

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele**

**Dynamische Veränderungen der Homing-Rezeptor-Expression humaner T-Zellen
im peripheren Blut**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Stefan Herz
aus Herrenberg**

Würzburg, September 2012

Referent: Prof. Dr. Hermann Einsele

Koreferent: Prof. Dr. Matthias Eyrich

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.03.2014

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1. Einführung	1
1.1. Bedeutung von Homing-Rezeptoren bei der T-Zell-Migration.....	1
1.2. Stammzelltransplantation und Graft-versus-Host Disease.....	3
1.3. Fragestellung und Zielsetzung.....	4
1.4. Die Rolle von T-Zell-Oberflächenmarkern in Immunprozessen und aGVHD..	6
1.4.1. Marker zur Subdifferenzierung von Lymphozytenpopulationen	6
1.4.2. Selektine.....	6
1.4.3. Integrine.....	7
1.4.4. Chemokine	8
1.4.5. Aktivierungsmarker.....	11
1.4.6. Leukotriene.....	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Material und Probanden.....	13
2.1.1. Zellen	13
2.1.2. Probanden.....	13
2.1.3. Material zur Blutentnahme.....	13
2.1.4. Material für Zellkultur und Analysen	14
2.1.5. Chemikalien, Medien, Puffer und Zusätze	14
2.1.6. Monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	15
2.1.7. T-Zell-Stimulanzen.....	16
2.1.8. Apparate und Geräte.....	17
2.1.9. Software	18
2.2. Einsatz etablierter Methoden.....	18
2.2.1. Blutentnahme	18
2.2.2. Blutbild	18
2.2.3. Aufreinigung des Spenderbluts und Bestimmung der Zellzahl	18
2.2.4. Konservierung von Blutkomponenten	20
2.2.5. Antikörperkonjugation	21
2.2.6. Durchflusszytometrie.....	21
2.3. Bestimmung der Expression von T-Zell-Oberflächenmarkern.....	22
2.3.1. Studiendesign	22
2.3.2. Gesundheitsstatus der Probanden	23
2.3.3. Experimenteller Aufbau	24
2.3.4. Antikörper-Titration.....	28
2.3.5. Fluoreszenz markierte Partikel	28
2.3.6. Positiv-Kontrollen.....	29
2.3.7. Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten	32
3. Ergebnisse	34
3.1. Positiv-Kontrollen	34
3.1.1. Notwendigkeit stimulierter T-Zellen als Positiv-Kontrollen	34
3.1.2. Anti-CD3 / anti-CD28 Stimulation.....	35

3.2. Messstabilität des Durchflusszytometers	38
3.3. Ergebnisse der Homing-Rezeptor-Expression.....	39
4. Diskussion	56
4.1. Bedeutung von Positiv-Kontrollen.....	56
4.2. Messstabilität des Durchflusszytometers	57
4.3. Interpretation und Vergleich der Ergebnisse mit publizierten Studien	58
4.4. Zur Methode.....	72
4.5. Ausblick.....	75
5. Zusammenfassung	77
6. Abstract	78
7. Literaturverzeichnis.....	79
8. Anhang	87

Danksagung

Lebenslauf

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Messung der Homing-Rezeptor-Expression humaner T-Zellen im peripheren Blut	23
Abbildung 2: Schema der 96-Well-Platten für die Messreihe.....	24
Abbildung 3: Titration eines Antikörpers.....	28
Abbildung 4: Prinzip der gemischten Leukozytenreaktion	31
Abbildung 5: Muster einer Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten	33
Abbildung 6: Bildung von Proliferationsknoten nach drei Tagen Stimulation von PBMCs mit anti-CD3 und anti-CD28	36
Abbildung 7: Expression von CD25, CD69, Integrin α 4 und α E auf zytotoxischen T-Zellen ohne bzw. mit Stimulation durch anti-CD3 / anti-CD28.....	36
Abbildung 8: Verlauf der Fluoreszenz Intensität über den Messzeitraum	38
Abbildung 9: Expression von CLA, CCR4 und CCR8 auf zytotoxischen T-Zellen.....	40
Abbildung 10: Expression von CLA, CCR4 und CCR8 auf T-Helfer-Zellen.....	41
Abbildung 11: Expression von β 7, CCR9 und α 4 auf zytotoxischen T-Zellen	42
Abbildung 12: Expression von Integrin β 7, CCR9 und α 4 auf T-Helfer-Zellen	43
Abbildung 13: Expression von CCR5, CXCR2 und CXCR3 auf zytotoxischen T-Zellen	44
Abbildung 14: Expression von CCR5, CXCR2 und CXCR3 auf T-Helfer-Zellen.....	45
Abbildung 15: Expression von CCR6 und CCR10 auf zytotoxischen T-Zellen.....	46
Abbildung 16: Expression von CCR6 und CCR10 auf T-Helfer-Zellen.....	46
Abbildung 17: Expression von CD25, CD69 und α E auf zytotoxischen T-Zellen.....	47
Abbildung 18: Expression von CD25, CD69 und α E auf T-Helfer-Zellen	48
Abbildung 19: Expression von CCR2, CD62L und CD45RA auf zytotoxischen T-Zellen	49
Abbildung 20: CCR2, CD62L und CD45RA auf T-Helfer-Zellen	50
Abbildung 21: Expression von CCR1, CXCR1 und LTB4R1 auf zytotoxischen T-Zellen	51
Abbildung 22: CCR1, CXCR1 und LTB4R1 auf T-Helfer-Zellen	52
Abbildung 23: CLA auf T-Helfer-Zellen	54
Abbildung 24: CD62L auf T-Helfer-Zellen	55
Abbildung 25: CCR1 auf T-Helfer-Zellen	55
Abbildung 26: Expression von CD25, CD69 und CCR1 auf T-Helfer-Zellen mit und ohne Stimulation mit PMA/Ionomycin	87
Abbildung 27: Expression von CCR10 auf zytotoxischen T-Zellen mit und ohne Stimulation durch Vitamin D3, IL-2 und IL-12	88
Abbildung 28: Expression von CD25 auf zytotoxischen T-Zellen mit und ohne Stimulation durch eine gemischte Leukozytenreaktion.....	89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht Antikörpercocktails.....	25
Tabelle 2: Die untersuchten Oberflächenmarker ließen sich bezüglich der Notwendigkeit von stimulierten Zellen als Positiv-Kontrollen in zwei Gruppen einteilen	34
Tabelle 3: Ergebnisse der Oberflächenmarker-Expression auf T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut.....	53
Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse mit publizierten Studien.....	70

Abkürzungsverzeichnis

aGVHD	Akute Graft-versus-Host Erkrankung (Graft- versus-host disease)	HLA	Humanes Leukozytenantigen
Allo-SZT	Allogene Stammzell- transplantation	IL	Interleukin
APC	Allophycocyanin	MACS	Magnetische Zellseparation (Magnetic cell separation)
CD	Differenzierungsmarker (Cluster of differentiation)	mAK	Monoklonaler Antikörper
Cy7	Cyanine dye 7	MHC	Haupt- histokompatibilitäts- komplex (Major histocompatibility complex)
CCR	Chemokin-Rezeptor	PBMC	Periphere mononukleäre Blutzelle (Peripheral blood mononuclear cell)
CLA	Cutaneous lymphocyte antigen	PBS	Phosphate buffered saline
DMSO	Dimethylsulfoxid	PCR	Polymerase Kettenreaktion
EDTA	Ethylendiamintetra- essigsäure	PE	Phycoerythrin
FACS	Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung	PerCP	Peridinin-Chlorophyll a
FBS	Rinderserumalbumin (Fetal bovine serum)	PI	Propidiumiodid
FISH	Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung	PMA	Phorbol Myristinsäure
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat	PMT	Photomultiplier tube
FSC	Vorwärtsstreulicht (Forward scatter)	PP	Polypropylen
GIT	Gastrointestinaltrakt	SSC	Seitwärtsstreulicht (Sideward scatter)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor	TCR	T-Zell-Rezeptor
HEV	Hochendotheliale Venole		

1. Einführung

1.1. Bedeutung von Homing-Rezeptoren bei der T-Zell-Migration

T-Lymphozyten stehen im Zentrum der meisten Immunantworten des adaptiven Immunsystems (von Andrian und Mackay, 2000). Naive T-Zellen, die noch keinen Kontakt mit dem für ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) spezifischen Antigen hatten, zirkulieren beständig zwischen den sekundär lymphatischen Organen, etwa den Lymphknoten sowie den Lymphgefäßen und der Blutbahn.

Die Rückkehr, das sogenannte Homing, der T-Lymphozyten in die sekundär lymphatischen Organe erfolgt über die hochendothelialen Venolen (HEV) und erfordert die Expression von Adhäsionsmolekülen (Butcher und Picker, 1996). In den sekundär lymphatischen Organen treten die T-Lymphozyten in Kontakt mit antigen-präsentierenden dendritischen Zellen aus entzündeten peripheren Geweben. Diese stimulieren antigen-spezifische T-Zellen und regen sie zur klonalen Expansion und zur Differenzierung zu Effektor-T-Zellen an. Diese Effektor-T-Zellen verändern nun die Expression bestimmter Oberflächenproteine. Mit Hilfe dieser sogenannten Homing-Rezeptoren können T-Lymphozyten zuerst aus den sekundär lymphatischen Organen in die Blutbahn eintreten und dann in entzündete periphere Gewebe einwandern (von Andrian und Mackay, 2000). Hier werden ihnen durch betroffene Gewebezellen die Antigene in Form von Peptiden im Kontext des sog. major histocompatibility complex (MHC) präsentiert (Porcelli und Modlin, 1999). Die Effektor-T-Zellen können nun auf präsentierte Pathogene reagieren und mit weiteren Abwehrzellen, wie etwa Makrophagen oder Granulozyten interagieren.

Die an der Migration von T-Lymphozyten beteiligten Homing-Rezeptoren lassen sich dabei in vier Klassen mit unterschiedlichen Funktionen untergliedern:

- Integrine,
- Selektine,
- Chemokin Rezeptoren,
- Leukotrien Rezeptoren.

Um die Blutbahn zu verlassen, durchlaufen T-Lymphozyten eine Reihe verschiedener Schritte (von Andrian und Mackay, 2000, Luster et al., 2005). Die im

Folgenden beschriebenen Schritte sind für das Homing von Lymphozyten in die sekundär lymphatischen Organe mit Ausnahme der Milz sowie für die Rekrutierung von Lymphozyten in entzündete Gewebe nötig.

In einem ersten Schritt greifen konstitutiv exprimierte Adhäsionsrezeptoren auf den Endothelzellen der Blutgefäße in peripheren Geweben die Zellen aus dem Blutstrom auf. Diese erste unbeständige Anhaftung der Zellen an der Gefäßwand wird durch Selektine, die auf schnellen Zugriff und hohe Zugfestigkeit spezialisiert sind, vermittelt. Die Unbeständigkeit dieser Bindung führt dazu, dass die T-Lymphozyten mit dem Blutstrom langsam an der Gefäßwand entlang rollen. Um sich an der Gefäßwand festsetzen zu können, müssen die Lymphozyten im nächsten Schritt sekundäre Adhäsionsmoleküle ausbilden (Lawrence und Springer, 1991). Diese Adhäsionsmoleküle, die alle der Gruppe der Integrine, wie etwa $\alpha 4 / \beta 7$, entstammen, werden chemotaktisch durch Chemokine und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert (von Andrian und Mackay, 2000) und sorgen für einen festen Halt der Zellen am Endothel der Gefäßwand.

Die Gruppe der Chemokin-Rezeptoren spielt in einem weiteren Schritt eine entscheidende Rolle bei der Rekrutierung von Leukozyten in entzündete Gewebe. Chemokin-Rezeptoren sind Oberflächenproteine, welche die Bindung von Chemokinen über G-Proteine an die Zelle melden. Fast jede Zelle kann Chemokine produzieren wenn sie durch Lipopolysaccharide oder inflammatorische Zytokine stimuliert wurde (von Andrian und Mackay, 2000). Je nach ihrer immunologischen Funktion können T-Lymphozyten die Expression ihrer Chemokin-Rezeptoren und damit die Empfänglichkeit für diese Signale hoch- oder herunterregulieren. Chemokine haben unterschiedliche Funktionen, wie etwa das Vermitteln der intravasalen Adhäsion oder die Migration der T-Lymphozyten durch den Extrazellulärraum. Das Expressionsmuster der Chemokin-Rezeptoren bzw. die Verteilung und Art der Chemokine in Geweben beeinflusst die Immunantwort entscheidend (von Andrian und Mackay, 2000).

Die Gruppe der Leukotrien-Rezeptoren binden Leukotriene, die potente Lockstoffe bei der nicht chemokin-assoziierten Migration von zytotoxischen T-Zellen in entzündete Gewebe darstellen (Goodarzi et al., 2003). Bestimmte Leukotrien-Signalwege sind außerdem an der Verbindung der frühen Phase der Aktivierung des Immunsystems mit

dem Beginn der Rekrutierung von Effektor-T-Zellen beteiligt (Goodarzi et al., 2003, Tager et al., 2003).

1.2. Stammzelltransplantation und Graft-versus-Host Disease

Die allogene Stammzelltransplantation (allo-SZT) ist eine wichtige Behandlungsmethode in der Therapie vieler maligner und nicht-maligner hämatologischer Erkrankungen (Horowitz et al., 1990, Kersey et al., 1987, Weiden et al., 1979), wie etwa akute lymphatische Leukämie oder schwere aplastische Anämie. Bei einigen Erkrankungen, wie etwa der chronisch lymphatischen Leukämie, stellt sie derzeit die einzig kurative Therapieoption dar. Bei circa 2500 Patienten pro Jahr wird in Deutschland die Indikation zu einer allo-SZT gestellt, meist aufgrund eines hämatologischen Malignoms (Siegmond-Schultze, 2009).

Bei einer allo-SZT werden dem Patienten Blutstammzellen eines gesunden Spenders übertragen. Dies erfolgt nach weitgehender Zerstörung des Immunsystems des Empfängers zum Beispiel durch eine Radio-Chemotherapie. Die Transplantation der Blutstammzellen führt zu einer Neukonstitution des Immunsystems des Empfängers.

Neue Ansätze der allo-SZT, wie nicht-myeloablative Konditionierung und die Verwendung von Spenderzellen aus dem peripheren Blut, haben zu einer schnelleren Ansiedlung der Spenderzellen und einer Reduktion der Morbidität und Mortalität geführt. Dies erlaubte eine Erweiterung des Einsatzspektrums auf ältere Patienten sowie Patienten mit nicht-hämatologischen Erkrankungen (Champlin et al., 2000, Champlin et al., 1999).

Trotz dieser Fortschritte sind opportunistische Infektionen (z.B. invasive Aspergillose, Cytomegalie-Virus-Infektionen) und die sogenannte akute Graft-versus-Host Disease (aGVHD) weiterhin die Hauptlimitation dieser Behandlungsmethode (Ferrara et al., 2009, Einsele et al., 2008, Beilhack et al., 2005). Bei einer aGVHD erkennen die T-Zellen des Spenders das Gewebe des Empfängers als fremd und verursachen eine Abstoßungsreaktion (Beilhack et al., 2005). Dies kann durch eine möglichst hohe serologische und molekulare Übereinstimmung des humanen Leukozytenantigen-Systems (HLA) von Spender und Empfänger reduziert werden. Trotz molekularem Abgleich tritt die aGVHD nach einer allo-SZT in über 30 – 50% der

Patienten auf. Bei unverwandten Spendern oder fehlender HLA-Übereinstimmung liegt dieser Wert noch höher (Przepiorka et al., 1999, Kollman et al., 2001).

Eine aGVHD lässt sich therapeutisch nur schwer beeinflussen und ist mit einer hohen Letalität verbunden. Derzeit ist es noch ungeklärt warum einige Patienten eine aGVHD entwickeln und andere nicht. Um den potenziell tödlichen Folgen einer aGVHD vorzubeugen, werden daher alle allo-SZT-Patienten immunsupprimiert. Dies erhöht jedoch das Risiko der Patienten an einer opportunistischen Infektion zu erkranken und zu versterben.

Die klinische Manifestation einer aGVHD betrifft vor allem die Zielorgane Haut, Leber und den Gastrointestinaltrakt (Beilhack et al., 2005, Ferrara und Deeg, 1991). Eine Theorie dieser Organ-Selektivität ist es, dass alloreaktive Effektor-T-Zellen während der Initiationsphase einer aGVHD in lymphatischen Organen instruiert werden, in diese Zielorgane einzuwandern (Guy-Grand et al., 1978, Mora et al., 2003, Agace, 2006, Stenstad et al., 2006). Alloreaktive T-Zellen sind bereits vor der klinischen Manifestation einer aGVHD in den Zielorganen nachweisbar (Beilhack et al., 2005). Die therapeutische Intervention nach dem Erkennen einer aGVHD beginnt beim heutigen Behandlungsstandard also zu einem Zeitpunkt, an dem bereits ein Großteil dieser Immunreaktion abgelaufen ist.

1.3. Fragestellung und Zielsetzung

Die akute Graft-versus-Host Disease (aGVHD) und opportunistische Infektionen, wie etwa eine Zytomegalievirus-Infektion, sind die Hauptrisiken der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation (allo-SZT). In Mausmodellen wurde gezeigt, dass die Pathogenese der aGVHD ein streng zeitlich regulierter und organspezifischer Immunprozess ist (Beilhack et al., 2005). Es wurde gezeigt, dass eine aGVHD ausschließlich in der T-Zell-Region von sekundär lymphatischen Organen in den ersten drei Tagen nach allo-SZT beginnt (Beilhack et al., 2008, Panoskaltis-Mortari et al., 2004).

Alloreaktive T-Zellen müssen bestimmte Homing-Rezeptoren exprimieren, um die Zielorgane der aGVHD (Gastrointestinaltrakt, Leber und Haut) zu erreichen. Die Immunreaktion auf eine Infektion setzt ebenfalls voraus, dass in der adaptiven

Immunantwort T-Zellen organ- und entzündungsspezifische Homing-Rezeptoren exprimieren. Daraus lässt sich folgern, dass bestimmte Homing-Rezeptoren auf T-Zellen im peripheren Blut als potenzielle Marker zur Vorhersage und Differenzierung zwischen aGVHD und einer Infektionskomplikation dienen könnten. Dieses Projekt soll dazu beitragen eine effiziente und zuverlässige Methode zu etablieren, mit der man eine drohende aGVHD vorhersagen und von einer Infektionskomplikation unterscheiden kann.

Für einen prospektiven klinischen Test mit allo-SZT Patienten ist es wichtig, die physiologische Bandbreite der Oberflächenmarker auf T-Lymphozyten in Gesunden zu kennen, um diese von pathophysiologischen Veränderungen unterscheiden zu können. Ziel des Projektes war es daher, eine effiziente und zuverlässige Methode zu finden, mit der man das Homing-Rezeptor-Profil von humanen T-Zellen im peripheren Blut analysieren kann. Mit diesem Test wurde das Expressionsprofil bestimmter Homing-Rezeptoren auf T-Zellen von gesunden Spendern untersucht. Die gewonnenen Daten dienen als Grundlage für Studien an allo-SZT-Patienten. Dazu wurde ein Durchflusszytometrie-Test etabliert, mit dem das Expressionsprofil bestimmter Oberflächenmarker (Aktivierungsmarker und organ- bzw. entzündungsspezifische Homing-Rezeptoren) auf T-Zell-Subpopulationen gemessen werden kann. In den Test wurden 25 Oberflächenmarker inkludiert, die potenziell eine Rolle in der Pathogenese der aGVHD und bei Infektionen spielen (siehe Kapitel 1.4). Auch in Gesunden finden beständig subklinisch verlaufende Kontakte mit Pathogenen statt. Für einen prospektiven klinischen Test mit allo-SZT Patienten ist es daher grundlegend, die physiologische Bandbreite der Oberflächenmarker auf T-Lymphozyten in Gesunden zu kennen, um diese von pathophysiologischen Veränderungen zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurde die Expression der Oberflächenmarker von 21 gesunden Probanden an 8 Zeitpunkten über einen Zeitraum von 3 Wochen analysiert.

Dieses Projekt soll dazu beitragen, eine effiziente und zuverlässige Methode zu finden, mit der man eine aGVHD vorhersagen und von einer Infektionskomplikation unterscheiden kann.

1.4. Die Rolle von T-Zell-Oberflächenmarkern in Immunprozessen und aGVHD

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten T-Zell-Oberflächenmarker (Aktivierungsmarker und organ- bzw. entzündungsspezifische Homing-Rezeptoren) bezüglich ihrer Bedeutung und Funktion in Immunprozessen und bei einer aGVHD kurz vorgestellt.

1.4.1. Marker zur Subdifferenzierung von Lymphozytenpopulationen

CD3 / CD4 / CD8

CD3 ist ein Protein-Komplex aus vier Polypeptidketten. Er ist nicht-kovalent mit dem T-Zell-Rezeptor (TCR) verbunden. Wenn der TCR ein Antigen erkennt, wird das Signal u.a. über CD3 transduziert. Dies führt zu einer Aktivierung des T-Lymphozyten. Antikörper gegen CD3 binden i.d.R. die sog. Epsilon-Kette. Sie können T-Zellen unabhängig von ihrer Antigen-Spezifität stimulieren. Im Gegensatz dazu stimuliert und aktiviert ein Antigen nur Antigen-spezifische T-Zellen.

CD4 und CD8 sind Oberflächen-Proteine die an der Signalübertragung durch den TCR-CD3-Komplex während der T-Zell-Aktivierung beteiligt sind. CD4 bindet dabei selektiv an MHC Klasse II Moleküle, während CD8 MHC Klasse I Moleküle bindet. CD3, CD4 und CD8 können zur Differenzierung von T-Lymphozyten verwendet werden. T-Zellen lassen sich dabei in zytotoxische CD3+CD8+ und CD3+CD4+ T-Helfer-Zellen unterteilen.

1.4.2. Selektine

L-Selektin (CD62L)

CD62L ist ein Homing-Rezeptor der naive T-Zellen in Lymphknoten leitet. Dieser Rezeptor vermittelt die Bindung von T-Zellen an die hochendotheliale Venolen (HEV). L-Selektin gehört zu den wichtigsten Molekülen, die das erste Anhaften und Rollen der Leukozyten an den Endothelzellen der Gefäßwand vermitteln (von Andrian und Mackay, 2000).

E-Selektin-Ligand (Cutaneous lymphocyte antigen, CLA)

Zirkulierende T-Zellen die auf den Eintritt in Haut-Gewebe spezialisiert sind, charakterisieren sich durch die Expression von E-Selektin-Ligand (CLA). Über die Expression von E-Selektin auf Endothelzellen können Lymphozyten aus dem Blutstrom abgefangen werden. Die Hauptfunktion von CLA besteht aber darin, die Geschwindigkeit des Rollens der Lymphozyten an der Gefäßwand zu bremsen (von Andrian und Mackay, 2000).

1.4.3. Integrine

Integrin $\beta 7$

Das effiziente Homing und die Aufrechterhaltung der Präsenz von T-Lymphozyten in Darm-Geweben wird vor allem durch die Expression von den $\beta 7$ enthaltenden Rezeptor-Heterodimeren $\alpha 4 / \beta 7$ und $\alpha E / \beta 7$ vermittelt (Berlin et al., 1993, Cepek et al., 1994, Salmi und Jalkanen, 2005).

Integrin $\alpha 4$

Die Hauptfunktion von Integrin $\alpha 4$ besteht darin, die Geschwindigkeit des Rollens an der Gefäßwand zu bremsen (von Andrian und Mackay, 2000). $\alpha 4$ Integrine können ebenfalls das erste Anhaften und Rollen der Leukozyten vermitteln, sind aber darin weniger effizient als Selektine (Berlin et al., 1995). Gastrointestinaltrakt (GIT) assoziierte Lymphozyten exprimieren den als Heterodimer auftretenden MAdCAM-1 Liganden $\alpha 4 / \beta 7$.

Integrin αE (CD103)

Integrin αE spielt eine Rolle beim Homing von T-Zellen in Darmgewebe (Cepek et al., 1994, Salmi und Jalkanen, 2005). Intraepitheliale intestinale Lymphozyten exprimieren zu >95% das Integrin $\alpha E / \beta 7$. Daher wird angenommen, dass es das Verweilen der Lymphozyten im Epithel vermittelt (Cepek et al., 1993). CD103 auf zytotoxischen T-Zellen ist außerdem mit verantwortlich für die intestinale Manifestation einer aGVHD (Zhou et al., 2008).

1.4.4. Chemokine

Chemokine sind Proteine die vor allem als chemotaktische Zytokine für Leukozyten dienen (Moser et al., 2004). Weitere Funktionen bestehen in der Angiogenese (Belperio et al., 2000), Hämatopoese (Youn et al., 2000) und der Aktivierung von Immunzellen (Luther und Cyster, 2001). Die Familie der Chemokine wird nach der Anzahl und Position von NH₂-terminalen Cysteinresten (C) untergliedert. Man unterscheidet hierbei die vier Untergruppen CC, CXC, XC sowie CX₃C. Der Name der Chemokine-Rezeptoren setzt sich aus der entsprechenden Chemokine-Familie sowie einem „R“ für Rezeptor zusammen.

CCR1

In Mausmodellen wird CCR1 frühzeitig nach einer allo-SZT auf Leukozyten des Spenders hochreguliert und ist an der Leukozytenmigration in Zielorgane der GVHD beteiligt. Weiterhin wurde gezeigt, dass CCR1 die alloreaktive Immunantwort sowohl *in vivo* als auch *in vitro* direkt beeinflusst (Choi et al., 2007).

CCR2

CCR2 ist wichtig für die Migration von alloreaktiven CD8⁺ T-Zellen in Darm und Leber sowie die Induktion einer GVHD. Interessanterweise wird der Graft-versus-Tumor-Effekt durch eine Blockade von CCR2 mit einem Antikörper nicht beeinträchtigt (Terwey et al., 2005). CCR2 könnte daher bei der Prävention und Therapie der GVHD eine potentielle Rolle spielen (Proudfoot, 2002, Gerard und Rollins, 2001). Weiterhin spielt CCR2 eine Rolle bei der adaptiven T-Zell-Antwort während respiratorischer Infektionen, etwa durch Influenza-Viren und zahlreiche mikrobielle Pathogene (Pamer, 2009). Die Migration von T-Zellen in die Lunge ist jedoch CCR2-unabhängig (Peters et al., 2004).

CCR4

Bei der Rezirkulation von T-Zellen in die Haut spielt CCR4 eine zentrale Rolle (Campbell et al., 1999). CCR4 ist ein vaskuläres Adressin von dem angenommen wird, dass es an der selektiven Migration von T-Zellen in die Haut beteiligt ist (Kupper und Fuhlbrigge, 2004).

CCR5

Die genaue Funktion von CCR5 ist noch nicht abschließend geklärt. CCR5 wird von Lymphozyten in Darmgeweben exprimiert und wird daher als Mukosa-spezifischer Rezeptor bezeichnet (Agace et al., 2000, Mackay, 1999). Es wurde jedoch auch über CCR5 Expression auf Lymphozyten des Gehirns von Patienten mit Multipler Sklerose (Sorensen et al., 1999), der Leber (Shields et al., 1999) und synoviale Lymphozyten bei Arthritis-Patienten (Suzuki et al., 1999) berichtet. In Maus-Modellen sind CCR5-positive T-Zellen mit verantwortlich für die Schädigung der Leber während einer aGVHD (Murai et al., 1999).

CCR6

Der Chemokin-Rezeptor CCR6 ist ein vaskuläres Adressin, von dem eine Beteiligung an der selektiven Migration von T-Zellen in die Haut angenommen wird (Kupper und Fuhlbrigge, 2004).

CCR7

CCR7 lenkt Zellen zu lymphatischen Organen und vermittelt die Bewegung innerhalb dieser Organe. Dieser Rezeptor ist in die Organisation der Architektur und Funktion des Thymus involviert und ist entscheidend am Homing von naiven und regulatorischen T-Zellen in die Lymphknoten über hochendotheliale Venolen (HEV) beteiligt (Forster et al., 2008, Sallusto und Mackay, 2004).

CCR8

Dem Chemokin-Rezeptor CCR8 wird eine Rolle im Homing von Lymphozyten in die Haut zugestanden. Die Bedeutung von CCR8 wird allerdings kontrovers diskutiert. Die Meinungen liegen zwischen einer potentiellen Beteiligung am Homing im Schatten von CLA und CCR4 auf der einen und einer zentralen Bedeutung bei der Kontrolle der T-Zell-Migration in die Haut im Steady-State des Immunsystems auf der anderen Seite (Schaerli et al., 2006, Clark et al., 2006).

CCR9

Der Chemokin-Rezeptor CCR9 wird von fast allen T-Lymphozyten, die den Dünndarm infiltrieren, exprimiert. Dagegen ist CCR9 auf T-Lymphozyten in Haut, Leber, Synovium, Lunge nicht nachweisbar und im Kolon nur geringfügig exprimiert. Dies deutet auf eine weitere Subdifferenzierung in Dün- und Dickdarm-spezifische Homing-Rezeptoren bei der Migration von Lymphozyten in den Gastrointestinaltrakt hin (Kunkel et al., 2000).

CCR10

CCR10 ist als vaskuläres Adressin beschrieben, das an der selektiven Migration von T-Zellen in die Haut beteiligt ist (Kupper und Fuhlbrigge, 2004). Dieser Chemokin-Rezeptor ist assoziiert mit dem Homing von T-Zell-Subpopulationen in die Haut während der Immunüberwachung und entzündlichen Prozessen (Hudak et al., 2002).

CXCR1

Das Chemokin IL-8 wird ausschließlich von CXCR1 gebunden. CXCR1 ist als Homodimer oder als Heterodimer mit CXCR2 exprimiert und kann u.a. auf Granulozyten, Monozyten und einer kleinen Subpopulation von T-Zellen nachgewiesen werden (Holmes et al., 1991). Die Bedeutung von CXCR1 für die Leukozytenmigration ist noch nicht abschließend geklärt. Es gibt aber Hinweise, dass CXCR1 bei der Rekrutierung von zytotoxischen T-Zellen eine Rolle spielen könnte. Auf T-Helfer-Zellen ist CXCR1 an allergischen Reaktionen insbesondere in der Lunge beteiligt (Francis et al., 2004).

CXCR2

CXCR2 ist als Homodimer oder als Heterodimer mit CXCR1 exprimiert. Im Gegensatz zu CXCR1 können neben IL-8 auch die Chemokine GRO α , β , γ , NAP-2 und ENA-78 gebunden werden (Holmes et al., 1991).

CXCR3

CXCR3 ist als Gewebe-spezifischer Rezeptor in verschiedenen Organen beschrieben. Dieser Oberflächenmarker wurde auf Lymphozyten in Darm (Agace et al., 2000),

entzündetem Hirngewebe (Sorensen et al., 1999), Leber (Shields et al., 1999), Synovia (Suzuki et al., 1999), Lunge (Grumelli et al., 2004) und Lymphknoten (Guarda et al., 2007) gefunden. Die Migration von zytotoxischen Spender-T-Zellen in Zielorgane der GVHD, wie etwa den Darm, ist in Maus-Modellen abhängig von der Expression von CXCR3. Dies trägt signifikant zur Morbidität und Mortalität einer aGVHD bei (Duffner et al., 2003).

1.4.5. Aktivierungsmarker

CD25

CD25 (IL-2-Rezeptor α) bildet in Assoziation mit CD122 (IL-2-Rezeptor β) und CD132 (IL-2-Rezeptor γ , common γ chain) den hoch-affinen IL-Rezeptor. Dieser wird auf aktivierten T- und B-Zellen exprimiert. Die hohe Expression von CD25 befähigt regulatorische T-Zellen sehr effizient IL-2 aufzunehmen und charakterisiert diese durch den Phänotyp CD4+CD25+.

CD43

CD43 spielt sowohl bei der T-Zell-Adhäsion als auch bei der Modulation dieser Verbindung eine Rolle (Ostberg et al., 1998). Außerdem ist es an der Aktivierung, dem Überleben sowie der Induktion von Apoptose von T-Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen beteiligt. Nach Aktivierung von T-Lymphozyten wird die Expression von CD43 rasch durch Proteolyse herunterreguliert (Bazil und Strominger, 1994).

CD44

CD44 wird ubiquitär exprimiert und hat einen Einfluss auf Wachstum und Migration von T-Zellen (Screaton et al., 1992, Lynch, 2004, Ponta et al., 2003). Bestimmte Unterformen von CD44 sind mit T-Zell-Aktivierung und der Aggressivität von Tumoren assoziiert (Lynch, 2004, Ponta et al., 2003). Über die Oberflächenrezeptoren CD44 und L-Selektin (CD62L) lassen sich die T-Zellen nach ihrem Differenzierungsgrad in naive T-Zellen, Effektor T-Gedächtniszellen und zentrale T-Gedächtniszellen unterscheiden (Sallusto et al., 1999).

CD45

Die meisten naiven T-Zellen exprimieren den Isotyp CD45RA. Aktivierte T-Zellen und T-Gedächtniszellen exprimieren dagegen den Isotyp CD45RO. Auf T-Lymphozyten erfüllt CD45 komplexe sowohl aktivierende als auch hemmende Funktionen (Pawlik et al., 1997).

CD69

Nach einer Aktivierung von Lymphozyten wird frühzeitig der Oberflächenmarker CD69 exprimiert. Während er auf ruhenden Lymphozyten nicht nachweisbar ist, wird er von aktivierten Zellen selektiv exprimiert. Frühere *in vitro* Daten deuteten eine proinflammatorische Funktion an. Aktuelle *in vivo* Daten liefern jedoch Hinweise auf eine modulierende Funktion auf die Entzündungsreaktion (Sancho et al., 2005).

1.4.6. Leukotriene

LTB₄R1 (BLT1)

Leukotrien B₄ ist ein potentes Chemoattractant (Lockstoff) bei der nicht chemokin-assoziierten Migration von zytotoxischen T-Zellen über den Leukotrien B₄ Rezeptor (BLT1) in entzündeten Geweben (Goodarzi et al., 2003). Bestimmte Leukotrien-Signalwege sind an der Verbindung der frühen Phase der Aktivierung des Immunsystems mit dem Beginn der Rekrutierung von Effektor-T-Zellen beteiligt (Goodarzi et al., 2003, Tager et al., 2003). Der exakte Phänotyp und die Funktion von humanen BLT1-positiven T-Zellen sowie die Bedeutung des LTB₄-BLT1 Signalweges bei der Migration von Zellen der adaptiven Immunantwort sind jedoch noch ungeklärt (Islam et al., 2006).

2. Material und Methoden

2.1. Material und Probanden

2.1.1. Zellen

Zur Messung der Expression von Oberflächenmarkern auf humanen T-Zellen wurden PBMCs aus dem peripheren Blut von gesunden freiwilligen Spendern aufgereinigt.

2.1.2. Probanden

Für die Studie wurden 22 Blutspender (11 weiblich, 11 männlich, Altersdurchschnitt 24,9 Jahre, Range 21 – 30 Jahre) rekrutiert. Der Gesundheitszustand der Probanden wurde im Rahmen einer Eingangsuntersuchung durch Dr. med. Manik Chatterjee (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg) festgestellt und in einem Untersuchungsbogen (siehe Anhang) dokumentiert.

Ziel dieser Studie war es, die physiologische Schwankungsbreite von T-Zell-Oberflächenmarkern zu untersuchen. Die gewonnenen Daten bei gesunden Spendern sollten als Grundlage für den späteren Vergleich mit allo-SZT Patienten dienen. In dieser Studie wurde daher die Gesundheit der Probanden bezogen auf die allo-SZT Patienten definiert als nicht stammzelltransplantiert bzw. das Fehlen einer aGVHD.

Die Untersuchungen erfolgten nach Prüfung und Bewilligung der Studie durch die Ethikkommission der Universität Würzburg. Jeder Proband wurde vor Beginn der Untersuchungen mündlich und schriftlich aufgeklärt und gab sein schriftliches Einverständnis zur freiwilligen Studienteilnahme.

Ein weiblicher Proband hat die Versuchsreihe nach dem ersten Messtag aus gesundheitlichen Gründen abgebrochen.

2.1.3. Material zur Blutentnahme

Zur Blutentnahme wurden folgende Materialien verwendet.

- Cutasept F, Bode Chemie GmbH, Hamburg, DE
- Monovette EDTA 7,5 ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
- Safety-Multifly, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE

2.1.4. Material für Zellkultur und Analysen

Folgendes Material wurde für Zellkulturen und Analysen benutzt.

- Cluster Tubes 1,2 ml, Corning Incorporated Costar, USA
- CryoTube Vials 1,8 ml, NUNC, DK
- Glaspipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, Costar Stripette, Corning Inc., USA
- Multisteperspitzen, Eppendorf AG, Hamburg, DE
- Objektträger SuperFrost Plus, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, DE
- Pipettenspitzen, 10, 100 und 1000 µl, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
- Polypropylen Test Tubes 15 ml, 50 ml, Greiner Bio-One, AT
- Reagenz-Reservoir, A. Hartenstein, Würzburg, DE
- Reagiergefäß, 0,5 ml, 2 ml, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
- Tissue Culture Plate 96 well, Flat Bottom With Lid und Vee Bottom Suspension Cells, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, DE
- Zellkulturflaschen, 200 ml, Greiner Bio-One, AT

2.1.5. Chemikalien, Medien, Puffer und Zusätze

Für die Experimente wurden folgende Chemikalien, Medien, Puffer und Zusätze eingesetzt.

- Aceton, CAS # 67-64-1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
- Biocoll-Trennlösung, Biochrom AG, Berlin, DE
- Bovines Serumalbumin (BSA), Roth, Karlsruhe, DE
- Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
- Ethanol, 99,8 Vol. %, CAS # 64-17-5, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, DE
- Fetales Kälberserum (FBS), Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE
- Natriumazid, CAS # 26628-22-8, AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
- Phosphate buffered saline (PBS), DPBS (-Magnesium) (-Calcium), PAN Biotech GmbH, Aidenbach, DE
- Propidiumiodid (PI), Invitrogen Corporation, USA
- RPMI Medium 1640/ HEPES, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, DE

- Ansatz complete RPMI (cRPMI):
 - 500 ml RPMI 1640/HEPES
 - 1% Penicillin / Streptomycin (5 ml)
 - 1% L-Glutamin (5 ml)
 - 10 FBS (50 ml)
 - 50 μ M β -Mercaptoethanol
 - Sphero™ Rainbow Fluorescent Partikels, Kisker biotech, Steinfurt, DE
 - Trypanblau, CAS # 72-57-1, AppliChem GmbH, Darmstadt, DE

Die Stammlösung wurde vor Gebrauch 1 : 8 mit PBS verdünnt

2.1.6. Monoklonale Antikörper für die Durchflusszytometrie

Zur Messung der Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie wurden die aufgereinigten PBMCs mit Fluoreszenz-konjugierten anti-humanen monoklonalen Antikörpern (mAK) gefärbt. Es wurden mAKs mit den folgenden Fluoreszenzfarbstoffen verwendet: Allophycocyanin (APC), Allophycocyanin-cyanine dye 7 (APC-Cy7), Fluorescein-Isothiocyant (FITC), Phycoerythrin (PE) und Phycoerythrin-cyanine dye 7 (PE-Cy7).

Fa. BioLegend, USA:

- CD3 ϵ APC-Cy7, Klon: HIT3a
- CD8 α PE-Cy7, Klon: HIT8a
- CD25 APC, Klon: BC96
- CD43 FITC, Klon: MEM-59
- CD44 APC, Klon: IM7
- CD45RA APC, Klon: HI100
- CD49d (Integrin α 4) APC, Klon: 9F10
- CD62L FITC, Klon: DREG-56
- CD69 FITC, Klon: FN50
- CD103 (Integrin α E) PE, Klon: LF61
- CD181(CXCR1) APC, Klon: 8F1/CXCR1
- CD182(CXCR2) APC, Klon: 5E8/CXCR2

- Cutaneous lymphocyte antigen (CLA) FITC, Klon: HECA-452
- Integrin β 7 FITC, Klon: FIB504

Fa. R&D Systems GmbH, Wiesbaden, DE:

- Chemokin-Rezeptor 1 (CCR1) PE, Klon: 53504
- CCR2 PE, Klon: 48607
- CCR4 APC, Klon: 205410
- CCR5 FITC, Klon: 45523.111
- CCR6 PE, Klon: 53103
- CCR7 PE, Klon: 150503
- CCR8 purified, Klon: 191704
- CCR9 PE, Klon: 112509
- CCR10 APC, Klon: 314305
- CXCR3 PE, Klon: 49801
- Leukotriene B4 Rezeptor 1 FITC, Klon: 203/14F11

Der mAK CCR8 purified wurde mit dem Antikörper-Konjugationskit LYNX Rapid Conjugation Kit (AbD Serotec, UK) mit R-Phycoerythrin konjugiert (siehe Kapitel 2.2.5).

Fa. Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, DE

- CD4, human MicroBeads
- CD8, human MicroBeads

2.1.7. T-Zell-Stimulanzen

Zur Stimulation von T-Zellen wurden folgende Stimulanzen eingesetzt:

- $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃, CAS # 32222-06-3, Sigma-Aldrich, Inc., USA
- All-trans-Retinoic acid, CAS # 302-79-4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Anti-CD28 purified, Klon: CD28.2, BD Bioscience, USA
- Orthoclone OKT3 (Muromonab-CD3), Janssen-Cilag GmbH, Neuss, DE

- Ionomycin calcium salt *Streptomyces conglobatus*, CAS # 56092-82-1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), CAS # 16561-29-8, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, DE
- Recombinant Human IL-12, R&D Systems GmbH, Wiesbaden, DE
- Recombinant Human IL-2 (carrier free), BioLegend, USA

2.1.8. Apparate und Geräte

Folgende Apparate und Geräte wurden für die Experimente benötigt.

- 5100Cryo 1°C Freezing Container „Mr. Frosty“, Nalgene Labware, USA
- 8-Kanal-Pipette, Eppendorf, Hamburg, DE
- Blutbild-Gerät: XT-2000iV/XT-1800iV, Sysmex Corporation, JPN
- Durchflusszytometer: BD FACSCanto II, Becton Dickinson, Heidelberg, DE
- Gefrierschrank: Premium BioFresh, Liebherr GmbH, Biberach an der Riss, DE
- Inkubator: Hera cell 150, Thermo Scientific, USA
- Magnetrührer: Yellow MAG HS 7, Yellow Line, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
- Mikroskop: Eclipse TS 100, Nikon Corporation, JPN
- Multisteppler: Multipette plus, Eppendorf, Hamburg, DE
- PH-Meter, pH 211, Hanna Instruments, Kehl am Rhein, DE
- Pipetten: 2,5, 10, 100 und 1000 µl, VWR International GmbH, Darmstadt, DE
- Pipettierhilfe: Accu-Jet Pro, Brand GmbH & Co. KG, Wertheim, DE
- Präzisionswaage: Kern EW 1500-2M, Kern & Sohn GmbH, Balingen, DE
- Sicherheitswerkbank: Hera safe type KS 18, Thermo Scientific, USA
- Vortex Mixer, Neo Lab, Heidelberg, DE
- Zählkammer nach Neubauer Improved, HBG Henneberg-Sander GmbH, Giessen, DE
- Zentrifuge: Espresso Centrifuge, Thermo Electron Corporation, USA
- Zentrifuge: Heaeus Multifuge 3SR+ Centrifuge, Thermo Scientific, USA
- Zytospin-Zentrifuge: Shandon Cytospin 2, Thermo Scientific, USA

2.1.9. Software

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden folgende Software-Programme eingesetzt.

- Aufnahme der Durchflusszytometrie-Rohdaten: BD FACSDiva, Becton Dickinson, Heidelberg, DE
- Auswertung der Rohdaten: FlowJo, Version 8.8.6 für Mac, Tree Star, Inc., USA
- Statistische Auswertung: Statistica, Version 9.1, StatSoft GmbH, Hamburg, DE
- Tabellenkalkulation: Microsoft Excel, Version 12.2.5, Microsoft Corporation, Redmond, USA
- Ergebnisgraphen: GraphPad Prism, Version 5.03, GraphPad Software Inc., USA

2.2. Einsatz etablierter Methoden

2.2.1. Blutentnahme

Zur Gewinnung humaner PBMCs wurde jedem Probanden Blut entnommen. Dazu wurde nach gründlicher Hautdesinfektion die Cubitalvene des Blutspenders punktiert und jeweils drei EDTA-Röhrchen à 7,5 ml Blut abgenommen. Soweit nicht anders vermerkt, wurde das Blut und seine Komponenten zwischen den einzelnen Arbeitsschritten und bis zur Messung lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

2.2.2. Blutbild

Um die prozentualen Ergebnisse der Durchflusszytometrie auf die absolute Zellzahl pro μl Blut beziehen zu können, wurde je Proband ein großes Blutbild erstellt. Vor der weiteren Verarbeitung der Blutproben wurde daher von jedem Probandenröhrchen jeweils ein 100 μl Aliquot für die Blutbildbestimmung (XT-2000iV/XT-1800iV, Sysmex Corporation, JPN) entnommen.

2.2.3. Aufreinigung des Spenderbluts und Bestimmung der Zellzahl

Die Gewinnung humaner PBMCs aus dem Blut der Probanden erfolgte mit Hilfe einer Dichtegradientenzentrifugation. Hierfür wurde das Blut jedes Probanden über eine Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g / ml) geschichtet und mittels Zentrifugation

(30min Zentrifugation bei 2000 rpm und 4°C ohne Bremse) in die verschiedenen Bestandteile aufgetrennt. Nach der Zentrifugation befindet sich ein Pelett mit Erythrozyten und Granulozyten unter der Biocoll-Trennlösung. Oberhalb der Lösung liegt eine PBMC-reiche Schicht, die von einer Schicht aus Serum bedeckt wird. Die PBMCs wurden abpipettiert und zur Lagerung und besseren Handhabung mit PBS auf ein Gesamtvolumen von 25 ml Zellsuspension aufgefüllt.

Die Zahl der gewonnenen lebenden Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Bei der Zählkammer handelt es sich um einen Objektträger mit eingravierten Quadraten, der mit appliziertem Deckglas ein definiertes Volumen von 0,1 µl pro Quadrat aufnehmen kann. Dies ermöglicht die genaue Auszählung eines definierten Volumens und damit die Berechnung der Gesamtzahl der Zellen. Zur Unterscheidung zwischen toten und lebenden Zellen wurde Trypanblau, ein Farbstoff der nur von toten Zellen aufgenommen wird, verwendet.

Es wurden jeweils 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau (1 : 10) gemischt und nach Applikation von 10 µl der Trypanblau-Zellsuspensions-Mischung in die Neubauer-Zählkammer jeweils vier Quadranten unter dem Mikroskop ausgezählt. Tote Zellen, die sich durch das Trypanblau dunkelblau anfärbten, wurden dabei ausgeschlossen. Die Gesamtzahl n_{gesamt} der gewonnenen lebenden PBMCs ergab sich dabei als:

$$n_{\text{gesamt}} = n_{\text{gezählt}} / \text{Anzahl Quadranten} \times \text{Volumen}_{\text{gesamt}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$$

mit

Verdünnungsfaktor = 10 (Zellsuspension : Trypanblau 1 : 10)

Kammerfaktor = 1×10^4 (ausgezähltes Volumen 1 / 10^4 ml)

Für die Durchflusszytometrie wurden je Proband acht Wells à 1×10^6 Zellen eingesetzt.

Die für die Messung benötigte Zellzahl n_X ($= 8 \times 10^6$ Zellen) wurde aus der Stammlösung entnommen. Das hierfür nötige Volumen V_X wurde wie folgt berechnet:

$$V_X = n_X \times V_{\text{gesamt}} / n_{\text{gesamt}}$$

Nach Zentrifugation (5 min Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C mit Bremse) und Entfernung des Überstandes wurden die PBMCs auf das für die Messung benötigte Volumen je Well (50 μ l) mit PBS aufgefüllt.

2.2.4. Konservierung von Blutkomponenten

Um bei Bedarf retrospektive Analysen durchführen zu können, wurden verschiedene Komponenten des Spenderblutes konserviert.

Zytospins

Mit einem Teil der Spender PBMCs wurden Zytospins erstellt, um daran später u.a. FISH-Analysen durchführen zu können. Hierfür wurden 70.000 Zellen pro 200 μ l für die Zytospins eingesetzt und die Zellen in einer Zytospinzentrifuge (3 min Zentrifugation bei 1100 rpm) auf einen Objektträger zentrifugiert. Die Zytospins wurden über Nacht luftgetrocknet und am nächsten Tag mit Azeton fixiert. Dazu wurden die Zellen auf den Objektträger 7 min mit Azeton fixiert. Anschließend wurden die Objektträger aus dem Azetonbad entnommen und für 2 min an der Luft getrocknet. Im Anschluss wurden sie in PBS gewaschen. Die fixierten Zytospins wurden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Serum- und Zellkonservierung

Die nach den Versuchen übrig gebliebenen Zellen wurden tief gefroren. Um die intrazelluläre Ausbildung von Eiskristallen zu verhindern und die Zellen zu schützen, wurden sie in einer Lösung (Verhältnis 10 : 1) aus FBS und DMSO (Lovelock und Bishop, 1959) in Kryoröhrchen aufgenommen und unter Zuhilfenahme eines sog. „Mr. Frosty“ (NALGENE Labware, USA) mit -1°C / Minute in einem Gefrierschrank auf

-80°C gekühlt. Die gefrorenen Zellen können etwa für retrospektive Real-Time-PCR Analysen verwendet werden. Für eine spätere Zytokinbestimmung wurde den Blutproben nach der Zentrifugation über einen Dichtegradienten jeweils 2 ml Serum entnommen und ebenfalls mit dem Mr. Frosty auf -80°C gekühlt. Nach drei Tagen wurden die gefrorenen Zellen und das Serum in flüssigen Stickstoff umgelagert.

2.2.5. Antikörperkonjugation

Unkonjugierte Antikörper wurden mit dem Antikörper-Konjugationskit LYNX Rapid Conjugation Kit (AbD Serotec, UK) mit den benötigten Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert. Dazu wurde je 1 µl der im Konjugationskit enthaltenen „LYNX Modifier“-Substanz zu 10 µl des unkonjugierten Antikörpers hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Diese Mischung wurde nun in ein ebenfalls im Kit enthaltenes Glasfläschen mit dem lyophilisierten Fluoreszenzfarbstoff pipettiert und erneut vorsichtig gemischt. Das Glasfläschen wurde verschlossen und lichtgeschützt bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Nach der Inkubation wurde zu der Mischung je 1 µl „LYNX Quencher“-Substanz zu 10 µl des unkonjugierten Antikörpers hinzugefügt und erneut vorsichtig gemischt. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur war der Antikörper einsatzbereit. Der konjugierte Antikörper wurde lichtgeschützt bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

2.2.6. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse einzelner Zellen aufgrund von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf dem Einsatz von Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern, die definierte Zellstrukturen binden. Die Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren Lichtenergie eines Lasers in einem für sie charakteristischen Wellenlängenbereich und geben eine definierte langwelligere Strahlung ab, die vom Durchflusszytometer erfasst werden kann. Das für die Versuche verwendete BD FACSCanto II (Becton Dickinson, Heidelberg, DE) kann neben Größe (Forwardscatter, FSC) und Granularität (Sidescatter, SSC) sechs weitere Parameter je Zelle messen. Dementsprechend konnten die Zellen mit fünf Fluoreszenz-konjugierten Antikörpern und einem Farbstoff zur Differenzierung von lebenden und

toten Zellen gefärbt werden.

Zu Beginn der Antikörperfärbung wurde jeweils 50 µl der Zellsuspension in die Wells einer 96-Well-Platte vorgelegt (Versuchsanordnung und Aufbau der Messplatte siehe Kapitel 2.3.3 Abbildung 2). Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden 50 µl FBS (Verdünnung 1 : 10 mit PBS) in jedes Well dazu gegeben und 5 min bei 4°C inkubiert.

Für die Antikörperfärbung wurde jeweils 100 µl eines Antikörper-Cocktails dazu gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden 50 µl PBS in jedes Well hinzugefügt und die Platte zentrifugiert (5 min Zentrifugation bei 1200 rpm und 4°C mit Bremse). Der Überstand wurde abpipettiert und das entstandene Zell-Pellet in 190 µl PBS gelöst. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde vor der Messung 5 µl PI (Konzentration 50 µg / ml) hinzugegeben.

2.3. Bestimmung der Expression von T-Zell-Oberflächenmarkern

2.3.1. Studiendesign

Für die Studie wurden den Probanden innerhalb von drei Wochen jeweils zu acht Zeitpunkten Blutproben entnommen. Die Zeitpunkte wurden anhand von vorausgegangenen Mausexperimenten (Beilhack A., unveröffentlichte Daten) ausgewählt. Beginnend an Tag 0 wurden den Probanden an den Tagen 2, 3, 7, 10, 14, 17 und 21 Blutproben entnommen und diese analysiert. Logistisch bedingt wurden die 22 Studienteilnehmer in zwei Durchgänge eingeteilt. Am ersten Durchgang nahmen zehn Probanden, am zweiten Durchgang zwölf Probanden teil.

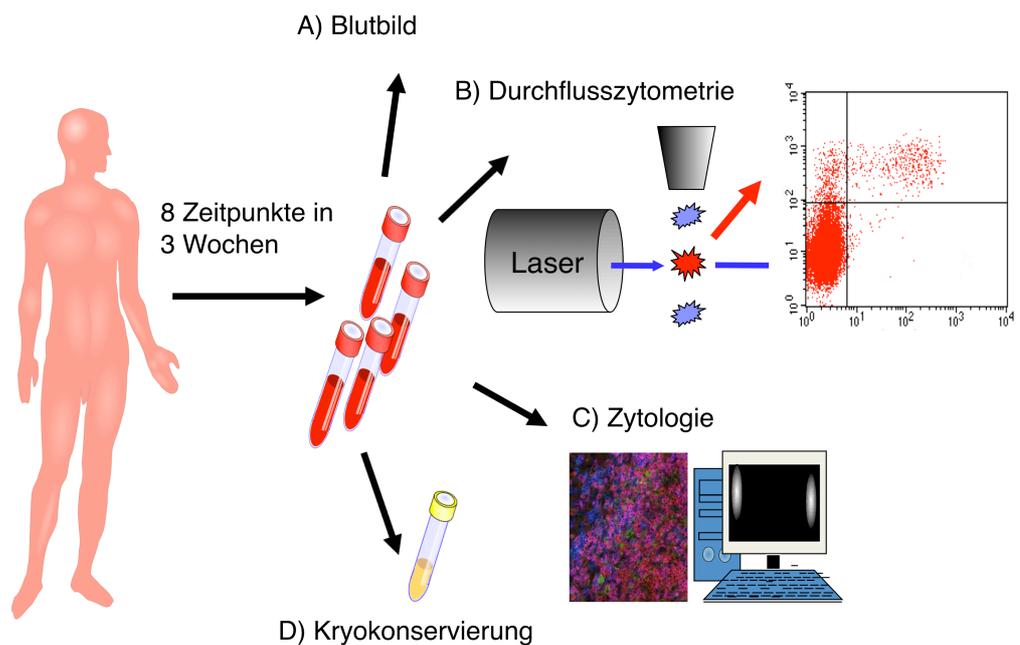


Abbildung 1: Messung der Homing-Rezeptor-Expression humaner T-Zellen im peripheren Blut¹.

Aus den Blutproben wurde jeweils ein großes Blutbild erstellt, die Oberflächenflächenmarker auf den T-Zellen bestimmt, Zellen mittels Zytospins für eine zytologische Analyse konserviert und Zellen bzw. Serum für spätere Real-time-PCR-Analysen tief gefroren (siehe Abbildung 1).

2.3.2. Gesundheitsstatus der Probanden

Am ersten Versuchstag wurden die Probanden über die Teilnahmebedingungen der Studie aufgeklärt und untersucht. Besonderes Augenmerk bei der Anamnese und klinischen Untersuchung lag auf Erkrankungen des Immunsystems wie etwa Allergien, Autoimmunerkrankungen sowie Medikamenteneinnahme und Impfungen (Untersuchungsbogen siehe Anhang).

An den übrigen Messtagen wurden Veränderungen des Gesundheitszustandes der Probanden, Impfungen oder Änderungen der Medikamenteneinnahme mit Hilfe eines Fragebogens (siehe Anhang) erfasst. Nach der Erhebung des Gesundheitszustandes erfolgte die Blutentnahme.

¹Nach Beilhack 2004.

2.3.3. Experimenteller Aufbau

Übersicht

Eine Übersicht über den Aufbau der Experimente ist in Abbildung 2 dargestellt².

# 1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Comp.		Beads			Setup						
B	FMO	FMO	FMO	FMO	FMO	FMO						
C	FMO	FMO	FMO	FMO	FMO	FMO						
D	FMO											Wash
E	Prob1	Prob1										
F	Prob 2	Prob2	Prob2	Prob2	Prob2	Prob2	Prob2	Prob2				Wash
G	Prob 3	Prob3										
H	Prob 4	Prob4				Wash						

# 2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Prob 5	Prob5										
B	Prob 6	Prob6				Wash						
C	Prob 7	Prob7										
D	Prob 8	Prob8				Wash						
E	Prob 9	Prob9										
F	Prob10				Wash							
G	Prob11			Wash	Wash							
H	Prob12			Wash	Wash							

Abbildung 2: Schema der beiden 96-Well-Platten für die Messung. Comp. = Kompensation, Beads = Fluoreszenz markierte Partikel, Setup = Zellen zur Einstellung des Durchflusszytometers, FMO = Fluorescence-minus-one, Prob1 - 12 = Proband 1 - 12, Wash = Zwischenspülung.

Neben den acht Proben-Wells je Proband (Prob), wurden Kontrollen (Kompensation und Fluorescence-minus-one), Zellen zur Geräteeinstellung (Setup), Fluoreszenz-markierte Partikel (Beads) für die Lasereinstellung und PBS zur Zwischenspülung (Wash) in den Versuchsaufbau integriert.

Antikörpercocktails

Die zu analysierenden mAKs wurden in acht verschiedene Antikörpercocktails aufgeteilt. Zur Messung der Expression der T-Zell-Oberflächenmarker wurde bei jedem Probanden je ein Antikörpercocktail pro Well eingesetzt. Zur Differenzierung der

² Eine ausführliche Darstellung des Experimentaufbaus mit genauer Aufschlüsselung der verwendeten Antikörper findet sich im Anhang.

T-Lymphozyten in zytotoxische T-Zellen und T-Helfer-Zellen wurden in allen Antikörpercocktails anti-CD3 und anti-CD8 verwendet. Zytotoxische T-Zellen wurden näherungsweise als CD3+CD8+ und T-Helfer-Zellen als CD3+CD8- definiert.

Durch den Zusatz von PI in jedes Well kurz vor der Messung konnten bei der Auswertung tote Zellen ausgeschlossen werden. Dies war essentiell da tote Zellen fluoreszenz-konjugierte Antikörper unspezifisch aufnehmen und somit die Messergebnisse verfälschen können (Tung et al., 2007). Am verwendeten 6-Farben Durchflusszytometer konnten neben den drei beschriebenen und bereits belegten Farbkanälen somit noch jeweils drei weitere Antikörper gegen Aktivierungsmarker, Homing-Rezeptoren und Immunantwort Rezeptoren pro Well gemessen werden.

Soweit möglich wurden die Antikörper-Kombinationen nach dem gleichen beschriebenen Zielorgan der Homing-Rezeptoren und der funktionellen Zusammengehörigkeit ausgewählt (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht Antikörpercocktails. Das Blut jedes Probanden wurde mit acht verschiedenen Antikörpercocktails analysiert. Die Antikörper CD43, CD44 und CCR7 wurden aus technischen Gründen nicht in die weitere Auswertung eingeschlossen.

Well 1		Titer	Well 2		Titer	Well 3		Titer	Well 4		Titer
FITC	β7	1: 20	CLA	1: 40	CCR5	1: 10	CD62L	1: 80			
PE	CCR9	1: 20	CCR8	1: 800	CXCR3	1: 10	CCR2	1: 40			
PE-CY7	CD8	1: 80	CD8	1: 80	CD8	1: 80	CD8	1: 80			
APC	α4	1: 40	CCR4	1: 10	CXCR2	1: 20	CD44	1: 800			
APC-Cy7	CD3	1: 40	CD3	1: 40	CD3	1: 40	CD3	1: 40			

Well 5		Titer	Well 6		Titer	Well 7		Titer	Well 8		Titer
FITC	CD43	1: 20	CD69	1: 20	CD62L	1: 80	LTB4R1	1: 40			
PE	CCR6	1: 20	αE	1: 160	CCR7	1: 20	CCR1	1: 10			
PE-CY7	CD8	1: 80	CD8	1: 80	CD8	1: 80	CD8	1: 80			
APC	CCR10	1: 20	CD25	1: 20	CD45RA	1: 40	CXCR1	1: 80			
APC-Cy7	CD3	1: 40	CD3	1: 40	CD3	1: 40	CD3	1: 40			

Der Antikörpercocktail im sog. „Darm“-Well 1 enthielt die darmspezifischen Homing-Rezeptoren Integrin α4, β7 und CCR9. Diese werden selektiv von T-Zellen exprimiert, die in den Dünndarm wandern (Berlin et al., 1993, Zabel et al., 1999) und sind wichtig für eine effiziente Migration der T Zellen in den Dünndarm (Hamann et al., 1994, Johansson-Lindbom et al., 2003, Svensson et al., 2002).

Im sog. „Haut“-Well 2 wurden die Haut Homing-Rezeptoren CLA, CCR4 und CCR8 (Schaerli et al., 2004, Campbell et al., 1999, Reiss et al., 2001) zusammengefasst.

Limitationen bei den Kombinationen ergaben sich durch die eingeschränkte Verfügbarkeit von Homing-Rezeptoren in bestimmten Fluoreszenzfarbstoffen und die auf drei begrenzte Antikörperzahl pro Well. Eine genauere Vorstellung der einzelnen Antikörper findet sich in der Einleitung (Kapitel 1.4).

Die Antikörper-Ansätze wurden jeweils für einen kompletten Messdurchgang angesetzt, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen Messtage zu gewährleisten. Zudem wurde jeder Antikörpercocktail vor dem Messdurchgang anhand einer Probemessung mit den PBMCs zweier freiwilliger Spender auf seine Funktion überprüft. Um die Stabilität der Antikörpercocktails zu erhöhen und eine längere Lagerung ohne Verunreinigung oder Wachstum durch Erreger zu ermöglichen, wurde PBS mit 0,1% Natriumazid verwendet.

Kompensation

Die Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe der Antikörper überlappen sich teilweise. Um diese spektrale Überlappung zu korrigieren, wurde eine sog. Kompensation verwendet. Dazu wurde für jede Fluoreszenz-Farbe (APC, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy7, PI) ein Well in die Messung integriert, in dem nur ein Antikörper (anti-CD3, anti-CD4 oder anti-CD8) mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff enthalten war. Zusätzlich wurde auch ein Kontrollwell ohne Antikörper eingefügt. Mit der Auswertungssoftware FlowJo (Version 8.8.6, Tree Star Inc., USA) konnten somit die spektral korrigierten Fluoreszenz-Farben berechnet und die Daten kompensiert werden.

Laut Herstellerangabe von BD Bioscience (San Jose, USA) ist der Farbstoff PI sehr klebrig. Wird ein Sample mit PI vor einem Sample ohne PI gemessen, so können auch hier PI+ Zellen gefunden werden. Um dies zu verhindern, wurden alle Samples ohne PI zeitlich vor den Samples mit PI gemessen.

Fluorescence-minus-one

Um die Grenze zwischen Positiv- und Negativ-Fraktion festzulegen, wurden sog. Fluorescence-minus-one (FMO) Kontrollen verwendet. Das Prinzip der FMO beruht darauf, den zu testenden Antikörper in einem Extrawell aus dem Antikörpercocktail weg zu lassen. In diesem Well befinden sich also alle Antikörper des Cocktails ohne den gesuchten Antikörper. Dieses FMO-Well zeigt damit die maximal zu erwartende Fluoreszenz in dem Farbkanal des gesuchten Antikörpers. Diese Fluoreszenz besteht u.a. aus Autofluoreszenz der Zellen und der Fluoreszenz aufgrund der Bindung der Antikörper (Tung et al., 2007). Damit erlaubt die FMO eine einfache und unabhängige Festlegung der Grenze zwischen den Populationen (Roederer et al., 2004, Tung et al., 2004a). Die FMO Kontrollen sind insbesondere dann wichtig, wenn bei schwach färbenden Antikörpern oder bei Immunzellpopulationen, die nicht eindeutig positiv oder negativ sind, die Grenze zwischen Positiv und Negativ festgelegt werden soll (Tung et al., 2007). Eine exakte Aufschlüsselung der pro Well verwendeten Antikörper und deren Konzentration findet sich im Anhang.

Aufgrund der eindeutigen Trennung der Positiv- bzw. Negativ-Fraktion für anti-CD3 und anti-CD8 wurde bei diesen Antikörpern aus Gründen der Praktikabilität auf eine FMO verzichtet.

Zwischenspülung

Um einem Verkleben oder Verstopfen des Durchflusszytometers vorzubeugen, wurden sechs Wells zur Zwischenspülung mit jeweils 200 µl PBS in die Messplatte integriert. Neben der Reinigung ermöglichte dies als Nebenprodukt auch die grobe Abschätzung der von Well zu Well verschleppten Zellen. Wenn nacheinander zwei Antikörper mit demselben konjugierten Fluoreszenzfarbstoff am Durchflusszytometer gemessen werden, können Zellen der ersten Probe in die zweite verschleppt und fälschlicherweise erfasst werden. Dies ist insbesondere dann kritisch, wenn Zellen eines stark färbenden Antikörpers, wie etwa CD45RA, zeitlich vor einem schwach färbenden Antikörper, wie etwa LTB4R1, gemessen werden. Dies könnte zu einer fälschlicherweise erhöhten positiven Population führen.

2.3.4. Antikörper-Titration

Um die Antikörper in optimaler Konzentration für die Färbung einsetzen zu können, wurden sie austitriert. Hierbei wurde unter den Bedingungen der geplanten Experimente (Zellzahl und Volumen) die optimale Antikörperkonzentration bestimmt. Dies ist für die Qualität der Färbung wichtig. Wird zu viel Antikörper eingesetzt, kommt es zu einer Überfärbung der Immunzellpopulationen (siehe Abbildung 3). Wird der Antikörper zu stark verdünnt, werden nicht alle Zellen gefärbt.

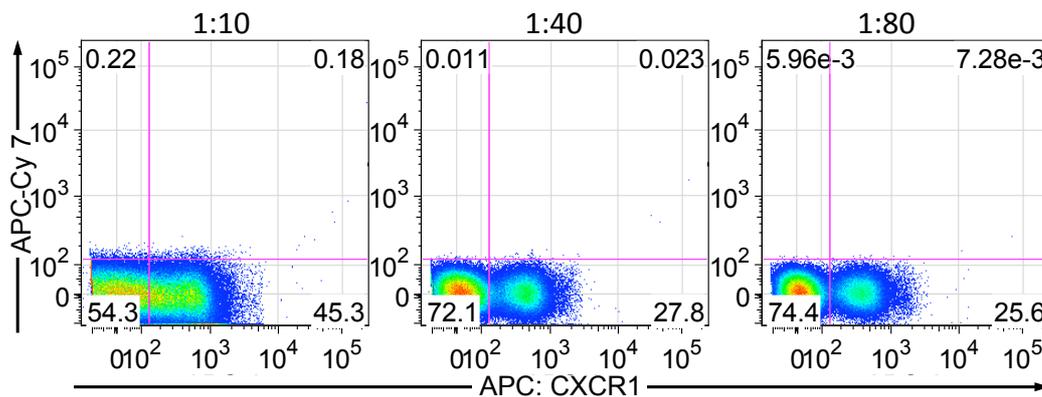


Abbildung 3: Titration eines Antikörpers. Der Antikörper CXCR1 wurde (von links nach rechts) in den Verdünnungen 1:10, 1:40 und 1:80 getestet. In der Verdünnung 1:10 sind die Zellen deutlich überfärbt. Mit steigender Verdünnung trennen sich die Immunzellpopulationen besser.

Durch die Titration von Antikörpern können neben der Verbesserung der Qualität auch die Kosten für Antikörper reduziert werden.

2.3.5. Fluoreszenz markierte Partikel

Für die Studie war die Vergleichbarkeit der einzelnen Messtage untereinander sehr wichtig, da die Messungen über einen Zeitraum von drei Wochen liefen. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verbessern und den Einfluss der Schwankungen des Durchflusszytometers im Messzeitraum auf das Ergebnis zu minimieren, wurden als Kontrolle Fluoreszenz-markierte Partikel eingeführt. Durch die Verwendung dieser sog. Fluoreszenz-Beads konnten die Gerät-Schwankungen aufgezeichnet und gegebenenfalls durch Anpassung der PMT (Photomultiplier Tube)-Spannung angepasst werden.

Die Fluoreszenz-Beads eigneten sich gut um die Schwankungen des Durchflusszytometers über einen längeren Messzeitraum zu erfassen und zu

kontrollieren, da sie für alle verwendeten Fluoreszenzfarben bei der durchflusszytometrischen Analyse ein einziges, sehr steiles Maximum aufwiesen. Schwankungen konnten so leicht sichtbar gemacht und angepasst werden.

Nachdem die Laser optimal eingestellt waren, wurden die Fluoreszenz-Beads am Durchflusszytometer gemessen und ein Gate um das Maximum der Intensität festgelegt, das bei den folgenden Messungen als Referenzbereich diente.

Vor jeder Messung wurde ein Well mit den Fluoreszenz-Beads gemessen. Mit Hilfe der vorher festgelegten Gates wurde überprüft, ob die Maxima der jeweiligen Fluoreszenz-Farben im Vergleich zur ersten Messung konstant geblieben waren. Bei Änderungen wurde die PMT-Spannung angepasst. Außerdem konnte durch die Fluoreszenz-Beads die generelle Funktionsfähigkeit der Laser vor der Messung der Proben überprüft werden. Durch die Aufnahmegeschwindigkeit und Kontinuität mit der die Beads vom Durchflusszytometer aufgenommen wurden, konnte weiterhin die Funktionsfähigkeit des Flüssigkeitssystems des Durchflusszytometers beurteilt werden.

2.3.6. Positiv-Kontrollen

Einige T-Zell-Oberflächenmarker, wie etwa die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 oder der Homing-Rezeptor Integrin αE , waren auf den Lymphozyten gesunder Blutspender gering oder gar nicht nachzuweisen. Hieraus ergab sich das Problem, dass unterschieden werden musste, ob diese Rezeptoren wirklich nicht exprimiert wurden oder ob der mAK fehlerhaft war. Der mAK hätte zum Beispiel defekt sein oder ganz fehlen können. Um dies auszuschließen musste ein Weg gefunden werden, die T-Zellen dazu zu bringen diese Marker deutlicher zu exprimieren. Um eine effiziente und vor allem praktikable Lösung zu finden, wurden verschiedene Methoden zur T-Zell-Stimulation geprüft. Es wurden Stimulationen mit anti-CD3 / anti-CD28, Phorbol Myristinsäure (PMA) / Ionomycin, Vitamin A und Vitamin D3 sowie eine Inkubation bei 37°C und eine gemischte Leukozytenreaktion getestet. Soweit nicht anderes vermerkt, wurden die Proben nach erfolgter Stimulation lichtgeschützt bei 4°C gelagert und schließlich die Expression der Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt.

Da die Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 am besten geeignet war (siehe Kapitel 3.1.2.), wurde diese Stimulationsmethode für den Test zur Analyse der Oberflächenmarker auf T-Zellen verwendet.

Anti-CD3 / anti-CD28 Stimulation

Zur Vorbereitung der Stimulation wurde eine flat-bottom 96-Well-Platte über Nacht bei 4°C mit 50 µl einer Antikörperlösung aus anti-CD3 (1 : 200) und anti-CD28 (1 : 1000) in PBS inkubiert. Für die Stimulation wurden je Well 300.000 oder 400.000 PBMCs in 200 µl cRPMI-Lösung verwendet. Zuerst wurde die Antikörper-Lösung aus der 96-Well-Platte abpipettiert und mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 µl cRPMI-Zell-Lösung in die nun mit Antikörper beschichteten Wells pipettiert. Die Zellen wurden nun bei 37°C und 5% CO₂ je nach Experiment zwischen 12 – 48h inkubiert.

Nach 24h wurden die durch die Stimulation induzierten Proliferationsknoten in den Wells mikroskopisch beurteilt und bei verbrauchtem cRPMI ein Mediumwechsel durchgeführt.

Stimulation mit Phorbol Myristinsäure / Ionomycin

Eine Aktivierung der T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor führt u.a. zu einer Erhöhung von freiem intrazellulärem Kalzium und einer Aktivierung (Translokation) der Proteinkinase C. Diese beiden Signale können auch durch Kalziumionophore, etwa Ionomycin, und Proteinkinase Aktivatoren, etwa PMA, erzeugt werden (Nau et al., 1988).

Für diesen Versuch wurden pro Well 300.000 PBMCs eingesetzt. Die Zellen wurden dazu in 250 µl cRPMI aufgenommen und anschließend jedem Well PMA (1 mg / ml) und Ionomycin (2 mM) zugesetzt. Die Zellen wurden 24h bzw. 96h in einem Inkubator (37°C, 5% CO₂) gelagert. Wenn das cRPMI aufgebraucht war (sichtbar durch den Farbumschlag des Indikators Phenolrot) erfolgte ein Mediumwechsel.

Gemischte Leukozytenreaktion

Das Prinzip der gemischten Leukozytenreaktion beruht darauf, die T-Lymphozyten eines Spenders mit den T-Zell-depletierten Zellen eines zweiten Spenders zu inkubieren. Die Folge ist eine Reaktion der T-Zellen von Spender 1 auf die „fremden“ Zellen von Spender 2 (Abbildung 4).

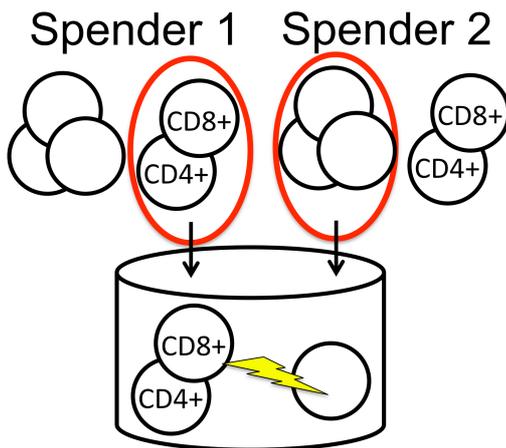


Abbildung 4: Prinzip der gemischten Leukozytenreaktion. CD4+ und CD8+ Zellen von Spender 1 werden mit den CD4-CD8- Zellen von Spender 2 zusammengebracht. Dies führt zu einer Reaktion der CD4+ und CD8+ Zellen auf die Zellen von Spender 2.

Um die T-Lymphozyten von den restlichen PBMCs zu trennen, wurden mit magnetischen Partikeln bestückte mAKs gegen CD4 und CD8 (MicroBeads, MACS-System) verwendet. Im magnetischen Feld einer Trennsäule konnten somit CD4+ und CD8+ Lymphozyten von CD4-CD8- Zellen getrennt werden. Nach der Trennung der PBMCs beider Spender wurden von Spender 1 je 150.000 CD4+ und CD8+ Zellen entnommen. Diese Zellen wurden gemeinsam mit 150.000 CD4- und CD8- PBMCs von Spender 2 in 250 µl cRPMI aufgenommen. Bis zur durchflusszytometrischen Analyse (je nach Experiment an Tag 5 bzw. 9) wurden die Zellen bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Wenn das cRPMI-Medium verbraucht war, wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Stimulation mit Vitamin D3

Die Migration von Lymphozyten in den Dünndarm und die Epidermis wird durch äußere Faktoren wie Vitamin A (über die Nahrung) und Vitamin D3 (über das Sonnenlicht) beeinflusst. Durch Zugabe von Vitaminen können T-Zellen angeregt werden bestimmte Homing-Rezeptoren zu exprimieren (Sigmundsdottir und Butcher, 2008). Daraus entstand die Idee durch Zugabe von Vitaminen, die T-Zellen zur Expression definierter Homing Rezeptoren anzuregen und diese als Positiv-Kontrollen in den experimentellen Aufbau zu integrieren. Für den Versuch wurden durch anti-CD3 / anti-CD28 voraktivierte Zellen verwendet (siehe Kapitel 2.3.6. Anti-CD3 / anti-CD28 Stimulation). Eingesetzt wurden 700.000 Zellen in 1000 µl cRPMI.

Die vorstimulierten Zellen wurden in ein neues Well mit frischem CRPMI Medium überführt. Anschließend wurde IL2 (12,5 ng / ml), IL12 (2,5 ng / ml) sowie 10 nM 1,25(OH)₂ D3 (Vitamin D3) hinzugegeben. Die Stimulation erfolgte 8 Tage lang. Das cRPMI wurde nach Bedarf erneuert.

2.3.7. Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten

Die Rohdaten wurden unkompensiert aufgenommen und mit der Software FlowJo (Version 8.8.6, Tree Star, Inc., USA) kompensiert, um bessere und genauere Analysen durchführen zu können (Tung et al., 2007). Zudem wurden die Durchflusszytometrie-Daten mit einer bi-exponentiellen Skala ausgewertet, um eine korrekte Darstellung der Daten zu gewährleisten (Tung et al., 2007).

Um nur lebende Zellen für die Auswertung zu berücksichtigen, wurde im Programm ein elektronisches „Fenster“ (Gate) auf die PI(-) Zellen gesetzt. In diesem „Live-Gate“ wurden zur Differenzierung der T-Zell-Subpopulationen Gates für CD3+CD8⁺ und CD3+CD8⁻ Zellen gesetzt. Die Auswertung der Rezeptorexpression erfolgte in diesen Gates (siehe Abbildung 5).

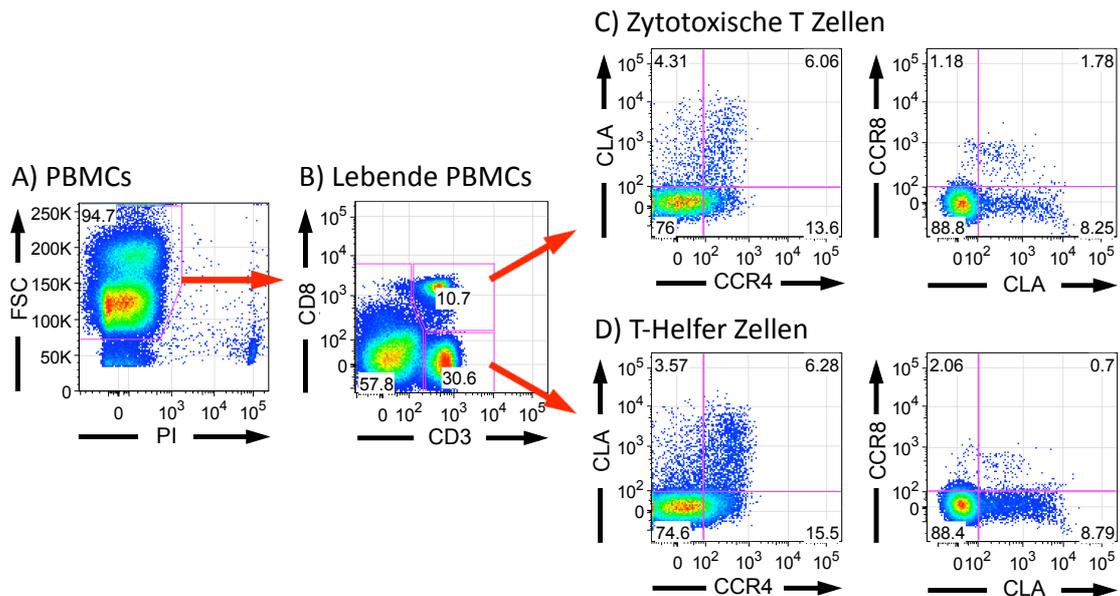


Abbildung 5: Muster einer Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten.

PBMCs = Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes. FSC = Forward Scatter, PI = Propidium Iodide, CLA = Cutaneous Lymphocyte Antigen, CCR4 / 8 = Chemokin-Rezeptor 4 / 8.

Die Gates der restlichen Antikörper wurden in der FMO definiert. Dazu wurde ein Gate um die vermeintlich positive Population eines bestimmten Antikörpers gelegt und in das korrespondierende Well der FMO ohne den entsprechenden Antikörper übertragen. Hier wurde das Gate so lange erweitert bzw. verkleinert, bis maximal noch < 0,4% falsch positive Zellen enthalten waren. Anschließend wurden die Gates von der FMO auf die Probanden übertragen und die Daten ausgewertet (siehe Abbildung 5).

Weitere Berechnungen, wie etwa die absolute Zellzahl, erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel, Microsoft Coporation. Die ausgewerteten Daten wurden schließlich in das Grafik-Programm Graph-Pad Prism übertragen und die Ergebnisgraphen erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Positiv-Kontrollen

3.1.1. Notwendigkeit stimulierter T-Zellen als Positiv-Kontrollen

Im Rahmen von state-of-the-art Durchflusszytometrie-Analysen wird die Grenze zwischen Rezeptor-positiven und -negativen Zellen in der FMO (siehe Kapitel 2.3.3.) festgelegt. Für Marker, die schon in Gesunden gut auf T-Zellen nachzuweisen sind, können hierfür normale PBMCs verwendet werden. Einige Oberflächenmarker sind dagegen in gesunden Probanden nicht nachweisbar (siehe Tabelle 2). Für die Positiv-Kontrolle dieser Marker können die T-Zellen etwa durch Stimulation zur Expression angeregt werden.

Tabelle 2: Die untersuchten Oberflächenmarker ließen sich bezüglich der Notwendigkeit von stimulierten Zellen als Positiv-Kontrollen in zwei Gruppen einteilen.

<p>Gruppe 1: Rezeptoren auf T-Zellen gut nachweisbar.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CCR2 - CCR4 - CCR5 - CCR6 - CCR7 - CCR8 - CCR9 - CD25 (nur auf T-Helfer-Zellen) - CD3 - CD43 - CD44 - CD45RA - CD62L - CD8a - Cutaneous lymphocyte antigen - CXCR1 - CXCR3 - Integrin β7 - Integrin α4 (CD49d) - LTB4R1 (Auf Leukozyten gute Expression und Trennung der Populationen)
<p>Gruppe 2: Rezeptoren auf T-Zellen kaum exprimiert.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - CD103 (Integrin αE) - CD69 - CD25 (nur auf zytotoxischen T-Zellen) - CCR10 - CXCR2

Aus diesem Grund wurden die 25 zu untersuchenden Rezeptoren in Vorexperimenten darauf getestet, ob eine Stimulation notwendig ist. Die untersuchten Rezeptoren ließen sich in zwei Gruppen einteilen (siehe Tabelle 2). In der ersten Gruppe ließen sich gut zu messende Rezeptoren zusammenfassen. Als Positiv-Kontrolle in der FMO reichte daher die Verwendung von unbehandelten PBMCs. Der zweiten Gruppe wurden die Rezeptoren zugeordnet, die auf T-Zellen kaum bzw. nicht nachweisbar waren. Für diese Oberflächenmarker wurde nach einer Möglichkeit gesucht, T-Zellen dazu anzuregen, diese Rezeptoren hoch zu regulieren.

3.1.2. Anti-CD3 / anti-CD28 Stimulation

Die Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 erwies sich letztendlich als die am besten geeignete Methode, um in Gesunden nicht exprimierte Oberflächenmarker auf T-Zellen hoch zu regulieren³. Insgesamt zeigte diese Stimulationsmethode die quantitativ besten Ergebnisse. So konnten die Marker CD25, CD69, $\alpha 4$ und αE sowohl auf zytotoxischen als auch auf T-Helfer-Zellen hoch reguliert werden. Weitere Vorteile dieser Methode waren hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die einfache Durchführbarkeit und der verhältnismäßig geringe zeitliche Aufwand.

Für die Oberflächenmarker CD25, CD69 und Integrin αE wurden daher mit anti-CD3 / anti-CD28 stimulierte PBMCs in die FMO (Fluoreszenz-minus-one) des Homing-Rezeptor Tests als Positiv-Kontrolle integriert. Durch die Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 wurden T-Lymphozyten aktiviert und zur Proliferation angeregt. Die Aktivierung und Proliferation war im Mikroskop durch die Bildung von Proliferationsknoten (siehe Abbildung 6) erkennbar.

³ Alternativ getestete Methoden waren aus verschiedenen Gründen nicht praktikabel (vgl. Anhang).

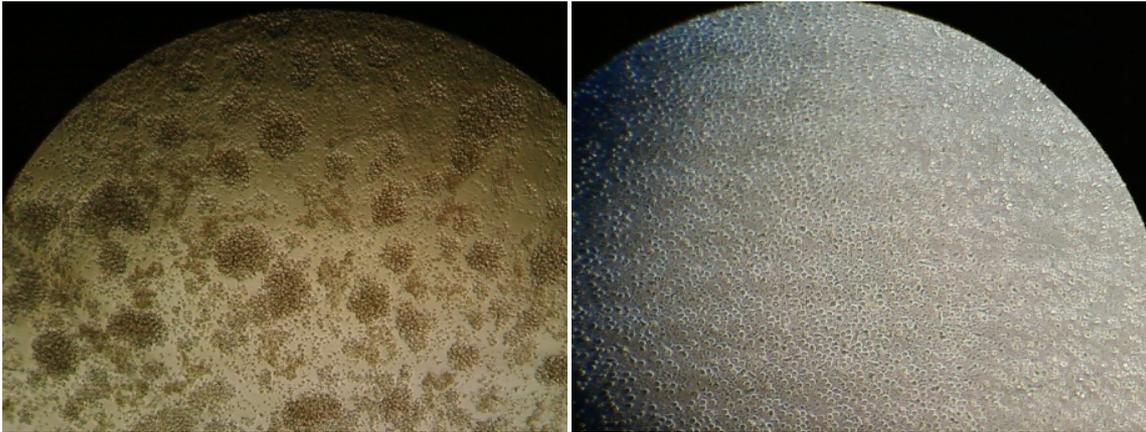


Abbildung 6: Bildung von Proliferationsknoten nach drei Tagen Stimulation von PBMCs mit anti-CD3 und anti-CD28. Links: Stimulierte PBMCs. Rechts: Unstimulierte Kontrolle. Vergrößerung 1:10. Die bräunliche Färbung der stimulierten Probe ist durch den erhöhten Verbrauch an Nährlösung bedingt.

Die durch die Stimulation aktivierten T-Lymphozyten exprimierten verstärkt die Oberflächenmarker CD25, CD69, Integrin $\alpha 4$ und Integrin αE (siehe Abbildung 7).

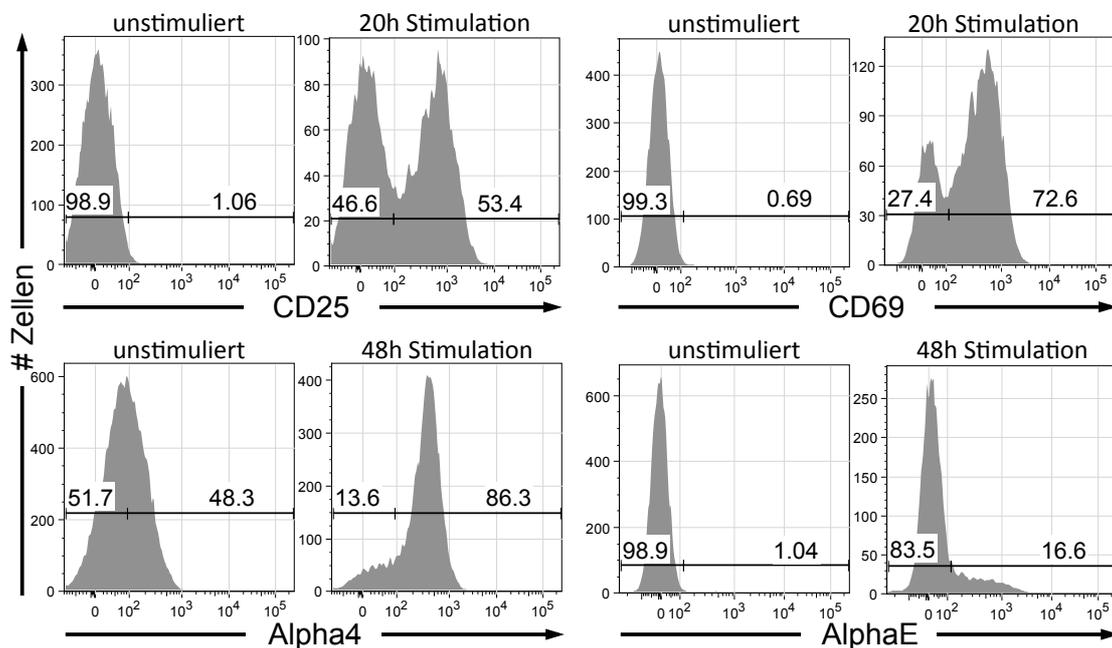


Abbildung 7: Expression von CD25, CD69, Integrin $\alpha 4$ und αE auf zytotoxischen T-Zellen ohne bzw. mit Stimulation durch anti-CD3 / anti-CD28.

Y-Achse = Anzahl gemessene Zellen, X-Achse = Durchflusszytometrisch ermittelte Fluoreszenz. Die Fluoreszenzintensität ist proportional zur Expressionrate des Markers auf der T-Zell-Oberfläche. In den Grafiken zeigt der Strich auf der horizontalen Linie die Grenze zwischen positiver und negativer Zellpopulation an. Die Zahl links der Grenze entspricht dem Anteil Rezeptor-negativer, die Zahl rechts davon dem Anteil Rezeptor-positiver Zellen.

Auf T-Zellen gesunder Probanden waren die Rezeptoren Integrin αE und CD69 kaum nachweisbar (1% positive Zellen). Durch eine Stimulation über 48h bzw. 20h mit anti-CD3 / anti-CD28 konnten sowohl zytotoxische als auch T-Helfer-Zellen dazu angeregt werden, diese Rezeptoren hochzuregulieren (im Beispiel 17% bzw. 73% Rezeptor-positive Zellen). Auch die Expressionsrate des auf zytotoxischen T-Zellen kaum nachweisbaren Aktivierungsmarkers CD25 (1%) konnte durch die Stimulation deutlich von 1% auf 53% gesteigert werden.

Integrin $\alpha 4$ zeigte zwar schon vor der Stimulation eine mittlere Expressionrate, allerdings lies die schlechte Trennung von positiver und negativer Fraktion die Qualität des Antikörpers fraglich erscheinen. Unter den stimulierten Bedingungen zeigte sich eine deutlich verbesserte Trennung der positiven und negativen Population (siehe Abbildung 7). Damit konnte gezeigt werden, dass der eingesetzte Antikörperklon gut funktionierte und das Kontinuum zwischen positiver und negativer T-Zell-Fraktion physiologischerweise vorkam.

Für die Oberflächenmarker CCR10, CXCR2 sowie LTB4R1 ergab sich auf T-Lymphozyten dagegen keine Änderung der Expressionsrate. Aus diesem Grund wurden die Ergebnisse nicht graphisch dargestellt. CCR10 und CXCR2 wurden trotz Mangel an geeigneten Stimulationsmethoden in den beiden Messdurchgängen analysiert.

3.2. Messstabilität des Durchflusszytometers

Die durchflusszytometrisch aufgenommene Fluoreszenz-Intensität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe APC, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy7 und PerCP-Cy5.5 wurde über den gesamten Messzeitraum mit Hilfe von standardisierten Fluoreszenz-markierten Partikeln analysiert. Um Schwankungen auszugleichen, wurden gegebenenfalls Änderungen der PMT (Photomultiplier Tube)-Spannung des Durchflusszytometers vorgenommen. Dadurch konnten die natürlich vorkommenden Schwankungen der gemessenen Fluoreszenz reduziert werden. Die Werte wurden für die beiden dreiwöchigen Messdurchgänge aufgezeichnet (siehe Abbildung 8).

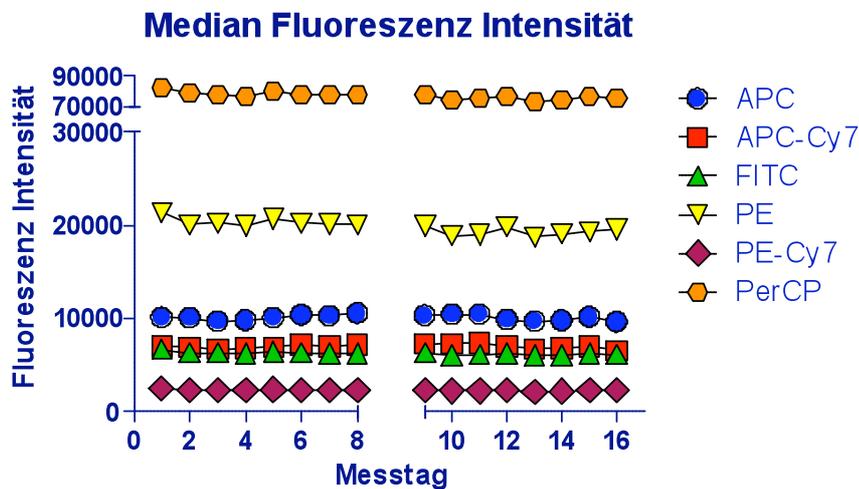


Abbildung 8: Verlauf der Fluoreszenz Intensität über den Messzeitraum. Median der Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe APC, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy7 und PerCP-Cy5.5 über einen Zeitraum von je drei Wochen von Durchgang 1 (Messtag 1 – 8) und Durchgang 2 (Messtag 9 – 16).

3.3. Ergebnisse der Homing-Rezeptor-Expression

Mit dem in Kapitel 2.3.3. beschriebenen Test wurde die Expression definierter Oberflächenmarker auf T-Zellen im peripheren Blut von 21 gesunden Probanden ermittelt. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Expression der Oberflächenmarker an acht Messtagen über einen Zeitraum von drei Wochen dargestellt.

CLA, CCR4 und CCR8

Die Durchflusszytometrie-Daten jedes Messtages wurden mit dem Programm FlowJo (Version 8.8.6, Tree Star Inc., USA) ausgewertet, wie in Abbildung 5 in Kapitel 2.3.7. beschrieben. Messtechnisch bedingt wurden jeweils drei Homing-Rezeptoren pro Antikörpercocktail analysiert (siehe Kapitel 2.3.3.). Die Ergebnisse der analysierten T-Zell-Oberflächenmarker werden daher in den entsprechenden Dreiergruppen, jeweils unterteilt nach zytotoxischen T-Zellen (A) und T-Helfer-Zellen (B), präsentiert (siehe Abbildung 9 und Abbildung 10). Für jeden Oberflächenmarker werden zuerst beispielhaft die Originaldaten eines Probanden graphisch dargestellt (siehe Abbildung 9 linke Spalte).

Die Ergebnisse der Expression der Oberflächenmarker der 21 Probanden beider Messdurchgänge werden zum einen als prozentualer Anteil aller Oberflächenmarker-positiven Zellen (siehe Abbildung 9, mittlere Spalte) und zum anderen als absolute Zellzahl (siehe Abbildung 9, rechte Spalte) dargestellt.

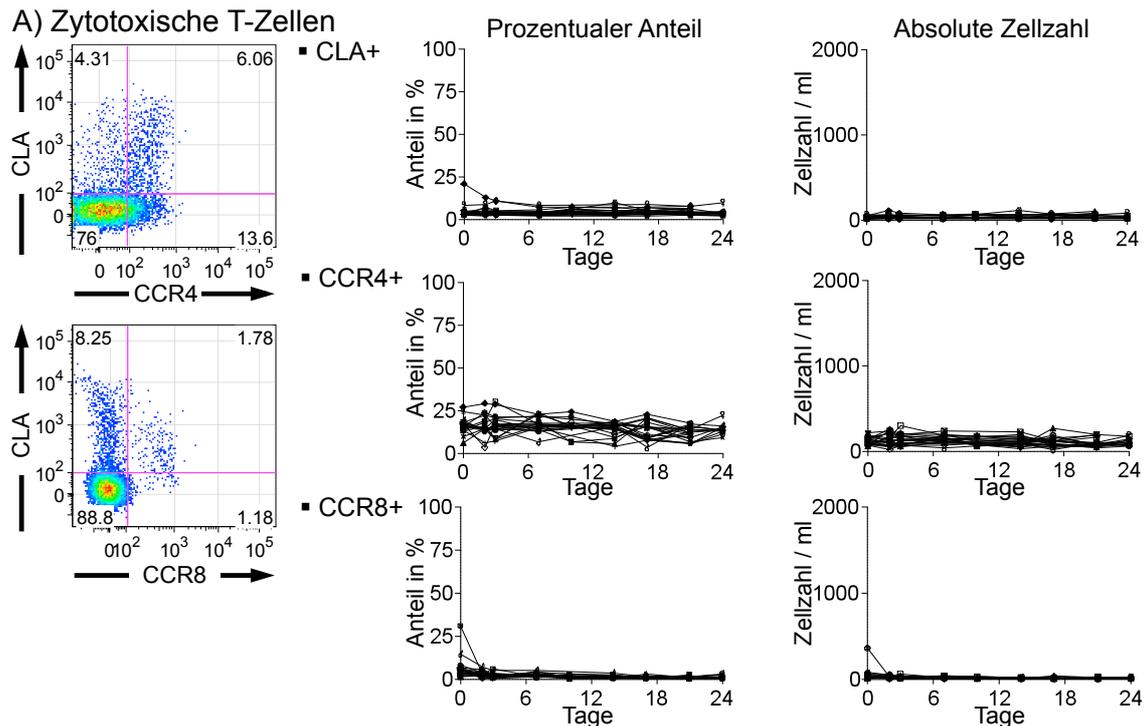


Abbildung 9: Expression von CLA, CCR4 und CCR8 auf zytotoxischen T-Zellen (A).
 Linke Spalte = Originaldaten in zwei Dimensionen, mittlere Spalte = prozentualer Anteil Rezeptorpositiver Zellen, rechte Spalte = absolute Zellzahl des entsprechenden Rezeptors pro ml. Anzahl der Probanden n = 21.

Die Rezeptoren CLA, CCR4 und CCR8 sind als sog. Haut Homing-Rezeptoren beschrieben und wurden daher gemeinsam analysiert. Auf zytotoxischen T-Zellen wird CLA zeitlich stabil mit einer niedrigen Expressionsrate exprimiert (siehe Abbildung 9). Der CLA-Wert eines Probanden fällt besonders an Messtag 1 auf. Der Proband hatte an diesem Tag im Vergleich zu den restlichen Probanden eine 5-fach erhöhte Prozentzahl von CLA-positiven zytotoxischen T-Zellen. Dieser Proband war bereits vor Beginn der Studie an einem akut respiratorischen Infekt mit Fieber und Husten mit Auswurf erkrankt. Aufgrund einer akuten Bronchitis erhielt er zudem eine antibiotische Therapie mit Doxycyclin. An Tag 2 besserte sich sein Zustand und nach Tag 4 gab er keine Beschwerden mehr an. Zu diesem Zeitpunkt hatte sich auch der Wert für CLA normalisiert.

Der Chemokin-Rezeptor CCR4 zeigt auf zytotoxischen T-Zellen eine schwankende Expressionsrate. CCR8 weist eine zeitlich stabile niedrige Expressionsrate auf. An Tag 1 sind allerdings zwei deutliche Ausreißer zu erkennen (siehe Abbildung 9). Diese Werte gehören zu zwei verschiedenen Probanden, die sich jedoch beide beschwerdefrei

zeigten. Auf Basis der vorliegenden Daten lässt sich daher keine gemeinsame Ursache ableiten.

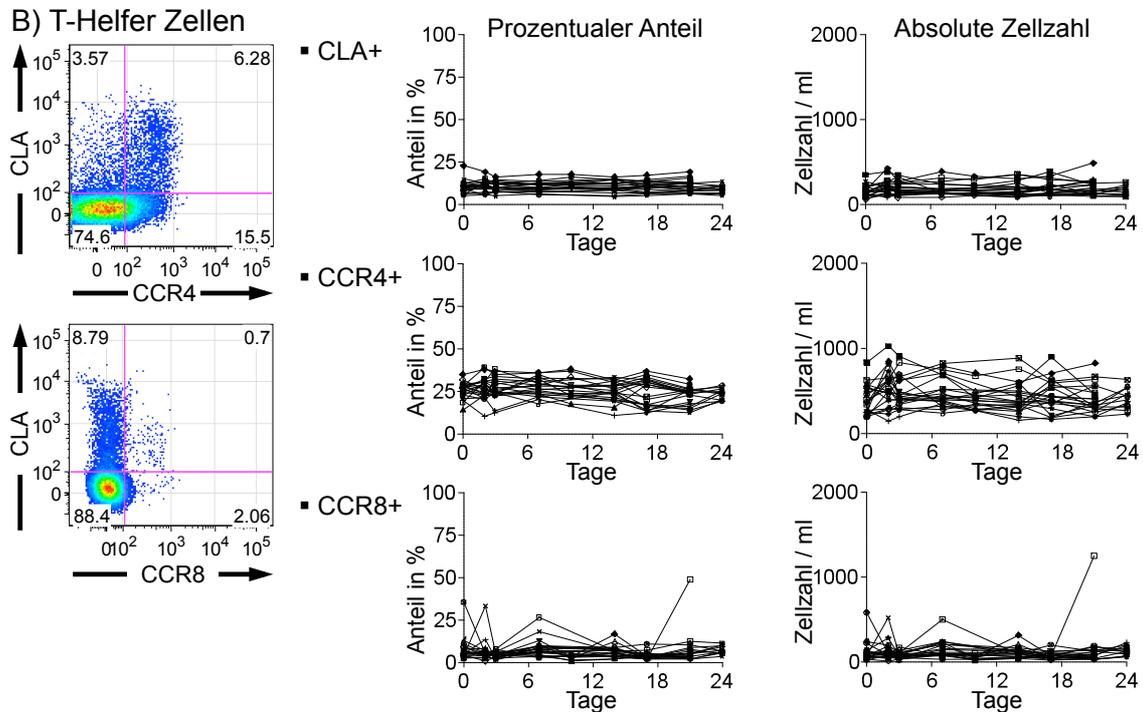


Abbildung 10: Expression von CLA, CCR4 und CCR8 auf T-Helfer-Zellen (B). N = 21.

Auf T-Helfer-Zellen wird CLA zeitlich stabil mit einer niedrigen Expressionsrate exprimiert (siehe Abbildung 10). CCR4 weist dagegen eine schwankende Expression auf. Bei CCR8 auf T-Helfer-Zellen lässt sich bei den meisten Probanden eine zeitlich stabile niedrige Expressionsrate erkennen. An den Tagen 1,2,4 und 8 sind jedoch, sowohl prozentual als auch in absoluten Zahlen, deutliche Ausreißer zu sehen. Diese Werte gehören zu verschiedenen Probanden, die sich jedoch alle beschwerdefrei zeigten. Eine gemeinsame Ursache für die Ausreißer lässt sich daher auf Grundlage der vorliegenden Daten zur Gesundheit der Probanden nicht ableiten.

Integrin $\alpha 4$, $\beta 7$ und CCR9

Die Integrine $\alpha 4$ und $\beta 7$ sind mukosa-assoziierte Rezeptoren. In Kombination mit CCR9 sind sie wichtig für die Migration von T-Zellen in den Dünndarm. Integrin $\beta 7$ zeigt auf zytotoxischen T-Zellen eine mittlere Expressionsrate, bei der zahlreiche Ausreißer auffallen (siehe Abbildung 11).

Bei CCR9 fällt ein über die Zeit abwärts gerichteter Trend der Messwerte der Probanden des zweiten Messdurchgangs auf. Diese Probanden sind durch ihren Messwert an Tag 24 erkennbar. Eine gemeinsame Ursache für den zentralen Trend im zweiten Messdurchgang lässt sich auf Basis der vorliegenden Daten zum Gesundheitszustand der Probanden nicht ableiten (vgl. Diskussion). Die Expressionsrate von Integrin $\alpha 4$ auf zytotoxischen T-Zellen liegt auf einem zeitlich stabilen hohen Niveau.

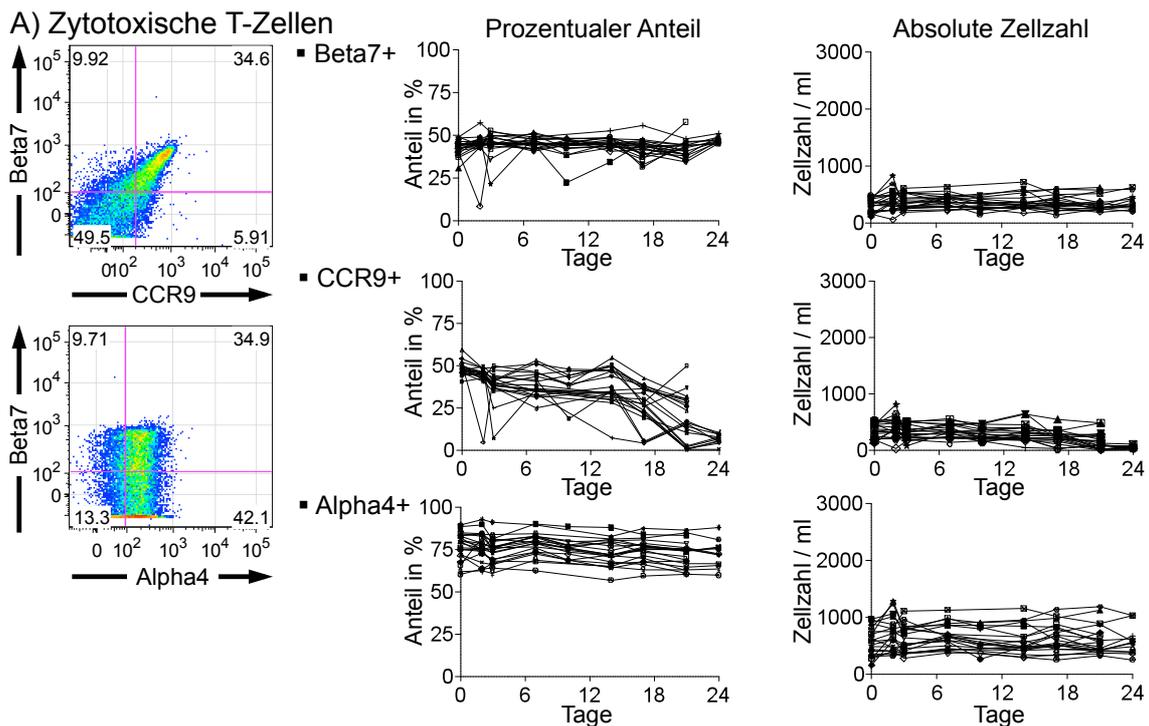


Abbildung 11: Expression von $\beta 7$, CCR9 und $\alpha 4$ auf zytotoxischen T-Zellen (A). N = 21.

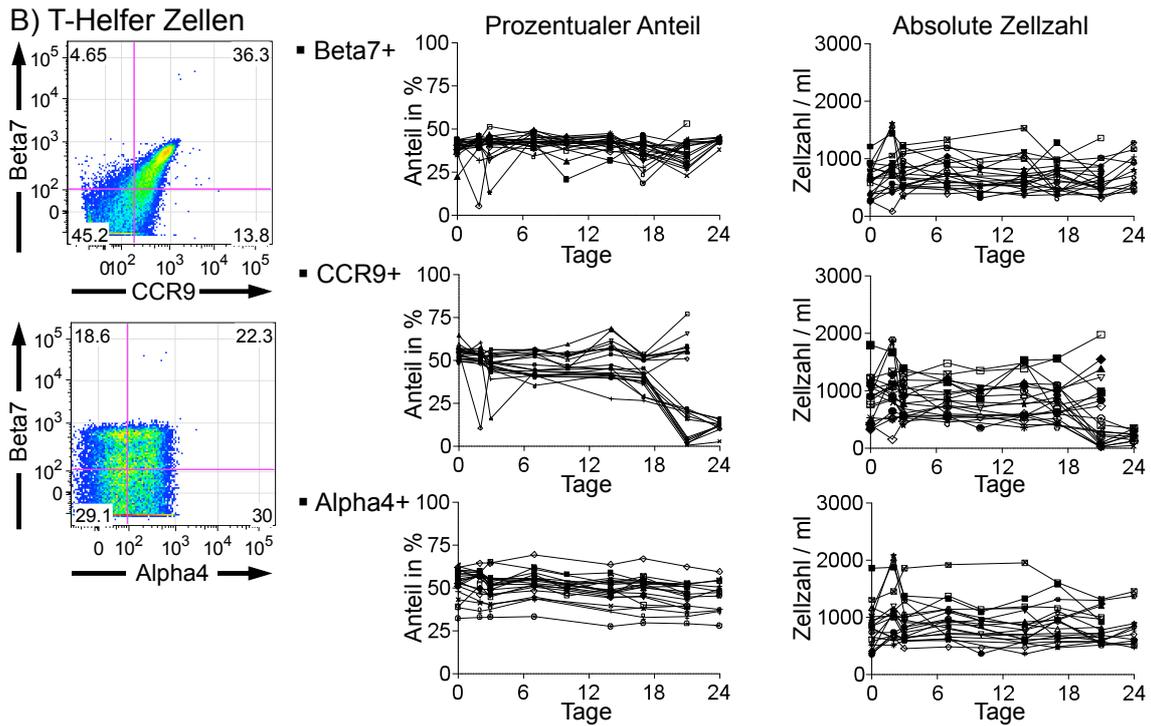


Abbildung 12: Expression von Integrin $\beta 7$, CCR9 und $\alpha 4$ auf T-Helfer-Zellen (B). N = 21.

Auf T-Helfer-Zellen zeigt sich für Integrin $\beta 7$, CCR9 und $\alpha 4$ ein ähnliches Bild wie auf zytotoxischen Zellen. Der Abwärtstrend der Expression von CCR9 in Messdurchgang 2 ist noch deutlicher als auf zytotoxischen T-Zellen sichtbar (siehe Abbildung 12). Auch hier konnte keine gemeinsame Ursache aus den Daten des Gesundheitszustands der Probanden für diesen zentralen Trend der Messwerte abgeleitet werden (vgl. Diskussion).

CCR5, CXCR2 und CXCR3

CCR5 und CXCR3 sind Gewebe-spezifische Rezeptoren, deren Funktion noch nicht abschließend geklärt ist. Diese Rezeptoren wurden auf T-Zellen in verschiedenen Organen wie etwa Darm, Haut, Leber und Synovium nachgewiesen (siehe Einleitung, Kapitel 1.4.). CXCR3 spielt etwa eine Rolle bei der GVHD-assoziierten Migration von T-Zellen in den Darm. CCR5-positive T-Zellen sind mit verantwortlich für die Schädigung der Leber während einer GVHD.

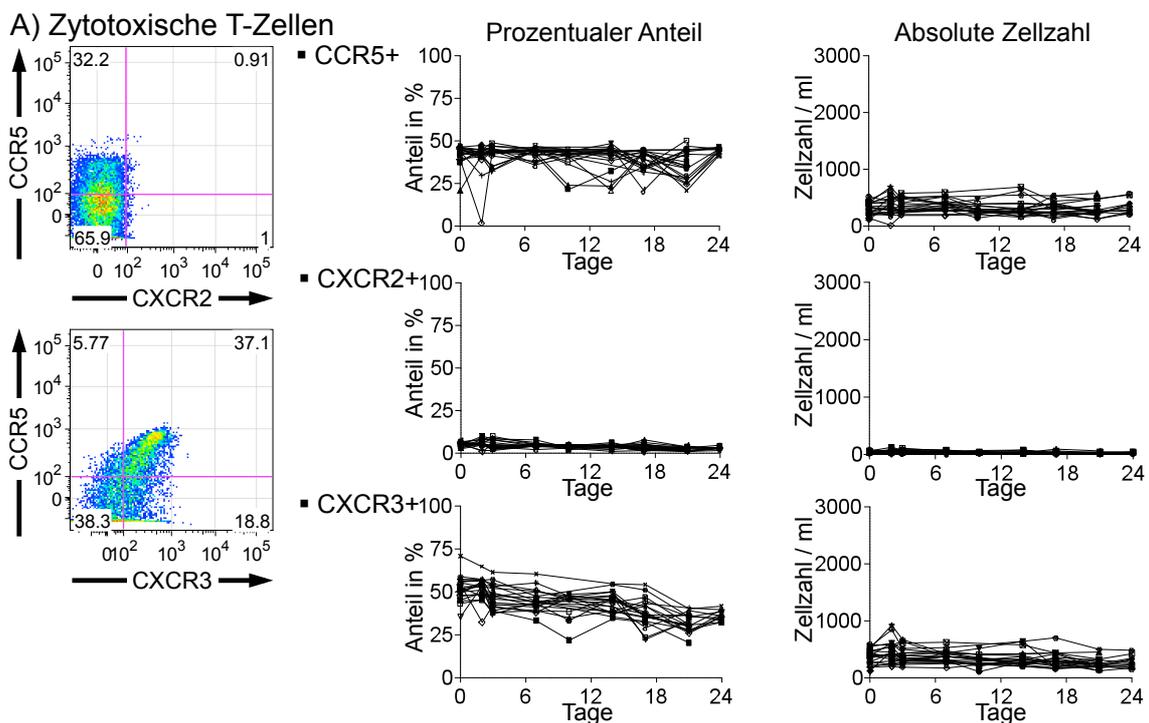


Abbildung 13: Expression von CCR5, CXCR2 und CXCR3 auf zytotoxischen T-Zellen (A).
N = 21.

CCR5 zeigt sowohl auf zytotoxischen (siehe Abbildung 13) als auch auf T-Helfer-Zellen (siehe Abbildung 14) eine mittlere Expressionsrate, die von zahlreichen Ausreißern begleitet wird. CXCR2 ist auf T-Lymphozyten nur durch eine geringe Basis-Expression vertreten. Die Expression von CXCR3 auf zytotoxischen T-Zellen scheint in beiden Messdurchgängen einem zentralen Trend nach unten zu folgen. Interessanterweise ist dies auf T-Helfer-Zellen nicht zu erkennen (siehe Abbildung 14).

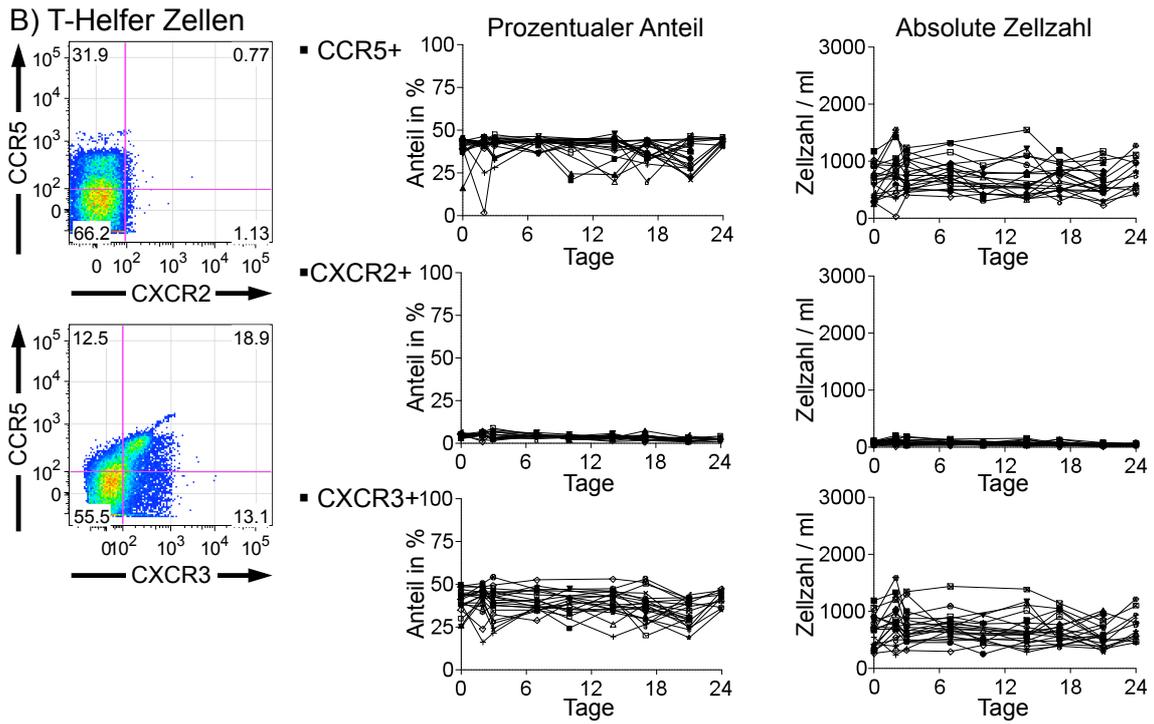


Abbildung 14: Expression von CCR5, CXCR2 und CXCR3 auf T-Helfer-Zellen (B). N = 21.

CCR6 und CCR10

CCR6 spielt eine Rolle bei der Migration von T-Zellen in entzündete Gewebe. CCR10 wird eine Funktion beim Homing von T-Zellen in die Haut zugeschrieben. Diese beiden Rezeptoren wurden aus logistischen Gründen in einen gemeinsamen Antikörper-Cocktail integriert⁴. CCR6 zeigt sowohl auf zytotoxischen (Abbildung 15) als auch auf T-Helfer-Zellen (Abbildung 16) eine dynamisch schwankende Expression. CCR10 ist auf beiden T-Zell-Subpopulationen über den Messzeitraum kaum nachweisbar.

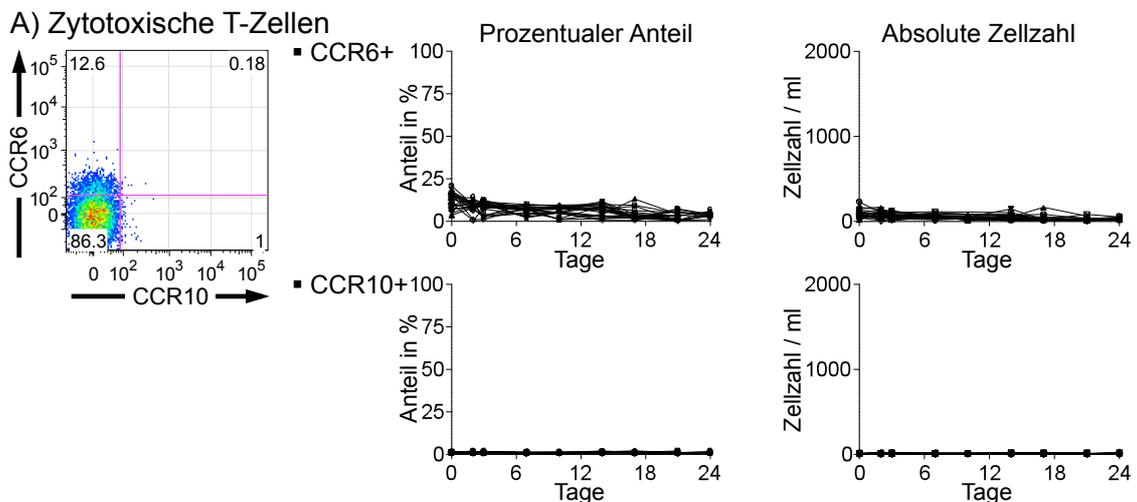


Abbildung 15: Expression von CCR6 und CCR10 auf zytotoxischen T-Zellen (A). N = 21.

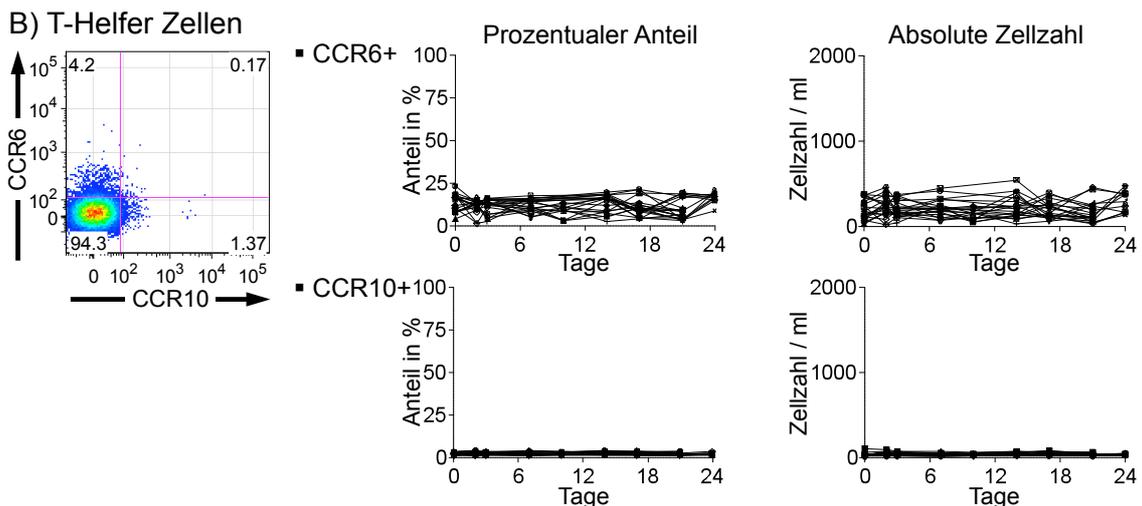


Abbildung 16: Expression von CCR6 und CCR10 auf T-Helfer-Zellen (B). N = 21.

⁴ Die Ergebnisse des ebenfalls in diesem Well gemessenen anti-CD43 sind nicht dargestellt, da aus technischen Gründen 100% der Zellen CD43-positiv waren.

CD25, CD69 und Integrin α E

CD25 und CD69 sind Aktivierungsmarker auf T-Zellen. Integrin α E spielt eine Rolle beim Homing von T-Zellen in Darmgewebe (Siehe Einleitung, Kapitel 1.4.).

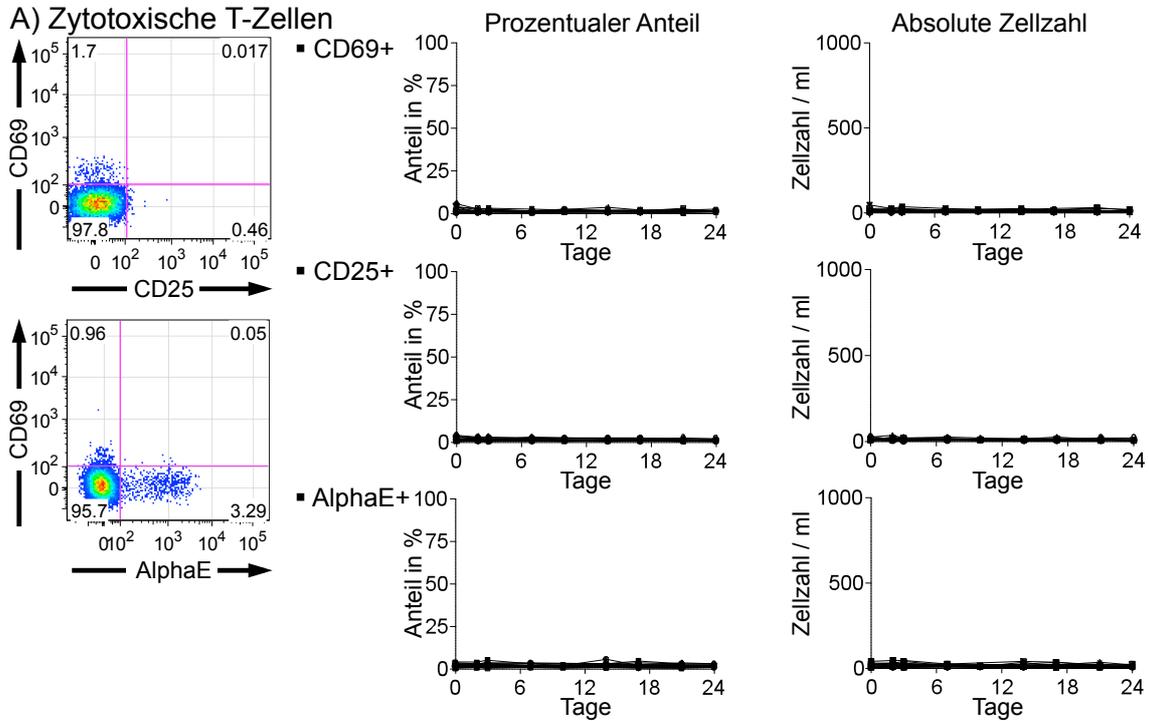


Abbildung 17: Expression von CD25, CD69 und α E auf zytotoxischen T-Zellen (A). N = 21.

Auf zytotoxischen T-Zellen zeigen die Rezeptoren CD25, CD69 und Integrin α E eine sehr niedrige zeitlich stabile Expression (siehe Abbildung 17).

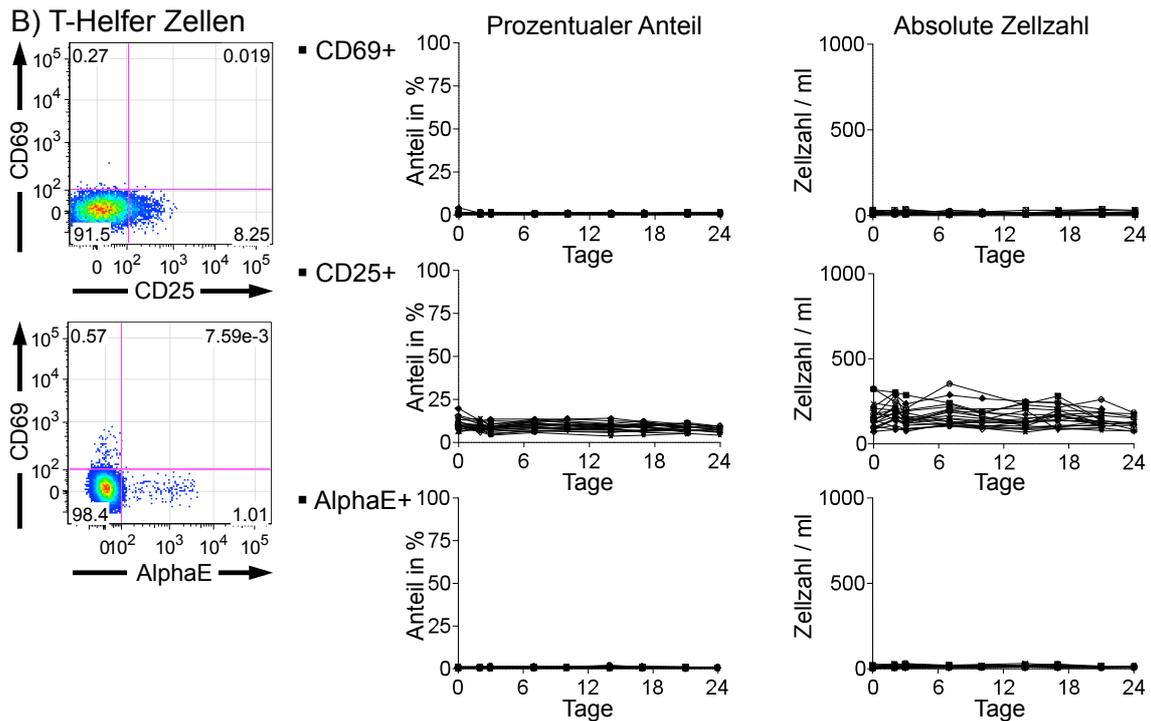


Abbildung 18: Expression von CD25, CD69 und α E auf T-Helfer-Zellen (B). N = 21.

CD69 und Integrin α E sind auf T-Helfer-Zellen über den Messzeitraum praktisch nicht nachweisbar (siehe Abbildung 18). CD25 ist dagegen zeitlich stabil mit einer niedrigen Expressionsrate exprimiert. Die CD25-positiven Zellen entsprechen größtenteils CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen.

CCR2, CD62L und CD45RA

CCR2 spielt eine wichtige Rolle bei der Induktion einer aGVHD. Mit CD62L und CD45RA können Effektor- von zentralen T-Gedächtniszellen unterschieden werden. CCR2 lässt sich auf zytotoxischen T-Zellen nur als niedrige Basisexpression nachweisen (siehe Abbildung 19). CD62L und CD45RA sind hingegen zeitlich stabil auf hohem Niveau exprimiert. Bei CD45RA fällt ein Proband auf, der eine Expressionsrate von annähernd 100% aufweist. Auch auf T-Helfer-Zellen weist dieser Proband die höchste CD45RA-Expression auf (siehe. Abbildung 20). Anhand der vorliegenden Daten des Gesundheitszustands dieses Spenders lässt sich jedoch keine Ursache erkennen.

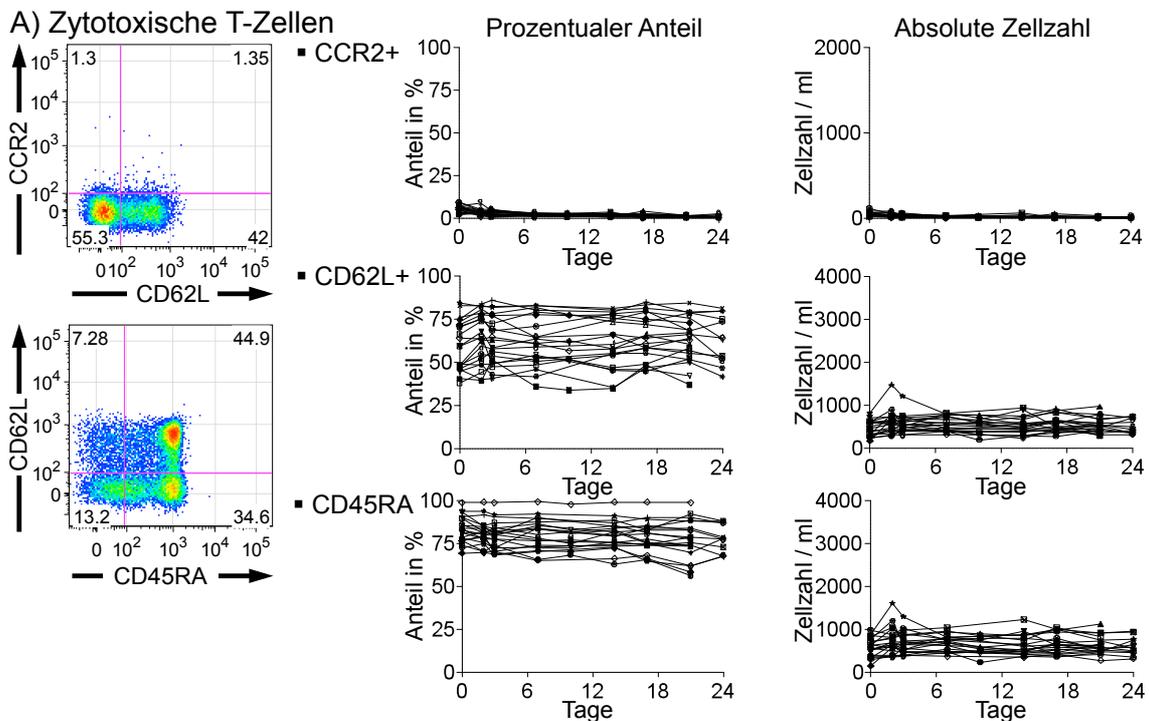


Abbildung 19: Expression von CCR2, CD62L und CD45RA auf zytotoxischen T-Zellen (A).
N = 21.

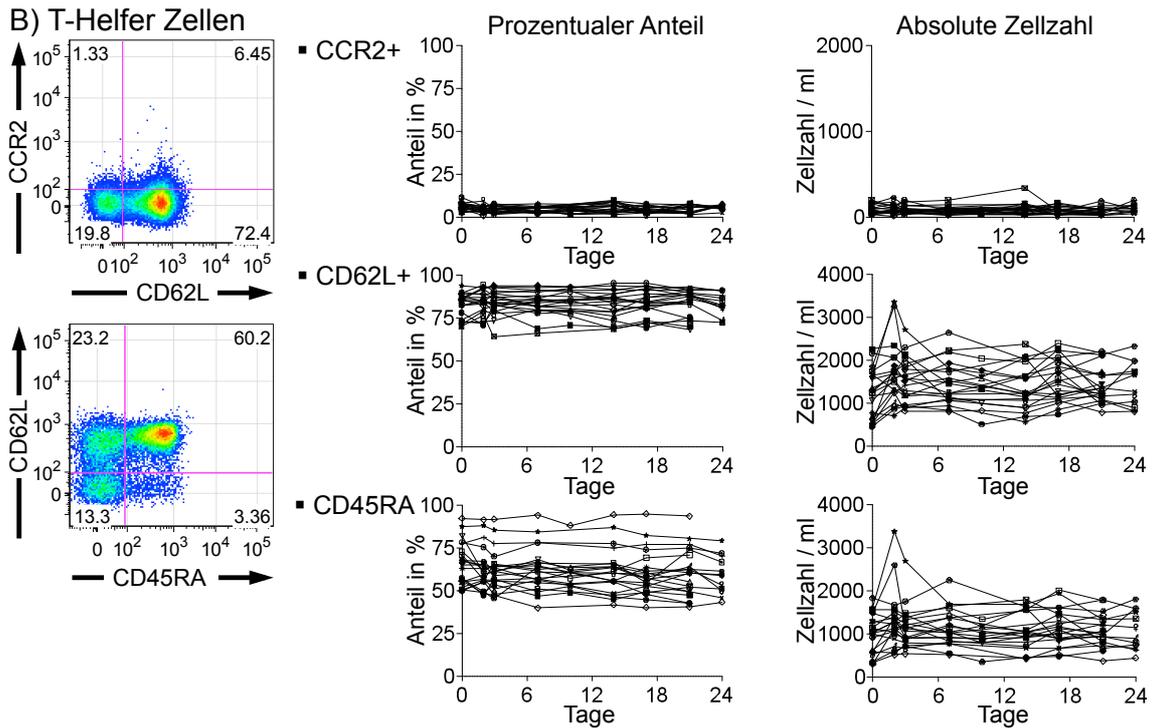


Abbildung 20: CCR2, CD62L und CD45RA auf T-Helfer-Zellen (B). N = 21.

Auf T-Helfer-Zellen zeigt CCR2 eine zeitlich stabile niedrige Expressionsrate (siehe Abbildung 20). Bei der absoluten Zellzahl lässt sich an Tag 5 ein deutlicher Ausreißer erkennen. Hierfür lässt sich jedoch auf Basis der vorliegenden Daten keine Ursache ableiten. CD62L und CD45RA werden ähnlich wie auf zytotoxischen Zellen zeitlich stabil mit einer hohen Expressionsrate exprimiert.

CCR1, CXCR1 und LTB4R1

In Mausmodellen ist CCR1 an der Migration von T-Lymphozyten in die Zielorgane der GVHD beteiligt. CXCR1 könnte eine Rolle beim Recruitment von zytotoxischen T-Zellen spielen. Seine Bedeutung ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. LTB4R1 spielt eine wichtige Rolle bei der nicht chemokin-assoziierten Migration von zytotoxischen T-Zellen in entzündete Gewebe.

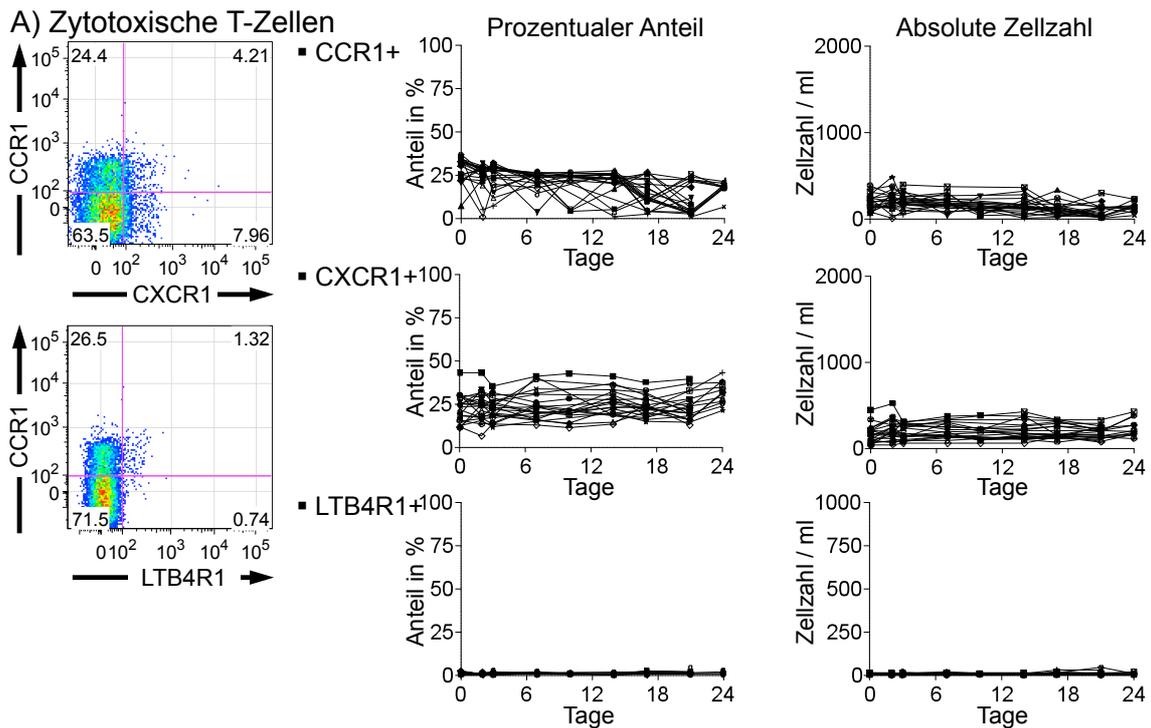


Abbildung 21: Expression von CCR1, CXCR1 und LTB4R1 auf zytotoxischen T-Zellen (A).
N = 21.

CCR1 und CXCR1 weisen auf zytotoxischen T-Zellen eine dynamisch schwankende Expression auf (siehe Abbildung 21). LTB4R1 lässt sich auf dieser T-Zell-Subpopulation kaum nachweisen.

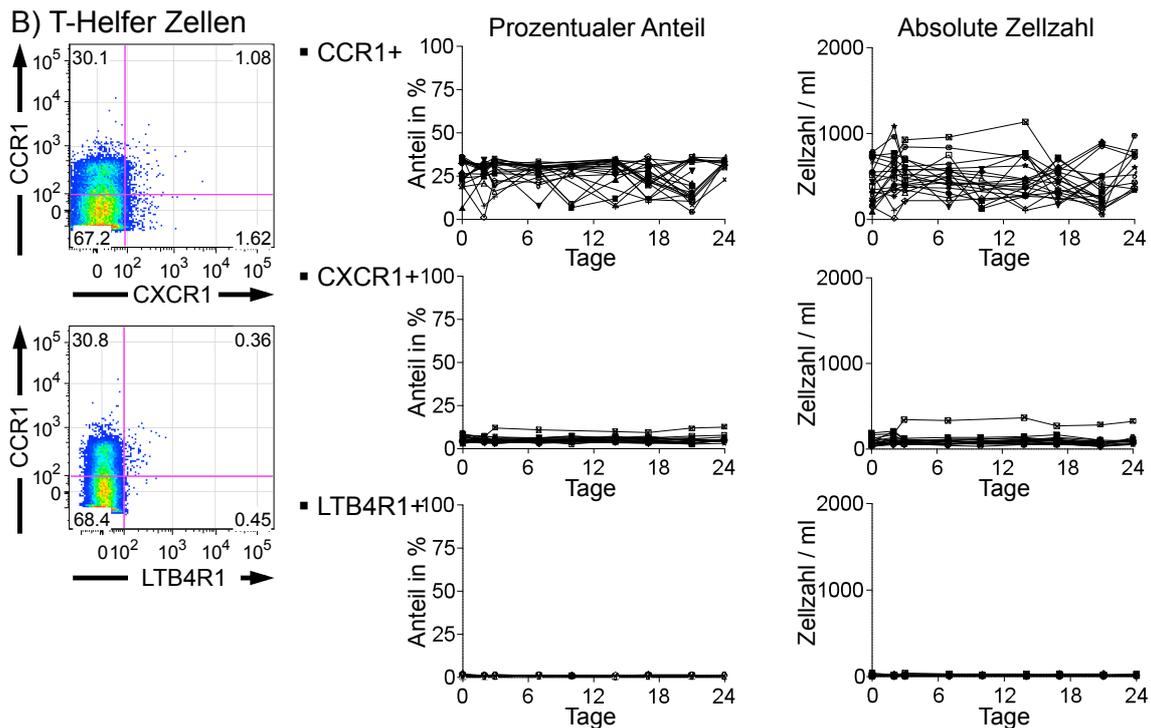


Abbildung 22: CCR1, CXCR1 und LTB4R1 auf T-Helfer-Zellen (B). N = 21.

Die Expression von CCR1 auf T-Helfer-Zellen zeigt eine schwankende Dynamik (siehe Abbildung 22). CXCR1 zeigt eine zeitlich stabile niedrige Expressionsrate. Ein Proband fällt jedoch auf, der von Messtag 3 bis zum Ende der Messreihe im Vergleich zum Durchschnitt der restlichen Probanden an diesem Tag einen 3-fach erhöhten Wert für CXCR1 auf T-Helfer-Zellen aufweist. Die absolute Zellzahl CXCR1-positiver T-Helfer-Zellen war um das 4-fache erhöht. Dieser Studienteilnehmer berichtete an Messtag 2 von einer beginnenden, ab Messtag 3 von einer stärkeren allergischen Rhinitis. Diese dauerte über das Ende der Messreihe hinaus an und wurde nach Messtag 5 aufgrund einer Verschlechterung der Symptomatik mit einem H1-Antihistaminikum (Ceterizin) behandelt.

Statistische Auswertung

Um zu testen ob das Ergebnis der durchschnittlichen Expressionsraten beider Messdurchgänge zusammengefasst werden kann, wurden sog. Friedmann-Tests durchgeführt. Dieser statistische Test vergleicht verbundene Stichproben bezüglich ihrer zentralen Tendenz. Bis auf CCR1, CCR5, CCR6, CCR10, CD62L, CD69, CLA und CXCR1 auf T-Helfer-Zellen sowie α E, CD62L und CXCR1 auf zytotoxischen T-Zellen ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Messdurchgängen. Diese sind unter anderem durch zahlreiche Ausreißer bzw. die geringe Probandenzahl bezogen auf die hohe Anzahl von acht Messtagen zu erklären (vgl. Diskussion). Daher ist das Ergebnis der durchschnittlichen Expressionsrate der Oberflächenmarker unterteilt nach Rund 1 bzw. 2 dargestellt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Ergebnisse der Oberflächenmarker-Expression auf T-Helfer-Zellen und zytotoxischen T-Zellen im peripheren Blut. Die durchschnittlichen Expressionsraten \pm Standardabweichung sind unterteilt nach Messdurchgang 1 und 2 dargestellt.

Oberflächenmarker	T-Helfer-Zellen (Durchschnitt \pm Standardabweichung)		Zytotoxische T-Zellen (Durchschnitt \pm Standardabweichung)	
	Durchgang 1	Durchgang 2	Durchgang 1	Durchgang 2
α 4	50,8% \pm 5,3	48,8% \pm 10,0	75,9% \pm 6,9	74,2% \pm 8,0
α E	0,6% \pm 0,3	0,7% \pm 0,2	1,7% \pm 1,0	1,9% \pm 0,8
β 7	39,5% \pm 7,1	39,9% \pm 6,1	42,6% \pm 6,7	44,7% \pm 4,6
CCR1	23,0% \pm 8,1	28,6% \pm 7,8	18,3% \pm 8,8	21,7% \pm 9,1
CCR2	3,5% \pm 1,3	5,6% \pm 2,1	1,9% \pm 1,3	2,4% \pm 2,1
CCR4	28,0% \pm 5,9	23,6% \pm 5,6	16,0% \pm 5,8	13,8% \pm 4,1
CCR5	38,7% \pm 8,1	40,5% \pm 6,4	39,4% \pm 8,1	41,1% \pm 6,0
CCR6	9,4% \pm 3,6	13,7% \pm 5,1	5,7% \pm 3,5	7,1% \pm 4,6
CCR8	4,9% \pm 5,9	7,1% \pm 5,3	1,9% \pm 1,5	2,6% \pm 3,6
CCR9	54,0% \pm 7,3	36,4% \pm 16,5	41,8% \pm 9,1	28,0% \pm 15,9
CCR10	2,5% \pm 0,8	1,9% \pm 0,6	1,0% \pm 0,3	1,0% \pm 0,2
CD25	9,4% \pm 2,4	8,6% \pm 2,4	1,4% \pm 0,7	1,3% \pm 0,6
CD45RA	61,1% \pm 13,4	62,1% \pm 12,0	78,9% \pm 9,6	80,0% \pm 8,0
CD62L	81,2% \pm 7,1	85,2% \pm 6,7	57,8% \pm 12,6	65,9% \pm 13,8
CD69	0,7% \pm 0,5	0,6% \pm 0,3	1,5% \pm 0,9	1,1% \pm 0,5
CLA	12,0% \pm 3,0	9,2% \pm 2,6	4,8% \pm 2,7	3,9% \pm 1,8
CXCR1	4,8% \pm 1,4	5,1% \pm 2,0	23,3% \pm 8,3	24,3% \pm 7,3
CXCR2	4,0% \pm 1,8	3,2% \pm 1,3	4,6% \pm 2,1	3,5% \pm 1,4
CXCR3	36,6% \pm 6,3	40,2% \pm 8,3	40,7% \pm 8,5	45,1% \pm 9,4
LTB4R1	0,8% \pm 0,3	0,6% \pm 0,2	0,9% \pm 0,5	0,8% \pm 0,4

Expressionsmuster der Oberflächenmarker

Mit dem beschriebenen Homing-Rezeptor Test (vgl. Kapitel 2.3.3.) wurden Oberflächenmarker auf peripheren T-Zellen im Blut gesunder Probanden analysiert. Ziel dieser Untersuchung war es, die physiologische Bandbreite der Expression von Oberflächenmarkern feststellen zu können. Anhand des prozentualen Ergebnisses der Analyse der Durchflusszytometrie-Daten lassen sich die Expressionsmuster der Oberflächenmarker in drei Gruppen einteilen:

1. Stabil niedrige Expression

Ein typisches Beispiel für die zeitlich stabile niedrige Expression ist Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA) auf T-Helfer-Zellen.

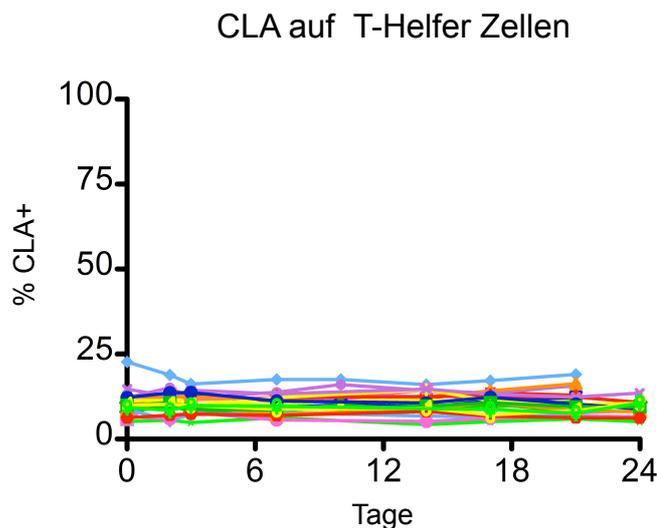


Abbildung 23: CLA auf T-Helfer-Zellen. N = 21.

In diese Gruppe lassen sich die Oberflächenmarker CD25, CD69, CCR2, CCR10, CXCR1 (nur auf T-Helfer-Zellen), CXCR2, Cutaneous Lymphocyte Antigen (CLA), Leukotriene B4 Rezeptor 1 und Integrin α E einordnen.

2. Stabil hohe Expression

Ein typisches Beispiel für die zeitlich stabile hohe Expressionrate ist CD62L auf T-Helfer-Zellen (siehe Abbildung 24).

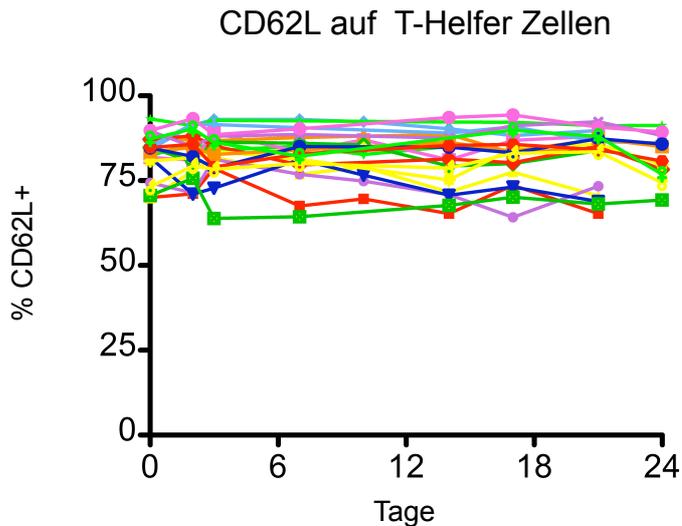


Abbildung 24: CD62L auf T-Helfer-Zellen. N = 21.

In diese Gruppe lassen sich die Oberflächenmarker CD45RA, Integrin $\alpha 4$ und CD62L einteilen.

3. Dynamisch schwankende Expression

CCR1 auf T-Helfer-Zellen ist ein typischer Vertreter von Markern mit einer dynamisch schwankenden Expressionsrate.

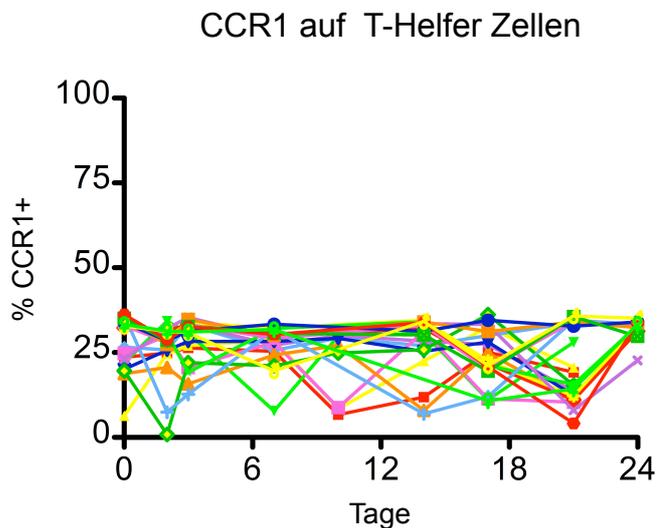


Abbildung 25: CCR1 auf T-Helfer-Zellen. N = 21.

Die Oberflächenmarker CCR1, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CCR9, CXCR1 (nur auf zytotoxischen T-Zellen), CXCR3 und Integrin $\beta 7$ zeigen dynamische Schwankungen in ihrem Expressionsmuster.

4. Diskussion

4.1. Bedeutung von Positiv-Kontrollen

Bestimmte Oberflächenmarker, wie etwa der Aktivierungsmarker CD69 oder der Homing-Rezeptor Integrin αE , sind auf den T-Lymphozyten im peripheren Blut gesunder Spender nur gering exprimiert oder gar nicht nachzuweisen. Zur Unterscheidung zwischen einer tatsächlichen Nicht-Expression und einer Dysfunktion des eingesetzten Antikörpers wurden die T-Zellen durch eine Stimulation dazu angeregt, diese Marker deutlicher zu exprimieren. Die stimulierten Zellen wurden als Positiv-Kontrollen in den Homing-Rezeptor-Test in der Fluorescence-minus-one (vgl. Kapitel 3.1.2.) eingesetzt. In der FMO wurde die Grenze zwischen Rezeptor-positiven und -negativen T-Zellen festgelegt (Tung et al., 2004b).

Für eine effiziente und praktikable Lösung wurden verschiedene Methoden der T-Zell-Stimulation geprüft. Es wurden Stimulationen mit anti-CD3 / anti-CD28, Phorbol Myristinsäure (PMA) / Ionomycin und Vitamin D3 sowie eine gemischte Leukozytenreaktion getestet. Insgesamt zeigte die Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 die besten Ergebnisse (vgl. Kapitel 3.1.2.). So konnten die Marker CD25, CD69, $\alpha 4$ und αE sowohl auf zytotoxischen als auch auf T-Helfer-Zellen hoch reguliert werden. Bei den anderen getesteten Stimulationsmethoden konnten zum Teil deutlich weniger Oberflächenmarker zur Expression angeregt werden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist die hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, die etwa bei der gemischten Leukozytenreaktion und der Stimulation mit Vitamin D3 nicht in diesem Maße gegeben war. Auch die einfache Durchführbarkeit und der verhältnismäßig geringe zeitliche Aufwand im Vergleich mit aufwändigeren Methoden, wie etwa der Stimulation mit Vitamin D3, waren ausschlaggebend für den Einsatz dieser Methode.

Die Stimulation mit PMA / Ionomycin stellte zwar ebenfalls eine einfach durchzuführende Methode dar. Allerdings kam es hierbei mit zunehmender Stimulationsdauer zu einer Reduktion der CD3+CD8+ T-Zell-Population. Möglicherweise sind diese Zellen durch die starke Stimulation abgestorben. Zudem ist die Stimulation von T-Zellen mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 eine physiologische Aktivierungsmethode. So können Antikörper gegen CD3 eine T-Zell-Antwort induzieren, die einer Antigen-induzierten Aktivierung entspricht. CD28

fungiert hierbei als Kostimulationsrezeptor. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung der T-Zellen mittels PMA / Ionomycin über eine direkte Erhöhung von freiem intrazellulärem Kalzium und einer Aktivierung (Translokation) der Proteinkinase C (Nau et al., 1988).

Ein Nachteil der Verwendung stimulierter Zellen war der zusätzliche Aufwand. Die Zellen mussten je nach Bedarf neu stimuliert werden. Der größte Nachteil der Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 war, dass der Stimulationsantikörper anti-CD3 die gleiche Bindungsstelle besetzt wie der für die später durchgeführte Messung eingesetzte Fluoreszenz-markierte CD3-Antikörper. Wurden die Zellen nach der Stimulation mit anti-CD3 gefärbt, erschienen viele T-Zellen falsch-negativ, da die CD3-Bindungsstellen schon besetzt waren. Dieser Effekt spielte vor allem bei kurzen Stimulationen < 24h eine Rolle. Mit zunehmender Proliferationsdauer der T-Zellen entstanden zahlreiche neue T-Zellen, die auch in der Durchflusszytometrie wieder CD3-positiv waren.

Die Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 erwies sich letztendlich als die für Positiv-Kontrollen am besten geeignete Methode, mit der Oberflächenmarker auf T-Zellen zuverlässig und mit überschaubarem Aufwand zur Expression gebracht werden konnten. Daher wurde sie für den Test zur Analyse der Oberflächenmarker auf T-Zellen eingesetzt.

4.2. Messstabilität des Durchflusszytometers

Die Fluoreszenz-Intensität der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe APC, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy7 und PerCP-Cy5.5 wurde über den Messzeitraum mit Hilfe von standardisierten Fluoreszenz-markierten Partikeln analysiert. Dadurch konnten die natürlich vorkommenden Schwankungen der gemessenen Fluoreszenz reduziert werden (vgl. Kapitel 3.2.)⁵. Ein wesentlicher Vorteil des Einsatzes von Fluoreszenz-markierten Beads war die Kontrolle und die gegebenenfalls mögliche Anpassung von Laser-Power-Schwankungen. Zu Beginn jeder Durchflusszytometrie-Messung konnte zudem auf

⁵ Durchflusszytometer der neuesten Generation haben inzwischen einen standardisierten internen Algorithmus, der die Messstabilität über einen größeren Zeitraum garantieren soll.

einen Blick die Einsatzbereitschaft aller Laser sowie des Flüssigkeitssystems des Durchflusszytometers (Fluidics System) überprüft werden.

Gelegentlich auftretende Fehler bei der Messung mit dem Durchflusszytometer waren der vorübergehende Ausfall eines Lasers bzw. eine drohenden Verstopfung des Durchflusszytometers, die sich etwa durch eine diskontinuierliche Aufnahme der Proben andeutete. Mit Hilfe der Fluoreszenz-markierten Partikel konnte die Überprüfung aller wichtigen Funktionen des Durchflusszytometers erfolgen, ohne dass bereits Zellen der Probe verwendet werden mussten. Die standardmäßige Verwendung von Fluoreszenz-Beads war daher hilfreich und sinnvoll für die Messungen.

Die eingeschränkte Vergleichbarkeit von Messdurchgang 1 und 2 (vgl. Kapitel 3.3. statistische Auswertung) könnte auf die Verwendung zweier separat hergestellter Antikörpercocktails in den beiden Messdurchgängen zurückzuführen sein. Weitere Gründe könnten unter anderem die unterschiedliche Anzahl von zum Teil deutlichen Ausreißern bzw. die relativ geringe Zahl von 9 bzw. 12 Probanden bezogen auf die hohe Anzahl von acht Messtagen sein. Dies ist möglicherweise auch der Grund, warum in vergleichbaren Studien stets nur Einzelmessungen an den Probanden durchgeführt wurden (siehe unten).

4.3. Interpretation und Vergleich der Ergebnisse mit publizierten Studien

Um die Darstellung zu vereinfachen, werden Daten von Vergleichsstudien aus der Literatur mit den Ergebnissen dieser Arbeit aus Messdurchgang 1 verglichen (siehe auch statistische Auswertung, Kapitel 3.3.). Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit der Literatur wird dadurch eingeschränkt, dass die Ergebnisse mit verschiedenen statistischen Maßen angegeben werden. In der Literatur findet sich die uneinheitliche Verwendung von arithmetischem Mittel mit bzw. ohne Standardabweichung oder Standardfehler sowie Median mit Bandbreite (Range). Für die Beurteilung und den Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es daher wichtig diese Unterschiede zu berücksichtigen (Koschack, 2008). Um den Vergleich zu erleichtern, werden daher jeweils die gleichen statistischen Maße für die eigenen Ergebnisse wie in der entsprechenden Referenzstudie angegeben.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse entweder als Durchschnitt mit Standardabweichung oder als Median mit Range angegeben. Die Expressionsraten der untersuchten Homing-Rezeptoren beziehen sich jeweils auf T-Lymphozyten im peripheren Blut gesunder Spender.

CCR1

Lichterfeld et al. (2002) geben in ihrer Studie mit 12 gesunden Blutspendern einen Median für den Anteil CD4+CCR1+ T-Zellen im peripheren Blut von 2,0% an. Für CCR1 auf CD8+ Zellen geben sie einen Median von 12% an. In der vorliegenden Arbeit liegt dieser Wert für T-Helfer-Zellen im Median bei 25,3% mit einer Bandbreite von 0,9% – 36,2%. Für zytotoxische T-Zellen ergibt sich 20,6% mit einer Bandbreite von 0,8% – 31,9%. Die höheren Expressionsraten für CCR1 sowohl auf T-Helfer als auch zytotoxischen T-Zellen in der vorliegenden Arbeit könnten durch die Verwendung eines anderen Antikörperklons im Vergleich mit der Studie von Lichterfeld et al. verursacht sein. Außerdem wird in der beschriebenen Studie, anders als in dieser Arbeit, keine Differenzierung von toten und lebenden Zellen unternommen, da lediglich ein drei-Farben-Durchflusszytometer verwendet wird. Mögliche weitere Unterschiede werden in der Zusammenfassung (siehe unten) diskutiert.

CCR2

Islam et al. (2006) berichten in ihrer Studie an 15 Probanden von im Durchschnitt 1,5% CCR2-positiven T-Helfer-Zellen im peripheren Blut gesunder Spender bei einer Standardabweichung von 1,7%. Für CCR2-positiv zytotoxische T-Zellen geben sie durchschnittlich 1,6% und eine Standardabweichung von 1,8% an. Connor et al. (2004) finden in ihrer Studie mit 11 gesunden Spendern auf T-Helfer-Zellen ähnliche Ergebnisse (Median: 2,5%, Range 1,1% – 28,8%). Diese Befunde lassen sich gut mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit vereinbaren. Hier sind im Durchschnitt 3,5% der T-Helfer-Zellen CCR2-positiv. Es findet sich eine Standardabweichung von 1,3%. Für zytotoxische T-Zellen sind durchschnittlich 1,9% CCR2-positiv bei einer Standardabweichung von 1,3%.

CCR4

Für den Fall CCR4 stimmen die Ergebnisse von Islam et al. (2006) ebenfalls gut mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit überein. Islam et al. finden eine Expressionsrate von 25,8% und eine Standardabweichung von 9,2% für T-Helfer-Zellen. Eine Studie von Ferenczi et al. (2002) mit 11 Probanden ergibt mit durchschnittlich 28% ein ähnliches Ergebnis. In der vorliegenden Arbeit sind im Durchschnitt 28,0% der T-Helfer-Zellen CCR4-positiv. Die Standardabweichung liegt bei 5,9%.

Unterschiede lassen sich jedoch auf zytotoxischen T-Zellen feststellen. Islam et al. berichten über durchschnittlich 5,6% mit einer Standardabweichung von 4,5%. Ferenczi et al. geben einen deutlich höheres arithmetisches Mittel von 33% an. Diese Ergebnisse stehen außerdem im Kontrast zu zwei weiteren Studien, die nur eine marginale Expression von CCR4 auf CD8⁺ T-Zellen nachweisen können (Norii et al., 2006, Perera et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit sind im Durchschnitt 16,0% der zytotoxischen T-Zellen CCR4-positiv. Die Standardabweichung liegt bei 5,8%. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liegen damit zwischen den Befunden von Islam et al. und Ferenczi et al.

Die Unterschiede könnten im Zusammenhang mit der vergleichsweise niedrigen Probandenzahl der Vergleichstudien von 8 – 15 gesunden Spendern stehen. Die Expression der Rezeptoren wurde zudem nur in einem einzelnen Experiment gemessen. Bei der relativ großen Bandbreite der Expression auf zytotoxischen T-Zellen zwischen 3% – 30% wirkt sich die Probandenzahl deutlich auf die Ergebnisse aus. In der Arbeit von Ferenczi et al. werden die PBMCs vor der Durchflusszytometrie-Analyse mit 1% Paraformaldehyd fixiert. Die Fixierung mit Paraformaldehyd könnte die Ergebnisse beeinflusst haben. Außerdem könnten die unterschiedlichen CCR4-Antikörper-Klone ursächlich für die Divergenz der Befunde verantwortlich sein. Weitere mögliche Unterschiede werden in der Zusammenfassung (siehe unten) ausführlicher diskutiert. Die teils erheblichen Differenzen der verschiedenen Studien unterstreichen die Bedeutung einer genauen Analyse der physiologischen Bandbreite in Gesunden gerade auch für diesen Homing-Rezeptor.

CCR5

In einer Studie mit 26 gesunden asiatischen Probanden von Norii et al. (2006) zeigt sich für CCR5 auf CD4+ T-Zellen eine Expressionsrate von durchschnittlich 22,9% mit einem Standardfehler von 2,2%. Auf zytotoxischen T-Zellen liegt die Expressionsrate bei durchschnittlich 43,2% mit einem Standardfehler von 2,4%. Die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der ungewöhnlichen Angabe des Standardfehlers und der fehlenden Angabe der Standardabweichung von Norii et al. nur eingeschränkt möglich. Die Angabe des Standardfehlers anstelle der Standardabweichung verschleiert die große biologische Variabilität (Koschack, 2008). Der Durchschnitt auf T-Helfer-Zellen liegt in der vorliegenden Arbeit mit 38,7% höher, der Standardfehler mit 0,6% deutlich niedriger als bei Norii et al. Die Ergebnisse für zytotoxische T-Zellen bewegen sich mit Durchschnittlich 38,7% in einer ähnlichen Größenordnung wie bei Norii et al. Der Standardfehler ist jedoch mit 0,5% ebenfalls deutlich geringer.

CCR6

In einer Studie mit 15 gesunden Blutspendern von Eriksson et al. (2003) wird die Expressionsrate von CCR6 auf T-Zellen mit einem Median von 28,5% (Range 20,4% – 39,6%) angegeben. In der vorliegenden Arbeit werden deutlich niedrigere Werte ermittelt. Für T-Helfer-Zellen ergibt sich ein Median von 9,5% (Range 1,2% – 19,1%) und für zytotoxische T-Zellen von 4,9% (Range 0,6% – 13,0). Die Unterschiede könnten in der Verwendung von anderen Antikörper-Klonen begründet sein. Weitere mögliche Unterschiede werden in der Zusammenfassung (siehe unten) diskutiert.

CCR8

Schaerli et al. (2004) beschreiben die Expression von CCR8+ auf T-Zellen im peripheren Blut in ihrer Studie als sehr selten (< 2% auf CD4+ und CD8+ Zellen). Die Expression von CCR8 auf CD4+ T-Zellen liegt in der vorliegenden Arbeit mit einer durchschnittlichen Expressionsrate von 4,9% und einer Standardabweichung von 5,9% im Vergleich zu den Ergebnissen von Schaerli et al. höher. In der vorliegenden Arbeit

fallen zudem sechs deutliche Ausreißer auf (vgl. Abbildung 10, Kapitel 3.3.), die von unterschiedlichen Probanden stammen.

Für CD8+ T-Zellen lässt sich das Ergebnis von Schaerli et al. in der vorliegenden Arbeit mit durchschnittlich 1,9% und einer Standardabweichung von 1,5% gut vereinbaren. Es fallen jedoch zwei Probanden mit deutlichen Ausreißern auf (vgl. Abbildung 9, Kapitel 3.3.).

Die Ausreißer sowohl auf T-Helfer-Zellen als auch auf zytotoxischen T-Zellen sind mitverantwortlich für die höhere Durchschnittsexpression und die vergleichsweise hohe Standardabweichung der Ergebnisse. Diese Probanden zeigten keine Symptome, weswegen sich auf Grundlage der vorliegenden Daten keine gemeinsame Ursache für die Ausreißer ableiten lässt. Dieser interessante Befund wirft die Frage auf, was die Ursache dieser Ausreißer gewesen sein könnte. Denkbar wäre etwa, dass sie Zeichen von schubweise und subklinisch verlaufenden Immunprozessen darstellen. Dies würde die Einsschätzung von Schaerli et al. (2006) stützen, nach der die Funktion von CCR8 in der Regulation des Homings von Lymphozyten in die Haut im „Normal-Zustand“ des Immunsystems besteht. Das Auftreten von einzelnen hohen physiologischen CCR8–Werten bei ansonsten sehr niedriger zeitlich stabiler Expressionsrate in Gesunden stellt eine nicht unerhebliche Schwierigkeit im Bezug auf einen späteren klinischen Test dar. Schaerli et al. machen zwar keine Angaben zur Größe des Probandenguts. In ihrer Studie könnten diese vereinzelt Ausreißer in der Expression von CCR8 jedoch durch eine geringe Anzahl von Probanden nicht aufgefallen sein. Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung von aussagekräftigen Daten von gesunden Probanden für den Vergleich mit Patienten besonders auch für CCR8.

CCR9

Papadakis et al. (2005) beschreiben die CCR9-Expression auf T-Helfer-Zellen als geringe Basisexpression von 2 bis 4%. Jedoch fehlt in ihren Angaben die Anzahl der teilnehmenden Probanden. In der vorliegenden Arbeit ergab sich für T-Helfer-Zellen ein arithmetisches Mittel von 54,0% mit einer Standardabweichung von 7,3%. Für zytotoxische T-Zellen ergab sich im Durchschnitt 41,8% mit einer Standardabweichung von 9,1%. Diese Ergebnisse liegen deutlich über den Befunden von Papadakis et al.

Für CCR9 fällt zudem auf, dass im zweiten Messdurchgang sowohl auf T-Helfer-Zellen als auch auf zytotoxischen T-Zellen eine mit der Zeit abnehmende Expression von CCR9 auftritt. Aus diesem Grund unterscheiden sich auch die mittleren Expressionsraten der beiden Messdurchgänge deutlich (Durchschnitt Durchgang 2, T-Helfer-Zellen: 36,3%, Standardabweichung: 16,5%; zytotoxische T-Zellen 28,0% Standardabweichung 15,9%). Dieser Trend im zweiten Messdurchgang lässt die Aussagekraft bzw. Vergleichbarkeit der Daten aus Durchgang 2 fraglich erscheinen. Eine mögliche Ursache dieses Befundes könnte ein Fehler bei der Zusammenstellung des Antikörpercocktails sein. Denkbar aber eher unwahrscheinlich ist auch eine Reaktion der Antikörper untereinander mit resultierender Fehlfunktion.

CCR10

In einer Studie mit 9 gesunden Spendern finden Fujita et al. (2006) auf CD4+CCR10+ im Durchschnitt 0,9% mit einem Standardfehler von 0,1%. Die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der fehlenden Angabe der Standardabweichung von Fujita et al. nur eingeschränkt möglich. Stattdessen wird in dieser Studie nur der Standardfehler angegeben. In der vorliegenden Arbeit sind im Durchschnitt 2,5% der T-Helfer-Zellen CCR10-positiv. Es ergibt sich ein Standardfehler von 0,1%. Das arithmetische Mittel liegt geringfügig über den Ergebnissen von Fujita et al.

Für die Expression von CCR10 auf zytotoxische T-Zellen konnten trotz intensiver Recherche bei pubmed.gov (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA) auf dem jetzigen Kenntnisstand keine vergleichbaren Studien gefunden werden.

CD25

Für CD25 wurde eine große Bandbreite an Studienergebnissen gefunden. Dieckmann et al. (2001) geben in ihrer Studie an 20 Probanden den Median der Expressionsrate von CD4+CD25+ T-Zellen mit 6% und einer Range von 2,8% – 17,2% an. Eine weitere Studie von Aandahl et al. (2004) an 10 Probanden berichtet über ein arithmetisches Mittel von 23%. In der vorliegenden Arbeit ergibt sich für T-Helfer-Zellen ein Median

von 9,4% mit einer Range von 5,9% – 19,4%. Dieser Wert liegt zwischen den beiden Studien von Dieckmann et al. und Aandahl et al.

Für den Anteil von CD25-positiven zytotoxische T-Zellen ermitteln Wenzel et al. (2005) in ihrer Studie an 18 gesunden Spendern im Durchschnitt 7%. Ostensen et al. (2005) finden in einer Studie mit 8 gesunden Spenderinnen einen Median von 0,4%. In der vorliegenden Arbeit liegt der Median für zytotoxische T-Zellen bei 1,3% mit einer Range von 0,5% – 4,1%. Dieser Wert liegt zwischen den Ergebnissen der beiden Studien von Wenzel et al. und Ostensen et al. Damit liegen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit im Mittelfeld einer großen Bandbreite an Studien in der Literatur.

Stanzani et al. (2004) untersuchen in ihrer Studie Stammzelltransplantate aus dem peripheren Blut von 60 Stammzellspendern für allogene Stammzelltransplantationen. Nach Stimulation mit dem Granulozyten-Kolonie stimulierenden Faktor (G-CSF) werden die Zellen durch Apherese gewonnen und die CD25-Expression auf T-Zellen analysiert. Stanzani et al. (2004) finden einen Median der Expressionsrate auf T-Helfer-Zellen von 7,2% mit einer Range von 0% – 31%) sowie auf zytotoxischen T-Zellen von 0,4% mit einer Range von 0% – 9,5%). Diese Ergebnisse decken sich weitgehend mit den Befunden der Expression von CD25 auf T-Zellen im peripheren Blut gesunder Spender aus der vorliegenden Arbeit, obwohl die untersuchten Zellen mit G-CSF stimuliert und mittels Apherese gewonnen werden.

CD45RA

In einer Studie mit 21 gesunden Spendern finden Pawlik et al. (1997) einen Durchschnitt von 52,1% mit einem Standardfehler von 14,7% CD45RA-positiven T-Helfer-Zellen. Diese Ergebnisse stimmen gut mit den Befunden der vorliegenden Arbeit (Durchschnitt: 61,1%, Standardfehler: 13,4%) überein. Das arithmetische Mittel der Ergebnisse für zytotoxische Zellen liegt in der vorliegenden Arbeit bei 78,9% mit einem Standardfehler von 9,6%. Diese Ergebnisse passen zu den Resultaten einer Studie von Gessl und Waldhausl (1998) mit 27 gesunden Blutspendern. Hier wird ein Durchschnitt von 72,2% mit einer Standardabweichung von 12,1% ermittelt.

CD62L

Nach Batra et al. (2007) sind im peripheren Blut gesunder Spender im Durchschnitt 92,8% der T-Helfer-Zellen CD62L-positiv mit einer Standardabweichung von 1,7%. Für zytotoxische T-Zellen liegt der Durchschnitt bei 72,0% mit einer Standardabweichung von 2,7%. Diese Daten einer Untersuchung an 46 gesunden Probanden liegen über den Befunden in der vorliegenden Arbeit. Hier liegt der Durchschnitt von CD62L-positiven T-Helfer-Zellen bei 81,2% mit einer Standardabweichung von 7,1%. Für zytotoxische T-Zellen ergibt sich ein arithmetisches Mittel von 57,8% mit einer Standardabweichung von 12,6%. Mögliche Gründe für diese Unterschiede werden in der Zusammenfassung (siehe unten) diskutiert.

CD69

Nielsen et al. (1998) finden in ihrer Studie an 8 gesunden Spendern eine durchschnittliche Expression von 10% mit einem Standardfehler von 4% auf T-Helfer-Zellen. Für zytotoxische T-Zellen liegt der Durchschnitt bei 17% mit einem Standardfehler von 5%. Die Vergleichbarkeit dieser Ergebnisse mit der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der fehlenden Angabe der Standardabweichung von Nielsen et al. nur eingeschränkt möglich. Es fällt zudem ein im Vergleich mit anderen Studien sehr hoher Standardfehler auf. Ein weitere Studie von Gessl und Waldhausl (1998) mit 26 gesunden Spendern beschreibt ebenfalls eine vergleichbare Expression von CD69 auf CD4+ (Durchschnitt: 13,8%, Standardabweichung: 9,9%) und CD8+ (Durchschnitt: 17,0%, Standardabweichung: 10,2%) T-Zellen. Auffällig ist dabei jedoch die relativ hohe Standardabweichung.

In der vorliegenden Arbeit wird für CD69 eine geringe Basisexpression mit einem arithmetischen Mittel von 0,7% auf T-Helfer-Zellen mit einem Standardfehler von 0,03% festgestellt. Für zytotoxische T-Zellen liegt der Durchschnitt bei 1,5% mit einem Standardfehler von 0,1%. Diese Werte liegen bezogen auf das arithmetische Mittel deutlich unter den von Nielsen et al. sowie Gessl und Waldhausl beschriebenen Daten. Die Ergebnisse von Nielsen et al. und Gessl und Waldhausl fallen jedoch beide durch eine große Streuung der Ergebnisse auf.

Nielsen et al. berichten weiterhin über ein Kontinuum zwischen positiver und negativer Fraktion des eingesetzten Antikörpers. Der in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Antikörper zeigte nach Titration und im stimulierten Zustand eine deutliche Trennung der Populationen. Durch eine Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 ließen sich T-Zellen außerdem zu einer deutlichen Steigerung der Expression von CD69 anregen (vgl. Abbildung 7, Kapitel 3.1.2.). Diese Befunde sprechen gegen eine Dysfunktion des in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Antikörpers. Außerdem wurden die PBMCs von Nielsen et al. vor der Messung mit CellFix (BD Bioscience, San Jose, USA) fixiert. Daher konnten tote Zellen nicht ausgeschlossen werden. Weitere mögliche Unterschiede werden in der Zusammenfassung (siehe unten) diskutiert.

CLA

Yano et al. (2002) untersuchten 25 gesunde Probanden auf die Expression von CLA auf T-Zellen. In ihrer Studie berichten sie für T-Helfer-Zellen über einen Durchschnitt von 4,7% mit einer Standardabweichung von 1,5%. In der vorliegenden Arbeit finden sich für den Anteil CLA-positiver T-Helfer-Zellen im Durchschnitt 12,0% mit einer Standardabweichung von 3,0%. Diese Ergebnisse liegen über den Werten von Yano et al. Der Unterschied könnte in der Verwendung von unterschiedlichen Antikörperklonen bzw. der Titration der Antikörper begründet sein. Mögliche weitere Unterschiede werden in der Zusammenfassung (siehe unten) diskutiert.

Für zytotoxische T-Zellen ergibt sich bei Yano et al. ein Durchschnitt von 1,6% mit einer Standardabweichung von 0,6%. Die Expressionsrate von CLA auf CD8-positiven Zellen im peripheren Blut wird von Picker et al. (1990b) mit 5-10% angegeben. In der vorliegenden Arbeit exprimieren zytotoxische T-Zellen CLA im Durchschnitt zu 4,8% mit einer Standardabweichung von 2,7%. Die Durchschnittsexpression von CLA in der vorliegenden Arbeit liegt damit im Mittelfeld zwischen den beiden Studien von Yano et al. und Picker et al.

CLA gilt als Haut-Homing-Rezeptor. Grund hierfür ist unter anderem, dass die große Mehrheit der T-Zellen in der Haut CLA exprimiert (Picker et al., 1990a). Ein Proband, der in dieser Arbeit an einem respiratorischen Infekt erkrankt war, zeigte auf zytotoxischen T-Zellen einen um das 5-fache erhöhten Wert für CLA (vgl. Abbildung 9,

Kapitel 3.3.). Dieser Befund wirft die interessante Frage auf, ob die Rolle von CLA über seine bisher angenommene Bedeutung als Homing-Rezeptor der Haut hinausgeht.

CXCR1

Francis et al. (2004) geben in ihrer Studie mit 10 gesunden Blutspendern den durchschnittlichen Anteil von CXCR1+CD4+ T-Zellen mit 4,3% und eine Standardabweichung von 0,8% an. Für zytotoxische T-Zellen ermitteln sie eine Expressionsrate mit im Durchschnitt 46,22% bei einer Standardabweichung von 5,4%. In der vorliegenden Arbeit exprimierten die T-Helfer-Zellen von Gesunden den Chemokin-Rezeptor CXCR1 im Durchschnitt zu 4,8% mit einer Standardabweichung von 1,4%. Die Werte von CXCR1 auf T-Helfer-Zellen stimmen damit gut mit den Ergebnissen von Francis et al. überein. Für zytotoxische T-Zellen liegt der Durchschnitt bei 23,3% mit einer Standardabweichung von 7,3%. Dieser Wert liegt deutlich unter den Ergebnissen von Francis et al. Mögliche Unterschiede werden in der Zusammenfassung (siehe unten) diskutiert.

Die Studie von Francis et al. untersucht die CXCR1-Expression auf T-Zellen von Patienten mit einer allergischen Rhinitis im Vergleich mit Gesunden. Durchschnittlich waren 9,4% der T-Helfer-Zellen von betroffenen Patienten CXCR1-positiv. In der vorliegenden Arbeit erkrankte ein Proband ebenfalls an einer allergischen Rhinitis. Er liegt mit durchschnittlich 10,9% CXCR1-positiver Zellen während des Erkrankungszeitraums in einer ähnlichen Größenordnung. Nach dem Beginn einer Behandlung mit Ceterizin kam es zu einem initialen Absinken seiner CXCR1-Werte. Unter fortgesetzter Medikation stiegen die Werte allerdings wieder auf das Ausgangsniveau an. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in einer Zunahme der entzündlichen Aktivität oder in der Dosierung der Medikation liegen. Übereinstimmend mit dieser Arbeit konnte im Bezug auf die allergische Rhinitis für CXCR1 auf zytotoxischen T-Zellen keine Unterschiede zu Gesunden festgestellt werden.

CXCR2

Der mit CXCR1 nah verwandte Chemokin-Rezeptor CXCR2 wird in einer Studie von Francis et al. (2004) auf T-Helfer-Zellen im Durchschnitt zu 16,3% exprimiert. Die

Standardabweichung liegt bei 3,4%. In der vorliegenden Arbeit liegt der Durchschnitt der CXCR2-Expression deutlich unter diesem Wert bei 4,6% mit einer Standardabweichung von 2,1%. Der Unterschied könnte etwa auf die Verwendung eines anderen Antikörper-Klons zurückzuführen sein. Für eine ausführlichere Diskussion der möglichen Unterschiede siehe auch Zusammenfassung.

Für CXCR2 auf zytotoxischen T-Zellen sind zum jetzigen Kenntnisstand keine vergleichbaren Studien bekannt.

CXCR3

In einer Studie an 26 gesunden, asiatischen Probanden von Norii et al. (2006) zeigt sich für CXCR3 auf CD4+ T-Zellen im peripheren Blut eine Expressionsrate von im Durchschnitt 32,8% mit einem Standardfehler von 1,9%. Auf zytotoxischen T-Zellen lag die durchschnittliche Expressionsrate bei 57,0% mit einem Standardfehler von 3,7%. Der Vergleich dieser Befunde mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist aufgrund der fehlenden Angabe der Standardabweichung von Norii et al. nur bedingt möglich. Anstelle der Standardabweichung geben Norii et al. den Standardfehler an.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auf T-Helfer-Zellen lassen sich mit durchschnittlich 36,6% und einem Standardfehler von 0,6% im wesentlichen gut mit den Befunden von Norii et al. vereinbaren. Im Vergleich dazu zeigt sich in der vorliegenden Arbeit für zytotoxische T-Zellen eine geringfügig niedrigere Expressionsrate von 40,7% mit einem Standardfehler von 0,7%. Aufgrund der fehlenden Standardabweichung in der Studie von Norii et al. lassen sich diese Ergebnisse jedoch nur eingeschränkt vergleichen.

Integrin $\alpha 4 / \beta 7$

Batra et al. (2007) untersuchen die Koexpression von $\alpha 4 / \beta 7$ auf T-Zellen. Auf T-Helfer-Zellen sind im Durchschnitt 41,7% der Zellen positiv für beide T-Zell-Oberflächenmarker. Die Standardabweichung beträgt 3,2%. Zytotoxische T-Zellen koexprimieren $\alpha 4 / \beta 7$ zu 56,9% mit einer Standardabweichung von 5,2%. Studien, die die Expression von Integrin $\alpha 4$ bzw. $\beta 7$ einzeln betrachten, sind zum jetzigen Kenntnisstand nicht bekannt.

In der vorliegenden Arbeit liegt das arithmetische Mittel der Expressionsrate von Integrin $\alpha 4$ auf T-Helfer-Zellen bei 50,8% mit einer Standardabweichung von 5,3%. Für Integrin $\beta 7$ liegt diese Werte bei 39,5% bzw. 7,1%. Integrin $\alpha 4$ wird von zytotoxischen T-Zellen im arithmetischen Mittel zu 75,9% mit einer Standardabweichung von 6,9% exprimiert. Integrin $\beta 7$ wird im Durchschnitt zu 42,6% mit einer Standardabweichung von 6,7% exprimiert.

Integrin αE (CD103)

Attig et al. (2009) geben für Integrin αE in ihrer Studie an 20 gesunden Spendern eine durchschnittliche Expressionsrate von 1% auf T-Helfer-Zellen an. Für zytotoxische T-Zellen werden durchschnittlich 2,7% angegeben. Die Daten in der vorliegenden Arbeit liegen übereinstimmend ebenfalls in dieser Größenordnung. T-Helfer-Zellen sind im Durchschnitt zu 0,6% CD103-positiv bei einer Standardabweichung von 0,3%. Für zytotoxische Zellen ergeben sich durchschnittlich 1,7% mit einer Standardabweichung von 1,0%.

LTB4R1 (BLT1)

In einer Studie mit 15 gesunden Spendern untersuchen Islam et al. (2006) die BLT1-Expression auf PBMCs im peripheren Blut. BLT1 ist nach ihren Angaben auf einer kleinen Population von CD3+CD4+ T-Zellen (Durchschnitt: 0,42%, Standardabweichung: 0,49%) und CD3+CD8+ T-Zellen (Durchschnitt: 0,69%, Standardabweichung: 0,44%) als Basisexpression vorhanden. Dieses Resultat lässt sich in der vorliegenden Arbeit gut reproduzieren. Die Expressionsrate von LTBR1 auf T-Helfer-Zellen wird hier mit durchschnittlich 0,8% und einer Standardabweichung von 0,3% angegeben. Für zytotoxische T-Zellen ergibt sich ein arithmetisches Mittel von 0,9% mit einer Standardabweichung von 0,5%.

Zusammenfassung

Die Expressionsraten der in dieser Arbeit untersuchten Homing-Rezeptoren auf humanen T-Lymphozyten im peripheren Blut stimmen in der Mehrzahl gut mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen überein (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse mit publizierten Studien⁶.

	T-Helfer-Zellen	Zytotoxische T-Zellen
Weitgehende Übereinstimmung	CCR2 CCR4 CCR8 CCR10 CD25 CD45RA CXCR1 CXCR3 Integrin α E LTB4R1	CCR2 CCR5 CCR8 CD25 CD45RA CD62L CLA Integrin α E LTB4R1
Geringe Unterschiede	CCR5 CD62L	CCR1 CXCR3
Deutliche Unterschiede	CCR1 CCR6 CCR9 CD69 CXCR2 CLA	CCR4 CCR6 CCR9 CD69 CXCR1

Einige Rezeptoren zeigen jedoch auch deutliche Unterschiede in der Expression. Diese lassen sich zum Teil durch Unterschiede in Material und Methoden wie etwa verschiedene Antikörperklone, Typ des Durchflusszytometers, Aufbereitung der PBMCs, Alter, Anzahl und Ethnie der Probanden oder Dauer des untersuchten Messzeitraums erklären. Aufgrund der Vielzahl von kommerziell angebotenen Antikörpern finden sich nur selten übereinstimmende Antikörperklone in den Vergleichsstudien. Unterschiede der Ergebnisse könnten auf marginale Unterschiede am Bindeorte der verschiedenen Antikörper zurückzuführen sein. Vor allem bei den älteren

⁶ Weitgehende Übereinstimmung = Übereinstimmung unter Berücksichtigung von Mittelwert und Standardabweichung, Geringe Unterschiede = Unterschiede im Mittelwert < 50%, Deutliche Unterschiede = Unterschiede im Mittelwert \geq 50%. Für CCR10 und CXCR2 auf zytotoxischen T-Zellen sowie Integrin α 4 / β 7 liegen zum derzeitigen Zeitpunkt keine vergleichbaren Daten aus publizierten Studien vor.

Studien werden Durchflusszytometrie-Modelle mit geringerer Farbenanzahl verwendet. In diesen Studien wurde aufgrund der eingeschränkten Messmöglichkeiten oft auf eine Differenzierung zwischen toten und lebenden Zellen verzichtet. Da tote Zellen unspezifisch Antikörper aufnehmen, kann es dadurch zu einer Verzerrung der tatsächlichen Antikörperbindung kommen (Tung et al., 2007).

Einige Studien fixierten die Zellen vor der durchflusszytometrischen Analyse zum Beispiel mit Paraformaldehyd. Hier kann ebenfalls keine Trennung zwischen lebenden und toten Zellen erfolgen, mit den oben beschriebenen Problemen. Zusätzlich könnten die Fixantien durch die Erzeugung von Autofluoreszenz der Zellen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse haben (Tokumasu und Dvorak, 2003).

Bei der Literaturrecherche fällt zudem auf, dass viele Studien meist nur kleine Kontrollgruppen zwischen 2 und 27 gesunden Spendern verwenden. Außerdem handelt es sich dabei fast ausschließlich um Einzelmessungen. Dagegen wurde in dieser Arbeit das Expressionsprofil der Homing-Rezeptoren auf T-Zellen von 21 Probanden an acht Messtagen über einen Zeitraum von drei Wochen analysiert. Im Vergleich zu vielen Studien konnten daher deutlich mehr Datensätze erhoben werden. Das Problem kleiner Probandengruppen ist, dass Ausreißer einen großen Einfluss auf die Ergebnisse der durchschnittlichen Expression eines Homing-Rezeptors haben. Außerdem ist die Schwankungsbreite der Ergebnisse breiter. Die Unterschiede in den durchschnittlichen Expressionsraten verschiedener Studien etwa bei CCR8 verdeutlichen die Problematik von kleinen Probandengruppen. So lassen sich in der vorliegenden Arbeit bei einigen Oberflächenmarkern, wie etwa CCR8, Hinweise auf das physiologische Vorkommen von gelegentlichen aber deutlichen Ausreißern erkennen (Vgl. Abbildung 10, Kapitel 3.3.). Für einen klinischen Test ist dies eine entscheidende Information, um falschpositiven Ergebnissen vorzubeugen. In vorangegangenen Studien sind diese möglicherweise aufgrund der geringen Anzahl an Datensätzen nicht erkannt worden.

Der Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Studien verdeutlicht den potentiellen Einfluss von eingesetztem Material und angewandten Methoden auf die Messergebnisse. Dies unterstreicht die Bedeutung einer soliden Analyse der physiologischen Bandbreite in Gesunden als Grundlage für einen klinischen Test.

4.4. Zur Methode

Durchflusszytometrie

Für die Messung der Expressionsrate der Oberflächenmarker wurde die multiparameter-Durchflusszytometrie eingesetzt. Für die Analyse von Homing-Rezeptoren kommen jedoch eine Reihe weiterer Verfahren wie etwa quantitative Real-time Polymerase Kettenreaktion (PCR), Zytologie, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder Immunfluoreszenzfärbungen in Frage.

Ein zentraler Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass im Gegensatz zu RNA-Verfahren die reale Expression der Oberflächenmarker erfasst wird. Die Fluoreszenz-markierten Antikörper binden nur die tatsächlich exprimierten Marker auf den untersuchten Zellen. Dies ermöglicht im Vergleich mit alternativen Methoden eine genauere Analyse der tatsächlich exprimierten Homing-Rezeptoren. Bei alternativen Verfahren könnten etwa fälschlicherweise Rezeptoren in internalisierten Vakuolen mitgemessen werden. RNA-Verfahren sind zwar sehr spezifisch. Eine tatsächliche Expression des Oberflächenmarkers kann mit dieser Methode jedoch nicht nachgewiesen werden, da eine Messung der transkribierten RNA und nicht der translatierten Proteine erfolgt. Zusätzlich muss bei der Messung von Transkriptionsprofilen die unterschiedliche Stabilität und Translationseffizienz für verschiedene RNA-Moleküle berücksichtigt werden.

Ein großer Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass das Rezeptorprofil jeder einzelnen Zelle und somit auch von eng definierten Zellpopulationen erfasst werden kann. Die Kombination von mehreren Fluoreszenz-Farben reduziert die Anzahl von Proben bzw. erlaubt mehr Tests pro Probe. Durch die Verwendung mehrerer Parameter können mehr T-Zell-Subpopulationen identifiziert werden. Die pro Zelle gewonnene Information steigt überproportional. Neben der Analyse von Subpopulationen können zusätzlich auch intrazelluläre metabolische Analysen, wie etwa die Bestimmung von Kalzium oder DNA und intrazelluläre Proteine, wie etwa Zytokine oder Enzyme, durchgeführt werden. Die multiparameter-Durchflusszytometrie erlaubt ebenfalls eine detaillierte Phänotypisierung von Proben mit geringer Anzahl von Zellen, wie sie etwa in Blutproben von allo-SZT-Patienten kurz nach Transplantation vorkommen (Herzenberg et al., 2002).

Ein weiterer wichtiger Vorteil der Durchflusszytometrie ist die gleichzeitige Messung und Differenzierung von Größe, Granularität und verschiedenen funktionellen Parametern von Zellen. Außerdem erlaubt die durchflusszytometrische Analyse die Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. Bei anderen Messverfahren, etwa bei einer PCR-Analyse, ist dies nicht der Fall.

Methodenbedingter Nachteil der Durchflusszytometrie ist jedoch, dass keine retrospektive Auswertung des Probandenmaterials möglich ist. Die Blutzellen müssen in der Regel direkt nach der Aufbereitung analysiert werden, um aussagekräftige Resultate zu erhalten. Zudem ist die Auswertung der Durchflusszytometrie-Daten abhängig vom „Faktor Mensch“. Die Vergleichbarkeit der Daten untereinander erfordert ein standardisiertes Auswertungsschema mit eindeutigen Grenzen zwischen positiver und negativer Zellpopulation. Für die Auswertung wurde daher ein standardisiertes Verfahren zur Determinierung dieser Grenze in der Fluoreszenz-minus-one (siehe Kapitel 2.3.3.) festgelegt. Durch die Messung mehrerer Proben mit unterschiedlichen Antikörpercocktails ist auch eine Verschleppung von gefärbten Zellen von einer Probe zur nächsten möglich. Dies kann zu falsch positiven Ergebnissen führen, wenn etwa stark gefärbte Zellen eines häufig vorkommenden Antikörpers in die Folgeprobe verschleppt werden, in der ein selten vorkommender Antikörper der selben Fluoreszenzfarbe analysiert wird. Um die Verschleppung von Zellen einzudämmen, wurden in dieser Arbeit daher zehn Spülungsproben integriert. Schließlich ist die Durchflusszytometrie mit vergleichsweise hohen Materialkosten sowohl für das Messgerät als auch für die eingesetzten Antikörper verbunden.

Dennoch überwiegen auch im Vergleich mit anderen möglichen Methoden zur Analyse von Homing-Rezeptoren auf T-Lymphozyten, wie etwa einer PCR oder der Zytologie, die Vorteile der Durchflusszytometrie. Diese Methode eignet sich aus den genannten Gründen sehr gut, um die Homing-Rezeptor-Expression auf humanen T-Zellen im peripheren Blut zu untersuchen. Die Alternativmethoden würden sich jedoch grundsätzlich zur Validierung der Ergebnisse sowie für zusätzliche und unterstützende Untersuchungen bei speziellen Fragestellungen eignen. Aus diesem Grund wurden für spätere retrospektive Analysen auch Zell- und Serumproben tief gefroren bzw. Zytospins erstellt (vgl. Kapitel 2.3.3.).

Messzeitpunkte

Die Migration aktivierter T-Lymphozyten verläuft in Schüben, was insbesondere auch auf T-Zellen in einer aGVHD zutrifft (Beilhack et al., 2005, Wysocki et al., 2005). Für einen klinischen Test ist es daher wichtig, die spezifische T-Zell-Dynamik einer aGVHD zu kennen. Würden die T-Zellen zu definierten Zeitpunkten nach einer allo-SZT auswandern, könnte man selektiv an diesen Tagen die Expression der Oberflächenmarker untersuchen. In klinisch relevanten Mausmodellen ließen sich bereits potenzielle Messzeitpunkte erkennen, an die der Homing-Rezeptor Test adaptiert wurde. Es ist jedoch noch ungeklärt, in wie weit sich die Dynamik der T-Zell-Migration in Mäusen spezieübergreifend auf den Menschen übertragen lässt. Diese Frage soll eine im Anschluss an diese Arbeit begonnene klinische Studie untersuchen.

Stichprobe

Die in der Studie untersuchte Stichprobe aus freiwilligen Blutspendern setzt sich aus organisatorischen Gründen vor allem aus jungen gesunden Studenten und Berufstätigen zusammen. Dies entspricht offensichtlich nicht der genauen Zusammensetzung des durchschnittlichen allo-SZT-Kollektivs. Daher stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf stammzelltransplantierte Patienten. Der Altersdurchschnitt der an dieser Studie beteiligten Probanden lag bei 24,9 Jahren. Dies liegt unter dem Durchschnittsalter stammzelltransplantierten Patienten von ca. 40 Jahren (Bartsch et al., 2001). Theoretisch könnten sich zwischen diesen beiden Gruppen relevante Unterschiede zeigen. Denkbar wäre eine mit zunehmendem Alter veränderte Homing-Rezeptor-Expression, etwa durch eine verminderte Zahl naiver T-Zellen. Im Alter reduziert sich die Leistungsfähigkeit des Immunsystems. Hieraus resultiert eine erhöhte Empfänglichkeit für Infektionen und Tumoren (McElhaney et al., 1998, Nagami und Yoshikawa, 1984). Weiterhin zeigt sich eine Beeinträchtigung der Selbst-Toleranz des Immunsystems durch ein mit dem Alter zunehmendes Auftreten von Autoimmunerkrankungen. Douek et al. (1998) und Haynes et al. (2000) zeigen eine Abnahme der Anzahl naiver CD45RA⁺ T-Zellen im Alter (Douek et al., 1998, Haynes et al., 2000).

Im Rahmen von Vorxperimenten wurde auch das Expressionsmuster von Oberflächenmarkern auf T-Zellen einer 80-jährigen Probandin untersucht. Bis auf eine geringfügig niedrigere Expression von CD45RA+ T-Zellen ließen sich jedoch keine relevanten Unterschiede im Vergleich mit dem untersuchten Probandenkollektiv finden. Dieser Befund könnte ein Hinweis darauf sein, dass es keine ausgeprägten altersabhängigen Veränderungen der Homing-Rezeptor-Expression gibt. Weitere Untersuchungen müssten diese Frage jedoch noch genauer analysieren.

4.5. Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines Bluttests, mit dem das Homing-Rezeptor-Profil von humanen T-Zellen analysiert werden kann, sowie die Evaluierung der physiologischen Rezeptor-Expression in gesunden Probanden. Dieses Projekt soll dazu beitragen, zuverlässig und effizient eine drohende aGVHD vorhersagen und von einer Infektionskomplikation unterscheiden zu können. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit wurde am Universitätsklinikum Würzburg eine prospektive klinische Studie an allo-SZT Patienten begonnen. Derzeit stellt eine allo-SZT für bestimmte Erkrankungen, wie etwa die chronisch lymphatische Leukämie, den einzigen kurativen Therapieansatz dar. Aufgrund ihrer potenziell tödlichen Komplikationen wird sie jedoch nur eingeschränkt eingesetzt. Eine durch einen prädiktiven Test verbesserte Vorhersage bzw. Differenzierung dieser beiden schweren Komplikationen könnte zu einem breiteren Einsatz der allo-SZT führen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten aber auch für weitere Krankheitsbilder interessant sein, da T-Lymphozyten wichtige Elemente des Immunsystems sind und Homing-Rezeptoren eine zentrale Rolle bei der Migration von T-Lymphozyten spielen. Auch in diesem Projekt ergaben sich Hinweise auf das Potenzial von Homing-Rezeptoren als prognostische Marker bei Krankheitsprozessen. So konnte etwa bei zwei Probanden, die während der Studie an einer allergischen Rhinitis bzw. einem schweren akut respiratorischen Infekt erkrankten, dynamische Änderungen des Homing-Rezeptor-Profiles im Vergleich mit Gesunden gezeigt werden. Es könnte daher sehr interessant sein in weiteren Studien zu prüfen, inwieweit die Homing-Rezeptor-Expression im Rahmen von klinischen Tests bei bestimmten Krankheitsbildern für die Diagnostik geeignet ist.

Besonders interessant wäre die Identifizierung krankheitsspezifischer Homing-Rezeptor-Phänotypen auf T-Zellen. Diese könnten etwa für die Fokussuche bei Infektionskrankheiten hilfreich sein. Auch für weitere Erkrankungen mit Beteiligung von T-Lymphozyten, wie etwa Diabetes mellitus Typ I, könnten die Ergebnisse dieser Arbeit relevant sein. Von besonderem Interesse wäre hierbei die Evaluierung weiterer organspezifischer Homing-Rezeptoren, etwa für das Pankreas. Denkbar wäre auch ein Einsatz eines klinischen Tests in der Prävention oder Therapieregime gegen Zielproteine auf T-Zellen.

5. Zusammenfassung

Dieses Projekt soll zur Entwicklung eines Bluttests beitragen, um bei allogenen stammzelltransplantierten (allo-SZT) Patienten eine drohende akute Graft-versus-Host Disease (aGVHD) vorhersagen und von einer Infektionskomplikation unterscheiden zu können. Die aGVHD und opportunistische Infektionen, wie etwa eine Zytomegalievirus-Infektion, stellen die Hauptrisiken der allo-SZT dar. Eine durch einen prädiktiven Test verbesserte Vorhersage bzw. Differenzierung dieser beiden schweren Komplikationen könnte zu einem breiteren Einsatz der allo-SZT führen.

Eine Reihe von Erkenntnissen lassen die Vermutung zu, dass bestimmte Homing-Rezeptoren auf T-Zellen im peripheren Blut als Marker zur Vorhersage und Differenzierung zwischen einer aGVHD und Infektionskomplikationen dienen könnten. So wurde in Mausmodellen gezeigt, dass die Pathogenese der aGVHD ein streng zeitlich regulierter und organspezifischer Immunprozess ist. Alloreaktive T-Zellen müssen bestimmte Homing-Rezeptoren exprimieren, um in die Zielorgane der aGVHD (Gastrointestinaltrakt, Leber und Haut) einwandern zu können. Die Immunreaktion auf eine Infektion setzt ebenfalls voraus, dass in der adaptiven Immunantwort T-Zellen organ- und entzündungsspezifische Homing-Rezeptoren exprimieren.

Eine zentrale Voraussetzung für einen prospektiven klinischen Test mit allo-SZT Patienten ist die Kenntnis der physiologischen Bandbreite der Oberflächenmarker auf T-Lymphozyten in Gesunden, um diese von pathophysiologischen Veränderungen unterscheiden zu können. Ziel dieser Arbeit war es daher, eine effiziente und zuverlässige Methode zu entwickeln, um das Homing-Rezeptor-Profil von humanen T-Zellen im peripheren Blut analysieren zu können. Dazu wurde ein Durchflusszytometrie-Test mit 25 Oberflächenmarkern etabliert, die eine Rolle in der Pathogenese der aGVHD und bei Infektionen spielen könnten. Mit diesem Test wurde die Expression der Oberflächenmarker von 21 gesunden Probanden an 8 Zeitpunkten über einen Zeitraum von 3 Wochen analysiert.

Die untersuchten Oberflächenmarker lassen sich dabei entsprechend ihrer Expressionsmuster in drei Kategorien einteilen, nämlich (I) zeitlich stabile niedrige, (II) zeitlich stabile hohe und (III) dynamisch schwankende Expression. Aufbauend auf diesen Ergebnissen für gesunde Probanden wurde am Universitätsklinikum Würzburg eine prospektive klinische Studie an aGVHD-Patienten begonnen.

6. Abstract

This project contributes to the development of a blood test to predict acute graft-versus-host disease (aGvHD) and to differentiate it from infectious complications in allogeneic hematopoietic cell transplantation (allo-HCT). aGvHD and opportunistic infections like Cytomegalovirus infections are major risks of allo-HCT. Such a predictive test could bring a major improvement in the prevention and treatment of aGvHD.

The basic idea of this test is that certain homing receptors on peripheral blood T cells could serve as markers to predict and to differentiate between aGvHD and opportunistic infections. This is supported by several empirical findings. It has been recently demonstrated in murine *in vivo* imaging models that aGvHD pathogenesis is an organ specific process that is tightly regulated in time. Alloreactive T cells express certain homing receptors in order to reach the aGvHD target organs (intestinal tract, liver and skin). Also the immune response to an infection requires the expression of specific homing receptors on T cells.

For a prospective clinical test with allo-HCT patients it is important to establish the physiological ranges of T cell surface markers of healthy individuals, to distinguish them from pathological changes. This project intends to establish an efficient and reliable method to analyze the homing receptor profile of human peripheral blood T cells. A multiplex flow cytometry test for cytotoxic and T helper cell subsets was developed to analyze the expression of 25 activation markers, organ specific homing receptors and inflammatory response receptors on human peripheral blood T cells that are likely to play a role in the pathogenesis of aGvHD and infections. With this test the surface marker profile of 21 healthy individuals was analyzed. The peripheral blood mononuclear cells were examined by flow cytometry at 8 points in time within 3 weeks. Preliminary mouse experiments in our group suggested these points in time as critical for subsequent prospective clinical studies.

We found that the surface marker expression on peripheral blood cytotoxic and T helper cells in healthy probands can be subdivided into 3 categories: (I) constant low expression, (II) constant high expression and (III) T cell subsets that dynamically change the expression. These findings for healthy probands form the basis for a recently initiated clinical prospective study with allo-HCT patients at the University Hospital Würzburg.

7. Literaturverzeichnis

- AANDAHL, E. M., MICHAELSSON, J., MORETTO, W. J., HECHT, F. M. & NIXON, D. F. 2004. Human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control T-cell responses to human immunodeficiency virus and cytomegalovirus antigens. *J Virol*, 78, 2454-9.
- AGACE, W. W. 2006. Tissue-tropic effector T cells: generation and targeting opportunities. *Nat Rev Immunol*, 6, 682-92.
- AGACE, W. W., ROBERTS, A. I., WU, L., GREINER, C., EBERT, E. C. & PARKER, C. M. 2000. Human intestinal lamina propria and intraepithelial lymphocytes express receptors specific for chemokines induced by inflammation. *Eur J Immunol*, 30, 819-26.
- ATTIG, S., HENNENLOTTER, J., PAWELEC, G., KLEIN, G., KOCH, S. D., PIRCHER, H., FEYERABEND, S., WERNET, D., STENZL, A., RAMMENSEE, H. G. & GOUTTEFANGEAS, C. 2009. Simultaneous infiltration of polyfunctional effector and suppressor T cells into renal cell carcinomas. *Cancer Res*, 69, 8412-9.
- BATRA, A., SMITH, A. C., FEEHALLY, J. & BARRATT, J. 2007. T-cell homing receptor expression in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*, 22, 2540-8.
- BAZIL, V. & STROMINGER, J. L. 1994. Metalloprotease and serine protease are involved in cleavage of CD43, CD44, and CD16 from stimulated human granulocytes. Induction of cleavage of L-selectin via CD16. *J Immunol*, 152, 1314-22.
- BEILHACK, A. & ROCKSON, S. G. 2003. Immune traffic: a functional overview. *Lymphat Res Biol*, 1, 219-34.
- BEILHACK, A., SCHULZ, S., BAKER, J., BEILHACK, G. F., NISHIMURA, R., BAKER, E. M., LANDAN, G., HERMAN, E. I., BUTCHER, E. C., CONTAG, C. H. & NEGRIN, R. S. 2008. Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood*, 111, 2919-28.
- BEILHACK, A., SCHULZ, S., BAKER, J., BEILHACK, G. F., WIELAND, C. B., HERMAN, E. I., BAKER, E. M., CAO, Y. A., CONTAG, C. H. & NEGRIN, R. S. 2005. In vivo analyses of early events in acute graft-versus-host disease reveal sequential infiltration of T-cell subsets. *Blood*, 106, 1113-22.
- BELPERIO, J. A., KEANE, M. P., ARENBERG, D. A., ADDISON, C. L., EHLERT, J. E., BURDICK, M. D. & STRIETER, R. M. 2000. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*, 68, 1-8.
- BERLIN, C., BARGATZE, R. F., CAMPBELL, J. J., VON ANDRIAN, U. H., SZABO, M. C., HASSLEN, S. R., NELSON, R. D., BERG, E. L., ERLANDSEN, S. L. & BUTCHER, E. C. 1995. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, 80, 413-22.
- BERLIN, C., BERG, E. L., BRISKIN, M. J., ANDREW, D. P., KILSHAW, P. J., HOLZMANN, B., WEISSMAN, I. L., HAMANN, A. & BUTCHER, E. C. 1993. Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell*, 74, 185-95.
- BUTCHER, E. C. & PICKER, L. J. 1996. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, 272, 60-6.
- CAMPBELL, J. J., HARALDSEN, G., PAN, J., ROTTMAN, J., QIN, S., PONATH, P., ANDREW, D. P., WARNKE, R., RUFFING, N., KASSAM, N., WU, L. & BUTCHER, E. C. 1999. The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature*, 400, 776-80.

- CEPEK, K. L., PARKER, C. M., MADARA, J. L. & BRENNER, M. B. 1993. Integrin alpha E beta 7 mediates adhesion of T lymphocytes to epithelial cells. *J Immunol*, 150, 3459-70.
- CEPEK, K. L., SHAW, S. K., PARKER, C. M., RUSSELL, G. J., MORROW, J. S., RIMM, D. L. & BRENNER, M. B. 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature*, 372, 190-3.
- CHAMPLIN, R., KHOURI, I., KORNBLAU, S., MOLLDREM, J. & GIRALT, S. 1999. Reinventing bone marrow transplantation: reducing toxicity using nonmyeloablative, preparative regimens and induction of graft-versus-malignancy. *Curr Opin Oncol*, 11, 87-95.
- CHAMPLIN, R., KHOURI, I., SHIMONI, A., GAJEWSKI, J., KORNBLAU, S., MOLLDREM, J., UENO, N., GIRALT, S. & ANDERLINI, P. 2000. Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol*, 111, 18-29.
- CHOI, S. W., HILDEBRANDT, G. C., OLKIEWICZ, K. M., HANAUER, D. A., CHAUDHARY, M. N., SILVA, I. A., ROGERS, C. E., DEURLOO, D. T., FISHER, J. M., LIU, C., ADAMS, D., CHENSUE, S. W. & COOKE, K. R. 2007. CCR1/CCL5 (RANTES) receptor-ligand interactions modulate allogeneic T-cell responses and graft-versus-host disease following stem-cell transplantation. *Blood*, 110, 3447-55.
- CLARK, R. A., CHONG, B., MIRCHANDANI, N., BRINSTER, N. K., YAMANAKA, K., DOWGIERT, R. K. & KUPPER, T. S. 2006. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. *J Immunol*, 176, 4431-9.
- CONNOR, S. J., PARASKEVOPOULOS, N., NEWMAN, R., CUAN, N., HAMPARTZOUMIAN, T., LLOYD, A. R. & GRIMM, M. C. 2004. CCR2 expressing CD4⁺ T lymphocytes are preferentially recruited to the ileum in Crohn's disease. *Gut*, 53, 1287-94.
- DIECKMANN, D., PLOTTNER, H., BERCHTOLD, S., BERGER, T. & SCHULER, G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, 193, 1303-10.
- DOUEK, D. C., MCFARLAND, R. D., KEISER, P. H., GAGE, E. A., MASSEY, J. M., HAYNES, B. F., POLIS, M. A., HAASE, A. T., FEINBERG, M. B., SULLIVAN, J. L., JAMIESON, B. D., ZACK, J. A., PICKER, L. J. & KOUP, R. A. 1998. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 396, 690-5.
- DUFFNER, U., LU, B., HILDEBRANDT, G. C., TESHIMA, T., WILLIAMS, D. L., REDDY, P., ORDEMANN, R., CLOUTHIER, S. G., LOWLER, K., LIU, C., GERARD, C., COOKE, K. R. & FERRARA, J. L. 2003. Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol*, 31, 897-902.
- EINSELE, H., KAPP, M. & GRIGOLEIT, G. U. 2008. CMV-specific T cell therapy. *Blood Cells Mol Dis*, 40, 71-5.
- ERIKSSON, C., ENESLATT, K., IVANOFF, J., RANTAPAA-DAHLQVIST, S. & SUNDQVIST, K. G. 2003. Abnormal expression of chemokine receptors on T-cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 12, 766-74.
- FERENCZI, K., FUHLBRIGGE, R. C., PINKUS, J., PINKUS, G. S. & KUPPER, T. S. 2002. Increased CCR4 expression in cutaneous T cell lymphoma. *J Invest Dermatol*, 119, 1405-10.
- FERRARA, J. L. & DEEG, H. J. 1991. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 324, 667-74.

- FERRARA, J. L., LEVINE, J. E., REDDY, P. & HOLLER, E. 2009. Graft-versus-host disease. *Lancet*, 373, 1550-61.
- FORSTER, R., DAVALOS-MISLITZ, A. C. & ROT, A. 2008. CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nat Rev Immunol*, 8, 362-71.
- FRANCIS, J. N., JACOBSON, M. R., LLOYD, C. M., SABROE, I., DURHAM, S. R. & TILL, S. J. 2004. CXCR1+CD4+ T cells in human allergic disease. *J Immunol*, 172, 268-73.
- FUJITA, Y., ABE, R., SASAKI, M., HONDA, A., FURUICHI, M., ASANO, Y., NORISUGI, O., SHIMIZU, T. & SHIMIZU, H. 2006. Presence of circulating CCR10+ T cells and elevated serum CTACK/CCL27 in the early stage of mycosis fungoides. *Clin Cancer Res*, 12, 2670-5.
- GERARD, C. & ROLLINS, B. J. 2001. Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2, 108-15.
- GESSEL, A. & WALDHAUSL, W. 1998. Increased CD69 and human leukocyte antigen-DR expression on T lymphocytes in insulin-dependent diabetes mellitus of long standing. *J Clin Endocrinol Metab*, 83, 2204-9.
- GOODARZI, K., GOODARZI, M., TAGER, A. M., LUSTER, A. D. & VON ANDRIAN, U. H. 2003. Leukotriene B4 and BLT1 control cytotoxic effector T cell recruitment to inflamed tissues. *Nat Immunol*, 4, 965-73.
- GRUMELLI, S., CORRY, D. B., SONG, L. Z., SONG, L., GREEN, L., HUH, J., HACKEN, J., ESPADA, R., BAG, R., LEWIS, D. E. & KHERADMAND, F. 2004. An immune basis for lung parenchymal destruction in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. *PLoS Med*, 1, e8.
- GUARDA, G., HONS, M., SORIANO, S. F., HUANG, A. Y., POLLEY, R., MARTIN-FONTECHA, A., STEIN, J. V., GERMAIN, R. N., LANZAVECCHIA, A. & SALLUSTO, F. 2007. L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8+ T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat Immunol*, 8, 743-52.
- GUY-GRAND, D., GRISCELLI, C. & VASSALLI, P. 1978. The mouse gut T lymphocyte, a novel type of T cell. Nature, origin, and traffic in mice in normal and graft-versus-host conditions. *J Exp Med*, 148, 1661-77.
- HAMANN, A., ANDREW, D. P., JABLONSKI-WESTRICH, D., HOLZMANN, B. & BUTCHER, E. C. 1994. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *J Immunol*, 152, 3282-93.
- HAYNES, B. F., MARKERT, M. L., SEMPOWSKI, G. D., PATEL, D. D. & HALE, L. P. 2000. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol*, 18, 529-60.
- HERZENBERG, L. A., PARKS, D., SAHAF, B., PEREZ, O. & ROEDERER, M. 2002. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem*, 48, 1819-27.
- HOLMES, W. E., LEE, J., KUANG, W. J., RICE, G. C. & WOOD, W. I. 1991. Structure and functional expression of a human interleukin-8 receptor. *Science*, 253, 1278-80.
- HOROWITZ, M. M., GALE, R. P., SONDEL, P. M., GOLDMAN, J. M., KERSEY, J., KOLB, H. J., RIMM, A. A., RINGDEN, O., ROZMAN, C., SPECK, B. & ET AL. 1990. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75, 555-62.
- HUDAK, S., HAGEN, M., LIU, Y., CATRON, D., OLDHAM, E., MCEVOY, L. M. & BOWMAN, E. P. 2002. Immune surveillance and effector functions of CCR10(+) skin homing T cells. *J Immunol*, 169, 1189-96.

- ISLAM, S. A., THOMAS, S. Y., HESS, C., MEDOFF, B. D., MEANS, T. K., BRANDER, C., LILLY, C. M., TAGER, A. M. & LUSTER, A. D. 2006. The leukotriene B4 lipid chemoattractant receptor BLT1 defines antigen-primed T cells in humans. *Blood*, 107, 444-53.
- JOHANSSON-LINDBOM, B., SVENSSON, M., WURBEL, M. A., MALISSEN, B., MARQUEZ, G. & AGACE, W. 2003. Selective generation of gut tropic T cells in gut-associated lymphoid tissue (GALT): requirement for GALT dendritic cells and adjuvant. *J Exp Med*, 198, 963-9.
- KERSEY, J. H., WEISDORF, D., NESBIT, M. E., LEBIEN, T. W., WOODS, W. G., MCGLAVE, P. B., KIM, T., VALLERA, D. A., GOLDMAN, A. I., BOSTROM, B. & ET AL. 1987. Comparison of autologous and allogeneic bone marrow transplantation for treatment of high-risk refractory acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*, 317, 461-7.
- KOLLMAN, C., HOWE, C. W., ANASETTI, C., ANTIN, J. H., DAVIES, S. M., FILIPOVICH, A. H., HEGLAND, J., KAMANI, N., KERNAN, N. A., KING, R., RATANATHARATHORN, V., WEISDORF, D. & CONFER, D. L. 2001. Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood*, 98, 2043-51.
- KUNKEL, E. J., CAMPBELL, J. J., HARALDSEN, G., PAN, J., BOISVERT, J., ROBERTS, A. I., EBERT, E. C., VIERRA, M. A., GOODMAN, S. B., GENOVESE, M. C., WARDLAW, A. J., GREENBERG, H. B., PARKER, C. M., BUTCHER, E. C., ANDREW, D. P. & AGACE, W. W. 2000. Lymphocyte CC chemokine receptor 9 and epithelial thymus-expressed chemokine (TECK) expression distinguish the small intestinal immune compartment: Epithelial expression of tissue-specific chemokines as an organizing principle in regional immunity. *J Exp Med*, 192, 761-8.
- KUPPER, T. S. & FUHLBRIGGE, R. C. 2004. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol*, 4, 211-22.
- LAWRENCE, M. B. & SPRINGER, T. A. 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 65, 859-73.
- LOVELOCK, J. E. & BISHOP, M. W. 1959. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature*, 183, 1394-5.
- LUSTER, A. D., ALON, R. & VON ANDRIAN, U. H. 2005. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*, 6, 1182-90.
- LUTHER, S. A. & CYSTER, J. G. 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol*, 2, 102-7.
- LYNCH, K. W. 2004. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 4, 931-40.
- MACKAY, C. R. 1999. Dual personality of memory T cells. *Nature*, 401, 659-60.
- MCELHANEY, J. E., GRAVENSTEIN, S., UPSHAW, C. M., HOOTON, J. W., KRAUSE, P. & DRINKA, P. 1998. Immune response to influenza vaccination in institutionalized elderly: effect on different T-cell subsets. *Vaccine*, 16, 403-9.
- MORA, J. R., BONO, M. R., MANJUNATH, N., WENINGER, W., CAVANAGH, L. L., ROSEMBLATT, M. & VON ANDRIAN, U. H. 2003. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 424, 88-93.
- MOSER, B., WOLF, M., WALZ, A. & LOETSCHER, P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 25, 75-84.

- MURAI, M., YONEYAMA, H., HARADA, A., YI, Z., VESTERGAARD, C., GUO, B., SUZUKI, K., ASAKURA, H. & MATSUSHIMA, K. 1999. Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest*, 104, 49-57.
- NAGAMI, P. & YOSHIKAWA, T. T. 1984. Aging and tuberculosis. *Gerontology*, 30, 308-15.
- NAU, G. J., KIM, D. K. & FITCH, F. W. 1988. Agents that mimic antigen receptor signaling inhibit proliferation of cloned murine T lymphocytes induced by IL-2. *J Immunol*, 141, 3557-63.
- NIELSEN, S. D., AFZELIUS, P., ERSBOLL, A. K., NIELSEN, J. O. & HANSEN, J. E. 1998. Expression of the activation antigen CD69 predicts functionality of in vitro expanded peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from healthy donors and HIV-infected patients. *Clin Exp Immunol*, 114, 66-72.
- NORII, M., YAMAMURA, M., IWAHASHI, M., UENO, A., YAMANA, J. & MAKINO, H. 2006. Selective recruitment of CXCR3+ and CCR5+ CCR4+ T cells into synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis. *Acta Med Okayama*, 60, 149-57.
- OSTBERG, J. R., BARTH, R. K. & FRELINGER, J. G. 1998. The Roman god Janus: a paradigm for the function of CD43. *Immunol Today*, 19, 546-50.
- OSTENSEN, M., SICHER, P., FORGER, F. & VILLIGER, P. M. 2005. Activation markers of peripheral blood mononuclear cells in late pregnancy and after delivery: a pilot study. *Ann Rheum Dis*, 64, 318-20.
- PAMER, E. G. 2009. Tipping the balance in favor of protective immunity during influenza virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 4961-2.
- PANOSKALTSIS-MORTARI, A., PRICE, A., HERMANSON, J. R., TARAS, E., LEES, C., SERODY, J. S. & BLAZAR, B. R. 2004. In vivo imaging of graft-versus-host-disease in mice. *Blood*, 103, 3590-8.
- PAPADAKIS, K. A., ZHU, D., PREHN, J. L., LANDERS, C., AVANESYAN, A., LAFKAS, G. & TARGAN, S. R. 2005. Dominant role for TL1A/DR3 pathway in IL-12 plus IL-18-induced IFN-gamma production by peripheral blood and mucosal CCR9+ T lymphocytes. *J Immunol*, 174, 4985-90.
- PAWLIK, I., MACKIEWICZ, U., LACKI, J. K., WIKTOROWICZ, K. & KONYS, J. 1997. The differences in the expression of CD45 isoforms on peripheral blood lymphocytes derived from patients with seasonal or perennial atopic allergy. *Tohoku J Exp Med*, 182, 1-8.
- PERERA, L. P., GOLDMAN, C. K. & WALDMANN, T. A. 1999. IL-15 induces the expression of chemokines and their receptors in T lymphocytes. *J Immunol*, 162, 2606-12.
- PETERS, W., CYSTER, J. G., MACK, M., SCHLONDORFF, D., WOLF, A. J., ERNST, J. D. & CHARO, I. F. 2004. CCR2-dependent trafficking of F4/80dim macrophages and CD11cdim/intermediate dendritic cells is crucial for T cell recruitment to lungs infected with Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol*, 172, 7647-53.
- PICKER, L. J., MICHIE, S. A., ROTT, L. S. & BUTCHER, E. C. 1990a. A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. *Am J Pathol*, 136, 1053-68.
- PICKER, L. J., TERSTAPPEN, L. W., ROTT, L. S., STREETER, P. R., STEIN, H. & BUTCHER, E. C. 1990b. Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. *J Immunol*, 145, 3247-55.

- PONTA, H., SHERMAN, L. & HERRLICH, P. A. 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4, 33-45.
- PORCELLI, S. A. & MODLIN, R. L. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol*, 17, 297-329.
- PROUDFOOT, A. E. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, 2, 106-15.
- PRZEPIORKA, D., SMITH, T. L., FOLLODER, J., KHOURI, I., UENO, N. T., MEHRA, R., KORBLING, M., HUH, Y. O., GIRALT, S., GAJEWSKI, J., DONATO, M., CLEARY, K., CLAXTON, D., BRAUNSCHEWIG, I., VAN BESSEN, K., ANDERSSON, B. S., ANDERLINI, P. & CHAMPLIN, R. 1999. Risk factors for acute graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood*, 94, 1465-70.
- REISS, Y., PROUDFOOT, A. E., POWER, C. A., CAMPBELL, J. J. & BUTCHER, E. C. 2001. CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med*, 194, 1541-7.
- ROEDERER, M., DARZYNKIEWICZ, Z. & PARKS, D. R. 2004. Guidelines for the presentation of flow cytometric data. *Methods Cell Biol*, 75, 241-56.
- SALLUSTO, F., LENIG, D., FORSTER, R., LIPP, M. & LANZAVECCHIA, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401, 708-12.
- SALLUSTO, F. & MACKAY, C. R. 2004. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr Opin Immunol*, 16, 724-31.
- SALMI, M. & JALKANEN, S. 2005. Lymphocyte homing to the gut: attraction, adhesion, and commitment. *Immunol Rev*, 206, 100-13.
- SANCHO, D., GOMEZ, M. & SANCHEZ-MADRID, F. 2005. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol*, 26, 136-40.
- SCHAERLI, P., EBERT, L., WILLIMANN, K., BLASER, A., ROOS, R. S., LOETSCHER, P. & MOSER, B. 2004. A skin-selective homing mechanism for human immune surveillance T cells. *J Exp Med*, 199, 1265-75.
- SCHAERLI, P., EBERT, L. M. & MOSER, B. 2006. Comment on "The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin". *J Immunol*, 177, 1375-6; author reply 1376-7.
- SCREATON, G. R., BELL, M. V., JACKSON, D. G., CORNELIS, F. B., GERTH, U. & BELL, J. I. 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 12160-4.
- SHIELDS, P. L., MORLAND, C. M., SALMON, M., QIN, S., HUBSCHER, S. G. & ADAMS, D. H. 1999. Chemokine and chemokine receptor interactions provide a mechanism for selective T cell recruitment to specific liver compartments within hepatitis C-infected liver. *J Immunol*, 163, 6236-43.
- SIGMUNSDOTTIR, H. & BUTCHER, E. C. 2008. Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol*, 9, 981-7.
- SORENSEN, T. L., TANI, M., JENSEN, J., PIERCE, V., LUCCHINETTI, C., FOLCIK, V. A., QIN, S., ROTTMAN, J., SELLEBJERG, F., STRIETER, R. M., FREDERIKSEN, J. L. & RANSOHOFF, R. M. 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest*, 103, 807-15.

- STANZANI, M., MARTINS, S. L., SALIBA, R. M., ST JOHN, L. S., BRYAN, S., COURIEL, D., MCMANNIS, J., CHAMPLIN, R. E., MOLLDREM, J. J. & KOMANDURI, K. V. 2004. CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood*, 103, 1140-6.
- STENSTAD, H., ERICSSON, A., JOHANSSON-LINDBOM, B., SVENSSON, M., MARSAL, J., MACK, M., PICARELLA, D., SOLER, D., MARQUEZ, G., BRISKIN, M. & AGACE, W. W. 2006. Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood*, 107, 3447-54.
- SUZUKI, N., NAKAJIMA, A., YOSHINO, S., MATSUSHIMA, K., YAGITA, H. & OKUMURA, K. 1999. Selective accumulation of CCR5+ T lymphocytes into inflamed joints of rheumatoid arthritis. *Int Immunol*, 11, 553-9.
- SVENSSON, M., MARSAL, J., ERICSSON, A., CARRAMOLINO, L., BRODEN, T., MARQUEZ, G. & AGACE, W. W. 2002. CCL25 mediates the localization of recently activated CD8alpha(+) lymphocytes to the small-intestinal mucosa. *J Clin Invest*, 110, 1113-21.
- TAGER, A. M., BROMLEY, S. K., MEDOFF, B. D., ISLAM, S. A., BERCURY, S. D., FRIEDRICH, E. B., CARAFONE, A. D., GERSZTEN, R. E. & LUSTER, A. D. 2003. Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol*, 4, 982-90.
- TERWEY, T. H., KIM, T. D., KOCHMAN, A. A., HUBBARD, V. M., LU, S., ZAKRZEWSKI, J. L., RAMIREZ-MONTAGUT, T., ENG, J. M., MURIGLAN, S. J., HELLER, G., MURPHY, G. F., LIU, C., BUDAK-ALPDOGAN, T., ALPDOGAN, O. & VAN DEN BRINK, M. R. 2005. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*, 106, 3322-30.
- TOKUMASU, F. & DVORAK, J. 2003. Development and application of quantum dots for immunocytochemistry of human erythrocytes. *J Microsc*, 211, 256-61.
- TUNG, J. W., HEYDARI, K., TIROUVANZIAM, R., SAHAF, B., PARKS, D. R. & HERZENBERG, L. A. 2007. Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin Lab Med*, 27, 453-68, v.
- TUNG, J. W., PARKS, D. R., MOORE, W. A. & HERZENBERG, L. A. 2004a. Identification of B-cell subsets: an exposition of 11-color (Hi-D) FACS methods. *Methods Mol Biol*, 271, 37-58.
- TUNG, J. W., PARKS, D. R., MOORE, W. A. & HERZENBERG, L. A. 2004b. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol*, 110, 277-83.
- VON ANDRIAN, U. H. & MACKAY, C. R. 2000. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med*, 343, 1020-34.
- WEIDEN, P. L., FLOURNOY, N., THOMAS, E. D., PRENTICE, R., FEFER, A., BUCKNER, C. D. & STORB, R. 1979. Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*, 300, 1068-73.
- WENZEL, J., HENZE, S., BRAHLER, S., BIEBER, T. & TUTING, T. 2005. The expression of human leukocyte antigen-DR and CD25 on circulating T cells in cutaneous lupus erythematosus and correlation with disease activity. *Exp Dermatol*, 14, 454-9.
- WYSOCKI, C. A., PANOSKALTSIS-MORTARI, A., BLAZAR, B. R. & SERODY, J. S. 2005. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 105, 4191-9.

- YANO, S., NAKAMURA, K., OKOCHI, H. & TAMAKI, K. 2002. Analysis of the expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on the peripheral blood and cutaneous lymphocytes of alopecia areata patients. *Acta Derm Venereol*, 82, 82-5.
- YOUN, B. S., MANTEL, C. & BROXMEYER, H. E. 2000. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev*, 177, 150-74.
- ZABEL, B. A., AGACE, W. W., CAMPBELL, J. J., HEATH, H. M., PARENT, D., ROBERTS, A. I., EBERT, E. C., KASSAM, N., QIN, S., ZOVKO, M., LAROSA, G. J., YANG, L. L., SOLER, D., BUTCHER, E. C., PONATH, P. D., PARKER, C. M. & ANDREW, D. P. 1999. Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med*, 190, 1241-56.
- ZEISER, R., BEILHACK, A. & NEGRIN, R. S. 2006. Acute graft-versus-host disease-challenge for a broader application of allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Curr Stem Cell Res Ther*, 1, 203-12.
- ZHOU, S., UETA, H., XU, X. D., SHI, C. & MATSUNO, K. 2008. Predominant donor CD103+CD8+ T cell infiltration into the gut epithelium during acute GvHD: a role of gut lymph nodes. *Int Immunol*, 20, 385-94.

8. Anhang

Alternative Stimulationsmethoden

Alternativ zur Stimulation mit anti-CD3 / anti-CD28 wurden weitere Methoden für den Einsatz als Positiv-Kontrollen getestet, die allerdings wegen verschiedener Probleme nicht eingesetzt wurden.

Stimulation mit Phorbol Myristinsäure / Ionomycin

Der Proteinkinase-Aktivator Phorbol Myristinsäure (PMA) und das Kalziumionophor Ionomycin können T-Zellen über eine Erhöhung von freiem intrazellulärem Kalzium und einer Aktivierung (Translokation) der Proteinkinase C aktivieren. Eine Stimulation von PBMCs mit PMA / Ionomycin führte zu einer vermehrten Expression von CD25 und CD69 auf T-Helfer-Zellen (siehe Abbildung 26).

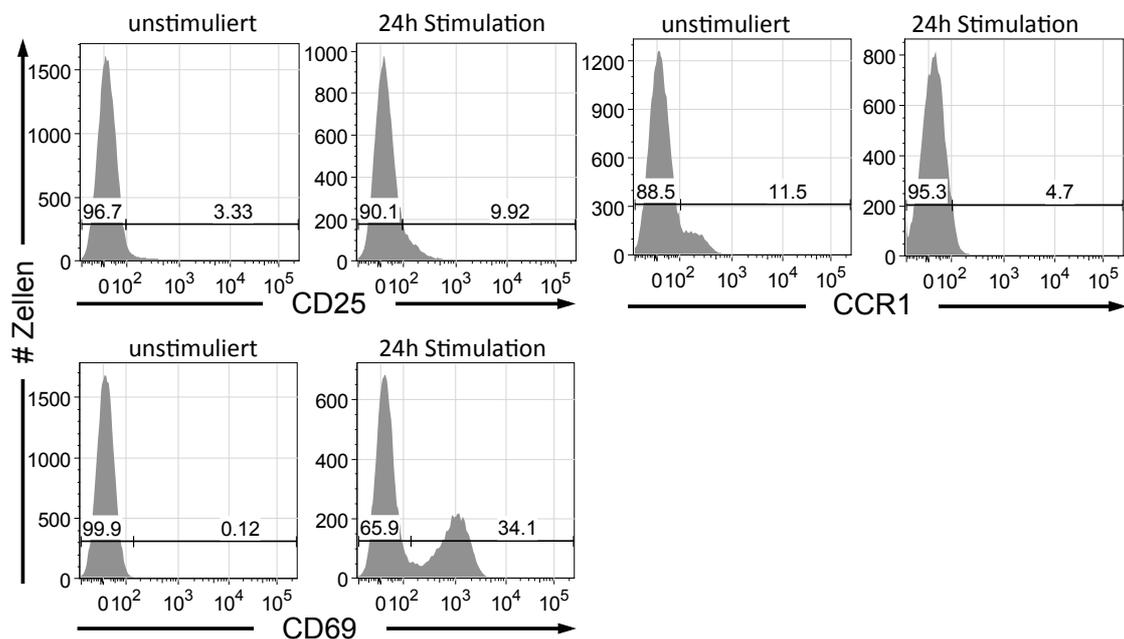


Abbildung 26: Expression von CD25, CD69 und CCR1 auf T-Helfer-Zellen mit und ohne Stimulation mit PMA/Ionomycin.

Die Expression der Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR4 und CCR8 auf T-Zellen verringerte sich jedoch. Beispielhaft wird das Ergebnis für CCR1 gezeigt (siehe Abbildung 26). Ein weiterer Nachteil der Stimulation mit PMA / Ionomycin war, dass

zytotoxische T-Zellen durch die Stimulation abstarben und nach 3 Tagen nur noch wenige vitale CD3+CD8+ Zellen nachweisbar waren. Als Positiv-Kontrolle für die beschriebenen Rezeptoren besonders auf zytotoxischen T-Zellen eignete sich diese Methode daher nur eingeschränkt.

Stimulation mit Vitamin D3

Für diesen Versuch wurden mit anti-CD3 / anti-CD28 für eine Dauer von zwei Tagen vorstimulierte PBMCs eingesetzt (vgl. Kapitel 2.3.6.). Die Inkubation der vorstimulierten Zellen mit Vitamin D3, IL-2 und IL-12 steigerte den Anteil CCR10-positiver zytotoxischer T-Zellen (siehe Abbildung 27).

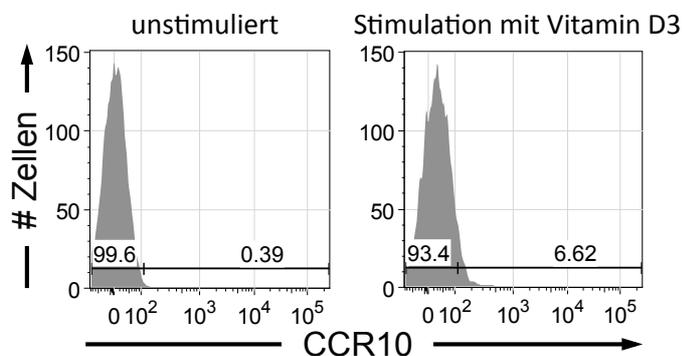


Abbildung 27: Expression von CCR10 auf zytotoxischen T-Zellen mit und ohne Stimulation durch Vitamin D3, IL-2 und IL-12.

Die Stimulation mit Vitaminen und Interleukinen ist eine sehr interessante Möglichkeit, selektiv Homing-Rezeptoren auf T-Zellen hochzuregulieren, wie etwa CCR10 durch Vitamin D3 oder CCR9 und Integrin $\alpha4 / \beta7$ durch Vitamin A. Aufgrund des hohen Aufwandes, dem komplizierten Experimentaufbau und der langen Versuchsdauer von über zwei Wochen, eignete sich diese Methode jedoch nur sehr eingeschränkt zum Einsatz als Positiv-Kontrolle im Homing-Rezeptor Test.

Gemischte Leukozytenreaktion

Bei der gemischten Leukozytenreaktion (MLR) wurden T-Lymphozyten aktiviert. In diesen Experimenten wurden jeweils die Tage 4 und 9 nach der MLR untersucht. An

Tag 9 der MLR war der Aktivierungsmarker CD25 auf zytotoxischen Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen erhöht exprimiert (siehe Abbildung 28).

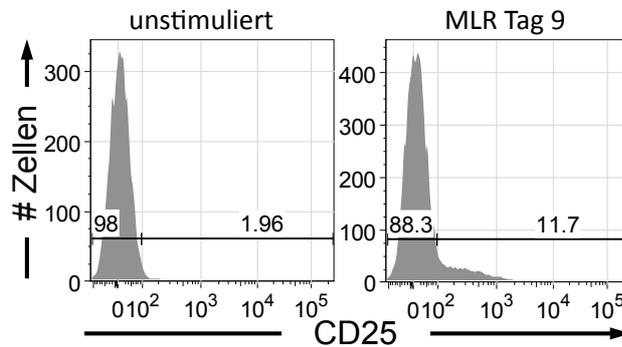


Abbildung 28: Expression von CD25 auf zytotoxischen T-Zellen mit und ohne Stimulation durch eine gemischte Leukozytenreaktion.

Für die Homing-Rezeptoren CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CXCR1, CXCR3 auf T-Lymphozyten sowie CD25 (auf T-Helfer-Zellen) ergaben sich unter den getesteten Versuchsbedingungen keine Veränderungen. Auch an Tag 4 nach MLR ergaben sich keine Veränderungen. Auf eine Darstellung der Ergebnisse wird daher verzichtet.

Informationsblatt für die Probanden der Studie:

Universitätsklinikum Würzburg

Klinikum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität

Medizinische Klinik und Poliklinik II

Direktor: Prof. Dr. H. Einsele



Medizinische Klinik und Poliklinik II · Josef-Schneider-Strasse 2 · 97080 Würzburg

Information zu einer wissenschaftlichen Untersuchung nach einer Blutabnahme

Titel der Studie:

Evaluation neuer prädiktiver Marker zur Früherkennung einer drohenden Graft-versus-Host Disease

Sehr geehrte(r) Studienteilnehmer(in),

um einen neuen diagnostischen Test zur Vorhersage einer Abstossungsreaktion nach Transplantation zu entwickeln, haben Sie einer Blutabnahme zugestimmt. Über die Massnahme und möglichen Risiken eines solchen diagnostischen Eingriffs sind Sie bereits aufgeklärt worden. Falls Sie damit einverstanden sind, würden wir im Rahmen dieser diagnostischen Untersuchung Blut (ca. 30ml) zu acht bestimmten Zeitpunkten zu wissenschaftlichen Zwecken entnehmen. Dieses Blut ist für Studien vorgesehen, die zur Entwicklung neuer Ansätze in der Diagnose und Vorhersage einer drohenden Abstossungsreaktion (sog. Graft-versus-Host Disease, GVHD) nach Stammzelltransplantation beitragen sollen. Es soll untersucht werden, ob bestimmte Immunzellen mit bestimmten Oberflächenmerkmalen und bestimmte Eiweissbotenstoffe (sogenannte Zytokine und Chemokine) zu bestimmten Zeitpunkten vermehrt in die Blutbahn ausgeschwemmt werden. Hierfür müssen Vergleichswerte bei Gesunden ermittelt werden. Der Nutzen dieser Untersuchung kommt Patienten mit Krebserkrankungen oder Erkrankungen des Immunsystems zugute. Es besteht daher auch die Möglichkeit, dass Sie zu einem viel späteren Zeitpunkt ebenfalls einen medizinischen Nutzen von den Ergebnissen dieser Studie haben. Die Laboruntersuchungen werden am Universitätsklinikum Würzburg, Medizinische Klinik und Poliklinik II durchgeführt. Der verantwortliche Studienleiter ist Herr Dr. med. univ. Andreas Beilhack.

Aus versuchstechnischen Gründen können wir Ihnen während der Laufzeit der Studie keine Angaben über die Untersuchungsergebnisse geben. Nach Abschluss der Studie haben Sie das Recht, über die wissenschaftlichen Ergebnisse informiert zu werden. Ihre Daten werden in anonymisierter Form gespeichert und die geltenden Datenschutzbestimmungen werden beachtet. Zur wissenschaftlichen Auswertung benötigen wir die Angaben Ihres Alters, Geschlechts, Vorkrankheiten, von bisherigen und derzeitigen Behandlungen sowie den körperlichen Untersuchungsbefund.

Zumal es sich um eine Untersuchung handelt bei der Sie ausschließlich das Risiko, das mit einer Blutentnahme verbunden ist, eingehen, bitten wir Sie um Ihre Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie. Damit würden Sie helfen, die Forschung und somit die erfolgreiche Behandlung von Krebskranken voranzutreiben. Die Zustimmung zu dieser wissenschaftlichen Zusatzuntersuchung erfolgt freiwillig. Eine Ablehnung als auch ein späterer Widerruf der Einwilligung hat für Sie keine nachteiligen Folgen.

Einwilligungserklärung der Probanden zur Studienteilnahme:

Universitätsklinikum Würzburg
Klinikum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität



Medizinische Klinik und Poliklinik II
Direktor: Prof. Dr. H. Einsele

Medizinische Klinik und Poliklinik II · Josef-Schneider-Strasse 2 · 97080 Würzburg

Einwilligungserklärung

Titel der Studie:

Evaluation neuer prädiktiver Marker zur Früherkennung einer drohenden Graft-versus-Host Disease

Hiermit erkläre ich (Titel, Vorname, Nachname, Adresse, Geburtsdatum):

.....
.....

dass ich durch Herrn Dr. Manik Chatterjee

mündlich und schriftlich über das Wesen, die Bedeutung, Tragweite und Risiken der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der Studie informiert wurde und ausreichend Gelegenheit hatte, meine Fragen hierzu in einem Gespräch mit der Ärztin/dem Arzt zu klären.

Ich habe insbesondere die mir vorgelegte Patienteninformation vom 02.03.09 verstanden und eine Ausfertigung derselben und dieser Einwilligungserklärung erhalten.

Ich bin bereit, an der wissenschaftlichen Untersuchung im Rahmen der oben genannten Studie teilzunehmen. Ich bin mit der Entnahme, Herauslösung, Untersuchung sowie anomysierten Lagerung meiner im Rahmen dieser Studie entnommenen Blutzellen für den Zweck der Studie durch den Laborleiter Dr. med. univ. Andreas Beilhack einverstanden.

Mir ist bekannt, dass ich meine Einwilligung jederzeit ohne Angaben von Gründen und ohne nachteilige Folgen für mich zurückziehen und einer Weiterverarbeitung meiner Daten jederzeit widersprechen kann. Ich bin damit einverstanden, dass der Studienleiter Herr Dr. med. univ. Andreas Beilhack sich mit meiner/m behandelnden Ärztin/Arzt im Rahmen dieser Studie in Verbindung setzt.

Einwilligungserklärung zur Datenverarbeitung

Ich bin damit einverstanden, dass die Medizinische Klinik und Poliklinik II personenbezogene Daten und Gesundheits- bzw. Krankheitsdaten im Rahmen und zum Zweck des oben genannten Forschungsvorhabens verarbeitet.

Ich willige darin ein, dass meine im Rahmen der oben genannten Studie erhobenen Krankheitsdaten aufgezeichnet, pseudonymisiert, anonymisiert, anonym gespeichert und anonymisiert veröffentlicht werden.

Würzburg, den

Unterschrift des/der Versuchsteilnehmer/in **X**.....

ggf. des gesetzlichen Vertreters/

Vormundes/Betreuers/Zeugen:

Hiermit erkläre ich den, die/den oben genannten Versuchsteilnehmer/in über Wesen, Bedeutung, Tragweite und Risiken der oben genannten Studie mündlich und schriftlich aufgeklärt und ihr/ihm eine Ausfertigung der Information sowie dieser Einwilligungserklärung übergeben zu haben.

Würzburg, den Unterschrift der/des aufklärenden Ärztin/Arztes

Fragenbogen für die Probanden vor jeder Blutentnahme zur Erfassung des Gesundheitszustandes:

Fragebogen Blutabnahme M1

Proband No. :

Datum Blutabnahme :

Bitte beantworten Sie die folgenden Fragen:

Seit der letzten Blutabnahme:

Trifft zu?
Bitte spezifizieren:

Neu aufgetretene Infektion		_____
Husten		_____
Schnupfen		_____
Fieber		_____
Geschwollene Lymphknoten		_____
Bereits bestehende Infektion		_____
Hat sich verbessert		_____
Hat sich verschlechtert		_____
Unverändert		_____
Kontakt zu kranken Personen		_____
Neu aufgetretene allergische Reaktion		_____
Bestehende allergische Reaktion		_____
Hat sich verbessert		_____
Hat sich verschlechtert		_____
Unverändert		_____
Impfung		_____
Neues Medikament		_____
Medikament abgesetzt		_____
Auslandsaufenthalt		_____
Sonstiges		_____
Keines der oben genannten		_____

Versuchsordnung und Pipettierschema des Homing-Rezeptor Tests:

1. Antikörpercocktails (Ansatz für einen kompletten Messdurchgang)

SAMPLES

HS

Ansatz1 Vol: 12495

PBS:	10464,56	µl
beta7	624,75	µl
CCR9	624,75	µl
CD8	156,19	µl
alpha4	312,38	µl
CD3	312,38	µl

Ansatz2 Vol: 12495

PBS:	10448,94	µl
CLA	312,38	µl
CCR8	15,62	µl
CD8	156,19	µl
CCR4	1249,5	µl
CD3	312,38	µl

Ansatz3 Vol: 12495

PBS:	8902,69	µl
CCR5	1249,5	µl
CXCR3	1249,5	µl
CD8	156,19	µl
CXCR2	624,75	µl
CD3	312,38	µl

Ansatz4 Vol: 12495

PBS:	11542,26	µl
CD62L	156,19	µl
CCR2	312,38	µl
CD8	156,19	µl
CD44	15,62	µl
CD3	312,38	µl

Ansatz5 Vol: 12495

PBS:	10152,19	µl
CD43	624,75	µl
CCR6	624,75	µl
CD8	156,19	µl
CCR10	624,75	µl
CD3	312,38	µl

Ansatz6 Vol: 12495

PBS:	10698,84	µl
CD69	624,75	µl
alphaE	78,09	µl
CD8	156,19	µl
CD25	624,75	µl
CD3	312,38	µl

Ansatz7 Vol: 12495

PBS:	10933,13	µl
CD62L	156,19	µl
CCR7	624,75	µl
CD8	156,19	µl
CD45RA	312,38	µl
CD3	312,38	µl

Ansatz8 Vol: 12495

PBS:	10308,38	µl
LTBR4	312,38	µl
CCR1	1249,5	µl
CD8	156,19	µl
CXCR1	156,19	µl
CD3	312,38	µl

2. Fluoreszenz-minus-one (FMO)

FMO Reihe B

HS

1	Vol:	1155
	PBS:	1025,06

P	CCR9	57,75
P7	CD8	14,44
A	alpha4	28,88
A7	CD3	28,88

2	Vol:	1155
	PBS:	1025,06
F	beta7	57,75

P7	CD8	14,44
A	alpha4	28,88
A7	CD3	28,88

3	Vol:	1155
	PBS:	996,19
F	beta7	57,75
P	CCR9	57,75
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

4	Vol:	1155
	PBS:	994,74

P	CCR8	1,44
P7	CD8	14,44
A	CCR4	115,5
A7	CD3	28,88

5	Vol:	1155
	PBS:	967,31
F	CLA	28,88

P7	CD8	14,44
A	CCR4	115,5
A7	CD3	28,875

6	Vol:	1155
	PBS:	1081,37
F	CLA	28,88
P	CCR8	1,44
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

7	Vol:	1155
	PBS:	938,44

P	CXCR3	115,5
P7	CD8	14,44
A	CXCR2	57,75
A7	CD3	28,88

8	Vol:	1155
	PBS:	938,44
F	CCR5	115,5

P7	CD8	14,44
A	CXCR2	57,75
A7	CD3	28,88

9	Vol:	1155
	PBS:	880,69
F	CCR5	115,5
P	CXCR3	115,5
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

10	Vol:	1155
	PBS:	1081,37

P	CCR2	28,88
P7	CD8	14,44
A	CD44	1,44
A7	CD3	28,88

11	Vol:	1155
	PBS:	1095,81
F	CD62L	14,44

P7	CD8	14,44
A	CD44	1,44
A7	CD3	28,88

12	Vol:	1155
	PBS:	1068,38
F	CD62L	14,44
P	CCR2	28,88
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

FMO Reihe C

HS

13	Vol:	1155
	PBS:	996,19

P	CCR6	57,75
P7	CD8	14,44
A	CCR10	57,75
A7	CD3	28,88

14	Vol:	1155
	PBS:	996,19
F	CD43	57,75

P7	CD8	14,44
A	CCR10	57,75
A7	CD3	28,88

15	Vol:	1155
	PBS:	996,19
F	CD43	57,75
P	CCR6	57,75
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

16	Vol:	1155
	PBS:	1046,72

P	alphaE	7,22
P7	CD8	14,44
A	CD25	57,75
A7	CD3	28,88

17	Vol:	1155
	PBS:	996,19
F	CD69	57,75

P7	CD8	14,44
A	CD25	57,75
A7	CD3	28,88

18	Vol:	1155
	PBS:	1046,72
F	CD69	57,75
P	alphaE	7,22
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

13	Vol:	1155
	PBS:	1025,06

P	CCR7	57,75
P7	CD8	14,44
A	CD45RA	28,88
A7	CD3	28,88

14	Vol:	1155
	PBS:	1068,38
F	CD62L	14,44

P7	CD8	14,44
A	CD45RA	28,88
A7	CD3	28,88

21	Vol:	1155
	PBS:	1039,50
F	CD62L	14,44
P	CCR7	57,75
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

22	Vol:	1155
	PBS:	981,75

P	CCR1	115,5
P7	CD8	14,44
A	CXCR1	14,44
A7	CD3	28,88

23	Vol:	1155
	PBS:	1068,38
F	LTBR4	28,88

P7	CD8	14,44
A	CXCR1	14,44
A7	CD3	28,88

24	Vol:	1155
	PBS:	967,31
F	LTBR4	28,88
P	CCR1	115,5
P7	CD8	14,44

A7	CD3	28,88
----	-----	-------

FMO Reihe D

25	Vol:	1155
	PBS:	1010,63
F	CD62L	14,44
P	CCR7	57,75
P7	CD8	14,44
A	CD45RA	28,88
A7	CD3	28,88

3. Kompensation

COMPENSATION

HS

Ansatz:	Vol. ges:	1155	Vol. AK.	PBS
A1				1155
A2	F	CD3	115,5	1039,5
A3	P	CD4	57,75	1097,25
A4	P7	CD8	14,44	1140,56
A5	A	CD3	28,875	1126,13
A6	A7	CD3	28,875	1126,13
A7				1155

Einfach Ansatz

	Antibody				PBS
A1	-				100
A2	FITC	CD3	10	10	90
A3	PE	CD4	20	5	95
A4	P7	CD8	80	1,25	98,75
A5	APC	CD3	40	2,5	97,5
A6	A7	CD3	40	2,5	97,5
A7	-				100

Danksagung

Diese Arbeit entstand unter Leitung des Direktors der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg Herrn Prof. Dr. Hermann Einsele. Ich danke Herrn Professor Einsele ganz herzlich für seine Unterstützung bei diesem Projekt sowie für die Übernahme des Erstgutachtens. Herrn Prof. Dr. Matthias Eyrich danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferates.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Beilhack für die Möglichkeit, an dem sehr interessanten immunologischen Thema der T-Zellmigration zu arbeiten, für die stets hervorragende Zusammenarbeit, seine immer konstruktive Kritik sowie seine stetige und zuverlässige Betreuung. Ohne seine Unterstützung wäre es nicht möglich gewesen, das Projekt in dieser Form abzuschließen.

Besonderen Dank verdient Frau Carina Bäuerlein für die hervorragende Einführung in die Labortechniken, ihre Unterstützung und ihr immer offenes Ohr für die Probleme des Laboralltags. Herzlicher Dank für einführende Erläuterungen, gute Zusammenarbeit und Kollegialität gilt den Mitarbeitern des Labors der Experimentellen Stammzelltransplantation der Medizinische Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Würzburg, Herr Christian Brede, Frau Ana-Laura Jordán Garrote, Frau Carolin Kiesel, Frau Simone Riedel und Frau Miriam Ritz.

Herrn Dr. Manik Chatterjee danke ich für die klinische Untersuchung der Studienteilnehmer. Den Mitarbeitern der AG Seggewiss und der AG Grigoleit danke ich für die Bereitstellung von Labormaterialien, etwa spezielle Antikörper und T-Zell-Stimulantien, den Mitarbeitern der AG Schäfer und der AG Kissler für die Einführung und Unterstützung in der Handhabung des Blutbildgeräts und des Durchflusszytometers. Dem Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg möchte ich für den unkomplizierten Nachschub an Leukozyten für die Vorexperimente danken, Herrn Johannes Hain für die äußerst kompetente statistische Beratung.

Meine Forschungsarbeit war in diesem Umfang nur durch die Förderung der Wilhelm-Sander-Stiftung möglich, der ich für ihre Unterstützung sehr zum Dank verpflichtet bin.

Mein besonderer Dank gilt auch Eva Krauss, die mit mir alle Höhen und Tiefen dieses Projekts teilte. Schließlich möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mir diesen Weg erst ermöglicht und mich in dieser Zeit entscheidend unterstützt haben.

Lebenslauf

Name	Stefan Marco Herz
Schulbildung	
06/2005	Abitur
1998 – 2005	Graf-Münster-Gymnasium, Bayreuth
08/2002 – 01/2003	Berkeley High School, Berkeley, USA
01/2002 – 03/2002	University High School, Melbourne, Australien
1996 – 1998	Kepler-Gymnasium, Tübingen
Studium	
10/2005 – 05/2012	Studium der Humanmedizin, Universität Würzburg
05/2012	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
02/2011 – 01/2012	Praktisches Jahr
09/2011 – 01/2012	Innere Medizin, Universitätsspital Zürich, Schweiz
06/2011 – 08/2011	Chirurgie, Kantonsspital Graubünden, Schweiz
02/2011 – 05/2011	Radiologie, Luzerner Kantonsspital, Schweiz
08/2007	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung