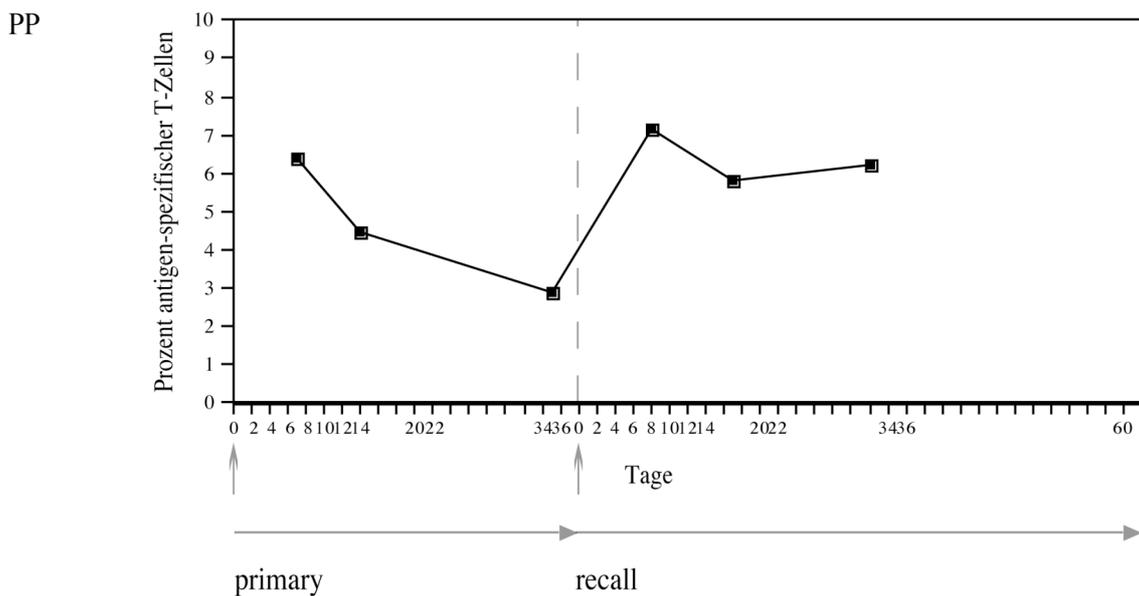
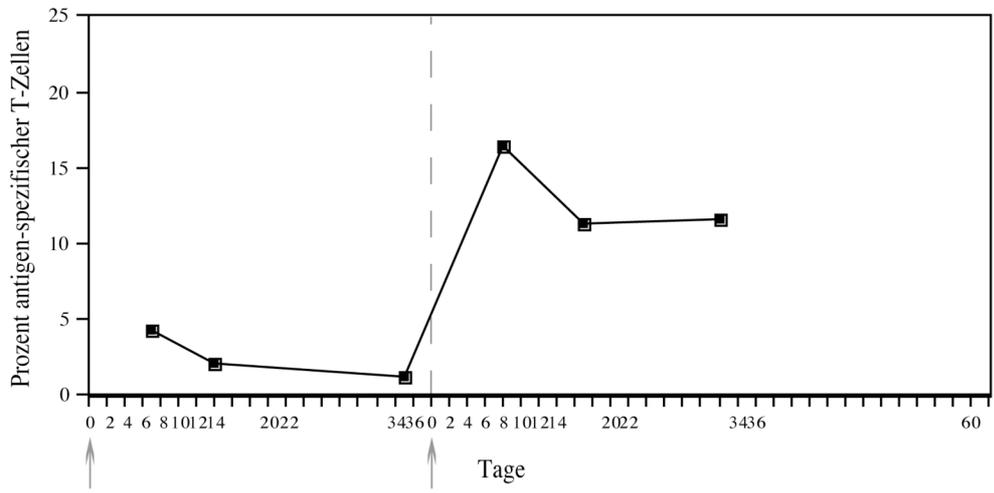
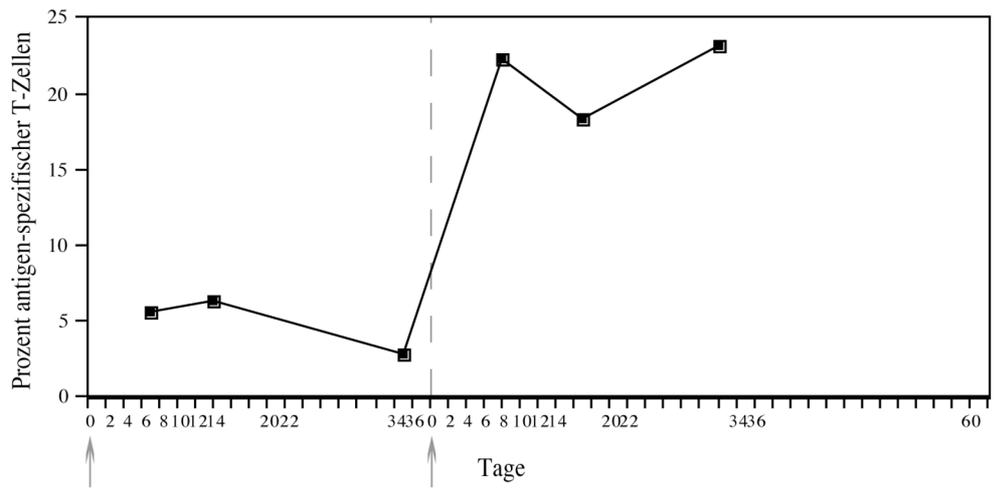


Abbildung 4.1

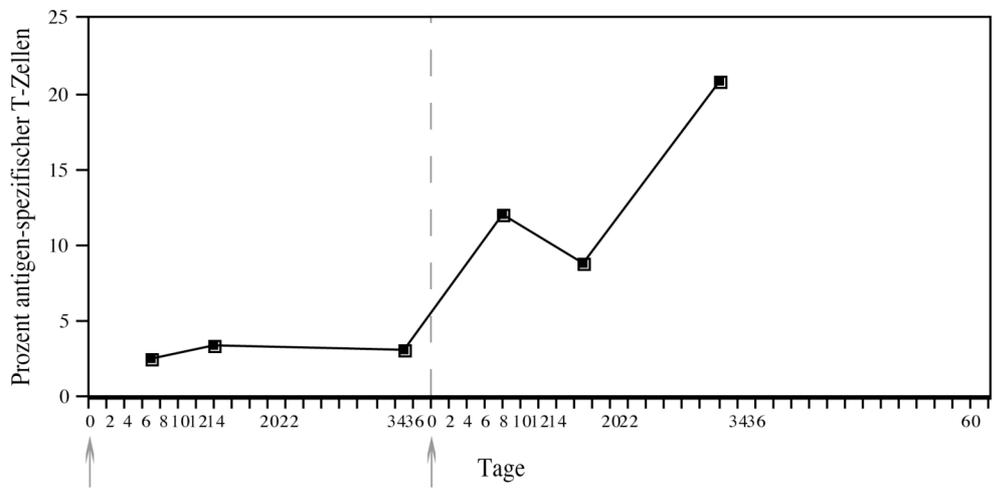
Milz



Knochenmark

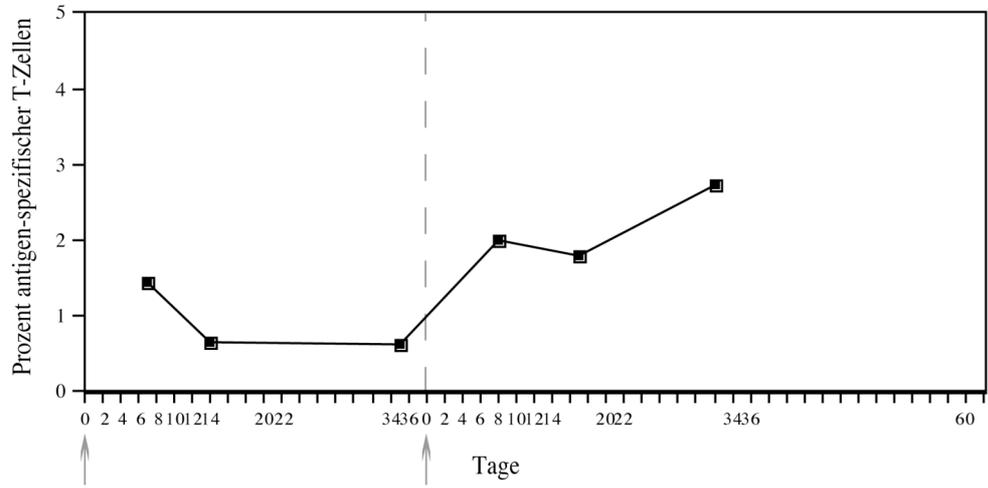


Blut

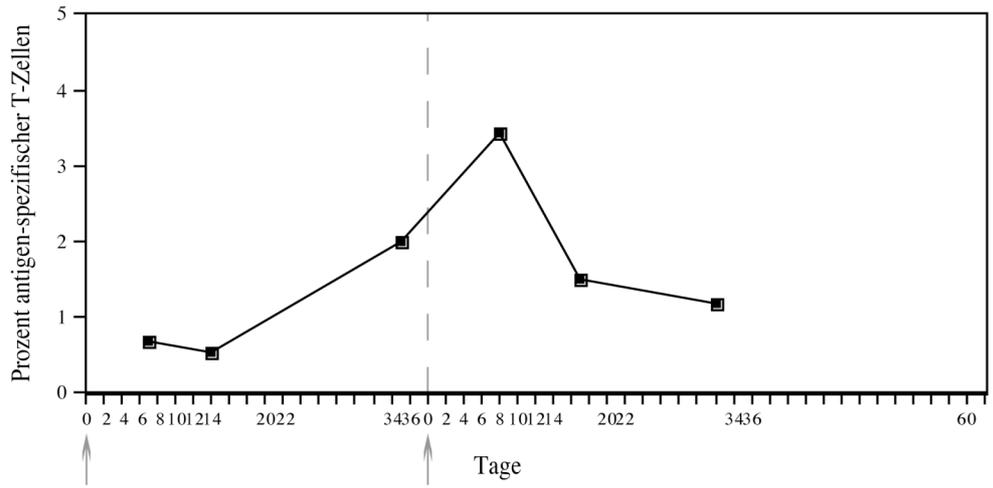


Abbildungen 4.2- 4.4

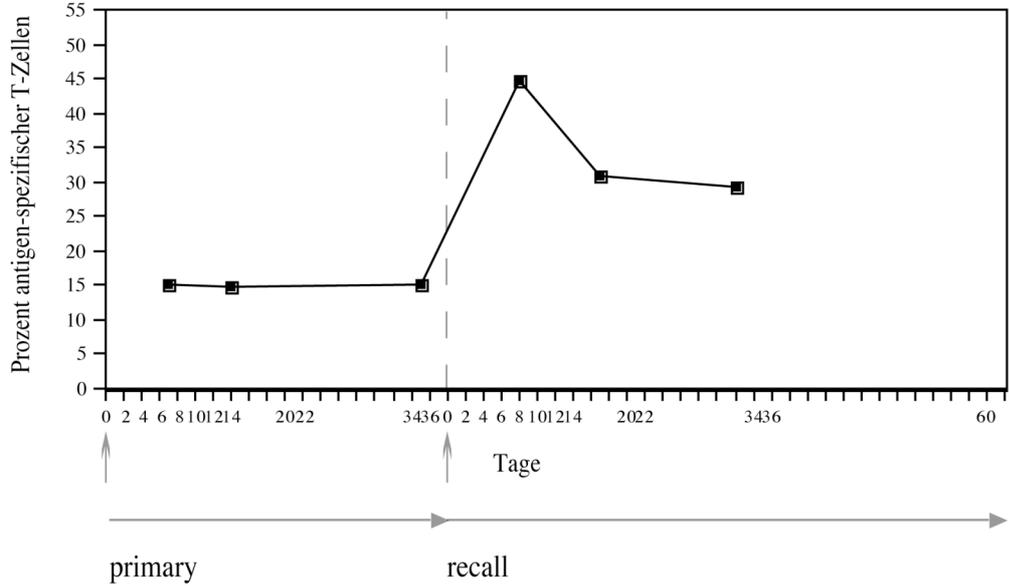
Lk
intestinal



Lk
peripher

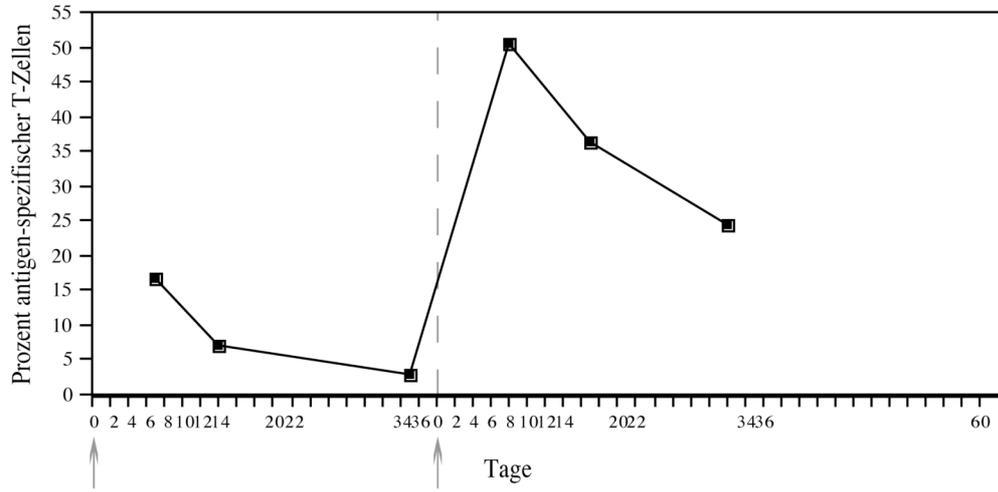


Leber

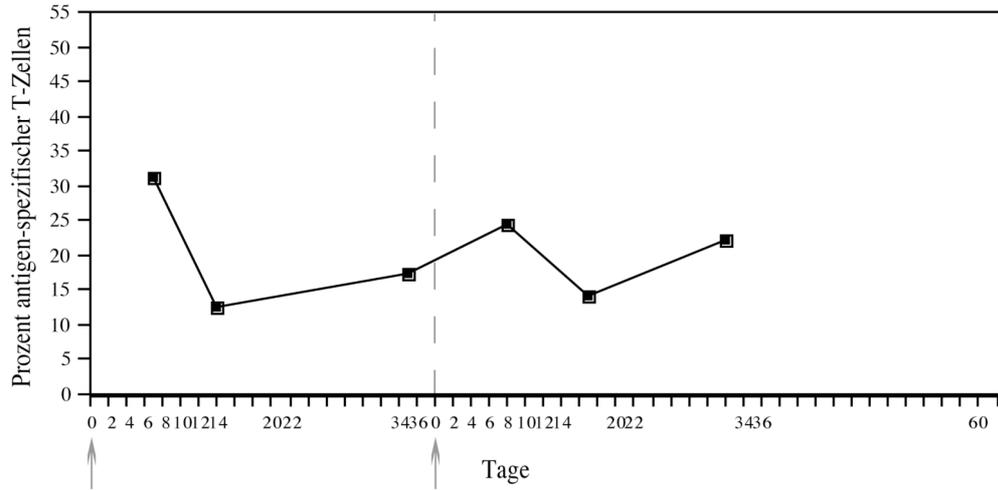


Abbildungen 4.5- 4.7

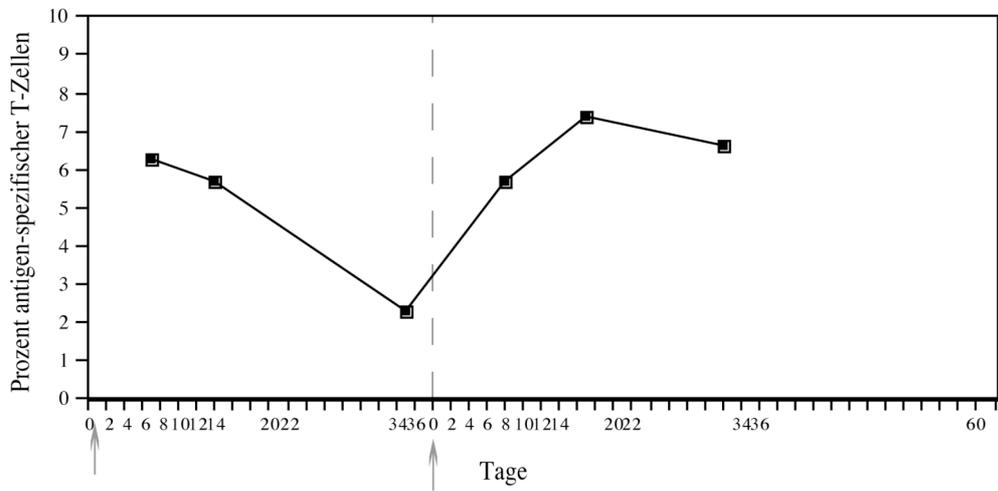
Lunge



IEL



LPL



Abbildungen 4.8-4.10

Abbildungen 4: Kinetiken der relativen Anzahl der LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellpopulation in verschiedenen Organen nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.* (je zwei Balb/c Mäuse pro Zeitpunkt gepoolt). Pfeile markieren die Infektionszeitpunkte an primary und recall Tag 0.

3.3 Kinetiken verschiedener Oberflächenmarker auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz

Um antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen über die Zeit genauer zu charakterisieren, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf Lymphozyten der Milz untersucht. Die lebenden (EMA negativen) Lymphozyten, die CD8 positiv und antigen-spezifisch (Tetramer positiv) sind, wurden auf ihre Markerexpression untersucht (Abbildung 5). Für eine Abgrenzung zwischen Marker hoch und niedrig exprimierenden Populationen wurden die auf den Marker gefärbten mit den für diesen ungefärbten Zellen verglichen. Da vermutet wird, daß die Milz vor allem in der Memory Phase eine Mischpopulation des zentralen und peripheren Kompartiments beherbergt, fokussierte diese Untersuchung insbesondere auf dieses Organ. Die Marker wurden nach ihrer möglichen Einflußnahme auf Generierung und Erhalt von Memory T-Zellen ausgewählt. Zu ihnen gehören Oberflächenmoleküle der Effektor- und Posteffektorphase einschließlich Apoptoseinduktoren, Aktivierungs- und Homingrezeptoren, kostimulatorische Moleküle und Wachstumsfaktorrezeptoren (Tabelle 2)

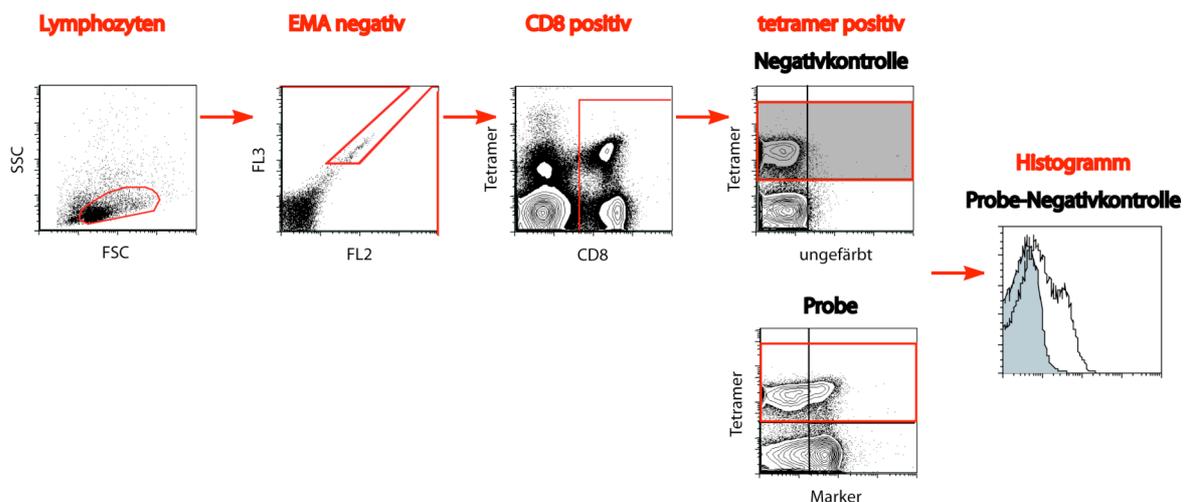


Abbildung 5: Schema der Auswertung für die Bestimmung der Kinetiken verschiedener Oberflächenmarker auf CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen. Rot bezeichnet sind die durch das Gate eingegrenzten Zellen, die im jeweils nächsten Schritt analysiert werden. Die Abgrenzung zwischen hoch und niedrig exprimierenden Zellen für den jeweiligen Marker der Probe wurde anhand der Negativkontrolle getroffen. Die Markerexpression ist schließlich als Dot Plot und Histogramm dargestellt.

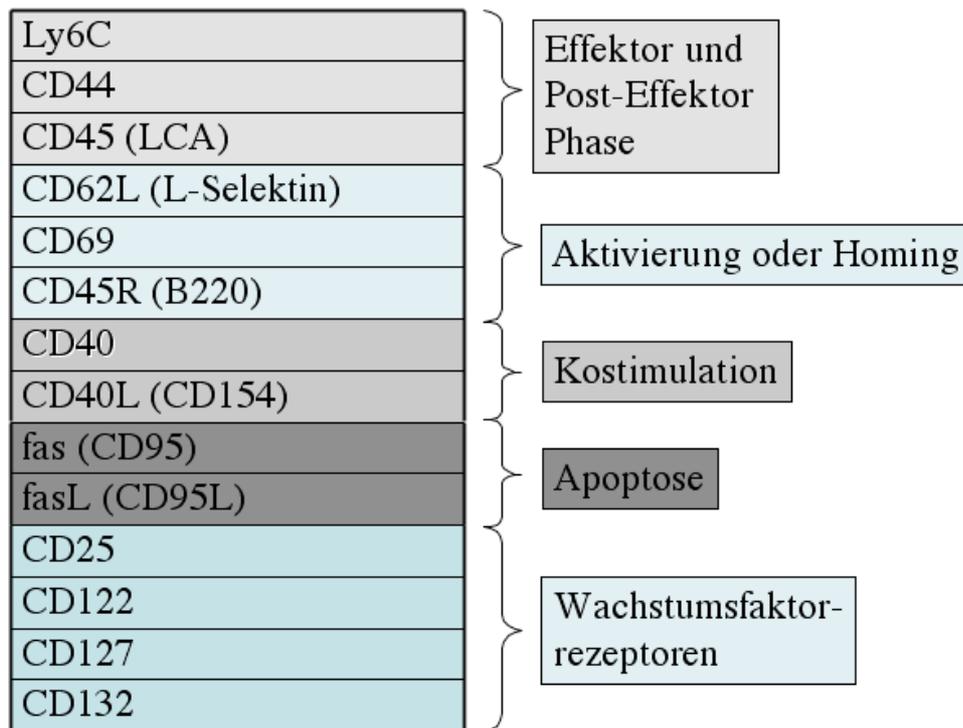


Tabelle 2: Übersicht der Gruppen untersuchter Oberflächenmarker

3.3.1 Marker der Effektor- und Post-Effektorphase

Als Moleküle der Effektor- und Post-Effektorphase sind Ly6C, CD44 und CD45 (LCA), außerdem die Apoptoseinduktoren fas und fasL untersucht worden.

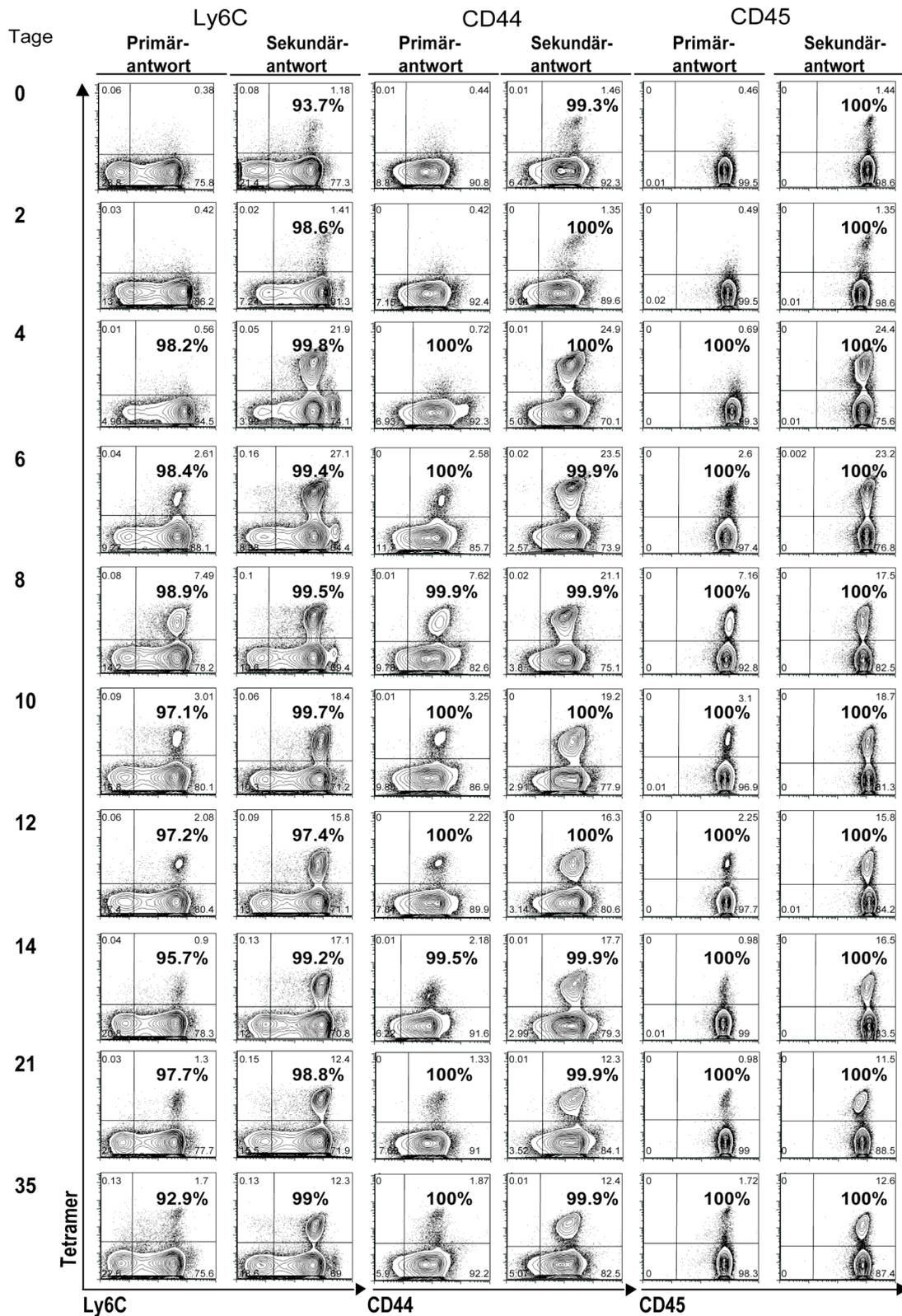
CD44 ist ein Adhäsionsmolekül, das auf T-Zellen sowohl temporär während ihrer Entwicklung im Thymus als auch in höherem Maße auf Memory T-Zellen exprimiert wird. CD45 erfährt auf Memory T-Zellen alternatives Spleißen seiner extrazellulären Domäne in die Isoformen CD45RA und RO, die durch Bindung an den TCR die Antigenerkennung erleichtern. Ly6C wird auf T-Zellen nach Aktivierung exprimiert und hat akzessorische Funktion in der Zytolyse von Zielzellen {Johnson, 1993}. Es stimuliert ebenso T-Zellproliferation und IL-2 Produktion nach Aktivierung {Dumont, 1987} und vermittelt als Adhäsionsmolekül *in vivo* Homing von CD8⁺ T-Zellen {Hanninen, 1997}.

Fas-Expression auf CD8⁺ T-Zellen triggert durch Bindung an fasL Apoptose {Nagata, 1995}. Dieser Mechanismus soll für negative Selektion und den Aufbau des Memory B-Zellrepertoires von Bedeutung sein {Takahashi, 2001}. Eine ähnliche Funktion auf T-Zellen wird diskutiert.

Die „antigen-experienced“ T-Zellmarker CD44 und Ly6C werden nach Antigenkontakt auf nahezu allen antigen-spezifischen T-Zellen exprimiert (Abbildung 6.1 und 2), fasL dagegen nur zu Beginn der Expansionsphase (Abbildung 7.1 und 2).

CD45 wird auf allen CD8⁺ T-Zellen, durchgehend hoch exprimiert. Die Expression von CD44 und Ly6C auf antigen-spezifischen T-Zellen unterscheidet sich eindeutig von der Expression auf der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen, die einen großen Pool an naiven und nicht *L.m.*-spezifischen T-Zellen einschließt. Antigen-spezifische Zellen sind praktisch zu 100% positiv für CD44 und Ly6C. Betrachtet man anhand des geometrischen Mittels die Expressionsintensität, zeigt CD44 auf dem Höhepunkt der Expansionsphase leicht erhöhte Expression, die mit der nachfolgenden Kontraktionsphase wieder abnimmt. Die Expression von Ly6C steigt ebenfalls während der Effektorphase an und erreicht nach der primären Kontraktionsphase ihre niedrigsten Werte. Interessanterweise steigt das geometrische Mittel nach Zweitimmunisierung schnell an und stabilisiert sich dann auf einem deutlich höheren Niveau im sekundären Memory T-Zellpool.

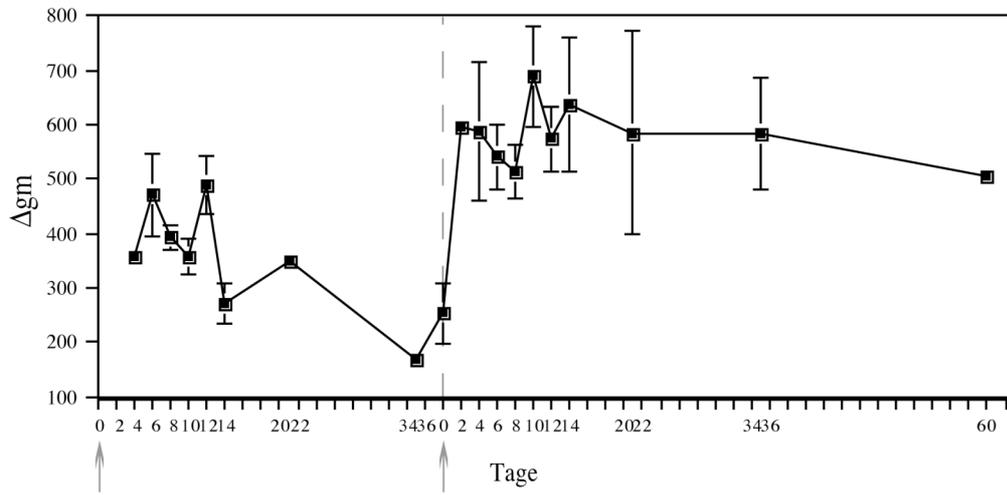
Eine Population antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, die fasL exprimiert, ist an Höhepunkten der Expansionsphase zwar abgrenzbar, dennoch scheinen fasL exprimierende Zellen im gesamten Verlauf eher in geringerer Zahl zu finden zu sein. Der Bindungspartner fas hingegen wird kurz vor der maximalen Expansion antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen höher exprimiert und ist am Höhepunkt der Immunantwort wieder auf niedrigem Niveau. Dies läßt sich sowohl anhand der relativen Anzahl fas positiver antigen-spezifischer T-Zellen als auch am Verlauf des geometrischen Mittels verfolgen.



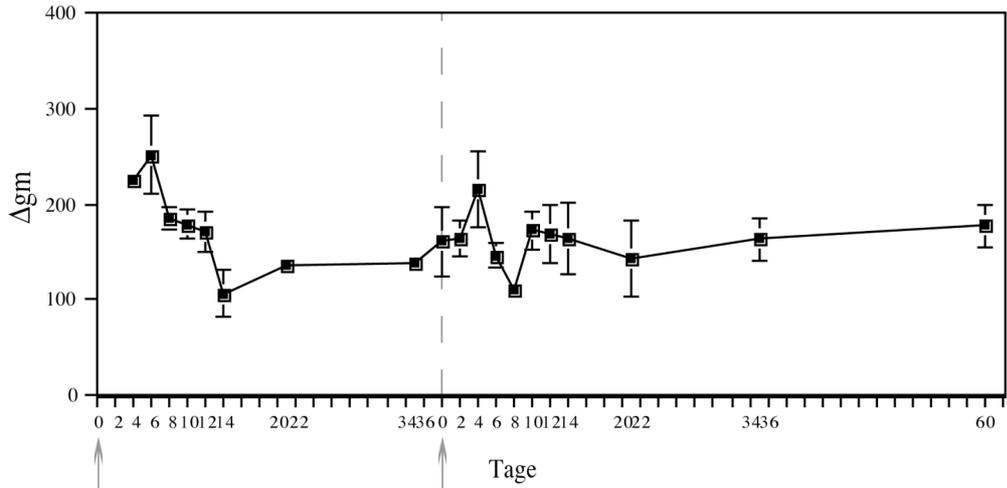
Abbildungen 6:

6.1 Kinetik der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von CD44 (FITC) CD45 (FITC) und Ly6C (FITC) nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.

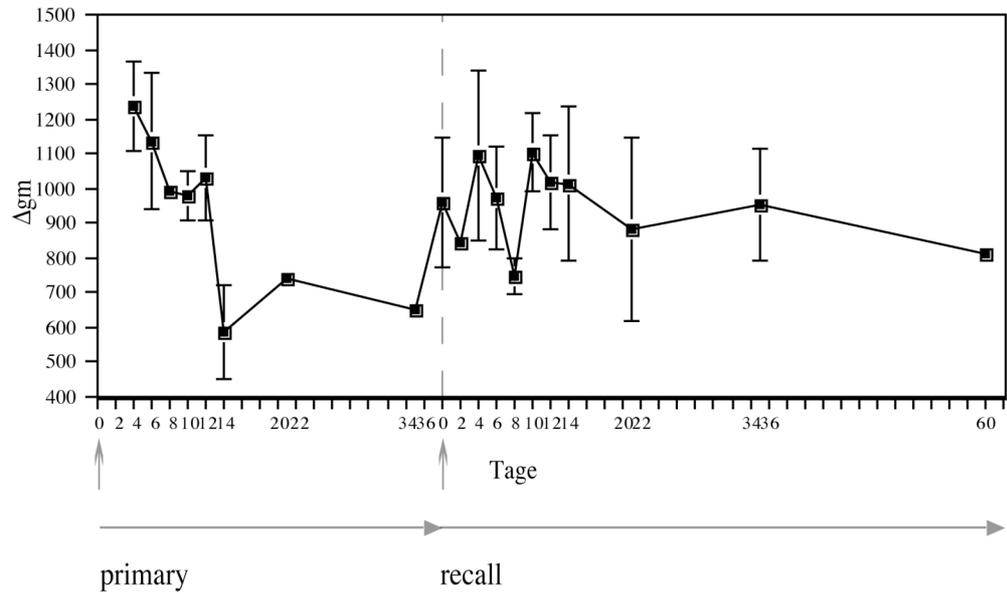
Ly6C



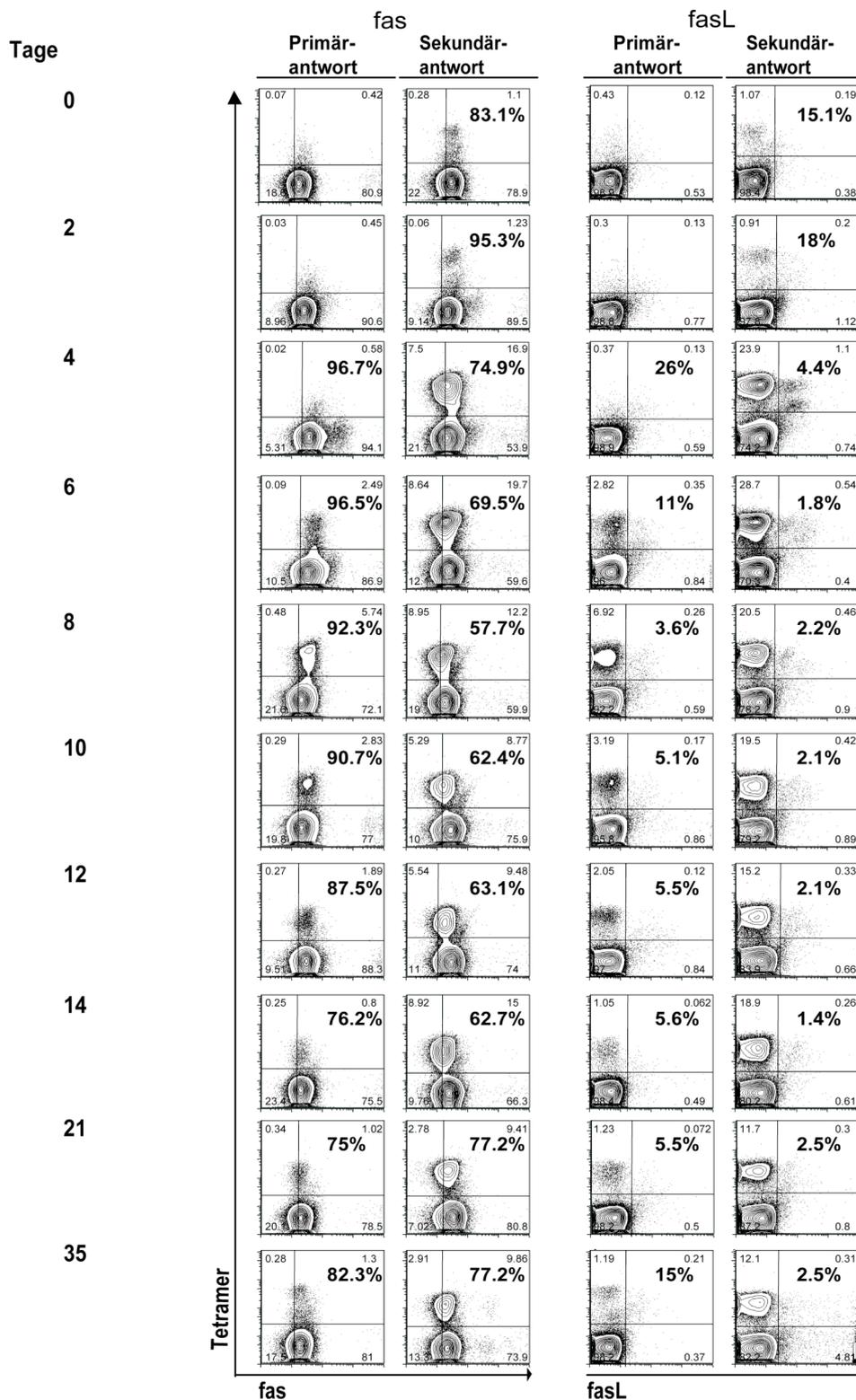
CD44



CD45



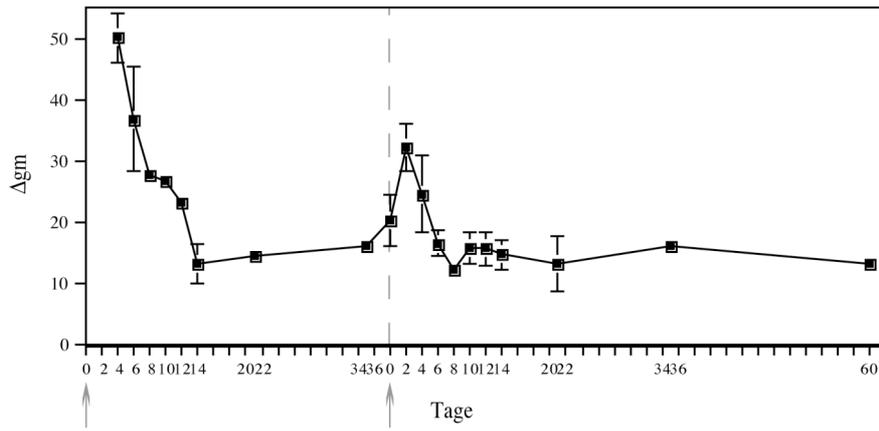
6.2 Darstellung derselben Kinetik von 6.1 als geometrisches Mittel der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen. Δgm ist die Differenz von Marker⁺ antigen-spezifischen T-Zellen und der Negativkontrolle.



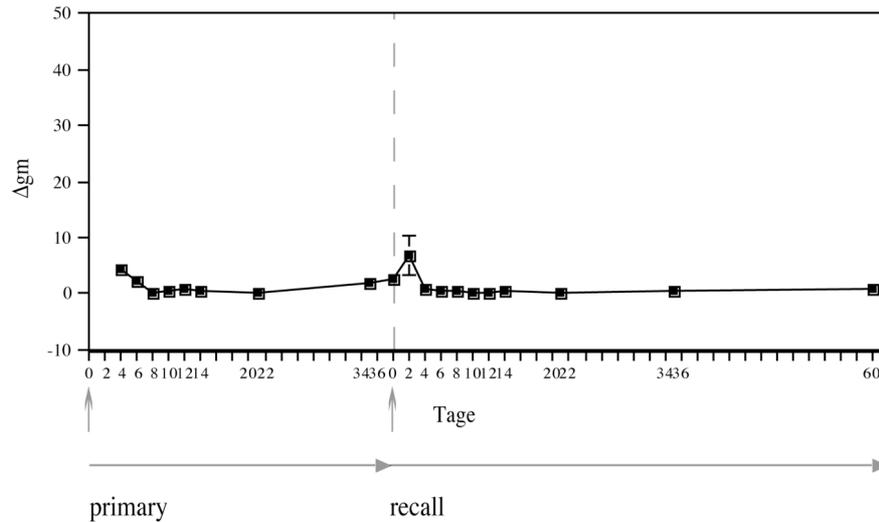
Abbildungen 7:

7.1 Kinetik der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von fas (FITC) und fasL (PE) nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.

fas



fasL



7.2 Darstellung derselben Kinetik von 7.1 als geometrisches Mittel der $CD8^+$ antigen-spezifischen T-Zellen. Δ_{gm} ist die Differenz von Marker⁺ antigen-spezifischen T-Zellen und der Negativkontrolle.

3.3.2 Aktivierungs- und Homingrezeptoren

Aus den Aktivierungs- und Homingrezeptoren wurden CD45R (B220), CD69 und CD62L ausgewählt.

CD45R (B220) ist ein Molekül, das insbesondere auf B-Zellen exprimiert wird, dessen Funktion auf T-Zellen aber noch weitgehend unklar ist. CD69 ist ein früher Aktivierungsmarker auf B- und T-Zellen. Seine genaue Funktion ist ebenfalls noch unklar. CD62L gehört zur Familie der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle und vermittelt Homing über Bindung an vaskuläre Adressine der hohen endothelialen Venolen. Er wird bei Aktivierung der T-Zellen herunterreguliert und verhindert so die Rückwanderung in die Lymphknoten. CD62L wird auch auf einer Subpopulation von Memory T-Zellen exprimiert {Wherry, 2003}.

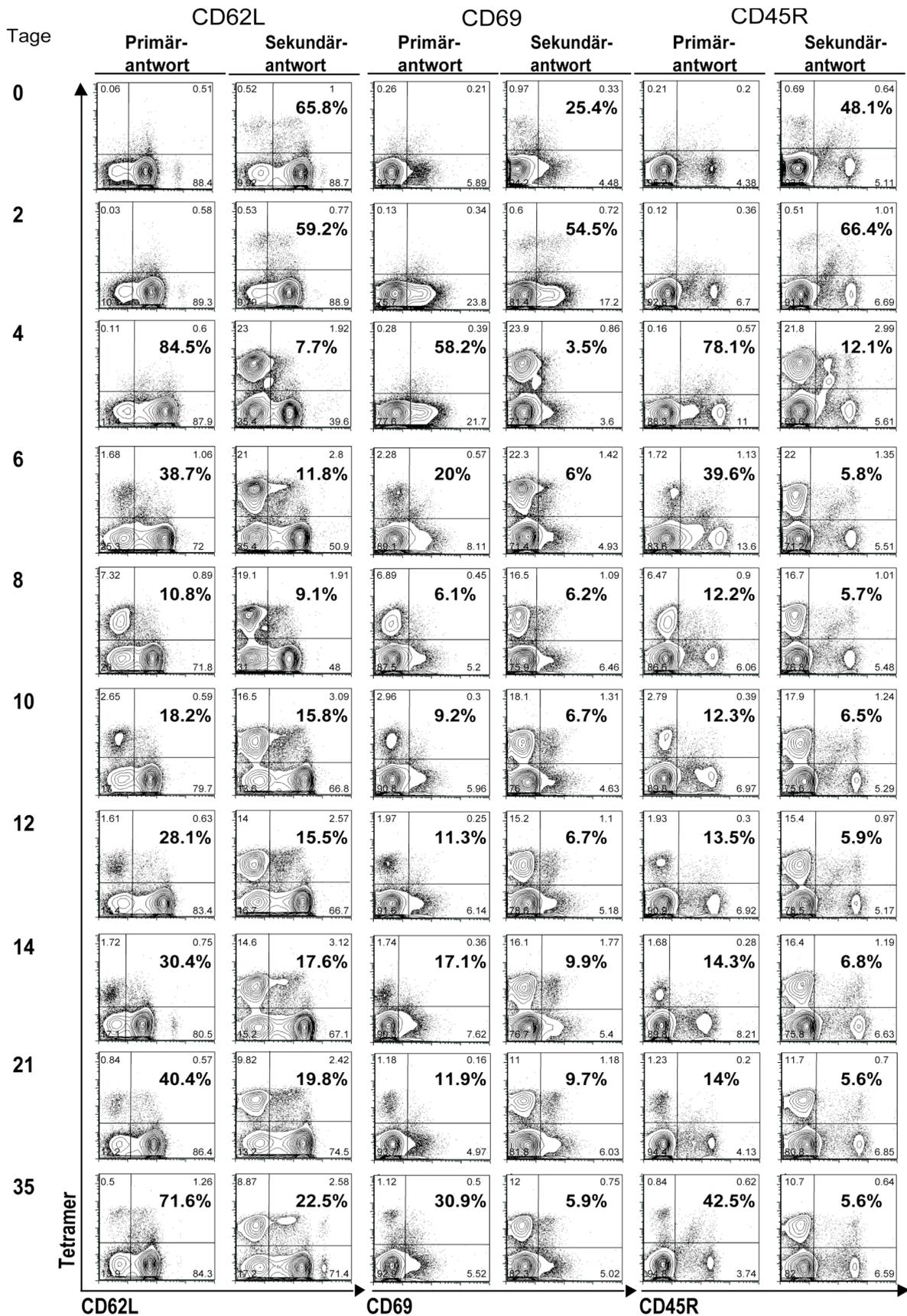
CD69 und CD45R werden insbesondere in der Aktivierungsphase exprimiert (Abbildung 8.1 und 2).

Die generellen Kinetiken der Oberflächenexpression innerhalb der antigen-spezifischen Population dieser beiden Marker zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf, wobei das Expressionsniveau von CD69 insgesamt sehr niedrig ist (Abbildung 8.1). Zu Beginn der Aktivierungsphase werden CD69 und B220 hoch exprimiert und fallen dann ziemlich abrupt auf sehr niedrige Werte ab. Ihre Expression steigt dann in der Memory Phase nach Primärinfektion wieder etwas an oder bleibt stabil. Das geometrische Mittel der Expression von CD62L fällt zwar initial ebenso ab, steigt im Gegensatz zu den anderen Markern aber im Memorypool zunehmend an. Dieser Verlauf wird deutlicher in der Kinetik der relativen Anteile CD62L hoher antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 8.3).

Die Dot Plot Analyse von CD69 und CD45R spiegelt den Verlauf der geometrischen Mittel wieder. Es lassen sich zwar in der frühen Aktivierungsphase zum Teil Subpopulationen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen abgrenzen, aber eine klare Aufspaltung in Subpopulationen ist nicht erkennbar (Abbildung 8.1).

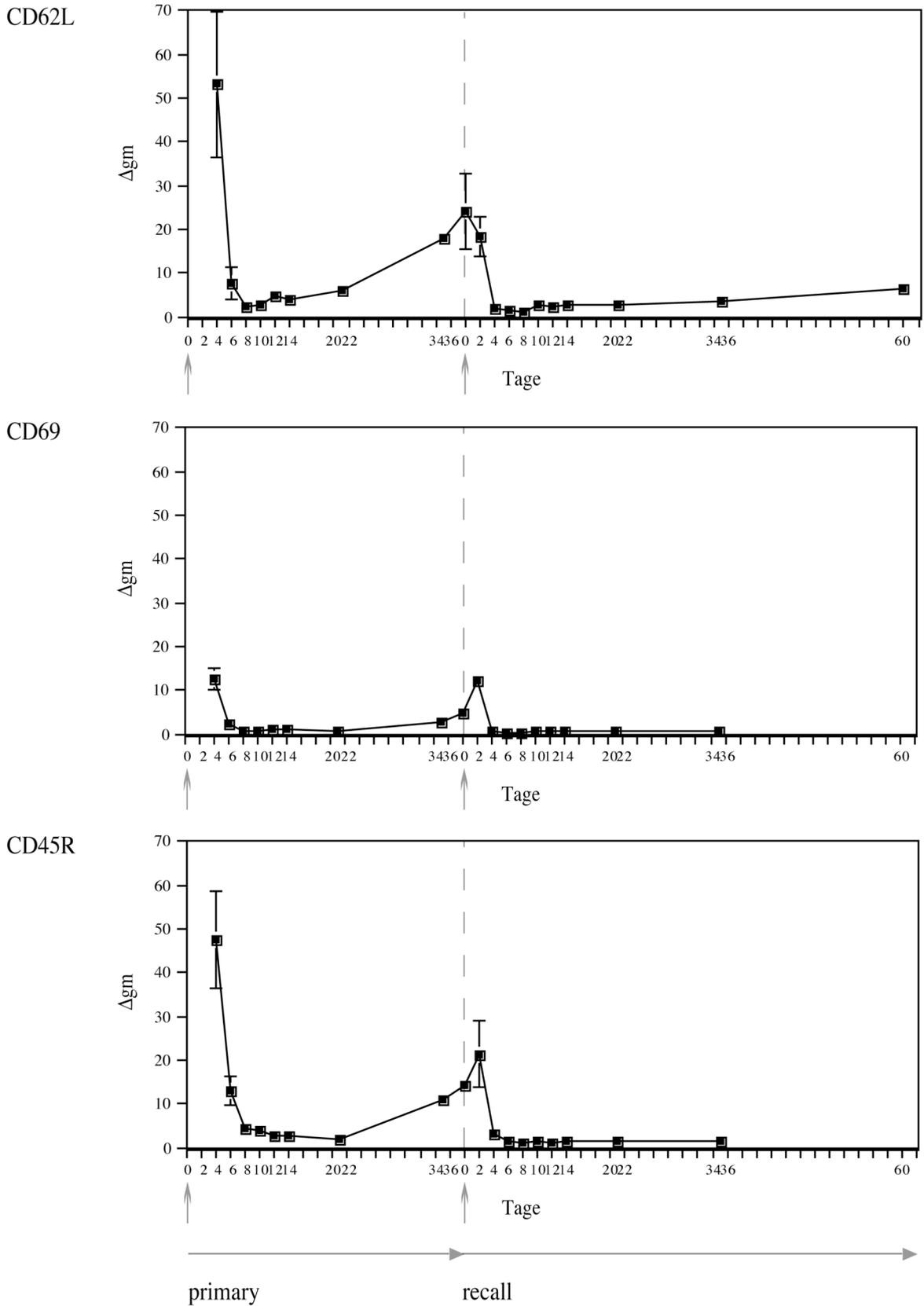
Die Kinetik von CD62L auf antigen-spezifischen T-Zellen zeigt einige Auffälligkeiten verglichen mit anderen Markern.

Naive T-Zellen sind CD62L hoch. In der Phase der Aktivierung ist die Mehrheit der Zellen CD62L niedrig, einige sind aber auch in dieser Phase hoch. Im Laufe der Zeit nimmt der Anteil von CD62L hoch exprimierenden T-Zellen zu, bis in der Memory-Phase die CD62L hoch exprimierenden T-Zellen überwiegen. In der Sekundärantwort zeigt sich ein der Primärantwort vergleichbares Bild mit höheren Frequenzen. Wenn man die Entwicklung der beiden Populationen CD62L hoher und niedriger CD8⁺ T-Zellen über die Zeit verfolgt, nehmen CD62L niedrige T-Zellen kontinuierlich ab, wohingegen die Population der CD62L hohen T-Zellen in der Memory Phase zunimmt (Abbildung 8.1). Auf der Ebene absoluter Zahlen zeigt CD62L in der Frühphase eine Expansion und Stabilisierung auf hohem Niveau. Nach Zweitinfektion folgt CD62L der bereits besprochenen Kinetik antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mit Expansion, Kontraktion und Stabilisierung auf höherem Niveau in der Memory-Phase (Abbildung 8.3).

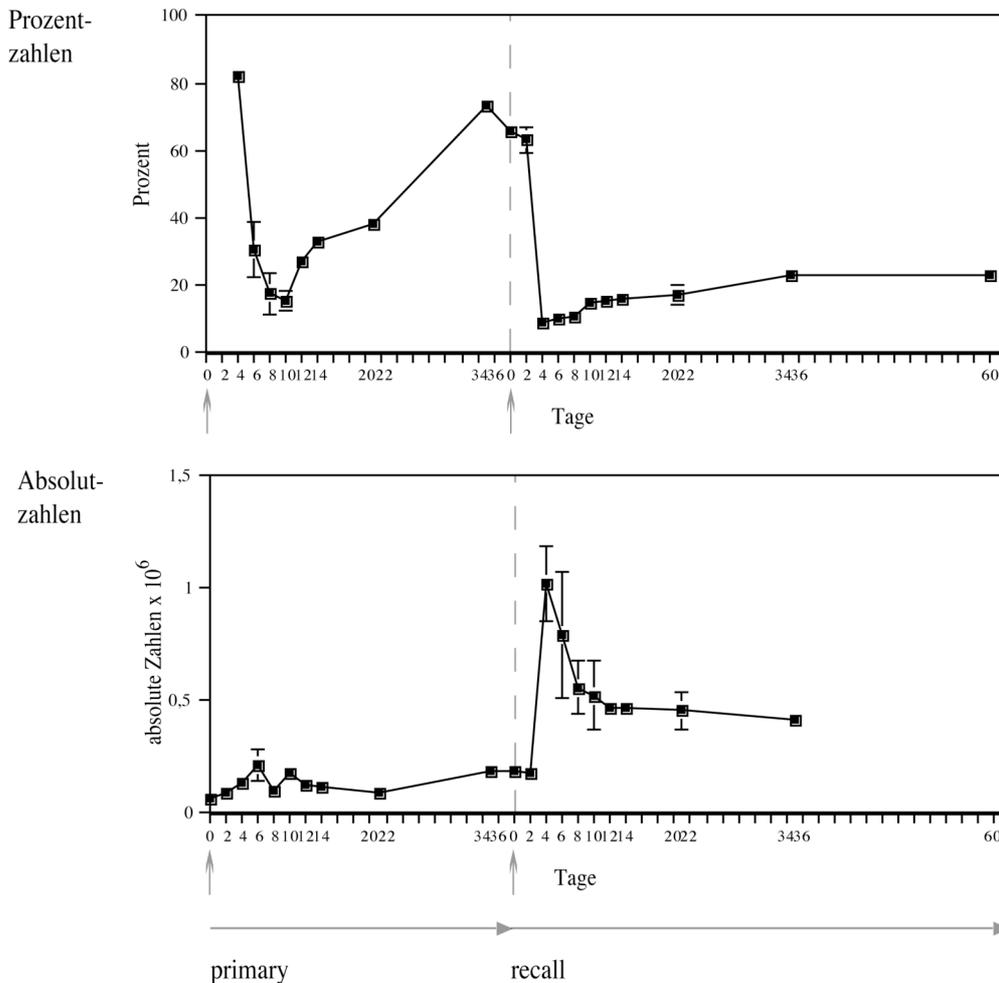


Abbildungen 8:

8.1 Kinetik der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von CD62L (FITC), CD69 (FITC) und CD45R (FITC) nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.



8.2 Darstellung derselben Kinetik von 8.1 als geometrisches Mittel der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen. Δgsm ist die Differenz von Marker⁺ antigen-spezifischen T-Zellen und der Negativkontrolle.



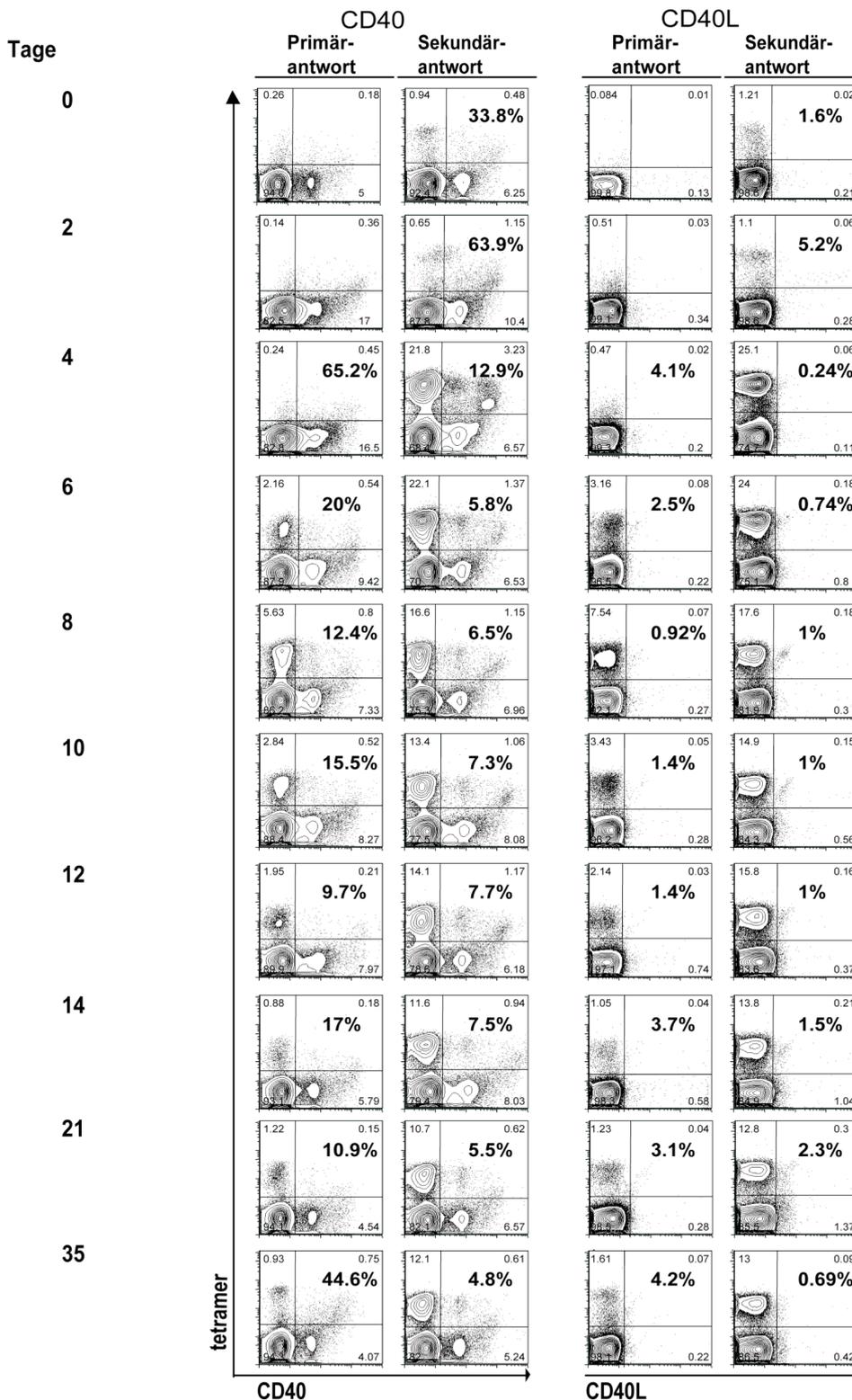
8.3 Darstellung derselben Kinetik von 8.1 als Prozentzahlen und als absolute Zahlen ($\times 10^6$) der CD62L hohen CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen

3.3.3 Kostimulatorische Moleküle

Als kostimulatorische Moleküle wurden CD40 und CD40L (CD154) ausgewählt. CD40 wird vor allem auf B-Zellen und APCs exprimiert. Auf CD8⁺ T-Zellen soll es für die Reexpansion aus dem Memory T-Zellpool wichtig sein. Über eine Bindung an CD40L (CD154) auf CD4⁺ T-Zellen und anderen APCs bekommen CD8⁺ T-Zellen hierzu entsprechende „Hilfssignale“ vermittelt {Borrow, 1996; Bourgeois, 2002}. Eine Expression von CD40L auf CD8⁺ T-Zellen wird diskutiert.

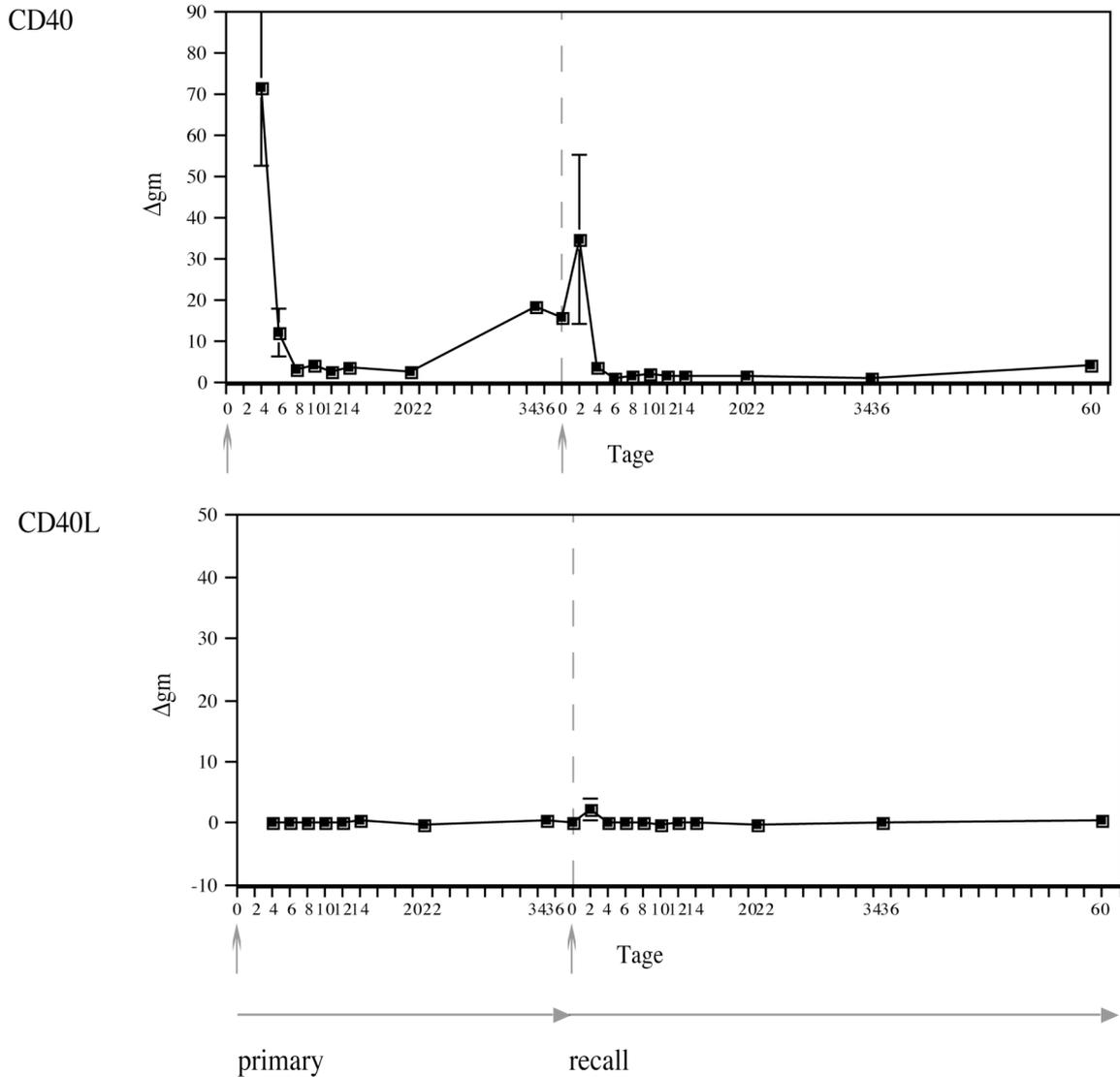
In dieser Untersuchung konnte CD40L zu keiner Phase der Immunantwort auf CD8⁺ T-Zellen nachgewiesen werden. Technische Probleme können allerdings als Ursache für diesen Befund nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. CD40 hingegen zeigt ein ähnliches Profil wie CD69 und CD45R. Es wird in der frühen Aktivierungsphase auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen hoch exprimiert und steigt am Ende der Memory Phase leicht an (Abbildung 9.2). In der frühen Aktivierungsphase lassen sich in der Dot

Plot Analyse CD40 exprimierende antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen identifizieren (Abbildung 9.1). Insgesamt ähneln sich die Verläufe von CD40, CD69 und CD45R.



Abbildungen 9:

9.1 Kinetik der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von CD40 (FITC) und CD40L (PE) nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.



9.2 Darstellung derselben Kinetik von 9.1 als geometrisches Mittel der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen.

3.3.4 Wachstumsfaktorrezeptoren

Von den Wachstumsfaktorrezeptoren wurden verschiedene Untereinheiten der „common γ -chain“ Rezeptorfamilie ausgewählt: CD25, die spezifische α -Kette des IL-2-Rezeptors, CD127, die spezifische α -Kette des IL7-Rezeptors, CD122, die gemeinsame β -Kette des IL-2- und IL-15-Rezeptors und CD132, die gemeinsame γ -Kette des IL-2, -4, -7, -9 und -15 Rezeptors.

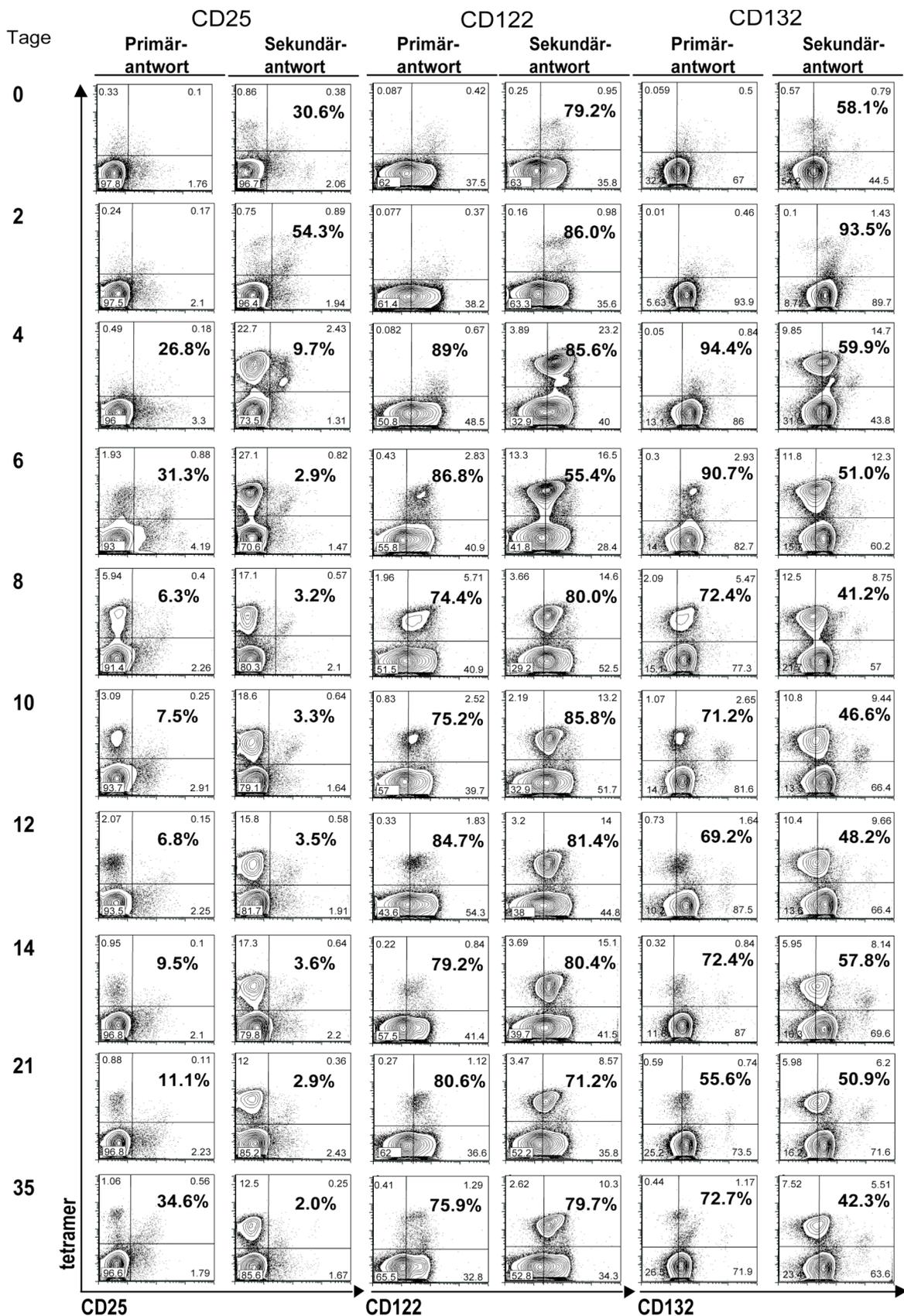
Die vorübergehende Expression von CD25 im Thymus ist bedeutend für die T-Zell-entwicklung. Später scheint CD25, neben seiner Expression auf regulatorischen T-Zellen {Kursar, 2002}, auch auf CD8⁺ T-Zellen für die Expansion oder Kontraktion eine Rolle zu spielen {Li, 2001}. CD127 wird auf reifen T-Zellen exprimiert und eine Bedeutung des IL-7- Rezeptors in der Erhaltung von Memory T-Zellen wird diskutiert

{Schluns, 2000}. CD122 und CD132 werden konstitutiv auf ruhenden T-Zellpopulationen exprimiert. CD122 ist nach Antigenkontakt auf der Oberfläche fast aller antigen-spezifischer T-Zellen exprimiert und wird deswegen als Marker für „antigen-experienced“ T-Zellen verwendet {Judge, 2002; Walzer, 2002}.

CD25 weist auf allen CD8⁺ T-Zellen das niedrigste Expressionsniveau der untersuchten Wachstumsfaktorrezeptoren auf (Abbildungen 10.2 und 10.3). Auf antigen-spezifischen und CD8⁺ T-Zellen wird es in der Phase früher Aktivierung und nach Primärinfektion in der Memory Phase höher exprimiert. Eine CD25⁺ Subpopulation lässt sich aber nur in der frühen Expansionsphase der Sekundärantwort klar abgrenzen (Abbildung 10.1). Später scheint die niedrige Expression von CD25 über die Zeit relativ gleich zu bleiben (Abbildungen 10.1 und 10.2).

CD122 und CD132 zeigen Unterschiede im Expressionsniveau, das besonders nach Aktivierung höher erscheint, es lassen sich aber keine klaren Subpopulationen abgrenzen (Abbildungen 10.1 und 10.2). In der Memory-Phase scheinen antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen insgesamt beide Marker auf höherem Niveau zu exprimieren, wobei die Expression von CD122 über derjenigen von CD132 liegt (Abbildung 10.1 und 2).

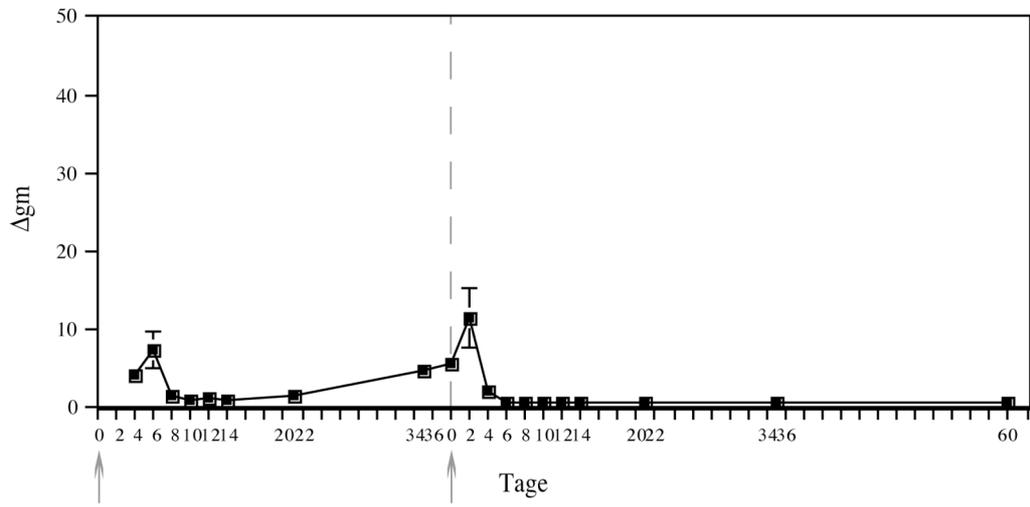
Weitere Unterschiede zeigen sich beim Vergleich der geometrischen Mittel der CD122- und CD132-Expression auf der Gesamtpopulation aller CD8⁺ T-Zellen mit der Expression auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 10.3). CD122 wird zu allen untersuchten Zeitpunkten auf der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen immer niedriger exprimiert als auf der Population antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Die beschriebenen Veränderungen spielen sich also insbesondere in der antigen-spezifischen Subpopulation ab. Das Verhalten von CD132 auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bis zur zweiten Aktivierungsphase gleicht dem aller CD8⁺ T-Zellen. Ab dann liegt das Expressionsniveau der antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen sogar unter dem der Gesamtpopulation. Die Expression von CD122 auf antigen-spezifischen Zellen stabilisiert sich also auf höherem, die von CD132 auf niedrigerem Niveau als auf der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen.



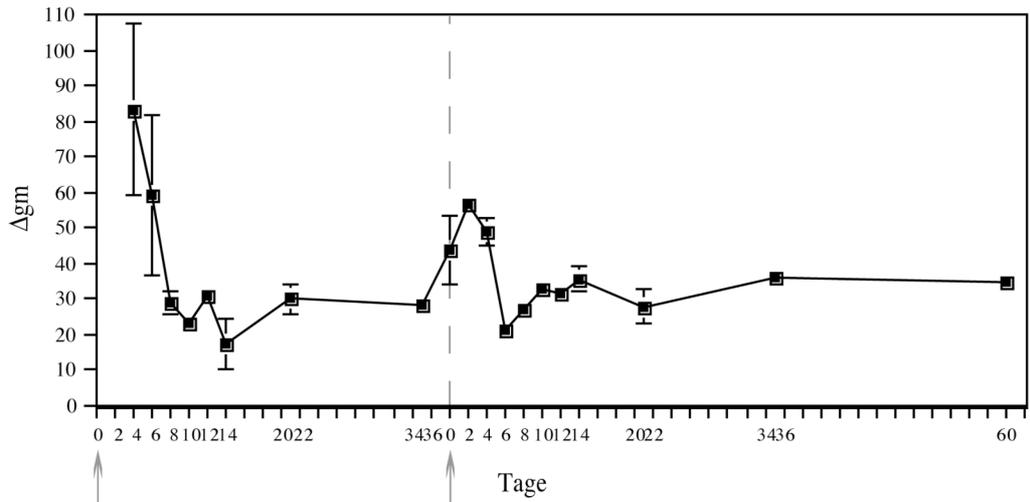
Abbildungen 10:

10.1 Kinetik der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von CD25 (FITC), CD122 (PE) und CD132 (PE) nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.

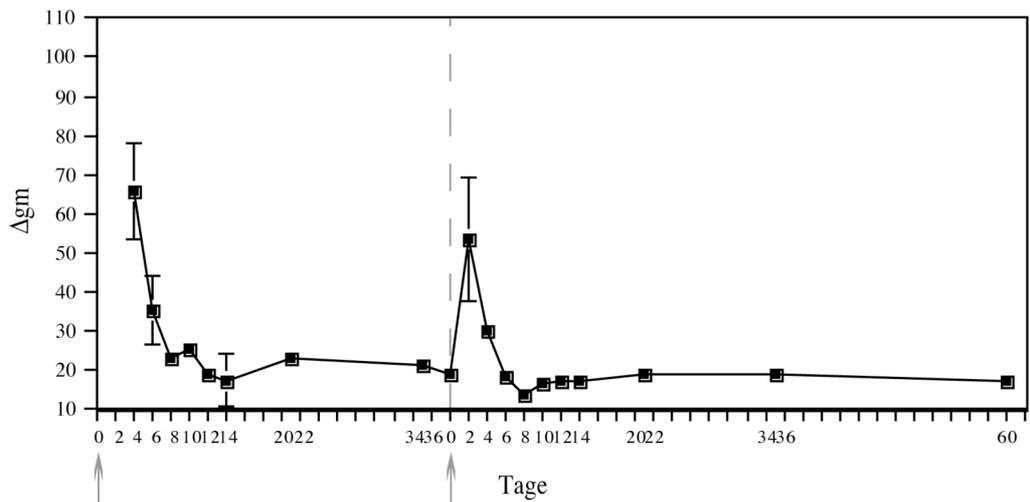
CD25



CD122

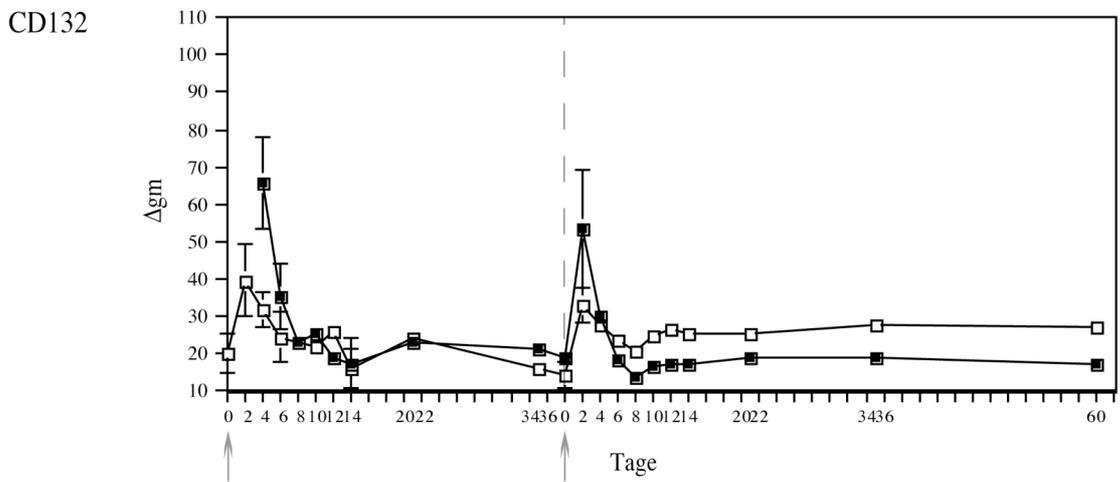
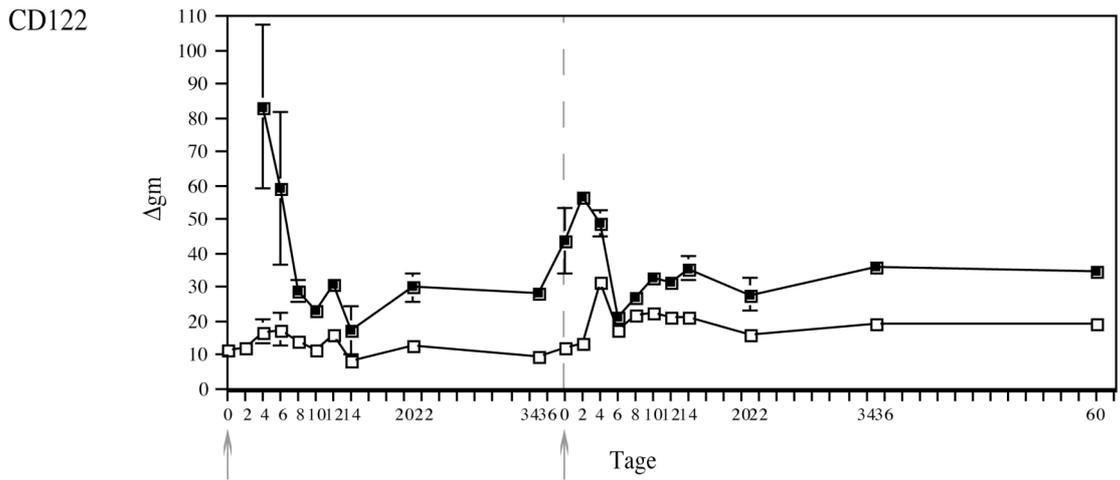
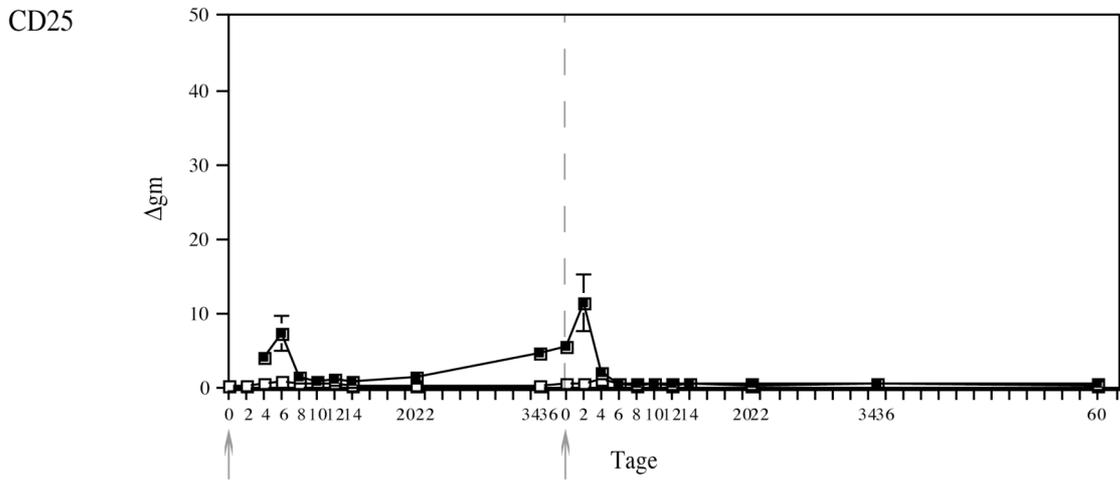


CD132



primary recall

10.2 Darstellung derselben Kinetik von 10.1 als geometrisches Mittel der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen. Δgm ist die Differenz von Marker⁺ antigen-spezifischen T-Zellen und der Negativkontrolle.



10.3 Vergleich der Kinetiken geometrischer Mittel der CD8⁺ T-Zellen mit der antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen.

3.4 Abgrenzung antigen-spezifischer Subpopulationen in der Milz mit Hilfe von CD127

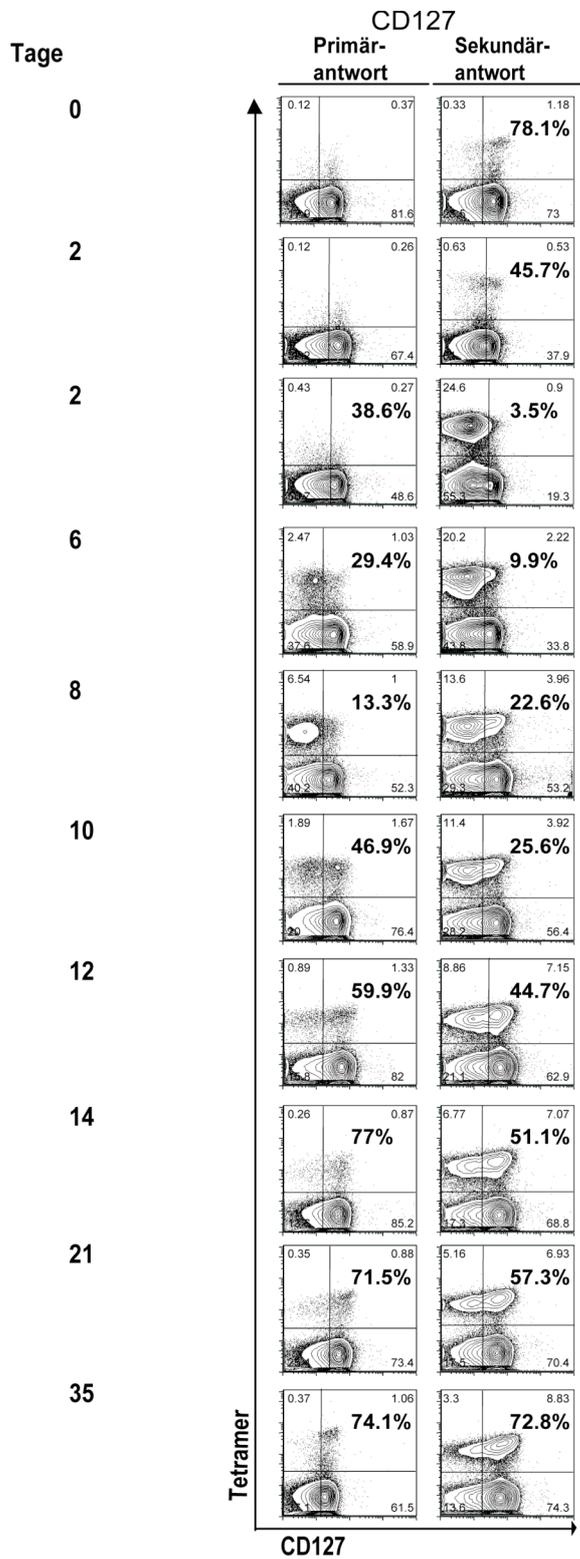
Ähnlich wie CD62L zeigt CD127 ein von den bisher erwähnten Markern abweichendes Expressionsmuster in der Milz. Über die Zeit betrachtet ist die allgemeine Expression von CD127 in der Expansionsphase niedrig, steigt dann aber kontinuierlich an (Abbildung 11.1). Diese Beobachtung erklärt sich im Fall von CD127 nicht, wie bei anderen untersuchten Markern, durch homogene Veränderungen in der Gesamtpopulation, sondern durch eine klare Aufspaltung der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen in eine CD127 hoch und niedrig exprimierende Subpopulation (Abbildung 11.1). Diese existieren nebeneinander in unterschiedlichen Größen während der gesamten Immunantwort.

3.4.1 Muster zu verschiedenen Zeiten der Expansions- und Kontraktionsphase

Während naive T-Zellen CD127 positiv sind, spalten sich die antigen-spezifischen T-Zellen nach Infektion in eine CD127 hoch und niedrig exprimierende Subpopulation auf (Abbildung 11.1 und 11.2).

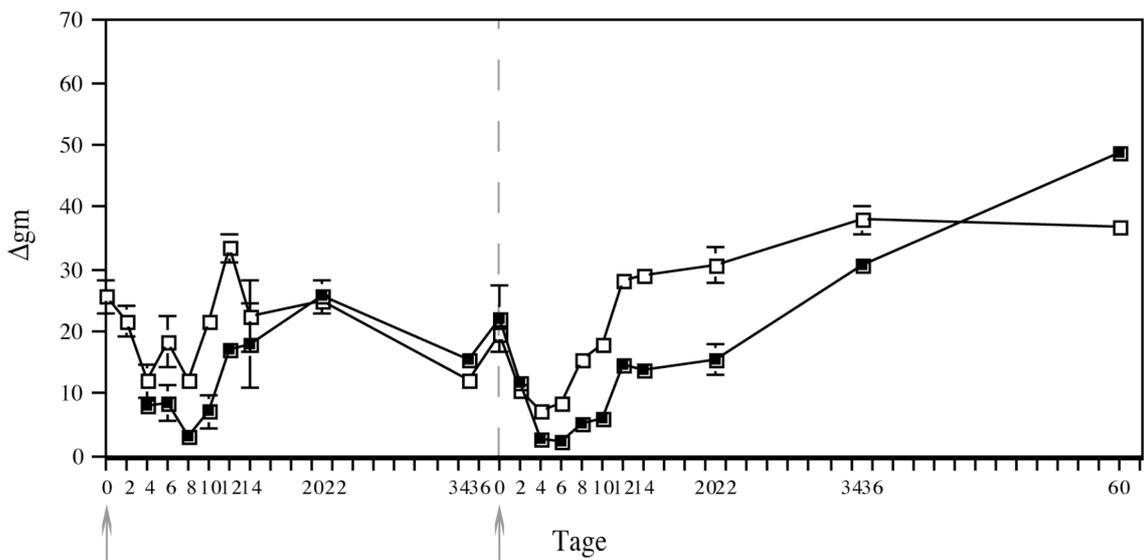
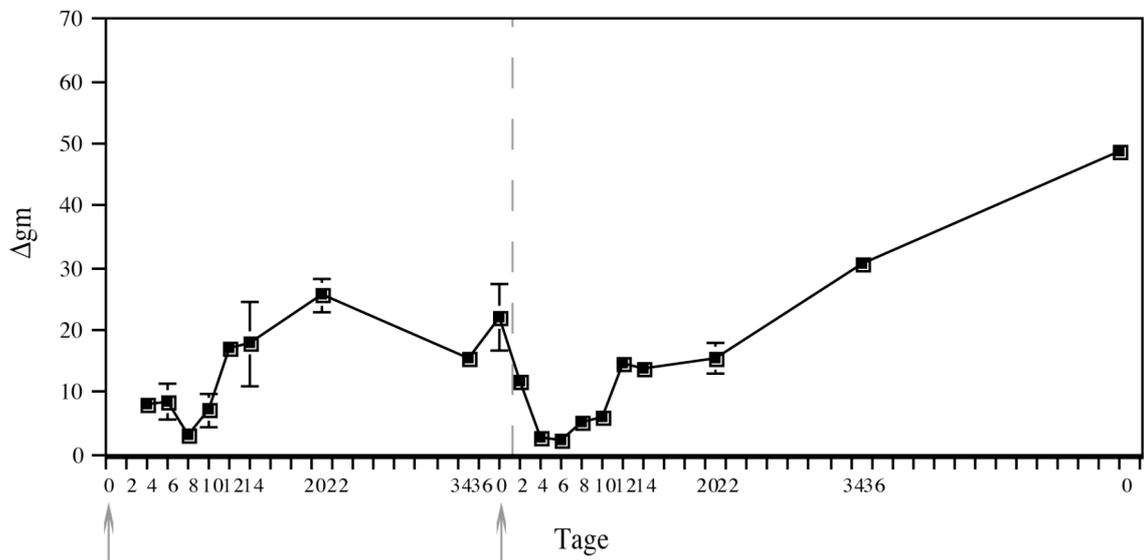
Die Mehrheit der antigen-spezifischen T-Zellen der Effektorphase ist CD127 niedrig und folgt der allgemeinen Kinetik der antigen-spezifischen T-Zellen mit Expansion in der Effektorphase und kontinuierlicher Abnahme in der Kontraktionsphase (Abbildungen 11.1 und 11.6).

Eine kleine Population der antigen-spezifischen T-Zellen ist jedoch bereits in der Effektorphase CD127 hoch. Ab der Expansionsphase nehmen die CD127 hohen Zellen kontinuierlich zu (Abbildungen 11.1 und 11.4). Die Veränderungen der Expression von CD127 auf der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen sind in diesen Phasen weniger deutlich als auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Eine klare Aufspaltung in Subpopulationen ist nicht erkennbar (Abbildungen 11.1 und 11.3). Betrachtet man die absoluten Zahlen erreichen sie im Gegensatz zur kontinuierlichen Abnahme der CD127 niedrigen Zellen schon in der Kontraktionsphase ein Plateau (Abbildungen 11.5 und 11.6).



Abbildungen 11:

11.1 Kinetik der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von CD127 (PE) nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.

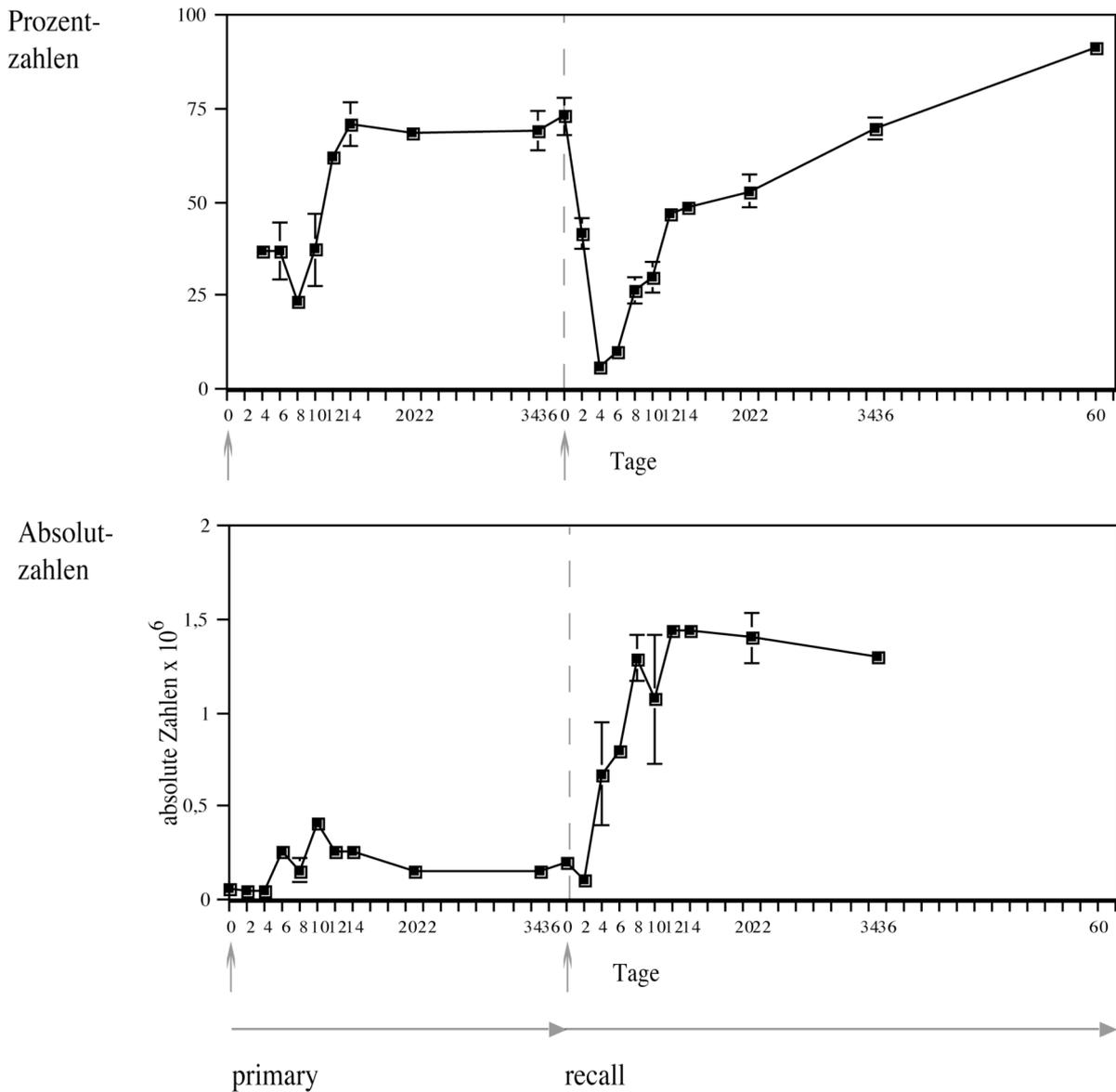


primary → recall

—■— Tetramer
—□— CD8

11.2 Darstellung derselben Kinetik von 11.1 als geometrisches Mittel der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen. Δgm ist die Differenz von Marker⁺ antigen-spezifischen T-Zellen und der Negativkontrolle.

11.3 Vergleich der Kinetiken geometrischer Mittel aller CD8⁺ T-Zellen mit der antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen



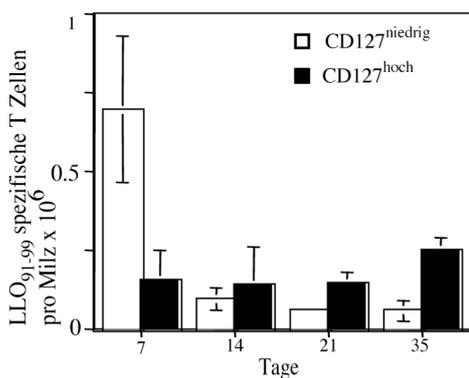
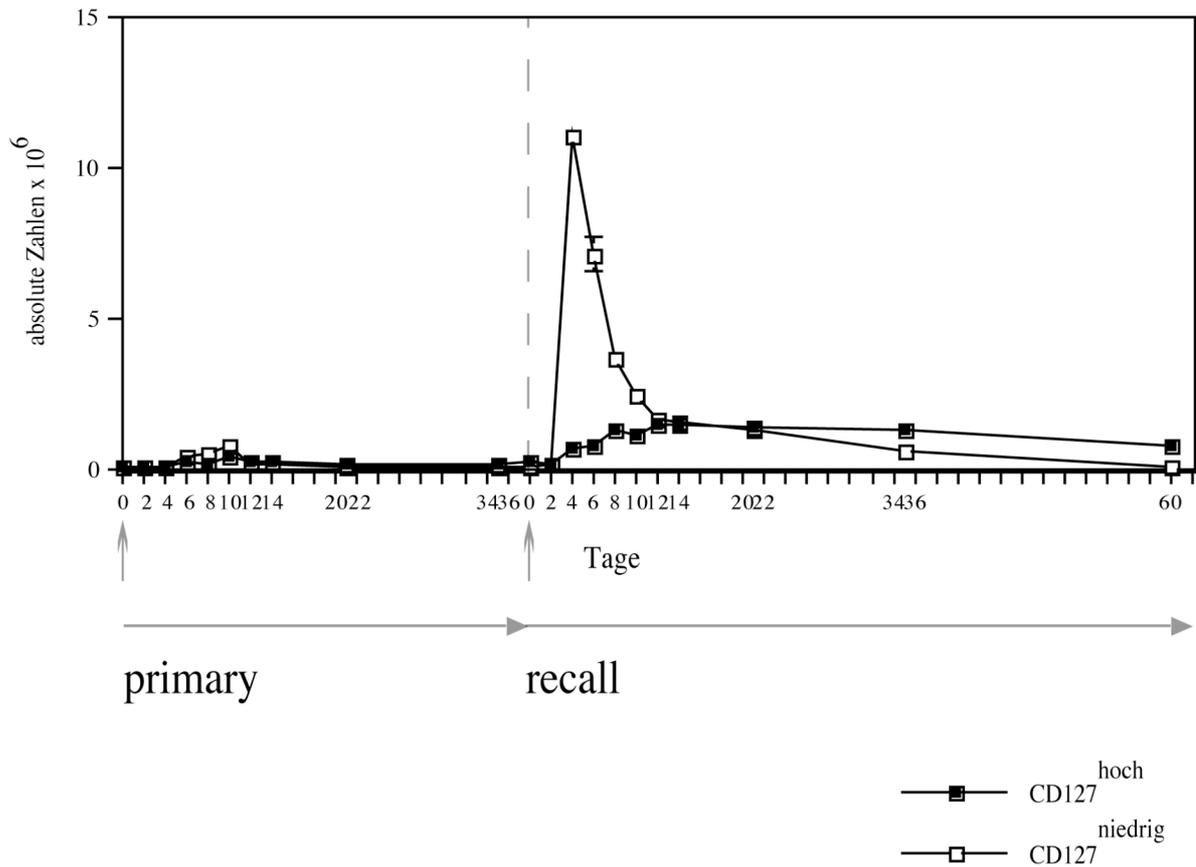
11.4: Zusammenfassung der Prozentzahlen der Kinetik von 11.1

11.5: Darstellung derselben Kinetik von 11.1 als absolute Zahlen ($\times 10^6$) der CD127 hohen CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen

3.4.2 Stabilität der CD127 hohen Population in der Gedächtnisphase

In der Memory Phase nimmt der relative Anteil von CD127 hoch exprimierenden antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen kontinuierlich zu (Abbildung 11.4). In der späten Memory Phase ist dann der relative Anteil der CD127 hoch exprimierenden Population der antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen größer als der Anteil der CD127 hoch exprimierenden Population aller CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 11.1). Vergleicht man die Frequenzen der CD127 hohen und niedrigen Populationen, nimmt die Frequenz der CD127 niedrigen Population kontinuierlich ab, der relative Anteil der CD127 hohen Population vergrößert sich dagegen (Abbildung 11.1). Doch nicht nur der relative Anteil

der CD127 hohen Population vergrößert sich; die absolute Anzahl CD127 niedriger Zellen nimmt ab, während die CD127 hohe Population bis spät in die Memory Phase auf dem bereits in der Kontraktionsphase erreichten Plateau konstant bleibt (Abbildungen 11.5 und 11.6). Die CD127 hohen Zellen dominieren dann in ihrem prozentualen und absoluten Anteil in der Memory Phase (Abbildungen 11.1 und 11.4-11.7).



11.6: Vergleich der Kinetiken absoluter Zahlen ($\times 10^6$) der CD127 hohen und niedrigen antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

11.7: Kinetiken der absoluten Zahlen ($\times 10^6$) der CD127 hohen und niedrigen antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen anhand ausgewählter Zeitpunkte aus Abbildung 11.6 (N=6 pro Zeitpunkt)

3.5 Kombination der Expression von CD127 und CD62L auf CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen

Im Vergleich zu den anderen untersuchten Markern weisen CD127 und CD62L also interessante Besonderheiten auf. Die Kinetiken der absoluten Anzahl antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen für die Expression aller dieser untersuchten Marker zeigen denselben Verlauf wie die Kinetik der Gesamtpopulation antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Betrachtet man die Expression von Oberflächenmarkern, werden Ly6C, CD44 und CD45 auf nahezu allen antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen exprimiert (Abbildungen 6), während die Expression von CD127 und CD62L auf diesen Zellen über die Zeit schwankt (Abbildungen 8 und 11). Die Apoptoseinduktoren fas und fasL, das kostimulatorische Molekül CD40 und auch die Aktivierungsmarker CD69 und CD45R schwanken zwar in ihrer Expression über die Zeit, aber sie zeigen nicht wie CD127 und CD62L eine Aufspaltung in klare Subpopulationen auf (Abbildungen 7, 8, 9, 11). Die anderen Wachstumsfaktorrezeptoren zeigen zwar Besonderheiten ihrer Expression auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich mit der Gesamtpopulation CD8⁺ T-Zellen, es zeigt sich aber ebenfalls keine klare Aufspaltung in Subpopulationen.

Im Gegensatz zu allen diesen Markern variiert die Expression von CD62L und CD127 über die Zeit. Sie zeigen bereits in den ersten Tagen der Immunantwort ausgehend von naiven Zellen, die positiv für beide Marker sind, eine Aufspaltung in eine hoch und eine niedrig exprimierende Population (Abbildungen 8 und 11). Diese beiden Populationen koexistieren dann während der gesamten Immunantwort, unterscheiden sich jedoch in ihrem relativen Anteil. Während in der Milz die CD62L niedrigen antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Verlauf der Zeit überwiegen, dominiert bei CD127 immer mehr die hohe Subpopulation. Im Verlauf scheinen sich die Frequenzen der CD62L positiven Subpopulation in der Memory Phase auf niedrigem Niveau zu stabilisieren, während die Frequenzen der CD127 hohen Population stetig ansteigen. An recall Tag 35 und noch deutlicher an Tag 60 sind die Zellen fast alle CD127 hoch, eine kleine Population ist CD62L hoch (Abbildungen 8, 11 und 12). Um daher zu testen, ob es sich bei der CD62L hohen Population um eine Subpopulation der CD127 hohen T-Zellen handelt oder ob auch in der CD127 niedrigen Population CD62L hohe Zellen enthalten sind, wurden an Tag 17 nach Sekundärinfektion antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen gleichzeitig auf CD62L und CD127 untersucht (Abbildung 13). Zu diesem Zeitpunkt liegen die antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz als CD127 hoch und niedrig zu etwa gleichen Teilen vor. Bei CD62L überwiegt die niedrige Population

(Abbildungen 8, 11 und 13). Betrachtet man die CD62L-Expression der CD127 hohen und niedrigen Population separat, so sieht man, daß in der CD127 hohen Population CD62L hohe und niedrige Zellen enthalten sind, in der CD127 niedrigen Population hingegen nur CD62L niedrige Zellen enthalten zu sein scheinen. Die CD127 hohe Population kann also weiter in Subpopulationen aufgeteilt werden, die CD62L hoch und niedrig exprimieren (Abbildung 13). Weitere Doppelfärbungen und erste funktionelle Analysen von Proliferations- und Zytotoxizitätsverhalten der einzelnen Subpopulationen geben Hinweise darauf, daß mit Hilfe der Kombination von CD127 und CD62L auch eine Unterscheidung von Memory und Effektor T-Zellpopulationen mit unterschiedlichem funktionellem Verhalten möglich ist.

Am auffälligsten ist der Unterschied zwischen diesen beiden Markern auf dem Niveau der absoluten Zahlen der Marker "hoch exprimierenden" antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Abbildungen 8.3 und 11.5).

Hier zeigt CD62L nach Primärinfektion ähnlich wie CD127 in der Frühphase eine Expansion und Stabilisierung auf hohem Niveau. Nach Zweitinfektion kontrahiert die CD62L hohe Population allerdings wie in der allgemeinen Kinetik der antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und stabilisiert sich anschließend auf einem zehnfach höheren Niveau als vor Infektion. Die Absolutzahlen der CD127 hohen antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen zeigen dagegen einen anderen Verlauf. Bereits in der Frühphase der primären Expansion steigt die CD127 hohe Population an und stabilisiert sich in der Memory Phase nahezu auf dem erreichten Niveau. Nach Reimmunisierung steigt die CD127 hohe Population bis in die Kontraktionsphase an. Die CD127 hoch exprimierende Population stabilisiert sich bis spät in die Memory Phase wie nach der Primärantwort auf dem erreichten Niveau. Vergleicht man die Entwicklung der absoluten Zahlen CD127 hoher und niedriger antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, expandiert und kontrahiert die Subpopulation der CD127 niedrigen Zellen wie die Gesamtpopulation antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, erreicht aber in der späten Memory Phase fast das Nullniveau. Die CD127 hohe Subpopulation steigt dagegen in ihrem relativen und absoluten Anteil ständig an und stabilisiert sich schließlich deutlich über dem Niveau der CD127 niedrigen Population (Abbildungen 11.6 und 11.7).

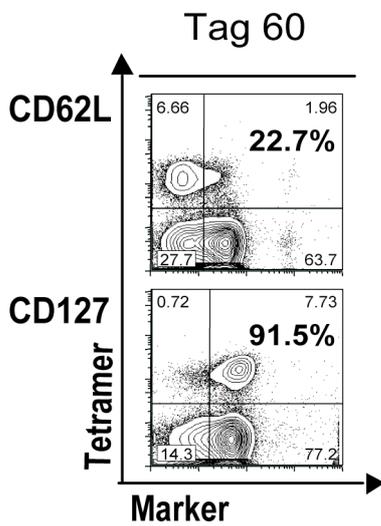


Abbildung 12:

CD8⁺ antigen-spezifische T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von CD127 (PE) oder CD62L (FITC) an Tag 60 nach Sekundärinfektion mit *L.m.* in der Milz. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.

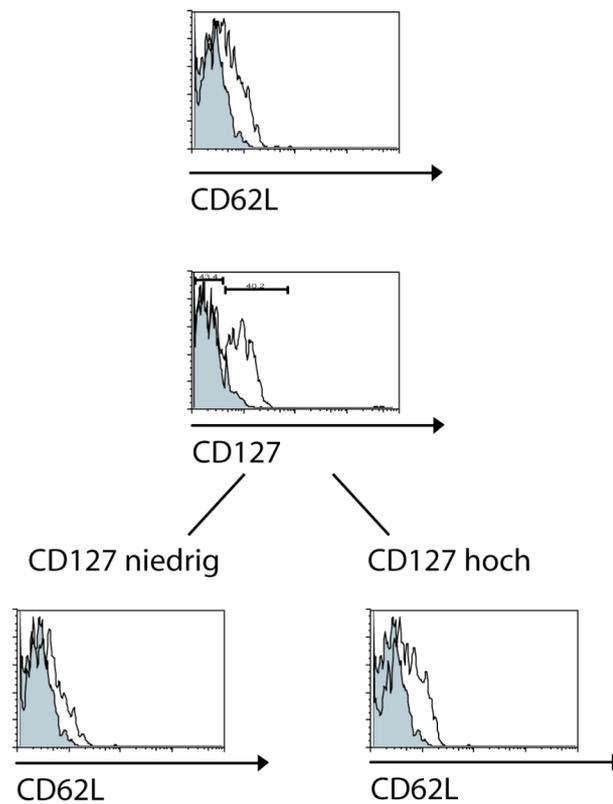


Abbildung 13: Doppelfärbung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-PE) mit CD62L (FITC) und CD127 (PE-Cy5) an Tag 17 nach Sekundärinfektion mit *L.m.* dargestellt als Histogramme der CD62L und CD127 Expression auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und CD62L Expression auf CD127 hohen und niedrigen antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen

3.6 Expressionsmuster von CD127 in verschiedenen Organen

Ob sich die CD127 hohen und niedrigen Populationen zu bestimmten Zeitpunkten der Immunantwort in abweichendem Verhältnis in verschiedenen Organen finden, wurde in einer Kinetik des Verteilungsmusters von CD127 an ausgewählten Zeitpunkten nach Erst- und Zweitimmunisierung in Organen des peripheren und zentralen Kompartiments untersucht.

In der Milz (M), die eine Mittelstellung zwischen zentralem und peripherem Kompartiment einnehmen soll, ist die Entwicklung der Prozentzahlen CD127 hoher antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen wie oben beschrieben. Während in der Expansionsphase das Verhältnis von CD127 hohen und niedrigen Zellen annähernd gleich ist, gewinnen die CD127 hohen Zellen immer mehr die Überhand und dominieren dann in der Memory Phase (Abbildung 14).

3.6.1 CD127 hohe antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen in lymphatischen Organen

In anderen lymphatischen Organen wie intestinalen (LKI) und peripheren (LKP) Lymphknoten zeigt sich eine unterschiedliche Kinetik CD127 hoher antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 14). In der Expansionsphase nach Erstinfektion sind die Zellen der intestinalen Lymphknoten noch überwiegend CD127 niedrig. Bis primary Tag 35 exprimieren aber nahezu alle Zellen CD127 hoch und erhalten diesen Phänotyp im weiteren Verlauf unabhängig von der zweiten Infektion. Die antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen der peripheren Lymphknoten verhalten sich ebenso, sind aber schon an Tag 7 nach Erstinfektion CD127 hoch. Die Abnahme CD127 hoch exprimierender Zellen peripherer Lymphknoten an recall Tag 35 erklärt sich am ehesten durch die geringe Abnahme antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Insgesamt scheinen in diesen lymphatischen Organen schon früh in der Immunantwort ausschließlich CD127 hoch exprimierende antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu existieren.

3.6.2 CD127 hohe und niedrige antigen-spezifische CD⁸⁺ T-Zellen in anderen Organen

Betrachtet man die Expression von CD127 in den anderen untersuchten Organen sieht man zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion eine Mischpopulation, in der CD127 hoch oder niedrig exprimierende antigen-spezifische CD⁸⁺ T-Zellen dominieren (Abbildung 14). In der Expansionsphase nach Primärinfektion sind die meisten Zellen CD127 niedrig oder negativ. Eine kleine Population CD127 hoch exprimierender antigen-spezifischer Zellen ist allerdings bereits in der frühen Expansionsphase in allen Organen nachweisbar. Nur in den Peyerschen Plaques (PP) ist das Verhältnis von CD127 hoch und niedrig exprimierenden antigen-spezifischen CD⁸⁺ T-Zellen annähernd gleich. Im Verlauf der primären Immunantwort stellt sich an Tag 14 bei den meisten Organen ein annähernd gleiches Verhältnis an CD127 hohen und niedrigen Zellen ein. In Knochenmark (KM), Blut (B) und Leber (LE) überwiegt dabei der hohe Anteil. Bei den Lymphozyten des Darmes (LPL, IEL) eher der niedrige. Die Lunge (LU) weist ein annähernd gleiches Verhältnis CD127 hoher und niedriger Zellen auf. Nach der Kontraktionsphase der Primärantwort überwiegt dann in fast allen Organen die CD127 hohe Population, wobei in Leber, Lunge und Peyerschen Plaques eine größere Population CD127 niedriger Zellen über längere Zeit erhalten bleibt. Später in der Memory Phase findet sich aber in allen Organen überwiegend ein CD127 hoher Phänotyp. Die Entwicklung nach Zweitimmunisierung ist ähnlich. Nur in den Peyerschen Plaques bleibt die Expression von CD127 fortan nahezu konstant. An recall Tag 8 ist in allen Organen die überwiegende Zahl der Zellen CD127 niedrig. Dennoch existiert außer in den IEL auch eine Population CD127 hoch exprimierender Zellen. In den IEL findet sich dagegen vorübergehend an recall Tag 17 eine CD127 hohe Population, die an Tag 32 verschwunden ist. An recall Tag 17 überwiegen im Knochenmark die CD127 hohen Zellen, im Blut dagegen noch die CD127 niedrigen. Bis zu Tag 32 dominiert dann die hohe Population in allen Organen wie nach Erstinfektion.

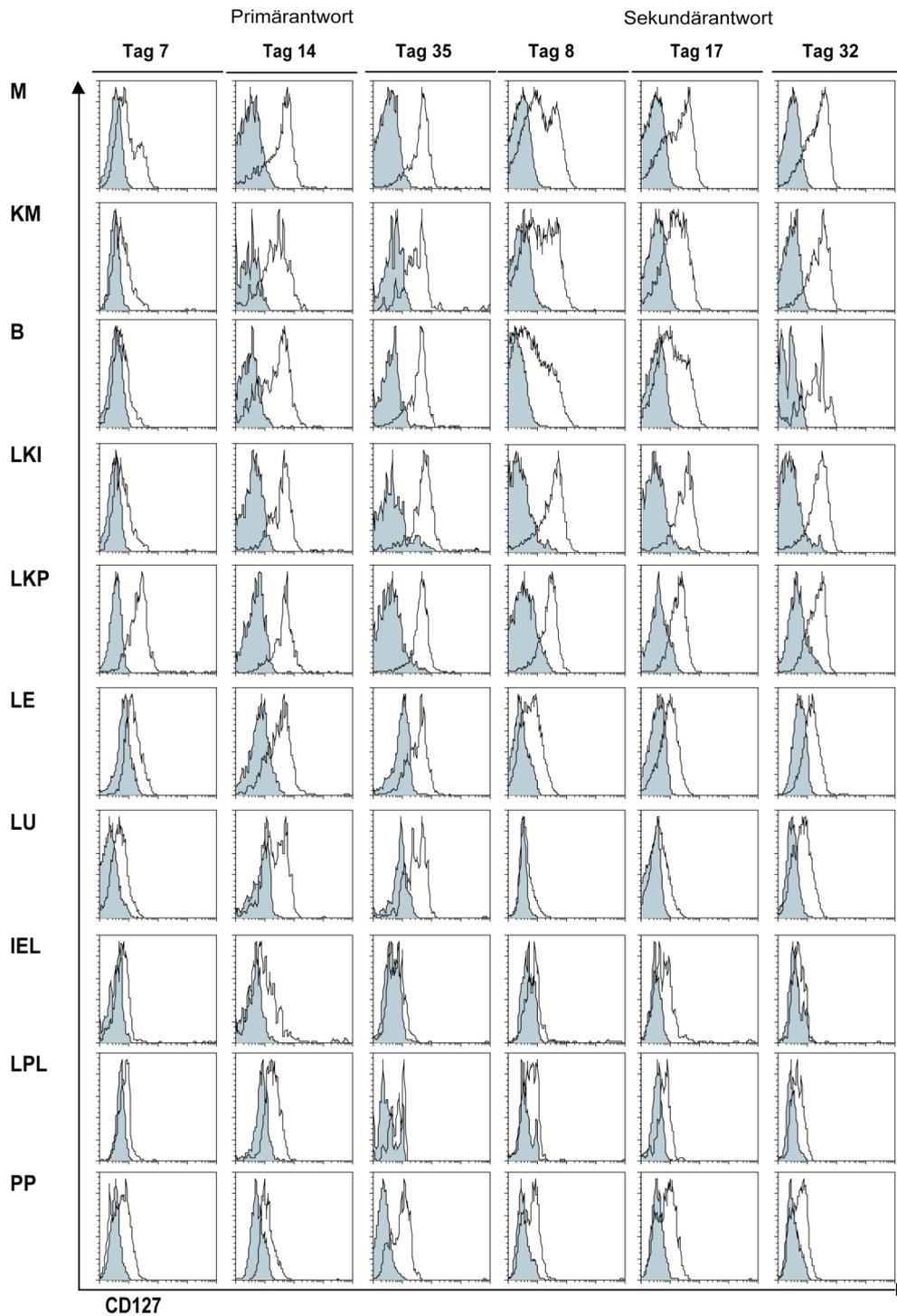


Abbildung 14: Kinetik der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) in verschiedenen Organen bezüglich Expression von CD127 (PE) an ausgewählten Zeitpunkten nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.*. Darstellung als Histogramm.

3.6.3 Stabilität der CD127 hohen Population

Das Organ mit der stabilsten CD127 hohen Population sind die Lymphknoten. Vor allem in den peripheren Lymphknoten sind alle antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen schon kurz nach der Expansionsphase ausschließlich CD127 hoch. In den anderen Organen ist die Population CD127 hoher antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen auch schon kurz nach der Expansionsphase nachzuweisen und dann über die Zeit verhältnismäßig konstant, wobei ihre Größe vom jeweiligen Organ abhängig ist. Je nach Zeitpunkt nach Infektion und abhängig vom Organ variiert im Gegensatz dazu die Größe der CD127 niedrigen Population.

Allgemein dominieren die CD127 niedrigen antigen-spezifischen T-Zellen in Effektorphasen. Die zu diesem Zeitpunkt zum Beispiel in der Lunge dramatisch expandierten Zellen sind alle CD127 niedrig. In der Leber ist diese Population dagegen im Verhältnis zu den CD127 hohen Zellen etwas kleiner als in der Lunge, im Blut wiederum etwas kleiner als in der Leber. Das Knochenmark weist ungefähr gleiche Zahlen CD127 hoher und niedriger Zellen auf. In IEL und LPL ist die überwiegende Mehrheit der Zellen fast immer CD127 niedrig, in den Peyerschen Plaques ungefähr die Hälfte aller Zellen.

Die CD127 hohen und niedrigen Populationen der Milz zeigen einen Verlauf, der zwischen den beiden Extremen der Lymphknoten und der Lunge zu liegen scheint.

Insgesamt existiert in allen untersuchten Organen schon früh in der Immunantwort eine Population CD127 hoher antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, die über lange Zeit relativ stabil bleibt. An Tag 35 nach Reinfektion sind dann alle antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen CD127 hoch in zentralen und peripheren Organen. Noch deutlicher wird dies zu einem späten Zeitpunkt nach recall Infektion an Tag 60 am Beispiel von Milz und Leber (Abbildung 15). Wie nach Primärantwort hat die CD127 niedrige Population in der Leber noch weiter abgenommen, so daß fast nur noch CD127 hohe Zellen nachweisbar sind. Insgesamt bleibt allerdings in peripheren Organen wie der Lunge die CD127 niedrige Population länger in größerer Zahl erhalten als zum Beispiel in der Milz.

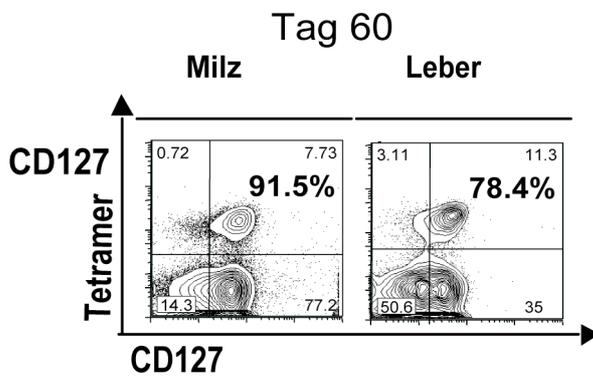


Abbildung 15:

CD8⁺ antigen-spezifische T-Zellen (Tetramere LLO₉₁₋₉₉-SA-APC) bezüglich Expression von CD127 (PE) an Tag 60 in Milz und Leber nach Sekundärinfektion mit *L.m.*. Der Anteil der Zellen jedes Quadranten ist angegeben. Fettgedruckte Zahlen entsprechen den Prozentwerten der für den Marker positiven Zellen innerhalb der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellpopulation.

3.7 Heterogenität der Zytokinproduktion antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen

Nachdem die Expression von CD127 über die Zeit in verschiedenen Organen heterogen zu sein scheint, wurde untersucht, ob diese Heterogenität der antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellpopulation auch auf Zytokinebene für IFN γ und TNF α zutrifft (Abbildung 16). In allen Kompartimenten fällt ein Unterschied zwischen der Anzahl mittels intrazellulärer Färbung und Tetramerfärbung detektierbarer antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen auf. Allgemein werden mit der funktionsunabhängigen Tetrameranalyse mehr Zellen detektiert als mit der funktionsabhängigen intrazellulären Zytokinfärbung. Besonders auffällig ist diese Differenz bei den Peyerschen Plaques, wo nur die Hälfte der Zellen mit intrazellulärer Zytokinfärbung detektiert wird. In der Leber machen die auf Zytokinbasis detektierten Zellen etwa nur ein Fünftel der Tetramer positiven Population aus. Noch gravierender ist diese Differenz bei den IEL, wo fast gar keine Zellen mittels Intrazellulärfärbung detektiert werden können (Abbildung 16 und Daten nicht gezeigt). Während die antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu allen untersuchten Phasen der Immunantwort homogen in der Produktion der beiden Zytokine sind, sind antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen deutlich heterogen. Zu allen Zeitpunkten existieren zwei Populationen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Die eine produziert nur IFN γ , die andere IFN γ und TNF α . Hierbei gibt es auch Unterschiede zwischen den Zeitpunkten nach Immunisierung als auch zwischen den verschiedenen Organen. An recall Tag 7 sind in peripheren Lymphknoten die Populationen von IFN γ einfach positiven antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen und IFN γ und TNF α doppelt positiven Zellen in etwa

gleich groß. In den intestinalen Lymphknoten finden sich dagegen mehr IFN γ einfach positive Zellen. In Leber und Lunge sind deutlich mehr antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen einfach positiv für IFN γ . Im Knochenmark ist das Verhältnis von IFN γ und TNF α produzierenden Zellen ungefähr gleich. Im Blut überwiegen die IFN γ einfach positiven Zellen in geringem Maße. Die LPL zeigen ebenfalls etwa ein gleiches Verhältnis beider Populationen. In der Milz überwiegen in geringem Maße die IFN γ einfach positiven Zellen.

Dieses beschriebene Muster ändert sich an Tag 35 in fast allen Organen in unterschiedlichem Maße zugunsten der IFN γ und TNF α doppelt positiven Population. Nur die Lymphknoten zeigen kein verändertes Profil. In Knochenmark, Blut und Milz findet sich eine Verschiebung zugunsten der IFN γ und TNF α doppelt positiven Population. Die Änderung dieses Verhältnisses ist in der Lunge gut ausgeprägt, weniger aber in der Leber.

Insgesamt findet sich auch auf Ebene der Zytokinproduktion eine über die Zeit veränderliche Heterogenität der antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellpopulation in den verschiedenen Organen.

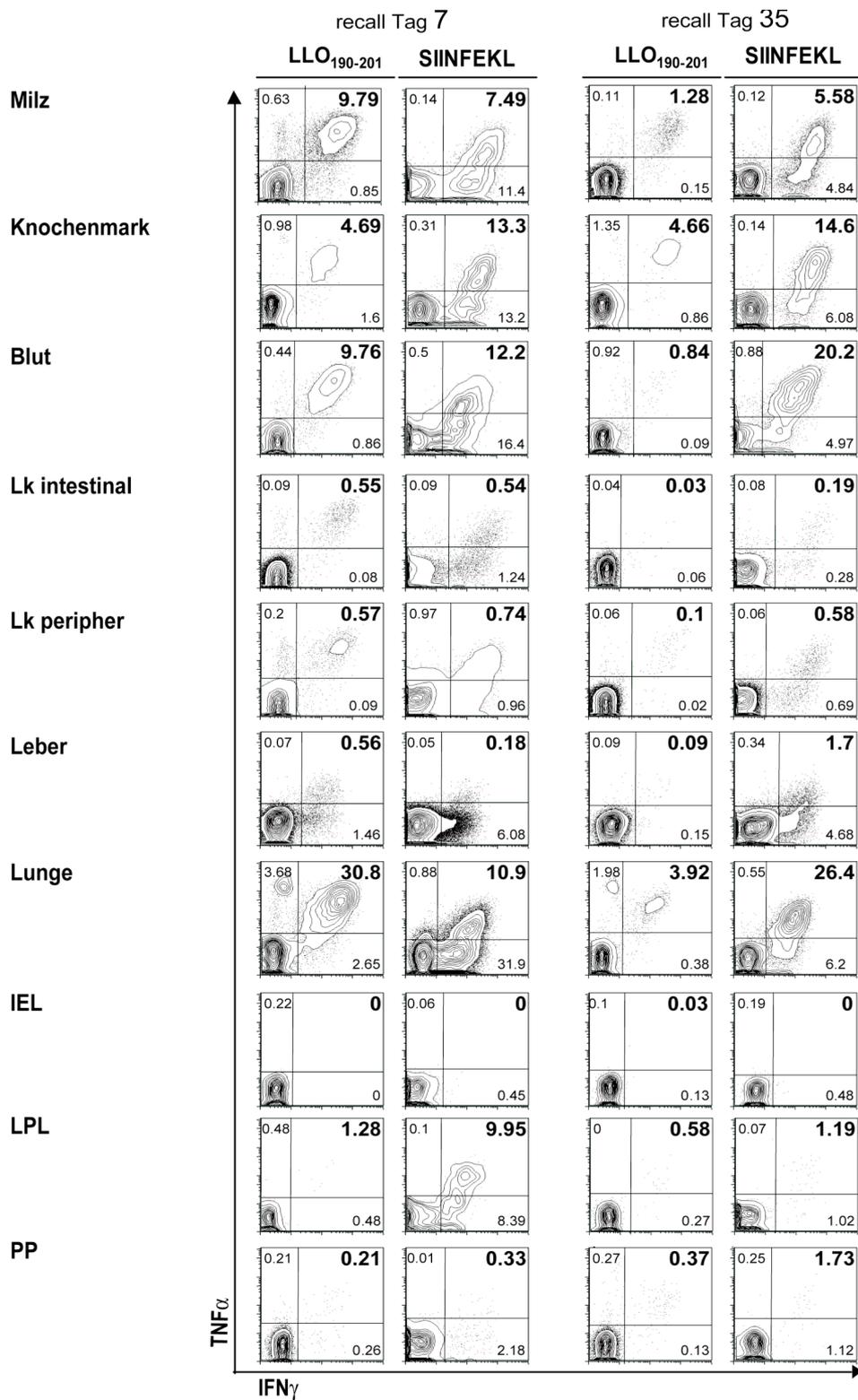


Abbildung 16: Kinetik CD4⁺ (LLO₁₉₀₋₂₀₁) und CD8⁺ (SIINFEKL) IFN γ (FITC) und TNF α (APC) produzierender T-Zellen nach Infektion mit *L.m.-Ova* in verschiedenen Organen. Dot Plots sind repräsentativ für vier C57BL/6 Mäuse 7 und 35 Tage nach recall Infektion. Zahlen geben den Anteil der Zellen jedes Quadranten an.

3.8 CD127- und CD62L- Expression in Abwesenheit von CD40L

Neuere Studien zeigen die Wichtigkeit von T-Zellhilfe für den Aufbau von lang anhaltender protektiver Immunität {Sun, 2003; Janssen, 2003; Shedlock, 2003}. Diese T-Zellhilfe erfolgt klassischerweise durch APC, die über CD40L an CD40 auf T-Helferzellen binden. Alternativ kann T-Zellhilfe durch die Interaktion von CD40 auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit CD40L auf CD4⁺ T-Zellen erfolgen {Bourgeois, 2002}. Da CD40L^{-/-} Mäuse eine Reduktion in der Qualität der Protektion gegen Reinfektion mit *L.m.* oder andere Erreger aufweisen {Sun, 2003; Shedlock, 2003; Borrow, 1996}, untersuchten wir, ob ein Unterschied in der Zusammensetzung CD127 und CD62L exprimierender Populationen in der Post-Effektorphase in der Abwesenheit von CD40L-vermittelter Hilfe während der Priming Periode besteht.

Dazu führten wir Kinetiken in CD40L^{-/-} Mäusen durch, die analog zu den bereits beschriebenen Kinetiken in Wildtyp BALB/c Mäusen auf CD127 und CD62L Expression untersucht wurden. Die Kinetiken zeigten eine normale Primärantwort der CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen in CD40L^{-/-} Mäusen auf Infektion mit *L.m.*. Nach Reinfektion war allerdings die Expansion CD8⁺ antigen-spezifischer T Zellen deutlich geringer als bei Wildtypmäusen (Abbildung 17). Untersucht man die Expression von CD127 und CD62L in der frühen Post-Effektorphase, erkennt man eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der Subpopulationen. Während in CD40L^{-/-} Mäusen die CD127 niedrige CD62L niedrige Population geringfügig reduziert scheint, sind von der CD127 hohen CD62L hohen Population etwas mehr Zellen nachweisbar. Einen deutlichen Unterschied zeigt aber die CD127 hohe CD62L niedrige Subpopulation, die in CD40L^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen deutlich reduziert ist (Abbildung 18).

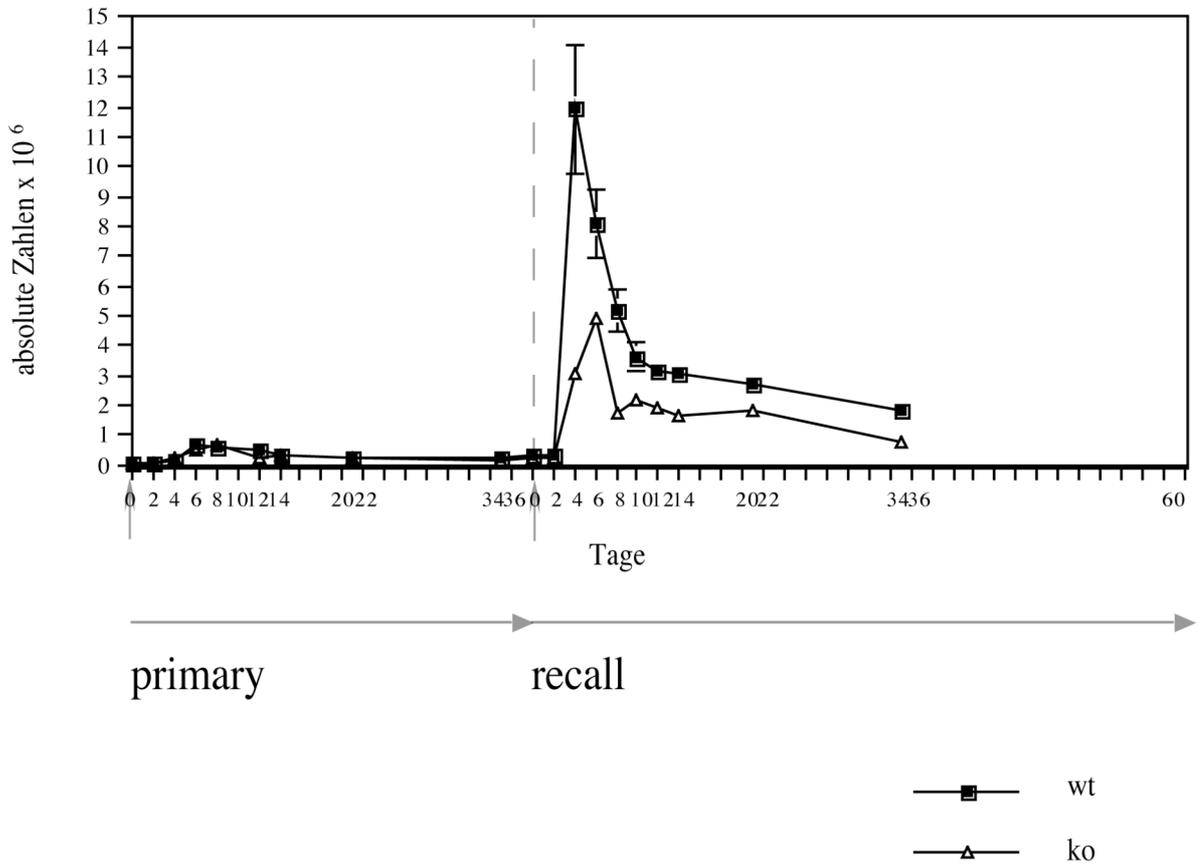


Abbildung 17: Kinetik der absoluten Anzahl LLO₉₁₋₉₉ spezifischer T-Zellen in der Milz nach Primär- und Sekundärinfektion mit *L.m.* (je zwei CD40L^{-/-} (=ko) und BALB/c (=wt) Mäuse pro Zeitpunkt). Pfeile markieren die Infektionszeitpunkte an primary und recall Tag 0.

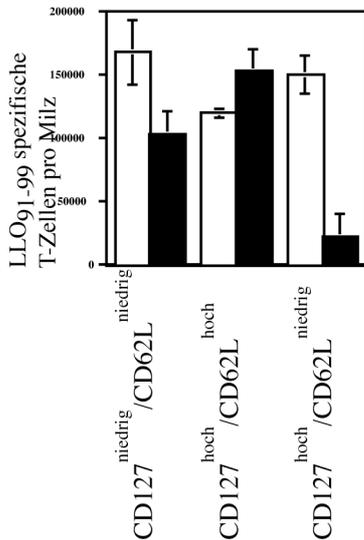


Abbildung 18: Absolute Zahlen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellpopulationen gefärbt auf CD127 oder CD62L in der Milz 10 Tage nach Primärinfektion mit *L.m.*. Weiße Balken repräsentieren WT, schwarze Balken CD40L^{-/-} Mäuse.

4. DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war die phänotypische Charakterisierung von antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen (MTZ) und ihr Vergleich mit antigen-spezifischen CD4⁺ Memory T-Zellen. Hierzu wurden erregerspezifische T-Zellen bei ihrem Übergang von der Effektor- in die Post-Effektorphase mit Hilfe von MHC-Tetramer Reagenzien und intrazellulärer Zytokinfärbung direkt *ex vivo* sichtbar gemacht und auf das Expressionsprofil verschiedener Oberflächenmarker untersucht. Neben generellen Unterschieden in der Langzeiterhaltung von antigen-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ Memory T-Zellen, stellte sich das Expressionsmuster von CD62L und CD127 (α -Kette des IL-7 Rezeptors) als besonders interessant heraus, da sich anhand dieser Marker eine deutliche Aufspaltung in Subpopulationen innerhalb der antigen-spezifischen CD8⁺ MTZ aufzeigen ließ. Diese Subpopulationen sind nicht identisch, vielmehr scheinen die CD62L hoch exprimierenden MTZ eine weitere Subpopulation innerhalb der CD127 positiven MTZ zu repräsentieren.

Das unterschiedliche Migrationsverhalten dieser neu identifizierten MTZ-Subpopulationen in lymphatische und nicht-lymphatische Gewebe legt die Vermutung nahe, daß sich insbesondere durch das Expressionsmuster von CD127 in Verbindung mit der CD62L-Expression „(Post)-Effektor T-Zellen (ET)“ von „Memory T-Zellen (MT)“ als ZMT und EMT mit Hilfe der CD62L-Expression unterscheiden lassen {Wherry, 2003}. Das Fehlen der EMT Subpopulation in CD40L^{-/-} Mäusen könnte darüber hinaus auch eine Erklärung für das Verhalten dieser Mäuse geben, zwar Langzeitprotektion aufzubauen und zu erhalten, aber dabei nicht die gleiche Qualität schneller Erregerbeseitigung wie in Wildtypmäusen zu erreichen {Belz, 2002; Shedlock, 2003; Shedlock, 2003; von Herrath, 1996}.

Für diese T-Zell Subpopulationen, die bisher nur im Humansystem klar unterschieden werden können, waren in der Maus keine Identifizierungsmarker bekannt. Ebenso war die Ursache der schlechten Qualität der Protektion von CD40L^{-/-} Mäusen gegen Reinfektionen lange nicht geklärt.

Die hier zusammengefassten Untersuchungen bilden eine wichtige Grundlage für die weiterführende Charakterisierung und funktionelle Analyse von (Post)-Effektor T-Zellen (ET), sowie zentralen und peripheren Memory T-Zellen in experimentellen Modellen; gleichzeitig weisen die Ergebnisse auf eine wichtige Funktion von IL-7 für die Generierung bzw. den Erhalt von Memory T-Zellen hin.

4.1 CD8⁺ T-Zellen als erste Abwehrlinie bei Reinfektion

Durch den direkten Vergleich der zellulären CD8⁺ und CD4⁺ Immunantwort gegen einen intrazellulären Erreger konnten unsere Untersuchungen aufzeigen, daß antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen zwar bei Infektion rasch auf ein hohes Niveau expandierbar sind, ihre Zahl aber im Gegensatz zu den sehr stabilen CD8⁺ Memory T-Zellpopulationen über die Zeit im gesamten Körper abnimmt. Kürzlich publizierte Untersuchungen in viralen Infektionsmodellen beschreiben sehr ähnliche Verläufe CD8⁺ und CD4⁺ Immunantworten, was auf einen generellen Unterschied der *in vivo* Kinetiken innerhalb dieser beiden T-Zellkompartimente hinweist {Whitmire, 2001; Homann, 2001}. Allerdings war in diesen Studien die Analyse ausschließlich auf das Organ ‚Milz‘ beschränkt, wodurch keine Aussage über den Mechanismus der kontinuierlichen Abnahme CD4⁺ MTZ gemacht werden konnte. Mögliche Erklärungsmodelle sind z.B. Unterschiede in der *in vivo* Überlebensfähigkeit antigen-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ MTZ, oder aber auch Unterschiede in den Wanderungscharakteristika und Verteilungen von MTZ im Körper. Mit unseren Untersuchungen konnten wir erstmals klar aufzeigen, daß antigen-spezifische CD4⁺ Effektor-MTZ im gesamten Körper, d.h. sowohl in lymphatischen wie auch nicht-lymphatischen Geweben, kontinuierlich in ihrer Frequenz abnehmen. CD8⁺ Memory T-Zellen bleiben dagegen im gesamten Körper auf hohem Niveau erhalten. Besonderheiten im Migrationsverhalten CD4⁺ MTZ im Vergleich zu CD8⁺ MTZ konnten als Erklärung für die Abnahme ausgeschlossen werden. CD4⁺ MTZ haben vielmehr eine verkürzte *in vivo* Halbwertszeit und die Reduktion der Frequenzen reflektiert das Absterben bzw. die Entfernung (Deletion) von Zellen aus der Gesamtpopulation antigen-spezifischer CD4⁺ MTZ. Da in dem hier verwendeten bakteriellen Infektionsmodell mit *Listeria monocytogenes* trotz der Abnahme erregerspezifischer CD4⁺ MTZ die Qualität der sehr effektiven protektiven Immunität nicht messbar beeinträchtigt ist, scheint diese Zellpopulation auch kein wesentlicher Träger des spezifischen Immunschutzes zu sein. Diese Interpretation wird weiter dadurch unterstützt, daß besonders bei nicht-chronischen Infektionen mit intrazellulären Erregern die aktive Entfernung CD4⁺ T-Zellen den Aufbau bzw. den Erhalt schützender Immunität nicht negativ beeinflusst {Shedlock, 2003}. Schützende Immunität scheint in diesen Modellen im Wesentlichen antigen-spezifischen CD8⁺ MTZ zuzukommen, deren Effektorfunktionen unabhängig von T-Zellhilfe während einer Sekundärantwort schnell reaktiviert werden können {Whitmire, 2000}. CD8⁺ Memory T-Zellen würde damit sozusagen die Rolle der ersten schützenden Abwehrlinie gegen bekannte Pathogene zukommen. Neben dieser schnellen Aktivierung spezifischer Abwehrmechanismen

durch die in hoher Zahl insbesondere in der Peripherie vorhandenen CD8⁺ T-Zellen, werden bei der Sekundärantwort auch antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen expandiert, die in Abhängigkeit von der Antigenmenge sehr schnell und effektiv aus dem Memory T-Zellpool expandiert werden können. Die Aufgabe, die antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu diesem Zeitpunkt während der Immunantwort zukommt, scheint eher immunmodulatorischer Natur zu sein. Allerdings sind das Ausmaß und die Bedeutung dieser Funktionen von antigen-spezifischen T-Helferzellen für z.B. CD8⁺ T-Zellen bisher nicht gut untersucht. Das Knochenmark ist das einzige Organ, in dem die Frequenz CD4⁺ Memory T-Zellen bei unseren Untersuchungen relativ konstant bleibt, wenn auch die Frequenzen insgesamt nur sehr gering sind. Kürzlich wurde beschrieben, daß sich insbesondere im Knochenmark von Tumorpatienten substantielle Mengen an tumorspezifischen Memory T-Zellen nachweisen lassen {Feurerer, 2001}. Möglicherweise resultiert aus den besonderen homöostatischen Aufgaben des Knochenmarks eine gewisse Sonderstellung dieses Organs, die auch Auswirkungen auf das Verteilungsmuster von antigen-spezifischen MTZ hat. Allerdings weisen unsere extensiven Untersuchungen der Migration antigen-spezifischer MTZ in verschiedensten Organen des Körpers nicht darauf hin, daß das Knochenmark ein spezielles Refugium für CD4⁺ MTZ darstellt.

4.2 Unterteilung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe von Oberflächenmarkern

Wie oben zusammengefasst, scheinen CD8⁺ Memory T-Zellen eine besondere Rolle beim Immunschutz gegen Reinfektionen mit intrazellulären Erregern einzunehmen. Um besser verstehen zu lernen, wie CD8⁺ MTZ diese wichtige Funktion ausüben, haben wir versucht, die Entwicklung dieser Zellpopulation während bzw. nach Infektion näher zu untersuchen. Dabei hat uns insbesondere interessiert, zu welchem Zeitpunkt der Immunantwort Memory T-Zellen gebildet werden bzw. wann sie sich von Effektor T-Zellen abgrenzen lassen.

Durch die Entwicklung der MHC-Tetramer-Methodik sind solche Untersuchungen jetzt prinzipiell möglich geworden, da mit Hilfe dieser Reagenzien die Gesamtpopulationen epitop-spezifischer T-Zellen direkt *ex vivo* sichtbar gemacht werden können. Allerdings fehlt es uns nach wie vor an zusätzlichen Markern, welche die Zugehörigkeit einer antigen-spezifischen T-Zelle zu den naiven, Effektor bzw. Memory T-Zellen eindeutig definieren. Wie sich mehr und mehr herausstellt, wird eine solche eindeutige Zuordnung nicht durch einzelne Marker möglich sein, da die meisten Oberflächenmoleküle zu

verschiedenen Stadien exprimiert werden. So werden z.B. Moleküle, die vor einiger Zeit noch als klassische Marker für naive T-Zellen definiert wurden (z.B. CD45RA), auch auf Subpopulationen von „antigen-erfahrenen“ Memory T-Zellen gefunden. Durch die Kombination bestimmter Marker (z.B. durch CD45RA, CD44, und Ly6C) kann zumindest eine Abgrenzung naiver T-Zellen von Effektor- bzw. Memory T-Zellen zuverlässig durchgeführt werden. Für die Unterscheidung von Effektor und Memory T-Zellen fehlte es allerdings bisher an eindeutigen Abgrenzungsmarkern bzw. Marker-Kombinationen. Durch die Untersuchung der Expressionsmuster verschiedener Oberflächenmarker auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, insbesondere während des Übergangs von der Effektor- in die Post-Effektorphase, wollten wir mit der vorliegenden Studie versuchen, neue Markerkombinationen zur Abgrenzung dieser Populationen zu identifizieren. Auf der Basis ihres Migrationsverhaltens in verschiedene Gewebe werden auch innerhalb der Memory T-Zellpopulationen unterschiedliche Subpopulationen vermutet. Die Milz scheint dabei eine Mittelstellung zwischen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen einzunehmen, da sich in diesem Organ alle der verschiedenen Effektor- und Memory T-Zellpopulationen gemeinsam nachweisen lassen {Reinhardt, 2001}. Deshalb wurden unsere Expressionmarker-Studien zunächst in diesem Organ durchgeführt.

4.2.1 Expressionskinetiken „klassischer“ Memory- und Aktivierungsmarker auf antigen-spezifischen Zellpopulationen

Unter den Markern, deren Expressionsmuster auf antigen-spezifischen T-Zellpopulationen der Milz untersucht wurde, erwarteten wir insbesondere mit Hilfe der bekannten „Memory-assoziierten Marker“, wie z.B. CD44, Ly6C, CD122 und CD132, eine Möglichkeit der Abgrenzung von Effektor und Memory T-Zellen finden zu können. Allerdings bestätigten sich diese Erwartungen nicht. Die Expressionsveränderungen dieser Oberflächenmarker fanden sich vielmehr homogen auf allen Zellen der antigen-spezifischen Populationen zu bestimmten Zeitpunkten der Immunantwort. Es wird vermutet, daß die Adhäsionsmoleküle CD44 und Ly6C, die direkt nach Antigenkontakt heraufreguliert werden, antigen-spezifischen CD8⁺ Effektor und Memory T-Zellen das „Andocken“ an Epithelien und den Eintritt in entzündete Gewebe erleichtern.

CD122, die β -Kette des IL-2- und IL-15-Rezeptors, wird ebenfalls nach Aktivierung homogen auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen heraufreguliert. IL-15 und IL-2 benutzen beide die β - und γ -Kette als Untereinheiten für ihre Rezeptoren. Über die β -

und γ -Untereinheiten erfolgt die Signaltransduktion, durch Assoziation mit einer α -Kette (z.B. CD25) kann die Affinität des Rezeptors für bestimmte Zytokine erhöht werden (hier z.B. für IL-2). Da ein Antikörper gegen die α -Kette des hochaffinen IL-15-Rezeptors nicht verfügbar war, erlauben unsere Untersuchungen nur indirekte Aussagen zur IL-15-Rezeptorexpression über die CD122-Expression. IL-15 wird als wichtiges Zytokin für CD8⁺ Memory T-Zellen diskutiert. Dabei scheint seine Rolle in der Vermittlung von kontinuierlicher oder akuter Proliferation und der Sicherung ihres Überlebens zu bestehen, allerdings sind diese Zusammenhänge noch nicht klar verstanden {Li, 2001; Becker, 2002}. Eine Heraufregulation dieses Rezeptors, wie sie die homogenen Veränderungen der β -Kette vermuten lassen, wäre mit der zentralen Rolle von IL-15 in der Generierung und Erhaltung von CD8⁺ MTZ gut vereinbar, allerdings weisen unsere Daten weder auf Unterschiede von CD8⁺ MTZ zu antigen-spezifischen Effektor T-Zellen, noch auf Unterschiede innerhalb der verschiedenen Memory T-Zellsubpopulationen hin.

Die Expression des hochaffinen IL-2 Rezeptors konnte durch spezifische Färbung auf die α -Kette (CD25) genauer untersucht werden. Im Unterschied zu den oben genannten Markern ließ sich CD25 allerdings nur in der frühen Aktivierungs- und Expansionsphase auf antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nachweisen. Dieser Befund wäre im Einklang mit der Annahme, dass IL-2-vermittelte Signale zur Expansion antigen-spezifischer T-Zellen benötigt werden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Expression von CD25 mit der Induktion von Apoptose während der Kontraktionsphase antigen-spezifischer T-Zellen in Verbindung gebracht {Li, 2001; Dai, 2000}. Bei unseren Untersuchungen konnten wir keine CD25-Expression während der Kontraktionsphase nachweisen, die diese Vermutungen unterstützen würde. Allerdings ist die *in vivo* Halbwertszeit von Zellen mit beginnender Apoptose nur sehr kurz, was ihre Untersuchung *ex vivo* sehr schwierig macht; tote Zellen wurden durch EMA-Färbungen aus unseren Analysen entfernt. Gerade aus diesem Grund müssen Interpretationen hinsichtlich der Assoziation bestimmter Rezeptoren mit Zelltod mit Vorsicht betrachtet werden. Dazu wurden die oben genannten Untersuchungen nicht in einem Infektionsmodell, sondern in einem alloreaktiven System durchgeführt, was eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert.

CD132 ist die gemeinsame γ -Kette des IL-2-, IL-15- und IL-7-Rezeptors. Die Veränderungen des Expressionsmusters von CD132 erfolgten vergleichbar mit CD122 homogen auf der Gesamtpopulation antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Die gemeinsame γ -Kette in all diesen Rezeptoren legt eine gemeinsame Entwicklung in der Evolution und möglicherweise auch ähnliche Funktionen nahe. Die von uns beobachtete

heraufregulierte Expression der gemeinsamen γ -Kette auf antigen-spezifischen $CD8^+$ MTZ wäre als Basis für die Assoziation mit anderen Rezeptor-Untereinheiten höherer Spezifität sinnvoll. Je nach Aufenthaltsort der MTZ und milieuabhängiger Zytokinkonzentrationen wäre so ein kompartiment-abhängiger Einfluß auf die Erhaltung von MTZ und ihrer Funktion denkbar.

4.2.2 CD127 und CD62L als Marker für Subpopulationen antigen-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen

Eine Unterscheidung von klaren Subpopulationen, die bis in die Memory Phase erhalten bleiben, war bei den Markern CD62L, das Homing in Lymphknoten ermöglicht, und CD127, der spezifischen α -Kette des IL-7 Rezeptors, erkennbar. Unsere Untersuchungen in verschiedenen Organen und Geweben deuten darauf hin, daß diese Subpopulationen antigen-spezifischer Effektor und Memory T-Zellen ein unterschiedliches Migrationsverhalten aufweisen. Auffällig ist dabei, daß sich vor allem in der Effektorphase antigen-spezifische $CD127^{hoch}$ T-Zellen vorzugsweise in lymphatischen Organen (Lymphknoten) auffinden lassen, während sich $CD127^{niedrig}$ T-Zellen vorzugsweise in nicht-lymphatischen Geweben (z.B. Lunge) aufhalten. In Übereinstimmung mit Daten anderer Arbeitsgruppen finden sich in der Milz Vertreter aller Subpopulationen. Die Milz nimmt eine Zwischenstellung zwischen den beiden Kompartimenten ein und beherbergt alle verschiedenen Subpopulationen, die sich durch hohe bzw. niedrige Expression von CD62L und CD127 auszeichnen, schon früh nach Infektion {Busch, 1998; Murali-Krishna, 1998}. Später in der Memory Phase finden sich dann in allen Organen überwiegend $CD127^{hoch}$ T-Zellen. Dieses Verteilungsmuster, insbesondere im Bezug auf die CD127 Expression, spiegelt die Eigenschaften von sogenannten Memory T-Zellen (MTZ) und (Post)-Effektor T-Zellen (ET) wieder. Möglicherweise steht uns mit CD127 in Kombination mit CD62L eine Markerkombination zu Verfügung, die Subpopulationen von T-Zellen, die bisher nur im Humansystem über das Expressionsmuster bestimmter Marker (CD45RA, CCR7) unterschieden werden können, auch in der Maus in Memory T-Zellen und (Post)-Effektor T-Zellen und die Memory T-Zellen mit CD62L weiter in zentrale und periphere MTZ zu unterteilen. Auch die Funktion dieser Oberflächenmoleküle würde gut zur Interpretation unserer Daten passen. Durch die Expression des Homingrezeptors CD62L könnten zentrale $CD8^+$ Memory T-Zellen über hohe endotheliale Venolen in die sekundären lymphatischen Organe eintreten und dort gespeichert werden. Sekundäre lymphatische Organe enthalten hohe Spiegel an IL-7 {Kieper, 2002}, was eine Präferenz zentraler $CD8^+$ Memory T-Zellen für diese Organe erklären könnte. IL-7 wird

seit langem als wichtiger Überlebensfaktor für naive und Memory T-Zellen diskutiert. Auch hier würde eine Expression von IL-7-Rezeptor auf CMT gut passen, da diese langlebiger als periphere EMT zu sein scheinen. Durch ein Fehlen des Homingrezeptors als auch des IL-7-Rezeptors könnten periphere CD8⁺ (Post)-Effektor T-Zellen nur in nicht-lymphatische Organe eintreten. Betrachtet man die absoluten und relativen Größen der Subpopulationen CD127 hoch und niedrig exprimierender CD8⁺ T-Zellen, überwiegt im zeitlichen Verlauf der Memory Phase die CD127^{hoch} Subpopulation. Memory T-Zellen bleiben wahrscheinlich durch ihre homöostatische Proliferationsfähigkeit, erhalten, während die Mechanismen der i.d.R. nur bedingt effektiven Erhaltung von peripheren Effektor T-Zellen bisher nicht bekannt sind.

Der Vergleich der Populationsgrößen lässt vermuten, daß die CD62L hoch exprimierende Subpopulation in der CD127 hoch exprimierenden Population enthalten ist. Dies suggeriert, daß CD62L eine Subpopulation, CD127 aber die Gesamtpopulation CD8⁺ Memory T-Zellen darstellen könnte. Eine weitere Charakterisierung zeigte, daß die Populationen CD62L und CD127 exprimierender Zellen nicht identisch sind, sondern unterschiedliche Memory T-Zellpopulationen, CMT und EMT, repräsentieren. Auch die Analyse der absoluten Zahlen CD62L und CD127 hoch exprimierender antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen unterstützt diese Interpretation. Der absolute Anteil CD127 hoch exprimierender Zellen steigt schon während der Effektorphase an und stabilisiert sich dann in der Memory Phase. Dies deutet darauf hin, daß während des Ablaufs der Infektion CD127 hoch exprimierende antigen-spezifische Memory T-Zellen generiert werden, die in der Milz konstant gehalten werden. Die CD62L hoch exprimierenden Zellen expandieren und kontrahieren dagegen wie die CD127 niedrig exprimierenden antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen. Da diese Beobachtung allerdings nur auf die Milz beschränkt ist, können Migrationseffekte als Ursache dieser Beobachtung nicht ausgeschlossen werden. Allerdings bleibt die Anzahl CD62L hoch exprimierender antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellen nach der akuten Immunantwort konstant, CD127 niedrig exprimierende antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen sinken dagegen fast auf das Nullniveau ab. Möglicherweise repräsentiert diese Zellpopulation keine wirkliche Memory T-Zellpopulation, sondern mehr eine Post-Effektor-Zellpopulation, die nicht über lange Zeit erhalten werden kann. Für diese Interpretation spräche auch die sehr niedrige Frequenz dieser Population in den zentralen lymphatischen Organen und ihr Überwiegen in der Peripherie je näher der Zeitpunkt an der Effektorphase liegt. Auch aus diesen Beobachtungen heraus scheint CD127 ein umfassenderer Marker für tatsächliche CD8⁺ Memory T-Zellen zu sein als CD62L, der nur eine Subpopulation von MTZ zu repräsentieren scheint. Durch CD62L lassen sich MTZ möglicherweise weiter in CMT und EMT unterteilen.

4.3 CD127 und CD62L als Marker zur Unterscheidung von MTZ und ET

Bisher ist keine Markerkombination für die Unterscheidung von MTZ und ET in der Maus bekannt. Ebenso ist unklar, ob die für den Menschen beschriebene Unterscheidung von MTZ in einen zentralen und peripheren Memory T-Zellpool auch im Mausmodell gilt {Sallusto, 1999}. Es ist allerdings bekannt, daß auch in der Maus Memory T-Zellen in peripheren und sekundär lymphatischen Organen verteilt sind. Bisherige Untersuchungen haben keine brauchbaren Marker zur Beantwortung dieser Fragen aufgewiesen.

In dieser Untersuchung identifizieren die unterschiedlichen Kinetiken der CD127 hohen und niedrigen Populationen CD127 als einen Marker für langlebige Memory T-Zellen und CD62L als Marker für eine Subpopulation dieser.

4.3.1 Unterschiede im Zytokinmilieu des zentralen und peripheren Kompartiments

Da das Zytokinmilieu nach heutigen Erkenntnissen ein entscheidender Erhaltungsfaktor für CD8⁺ Memory T-Zellen ist, wäre eine besondere Bedeutung des hohen IL-7-Spiegels in sekundären lymphatischen Organen für die Erhaltung CD8⁺ Memory T-Zellen denkbar. Durch IL-7 könnte die Proliferationsfähigkeit der CMT zur Speisung des peripheren T-Zellpools gefördert werden. Nach bisherigen Erkenntnissen scheint das Zusammenspiel von IL-7, IL-2 und IL-15 aus der „common γ -chain“ Rezeptorfamilie für die Regulation antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellen wichtig zu sein. Besonders IL-15 wird als Erhaltungsfaktor für Memory T-Zellen diskutiert {Becker, 2002; Zhang, 1998}.

Die bisherigen Untersuchungen, die IL-15 als wichtigstes Zytokin für CD8⁺ Memory T-Zellen darstellen, beschreiben allerdings fast immer eine Population von CD8⁺ Memory T-Zellen, die auch in einem IL-15 freien Milieu überleben kann {Schluns, 2002; Kieper, 2002}. Da für diese Untersuchungen im überwiegenden Fall alle antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen betrachtet werden, könnte diese Population auch eine von IL-7R α exprimierenden CD8⁺ Memory T-Zellen sein, die nicht durch IL-15, sondern IL-7 erhalten werden. Diese Interpretation würde bedeuten, daß CD8⁺ Memory T-Zellen wie naive CD8⁺ T-Zellen nicht durch permanenten Antigenkontakt, sondern durch IL-7 erhalten werden {Schluns, 2000}. Einen Einfluß auf antigen-abhängige Expansion scheint IL-7 allerdings nicht zu haben. Durch hohe Spiegel an IL-7 in sekundären

lymphatischen Organen würden IL-7R exprimierende Zellen in den sekundären lymphatischen Organen bevorzugt akkumulieren {Goldrath, 2002}. In peripheren Organen wäre dagegen IL-15 Rezeptor, dessen β -Kette auf allen antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Memory Phase exprimiert wird, für die Erhaltung von CD8⁺ (Post)-Effektor T-Zellen verantwortlich {Judge, 2002}. Ein Unterschied in der Erhaltung der beiden CD8⁺ Memory T-Zellpopulationen wäre durch die Regulierung der Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 erklärbar {Grayson, 2000}. Diese scheint durch IL-7 gesteigert zu werden {Schluns, 2000}. Jedoch scheint auch für IL-15 eine Regulation von Bcl-2 über die „common γ -chain“ möglich {Li, 2001}. Die langsame Abnahme der (Post)-Effektor Memory T-Zellen wäre durch eine ineffektivere anti-apoptotische Wirkung, bedingt durch unterschiedliche Mengen an IL-15 im jeweiligen Mikromilieu in peripheren Geweben im Vergleich zu IL-7, erklärbar {Akbar, 1993}.

4.3.2 Korrelation der CD127-Expression mit Migration in verschiedene Kompartimente

Über die Hypothese, daß die Expression von CD127 CD8⁺ Memory von Post-Effektor T-Zellen unterscheidet, gibt die Analyse des Migrationsverhaltens CD127 exprimierender antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen Aufschluß.

Die Abnahme der CD127 niedrig exprimierenden Population antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellen in der Milz reflektiert nicht das Absterben dieser Zellen im gesamten Körper und eine Erhaltung CD127 hoch exprimierender antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellen. Die Abnahme in der Milz ist vielmehr die Folge von Migration dieser Population in periphere Organe. Apoptose wurde durch die Berechnung der absoluten Zahlen antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellen in den verschiedenen Organen als Ursache bereits in anderen Arbeiten ausgeschlossen {Masopust, 2001; Reinhardt, 2001}.

Nach Aktivierung z.B. in der Milz reguliert der überwiegende Teil CD8⁺ T-Zellen CD127 herunter, auf einer anderen Population bleibt CD127 dagegen erhalten. Ob die unterschiedliche Regulierung durch Kontakt mit verschiedenen APC {Lauvau, 2001}, einer Aktivierung in verschiedenen Kompartimenten sekundärer lymphatischer Organe {Potsch, 1999} oder ein unterschiedliches Zytokinemilieu {Sallusto, 2000} zustande kommt, ist zurzeit reine Spekulation. Da beide Subpopulationen Adhäsionsmoleküle für entzündliche Gewebe exprimieren, können sie auch in periphere Organe eintreten. Je höher der Bedarf an antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im jeweiligen Organ ist, desto

größer ist auch die Expansion und Akkumulation. So sehen wir einen dramatischen Anstieg auf bis zur Hälfte aller CD8⁺ T-Zellen in Lunge und Leber, die aufgrund ihres hohen Blutdurchsatzvolumens und der großen Mukosa-Oberfläche (Lunge) mit höherer Wahrscheinlichkeit erneut mit Erregern in Kontakt kommen.

In allen peripheren Organen finden sich besonders auf dem Höhepunkt der Immunantwort unter den antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen fast nur CD127 niedrig exprimierende Zellen. Ihre Aufgabe dürfte dort eine rasche Beseitigung des Erregers sein. Diese Funktion könnte also eher CD127 niedrig exprimierenden Post-Effektor CD8⁺ T-Zellen zugeschrieben werden. Die expandierten CD127 niedrig exprimierenden Zellen könnten sich aus dem Rest der CD127 niedrigen Zellen der Primärinfektion und dem Nachschub durch Aktivierung aus dem peripheren Reservoir CD127 hoher Zellen zusammensetzen.

In peripheren Lymphknoten finden sich in der frühen Phase der Immunantwort nur CD127 hoch exprimierende Zellen, wahrscheinlich auch deshalb da die Lymphknoten nicht Ort der Infektion sind. Dies könnte entweder eine einseitige Aktivierung von CD127 hoch exprimierenden CD8⁺ T-Zellen bedeuten oder eine schnellere Auswanderung CD127 niedrig exprimierender Zellen aus den peripheren Lymphknoten in andere Organe {Ostler, 2001}. Eine dramatische Expansion antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellen ist in den Lymphknoten ebenfalls nicht feststellbar. Dies scheint dafür zu sprechen, daß die Lymphknoten eher für die Belieferung antigen-spezifischer CD8⁺ Effektor Memory T-Zellen in die infizierten umliegenden Gewebe verantwortlich sind. Die Migration CD127 hoch und niedrig exprimierender antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in periphere Organe ist an ihr Vorhandensein im Blut gekoppelt. Sowohl CD127 hohe als auch niedrige antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen sind im Blut nachweisbar. Sie scheinen auf dem Blutweg in periphere Organe zu migrieren. Eine direkte Aktivierung durch Antigen im Blut, ist durch die intrazelluläre Ausbreitung des Erregers unwahrscheinlich.

Organe wie die Milz, die eine Stellung zwischen lymphatischem und nicht-lymphatischem Kompartiment einnehmen, können einerseits bei septischen Infektionsverläufen direkt von Erregern befallen werden, andererseits können in diesem Organ antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen gespeichert werden. Nach der erfolgreichen Eliminierung des Pathogens nehmen die antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen in den meisten peripheren Organen ab. In den Organen des zentralen Kompartiments bleiben die Frequenzen CD8⁺ Memory T-Zellen dagegen relativ konstant. Zentral und peripher sind die erhaltenen antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen CD127 hoch. Die kontinuierliche Abnahme der Frequenzen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen in der Lunge dürfte nach Eliminierung des nicht primär respiratorischen Erregers (*Listeria*

monocytogenes) zu erwarten sein {Hogan, 2001}. In der Leber stabilisieren sich allerdings, ähnlich wie in der Milz, die antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auf einem höheren Niveau. Diese Beobachtung stellt eine Behandlung der Leber als rein „peripheres“ Organ in Frage. Die absoluten Zahlen antigen-spezifischer T-Zellen in Leber und Lunge sind aber längere Zeit beide wie zum Zeitpunkt der Infektionsbekämpfung CD127 relativ niedrig, dann aber in der späten Memory Phase ebenfalls CD127 hoch. Aufgrund der gleichzeitigen Perfusion der Leber mit Blut aus dem Darm und aus anderen Regionen des Körpers, könnte dieses Organ eine strategisch wichtige Position als Speicherort antigen-spezifischer CD8⁺ (Post)-Effektor T-Zellen für einige Zeit nach Infektion einnehmen. Hier hätten die Zellen eine hohe Chance bei Wiedereintritt des gleichen Antigens als eine der ersten mit ihm in Kontakt zu kommen. Eine andere strategisch gute Positionierung wäre der Gastrointestinaltrakt in diesem Infektionssystem {Harrington, 2000}. Hier sind auch hohe Frequenzen antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen nach Infektion detektierbar. Allgemein stellt die Positionierung von CD8⁺ (Post)-Effektor T-Zellen in peripheren Organen eine Möglichkeit dar, direkt im befallenen Gewebe aktiviert zu werden, wieder eindringendes Antigen zu eliminieren und damit sofort eine systemische Ausbreitung des Erregers zu verhindern. Nach einiger Zeit würden aber auch die (Post)-Effektor T-Zellen zugrunde gehen und nur noch Memory T-Zellen in peripheren Geweben erhalten bleiben. Aufgrund eines Fehlens von CD62L könnten sie nicht in die Lymphknoten eintreten und würden in peripheren Organen akkumulieren. Dort würde ihnen eine wichtige Funktion als EMT in der sofortigen Bekämpfung einer Reinfektion zukommen.

In Organen des zentralen Kompartiments, wie Milz und Lymphknoten, bleiben nur CD127 hohe antigen-spezifische CD8⁺ Memory T-Zellen erhalten. Diese könnten als zentraler Speicher für CD8⁺ Memory T-Zellen fungieren und EMT für periphere Organe bereitstellen. CD127 hoch exprimierende antigen-spezifische CD8⁺ Memory T-Zellen im Blut nach Eliminierung des Pathogens sind wahrscheinlich analog zu naiven T-Zellen Ausdruck ihrer kontinuierlichen Migration durch den Körper. Das Knochenmark enthält in der Memory Phase interessanterweise auch ein Reservoir an CD127 hohen antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen, was durch seine Bedeutung für die Homöostase hämatopoetischer Zellen erklärbar ist.

Die Analyse des Migrationsverhaltens untermauert insgesamt die Hypothese, daß CD127 Expression charakteristisch für CD8⁺ Memory T-Zellen, nicht dagegen für Post-Effektor T-Zellen ist. Durch diesen Marker könnten also CD8⁺ Memory und Post-Effektor T-Zellen voneinander unterschieden werden. Eine weitere Unterteilung von CD127 hohen MTZ könnte mit Hilfe von CD62L erfolgen, um die Population der MTZ

weiter in zentrale und periphere MTZ aufzugliedern {Wherry, 2003}. Die Expression von CD62L auf CMT würde ihnen ein Eintreten in die Lymphknoten über hohe endotheliale Venolen erlauben. Durch ihre Proliferationsfähigkeit würden sie dort lange erhalten bleiben und den Pool von peripheren EMT speisen. Diese könnten durch die fehlende Expression von CD62L nur in periphere Organe eintreten, wo sie lange erhalten bleiben und so bei Reinfektion direkt am Ort des Eindringens das Pathogen bekämpfen und eine systemische Ausbreitung verhindern können. Erste Untersuchungen dieser Subpopulationen auf Proliferationsfähigkeit und Zytotoxizität scheinen diese Hypothese zu untermauern.

4.4 Mögliche funktionelle Bedeutung der IL-7R auf Memory T-Zellen

Einen ersten Einblick in die funktionellen Unterschiede von Memory und Post-Effektor CD8⁺ T-Zellen geben Untersuchungen der Zytokinproduktion in verschiedenen Organen des zentralen und peripheren Kompartiments. Kurz nach der Expansionsphase produzieren antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen in den meisten Organen mehr IFN γ als TNF α . Da IFN γ neben Perforin an der Apoptose antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen beteiligt sein könnte, erklären sich hierdurch möglicherweise die unterschiedlichen Verhältnisse in den Organen {Badovinac, 2002}. In der Leber ist das Überwiegen der IFN γ Produktion am deutlichsten. Dies könnte ein Hinweis auf die Funktion der Leber sein, eine Art Friedhof für antigen-spezifische CD8⁺ Memory T-Zellen aus verschiedenen Organen darzustellen {Huang, 1994}. Die Lunge zeigt ein ähnliches, wenn auch nicht so ausgeprägtes, Bild wie die Leber. In den peripheren Lymphknoten und im Knochenmark sind die Verhältnisse IFN γ und TNF α produzierender Zellen dagegen eher ausgewogen, was aus ihrem Beitrag zur Homöostase erklärbar wäre. Als Ort für die Beherbergung zentraler MTZ könnte dies ein Hinweis auf die höhere Homogenität dieser MTZ-Population im Vergleich zu der in peripheren Organen sein, in denen Memory und (Post)-Effektor T-Zellen nebeneinander über einen längeren Zeitraum existieren. Der Unterschied zwischen funktionsabhängiger und -unabhängiger Untersuchung antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zeigt sich am deutlichsten bei den IEL, die weder IFN γ noch TNF α zu produzieren scheinen. Ein zusätzliches Bedürfnis von Kostimulation, auch in der Reaktivierung, wäre aufgrund der besonderen Anforderungen an diese Zellpopulation durch ihre anatomische Lokalisation sicher vorstellbar {Pope, 2001}.

Erste getrennte Analysen der CD127 hoch und niedrig exprimierenden Population antigen-spezifischer CD8⁺ T-Zellen zeigen einen Unterschied in der Produktion von IL-

2, TNF- α und IFN- γ nach Antigenkontakt. Diese Unterschiede scheinen sich noch deutlicher bei einer weiteren Aufspaltung der CD127 hohen Subpopulation mit CD62L zu demarkieren. Durch Antigenkontakt könnten CD127 hoch exprimierende Zellen aktiviert werden, CD127 herunterregulieren und Effektorfunktionen aquirieren. Eine Konversion in die entgegengesetzte Richtung ist ebenfalls nicht ausgeschlossen. Dennoch weist die rasche Aquisition von Effektorfunktionen in Kombination mit dem dargestellten Migrationsverhalten eher auf die erste Möglichkeit hin.

In ersten Proliferationsexperimenten scheinen sich die vermuteten Unterschiede zwischen den CD127 hoch und niedrig exprimierenden Populationen zu bestätigen. CD127 hoch exprimierende antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen proliferieren rasch auf Antigenkontakt, CD127 niedrig exprimierende dagegen nicht.

Insgesamt zeigen die Subpopulationen CD127 hoch und niedrig exprimierender antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellen ein heterogenes Verteilungsmuster in peripheren und zentralen Organen. Erste Untersuchungen geben Hinweise, daß diese Verteilung mit bestimmten Funktionen und damit unterschiedlichen Aufgaben korreliert sein könnte. Die hier dargestellten Ergebnisse betonen die besondere Aufgabe der proliferativ orientierten antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen bei der langfristigen Aufrechterhaltung der Immunität. Die CD8⁺ Memory T-Zellen, die CD127 niedrig exprimieren, könnten dagegen durch ihre fehlende spontane Proliferationsfähigkeit langsam verringert werden. Ebenso geben erste funktionelle Analysen der CD62L hoch und niedrig exprimierenden Subpopulation der MTZ in Organen des zentralen und peripheren Kompartiments erste Hinweise auf ihre mögliche Funktion als CMT und EMT.

Obwohl eingehende funktionelle Analysen der CD127 hoch und niedrig exprimierenden Populationen für die Unterstützung dieser Erklärungsversuche unabdingbar sind, scheinen dennoch erste Untersuchungen die Theorie zu unterstützen, daß CD127 niedrig exprimierende am ehesten (Post)-Effektor CD8⁺ T-Zellen, CD127 hoch exprimierende am ehesten der Gesamtpopulation langlebiger Memory T-Zellen entsprechen, die mithilfe von CD62L in CMT und EMT differenziert werden können.

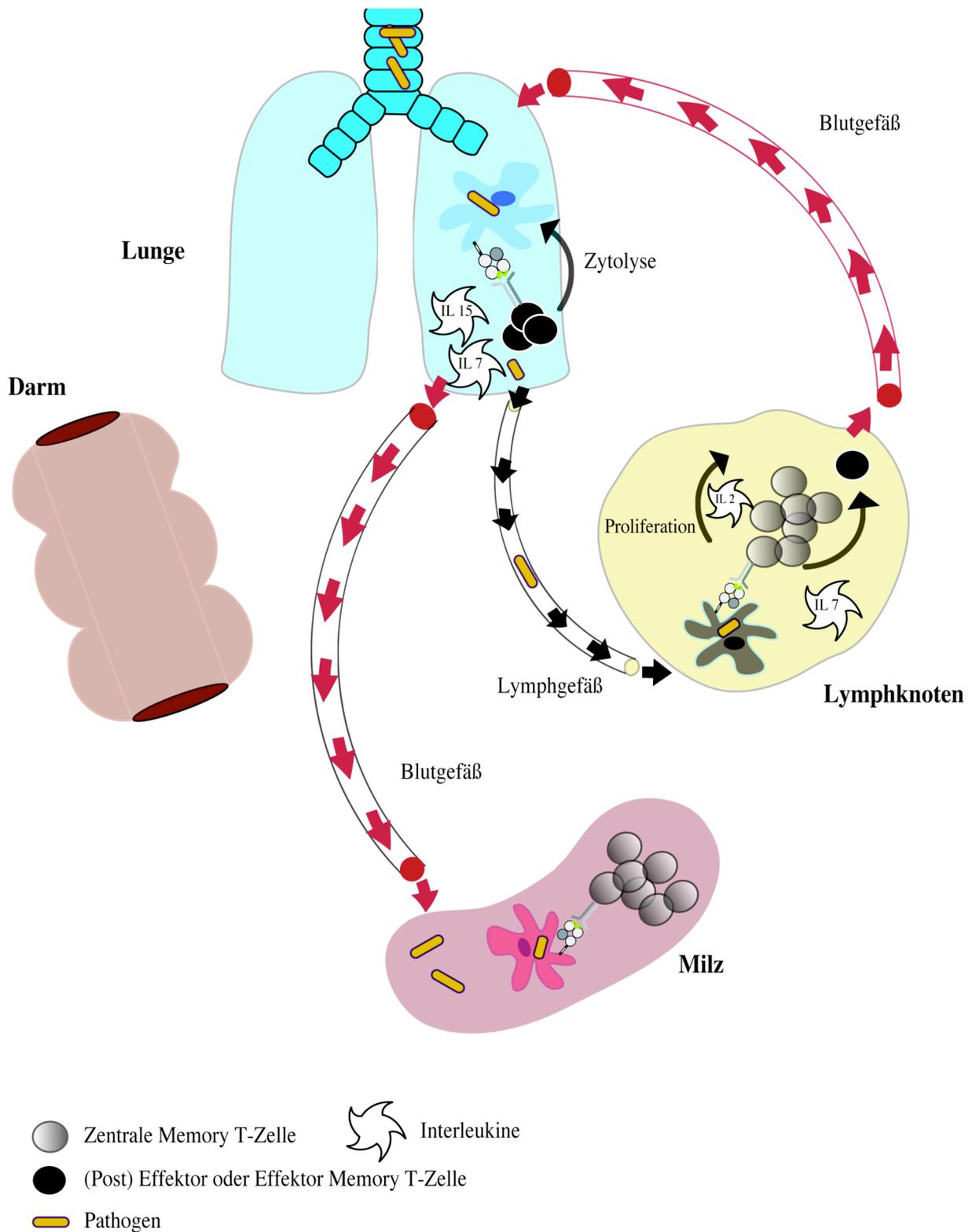


Abbildung 19: Schema des Verteilungsmusters von CD8⁺ antigen-spezifischen T-Zellen in lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen exemplarisch an Lunge und Lymphknoten. Unterschiede im Zytokinmilieu der verschiedenen Kompartimente, der funktionellen Charakteristika der CMT, EMT und ET unterschiedlicher Lokalisation und ihrer Migration nach Antigenkontakt mit bekanntem Pathogen.

4.5 Bedeutung der Aufteilung des T-Zellpools in Memory und Post-Effektor T-Zellen

Durch eine Aufteilung des T-Zellpools in (Post)-Effektor T-Zellen, CMT und EMT wird eine qualitativ höhere Protektivität gewährleistet. Die Kompartimente ergänzen sich durch die Fähigkeit von Memory T-Zellen zur Proliferation und damit Langzeiterhaltung und (Post)-Effektor T-Zellen zur raschen Effektorfunktion. Auch nach Untergang der (Post)-Effektor T-Zellen wird ein längerer Schutz durch peripher bereitgestellte rasche Effektorfunktion durch EMT gewährleistet. Besonders bei intrazellulären Erregern, die durch CTL direkt eliminiert werden können, scheint diese Aufteilung sinnvoll. Bei Erregern, bei welchen die humorale Immunantwort im Vordergrund steht, ist es dagegen wahrscheinlich, daß andere Teile des Immunsystems eine größere Rolle spielen.

Nach Primärinfektion bleiben die $CD8^+$ Post-Effektor T-Zellen neben Memory T-Zellen in nicht-lymphatischen Organen wie der Lunge bestehen (Abbildung 19). Da sie nicht proliferieren können, bleiben sie zwar einige Zeit erhalten, vielleicht durch bestimmte Zytokine wie IL-15, ihre Zahl nimmt aber im Laufe der Zeit ab. Diese Abnahme in der Peripherie ist nötig, da Speicherplatz für $CD8^+$ Memory und Post-Effektor T-Zellen nicht nur gegen einen, sondern gegen viele verschiedene Erreger benötigt wird. Die strategische Positionierung von $CD8^+$ T-Zellen mit rascher Effektorfunktion ist für die Verhinderung einer systemischen Ausbreitung der Infektion nötig. Eindringendes Pathogen, zum Beispiel in die Lunge, kann so direkt unschädlich gemacht werden. Die Infektion bleibt also lokal begrenzt. Erst wenn, je nach Zeitpunkt der Reinfektion, die peripheren $CD8^+$ Post-Effektor T-Zellen oder EMT das Pathogen nicht sofort beseitigen können und ein systemischer Krankheitsverlauf mit Eindringen in die Blut- und Lymphbahnen entsteht, werden die $CD8^+$ Memory T-Zellen in Lymphknoten und Milz gebraucht. Das Pathogen wird in die nächsten Lymphknotenstationen oder bei septischer Infektion über das Blut in die Milz drainiert und dort von professionellen APC aufgenommen. Die $CD8^+$ Memory T-Zellen werden durch diese Präsentation und mit Hilfe von Zytokinen aktiviert und wandern in das betroffene Organ aus, um mehr Effektorzellen bereitzustellen. Die zentral lokalisierten $CD8^+$ Memory T-Zellen proliferieren spontan und gewährleisten so die Aufrechterhaltung eines ausreichenden Memory T-Zellpools. Durch die zentralen $CD8^+$ Memory T-Zellen wird so ein bestimmtes Maß an Protektivität nie unterschritten. Durch periphere $CD8^+$ Post-Effektor T-Zellen und EMT kann die Qualität der Protektion jedoch noch gesteigert werden. Die Kompartimente ergänzen sich also in ihrer Bedeutung für protektive Immunität.

Für eine langfristige Erhaltung von Memory T-Zellen in der Peripherie ist möglicherweise der Kontakt mit Antigen in bestimmten Abständen notwendig. Dieses Prinzip wäre eine Erklärung für den positiven Effekt bei der Auffrischung von Impfungen und auch für die größer werdenden Abstände zwischen den notwendigen Impf-„Boosts“. Durch die wiederholte Gabe von Antigen könnten langfristig größere Populationen CD8⁺ Post-Effektor T-Zellen und EMT in der Peripherie bereitgehalten werden, die unmittelbar auf eine Infektion mit demselben Antigen reagieren können. Durch die Auffrischimpfungen würde also die Qualität der Protektion auf einem hohen Niveau gehalten.

Neben Implikationen für die Optimierung aktiver Impfungen, wäre auch eine Art passiver Impfung durch Transfer von CD8⁺ Memory T-Zellen möglich. Hierbei würde die Übertragung CD127 hoher CD8⁺ Memory T-Zellen in naive Empfänger ein gewisses Maß an Protektivität vermitteln. Der Transfer CD127 niedriger CD8⁺ Post-Effektor T-Zellen alleine wäre aufgrund ihrer fehlenden Proliferationsfähigkeit dagegen nicht für den langfristigen Aufbau von Protektivität geeignet.

Auch für die weitere Grundlagenforschung haben unsere Beobachtungen große Bedeutung. Da der Memory T-Zellpool der Maus analog zu dem des Menschen aufgebaut zu sein scheint, hätten Untersuchungen im Immunsystem der Maus eine größere Chance, direkt auf den Menschen übertragbar zu sein. Mit den neu identifizierten Memory T-Zell Markern könnten neue Methoden für Diagnostik und Therapie im Mausmodell entwickelt und erforscht werden.

4.6 Linear- versus Post-Effektormodell

Die frühe Detektion von CD8⁺ Memory T-Zellen während der Immunantwort gibt erste Hinweise auf ihren Generierungsweg (Abbildung 20). Die hier vorliegenden Untersuchungen deuten eher auf ein lineares Modell der Entstehung von CD8⁺ Memory T-Zellen hin {Manjunath, 2001}. Die Anwesenheit CD8⁺ Memory T-Zellen in allen Stadien der Immunantwort weist möglicherweise darauf hin, daß CD8⁺ Memory T-Zellen nicht aus Effektorzellen hervorgehen. Sie scheinen sich direkt aus naiven CD8⁺ T-Zellen zu entwickeln. Dies steht im Gegensatz zur weit verbreiteten Meinung, CD8⁺ Memory T-Zellen müssten erst zu Effektorzellen aktiviert werden und würden dann durch stochastische oder gezielte Mechanismen vor ihrem Untergang gerettet und sozusagen über die Zeit zu einer Memory T-Zelle reifen {Opferman, 1999}. Hiernach durchlaufen CD8⁺ Memory T-Zellen ein Zwischenstadium als sogenannte Effektor-Memory T-Zellen bis sie als eigentliche Memory T-Zellen erhalten bleiben {Wherry, 2003; Kaech, 2002}. Dies ist das Post-Effektormodell der Generierung von CD8⁺

Memory T-Zellen. Da allen diesen Untersuchungen, die für das Post-Effektormodell argumentieren, verlässliche Marker für die Unterscheidung von Post-Effektor und Memory T-Zellpopulationen als auch CMT und EMT fehlen, könnten sie die Population von CD8⁺ Memory T-Zellen, die schon früh in der Immunantwort besteht, nicht von Post-Effektor T-Zellen unterschieden haben. Diese Daten wurden außerdem durch die Kinetiken der Genexpression von gesamten T-Zellpopulationen der Milz gewonnen. Da unsere Daten eine frühe Aufteilung in die verschiedenen T-Zellsubpopulationen mit unterschiedlichen phänotypischen und wahrscheinlich auch funktionellen Charakteristika und darüber hinaus unterschiedlichem Wanderungs- und Überlebensverhalten zeigen, könnten Veränderungen der Gesamtpopulation ebenso Ausdruck von Häufigkeitsschwankungen zu bestimmten Zeitpunkten in der Milz sein. Das Linearmodell wurde zum Beispiel kürzlich durch Experimente mit adaptivem murinem Zelltransfer in Frage gestellt, in dem zentrale und Effektor Memory T-Zellen nur anhand ihrer CD62L Expression definiert wurden {Wherry, 2003}. Unsere Untersuchungen weisen allerdings auf die Heterogenität der CD62L niedrigen Population hin, weshalb Ergebnisse aus derartigen Experimenten mit Vorsicht zu interpretieren sind. Obwohl unsere Daten eher für das Linearmodell der Memory T-Zellentwicklung sprechen, bedarf es weiterer insbesondere genetischer Analysen, um die exakte Dynamik der Entwicklung dieser Subpopulationen festzustellen.

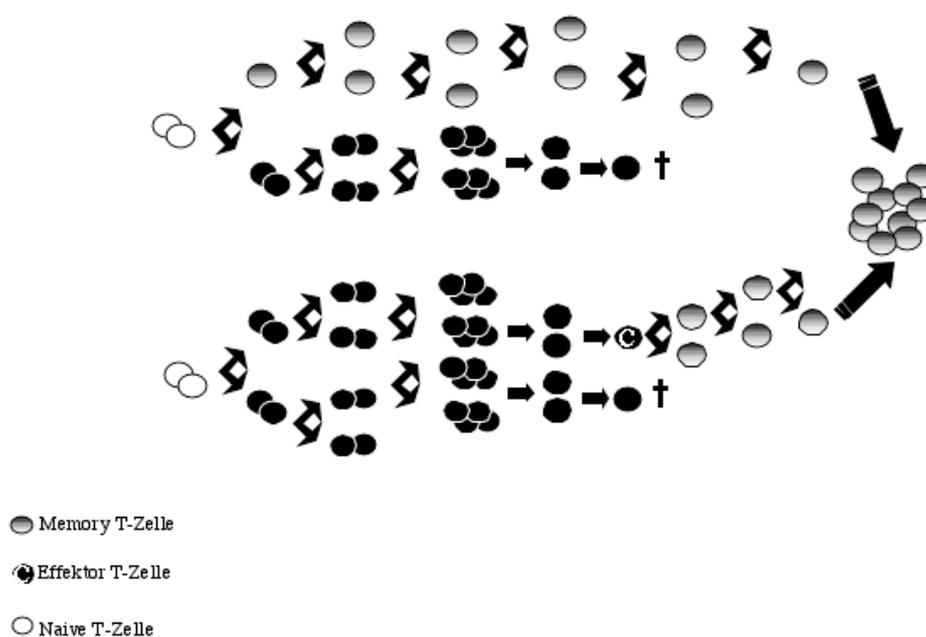


Abbildung 20: Gegenüberstellung von Linearmodell und Post-Effektormodell der Generierung von Memory T-Zellen

4.7 Bedeutung der frühen Detektion von Memory T-Zellen in der Immunantwort

Die Veränderungen in den T-Zellsubpopulationen sind schon früh nach Infektion detektierbar. Dies ist im Einklang mit anderen Studien, die die Induzierbarkeit einer charakteristischen Memory Antwort bereits durch eine Reinfektion in der frühen Effektorphase zeigen. Schon zu diesem frühen Zeitpunkt müssten also bereits T-Zellen mit Memory Charakteristika vorhanden sein {Busch, 2000}. Dabei erlaubt die Identifikation neuer phänotypischer Marker für die Unterscheidung von Effektor und Memory T-Zellsubpopulationen erstmals die Untersuchung ihrer frühen Entwicklung. Diese Beobachtung ist von speziellem klinischen Interesse, da es so möglich wäre, Informationen über die Qualität der langfristigen protektiven Immunität schon früh während der Immunantwort zu erhalten, zum Beispiel nach einer Impfung gegen ein Pathogen.

Die frühe Beurteilung der Qualität der induzierten protektiven Immunität hat wichtige Implikationen für die Entwicklung und Beurteilung der Effektivität neuer Impfstoffe, da schon kurz nach Immunisierung eine Aussage über den später durch die Impfung vermittelten Schutz getroffen werden könnte. Da $CD8^+$ Memory T-Zellen ähnlich naiven Zellen kontinuierlich im Blut durch den Körper zu zirkulieren scheinen, könnte vor allem bei der Impfung gegen intrazelluläre Erreger ein Bluttest auf das Vorhandensein $CD8^+$ Memory T-Zellen eine hilfreiche Aussage über die Ausbildung protektiver Immunität erlauben. Ebenso wäre durch die Fähigkeit, die Entwicklung von T-Zellsubpopulationen über die Zeit zu verfolgen, eine Optimierung von Impfstoffen möglich.

Das Ziel der Impfstoffentwicklung ist, eine möglichst schonende Impfung mit der Vermittlung einer hohen Protektivität zu kombinieren. Bestimmte Impfstrategien könnten vor allem Post-Effektor T-Zellen generieren, die zwar sofortige Effektorfunktion hätten, aber nicht langfristig erhalten werden. Andere Protokolle könnten dagegen eher Memory T-Zellen generieren, die entweder direkt Effektorfunktionen oder eher proliferative Eigenschaften haben. Durch eine hauptsächliche Induktion der Entwicklung zentraler $CD8^+$ Memory T-Zellen, denen die rasche Effektorfunktion fehlt, würde der Körper durch eine erste Impfung weniger belastet. Gleichzeitig würden diese Zellen ein gewisses Maß an Protektivität garantieren, was auch folgende Impfungen schonender macht. Um die Qualität der Protektivität zu erhöhen, könnte dann in einer nächsten Impfung vor allem auf den

Aufbau von EMT in peripheren Organen fokussiert werden. Jede dieser Impfstrategien könnte bei bestimmten klinischen Anwendungen jeweils Vorteile erbringen.

Diese Erkenntnisse haben also nicht nur für die Grundlagenforschung Bedeutung, sondern auch für immunologische Diagnose und für Impfstrategien. Sie können einen entscheidenden Beitrag zur Optimierung von Impfstoffen leisten und die Möglichkeiten zur gezielten Entwicklung schonender Impfungen, zur genaueren Bestimmung der Immunitätslage und zur frühen Prognose über den Erfolg von Immunisierungen vorantreiben.

4.8 Ausblick

Diese Arbeit identifiziert CD127 als einen neuen Marker für die Unterscheidung von CD8⁺ Memory und Post-Effektor T-Zellen. Die so charakterisierten Memory T-Zellen lassen sich mit CD62L noch weiter unterteilen. Dieser phänotypische Befund bildet die Grundlage für weiterführende funktionelle Analysen, besonders im Hinblick auf Unterschiede in Proliferation, Zytotoxizität, Abhängigkeit von Zytokinen und Vermittlung von Protektivität durch die einzelnen Subpopulationen.

Eine wichtiges Charakteristikum von CD8⁺ Memory T-Zellen ist ihre Fähigkeit, im Gegensatz zu Post-Effektor CD8⁺ T-Zellen, schnell auf Antigen zu proliferieren. Post-Effektor CD8⁺ T-Zellen wirken im Gegensatz zu CD8⁺ Memory T-Zellen rasch zytolytisch. Effektorfunktion kann aber auch durch die Produktion von IFN γ und TNF α auf epitop-spezifische Stimulation getestet werden, spontane Proliferationsfähigkeit zum Beispiel durch die Produktion von IL-2. Obwohl bereits erste Versuche zur Detektion von Unterschieden zwischen den definierten Populationen durchgeführt wurden, müssen die Ergebnisse noch genauer bestätigt werden.

Da das Zytokinmilieu des zentralen und peripheren Kompartiments differiert, sollte die Abhängigkeit CD8⁺ Memory und Post-Effektor T-Zellen von kompartiment-spezifischen Zytokinen getestet werden. Einen ersten Hinweis auf die Charakterisierung von CD8⁺ Memory T-Zellen würde eine Mehrfachfärbung mit mehreren Memory T-Zellmarkern besonders gegen IL-2, IL-7 und IL-15 geben. Diese Zytokine sollten zusätzlich auf ihre funktionelle Wirkung auf die verschiedenen CD8⁺ T-Zellpopulationen untersucht werden. Zusätzlich sollte die Fähigkeit der verschiedenen Populationen, unter dem Einfluß dieser Zytokine zu überleben und zu proliferieren, untersucht werden.

Um die Hypothese zu bestätigen, daß in Anlehnung an das kürzlich veröffentlichte Expressionsmuster von CD62L die Subpopulationen der CD127^{hoch} CD62L^{hoch} T-Zellen zentralen und die CD127^{hoch} CD62L^{niedrig} T-Zellen peripheren Memory T-Zellen

entsprechen, müssen ebenso noch weitere Doppelfärbungen in Organen des peripheren und zentralen Kompartiments als auch funktionelle Analysen auf Proliferation und Zytotoxizität durchgeführt werden, die charakteristisch für die postulierten Subpopulationen sind.

Der aufgezeigte Defekt in Abwesenheit von CD40L eine bestimmte Subpopulation von Memory T-Zellen zu entwickeln, könnte noch genauer im Hinblick auf die für diesen Effekt verantwortliche CD40L exprimierende Population untersucht werden. Die T-Zellhilfe könnte von APCs oder CD4⁺ T-Zellen oder auch von beiden in Kombination bereitgestellt werden. Hierzu wären Transferexperimente verschiedener Knockout-Zellpopulationen nötig.

Es bleibt ebenfalls zu untersuchen, ob der Defekt der CD40L^{-/-} Mäuse in der recall Antwort auf ihrer verminderten Proliferationsfähigkeit beruht oder auf einem Defekt in der Erhaltung von Memory T-Zellen. Obwohl unsere Untersuchungen eher das Fehlen einer bestimmten Subpopulation mit bestimmten raschen Effektorfunktionen für die geringere Qualität der Protektivität in CD40L^{-/-} Mäusen verantwortlich machen, müssen die anderen Möglichkeiten für definitive Aussagen ausgeschlossen werden.

Es ist ebenfalls nötig Migrationseffekte und Häufigkeitsverteilungen als Ursache dieses Phänomens auszuschließen und deshalb die Ergebnisse in der Milz und anderen Organen des zentralen und peripheren Kompartiments zu vergleichen.

Neben den funktionellen Experimenten *in vitro* sollte es das Ziel sein, die unterschiedliche Vermittlung von Protektivität nach Retransfer *in vivo* zu testen. Retransferierte CD8⁺ Memory und Post-Effektor T-Zellen müssten in den verschiedenen Kompartimenten wiedergefunden werden und je nach ihrer Fähigkeit zu proliferieren unterschiedliche Zeit im Körper überleben können.

Nach den Untersuchungen im Mausmodell wäre es auch interessant, humane Zellen auf die Expression von CD127 und CD62L zu testen und mit anderen Memory T-Zellmarkern wie CCR7 zu kombinieren. Diese Untersuchungen würden eine direkte Übertragung der im Mausmodell erhobenen Daten auf den Menschen erlauben. So könnten z.B. die Wirkung von Impfungen am Menschen studiert werden oder isolierte Zellen in der Therapie für Retransfer eingesetzt werden und z.B. durch Gabe von Zytokinen für die *in vivo* Erhaltung bestimmter Memory T-Zellsubpopulationen gezielt beeinflusst werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung polyklonaler antigen-spezifischer CD8⁺ Memory T-Zellpopulationen ist heute in Abhängigkeit ihrer Funktion mit intrazellulärer Zytokinfärbung und funktionsunabhängig mit MHC-Tetrameren möglich.

Ziel dieser Arbeit war eine grundlegende Analyse des Verhaltens von CD8⁺ Memory T-Zellen im Vergleich zu CD4⁺ Memory T-Zellen, ihres Phänotyps und ihrer Entstehung im Verlauf einer Immunantwort. Die Immunantwort wurde nach muriner Infektion mit dem Wildtypstamm bzw. einem rekombinant Ovalbumin-sezernierenden Stamm des intrazellulären Bakterium *Listeria monocytogenes* untersucht.

Der Vergleich von CD4⁺ und CD8⁺ Memory T-Zellen mittels intrazellulärer Färbung in verschiedenen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen zeigte, daß die Zahl CD8⁺ T-Zellen in der Memory Phase fast konstant bleibt, CD4⁺ T-Zellen jedoch im gesamten Körper abnehmen. CD8⁺ T-Zellen scheinen eine erste Abwehrlinie gegen Reinfektionen mit intrazellulären Erregern zu bilden, während CD4⁺ T-Zellen eher modulatorische Funktionen haben. CD8⁺ Memory T-Zellen sind für die Erhaltung langfristiger Protektivität gegen diesen intrazellulären Erreger entscheidend.

In der phänotypischen Analyse CD8⁺ T-Zellen mit MHC-Tetrameren und verschiedenen Oberflächenmarkern unterschiedlicher Funktion in der Milz wurde besonders auf den Übergang von der Effektor- in die Post-Effektorphase fokussiert, der für den Aufbau des CD8⁺ Memory T-Zellpools entscheidend ist. Neben den Adhäsionsmolekülen CD44 und Ly6C und Mitgliedern der „common γ -chain“ Rezeptorfamilie wie CD122 und CD132, die auf allen antigen-spezifischen CD8⁺ Memory T-Zellen exprimiert werden, wurden CD127 und CD62L nur auf bestimmten Subpopulationen antigen-spezifischer T-Zellen gefunden. Dabei ist die CD62L hoch exprimierende Subpopulation in der CD127 hoch exprimierenden enthalten. Die CD127 hoch exprimierende Subpopulation wird in der Memory Phase stabil gehalten, die CD127 niedrige Subpopulation nimmt dagegen kontinuierlich über die Zeit ab. Dieses Verhalten korreliert mit einem unterschiedlichen Expressionsmuster von CD127 in Organen des zentralen und peripheren Kompartiments. In den Lymphknoten finden sich in allen Phasen der Immunantwort nur CD127 hoch exprimierende CD8⁺ Memory T-Zellen, in der Milz eine Mischpopulation, die in der Memory Phase nur noch CD127 hoch exprimiert. In peripheren Organen wie der Lunge und der Leber finden sich in der Effektor Phase fast nur CD127 niedrig exprimierende Zellen, in der Memory Phase CD127 hoch exprimierende Populationen. Dieses Verteilungsmuster zeigt phänotypisch

CD127 als einen Marker für die Unterscheidung von CD8⁺ Memory und Post-Effektor T-Zellen in der Maus. Eine weitere Differenzierung der CD8⁺ Memory T-Zellen mit Hilfe von CD62L zeigte ihre Aufteilung in Subpopulationen.

Die Kombination von CD127 und CD62L erlaubt zwischen Post-Effektor und Memory T-Zellpopulationen in Mäusen zu unterscheiden und wahrscheinlich die Memory T-Zellpopulation weiter in CMT und EMT zu unterteilen, die den im Humansystem beschriebenen Populationen entsprechen. Das Fehlen der CD127^{hoch} CD62L^{niedrig} Population in Abwesenheit von CD40L könnte für den geringeren Schutz und die geringere Expansion nach Reinfektion in CD40L^{-/-} Mäusen verantwortlich sein.

Im Zusammenhang mit anderen auf CD8⁺ Memory T-Zellen konstitutiv oder temporär exprimierten Oberflächenmarkern, besonders Rezeptoren für die Zytokine IL-2 und IL-15, ist eine genauere Charakterisierung CD8⁺ Memory T-Zellen möglich. Eine Korrelation der phänotypischen Ergebnisse mit distinkter funktioneller Aktivität, besonders im Hinblick auf Proliferation, Zytotoxizität, Zytokinabhängigkeit und Protektion ist zu vermuten, bedarf aber noch weiterer Untersuchungen. Die Existenz von CD8⁺ Memory T-Zellen bereits zu Beginn der Immunantwort legt darüber hinaus ihre direkte Abstammung von naiven CD8⁺ T-Zellen nahe (lineares Entwicklungsmodell). Ein protektiver Memory T-Zellpool könnte somit schon vor dem Durchlaufen der Effektorphase nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse können nicht nur dem besseren Verständnis der Korrelation zwischen murinem und humanem System in der Grundlagenforschung dienen, sondern zusätzlich diagnostisch bei der Bestimmung der Immunitätslage als auch therapeutisch bei der Optimierung von Vakzinen und der Vermittlung von Protektivität bedeutend sein.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahmed, R., and Gray, D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*, 272 (1996)
- Akbar, A. N., Salmon, M., Savill, J., and Janossy, G. A possible role for bcl-2 in regulating T-cell memory--a 'balancing act' between cell death and survival. *Immunol Today* 14 (1993) 526-532.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., and Davis, M. M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274 (1996) 94-96.
- Badovinac, V. P., and Harty, J. T. Intracellular staining for TNF and IFN-gamma detects different frequencies of antigen-specific CD8(+) T cells. *J Immunol Methods* 238 (2000) 107-117.
- Badovinac, V. P., Porter, B. B., and Harty, J. T. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3 (2002) 619-626.
- Badovinac, V. P., Tvinnereim, A. R., and Harty, J. T. Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290 (2000) 1354-1358.
- Becker, C., Pohla, H., Frankenberger, B., Schuler, T., Assenmacher, M., Schendel, D. J., and Blankenstein, T. Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nat Med* 7 (2001) 1159-1162.
- Becker, T. C., Wherry, E. J., Boone, D., Murali-Krishna, K., Antia, R., Ma, A., and Ahmed, R. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med* 195 (2002) 1541-1548.
- Belz, G. T., Wodarz, D., Diaz, G., Nowak, M. A., and Doherty, P. C. Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice. *J Virol* 76 (2002) 12388-12393.
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L., McEver, R., and et al. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell* 67 (1991) 233.
- Borrow, P., Tishon, A., Lee, S., Xu, J., Grewal, I. S., Oldstone, M. B., and Flavell, R. A. CD40L-deficient mice show deficits in antiviral immunity and have an impaired memory CD8+ CTL response. *J Exp Med* 183 (1996) 2129-2142.
- Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. *Science* 297 (2002) 2060-2063.
- Busch, D. H., Kerksiek, K. M., and Pamer, E. G. Differing roles of inflammation and antigen in T cell proliferation and memory generation. *J Immunol* 164 (2000) 4063-4070.
- Busch, D. H., and Pamer, E. G. T lymphocyte dynamics during *Listeria monocytogenes* infection. *Immunol Lett* 65 (1999) 93-98.
- Busch, D. H., Pilip, I. M., Vijh, S., and Pamer, E. G. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8 (1998) 353-362.
- Campbell, J. J., Murphy, K. E., Kunkel, E. J., Brightling, C. E., Soler, D., Shen, Z., Boisvert, J., Greenberg, H. B., Viera, M. A., Goodman, S. B., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Butcher, E. C., and Wu, L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166 (2001) 877-884.
- Chambers, C. A., Sullivan, T. J., Truong, T., and Allison, J. P. Secondary but not primary T cell responses are enhanced in CTLA-4-deficient CD8+ T cells. *Eur J Immunol* 28 (1998) 3137-3143.
- Cho, B. K., Wang, C., Sugawa, S., Eisen, H. N., and Chen, J. Functional differences between memory and naive CD8 T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 2976-2981.
- Clarke, S. R. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol* 67 (2000) 607-614.

- Coligan, J. E., Kruisbeek A. M., Margulies D. H., Shevach E. M., Strober W., Ed. (Hrsg.) "Current Protocols in Immunology", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1996
- Dai, Z., Konieczny, B. T., and Lakkis, F. G. The dual role of IL-2 in the generation and maintenance of CD8⁺ memory T cells. *J Immunol* 165 (2000) 3031-3036.
- Dumont, F. J. Stimulation of murine T cells via the Ly-6C antigen: lack of proliferative response in aberrant T cells from *lpr/lpr* and *gld/gld* mice despite high Ly-6C antigen expression. *J Immunol* 138 (1987) 4106-4113.
- Dutton, R. W., Bradley, L. M., and Swain, S. L. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 16 (1998) 201-223.
- Faint, J. M., Annels, N. E., Curnow, S. J., Shields, P., Pilling, D., Hislop, A. D., Wu, L., Akbar, A. N., Buckley, C. D., Moss, P. A., Adams, D. H., Rickinson, A. B., and Salmon, M. Memory T cells constitute a subset of the human CD8⁺CD45RA⁺ pool with distinct phenotypic and migratory characteristics. *J Immunol* 167 (2001) 212-220.
- Feuerer, M., Rocha, M., Bai, L., Umansky, V., Solomayer, E. F., Bastert, G., Diel, I. J., and Schirmacher, V. Enrichment of memory T cells and other profound immunological changes in the bone marrow from untreated breast cancer patients. *Int J Cancer* 92 (2001) 96-105.
- Fukada, K., Sobao, Y., Tomiyama, H., Oka, S., and Takiguchi, M. Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8⁺ T cells. *J Immunol* 168 (2002) 2225-2232.
- Goldrath, A. W., and Bevan, M. J. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402 (1999) 255-262.
- Goldrath, A. W., Sivakumar, P. V., Glaccum, M., Kennedy, M. K., Bevan, M. J., Benoist, C., Mathis, D., and Butz, E. A. Cytokine requirements for acute and Basal homeostatic proliferation of naive and memory CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 195 (2002) 1515-1522.
- Grayson, J. M., Zajac, A. J., Altman, J. D., and Ahmed, R. Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 164 (2000) 3950-3954.
- Hanninen, A., Jaakkola, I., Salmi, M., Simell, O., and Jalkanen, S. Ly-6C regulates endothelial adhesion and homing of CD8(+) T cells by activating integrin-dependent adhesion pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 6898-6903.
- Harrington, L. E., Galvan, M., Baum, L. G., Altman, J. D., and Ahmed, R. Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans. *J Exp Med* 191 (2000) 1241-1246.
- Harty, J. T., and Bevan, M. J. CD8 T cells specific for a single nonamer epitope of *Listeria monocytogenes* are protective in vivo. *J. Exp. Med.* 175(1992) 1531-1540.
- Hogan, R. J., Usherwood, E. J., Zhong, W., Roberts, A. A., Dutton, R. W., Harmsen, A. G., and Woodland, D. L. Activated antigen-specific CD8⁺ T cells persist in the lungs following recovery from respiratory virus infections. *J Immunol* 166 (2001) 1813-1822.
- Homann, D., Teyton, L., and Oldstone, M. B. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8⁺ but declining CD4⁺ T-cell memory. *Nat Med* 7 (2001) 913-919.
- Huang, L., Soldevila, G., Leeker, M., Flavell, R., and Crispe, I. N. The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1 (1994) 741-749.
- Jacob, J., and Baltimore, D. Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo. *Nature* 399 (1999) 593-597.
- Janeway Ch. A. Jr., T. P., Walport M., Shlomchik M. J.
The Thymus and the Development of T Lymphocytes
Host Defense against Infection

- Immunological Memory
 In "Immunobiology: the immune system in health and disease." Garland Publishing, Taylor & Francis Group, New York, 1999, 234, 402, 408
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., and Schoenberger, S. P. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 421 (2003) 852-856.
- Johnson, R., Lancki, D. W., and Fitch, F. W. Accessory molecules involved in antigen-mediated cytotoxicity and lymphokine production by cytotoxic T lymphocyte subsets. I. Identification of functions for the T cell surface molecules Ly-6C and Thy-1. *J Immunol* 151 (1993) 2986-2999.
- Judge, A. D., Zhang, X., Fujii, H., Surh, C. D., and Sprent, J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8(+) T cells. *J Exp Med* 196 (2002) 935-946.
- Kaech, S. M., and Ahmed, R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2 (2001) 415-422.
- Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E., and Ahmed, R. Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111 (2002) 837-851.
- Kaufmann, S. H. E. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol. Today* 16 (1995) 338-342.
- Kieper, W. C., Tan, J. T., Bondi-Boyd, B., Gapin, L., Sprent, J., Ceredig, R., and Surh, C. D. Overexpression of interleukin (IL)-7 leads to IL-15-independent generation of memory phenotype CD8+ T cells. *J Exp Med* 195 (2002) 1533-1539.
- Knabel, M., Franz, T. J., Schiemann, M., Wulf, A., Villmow, B., Schmidt, B., Bernhard, H., Wagner, H., and Busch, D. H. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med* 8 (2002) 631-637.
- Kursar, M., Bonhagen, K., Fensterle, J., Kohler, A., Hurwitz, R., Kamradt, T., Kaufmann, S. H., and Mittrucker, H. W. Regulatory CD4(+)CD25(+) T Cells Restrict Memory CD8(+) T Cell Responses. *J Exp Med* 196 (2002) 1585-1592.
- Lalvani, A., Brookes, R., Hambleton, S., Britton, W. J., Hill, A. V., and McMichael, A. J. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med* 186 (1997) 859-865.
- Lauvau, G., Vijn, S., Kong, P., Horng, T., Kerksiek, K., Serbina, N., Tuma, R. A., and Pamer, E. G. Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine. *Science* 294 (2001) 1735-1739.
- Li, X. C., Demirci, G., Ferrari-Lacraz, S., Groves, C., Coyle, A., Malek, T. R., and Strom, T. B. IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells in vivo. *Nat Med* 7 (2001) 114-118.
- MacDonald, H. R., Casanova, J. L., Maryanski, J. L., and Cerottini, J. C. Oligoclonal expansion of major histocompatibility complex class I-restricted cytolytic T lymphocytes during a primary immune response in vivo: direct monitoring by flow cytometry and polymerase chain reaction. *J Exp Med* 177 (1993) 1487-1492.
- Manjunath, N., Shankar, P., Wan, J., Weninger, W., Crowley, M. A., Hieshima, K., Springer, T. A., Fan, X., Shen, H., Lieberman, J., and von Andrian, U. H. Effector differentiation is not prerequisite for generation of memory cytotoxic T lymphocytes. *J Clin Invest* 108 (2001) 871-878.
- Manz, R., Assenmacher, M., Pfluger, E., Miltenyi, S., and Radbruch, A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 1921-1925.
- Maruyama, M., Lam, K. P., and Rajewsky, K. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature* 407 (2000) 636-642.

- Marzo, A. L., Vezys, V., Williams, K., Tough, D. F., and Lefrancois, L. Tissue-level regulation of Th1 and Th2 primary and memory CD4 T cells in response to *Listeria* infection. *J Immunol* 168 (2002) 4504-4510.
- Masopust, D., Vezys, V., Marzo, A. L., and Lefrancois, L. Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue. *Science* 291 (2001) 2413-2417.
- McMichael, A., and Kelleher, A. The arrival of HLA class II tetramers. *JCI* 104 (1999) 1669-1670.
- McMichael, A. J., and O'Callaghan, C. A. A new look at T cells. *J Exp Med* 187 (1998) 1367-1371.
- Mercado, R., Vijh, S., Allen, S. E., Kerksiek, K., Pilip, I. M., and Pamer, E. G. Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165 (2000) 6833-6839.
- Michie, C. A., McLean, A., Alcock, C., and Beverley, P. C. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360 (1992) 264-265.
- Miyahira, Y., Murata, K., Rodriguez, D., Rodriguez, J. R., Esteban, M., Rodriguez, M. M., and Zavala, F. Quantification of antigen specific CD8+ T cells using an ELISPOT assay. *J. Immunol. Methods* 181 (1995) 45-54.
- Mombaerts, P., Arnoldi, J., Russ, F., Tonegawa, S., and Kaufmann, S. H. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 365 (1993) 53-56.
- Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, M., Sourdive, D. J., Zajac, A. J., Miller, J. D., Slansky, J., and Ahmed, R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8 (1998),177-187.
- Murali-Krishna, K., Lau, L. L., Sambhara, S., Lemonnier, F., Altman, J., and Ahmed, R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286 (1999) 1377-1381.
- Nagata, S., and Golstein, P. The Fas death factor. *Science* 267 (1995) 1449-1456.
- Novak, T. J., Farber, D., Leitenberg, D., Hong, S. C., Johnson, P., and Bottomly, K. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition. *Immunity* 1 (1994) 109-119.
- O'Brien, M. C., and Bolton, W. E. Comparison of cell viability probes compatible with fixation and permeabilization for combined surface and intracellular staining in flow cytometry. *Cytometry* 19 (1995) 243-255.
- Ogg, G. S., and McMichael, A. J. HLA-peptide tetrameric complexes. *Curr Opin Immunol* 10 (1998) 393-396.
- Opferman, J. T., Ober, B. T., and Ashton-Rickardt, P. G. Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes. *Science* 283 (1999) 1745-1748.
- Ostler, T., Hussell, T., Surh, C. D., Openshaw, P., and Ehl, S. Long-term persistence and reactivation of T cell memory in the lung of mice infected with respiratory syncytial virus. *Eur J Immunol* 31 (2001) 2574-2582.
- Pape, K. A., Kearney, E. R., Khoruts, A., Mondino, A., Merica, R., Chen, Z. M., Ingulli, E., White, J., Johnson, J. G., and Jenkins, M. K. Use of adoptive transfer of T-cell-antigen-receptor-transgenic T cell for the study of T-cell activation in vivo. *Immunol Rev* 156 (1997) 67-78.
- Pihlgren, M., Dubois, P. M., Tomkowiak, M., Sjogren, T., and Marvel, J. Resting memory CD8+ T cells are hyperreactive to antigenic challenge in vitro. *J Exp Med* 184 (1996) 2141-2151.
- Pope, C., Kim, S. K., Marzo, A., Masopust, D., Williams, K., Jiang, J., Shen, H., and Lefrancois, L. Organ-specific regulation of the CD8 T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 166 (2001) 3402-3409.
- Potsch, C., Vohringer, D., and Pircher, H. Distinct migration patterns of naive and effector CD8 T cells in the spleen: correlation with CCR7 receptor expression and chemokine reactivity. *Eur J Immunol* 29 (1999) 3562-3570.

- Reinhardt, R. L., Khoruts, A., Merica, R., Zell, T., and Jenkins, M. K. Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body. *Nature* 410 (2001) 101-105.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401 (1999) 708-712.
- Sallusto, F., Mackay, C. R., and Lanzavecchia, A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18 (2000) 593-620.
- Schatz, P. J. Use of peptide libraries to map the substrate specificity of a peptide modifying enzyme: a 13 residue consensus peptide specifies biotinylation in *Escherichia coli*. *Biotechnology* 11 (1993) 1138-1143.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., and Lefrancois, L. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1 (2000) 426-432.
- Schluns, K. S., Williams, K., Ma, A., Zheng, X. X., and Lefrancois, L. Cutting edge: requirement for IL-15 in the generation of primary and memory antigen-specific CD8 T cells. *J Immunol* 168 (2002) 4827-4831.
- Schneck, J. P. Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers. *Immunol Invest* 29 (2000) 163-169.
- Shedlock, D. J., and Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 300 (2003) 337-339.
- Shedlock, D. J., Whitmire, J. K., Tan, J., MacDonald, A. S., Ahmed, R., and Shen, H. Role of CD4 T Cell Help and Costimulation in CD8 T Cell Responses During *Listeria monocytogenes* Infection. *J Immunol* 170 (2003) 2053-2063.
- Sprent, J., and Surh, C. D. T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20 (2002) 551-579.
- Sprent, J., and Tough, D. F. T cell death and memory. *Science* 293 (2001) 245-248.
- Sun, J. C., and Bevan, M. J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* 300 (2003) 339-342.
- Takahashi, Y., Ohta, H., and Takemori, T. Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire. *Immunity* 14 (2001) 181-192.
- Thukydides "Der Peloponnesische Krieg." Vretska H. u. Rinner W. (Ed.), Philipp Reclam jun. GmbH & Co., 2000, Stuttgart.
- von Herrath, M. G., Yokoyama, M., Dockter, J., Oldstone, M. B., and Whitton, J. L. CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* 70 (1996) 1072-1079.
- Walunas, T. L., Bruce, D. S., Dustin, L., Loh, D. Y., and Bluestone, J. A. Ly-6C is a marker of memory CD8⁺ T cells. *J Immunol* 155 (1995) 1873-1883.
- Walzer, T., Arpin, C., Beloeil, L., and Marvel, J. Differential in vivo persistence of two subsets of memory phenotype CD8 T cells defined by CD44 and CD122 expression levels. *J Immunol* 168 (2002) 2704-2711.
- Wherry, E. J., Teichgraber, V., Becker, T. C., Masopust, D., Kaech, S. M., Antia, R., Von Andrian, U. H., and Ahmed, R. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol.* (2003)
- Whitmire, J. K., and Ahmed, R. The economy of T-cell memory: CD4⁺ recession in times of CD8⁺ stability? *Nat Med* 7 (2001) 892-893.
- Whitmire, J. K., Murali-Krishna, K., Altman, J., and Ahmed, R. Antiviral CD4 and CD8 T-cell memory: differences in the size of the response and activation requirements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355 (2000) 373-379.
- Young, J. L., Ramage, J. M., Gaston, J. S., and Beverley, P. C. In vitro responses of human CD45R0brightRA- and CD45R0-RAbright T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur J Immunol* 27 (1997) 2383-2390.

- Zhang, X., Sun, S., Hwang, I., Tough, D. F., and Sprent, J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8 (1998) 591-599.
- Zinkernagel, R. M., Bachmann, M. F., Kundig, T. M., Oehen, S., Pirchet, H., and Hengartner, H. On immunological memory. *Annu Rev Immunol* 14 (1996) 333-367.

7. DANKVERMERK

Ich möchte danken allen Mitarbeitern des Busch-Labors sowie Wolfgang Reindl für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft. Besonders danken möchte ich Dirk Busch für die gute Betreuung und Hermann Wagner für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Ohne die Unterstützung meiner Familie, vor allem meiner Mutter, die Hilfsbereitschaft meiner Kommilitonen und das Verständnis von Martin wäre mancher Versuch nicht möglich gewesen. Deswegen gilt ihnen mein besonderer Dank.

8. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name Verena Julia Busch
Adresse Ludwig-Merk-Str. 12
D-80805 München
Geburtsdatum 02.01.1978
Geburtsort München

Ausbildung

1984-88 Grundschole in München
1989-97 Humanistisches Maximiliansgymnasium in München
1997 Abitur in den Leistungskursen Griechisch und Biologie,
den Grundkursen Mathematik und Religion,
Abiturnote 1,0
Facharbeit im Leistungskurs Biologie zu dem Thema
"Zellinteraktionen in der Immunbiologie"

Auszeichnungen: Max-Planck-Preis des Maximiliansgymnasiums für
Geisteswissenschaften
Karl-von-Frisch-Preis für Biologie

Stipendium: Hochbegabtenstipendium des Freistaats Bayern für die Dauer des
gesamten Studiums, erfolgreiche Ablegung aller
Stipendiumsprüfungen von Abitur bis Studiumsende
Unterstützung des Aufenthaltes an der „Yale School of
Medicine“, USA, im Rahmen des Praktischen Jahres

1998-2004 Studium der Humanmedizin

1998-2000 Vorklinisches Studium an der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Herbst 2000 Ärztliche Vorprüfung
Gesamtnote 2,0 (schriftlich 2,0; mündlich 2,0)

seit 2000	Fortsetzung des Studiums an der Technischen Universität München
Herbst 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote 2,0
Frühjahr 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote 1,6 (schriftlich 2,0; mündlich 1,0)
Herbst 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote 1,0
Herbst 2004	Ärztliche Prüfung Gesamtnote sehr gut (1,49) und Approbation als Ärztin

Promotion

2001-2003 am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München zu dem Thema „Charakterisierung von Memory T-Zellen bei ihrem Übergang von der Effektor- in die Post-Effektorphase“ unter der Leitung von Prof. Dr. med. D.H. Busch

Kongresse

15. Europäischer Immunologie Kongress (EFIS) im Juni 2003

Poster und Vortrag zu dem Thema „Differences in long-term maintenance of CD8⁺ and CD4⁺ bacteria-specific memory T cells“

31. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie in Erlangen im Frühjahr 2005

Poster zu dem Thema „A severe case of Aicardi Syndrome with triple X“

101. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin in Bremen Herbst 2005

Poster zu dem Thema „Subcutane Mikrodialyse - Eine nebenwirkung sarme minimalinvasive Methode für ein biochemisches Gewebsmonitoring bei Mitochondriopathien“

Publikationen

„Differences in maintenance of CD8⁺ and CD4⁺ bacteria-specific effector-memory T cell populations“, Schiemann M, Busch V et al., Eur J Immunol. 2003 Oct;33(10):2875-85

„Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8⁺ memory T cell subsets“, Huster KM, Busch V et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Apr 13;101(15):5610-5. Epub 2004 Mar 25

„Treatment of glycogenosis type V with ketogenic diet“, Busch V et al. Ann Neurol. 2005 Aug;58(2):341.

„Subcutaneous microdialysis for children- Safe biochemical tissue monitoring based on a minimal traumatizing no touch insertion technique.“, Hack A, Busch V et al. Eur J Med Res. 2005 Oct 18;10(10):419-25.

„Cloning and gene structure of the rod cGMP phosphodiesterase delta subunit gene (PDED) in man and mouse“, Lorenz B. et al., Eur J Hum Genet. 1998 May-Jun;6(3):283-90, (Mitarbeit als Praktikantin in der Abteilung Medizinische Genetik an der Kinderpoliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München)

Buchbeitrag

Baumeister F.A.M., Busch V. et al.

„Biochemisches Therapie-Monitoring bei Mitochondrialen Enzephalomyopathien mittels subkutaner Mikrodialyse“

In: „Aktuelle Neuropädiatrie“ 2005

Herausgeber R. Trollmann

Novartis Verlag, Nürnberg, S

Forschungspraktika

September 1997

Abteilung für Medizinische Genetik an der Kinderpoliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Dr. med. Dipl. Biol. T. Meitinger und Prof. Dr. J. Murken

März 1999 Adolf-Butenand-Institut für Physiologische Chemie, Molekularbiologie, Stoffwechselbiochemie und Zellbiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Prof. Dr. M. Brunner und Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Famulaturen

August 2000 Abteilung Innere Medizin des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München (Schwerpunkt Gastroenterologie, Hepatologie, Endokrinologie, Stoffwechsel)

September 2000 Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikums „L'Archet II“ der Universität Nizza in Frankreich (Schwerpunkt Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin)

September 2001 Chirurgische Ambulanz und Nothilfe des Krankenhauses München-Bogenhausen der Technischen Universität München

September/Oktober 2001 Institut für Röntgendiagnostik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München

März 2002 Praxis für Neurologie und Psychiatrie bei Prof. Dr. Dr. C. Franke in München

September/Oktober 2002 „The Walton Centre of Neurology and Neurosurgery, NHS Trust“ in Liverpool, England, unter der Leitung von Dr. U. C. Wiesmann

Praktisches Jahr

Oktober-Dezember 2003 “Department of Neurosurgery of the Royal Melbourne Hospital and the Royal Children’s Hospital” in Melbourne, Australien, unter der Leitung von Professor A. H. Kaye

Dezember 2003-Februar 2004 „Department of Cardiothoracic Surgery of the Royal Prince Alfred Hospital“ in Sydney, Australien, unter der Leitung von Professor C. F. Hughes AO

Februar-April 2004	Kinderklinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, Kinderklinik Schwabing unter der Leitung von PD Dr. F.A.M. Baumeister
April-Juni 2004	„Yale University Schoool of Medicine, Yale-New Haven Hospital“, USA, in den Abteilungen für Pädiatrische Kardiologie unter der Leitung von G.A. Porter M.D. Ph.D. und J. Fahey M.D. und Pädiatrische Neurologie unter der Leitung von M. Engel M.D., Professor L.R. Ment M.D. und Professor B.A. Shaywitz M.D.
Juni-September 2004	III. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, Abteilung für Hämatologie und Onkologie

Facharztausbildung

seit Ende 2004	Ausbildung zur Neuropädiaterin an der Kinderklinik der Technischen Universität München, Kinderklinik München Schwabing
seit Ende 2004	Ausbildung zum Erwerb des EEG-Zertifikats der Deutschen Gesellschaft für Klinische Neurophysiologie
seit April 2005	Juniormitglied der Gesellschaft für Neuropädiatrie

Sprachkurse und Sprachstudien im Ausland

Oktober-Dezember 1997	"Cours intensif de langue française" an der "Université Stendhal Grenoble III" in Grenoble, Frankreich
Januar 1998	Fortsetzung am "Eurocentre Paris", Frankreich
Februar-April 1998	"Cours de Civilisation Française de la Sorbonne (Conférences)" und "Cours d'expression écrite" niveau supérieur in Paris, Frankreich
Sommersemester 2000	"Cours de Conversation“ am Institut Français in München
Wintersemester 2001	„Medical English“ an der Technischen Universität München