

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin

(Department) Tübingen

Abteilung I

(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie,

Hämatologie/Onkologie)

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Charakterisierung humaner peripherer
γδ T-Zellsubpopulationen in Hinblick auf
regulatorische Eigenschaften**

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

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

vorgelegt von

Karoline Pfeiffer, geb. Bracht

aus Frechen

2009

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger
2. Berichterstatter: Professor Dr. S. Stevanovic

Für meine Eltern,
Angelika und Walter Gauss

1	EINLEITUNG	6
1.1	Immunregulation	6
1.2	Regulatorische T-Zellen	7
1.3	Charakteristika regulatorischer T-Zellen	10
1.4	$\gamma\delta$ T-Zellen	13
1.5	Fragestellung	17
2	MATERIAL	18
2.1	Allgemeine Materialien	18
2.2	Materialien für die Isolierung mononukleärer Zellen	19
2.3	Materialien für die Anreicherung von T-Zellen	19
2.4	Materialien für die Zellzählung und Mikroskopie	20
2.5	Materialien für die Zellkultivierung	21
2.6	Materialien für die Durchflusszytometrie	21
2.7	Materialien für den Proliferationsassay	23
2.8	Materialien für die RNA-Isolierung	24
2.9	Materialien für die cDNA-Synthese	24
2.10	Materialien für die qRT-PCR	25
3	METHODEN	26
3.1	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque	26
3.2	Isolierung von T-Zellsubpopulationen	27
3.3	Kultivierung von $\gamma\delta$ -Zellen	36
3.4	Expansion und Kultivierung von regulatorischen CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen	37
3.5	Durchflusszytometrie	38
3.6	RNA-Isolierung	42

3.7	cDNA-Synthese	44
3.8	qRT-PCR	45
3.9	Generierung von CD4 ⁺ γδ T-Zellen	47
3.10	Suppressionsassay: Mixed lymphocytes culture (MLC)	49
4	ERGEBNISSE	51
4.1	Pan γδ T-Zellen exprimieren schwach FOXP3	51
4.2	Multiple γδ T-Zellsubpopulationen exprimieren FOXP3	52
4.3	FOXP3-Expression von γδ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie	60
4.4	Phänotypische und funktionelle Charakterisierung CD4 ⁺ Vδ1 ⁺ T-Zellen	65
5	DISKUSSION	81
5.1	Einleitung	81
5.2	Isolierung von γδ T-Zellsubpopulationen mit MACS / FACS / Dynabeads	82
5.3	Schwaches FOXP3-Signal in multiplen γδ T-Zellsubpopulationen	84
5.4	Gewinnung und Charakterisierung der pauciklonalen Vδ1 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellpopulation	88
5.5	Schlussfolgerung	97
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	LITERATUR	102
8	ANHANG	116
8.1	Abkürzungen	116
8.2	Abbildungsverzeichnis	116
8.3	Tabellenverzeichnis	118

1 Einleitung

1.1 Immunregulation

Eine zentrale Aufgabe des Immunsystems ist es, körperfremde Eiweiße von körpereigenen Eiweißen zu unterscheiden. Dies ermöglicht, dass einerseits eindringende Krankheitserreger effektiv zerstört werden, andererseits körpereigene Gewebe verschont bleiben. Die ausbleibende Immunantwort gegenüber körpereigenem Gewebe nennt man Immuntoleranz bzw. Selbsttoleranz. Ihr liegen verschiedene Mechanismen zugrunde. Von zentraler Bedeutung ist die intrathymische Deletion selbstreaktiver T-Zellen ¹: nur 5% der heranreifenden T-Zellen verlassen den Thymus, 95% der T-Zellen werden im Thymus aussortiert, da sie eigene Antigene erkennen. Dennoch kommen autoreaktive T- und B-Zellen beim Gesunden im Blut vor ^{2, 3}. Es muss somit auch in der Peripherie potente Regulationsmechanismen geben, die im Normalfall pathologische Autoimmunität verhindern. Es konnte gezeigt werden, dass, abhängig von der Art der costimulatorischen Signale, die Aktivierung selbstreaktiver T-Zellen zu T-Zell-Anergie, Apoptose oder einer Veränderung des Phänotyps führt und zerstörerische Autoimmunität verhindert wird. Ein weiterer, ganz entscheidender Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz ist die Suppression autoreaktiver T- und B-Zellen durch regulatorische T-Zellen ^{4, 5}. T-Zellen waren lange Zeit ausschließlich für ihre Rolle bei der Abwehr von Infektionen, der Entstehung von Autoimmunität und Transplantatabstoßung bekannt ^{6, 7, 8}. Inzwischen weiß man, dass T-Zellen auch über regulatorische, immunsuppressive Eigenschaften verfügen und an der Unterbindung von Autoimmunität, Allergien und Transplantatabstoßung sowie der Begrenzung und Unterdrückung physiologischer Immunantworten beteiligt sind ^{4, 9, 6, 10, 11}. In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl unterschiedlicher regulatorischer T-Zellpopulationen ($CD4^+CD25^+$ T-Zellen ¹², Tr1-Zellen ¹³, Tr3Zellen ¹⁴, $CD8^+$ T-Zellen ¹⁵, $TCR^+CD4^-CD8^-$ T-Zellen ¹⁶ beschrieben werden, die sich zwar durch ihren Phänotyp, ihren

Ursprung, ihre Funktionsweise und ihren Wirkort voneinander unterscheiden, sich aber im Hinblick auf ihre Funktion, den Erhalt der Immunhomöostase und der Immuntoleranz, ergänzen. Die Identifizierung der unterschiedlichen, hoch spezialisierten regulatorischen T-Zellpopulationen lässt erahnen, wie vielfältig und kompliziert die Interaktionen sind, die den Erhalt der Immunhomöostase garantieren.

1.2 Regulatorische T-Zellen

Die erste und bisher am besten charakterisierte periphere regulatorische T-Zellpopulation wird von $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+$ T-Zellen gebildet und exprimiert stark und konstitutiv die alpha-Untereinheit des IL-2 Rezeptors (CD25)¹⁷. $\text{TCR}\alpha\beta^+ \text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$ T-Zellen (nTreg), machen ungefähr 1-2% der peripheren CD4^+ T-Zellen aus¹⁸. Sie entwickeln sich im Thymus^{19, 20} zu einer funktionell hoch spezialisierten, reifen T-Zellpopulation, deren TCR-Repertoire genauso vielfältig ist wie das naiver T-Zellen^{21, 22}. Für den Erhalt bzw. die Expansion von nTreg ist die Expression relevanter Autoantigene in der Peripherie erforderlich²¹. Es ist anzunehmen, dass eine de novo Generierung von regulatorischen T-Zellen auch in der Peripherie stattfindet. Walker et al. konnten zeigen, dass sich humane $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen nach TCR-Aktivierung phänotypisch und funktionell in regulatorische Zellen umwandeln²³. Fu et al. und Fantini et al. konnten zeigen, dass TGF- β die Entstehung von FOXP3^+ regulatorischen T-Zellen aus $\text{CD4}^+\text{CD25}^-$ T-Zellen induziert^{24, 25}. Es ist daher anzunehmen, dass eine Aktivierung von T-Zellen im Rahmen einer Immunantwort nicht nur zu der Entstehung von Effektor-T-Zellen, sondern auch von regulatorischen T-Zellen führt.

nTreg zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, beim Gesunden die zerstörerische Aktivität von autoreaktiven CD4^+ T-Helfer-, autoreaktiven CD8^+ zytotoxischen T-Zellen²⁶ und autoreaktiven B-Zellen²⁷ zu unterbinden und physiologische Immunantworten einzudämmen²⁸. nTreg unterliegen im Thymus der sogenannten „altered negative selection“: Ihre Affinität zum Peptid-MHC-Klasse-II-Komplex ist zu schwach, als dass eine

Deletion stattfinden würde, jedoch zu stark, als dass sie den Weg in die Peripherie fortsetzen können. Es wird daher angenommen, dass nTreg während des Prozesses der „altered negative selection“ ein Signal erhalten, das die Entwicklung zu suppressiven T-Zellen induziert ^{29, 30, 19}. nTreg kommen im Blut ^{31, 32}, in lymphatischen Organen (Tonsillen und Milz) ^{6, 33} und im Nabelschnurblut ³⁴ vor. Ein weiteres für nTreg charakteristisches Merkmal ist die konstitutive Expression der Marker CD122, CD45Rb^{low} ^{35, 36}, CD45RO ³², von intrazellulärem CTLA-4 ^{21, 37}, GITR ^{38, 39} und HLA-DR ²⁸. nTreg exprimieren zudem kein/niedrig CD127 ^{40, 41}. Keiner dieser Marker ist ausschließlich auf nTreg beschränkt; jedoch ist die Quantität der exprimierten Marker, ihre Kombination und Kontinuität ein Charakteristikum für regulatorische T-Zellen. Ein weiterer Marker, der ausschließlich von regulatorischen T-Zellen hoch exprimiert wird, ist das Genprodukt von FOXP3 ⁴². Das Gen FOXP3 kodiert für den Transkriptionsinhibitor Scurfin und ist an der negativen Regulation der Aktivierung und Funktion von T-Zellen entscheidend beteiligt ⁴³. Es konnte gezeigt werden, dass FOXP3 eine Schlüsselposition in der Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen einnimmt ^{42, 44, 45}. Walker et al. konnten zeigen, dass die Expression von FOXP3 durch TCR-vermittelte Stimulation naiver CD4⁺CD25⁻ T-Zellen induziert werden kann und mit einer suppressiven Aktivität einhergeht ²³. Dies gilt ebenfalls für die Stimulation von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit TGF-β ^{24, 25}.

nTregs sezernieren kein IL-2 und IL-4 und nur geringe Mengen an TGF-β, IFN-γ und IL-10 ⁴⁶. Die Suppression durch nTregs ist zellkontaktabhängig ^{31, 33, 32}, sowohl antigenspezifisch ^{30,47} als auch antigenunspezifisch ^{32, 21}. Dabei scheint die Regulation der Zytokinproduktion der Zielzellen eine Rolle zu spielen, da die Synthese von IFN-γ und vor allem von IL-2 durch CD4⁺CD25⁻ in Co-Kultur mit nTregs deutlich vermindert ist ^{31, 32, 48}. CD4⁺CD25⁺ T-Zellen produzieren nicht nur lösliches TGF-β, sondern exprimieren, im Gegensatz zu CD4⁺CD25⁻ T-Zellen, zelloberflächengebundenes TGF-β. Inwieweit TGF-β an der Suppression durch nTregs beteiligt ist, bleibt jedoch umstritten ⁴⁶. Neben nTregs

wurden Tr1- und Th3-Zellen als weitere CD4⁺ αβ T- Zellpopulationen mit immunsuppressiver Wirkung identifiziert. Tr1- und Th3-Zellen werden in der Peripherie nach Antigenkontakt unter tolerogenen Bedingungen aus CD4⁺ T-Helferzellen rekrutiert^{49, 13, 29, 14}. Tr1- und Th3-Zellen exprimieren CD25, CD122, CD45Rb^{low}, CTLA-4, GITR und HLA-DR jedoch erst nach Aktivierung. Tr1 Zellen exprimieren FOXP3 um ein Vielfaches geringer als nTregs^{50, 51}. Auf die FOXP3-Expression von Th3-Zellen wird in der Literatur nicht eingegangen. Der entscheidende Unterschied zu nTregs ist die Zytokinproduktion: Tr1-Zellen sezernieren IL-5, IL-10, IFN-γ, TGF-β und kein oder nur wenig IL-2 und IL-4¹³, während sich Th3-Zellen durch die Produktion von IL-4 und TGF-β auszeichnen¹⁴. Die immunregulatorische Funktion von Tr1- und Th3-Zellen kommt durch die suppressive Wirkung der sezernierten Zytokine zustande. Es wird angenommen, dass nTregs an der Induktion von Tr1- und Th3-Zellen beteiligt sind und die direkte zellkontaktabhängige Suppression durch nTregs durch eine indirekte zytokinabhängige Suppression ergänzt und/oder abgelöst wird^{52 53}. Durch die Induktion peripherer regulatorischer T-Zellen wäre die zahlenmäßig kleine Population der nTregs in der Lage, ein hohes Maß an Suppression zu induzieren und die Immunhomöostase in vivo zu garantieren^{32, 52}.

Von welcher entscheidenden Bedeutung regulatorische T-Zellen sind und welche verheerenden Auswirkungen ihr Fehlen oder ihr Funktionsverlust haben, konnte in zahlreichen Mausmodellen als auch für den Menschen eindrucksvoll gezeigt werden. So liegt z.B. bei dem Mausmodell Scurfy eine Mutation des Gens FOXP3 vor. Die Erkrankung ist durch einen Verlust funktionsfähiger nTregs und eine Zunahme sowie Hyperreaktivität von CD4⁺ T-Zellen gekennzeichnet^{54, 55, 56, 43}. Scurfy-Mäuse zeigen die gleiche Immunpathologie wie Menschen, die am sogenannten IPEX-Syndrom (Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomales Syndrom) leiden, bei dem ebenfalls eine Mutation von FOXP3 vorliegt. Das IPEX-Syndrom und das Krankheitsbild der scurfy-Mäuse zeichnet sich durch zerstörende Autoimmunität gegenüber

endokrinen Organen (Diabetes mellitus Typ I, Thyroiditis), Allergien (Nahrungsmittelallergie, Atopische Dermatitis), chronisch entzündliche Darmerkrankung und fatale Infektionen aus ^{57, 58, 59, 60, 61}. Der Transfer von nTreg-Zellen gesunder Mäuse in Scurfy-Mäuse verhindert die Entstehung von Autoimmunität und zeigt, welche entscheidende Bedeutung die zahlenmäßig geringe Population der nTreg-Zellen für den Erhalt der Immunhomöostase hat ⁴⁴.

Die bisher beschriebenen peripher wirkenden regulatorischen T-Zellpopulationen (CD4⁺CD25⁺, Tr1 und Th3) gehören alle dem TCRαβ⁺ Zellpool an.

TCRγδ-knock-out Mäuse zeigen interessanterweise keine verstärkte Infektanfälligkeit, sondern leiden unter einer Störung der Immunregulation, die sich in einer überschießenden Immunantwort, einer vermehrten Anzahl von Autoantikörpern und einem Anstieg der CD4⁺ αβ T-Zellen äußert ^{62, 63, 64, 65}. Die beobachtete Dysregulation von αβ T-Zellen und B-Zellen in γδ T-Zell-knock-out Mäusen lässt darauf schließen, dass γδ T-Zellen beim Gesunden die Aktivität von αβ T-Zellen und autoreaktiven B-Zellen regulieren und somit Merkmale regulatorischer T-Zellen zeigen ⁶⁶. Ob dies für pan γδ oder nur für distinkte γδ Subpopulationen gilt, ist unklar. Für murine als auch humane TCRγδ⁺ T-Zellen der Mukosa konnte bereits gezeigt werden, dass sie entscheidend an der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität, der Gewebeimmunität und der Immuntoleranz ^{67, 68, 69, 70, 71, 72} sowie an der Vermeidung von Allergien ⁶⁶ beteiligt sind. Das immunregulatorische Potential peripherer humaner TCRγδ⁺ T-Zellen wurde bis jetzt nicht genauer untersucht.

1.3 Charakteristika regulatorischer T-Zellen

CD25

CD25 steht für die α-Kette des hoch affinen IL-2-Rezeptors und wird von aktivierten T-Zellen, aber auch von B-Zellen und Monozyten exprimiert. Typisch für nTreg ist die hohe konstitutive Expression von CD25 ¹⁷. CD25 ist für die Entwicklung und den Erhalt von nTregs unverzichtbar ^{73, 74}.

CD122

Assoziiert mit CD25 ist der Marker CD122. CD122 steht für die β -Kette des IL-2- und IL-15-Rezeptors und ist am Zellsignaling beteiligt. Der Oberflächenmarker CD122 wird von ruhenden als auch aktivierten T-Zellsubpopulationen, B-Zellen und NK-Zellen exprimiert. Typisch für nTreg ist eine hohe und konstitutive Expression ³⁵.

CD45Rb

CD45Rb ist eine Isoform von CD45 und verstärkt das Antigenrezeptorsignaling von B- und T-Zellen. Außer von T-Zellsubpopulationen und B-Zellen wird CD45Rb auch von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen exprimiert. Typisch für nTreg ist eine niedrige Expression von CD45Rb ³⁶.

CD45RO

CD45RO ist eine Isoform von CD45 und wird von antigenerfahrenen T-Zellen, B-Zellsubpopulationen, Monozyten und Makrophagen exprimiert. CD45RO kennzeichnet den Phänotyp von Gedächtniszellen. nTreg exprimieren CD45RO ³².

CTLA-4

CTLA-4 wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und inhibiert als Gegenspieler von CD28 die weitere T-Zellproliferation, indem es die IL-2-Produktion frisch aktivierter T-Zellen hemmt ⁴⁶. CTLA-4 und CD28 konkurrieren um die Rezeptoren CD80 und CD86, welche von aktivierten antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. In-vitro-Experimente mit anti-CTLA-4-mAb konnten eine Beteiligung von CTLA-4 an der suppressiven Wirkung von nTreg nicht belegen ^{32, 48}. Ebenfalls scheint CTLA-4 für die Entwicklung von nTreg nicht essentiell zu sein, da eine forcierte FOXP3-Expression in CTLA-4-defizienten Mäusen die Entwicklung funktionsfähiger nTreg ermöglicht. Dennoch kann die Funktion von CTLA-4 durch die forcierte FOXP3-Expression nicht

vollständig kompensiert werden und der schwere Krankheitsverlauf der CTLA-4-defizienten Mäuse wird lediglich abgeschwächt. Es ist daher anzunehmen, dass CTLA-4 und FOXP3 bei der Entwicklung von regulatorischen T-Zellen interagieren. Im Gegensatz zu normalen T-Zellen exprimieren CD4⁺CD25⁺ T-Zellen CTLA-4 konstitutiv^{21, 75, 37}.

GITR

GITR wird von T-Zellen, B-Zellen, DCs und Makrophagen schwach exprimiert und nach Aktivierung hochreguliert. In nTreg wird GITR sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene hochreguliert³⁹. Im Gegensatz zu Antikörpern gegen CTLA-4 ist anti-GITR mAb in der Lage, die suppressive Funktion von nTreg zu vermindern⁷⁶. In-vitro-Studien mit murinen Zellen haben gezeigt, dass die Bindung von anti-GITR mAb zu einer erhöhten Expression von NFκB in nTregs führt, welches wahrscheinlich zu einer Modifikation inhibitorischer Signalwege und zur Aufhebung der suppressiven Funktion führt³⁸. Interessanterweise wurde die Suppression durch nTregs nur antagonisiert, wenn anti-GITR mAb vor der Zellaktivierung hinzugefügt wurde, was darauf hinweist, dass GITR den Aktivierungsprozess von nTregs beeinflusst. GITR könnte demnach als costimulatorisches Molekül an der TCR-vermittelten Stimulation beteiligt sein und als solches die T-Zellaktivierung modulieren³⁸. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass GITR nach TCR-Bindung den programmierten Zelltod (Apoptose) verhindert⁷⁷.

HLA-DR

HLA-DR ist ein MHC-Klasse-II-Molekül. Als solches ist es an der Präsentation von Antigenen beteiligt. nTregs exprimieren stark und konstitutiv HLA-DR²⁸. Baecher-Allen et al. stellten die Hypothese auf, dass nTregs ein bisher nicht identifiziertes Molekül exprimieren, welches mit HLA-DR assoziiert ist und von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen erkannt wird⁷⁶. Dies könnte aufgrund fehlender Co-Stimulation zu einer T-Zellanergie führen. Diese Hypothese konnte jedoch bisher nicht bestätigt werden.

CD127

CD127 steht für den IL-7-Rezeptor und wird von reifen T-Zellen exprimiert. nTreg unterscheiden sich von Effektor-T-Zellen durch die fehlende bzw. schwache Expression des IL-7 Rezeptors ^{40, 41}.

FOXP3

FOXP3 ist von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung und Funktion von nTreg. Das Gen FOXP3 kodiert für den intrazellulären Transkriptionsinhibitor Scurfin ⁴³. Scurfin reguliert die Transkription von Zytokinen und Aktivierungsmarkern, die in enger Verbindung mit der regulatorischen Funktion von nTreg stehen ^{21, 78, 45}. nTreg exprimieren FOXP3 100mal stärker als CD4⁺CD25⁻ T-Zellen ⁴². CD8⁺ T-Zellen transkribieren ebenfalls schwach FOXP3, während B-Zellen und nicht-lymphoide Zellen kein FOXP3 exprimieren ^{23, 56}. Die FOXP3-Expression von nTreg ist stabil und unabhängig vom Aktivierungszustand der T-Zelle ⁷⁹. Für humane CD4⁺CD25⁻ T-Zellen gilt, dass sie nach TCR- und/oder TGF- β -vermittelter Stimulation FOXP3 exprimieren und regulatorisches Potential gewinnen ^{23, 24, 25}. Kasproicz et al. sind der Ansicht, dass FOXP3 nicht nur für regulatorische T-Zellen von Bedeutung ist, sondern auch für die Funktion normaler CD4⁺ T-Zellen, das heißt für die erfolgreiche Koordination einer Immunantwort ⁸⁰.

1.4 $\gamma\delta$ T-Zellen

Während der CD3-assoziierte T-Zellrezeptor der meisten T-Zellen aus einer α - und einer β -Kette besteht, exprimiert eine zahlenmäßig geringere T-Zellpopulation eine γ - und eine δ -Kette ⁸¹. $\gamma\delta$ T-Zellen kommen vor allem in Geweben vor, z.B. als $\gamma\delta$ IEL (intraepitheliale Lymphozyten) des Darms, und bilden im peripheren Blut mit einem Anteil von in der Regel < 5% der peripheren T-Zellen eine eher kleine T-Zellpopulation ^{82, 83}. Bestehen $\alpha\beta$ T-Zellen zum größten Teil aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, so sind $\gamma\delta$ T-Zellen überwiegend negativ für einen der beiden Co-Rezeptoren: < 5% exprimieren CD4 und ca. 20% CD8. Es werden 6 verschiedene V δ -

Kettensegmente (V δ 1, V δ 2, V δ 3, V δ 4, V δ 5, V δ 6) und 6 verschiedene V γ -Kettensegmente (V γ 2,3,4,5,8 und 9) ^{84, 85} unterschieden. Der periphere $\gamma\delta^+$ T-Zellpool besteht zu 80-90% aus V δ 2V γ 9 T-Zellen ^{86, 87}. Die restlichen 10-20% exprimieren vor allem V δ 1, das keine präferentielle Assoziation mit einer der γ -Ketten zeigt ⁸⁴. Im Gegensatz dazu exprimiert die Mehrzahl der gewebeständigen $\gamma\delta$ T-Zellen V δ 1 ⁸⁸. $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen ihre Zielstruktur nicht spezifisch: Der T-Zellrezeptor von $\gamma\delta$ T-Zellen dient als so genannter „pattern recognition receptor“ und erkennt ein Set von unprozessierten Antigenen mit konservierten molekularen Strukturen. Zu diesem Set gehören der niedermolekulare pathogenassoziierte Marker Isopentenylpyrophosphat ⁸⁹, Alkylamine ⁹⁰, Phosphoantigene ⁹¹ wie auch die zur Therapie osteolytischer Tumoren eingesetzten Bisphosphonate ⁹², Nukleotidderivate ⁹³ und autologe Peptide, die durch infizierte, transformierte oder anderweitig dysregulierte Zellen hochreguliert und exprimiert werden ⁹⁴. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren ebenfalls Toll-like Rezeptoren, die auch als so genannte „pattern recognition receptors“ dienen ⁹⁵. V δ 2V γ 9 T-Zellen und V δ 1 T-Zellen erkennen unterschiedliche Gruppen von Antigenen: V δ 2V γ 9 T-Zellen erkennen phosphathaltige Verbindungen (IPP ⁹⁶, HMB-PP ^{97, 98}, Bisphosphonate ^{91, 99} und Alkylamine ^{90, 100}, die sowohl bei einer Vielzahl von Mikroben und Pflanzen als auch in Säugetierzellen vorkommen. Es konnte gezeigt werden, dass V δ 2V γ 9 T-Zellen während einer Infektion durch Bakterien oder Protozoen wie z.B. Tuberkulose, Salmonellose, Leishmaniose, Toxoplasmose und Malaria ¹⁰¹ mehr als 50-fach expandieren. V δ 2V γ 9 T-Zellen werden ebenfalls durch Viren wie z.B. HSV ¹⁰² stimuliert. V δ 1 T-Zellen reagieren nicht auf IPP, Alkylamine oder Bisphosphonate ^{103, 104, 105}, sondern erkennen CD1-präsentierte Selbst-Lipide ¹⁰⁶. V δ 1 T-Zellen werden sowohl durch CMV ¹⁰⁷ und HIV ¹⁰⁸ stimuliert als auch durch die Erreger der Borreliose (*B.burgdorferi*) ¹⁰⁹ und der Amerikanischen kutanen Leishmaniose ¹¹⁰. Das V δ 1 TCR-Repertoire intestinaler V δ 1 T-Zellen unterscheidet sich deutlich vom TCR-Repertoire peripherer V δ 1 T-Zellen. Dies zeigt, dass es sich bei der kleinen

peripheren V δ 1 T-Zellpopulation nicht einfach um rezirkulierende intestinale V δ 1 T-Zellen, sondern um eine eigenständige Population handelt, die auf andere Antigene reagiert und möglicherweise auch andere Funktionen übernimmt ¹¹¹. Dies gilt genauso für die zahlenmäßig geringen gewebeständigen V δ 2 T-Zellen im Vergleich zu den peripheren V δ 2V γ 9 T-Zellen ¹¹². Sowohl V δ 1 als auch V δ 2 T-Zellen erkennen transformierte Zellen aufgrund deren Expression stressinduzierter Liganden (MICA/MICB), deren Verlust von MHC-Klasse-1 Molekülen ^{113, 114} oder deren Überproduktion von Metaboliten der Cholesterinbiosynthese ¹¹⁵. Anti-Tumor-Effekte von $\gamma\delta$ T-Zellen konnten sowohl für solide ^{116, 117} als auch für nicht-solide Tumoren gezeigt werden ^{118, 119, 120}. $\gamma\delta$ T-Zellen verfügen im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen über eine natürliche nicht MHC-restringierte Zytotoxizität ^{91, 116, 121}. Das Killen verdächtiger Target-Zellen erfolgt über Perforin/GranzymeB und/oder den Fas/FasL Signalweg ¹⁰⁶.

$\gamma\delta$ T-Zellen zeigen Charakteristika des erworbenen und des angeborenen Immunsystems. Einerseits sind $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage, Gedächtniszellen zu bilden, und exprimieren einen TCR, der durch Gen-rearrangement zustande kommt; andererseits ist die Diversität des T-Zellrezeptors eingeschränkt und ermöglicht, wie bereits beschrieben, die Erkennungen einer Gruppe unprozessierter Antigene mit konservierten molekularen Strukturen ¹²². $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunantwort zu fungieren ¹²³. Sie wirken sowohl auf Zellen des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems immunregulatorisch: Als Bestandteil der „first line defense“ akkumulieren $\gamma\delta$ T-Zellen früh an Orten viraler, bakterieller und fungaler Entzündung und üben ihre Effektorfunktion aus, bevor sie mit der Proliferation beginnen. So produzieren Th1 $\gamma\delta$ T-Zellen IFN- γ und TNF- α direkt nach Antigenkontakt und liefern damit einen entscheidenden Stimulus für Makrophagen in der frühen Phase einer Infektion ^{124, 125}. Ferrick et al. zeigten, dass $\gamma\delta$ T-Zellen zwischen Pathogenen differenzieren und durch die Produktion bestimmter Zytokine die T-Helferzellantwort entsprechend in Th1 bzw. Th2 Richtung

induzieren¹²⁶. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass eine Subpopulation von V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage ist, die Reifung von DC zu induzieren, und damit wesentlich am Gelingen der Immunabwehr gegen Mikroorganismen beteiligt ist^{127, 128, 129}. $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflussen/steuern auch die Antikörperproduktion durch B-Zellen, indem sie im Zusammenspiel mit IL-4 die Produktion von IgE favorisieren¹³⁰, während sie in der Abwesenheit von IL-4 die IgG-Produktion unterstützen¹³¹. Kaufmann et al. beschreiben, dass ex vivo und ohne Antigenexposition kultivierte $\alpha\beta$ CD4⁺ T-Zellen, in Abwesenheit von $\gamma\delta$ T-Zellen, IL-2 produzieren und CD8⁺ T-Zellen in zytolytische T-Zellen differenzieren, die sowohl allogene, syngene als auch autologe target-Zellen lysieren¹³². Weitere immunregulatorische Funktionen, auch im Sinne von Immunsuppression, wurden vor allem für organspezifische V δ 1 T-Zellpopulationen beschrieben. In der Dezidua sind V δ 1 T-Zellen maßgeblich an der Induktion und der Aufrechterhaltung der Frühschwangerschaft beteiligt⁷¹. V δ 1 T-Zellen schaffen in der Dezidua ein Zytokinmilieu, das die Immuntoleranz der Mutter gegenüber dem Fetus ermöglicht. Es ist noch unklar, ob diese direkt oder durch die Induktion regulatorischer T-Zellen erreicht wird. Jedoch konnte gezeigt werden, dass CD56⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen in der Dezidua tolerogene Zytokine sezernieren⁷². Im Darm gewährleisten intestinale intraepitheliale Lymphozyten ($\gamma\delta$ iIEL) durch die Produktion des epithelial wirkenden Mitogens KGF-1 die Integrität des Gewebes⁶⁸ und in der Lunge verhindern $\gamma\delta$ T-Zellen die für Asthma typische Hyperreaktivität, indem sie eine Immunantwort inhibieren⁶⁹.

1.5 Fragestellung

CD4⁺CD25⁺ αβ T-Zellen (nTreg) sind von entscheidender Bedeutung für den Erhalt der Immuntoleranz. Charakteristisch für nTreg ist die konstitutive Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und ihr Zytokinprofil. Ein weiteres Charakteristikum von nTreg ist die Expression des Gens FOXP3. FOXP3 wird ausschließlich von regulatorischen T-Zellen hoch exprimiert und ist für deren Entwicklung und Funktion von entscheidender Bedeutung.

Zahlreiche Studien konnten immunregulatorische Funktionen für γδ T-Zellen belegen. Dies scheint zumindest für distinkte γδ T-Zellsubpopulationen zu gelten.

Es konnte gezeigt werden, dass pan γδ T-Zellen den für regulatorische T-Zellen charakteristischen Marker FOXP3 schwach exprimieren. Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob dieses schwache Signal einer distinkten γδ T-Zellsubpopulation zugeordnet werden kann. Die FOXP3-Expression unterschiedlicher γδ T-Zellsubpopulationen sollte auf mRNA- (qRT-PCR) und Proteinebene (FACS-Analyse) analysiert werden. Dazu wurden folgende γδ T-Zellsubpopulationen mit unterschiedlichen Methoden (MACS-System, FACS-Technologie, Dybabeads) isoliert: Vδ1⁺, Vδ2⁺, γδ⁺CD56⁺, γδ⁺CD56⁻, Vδ1⁺CD56⁺, Vδ1⁺CD56⁻, Vδ2⁺CD56⁺, Vδ2⁺CD56⁻, Vδ1⁺CD8⁺, Vδ1⁺CD8⁻, Vδ2⁺CD8⁺, Vδ2⁺CD8⁻.

Die bisher am besten charakterisierten peripheren regulatorischen T-Zellen des αβ⁺ T-Zellpools (nTreg, T1 und Th3-Zellen) sind alle CD4⁺. Da CD4⁺ γδ T-Zellen mit <1% des peripheren γδ T-Zellpools sehr selten sind, können sie nicht mittels MACS- oder FACS-System angereichert werden. CD4⁺ γδ T-Zellen sollten daher mittels Kultivierung gewonnen und auf potentielle regulatorische Eigenschaften mittels qRT-PCR, Durchflusszytometrie und Proliferationsassay untersucht werden.

2 Material

2.1 Allgemeine Materialien

Sterile Werkbank Hera safe	Heräus
Brutschrank Hera cell	Heräus
Laborzentrifugen: <ul style="list-style-type: none"> • Rotanta 46 RSC • Mikro 22R • Tischzentrifuge • Kryofuge 	Hettich Hettich neoLab
Beheizbares Wasserbad	memmert
Eismaschine	Scotsman
Ultraschallentgaser Sonorex, Super RK 106	Bandelin
Vortexer relax top	Heidolph (neoLab)
Verstellbare Pipetten	Gilson
Pipettenspitzen (10, 100, 200, 1000 µl)	Greiner bio-one; Biozym
Pipettiergerät Pipetboy acu	Integra Biosciences
Sterile Plastikpipetten (1, 5, 10, 25 ml)	costar
Sterile Röhrchen mit Deckel (15 ml, 50 ml)	greiner bio-one
FACS-Röhrchen 5 ml	greiner bio-one
Zellkulturplatten (96well)	costar
Zellkulturflaschen	Falkon
Handschuhe Safeskin	Kimberly-Clark
Butterfly 21	Abbott
Kanüle Sterican®	Braun
Sterile Spritzen, 50 ml	Braun

2.2 Materialien für die Isolierung mononukleärer Zellen

Peripheres Vollblut	freiwillige gesunde Spender
Heparin: Liquemin®	Roche
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG
Phosphat buffered saline (D-PBS)	Gibco
Lysepuffer	Universitätsapotheke

2.3 Materialien für die Anreicherung von T-Zellen

2.3.1 MACS

Vario MACS (Magnet)	Miltenyi Biotec
Separationssäulen Typ MS ⁺ , LS ⁺	Miltenyi Biotec
Pufferlösung (entgast): 462 ml D-PBS 4 ml EDTA (250 mM) 34 ml BSA (7,5%)	Gibco Universitätsapotheke Invitrogen Corporation
Monoklonale Antikörper: Anti-V δ 1-FITC Anti-V δ 2-FITC Anti-CD56-PE Anti-CD8-PE MicroBeads bzw. MicroBead Kit: Anti-TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit Anti-FITC MicroBeads Anti-PE MicroBeads CD8+ T Cell Isolation Kit CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit	endogen endogen Becton Dickinson Becton Dickinson Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec
Eis	

2.3.2 FACS

FACS Aria / FACS Vantage	Becton Dickinson
Pufferlösung: FACSFlow	Becton Dickinson
Antikörper: Anti-V δ 1-FITC Anti-V δ 2-FITC Anti-CD56-PE Anti-CD8-APC	endogen endogen Becton Dickinson Becton Dickinson

2.3.3 Dynabeads

CD4 Positive Isolation Kit (beinhaltet: Dynabeads CD4, DETACHaBEADS)	Dynal Biotech
Dynabeads CD8	Dynal Biotech
Dynal Magnet	Dynal Biotech
Pufferlösungen: D-PBS / 2% FCS RPMI 1610 / 1% FCS D-PBS / 0,1% BSA / 2mM EDTA	Gibco, PAA Laboratories Biochrom, PAA Laboratories Gibco, Invitrogen Corporation, Universitätsapotheke

2.4 Materialien für die Zellzählung und Mikroskopie

Neubauer Zählkammer	Assistent
Deckglas	Menzel
Trypanblau (0,4%)	Sigma
Lichtmikroskop	Olympus, Zeiss

2.5 Materialien für die Zellkultivierung

2.5.1 Kultivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen

Medium: 440 ml RPMI 1640 50 ml Fetales Kälberserum (FCS) 5 ml L-Glutamin (200mM) 5 ml Penicillin (10000U) / Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom PAA Laboratories Biochrom Biochrom
IL-2	Proleukin
PHA	Murex HA16, France

2.5.2 Kultivierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen

Medium: 440 ml RPMI 1640 50 ml Fetales Kälberserum (FCS) 5 ml L-Glutamin (200mM) 5 ml Penicillin (10000U)/ Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom PAA Laboratories Biochrom Biochrom
IL-2	Proleukin
CD3/CD28 microbeads	Miltenyi Biotec

2.6 Materialien für die Durchflusszytometrie

FACSCalibur	Becton Dickinson
angeschlossene Hardware	Apple
Auswertungsprogramm CellQuest	Becton Dickinson
Pufferlösung: FACSFlow	Becton Dickinson

FACSClean	Becton Dickinson
FACSRinse	Becton Dickinson
Analyseröhrchen: 5ml, Rundboden	greiner bio-one
Fix & Perm	Caltag Laboratories
eBioscience FOXP3 Staining Buffer Set (beinhaltet: Solution A, Solution B, eBioscience Flow Cytometry Staining Buffer, Blocking Buffer Cat. No. 88-5778- 73)	eBioscience

Monoklonale Antikörper

Antikörper	Markierung	Hersteller
Isotypkontrolle		
IgG1	FITC	Dakocytomation
IgG1	PE	Dakocytomation
IgG1	PerCP	Becton Dickinson
IgG1	APC	Becton Dickinson
TCR $\gamma\delta$	FITC / PE	Becton Dickinson
TCR $\alpha\beta$	FITC / PE	Becton Dickinson / Immunotech
V δ 1	FITC	endogen
V δ 2	FITC	endogen
CD2	PE	Becton Dickinson
CD3	FITC / PerCP	Immunotools / Becton Dickinson
CD4	PerCP	Becton Dickinson
CD8	PerCP / APC	Becton Dickinson
CD25	APC	Becton Dickinson
CD62L	PE	BD Pharmingen

CCR7	PE	BD Pharmingen
CD103	FITC	Immunotools
CD122	FITC	Immunotools
CD45RB	PE	Immunotools
CD45RO	PE	Becton Dickinson
CD45RA	APC	BD Pharmingen
HLA-DR	PE	Becton Dickinson
CTLA-4 (CD152)	APC	BD Pharmingen
GITR	PE	R&D systems
Perforin	PE	Hölzel Diagnostika
GranzymeB	PE	Hölzel Diagnostika
IL-4	APC	Becton Dickinson
IL-10	APC	Becton Dickinson
TNF- α	APC	Becton Dickinson
IFN- γ	APC	Becton Dickinson
hFOXY (Cat. No. 12-5779)	PE	eBioscience
FOXP3 (ab10563)	unkonjugiert	abcam
goat-anti-rabbit	Biotin	Immunotech
Streptavidin	PE	eBioscience
goat-anti-rabbit	FITC	Immunotech

2.7 Materialien für den Proliferationsassay

1450 Microbeta Trilux	Wallac
angeschlossene Hardware	Compaq
Mikrobeta Windows Workstation	Wallac
Cell Harvester	Tomtec
Heat Sealer	Wallac
Microwelle	Siemens

Betaplate Scint	Wallac
Printed Filtermat A	Wallac
Sample Bag	Perkin Elmer
H3-Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech
Interleukin 2 (r-IL2)	Universitätsapotheke

2.8 Materialien für die RNA-Isolierung

Isolierungskit:	
RNeasy Mini	Qiagen
RNeasy Micro	Qiagen
β -Mercaptoethanol	Sigma
SIGMA Wasser	Sigma
Ethanol	Merck
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech
Küvette Suprasil [®]	Hellma

2.9 Materialien für die cDNA-Synthese

GeneAmp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems
ThermoStrip [™] Standard Strip Tubes and Cap Strips 0,2ml	PEQLAB
Superscript [™] III First-Strand Synthesis system for RT-PCR (beinhaltet: Oligo(dT) ₂₀ (50 μ M), 10x RT buffer, 25 mM MgCl ₂ , 0,1 M DTT, 10 mM dNTP mix, SuperScript [™] III RT (200 U/ μ l), RNaseOUT [™] (40 U/ μ l), DEPC-treated water)	invitrogen

2.10 Materialien für die qRT-PCR

ABI PRISM 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems
angeschlossene Hardware	Apple
Auswerteprogramm: Sequence Detection v1.7; ABI PRISM® 7700 Dissociation Curve Analysis Software	Applied Biosystems
iQ SYBR Green Supermix (beinhaltet: 100mM KCl, 40mM Tris-HCl, pH 8,4, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) jeweils 0,4mM, 50U/ml iTaq DNA polymerase, 6mM MgCl ₂ , SYBR Green I, 20mM Fluoreszein)	BIO-RAD
<u>Primer:</u> FOXP3: 5'-GAAACAGCACATTCCCAGAGTTC-3' 5'-ATGGCCCAGCGGATGAG-3' GAPDH: 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3' 5'-GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT-3'	Nach Steven F. Ziegler, Benaroya Research Institut, Seattle, Washington, USA
DEPC-treated-water	Invitrogen
FOXP3-Plasmid	Steven F. Ziegler, Benaroya Research Institut, Seattle, Washington, USA
LightCycler®-Primer Set Human Fox-P3 (beinhaltet: FOXP3 primer mix, amplification standard, standard stabilizer, control cDNA, PCR grade water)	Search LC

3 Methoden

3.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen mit Ficoll-Hypaque

3.1.1 Hintergrundinformation

Die Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque ermöglicht die Trennung peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs) von anderen Blutzellen: Thrombozyten und PBMCs haben eine geringere Dichte als Ficoll-Hypaque und sammeln sich auf der Ficollschicht an, während z.B. Erythrozyten und Granulozyten eine höhere Dichte haben und sich unter der Ficollschicht absetzen.

3.1.2 Durchführung

Verwendet wurde das Blut von freiwilligen gesunden Spendern.

- Heparinisiertes Vollblut wird mit der gleichen Menge PBS verdünnt, anschließend werden 33 ml dieser Mischung in einem 50 ml Röhrchen vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Hypaque aufgetragen.
- Zentrifugation der Röhrchen 15 min bei Raumtemperatur (RT) mit 800 g; ohne Bremse.
- Mit einer Pipette wird die Hälfte der obersten Schicht, die das Plasma und die Thrombozyten enthält, entfernt. Mit einer 10 ml Pipette wird die Schicht, die die PBMCs enthält und sich über dem Ficoll-Hypaque abgesetzt hat, vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt.
- Die geernteten PBMCs werden 10 min bei 500 g mit PBS gewaschen, anschließend wird der Überstand abgesaugt.
- Das Zellpellet wird in Lysepuffer resuspendiert. Die Lyse erfolgt für 20 min bei RT.

- Anschließend werden die Röhren 7 min bei 450 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt. Es folgen zwei Waschstritte bei 450 g für 7 min.
- Nach dem vorsichtigen Absaugen des Überstandes kann das Zellpellet in MACS-Puffer aufgenommen und mit der Isolierung der gewünschten Zellpopulation begonnen werden.

3.2 Isolierung von T-Zellsubpopulationen

3.2.1 Zellanreicherung mit MACS-System

3.2.1.1 Hintergrundinformation

„Magnetic-activated cell sorting“ (MACS) ermöglicht die Anreicherung bzw. Depletion bestimmter Zellen mit Hilfe magnetischer Mikropartikel, so genannten microbeads. Die anzureichernden bzw. zu depletierenden Zellen werden mit einem monoklonalen Antikörper, der an für die Zelle typische Epitope bindet, markiert. Diese Antikörper sind entweder direkt mit einem magnetischen Mikropartikel konjugiert oder werden von einem magnetisierten Sekundärantikörper erkannt. Lässt man das Zellgemisch nun über eine Trennsäule laufen, die mit einer Eisenmatrix gefüllt ist und in einem Magnetfeld steht, so bleiben die magnetisch markierten Zellen als Positivfraktion in der Säule hängen. Entfernt man danach die Säule aus dem Magnetfeld, lassen sich die markierten Zellen aus der Säule eluieren. Je nach Gesamtzellzahl und der erwarteten Menge an markierten Zellen stehen unterschiedlich große Trennsäulen zur Verfügung. Man unterscheidet Trennsäulen für die positive Isolierung (MS, LS, XS) von Depletionssäulen (LD).

Trennsäule	max. Anzahl an markierten Zellen	max. Gesamtzellzahl
MS	1×10^7	2×10^8
LS	1×10^8	2×10^9
XS	1×10^9	2×10^{10}
LD	1×10^8	5×10^8

3.2.1.2 Durchführung

Für die MACS-Anreicherung wurden verschiedene Kits der Firma Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland, verwendet. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Es ist generell darauf zu achten, dass schnell gearbeitet wird, die Zellen kalt gehalten und gekühlte Reagenzien verwendet werden. Die Mengenangaben beziehen sich auf 1×10^7 Zellen. Handelt es sich um weniger als 1×10^7 Zellen, gelten die angegebenen Mengen; handelt es sich hingegen um mehr als 1×10^7 Zellen, müssen die benötigten Mengen berechnet werden. Hierbei gilt: Doppelte Zellzahl benötigt die doppelte Menge. Der Schritt der magnetischen Separation verläuft bei allen Protokollen gleich und wird daher nach der Darstellung der einzelnen Färbeprotokolle einmal beispielhaft erklärt. Wichtig ist, entsprechend der Zellzahl die richtige Trennsäule zu wählen (s.o.). Diese sollte ca. 1 Stunde vor der Isolierung bei 4°C gekühlt werden.

Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Anti-TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit

- 1×10^7 Zellen werden in 40 μ l MACS-Puffer resuspendiert. 10 μ l pro 1×10^7 Zellen Anti-TCR $\gamma\delta$ Hapten-Antikörper werden hinzugefügt und gut vermischt. Die Zellen werden im Dunkeln bei 4°C 10 min inkubiert.
- Die Probe wird anschließend mit insgesamt 15 ml MACS-Puffer gewaschen (300 g, 10 min), der Überstand abgesaugt.

- Pro 1×10^7 Zellen werden nun 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l MACS Anti-Hapten MicroBeads-FITC hinzugefügt, die Probe gut vermischt und im Dunkeln bei 4°C für 15 min inkubiert.
- Die Zellen mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen waschen (300 g, 10 min).
- Bis zu 1×10^8 Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendieren und mit der magnetischen Separation fortfahren.

Isolierung von $V\delta 1^+$ bzw. $V\delta 2^+$ T-Zellen mit Anti-FITC MicroBeads

- 1×10^7 Zellen werden in 100 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Pro 1×10^7 Zellen werden 10 μ l Anti- $V\delta 1^-$ bzw. Anti- $V\delta 2^-$ -FITC hinzugefügt und gut vermischt. Die Zellen werden im Dunkeln bei 4°C 10 min inkubiert.
- Die Probe wird anschließend mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen gewaschen (300 g, 10 min).
- Den Überstand vollständig absaugen und Zellpellet in 90 μ l MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendieren.
- Nun 10 μ l Anti-FITC MicroBeads pro 1×10^7 Zellen hinzufügen, Probe gut schütteln und bei 4°C 15 min inkubieren.
- Zellen erneut mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen waschen (300 g, 10min).
- Den Überstand vollständig absaugen.
- Bis zu 1×10^8 Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendieren und mit der magnetischen Separation fortfahren.

Isolierung von $CD56^+$ bzw. $CD56^- \gamma\delta$ T-Zellen und $V\delta 1^+CD56^+/CD56^-$ bzw. $V\delta 2^+CD56^+/CD56^- \gamma\delta$ T-Zellen mit Anti-PE MicroBeads

In einem zweiten Schritt können nun die isolierten $\gamma\delta^+$ bzw. $V\delta 1^+$ bzw. $V\delta 2^+$ T-Zellen in eine $CD56^+$ und eine $CD56^-$ Zellfraktion unterteilt werden:

- 1×10^7 Zellen werden in 100 μl MACS-Puffer resuspendiert. 10 μl Anti-CD56⁺-PE werden hinzugefügt und gut vermischt. Die Zellen werden im Dunkeln bei 4°C 10 min inkubiert.
- Die Probe wird anschließend mit 1-2 ml MACS-Puffer gewaschen (300 g, 10 min).
- Den Überstand vollständig absaugen und Zellpellet in 80 μl MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendieren.
- Nun 20 μl Anti-PE MicroBeads pro 1×10^7 hinzufügen, Probe gut schütteln und bei 4°C 15 min inkubieren
- Zellen erneut mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen waschen (300 g, 10min).
- Den Überstand vollständig absaugen.
- Bis zu 1×10^8 Zellen in 500 μl MACS-Puffer resuspendieren und mit der magnetischen Separation fortfahren

Isolierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen mit CD4+CD25+ Regulatory T Cell Isolation Kit

Die Isolierung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen wird in zwei Schritten durchgeführt. In einem ersten Schritt werden CD4⁻ Zellen indirekt mit einem Cocktail Biotin-konjugierter Antikörper und Anti-Biotin MicroBeads magnetisch markiert und depletiert. Der Cocktail Biotin-konjugierter Antikörper beinhaltet Antikörper gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR $\gamma\delta$ und Glycophorin A. Im zweiten Schritt werden CD4⁺CD25⁺ T-Zellen direkt mit CD25 MicroBeads markiert und positiv isoliert.

Magnetische Markierung der CD4⁻ Zellen

- 1×10^7 Zellen werden in 90 μl MACS-Puffer resuspendiert. 10 μl Biotin-Antikörper-Cocktail werden hinzugefügt, gut vermischt und im Dunkeln bei 4°C 10 min inkubiert.

- Die Zellen werden anschließend mit 1-2 ml MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen gewaschen (300 g, 10 min, 4°C).
- Pro 1×10^7 Zellen werden nun 20 μ l Anti-Biotin MicroBeads hinzugefügt, gut vermischt und im Dunkeln bei 4°C 15 min inkubiert.
- Die Zellen nun mit dem 10-20fachen des Färbevolumens waschen (300 g, 10 min, 4°C), den Überstand vollständig absaugen.
- Bis zu 1×10^8 Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendieren und mit der magnetischen Isolierung fortfahren.

Depletion der CD4⁻ Zellen

Verwendet wird eine LD Trennsäule (max. Anzahl markierter Zellen: 1×10^8 , max. Gesamtzellzahl: 5×10^8)

Die Trennsäule in das Magnetfeld setzen.

1. Die Trennsäule mit 2 ml kalter MACS-Puffer spülen.
2. Nun die Zellsuspension auf die Trennsäule geben. Die nicht markierten Zellen, die die Trennsäule durchlaufen, auffangen. Die Trennsäule anschließend mit 2x1 ml MACS-Puffer waschen.
3. Bei den nicht markierten Zellen handelt es sich um die gewünschten CD4⁺ Zellen.

Magnetische Markierung der CD4⁺CD25⁺ T- Zellen

1. Die Zellen zentrifugieren (300 g, 10 min) und den Überstand absaugen.
2. Zellpellet in 90 μ l MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen resuspendieren.
3. 10 μ l CD25 MicroBeads pro 1×10^7 Zellen hinzufügen, gut vermischen und bei 4°C 15 min inkubieren.
4. Die Zellen nun mit dem 10-20fachen des Färbevolumens waschen (300 g, 10 min, 4°C), den Überstand vollständig absaugen.

5. Bis zu 1×10^8 Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendieren und mit der magnetischen Separation fortfahren.

Magnetische Separation

- Die Trennsäule in das Magnetfeld setzen.
- Die Trennsäule mit kaltem MACS-Puffer spülen.
 - MS: 500 μ l LS: 3 ml
- Nun die Zellsuspension auf die Trennsäule geben.
- Die nicht markierten Zellen, die die Trennsäule durchlaufen, auffangen. Die Trennsäule anschließend mit MACS-Puffer waschen.
 - MS: 3x500 μ l LS: 3x3 ml
- Um die markierten Zellen zu eluieren, die Trennsäule aus dem Magnetfeld entfernen und auf ein 15 ml Falcon-Röhrchen setzen.
- Die entsprechende Menge MACS-Puffer auf die Trennsäule geben und schnell mit dem mitgelieferten Stempel durchdrücken.
 - MS: 1 ml LS: 3 ml

3.2.2 Zellanreicherung mit FACS-Technologie

3.2.2.1 Hintergrundinformation

Die Durchflusszytometrie erlaubt die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Zellsuspension auf Einzelzellebene (s. 3.5). Dabei können durch den Einsatz geeigneter fluoreszenzmarkierter Antikörper unterschiedliche Zellpopulationen wie z.B. Lymphozytensubpopulationen unterschieden werden. "Fluorescence-activated cell sorting" mit dem FACS Aria von Becton Dickinson ermöglicht die Auftrennung und Anreicherung solcher Zellpopulationen in hoher Reinheit, wobei maximal vier unterschiedlich definierte Zellpopulationen gleichzeitig angereichert werden können. Dazu wird ein Wasserstrahl, in

dem sich die Zellen befinden, mit Hilfe der s.g. „Nozzle“ – ein Metallblättchen mit einer sehr kleinen Öffnung (35µm oder 70µm) – und durch hochfrequente Vibration in einen Strahl einzelner Tröpfchen umgewandelt, in dem sich im Idealfall maximal eine Zelle/Tropfen befindet bzw. sich zwischen Tropfen mit Zellen genügend leere Tropfen befinden. Tropfen, die eine Zelle der gewünschten Zellpopulation enthalten, werden mit einer bestimmten elektrischen Ladung versehen und in einem elektrischen Feld aus dem Tröpfchenstrahl abgelenkt und können dadurch separat aufgefangen werden.

3.2.2.2 Durchführung

Da $\gamma\delta$ T-Zellen mit einem Anteil von in der Regel <5% des peripheren T-Zellpools eine kleine Population bilden, wurden sie vor der FACS-Isolierung mit MACS-System auf 50-70% angereichert. Je nach der gewünschten Zielpopulation wurde hierfür der Anti-TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit oder Anti-V δ 1- bzw. Anti-V δ 2-FITC in Kombination mit Anti-FITC MicroBeads verwendet. Für die Isolierung wurden normale 5 ml Rundbodenröhrchen verwendet. Die Zellen wurden mit einer Konzentration von 1×10^7 /ml in FACS-Puffer aufgenommen. Nach einer ersten Messung mit dem FACS-Gerät wurden die gewünschten Subpopulationen anhand ihres Fluoreszenzsignals identifiziert und anschließend die gesamte Probe aufgetrennt und die gewünschten Zellpopulationen in 15ml Falconröhrchen aufgefangen. Die so erhaltenen hochreinen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen wurden anschließend mittels qRT-PCR bzgl. der Expression des Gens FOXP3 untersucht.

3.2.3 Zellanreicherung mit Dynabeads

3.2.3.1 Hintergrundinformation

Eine andere Methode der Zellisolierung ist die Zellanreicherung mit Dynabeads. Wie beim MACS-System verwendet man Antikörper, die mit

magnetischen Partikeln gekoppelt sind. Die magnetischen Partikel der Dynabeads sind mit einem Durchmesser von 4,5 μm wesentlich größer als die MACS-Beads mit einem Durchmesser von 150 nm, so dass für die Abtrennung der mit Dynabeads markierten Zellen ein schwächeres Magnetfeld ausreicht.

3.2.3.2 Durchführung

Die Zellanreicherung mit Dynabeads wurde mit dem Ziel der Gewinnung von CD4^+ $\gamma\delta$ T-Zellen und CD8^+ $\gamma\delta$ T-Zellen durchgeführt.

Isolierung von CD4^+ T-Zellen mit dem CD4 Positive Isolation Kit (Dyna)

Die Anzahl der CD4^+ $\gamma\delta$ T-Zellen ist für eine Anreicherung mit CD4^+ Dynabeads zu gering. Die Idee war daher, CD4^+ T-Zellen, d.h. $\text{TCR}\alpha\beta$ und $\text{TCR}\gamma\delta$ T-Zellen, anzureichern und CD4^+ $\gamma\delta$ T-Zellen im Rahmen einer Klonierung zu generieren.

Bei der Isolierung mit Dynabeads ist zu beachten, dass die Zellsuspension und der Puffer während der Isolierung kalt bleiben (2-8°C).

- Waschen der Dynabeads: die benötigte Menge Dynabeads (72 μl pro $0,5 \times 10^7$ PBMCs) in ein 1,5 ml Röhrchen geben. 1 ml D-PBS / 2% FCS hinzufügen und gut mischen, anschließend das Röhrchen für 30 sec in einen Dynal-Magneten stellen. Den Überstand abpipettieren und die gewaschenen Dynabeads mit D-PBS / 2% FCS entsprechend der Ausgangsmenge auffüllen. Das Röhrchen aus dem Magneten nehmen.
- $0,5 \times 10^7$ PBMCs in 1 ml D-PBS / 2 % FCS resuspendieren.
- Die entsprechende Menge an gewaschenen Dynabeads hinzufügen und bei 2-8°C 20 min unter ständigem sanften Schütteln inkubieren.
- Um die markierten Zellen zu isolieren, das Röhrchen für 2-3 min in den Dynal-Magneten stellen. Dies bewirkt, dass die markierten Zellen im Magnetfeld an der Röhrchenwand fest haften.
- Der Überstand kann nun vorsichtig abpipettiert werden.

- Die markierten Zellen 4-5 mal mit D-PBS / 2% FCS waschen.
- Die markierten Zellen in 100 µl RPMI / 1% FCS resuspendieren.
- Ablösung (Detachment) der Dynabeads: 10 µl DETACHaBEADS pro 100 µl Zellsuspension hinzufügen und bei RT unter ständigem sanften Schütteln 45-60 min inkubieren. Anschließend das Röhrchen für 2 min in den Dynal-Magneten stellen. Den Überstand (unmarkierte CD4⁺ T-Zellen!) in ein neues Röhrchen überführen. Die Dynabeads 2-3x mit 500 µl RPMI / 1% FCS waschen und den Überstand ebenfalls in das neue Röhrchen überführen. Zum Schluss die unmarkierten Zellen in 10 ml RPMI / 1% FCS waschen (300 g, 8min).

Isolierung von CD8⁺ T-Zellen mit CD8⁺ Dynabeads (invitrogen / Dynal)

Die Isolierung von CD8⁺ und CD8⁻ Zellen mit Dynabeads gegen CD8 wurde im Anschluss an die Vδ1- bzw. Vδ2-Isolierung mit MACS-System durchgeführt und stellt somit eine Alternative zur CD8-Isolierung mittels CD8+ T Cell Isolation Kit dar.

Bei der Isolierung mit Dynabeads ist zu beachten, dass die Zellsuspension und der Puffer während der Isolierung kalt bleiben (2-8°C).

- Waschen der Dynabeads: die benötigte Menge Dynabeads (25 µl pro 1x10⁷ PBMCs für die CD8 Anreicherung bzw. 50 µl für Die CD8 Depletion) in ein 1,5 ml Röhrchen geben. 1 ml D-PBS / 0,1% BSA / 2mM EDTA hinzufügen und gut mischen, anschließend das Röhrchen für 60 sec in einen Dynal-Magneten stellen. Den Überstand abpipettieren und die gewaschenen Dynabeads mit D-PBS / 0,1% BSA / 2mM EDTA entsprechend der Ausgangsmenge auffüllen. Das Röhrchen aus dem Magneten nehmen.
- 1x10⁷ PBMCs in 1 ml D-PBS / 0,1% BSA / 2mM EDTA resuspendieren.

- Die entsprechende Menge an gewaschenen Dynabeads hinzufügen und bei 2-8°C 20 min (CD8 Anreicherung) bzw. 30 min (CD8 Depletion) unter ständigem sanften Schütteln inkubieren.
- Um die markierten Zellen zu isolieren, das Röhrchen für 2-3 min in den Dynal-Magneten stellen. Dies bewirkt, dass die markierten Zellen im Magnetfeld an der Röhrchenwand fest haften.
- Der Überstand (CD8 depletiert) kann nun vorsichtig abpipettiert werden.
- Die markierten Zellen 3x mit 1ml D-PBS / 0,1% BSA / 2mM EDTA waschen. Jeweils für 60 sec in den Magneten stellen.
- Die CD8 angereicherte bzw. die CD8 depletierte Fraktion kann anschließend weiteren Analysen zugeführt werden.

3.3 Kultivierung von $\gamma\delta$ -Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro well pro 200 μ l Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin (2mmol/l)) in 96well-Kulturplatten kultiviert. Das Medium wurde mit IL-2 (je nach Bedarf zwischen 50-100U/ml) und Phytohämagglutinin (PHA; 0,25 μ g/ml) substituiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO₂. Das Zellwachstum wurde mikroskopisch regelmäßig kontrolliert, die Population bei einer zu hohen Dichte geteilt und das Medium bei Bedarf erneuert.

3.4 Expansion und Kultivierung von regulatorischen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

3.4.1 Hintergrundinformation

Die funktionelle Aktivierung CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen (nTreg) erfolgt durch Antigenstimulation. Die Antigenstimulation führt jedoch nicht zu einer Proliferation der nTreg, d.h. die Zellen bleiben anerg^{21, 78}. nTregs üben ihre suppressive Funktion somit in einem anergen Zustand aus. Der anerge/suppressive Funktionszustand scheint jedoch den Ruhezustand der nTreg widerzuspiegeln, da nTregs, die über ihren TCR und zusätzlich mit IL-2 oder CD28-Ab stimuliert wurden (aktive/nicht-suppressive nTreg) spontan in den anergen/suppressiven Ausgangszustand übergehen, sobald man ihnen IL-2 oder CD28-Ab entzieht^{21, 26}. Interessanterweise zeigen die expandierten nTregs auf Einzelzellniveau sogar eine stärkere suppressive Aktivität als zuvor²⁶. Dieses Merkmal unterscheidet nTregs von anderen anergen oder regulatorischen T-Zellen, da diese zwar suppressives Potential zeigen können, wenn sie in vitro ohne Co-Stimulation aktiviert werden, doch niemals spontan wieder in einen anergen/suppressiven Funktionszustand zurückkehren^{133, 134}. Die Fähigkeit von nTreg, aus dem aktiven/nicht-suppressiven Funktionszustand wieder in den anergen/suppressiven überzugehen, kann dazu genutzt werden, sie mittels TCR-Stimulation und high-dose IL-2 zu expandieren¹³⁵.

3.4.2 Durchführung

CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen wurden mit einer Dichte von 1x10⁴ Zellen pro well pro 200 µl Medium (RPMI 1640, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin (2mmol/l)) in 96well-Kulturplatten kultiviert. Das Medium wurde mit 400U IL-2/ml substituiert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre von 95% Luft und 5% CO₂. CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen wurden 2x pro Woche mit CD3/CD28 microbeads

(Verhältnis: 4 (microbeads): 1 (nTreg)) stimuliert.

3.5 Durchflusszytometrie

3.5.1 Hintergrundinformation

Die Durchflusszytometrie erlaubt die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Zelleigenschaften in einer Zellsuspension auf Einzelzellebene. Die Zellsuspension wird dazu von dem Messgerät mit Überdruck in eine Messküvette eingeführt und die Zellen werden stark beschleunigt. Dadurch trennen sich Aggregate auf und die Zellen können sequentiell durch einen Laserstrahl geführt werden. Dabei werden Streuungseffekte der Zellen und Fluoreszenzen der verwendeten fluoreszierenden Antikörper gemessen.

Zellgröße und Zellgranularität nehmen Einfluss auf die Lichtstreuung: Das Vorwärtstreulicht (forward scatter, FSC) ist ein Maß für die Zellgröße, während das dazu im rechten Winkel gestreute Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC) von der intrazellulären Granularität abhängt. In der Darstellung FSC gegen SSC ergibt sich eine für PBMCs charakteristische Aufteilung der Zellen, in der Lymphozyten von Monozyten und Granulozyten unterschieden werden können. Ebenso ist eine Unterscheidung vitaler Zellen von toten Zellen möglich.

Zur immunologischen Phänotypisierung werden Zellen mit monoklonalen Antikörpern markiert, an die fluoreszierende Farbstoffe gekoppelt sind. Bei dem verwendeten FACS-Gerät handelte es sich um einen FACS Calibur, der Firma Becton Dickinson. Es verfügt über zwei Laser unterschiedlicher Wellenlänge und ermöglicht die Detektion von vier verschiedenen Farbstoffen. Die in dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe sind: Fluorescein-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein

(PerCP) sowie Allophycocyanin (APC). Diese Farbstoffe unterscheiden sich in ihren Emissionsmaxima bei einer bestimmten Wellenlänge und ermöglichen so eine farbstoffspezifische Messung. Verwendet man unterschiedlich markierte Antikörper, können so mehrere phänotypische Charakteristika auf einer Zelle gleichzeitig nachgewiesen werden.

3.5.2 Durchführung

Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung

- 60µl FACS-Puffer werden in einem Röhrchen vorgelegt.
- Die gewünschte Anzahl der zu analysierenden Zellen wird zu dem FACS-Puffer pipettiert.
- Je nach Antikörper und Zellzahl wird die entsprechende Menge des fluoreszierenden Antikörpers in der gewünschten Kombination dazu pipettiert.
- Die Probe wird geschüttelt (Vortexer) und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert.
- Die Probe wird mit 1 ml FACS-Puffer aufgefüllt, zentrifugiert (660 g, 2 min, RT) und dekantiert.
- Die gefärbten Zellen werden resuspendiert und im Dunkeln im Kühlschrank bis zur Messung aufbewahrt

Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung mit FIX & PERM (Caltag Laboratories) für den Nachweis von IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , Perforin, GranzymeB, CTLA-4 und FOXP3 (abcam; eBioscience)

- 1×10^6 zu analysierende Zellen werden in einem Röhrchen in FACS-Puffer vorgelegt.
- Es folgt die Zugabe der gegen Oberflächenantigene gerichteten fluoreszierenden Antikörper in entsprechender Menge (s. 1a: Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung).

- Die Probe wird geschüttelt (Vortexer) und 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert.
- 100 µl des Reagenz A (Fixierung) werden hinzugefügt und die Probe für 15 min bei RT inkubiert.
- Die Probe wird mit 3 ml D-PBS gewaschen (300 g, 10 min); anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet resuspendiert.
- 100 µl des Reagenz B (Permeabilisierung der Zellmembran) sowie die empfohlene Menge des fluoreszierenden intrazellulären Antikörpers werden hinzugefügt. Die Probe wird geschüttelt (Vortexer) und 30 min inkubiert.
- Die Probe wird gewaschen (3 ml D-PBS, 300 g, 10 min); anschließend wird das Zellpellet für die weitere Analyse in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert.
- Messung und Auswertung der Immunfluoreszenz

Intrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung für den Nachweis von FOXP3 mit eBioscience FOXP3 Staining Buffer Set

- Ca. 1×10^7 Zellen werden in einem Röhrchen vorgelegt. 1 ml der Lösung A wird hinzu pipettiert. Dabei kräftig schütteln (Vortexer). Anschließend bei RT im Dunkeln 20 min inkubieren.
- Die Proben über Nacht bei -20°C inkubieren.
- Am nächsten Tag Zellen bei 22°C im Wasserbad auftauen, bei 400 g 5 min zentrifugieren, Überstand verwerfen.
- Das Zellpellet resuspendieren und 1 ml kalte Lösung B hinzufügen. Im Dunkeln bei 4°C 20 min inkubieren.
- Um die Lösung B vollständig zu entfernen, werden die Proben anschließend bei 400 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

- Die Zellen zweimal mit jeweils 5 ml eBioscience Flow Cytometry Buffer waschen (400 g für 5 min). Überstand verwerfen.
- Die Zellen in 1 ml Flow Cytometry Staining Buffer resuspendieren.
- Für die Färbung jeweils 1×10^6 Zellen (ca. 100 μ l) in frische Röhrchen überführen.
- In jedes Röhrchen 20 μ l Blocking Buffer pipettieren und im Dunkeln bei RT 15 min inkubieren.
- Es folgt die Zugabe der gegen Oberflächenantigene und FOXP3 gerichteten fluoreszierenden Antikörper in entsprechender Menge (s. 1a: Extrazelluläre Immunfluoreszenzfärbung). Folgende Mengen an hFoxy wurden für jeweils 1×10^6 Zellen eingesetzt: 0,003 μ g (2 μ l), 0,007 μ g (5 μ l), 0,015 μ g (10 μ l) und 0,03 μ g (20 μ l). Die Proben im Dunkeln bei RT 30 min inkubieren.
- Proben zweimalig mit 1 ml Flow Cytometry Staining Buffer waschen (400 g, 5 min).
- Zuletzt wird das Zellpellet in 0,2 ml Flow Cytometry Staining Buffer resuspendiert.
- Messung und Auswertung der Immunfluoreszenz.

Die Messung erfolgt mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur, die Auswertung mit der zugehörigen Software CellQuest. Ausgehend von Routineeinstellungen werden die genauen Messeinstellungen anhand der Kontrolle durchgeführt:

Die Verstärkerspannungen für FSC und SSC werden so eingestellt, dass in der Darstellung FSC gegen SSC (FSC: x-Achse, SSC: y-Achse) die übliche Zellverteilung zustande kommt. Um die Zielpopulation, die Lymphozyten, kann in dieser Darstellung ein so genanntes Gate gesetzt werden. Dies erlaubt die Darstellung nur dieser Zellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz in einem weiteren Diagramm.

Anhand der Kontrollfärbung, dem so genannten Isotyp, werden nun die Verstärkerspannungen der verschiedenen Messkanäle so eingestellt, dass

sich die Zellen im jeweiligen Kanal zwischen 10^0 und 10^1 der Fluoreszenzskala befinden.

Es folgt die Messung der Proben. Zur Auswertung wird ein Gate auf die Lymphozytenpopulation gesetzt. Diese Zellen werden in einem weiteren Diagramm hinsichtlich ihrer Fluoreszenz dargestellt, wobei immer zwei Kanäle gegeneinander dargestellt werden, z.B. FITC gegen PE. Zur statistischen Auswertung wird dieses Diagramm in Quadranten eingeteilt, die es erlauben, die Zellen bezüglich der gefärbten Oberflächenmarker als einfach positiv, doppelt positiv oder doppelt negativ zu definieren. Die absoluten und relativen Häufigkeiten dieser verschiedenen Zellen werden von der Software automatisch berechnet.

3.6 RNA-Isolierung

Für die RNA Isolierung wurden der RNeasy[®] Mini (max. 1×10^7 Zellen) sowie der RNeasy[®] Micro Kit (max. 1×10^5 Zellen) der Firma Qiagen verwendet.

Die Pipettenspitzen müssen RNase-frei sein.

Die bei Verwendung des RNeasy[®] Micro Kit nötigen Änderungen bzw. Ergänzungen sind in Klammern (*) dargestellt.

- Um die Zellen zu lysieren, werden sie in einen RLT-Puffer / β -Mercaptoethanolgemisch mit dem Verhältnis 9:1 aufgenommen:

RLT / β -Mercaptoethanol	Zellzahl
350 μ l	bis zu 5×10^6
600 μ l	5×10^6 bis 1×10^7

- Um die Zellen zu homogenisieren, wird das Zelllysat mind. 5 mal durch eine 20-G (\varnothing 0,9mm) Nadel (1 ml Spritze) aufgezogen.
- Anschließend wird das gleiche Volumen 70%igen Ethanol hinzugegeben und die Probe gut durchpipettiert.

- Bis zu 700 µl des Zelllysats-Ethanolgemisches werden nun mittig (!) auf eine RNeasy Säule aufgetragen. Die Säule sitzt in einem 2 ml Sammeltube.
- Die Säule wird 15 sec bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert, der Durchlauf verworfen.
- (*Nun werden 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben; diese wird dann 15 sec bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert.)
- (*10 µl DNase I werden vorsichtig mit 70 µl RDD-Puffer vermischt
ACHTUNG: DNase I denaturiert leicht bei zu starker physikalischer Manipulation.)
- (*Den DNase I Mix (80 µl) direkt auf die Gelfmembran der Säule pipettieren und diese bei RT 15 min inkubieren)
- Jetzt werden 700 µl (*350 µl) RW1-Puffer auf die Säule pipettiert, und diese wird erneut 15 sec bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert. Danach wird die Säule auf ein neues 2 ml Sammeltube gesetzt.
- 500 µl RPE-Puffer werden auf die Säule pipettiert, die Säule wird wie oben zentrifugiert.
- (*500 µl 80%iges Ethanol werden auf die Säule gegeben. Anschließend wird die Säule 2 min bei ≥ 10.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wird verworfen und die Säule auf ein neues 2 ml Sammeltube gesetzt.)
- (*Die Säule wird mit offenem Deckel 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, das Sammeltube anschließend verworfen.)
- (*Zuletzt wird die Säule auf ein 1,5 ml Sammeltube gesetzt und die RNA mit 14 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Zentrifugation 1 min bei maximaler Geschwindigkeit. Der RNA-Gehalt kann nun im Photometer bestimmt werden)

Folgende Schritte gelten nur noch für den RNeasy® Mini Kit:

- 500 µl RPE-Puffer werden auf die Säule pipettiert; die Säule wird 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um die Gelmembran zu trocknen.
- Schließlich wird die Säule in ein 1,5 ml Sammeltube gesetzt. 50 µl RNase-freies Wasser werden direkt auf die RNeasy Membran aufgetragen. Die Säule wird 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert.
- Der RNA-Gehalt wird mit dem Photometer bestimmt.

3.7 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR der Firma invitrogen verwendet.

Vor dem Gebrauch werden die Reagenzien und die Probe kurz gevortext und abzentrifugiert.

- Folgende Komponenten werden in einem 0,5 ml tube gemischt:

Komponenten	Menge
1-2 µg RNA	auf 8 µl eindampfen
Primer: 50 µM oligo(dT)20	1 µl
10 mM dNTP mix	1 µl

- Die Probe wird anschließend 5 min bei 65°C inkubiert, dann 1 min auf Eis deponiert.
- cDNA Synthese-Mix:

Komponenten	Menge
10x RT Puffer	2 µl
25 mM MgCl ₂	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
RNase OUT™ (40U/µl)	1 µl

SuperScript™ III RT (200U/μl)	1 μl
-------------------------------	------

- Nun werden 10 μl des cDNA Synthese-Mixes zu dem RNA/Primer-Mix hinzugefügt, vorsichtig vermischt, kurz: abzentrifugiert und inkubiert:

Zeit	Temperatur
50 min	50°C
5 min	85°C
2 min	Eis

- Die Proben werden kurz abzentrifugiert. 1 μl RNase H wird hinzugefügt, die Probe 20 min bei 37°C inkubiert.
- cDNA kann bei -20°C aufbewahrt oder direkt in der qRT-PCR eingesetzt werden.

3.8 qRT-PCR

3.8.1 Hintergrundinformation

Mit der quantitativen real-time PCR können spezifische Nukleinsäuren sensitiv amplifiziert und durch Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff quantifiziert werden. Im Gegensatz zur konventionellen PCR ermöglicht die quantitative real-time PCR zum einen die Detektion viel geringerer Mengen an Nukleinsäure und zum anderen, wie der Name bereits sagt, eine Quantifizierung der PCR-Produkte.

3.8.2 Durchführung

Für die qRT-PCR wurde iQ SYBR Green Supermix der Firma Roche verwendet.

Die qRT-PCR wurde am ABI PRISM® 7700 durchgeführt und mit der zugehörigen Software (Sequence Detection v1.7 and ABI PRISM® 7700 Dissociation Curve Analysis Software, Applied Biosystems) ausgewertet.

- Mastermix:

Komponenten	Menge
iQ SYBR Green Supermix	7,5 µl
forward primer	0,9 µl
reverse primer	0,9 µl
DEPC Wasser	0,7 µl

- 5µl cDNA werden in PCR-tubes vorgelegt. 10 µl Mastermix werden zu der vorgelegten cDNA pipettiert. Die Proben werden kurz zentrifugiert.
- Die Amplifikation der Probe wurde wie folgt durchgeführt:

Stage	Temperatur	Zeit
1	94°C	2 min
2 (40 Zyklen)	94°C	30 sec
	59°C	30 sec
	72°C	30 sec
3	95°C	15 sec
4	60°C	20 sec
5	95°C	15 sec

Als Standard diente ein FOXP3 Plasmid, das uns freundlicherweise von Steven F. Ziegler, Benaroya Research Institut, Seattle, Washington, USA, zur Verfügung gestellt wurde. Die Kopienzahl pro Verdünnungsstufe des Plasmids wurde mit dem Amplifizierungsstandard des LightCycler® - Primer Set Human Fox-P3 von SearchLC, Heidelberg, ermittelt: dreifache Messung und Verwendung des Mittelwertes.

Titrationsskurve Plasmid FOXP3:

Verdünnungsstufe Plasmid	Kopienzahl
1:1x10 ⁶	ca. 358000
1:1x10 ⁷	ca. 35800
1:1x10 ⁸	ca. 3580
1:1x10 ⁹	ca. 358

Um durch Zellvitalität bedingte Schwankungen der FOXP3-Expression und/oder Schwankungen durch Pipettierfehler während der RNA-Isolierung und cDNA-Synthese zu korrigieren, wurde die FOXP3-Expression in Relation zu der entsprechenden GAPDH-Expression gesetzt: Kopienzahl FOXP3 / Kopienzahl GAPDH.

Anstatt der GAPDH-Expression kann auch die Expression von β -Aktin bestimmt und in Relation zur FOXP3-Expression gesetzt werden.

Andere Autoren verwendeten HPRT (Hypoxanthine-Guanidin-Phosphoribosyltransferase)⁴² oder Dad I⁴⁵ als endogenes Referenzgen.

3.9 Generierung von CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen

3.9.1 Durchführung

CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen sind mit durchschnittlich 0,17% \pm 0,32% (n=8) des peripheren $\gamma\delta$ T-Zellpools der untersuchten Spender sehr selten. Um genügend vitale CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen für weitere Analysen zu erhalten, wurden angereicherte CD4⁺ T-Zellen (MACS[®], CD4+ Multisort Kit), die zu 97,3% aus $\alpha\beta$ T-Zellen und zu 2,7% aus $\gamma\delta$ T-Zellen bestanden, kultiviert. Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1000 -10000 Zellen pro 96well-Platte ausplattiert. Die einzelnen Kultivierungsschritte können der Abbildung 3.1 entnommen werden. Bei den feeder-Zellen handelte es sich um 5fach gepoolte, allogene, 30 Gy bestrahlte PBMCs freiwilliger Spender. LG2-Zellen, EBV-transformierte B-Zellen, wurden uns freundlicherweise von Herrn Pierre van der Bruggen, Ludwig Institute for

Cancer Research, Brüssel, Belgien, zur Verfügung gestellt. LG2-Zellen wurden vor der Zugabe zur Zellkultur mit 120 Gy bestrahlt. Pro well wurden 4×10^4 feeder-Zellen und 1×10^4 LG2-Zellen hinzugegeben. Die sich entwickelnden Klone wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

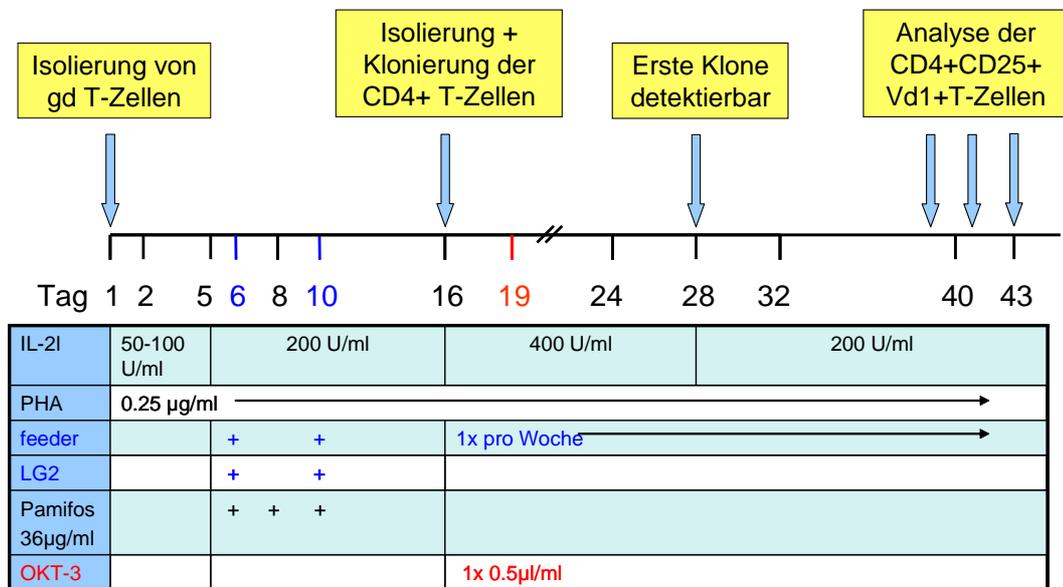


Abb. 3.1: Generierung von $CD4^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen

3.10 Suppressionsassay: Mixed lymphocytes culture (MLC)

3.10.1 Hintergrundinformation

Regulatorische T-Zellen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, die Proliferation von kokultivierten allostimulierten CD4⁺ T-Helferzellen zu supprimieren. Dies kann mit der Durchführung eines Suppressionsassays gezeigt werden. Die Stärke der Suppression kann durch die Menge an eingebautem radioaktivem Tritium-Thymidin bestimmt werden. Mit dem Suppressionsassay sollte das suppressive Potential der isolierten CD4⁺CD25⁺Vδ1⁺ T-Zellen untersucht werden.

3.10.2 Durchführung

CD4⁺CD25⁺Vδ1⁺ T-Zellen, CD4⁺CD25⁻TCRαβ⁺ T-Zellen (T-Helfer) und CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) des gleichen Spenders wurden isoliert und mit einer Zellzahl von jeweils 5x10⁴ Zellen in einer 96well Platte in folgender Kombination eingesetzt:

	Proliferation allo-stimulierter T-Helfer allein	Suppression der allo-stimulierten T-Helfer durch CD4 ⁺ CD25 ⁺ Vδ1 ⁺ T-Zellen?	Suppression der allo-stimulierten T-Helfer durch Treg?	Einfluss von CD4 ⁺ CD25 ⁺ Vδ1 ⁺ T-Zellen auf die suppressive Wirkung von Treg?
CD4 ⁺ CD25 ⁻ TCRαβ ⁺	+	+	+	+
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Vδ1 ⁺		+		+
Treg			+	+
alloPBMCs	+	+	+	+

Die Zellen wurden in Triplets pipettiert.

Der Suppressionassay erstreckte sich über einen Zeitraum von 3d (Inkubation im Brutschrank bei 37°C). Als Medium wurde RPMI-Medium verwendet. IL-2 wurde einmalig in einer Konzentration von 30U/ml hinzugefügt. Für die TCR-Stimulation wurden jeweils 5×10^4 allogene, bestrahlte (30Gy), 5x gepoolte PBMC hinzugegeben. Am Abend des 3.d wurde in jedes well 1µCi Tritium-Thymidin pipettiert. Nach weiteren 24h wurden die Platten bei -20°C eingefroren. Zur Messung wurden die Platten aufgetaut und die Zellkerne mit dem Cell Harvester auf Nitrocellulose-Filter übertragen und so von nicht eingebautem Tritium-Thymidin befreit. Nach dem Trocknen der Filter in der Mikrowelle wurden diese in Plastikbeutel nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit eingeschweißt und im β -Counter gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Pan $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren schwach FOXP3

Die Expression des Gens FOXP3 ist das Charakteristikum von natürlichen regulatorischen T-Zellen (nTreg) und für deren Entstehung und Funktion von entscheidender Bedeutung^{42, 45}. Auch $\gamma\delta$ T-Zellen verfügen über immunregulatorisches Potential, welches in zahlreichen Studien gezeigt werden konnte^{66, 132, 71, 72}. Ziel der Untersuchung war es, $\gamma\delta$ T-Zellen zu isolieren und bezüglich ihrer FOXP3-Expression zu untersuchen.

In der qRT-PCR konnte gezeigt werden, dass pan $\gamma\delta$ T-Zellen den Transkriptionsfaktor FOXP3 exprimieren, wenn auch 100-200x schwächer als nTreg. Die FOXP3-Expression, gesetzt in Relation zur entsprechenden GAPDH-Expression, betrug im Durchschnitt für nTreg $0,12446 \pm 0,053257$ (n=2) und für pan $\gamma\delta$ T-Zellen $0,00077 \pm 0,00061$ (n=2). LG2 Zellen, EBV-transformierte B-Zellen, exprimieren kein FOXP3 und dienten als Negativkontrolle (Abb. 4.1).

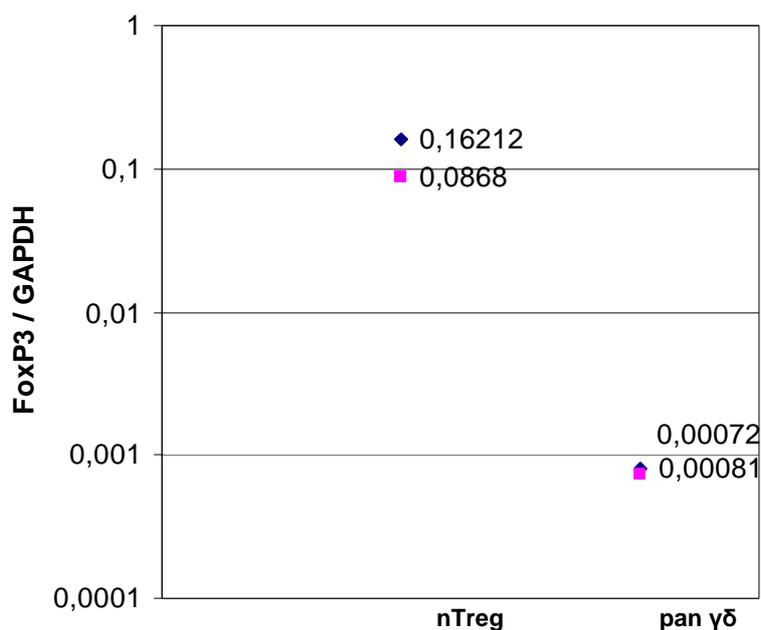


Abb. 4.1: FOXP3-Expression von nTreg und pan $\gamma\delta$ T-Zellen (n=2)

4.2 Multiple $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen exprimieren FOXP3

Die Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen sollte zeigen, ob das schwache FOXP3-Signal der analysierten pan $\gamma\delta$ T-Zellen einer distinkten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation zugeordnet werden kann, analog den nTreg im TCR $\alpha\beta$ T-Zellpool.

4.2.1 Isolierung und Analyse von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen, die sich in einem Merkmal unterscheiden

Da periphere $\gamma\delta$ T-Zellen zu 80-90% das Kettensegment V δ 2^{86, 87} und zu 10-20% V δ 1⁸⁴ exprimieren, wurden Subpopulationen isoliert, die sich bezüglich einem Merkmal, der δ -Kettenexpression, unterscheiden. Sowohl für die Isolierung der V δ 1+ bzw. V δ 2+ $\gamma\delta$ T-Zellen als auch der weiter unten im Text aufgeführten Subpopulationen wurden PBMCs aus dem Vollblut freiwilliger Spender über einen Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten isoliert. Der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an der Gesamtzahl der peripheren Lymphozyten wurde anschließend durchflusszytometrisch ermittelt. Er ist individuell sehr unterschiedlich und betrug bei den 6 untersuchten Spendern 0,4% bis maximal 9,12% (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an der Gesamtzahl der peripheren Lymphozyten von 6 Spendern und Expression von CD4⁺ und CD8⁺

Spender	$\gamma\delta$ (%)	CD4	CD8	DN
1	4,49	0,21	25,46	74,25
	4,42	0	24	76
2	1,02	0,95	40,62	58,31
3	9,12	0,1	28,75	71,14
	5,08	0	15,29	84,50
	7,31	0,09	n.b.	n.b.
	8,13	0	34,19	65,51
4	2,14	0	28,24	70,59
5	0,4	n.b.	n.b.	n.b.
6	3,15	n.b.	n.b.	n.b.

Für die Isolierung der Subpopulationen wurden nur Spender genommen, die einen $\gamma\delta$ T-Zellanteil von mind. 2% der Lymphozyten aufwiesen. Für die folgenden Isolierungen standen 3 verschiedene Spender zur Verfügung (s. Tab. 4.1: fett gedruckt). Mit MACS-System bzw. FACS-Technologie wurden die isolierten PBMCs in Subpopulationen sortiert.

Insgesamt wurden jeweils 4 $V\delta 1^+$ bzw. $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen isoliert. Die Reinheit der isolierten $V\delta 1^+$ bzw. der $V\delta 2^+$ Subpopulationen betrug $\geq 96\%$. Die FOXP3-Expression wurde mittels qRT-PCR analysiert. Als Negativkontrolle dienten LG2-Zellen, EBV-transformierte B-Zellen. Sowohl $V\delta 1^+$ als auch $V\delta 2^+$ T-Zellen exprimierten FOXP3. In 3/4 Versuchen exprimierte die $V\delta 1^+$ Subpopulation mehr FOXP3 als die $V\delta 2^+$ T-Zellen. Die FOXP3-Expression zeigte große intra- und interindividuelle Schwankungen. Die FOXP3-Expression, gesetzt in Relation zur entsprechenden GAPDH-Expression, betrug im Durchschnitt für $V\delta 1^+$ T-Zellen $0,00275 \pm 0,00238$ (n=4) und für $V\delta 2^+$ T-Zellen $0,00171 \pm 0,00149$ (n=4) (Abb. 4.2).

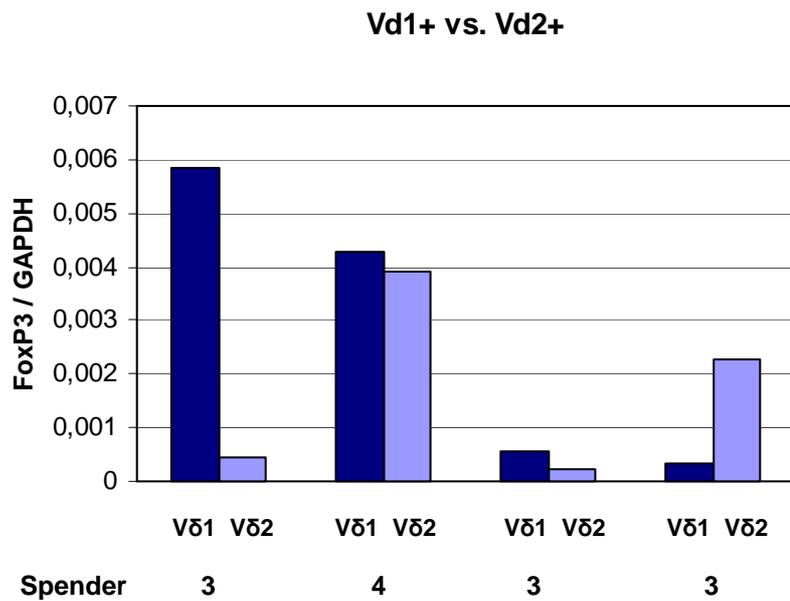


Abb. 4.2: FOXP3-Expression von Vδ1⁺ und Vδ2⁺ T-Zellen.

Die starken Schwankungen der FOXP3-Expression der Vδ1⁺ bzw. Vδ2⁺ γδ T-Zellen ließen uns weitere Oberflächenmarker in die Analyse von γδ T-Zellsubpopulationen einbeziehen, um sie in ihrer FOXP3-Expression von anderen γδ T-Zellen zu diskriminieren. Da gezeigt werden konnte, dass CD56⁺ deziduale γδ T-Zellen gegenüber ihrem CD56⁻ Counterpart deutlich geringere Mengen an tolerogenen Zytokinen freisetzen⁷², wurde CD56 als diskriminierender Marker für die FOXP3 Expression herangezogen. Mit MACS-System bzw. FACS-Technologie wurden CD56⁺ und CD56⁻ γδ T-Zellen isoliert. Die Analyse ergab, dass die CD56⁻ γδ T-Zellsubpopulation in 5/7 Versuchen FOXP3 stärker exprimiert als die CD56⁺ γδ Subpopulation (**Abb. 4.3**). Auch hier zeigten sich große Schwankungen bzgl. der Stärke der Genexpression. Der Mittelwert der FOXP3-Expression betrug für CD56⁻ γδ T-Zellen $0,00404 \pm 0,00496$ (n=7) und für CD56⁺ γδ T-Zellen $0,00169 \pm 0,00168$ (n=7). Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant (Student t Test: p=0,2397) (**Abb. 4.4**).

CD56⁻ vs. CD56⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen

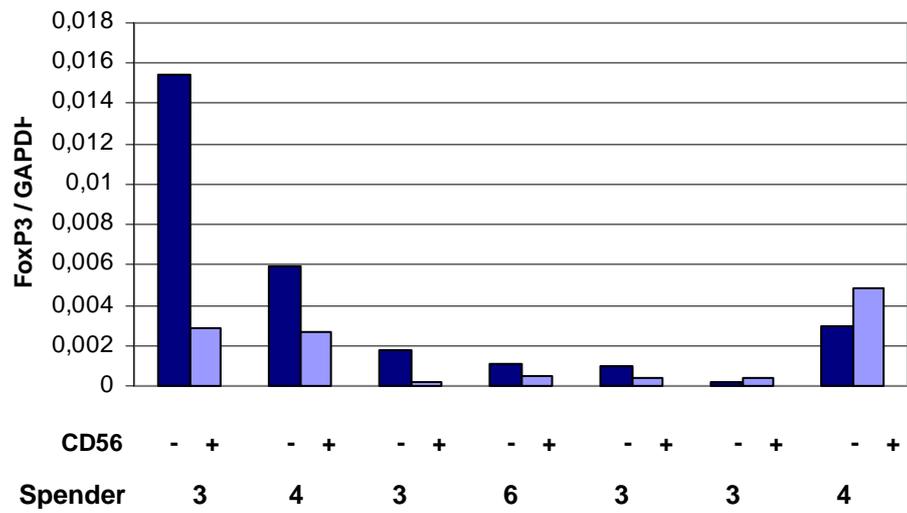


Abb. 4.3: Vergleich der FOXP3-Expression von CD56⁻ und CD56⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen.

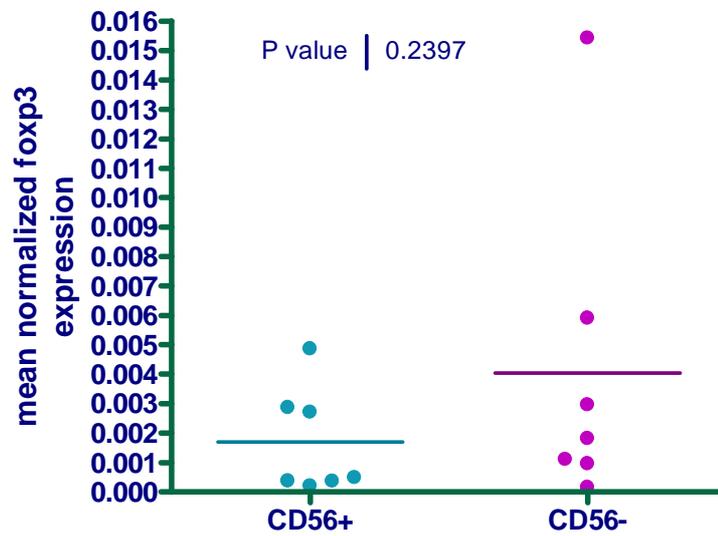


Abb. 4.4: Vergleich der FOXP3-Expression von CD56⁺ und CD56⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen (Student t-Test)

4.2.2 Isolierung und Analyse von Subpopulationen, die sich in zwei Merkmalen unterscheiden

Die Versuche von 4.2.1 zeigten keine maximale FOXP3-Expression für eine der isolierten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen. In der Annahme, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eine sehr heterogene Zellpopulation bilden, wurden $\gamma\delta$ Subpopulationen angereichert, die sich nicht nur durch ein Merkmal, die Expression der δ -Kette, sondern durch ein zweites Merkmal, die Expression von CD56, CD8 oder CD4, unterschieden. Während die Einfachisolierung von $V\delta 1^+$ und $V\delta 2^+$ bzw. $CD56^+$ und $CD56^-$ $\gamma\delta$ T-Zellen mit MACS-System unproblematisch war und hohe Reinheiten erreicht wurden (s.o.), erwies sich die Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellen nach zwei Kriterien mit MACS-System als schwierig. Vor einem weiteren Isolierungsschritt mussten die Zellen für 3-4 Tage in Kultur genommen werden, damit sie den magnetisch markierten ersten Antikörper verlieren. Die Kultivierung der Zellen mit der für die Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen üblichen Konzentration von IL-2 (200U/ml Medium) erwies sich dabei als ungeeignet: Bei der erneuten Isolierung sank die Reinheit bis auf 50%. Die Zellen wurden verworfen. Die Kultivierung der isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen vor einem weiteren Isolierungsschritt mit low-dose IL-2 (20U/ml Medium) für 3-4 Tage ermöglichte hingegen die Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen mit einer Reinheit von $\geq 97\%$.

Eine weitere Isolierungsmethode von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen ist die Anreicherung mit FACS-Technologie. Wie für die Anreicherung mit MACS-System dienten als Ausgangszellen für die FACS-Anreicherung PBMCs von 3 freiwilligen Spendern, die aus Vollblut über Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation gewonnen wurden. Da die $\gamma\delta$ T-Zellen der untersuchten Spender mit einem Anteil von durchschnittlich $4,53\% \pm 2,96$ (n=10) des peripheren T-Zellpools eine sehr kleine Population bilden, wurden sie vor der FACS-Isolierung mittels MACS-System mit Anti- $V\delta 1$ - bzw. Anti- $V\delta 2$ -FITC und Anti-FITC MicroBeads nach $V\delta 1$ bzw. $V\delta 2$ angereichert. Nach der Isolierung mit FACS-Technologie kam aufgrund

der geringen Zellzahlen der isolierten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen ein weiterer Zellverlust durch eine anschließende durchflusszytometrische Analyse nicht in Frage. Deshalb wurden die Zellpopulationen stringent gegatet und mit hoher Reinheit gewonnen.

Mit MACS-System und FACS-Anreicherung konnten insgesamt folgende Subpopulationen isoliert werden: $V\delta 1^+CD56^+$, $V\delta 1^+CD56^-$, $V\delta 2^+CD56^+$, $V\delta 2^+CD56^-$, $V\delta 1^+CD8^+$, $V\delta 1^+CD8^-$, $V\delta 2^+CD8^+$ und $V\delta 2^+CD8^-$.

$V\delta 1^+CD8^+$, $V\delta 1^+CD8^-$ und $V\delta 2^+CD8^-$ wurden auch mit CD8 Dynabeads der Firma Invitrogen / Dynal gewonnen. Eine Anreicherung von $V\delta 1^+CD4^+$ bzw. $V\delta 2^+CD4^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen war aufgrund des geringen Anteils der $CD4^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen mit durchschnittlich $0,17\% \pm 0,32\%$ ($n=8$) der $\gamma\delta$ T-Zellen der untersuchten Spender weder mit MACS-System noch mit der FACS- oder Dynal-Isolierung möglich. Erst die Kultivierung von angereicherten $CD4^+$ T-Zellen, auf die später genauer eingegangen wird, ermöglichte die Gewinnung einer $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellpopulation.

Die Analyse der FOXP3-Expression der isolierten Subpopulationen mittels qRT-PCR zeigte, dass jede der isolierten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen FOXP3 exprimiert, wenn auch zum Teil nur sehr gering. $V\delta 1^+CD56^-$ T-Zellen zeigten in 2/2 Versuchen eine stärkere FOXP3-Expression als die $V\delta 1^+CD56^+$ T-Zellfraktion (**Abb. 4.5**). Der Mittelwert der FOXP3-Expression der $V\delta 1^+CD56^-$ T-Zellen betrug $0,0107 \pm 0,0067$ ($n=2$) und der $V\delta 1^+CD56^+$ T-Zellen $0,0028 \pm 0,0001$ ($n=2$). Die mittlere FOXP3-Expression der $V\delta 2^+CD56^-$ T-Zellen betrug $0,0013 \pm 0,0012$ ($n=4$) und der $V\delta 2^+CD56^+$ T-Zellen $0,0015 \pm 0,0022$ ($n=4$). In 2/4 Versuchen exprimierten die $V\delta 2^+CD56^-$ T-Zellen stärker FOXP3 als die $CD56^+$ Fraktion, in den beiden anderen Versuchen zeigte sich ein gegenteiliges Ergebnis (**Abb. 4.6**). In der $V\delta 2^+$ T-Zellfraktion waren die Unterschiede bzgl. der FOXP3-Expression zwischen $CD56^-$ und $CD56^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen jedoch äußerst gering.

Vd1 CD56+ vs. Vd1 CD56-

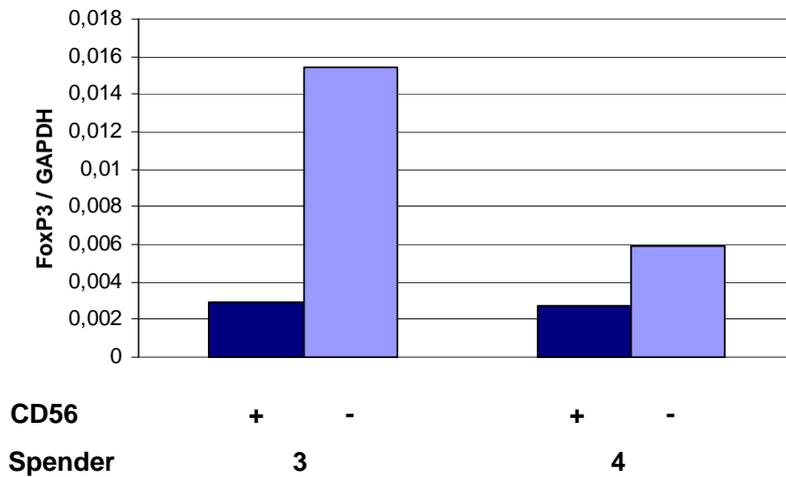


Abb. 4.5: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ1 CD56+ vs. Vδ1 CD56- γδ T-Zellen.

Vd2 CD56+ vs. Vd2 CD56-

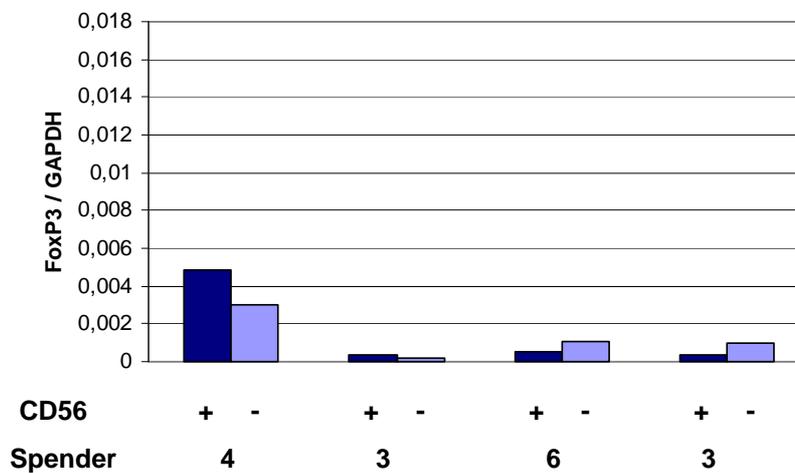


Abb. 4.6: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ2+CD56- vs. Vδ2+CD56+ γδ T-Zellen.

Vδ1+ CD8+ bzw. CD8- und Vδ2+ CD8+ bzw. CD8- T-Zellen exprimierten FOXP3 geringer als die anderen analysierten γδ T-Zellsubpopulationen. Der Mittelwert der FOXP3-Expression betrug für Vδ1+CD8+ T-Zellen

0,00004 ±0,00002 (n=2) und für Vδ1⁺CD8⁻ T-Zellen 0,00005 ±0,00026 (n=2). Vδ2⁺CD8⁺ T-Zellen zeigten eine mittlere FOXP3-Expression von 0,00009 ±0,00003 (n=2) und Vδ2⁺CD8⁻ T-Zellen von 0,00009 (n=1).

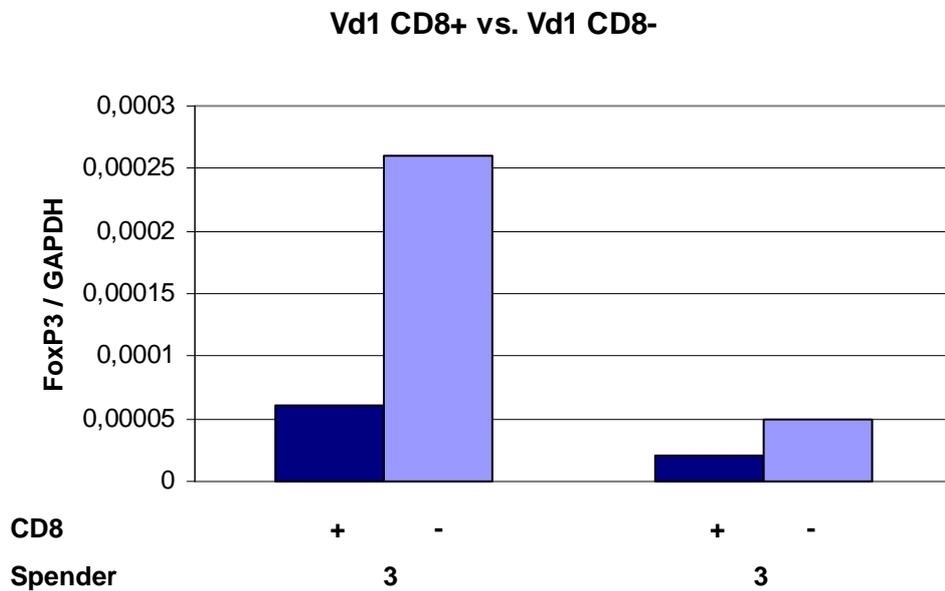


Abb. 4.7: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ1⁺CD8⁺ vs. Vδ1⁺CD8⁻ γδ T-Zellen. Daten von 2 unabhängigen Versuchen und 1 Spender. Reinheit der γδ Subpopulationen im 2. Versuch nur 50%.

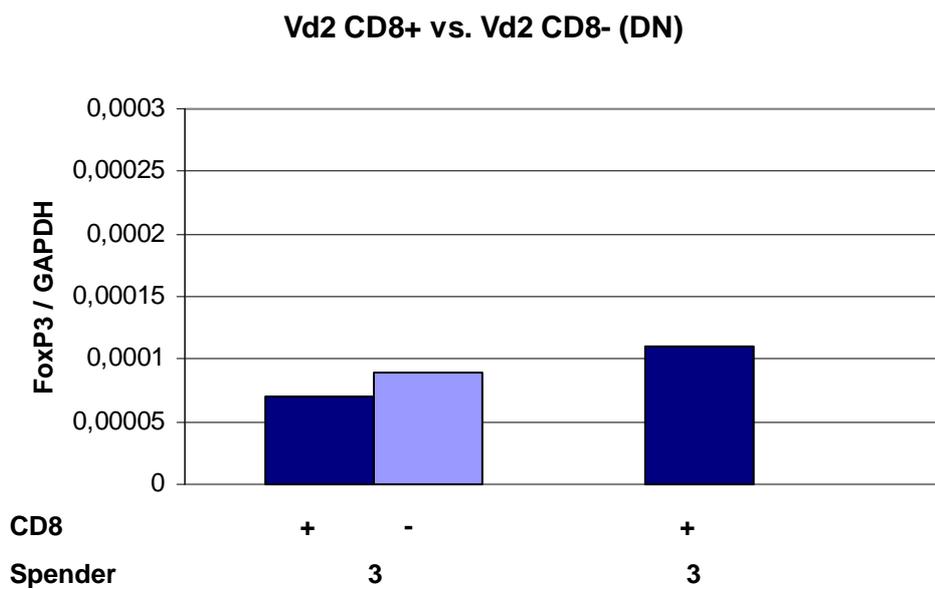
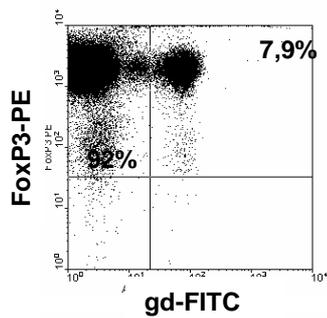


Abb. 4.8: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ2 CD8⁺ vs. Vδ2 CD8⁻ γδ T-Zellen. Daten von 2 unabhängigen Versuchen und 1 Spender.

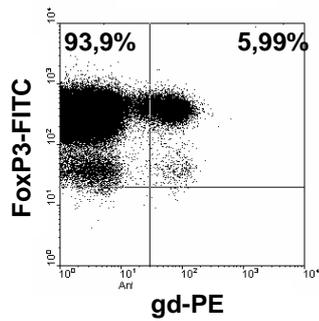
4.3 FOXP3-Expression von $\gamma\delta$ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Die mittels qRT-PCR gewonnenen Daten zur FOXP3-Expression sollten durchflusszytometrisch validiert werden. Zum Nachweis der FOXP3-Expression auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie standen zwei verschiedene Antikörper zur Verfügung. Zum einen ein unkonjugierter polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes FOXP3 der Firma abcam (FoxP3 antibody ab10563), zum anderen ein PE-konjugierter Mausantikörper der Firma eBioscience (hFoxy, Cat. No. 12-5779).

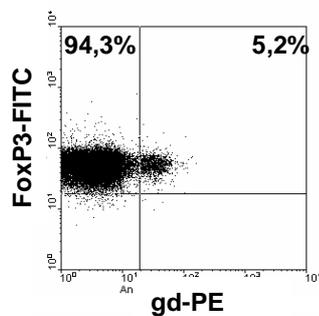
Die intrazelluläre Färbung mit dem Antikörper von abcam wurde nach dem Protokoll FIX & PERM (Caltag Laboratories) durchgeführt. Als sekundärer bzw. tertiärer Antikörper wurde in einem ersten Ansatz Biotin-goat-anti-rabbit-IgG und Streptavidin-PE verwendet, in zwei weiteren Ansätzen FITC-goat-anti-rabbit-IgG. **Alle drei Ansätze zeigten eine dosisabhängige und somit unspezifische Bindung des anti-FOXP3 Antikörpers (Abb. 4.9 A-D).** Auch der Gebrauch von D-PBS + 5% BSA anstatt D-PBS als Waschpuffer mit dem Ziel der maximalen Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen führte nicht zu einer Erhöhung der Spezifität (Abb. 4.9 E).



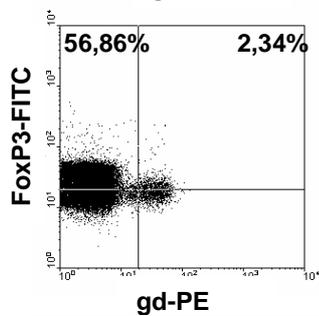
- A. 10 μ l FoxP3 antibody (abcam)
10 μ l Biotin-goat-anti-rabbit-IgG
5 μ l Streptavidin-PE



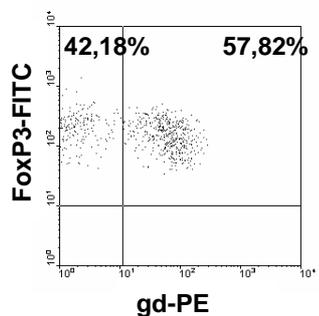
- B. 10 μ l FoxP3 antibody (abcam)
5 μ l FITC-goat-anti-rabbit-IgG



- C. 1 μ l FoxP3 antibody (abcam)
1 μ l FITC-goat-anti-rabbit-IgG



- D. 0,1 μ l FoxP3 antibody (abcam)
1 μ l FITC-goat-anti-rabbit-IgG



- E. 1 μ l FoxP3 (abcam)
1 μ l FITC-goat-anti-rabbit-IgG
anstatt D-PBS: D-PBS / 5% BSA

Abb. 4.9: Anfärbarkeit von PBMCs mit anti-FoxP3 Antikörper der Firma abcam (FoxP3 antibody ab10563) : dosisabhängige und somit unspezifische Bindung des anti-FoxP3 Antikörpers

Die intrazelluläre Färbung mit dem Antikörper hFoxy der Firma eBioscience wurde nach dem Protokoll Intracellular Staining Protocol for hFoxy on Human PBMC und dem empfohlenen FOXP3 Staining Buffer Set der Firma eBioscience (Cat. No. 88-5778-73) durchgeführt. In unseren Versuchen (n=5) zeigten 4,55% \pm 1,68 der intrazellulär gefärbten PBMCs im Lymphozytengate eine Anfärbarkeit mit hFoxy (Abb. 4.10).

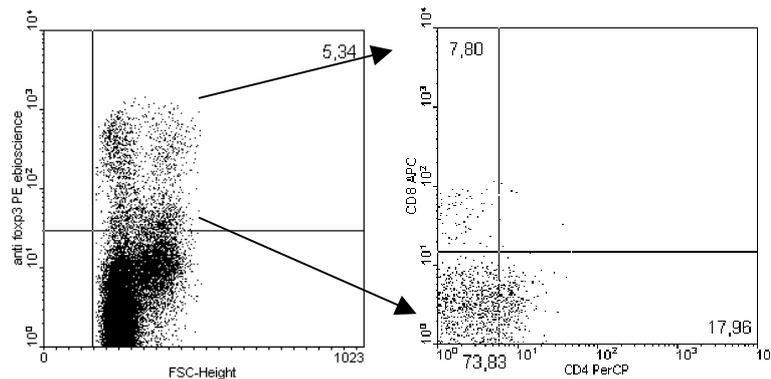


Abb. 4.10: Anfärbarkeit von PBMCs mit hFoxy der Firma eBioscience (Cat. No. 12-5779) und Expression von CD4 bzw. CD8. Daten repräsentativ für 4 weitere Versuche

Überraschenderweise bestanden in den FACS Analysen die für hFoxy positiven PBMCs in unseren Versuchen (n=5) vor allem aus CD4⁻/CD8⁻ (DN) (69,93% \pm 2,40) und wenigen CD8⁺ (8,67% \pm 4,43) und CD4⁺ (20,44% \pm 3,52) Zellen.

Ein interessantes Phänomen ergab sich bei dem Versuch, die FOXP3-Expression $\gamma\delta$ bzw. $\alpha\beta$ T-Zellen unter Verwendung des jeweils spezifischen monoklonalen TCR-Antikörpers zuzuordnen. In Kombination mit hFoxy konnten weder TCR $\alpha\beta$ (Abb. 4.11) bzw. TCR $\gamma\delta$ (Abb. 4.12), noch der Oberflächenmarker CD2 (Abb. 4.13) nachgewiesen werden.

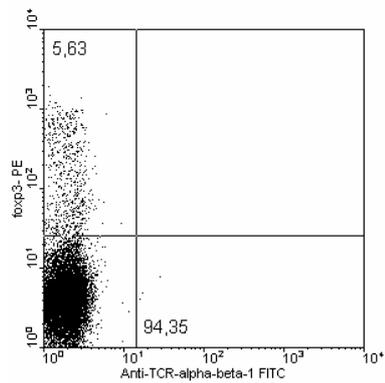


Abb. 4.11: Anfärbarkeit von TCR $\alpha\beta$ T-Zellen mit hFoxy

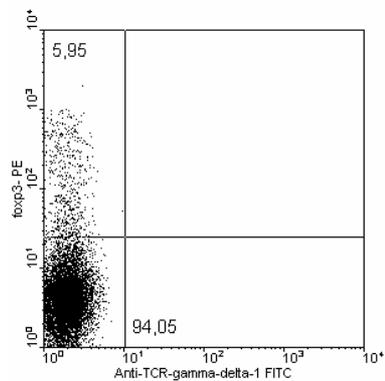


Abb. 4.12: Anfärbarkeit von TCR $\gamma\delta$ T-Zellen mit hFoxy

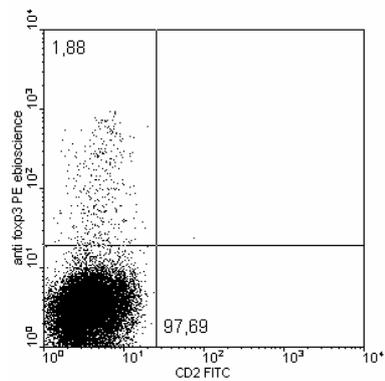


Abb. 4.13: Anfärbarkeit von CD2⁺ Zellen mit hFoxy

Allein die Kombination des T-Zellmarkers CD3 mit hFoxy ermöglichte eine Darstellung der hFoxy⁺ T-Zellen (Abb. 4.14). Der Großteil der CD3⁺ hFoxy⁺ T-Zellen exprimierte jedoch ebenfalls weder CD4, noch CD8.

Wie in Abb. 4.14 deutlich wird, zeigten auch CD3⁻ Zellen eine Anfärbarkeit mit hFoxy.

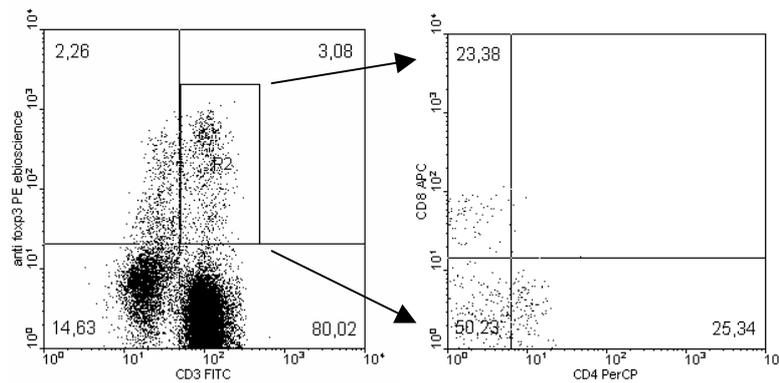


Abb. 4.14: Anfärbarkeit von CD3⁺ und CD3⁻ Zellen mit hFoxy der Firma eBioscience (Cat. No. 12-5779) und Expression von CD4 bzw. CD8 durch CD3⁺hFoxy⁺ Zellen

Um eine gleichzeitige Darstellung des TCR und der FOXP3-Expression zu erreichen, wurde das Protokoll zur intrazellulären Färbung mehrfach modifiziert:

1. Erhöhung der Menge des gegen $\gamma\delta$ - bzw. $\alpha\beta$ -TCR gerichteten Antikörpers von 2 μ l pro Ansatz auf 5 μ l und 10 μ l pro 1×10^6 Zellen
→ auch keine Anfärbung des TCR
2. hFoxy + Protokoll von FIX & PERM (CALTAQ Laboratories): pro 1×10^6 Zellen 2 μ l hFoxy und jeweils 2 μ l extrazelluläre Antikörper → gute Anfärbarkeit der Oberflächenmoleküle, keine Anfärbung von FOXP3.
3. hFoxy + Protokoll von FIX & PERM (CALTAQ Laboratories): pro 1×10^6 Zellen 5 μ l bzw. 10 μ l hFoxy und jeweils 2 μ l extrazelluläre Antikörper, anstatt D-PBS-Puffer D-PBS + 5% BSA → Auch die Erhöhung der Menge des Antikörpers hFoxy auf 5 μ l bzw. 10 μ l führt zu keinem Ergebnis.

Der unkonjugierte polyklonale Kaninchenantikörper gegen humanes FOXP3 der Firma abcam (FOXP3 antibody ab10563) und der PE-konjugierte Mausantikörper der Firma eBioscience (hFoxy, Cat. No. 12-

5779) sind somit für eine Validierung der in der qRT-PCR gewonnenen Daten mittels Durchflusszytometrie definitiv **nicht** geeignet.

4.4 Phänotypische und funktionelle Charakterisierung CD4⁺ Vδ1⁺ T-Zellen

Ziel der Charakterisierung der durch Kultivierung gewonnenen CD4⁺ Vδ1⁺ γδ T-Zellpopulation war die vergleichende Gegenüberstellung mit nTreg, Tr1 und Th3-Zellen und konventionellen CD4⁺CD25⁻ T-Zellen in Hinblick auf suppressive Eigenschaften.

4.4.1 Gewinnung von CD4⁺ Vδ1⁺ T-Zelle

CD4⁺ γδ T-Zellen sind mit durchschnittlich 0,17% ±0,32% (n=8) des peripheren γδ T-Zellpools der untersuchten Spender sehr selten. Um genügend vitale CD4⁺ γδ T-Zellen für weitere Analysen zu erhalten, wurden zunächst pan γδ T-Zellen mittels MACS (Anti-TCR γδ MicroBead Kit) isoliert und nach 16 Tagen in Kultur nach CD4⁺ angereichert (MACS, CD4+ Multisort Kit). Die so isolierten CD4⁺ T-Zellen bestanden zu 97,3% aus αβ T-Zellen und zu 2,7% aus γδ T-Zellen. Diese Vorgehensweise ermöglichte nun die Gewinnung von CD4⁺ γδ T-Zellen. Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1000 -10000 Zellen pro 96well-Platte ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte unter IL-2, Pamifos, PHA und der einmaligen Zugabe von OKT-3 in Co-Kultur mit LG2- und feeder-Zellen (s. Methoden). Insgesamt wurden 80 wells durchflusszytometrisch auf das Wachstum einer CD4⁺ γδ T-Zellpopulation untersucht. In nur einem der 80 analysierten wells entwickelte sich eine CD4⁺ γδ T-Zellpopulation, die zahlenmäßig groß genug für weitere Analysen war. Diese γδ T-Zellpopulation entwickelte sich in Co-Kultur mit CD4⁺ αβ T-Zellen (3,5% γδ T-Zellen, 94,3% αβ T-Zellen) und stammte von einer Kulturplatte mit anfänglich 1000 Zellen pro 96well-Platte. Die CD4⁺ γδ T-Zellpopulation zeigte eine hohe proliferative Aktivität und konnte bereits 12 Tage nach

Beginn der Kultivierung detektiert und hinsichtlich potentieller regulatorischer Eigenschaften durchflusszytometrisch analysiert werden. Die Analyse erstreckte sich über einen Zeitraum von weiteren 12 Tagen. Anschließend wurden die CD4⁺ γδ T-Zellen mit Dynal isoliert (Reinheit: 90,67%) und der qRT-PCR auf FOXP3 und dem Proliferationsassay zugeführt. Eine Vδ2⁺CD4⁺ γδ T-Zellpopulation konnte leider nicht in ausreichender Zellzahl gewonnen werden.

4.4.2 TCR-Repertoire: pauciklonale CD4⁺ Vδ1⁺ T-Zellen

Die Analyse des TCR-Repertoire ergab, dass die generierten CD4⁺ γδ T-Zellpopulation zu 98,8% Vδ1, zu 0,04% Vδ2, zu 1,11% Vδ4 und zu 0,02% Vδ5. exprimierten. 79,5% exprimierten Vγ9, 9,5% Vγ2, 4,2% Vγ3, 0,07% Vγ4, 0,31% Vγ5, 6,5% Vγ8, (**Abb. 4.15**). Bei den generierten CD4⁺ γδ T-Zellen handelte es sich damit um eine pauciklonale γδ T-Zellpopulation mit präferentieller Expression der Kettensegmente Vδ1 und Vγ9.

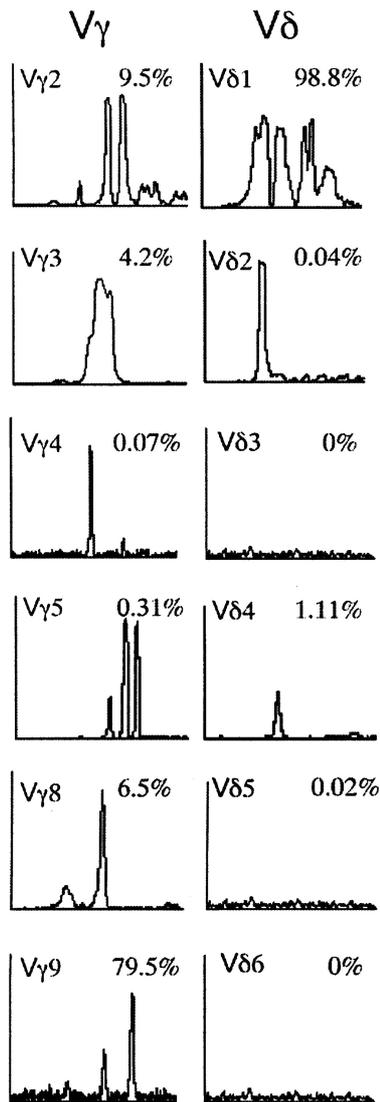
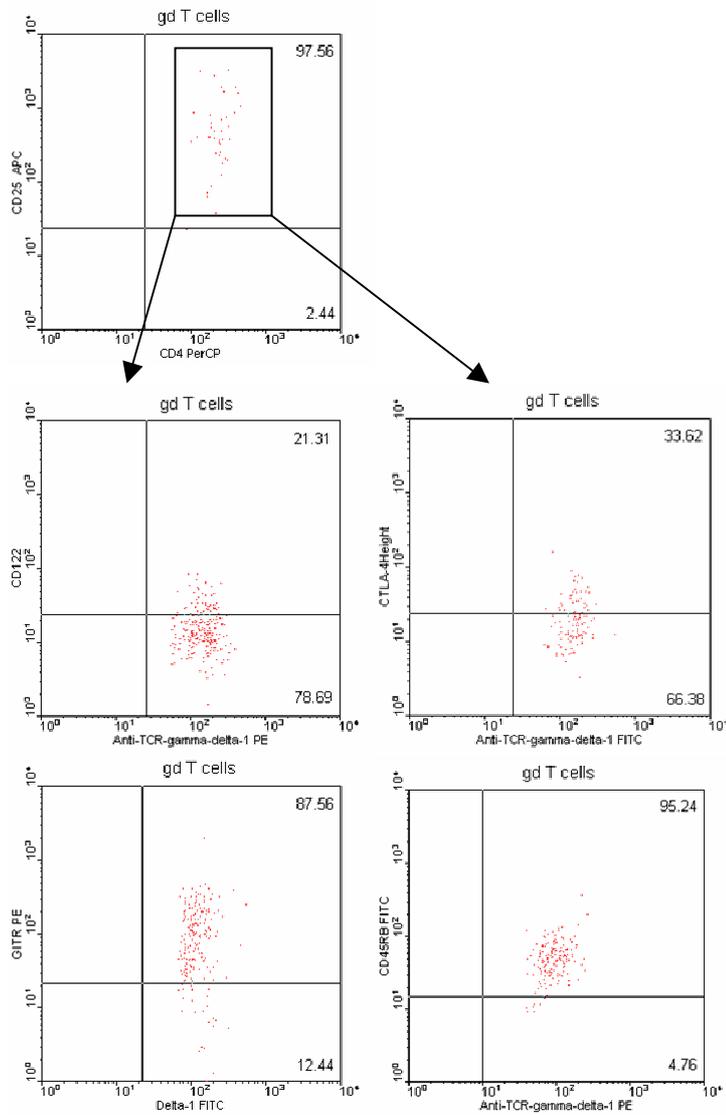


Abb. 4.15: TCR $\gamma\delta$ Spectratype-Analyse der generierten $CD4^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen

4.4.3 Expression von Markern und Zytokinen charakteristisch für regulatorische T-Zellen: $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen unterscheiden sich von nTreg, Tr1 und Th3

$V\delta 1^+$ $CD4^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen (kurz: $V\delta 1^{4+25+}$) exprimierten zu 97,56% CD25 (IL-2-Rezeptor- α -Kette). $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimierten zu 95,24% $CD45Rb^{\text{niedrig}}$, zu 85,07% HLA-DR und zu 87,56% GITR. Alle $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen waren antigenerfahren ($CD45RO^+$), 1,25% exprimierten zusätzlich $CD45RA^+$. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation exprimierten schwach intrazellulär CTLA-4 (33,62%) und CD122 (21,31%) (IL-2- u. IL-15-

Rezeptor- β -Kette). $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen waren zu 99,37% negativ für CD103 (αE -Integrin) und zu 95,83% negativ für CD127 (IL-7-Rezeptor- α -Kette) (Abb. 4.16).



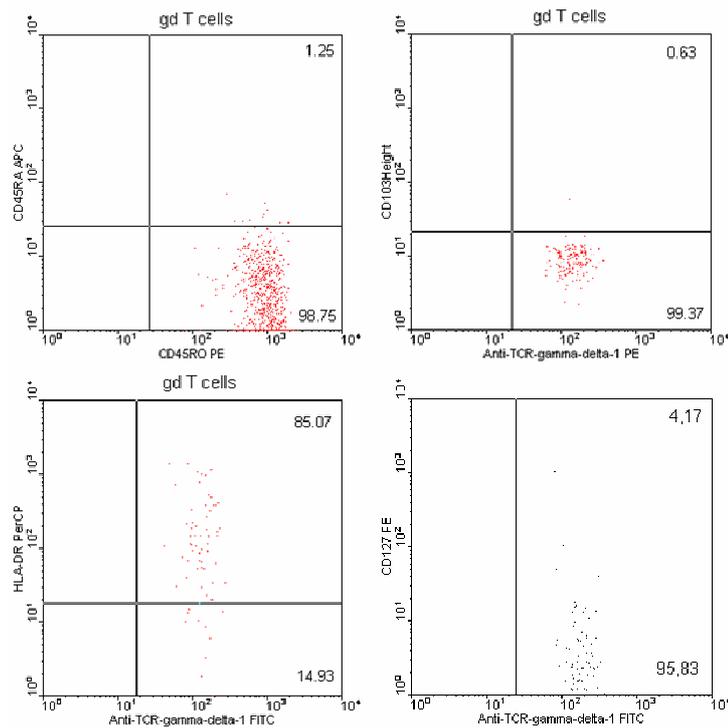


Abb. 4.16: Durchflusszytometrische Analyse von $V\delta 1^+CD4^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen bezüglich der Expression von Markern charakteristisch für regulatorisches Potential

Die FOXP3-Expression der $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen in Relation zur GAPDH-Expression betrug 0,000413. Die analysierte pauciklonalen $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen zeichneten sich damit nicht durch eine hohe FOXP3-Expression aus. Die pauciklonalen $CD56^- V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen werden in der folgenden Abbildung $V\delta 1^+ CD56^-$ bzw. $V\delta^+ CD56^+$ T-Zellen gegenübergestellt (**Abb. 4.17**).

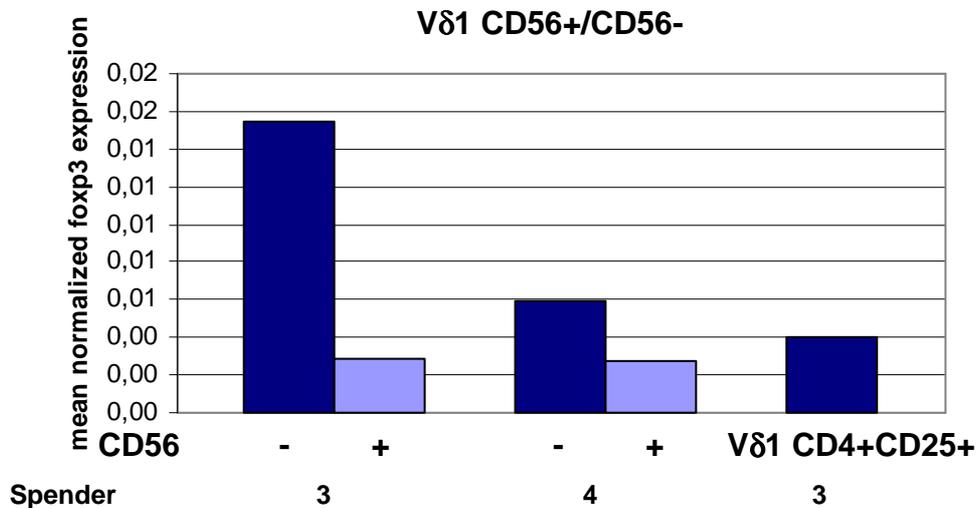


Abb. 4.17: FOXP3-Expression der isolierten Vδ1 CD4+CD25+CD56- γδ T-Zellen im Vergleich zu Vδ1 CD56+ und Vδ1 CD56- γδ T-Zellen.

Die Annahme, dass sich CD4⁺ γδ T-Zellen durch ihre FOXP3-Expression von anderen γδ T-Zellen abheben, hat sich in dieser Analyse nicht bestätigt. Zwar wurden keine weiteren CD4⁺ γδ T-Zellen für die FOXP3-Analyse isoliert; da jedoch alle γδ T-Zellsubpopulationen eine, wenn auch geringe, jedoch nachweisbare FOXP3-Expression zeigen, die in keinem Fall vergleichbar mit der FOXP3-Expression von nTreg ist, ist davon auszugehen, dass sich das schwache Signal von pan γδ T-Zellen aus einer mehr oder weniger geringen Expression dieses Markers aller Subpopulationen zusammensetzt. Dies wird in Abb. 4.18, die die FOXP3-Expression verschiedener γδ T-Zellsubpopulationen eines Spenders im Vergleich zeigt, deutlich.

gd Subpopulationen eines Spenders im Vergleich

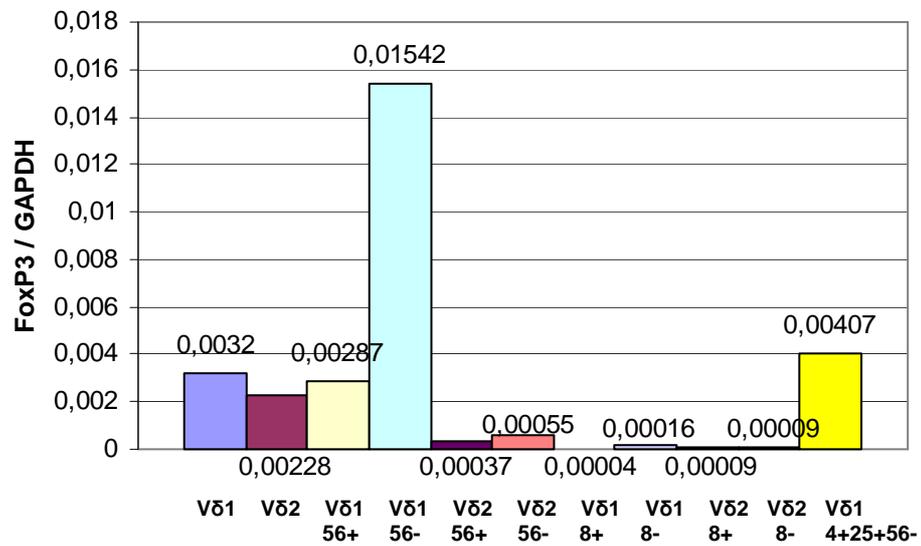


Abb. 4.18: FOXP3-Expression von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen eines Spenders im Vergleich

Aktivierte $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen ein interessantes Zytokinprofil: Sie sezernierten auf Einzelzellebene sowohl Th2 (IL-10, IL-4) (Abb. 4.19) als auch Th1 (IFN- γ , TNF- α) (Abb. 4.20) Zytokine. Da 100% der Zellen IL-10, 71,79% IL-4, 84,51% IFN- γ und 77,38% TNF- α sezernierten, bestehen $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen aus Th0-Zellen, die sowohl IL-4 und IL-10 als auch IFN- γ sezernieren können.

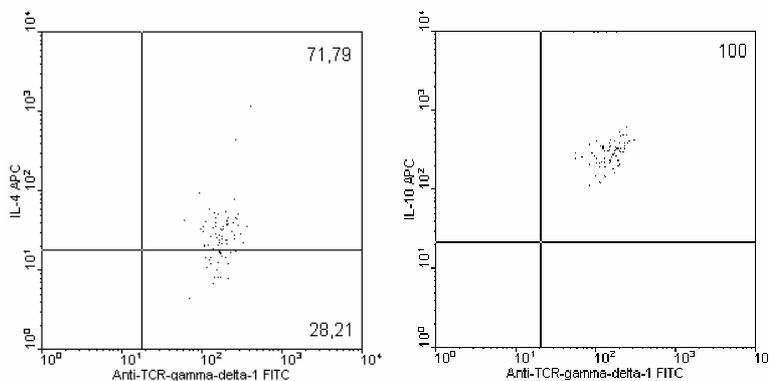


Abb. 4.19: Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 von $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen

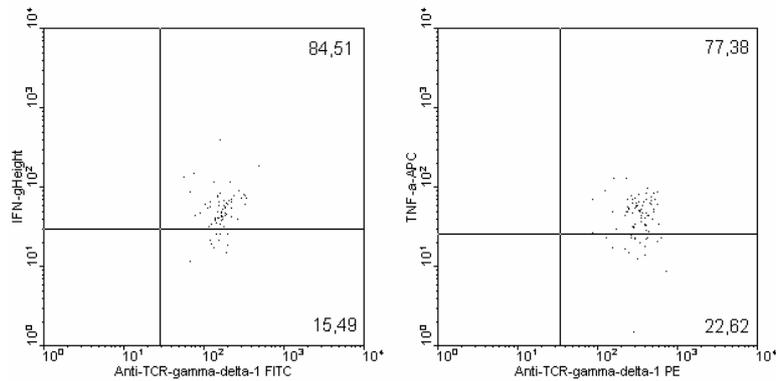


Abb. 4.20: Produktion der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α von $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen

Zusammenfassend ist zu sagen, dass sich $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen hinsichtlich der Marker und Zytokine charakteristisch für regulatorische T-Zellen deutlich von nTreg-, Tr1- und Th3- Zellen abheben. Hinsichtlich der Expression von intra- und extrazellulären Markern unterscheiden sie sich nicht von pan $\gamma\delta$ T-Zellen und konventionellen $CD4^+$ T-Zellen, jedoch weisen sie ein breites Zytokinspektrum im Sinne eines Th0-Types auf.

Tab 4.2: Expression von Markern typisch für regulatorische T-Zellen; Vergleichende Gegenüberstellung von $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen, nTreg, Tr1, Th3, aktivierte konv. $CD4^+$ T-Zellen und pan $\gamma\delta$ T-Zellen

	$V\delta 1^+$ $CD4^+$ $\gamma\delta$ T- Zellen	nTreg	Tr1	Th3	akti. konv. $CD4^+$ T-Zellen	pan $\gamma\delta$ T- Zellen
CD25	97,56% konstitu- tiv? /nach Aktivier- ung?	+ konstitu- tiv ¹⁷	+ nach Aktivier- ung	+ nach Aktivier- ung	+ nach Aktivierung ⁵²	+ nach Akti- vierung
CD122	21,31% niedrig	+ ³⁵	+	+	+ nach Aktivierung ⁵²	+
CD45 Rb	95,24% niedrig	niedrig ³⁵	+	+	+	+
CTLA- 4	33,62% niedrig	+ ³⁷	+	+	+ nach Aktivierung ⁵²	+

GITR	87,56%	+ ³⁹	+	+	+ nach Aktivierung	+
HLA-DR	85,07%	+ ¹²	+	+	+ nach Aktivierung ⁵²	+
CD45 RO	100%	+ ³²	+	+	+ nach Aktivierung ⁵²	+
FOXP3	niedrig	hoch ⁴²	-/ niedrig ^{50, 51}	nicht beschrieben	Expression abhängig vom Aktivierungsgrad ⁷⁹	niedrig
CD103	-	- (murine nTreg: +)	-	nicht beschrieben	+ (intra-epitheliale Lymphozyten, 2-6% der peripheren Blutlymphozyten) ²	+ (intra-epitheliale)
CD127	4,17% niedrig	-/ niedrig ⁴⁰	- ¹³⁶	nicht beschrieben	+ ⁴⁰	nicht beschrieben
IL-2	nicht bestimmt	- ⁴⁶	-/ niedrig ²⁹	nicht beschrieben	Th1, naive	+
IFN- γ	84,51% niedrig	-/ niedrig ⁴⁶	niedrig ²⁹	- ¹⁴	Th1	+
TNF- α	77,38% niedrig	- ⁴⁶	- ²⁹	- ¹⁴	Th1, einige Th2	+
IL-10	100%	-/ niedrig ⁴⁶	+ ²⁹	- ¹⁴	Th2, einige Th1	+
IL-4	71,79% niedrig	- ⁴⁶	- ²⁹	+ ¹⁴	Th2	+
TGF- β	nicht bestimmt	-/ niedrig ⁴⁶	+ ²⁹	+ ¹⁴	+	+

4.4.4 Expression zytotoxischer Effektormoleküle: $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen sind primär nicht zytotoxisch

$V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen exprimierten Granzyme B, jedoch kein Perforin (Abb. 4.21). Dies lässt vermuten, dass die untersuchten $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen in erster Linie keinen killer-Phänotyp exprimieren, was nicht ausschließt, dass Perforin möglicherweise induziert werden kann (Diplomarbeit Hendrik Ziegler 2008, Arbeitsgruppe Dr. Karin Schilbach-Stückle).

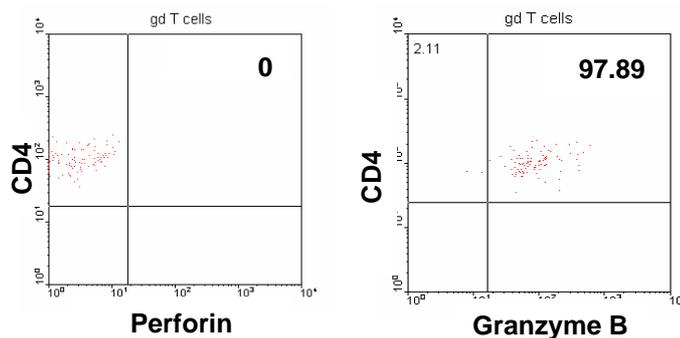


Abb. 4.21: Expression zytotoxischer Effektormoleküle von $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen

4.4.5 Expression von Adhäsionsmolekülen und Markern charakteristisch für Lymphknotenmigration und Migration in epitheliales Gewebe

$V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen waren negativ für das Adhäsionsmolekül CD56. Alle $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimierten stark CD44, 93,48% exprimierten CD54 (ICAM-1) und 23,44% CD11c (Abb. 4.22). $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimierten kein CD103 (αE -Integrin) (Abb. 4.16 S. 69). 41,03% der $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimierten CD62L (L-Selectin) und 5,39% CCR7 (Abb. 4.23). Ein Teil der $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen ist damit in der Lage, in sekundäre lymphatische Organe zu migrieren.

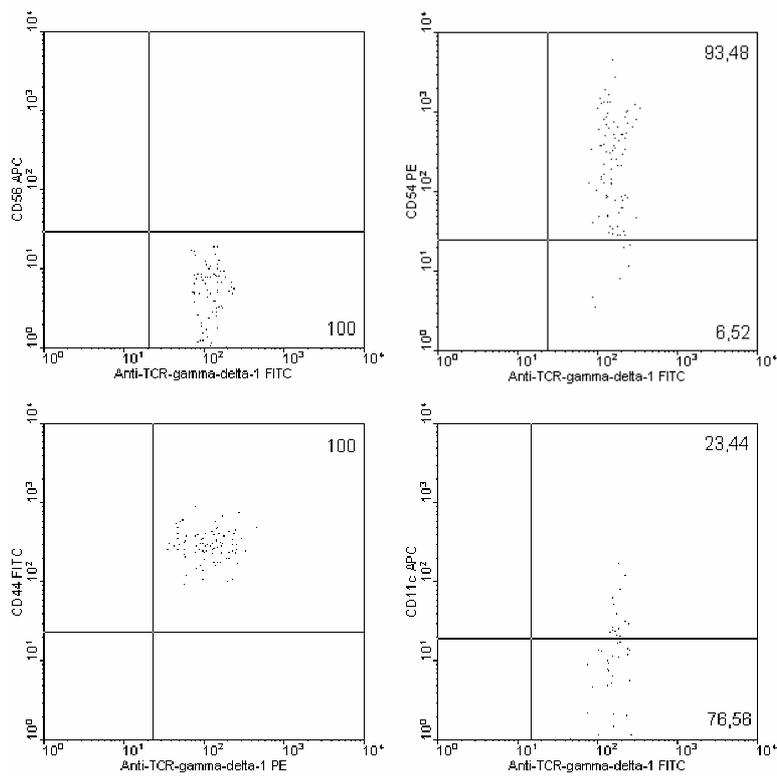


Abb 4.22: Expression der Adhäsionsmoleküle CD56, CD54, CD44 und CD11c von $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen

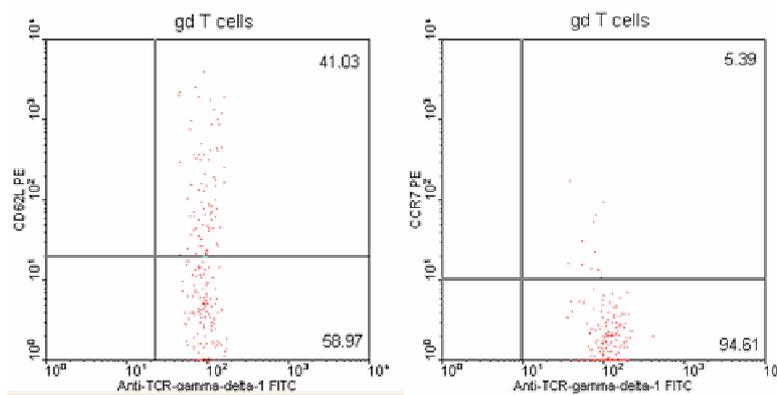


Abb. 4.23: Expression von Markern charakteristisch die Lymphknotenmigration von $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen

4.4.6 Expression von Differenzierungsmarkern für die Einteilung in zentrale Gedächtniszellen (CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ / T_{CM}) und Gedächtniszellen mit Effektorfunktion (CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ / T_{EM})

Alle Vδ1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen exprimierten CD45RO⁺ (Abb. 4.16 S. 69). 1,25% waren zudem positiv für CD45RA (Abb. 4.16 S. 69). Vδ1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen exprimierten kein/schwach CD27 (Abb. 4.24). Vδ1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen exprimierten zu 5,39% CCR7 und zu 41,03% CD62L (Abb. 4.23 S. 75) Vδ1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen setzen sich damit aus Gedächtniszellen mit Effektorfunktion (CD45RA⁻CD27⁻CCR7⁻ / T_{EM}) und wenigen zentralen Gedächtniszellen (CD45RA⁻CD27⁺CCR7⁺ / T_{CM}) zusammen.

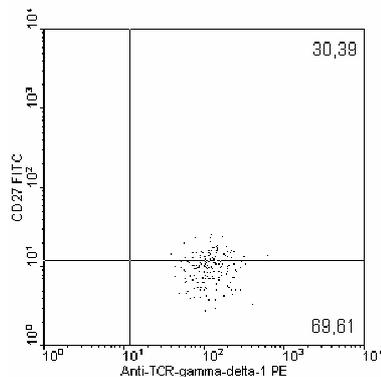


Abb. 4.24: Expression von CD27

4.4.7 Expression von Molekülen typisch für antigenpräsentierende Zellen: Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen haben keine professionelle antigenpräsentierende Funktion

Die Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellpopulation exprimierte die costimulatorischen Moleküle CD86 zu 100% und CD80 zu 98% (Abb. 4.25). Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen exprimierten kein/schwach CD83 und CD40 (Abb. 4.25). HLA-DR, ein MHC-Klasse-II-Molekül, das an der Präsentation von Antigenen beteiligt ist, wurde zu 85,07% exprimiert (Abb. 4.16 S. 69). 93,48% der Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen exprimierten das Adhäsionsmolekül CD54 (Abb. 4.22 S. 75).

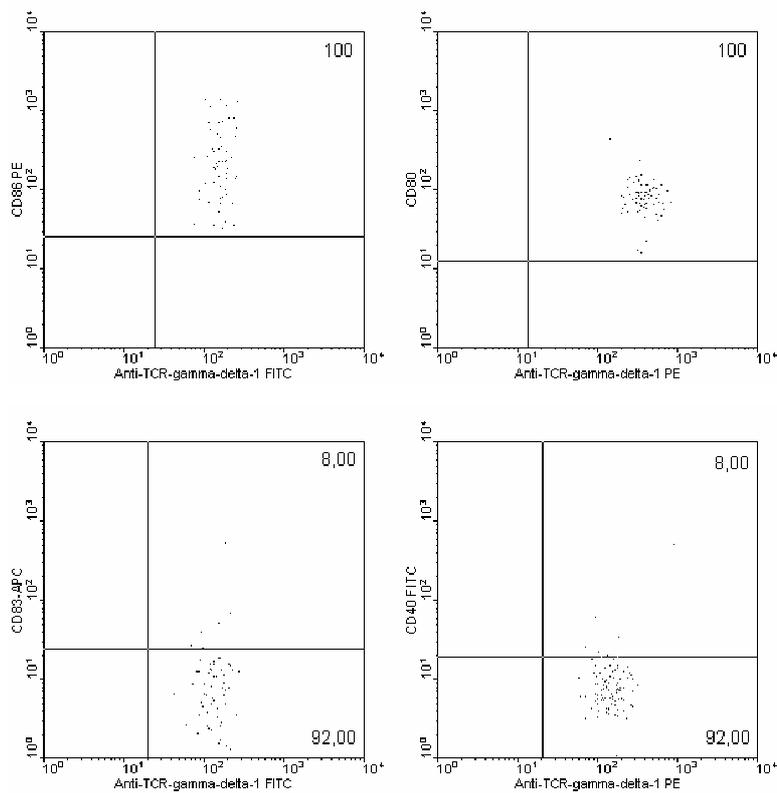


Abb. 4.25 Expression von CD80, CD83, CD86 und CD40 von $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen

Wie in Abb. 4.26 deutlich wird, unterschied sich die $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation in Hinblick auf die Expression von costimulatorischen und antigenpräsentierenden Molekülen nicht von den kokultivierten $CD4^+$ $TCR\alpha\beta^+$ Zellen (Abb. 4.26). Es ist daher davon auszugehen, dass $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen keine professionelle antigenpräsentierende Funktion ausüben.

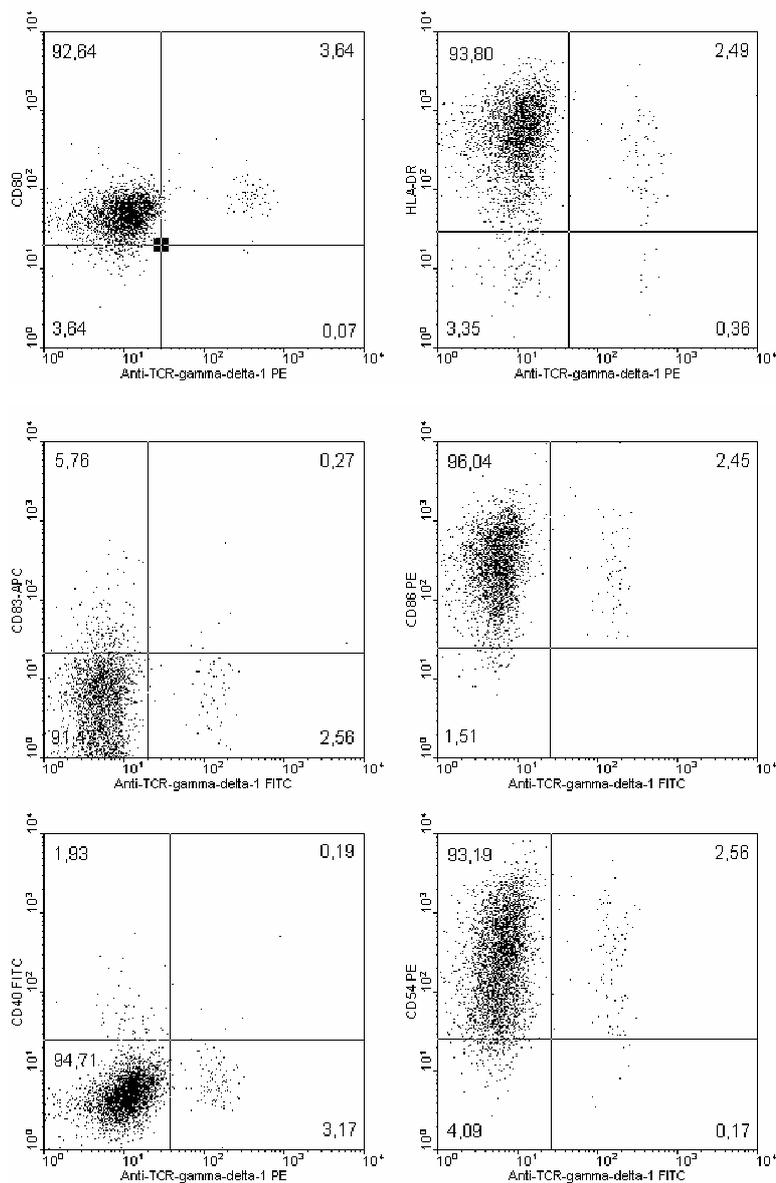


Abb. 4.26 Expression von Adhäsionsmolekülen und Markern typisch für antigenpräsentierende Zellen von $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen und $CD4^+$ TCR $\alpha\beta$ T-Zellen

4.4.8 Verhalten im Proliferationsassay (Mixed lymphocyte culture / MLC): $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen haben keine suppressive Funktion, verstärken aber die suppressive Aktivität von nTreg

Regulatorische T-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie alloreaktive autoreaktive $TCR\alpha\beta^+$ T-Zellen supprimieren können²⁶. In der MLC (Abb. 4.27) zeigten $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen keine Suppression alloreaktiver autologer

CD4⁺CD25⁻ αβ⁺ T-Zellen. Im Gegenteil: Die Co-Kultur von alloreaktiven autologen CD4⁺CD25⁻ αβ⁺ T-Zellen und Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen resultierte in einem 2,5-fachen Anstieg der Tritiumaufnahme im Vergleich zur Proliferation alloreaktiver CD4⁺CD25⁻ αβ⁺ T-Zellen allein. Beide Zelltypen, CD4⁺ T-Helfer Zellen und Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen, proliferierten und zeigten eine 50% / 50% Verteilung.

Im Proliferationsassay wird deutlich, dass Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen, genau wie TCRαβ⁺ CD4⁺ Helferzellen, der Suppression durch nTreg Zellen unterworfen sind. Dennoch scheinen Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen die durch nTreg Zellen vermittelte Suppression zu verstärken. Welcher Mechanismus hierzu beiträgt, muss untersucht werden. In nachfolgenden MLCs konnten wir jedoch auch zeigen, daß pan γδ T-Zellen die gleiche suppressionsverstärkende Funktion auf nTreg haben wie Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen.

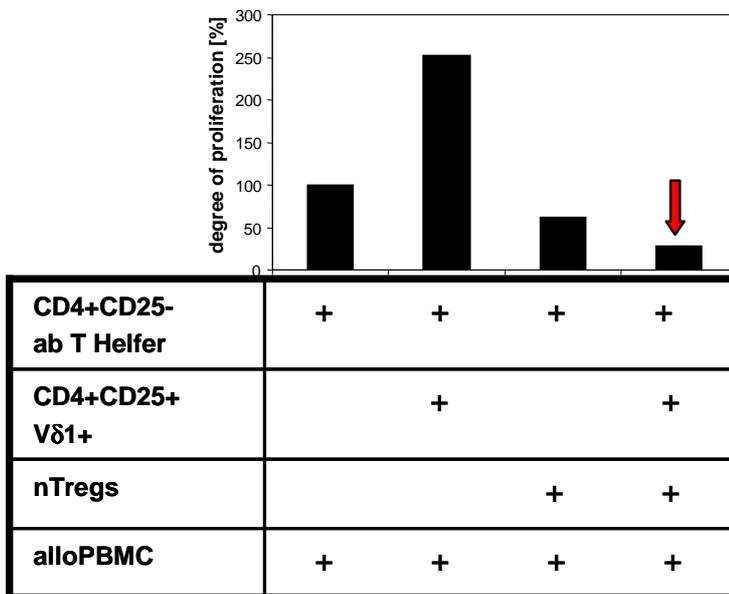


Abb. 4.27: Verhalten der Vδ1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellpopulation im Proliferationsassay

4.4.9 Expression von frühen T-Zellmarkern: V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen als Vorläuferzellen?

CD2 ist ein Differenzierungsmarker, der von NK-Zellen, T-Zellen und Thymozyten exprimiert wird. CD2 fehlt auf CD3⁻ Thymozyten, wird jedoch nahezu gleichzeitig mit CD3 während der frühen T-Zellentwicklung exprimiert ¹³⁷.

Die Mehrzahl der V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen war zum Zeitpunkt der Detektion CD2 negativ (53,72%), 3,4% niedrig positiv und 44,2% positiv (**Abb. 4.28**), während alle V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen CD3 exprimierten. Die CD2 Expression wurde während der Kultur hoch reguliert und erreichte letztendlich 100% (**keine Abb.**)

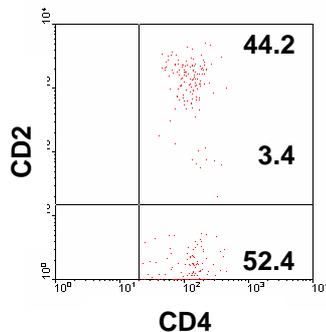


Abb. 4.28: CD2 Expression von V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen

5 Diskussion

5.1 Einleitung

Die intakte Immunregulation ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase. Der menschliche Organismus sieht sich mit einer Vielzahl von Pathogenen konfrontiert, denen er eine effektive Immunantwort als Zusammenspiel zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem entgegensetzt. Dabei muss gewährleistet werden, dass die Immunantwort geregelt abläuft, nach erfolgreicher Eliminierung des Pathogens beendet wird und körpereigene Gewebe verschont bleiben. Der Nachweis autoreaktiver T- und B-Zellen im Blut^{2, 3} von Gesunden macht deutlich, welche enorme Bedeutung regulatorische, suppressiv wirkende Immunzellen haben und Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel die Rheumatoide Arthritis oder die Colitis ulcerosa zeigen, wie verheerend sich die Dysregulation des Immunsystems äußert.

$\gamma\delta$ T-Zellen übernehmen eine Vielzahl unterschiedlicher, teilweise gegensätzlicher Funktionen des Immunsystems^{106, 116, 125, 127, 130, 131}. TCR $\gamma\delta$ T-Zell-knock-out Mäuse zeigen interessanterweise keine verstärkte Infektanfälligkeit, sondern leiden unter einer Störung der Immunregulation, die sich in einer überschießenden Immunantwort, einer vermehrten Anzahl von Autoantikörpern und einem Anstieg der CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen äußert^{62, 63}^{64, 65}. Die beobachtete Dysregulation von $\alpha\beta$ T-Zellen und B-Zellen in $\gamma\delta$ T-Zell-knock-out Mäusen lässt darauf schließen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen beim Gesunden die Aktivität von $\alpha\beta$ T-Zellen und autoreaktiven B-Zellen regulieren und somit Merkmale regulatorischer T-Zellen zeigen⁶⁶. Das immunregulatorische Potential peripherer $\gamma\delta$ T-Zellen wurde bisher nicht eingehend untersucht.

Pan $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren schwach das für natürliche regulatorische CD4⁺CD25⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen (nTreg) charakteristische Gen FOXP3. Folgende

Fragen sollten daher mit dieser Arbeit beantwortet werden: Ist das schwache FOXP3-Signal von pan $\gamma\delta$ T-Zellen einer bestimmten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation zuzuordnen, die sich durch ihre suppressive Funktion von anderen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen abhebt? Welche Funktion übt die kleine Population von CD4+ $\gamma\delta$ T-Zellen aus? Ist sie, trotz oder aufgrund ihrer geringen Anzahl, ein Kandidat mit regulatorischem Potential? Zeigt sie phänotypische Charakteristika von nTregs, Th3 oder Tr1 Zellen?

In dieser Arbeit wurden daher $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen mit MACS-System, FACS-Technologie und Dynabeads isoliert und bzgl. ihrer FOXP3-Expression auf mRNA- (qRT-PCR) und Proteinebene (FACS-Analyse) analysiert.

Des Weiteren wurden $V\delta 1^+$ CD4+ T-Zellen auf potentielle regulatorische Eigenschaften mittels qRT-PCR, Durchflusszytometrie und Proliferationsassay untersucht.

5.2 Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen mit MACS / FACS / Dynabeads

Der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an der Gesamtzahl der peripheren Lymphozyten ist mit 4,53% \pm 2,96% der untersuchten 6 freiwilligen gesunden Spender gering. Dies erschwerte zum einen die Auswahl geeigneter Spender als auch die Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen in ausreichender Menge für weitere Analysen.

Während die Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellen, die sich in einem Merkmal unterscheiden (Einfachisolierung), mit MACS-System unproblematisch war und hohe Reinheiten erzielt wurden (>97%), erwies sich die Mehrfachisolierung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit MACS-System als schwierig. Vor einem weiteren Isolierungsschritt mussten die Zellen für 3-4 Tage in Kultur genommen werden, damit sie den magnetisch markierten ersten Antikörper verlieren. Die Kultivierung der Zellen mit der für die Expansion

von $\gamma\delta$ T-Zellen üblichen Konzentration von IL-2 (200 U/ml Medium) erwies sich dabei als ungeeignet: Bei der Isolierung auf den zweiten Marker sank die Anreicherung bis auf 50%. Dies ist wahrscheinlich auf eine aktivierungsbedingte vermehrte Expression von Oberflächenmolekülen zurückzuführen, die eine Zelladhäsion bewirkt. Alle sortierten Zellen wurden verworfen. Die Kultivierung der isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen vor einem weiteren Isolierungsschritt mit low-dose IL-2 (20 U/ml Medium) für 3-4 Tage ermöglichte hingegen die Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen mit einer Reinheit von $\geq 97\%$. Jedoch standen für die weiteren Analysen somit keine nativen, sondern kultivierte $\gamma\delta$ T-Zellen zur Verfügung.

Eine weitere Isolierungsmethode von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen ist die Anreicherung mit FACS-Technologie. Auch hier stellte sich das Problem der geringen Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut. Um die ohnehin zeitaufwändige Isolierung mittels FACS-System effektiver zu gestalten, wurden $\gamma\delta$ T-Zellen vor der FACS-Isolierung mittels MACS-System mit Anti-V δ 1- bzw. Anti-V δ 2-FITC und Anti-FITC MicroBeads nach V δ 1 bzw. V δ 2 angereichert. Im Gegensatz zu einem zweiten Isolierungsschritt mit MACS-System war die anschließende Isolierung mit FACS-Technologie ohne vorhergehende Kultivierung mit low-dose IL-2 möglich. Da die isolierten Subpopulationen mit zum Teil nur ca. 4000 Zellen äußerst klein waren und ein weiterer Zellverlust vermieden werden musste, kam die anschließende Durchflusszytometrische Kontrolle der Reinheit nicht in Betracht. Um eine hohe Reinheit der FACS-isolierten Subpopulationen zu gewährleisten, wurde auf das Setzen äußerst stringenter Gates geachtet. Trotz der Probleme bei der Isolierung von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen konnten in dieser Arbeit folgende Subpopulationen isoliert werden: 4 x V δ 1⁺, 4 x V δ 2⁺, 7 x TCR $\gamma\delta$ ⁺CD56⁺, 7 x TCR $\gamma\delta$ ⁺CD56⁻, 2 x V δ 1⁺CD56⁺, 2 x V δ 1⁺CD56⁻, 2 x V δ 2⁺CD56⁺, 2 x V δ 2⁺CD56⁻, 2 x V δ 1⁺CD8⁺, 2 x V δ 1⁺CD8⁻, 2 x V δ 2⁺CD8⁺, 1 x V δ 2⁺CD8⁻.

CD4⁺ γδ T-Zellen bilden eine sehr kleine Population⁸³. Der Anteil der CD4⁺ γδ T-Zellen an der Gesamtzahl der peripheren γδ T-Zellen betrug bei den untersuchten Spendern 0,17% ±0,32 (n=8). Eine Isolierung mit dem MACS- oder FACS-Technologie kam daher nicht in Betracht. Auf die Gewinnung von CD4⁺ γδ T-Zellen wird in Abschnitt 5.4 eingegangen.

5.3 Schwaches FOXP3-Signal in multiplen γδ T-Zellsubpopulationen

Das schwache FOXP3-Signal von pan γδ T-Zellen konnte keiner der analysierten γδ T-Zellsubpopulationen zugeordnet werden. Vielmehr zeigten alle analysierten γδ T-Zellsubpopulationen eine schwache FOXP3-Expression, die 100-200x geringer als diejenige von Treg war. Die geringe FOXP3-Expression der analysierten γδ T-Zellsubpopulationen weist auf eine niedrige physiologische Expression von FOXP3 in diesen Zellpopulationen hin.

Auch die FOXP3-Expression der Vδ1⁺ CD4⁺ T-Zellpopulation ist im Vergleich zu nTreg sehr gering und entspricht eher der FOXP3-Expression konventioneller CD4⁺TCRαβ T-Zellen⁴². Leider konnte keine weitere CD4⁺ γδ T-Zellpopulation isoliert und analysiert werden, so dass bzgl. der FOXP3-Expression von CD4⁺ γδ T-Zellen keine definitive Aussage gemacht werden kann.

Die FOXP3-Expression der analysierten γδ T-Zellsubpopulationen unterlag intra- und interindividuellen Schwankungen. Ein Grund für diese Schwankungen könnte eine bestehende Heterogenität der analysierten Subpopulationen sein, d.h., dass ein bis jetzt nicht untersuchter Marker eine Subpopulation kennzeichnet, die sich durch ihre FOXP3-Expression von anderen γδ T-Zellen abhebt. Jedoch könnte auch ein unterschiedlicher Aktivierungszustand für die Schwankungen der FOXP3-Expression verantwortlich sein. Für letzteres sprechen neuere Studien, die annehmen lassen, dass FOXP3 nicht nur für die Funktion von

regulatorischen suppressiven T-Zellen von Bedeutung ist, sondern auch die Funktion konventioneller T-Zellen koordiniert^{79, 138, 139, 140}. So konnte für humane T-Zellen gezeigt werden, dass die FOXP3-Expression nicht zwangsläufig zu einem suppressiven Phänotyp führt, wie Walker et al. es für induzierte nTreg zeigen konnten²³, sondern auch aktivierte nicht suppressive CD4⁺ T-Zellen FOXP3 exprimieren^{139, 140, 79}. Allan et al. konnten zeigen, dass die FOXP3-Expression aktivierter T-Zellen vorübergehend ist und nicht zu der Induktion eines nTreg-Phänotyps führt⁷⁹. Während nTreg keine nennenswerte Menge an Zytokinen produzieren, da FOXP3 in nTreg die Transkription von Zytokinpromotern inhibiert^{141, 43}, wird die Zytokinproduktion in Effektor T-Zellen durch FOXP3 nicht beeinflusst⁷⁹. FOXP3 ist damit ein Aktivierungsmarker und kann nicht länger als ein Marker exklusiv für regulatorische T-Zellen angesehen werden⁷⁹: Ebenfalls scheint das während einer Immunantwort vorherrschende Mikromilieu die Expression von FOXP3 zu beeinflussen^{142, 25}. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass FOXP3 eine Komponente eines hochmolekularen Komplexes^{143, 144} ist und die suppressive Funktion von FOXP3 von seinen Bindungspartnern (Transkriptionsfaktoren, Corepressoren und Coaktivatoren) abhängt¹⁴⁵. Li et al. vermuten daher, dass nicht-suppressive FOXP3⁺ T-Zellen eine Imbalance der benötigten Cofaktoren aufweisen¹⁴⁶.

In Hinblick auf die Ergebnisse von Allan et al. ist die schwache FOXP3-Expression der analysierten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen somit Ausdruck der Zellaktivierung, wobei intra- und interindividuelle Unterschiede auf einen unterschiedlichen Aktivierungszustand hinweisen. Dazu passt, dass die schwache FOXP3-Expression der analysierten pauciklonalen V δ 1⁺ CD4⁺ T-Zellen und evtl. das Fehlen akzessorischer Moleküle des FOXP3-Komplexes nicht zu einer Suppression der Zytokinproduktion führt. (**Abb. 4.19 / 4.20 S. 71/72**).

Da der Krankheitsverlauf in FOXP3 negativen Scurfy-Mäusen (Tiermodell für das IPEX-Syndrom) weit dramatischer ist als in nTreg-depletierten Tieren¹⁷, vermuteten bereits Khattri et al., dass FOXP3 auch für die

Funktion von konventionellen T-Zellen von Bedeutung ist, oder, dass auch andere regulatorische T-Zellen FOXP3 exprimieren ⁴⁵. Der Nachweis von FOXP3 in induzierten nTreg ²³, aktivierten CD4⁺ T-Zellen ⁷⁹ und, wie wir zeigen konnten, $\gamma\delta$ T-Zellen bestätigt beide Vermutungen. Da für $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl immunmodulatorische als auch immunregulatorische Funktionen gezeigt werden konnten, ist anzunehmen, dass ein Defekt im Gen FOXP3, wie es dem IPEX-Syndrom zugrunde liegt, nicht nur zu einem Funktionsverlust regulatorischer T-Zellen, sondern auch zu einer eingeschränkten/aufgehobenen Funktion konventioneller $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ T-Zellen führt, da beide T-Zellpopulationen FOXP3 schwach exprimieren. Für diese Annahme sprechen Studien von Bacchetta et al., die zeigen, dass FOXP3 Mutationen in IPEX-Patienten nicht zwangsläufig zu einem Fehlen von nTreg, sondern vor allem zu einer Dysfunktion in nTreg und Effektorzellen führen ¹⁴⁷.

Die mittels qRT-PCR gewonnenen Daten zur FOXP3-Expression sollten durchflusszytometrisch validiert werden. Zum Nachweis der FOXP3-Expression auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie standen zwei verschiedene Antikörper zur Verfügung: zum einen ein unkonjugierter polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes FOXP3 der Firma abcam (FOXP3 antibody ab10563), zum anderen ein PE-konjugierter Mausantikörper der Firma eBioscience (hFoxy, Cat. No. 12-5779). Die intrazelluläre Färbung mit dem Antikörper von abcam wurde nach dem Protokoll FIX & PERM (Caltag Laboratories) durchgeführt. Als sekundärer bzw. tertiärer Antikörper wurden in einem ersten Ansatz Biotin-goat-anti-rabbit-IgG und Streptavidin-PE verwendet, in drei weiteren Ansätzen FITC-goat-anti-rabbit-IgG. Alle vier Ansätze zeigten eine dosisabhängige und somit unspezifische Bindung des anti-FOXP3 Antikörpers. Auch der Gebrauch von D-PBS + 5% BSA anstatt D-PBS als Waschpuffer mit dem Ziel der maximalen Abdeckung unspezifischer Bindungsstellen führte nicht zu einer Erhöhung der Spezifität.

Die intrazelluläre Färbung mit dem Antikörper hFoxy der Firma eBioscience wurde nach dem Protokoll Intracellular Staining Protocol for

hFoxy on Human PBMC und dem empfohlenen FOXP3 Staining Buffer Set der Firma eBioscience (Cat. No. 88-5778-73) durchgeführt. Laut Hersteller besteht hinsichtlich der Anfärbarkeit der PBMCs im Lymphozytengate mit hFoxy eine interindividuelle Variabilität. Angegeben wird eine Anfärbarkeit von ca. 20% der gateden PBMCs. In unseren Versuchen zeigten 4,348% \pm 1,869 (n=4) der intrazellulär gefärbten PBMCs eines Spenders im Lymphozytengate eine Anfärbarkeit mit hFoxy. Überraschenderweise bestanden in den FACS Analysen die für FOXP3 positiven PBMCs in unseren Versuchen vor allem aus CD4⁻/CD8⁻ (DN) (68,95% \pm 1,15) und wenigen CD8⁺ (8,89% \pm 5,08) und CD4⁺ (21,058% \pm 3,736) Zellen. Ebenfalls zeigten auch CD3⁻ Zellen eine FOXP3-Expression. Dies stimmt nicht mit den Angaben des Herstellers und mit der durch den Nachweis von FOXP3-mRNA gesicherten Tatsache überein, dass vor allem die mit einem Anteil von 1-2% der peripheren CD4⁺ T-Zellen sehr kleine Population der natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen ¹⁸, eine Subpopulation von CD8⁺ T-Zellen ¹⁵ und aktivierte konventionelle CD4⁺ T-Zellen ⁷⁹ FOXP3 exprimieren. Da, wie wir zeigen konnten, auch $\gamma\delta$ T-Zellen FOXP3 schwach exprimieren, könnte es sich bei den DN FOXP3⁺ T-Zellen um $\gamma\delta$ T-Zellen handeln. Jedoch erwies sich die Färbung sowohl des $\alpha\beta$ als auch des $\gamma\delta$ T-Zellrezeptors in Kombination mit hFoxy trotz Modifikation des Färbeprotokolls als unmöglich. Dasselbe galt für den Oberflächenmarker CD2. Es ist anzunehmen, dass der TCR und der Oberflächenmarker CD2 durch einen der Arbeitsschritte des Färbeprotokolls verändert/zerstört wurden. Dass auch CD3 negative Zellen eine Anfärbarkeit mit hFoxy zeigen, würde bedeuten, dass auch NK- und/oder B-Zellen FOXP3 exprimieren. In der Tat zeigten NK-Zellen in der qRT-PCR (n = 1) eine, wenn auch sehr schwache, FOXP3 Expression (FOXP3/GAPDH = 0,00006). Dies muss jedoch durch eine größere Anzahl von Versuchen bestätigt werden. LG2-Zellen, EBV-transformierte B-Zellen, zeigten in unseren Versuchen keine FOXP3-Expression.

Der unkonjugierte polyklonale Kaninchenantikörper gegen humanes FOXP3 der Firma abcam (FOXP3 antibody ab10563) und der PE-konjugierter Mausantikörper der Firma eBioscience (hFoxy, Cat. No. 12-5779) sind laut unseren Ergebnissen für die durchflusszytometrische Validierung der mittels qRT-PCR gewonnenen Daten ungeeignet.

Der PE-konjugierte Mausantikörper der Firma eBioscience (hFoxy, Cat. No. 12-5779) wird inzwischen nicht mehr vertrieben. Die von eBioscience neu auf den Markt gebrachten Antikörper sind fast ausschließlich auf die Klone DCH 101 und 236A/E7 zurückzuführen.

5.4 Gewinnung und Charakterisierung der pauciklonalen V δ 1⁺ CD4⁺ T-Zellpopulation

CD4⁺ $\gamma\delta$ T Zellen sind mit durchschnittlich 0,17% \pm 0,32 (n=8) des peripheren $\gamma\delta$ T Zellpools der untersuchten Spender sehr selten. Um genügend vitale CD4⁺ $\gamma\delta$ T Zellen für weitere Analysen zu erhalten, wurden zunächst pan $\gamma\delta$ T-Zellen mittels MACS (Anti-TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit) isoliert und nach 16 Tagen in Kultur nach CD4⁺ angereichert (MACS[®], CD4+ Multisort Kit). Die isolierten CD4⁺ T-Zellen bestanden zu 97,3% aus $\alpha\beta$ T Zellen und zu 2,7% aus $\gamma\delta$ T Zellen.. Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1000 -10000 Zellen pro 96well-Platte kultiviert (s. Methoden). Insgesamt wurden 80 wells durchflusszytometrisch auf das Wachstum einer CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation untersucht. In nur einem der 80 analysierten wells entwickelte sich eine CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation, die zahlenmäßig groß genug für weitere Analysen war. Diese $\gamma\delta$ T-Zellpopulation entwickelte sich in Co-Kultur mit CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen (3,5% $\gamma\delta$ T-Zellen, 94,3% $\alpha\beta$ T-Zellen) und stammte von einer Kulturplatte mit anfänglich 1000 Zellen pro 96well-Platte. Eine V δ 2⁺CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation konnte leider nicht in ausreichender Zellzahl gewonnen werden.

Bei den generierten CD4⁺ γδ T-Zellen handelte es sich um eine pauciklonale γδ T-Zellpopulation mit präferentieller Expression der Kettensegmente Vδ1 und Vγ9. Die bisher am besten charakterisierten peripheren regulatorischen T-Zellen des αβ T-Zellpools (nTreg, T1 und Th3-Zellen) sind alle CD4⁺. Wir führten daher eine durchflusszytometrische Phänotypisierung der Vδ1⁺CD4⁺ γδ T-Zellen in Hinblick auf Marker, charakteristisch für regulatorische T-Zellen, durch. Vδ1⁺CD4⁺ γδ T-Zellen exprimierten zu 97,56% CD25. Aufgrund der Generierung durch Klonierung ist nicht zu sagen, ob dieser Marker konstitutiv exprimiert wird, wie es für nTreg charakteristisch ist, oder erst nach Aktivierung. Vδ1⁺CD4⁺CD25⁺ γδ T-Zellen (Vδ⁴⁺²⁵⁺) exprimierten CD45Rbniedrig (95,24%), HLA-DR (85,07%) und GITR (87,56%) und waren schwach positiv für intrazelluläres CTLA-4 (33,62%) und CD122 (21,31%). Alle Vδ⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen waren antigenerfahren (CD45RO⁺). Vδ⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen waren zu 99,37% negativ für CD103. Das Expressionsprofil von Vδ1⁴⁺²⁵⁺ stimmt mit dem Expressionsprofil von nTreg nur teilweise überein: nTreg zeigen eine stärkere CTLA-4- und CD122-Expression als die analysierten Vδ1⁴⁺²⁵⁺. Auch konventionelle CD4⁺CD25⁻ T-Zellen exprimieren nach Aktivierung vermehrt CTLA-4, HLA-DR, CD122, CD45RO und CD25, teilweise sogar stärker als nTreg⁴⁶. Die Expression der α-Kette des αEβ7-Integrins (CD103) ermöglicht in Kombination mit der Expression von CD25 die Identifizierung drei verschiedener Subpopulationen innerhalb des Treg-Pools: CD4⁺CD103⁻CD25⁺, CD4⁺CD103⁺CD25⁻ und CD4⁺CD103⁺CD25⁺ Treg¹⁴⁸. Alle drei Subpopulationen exprimieren FOXP3 und zeigen eine suppressive Funktion¹⁴⁸. CD103 ist zudem ein Marker für die Migration in entzündliches Gewebe und ermöglicht regulatorischen T-Zellen die Akkumulation in entzündlichen Geweben¹⁴⁹. Vδ1⁴⁺²⁵⁺ waren zu 95,83% negativ für CD127. Nach Liu et al. und Seddiki et al. können nTreg von CD4⁺ Effektor T-Zellen durch ihre fehlende/niedrige CD127 (IL-7Rα) Expression unterschieden werden^{40, 41}. Jedoch können auch CD4⁺ Effektor T-Zellen in der frühen Phase der

Aktivierung FOXP3⁺, CD25⁺, aber CD127⁻ sein ⁷⁹. Dies zeigt auch die analysierte Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellpopulation, die trotz Expression von CD25 und schwacher FOXP3-Expression CD127 negativ war. Nach Couper et al. sind auch adaptive Tr1-Zellen CD127 negativ ¹³⁶. Wie später anhand des Zytokinprofils und in der MLC deutlich wird, handelt es sich bei den Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen jedoch nicht um Tr1-Zellen.

γδ T-Zellen können auf klonaler Ebene sowohl vom Th1- als auch vom Th2-Typ sein ^{70, 126}. Wen et al. gehen von einer Assoziation der CD4-Expression mit der Ausbildung eines Th2-Typs aus, da die von ihm beschriebenen CD4⁺ γδ T-Zellklone keine Th1-Zytokine produzierten ¹⁵⁰.

Die aktivierten Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen zeigten ein interessantes Zytokinprofil: Sie sezernierten auf Einzelzellebene sowohl Th2 (IL-10, IL-4) als auch Th1 (IFN-γ, TNF-α) Zytokine und entsprechen damit Th0-Zellen, die sowohl die tolerogenen Zytokine IL-4 und IL-10 als auch die proinflammatorischen Zytokine IFN-γ und TNF-α sezernieren können. IL-4 und TNF-α tragen zur Generierung, Mobilisierung und zum Überleben verschiedener hämatopoetischer Zellen, einschließlich Granulozyten und Monozyten bei und unterstützen damit die Immunabwehr. IL-10, als Th2-Zytokin, unterstützt tolerogene Prozesse. Durch die Sekretion des immunsuppressiv wirkenden Zytokins IL-10 sind Vδ1⁴⁺²⁵⁺ potentiell in der Lage, die Differenzierung von Th0 TCRαβ⁺ T-Zellen in regulatorische T-Zellen zu induzieren.

Damit unterscheiden sich Vδ1⁴⁺²⁵⁺ auch hinsichtlich der Zytokinproduktion sowohl eindeutig von nTreg als auch von Tr1- und Th3-Zellen: Während nTreg bis auf geringe Mengen an TGF-β, IFN-γ und IL-10 keine Zytokine produzieren ⁴⁶, zeichnen sich Tr1-Zellen durch die Produktion von IL-10 und TGF-β ¹³ und Th3 durch die Produktion von IL-4 und TGF-β aus ¹⁴.

Phänotypisch unterschieden sich damit Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen von nTreg-, Tr1- und Th3-Zellen.

Die Produktion der Th1-Zytokine IFN- γ und TNF- α durch V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen spricht gegen die Annahme von Wen et al., dass die CD4-Expression mit der Ausbildung eines Th2-Typs assoziiert ist.

V δ 1⁴⁺²⁵⁺ zeigten keinen killer-Phänotyp (**Abb. 4.21 S. 74**). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass dieser nach Kontakt mit einem geeigneten target induziert wird (Diplomarbeit Hedrik Ziegler 2008; Arbeitsgruppe Dr. Karin Schilbach-Stückle).

CD62L und CCR7 sind Homing-Rezeptoren, die die Extravasation und die T-Zellmigration in Lymphknoten ermöglichen ¹⁵¹.

41,03% der analysierten V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen exprimierten CD62L und 5,39% waren positiv für CCR7. Ein Teil der V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen ist somit in der Lage, in Lymphknoten zu migrieren und in Kontakt zu anderen Immunzellen zu treten. Auch nTreg exprimieren den Chemokinrezeptor CCR7 und das Adhäsionsmolekül CD62L ^{7, 52}, was annehmen lässt, dass naive T-Zellen, nTreg und ein Teil der V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen die gleiche Lokalisation zeigen. Die Mehrheit der V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen war negativ für den Chemokinrezeptor CCR7. Leider wurde die Expression von Chemokinrezeptoren für entzündliches Gewebe (CCR2, CCR5, CCR3, CCR6, CXCR3) nicht untersucht. Dies wäre in Hinblick auf die Funktion von V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen von Interesse, da sie potentiell in der Lage sind, durch die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen (IL-10, IL-4) in entzündlichen Geweben direkt die Entzündung einzudämmen, so wie es für Tr1 Zellen beschrieben wurde ²⁹.

Naive und Gedächtnis-T-Zellen werden anhand der Expression der CD45-Isoformen CD45RA bzw. CD45RO identifiziert ¹⁵². Sallusto et al. konnten zeigen, dass anhand der Expression der Homing-Rezeptoren CCR7 und CD62L zwei TCR $\alpha\beta$ ⁺ CD45RO⁺ Gedächtniszellpopulationen differenziert werden können, die sich in ihrer Funktion und Lokalisation voneinander unterscheiden: Während "central memory" (T_{CM}) T-Zellen die Homing-Rezeptoren CD62L und CCR7 exprimieren, die die Migration in

sekundäre lymphatische Organe ermöglichen, bis auf IL-2 keine Zytokine sezernieren und gegen zukünftige Infektionen schützen, zeichnen sich CD62L⁻CCR7⁻ „effector memory“ (T_{EM}) T-Zellen durch die Expression von Rezeptoren für die Migration in entzündliches Gewebe aus und sezernieren die Zytokine IFN- γ , IL-4 und IL-5, welche eine Ausbreitung von Pathogenen zügig unterbinden ¹⁵³. Dieli et al. konnten zeigen, dass CD45RO⁺ V δ 2 T-Zellen anhand der Expression des Markers CD27 in zwei Gedächtniszellpopulationen unterteilt werden können, die sich analog den T_{CM} und T_{EM} TCR $\alpha\beta$ T-Zellen hinsichtlich ihrer Funktion und Lokalisation voneinander unterscheiden: CD45RO⁺CD27⁺ exprimieren die Homing-Rezeptoren CD62L und CCR7, während CD45RO⁺CD27⁻ Chemokinrezeptoren für entzündliches Gewebe exprimieren (CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3) ¹⁵⁴. Analog den T_{CM} des TCR $\alpha\beta$ T-Zellpools produzieren CD45RO⁺CD27⁺ V δ 2 T-Zellen kaum IFN- γ , während sich CD45RO⁺CD27⁻ V δ 2 T-Zellen durch eine hohe IFN- γ -Produktion auszeichneten und damit T_{EM} gleichen ^{154, 153}. Alle V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen exprimierten CD45RO⁺, 1,25% zusätzlich CD45RA⁺. 30,39% waren schwach positiv für CD27. 5,39% exprimierten CCR7 und 41,03% CD62L. Es ist daher anzunehmen, dass sich V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen, analog den V δ 2 T-Zellen, aus zwei verschiedenen Gedächtniszellpopulationen zusammensetzen, die sich hinsichtlich Funktion und Lokalisation voneinander unterscheiden: Nach der Einteilung von Sallusto et al. sind daher CCR7⁺ und CD62L⁺ V δ 1 T-Zellen „central memory“ T-Zellen (T_{CM}). Ein Teil der V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen produzierte kein IFN- γ , IL-4 oder TNF- α , welches zu dem Phänotyp zentraler Gedächtniszellen (T_{CM}) passen würde ¹⁵³. Der Großteil der V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen sind jedoch „effector memory“ T-Zellen (T_{EM}), migrieren nicht in sekundäres lymphatisches Gewebe (CCR7⁻CD62L⁻) und sezernieren eine Vielzahl an Zytokinen (IFN- γ (84,51%), TNF- α (77,38%) und IL-4 (71,79%)). Nach Dieli et al. ist ein geringer Anteil der V δ 2 T-Zellen des Lymphknotens (CCR7⁺CD62L⁺) aber auch CD45RA⁻CD27⁻, so dass die geringe Expression von CCR7 auch von CD45RA⁻CD27⁻ V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen stammen könnte ¹⁵⁴. Alle V δ 1⁴⁺²⁵⁺

produzierten IL-10. Dies würde bedeuten, dass sowohl $T_{CM} V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen als auch $T_{EM} V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen IL-10 sezernieren. Auf die IL-10 und TNF- α Produktion von T_{CM} und T_{EM} wurde bei Dieli et al. und Sallusto et al. nicht eingegangen.

1,25% der $CD45RO^+ V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen exprimierten zusätzlich CD45RA. Bei diesen Zellen könnte es sich um den Übergang von $CD45RA^-CD27^-$ zu $CD45RA^+CD27^-$ terminal differenzierten zytotoxischen $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen handeln, wie es Dieli et al. für $CD45RA^+CD27^- V\delta 2$ T-Zellen vermuten. Jedoch konnte für die $CD45RA^+CD27^- V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen die für terminal differenzierte $CD45RA^+CD27^- V\delta 2$ gezeigte Perforin-Produktion¹⁵⁴ nicht nachgewiesen werden. Bei den $CD45RA^+ CD45RO^+ V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen könnte es sich daher auch um eine Übergangsstufe von naiven $CD45RA^+CD27^+ V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen zu antigenerfahrenen $CD45RA^- CD45RO^+$ T-Zellen handeln.

$V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen exprimierten CD27 nur schwach, und nur 5,39% exprimierten CCR7. Es besteht daher die Möglichkeit, dass sich die kultivierten $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen in dem Differenzierungsschritt von $CD45RA^- CD27^+CCR7^+ T_{CM}$ in $CD45RA^-CD27^-CCR7^- T_{EM}$ befanden. Dieli et al. und Sallusto et al. konnten zeigen, dass, zumindest in vitro, eine Differenzierung von naiven $CD45RA^+CD27^+CCR7^+$ T-Zellen über $CD45RA^-CD27^+CCR7^+$ Gedächtniszellen (T_{CM}) zu $CD45RA^-CD27^-CCR7^-$ Gedächtniszellen mit Effektorfunktion (T_{EM}) stattfindet^{154, 153}.

Für eine sichere Einteilung der $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen in T_{CM} und T_{EM} wäre eine simultane Färbung von CD45RA, CD27, CCR7 und CD62L sowie die Färbung von Chemokinrezeptoren für entzündliches Gewebe (CCR1, CCR2, CCR5, CCR3, CCR6, CXCR3) unabdingbar gewesen. Letzteres war jedoch aus Kostengründen nicht möglich.

Brandes et al. beschreiben eine antigenpräsentierende Funktion für $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen, vergleichbar mit der dendritischer Zellen: So exprimieren stimulierte $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen ein Repertoire von costimulatorischen, antigenpräsentierenden und adhäsiven Molekülen (HLA-DR, CD80, CD83,

CD86, CD40, CD54), das von demjenigen reifer dendritischer Zellen nicht zu unterscheiden ist ¹⁵⁵.

V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimierten zwar HLA-DR, CD80, CD86 und CD54, jedoch kein/schwach CD83 und CD40. Ebenfalls unterschied sich das Expressionsprofil nicht von demjenigen der kokultivierten CD4⁺ TCR $\alpha\beta$ T-Zellen. Es ist daher nicht wahrscheinlich, dass die analysierten V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen eine professionelle antigenpräsentierende Funktion ausüben.

Phänotypisch unterscheiden sich V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen von nTreg, Tr1 und Th3 Zellen. Die funktionelle Analyse mittels MLC sollte zeigen, ob V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen eine suppressive Funktion ausüben.

In der MLC zeigten V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen keine Suppression alloreaktiver autologer CD4⁺CD25⁻ $\alpha\beta$ T-Zellen. Dieses Ergebnis passt zu der nur geringen Expression von FOXP3 und dem oben beschriebenen Phänotyp. Die Co-Kultur von alloreaktiven autologen CD4⁺CD25⁻ $\alpha\beta$ T-Zellen und V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen resultierte sogar in einem 2,5fachen Anstieg der Tritiumaufnahme im Vergleich zur Proliferation alloreaktiver CD4⁺CD25⁻ $\alpha\beta$ T-Zellen allein. Welcher der beiden Zelltypen, CD4⁺ T-Helferzellen oder V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen die proliferierende Zellpopulation war, konnte später im FACS gezeigt werden: V δ 1 und CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Helferzellen proliferierten zu gleichen Teilen. V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen exprimierten kein CD103. Allakhverdi et al. konnten zeigen, dass durch allogene Stimulation bei ca. 15% der T-Zellen die Expression von CD103 induziert werden kann ¹⁴⁸. Induzierte CD103⁺ T-Zellen zeigten Charakteristika regulatorischer T-Zellen, während CD103⁻ T-Zellen FOXP3 nur schwach exprimierten, die Proliferation co-kultivierter allogener T-Zellen nicht supprimierten, sondern, im Gegenteil, wie die von uns analysierten V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen zu einem Anstieg der Proliferation führten ¹⁴⁸. Hier stellt sich für zukünftige Projekte die Frage, welche Faktoren eine Induktion von CD103 in $\gamma\delta$ T-Zellen bewirken und ob induzierte CD103⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen regulatorisches Potential zeigen.

Lamp et al. konnten zeigen, dass die Co-Kultur von CD4⁺ T-Helferzellen mit peripheren $\gamma\delta$ T-Zellen für 21 d in 6 von 10 Ansätzen zu einer starken Proliferation von V δ 1⁺ T-Zellen führte¹⁵⁶. Dies lässt vermuten, dass V δ 1⁺ T-Zellen ein größeres proliferatives Potential als V δ 2⁺ T-Zellen besitzen. In diesem Zusammenhang ist es ebenfalls interessant, dass 4/4 berichtete TCR $\gamma\delta$ ⁺ lymphoproliferative Erkrankungen (LDGL) ausschließlich die Ketten V δ 1V γ 9 exprimierten¹⁵⁷, also den Phänotyp der von uns generierten V δ 1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellpopulation.

Im Proliferationsassay wird zudem deutlich, dass V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen, genau wie TCR $\alpha\beta$ CD4⁺ Helferzellen, der Suppression durch Treg unterworfen sind. Zusätzlich scheinen V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen die durch Treg vermittelte Suppression zu verstärken. In nachfolgenden MLCs konnten wir jedoch zeigen, daß pan $\gamma\delta$ T-Zellen die gleiche suppressionsverstärkende Funktion auf Treg haben wie V δ 1⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen. Welcher Mechanismus hierzu beiträgt, muss untersucht werden. Denkbar wäre, dass Treg ein Milieu schaffen, das die Differenzierung der $\gamma\delta$ T-Zellen in eine suppressive T-Zellpopulation im Sinne der „infectious tolerance“ ermöglicht. Die suppressionsverstärkende Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen könnte bei der Eindämmung / Beendigung einer Immunantwort sinnvoll und hilfreich sein. Jedoch ist zu bedenken, dass in der MLC die einzelnen Zellpopulationen in unphysiologischen Konzentrationsverhältnissen eingesetzt wurden und es sich damit bei o.g. Beobachtungen nicht unbedingt um eine physiologische Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen handelt.

Immunregulation ist aber ein primär lokaler und kein systemischer Vorgang. Durch die Expression der Homing-Rezeptoren CD62L und CCR7 sind $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage, in sekundäre lymphatische Organe zu migrieren, um hier in Kontakt zu anderen Immunzellen, inclusive nTreg, zu treten. Hier wäre das Szenario der „infectious tolerance“ denkbar. Die suppressionsverstärkende Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen könnte auch in entzündlichem Gewebe von Bedeutung sein.

Neben der von Funktion und Lokalisation waren wir an der Expression früher T-Zellmarker interessiert. Die Mehrzahl der $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen war zum Zeitpunkt der Detektion CD2 negativ (53,72%), 3,4% niedrig positiv und 44,2% positiv, während alle $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen CD3 exprimierten. Die CD2 Expression wurde während der Kultur hoch reguliert und erreichte letztendlich 100%.

Loza et al. beschreiben eine periphere unreife $CD2^{-/lo}CD3^+$ T-Zellpopulation, die entweder den TCR $\alpha\beta$ oder den TCR $\gamma\delta$ exprimiert ¹⁵⁸. Diese T-Zellpopulation ist mit einem Anteil von <0,1% des peripheren T-Zellpools sehr klein ¹⁵⁸. Sie verfügt jedoch über ein hohes proliferatives Potential und proliferiert nach TCR-vermittelter Stimulation signifikant stärker als reife $CD2^+$ T-Zellen ¹⁵⁸. $CD2^{-/lo}$ T-Zellen entwickelten sich in vitro in der Gegenwart von IL-2 und ohne exogene CD3-vermittelte Stimulation zu funktionell reifen $CD2^+$ T-Zellen ¹⁵⁸. Die einzelnen Entwicklungsschritte können anhand der Produktion unterschiedlicher Zytokine unterschieden werden: $CD2^{-/lo}$ T-Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13. Während der Entwicklung in reife $CD2^+$ T-Zellen verlieren sie diese Fähigkeit und zeichnen sich durch die Produktion von IFN- γ , TNF- α und letztendlich IL-10 aus ¹⁵⁸. $CD2^{-/lo}$ T-Zellen zeigen hinsichtlich Phänotyp und Entwicklung Parallelen zu frühen thymischen T-Zellen ¹⁵⁸. Loza et al. schließen daraus, dass es sich bei den $CD2^{-/lo}$ T-Zellen um T-Zellvorläufer handelt, die extrathymisch reifen können und entscheidend an der Homöostase des peripheren T-Zellpools beteiligt sind ¹⁵⁸.

Die mehrheitlich $CD2^{-/lo} V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen zeigen starke Ähnlichkeit zu der beschriebenen $CD2^{-/lo}$ T-Zellpopulation. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen verfügten über ein großes proliferatives Potential und entwickelten sich in Kultur in reife $CD2^+$ T-Zellen. Sie sezernierten IL-4, IFN- γ , TNF- α und IL-10, ein Zytokinprofil, das auf Einzelzellebene für Th0 Zellen spricht. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen könnten somit als potentielle $\gamma\delta$ T-Zellvorläufer extrathymisch an der Aufrechterhaltung des peripheren $\gamma\delta$ T-Zellpools beteiligt sein.

Loza et al stellen die Theorie auf ¹⁵⁹, dass Th2 Zellen Vorläuferzellen für Th1 Zellen sind und widersprechen damit dem Th1-Th2-Paradigma,

wonach die Differenzierung von Th1 und Th2 Zellen aus Th0 Zellen TCR-vermittelt abläuft.

Unsere Ergebnisse für $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen unterstützen hingegen das Th1-Th2-Paradigma, da $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen, obwohl zum Teil $CD2^{-}$, alle IL-10 und IFN- γ produzieren und damit im $CD2^{-}$ Stadium ein Th0-Profil vorliegt.

5.5 Schlussfolgerung

Die schwache FOXP3-Expression aller analysierten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen lässt auf eine Funktion von FOXP3 schließen, die über eine alleinige suppressive Funktion hinausgeht. Ob das schwache FOXP3-Signal Ausdruck der Zellaktivierung ist und/oder FOXP3 eine Rolle in der Zellregulation übernimmt, muss in weiteren Studien geklärt werden.

Für die durchflusszytometrische Darstellung $FOXP3^{+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen sind die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper Anti-FoxP3 der Firma abcam und hFoxy der Firma eBioscience nicht geeignet. Inzwischen gibt es eine Vielzahl neuer Antikörper gegen humanes FOXP3, deren Eignung für die Analyse von $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden muss.

Pauciklonale $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen unterschieden sich hinsichtlich ihrer FOXP3-Expression nicht von anderen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen. Da alle analysierten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen schwach FOXP3 exprimierten, ist anzunehmen, dass sich $CD4^{+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen bzgl. ihrer FOXP3-Expression nicht von anderen $\gamma\delta$ T-Zellen abheben. Da jedoch nur eine $V\delta 1^{+}CD4^{+}$ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation untersucht werden konnte, muss diese Annahme durch Folgeversuche bestätigt werden.

Pauciklonale $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen unterschieden sich phänotypisch und funktionell von nTreg, Tr1 und Th3-Zellen. In der MLC kam es in Co-Kultur

mit CD4⁺ T-Helferzellen zu einer Zunahme der Proliferation beider Zellpopulationen.

Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen waren der Suppression durch Treg unterworfen, zeigten jedoch interessanterweise eine suppressions-verstärkende Aktivität. Auch pan γδ T-Zellen verstärkten in der MLC die suppressive Funktion von Treg. Ob es sich hierbei um eine physiologische Funktion von γδ T-Zellen handelt und welcher Mechanismus („infectious tolerance“ ?) hierzu beiträgt, ist zu klären.

Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen können wahrscheinlich anhand der Expression der Marker CD27, CD62L und CCR7 in zwei Gedächtnis-zellpopulationen differenziert werden, die sich analog den T_{CM} und T_{EM} TCRαβ und TCRVδ2 T-Zellen hinsichtlich Funktion und Lokalisation voneinander unterscheiden.

Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen waren negativ für den frühen T-Zellmarker CD2. Loza et al. vermuten, dass CD2⁻ T-Zellen extrathymisch reifen können und als T-Zellvorläufer an der Aufrechterhaltung des peripheren T-Zellpools beteiligt sind¹⁵⁸. Bei den von uns analysierten Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen könnte es sich damit um potentielle T-Zellvorläufer handeln. Dazu würde die in der MLC beschriebene hohe proliferative Aktivität und das breite Zytokinprofil im Sinne eines Th0-Typs passen. Inwieweit CD2⁻ γδ T-Zellen im Allgemeinen und CD2⁻ Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen im Speziellen an der extrathymischen T-Zellreifung beteiligt sind, muss in Folgeversuchen gezeigt werden.

6 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die FOXP3-Expression von γδ T-Zellen untersucht. Wie mittels qRT-PCR gezeigt werden konnte, exprimieren pan γδ T-Zellen das für CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (nTreg) charakteristische Gen FOXP3. Pan γδ T-Zellen exprimieren FOXP3

jedoch 100-200x schwächer als nTreg. Die Analyse der FOXP3-Expression verschiedener $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen sollte zeigen, ob das schwache FOXP3-Signal von pan $\gamma\delta$ T-Zellen einer bestimmten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation zugeordnet werden kann. Mittels MACS-System, Dynabeads und FACS-Technologie konnten folgende $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen gewonnen und hinsichtlich ihrer FOXP3-Expression analysiert werden: 4 x $V\delta 1^+$, 4 x $V\delta 2^+$, 7 x $TCR\gamma\delta^+CD56^+$, 7 x $TCR\gamma\delta^+CD56^-$, 2 x $V\delta 1^+CD56^+$, 2 x $V\delta 1^+CD56^-$, 2 x $V\delta 2^+CD56^+$, 2 x $V\delta 2^+CD56^-$, 2 x $V\delta 1^+CD8^+$, 2 x $V\delta 1^+CD8^-$, 2 x $V\delta 2^+CD8^+$, 1 x $V\delta 2^+CD8^-$.

Alle analysierten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen zeigten eine schwache FOXP3-Expression. Das schwache FOXP3-Signal von pan $\gamma\delta$ T-Zellen kann damit keiner distinkten $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulation zugeordnet werden, sondern kommt durch die mehr oder weniger starke FOXP3-Expression aller untersuchten Subpopulationen zustande. Die intra- und interindividuellen Schwankungen sind wahrscheinlich auf einen unterschiedlichen Aktivierungszustand zurückzuführen.

Die mittels qRT-PCR gewonnenen Daten zur FOXP3-Expression sollten durchflusszytometrisch validiert werden. Zum Nachweis der FOXP3-Expression auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie standen zwei verschiedene Antikörper zur Verfügung: zum einen ein unkonjugierter polyklonaler Kaninchenantikörper gegen humanes FOXP3 der Firma abcam (FOXP3 antibody ab10563), zum anderen ein PE-konjugierter Mausantikörper der Firma eBioscience (hFoxy, Cat. No. 12-5779). Trotz mehrfacher Modifikation der Färbeprotokolle waren in unseren Versuchen die Antikörper FOXP3 antibody der Firma abcam und hFoxy der Firma eBioscience für die Analyse der FOXP3-Expression der o.g. $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen nicht geeignet.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde eine $CD4^+CD25^+$ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation gewonnen und in Hinblick auf potentielle regulatorische Eigenschaften mittels qRT-PCR, Durchflusszytometrie und Proliferationsassay

charakterisiert. Für die pauciklonale $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellpopulation ist zusammenfassend zu sagen, dass

1. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen eine schwache FOXP3-Expression zeigen, sich hinsichtlich ihre FOXP3-Expression von anderen $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen jedoch nicht abheben;
2. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen sich phänotypisch von nTreg-, Tr1- und Th3-Zellen unterscheiden;
3. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen sich funktionell von nTreg-, Tr1- und Th2 Zellen unterscheiden: keine suppressive Funktion in der MLC, jedoch selbst Suppression durch Treg unterworfen;
4. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen in der MLC die suppressive Funktion von Treg verstärken („infectious tolerance“/ andere suppressionsverstärkende Mechanismen?);
5. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl auf $CD4^+$ Helferzellen als auch auf sich selbst proliferationsfördernd wirken;
6. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen keinen killer-Phänotyp zeigen, die Induktion eines killer-Phänotypes jedoch evtl. möglich ist;
7. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen keine professionelle antigenpräsentierende Funktion aufweisen;
8. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen die tolerogenen Zytokine IL-4, IL-10 sowie die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IFN- γ produzieren (Th0-Profil); keine Assoziation der CD4-Expression mit der Ausbildung eines Th2-Typs.
9. $CD62L^+CCR7^+$ $V\delta 1^{4+25+}$ T-Zellen in sekundäres lymphatisches Gewebe migrieren können;
10. $V\delta 1^{4+25+}$ $\gamma\delta$ T-Zellen sich wahrscheinlich aus zentralen Gedächtniszellen (T_{CM}) und Gedächtniszellen mit Effektorfunktion (T_{EM}) zusammensetzen, dies jedoch durch eine simultane Färbung von CD45RA, CD27, CCR7 und CD62L sowie die Färbung von Chemokinrezeptoren für entzündliches Gewebe (CCR1, CCR2, CCR5, CCR3, CCR6, CXCR3) bestätigt werden muss;

11. CD2⁻ Vδ1⁴⁺²⁵⁺ γδ T-Zellen evtl. T-Zellvorläuferzellen sind, die extrathymisch reifen können und an der Homöostase des peripheren γδ T-Zellpools beteiligt sind.

7 Literatur

Reference List

1. Palmer, E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 383-391 (2003).
2. Weigle, W.O. Analysis of autoimmunity through experimental models of thyroiditis and allergic encephalomyelitis. *Adv. Immunol.* **30**, 159-273 (1980).
3. Guerder, S., Picarella, D.E., Linsley, P.S., & Flavell, R.A. Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor alpha leads to autoimmunity in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 5138-5142 (1994).
4. Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K., & Masuda, T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J. Exp. Med.* **161**, 72-87 (1985).
5. Walker, L.S. & Abbas, A.K. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 11-19 (2002).
6. Shevach, E.M. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 423-449 (2000).
7. Chatenoud, L., Salomon, B., & Bluestone, J.A. Suppressor T cells--they're back and critical for regulation of autoimmunity! *Immunol. Rev.* **182**, 149-163 (2001).
8. Zelenika, D. *et al.* The role of CD4+ T-cell subsets in determining transplantation rejection or tolerance. *Immunol. Rev.* **182**, 164-179 (2001).
9. Sakaguchi, S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**, 455-458 (2000).
10. Maloy, K.J. & Powrie, F. Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* **2**, 816-822 (2001).
11. Caramalho, I. *et al.* Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* **197**, 403-411 (2003).

12. Sakaguchi,S. *et al.* Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* **182**, 18-32 (2001).
13. Groux,H. *et al.* A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742 (1997).
14. Chen,Y., Kuchroo,V.K., Inobe,J., Hafler,D.A., & Weiner,H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-1240 (1994).
15. Xystrakis,E. *et al.* Identification of a novel natural regulatory CD8 T-cell subset and analysis of its mechanism of regulation. *Blood* **104**, 3294-3301 (2004).
16. Fischer,K. *et al.* Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* **105**, 2828-2835 (2005).
17. Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., & Toda,M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151-1164 (1995).
18. Baecher-Allan,C., Brown,J.A., Freeman,G.J., & Hafler,D.A. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* **167**, 1245-1253 (2001).
19. Itoh,M. *et al.* Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* **162**, 5317-5326 (1999).
20. Papiernik,M., de Moraes,M.L., Pontoux,C., Vasseur,F., & Penit,C. Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int. Immunol.* **10**, 371-378 (1998).
21. Takahashi,T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* **10**, 1969-1980 (1998).
22. Romagnoli,P., Hudrisier,D., & van Meerwijk,J.P. Preferential recognition of self antigens despite normal thymic deletion of

- CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J. Immunol.* **168**, 1644-1648 (2002).
23. Walker, M.R. *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J. Clin. Invest* **112**, 1437-1443 (2003).
 24. Fu, S. *et al.* TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + C. *Am. J. Transplant.* **4**, 1614-1627 (2004).
 25. Fantini, M.C. *et al.* Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J. Immunol.* **172**, 5149-5153 (2004).
 26. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J. Immunol.* **164**, 183-190 (2000).
 27. Tsubata, T., Wu, J., & Honjo, T. B-cell apoptosis induced by antigen receptor crosslinking is blocked by a T-cell signal through CD40. *Nature* **364**, 645-648 (1993).
 28. Sakaguchi, S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 531-562 (2004).
 29. Cottrez, F. & Groux, H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* **77**, S12-S15 (2004).
 30. Jordan, M.S. *et al.* Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* **2**, 301-306 (2001).
 31. Stephens, L.A., Mottet, C., Mason, D., & Powrie, F. Human CD4(+)CD25(+) thymocytes and peripheral T cells have immune suppressive activity in vitro. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1247-1254 (2001).
 32. Jonuleit, H. *et al.* Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **193**, 1285-1294 (2001).
 33. Taams, L.S. *et al.* Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur. J. Immunol.* **31**, 1122-1131 (2001).

34. Ng,W.F. *et al.* Human CD4(+)CD25(+) cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* **98**, 2736-2744 (2001).
35. Powrie,F. & Mason,D. OX-22high CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22low subset. *J. Exp. Med.* **172**, 1701-1708 (1990).
36. Fowell,D. & Mason,D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J. Exp. Med.* **177**, 627-636 (1993).
37. Read,S., Malmstrom,V., & Powrie,F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **192**, 295-302 (2000).
38. Shimizu,J., Yamazaki,S., Takahashi,T., Ishida,Y., & Sakaguchi,S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* **3**, 135-142 (2002).
39. McHugh,R.S. *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* **16**, 311-323 (2002).
40. Liu,W. *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1701-1711 (2006).
41. Seddiki,N. *et al.* Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* **203**, 1693-1700 (2006).
42. Hori,S., Nomura,T., & Sakaguchi,S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061 (2003).
43. Schubert,L.A., Jeffery,E., Zhang,Y., Ramsdell,F., & Ziegler,S.F. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J. Biol. Chem.* **276**, 37672-37679 (2001).
44. Fontenot,J.D., Gavin,M.A., & Rudensky,A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 330-336 (2003).

45. Khattri,R., Cox,T., Yasayko,S.A., & Ramsdell,F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**, 337-342 (2003).
46. Holm,T.L., Nielsen,J., & Claesson,M.H. CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *APMIS* **112**, 629-641 (2004).
47. Seddon,B. & Mason,D. Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity. *J. Exp. Med.* **189**, 877-882 (1999).
48. Levings,M.K., Sangregorio,R., & Roncarolo,M.G. Human cd25(+)/cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J. Exp. Med.* **193**, 1295-1302 (2001).
49. Bluestone,J.A. & Abbas,A.K. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 253-257 (2003).
50. Vieira,P.L. *et al.* IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **172**, 5986-5993 (2004).
51. Waldmann,H. *et al.* Regulatory T cells and organ transplantation. *Semin. Immunol.* **16**, 119-126 (2004).
52. Dieckmann,D., Plottner,H., Berchtold,S., Berger,T., & Schuler,G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)/CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J. Exp. Med.* **193**, 1303-1310 (2001).
53. Stassen,M. *et al.* Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 1303-1311 (2004).
54. Godfrey,V.L., Wilkinson,J.E., & Russell,L.B. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am. J. Pathol.* **138**, 1379-1387 (1991).
55. Kanangat,S. *et al.* Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur. J. Immunol.* **26**, 161-165 (1996).
56. Brunkow,M.E. *et al.* Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**, 68-73 (2001).

57. Gambineri,E., Torgerson,T.R., & Ochs,H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**, 430-435 (2003).
58. Wildin,R.S. *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* **27**, 18-20 (2001).
59. Powell,B.R., Buist,N.R., & Stenzel,P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J. Pediatr.* **100**, 731-737 (1982).
60. Bennett,C.L. *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat. Genet.* **27**, 20-21 (2001).
61. Chatila,T.A. *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest* **106**, R75-R81 (2000).
62. Mombaerts,P., Arnoldi,J., Russ,F., Tonegawa,S., & Kaufmann,S.H. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* **365**, 53-56 (1993).
63. D'Souza,C.D. *et al.* An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* **158**, 1217-1221 (1997).
64. Mukasa,A. *et al.* Bacterial infection of the testis leading to autoaggressive immunity triggers apparently opposed responses of alpha beta and gamma delta T cells. *J. Immunol.* **155**, 2047-2056 (1995).
65. Peng,S.L., Madaio,M.P., Hayday,A.C., & Craft,J. Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells. *J. Immunol.* **157**, 5689-5698 (1996).
66. Hayday,A. & Tigelaar,R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 233-242 (2003).
67. Kapp,J.A., Kapp,L.M., McKenna,K.C., & Lake,J.P. gammadelta T-cell clones from intestinal intraepithelial lymphocytes inhibit development of CTL responses ex vivo. *Immunology* **111**, 155-164 (2004).

68. Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W.L., & Boismenu, R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 14338-14343 (2002).
69. Holt, P.G. & Sly, P.D. gammadelta T cells provide a breath of fresh air for asthma research. *Nat. Med.* **5**, 1127-1128 (1999).
70. Lahn, M. The role of gammadelta T cells in the airways. *J. Mol. Med.* **78**, 409-425 (2000).
71. Mincheva-Nilsson, L. *et al.* Gamma delta T cells of human early pregnancy decidua: evidence for local proliferation, phenotypic heterogeneity, and extrathymic differentiation. *J. Immunol.* **159**, 3266-3277 (1997).
72. Nagaeva, O., Jonsson, L., & Mincheva-Nilsson, L. Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadelta T cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. *Am. J. Reprod. Immunol.* **48**, 9-17 (2002).
73. Schorle, H., Holtschke, T., Hunig, T., Schimpl, A., & Horak, I. Development and function of T cells in mice rendered interleukin-2 deficient by gene targeting. *Nature* **352**, 621-624 (1991).
74. Almeida, A.R., Legrand, N., Papiernik, M., & Freitas, A.A. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J. Immunol.* **169**, 4850-4860 (2002).
75. Salomon, B. *et al.* B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.* **12**, 431-440 (2000).
76. Baecher-Allan, C., Viglietta, V., & Hafler, D.A. Inhibition of human CD4(+)/CD25(+high) regulatory T cell function. *J. Immunol.* **169**, 6210-6217 (2002).
77. Nocentini, G. *et al.* A new member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor family inhibits T cell receptor-induced apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **94**, 6216-6221 (1997).
78. Thornton, A.M. & Shevach, E.M. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* **188**, 287-296 (1998).
79. Allan, S.E. *et al.* Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int. Immunol.* **19**, 345-354 (2007).

80. Kasprowicz,D.J., Smallwood,P.S., Tyznik,A.J., & Ziegler,S.F. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J. Immunol.* **171**, 1216-1223 (2003).
81. Brenner,M.B. *et al.* Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* **322**, 145-149 (1986).
82. Lanier,L.L. *et al.* Structural and serological heterogeneity of gamma/delta T cell antigen receptor expression in thymus and peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* **18**, 1985-1992 (1988).
83. Groh,V. *et al.* Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* **169**, 1277-1294 (1989).
84. Hayday,A.C. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* **18**, 975-1026 (2000).
85. Arden,B., Clark,S.P., Kabelitz,D., & Mak,T.W. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* **42**, 455-500 (1995).
86. Hinz,T. *et al.* Identification of the complete expressed human TCR V gamma repertoire by flow cytometry. *Int. Immunol.* **9**, 1065-1072 (1997).
87. Porcelli,S., Brenner,M.B., & Band,H. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol. Rev.* **120**, 137-183 (1991).
88. Deusch,K. *et al.* A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur. J. Immunol.* **21**, 1053-1059 (1991).
89. Tanaka,Y. *et al.* Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* **375**, 155-158 (1995).
90. Bukowski,J.F., Morita,C.T., & Brenner,M.B. Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity.* **11**, 57-65 (1999).
91. Kunzmann,V. *et al.* Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* **96**, 384-392 (2000).

92. Kunzmann,V., Bauer,E., & Wilhelm,M. Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N. Engl. J. Med.* **340**, 737-738 (1999).
93. Constant,P. *et al.* Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* **264**, 267-270 (1994).
94. Chien,Y.H. & Konigshofer,Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol. Rev.* **215**, 46-58 (2007).
95. Alexopoulou,L., Holt,A.C., Medzhitov,R., & Flavell,R.A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**, 732-738 (2001).
96. Morita,C.T. *et al.* Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by human gammadelta T cells. *Microbes. Infect.* **1**, 175-186 (1999).
97. Eberl,M., Jomaa,H., & Hayday,A.C. Integrated immune responses to infection - cross-talk between human gammadelta T cells and dendritic cells. *Immunology* **112**, 364-368 (2004).
98. Begley,M. *et al.* The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gammadelta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett.* **561**, 99-104 (2004).
99. Das,H., Wang,L., Kamath,A., & Bukowski,J.F. Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood* **98**, 1616-1618 (2001).
100. Kamath,A.B. *et al.* Antigens in tea-beverage prime human Vgamma 2Vdelta 2 T cells in vitro and in vivo for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **100**, 6009-6014 (2003).
101. Kabelitz,D., Wesch,D., & Hinz,T. gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin. Immunopathol.* **21**, 55-75 (1999).
102. Bukowski,J.F., Morita,C.T., & Brenner,M.B. Recognition and destruction of virus-infected cells by human gamma delta CTL. *J. Immunol.* **153**, 5133-5140 (1994).
103. Green,A.E. *et al.* Recognition of nonpeptide antigens by human V gamma 9V delta 2 T cells requires contact with cells of human origin. *Clin. Exp. Immunol.* **136**, 472-482 (2004).
104. Tanaka,Y. *et al.* Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 8175-8179 (1994).

105. Nishimura,H. *et al.* Contribution of complementarity-determining region 3 of the T-cell receptor Vdelta2 chain to the recognition of aminobisphosphonates by human gammadelta T-cells. *Int. J. Hematol.* **79**, 369-376 (2004).
106. Spada,F.M. *et al.* Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J. Exp. Med.* **191**, 937-948 (2000).
107. Dechanet,J. *et al.* Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J. Clin. Invest* **103**, 1437-1449 (1999).
108. Boullier,S., Cochet,M., Poccia,F., & Gougeon,M.L. CDR3-independent gamma delta V delta 1+ T cell expansion in the peripheral blood of HIV-infected persons. *J. Immunol.* **154**, 1418-1431 (1995).
109. Glatzel,A. *et al.* The responsiveness of human V delta 1 gamma delta T cells to *Borrelia burgdorferi* is largely restricted to synovial-fluid cells from patients with Lyme arthritis. *J. Infect. Dis.* **186**, 1043-1046 (2002).
110. Uyemura,K. *et al.* Evidence for clonal selection of gamma/delta T cells in response to a human pathogen. *J. Exp. Med.* **174**, 683-692 (1991).
111. Chowers,Y., Holtmeier,W., Harwood,J., Morzycka-Wroblewska,E., & Kagnoff,M.F. The V delta 1 T cell receptor repertoire in human small intestine and colon. *J. Exp. Med.* **180**, 183-190 (1994).
112. Holtmeier,W., Chowers,Y., Lumeng,A., Morzycka-Wroblewska,E., & Kagnoff,M.F. The delta T cell receptor repertoire in human colon and peripheral blood is oligoclonal irrespective of V region usage. *J. Clin. Invest* **96**, 1108-1117 (1995).
113. Groh,V., Steinle,A., Bauer,S., & Spies,T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* **279**, 1737-1740 (1998).
114. Fisch,P. *et al.* Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur. J. Immunol.* **27**, 3368-3379 (1997).

115. Gober,H.J. *et al.* Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* **197**, 163-168 (2003).
116. Schilbach,K.E., Geiselhart,A., Wessels,J.T., Niethammer,D., & Handgretinger,R. Human gammadelta T lymphocytes exert natural and IL-2-induced cytotoxicity to neuroblastoma cells. *J. Immunother.* **23**, 536-548 (2000).
117. Dieli,F. *et al.* Induction of gammadelta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. *Blood* **102**, 2310-2311 (2003).
118. Fisch,P. *et al.* Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* **250**, 1269-1273 (1990).
119. Kabelitz,D., Wesch,D., Pitters,E., & Zoller,M. Potential of human gammadelta T lymphocytes for immunotherapy of cancer. *Int. J. Cancer* **112**, 727-732 (2004).
120. Wilhelm,M. *et al.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* **102**, 200-206 (2003).
121. Kato,Y., Tanaka,Y., Miyagawa,F., Yamashita,S., & Minato,N. Targeting of tumor cells for human gammadelta T cells by nonpeptide antigens. *J. Immunol.* **167**, 5092-5098 (2001).
122. Holtmeier,W. & Kabelitz,D. gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem. Immunol. Allergy* **86**, 151-183 (2005).
123. Mak,T.W. & Ferrick,D.A. The gammadelta T-cell bridge: linking innate and acquired immunity. *Nat. Med.* **4**, 764-765 (1998).
124. Lang,F. *et al.* Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *J. Immunol.* **154**, 5986-5994 (1995).
125. Wang,L., Das,H., Kamath,A., & Bukowski,J.F. Human V gamma 2V delta 2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. *J. Immunol.* **167**, 6195-6201 (2001).
126. Ferrick,D.A. *et al.* Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* **373**, 255-257 (1995).

127. Leslie, D.S. *et al.* CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **196**, 1575-1584 (2002).
128. Ismaili, J., Olislagers, V., Poupot, R., Fournie, J.J., & Goldman, M. Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. *Clin. Immunol.* **103**, 296-302 (2002).
129. Jameson, J., Witherden, D., & Havran, W.L. T-cell effector mechanisms: gammadelta and CD1d-restricted subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 349-353 (2003).
130. Gascan, H. *et al.* Membranes of activated CD4+ T cells expressing T cell receptor (TcR) alpha beta or TcR gamma delta induce IgE synthesis by human B cells in the presence of interleukin-4. *Eur. J. Immunol.* **22**, 1133-1141 (1992).
131. Haecker, G. & Wagner, H. Proliferative and cytolytic responses of human gamma delta T cells display a distinct specificity pattern. *Immunology* **81**, 564-568 (1994).
132. Kaufmann, S.H., Blum, C., & Yamamoto, S. Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 9620-9624 (1993).
133. Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R., & Lechler, R. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science* **264**, 1587-1589 (1994).
134. Taams, L.S. *et al.* Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell. *Eur. J. Immunol.* **28**, 2902-2912 (1998).
135. Cohen, J.L., Trenado, A., Vasey, D., Klatzmann, D., & Salomon, B.L. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J. Exp. Med.* **196**, 401-406 (2002).
136. Couper, K.N. *et al.* IL-10 from CD4CD25Foxp3CD127 adaptive regulatory T cells modulates parasite clearance and pathology during malaria infection. *PLoS. Pathog.* **4**, e1000004 (2008).
137. Spits, H., Lanier, L.L., & Phillips, J.H. Development of human T and natural killer cells. *Blood* **85**, 2654-2670 (1995).
138. Gavin, M.A. *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 6659-6664 (2006).

139. Mantel,P.Y. *et al.* Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J. Immunol.* **176**, 3593-3602 (2006).
140. Roncador,G. *et al.* Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1681-1691 (2005).
141. Allan,S.E. *et al.* The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J. Clin. Invest* **115**, 3276-3284 (2005).
142. Chen,W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+. *J. Exp. Med.* **198**, 1875-1886 (2003).
143. Li,B. & Greene,M.I. FOXP3 actively represses transcription by recruiting the HAT/HDAC complex. *Cell Cycle* **6**, 1432-1436 (2007).
144. Li,B. *et al.* FOXP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune disease. *Int. Immunol.* **19**, 825-835 (2007).
145. Sakaguchi,S. & Powrie,F. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* **317**, 627-629 (2007).
146. Li,B. *et al.* FOXP3 ensembles in T-cell regulation. *Immunol. Rev.* **212**, 99-113 (2006).
147. Bacchetta,R. *et al.* Defective regulatory and effector T cell functions in patients with FOXP3 mutations. *J. Clin. Invest* **116**, 1713-1722 (2006).
148. Allakhverdi,Z. *et al.* Expression of CD103 identifies human regulatory T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.* **118**, 1342-1349 (2006).
149. Suffia,I., Reckling,S.K., Salay,G., & Belkaid,Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* **174**, 5444-5455 (2005).
150. Wen,L. *et al.* Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. *J. Immunol.* **160**, 1965-1974 (1998).
151. Gunn,M.D. *et al.* Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J. Exp. Med.* **189**, 451-460 (1999).

152. Michie,C.A., McLean,A., Alcock,C., & Beverley,P.C. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* **360**, 264-265 (1992).
153. Sallusto,F., Lenig,D., Forster,R., Lipp,M., & Lanzavecchia,A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712 (1999).
154. Dieli,F. *et al.* Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J. Exp. Med.* **198**, 391-397 (2003).
155. Brandes,M., Willimann,K., & Moser,B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* **309**, 264-268 (2005).
156. Ye,Z., Haley,S., Gee,A.P., Henslee-Downey,P.J., & Lamb,L.S., Jr. In vitro interactions between gamma deltaT cells, DC, and CD4+ T cells; implications for the immunotherapy of leukemia. *Cytotherapy.* **4**, 293-304 (2002).
157. Makishima,H. *et al.* Lymphoproliferative disease of granular lymphocytes with T-cell receptor gamma delta-positive phenotype: restricted usage of T-cell receptor gamma and delta subunit genes. *Eur. J. Haematol.* **70**, 212-218 (2003).
158. Loza,M.J. *et al.* Human peripheral CD2-/lo T cells: an extrathymic population of early differentiated, developing T cells. *Int. Immunol.* **17**, 1213-1225 (2005).
159. Loza,M.J. & Perussia,B. Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1-type 2 differentiation? *Nat. Immunol.* **2**, 917-924 (2001).

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

HLA	human leucocyte antigen
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IPEX-Syndrom	Immundysregulation Polyendokrinopathie Enteropathie X-chromosomales Syndrom
MLC	mixed lymphocyte culture
nTreg	natürliche regulatorische CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Zellen
OKT3	Anti-T-Zell Antikörper
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PHA	Phythämagglutinin
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
RT	Raumtemperatur
scurfy-Maus	Mausmodell für das IPEX-Syndrom
TCR	T-Zellrezeptor
Treg	regulatorische T-Zellen

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Generierung von CD4⁺ γδ T-Zellen.....	48
Abb. 4.1: FOXP3-Expression von nTreg und pan γδ T-Zellen (n=2).	51
Abb. 4.2: FOXP3-Expression von Vδ1⁺ und Vδ2⁺ T-Zellen.....	54
Abb. 4.3: Vergleich der FOXP3-Expression von CD56⁻ und CD56⁺ γδ T-Zellen.....	55
Abb. 4.4: Vergleich der FOXP3-Expression von CD56⁺ und CD56⁻ γδ T-Zellen (Student t-Test).....	55
Abb. 4.5: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ1 CD56⁺ vs. Vδ1 CD56⁻ γδ T-Zellen.....	58
Abb. 4.6: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ2⁺CD56⁻ vs. Vδ2⁺CD56⁺ γδ T-Zellen.....	58

Abb. 4.7: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ1⁺CD8⁺ vs. Vδ1⁺CD8⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen. Daten von 2 unabhängigen Versuchen und 1 Spender. Reinheit der $\gamma\delta$ Subpopulationen im 2. Versuch nur 50%.....	59
Abb. 4.8: Vergleich der FOXP3-Expression von Vδ2 CD8⁺ vs. Vδ2 CD8⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen. Daten von 2 unabhängigen Versuchen und 1 Spender.....	59
Abb. 4.9: Anfärbarkeit von PBMCs mit anti-FoxP3 Antikörper der Firma abcam (FoxP3 antibody ab10563) : dosisabhängige und somit unspezifische Bindung des anti-FoxP3 Antikörpers.....	61
Abb. 4.10: Anfärbarkeit von PBMCs mit hFoxy der Firma eBioscience (Cat. No. 12-5779) und Expression von CD4 bzw. CD8. Daten repräsentativ für 4 weitere Versuche.....	62
Abb. 4.11: Anfärbarkeit von TCR$\alpha\beta$ T-Zellen mit hFoxy.....	63
Abb. 4.12: Anfärbarkeit von TCR$\gamma\delta$ T-Zellen mit hFoxy.....	63
Abb. 4.13: Anfärbarkeit von CD2⁺ Zellen mit hFoxy.....	63
Abb. 4.14: Anfärbarkeit von CD3⁺ und CD3⁻ Zellen mit hFoxy der Firma eBioscience (Cat. No. 12-5779) und Expression von CD4 bzw. CD8 durch CD3⁺hFoxy⁺ Zellen.....	64
Abb. 4.15: TCR $\gamma\delta$ Spectratype-Analyse der generierten CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen.....	67
Abb. 4.16: Durchflusszytometrische Analyse von Vδ1⁺CD4⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen bezüglich der Expression von Markern charakteristisch für regulatorisches Potential.....	69
Abb. 4.17: FOXP3-Expression der isolierten Vδ1 CD4⁺CD25⁺CD56⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu Vδ1 CD56⁺ und Vδ1 CD56⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen.....	70
Abb. 4.18: FOXP3-Expression von $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen eines Spenders im Vergleich.....	71
Abb. 4.19: Produktion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 von Vδ1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen.....	71
Abb. 4.20: Produktion der Th1-Zytokine IFN-γ und TNF-α von Vδ1⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen.....	72

Abb. 4.21: Expression zytotoxischer Effektormoleküle von V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen.....	74
Abb. 4.22: Expression der Adhäsionsmoleküle CD56, CD54, CD44 und CD11c von V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen.....	75
Abb. 4.23: Expression von Markern charakteristisch die Lymphknotenmigration von V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen.....	75
Abb. 4.24: Expression von CD27.....	76
Abb. 4.25: Expression von CD80, CD83, CD86 und CD40 von V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen.....	77
Abb. 4.26: Expression von Adhäsionsmolekülen und Markern typisch für antigenpräsentierende Zellen von V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen und CD4 ⁺ TCR $\alpha\beta$ T-Zellen.....	78
Abb. 4.27: Verhalten der V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ T-Zellpopulation im Proliferationsassay.....	79
Abb. 4.28: CD2 Expression von V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen.....	80

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 4.1: Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an der Gesamtzahl der peripheren Lymphozyten von 6 Spendern und Expression von CD4 ⁺ und CD8 ⁺	53
Tab 4.2: Expression von Markern typisch für regulatorische T-Zellen; Vergleichende Gegenüberstellung von V δ 1 ⁴⁺²⁵⁺ T-Zellen, nTreg, Tr1, Th3, aktivierte konv. CD4 ⁺ T-Zellen und pan $\gamma\delta$ T-Zellen.....	72

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. med. R. Handgretinger bedanke ich mich herzlich für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in den Laborräumen der Hämatologie/Onkologie der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen durchführen zu können.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Klaus Frommer bedanke ich mich für die Hilfe bei der Bedienung des LightCyclers und bei Herrn Dr. med. Matthias Eyrich ganz herzlich für die Durchführung des Spektratypes. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. rer. nat. Hans-Jörg Bühring und Herrn Dr. med. Matthias Pfeiffer für die zeitintensive und geduldige Hilfe bei der FACS-Isolierung.

Ein ganz großes Dankeschön an die Korrekturleser und an meinen Ehemann und meine Eltern, die mich kräftig unterstützten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Karin Schilbach-Stückle für die Überlassung des Themas, die ausgezeichnete Betreuung, ihre Unterstützung und ihre Freundschaft.

Lebenslauf

Persönliche Daten: Name: Karoline Pfeiffer, geb. Bracht
Geburtsdatum: 16.10.1980
Geburtsort: Frechen
Familienstand: verheiratet, ein Kind
Eltern: Dr. rer.nat. Angelika Gauss (verwitwete Bracht)
Dr. ing. Karl-Friedrich Bracht (verstorben 1986)

Ausbildung: 1987 – 1989 Grundschule Forsbach
1990 – 1991 Grundschule Weil der Stadt
1991 – 2000 Johannes-Kepler-Gymnasium Weil der Stadt
September 1996 bis Dezember 1996: Auslandsaufenthalt
im Internat Jacques-Amyot in Auxerre
Juni 2000: Abitur
Oktober 2000: Beginn des Psychologiestudiums an der
Eberhard Karls Universität Tübingen
Dezember 2000 bis Februar 2001: Pflegepraktikum in der
BG Unfallklinik Tübingen
April 2001: Studienfachwechsel: Beginn des Medizin-
studiums an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Oktober 2003-Oktober 2004: Stipendiatin des
Promotionskollegs des Interdisziplinären Zentrums für
Klinische Forschung (IZKF); Promotion in der Abteilung
Kinderheilkunde I mit Poliklinik, Universitätsklinik für
Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Februar 2007: Beginn des Praktischen Jahres im Klinikum
Böblingen/Sindelfingen
August 2007: Geburt unseres Sohnes
Dezember 2008: Beendigung des Praktischen Jahres
27.10.2009: 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung