

Aus dem
Institut für Medizinische Psychologie der Universität Tübingen

**Stimulation von G_{α_s} -Protein-gekoppelten Rezeptoren
inhibiert die Integrinaktivität auf antigenspezifischen T-
Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Lehnholz, Jannik Simon**

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Born

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. J. Fallgatter

Tag der Disputation: 09.02.2021

Inhaltsverzeichnis

Abbildungen.....	VII
Tabellen.....	VII
1 Einleitung.....	8
1.1 Immunsystem	8
1.1.1 Genereller Aufbau des Immunsystems	8
1.1.2 T-Zell-Immunität	9
1.2 Integrin, ein Hauptakteur bei der Zell-Zell-Adhäsion	10
1.2.1 Inside-out-signaling	11
1.2.2 Chemokin-Rezeptor-induzierte Diapedese	12
1.2.3 TCR-induzierte immunologische Synapse	13
1.3 Infektionen mit CMV und EBV	15
1.4 Erfassen der antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort	17
1.4.1 Methoden zur Erfassung der antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort	17
1.4.2 Durchflusszytometrie.....	18
1.4.3 Erfassen der antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort mit ICAM-1-Multimeren	19
1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	20
1.6 G-Protein-gekoppelte Rezeptorstimulation führt zu Anti-adhäsiven Signalen auf Immunzellen	21
1.7 Fragestellung	23
2 Material und Methoden	24
2.1 Probanden und Blutproben.....	24
2.2 Herstellung der notwendigen Versuchssubstanzen	26
2.2.1 Herstellung von biotinierten pHLA-A*0201 Monomeren für CMV und EBV und deren Multimerisierung	26
2.2.2 Herstellung von humanen ICAM-1 Multimeren	28
2.3 Versuchsablauf: Zellstimulation, Inhibition und Anfärbeverfahren.....	30
2.4 Auswertung der Proben.....	31
2.5 Statistische Analysen	35
3 Ergebnisse.....	36

3.1	Wirkung von $G\alpha_s$ PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung bei CMV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen	36
3.1.1	Wirkung von Isoproterenol, Norepinephrin und Epinephrin.....	36
3.1.2	Wirkung von Prostaglandin D2 und Prostaglandin E2	39
3.1.3	Wirkung von Adenosin, Histamin, Serotonin und Dopamin.....	41
3.2	Wirkung von $G\alpha_s$ PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung bei EBV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen	43
3.2.1	Wirkung von Isoproterenol, Norepinephrin und Epinephrin.....	43
3.2.2	Wirkung von Prostaglandin D2 und Prostaglandin E2	45
3.3	Wirkung $G\alpha_s$ PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung CMV-spezifischer Subpopulationen von $CD8^+$ T-Zellen	47
4	Diskussion	51
5	Zusammenfassung.....	58
6	Literaturverzeichnis	60
7	Erklärung zum Eigenanteil	71
8	Veröffentlichungen.....	71
9	Danksagung.....	72

Abkürzungen

APC	Allophycocyanin, Antigen-präsentierende Zelle
APC-Cy7	Allophycocyanin-Cyanin7
BV421	Brilliant Violet 421™
BV510	Brilliant Violet 510™
BV605	Brilliant Violet 605™
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CD8 ⁺	CD8-positiv
CMV	Zytomegalievirus
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ELISpot	Enzyme-Linked Immunospot
F(ab')	antigenbindendes Fragment
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc-Region	kristallisierbares Fragment
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter-Rezeptor
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat, Guanosintriphosphat
Gα _s PCR	Gα _s -Protein-gekoppelter Rezeptor
ICAM-1	Interzellulär-Zelladhäsionsmolekül-1
LFA-1	Leukozytenfunktions-assoziiertes-Antigen-1
mICAM	multimeres ICAM-1
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphat-gepufferte-Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5
PGE2	Prostaglandin E2
pHLA	HLA-Peptide
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
SSC	side scatter
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor

Abbildungen

Abbildung 1: Aufbau und Dynamik von Integrinen	11
Abbildung 2: Chemokin-Rezeptor-induzierte Diapedese.	13
Abbildung 3: TCR-induzierte Integrinaktivierung.....	14
Abbildung 4: Hydrodynamisches Fokussieren.	19
Abbildung 5: Produktion von humanen ICAM-Multimeren	29
Abbildung 6: Gating Strategie.	34
Abbildung 7: CMV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Isoproterenol, Epinephrin und Norepinehprin.....	38
Abbildung 8: CMV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Prostagandin D2 und –E2 ...	40
Abbildung 9: CMV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Adenosin, Histamin, Serotonin, und Dopamin	42
Abbildung 10: EBV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Isoproterenol, Epinephrin und Norepinehprin	44
Abbildung 11: EBV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Prostagandin D2 und –E2 ...	46
Abbildung 13: mICAM-1 ⁺ T-Zellen CMV-spezifische T-Zell-Subpopulationen im Dot-Plot	49
Abbildung 14: Anzahl mICAM-1 ⁺ Subtypen von CM-spezifischen CD8 ⁺ -T-Zellen aller Probanden.....	50

Tabellen

Tabelle 1: Herstellung von pHLA-A2 Multimeren	27
Tabelle 2: Herstellung der 3X-Glycerin Einfrierlösung	27
Tabelle 3: Mixen von Multimer and 3X-Glycerin.....	28

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

1.1.1 Genereller Aufbau des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen stellt die Gesamtheit von Mechanismen des Körpers dar, ihn vor Infektionen durch Antigene zu schützen. Diese lassen sich in eine unspezifische angeborene Abwehr und eine adaptive spezifische Abwehr unterteilen. Beide Abwehrstrategien sind sowohl auf zellulärer als auch auf humoraler Ebene vertreten. Zum einen stellen Haut und Schleimhäute angeborene Hindernisse dar, zum anderen wirken Lysozym im Speichel chemisch, sowie Husten- und Niesreflexe biologisch gegenüber Eindringlingen. Auf zellulärer Ebene findet eine unspezifische Immunantwort, beispielsweise durch Makrophagen und Mastzellen, statt. Des Weiteren existieren verschiedene proteinbasierte Abwehrmechanismen wie das Komplementsystem und das Akute-Phase-Protein, die als humoraler Anteil des angeborenen unspezifischen Komplexes zusammengefasst werden. Dem gegenüber steht das System der adaptiven spezifischen Immunantwort, welches im Wesentlichen durch B- und T-Lymphozyten umgesetzt wird. Das adaptive System benötigt einen vorausgehenden Antigenkontakt sowie Zeit, um eine Immunantwort aufzubauen. Allerdings formt sich dabei ein Antigengedächtnis aus, das im späten Infektionsstadium oder bei einer Reinfektion für eine erfolgreiche kompetente Abwehr sorgt. Untergruppen der T-Zelle reagieren unterschiedlich auf Antigenkontakt. Die zytotoxische T-Zelle kann infizierte Zellen und Tumorzellen abtöten. Eine zweite Gruppe, die T-Helfer-Zellen, reagieren mit einer Ausschüttung von Zytokinen, um B-Zellen bei ihrer Antigenreaktion zu unterstützen. Die B-Zelle produziert dabei spezifische Antikörper, welche im Körperkreislauf verweilen, um bei einer Infektion das Antigen schneller zu neutralisieren. Antikörper bilden somit den humoralen Teil der adaptiven Immunantwort. Während sie das Antigen direkt erkennen und binden, ist es bei T-Zellen erforderlich von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) phagozytiert und anschließend auf der Oberfläche präsentiert zu werden.

1.1.2 T-Zell-Immunität

Die Zellen des Immunsystems können mithilfe von membrangebundenen Glykoproteinketten, auch Oberflächenmerkmale (CD) genannt, klassifiziert werden. So lassen sich T-Zellen mittels des Oberflächenmerkmals CD3 nachweisen. Untergruppen wie die T-Helfer-Zellen exprimieren CD4, während die zytotoxischen T-Zellen das Oberflächenmerkmal CD8 aufweisen. CD8-positive Zellen ($CD8^+$) kontrollieren auf ihrer Passage durch das humane Blut- und Lymphsystem körpereigene Zellen vor allem auf virale Infektion und auf Entartung. Jede T-Zelle besitzt hierfür einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptor (TCR), den sie über einen komplexen Reifungsprozess erhält. Der TCR ist pro Zelle nur gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet. Das Signal einer TCR-Antigenerkennung wird über den CD3-Komplex ins Innere der Zelle weitergeleitet. $CD8^+$ T-Zellen erkennen ihr passendes Antigen aber nur, wenn es über Oberflächenproteinkomplexe, sogenannte Haupthistokompatibilitätskomplexe-1 (MHC-1), einer körpereigenen Zelle präsentiert wird. MHC-1 befindet sich auf jeder Zelle, die einen Zellkern besitzt und kann in die Proteine HLA-A, HLA-B und HLA-C unterteilt werden. $CD4^+$ T-Helfer-Zellen benötigen hingegen MHC-2 präsentierte Antigene. Die Präsentation findet ausschließlich über APCs, wie Monozyten, Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen statt. MHC-2-Proteine sind HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. Ein kostimulatives Signal einer reifen APC ist notwendig, um aus einer naiven T-Zelle eine zytotoxische Effektorzelle oder eine T-Helfer-Zelle zu entwickeln. Aufgrund der Letalität der zytotoxischen Effektorzellen ist ergänzend ein weiteres aktivierendes Signal über $CD4^+$ T-Helferzellen erforderlich. Voll funktionsfähige zytotoxische T-Zellen reagieren auf das Erkennen ihres Antigens auf der Oberfläche einer Zielzelle direkt mit der Ausschüttung von Zytotoxinen, wie Perforine und Granzyme, welche die Membran der Zielzelle durchbrechen und in ihrem Inneren den programmierten Zelltod einleiten. Des Weiteren werden Zytokine (hauptsächlich Tumornekrosefaktor (TNF)) ausgeschüttet, die unter anderem die virale Replikation inhibieren und andere Zellen zur vermehrten Produktion an MHC-1-Molekülen anregen (Murphy, Travers & Walport, 2009).

1.2 Integrin, ein Hauptakteur bei der Zell-Zell-Adhäsion

Um eine effiziente Immunantwort zu gewährleisten, ist ein Rezirkulieren von naiven T-Zellen durch Blut und sekundär lymphatische Organe und die Migration von Effektor-T-Zellen zu peripheren Entzündungsherden grundlegend. Ziel ist das spezifische TCR-vermittelte Erkennen von MHC-2-präsentierten Antigenen auf APCs oder MHC-1 auf Zielzellen (Dustin & Long, 2010; Fooksman et al., 2010; Scholer, Hugues, Boissonnas, Fetler & Amigorena, 2008). Da die alleinige Bindung des TCR zu MHC-1/ -2 verhältnismäßig schwach ist, sind weitere Molekülinteraktionen nötig, um den Komplex zwischen T-Zelle und APC oder Zielzelle zu stabilisieren. Für eine erfolgreiche Zell-Zell-Bindung stellen Integrine eine zentrale Rolle dar. Integrine sind heterodimere membranständige Glykoproteine, die ausgenommen von Erythrozyten auf allen Zellen vorkommen. Sie bestehen aus einer α - und einer β -Kette (Hynes, 2002; Luo, Carman & Springer, 2007). Ein wichtiges β 2-Integrin auf T-Zellen ist das Leukozytenfunktions-assoziiertes-Antigen-1 (LFA-1) (Dimitrov et al., 2009; Dimitrov, Lange & Born, 2010).

Die Regulierbarkeit der Zell-Zell-Adhäsion obliegt einer Strukturveränderung und einem Bündelungsmechanismus (Clustering) von LFA-1 auf der Zelloberfläche infolge einer Aktivierung. Die gefaltete Form von LFA-1 limitiert die Bindungsaffinität zu seinem natürlichen Liganden Interzellulär-Zelladhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), welches auf APC, Zielzellen oder Endothelium exprimiert wird. Im Verlauf einer Aktivierung entfaltet sich die Ektodomäne des LFA-1-Proteins (Abbildung 1A). Diese Konformitätsänderung bewirkt eine Affinitätszunahme von LFA-1 zu ICAM-1. Zusammen mit einer Cluster-Bildung von aktiviertem LFA-1 auf der Zelloberfläche (Abbildung 1B) entsteht eine Aviditätszunahme der Zellbindung (Dustin & Springer, 1989; Long, 2011; Saito, 2013).

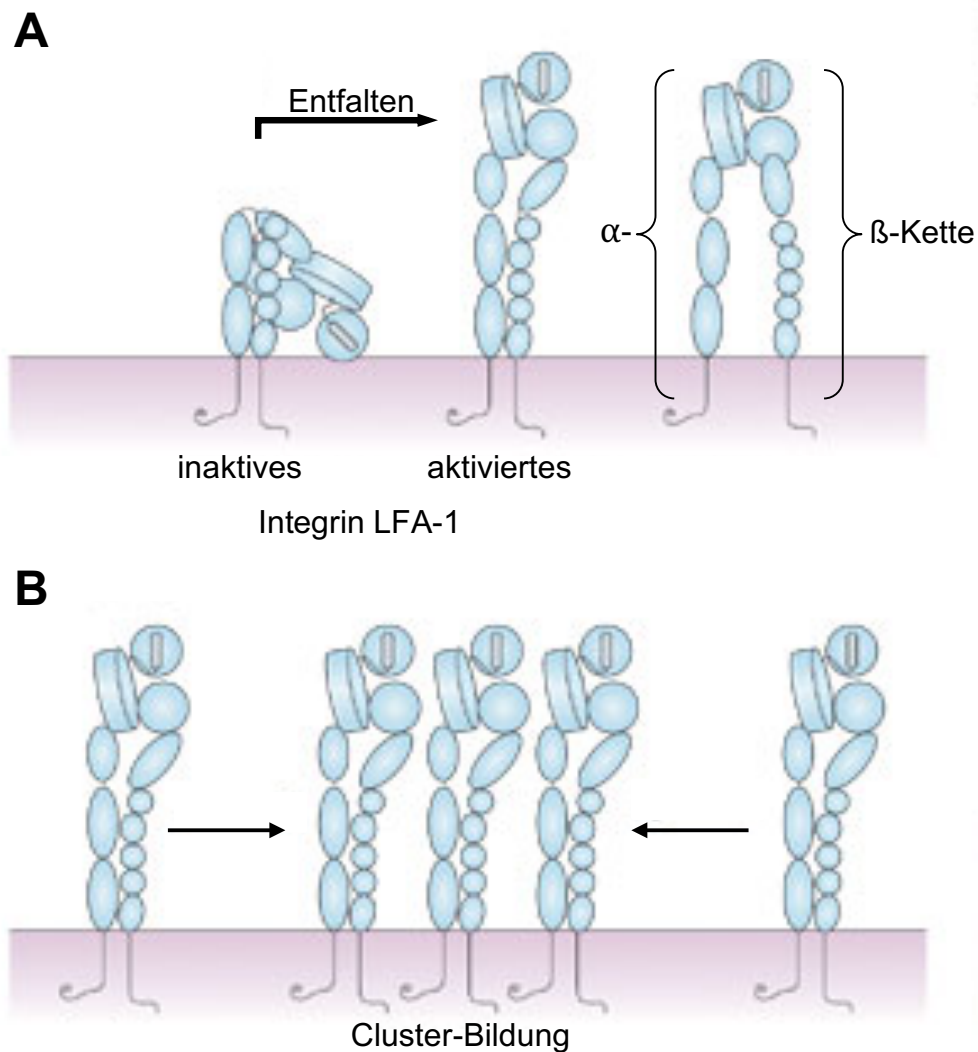


Abbildung 1: Aufbau und Dynamik von Integrinen A (links): Durch Entfalten der extrazellulären Integrin-Domäne steigert sich die Bindungsaffinität zu ICAM-1. A (rechts): Aufbau der Integrinstruktur mit einer Unterteilung in α - und β -Kette/ Untereinheit. B: Das Zusammenführen aktivierter Integrine zu Clustern steigert die Avidität. Modifiziert, (Kinashi et. al, 2005).

1.2.1 Inside-out-signaling

Prinzipiell bestehen zwei Möglichkeiten Integrine zu aktivieren. Integrine auf T-Zellen können, sowohl über Chemokin-Rezeptoren, als auch infolge der TCR-Bindung an MHC-präsentierte Antigenpeptide, aktiviert werden. Binnen Sekunden wird in beiden Fällen eine Signalkaskade in der Zelle ausgelöst, die „inside-out-signaling“ genannt wird. Dabei sind unter anderem Guanosin triphosphat (GTP)-bindende-Proteine und Adaptermoleküle beteiligt.

Der Begriff beinhaltet alle Ereignisse, die von der Rezeptorbindung bis zur Integrinaktivierung und Clusterbildung auf der Zelloberfläche führen (Abram & Lowell, 2009; Dustin & Springer, 1989; Saito, 2013).

1.2.2 Chemokin-Rezeptor-induzierte Diapedese

Das Verlassen der Blutbahn durch postkapilläre Venolen in Lymphknoten ist für das Auffinden von Antigenen durch naive T-Zellen essenziell. Hierbei spielen unterschiedliche Adhäsionsmoleküle eine wichtige Rolle. So vermitteln L-Selektine auf Lymphozyten deren Homing in sekundäre lymphatische Organe. Periphere Entzündungsherde können von Effektor-T-Zellen durch endotheliale Extravasation erreicht werden. Das Endothelium übernimmt eine tragende Rolle bei der Migration von Leukozyten. Dabei exprimieren Endothelzellen E- /P-Selektine, welche mit ihrem Liganden der T-Zelle interagieren. Dies versetzt den Lymphozyten in einen als „Roller“ bezeichneten Vorgang und ermöglicht trotz des Blutflusses eine erste Annäherung an entzündetes Endothel. Um schlussendlich eine weitere Festigung der Bindung zu erzeugen, induzieren exprimierte Chemokine der Endothelzellen eine Integrinaktivierung auf der T-Zelle. Während des Zirkulierens im Blutkreislauf werden Integrine prinzipiell in ihrer nicht-adhäsiven, gefalteten Form gehalten. Das Chemokin-induzierte Inside-out-signaling führt über ein Auffalten und Clustern des Integrins LFA-1 zu einer erhöhten Bindungsaffinität zu ICAM-1 der Endothelzelle. Dies leitet eine spätere trans- oder parazelluläre Diapedese ein (Ley, Laudanna, Cybulsky & Nourshargh, 2007) (Abbildung 2).

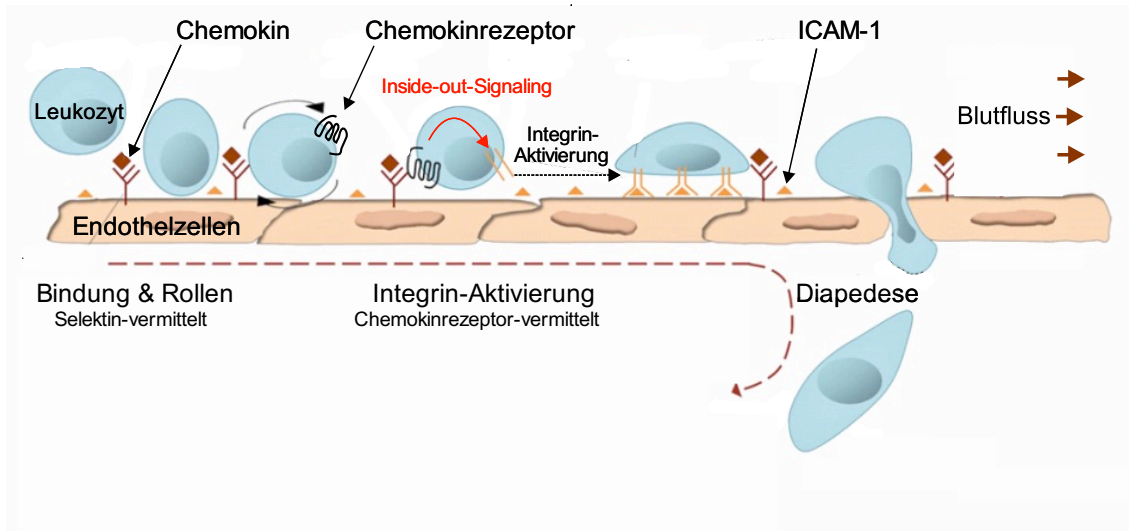


Abbildung 2: Chemokin-Rezeptor-induzierte Diapedese. Selektin vermittelt beginnenden Leukozyten am Endothel zu „Rollen“, Chemokin-Rezeptor-vermitteltes „Inside-out-signaling“ führt zu einer Integrinaktivierung auf der Oberfläche von Leukozyten. LFA-1-Binden an ICAM-1 festigt die Adhäsion und leitet die Diapedese ein.

1.2.3 TCR-induzierte immunologische Synapse

Erst die Bindung und das Ausbilden einer immunologischen Synapse zwischen naiver T-Zelle und APC verhilft der T-Zelle zu ihren Effektorfunktionen. Derselbe Mechanismus verstärkt die Effektor-T-Zell-Bindung zu einer Zielzelle nach TCR-Erkennen eines Antigenes auf MHC-1, um die Zielzelle abtöten zu können. Die Interaktion von T-Zelle und APC ist in Bezug auf die Funktionalität der adaptiven Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Da der TCR eine niedrige Bindungsaffinität zu einem Peptid-tragenden MHC (pMHC) besitzt, reicht diese Bindung allein nicht aus, um eine Signaltransduktion über längere Zeit aufrechtzuerhalten. Um eine stabilere Bindung einzugehen, löst das Erkennen eines pMHC über TCR das Formieren einer speziellen polaren Struktur aus, die als immunologische Synapse bezeichnet wird. Das damit verbundene Zusammenbringen von TCR, Adhäsionsmolekülen sowie costimulierenden Rezeptoren schafft eine optimale räumliche Annäherung der Zellen. Infolgedessen gelingt eine Ausschüttung von Zytokinen, die zu einer Aktivierung, klonalen Expansion und Differenzierung der T-Zelle zur Effektor-T-Zelle führt (Dustin, 2014). Auch bei der Bekämpfung von Zielzellen wird nach der TCR-pMHC-Bindung eine immunologische Synapse ausgebildet. In diesem Fall wird

sie als zytotoxische Synapse bezeichnet. Sie bewirkt einen gerichteten Ausstoß zytotoxischer Granula zur Zielzelle hin (Beal et al., 2009). Im Inneren der Zelle findet ein Umorganisieren der mikrotubulären Strukturen statt. Das Mikrotubuli-Organisations-Zentrum (MTOC) verlagert sich hierbei zur Zielzelle hin und zieht zytolytische Granula in seine Richtung. Im Zentrum der immunologischen, sowie zytotoxischen Synapse finden sich TCRs zusammen. Dies wird als zentrale Zone bezeichnet. LFA-1 umringen als Hauptadhäsionsmoleküle die zentrale Zone. Dies wird als periphere Zone bezeichnet. Am Ende entscheidet die Bindung über Erkennen und Abtöten einer Virus-infizierten Zielzelle oder einer Tumorzelle durch die Effektor-T-Zelle (Dustin & Long, 2010; Fooksman et al., 2010).

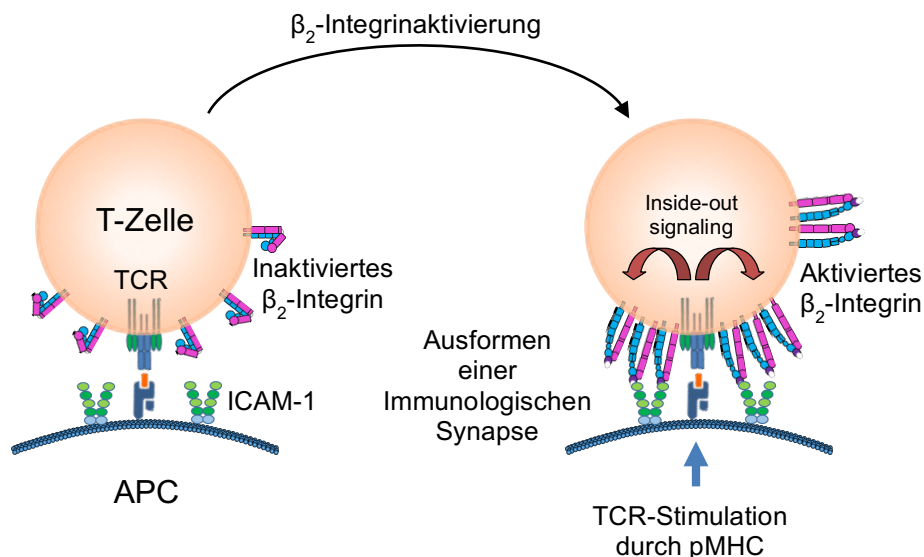


Abbildung 3: TCR-induzierte Integrinaktivierung. Links: Der TCR einer T-Zelle erkennt ein pMHC-präsentiertes Antigen auf einer APC. TCR vermitteltes „Inside-out-signaling“ führt zu einer Integrinaktivierung auf der Oberfläche der T-Zelle. LFA-1-Binden an ICAM-1 ermöglicht das Ausformen einer immunologischen Synapse.

Das Blockieren der Bindung von LFA-1 zu ICAM-1 führte im Versuch zu einer verminderten Ausbildung und reduzierten Zahl an Effektor-T-Zellen (Scholer et al., 2008). Darüber hinaus wurde eine gestörte Funktion der zytotoxischen T-Zellen bei der Vernichtung ihrer Zielzelle beobachtet (Anikeeva et al., 2005). Auch eine Genmutation, die mit einem Defizit der Leukozytenadhäsion einhergeht, führt zu einer geschwächten Immunantwort mit folglich höherer

Anfälligkeit auf Krankheitserreger (Abram & Lowell, 2009). Somit war die Interaktion von LFA-1 zu seinem Liganden ICAM-1 als Schlüsselrolle in der T-Zell-Immunantwort bewiesen.

1.3 Infektionen mit CMV und EBV

Eine virale Infektion findet durch Vermehrung der Viren in Körperzellen statt. Viren sind auf eine Reproduktion des Genoms in Wirtszellen angewiesen. Im Körper wird daraufhin eine Entzündungsreaktion ausgelöst, die das eigentliche Erkrankungsbild hervorruft. Viren werden hauptsächlich durch Tröpfchen- oder Schmierinfektion übertragen. Des Weiteren kann eine Ansteckung über den Austausch von Körperflüssigkeiten oder Insektenstiche erfolgen.

Eine Infektion mit dem Zytomegalievirus (CMV), einem humanen Herpesvirus (HHV-5) verursacht Zytomegalie, eine Vergrößerung der infizierten Zelle. Das Virus kann über den Respirationstrakt und nahezu jedwede Körperflüssigkeit übertragen werden. Es ist weltweit verbreitet und seine Seroprävalenz hängt sehr stark von den lokal gegebenen Hygieneverhältnissen ab. Laut dem Bundesinstitut für Infektionskrankheiten (Robert-Koch-Institut), liegt die Durchseuchungsrate in Deutschland bei 40-50%. In süd- und osteuropäischen Ländern kann von einer 80-90%igen Durchseuchungsrate ausgegangen werden. Bei Gesunden und Immunkompetenten verläuft eine Erstinfektion in 90% der Fälle asymptomatisch. Selten treten klinische Bilder wie Fieber, Hepatomegalie, Myalgie und Arthralgie auf. Bei immungeschwächten Individuen (AIDS, Immunsuppression) und Ungeborenen kann allerdings eine Infektion mit CMV schwerwiegende Folgen haben. Nach einer Infektion persistiert das Virus lebenslang in lymphatischen Geweben (Alford & Britt, 1993; Mocarski, 1993). 6-11% aller CD4- und CD8-Zellen eines infizierten Individuums sind CMV-spezifische T-Zellen. Dabei sind alle Differenzierungsgrade vertreten. Aufgrund der hohen Anzahl Antigen-spezifischer T-Zellen bei CMV-infizierten Probanden, bietet sich CMV als Modell zur Untersuchung CD8⁺ T-Zellen an und ermöglicht zusätzlich die Untersuchung kleinerer Subpopulationen (s.u.) (Lachmann et al.,

2012; Stubbe, Vanderheyde, Pircher, Goldman & Marchant, 2008; Waller, Day, Sissons & Wills, 2008).

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) verweilt, wie auch das CMV, ein Leben lang im Körper. Das Virus ist als doppelsträngige DNA aufgebaut und zählt ebenfalls zu der Gruppe der Herpesviren. In 30-60% der Erstinfektionen bei Erwachsenen und Jugendlichen kommt es zur infektiösen Mononukleose, oder auch Pfeiffer-Drüsenfieber genannt. Eine Infektion befällt vornehmlich B-Lymphozyten und klingt im Normalfall innerhalb von drei Wochen wieder ab. Weltweit sind mehr als 90% der Bevölkerung mit EBV infiziert. Bei der Bekämpfung und Unterdrückung der latenten Infektion sind hauptsächlich CD8⁺ T-Zellen in großer Zahl beteiligt. Die Anzahl antigenspezifischer T-Zellen fällt jedoch etwas niedriger aus als bei CMV-Infektionen (Kieff & Liebowitz, 1990; Maeda et al., 2009).

Es wurde gezeigt, dass bei vorliegender Infektion durch CMV oder EBV, CD8⁺-T-Zellen je nach Differenzierungsgrad in drei Subpopulationen unterteilt werden können. Dabei weisen die T-Zellen in einem frühen Differenzierungsgrad sowohl CD27 als auch CD28 auf ihrer Oberfläche auf (CD27⁺CD28⁺). Im Verlauf ihrer Reife verliert sich erst die CD28- und später die CD27-Expression. Dadurch lässt sich ein mittlerer Differenzierungsgrad mit CD27-positiven, aber CD28-negativen T-Zellen (CD27⁺CD28⁻) von einem späten Differenzierungsgrad mit doppelt negativer CD27-CD28-Expression (CD27⁻CD28⁻) unterscheiden. Die Untersuchungen ergaben weiterhin, dass antigenspezifische T-Zellen einer EBV-Infektion weniger differenziert sind als antigenspezifische T-Zellen einer CMV-Infektion (Appay et al., 2002; Appay, van Lier, Sallusto & Roederer, 2008). Weitere Untersuchungen von Dimitrov et al. führten zu der Erkenntnis, dass vor allem Effektor-Immunezellen (CD8⁺ T-Zellen, γ/δ -T-Zellen, zytotoxische natürliche Killerzellen und CD16 Monozyten) unter Zunahme des Katecholaminspiegels vom Endothel in die Zirkulation entlassen und rekrutiert werden. Diese Effektor-Immunezellen haben alle dasselbe phänotypische Alterungszeichen einer doppelt negativen CD27-CD28-Expression gemeinsam (Dimitrov et al., 2010).

1.4 Erfassen der antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort

Die Quantifizierung und Qualifizierung antigenspezifischer T-Zellen ist in der heutigen Immuntherapie von großer Wichtigkeit. Dafür stehen einige Methoden zur Verfügung, die grundsätzlich in funktionelle und nicht-funktionelle Verfahren unterteilt werden können.

1.4.1 Methoden zur Erfassung der antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort

Eine häufig angewandte Methode zur Erfassung der antigenspezifischen-Immunantwort findet über das direkte Markieren des TCR mithilfe von fluoreszenzmarkierten pMHC-Molekülen statt. Durch Rekombination der Peptide koppelt pMHC an spezifische TCRen und wird anschließend mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die sehr geringe Bindungsaffinität der pMHC-Monomere zu TCR kann mithilfe von pMHC-Tetrameren deutlich verbessert werden. Eine tetramere Struktur besteht aus vier Untereinheiten. Häufig wird Streptavidin als Universalbindeglied für Tetramere genutzt. Aufgrund der Tetramerisierung steigt die Bindungswahrscheinlichkeit und Bindungsdauer (Altman & Davis, 2016; Huang et al., 2016). Allerdings ist es bei dieser Methode nicht möglich die Effektor-Funktionen der T-Zelle zu untersuchen. Funktionelle Methoden stützen sich auf den Nachweis funktioneller Marker, wie beispielsweise CD137, CD107a und CD154, oder das Quantifizieren von Zytokinsekretion. Für die Analyse von Sekretionsfaktoren eignet sich in erster Linie die Enzyme-Linked-Immunospot (ELISpot) –Methode: Auf eine mit Antikörpern beschichtete Platte werden T-Zellen gegeben, die nach Antigenstimulation Zytokine sezernieren. Nach dem Anfärben der Antikörpergebundenen Sekretionsfaktoren auf der Platte lassen sich diese mittels eines ELISpot-Readers auslesen. Daraus lässt sich die Anzahl der antigenspezifischen T-Zellen und deren Zytokinproduktion errechnen. Des Weiteren lassen sich Zytokine intrazellulär mittels der „intercellular-cytokine“-Methode analysieren. Indes ist hierfür jedoch das Permeabilisieren und Fixieren der Zellen, sowie eine Durchflusszytometrie-gestützte Analyse notwendig. Eine CD137- und CD107a-

Expression auf CD8⁺ T-Zellen, infolge einer antigenspezifischen Stimulation, kann mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern nachgewiesen werden. Gleiches gilt für CD154, welches auf aktivierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird. (Betts et al., 2003; Chattopadhyay, Yu & Roederer, 2005; Frentsch et al., 2005; Wolf et al., 2007). Nachteil all dieser funktionellen Verfahren ist die lange, über Stunden dauernde, Stimulationszeit, die für die *de novo*-Produktion von Proteinen in der Zelle oder Oberflächenexpression erforderlich ist (Gouttefangeas, Schuhmacher & Dimitrov, 2019).

1.4.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorting = FACS) ist eine etablierte Methode, um physikalische wie chemische Eigenschaften, einzelner Zellen zu messen. Dabei wird ein komplexes System der Optik, der Strömungslehre und der Elektronik angewandt. Über einen Prozess, der als „hydrodynamisches Fokussieren“ bezeichnet wird, lassen sich zufällig verteilte Zellen einer Probe in einem Strom aus Trägerflüssigkeit zu aneinandergereihten einzelnen Zellen ordnen. Beim Passieren eines Laserstrahls können nun quantitative und qualitative Informationen Zell-individuell erfasst werden. Größe und Granularität einer Zelle können mithilfe von Streulichtern ausgewertet werden. Dies wird zur ersten Aufgliederung von Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten angewandt. Um eine weitere Differenzierung zu erreichen, werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet. Mit diesen Farbstoffen, die an Antikörper gekoppelt werden, lassen sich über die Antigen-Antikörper-Reaktion nahezu beliebige Moleküle anfärben. Fluoreszenzmarkierte Antikörper, die an Zellart-spezifische Oberflächenmerkmale binden, ermöglichen große Blutproben in ausgewählte Zell-Gruppen und -Untergruppen zu untergliedern. Moderne Fluoreszenz-Durchflusszytometrie nutzt mehr als einen Laser. Eine angepasste Auswahl an Farbstoffen und deren verschiedene Emissionsspektren erlaubt das Verwenden mehrerer Farbstoffe in einer Probe. Jedes optische Ereignis wird

computergestützt aufgezeichnet und kann in Histogrammen und Punktdiagrammen (Dot-Plots) ausgewertet werden.

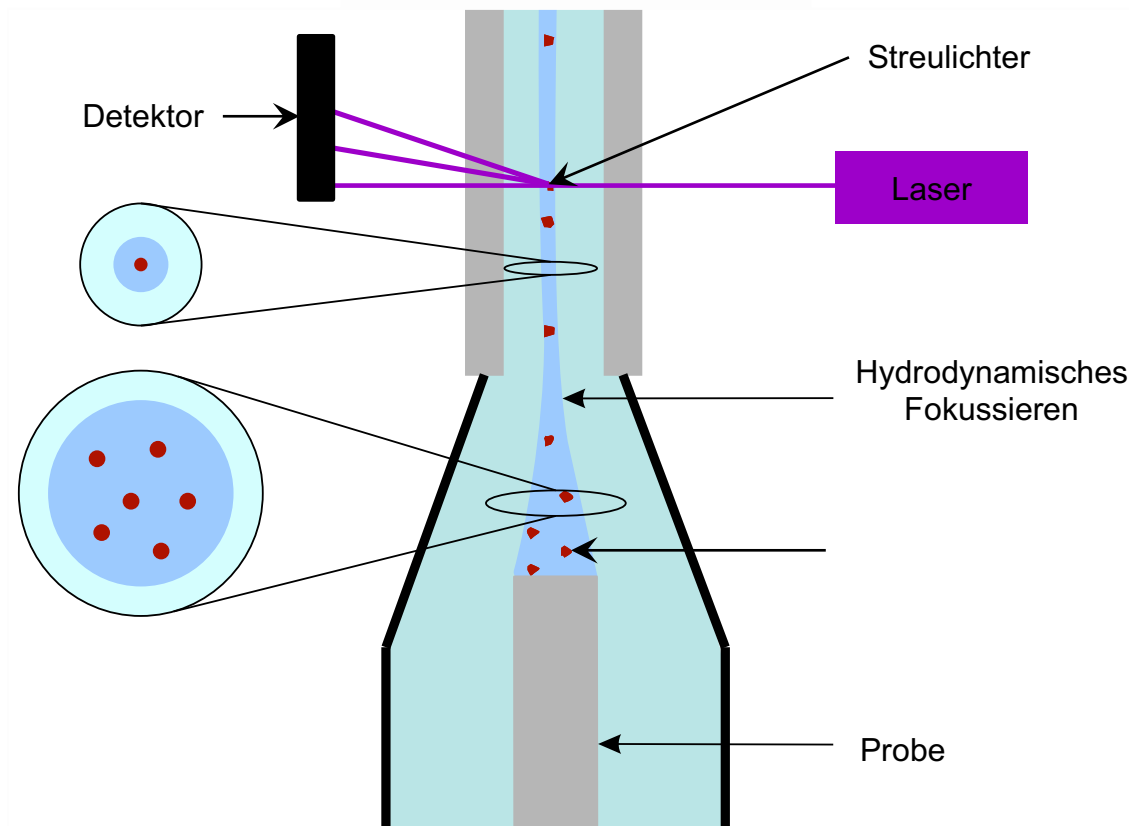


Abbildung 4: Hydrodynamisches Fokussieren. Bei der Durchflusszytometrie wird die Probe zu einer Zell-Zell-Kette gebündelt: Eine Quarzküvette verjüngt sich in Richtung Auslass. Durch Reduzieren des Radius und einer laminaren Strömung, entsteht ein Kernfluss, der die Zellen nacheinander anordnet. Dieser Prozess wird „Hydrodynamisches Fokussieren“ genannt. Mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen und deren Streulichter können Informationen über Laseremissionen auf Detektoren gesammelt werden.

1.4.3 Erfassen der antigenspezifischen T-Zell-Immunantwort mit ICAM-1-Multimeren

Dimitrov et al. etablierte 2018 eine neuartige, ebenfalls FACS-gestützte Methode zur Markierung und Untersuchung antigenspezifisch aktivierter T-Zellen. Diese Methode nutzt die $\beta 2$ -Integrinaktivierung infolge einer pMHC-Erkennung durch den TCR aus. Zur Markierung wird der natürliche LFA-1-Ligand ICAM-1

verwendet. Da ICAM-1 *in vitro* eine sehr schwache Affinität zu LFA-1 besitzt (Tominaga et al., 1998), werden ICAM-1-Multimere (mICAM-1) verwendet. Die Funktionalität dieser Methode konnte mit einer breiten Auswahl von Antigenen (CMV, HIV, EBV, Flu, YFV) an Vollblutproben, sowie frischen, aber auch zuvor eingefrorenen, mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC's) bestätigt werden. Ein großer Vorteil dieser Methode ist die Integrinaktivierung infolge einer antigenspezifischen T-Zellaktivierung binnen Minuten und der laboratorisch simple und geringe Aufwand der Prozedur. Aufgrund der kurzen Stimulationszeit lassen sich gleichzeitig weitere Zellmerkmale anfärben, um detailliertere Informationen der T-Zelle zu erfassen. Dabei korreliert das Maß der mICAM-1-Markierung mit dem Nachweis funktioneller Marker wie der Zytokinproduktion (IFN- γ / TNF) und der CD107a-Präsentation der T-Zelle. Ebenfalls konnte eine Korrelation mit der Perforin- und Granzym B-Expression beobachtet werden (Dimitrov et al., 2018).

1.5 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Eine der wichtigsten und größten Klassen membranständiger Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs). Sie leiten Informationen durch extrazellulär bindende Liganden in das Innere einer Zelle weiter. Von zentraler funktioneller Bedeutung ist ihre Assoziation mit Guanosinnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteine). G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten: der α -, β - und γ -Untereinheit. Man unterscheidet einen aktiven von einem inaktiven Zustand des Rezeptors. Im aktiven Zustand ist Guanosintriphosphat (GTP), im inaktiven Zustand Guanosindiphosphat (GDP) an die α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins gebunden. Nach Aktivierung dissoziieren die Untereinheiten und geben das Signal ihrerseits durch verschiedene Interaktionen mit Effektormolekülen in der Zelle weiter. Je nach Art und Zusammensetzung verschiedener Untereinheit-Varianten ergeben sich unterschiedliche Wirkmechanismen. So lassen sich vier α -Untereinheiten differenzieren (α_s , α_i , α_q , $\alpha_{12/13}$). Dabei stimulieren $G\alpha_s$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren ($G\alpha_s$ PCRs) und $G\alpha_i$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren inhibieren ihr wichtigstes Effektorenzym Adenlytzyklase. Adenlytzyklase bildet

wiederum den Second messenger zyklisches Adenosinmonophosphat aus. Der Anstieg von cAMP führt in T-Zellen zu inhibitorischen Stimuli auf Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität. Adrenerge Rezeptoren sind klassische GPCRs. Ihre Liganden sind Katecholamine wie Epinephrin und Norepinephrin. Auch diese Rezeptoren lassen sich in α - und β -Rezeptoren mit weiteren Unterklassen, je nach Gewebsverteilung und unterschiedlicher intrazellulärer Signalreaktion, differenzieren. Dabei befinden sich α -adrenerge Rezeptoren typischerweise in den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen, Niere, Haut und Darm. β -adrenerge Rezeptoren werden vor allem von Herzzellen, glatten Muskelzellen der Lunge, sowie von Lymphozyten und Fettgewebszellen exprimiert (Friedrich & Behrmann, 2009).

Studien mit Katecholaminen (Wahle et al., 2005), Prostaglandin E2 (PGE2) und D2 (PGD2) (Kalinski, 2012; Scher & Pillinger, 2009), Adenosin (Hoskin, Mader, Furlong, Conrad & Blay, 2008), Dopamin (Yan et al., 2015), Histamin und Serotonin (Kim et al., 2013), zeigen eine breite Palette an immunmodulatorischen Effekten auf Immunzellen, die von der jeweiligen Expression der verschiedenen GPCRs abhängig sind. Hoffmann et al. (2004) charakterisierte die Bindungsaffinität einiger GPCR-Agonisten, darunter Epinephrin, Norepinephrin und Isoproterenol, zu den drei bekannten β_1 -, β_2 - und β_3 -Rezeptorsubtypen. Dabei wurde die Bindungsaffinität in Bezug zu der damit verbundenen Stimulation der Adenylcyclase und somit einer erhöhten cAMP-Produktion gesetzt. Das Ergebnis zeigt einen einheitlich hohen Wirkungsgrad von Isoproterenol, unabhängig des β -Rezeptorsubtyps. Norepinephrin weist hohe Effektivität gegenüber β_1 -Rezeptoren auf. Epinephrin wirkt hauptsächlich über β_2 -Rezeptoren.

1.6 G-Protein-gekoppelte Rezeptorstimulation führt zu Anti-adhäsiven Signalen auf Immunzellen

Immunologische Studien der letzten 20-30 Jahre bestätigen die entscheidende Rolle der Integrin-vermittelten Adhäsion in der T-Zell-Immunantwort bezüglich ihrer Rezirkulation, Rekrutierung, Aufenthalt und Ausbildung der immunologischen, sowie zytotoxischen Synapse. In der Neuroimmunologie ist

die Rekrutierung von Effektor-Immunzellen, wie beispielsweise CD8⁺ T-Zellen und natürliche Killerzellen, infolge eines gesteigerten Katecholaminspiegels durch Stress, Tageslicht oder Epinephrininfusion eines der meistreplizierten Themen (Anane et al., 2009; Bosch, Fischer & Fischer, 2009; Dimitrov et al., 2009; Dimitrov, Hulteng & Hong, 2017; Kühlwein et al., 2001; Lange, Dimitrov & Born, 2010). Nichtsdestotrotz blieben die molekularen Regelmechanismen der Katecholamin-induzierten Mobilisation von Effektorzellen weiter unklar.

Erste Hinweise auf eine Verbindung zwischen Katecholamin-induzierter Mobilisation und einer Integrin-vermittelten Adhäsion lieferten Untersuchungen von Chigaev et al. (2008/2011). Sie belegen ein, von Gα_s-Protein-gekoppelten Rezeptoragonisten ausgelöstes, anti-adhäsives Signal auf Monozyten. Über den intrazellulären Anstieg von cAMP führt dies zu einem Abfall der Integrinaffinität auf der Oberfläche. Dabei wurden Amthamin, ein H₂-histaminerges Rezeptoragonist und Isoproterenol als β_{1/2}-adrenerger Rezeptoragonist verwendet (Chigaev, Smagley & Sklar, 2011; Chigaev, Waller, Amit & Sklar, 2008). Später konnte Dimitrov et al. (2010) zeigen, dass alle mobilisierten Effektorzellen eine hohe Anzahl an Integrin LFA-1 und Chemokin-Rezeptor CX3CR1 exprimieren. Das steigert ihre Adhärenz zu aktiviertem Endothel. Dies ließ sich in-vitro jedoch umgehend durch Zugabe von Epinephrin blockieren. Obwohl es noch nicht direkt durch In-vivo-Studien belegt werden konnte, führen diese Erkenntnisse zu der Vermutung, Effektorzellen könnten durch einen CX3CR1-induzierten LFA-1-aktivierenden Mechanismus am Endothelium verharren. Dieser Prozess ließe sich mit steigenden Epinephrin-Konzentrationen rapide inhibieren. Infolgedessen käme es zu einem Ablösen der Zelle vom Endothel und entließe die Zelle in den Kreislauf (Dimitrov et al., 2010).

Zudem konnten durch gesteigerte GPCR-Agonist-Konzentrationen negative Auswirkungen auf die Funktionalität des Immunsystems beobachtet werden. Krankheitsbilder wie chronischer Stress und Schlafstörungen heben den Katecholaminspiegel, und haben dadurch suppressive Effekte auf die T-Zell-Immunantwort (Atanackovic et al., 2006; Brudvik & Taskén, 2012; Sloan et al., 2010). In Bezug auf Schlafentzug konnten erhöhte Serotoninwerte beobachtet

werden (Davies et al., 2014). Aktuelle Forschung beschäftigt sich zudem intensiv mit gesteigerten Prostaglandinwerten, die mit einigen Tumoren, aber auch mit Malaria-Erkrankung assoziiert sind (Chaudry, Wahle, McClinton & Moffat, 1994; Kilunga Kubata et al., 1998; Klapan, Culo, Snyderman, Johnson & Whiteside, 1991; Loh, Hwang, Lieu, Huang & Howng, 2002). Bei Hypoxie und Schlafapnoe, sowie lokaler Gewebs-Hypoxie infolge von Tumorwachstum, konnten gesteigerte Adenosinwerte gemessen werden, die die T-Zell-Funktion über A_{2A}-Rezeptoren erheblich beeinträchtigen (Hoskin et al., 2008; Ohta et al., 2006).

Darüber hinaus weisen neueste Untersuchungen auf einen Zusammenhang nächtlich reduzierter G_{α_s}PCR-Agonist-Konzentrationen und einer Verbesserung der adaptiven Immunität hin (Benedict, Brytting, Markström, Broman & Schiöth, 2012; Irwin, Thompson, Miller, Gillin & Ziegler, 1999; Lange, Dimitrov, Bollinger, Diekelmann & Born, 2011; Lange, Perras, Fehm & Born, 2003).

1.7 Fragestellung

- 1.) Derzeit sind zwei Signalwege zur Aktivierung von Integrinen bekannt: Zum einen der Weg über Chemokin-Rezeptoren und zum anderen über eine Stimulation des TCR. Chigaev et al. (2008) zeigte an Monozyten und deren Chemokin-Rezeptoren eine Inhibition der Integrinaktivierung durch G_{α_s}PCR-Agonisten. Wir stellten die Hypothese auf, G_{α_s}PCR-Agonisten hätten ebenfalls inhibierenden Einfluss auf die TCR-vermittelte Integrinaktivierung auf antigenspezifischen T-Zellen. Dafür untersuchten wir CMV- und EBV-spezifische T-Zellen CMV- und EBV-positiver Probanden. TCRen dieser antigenspezifischen T-Zellen wurden mit Hilfe von pMHC Tetrameren stimuliert und gekennzeichnet. Die dadurch ausgelöste Aktivierung von Integrinen wurde unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten ICAM-1 Multimeren im Durchflusszytometer aufgezeichnet und dargestellt. Diese Methode wurde von Dimitrov et. al 2018 beschrieben. Anschließend verwendeten wir unterschiedliche Konzentrationen an G_{α_s}-PCR-Agonisten, um ihren Effekt auf die Integrinstimulation zu beurteilen. Die Ergebnisse sollten zeigen, wie

Bedingungen mit niedrigen, physiologischen Konzentrationen an $G\alpha_s$ -PCR-Agonisten, wie beispielsweise denen unter Schlafbedingungen, sowie Bedingungen mit hohen Konzentrationen die Integrinaktivierung und das damit verbundene Ausformen einer immunologischen Synapse sowie die Effektor-T-Zell-Funktion beeinflussen.

- 2.) Die zweite konsequente Frage war: Welche der bekannten $G\alpha_s$ -PCR-Agonisten haben einen inhibierenden Einfluss auf die TCR-vermittelte Integrinaktivierung auf antigenspezifischen T-Zellen? Von Interesse waren für uns bekannte immunmodulierende Stresshormone wie Epinephrin, Norepinephrin und dem synthetischen Isoproterenol, aber auch andere über $G\alpha_s$ -PCRen immunmodulierende Substanzen wie Prostaglandin D2 und E2, Adenosin, Histamin, Serotonin und Dopamin.
- 3.) Bekannterweise verlieren insbesondere höher differenzierte Immunzellen durch einen Anstieg von Katecholamin-Konzentrationen ihre Bindung zum Endothel und werden einfacher in den Blutkreislauf mobilisiert. Diese Reaktion lässt sich eventuell auf ihre höhere Sensitivität der GPCR zurückführen. Wir stellten uns folglich die Frage, ob der Einfluss von GPCR-Signalen eine unterschiedliche Inhibition von Integrinen der einzelnen CMV-spezifischen $CD8^+$ T-Zell-Subpopulationen zur Folge hat. Subpopulationen wurden mit den Oberflächenmerkmalen CD27 und CD28 in einen frühen Differenzierungsgrad ($CD27^+CD28^+$), einen mittleren Differenzierungsgrad ($CD27^+CD28^-$) und einen späten Differenzierungsgrad ($CD27^-CD28^-$) unterteilt und untersucht. Es sollte überprüft werden, ob sich in Bezug auf die Integrininhibition auch hier der Einfluss steigender Katecholaminspiegel hauptsächlich auf den späten Differenzierungstyp auswirkt.

2 Material und Methoden

2.1 Probanden und Blutproben

Für eine Schlaf-Immunistudie unserer Arbeitsgruppe wurden 150 Testpersonen nach einem positiven CMV-Titer-Nachweis und dem HLA-Merkmal (Humanes

Leukozytenantigen) A2 untersucht. Um eine HLA-A2-Positivität festzustellen, wurden die Blutproben mit einem HLA-A2-Antikörper (Klon BB7.2) der Firma Biologend (San Diego, Kalifornien, USA) markiert. Diese Kriterien erfüllten 11 Probanden mit nachweisbaren CMV-Tetramer positiven Zellzahlen. Bei fünf gesunden Probanden konnten zusätzlich der CMV-spezifischen T-Zellen auch nachweisbare EBV-spezifische T-Zell-Populationen festgestellt werden. Meine Studie präsentiert die Ergebnisse dieser 5 Probanden (2 Frauen, 3 Männer). Das Alter der Probanden lag zwischen 19 und 34 Jahren (mittleres Alter von 24,7 Jahren) bei einem mittleren Body-Mass-Index von 22,4. Keiner der fünf Probanden war Raucher. Medikationen (außer orale Kontrazeptiva bei Frauen), eine medizinische Vorgeschichte relevanter chronischer Krankheiten oder psychische Störungen wurden mittels eines Fragebogens abgefragt und lagen zum Zeitpunkt der Experimente nicht vor. Auch akute Krankheit wurde durch eine körperliche Untersuchung und die Erhebung der üblichen Laborwerte ausgeschlossen (Blutbild, CRP Konzentration < 6 mg/L, Leukozytenzahl (WBC) < 9,000/ μ L). Meine Untersuchungen waren Teil einer größeren Schlafstudie, in deren Verlauf Probanden innerhalb von 24 Stunden, je um 22, 2, 6, 10, 14 und 18 Uhr Blut entnommen wurde. Die Probanden schliefen in der Nacht zwischen 23 und 7 Uhr morgens. Um die Teilnehmer in der Nacht nicht zu wecken, wurde mithilfe eines peripheren Venenverweilkatheters „Vasofix“ der Firma Braun (Melsungen, Deutschland) mit Heidelberger Verlängerung, von einem angrenzenden Überwachungsraum aus abgenommen. Einer Blutgerinnung wurde durch eine nächtliche Infusion von insgesamt 500 ml – 700 ml physiologischer Kochsalzlösung über den Venenverweilkatheter vorgebeugt. Jeder Teilnehmer musste zuvor eine Adaptionnacht unter Versuchsbedingungen im Schlaflabor verbringen. Um den hormonellen Einfluss bei weiblichen Versuchsteilnehmerinnen zu vereinheitlichen, fand das Experiment jeweils zwischen drei bis sechs Tagen nach Beginn des Menstruationszyklus, beziehungsweise des hormonfreien Intervalls bei Kontrazeption, statt. Für die diese Dissertation wurde mit frischem Heparin-Blut der 6-Uhr-Entnahme gearbeitet, da bei Schlafenden der endogene Spiegel an $G\alpha_s$ -PCR-Agonisten niedriger ist als im Wachzustand. Entnommen wurde in eine

Natrium-Heparin Monovette der Firma Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), wobei die ersten 7,5ml der Blutprobe verworfen wurden.

Die Ethik-Kommission der Universität Tübingen prüfte und genehmigte die Studie (Aktenzeichen 642/2013BO2) am 29.01.2014. Die Probanden nahmen aus freiwilligen Stücken an der Untersuchung teil und gaben vorausgehend eine schriftliche Einverständniserklärung nach entsprechender Bedenkzeit gemäß der Deklaration von Helsinki ab. Vorausgehend wurden sie über Durchführung und Risiken durch einen Arzt aufgeklärt. Für das Analysieren und Präsentieren der Daten wurden den Probanden, im Sinne des Datenschutzes, Pseudonyme vergeben.

2.2 Herstellung der notwendigen Versuchssubstanzen

2.2.1 Herstellung von biotinilierten pHLA-A*0201 Monomeren für CMV und EBV und deren Multimerisierung

Bei den Untersuchungen wurden bekannte immundominante CD8-T-Zell-Epitope von Viren (CMV/ EBV) verwendet, um die T-Zellen zu stimulieren. Die Epitope wurden auf HLA-A2-Komplexen präsentiert. Im Speziellen wurden das NLVPMVATV-Peptid des humanen Zytomegalievirus-Proteins PP65 und das GLCTLVAML-Peptid des Epstein-Barr-Virus-Proteins BMLF1 verwendet und im Eigenlabor zu biotinilierten HLA-A2-Peptid-Monomeren (pHLA-A2) rückgefaltet. Die Monomere wurden mit einer Konzentration von 2mg/ml aliquotiert und bei -80 °C eingelagert (Hadrup et al., 2015).

Um fluoreszente pHLA-A2 (CMV: A2-NLV- und EBV: A2-GLC) Multimere herzustellen, wurden die gefrorenen Monomer-Aliquote zuerst auf eine Temperatur von 4 °C gebracht und dann mit einer Streptavidin-Farbstoff-Kombination in einem 4 (Streptavidin): 1 (Monomer) Verhältnis (Dimitrov et al., 2018) inkubiert. Im Falle der CMV-Peptide wurde Streptavidin mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Phycoerythrin (PE) und bei EBV-Peptiden mit PE oder Allophycocyanin (APC) verwendet. Die Streptavidin-Farbstoff-Kombinationen wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) bezogen.

Bei der Herstellung der Multimere wurde den Monomeren alle 30 Minuten 10% der angestrebten Streptavidin-Farbstoff-Menge hinzugegeben. Diese Prozedur wurde wiederholt, bis 100% erreicht waren. Die Herstellung fand im Dunkeln und bei einer Temperatur von 4 °C statt. Zum Schluss wurde 1 mM Biotin (B4501; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) bis zu einer Endkonzentration von 25 µM hinzugefügt (Chandran et al., 2016). Nach erneutem Aliquotieren wurden die Multimere in einer Gefrierlösung (s.u.) bei -80 °C eingefroren. Sämtliche Mengenangaben der verwendeten Substanzen zur Herstellung von CMV A2-NLV/PE- und EBV A2-GLC/PE(APC)-Multimeren sind in Tabelle 1 gelistet:

Tabelle 1: Herstellung von pHLA-A2 Multimeren

<i>Konjugat</i>	<i>Volumen Monomer</i>	<i>Volumen Streptavidin</i>	<i>Volumen Biotin 1 mM</i>	<i>Gesamt-volumen</i>	<i>Endkonz. der Multimere</i>
CMV A2-NLV/PE	125 µl	400 µl	13.1 µl	538.1 µl	465 µg/ml
EBV A2-GLC/PE	50 µl	160 µl	5.3 µl	215.3 µl	465 µg/ml
EBV A2-GLC/APC	125 µl	210 µl	8.4µl	343,4 µl	728 µg/ml

Als Gefrierlösung wurde 1 ml 3X-Glycerin Lösung aus humanem Serum-Albumin (HSA) (Albiomin® , Biotest, Dreieich, Deutschland), Natriumazid (NaN₃), Glycerin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS) mit einem pH-Wert von 8 und bei einer Temperatur von 4 °C angewendet (Hadrup et al., 2015).

Im Detail wurde folgende Zusammensetzung verwendet (Tabelle 2):

Tabelle 2: Herstellung der 3X-Glycerin Einfrierlösung

<i>Substanzen</i>	<i>Konzentration der Vorratslösung</i>	<i>Hinzuzufügendes Volumen</i>	<i>Konz. in 3X - Lösung</i>	<i>Endkonz. der Tetramere</i>

HSA	20%	75 µl	1.5%	0.5%
NaN₃	10%	6 µl	0.06%	0.035%
Glycerin	100%	480 mg	48%	16%
TBS	20 mM	439 µl		

Die 3X-Glycerinlösung wurde nun zu der bestehenden pHLA-A2-Multimer Lösung in einem 2 (Multimer): 1 (3X-Glycerin Lösung) molaren Verhältnis (Tabelle 3) hinzugegeben (gearbeitet wurde auf Eis und an einer sterilen Werkbank):

Tabelle 3: Mixen von Multimer and 3X-Glycerin

<i>Parameter</i>	<i>CMV-Tetamer-PE</i>	<i>EBV-Tetamer-PE</i>
Vol. Multimer	538 µl	215 µl
Vol. 3X-Glycerin	269 µl	108 µl
Gesamtvolumen	807 µl	323 µl
Endkonz. der Tetramere	310 µg/ml	310 µg/ml
Nb/ Vol. des Aliquot	67/ 12µl	34/ 12µl

2.2.2 Herstellung von humanen ICAM-1 Multimeren

In der Vergangenheit wurde fluoreszenzmarkierte ICAM-1-Monomere oder -Komplexe verwendet, um Veränderungen der β_2 -Integrin Affinität auf humanen T-Zellen zu messen. Zur direkten Aktivierung der Zelle wurden entweder Chemokine (Chan, Hyduk & Cybulsky, 2003), oder Antikörper (Tang, 2005) eingesetzt. Bei weiteren gängigen Methoden der unspezifischen Stimulation von T-Zellen fanden Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) oder hohe Konzentrationen an Magnesium Verwendung (Altman & Davis, 2016; Konstandin et al., 2006, 2007). In dieser Studie wurde zum ersten Mal die β_2 -Integrin Affinität auf humanen T-Zellen infolge einer spezifischen TCR-Stimulation untersucht. Da monomeres ICAM-1 eine sehr schwache Bindungsaffinität zu β_2 -Integrinen aufweist, wurden multimere ICAM-1 Komplexe (mICAM-1) verwendet, die eine deutlich gesteigerte Adhäsion erzielen (Konstandin et al., 2006, 2007). Für die Multimerisierung, macht man sich eine Verkettungsreaktion zwischen der

konstanten fragmentkristallisierbaren Region (Fc-Region) rekombinanter humaner ICAM-1-Fc-Moleküle und Antikörpern, mit fluoreszenzmarkierten polyklonalen antigenbindenden Fragmenten (F(ab')₂), gegen die humane Fc-Region zunutze (Bengtsson et al., 2013). 200 µg/ml rekombinantes humanes ICAM-1-Fc, wurden mit polyklonalen anti-humanen Fc F(ab')₂ Fragmenten inkubiert. Die Fragmente ihrerseits wurden vorausgehend mit dem Flouorchrom Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK) konjugiert. Die Ko-Inkubation wurde in einem molaren Verhältnis von 1 (ICAM-1-Fc): 4 (anti-Fc-FITC F(ab')₂) durchgeführt (s. Abbildung 5). Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden bei 4 °C.

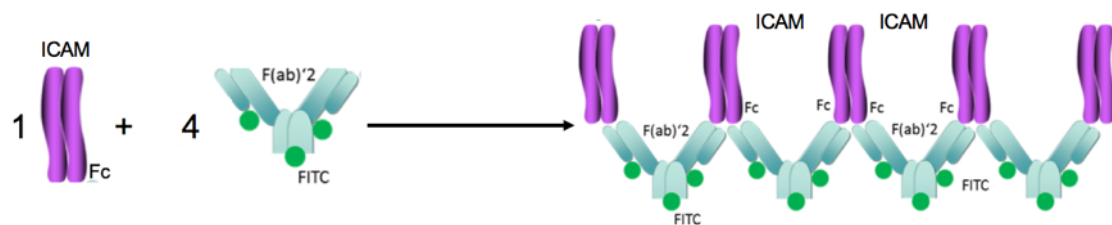


Abbildung 5: Produktion von humanen ICAM-Multimeren (mICAM). ICAM-1Fc wurde in einem molaren 1: 4 Verhältnis mit Fc-FITC F(ab')₂ koinkubiert.

Um die optimal wirksame Konzentration an mICAM-1 für die folgenden Untersuchungen festzulegen, wurden verschiedene mICAM-1 Konzentrationen und ihre Bindung zu stimulierten CD8⁺ T-Zellen in einem Vorversuch getestet. Hierzu wurde 380 µl frisches Vollblut von Spendern mit positivem CMV HLA-A2/NLV-Multimer-Nachweis verwendet. Das Blut wurde erst 8 Minuten mit NLV-Peptiden stimuliert, bevor in den letzten 4 Minuten 0,6 µg/ml HLA-A2/NLV Multimere und mICAM-1 je in ansteigenden Konzentrationen von 25 zu 0,78 µg/ml hinzugegeben wurde. Eine Negativkontrolle wurde mit PBS (Phosphat-gepufferte-Salzlösung) anstatt mit ICAM-1-Fc durchgeführt, um die unspezifische Bindung zu quantifizieren.

So wurde in dieser Studie 6,25 µg/ml ICAM-1-Fc in einem 1 (ICAM-1-Fc) zu 4 (Fc-FITC F(ab')₂) molaren Verhältnis verwendet, da hier der größte Anteil positiver Zellen (>60%) und die geringste Hintergrundfärbung durch anti-Fc-

Antikörper (<0,05%) erreicht werden konnte. Die Ergebnisse der Färbung wiesen zu den Ergebnissen kürzerer Inkubationszeiten (1 oder 2 Minuten) keine Unterschiede auf. Um trotzdem zur gleichen Zeit mit pHLA-A2-Multimeren stimulieren zu können wurde die Inkubationszeit bei 4 min belassen. Die mICAM-1 Komplexe wurden entweder sofort verwendet oder bei -20 °C eingefroren und innerhalb von einer Woche eingesetzt (Dimitrov et al., 2018).

2.3 Versuchsablauf: Zellstimulation, Inhibition und Anfärbeverfahren

Bei der Zellstimulation und das darauf folgende Anfärben der Proben wurde auf ein bereits entwickeltes FACS-gestütztes Verfahren zur Beobachtung von β_2 -Integrinaktivierung auf antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen zurückgegriffen (Dimitrov et al., 2018). Infolge einer spezifischen TCR-induzierten Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen durch CMV A2-NLV/PE- oder EBV A2-GLC/PE-Multimere, wird hierbei die zelluläre Bindung von mICAM-1 als Indikator der resultierenden steigenden β_2 -Integrinaffinität und -avidität veranschaulicht. Im Versuch verwendeten wir 380 μ l frisches heparinisiertes Vollblut. Um die Auswirkungen der $G\alpha_s$ -Protein-gekoppelten Rezeptoragonisten auf die TCR-induzierte β_2 -Integrinaktivierung zu untersuchen, wurden zuerst die Blutproben mit den jeweiligen Agonisten (Isoproterenol (1), Epinephrin (2), Norepinephrin (3), Prostaglandin D2 (4), Prostaglandin E2 (5), Adenosin (6), Serotonin (7), Histamin (8) Dopamin (9)) in 5 ml-Falcon-Zentrifugenröhrchen (BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA) für 5 min bei 37 °C inkubiert. Substanzen 1- 6 wurden über die Firma Sigma-Aldrich (s.o.), 6- 9 über die Firma Carl Roth (s. o.) bezogen. Pro Agonist gab es eine Nullprobe, die mit PBS inkubiert wurde. Dabei fanden folgende Konzentrationen Verwendung:

- (1) und (2): 5×10^{-11} , 1×10^{-10} , $3,3 \times 10^{-10}$, 1×10^{-9} , 1×10^{-8} M
- (3): 1×10^{-9} , $3,3 \times 10^{-9}$, 1×10^{-8} , $3,3 \times 10^{-8}$, 1×10^{-7} , 1×10^{-6} M
- (4) und (5): 10, 33, 100, 333, 1000, 10000 pg/ml
- (6), (7) und (8): 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} , M
- (9): 1×10^{-10} , 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} M

Unmittelbar danach wurden die Proben mit 0,6 µg/ml CMV A2-NLV/PE (oder 0,6 µg/ml EBV A2-GLC/PE) Multimeren, sowie der 6,25 µg/ml mICAM-1/FITC Aliquote, für 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden Erythrozyten mit einer FACS-Lyse (FACS-Lysing solution, BD Biosciences) für 5 min lysiert. Diese fixiert gleichzeitig die Zellen, um eine weitere Aktivierung von Integrinen zu verhindern und um das Färbereagenz an Integrinen fest zu binden. Die Lyse enthielt zusätzlich 1 mM Ca²⁺ und 2 mM Mg²⁺. Gewaschen wurden die Proben mit PBS (mit 0,5% Albumin- und 0,1% NaN₃). Nach dem Zentrifugieren wurden einige Oberflächenmarker der Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mittels Fluoreszenzfarbstoffen der Firma BioLegend (Anton-Jordan-Str. 1, Koblenz, Deutschland) angefärbt, um CD8⁺ T-Zellen und ihre Subpopulationen zu identifizieren. Das Anfärben fand im Dunkeln statt. Im Einzelnen wurden die folgenden monoklonalen Antikörper-Farbstoffverbindungen verwendet:

- CD4/Brilliant Violet 421™ (CD4/BV421)
- CD3/Brilliant Violet 510™ (CD3/BV510)
- CD8/Brilliant Violet 605™ (CD8/BV605)
- CD28/Peridinin-Chlorophyll-Protein-Cyanin5.5 (CD28/PerCP-Cy5.5)
- CD27/Allophycocyanin (CD27/APC)
- CD14/Allophycocyanin-Cyanin7 (CD14/APC-Cy7)
- CD19/APC-Cy7

Die optimale Konzentration der jeweiligen Antikörper-Farbstoffverbindung wurde im Voraus getestet und konform verwendet. Adenosin wird bei der Verwendung von Vollblut schnell von Erythrozyten aufgenommen (Ramakers et al., 2008). Ergänzend Weise untersuchten wir somit PBMCs dreier CMV-positiver Probanden. Dazu wurden PBMCs mittels BD Vacutainer® CPT™ Blutentnahmeröhrchen (BD Biosciences) isoliert und nachfolgend wie oben beschrieben behandelt.

2.4 Auswertung der Proben

Zur Auswertung der Proben diente der Durchflusszytometer „LSR Fortessa“ (BD Biosciences) und die Auswertungs-Software „FACS DiVA“ (Version 8.0). Die

Daten wurden mit Hilfe von Punktdiagrammen, sogenannten Dot-Plots dargestellt. Punktdiagramme haben den Vorteil einer bivariaten Analyse. Der Durchflusszytometer zeichnet jede Zelle inklusiver aller Farbstoffmarkierungen als Event auf. Es wurde pro Probe im Minimum 50000 CD8⁺-Events für die Analyse gesammelt. Auf einer logarithmischen Skala wird die gemessene Intensität der Fluoreszenzfarbstoffe aufgetragen. Als Vorsortierung dienen Vorwärtsstreulichter (forward scatter, FSC) und Seitenstreulicht (side scatter, SSC). Diese Streulichtparameter geben Auskunft über Größe und Granularität einer Zelle. Setzt man im Dot-Plot zwei Parameter gegeneinander, erhält man Populationen von Zellen. Mit Filtern, sogenannten Gates, können logische Differenzierungen der Zellen aufgrund ihrer spezifischen Fluoreszenz-Färbungen erfolgen. Dieser Prozess wird auch als Gating bezeichnet. Bei der verwendeten Gating-Strategie wurden zunächst mithilfe der SSC- und FSC-Parameter Lymphozyten, aus Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, Monozyten, Neutrophile und Eosinophile) ausgewählt. Aufgrund einer späteren Zellspezifikation über Oberflächenmarker, konnte hier das Gate etwas großzügiger gewählt werden (Abbildung 6A, links). Mit Hilfe von FSC-H (Höhe) und -A (Breite) lassen sich in einem zweiten Schritt Einzelzellen von Zelle-Dubletten separieren (Abbildung 6A, Mitte). Anhand der Oberflächenmarker CD3 und CD8 und der doppelt positiven Zellpopulation im Dot-Plot werden CD8⁺ T-Zellen erkannt (Abbildung 6A, rechts). CD14 und CD19 wurden jeweils mit einer Antikörper-Farbstoffverbindung mit demselben Farbstoff angefärbt. Somit konnte im Dot-Plot, in Kombination des Oberflächenmarkers für CD4, ein trivariater Ausschluss von T-Helferzellen (CD4/BV421⁺), B-Zellen (CD19/APC-Cy7⁺) und Monozyten (CD14/APC-Cy7⁺), die sich bis hierher eventuell noch in der Auswahl befunden haben könnten, erreicht werden (Abbildung 6A, zweite Reihe). Diese „saubere“ CD8⁺ T-Zell-Population konnte nun unter Verwendung der Differenzierungsmarker CD27 (CD27/PECy7⁺) und CD28 (CD28/BV410⁺) in vier verschiedene Subpopulationen nach Appay (Appay et al., 2002, 2008) aufgeteilt werden. So befinden sich in Abbildung 6B die doppelt negative Population CD27⁻ CD28⁻ im unteren linken Quadranten des Dot-Plots, die einfach positiven

Populationen CD27⁺CD28⁻ links oben sowie CD27⁻CD28⁺ rechts unten und die doppelt positive Population CD27⁺CD28⁺ im oberen rechten Quadranten.

Antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen mit positiver mICAM-1 (mICAM-1/FITC⁺), als auch positiver pHLA-A2-Tetramer-Färbung (im Graph als A2 abgekürzt: A2-NLV/PE⁺ und A2-GLC/PE⁺), werden in Abbildung 6C und D präsentiert. Der mICAM-1⁺ Anteil wurde prozentual zum Elternteil aller entsprechenden antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen (A2⁺) berechnet. Im Dot-Plot sind antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen mit einem magentafarbenem Rahmen hervorgehoben. Diejenigen antigenspezifischen CD8⁺ die zusätzlich eine mICAM-1⁺-Färbung aufweisen, befinden sich im oberen Teil des unterteilten Rahmens.

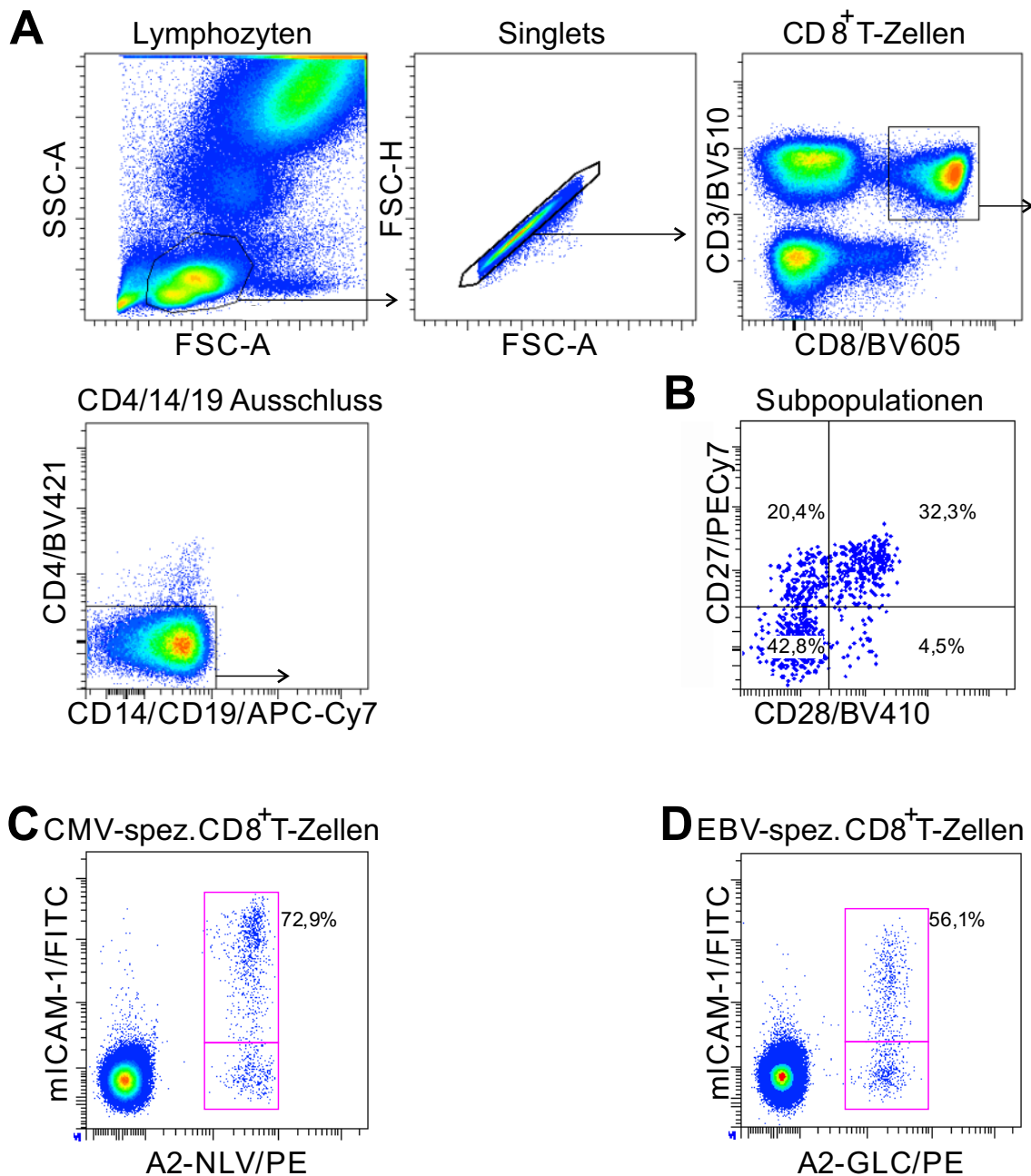


Abbildung 6: Gating Strategie. A: Über SSC/ FSC werden Lymphozyten (umrahmte Population) ausgewählt. Einzelzellen von Dubletten werden mit Vorwärtsstreulichtspezifikation FSC-H (Höhe) und -A (Breite) separiert. Anhand der Oberflächenmarker CD3 und CD8 werden CD8⁺ T-Zellen erkannt. Mit einem CD4/19/14 Gate werden T-Helferzellen, B-Zellen und Monozyten ausgeschlossen. B: In einem zusätzlichen Dot-Plot mit den Differenzierungsfaktoren CD27 und CD28, können alle drei Differenzierungsgrade nach Appay et al. (2008) selektiert werden. C: Der mICAM-1⁺ Anteil wurde prozentual zum Elternteil aller CMV-antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen (A2-NLV⁺) angegeben. D: Der mICAM-1⁺ Anteil wurde prozentual zum Elternteil aller EBV-antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen (A2-GLC⁺) angegeben.

2.5 Statistische Analysen

Die ausgewerteten Daten aller Versuchsteilnehmer werden im arithmetischen Mittel und der dazugehörigen Standardabweichung in angepassten Kurven (Nichtlineare Regression) dargestellt. Die Veränderung der mICAM-1-Bindung, unter Zugabe der jeweiligen $G\alpha_s$ PCR-Agonisten wurde in prozentualer Relation zur Kontrollprobe (ohne Zugabe der $G\alpha_s$ PCR-Agonisten) berechnet. Die Kontrolle entspricht hierbei 100%. Zur Analyse der Signifikanz (p-Wert) wurden gepaarte t-Tests angewandt. Für die Berechnungen und zur Darstellung wurde Microsoft Excel (Version 16.16.17) und Corel Draw (Graphics Suite X7) verwendet. Die Berechnung der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}) der Kurven fand mithilfe des Programms SigmaPlot statt.

3 Ergebnisse

Im Folgenden wird die Wirkung von $G\alpha_s$ PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung auf $CD8^+$ T-Zellen infolge einer spezifischen TCR-Stimulation gezeigt. Die Ergebnisse beleuchten sowohl CMV-, als auch EBV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen. Als $G\alpha_s$ PCR-Agonisten sind Isoproterenol, Norepinephrin, Epinephrin, Prostaglandin D2 und E2, Adenosin, Histamin, Serotonin und Dopamin untersucht worden. Zur Darstellung wurden die einzelnen Dot-Plot-gestützt ausgewerteten T-Zellpopulationen aller Probanden im Mittelwert auf einer y-Achse aufgetragen. Je Agonist sind steigende Konzentrationen aufgezeigt (x-Achse): Von einer Nullprobe (ohne Zugabe des Agonisten) wird über physiologische bis hin zu pathologischen Konzentrationen angehoben. Im ersten Teil werden die Untersuchungen CMV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen und im zweiten Teil die Untersuchungen EVB-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen präsentiert. Ein dritter Teil behandelt die Wirkung von Isoproterenol, Norepinephrin und Epinephrin auf die unterschiedlichen Subpopulationen CMV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen.

3.1 Wirkung von $G\alpha_s$ PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung bei CMV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

Die folgenden Ergebnisse zeigen die Wirkung von $G\alpha_s$ PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung auf $CD8^+$ T-Zellen infolge einer CMV-spezifischen TCR-Stimulation.

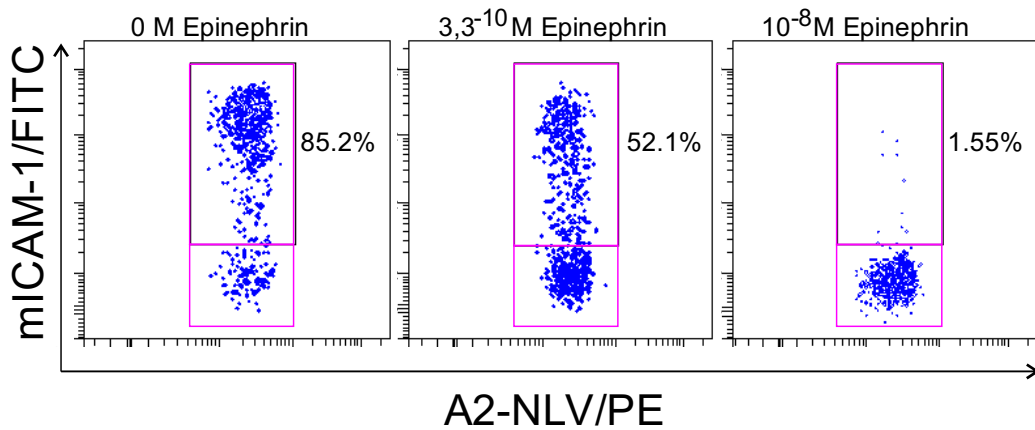
3.1.1 Wirkung von Isoproterenol, Norepinephrin und Epinephrin

Die Dot-Plots eines repräsentativen Probanden zeigen, dass 85,2% aller pHLA-A2⁺ $CD8^+$ T-Zellen (CMV-spezifische $CD8^+$ T-Zellen) ohne Zugabe von Epinephrin auch mICAM-1⁺ sind (Abbildung 7; A). Mit steigenden Konzentrationen sinkt dieser Anteil stetig ab. Bei einer Epinephrin-Konzentration von $3,3 \times 10^{-10}$ M weisen nur noch 52,1% aller CMV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

eine β_2 -Integrinaktivierung auf. Mit der Endkonzentration von 10^{-8} M Epinephrin sind es nur noch 1,55% der Zellen.

Im Graph zeigen Isoproterenol, Norepinephrin und Epinephrin eine unterschiedliche konzentrationsabhängige Reduktion der β_2 -Integrinaktivierung auf CMV-spezifisch aktivierten $CD8^+$ T-Zellen, bei zugrundeliegenden Daten aller fünf Probanden (Abbildung 7; B). Im Vergleich zu Isoproterenol und Epinephrin sind für eine Abnahme der β_2 -Integrinaktivierung deutlich höhere Konzentrationen an Norepinephrin erforderlich. Bei Versuchen mit Isoproterenol ist eine signifikante Inhibition ($P= 0,004$) ab Konzentrationen von über 5×10^{-11} M zu sehen. Epinephrin inhibiert signifikant ($P= 0,006$) ab einer Konzentration von 10^{-10} M und Norepinephrin ($P= 0,002$) erst ab einer Konzentration von 10^{-8} M. In Bezug auf die EC_{50} , die zu einer um die Hälfte reduzierten β_2 -Integrinaktivierung führen, kann ein deutlicher Unterschied der Substanzen gemessen werden. Im Vergleich zu Isoproterenol ist zum Erreichen der EC_{50} eine nahezu doppelt erhöhte Konzentration an Epinephrin notwendig (EC_{50} Isoproterenol: $2,0 \times 10^{-10}$ M/ EC_{50} Epinephrin: $5,1 \times 10^{-10}$ M). Für Norepinephrin muss die Konzentration 200-mal so hoch gewählt werden (EC_{50} Norepinephrin: $4,3 \times 10^{-8}$ M). Im Falle von Isoproterenol und Epinephrin konnte eine nahezu vollständige β_2 -Integrin Blockade mit einer Konzentration von 10^{-8} M erreicht werden. Diese wurde bei Norepinephrin mit einer Konzentration von 10^{-6} M erreicht.

A CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen



B

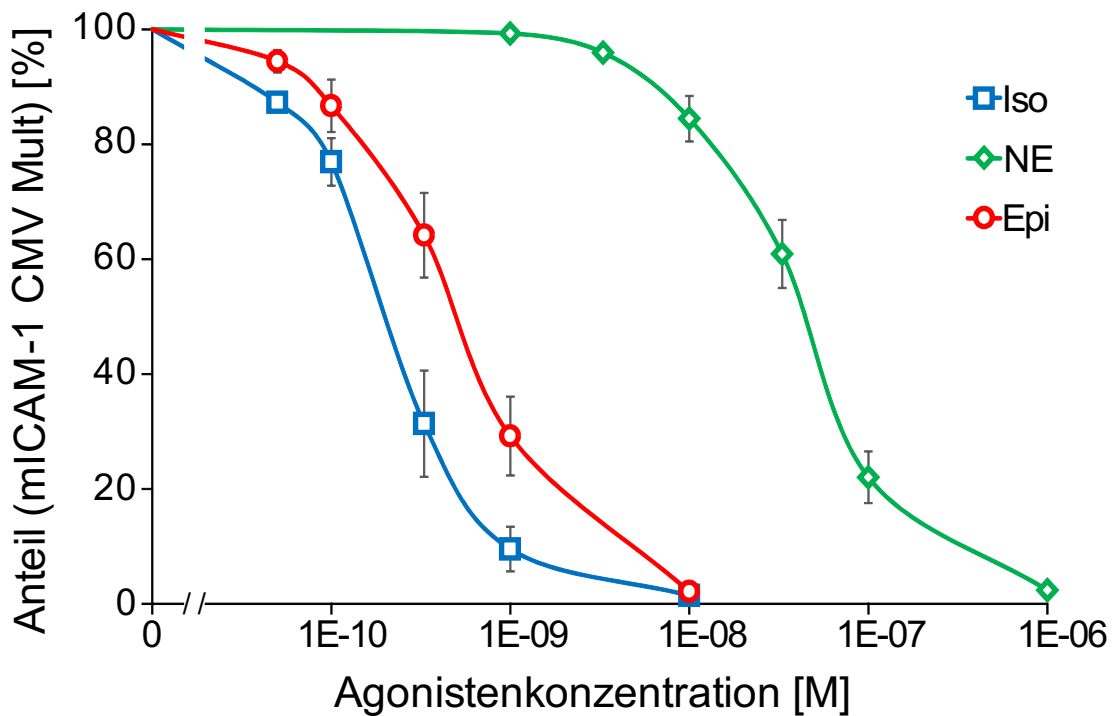


Abbildung 7: CMV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin. A: Dot-Plot gestützte Erfassung des Anteils mICAM-1⁺ T-Zellen (mICAM-1/FITC) an allen pHLA-A2⁺ T-Zellen (A2-NLV/PE) eines einzelnen Probanden. Der Anteil (Rahmen in Magenta) wird in Prozent angegeben. Beispielhaft wird hier die Zugabe steigender Epinephrinkonzentrationen aufgezeigt. B: Grafische Zusammenfassung der abnehmenden Anzahl spezifischer mICAM-1⁺/CD8⁺ T-Zellen aller Probanden, nach Zugabe steigender Konzentrationen (x-Achse) G_{α_s}-Protein-gekoppelter Rezeptoragonisten (Blaue Kurve: Isoproterenol; grüne Kurve: Norepinephrin; rote Kurve: Epinephrin). Der mICAM-1⁺-Anteil (Y-Achse) wurde jeweils in prozentualen Bezug zur Kontrolle mit 0 M des Agonisten = 100% gesetzt.

3.1.2 Wirkung von Prostaglandin D2 und Prostaglandin E2

81% aller pHLA-A2⁺ CD8⁺ T-Zellen des repräsentativen Probanden zeigen eine β_2 -Integrinaktivierung ohne Zugabe von Prostaglandin E2. Bei einer Konzentration von 1000 pg/ml sind nur noch 47,9% aller CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mICAM-1⁺. Gibt man Prostaglandin E2 in einer Konzentration von 10000 pg/ml hinzu, hat sich der Anteil auf 7% verringert (Abbildung 8; A).

Prostaglandin D2 und Prostaglandin E2 zeigen ebenfalls eine konzentrationsabhängige Reduktion der β_2 -Integrinaktivierung auf CMV-spezifisch aktivierte CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 8; B). Beide Substanzen zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf. Beispielsweise weisen sie nur einen geringen Unterschied der EC₅₀ auf. Sie wird von Prostaglandin D2 bei einer Konzentration von 1295 pg/ml und von Prostaglandin E2 bei einer Konzentration von 3817 pg/ml erreicht. Ebenfalls ist bei beiden mit 10000 pg/ml eine maximale Abnahme der β_2 -Integrinaktivierung erreicht. Bei Versuchen mit Prostaglandin D2 ist ab Konzentrationen von 1000 pg/ml eine signifikante Inhibition (P= 0,012) zu sehen. Prostaglandin E2 ist bei geringen Konzentrationen wirkungsvoller und inhibiert bereits ab 100 pg/ml signifikant (P= 0,013).

A CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen

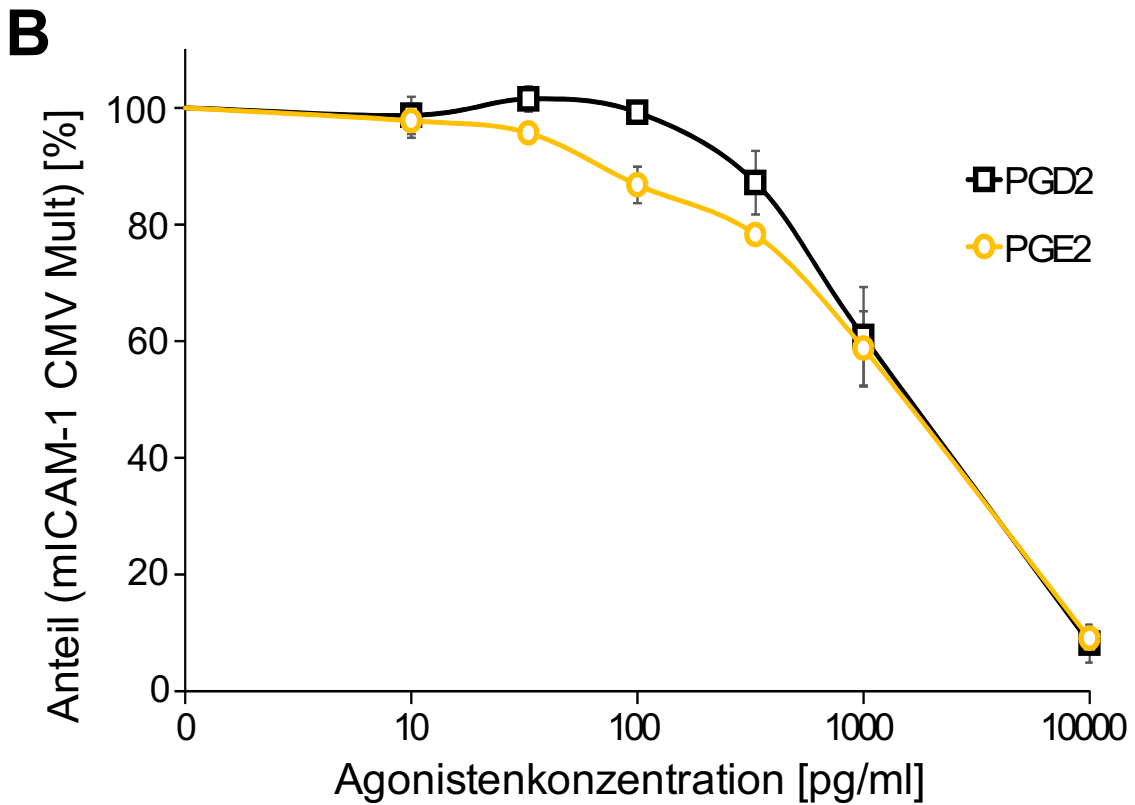
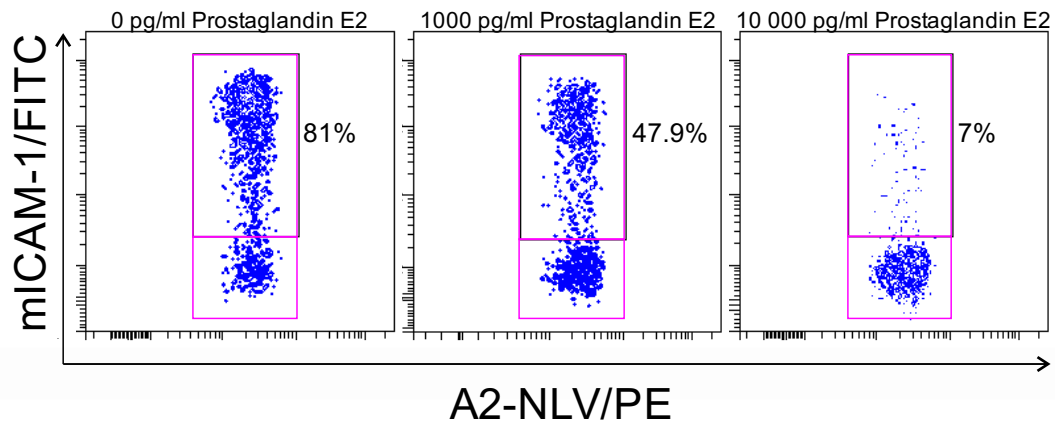


Abbildung 8: CMV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Prostaglandin D2 und -E2. A: Dot-Plot gestützte Erfassung des Anteils mICAM-1⁺ T-Zellen (mICAM-1/FITC) an allen pHLA-A2⁺ T-Zellen (A2-NLV/PE) eines einzelnen Probanden. Der Anteil (Rahmen in Magenta) wird in Prozent angegeben. Beispielhaft wird hier die Zugabe steigender Prostaglandin E2 Konzentrationen aufgezeigt. B: Grafische Zusammenfassung der abnehmenden Anzahl spezifischer mICAM-1⁺/CD8⁺ T-Zellen aller Probanden, nach Zugabe steigender Konzentrationen (x-Achse) Gα_s-Protein-gekoppelter Rezeptoragonisten (schwarze Kurve: Prostaglandin D2; gelbe Kurve: Prostaglandin E2). Der mICAM-1⁺-Anteil (Y-Achse) wurde jeweils in prozentualen Bezug zur Kontrolle mit 0 M des Agonisten = 100% gesetzt.

3.1.3 Wirkung von Adenosin, Histamin, Serotonin und Dopamin

Die Auswertung der Dot-Plots eines repräsentativen Probanden zeigen im Vollblutversuch keine erkennbare Reduktion des mICAM-1-Anteils (Abbildung 9; A). Der Anteil der CD8⁺ T-Zellen mit nachweisbarer β_2 -Integrinaktivierung bleibt somit trotz gesteigerter Konzentrationen (0 M, 10^{-6} M, 10^{-4} M) unverändert (79,8%, 76,6%, 78,1%)

Auswertungen der Vollblutproben und Zugabe von Adenosin, Histamin, Serotonin oder Dopamin zeigen keine inhibitorischen Effekte auf die β_2 -Integrinaktivierung. Die Untersuchung mit PBMCs anstatt Vollblut hat mit Adenosin eine Abnahme der Integrinaktivierung zur Folge (Abbildung 9; B). Ein maximaler Effekt einer Abnahme um 60% zeigt sich mit einer Konzentration von 10^{-4} M. Eine weitere Abnahme ist, dem Kurventrend nach zu urteilen, nicht zu erwarten. Eine signifikante Abnahme ($P= 0,0004$) ist mit einer Konzentration von 10^{-6} M erreicht. Geht man von einer maximal erreichbaren Reduktion auf 40% aus, so liegt die mittlere effektive Konzentration bei $3,4 \times 10^{-7}$ M.

A CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen

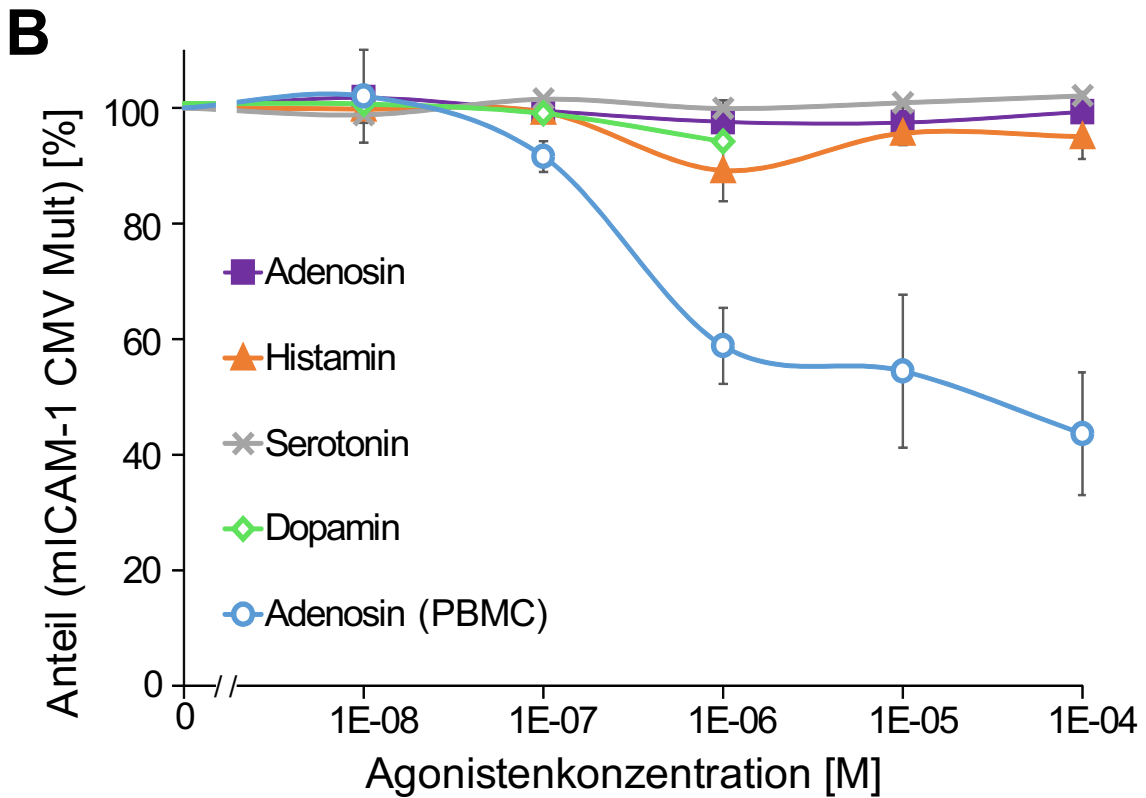
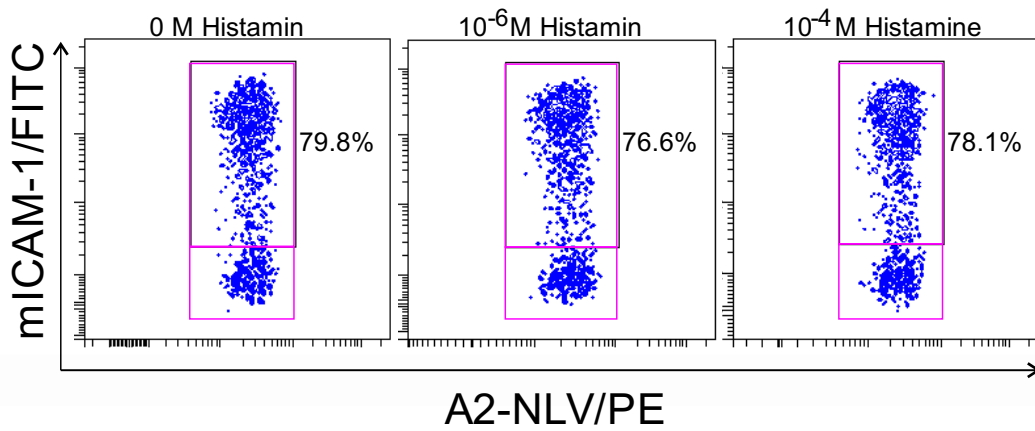


Abbildung 9: CMV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Adenosin, Histamin, Serotonin, und Dopamin. A: Dot-Plot gestützte Erfassung des Anteils mICAM-1⁺ T-Zellen (mICAM-1/FITC) an allen pHLA-A2⁺ T-Zellen (A2-NLV/PE) eines einzelnen Probanden. Der Anteil (Rahmen in Magenta) wird in Prozent angegeben. Beispielhaft wird hier die Zugabe steigender Histamin Konzentrationen aufgezeigt. B: Grafische Zusammenfassung der abnehmenden Anzahl spezifischer mICAM-1⁺ /CD8⁺ T-Zellen aller Probanden, nach Zugabe steigender Konzentrationen (x-Achse) G_{αs}-Protein-gekoppelter Rezeptoragonisten (Violette Kurve: Adenosin; orangene Kurve: Histamin; graue Kurve: Serotonin; grüne Kurve: Dopamin; blaue Kurve: Adenosin (PBMC)). Der mICAM-1⁺-Anteil (Y-Achse) wurde jeweils in prozentualen Bezug zur Kontrolle mit 0 M des Agonisten = 100% gesetzt.

3.2 Wirkung von α_s PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung bei EBV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen

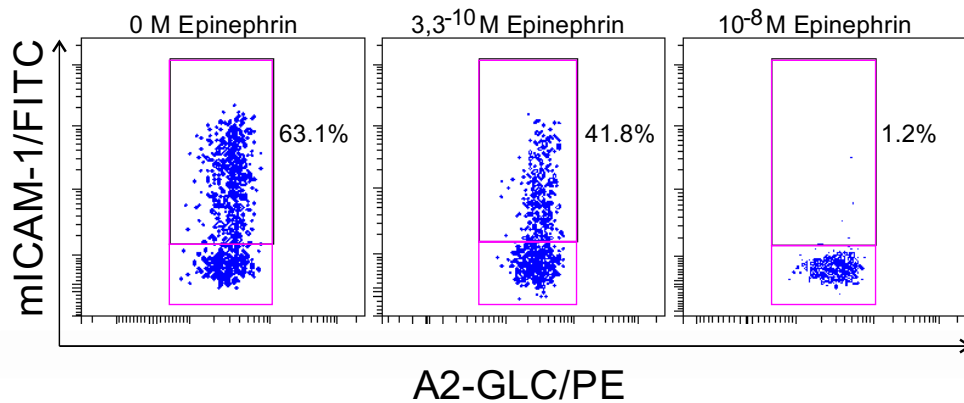
Die in diesem zweiten Teil präsentierten Ergebnisse zeigen die Wirkung der α_s PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung auf $CD8^+$ T-Zellen infolge einer EBV-spezifischen TCR-Stimulation. Untersuchungen EBV-spezifischer $CD8^+$ T-Zellen mit Adenosin, Histamin, Serotonin und Dopamin weisen ähnliche Ergebnisse wie für CMV auf und werden aus diesem Grund hier nicht präsentiert.

3.2.1 Wirkung von Isoproterenol, Norepinephrin und Epinephrin

Ohne Zugabe von Epinephrin sind bei einem repräsentativen Probanden 63,1% aller $pHLA-A2^+$ $CD8^+$ T-Zellen ebenfalls $mICAM-1^+$. Mit steigenden Konzentrationen sinkt dieser Anteil stetig ab. Bei einer Epinephrin-Konzentration von $3,3 \times 10^{-10}$ M weisen nur noch 41,8% aller CMV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen eine β_2 -Integrinaktivierung auf. Mit der Endkonzentration von 10^{-8} M Epinephrin sind es nur noch 1,2% der Zellen (Abbildung 10; A).

Ähnlich der Ergebnisse der CMV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen, zeigen Isoproterenol, Norepinephrin und Epinephrin auch bei der β_2 -Integrinaktivierung auf EBV-spezifisch aktivierten $CD8^+$ T-Zellen eine unterschiedliche konzentrationsabhängige Reduktion (Abbildung 10; B). Auch hier ist eine vergleichsweise hohe Konzentration von Norepinephrin für gleiche Effekte notwendig. Die EC_{50} wird von Isoproterenol bei einer Konzentration von $1,6 \times 10^{-10}$ M erreicht. Für denselben Effekt wird eine 3-fache Konzentration an Epinephrin (EC_{50} : $5,0 \times 10^{-10}$ M) und für Norepinephrin sogar eine 200-fach (EC_{50} : $3,0 \times 10^{-8}$ M) erhöhte Konzentration benötigt. Eine nahezu vollständige Abnahme der β_2 -Integrinaktivierung ist jeweils mit einer Konzentration von 10^{-8} M Isoproterenol und Epinephrin zu bewirken. Von Norepinephrin sind hierzu 10^{-6} M notwendig. Eine signifikante Reduktion kann ab einer Konzentration von 5×10^{-11} M Isoproterenol ($P= 0,025$), 10^{-10} M Epinephrin ($P= 0,010$) und 10^{-8} M Norepinephrin ($P= 0,042$) bemessen werden.

A EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen



B

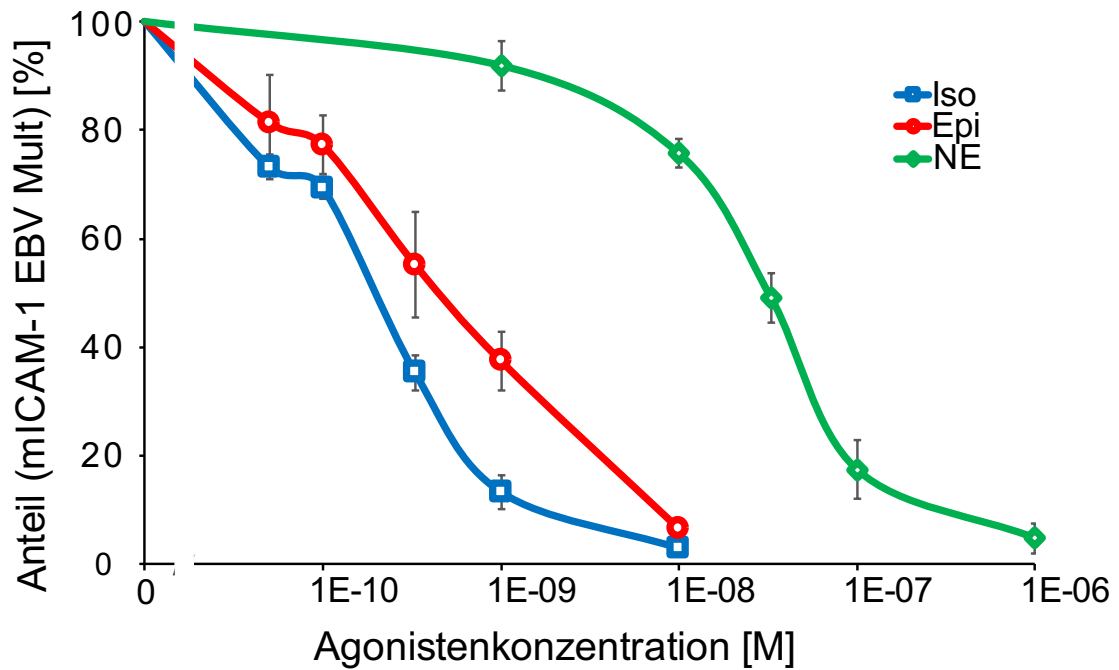


Abbildung 10: EBV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Isoproterenol, Epinephrin und Norepinehprin. A: Dot-Plot gestützte Erfassung des Anteils mICAM-1⁺ T-Zellen (mICAM-1/FITC) an allen pHLA-A2⁺ T-Zellen (A2-NLV/PE) eines einzelnen Probanden. Der Anteil (Rahmen in Magenta) wird in Prozent angegeben. Beispielhaft wird hier die Zugabe steigender Epinephrin Konzentrationen aufgezeigt. B: Grafische Zusammenfassung der abnehmenden Anzahl spezifischer mICAM-1⁺/CD8⁺ T-Zellen aller Probanden, nach Zugabe steigender Konzentrationen (x-Achse) G α_s -Protein-gekoppelter Rezeptoragonisten (Blaue Kurve: Isoproterenol; grüne Kurve: Norepinehprin; rote Kurve: Epinephrin). Der mICAM-1⁺-Anteil (Y-Achse) wurde jeweils in prozentualen Bezug zur Kontrolle mit 0 M des Agonisten = 100% gesetzt.

3.2.2 Wirkung von Prostaglandin D2 und Prostaglandin E2

Stellvertretend zeigt der Dot-Plot eines repräsentativen Probanden ohne Zugabe von Prostaglandin E2 eine β_2 -Integrinaktivierung von 59,5%. Nach Erreichen einer Konzentration von 1000 pg/ml Prostaglandin E2 sinkt der Wert auf 34,1% ab. Bei einer Endkonzentration von 10000 pg/ml Prostaglandin E2 beträgt der β_2 -Integrin aktivierte Anteil aller EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen nur noch 5,8% (Abbildung 11; A).

Zu den Untersuchungen von Prostaglandin E2 und Prostaglandin D2 an CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen, kann an EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen ein vergleichbar abnehmender Kurvenverlauf der β_2 -Integrinaktivierung beobachtet werden (Abbildung 11; B). Beide Prostaglandine zeigen eine ähnliche Inhibitionsdynamik: Prostaglandin D2 erreicht bei einer Konzentration von 333 pg/ml ($P=0,05$) eine signifikante Inhibition. Prostaglandin E2 inhibiert schon ab einer Konzentration von 100 pg/ml ($P=0,010$) signifikant. Die EC_{50} wird von Prostaglandin E2 bei 1011 pg/ml und von Prostaglandin D2 bei 2483 pg/ml erreicht. Eine maximale Inhibition der β_2 -Integrinaktivierung wird mit Konzentration von 10000 pg/ml erreicht.

A EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen

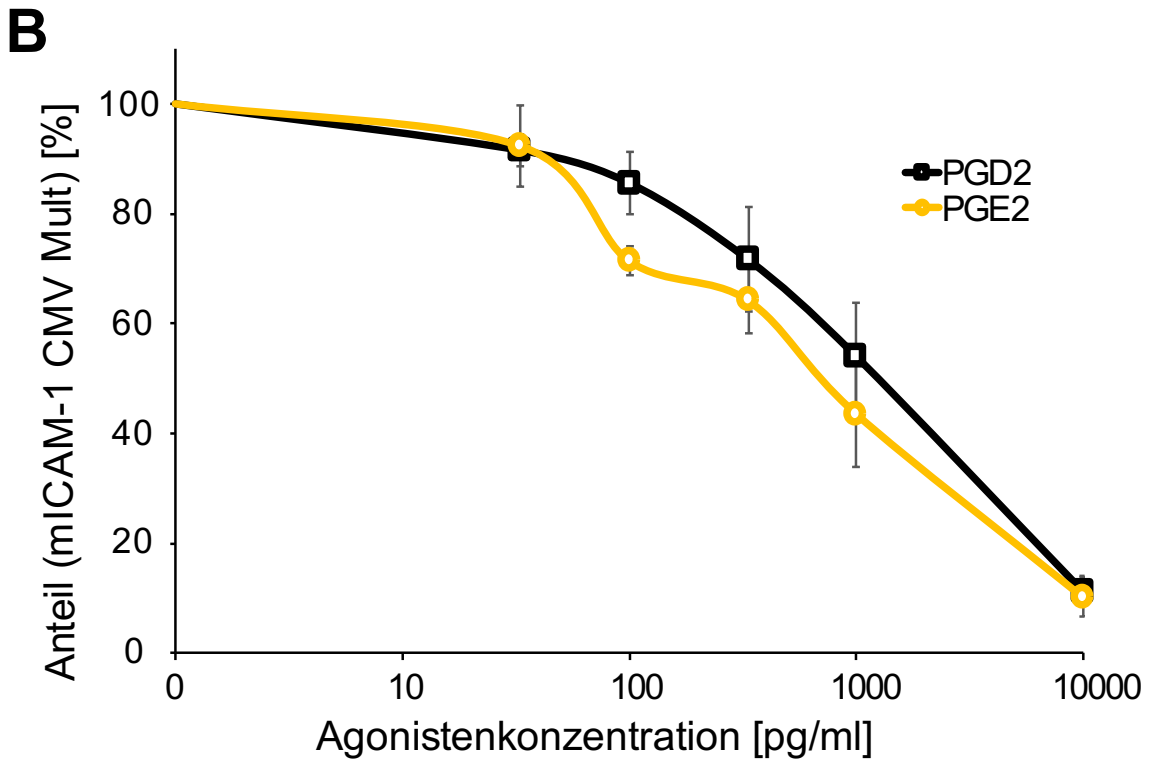
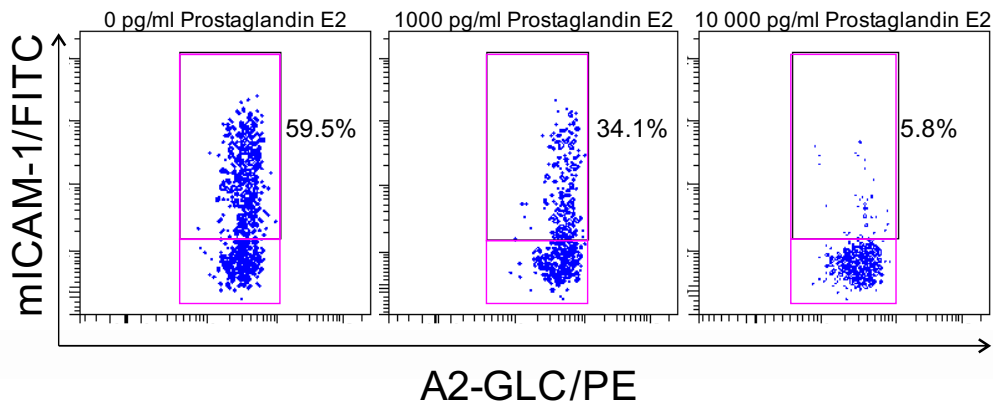


Abbildung 11: EBV-spezifische T-Zellen: Wirkung von Prostaglandin D2 und -E2. A: Dot-Plot gestützte Erfassung des Anteils mICAM-1⁺ T-Zellen (mICAM-1/FITC) an allen pHLA-A2⁺ T-Zellen (A2-NLV/PE) eines einzelnen Probanden. Der Anteil (Rahmen in Magenta) wird in Prozent angegeben. Beispielhaft wird hier die Zugabe steigender Prostaglandin E2 Konzentrationen aufgezeigt. B: Grafische Zusammenfassung der abnehmenden Anzahl spezifischer mICAM-1⁺/CD8⁺ T-Zellen aller Probanden, nach Zugabe steigender Konzentrationen (x-Achse) G_{αs}-Protein-gekoppelter-Rezeptoragonisten (schwarze Kurve: Prostaglandin D2; gelbe Kurve: Prostaglandin E2). Der mICAM-1⁺-Anteil (Y-Achse) wurde jeweils in prozentualen Bezug zur Kontrolle mit 0 M des Agonisten = 100% gesetzt.

3.3 Wirkung α_5 PCR-Agonisten auf die β_2 -Integrinaktivierung CMV-spezifischer Subpopulationen von CD8⁺ T-Zellen

Der dritte Ergebnisteil geht auf die verschiedenen Subpopulationen CMV-spezifischer (A2-NLV+) CD8⁺ T-Zellen bezüglich ihres Differenzierungsgrades ein. Dargestellt werden die Ergebnisse der Untersuchungen des frühen (CD27⁺CD28⁺), mittleren (CD27⁺CD28⁻) und späten (CD27⁻CD28⁻) Differenzierungsgrades. Zunächst wurden die prozentualen Anteile der Subpopulationen bestimmt. Jeder Differenzierungsgrad war dabei annäherungsweise zu einem Drittel vertreten. Für EBV-spezifische CD8⁺ Subpopulationen waren für eine aussagekräftige Analyse nicht genügend Zellen für den späten Differenzierungsgrad nachweisbar. Die prozentualen Anteile betragen für CMV-spezifische CD8⁺ Subpopulationen im frühen Differenzierungsgrad 35,15% \pm 0,87 im mittleren Differenzierungsgrad 28,65% \pm 1,41 und im späten Differenzierungsgrad 31,45% \pm 0,39. Für EBV-spezifische CD8⁺ T-Zellen sind die Subpopulationen prozentual wie folgt vertreten: früher Differenzierungsgrad 70,86% \pm 0,52, mittlerer Differenzierungsgrad 18,75% \pm 0,43, später Differenzierungsgrad 6,47% \pm 0,29. (Dimitrov et al., 2019). Es werden jeweils die Daten der Versuche mit Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin präsentiert.

Die einzelnen Analysen der CMV-spezifischen CD8⁺ Subpopulationen weisen ähnliche Ergebnisse wie die vorausgehenden Untersuchungen aller CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Total) auf: Stellvertretend werden in Abbildung 13 die Dot-Plot Ergebnisse mit Epinephrin eines repräsentativen Probanden dargestellt (Für alle drei Subpopulationen wurden Daten desselben Probanden verwendet): Der Anteil der β_2 -Integrinaktivierung sinkt bei der doppelt positiven Population (CD27⁺CD28⁺), nach der Zugabe von $3,3 \times 10^{-10}$ M Epinephrin, von 77,2% auf 34,7% ab. Wird die Epinephrin-Konzentration auf 10^{-8} M angehoben, fällt der Wert auf 0,4%. Ähnlich verhält es sich bei CD27⁺CD28⁻ T-Zellen des mittleren Differenzierungsgrades. Ohne eine Epinephrinzugabe weisen 81,2% eine nachweisbare β_2 -Integrinaktivierung auf. Bei einer Konzentration von $3,3 \times 10^{-10}$ M bleiben 56,4% und bei einer Konzentration von 10^{-8} M bleiben 3%

der Zellen ICAM-1 nachweisbar. Die Reduktion der β_2 -Integrinaktivierten T-Zellen des dritten späten Differenzierungsgrades ($CD27^-CD28^-$) verläuft von 91,8% bei 0 M Epinephrin, über 60,9% bei $3,3 \times 10^{-10}$ M, zu 1,1% bei einer Endkonzentration von 10^{-8} M.

Die nachfolgenden Graphen (Abbildung 13) zeigen bei zugrundeliegenden Daten aller fünf Probanden, dass auch bei den drei unterschiedlichen Differenzierungsgraden der CMV-spezifisch aktivierten $CD8^+$ T-Zellen, Norepinephrin die höchsten Konzentrationen erfordert, um eine Inhibition der β_2 -Integrinaktivierung zu erreichen. Die EC_{50} beträgt für Isoproterenol im frühen Differenzierungsgrad $2,56 \times 10^{-10}$ M, im mittleren Differenzierungsgrad $2,66 \times 10^{-10}$ M und im späten Differenzierungsgrad $2,50 \times 10^{-10}$ M. Hierbei gibt es keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Differenzierungsgrade ($P > 0,675$). Die EC_{50} -Werte für Norepinephrin betragen im frühen Differenzierungsgrad $3,47 \times 10^{-8}$ M, im mittleren Differenzierungsgrad $4,54 \times 10^{-8}$ M und im späten Differenzierungsgrad $4,53 \times 10^{-8}$ M. Epinephrin weist im frühen Differenzierungsgrad eine EC_{50} von $4,78 \times 10^{-10}$ M auf. Im mittleren Differenzierungsgrad liegt die EC_{50} $6,35 \times 10^{-10}$ M und im späten Differenzierungsgrad bei $5,68 \times 10^{-10}$ M. Sowohl Norepinephrin als auch Epinephrin weisen im frühen Differenzierungsgrad, im Vergleich zum mittleren Differenzierungsgrad, eine schwach signifikant gesteigerte Wirkung auf (NE: $P = 0,009$; Epi: $P = 0,021$). Unabhängig des Differenzierungsgrades wird eine maximale Inhibition mit Isoproterenol und Epinephrin bei einer Konzentration von 10^{-8} M und mit Norepinephrin bei einer Konzentration von 10^{-6} M erreicht.

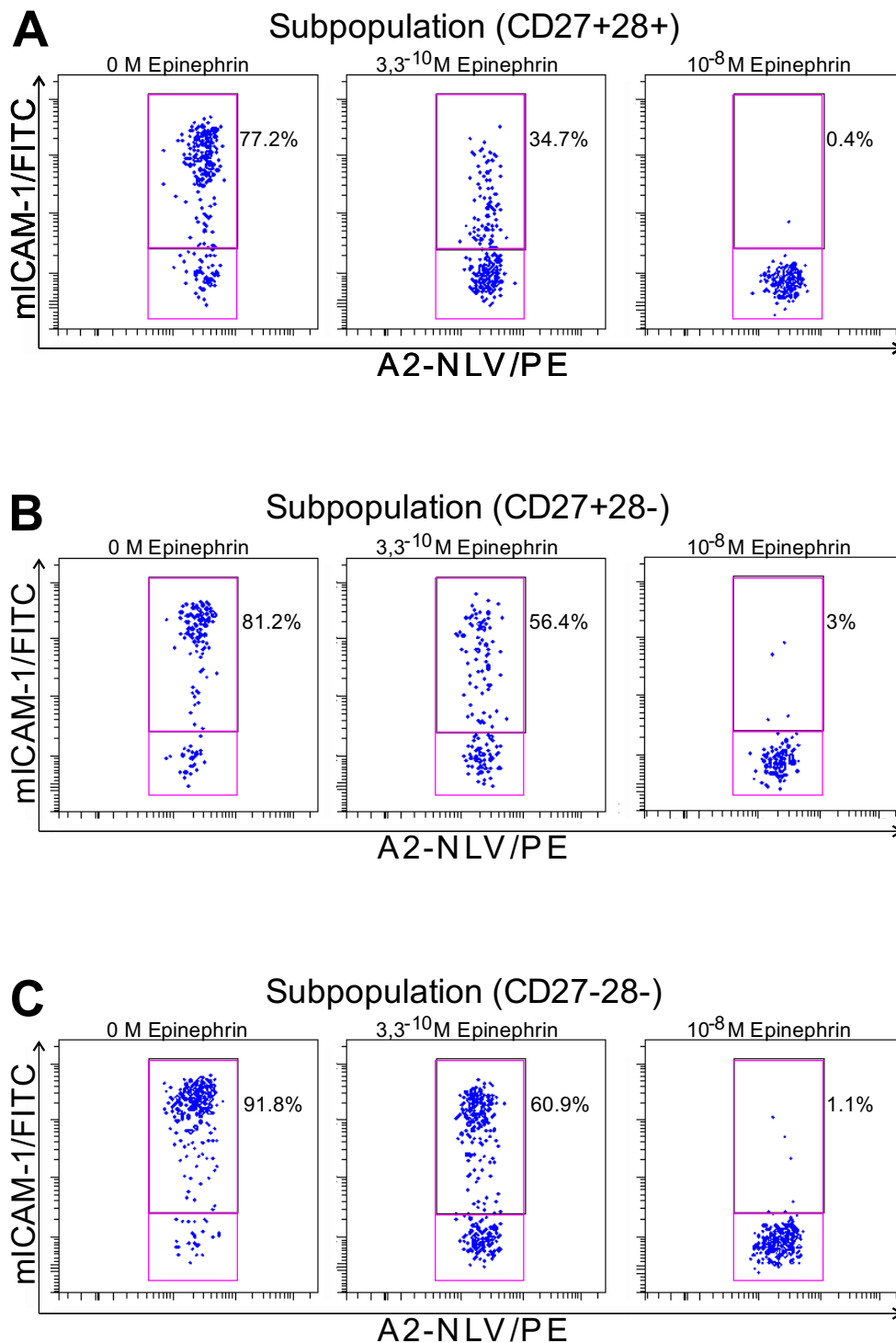


Abbildung 12: mICAM-1⁺ T-Zellen CMV-spezifische T-Zell-Subpopulationen im Dot-Plot. Dot-Plot gestützte Erfassung des Anteils mICAM-1⁺ T-Zellen (mICAM-1/FITC) an allen pHLA-A2⁺ T-Zellen (A2-NLV/PE) eines einzelnen Probanden Der Anteil (Rahmen in Magenta) wird in Prozent angegeben. Beispielhaft wird hier die Zugabe steigender Epinephrin Konzentrationen aufgezeigt. Um T-Zell-Subpopulationen zu erfassen, wurden T-Zellen zusätzlich auf die Oberflächenmarker CD27 und CD28 untersucht. A: Positiver Nachweis von CD27 und CD28; B: Positiver Nachweis von CD27; C: Kein Nachweis von CD27 und CD28.

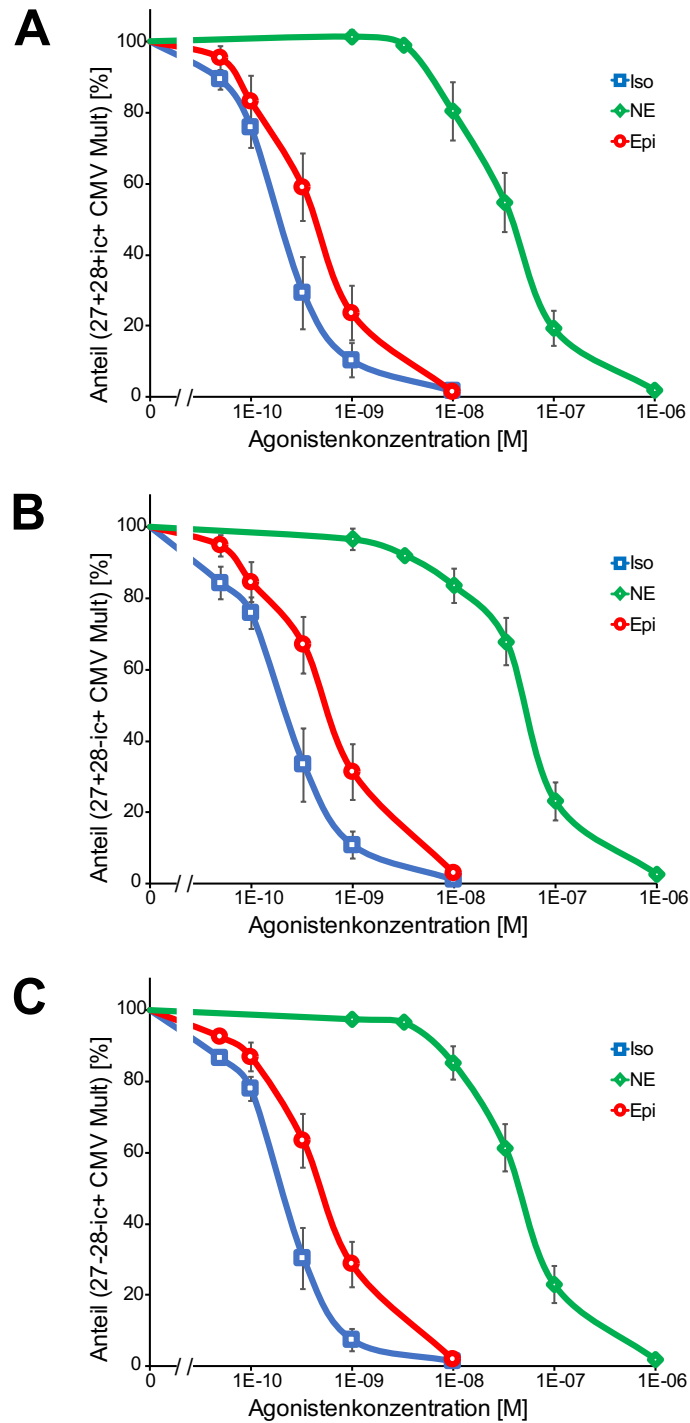


Abbildung 13: Anzahl mICAM-1⁺ Subtypen von CMV-spezifischen CD8⁺-T-Zellen aller Probanden nach Zugabe steigender Konzentrationen (x-Achse) G_αs-Protein-gekoppelter Rezeptoragonisten (Blaue Kurve: Isoproterenol; grüne Kurve: Norepinephrin; rote Kurve: Epinephrin). Der mICAM-1⁺-Anteil (Y-Achse) wurde jeweils in prozentualen Bezug zur Kontrolle mit 0 M des Agonisten = 100% gesetzt. Um T-Zell-Subpopulationen zu erfassen, wurden T-Zellen zusätzlich auf die Oberflächenmarker CD27 und CD28 untersucht. A: Nachweis von CD27 und CD28; B: Nachweis von CD27; C: Kein Nachweis von CD27 und CD28.

4 Diskussion

Die Ergebnisse zeigen eine dosisabhängige Inhibition der TCR-vermittelten Integrinaktivierung auf CMV- sowie EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch die Katecholamine Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin, die Prostaglandine E2 und D2, sowie durch Adenosin. Schon geringfügig erhöhte physiologische Konzentrationen sind hierfür ausreichend. Dabei ist der Effekt bei CMV-spezifischen T-Zellen im frühen Differenzierungsgrad (CD27⁺CD28⁺) mit Norepinephrin und Epinephrin schwach signifikant ausgeprägter. Da die TCR-vermittelte β_2 -Integrinaktivierung für die Bildung einer funktionstüchtigen immunologischen- und zytotoxischen Synapse von zentraler Bedeutung ist (Abram & Lowell, 2009; Dustin & Long, 2010; Dustin & Springer, 1989; Fooksman et al., 2010; Long, 2011), deutet diese Studie darauf hin, dass Bedingungen mit niedrigen Konzentrationen an endogenen $G\alpha_s$ PCR-Agonisten, wie beispielsweise Schlaf, enorm wichtig für eine gestärkte effektive T-Zell-Immunantwort sind (Irwin et al., 1999; Lange et al., 2011). Die Studie liefert auch wichtige Erkenntnisse über suppressive Einflüsse einiger Pathologien auf die T-Zell-Funktion, die gesteigerte Werte der $G\alpha_s$ PCR-Agonisten zur Folge haben. Chronischer Stress und Schlafstörungen führen zu erhöhten Katecholaminwerten im Blut (Atanackovic et al., 2006; Brudvik & Taskén, 2012; Sloan et al., 2010). Ein Anstieg der Prostaglandinwerte konnte bei Malaria und diversen Tumoren nachgewiesen werden (Chaudry et al., 1994; Kilunga Kubata et al., 1998; Klapan et al., 1991; Loh et al., 2002). Hypoxie, Schlafapnoe und Tumorwachstum gehen mit erhöhten Adenosinwerten einher (Hoskin et al., 2008; Ohta et al., 2006).

Durch unsere Daten wird die entscheidende Rolle der $G\alpha_s$ PCR-Stimulation bei der Immunmodulation über die Bildung einer immunologischen- und zytotoxischen Synapse zwischen T-Zelle und APC oder Zielzelle, in neuem, bisher unbekanntem Maße hervorgehoben. Bisherige Studien begrenzen sich auf die Untersuchung Anti-adhäsiver Faktoren bei der Immunzell-Adhäsion an das Endothelium. Es wurde gezeigt, dass gesteigerte Epinephrinwerte die Rekrutierung einiger Effektor-Leukozyten in den Blutkreislauf vermitteln. Dies war im Laufe der Tagesstunden, insbesondere aber auch infolge von körperlicher

Betätigung und mentalem Stress, zu beobachten. Dabei wird die Adhäsion der Leukozyten zum Endothelium durch Epinephrin gehemmt (Dimitrov et al., 2009, 2010). Obwohl sich mechanistische Studien bisher nur auf Monozyten beziehen, zeigen sie jedoch deutlich, dass eine Hemmung der Chemokin-vermittelten Integrinaktivierung durch G_{α_s} PCR-Agonisten für den Adhäsionsverlust verantwortlich ist (Chigaev et al., 2011, 2008). Unsere Untersuchungen weiten diese Erkenntnisse auf die TCR-vermittelte Integrinaktivierung aus. Unsere Ergebnisse belegen eine Hemmbarkeit der TCR-vermittelten Integrinaktivierung durch verschiedene G_{α_s} PCR-Agonisten. Damit inbegriffen kann eine resultierende Schwächung der Immunantwort, über eine eingeschränkte T-Zell-Funktion, vermutet werden.

Für unsere Analysen von Vollblutproben verwendeten wir eine neuartige Durchflusszytometrie-gestützte Untersuchungsmethode unserer Arbeitsgruppe, die die β_2 -Integrinaktivierung auf antigenspezifischen T-Zellen misst (Dimitrov et al., 2018). Die Bindung von pHLA-A2-Multimeren an ihren passenden TCR wird hierbei a) für die Markierung und Identifizierung der Antigen-spezifischen T-Zellen mittels Fluoreszenzfarbstoffe und b) für die unmittelbare Aktivierung der β_2 -Integrine verwendet. Diese Aktivierung lässt sich mit Hilfe von mICAM-1-Farbkomplexen feststellen. Um selbst kleinste Populationen von antigenspezifischen T-Zellen und deren Subpopulationen auszuwerten, benötigt es nur einige Minuten der in-vitro-Inkubation von unaufbereiteten Vollblutproben. Damit ist eine vorausgehende aufwendige Zellisolation oder Aufbereitung der Blutproben, wie sie in anderen Untersuchungsmethoden zur Erforschung von Einflüssen der G_{α_s} PCR-Agonisten auf die Integrinaktivierung Verwendung finden, nicht nötig (Chigaev et al. 2008; Chigaev, et al. 2011). Hinzu kommt, dass bisherige Studien zu Auswirkungen von Blutmediatoren auf Zellparameter, wie beispielsweise die Zytokinproduktion, lange Inkubationszeiten und das Unterbinden von zellulären Transportmechanismen erforderlich machen und somit nicht die in-vivo-Situation widerspiegeln (Gouttefangas et al., 2019; McNeil et al., 2013). Unsere Methodik eröffnet somit einen einfachen, schnellen und sensiblen Weg, Veränderungen der β_2 -Integrinaktivierung unter Einfluss von G_{α_s} PCR-Agonisten bis hin zu kleinsten Zellpopulationen zu untersuchen.

Systematisch haben wir verschiedene G_{α_s} PCR-Agonisten, wie Katecholamine, Prostaglandine, Adenosin, Histamin und Serotonin, bezüglich deren Regulationsvermögen der Integrinaktivierung verglichen. Jeder dieser Mediatoren ist dafür bekannt, in Abhängigkeit unterschiedlicher Expression von GPCR-Klassen auf Immunzellen, immunmodulatorische Effekte zu bewirken. Allgemein führt eine Stimulation von G_{α_s} PCR, über einen Anstieg der cAMP-Produktion, zu einer Inhibition der Proliferation, Zytokinproduktion und Zytotoxizität von T-Zellen. Eine G_{α_i} - und G_{α_q} -Protein-gekoppelte Rezeptorstimulation verstärkt hingegen entzündliche Effekte (Brudvik and Taskén 2012; Grisanti et al. 2011). Eine weitere Studie stellte fest, dass cAMP über die Protein-Kinase-A zu einer verminderten Chemoattraktanten-vermittelten Integrin-abhängigen Leukozytenadhäsion führt. Deren Daten ließen vermuten, ein Anstieg von cAMP rufe Anti-adhäsive Effekte hervor und erkläre somit Anti-entzündliche Wirkungen durch cAMP-steigernde Agonisten und Arzneien (Laudanna et al. 1997). Dies führte zu der Annahme, G_{α_s} PCR auf T-Zellen seien für eine Inhibition der TCR-getriggerten Integrinaktivierung verantwortlich. Die vorliegende Studie konnte schlussendlich die Hemmung der TCR-induzierten Integrinaktivierung, durch einiger G_{α_s} PCR-Agonisten beobachten.

Bei der näheren Untersuchung der wirksamen Rezeptoragonisten in Bezug auf ihre inhibitorische Potenz zeigten sich deutliche Unterschiede. Die konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekte der Katecholamine auf die Integrinaktivierung, waren für Isoproterenol am höchsten. Isoproterenol überragte in seiner Potenz Epinephrin um etwa das Doppelte. Norepinephrin inhibiert um ein 200-faches schwächer als Isoproterenol. Dies korreliert mit den Ergebnissen einer vorausgehenden Studie, die eine Reduzierung der Produktion von TNF durch Monozyten unter Einwirkung von Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin beobachtete. Auch hier konnte dasselbe Verhältnis in der Wirkungspotenz (Isoproterenol \approx 2x Epinephrin \gg Norepinephrin) nachgewiesen werden (Dimitrov et al., 2017). Die Bindungsaffinität dieser Katecholamine zu β_2 -Adrenozeptoren und die damit verbundene Stimulation der Adenylcyclase, weist ebenfalls kongruente Größenverhältnisse

(Isoproterenol \approx 2x Epinephrin \gg Norepinephrin) auf (Hoffmann et al., 2004). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, eine Inhibition der Integrinaktivierung auf T-Zellen finde hauptsächlich über β_2 -Adrenozeptoren, anstatt über β_1 - oder β_3 -Adrenozeptoren, statt. Diese Annahme wird zudem von der Tatsache unterstrichen, dass G_{α_s} -Protein-gekoppelte β_2 -adrenerge Rezeptoren die größte Gruppe der β -Adrenozeptoren auf T-Zellen repräsentieren (Sanders et al. 2012).

Prostaglandine besitzen ein weites Wirkungsspektrum und obwohl sie eher als Entzündungsmediatoren mit lokal vasodilatierenden Einflüssen bekannt sind, haben sie auch eine direkt unterdrückende Wirkung auf die Zytokinproduktion und Proliferation von T-Zellen (Kalinski, 2012; Scher & Pillinger, 2009). Unsere Untersuchungen schlossen deshalb auch Prostaglandine mit ein. Gesteigerte Prostaglandinwerte werden mit Malaria und einigen Tumoren assoziiert. In malignem Prostatagewebe wies Chaudry et al. (1994) bis zu 10-fach erhöhte PGE2-Werte nach. Bei Larynxtumoren im Kopf- Halsbereich konnten PGE2-Werte von 82 pg/ml gemessen werden (Klapan et al., 1991). Akut dekompensierte Leberzirrhose ließ O'Brien et al. (2014) PGE2-Werte von 91 pg/ml beobachten. Für Prostaglandin E2 konnten wir eine, zu diesen Werten korrelierende, beginnende Hemmung der β_2 -Integrinaktivierung feststellen. Eine weitere Studie wies PGE2-Werte von 6300 pg/ml in malignen Hirntumoren nach (Loh et al., 2002). Damit liegt dieser Wert weit über der von uns gemessenen EC_{50} von PGE2 für CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen von 1011 pg/ml und 3817 pg/ml. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Pathologien mit analog erhöhten Prostaglandinwerten eine geschwächte Immunantwort der T-Zellen verursachen und sich Tumore über diese Mechanismen sogar der körpereigenen Abwehr entziehen können.

Adenosin wird ebenfalls eine T-Zell-funktionseinschränkende Wirkung über G_{α_s} -Protein-gekoppelte A_{2A} - und A_{2B} -adenosinerge Rezeptoren zugesprochen (Leone, Lo & Powell, 2015; Lokshin et al., 2006). Eine verminderte Sauerstoffversorgung im Körper, sei es durch Hypoxie bei Schlafapnoe oder in lokalem Gewebe infolge von Tumorwachstum, führt zu gesteigerten Adenosinwerten, die die T-Zell-Funktion über A_{2A} -Rezeptoren erheblich

beeinträchtigen (Hoskin et al., 2008; Ohta et al., 2006). Wir konnten nur unter Verwendung von PBMCs, nicht aber mit Vollblutproben, eine geschwächte Integrinaktivierung nachweisen. Eine mögliche Erklärung ist der schnelle Abbau sowie eine erythrozytäre Wiederaufnahme von Adenosin und die somit auf 1-2 s deutlich verkürzte Halbwertszeit in Vollblut (Shryock, Boykin, Hill & Belardinelli, 1990). Nichtsdestotrotz zeigen unsere Ergebnisse in Kombination mit den Ergebnissen der Tumorforschung eine mögliche Erklärung für die verminderte Fähigkeit des Körpers, infolge der A2A-Rezeptor-Hemmung durch gesteigerte Adenosinwerte, Tumore zu bekämpfen.

Für Serotonin, Dopamin und Histamin konnten wir keine Inhibition der Integrinaktivierung auf CMV- und EBV-spezifischen T-Zellen beobachten, obwohl immunmodulatorische Effekte dieser Substanzen bekannt sind. Als mögliche Ursache käme eine fehlende oder geringe Expression dieser $G\alpha_s$ PCR auf T-Zellen in Frage (Kmiecik, Otocka-Kmiecik, Górska-Ciebiada & Ciebiada, 2012; León-Ponte, Ahern & O'Connell, 2007; Saha, Mondal, Majumder, Basu & Dasgupta, 2001).

Da wir in unserer Studie sowohl CMV- als auch EBV-antigenspezifische T-Zellen auf den inhibierenden Einfluss von $G\alpha_s$ PCR-Agonisten auf die Integrinaktivierung untersucht haben, kann davon ausgegangen werden, dass sich die Effekte nicht auf einzelne antigenspezifische T-Zell-Populationen beschränken. Unsere Versuche der unterschiedlichen Differenzierungsgrade von CMV-antigenspezifischen T-Zellen ergaben eine leicht erhöhte Sensitivität unter der Gruppe der früh differenzierten ($CD27^+CD28^+$) T-Zellen. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu vorausgehenden Untersuchungen mit der Schlussfolgerung, Epinephrin habe in Bezug auf die T-Zell-Bindung an das Endothel insbesondere auf den späten Differenzierungsgrad ($CD27^-CD28^-$) anti-adhäsive Einflüsse (Dimitrov et al. 2009; Dimitrov et al. 2010). Dabei ist allerdings hervorzuheben, dass sich diese Untersuchungen auf die Chemokin-induzierte Integrinaktivierung konzentrierten. Dies steht im Gegensatz zu dem hier vorgestellten TCR-stimulierten Signalweg der Integrinaktivierung.

Aufgrund unserer Vorgehensweise und angewandten Untersuchungsmethode war es uns nicht möglich naive T-Zell-Populationen in die Studie miteinzubeziehen. Die Vermutung liegt nahe, dass man auch unter naiven T-Zellen von einer ähnlich starken Verminderung der Integrinaktivierung ausgehen kann, da wir einen abnehmenden Einfluss mit zunehmendem Differenzierungsgrad feststellen konnten. Studien, die den positiven Einfluss von Schlaf auf die Ausbildung einer Antigen-spezifischen Immunantwort im Zuge einer Impfung zeigen (Benedict et al., 2012; Lange et al., 2011; Lange, 2003), könnten in Verbindung mit unseren Ergebnissen die Erklärung liefern, dass eine nächtlich gesteigerte T-Zell-APC-Adhäsion einen unterstützenden Effekt auf die adaptive Immunantwort zur Folge hat. Unsere Untersuchungsmethode kann für zukünftige Ausweitungen der Experimente auf naive T-Zellen eine Basis liefern.

Wir konnten mithilfe einer neuartigen sensiblen FACS-gestützten Analyse eine Hemmung der β_2 -Integrinaktivierung auf $CD8^+$ T-Zellen durch $G\alpha_s$ PCR-Agonisten beobachten. Die von uns untersuchten Konzentrationen von physiologischen bis hin zu pathologisch hohen Werten zeigen, dass schon geringe Steigerungen eine Inhibition zur Folge haben. Da Integrine auf T-Zellen eine maßgebliche Rolle an ihrer Funktion im Immunsystem tragen, kann auf einen hohen immunmodulatorischen Einfluss dieser Substanzen über $G\alpha_s$ PCR rückgeschlossen werden. Unsere Studie beschäftigte sich mit einem kleinen Teil der bekannten immunmodulatorischen Rezeptoragonisten, eröffnet aber dennoch ein weiteres Feld, das zum Verständnis des menschlichen Immunsystems und im speziellen der T-Zell-Funktion beiträgt. T-Zellen stellen einen entscheidenden Abwehrmechanismus unseres Körpers, vor allem gegen Virusbefall und Entartung eigener Zellen, dar. Die Erkenntnis einer Hemmung unseres Immunsystems durch Bedingungen, die mit diesen Pathologien einhergehen, liefert einen vielversprechenden Weg für zukünftige therapeutische Ansätze, die eigene Körperabwehr hiergegen zu sensibilisieren und zu mobilisieren. Diesbezüglich wären folgende Untersuchungen der Hemmung von T-Zellen in tumorösen Geweben von Interesse. Ebenfalls sollte untersucht werden ob weitere Signalwege die β_2 -Integrinaktivierung auf T-Zellen beeinflussen können. Zu guter Letzt hebt der Umkehrschluss unserer Ergebnisse

auch hervor, wie wichtig die Phasen und die Bedingungen niedriger Konzentrationen $G\alpha_s$ PCR-Agonisten für die Funktionalität und Qualität unseres Immunsystem sind. Herausforderungen im heutigen Berufs- und Familienalltag, hohe Arbeitsbelastung, Nacht- und Schichtarbeit, sowie Zeit- und Termindruck, tragen hierzu kontraproduktiv bei und erfordern deshalb einen adäquaten Ausgleich und Ruhepausen.

Weiterführend sollten die immunmodulatorischen Effekte der Hemmbarkeit von Integrinen durch $G\alpha_s$ PCR-Agonisten in Gewebe sowie Tierversuchen weiter untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Das menschliche Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk sich gegenseitig beeinflussender Faktoren und Mechanismen. T-Zellen kommt dabei eine tragende Rolle zuteil. $CD8^+$ T-Zellen bilden funktionsentscheidende Zell-Zell-Kontakte mithilfe von aktivierten β_2 -Integrinen auf ihrer Oberfläche aus. β_2 -Integrine sind für die Bildung einer funktionstüchtigen immunologischen- und zytotoxischen Synapse zwischen T-Zelle und APC, oder anderen Zielzellen, wie z.B. virusinfizierten Zellen, von großer Wichtigkeit. Eine Integrinaktivierung findet sowohl TCR- als auch Chemokinvermittelt statt. In der Vergangenheit konnte an Monozyten bereits eine Inhibition der Chemokin-Rezeptor-induzierten β_2 -Integrinaktivierung durch $G\alpha_s$ PCR-Agonisten beobachtet werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war herauszufinden, ob dieser Hemmmechanismus ebenfalls bei einer T-Zell-Rezeptor-induzierten β_2 -Integrinaktivierung auf T-Zellen festzustellen ist und ob verschiedene $G\alpha_s$ PCR-Agonisten einen inhibierenden Einfluss haben könnten. Von Interesse waren dabei immunmodulierende Stresshormone, wie Epinephrin, Norepinephrin und das synthetische Isoproterenol, aber auch Entzündungsaktoren wie Prostaglandin D2 und E2, Adenosin, Histamin, Serotonin und Dopamin, deren Rezeptoren bekannterweise von Immunzellen exprimiert werden.

Eine neu etablierte FACS-gestützte Untersuchungsmethode ermöglichte es schnell und sensibel antigenspezifische $CD8^+$ T-Zell-Populationen zu identifizieren und hinsichtlich einer möglichen Inhibition der β_2 -Integrinaktivierung durch $G\alpha_s$ PCR-Agonisten zu quantifizieren.

Die Ergebnisse zeigen eine durch Isoproterenol, Epinephrin und Norepinephrin, Prostaglandine E2 und D2, sowie Adenosin dosisabhängige Inhibition der TCR-vermittelten Integrinaktivierung auf CMV- sowie EBV-spezifischen $CD8^+$ T-Zellen. Schon Konzentrationen der $G\alpha_s$ PCR-Agonisten im erhöhten physiologischen Bereich sind für eine signifikante Hemmung ausreichend. Bei T-Zellen konnte im frühen Differenzierungsgrad für Epinephrin und Norepinephrin eine schwache, aber statistisch signifikante, gesteigerte Sensibilität im Vergleich zu den später differenzierten Zellen festgestellt werden. Für Histamin, Serotonin

und Dopamin konnte in diesem Versuchsaufbau kein inhibierendes Signal beobachtet werden.

Diese Erkenntnis konnte das Verständnis der Regulierungsmechanismen unseres Immunsystems um einen weiteren Ansatzpunkt bereichern. Eine vorstellbare Erweiterung des Forschungsstandes, wäre eine Steuerung der T-Zell-Funktion über die gezielte Enthemmung der Integrinbindungskapazität zu ausgewählten Zielzellen. Diese Einflussnahme kann zukünftig auf vielerlei Arten den Weg in neueste Immunforschung finden.

6 Literaturverzeichnis

Abram, C. L. & Lowell, C. A. (2009). The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 339–362. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132554>

Alford, C. A. & Britt, W. J. (1993). Cytomegalovirus. In B. Roizmann, R.J. Whitley & C. Lopez (Hrsg.), *The human herpesviruses* (S. 227–255). New York: Raven Press New York.

Altman, J. D. & Davis, M. M. (2016). MHC-Peptide Tetramers to Visualize Antigen-Specific T Cells: MHC-Peptide Tetramers to Visualize Antigen-Specific T Cells. In J.E. Coligan, B.E. Bierer, D.H. Margulies, E.M. Shevach & W. Strober (Hrsg.), *Current Protocols in Immunology* (S. 17.3.1-17.3.44). Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/cpim.14>

Anane, L. H., Edwards, K. M., Burns, V. E., Drayson, M. T., Riddell, N. E., van Zanten, J. J. C. S. V. et al. (2009). Mobilization of gammadelta T lymphocytes in response to psychological stress, exercise, and beta-agonist infusion. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(6), 823–829. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.03.003>

Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T. N., Thomas, V. K., Dustin, M. L. & Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(18), 6437–6442. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502467102>

Appay, V., Dunbar, P. R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G. M., Papagno, L. et al. (2002). Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nature medicine*, 8(4), 379–385.

Appay, V., van Lier, R. A. W., Sallusto, F. & Roederer, M. (2008). Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: Consensus and issues. *Cytometry Part A*, 73A(11), 975–983. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20643>

Atanackovic, D., Schnee, B., Schuch, G., Faltz, C., Schulze, J., Weber, C. S. et al. (2006). Acute psychological stress alerts the adaptive immune response: stress-induced

mobilization of effector T cells. *Journal of Neuroimmunology*, 176(1–2), 141–152. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.03.023>

Beal, A. M., Anikeeva, N., Varma, R., Cameron, T. O., Vasiliver-Shamis, G., Norris, P. J. et al. (2009). Kinetics of early T cell receptor signaling regulate the pathway of lytic granule delivery to the secretory domain. *Immunity*, 31(4), 632–642. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.004>

Benedict, C., Brytting, M., Markström, A., Broman, J.-E. & Schiöth, H. B. (2012). Acute sleep deprivation has no lasting effects on the human antibody titer response following a novel influenza A H1N1 virus vaccination. *BMC immunology*, 13, 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-13-1>

Betts, M. R., Brenchley, J. M., Price, D. A., De Rosa, S. C., Douek, D. C., Roederer, M. et al. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *Journal of Immunological Methods*, 281(1–2), 65–78. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00265-5](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00265-5)

Bosch, J. A., Fischer, J. E. & Fischer, J. C. (2009). Psychologically adverse work conditions are associated with CD8⁺ T cell differentiation indicative of immunosenescence. *Brain, Behavior, and Immunity*, 23(4), 527–534. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2009.02.002>

Brudvik, K. W. & Taskén, K. (2012). Modulation of T cell immune functions by the prostaglandin E(2) - cAMP pathway in chronic inflammatory states. *British Journal of Pharmacology*, 166(2), 411–419. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01800.x>

Chan, J. R., Hyduk, S. J. & Cybulsky, M. I. (2003). Detecting rapid and transient upregulation of leukocyte integrin affinity induced by chemokines and chemoattractants. *Journal of immunological methods*, 273(1), 43–52.

Chandran, P. A., Laske, K., Cazaly, A., Rusch, E., Schmid-Horch, B., Rammensee, H.-G. et al. (2016). Validation of immunomonitoring methods for application in clinical studies: The HLA-peptide multimer staining assay: Validation of the HLA-Multimer Staining Assay. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21397>

Chattopadhyay, P. K., Yu, J. & Roederer, M. (2005). A live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T cells with diverse cytokine profiles. *Nature Medicine*, *11*(10), 1113–1117. <https://doi.org/10.1038/nm1293>

Chaudry, A. A., Wahle, K. W., McClinton, S. & Moffat, L. E. (1994). Arachidonic acid metabolism in benign and malignant prostatic tissue in vitro: effects of fatty acids and cyclooxygenase inhibitors. *International Journal of Cancer*, *57*(2), 176–180. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910570208>

Chigaev, A., Smagley, Y. & Sklar, L. A. (2011). Nitric oxide/cGMP pathway signaling actively down-regulates $\alpha 4\beta 1$ -integrin affinity: an unexpected mechanism for inducing cell de-adhesion. *BMC Immunology*, *12*(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-12-28>

Chigaev, A., Waller, A., Amit, O. & Sklar, L. A. (2008). G α s-coupled receptor signaling actively down-regulates $\alpha 4\beta 1$ -integrin affinity: A possible mechanism for cell de-adhesion. *BMC Immunology*, *9*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2172-9-26>

Davies, S. K., Ang, J. E., Revell, V. L., Holmes, B., Mann, A., Robertson, F. P. et al. (2014). Effect of sleep deprivation on the human metabolome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(29), 10761–10766. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402663111>

Dimitrov, S., Benedict, C., Heutling, D., Westermann, J., Born, J. & Lange, T. (2009). Cortisol and epinephrine control opposing circadian rhythms in T cell subsets. *Blood*, *113*(21), 5134–5143. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-11-190769>

Dimitrov, S., Gouttefangeas, C., Besedovsky, L., Jensen, A. T. R., Chandran, P. A., Rusch, E. et al. (2018). Activated integrins identify functional antigen-specific CD8⁺ T cells within minutes after antigen stimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(24), E5536–E5545. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720714115>

Dimitrov, S., Hulteng, E. & Hong, S. (2017). Inflammation and exercise: Inhibition of monocyte intracellular TNF production by acute exercise via $\beta 2$ -adrenergic activation. *Brain, Behavior, and Immunity*, *61*, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.12.017>

Dimitrov, S., Lange, T. & Born, J. (2010). Selective mobilization of cytotoxic leukocytes

by epinephrine. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 184(1), 503–511. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902189>

Dimitrov, S., Lange, T., Gouttefangeas, C., Jensen, A. T. R., Szczepanski, M., Lehnholz, J. et al. (2019). Gas-coupled receptor signaling and sleep regulate integrin activation of human antigen-specific T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 216(3), 517–526. <https://doi.org/10.1084/jem.20181169>

Dustin, M. L. (2014). The immunological synapse. *Cancer Immunology Research*, 2(11), 1023–1033. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0161>

Dustin, M. L. & Long, E. O. (2010). Cytotoxic immunological synapses. *Immunological Reviews*, 235(1), 24–34. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00904.x>

Dustin, M. L. & Springer, T. A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*, 341(6243), 619–624. <https://doi.org/10.1038/341619a0>

Fooksman, D. R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D. A., Waite, J. et al. (2010). Functional anatomy of T cell activation and synapse formation. *Annual Review of Immunology*, 28, 79–105. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-030409-101308>

Frentsch, M., Arbach, O., Kirchhoff, D., Moewes, B., Worm, M., Rothe, M. et al. (2005). Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nature Medicine*, 11(10), 1118–1124. <https://doi.org/10.1038/nm1292>

Friedrich, K. H. & Behrmann, I. (2009). Zelluläre Signalprozesse. In M. Schartl, M. Gessler & A. von Eckardstein (Hrsg.), *Biochemie und Molekularbiologie des Menschen* (1. Auflage., S. 639–644). München: Elsevier GmbH, Urban & Fischer. Zugriff am 10.1.2020. Verfügbar unter: <https://www.elsevier.com/books/biochemie-und-molekularbiologie-des-menschen/unknown/978-3-437-43690-1>

Gouttefangeas, C., Schuhmacher, J. & Dimitrov, S. (2019). Adhering to adhesion: assessing integrin conformation to monitor T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 68(11), 1855–1863. <https://doi.org/10.1007/s00262-019-02365-1>

Grisanti, L. A., Perez, D. M. & Porter, J. E. (2011). Modulation of Immune Cell Function

by α 1-Adrenergic Receptor Activation. *Current topics in membranes*, 67, 113–138. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384921-2.00006-9>

Hadrup, S. R., Maurer, D., Laske, K., Frøsig, T. M., Andersen, S. R., Britten, C. M. et al. (2015). Cryopreservation of MHC multimers: Recommendations for quality assurance in detection of antigen specific T cells. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 87(1), 37–48. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22575>

Hoffmann, C., Leitz, M. R., Oberdorf-Maass, S., Lohse, M. J. & Klotz, K.-N. (2004). Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 369(2), 151–159. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0860-y>

Hoskin, D. W., Mader, J. S., Furlong, S. J., Conrad, D. M. & Blay, J. (2008). Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *International Journal of Oncology*, 32(3), 527–535.

Huang, J., Zeng, X., Sigal, N., Lund, P. J., Su, L. F., Huang, H. et al. (2016). Detection, phenotyping, and quantification of antigen-specific T cells using a peptide-MHC dodecamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), E1890–E1897. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602488113>

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673–687. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00971-6)

Irwin, M., Thompson, J., Miller, C., Gillin, J. C. & Ziegler, M. (1999). Effects of sleep and sleep deprivation on catecholamine and interleukin-2 levels in humans: clinical implications. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(6), 1979–1985. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.6.5788>

Kalinski, P. (2012). Regulation of immune responses by prostaglandin E2. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 188(1), 21–28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>

Kieff, E. & Liebowitz, D. (1990). Epstein-Barr virus and its replication. In B.N. Fields,

D.M. Knipe, R.M. Chanock, M. Hirsch, J. Melnick, T. Monath et al. (Hrsg.), *Virology* (2nd edition., S. 1889–1920). New York: Raven Press New York.

Kilunga Kubata, B., Eguchi, N., Urade, Y., Yamashita, K., Mitamura, T., Tai, K. et al. (1998). Plasmodium falciparum Produces Prostaglandins that are Pyrogenic, Somnogenic, and Immunosuppressive Substances in Humans. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(6), 1197–1202.

Kim, J. J., Bridle, B. W., Ghia, J.-E., Wang, H., Syed, S. N., Manocha, M. M. et al. (2013). Targeted inhibition of serotonin type 7 (5-HT7) receptor function modulates immune responses and reduces the severity of intestinal inflammation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 190(9), 4795–4804. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1201887>

Kinashi, T. (2005). Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology*, 5(7), 546–559. <https://doi.org/10.1038/nri1646>

Klapan, I., Culo, F., Snyderman, C. H., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. (1991). In vitro production of PGE2 by squamous cell cancer lines of the head and neck (SCCHN). *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 27, S79. [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(91\)91527-P](https://doi.org/10.1016/0277-5379(91)91527-P)

Kmiecik, T., Otocka-Kmiecik, A., Górska-Ciebiada, M. & Ciebiada, M. (2012). T lymphocytes as a target of histamine action. *Archives of Medical Science : AMS*, 8(1), 154–161. <https://doi.org/10.5114/aoms.2012.27295>

Konstandin, M. H., Sester, U., Klemke, M., Weschenfelder, T., Wabnitz, G. H. & Samstag, Y. (2006). A novel flow-cytometry-based assay for quantification of affinity and avidity changes of integrins. *Journal of Immunological Methods*, 310(1–2), 67–77. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2005.12.005>

Konstandin, M. H., Wabnitz, G. H., Aksoy, H., Kirchgessner, H., Dengler, T. J. & Samstag, Y. (2007). A sensitive assay for the quantification of integrin-mediated adhesiveness of human stem cells and leukocyte subpopulations in whole blood. *Journal of Immunological Methods*, 327(1–2), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.07.005>

Kühlwein, E. C., Irwin, M. R., Ziegler, M. G., Woods, V. L., Kennedy, B. & Mills, P. J.

(2001). Propranolol affects stress-induced leukocytosis and cellular adhesion molecule expression. *European Journal of Applied Physiology*, 86(2), 135–141. <https://doi.org/10.1007/s00421-001-0526-8>

Lachmann, R., Bajwa, M., Vita, S., Smith, H., Cheek, E., Akbar, A. et al. (2012). Polyfunctional T cells accumulate in large human cytomegalovirus-specific T cell responses. *Journal of Virology*, 86(2), 1001–1009. <https://doi.org/10.1128/JVI.00873-11>

Lange, T., Dimitrov, S., Bollinger, T., Diekelmann, S. & Born, J. (2011). Sleep after vaccination boosts immunological memory. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(1), 283–290. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100015>

Lange, T., Dimitrov, S. & Born, J. (2010). Effects of sleep and circadian rhythm on the human immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1193, 48–59. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05300.x>

Lange, T., Perras, B., Fehm, H. L. & Born, J. (2003). Sleep enhances the human antibody response to hepatitis A vaccination. *Psychosomatic Medicine*, 65(5), 831–835.

Lange, W. (2003). [Influenza--the last big epidemic. What makes it so dangerous?]. *MMW Fortschritte der Medizin*, 145(3–4), 32–34.

Laudanna, C., Campbell, J. J. & Butcher, E. C. (1997). Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24141–24144. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24141>

Leone, R. D., Lo, Y.-C. & Powell, J. D. (2015). A2aR antagonists: Next generation checkpoint blockade for cancer immunotherapy. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.008>

León-Ponte, M., Ahern, G. P. & O'Connell, P. J. (2007). Serotonin provides an accessory signal to enhance T-cell activation by signaling through the 5-HT7 receptor. *Blood*, 109(8), 3139–3146. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-052787>

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*,

7(9), 678–689. <https://doi.org/10.1038/nri2156>

Loh, J.-K., Hwang, S.-L., Lieu, A.-S., Huang, T.-Y. & Howng, S.-L. (2002). The alteration of prostaglandin E2 levels in patients with brain tumors before and after tumor removal. *Journal of Neuro-Oncology*, 57(2), 147–150. <https://doi.org/10.1023/a:1015782809966>

Lokshin, A., Raskovalova, T., Huang, X., Zacharia, L. C., Jackson, E. K. & Gorelik, E. (2006). Adenosine-mediated inhibition of the cytotoxic activity and cytokine production by activated natural killer cells. *Cancer Research*, 66(15), 7758–7765. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0478>

Long, E. O. (2011). ICAM-1: Getting a Grip on Leukocyte Adhesion. *The Journal of Immunology*, 186(9), 5021–5023. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100646>

Luo, B.-H., Carman, C. V. & Springer, T. A. (2007). Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annual review of immunology*, 25, 619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618>

Maeda, E., Akahane, M., Kiryu, S., Kato, N., Yoshikawa, T., Hayashi, N. et al. (2009). Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Japanese Journal of Radiology*, 27(1), 4–19. <https://doi.org/10.1007/s11604-008-0291-2>

McNeil, L. K., Price, L., Britten, C. M., Jaimes, M., Maecker, H., Odunsi, K. et al. (2013). A harmonized approach to intracellular cytokine staining gating: Results from an international multiconsortia proficiency panel conducted by the Cancer Immunotherapy Consortium (CIC/CRI). *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 83(8), 728–738. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.22319>

Mocarski, E. S. (1993). Cytomegalovirus biology and replication. In B. Roizman, R.J. Whitley & C. Lopez (Hrsg.), *The human herpesviruses* (S. 173–226). New York: Raven Press New York.

Murphy, K. M., Travers, P. & Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Zugriff am 7.1.2020. Verfügbar unter: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:1111-2014081685>

O'Brien, A. J., Fullerton, J. N., Massey, K. A., Auld, G., Sewell, G., James, S. et al. (2014). Immunosuppression in acutely decompensated cirrhosis is mediated by prostaglandin E2. *Nature Medicine*, 20(5), 518–523. <https://doi.org/10.1038/nm.3516>

Ohta, A., Gorelik, E., Prasad, S. J., Ronchese, F., Lukashev, D., Wong, M. K. K. et al. (2006). A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(35), 13132–13137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605251103>

Ramakers, B. P., Pickkers, P., Deussen, A., Rongen, G. A., Broek, P. van den, Hoeven, J. G. van der et al. (2008, September 30). Measurement of the Endogenous Adenosine Concentration in Humans In Vivo: Methodological Considerations. *Current Drug Metabolism*. Zugriff am 17.4.2019. Verfügbar unter: <http://www.eurekaselect.com/67796/article>

Ricon, I., Hanalis-Miller, T., Haldar, R., Jacoby, R. & Ben-Eliyahu, S. (2019). Perioperative biobehavioral interventions to prevent cancer recurrence through combined inhibition of β -adrenergic and cyclooxygenase 2 signaling. *Cancer*, 125(1), 45–56. <https://doi.org/10.1002/cncr.31594>

Saha, B., Mondal, A. C., Majumder, J., Basu, S. & Dasgupta, P. S. (2001). Physiological concentrations of dopamine inhibit the proliferation and cytotoxicity of human CD4+ and CD8+ T cells in vitro: a receptor-mediated mechanism. *Neuroimmunomodulation*, 9(1), 23–33. <https://doi.org/10.1159/000049004>

Saito, T. (2013). Mechanisms of T-Lymphocyte Signaling and Activation. In W.E. Paul (Hrsg.), *Fundamental immunology* (S. 306–320). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Sanders, V. M. (2012). The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? *Brain, Behavior, and Immunity*, 26(2), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.08.001>

Scher, J. U. & Pillinger, M. H. (2009). The anti-inflammatory effects of prostaglandins. *Journal of Investigative Medicine: The Official Publication of the American Federation for Clinical Research*, 57(6), 703–708. <https://doi.org/10.2310/JIM.0b013e31819aaa76>

Scholer, A., Hugues, S., Boissonnas, A., Fetler, L. & Amigorena, S. (2008). Intercellular adhesion molecule-1-dependent stable interactions between T cells and dendritic cells determine CD8+ T cell memory. *Immunity*, 28(2), 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.12.016>

Shryock, J. C., Boykin, M. T., Hill, J. A. & Belardinelli, L. (1990). A new method of sampling blood for measurement of plasma adenosine. *The American Journal of Physiology*, 258(4 Pt 2), H1232-1239. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1990.258.4.H1232>

Sloan, E. K., Priceman, S. J., Cox, B. F., Yu, S., Pimentel, M. A., Tangkanangnukul, V. et al. (2010). The sympathetic nervous system induces a metastatic switch in primary breast cancer. *Cancer Research*, 70(18), 7042–7052. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0522>

Stubbe, M., Vanderheyde, N., Pircher, H., Goldman, M. & Marchant, A. (2008). Characterization of a subset of antigen-specific human central memory CD4+ T lymphocytes producing effector cytokines. *European Journal of Immunology*, 38(1), 273–282. <https://doi.org/10.1002/eji.200737611>

Tang, R.-H. (2005). Epitope Mapping of Monoclonal Antibody to Integrin L 2 Hybrid Domain Suggests Different Requirements of Affinity States for Intercellular Adhesion Molecules (ICAM)-1 and ICAM-3 Binding. *Journal of Biological Chemistry*, 280(32), 29208–29216. <https://doi.org/10.1074/jbc.M503239200>

Tominaga, Y., Kita, Y., Satoh, A., Asai, S., Kato, K., Ishikawa, K. et al. (1998). Affinity and Kinetic Analysis of the Molecular Interaction of ICAM-1 and Leukocyte Function-Associated Antigen-1. *The Journal of Immunology*, 161(8), 4016–4022.

Wahle, M., Neumann, R. P., Moritz, F., Krause, A., Buttgerit, F. & Baerwald, C. G. O. (2005). Beta2-adrenergic receptors mediate the differential effects of catecholamines on cytokine production of PBMC. *Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 25(7), 384–394. <https://doi.org/10.1089/jir.2005.25.384>

Waller, E. C. P., Day, E., Sissons, J. G. P. & Wills, M. R. (2008). Dynamics of T cell

memory in human cytomegalovirus infection. *Medical Microbiology and Immunology*, 197(2), 83–96. <https://doi.org/10.1007/s00430-008-0082-5>

Wofl, M., Kuball, J., Ho, W. Y., Nguyen, H., Manley, T. J., Bleakley, M. et al. (2007). Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8+ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities. *Blood*, 110(1), 201–210. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-11-056168>

Yan, Y., Jiang, W., Liu, L., Wang, X., Ding, C., Tian, Z. et al. (2015). Dopamine controls systemic inflammation through inhibition of NLRP3 inflammasome. *Cell*, 160(1–2), 62–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.047>

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensneurobiologie unter Betreuung von Prof. Dr. Jan Born durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Dr. Luciana Besedovsky (Betreuer), Prof. Dr. Tanja Lange und Dr. Stoyan Dimitrov (Betreuer).

Die Versuche wurden von mir und mit Unterstützung durch Michael Szczepanski (Co- Doktorand) durchgeführt. Dabei lag die medizinische Betreuung der Probanden und das Beschaffen der Blutproben bei Michael Szczepanski, das Aufbereiten und Analysieren der Proben bei mir.). Ebenfalls danke ich Dardan Demhasaj, Heidi Ströle, Adam Murtazaliev und Verena Leykamm für die Zusammenarbeit an diesem Projekt.

Die Ergebnisse dieser Versuche führten auch zu folgender Veröffentlichung (s. 8 Veröffentlichungen, Dimitrov et al., 2019

Die statistische Auswertung führte ich unter Anleitung von Dr. Stoyan Dimitrov selbst aus.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 09.02.2021

Jannik Lehnholz

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Dimitrov, S., Lange, T., Gouttefangeas, C., Jensen, A. T. R., Szczepanski, M., Lehnholz, J. et al. (2019). Gas-coupled receptor signaling and sleep regulate integrin activation of human antigen-specific T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 216(3), 517–526.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Prof. Dr. Jan Born danke ich für die Möglichkeit, in seinem Institut meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Die freundliche und strebsame Arbeitsatmosphäre hat mich stets bei der Erschließung der Thematik motiviert.

Herrn Dr. Stoyan Dimitrov danke ich besonders für die Bereitstellung dieser packenden Dissertationsthematik, die umfassende Einweisung in die Laborarbeit sowie seine unerschöpfliche Hilfe und Unterstützung bei der Auswertung der Daten. Danke für die stets herzliche und freundschaftliche Betreuung und für die Durchsicht dieser Arbeit.

Für die Hilfe und Unterweisung im Labor, bei der Patientenbetreuung sowie -untersuchung, als auch bei den EEG-Messungen gilt Dr. Luciana Besedovsky ein herzlicher Dank.

An dieser Stelle möchte ich auch meinem Promotionskollegen Michael Szczepanski für die gute Hand-in-Hand-Zusammenarbeit und die hervorragende medizinische Betreuung der Probanden ganz herzlich danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich hier nicht versäumen, für ihre Hilfsbereitschaft meinen Dank auszusprechen.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern und Großeltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich allzeit unterstützten, sowie meiner Freundin Monique für viel Verständnis, unerschöpfliche Motivation und Geduld.

Außerdem danke ich meinem Bruder Johannes für die erstklassige Beratung in allen grafischen Belangen und die vielen wertvollen Stunden in seiner Firma.

Für die finanzielle Unterstützung danken wir der DFG.