

S. T. Mees, L. Kebschull, N. Senninger,
H. Wolters, J. Haier

Nachweis virusspezifischer T-Zellen bei Patienten nach allogener Nierentransplantation

Einleitung: Infektionen mit Zytomegalievirus (CMV) gehören noch immer zu den führenden opportunistischen Infektionen nach Nierentransplantation und stellen eine schwerwiegende Komplikation mit hoher Morbidität und Mortalität dar. Bisherige Studien haben gezeigt, dass MHC-Tetramere, die CMV-spezifische CD8⁺ Zellen binden können, für das Monitoring der virusspezifischen Abwehr eingesetzt werden können. Das Ziel dieser Studie bestand darin, die Nutzbarkeit von MHC-Tetrameren für die Prädiktion des Risikos von Patienten nach Nierentransplantation für CMV-Infektionen zu bestimmen.

Methoden: Mit Hilfe einer Mehrfarb-Flowzytometrie wurde die Bindung von MHC-CMV-Tetrameren (Beckman Coulter Class I iTATM) bei 5 verschiedenen HLA-Allelen untersucht. CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden mittels Single-plattform, 2-panel, Lyse-no-wash Technologie und anti-CD3, anti-CD8 sowie Fluoreszenz Flowcounts bestimmt. Die Anzahl Tetramer-positiver Zellen wurde mittels anti-CD3, anti-CD8 und peptidspezifischen Tetrameren gemessen. Beide Messergebnisse wurden zusammengeführt und mit klinischen Verlaufsdaten korreliert.

Ergebnisse: Tetramer-positive Zellen für mindestens ein Allel wurden bei 50% der Patienten nachgewiesen. Die Spezifität positiver Ergebnisse wurde durch Differenzierung zwischen T-Zellen und Monozyten, die potentiell eine Phagozytose von Tetrameren durchführen können, vorgenommen. Falsch-positive Ergebnisse der unterschiedlichen HLA-Allele wurden nicht beobachtet. Von den Tetramer-positiven Patienten entwickelten 50% im weiteren Verlauf klinische Zeichen einer CMV-Infektion. In 83% dieser Fälle trat diese CMV-Infektion innerhalb von 100 Tagen nach Transplantation auf.

Diskussion: Die Bestimmung der Anzahl CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen bei Patienten mit Nierentransplantation kann ein schnelles und sensitives Verfahren zur Identifizierung des Risikos für die Entwicklung von CMV-Infektionen darstellen. Dieser Nachweis virusspezifischer T-Zellen nach Nierentransplantation kann die klinische Entscheidung zur präemptiven antiviralen Therapie bei diesen Patienten zukünftig unterstützen.

Schlüsselwörter: Nierentransplantation, Zytomegalievirus, T-Zellen, Tetramere, Flowzytometrie

Klinik und Poliklinik für Allgemein-
und Viszeralchirurgie, Universitätsklinikum Münster

Mees ST, Kebschull L, Senninger N,
Wolters H, Haier J (2010) Nachweis virusspezifischer T-Zellen bei Patienten nach allogener Nierentransplantation. Tx Med 22: 123-127

Detection of Virus-specific T-cells in Patients after Kidney Transplantation

Introduction: Cytomegalovirus (CMV) infection is still the leading opportunistic infection following kidney transplantation and represents a serious complication, resulting in increased morbidity and mortality. Published studies have suggested that MHC tetramers specific for CMV may be useful in monitoring CMV-specific CD8+ cells in post-transplant patients. In this study we analyzed functional viral-specific host responses in kidney transplant patients after transplantation. The aim was to evaluate MHC tetramers for prediction of patients at risk for recurrent or persistent viral reactivation or disease caused by CMV.

Methods: Based on multicolor flow cytometry analysis CMV-specific MHC Tetramers (Beckman Coulter Class I iTag™) for 5 different HLA alleles were established for enumeration of CMV-specific CD8+ T-cells using a single-platform, 2-panel technique. CD3+CD8+ cells were identified using anti-CD3 and -CD8 antibodies and Flow-Count™ Fluorospheres in a lyse-no-wash method. The frequency of tetramer positive cells was determined using anti-CD3 and -CD8 antibodies and tetramers in a similar technique. The two results were combined to give the absolute count of CMV-specific CD8+ T-cells and data were correlated to the clinical course of patients.

Results: Tetramer positive T-cells were detected for at least one HLA allele in 50% of the patients. Specificity of positive results was confirmed by differentiation of T-cells from monocytes that are potentially able to phagocyte the tetramers. Non-matching false positive results for HLA types that were not expressed by the patients or donors were not observed. 50% of the tetramer positive patients developed a clinical evident CMV infection within the initial 6 months after transplantation. This was diagnosed during the first 100 days after transplantation in 83% (5/6) of patients that were tetramer positive perioperatively.

Discussion: Enumeration of CMV-specific CD8+ T cells in patients after kidney transplantation may constitute a rapid and sensitive tool to identify patients at risk for developing CMV disease. Detection of virus-specific T-cells in patients after kidney transplantation may facilitate the decision to initiate a pre-emptive therapy with antiviral medication in patients after kidney transplantation.

Key words: kidney transplantation, cytomegalovirus, tetramers, T-cells

Einleitung

Infektionen mit Zytomegalievirus (CMV) treten bei Patienten nach Nierentransplantation im Allgemeinen ab

dem 2. bis 3. Monat auf. Diese Infektionen sind eine schwerwiegende opportunistische Infektion und als eine der problematischsten Komplikationen zu betrachten [1]. Diese Problematik ergibt

sich einerseits aus der Schwere der Erkrankung mit hoher Morbidität und Mortalität und andererseits aus den unzureichenden frühzeitigen diagnostischen Möglichkeiten. Andererseits ist eine ungezielte prophylaktische Therapie bei diesen Patienten nicht mehr vertretbar. Daher werden seit einigen Jahren vermehrt Anstrengungen unternommen, die diagnostischen Möglichkeiten sowohl hinsichtlich der Frühdiagnostik als auch der Prädiktion von Risikopatienten zu verbessern [2].

CMV gehört zur Gruppe der Herpesviren, die bei 60 – 80% der Erwachsenen weltweit mit latenter, asymptomatischer CMV-Infektion vorkommen. Bei Gesunden sind diese Infektionen durch virusspezifische T-Zellen kontrolliert. Infizierte Zellen produzieren virale Peptidsequenzen, die nach Prozessierung über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Dadurch können die spezifischen CD8+ T-Zellen die Virussequenzen erkennen und die zytotoxischen Abwehrmechanismen in Gang setzen.

Bei immunsupprimierten Patienten hingegen kann eine Reaktivierung der CMV-Infektion auftreten [3], da die entsprechenden zytotoxischen Prozesse nicht mehr ausreichend ablaufen [4] und nachfolgend klinische Symptome mit interstitieller Pneumonie, gastrointestinalen Entzündungen, Hepatitis, Chorioretinitis, Neuritiden und Sepsis entstehen können. Neben diesem in der Frühphase unspezifischen klinischen Bild basiert die derzeitige Diagnostik vor allem auf dem Nachweis spezifischer Antigene (gp65) oder DNA-Sequenzen. Beide Parameter sind zwar spezifisch, weisen aber eine geringe Sensitivität bzw. späte Nachweisbarkeit auf. Die Überwachung des zellulären Immunstatus hingegen ist nicht virusspezifisch und für diese Diagnostik nicht geeignet.

In den letzten Jahren wurde der Nachweis virusspezifischer CD8+ T-Zellen im peripheren Blut etabliert [5]. Durch den Einsatz von Tetrameren, die MHC-prozessierte virusspezifische Peptide erkennen, konnte eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität für diesen Nachweis erreicht werden [6-8]. Vor allem an Knochenmark-transplantierten Patienten wurde die Rekonstitution der virusspezifischen Abwehr überwacht und der klinische Nutzen beim Monitoring dieser Patienten in verschiedenen Studien belegt [9-14].

Ziel dieser Studie war es daher, den Einsatz von MHC-Klasse-1-TetramerenTM beim Nachweis von CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auch bei nieren-transplantierten Patienten in einer Pilotstudie zu überprüfen.

Methodik

Patienten

Es wurden 24 Patienten, die einer allogenen Nierentransplantation unterzogen wurden, in die Studie eingeschlossen. Bei allen Patienten waren die HLA-Typisierung sowie der serologischen CMV-Status (IgG, IgM) von Empfänger und Spender bekannt. Patienten, bei denen weder der Spender noch der Empfänger serologisch CMV-positiv war, wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Die Bestimmung der Tetramere erfolgte unmittelbar vor der Transplantation und für die ersten 6 postoperativen Monate.

CMV-spezifische Tetramere

Es wurden CMV-spezifische Peptidsequenzen für die Allele HLA-A0201, HLA-A2402, HLA-B0702, HLA-B0801 und HLA-B3501 mittels MHC-Klasse-1-Tetrameren iTA_gTM (Beckman-Coulter, Krefeld) nachgewiesen. Die Bestimmung erfolgte mittels eines Flowzytometers EPICS500 (Beckman-Coulter). CD3, CD4 und CD8 wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen (Beckman-Coulter). Zur Bestimmung wurde venöses EDTA-Blut genutzt, welches maximal 24 Stunden bei Raumtemperatur gelagert wurde. In einer Vorstudie wurde festgestellt, dass diese Lagerung keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl Tetramer-positiver CD8⁺ T-Zellen verursacht.

Die Bestimmung der Tetramer-bindenden CD8⁺ T-Zellen erfolgte mittels 2-Panel-Technik. Panel 1: Quantifizierung der CD3⁺CD8⁺ Zellen unter Nutzung von Flow-CountTM Fluorosphären nach der Lyse-no-wash Methodik; Panel 2: Messung der Anzahl Tetramer-positiver Zellen mittels anti-CD3, anti-CD8 sowie dem jeweiligen Tetramer nach der gleichen Methodik. Die Ergebnisse beider Panels wurden kombiniert, um die absolute und relative Anzahl Tetramer-positiver CD8⁺ T-Zellen zu ermitteln.

Ergebnisse

Klinischer Verlauf

Von den 24 eingeschlossenen Patienten entwickelten 6 Patienten innerhalb der ersten 6 postoperativen Monate das klinische Bild einer CMV-Erkrankung. Der Nachweis erfolgte neben dem klinischen Bild mittels serologischer Untersuchungen (IgM und IgG) sowie mittels gp65-Bestimmung im Serum. Bei unklaren Fällen wurde die Diagnose mittels Nachweis von CMV-DNA bestätigt.

Spezifität und Cut-off

Zur Bestimmung der Spezifität wurden alle bei den Patienten nicht nachweisbaren HLA-Allele genutzt. Bei einem Cut-off-Wert von 0,3% waren keine falsch-positiven Ergebnisse nachweisbar. Daher wurde dieser Cut-off für alle weiteren Analysen genutzt. Fehlende Übereinstimmungen mit dem HLA-Muster von Spender bzw. Empfänger, was falsch-positiven Ergebnissen entsprechen würde, wurden nicht beobachtet.

Da Tetramere grundsätzlich durch Monozyten phagozytierbar sind, wurde

flowzytometrisch untersucht, ob Monozyten Tetramer-positiv Signale aufweisen. In keinem der Patienten waren jedoch positive Monozyten nachweisbar (Abb. 1).

CMV-spezifische T-Zellen

Der Nachweis von mindestens einem CMV-spezifischen, Tetramer-bindendem HLA-Allel gelang in 50% der Patienten (n=12). Von diesen 12 Patienten waren 11 Patienten im weiteren Verlauf IgM-positiv. CD8⁺ T-Zellen wurden für alle untersuchten HLA-Typen beobachtet. Diese Patienten mit einem präoperativen Nachweis von virusspezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden im weiteren Verlauf hinsichtlich der Kinetik der absoluten und relativen Zellzahl weiter analysiert. Von diesen 12 Patienten entwickelten im 6-monatigen Beobachtungszeitraum 6 Patienten (50%) CMV-assoziierte klinische Symptomatik. Bei 5 dieser Patienten (83%) traten diese CMV-Erkrankungen innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation auf.

Obwohl es im Rahmen der Machbarkeitsstudie nicht das Ziel der Untersuchung war, ist es bemerkenswert, dass sich Hinweise für eine Eignung als

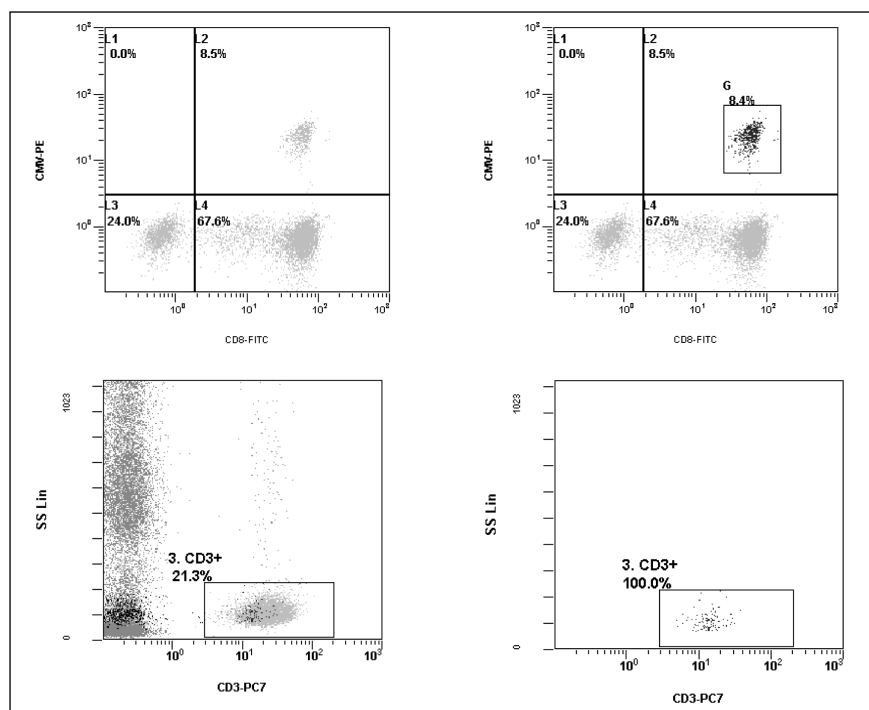


Abb. 1: Flowzytometrischer Nachweis von CD8⁺ T-Zellen mit spezifischer Bindung von CMV-Tetrameren (obere Reihe). Andere Zellen, wie z.B. Monozyten, wiesen keine Tetramerpositivität auf, sodass eine Phagozytose der Tetramere ausgeschlossen werden konnte (unten).

Frühdiagnostik ergaben. Beispielhaft sollen klinische Verläufe eines Tetramer-positiven, aber klinisch unauffälligen Patienten und einer Tetramer-positiven Patientin mit nachfolgender CMV-Erkrankung gegenübergestellt werden. Während der klinisch unauffällige Patient keine relevanten Veränderungen in der Anzahl CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen aufweist, steigt deren Anzahl ca. 2-3 Wochen vor Auftreten der ersten klinischen Symptome deutlich an (Abb. 2).

Diskussion

Die Diagnostik und frühzeitige, möglichst präemptive Therapie von CMV-Erkrankungen bei Patienten nach Nierentransplantation stellt noch immer eine klinische Herausforderung dar. Die bisherigen diagnostischen Methoden mit serologischen Nachweisen und Antigen- bzw. genetischer Erregerdetektion leidet unter geringer Spezifität bei Virusreaktivierungen oder einer späten Reaktion, die dem klinischen Bild hinterherläuft. Durch die Verfügbarkeit effektiver antiviraler Therapeutika und deren grundsätzliche Einsetzbarkeit im Rahmen präventiver Therapien wurde jedoch in den letzten Jahren die Notwendigkeit einer sensitiven und spezifischen Diagnostik vor allem für die Frühphase von CMV-Reaktivierungen intensiviert [15, 16]. Nach den Erfolg versprechenden Studien bei Knochenmarktransplantationen [9, 10] scheint auch bei Patienten mit solider Organtransplantation der Nachweis virusspezifischer CD8+ T-Zellen für diese Fragestellung einsetzbar zu sein [17]. Mit der vorliegenden Machbarkeitsstudie wurde gezeigt, dass bei Patienten mit Nierentransplantation diese Zellen zuverlässig mit hoher Sensitivität und Spezifität detektierbar sind. Die eingesetzten HLA-Allele decken den größten Teil der in Mitteleuropa vorkommenden HLA-Typen ab, sodass eine ausreichende Basis für den Nachweis bei diesem Patientenkollektiv gegeben scheint. In dem kleinen Patientenkollektiv dieser Studie konnte eine hohe Übereinstimmung zwischen dem Nachweis CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen und dem nachfolgenden Auftreten von CMV-Erkrankungen festgestellt werden. Inwieweit diese Beobachtung sich in einem hohen prädiktiven Wert widerspiegelt, muss in einer nachfolgenden

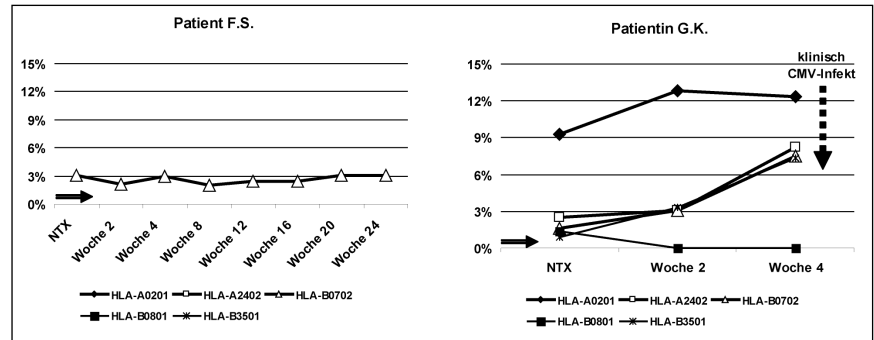


Abb. 2: Verlauf der Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen bei einem Patienten ohne klinische Symptome (links) und einer Patientin mit CMV-Erkrankung 5 Wochen nach Transplantation (rechts). Nicht dargestellte HLA-Allele waren nicht nachweisbar bzw. unterhalb des Cut-off-Wertes (Pfeilmarkierung).

Studie an einem größeren Patientenkollektiv analysiert werden.

Bei einer Bestätigung dieser vorläufigen Ergebnisse kann dieser Nachweis CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen unter mehreren Gesichtspunkten interessant sein. Erstens ist eine Identifikation von Risikopatienten möglich, für die eine Indikation zur prophylaktischen Therapie besteht. Die bisherigen Risikostratifizierungen bieten hierfür zurzeit nur ein wenig zuverlässiges Raster. Zweitens kann die Früherkennung von Patienten, bei denen eine CMV-Reaktivierung auftritt, zu einer präemptiven Therapie genutzt werden. Weiterhin ist der Einsatz dieser innovativen Diagnostik grundsätzlich auch für das Therapiemonitoring bei aufgetretener CMV-Erkrankung möglich. Hierzu bedarf es jedoch weiterer Studien.

Insgesamt kann festgestellt werden, dass der Tetramer-basierte Nachweis CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen bei Patienten mit Nierentransplantation ein innovatives Tool darstellt, das die diagnostische Lücke bei diesen Patienten hinsichtlich der Früherkennung von CMV-Erkrankungen und/oder Risikopatienten schließen kann. Weitere Studien zur Evaluation an größeren Patientenkollektiven sind notwendig, um die Aussagekraft dieses Diagnostikums zu bestätigen.

Literatur

- Solà R, Diaz JM, Guirado L, Ravella N, Vila L, Sainz Z, Gich I, Picazo M, García R, Abreu E, Ortiz F, Alcaraz A (2003) Significance of Cytomegalovirus Infection in Renal Transplantation. *Transplant Proc* 35 (5): 1753-5
- Folkman I, Chapenko S, Amerika D, Bicans J, Murovska M, Rosentals R (2001) beta-herpesvirus activation after kidney transplantation with myco-

phenolate mofetil-based maintenance immunosuppression. *Transplant Proc* 33 (3): 2384-5

- Demopoulos L, Polinsky M, Steele G, Mines D, Blum M, Caulfield M, Adamkovic A, Liu Q, Harler MB, Hahn C, Singh A (2008) Reduced Risk of Cytomegalovirus Infection in Solid Organ Transplant Recipients Treated With Sirolimus: A Pooled Analysis of Clinical Trials. *Transplant Proc* 40 (5): 1407-10
- Sebelin K, Schulzki A, Kloetzel PM, Dörken B, Pezzutto A, Subklewe M (2006) Impairment of circulating myeloid dendritic cells in immunosuppressed renal/pancreas transplant recipients. *Transplantation* 82 (6): 779-87
- Christmas SE, Halliday D, Lawton N, Wang H, Abdalla I, Masters J, Hassan RL, Hart JJ, Khan N, Smith J, Hammad A, Bakran A (2009) Cytomegalovirus-specific CD8+ T cells do not develop in all renal transplant patients at risk of virus infection. *Transpl Immunol* [Epub ahead of print]
- Schermann CM, Fischer G, Witt V, Kurz M, Potschger U, Fritsch G (2008) Detection of human cytomegalovirus-specific T lymphocytes in human blood: comparison of two methods. *Cytotherapy* 10 (8): 834-41
- Brooimans RA, Boyce CS, Popma J, Broyles DA, Gratama JW, Southwick PC, Keeney M (2008) Analytical performance of a standardized single-platform MHC tetramer assay for the identification and enumeration of CMV-specific CD8+ T lymphocytes. *Cytometry A* 73 (11): 992-1000
- Zha QB, He XH, Xu LH, Chi XY, Zeng YY (2006) Quantification and phenotypic analysis of hCMV specific CTL in peripheral blood from HLA-A2+ donors. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 22 (2): 247-51
- Moins-Teisserenc H, Busson M, Scieux C, Bajzik V, Cayuela JM, Clave E, de Latour RP, Agbalika F, Ribaud P, Robin M, Rocha V, Gluckman E, Charron D, Socié G, Toubert A (2008) Patterns of cytomegalovirus reactivation are associated with distinct evolutive profiles of immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Infect Dis* 198 (6): 818-26
- Hobeika A, Osada T, Serra D, Peplinski S, Hanson K, Tanaka Y, Niedzwiecki D, Chao N, Rizzieri D, Lyster H, Clay T, Morse M (2008) Detailed analysis of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells expanded for adoptive immunotherapy of CMV infection following allogeneic stem cell transplantation for malignant disease. *Cytotherapy* 10 (3): 289-302
- Hossain MS, Roback JD, Pollack BP, Jaye DL, Langston A, Waller EK (2007) Chronic GvHD decreases antiviral immune responses in allogeneic BMT. *Blood* 109 (10): 4548-56
- Komatsu H, Kogawa K, Nonoyama S, Inui A, Sogo T, Fujisawa T, Klenerman P (2006) Bone mar-

- row transplantation from a pediatric donor with a high frequency of cytomegalovirus-specific T-cells. *J Med Virol* 78 (12): 1616-23
13. Ohnishi M, Sakurai T, Heike Y, Yamazaki R, Kanda Y, Takaue Y, Mizoguchi H, Kawakami Y (2005) Evaluation of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution in patients after various allogeneic haematopoietic stem cell transplantation using interferon-gamma-enzyme-linked immunospot and human leucocyte antigen tetramer assays with an immunodominant T-cell epitope. *Br J Haematol* 131 (4): 472-9
 14. Gallez-Hawkins G, Thao L, Lacey SF, Martinez J, Li X, Franck AE, Lomeli NA, Longmate J, Diamond DJ, Spielberger R, Forman SJ, Zaia JA (2005) Cytomegalovirus immune reconstitution occurs in recipients of allogeneic hematopoietic cell transplants irrespective of detectable cytomegalovirus infection. *Biol Blood Marrow Transplant* 11 (11): 890-902
 15. Huurman VA, Kalpoe JS, van de Linde P, Vaessen N, Ringers J, Kroes AC, Roep BO, De Fijter JW (2006) Choice of antibody immunotherapy influences cytomegalovirus viremia in simultaneous pancreas-kidney transplant recipients. *Diabetes Care* 29 (4): 842-7
 16. Sund F, Lidehäll AK, Claesson K, Foss A, Tötterman TH, Korsgren O, Eriksson BM (2009) CMV-specific T-cell immunity, viral load, and clinical outcome in seropositive renal transplant recipients: a pilot study. *Clin Transplant* [Epub ahead of print]
 17. Pipeling MR, West EE, Osborne CM, Whitlock AB, Dropulic LK, Willett MH, Forman M, Valsamakis A, Orens JB, Moller DR, Lechtzin N, Migueles SA, Connors M, McDyer JF (2008) Differential CMV-specific CD8⁺ effector T cell responses in the lung allograft predominate over the blood during human primary infection. *J Immunol* 181 (1): 546-56