

Immunologische afweer tegen virale infecties: virus specifieke T-cellen in beeld

G.J.de Bree, E.M.M.van Leeuwen en R.J.M.ten Berge

- T-cellen spelen een centrale rol in de bescherming tegen virale infecties en het onder controle houden van deze infecties.
- De T-celpopulatie bestaat uit diverse virus specifieke geheugen-T-cellen. De verschillen in eigenschappen van deze T-cellen lijken vooral te worden bepaald door het type virus waartegen ze zijn gericht.
- T-cellen die gericht zijn tegen persisterende virussen, zoals het cytomegalovirus, zijn cytotoxisch. T-cellen die gericht zijn tegen virussen die na de eerste infectie geheel opgeruimd worden door het afweersysteem, zoals het influenzavirus, zijn niet cytotoxisch.
- De ontwikkeling van nieuwe immunologische technieken, waaronder de detectie van virus specifieke cellen door middel van HLA-peptide-tetrameercomplexen, maakt het mogelijk de eigenschappen van virus specifieke T-cellen in bloed en organen te analyseren.

Ned Tijdschr Geneeskd. 2007;151:2440-4

In de strijd tegen virale infecties worden alle linies van het afweersysteem ingezet, waaronder het aangeboren immuunsysteem en het verworven, specifieke immuunsysteem. Naast de B-cellen, die voor antilichamen zorgen, hebben de CD4⁺- en CD8⁺-T-lymfocyten een plaats in het verworven immuunsysteem. Vooral de CD8⁺-T-lymfocyten spelen een belangrijke rol in het langdurig onder controle houden van persisterende virale infecties die niet direct door het afweersysteem kunnen worden geëlimineerd. Het zijn deze infecties die tot een hoge morbiditeit leiden onder immunogecompromitteerde patiënten, zoals transplantatiepatiënten en hiv-seropositieve mensen.

De kennis over de antivirale T-celgedemedieerde afweer heeft de laatste jaren een hoge vlucht genomen dankzij betere technieken om de virus specifieke T-cellen te analyseren. In dit artikel geven wij een overzicht van de huidige kennis omtrent de opbouw van de virus specifieke CD8⁺-T-celafweer, de technieken die gebruikt kunnen worden om deze afweer in kaart te brengen en mogelijke toepassingen van die technieken in de medische praktijk.

PRIMAIRE EN SECUNDAIRE INFECTIE: DE ONTWIKKELING VAN NAÏEVE T-CEL TOT GEHEUGEN-T-CEL

Primaire infectie. Tijdens de eerste of primaire infectie met een virus worden geheugen-T-cellen gevormd. Bij dit eerste contact wordt het virus, in bijvoorbeeld de darm of de longen, opgenomen door een antigeen presenterende cel (APC). Deze APC migreert naar de lymfknoop, verwerkt 'en passant' het virus en presenteert stukjes van het virus als virale peptiden, gekoppeld aan HLA-klasse I-moleculen, op zijn celoppervlak. De lymfknoop is de ontmoetingsplaats bij uitstek voor APC's en naïeve T-cellen die zich daar bevinden.

Als de APC in de lymfknoop is aangekomen, wordt het HLA-peptidecomplex op de APC herkend door de T-celreceptor (TCR) van een naïeve CD8⁺-T-cel (figuur 1). Het TCR-sigitaal resulteert, in combinatie met een sigitaal van de costimulatoire moleculen CD28 en CD27, in de activatie van de T-cel.

Na activatie ondergaat de naïeve T-cel een klonale deling waarbij vele dochtercellen ontstaan, alle gericht tegen hetzelfde virale peptide. Deze cellen hebben tijdens de delingsfase middelen zoals granzymen en perforine in stelling gebracht om cellen op te ruimen die met het virus geïnfecteerd zijn (tabel 1).¹ Vanwege deze capaciteiten worden deze cellen 'geheugen-effector-T-cellen' genoemd.

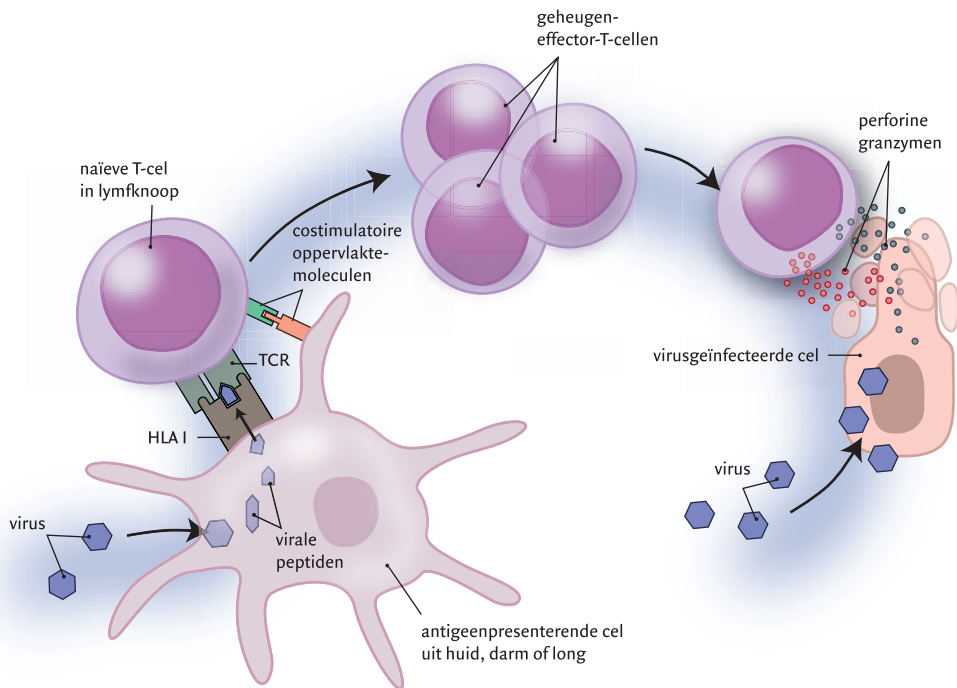
Nadat de initiële infectie tot staan is gebracht, verdwijnt het grootste deel van de geheugen-effector-T-celpopulatie door geprogrammeerde celdood en uiteindelijk resteert slechts 10% van de T-cellen.² Deze T-celpopulatie houdt zich gedurende vele jaren op in de circulatie en in potentiële contactorganen, zoals de darmen, de longen en de huid.

Academisch Medisch Centrum/Universiteit van Amsterdam, Huispost F4-222, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam.

Afd. Inwendige Geneeskunde: mw.dr.G.J.de Bree, arts in opleiding tot internist; mw.prof.dr.R.J.M.ten Berge, internist.

Afd. Experimentele Immunologie: mw.dr.E.M.M.van Leeuwen, immunoloog.

Correspondentieadres: mw.dr.G.J.de Bree (g.j.debree@amc.uva.nl).



FIGUUR 1. Tijdens een primaire virusinfectie wordt het virus door de antigeenpresenterende cel (APC) opgenomen. Het wordt dan, verwerkt als virale peptiden, in het HLA-klasse I-molecuul gepresenteerd. Een naïeve T-cel in de lymfknoop herkent dit HLA-I-peptide-complex met zijn T-celreceptor (TCR). Het TCR-signaal leidt, in combinatie met een signaal van de costimulatoire moleculen op het oppervlak van de naïeve T-cel, tot de activatie van die cel. Die ondergaat vervolgens een klonale expansie en ontwikkelt zich tot geheugen-effector-T-cel. Tijdens dit proces verkrijgt de geheugen-effector-T-cel granzymen en perforine, waarmee cellen opgeruimd kunnen worden die met het virus geïnfecteerd zijn.

Secundaire infectie. Bij een latere infectie met hetzelfde virus wordt deze T-cel populatie gereactiveerd. Ze is dan in staat tot snelle deling en verkrijgt vlot effectormechanismen (zie figuur 1). Dientengevolge zal een secundaire infectie over het algemeen met minder klinische symptomen gepaard gaan.

GEHEUGEN-T-CELLEN EN GEHEUGEN-EFFECTOR-T-CELLEN IN HET PERIFERE BLOED EN IN DE ORGANEN

Nader beschouwd blijkt de geheugen-T-cel populatie niet uniform. Ze bestaat uit verschillende typen cellen, aangeduid als geheugen- en geheugen-effector-T-cellen, die zich van elkaar onderscheiden door de af- respectievelijk aanwezigheid van een directe cytotoxische capaciteit waarmee cellen kunnen worden opgeruimd die met een virus geïnfecteerd zijn. T-cellen met een directe cytotoxische capaciteit bevatten granula met granzymen en perforine en worden geheugen-effector-T-cellen genoemd. T-cellen zonder granzymen en perforine worden aangeduid als geheugen-T-cellen.¹ Granzymen zijn proteasen die door de cel worden uit-

gestoten bij herkenning van een geïnfecteerde cel en die deze vernietigen. De T-cellen moeten eerst worden geactiveerd voordat ze cytotoxisch worden en geïnfecteerde cellen kunnen doden. Men kan deze T-cellen labelen door celoppervlaktemarkeringen – zoals de costimulatoire moleculen CD28 en CD27, de chemokinereceptor CCR7 en de activatiemarkers CD45RA/Ro en IL-7R α – te koppelen aan fluorochromen; men kan ze dan door middel van flowcytometrische analyse in beeld brengen en van elkaar onderscheiden (zie tabel 1).³

Geheel geëlimineerde versus persisterende virusinfecties. De verschillen tussen geheugen-T-cellen en geheugen-effector-T-cellen houden verband met het soort virus waartegen de T-cel gericht is. De geheugen-T-cellen zijn specifiek voor virussen die na de eerste infectie geheel opgeruimd worden door het afweersysteem, zoals het influenzavirus en het respiratoir syncytieel virus (RSV). De geheugen-T-cellen oefenen hun werkzaamheid tegen de virussen uit doordat ze cytotoxisch kunnen worden wanneer herinfectie plaatsvindt.

De cytotoxische geheugen-effector-T-cellen daarentegen zijn gericht tegen virussen die na de eerste infectie weliswaar teruggedrongen worden door het afweersysteem, maar nooit volledig opgeruimd worden. Tot deze groep van per-

TABEL 1. Het fenotype van naïeve T-cellen, geheugen-T-cellen en geheugen-effector-T-cellen¹

type T-cel	oppervlakteantigeen					effectormechanisme
	CD27	CD28	CCR7	IL-7Ra	CD45RA/Ro	
naïeve T-cel	+	+	+	+	CD45RA	–
geheugen-T-cel	+/-	+/-	+	+	CD45Ro	–
geheugen-effector-T-cel	–	–	–	–	CD45RA	granzymen, perforine, IFN γ

CD = 'cluster of differentiation'; CCR = chemokinereceptor; IL = interleukine; IFN = interferon; + = aanwezig; – = afwezig.

sisterende virussen behoren onder andere het cytomegalovirus (CMV), het epstein-barrvirus (EBV) en het hepatitis C-virus (HCV).⁴ Verder is gebleken dat T-cellen die tegen persisterende virussen gericht zijn, in veel grotere aantallen in het perifere bloed voorkomen dan T-cellen die gericht zijn tegen virussen die kunnen worden opgeruimd (tabel 2).⁵⁻¹⁰ De verklaring hiervoor is waarschijnlijk dat als het virus continu aanwezig is in het lichaam, de T-cellen regelmatig weer geactiveerd worden en moeten blijven werken om het virus onder controle te houden. T-cellen daarentegen die gericht zijn tegen verwijderbare virussen (influenzavirus, RSV), hoeven alleen in actie te komen als datzelfde virus weer opnieuw het lichaam binnenkomt.

Deze gegevens werden verkregen middels onderzoek van perifere bloed. Recentelijk is aangetoond dat zich veel grotere aantallen influenzaspecifieke T-cellen in de long bevinden dan in het perifere bloed (zie tabel 2). Deze cellen in de long bleken ook andere eigenschappen te bezitten dan circulerende influenzaspecifieke cellen. Ze bleken onder andere in vitro een veel lagere activatiedrempel te hebben dan dezelfde cellen in het perifere bloed.⁷ Er werd verondersteld dat dit verband houdt met het feit dat de luchtwegen relatief frequent geïnfecteerd raken met het influenzavirus.

FREQUENTIE EN FENOTYPE VAN VIRUSSPECIFIEKE T-CELLEN

HLA-peptide-tetrameercomplex. De laatste 10 jaar heeft de analyse van virusspecifieke CD8⁺-T-cellen een hoge vlucht genomen met de ontwikkeling van zogenaamde HLA-peptide-tetrameercomplexen.¹¹ Een tetrameer bestaat uit een multi-meercomplex van 4, in vitro gesynthetiseerde, zware ketens en lichte ketens van HLA-klasse I, aan elkaar gekoppeld en gelabeld met een fluorochroom. De HLA-ketens worden gevormd tot een HLA-complex waarin het immunodominante peptide van een virus opgenomen wordt.

Een CD8⁺-T-cel die het HLA-peptide-tetrameercomplex herkent met zijn TCR, bindt zich specifiek aan de gelabelde tetrameer. Op deze manier kunnen virusspecifieke T-cellen worden gevisualiseerd en door middel van flowcytometrie kunnen ze nader gekarakteriseerd worden voor celopper-

vlaktemarkers (figuur 2). De bestudering van virusspecifieke T-cellen door middel van tetrameren is alleen mogelijk bij virussen waarvan een immunodominant epitooop bekend is. Recente studies hebben immunodominante epitopen van onder andere EBV,¹² hiv,⁴ CMV,⁴ RSV^{8, 13} en influenzavirus⁵ in kaart gebracht.

Het voordeel van deze techniek is dat virusspecifieke T-cellen kunnen worden geanalyseerd zonder voorafgaande stimulatie. Een beperking is echter dat alleen cellen bestudeerd kunnen worden van patiënten van wie de HLA-typing overeenkomt met de beschikbare tetrameren.

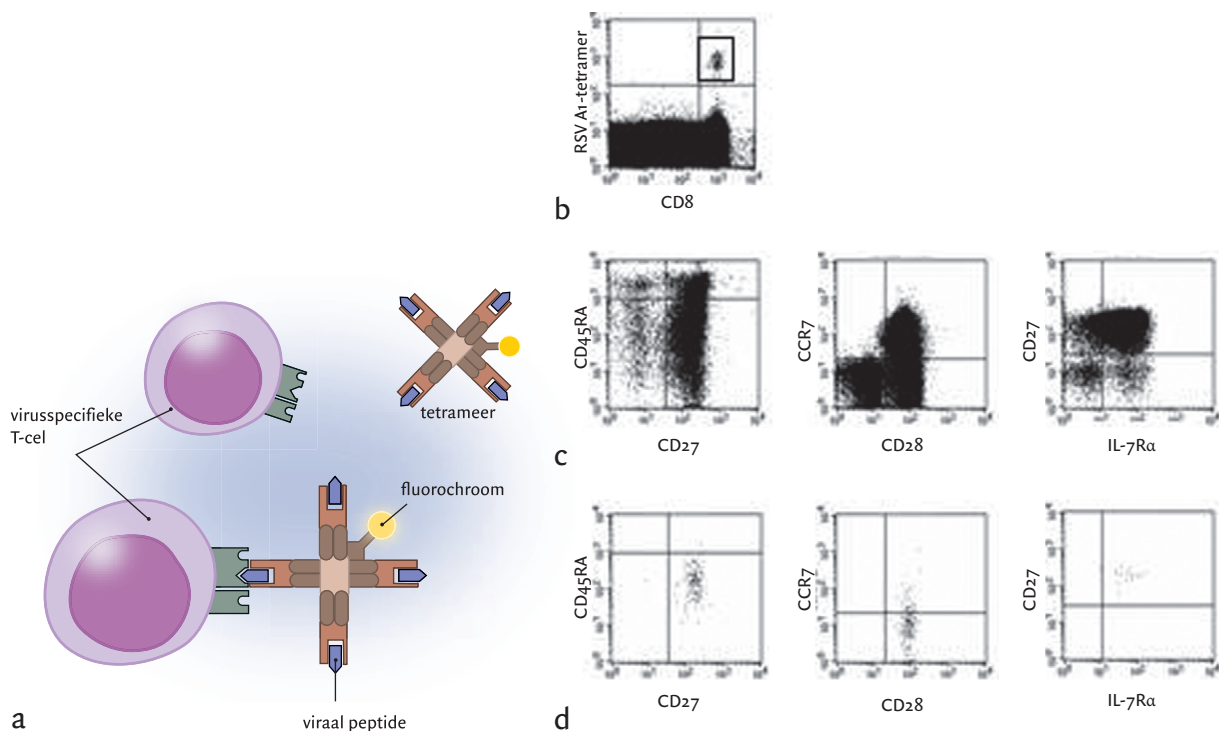
MOGELIJKE TOEPASSING VAN TETRAMEREERTECHNOLOGIE IN DE KLINIEK

Het monitoren van de frequentie en de kenmerken van virusspecifieke T-cellen door middel van tetrameertechno-

TABEL 2. De frequenties van virusspecifieke T-cellen in het perifere bloed en de longen

virus	T-celfrequentie*†		tetrameer*
	in bloed	in longen	
verwijderbaar virus			
influenzavirus	0,06-1,6 0,03-0,46		A2 ⁵ A1 ⁶
RSV	0-0,34	1,2-11,6	A1, A2 ⁷
	0,02-0,15		B7 ⁸
	0,003-0,07		A1 ⁶
	0-0,07	0,12-2,0	A1 ⁷
persisterend virus			
cytomegalovirus	0,5-3,8		A2 ⁹
epstein-barrvirus	0,4-5,5		A2; B8 ¹⁰

RSV = respiratoir syncytieel virus.
*Met een in vitro gesynthetiseerde tetrameer van HLA-eiwitten die met een fluorochroom heeft gelabeld, kan men cellen visualiseren die het betreffende HLA-peptidecomplex kunnen binden aan hun T-cel-receptor.
†Weergegeven als de fractie tetrameerpositieve cellen van het totaal van de CD8⁺-T-cellen.



FIGUUR 2. (a) Schematische voorstelling van een tetrameercomplex. Het complex bestaat uit 4 synthetische HLA-ketens die elk een viraal peptide bevatten. Het complex is gelabeld met een fluorochroom. De tetrameer bindt zich aan een T-cel met een T-celreceptor (TCR) die specifiek is voor het gebruikte virale peptide; (b) voorbeeld van de toepassing van een tetrameerkleuring van lymfocyten: de 'dotplot' geeft het totaal aan lymfocyten weer. Op de x-as is de CD8-keuring uitgezet en op de y-as de tetrameerkeuring. De cellen die aankleuren met de tetrameren die specifiek zijn voor respiratoir syncytieel virus (RSV) bevinden zich in het kwadrant rechtsboven; (c) 3 dotplots van het totale aantal CD8⁺-T-cellen, met van links naar rechts de verschillende markers: CD45RA versus CD27, CCR7 versus CD28, en CD27 versus IL-7R α ; (d) RSV-specifieke CD8⁺-T-cellen met een geheugenfenotype; elke dotplot geeft de tetrameerpositieve cellen uit het rechter bovenkwadrant in figuur b weer, voor dezelfde markers als in figuur c.

logie vindt momenteel nog slechts beperkt plaats binnen de diagnostiek in de geneeskunde. Toch zijn er recentelijk enkele onderzoeken verricht die aantonen dat deze techniek ook kan worden toegepast in de kliniek. Een belangrijke doelgroep wordt gevormd door immuuncompromitteerde patiënten met een hoog risico op ernstige symptomen bij reactivatie van bijvoorbeeld CMV. Deze CMV-activatie is voornamelijk het gevolg van remming dan wel afwezigheid van een CD8⁺-T-celrespons op CMV. Reeds begin jaren negentig van de vorige eeuw is er een pilotstudie verricht waarin werd aangetoond dat de toediening van T-cellen uit donorbeenmerg aan immuuncompromitteerde patiënten resulteerde in een betere controle van virale infecties.¹⁴ In een recente studie werden CMV-tetrameren gebruikt om CMV-specifieke cellen te isoleren uit patiënten die een stamceltransplantatie zouden ondergaan.¹⁵ Deze CMV-specifieke cellen werden in vitro vermenigvuldigd en vervolgens teruggegeven. In de weken na de beenmergtransplantatie hadden deze patiënten een betere immuniteit tegen CMV-

infectie en op lange termijn hielden zij deze infectie opmerkelijk goed onder controle. Deze studies bieden uitzicht op een klinische toepassing van tetrameertechnologie in de diagnostiek bij en de behandeling van patiënten met stoornissen in de virusspecifieke afweer.

Belangenconflict: geen gemeld. Financiële ondersteuning: geen gemeld.

Aanvaard op 20 augustus 2007

Literatuur

- 1 Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J Exp Med.* 1997;186:1407-18.
- 2 Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity.* 1998;8:177-87.

- 3 Lier RA van, Berge IJ ten, Gamadia LE. Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:931-9.
- 4 Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, et al. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med.* 2002;8:379-85.
- 5 He XS, Mahmood K, Maecker HT, Holmes TH, Kemble GW, Arvin AM, et al. Analysis of the frequencies and of the memory T cell phenotypes of human CD8+ T cells specific for influenza A viruses. *J Infect Dis.* 2003;187:1075-84.
- 6 Bree GJ de, Heidema J, Leeuwen EM van, Bleek GM van, Jonkers RE, Jansen HM, et al. Respiratory syncytial virus-specific CD8+ memory T cell responses in elderly persons. *J Infect Dis.* 2005;191:1708-10.
- 7 Bree GJ de, Leeuwen EM van, Out TA, Jansen HM, Jonkers RE, Lier RA van. Selective accumulation of differentiated CD8+ T cells specific for respiratory viruses in the human lung. *J Exp Med.* 2005;202:1433-42.
- 8 Goulder PJ, Lechner F, Klenerman P, McIntosh K, Walker BD. Characterization of a novel respiratory syncytial virus-specific human cytotoxic T-lymphocyte epitope. *J Virol.* 2000;74:7694-7.
- 9 Gamadia LE, Rentenaar RJ, Baars PA, Remmerswaal EB, Surachno S, Weel JE, et al. Differentiation of cytomegalovirus-specific CD8(+) T cells in healthy and immunosuppressed virus carriers. *Blood.* 2001;98:754-61.
- 10 Tan LC, Gudgeon N, Annels NE, Hansasuta P, O'Callaghan CA, Rowland-Jones S, et al. A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol.* 1999;162:1827-35.
- 11 Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 1996;274:94-6.
- 12 Hislop AD, Annels NE, Gudgeon NH, Leese AM, Rickinson AB. Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J Exp Med.* 2002;195:893-905.
- 13 Heidema J, Bree GJ de, Graaff PM de, Maren WW van, Hoogerhout P, Out TA, et al. Human CD8(+) T cell responses against five newly identified respiratory syncytial virus-derived epitopes. *J Gen Virol.* 2004;85(Pt 8):2365-74.
- 14 Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science.* 1992;257:238-41.
- 15 Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, Tauro S, McDonald D, Osman H, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med.* 2005;202:379-86.

Abstract

Immunological defense to viral infections: focus on virus-specific T cells

- T cells play a central role in the control of and the protection against viral infections.
- The T cell population consists of a diversity of virus-specific memory T cells. The characteristics of these T cells seem to depend largely on the type of virus for which they are specific.
- T cells directed against latent viruses, such as cytomegalovirus, are cytotoxic cells. T cells directed against viruses that after the initial infection are completely removed by the immune system, such as the influenza virus, are non-cytotoxic cells.
- The development of new immunological techniques, such as the detection of virus-specific cells with HLA-peptide tetrameric complexes, enables the characterization of the properties of virus-specific T cells in the blood and organs.

Ned Tijdschr Geneesk. 2007;151:2440-4