

Charakterisierung von humanen  
 $\gamma\delta$  T-Lymphozyten  
als Komponenten  
der frühen Immunantwort

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Lothar Marischen

Kiel, 2012



Erster Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Bosch  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Dieter Kabelitz

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2013  
Zum Druck genehmigt: 14.02.2013

gez. Prof. Dr. Wolfgang J. Duschl, Dekan



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Immunsystem	11
1.1.1 Angeborenes Immunsystem	12
1.1.2 Erworbenes Immunsystem	13
1.1.3 Kooperation zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem	13
1.2 T-Zellen	14
1.2.1 $\alpha\beta$ T-Lymphozyten	14
1.2.2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten	16
1.3 Ausgewählte Funktionen von Immunzellen	23
1.3.1 Migration	23
1.3.2 Mustererkennungsrezeptoren	28
1.3.3 Zytokine und antimikrobielle Peptide	32
<b>2 Fragestellung der Arbeit</b>	<b>39</b>
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>41</b>
3.1 Material	41
3.1.1 Geräte	41
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	43
3.1.3 Material für zellbiologische Methoden	44
3.1.4 Material für molekularbiologische Methoden	52
3.1.5 Material für proteinbiochemische Methoden	55
3.2 Methoden	61
3.2.1 Zellbiologische Methoden	61
3.2.2 Molekularbiologische Methoden	71
3.2.3 Proteinbiochemische Methoden	74
3.2.4 Statistik	78
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>79</b>
4.1 Expression von Chemokinrezeptoren auf $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben	79
4.1.1 Blut: Expression von Chemokinrezeptoren auf frisch isolierten V $\delta$ 1 vs. V $\delta$ 2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten	79
4.1.2 Dünndarm, Blut und Synovialflüssigkeit: Expression von Chemokinrezeptoren auf frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Zelllinien	81
4.1.3 Fazit	87
4.2 Expression von NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten	88
4.2.1 Expression von funktionalem NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten enthaltenden PBMZ	89
4.2.2 Expression von funktionalem TLR2 und NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im PBMZ-Verband	91
4.2.3 Expression von funktionalem NOD2 durch hochrein isolierte CD4 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten	97
4.2.4 Fazit	104
4.3 Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit <i>Ps. aeruginosa</i>	105
4.3.1 Induktion der Expression von Botenstoffen	105
4.3.2 Induktion der Expression von antimikrobiellen Molekülen	107
4.3.3 Fazit	118

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>119</b>
5.1	Expression von Chemokinrezeptoren auf $\gamma\delta$ T-Lymphozyten . . . . .	119
5.1.1	Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus dem Blut . . . . .	120
5.1.2	Chemokinrezeptorexpression auf $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus Dünndarm und anderen Geweben	124
5.1.3	Fazit . . . . .	128
5.2	TLRs und NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und anderen Immunzellen . . . . .	129
5.2.1	TLRs . . . . .	129
5.2.2	NOD2 . . . . .	130
5.2.3	Fazit . . . . .	134
5.3	Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit <i>Ps. aeruginosa</i> . .	135
5.3.1	Produktion von Zytokinen . . . . .	136
5.3.2	Expression von AMPs . . . . .	137
5.3.3	Fazit . . . . .	139
5.4	Charakterisierung von humanen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten als Komponenten der frühen Immunantwort	140
5.5	Ausblick . . . . .	141
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>145</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>175</b>
9.1	Abbildungsverzeichnis . . . . .	175
9.2	Tabellenverzeichnis . . . . .	176
9.3	Publikationsliste . . . . .	177
9.4	Erklärung . . . . .	179
9.5	Danksagung . . . . .	180

# Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit werden die Abkürzungen des Internationalen Einheitensystems (Système international d'unités (SI)), die SI-Präfixe (m-,  $\mu$ -, n-, p-, k-...) und die Bedeutung chemischer Summenformeln ( $^3\text{H}$ ,  $\text{NaN}_3$ ...) als bekannt vorausgesetzt. Aminosäuren werden entsprechend der auch in Fachbüchern genutzten Empfehlungen der *Joint Commission on Biochemical Nomenclature* (Met, Lys...) abgekürzt<sup>[1]</sup>. Bundesstaaten der Vereinigten Staaten von Amerika werden entsprechend der Vorschrift 3166-2 der *International Organization for Standardization* (ISO) mit ihrem postalischen Kürzel bezeichnet (CA = California, NJ = New Jersey...). Wird eine Abkürzung bei jeder Verwendung direkt erläutert, so wird sie nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Darüber hinaus in der vorliegenden Arbeit verwendete Abkürzungen werden in der folgenden Liste dargelegt.

Abkürzung	originärer Begriff	deutsche Bedeutung
(Molekül) <sup>+</sup>		das (Molekül) exprimierend
$\alpha$ (Proteinname)	<i>anti</i> -(Proteinname)	Antikörper gegen (Proteinname)
Abb.		Abbildung
ad		auffüllen auf / bis
ad Vol.	<i>ad Volumina</i>	auf das jeweilige Volumen auffüllen
(Firmenname) AG		Aktiengesellschaft
AG (Personenname)		Arbeitsgruppe
AMP(s)	<i>antimicrobial peptide(s)</i>	antimikrobielle(s) Peptid(e)
APC		Allophycocyanin
APS		Ammoniumperoxydisulfat
APZ(s)		antigenpräsentierende Zelle(n)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	Sammlung von Zelllinien in den Vereinigten Staaten von Amerika
BBS	<i>BES-buffered solution</i>	durch N,N-Bis(2-Hydroxy-Ethyl)-2-Amino-Ethan-Sulfonsäure (BES) gepufferte Lösung
BD		Becton Dickinson
BES		N,N-Bis(2-Hydroxy-Ethyl)-2-Amino-Ethan-Sulfonsäure
Bestnr.		Bestellnummer
BrHPP		Bromo-Hydrin-Pyro-Phosphat
bzw.		beziehungsweise
ca.		zirka
CARD	<i>caspase recruiting and activating domain</i>	Caspase-Rekrutierungs-und-Aktivierungs-Domäne
CAU		Christian-Albrechts-Universität
CCL		Chemokin der CC-Familie
CCR		Chemokinrezeptor der CC-Familie
CD	<i>cluster of differentiation</i>	Gruppe zur (Zell)differenzierung
cDNA(s)	<i>complementary deoxyribonucleic acid(s)</i>	komplementäre Desoxyribonukleinsäure(n)
CPM	<i>counts per minute</i>	Maß für die Radioaktivität
CXCL		Chemokin der CXC-Familie
CXCR		Chemokinrezeptor der CXC-Familie
Da		Dalton
DAMP(s)	<i>danger-associated molecular pattern(s)</i>	Gefahr-assoziierte, molekulare Muster
DC(s)	<i>dendritic cell(s)</i>	dendritische Zelle(n)
ddH <sub>2</sub> O	<i>double-distilled water</i>	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>	Dulbeccos Minimalmedium

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	originärer Begriff	deutsche Bedeutung
DMSO		Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	<i>deoxy-nucleoside-tri-phosphate</i>	Nukleotidmix
<i>E. coli</i>		<i>Escherichia coli</i>
EBV		Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA		Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>	verstärkt grünfluoreszierendes Protein
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Methode zur Bestimmung von Protein- konzentrationen in Flüssigkeit
<i>et al.</i>	<i>et alii / aliae</i>	und andere
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>	fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
Fas	<i>fragment, apoptosis stimulating</i>	Zelltod stimulierendes Fragment
FCS	<i>fetal calve serum</i>	fetales Kälberserum
FITC		Fluoresceinisothiocyanat
FSC	<i>forward scatter</i>	in Richtung des Anregungslaserstrahls gestreutes Licht
g		Gramm
GAPDH		Glycerinaldehyd-3-Phosphat- Dehydrogenase
GE		General Electric
ggf.		gegebenenfalls
GM-Di/Tri-peptid		Glutamyl-Muramyl-Di/Tri-peptid
h		Stunde(n)
HaCaT	<i>human adult low calcium temperature keratinocytes</i>	humane Keratinozytenzelllinie
HBD		humanes $\beta$ -Defensin
hbt		Hycult Biotechnology
HD		humanes Defensin
HEK (293T-Zellen)	<i>human embryonic kidney (293T-cells)</i>	293T-Zellen aus humaner Embryoniere
HIV		humanes Immundefizienzvirus
HLA		humanes Leukozytenantigen
HMB-PP		(E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-enyl- Pyro-Phosphat
HNP	<i>human neutrophil peptide</i>	AMP aus neutrophilen Granulozyten
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>	Meerrettichperoxidase
i.a.R.		in aller Regel
I-TAC (CXCL11)	<i>interferon-inducible T-cell <math>\alpha</math>-chemo- attractant</i>	durch Interferon induzierbares, für T-Zellen chemoattraktives Molekül
IE		internationale Einheiten
IFN		Interferon
Ig		Immunglobulin
IL		Interleukin
IP		Immunpräzipitation
IP-10 (CXCL10)	<i>interferon-<math>\gamma</math>-inducible protein 10</i>	durch IFN- $\gamma$ induziertes Protein 10
IPP		Isopentenyl-Pyro-Phosphat
Kap.		Kapitel
l		Liter
LEAP	<i>liver expressed antimicrobial peptide</i>	AMP aus der Leber
LL-37		AMP bestehend aus 2 * Leuzin + 35 weitere Aminosäuren
LPS		Lipopolysaccharid
M		Molar
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>	magnetisch unterstützte Zellsortierung
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>	Monozyten-chemoattraktives Protein
MDC	<i>macrophage-derived chemokine</i>	Makrophagen-produziertes Chemokin
MDP / MDP-LD	<i>muramyl-dipeptide, LD-isomer</i>	LD-Isomer des Muramyl-dipeptids



Abkürzung	originärer Begriff	deutsche Bedeutung
MDP-DD	<i>muramyl-dipeptide, DD-isomer</i>	DD-Isomer des Muramyldipeptids
MFI		mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC-A / -B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A / -B</i>	MHC-I-ähnliches Protein A / -B
MIG (CXCL9)	<i>monokine-induced by interferon-<math>\gamma</math></i>	von Monozyten nach IFN- $\gamma$ -Stimulation freigesetztes Chemokin
min		Minute(n)
MIP	<i>macrophage inflammatory protein</i>	Entzündungsprotein von Makrophagen
mRNA(s)	<i>messenger ribonucleic acid(s)</i>	Boten-Ribonukleinsäure(n)
NK-Zellen	<i>natural killer cells</i>	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	<i>natural killer T cells</i>	Natürliche Killer-T-Zellen
NLR(s)	<i>nucleotide-binding leucine-rich repeat receptor(s)</i>	eine Familie von Mustererkennungsrezeptoren
NOD1, -2	<i>nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 bzw. 2</i>	NLRs mit CARD-Domänen
NP-40		Nonidet P 40
P/S		Penicillin/Streptomycin
PAA		Polyacrylamid
PAGE		Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Pam <sub>2</sub> CSK4 / PAM2		diacyliertes Lipopeptid, TLR2-Ligand
Pam <sub>3</sub> CSK4 / PAM3		triacyliertes Lipopeptid, TLR2-Ligand
PAMP(s)	<i>pathogen-associated molecular pattern(s)</i>	pathogen-assoziierte(s), molekulare(s) Muster
PBMZ	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>	mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>	Polymerase-Kettenreaktion
PE		Phycoerythrin
pEGFP	<i>plasmid, enhanced green fluorescent protein</i>	Plasmidvektor mit verstärkt grün fluoreszierendem Protein
pEGFP-NOD2		pEGFP, NOD2 kodierend
PFA		Paraformaldehyd
PHA		Phytohämagglutinin
PRR(s)	<i>pattern recognition receptor(s)</i>	Mustererkennungsrezeptor(en)
<i>Ps. aeruginosa</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
qRT-PCR		quantitative Polymerasekettenreaktion nach reverser Transkription
RANTES (CCL5)	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted</i>	ein Chemokin
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i>	Umdrehungen pro Minute
RPMI (Medium)	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>	ein Zellmedium, entwickelt am RPMI
RT		Reverse Transkription
s.		siehe
<i>S. aureus</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>
SCDA	<i>Standard Cell Dilution Analysis</i>	Methode zur Bestimmung der absoluten Zellzahl in Lösung
SDS	<i>sodium dodecyl-sulfate</i>	Natriumdodecylsulfat
SLPI	<i>secretory leukocyte protease inhibitor</i>	Proteaseinhibitor aus Leukozyten
SSC	<i>side scatter</i>	quer zur Richtung des Anregungslaserstrahls gestreutes Licht
T/I		TPA/Ionomycin
Tab.		Tabelle
TAE-Puffer		Tris/Acetat/EDTA-Puffer
TARC (CCL17)	<i>thymus- and activation-regulated chemokine</i>	ein Chemokin

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	originärer Begriff	deutsche Bedeutung
T <sub>CM</sub> -Zelle	<i>central memory T cell</i>	zentrale Gedächtnis-T-Zelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST		TBS mit Tween 20
TECK (CCL25)	<i>thymus-expressed chemokine</i>	ein Chemokin
T <sub>EM</sub> -Zelle	<i>effector memory T cell</i>	Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TEMED		N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
T <sub>H</sub> -Zelle		T-Helferzelle
TLR(s)	<i>Toll-like receptor(s)</i>	Toll-ähnliche(s) Rezeptorprotein(e)
TM	<i>Trademark</i>	eingetragenes Warenzeichen
T <sub>memory</sub> -Zelle	<i>memory T cell</i>	T-Gedächtnis-Zelle
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>	Tumornekrosefaktor
TPA		12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat
Trappin-2	<i>transglutaminase substrate and whey acidic protein domain containing protein 2</i>	Pre-Elafin
T <sub>reg</sub> -Zelle	<i>regulatory T cell</i>	regulatorische T-Zelle
Tris		Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>	ein Zellmedium
T <sub>EMRA</sub> -Zelle	<i>terminally-differentiated effector memory CD45RA<sup>+</sup> T-cell</i>	ausdifferenzierte, CD45RA <sup>+</sup> Effektor-Gedächtnis-T-Zelle
TZR(s)		T-Zellrezeptor(en)
u.a.		unter anderem
UK	<i>United Kingdom</i>	Großbritannien
UK S-H		Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
ÜN		über Nacht
USA	<i>United States of America</i>	Vereinigte Staaten von Amerika
v/v	<i>volume per volume</i>	Volumen pro Volumen
vs.	<i>versus</i>	gegenüber
w/v	<i>weight per volume</i>	Gewicht pro Volumen
WAP	<i>whey acidic protein</i>	Weizenprotein, saure Charakteristik
z.B.		zum Beispiel
z.T.		zum Teil

# 1 Einleitung

## 1.1 Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen umfasst primäre (Knochenmark und Thymus) und sekundäre (Milz, Tonsillen, Peyer-Plaques, Blinddarm und Lymphknoten) lymphatische Organe, mechanische und biochemische Barrieren, Zellprodukte wie Effektormoleküle und Antikörper, das Komplementsystem und die Immunzellen selbst. Diese werden aufgrund ihrer Morphologie als Leukozyten (altgriechisch: *leukos* = weiß, *kytos* = Hülle) oder auch als weiße Blutkörperchen bezeichnet.

Bei Verletzung der körperlichen Integrität reagiert das humane Immunsystem in zwei – in aller Regel (i.a.R.) aufeinander aufbauenden – Stufen. Als die erste Stufe erkennt das **angeborene Immunsystem** Mikroorganismen anhand repetitiver molekularer Muster, wie sie zum Beispiel bei bakteriellen Zellwandbestandteilen vorkommen. Diese werden als *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet (siehe (s.) Kapitel (Kap.) 1.3.2). Zur Bekämpfung des Pathogens werden Komponenten eingesetzt, die in ihrer Intensität unabhängig von eventuellen Vorinfektionen mit dem gleichen Mikroorganismus gegen das Pathogen vorgehen. Zu diesen Komponenten zählen unter anderem (u.a.) das Komplementsystem, Phagozyten und von Epithel- und anderen Zellen freigesetzte Zytokine und antimikrobielle Peptide. Sollten diese Maßnahmen erfolglos sein, so muss darüber hinaus in der zweiten Stufe das **erworbenne Immunsystem** eingeschaltet werden. Dieses beinhaltet mit Antikörpern, T- und B-Zellen Komponenten, die hochspezifisch Bestandteile der molekularen Struktur eines Pathogens erkennen. Führt ein solcher Bestandteil zur Induktion einer Immunantwort, wird er als „Antigen“ bezeichnet. Eine entscheidende Maßnahme bei der adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses für das Antigen. So kann bei einer künftigen Infektion durch das gleiche Pathogen die Immunreaktion deutlich schneller und intensiver ablaufen.

### 1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Das angeborene („*innate*“) Immunsystem beinhaltet alle Barrieren und Bestandteile (auch Zellen) des Körpers gegen das Eindringen eines Fremdorganismus, die nicht spezifisch gegen genau ein bestimmtes Pathogen gerichtet sind und auch nicht zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses gegen genau ein bestimmtes Pathogen beitragen.

Zu den **mechanischen Barrieren** gehören die Haut und die Schleimhäute in Nase, Mund, Rachen, Luftröhre, Vaginal- und Gastrointestinaltrakt. Daneben steht der Körper auch durch Flüssigkeiten wie Tränen, Magensäure und Speichel mit der Umwelt in Kontakt. Häufig verfügen diese Kontaktflächen oder -flüssigkeiten über eine (bio)chemische Barriere wie einen niedrigen pH-Wert („**Säureschutzmantel**“) und dort frei vorliegende oder in peripheren Zellen vorgehaltene **antimikrobielle Peptide (AMPs)**. Neben dem epithelbedeckenden Schleim, der Krankheitserregern das Fortkommen erschwert, sorgen im respiratorischen Trakt zudem die **Zilien der Epithelzellen** für einen konstanten Austransport von Mikroorganismen. Weiterhin erschwert eine **Besiedlung** der Haut, der Schleimhäute und vor allem des Darmepithels **durch nicht pathogene Mikroorganismen** eine starke Vermehrung von pathogenen Bakterien. Gelingt einem Krankheitserreger dennoch der Übertritt ins Gewebe, so kann auch weiterhin eine Erkennung und Bekämpfung durch Bestandteile des angeborenen Immunsystems erfolgen – zum Beispiel (z.B.) durch das Komplementsystem, bestimmte Immunzellen und von diesen oder Epithelzellen exprimierte Effektormoleküle.

Zu den Immunzellen des angeborenen Immunsystems gehören „Natürliche Killerzellen“ (NK-Zellen), die das Antigen *cluster of differentiation No. 14* (CD14) exprimierende (+) Monozyten/Makrophagen, dendritische Zellen (DCs), Mastzellen und Granulozyten. Letztere werden in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterschieden. Zu den Funktionen der Leukozyten gehören die Migration zu einem Infektionsort (s. Kap. 1.3.1), die Erkennung von Pathogenen durch sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (s. Kap. 1.3.2), die Phagozytose von Fremdstoffen oder Bakterien (Monozyten, Makrophagen, DCs, neutrophile Granulozyten), die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Mastzellen, Granulozyten), die direkte Lyse von Pathogenen durch Freisetzung von AMPs (s. Kap. 1.3.3), die Lyse von mit Viren befallener oder entarteter Körperzellen durch die Ausschüttung von Granula (NK-Zellen) und – sollten die Maßnahmen der angeborenen Immunität nicht ausreichen – die Aktivierung des erworbenen Immunsystems durch die Prozessierung und Präsentation von Peptidfragmenten des Pathogens (Makrophagen, DCs) und die Ausschüttung von Effektormolekülen (s. ebenfalls Kap. 1.3.3).

Zu den Effektormolekülen zählen Akutphasenproteine, Blutgerinnung und Gefäßpermeabilität modulierende Plasmaenzyme, AMPs und Zytokine. Letztere werden unterschieden in Chemokine, die der Rekrutierung anderer Immunzellen zum Ort der Infektion dienen, und die Gruppe der Interleukine und Interferone, die eine Kommunikation der Immunzellen untereinander und mit anderen Körperzellen ermöglichen.

## 1.1.2 Erworbenes Immunsystem

Das erworbene – auch „adaptive“ – Immunsystem umfasst T- und B-Zellen und die von ausdifferenzierten B-Zellen („Plasmazellen“) produzierten Antikörper. Dabei stellen T-Zellen die „zelluläre“, Antikörper die „humorale“ Immunantwort. Charakteristisch für das adaptive Immunsystem ist eine hochspezifische Erkennung von Strukturen des Pathogens, ein massives, aber kontrolliertes Vorgehen gegen den Mikroorganismus und die Ausbildung von Gedächtniszellen zur schnelleren Bekämpfung des erfassten Pathogens bei einer künftigen Infektion<sup>[2]</sup>.

## 1.1.3 Kooperation zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem

Komponenten aus beiden Bereichen des Immunsystems sind sowohl im peripheren Gewebe als auch im Blut nebeneinander vertreten. In letzterem werden neben Bestandteilen des Komplementsystems auch Leukozyten aus beiden Teilen des Immunsystems und Antikörper vorrätig gehalten, um bei einer Infektion schnell zum befallenen Gewebe transportiert werden zu können. Darüber hinaus sind beide Bereiche des Immunsystems durch Kooperation miteinander verbunden. So führt beispielsweise die Phagozytose von Pathogenen durch DCs (angeborenes Immunsystem) zur durch den Haupthistokompatibilitätskomplex II (*major histocompatibility complex II* (MHC-II)) vermittelten Präsentation von antigenen Peptiden für T-Zellen, die B-Zellen zur Produktion von Antikörpern stimulieren (erworbenes Immunsystem). Mit Antikörpern (erworbenes Immunsystem) opsonierte Pathogene werden wiederum leichter durch Makrophagen erkannt beziehungsweise (bzw.) durch den klassischen Weg des Komplementsystems (angeborenes Immunsystem) lysiert. Weiterhin sind sowohl dem angeborenen als auch dem erworbenen Immunsystem zugerechnete Immunzellen zur Freisetzung von Zytokinen und chemotaktisch wirksamen Molekülen befähigt, die auch Immunzellen des jeweils anderen Immunsystems aktivieren und/oder zur Infektionsstelle rekrutieren können.

## 1.2 T-Zellen

### 1.2.1 $\alpha\beta$ T-Lymphozyten

$\alpha\beta$  T-Zellen stellen die numerisch größte und am besten untersuchte Population der  $CD3^+$  T-Lymphozyten dar. Die Charakterisierung einer T-Zellsubpopulation (wie den  $\gamma\delta$  T-Zellen) erfolgt daher im Vergleich zu den Eigenschaften von  $\alpha\beta$  T-Zellen, die im Folgenden beschrieben werden.

T-Zellen entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und migrieren als Vorläuferzellen in den Thymus (daher: „**T**(hymus)-Zellen“), wo sie ihre Ausreifung zu immunkompetenten Zellen erfahren. Der T-Zellrezeptor (TZR) besteht aus einem Heterodimer von zumeist einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Polypeptidkette, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die Gen-Loci für TZR- $\alpha$  und TZR- $\beta$  weisen Gensegmente für die Kodierung von V- (*variable* = variabel), J- (*joining* = verbindend) und C- (*constant* = konstant) Segmenten auf, der Gen-Locus für TZR- $\beta$  beinhaltet zusätzlich die Kodierung für D- (*diversity* = diversifizierend) Segmente. Aus einer für jede Kette erfolgenden, somatischen Rekombination der verschiedenen Gensegmente entstehen pro T-Zelle je eine  $\alpha$ - und eine  $\beta$ -Polypeptidkette, die dann als Heterodimer zum TZR der jeweiligen Zelle verbunden werden. Dabei sind alle Segmente bis auf die C-Segmente bei der Ausbildung der Antigenbindungsstelle beteiligt.

Neben dem  $\alpha\beta$  TZR exprimieren die T-Zellen u.a. die Oberflächenproteine CD2, -3, -4 und -8. Während CD2 zur Bindung an das auf der Zelloberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZs) exprimierte *lymphocyte function-associated antigen-3* (LFA-3/CD58) genutzt wird, handelt es sich bei CD3 um ein mit dem TZR assoziierten Rezeptorkomplex, der für die Expression des  $\alpha\beta$ -Heterodimers an der Zelloberfläche und die Signalweiterleitung notwendig ist. CD4 und CD8 stellen TZR-Korezeptoren da, die bei einer Antigenerkennung mit dem TZR assoziieren und an konstante Regionen des auf APZs exprimierten MHC-I bzw. -II binden. Nur durch MHC präsentierte Moleküle können von  $\alpha\beta$  T-Zellen gebunden und gegebenenfalls (ggf.) als Antigen erkannt werden („MHC-Restriktion“).

Den ersten Schritt der spezifischen T-Zell-Erkennung stellt die Präsentation von prozessierten Peptiden an der Oberfläche einer APZ dar. Präsentiert werden zelleigene oder aufgrund eines Virenbefalls produzierte Peptide mittels Glykoproteinen des MHC-I. Dagegen werden Peptide, die aus phagozytierten Fremdorganismen prozessiert worden sind, durch MHC-II-Proteine an der Zelloberfläche von Makrophagen und/oder DCs präsentiert.  **$CD8^+$  T-Zellen** erkennen MHC-I und überprüfen das damit präsentierte Peptid. Handelt es sich um eine körperfremde Struktur, so lysiert die – aus diesem Grund auch als zytotoxische T-Zelle bezeichnete –  $CD8^+$  T-Zelle die betreffende Zelle mittels der Freisetzung von Perforin, Granzym B oder *fragment, apoptosis stimulating* (Fas)-Ligand<sup>[3,4]</sup>.

**CD4<sup>+</sup> T-Zellen**, auch als T-Helferzellen (T<sub>h</sub>-Zellen) bezeichnet, erkennen dagegen MHC-II und analysieren das damit präsentierte Peptid. Wird dieses als Fremdpeptid erkannt, so werden von der CD4<sup>+</sup> T-Zelle weitere Immunzellen aktiviert. Handelt es sich dabei um eine **CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1-Zelle**, so werden Makrophagen aktiviert, handelt es sich um eine **CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>2-Zelle**, so werden B-Zellen aktiviert. Mit entscheidend für die Differenzierung in eine T<sub>h</sub>1- oder T<sub>h</sub>2-Zelle ist die vor Ort vorhandene Konzentration der Zytokine Interleukin (IL)-12, Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (pro T<sub>h</sub>1) und IL-4 (pro T<sub>h</sub>2). Für die vorliegende Arbeit ist der Einfluss von IFN- $\gamma$  von besonderem Interesse: Eine hohe Konzentration bewirkt eine sich selbst verstärkende und durch T<sub>h</sub>1-Zellen dominierte Immunantwort ohne die Produktion und Verwendung von Antikörpern (s. auch Seite 27, Abschnitt „CXCR3“ und 33, Abschnitt „Interferone“). Eine niedrige Konzentration von IFN- $\gamma$  befördert eine durch T<sub>h</sub>2-Zellen und Antikörpern dominierte Immunantwort.

Neben CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1- und T<sub>h</sub>2-Zellen existieren **CD4<sup>+</sup> T<sub>h</sub>17-Zellen**<sup>[5]</sup>. Sie zeichnen sich durch eine starke Produktion von IL-17<sup>[6]</sup> und IL-22 aus. Vor allem IL-17 spielt eine Rolle bei der Immunreaktion gegen eine Vielzahl von Pathogenen<sup>[7]</sup> wie *Klebsiella pneumoniae*<sup>[8]</sup>, *Bacteroides fragilis*<sup>[9]</sup>, *Candida albicans*<sup>[10]</sup>, *Mycobacterium tuberculosis*, *Borrelia burgdorferi*<sup>[11]</sup> oder Zymosan, einem Zellwandbestandteil von Pilzen<sup>[12]</sup>. In Kombination mit IL-22 stimuliert IL-17 die Freisetzung von AMPs durch Keratinozyten<sup>[13]</sup>.

Allerdings konnte ebenfalls eine Beteiligung von T<sub>h</sub>17-Zellen in autoimmunen Reaktionen nachgewiesen werden. So weisen beispielsweise die Untersuchungen von Kebir und anderen (*et al.*) auf die Mitwirkung von T<sub>h</sub>17-Zellen bei der Entwicklung von multipler Sklerose hin<sup>[14]</sup>. Zusammenfassend konnten T<sub>h</sub>17-Zellen also generell als entzündungsfördernde Immunzellen charakterisiert werden, deren eventuelle Überfunktion an einer autoimmunen Reaktion beteiligt sein kann<sup>[7,15]</sup>.

Um schädliche Auswirkungen auf den eigenen Organismus zu vermeiden, müssen Immunreaktionen bereits während der Immunantwort kontrolliert und nach Beseitigung des Pathogens beendet werden. Dabei spielen **regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen)** eine entscheidende Rolle.

Zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis differenziert ein Teil der in der Immunantwort aktiven  $\alpha\beta$  T-Zellen zu **T-Gedächtnis- (T<sub>memory</sub>-) Zellen**. Diese vermitteln bei erneuter Konfrontation mit dem gleichen Pathogen eine schnelle und – in Bezug auf eventuell gebildete Antikörper – optimierte Immunantwort.

Desweiteren exprimieren  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten auch verschiedene *Toll-like*- und damit eigentlich dem angeborenen Immunsystem zugerechnete Mustererkennungsrezeptoren<sup>[16,17]</sup>. Durch die damit mögliche Erkennung von PAMPs können  $\alpha\beta$  T-Zellen bei Kontakt mit Pathogenen eine schnelle Immunreaktion auslösen.

## 1.2.2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

$\gamma\delta$  T-Lymphozyten repräsentieren eine numerisch kleine Subpopulation innerhalb der  $CD3^+$  T-Zellen. Namensgebend ist die Verwendung von  $\gamma$ - und  $\delta$ - statt  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptidketten zur Ausbildung eines TZR.  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zeichnen sich durch eine schnelle Reaktion auf Pathogene und die Vermittlung einer engen Kooperation zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem aus.

### Der $\gamma\delta$ TZR

#### Expression

Im Knochenmark entstandene Vorläuferzellen erfahren ihre Ausprägung zu  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  T-Zellen im Thymus. Die dabei stattfindenden molekularen Mechanismen sind gegenwärtig in der Diskussion. Einerseits wird eine initiale stochastische Variation in der Genexpression vermutet, die zu einer **Vorprägung** der Zelle für die eine oder andere T-Zelllinie führt. Eine solche Vorprägung könnte im Thymus mittels des TZR-Signals bestätigt werden<sup>[18]</sup>. Andererseits wird von einer nicht vorgeprägten Zelle ausgegangen, deren Zuordnung zu einer der beiden T-Zelllinien entscheidend durch die im Thymus vorliegende **Signalstärke des TZR** bestimmt wird<sup>[19,20]</sup>. In einer kürzlich veröffentlichten Übersichtsarbeit integrieren Turchinovich & Pennington beide theoretische Ansätze in ein Modell. Darin werden als Ursachen für die Zuordnung der T-Vorläuferzelle zur  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  T-Zelllinie nicht nur die Expression bestimmter Faktoren wie CD127 oder Sox13 und die Signalstärke des TZR, sondern ergänzend auch das Alter des Thymus in einem zweidimensionalen Diagramm veranschaulicht<sup>[21]</sup>.

Einigkeit besteht allerdings über den chronologischen Ablauf bei der Assemblierung des ( $\gamma\delta$ ) TZR. Dazu exprimiert die Zelle sowohl einen „pre-( $\alpha\beta$ ) TZR“ als auch einen  $\gamma\delta$  TZR<sup>[19]</sup>. Wie der  $\alpha\beta$  TZR setzt sich auch der  $\gamma\delta$  TZR aus einer Kombination von V-, D-, J- und C-Segmenten zusammen. Dabei verfügt der  $\gamma\delta$  TZR über eine deutlich geringere Anzahl der einzelnen Elemente (s. Tabelle (Tab.) 1.1), womit eine reduzierte „kombinatorische“ Rezeptordiversität einhergeht.

**Tabelle 1.1: Anzahl der V-, D- und J-Segmente von  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  TZRs**

Segmente	$\alpha\beta$ TZR		$\gamma\delta$ TZR	
	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
V	47	54	12/7	8/3
D	–	2	–	3
J	58	14	5	4

Bezüglich der V-Segmente der  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten sind sowohl die Anzahl der genetisch angelegten (erste Zahl) als auch der tatsächlich funktional exprimierten Segmente (zweite Zahl) angegeben. Anzahl der D $\beta$ -Segmente aus<sup>[2]</sup>, alle anderen Angaben aus<sup>[22]</sup>.

Neben der kombinatorischen Diversität existiert eine „junktionale“ Vielfalt des Rezeptors. Dabei führt eine variierte Verknüpfung der einzelnen (V-, D-, J-) Segmente bei der somatischen



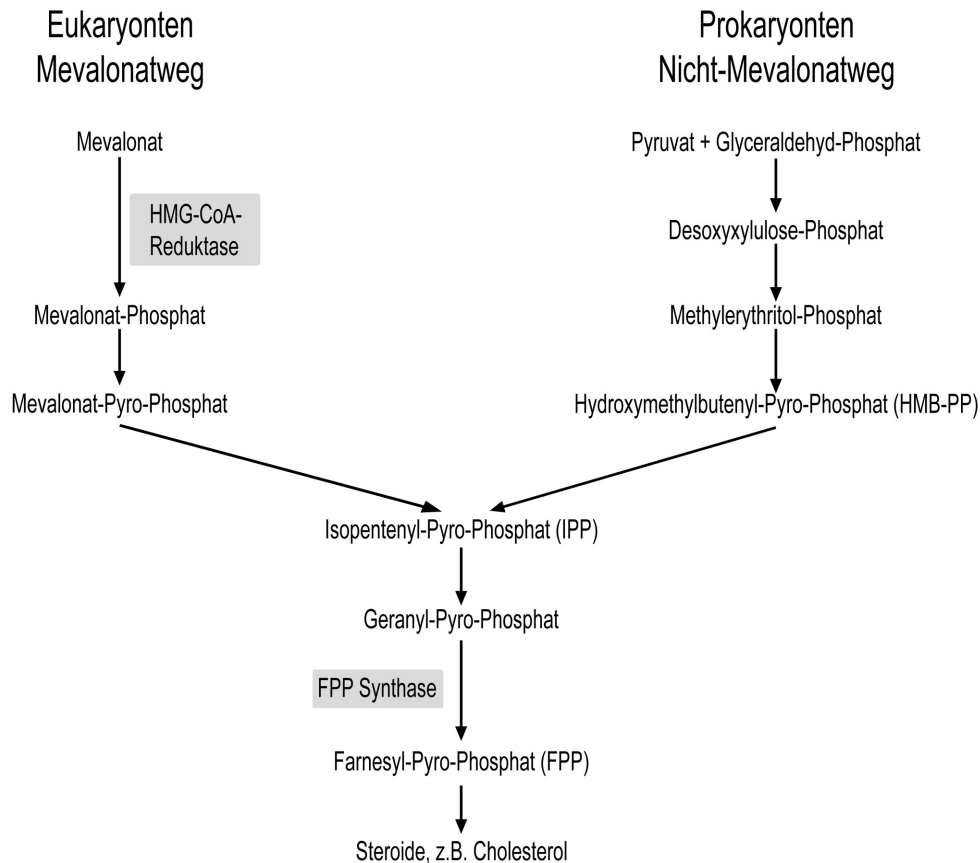
Rekombination zu einer veränderten Bindungsstelle des TZR. Die Varianz der Verknüpfung wird durch den Einsatz sogenannter **P**(alindromischer)- und **N**(icht kodierter)-Nukleotide in den Bindungsstellen erreicht<sup>[2]</sup>. Deren Verwendung ist für die Generierung aller TZRs, für die von  $\gamma\delta$  TZRs jedoch in erhöhtem Maße beschrieben worden<sup>[23]</sup>.

Die Nutzung der verfügbaren  $V\gamma$ - und  $V\delta$ -Genelemente erfolgt nicht gleichmäßig. So weisen ausgebildete  $\delta$ -Polypeptidketten i.a.R. nur die Verwendung des  $V\delta 1$ - oder  $V\delta 2$ -Segments auf. Die Dimerisierung von  $\gamma$ - und  $\delta$ -Polypeptidketten zur Ausbildung eines TZR unterliegt ebenfalls Restriktionen. So erscheint die Dimerisierung von  $V\delta 1$ -Polypeptidketten mit  $V\gamma 2$ , -3 oder -4 begünstigt<sup>[24]</sup>, während eine  $V\delta 2$ -Polypeptidkette bevorzugt mit  $V\gamma 9$  einen TZR ausbildet<sup>[25,26]</sup>. Auch in der Komposition des CD3-Korezeptors unterscheidet sich der  $\gamma\delta$  vom  $\alpha\beta$  TZR. Während der CD3-Komplex in  $\alpha\beta$  T-Zellen aus  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Polypeptidketten besteht, fehlt die  $\delta$ -Polypeptidkette zumindest in ruhenden  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[27]</sup>. Ebenso werden die für eine MHC-Bindung erforderlichen  $\alpha\beta$  TZR-Korezeptoren CD4 und CD8 durch  $\gamma\delta$  T-Zellen, die ihre Liganden ohne MHC-Restriktion erkennen, i.a.R. nicht exprimiert<sup>[28,29]</sup>.

## Liganden

Die Mehrzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen erkennt mittels ihres TZR Liganden direkt und ohne MHC-gestützte Präsentation durch APZs. Aus dem Blut isolierte, humane  $V\delta 1$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erkennen das zur Peptidpräsentation genutzte CD1c<sup>[30,31]</sup> und Teile des Cytomegalovirus<sup>[32]</sup>.  $V\delta 1$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm binden ebenfalls CD1c<sup>[33-35]</sup>, die stressinduzierten, MHC-ähnlichen Proteine *MHC class I polypeptide-related sequence A* und *-B* (MIC-A und MIC-B)<sup>[36-40]</sup> und das Staphylokokken-Enterotoxin-B<sup>[41]</sup>. Aus der Synovialflüssigkeit isolierte  $V\delta 1$   $\gamma\delta$  T-Lymphozyten identifizieren Lipopeptide von *Borrelia burgdorferi* als pathogene Moleküle<sup>[42]</sup>.

$V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen aus dem peripheren Blut reagieren auf Alkylamine aus Mikroben und pflanzlichen Nahrungsmitteln<sup>[43]</sup> und auf „Phosphoantigene“ von Bakterien, Parasiten und Pflanzen<sup>[44-53]</sup>. Die bekanntesten Liganden für den  $V\gamma 9V\delta 2$  TZR sind (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-enyl-Pyro-Phosphat (HMB-PP) und Isopentenyl-Pyro-Phosphat (IPP). Sowohl HMB-PP als auch IPP werden von Bakterien als Stoffwechselmetabolite bei der Produktion von Isoprenoiden, Zwischenprodukten bei der Herstellung von z.B. Cholesterol, generiert. HMB-PP stimuliert  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen bereits in pico- bis nanomolaren Konzentrationsbereichen und stellt damit den bisher als stärksten bekannten natürlichen Aktivator dar<sup>[49,54]</sup>. IPP wird als Metabolit sowohl von Bakterien als auch von eukaryontischen, und damit körpereigenen Zellen gebildet. Der dazu verwendete Stoffwechselweg unterscheidet sich allerdings: Während Eukaryonten (und Archebakterien) den „klassischen“ Mevalonatweg nutzen, verwenden Bakterien häufig zusätzlich oder auch exklusiv einen „Nicht-Mevalonat-Weg“, den sogenannten Rohmer-, Desoxyxylulose- oder 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat-Stoffwechselweg<sup>[55]</sup> (s. Abbildung (Abb.) 1.1).



**Abb. 1.1: Schematischer Vergleich der Steroidsynthesewege in Eu- und Prokaryonten**  
 Die 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-Co)-Reduktase kann durch Statine, die Farnesylpyro-  
 phosphat (FPP)-Synthase durch Aminobisphosphonate inhibiert werden (nach [56]).

Die von eukaryontischen Zellen freigesetzte Konzentration an IPP ist zu gering, um  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen zu aktivieren. Tumorzellen allerdings zeichnen sich i.a.R. durch eine erhöhte Stoffwechselrate, und damit auch durch eine erhöhte Produktion von IPP aus. Dessen Konzentration kann durch die Behandlung der Tumorzellen mit Aminobisphosphonaten noch weiter gesteigert werden. Dabei wirken die Aminobisphosphonate als Hemmer der Farnesyl-Pyro-Phosphat-Synthase (s. Abb. 1.1) und bewirken so eine weitere Erhöhung der IPP-Konzentration. Auf diese Weise verstärkt die Behandlung von Tumorzellen mit Aminobisphosphonaten deren Suszeptibilität für eine durch  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen vermittelte Lyse<sup>[57–59]</sup>.

Bromo-Hydrin-Pyro-Phosphat (BrHPP) ist ein synthetisch hergestelltes Phosphoantigen, das  $V\gamma 9V\delta 2$  T-Zellen zuverlässig aktiviert<sup>[54,60]</sup> und in der vorliegenden Arbeit häufig zur Stimulation eingesetzt wurde.

## Eigenschaften

### Lokalisation

Bereits während der fetalen Ontogenese verlassen  $\gamma\delta$  T-Zellen als erste T-Zellen den Thymus<sup>[61]</sup>. Bei murinen  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte sogar eine bereits vor der Expression des  $\gamma\delta$  TZR im Thymus erfolgte Prägung für die Lokalisation in peripheren Geweben nachgewiesen werden<sup>[62]</sup>. Dementsprechend besiedelt die Mehrheit der  $\gamma\delta$  T-Zellen epitheliale Gewebe wie die Haut<sup>[63–65]</sup>, die Lunge<sup>[66]</sup>, die Gebärmutter Schleimhaut<sup>[67]</sup>, den Urogenitaltrakt<sup>[68]</sup> oder den (Dünn-)Darm<sup>[69–72]</sup>, wo sie direkt neben den Epithelzellen verortet werden können<sup>[73,74]</sup>. Auch durch später in die peripheren Organe einwandernde  $\alpha\beta$  T-Zellen werden die initial vorhandenen  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht vollständig verdrängt, sondern stellen weiterhin einen Anteil von bis zu zirka (ca.) 20 % aller vorhandenen T-Lymphozyten<sup>[28]</sup>.

Desweiteren wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen in Tonsillen<sup>[70,71]</sup> und Synovialflüssigkeit – letztere von Patienten mit rheumatoider Arthritis<sup>[75–77]</sup> – lokalisiert. In lymphoiden Geweben wie der Milz<sup>[70]</sup> und den Lymphknoten sind  $\gamma\delta$  T-Zellen nur in geringer Zahl vertreten. Die dort mittels MHC-Molekülen auf APZs präsentierte Antigene werden von  $\alpha\beta$  („MHC-Restriktion“), nicht jedoch von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erkannt. In das periphere Blut werden  $\gamma\delta$  T-Zellen erst vergleichsweise spät entlassen. Direkt nach der Geburt können dort nur wenige  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden, ihr Anteil erhöht sich jedoch in der frühen Kindheit auf ca. 1–5 % aller CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten<sup>[78]</sup>.

Interessanterweise korreliert die Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit der Art des exprimierten TZR. So beinhaltet der TZR von im peripheren Gewebe ansässigen  $\gamma\delta$  T-Zellen bevorzugt eine V $\delta$ 1-Polypeptidkette<sup>[28,65,69,79]</sup>, während  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem peripheren Blut in der Regel zu über 50 % und bis zu 95 % eine Kombination aus V $\gamma$ 9- und V $\delta$ 2-Polypeptidketten zur Ausbildung eines TZR exprimieren<sup>[26]</sup>.

### Funktionen

Wie  $\alpha\beta$  T-Zellen proliferieren i.a.R. auch  $\gamma\delta$  T-Zellen als Reaktion auf Infektionen mit verschiedenen Mikroorganismen<sup>[80]</sup>. Weiterhin findet jede der für  $\alpha\beta$  T-Zellen vorgestellten Subpopulation und/oder Eigenschaft (s. Kap. 1.2.1) ihre Entsprechung in  $\gamma\delta$  T-Zellen. So weisen  $\gamma\delta$  T-Zellen zytotoxische Aktivitäten gegen infizierte Makrophagen<sup>[81]</sup> und verschiedene Tumorzellen<sup>[57,59]</sup> auf. Die Lyse erfolgt mittels Mechanismen basierend auf Fas/Fas-Ligand, Granzysin oder Perforin/Granzym B<sup>[81-84]</sup>.

Weiterhin exprimieren *ex vivo* analysierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten i.a.R. die für  $T_h1$ -Zellen typischen Zytokine IFN- $\gamma$  und *tumor necrosis factor  $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ )<sup>[85,86]</sup>. Liegt ein entsprechendes Mikromilieu vor, so können  $\gamma\delta$  T-Zellen jedoch auch zur Expression des  $T_h2$ -typischen IL-4 konditioniert werden<sup>[87,88]</sup>.

Wie  $\alpha\beta$   $T_h17$ -Zellen besitzen auch  $\gamma\delta$  T-Zellen die Fähigkeit zur Expression von IL-17<sup>[80,89,90]</sup>. *In vivo* wurden humane IL-17 produzierende  $\gamma\delta$  T-Zellen bislang allerdings nur in Patienten mit Tuberkulose<sup>[91]</sup> und dem humanen Immundefizienzvirus (HIV)<sup>[92]</sup> nachgewiesen. Die Rolle von  $\gamma\delta$   $T_h17$ -Zellen wird in einer frühen Aktivierung der Immunantwort durch eine rasche IL-17-Produktion (schneller als durch sich erst zu  $T_h17$ -Zellen entwickelnden  $\alpha\beta$   $T_h17$ -Zellen) vermutet<sup>[80]</sup>.

In letzter Zeit vorgestellte Publikationen weisen einer Subpopulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen ebenfalls eine Rolle als  $\gamma\delta$   $T_{reg}$ -Zellen zu. Als solche bewirken sie eine Suppression der Proliferation von  $CD4^+$  T-Zellen und schwächen somit eine im Vollzug befindliche Immunantwort ab<sup>[93-95]</sup>.

Die Fähigkeit von  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Ausbildung einer immunologischen Gedächtnisfunktion wird gegenwärtig diskutiert. So konnten Shen *et al.* in einer Studie mit gegen Tuberkulose geimpften Affen zeigen, dass die infolge der Impfung expandierten V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen bei einer zweiten Aktivierung eine schnellere Reaktion aufwiesen<sup>[96]</sup>. Dagegen zeigten Hogg *et al.* in einer ähnlichen Studie, dass bei gegen Tuberkulose geimpften Rindern nicht  $\gamma\delta$  T-Zellen, sondern  $CD8^+$   $\gamma\delta^-$  T-Zellen zum immunologischen Gedächtnis beitrugen<sup>[97]</sup>.

Neben der eigentlichen Funktion wird auch die Begrifflichkeit um  $\gamma\delta$  T-Zellen, die in das immunologische Gedächtnis involviert sind, diskutiert. So grenzen Born *et al.*  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einer immunologischen Gedächtnisfunktion als „*prepared*“ (zu Deutsch: vorbereitet) zum einen von regulären  $\gamma\delta$  T-Zellen, zum anderen von  $\alpha\beta$   $T_{memory}$ -Zellen ab<sup>[98]</sup>. Mit Bezug auf unterschiedliche, auch das immunologische Gedächtnis betreffende Funktionen werden  $\gamma\delta$  T-Zellen entsprechend ihrer Expression von CD45RA und CD27 in naive Zellen ( $CD45RA^+CD27^+$ ), zentrale Gedächtnis- ( $CD45RA^-CD27^+$   $T_{central\ memory}$  (CM)), Effektorgedächtnis- ( $CD45RA^-CD27^-$   $T_{effector\ memory}$  (EM)) und abschließend differenzierte Effektorgedächtniszellen ( $CD45RA^+CD27^-$   $T_{terminally-differentiated\ effector\ memory\ CD45RA^+}$  (EMRA)) eingeteilt<sup>[99]</sup>. Dabei stellen V $\gamma$ 9V $\delta$ 2  $T_{CM}$  möglicherweise eine antigenaktivierte Population dar, die zu den Lymphknoten migriert und

bei der Entstehung einer neuen Population von Effektorzellen eine Rolle spielt. Ebenfalls antigenaktivierte V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T<sub>EM</sub> migrieren in periphere Gewebe und differenzieren dort zu T<sub>EMRA</sub>-Zellen, um mittels der Produktion von IFN- $\gamma$ , Perforin und Granzymen in die Immunantwort einzugreifen<sup>[100,101]</sup>.

Unabhängig von begrifflichen Definitionen kann davon ausgegangen werden, dass V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen aufgrund des frühen und unvermeidlichen Kontakts mit mikrobiellen Phosphoantigenen expandieren<sup>[102]</sup> und dementsprechend den Gedächtniszellmarker CD45RO exprimieren<sup>[103]</sup>. Insofern stellen ca. 90 % aller V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen Gedächtniszellen dar<sup>[99]</sup>.

Wie  $\alpha\beta$  T-Zellen exprimieren auch  $\gamma\delta$  T-Zellen die auf Seite 29 näher beschriebenen *Toll-like*-Rezeptoren<sup>[104–106]</sup>. Damit sind beide T-Zellsubpopulationen imstande, nach Erkennung repetitiver molekularer Strukturen von Pathogenen eine rasche Immunantwort zu induzieren.

Im Unterschied zum  $\alpha\beta$  TZR erfolgt die Bindung von Liganden an den  $\gamma\delta$  TZR ohne die Beteiligung von MHC-Molekülen. Die Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erfolgt dementsprechend schneller (< 48 Stunden (h)) als bei  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten (ca. 96 h). Desweiteren verfügen  $\gamma\delta$  T-Zellen wie einige Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, DCs) über die Fähigkeit zur Präsentation von antigenen Peptiden. Somit können sie eine direkte Verbindung zum erworbenen Immunsystem ausbilden<sup>[107–109]</sup>.

### Kommunikation mit anderen Immunzellen

$\gamma\delta$  T-Zellen interagieren direkt mit **Monozyten** und tragen zu deren Reifung zu **DCs** bei<sup>[110]</sup>. Bei Mäusen konnte eine Interaktion von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit Monozyten und ausgereiften DCs in der Lunge ebenfalls festgestellt werden<sup>[111]</sup>. Ebenso wird eine **NK-Zellen** aktivierende Rolle von  $\gamma\delta$  T-Zellen vermutet<sup>[112]</sup>. Auch IL-17 produzierende  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten kommunizieren mit DCs in Lymphknoten<sup>[90]</sup>, Hirngewebe<sup>[113,114]</sup> oder Hautläsionen<sup>[115]</sup>. In der Kommunikation mit **T<sub>reg</sub>-Zellen** sind sowohl regulierende Funktionen von  $\gamma\delta$  T-Zellen auf T<sub>reg</sub>-Zellen<sup>[113,116–118]</sup>, als auch *vice versa*<sup>[119–121]</sup> beschrieben worden. Weiterhin interagieren  $\gamma\delta$  T-Zellen mit **B-Zellen** durch die Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD40L, OX40, CD70 und den *inducible costimulator* (ICOS), und leisten Unterstützung bei der Produktion von Antikörpern<sup>[70,122]</sup>.

## **$\gamma\delta$ T-Lymphozyten als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem**

Aufgrund der Expression eines durch somatische Rekombination erstellten TZR, zytotoxischer Eigenschaften, der möglicherweise vorhandenen Funktion im immunologischen Gedächtnis und der möglichen Kommunikation mit B-Zellen können  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten dem erworbenem Immunsystem zugeteilt werden.

Andererseits ist das in der Keimbahn kodierte  $\gamma\delta$  TZR-Repertoire deutlich geringer als das von  $\alpha\beta$  T-Lymphozyten (s. Tab. 1.1). Weiterhin wird das zur Verfügung stehende Repertoire *in vivo* nur in begrenztem Maß umgesetzt. Damit ist eine Funktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen bei der Antigenerkennung im Rahmen einer adaptiven Immunantwort – wie sie bei  $\alpha\beta$  T-Zellen vorliegt – unwahrscheinlich. Tatsächlich nutzen V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T-Zellen ihren TZR als Mustererkennungsrezeptor<sup>[105]</sup>. Mit der Expression von *Toll-like*-Rezeptoren (s. Kap. 1.3.2) und der Phagozytose und Präsentation von antigenen Peptiden zeigen  $\gamma\delta$  T-Zellen typische Eigenschaften von Zellen des angeborenen Immunsystems. Auch das reduzierte Vorkommen von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in sekundären lymphoiden *versus (vs.)* peripheren Geweben begründet ihre Einteilung in das angeborene Immunsystem.

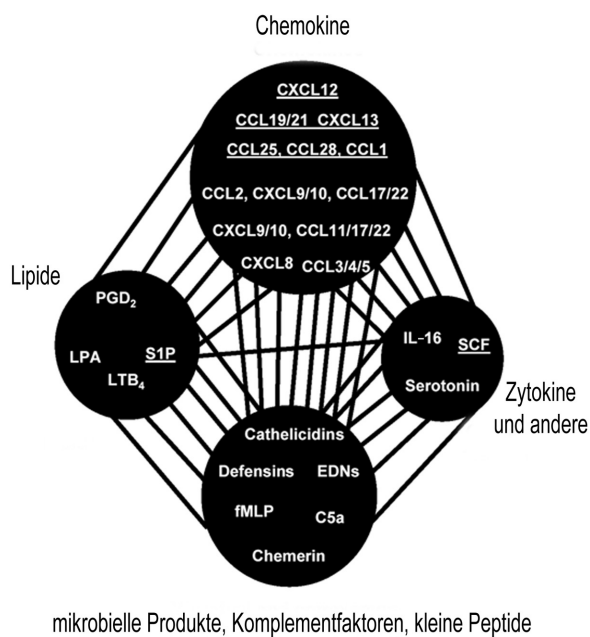
Unabhängig von ihrer Zugehörigkeit zu bestimmten Komponenten des Immunsystems wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen bereits wenige Jahre nach ihrer Erstbeschreibung (1986,<sup>[123]</sup>) aufgrund ihrer Lokalisation im peripheren Gewebe und ihrer schnellen, MHC-ungebundenen Immunreaktion als zelluläre Träger einer ersten Verteidigungslinie gegen Pathogene charakterisiert<sup>[124]</sup>. Diese Eigenschaften kennzeichnen  $\gamma\delta$  T-Zellen als wichtige Bestandteile einer frühen Immunantwort, deren Wesen entscheidenden Einfluss auf Art und Umfang der nachfolgenden, ggf. umfassenderen Immunreaktion hat. Insofern trägt die weitere Erforschung von  $\gamma\delta$  T-Zellen zum besseren Verständnis der frühen Immunantwort bei und kann langfristig zur Optimierung einer frühzeitigen Behandlung von Infektionen führen.

## 1.3 Ausgewählte Funktionen von Immunzellen

Für die zuverlässige Funktion des Immunsystems ist es entscheidend, dass Immunzellen zu ihrem Bestimmungsort **migrieren** (s. Kap. 1.3.1), die Pathogene als solche **erkennen** (s. Kap. 1.3.2) und sie folgerichtig **bekämpfen** (s. Kap. 1.3.3).

### 1.3.1 Migration

Die Migration der Immunzellen zu ihrem jeweiligen Zielort wird durch ein Netzwerk aus chemotaktisch wirkenden Substanzen reguliert. Neben Lipidmediatoren, antimikrobiellen Peptiden und Zytokinen gehören an erster Stelle die Chemokine dazu (s. Abb. 1.2).



**Abb. 1.2: Netzwerk chemotaktischer Moleküle**

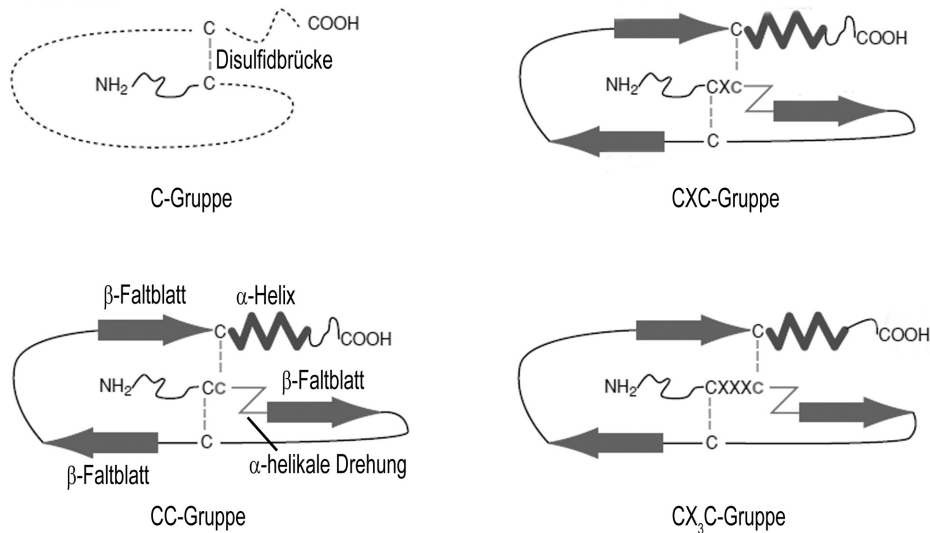
Das Netzwerk chemotaktischer Moleküle besteht aus Chemokinen, Zytokinen, Lipiden, antimikrobiellen Peptiden, Neurotransmittern, Produkten des Komplementsystems und auch Produkten von Pathogenen. Chemotaktisch wirksame Substanzen für die Regulation der homöostatischen Lymphozytenmigration sind unterstrichen. Zur besseren Übersicht werden alternative Namen der genannten Chemokine (etwa CCL17/TARC statt CCL17) nicht zusätzlich aufgeführt. EDN = *eosinophil-derived neurotoxin*, fMLP = fMet-Leu-Phe, IL-16 = Interleukin-16, LPA = *lysophosphatidic acid*, LTB<sub>4</sub> = Leukotrien B<sub>4</sub>, PGD<sub>2</sub> = Prostaglandin D<sub>2</sub>, SCF = *stem cell factor*, S1P = Sphingosin-1-Phosphat, C5a = Komplementfaktor (modifiziert nach Kim<sup>[125]</sup>).

### Chemokine

Die am besten charakterisierte Gruppe von chemotaktisch wirksamen Substanzen stellen die Chemokine (von „**chemotaktische Zytokine**“) dar. Die Proteinfamilie der Chemokine besteht aus ca. 50 Mitgliedern<sup>[126]</sup>, die entsprechend ihrer Aminosäuresequenz in mehrere Gruppen eingeteilt werden (s. Abb. 1.3).

Ein Chemokin wird durch die Gruppe (also CXC, CC, CX<sub>3</sub>C oder C), ein anschließendes 'L' für „Ligand“ und eine fortlaufende Nummer bezeichnet. So steht z.B. 'CCL2' für das/den **2.** Chemokin/Ligand der **CC**-Gruppe<sup>[126]</sup>. Eine andere Einteilung der Chemokine nutzt deren physiologische Eigenschaften inklusive der Bedingungen und Lokalisation ihrer Produktion und der zellulären Verteilung der zugehörigen Rezeptoren. Dabei wird zwischen „homöostatischen“

## 1 Einleitung



**Abb. 1.3: Strukturmotive der Chemokinfamilien**

Die Aminosäuresequenzen nahezu aller Chemokine weisen vier konservierte Cysteine (C) auf. Zwischen dem ersten und dritten einerseits, und dem zweiten und vierten Cystein andererseits bildet sich eine Disulfidbrücke aus (gestrichelte Linie). Abhängig von der An- oder Abwesenheit anderer Aminosäuren (X) zwischen den ersten beiden Cysteinen wird zwischen 'CXC'-, 'CC'- und 'CX<sub>3</sub>C'-Chemokinen unterschieden<sup>[127]</sup>. An die ersten zwei konservierten Cysteine schließt sich eine  $\alpha$ -helikale Struktur an, dann folgt ein  $\beta$ -Faltblatt, das dritte konservierte Cystein, zwei weitere  $\beta$ -Faltblätter, das vierte konservierte Cystein, eine  $\alpha$ -helikale Struktur und schließlich der C-Terminus. Neben den drei beschriebenen Familien kommt XCL1/Lymphotaktin als einziges Mitglied der C-Chemokine dazu<sup>[128]</sup>, deren sekundäre Strukturmotive bislang unerforscht sind (modifiziert nach Frederick und Clayman<sup>[129]</sup>).

(auch: „konstitutiven“, „lymphoiden“ oder „Haushalts-“) und „inflammatorischen“ (auch: „induzierbaren“) Chemokinen unterschieden, wobei einige beiden Gruppen zugerechnet werden. Die Tabelle 1.2 zeigt eine Auswahl von Chemokinen mit ihren jeweiligen Rezeptoren und die Einordnung in verschiedene Gruppen.

Homöostatische Chemokine werden in diskreten Mikroumgebungen innerhalb von lymphoiden oder auch nicht-lymphoiden Geweben, wie z.B. Haut oder Darm, exprimiert. Diese konstitutiv produzierten Chemokine sind bei der permanenten Überwachung des Organismus durch das Immunsystem beteiligt. Dazu gehören die Aufrechterhaltung eines physiologischen Kreislaufs von Immunzellen durch verschiedene Körperregionen, die Etablierung spezifischer Immunzellen in bestimmten Geweben und die Zuordnung von Antigenen zu entsprechenden Zellen des Immunsystems in den sekundären lymphatischen Organen<sup>[131]</sup>. Im Gegensatz zu homöostatischen werden inflammatorische Chemokine in entzündetem Gewebe durch dort ansässige oder eingewanderte Zellen nach Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen oder Antigenkontakt freigesetzt. Diese Chemokine induzieren wie auch die oben vorgestellten Migrationsfaktoren eine zielgerichtete Chemotaxis bei in der Nähe befindlichen reaktiven Immunzellen wie Monozyten, Granulozyten und T-Zellen<sup>[132–136]</sup>.



**Tabelle 1.2: Ausgewählte homöostatische und inflammatorische Chemokine** (modifiziert nach Zlotnik *et al.* [130]).

Chemokin	alternativer Name*	Chemokinrezeptor*	Gruppenzugehörigkeit	
			strukturell	physiologisch
CCL3	MIP-1 $\alpha$	CCR1, -4, -5	CC	dual
CCL17	TARC	CCR4	CC	dual
CCL22	MDC	“	CC	dual
CCL20	MIP-3 $\alpha$	CCR6	CC	dual
CCL25	TECK	CCR9	CC	homöostatisch
CXCL9	MIG	CXCR3	CXC	inflammatorisch
CXCL10	IP-10	“	CXC	inflammatorisch
CXCL11	I-TAC	“	CXC	inflammatorisch
CXCL16	–	CXCR6	CXC	inflammatorisch

\*Die Bedeutung der Abkürzungen wird im Folgenden erläutert. „dual“: kann sowohl homöostatisch als auch inflammatorisch wirken.

## Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren werden aufgrund der Vorgaben des gemeinsamen Komitees der *International Union of Immunological Societies* (IUIS) und der *World Health Organisation* (WHO) entsprechend ihrer Liganden in die vier oben vorgestellten Gruppen 'CXC', 'CC', 'CX<sub>3</sub>C' oder 'C' eingeteilt<sup>[137–140]</sup>. Bei der Benennung eines Rezeptors folgt auf die Bezeichnung für die Gruppe ein 'R' für „Rezeptor“ und eine fortlaufende Nummer. „CCR4“ steht also für den 4. Rezeptor der CC-Gruppe. Bis heute sind 23 humane Chemokinrezeptoren bekannt<sup>[141]</sup>, von denen viele mehrere Chemokine und zum Teil (z.T.) andere Liganden binden können. Initial wurden Chemokine und Chemokinrezeptoren bei Zellen des angeborenen Immunsystems nachgewiesen<sup>[131]</sup>, mittlerweile werden sie jedoch vor allem im Kontext der gewebsspezifischen Zirkulation und der gerichteten Migration von Lymphozyten und ihren Subpopulationen diskutiert<sup>[125,131,142–144]</sup>. Im Folgenden werden die im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit bedeutenden Chemokinrezeptoren detaillierter vorgestellt.

### CCR4

CCR4 bindet spezifisch die Liganden CCL17 (auch: *thymus- and activation-regulated chemokine* (TARC)) und CCL22 (auch: *macrophage-derived chemokine* (MDC))<sup>[145]</sup>. CCL17/TARC ist in Endothelzellen von Blutgefäßen sowohl in entzündeter<sup>[146]</sup> als auch nicht-entzündeter Haut<sup>[147,148]</sup> nachweisbar. In Kombination mit CCL22/MDC konnte CCL17/TARC überdies in der Lunge<sup>[149]</sup> und in der Leber<sup>[150]</sup> detektiert werden. Nach Antigenkontakt gereifte DCs und auch B-Zellen exprimieren sowohl CCL17/TARC als auch CCL22/MDC<sup>[151,152]</sup>.

Eine nach Antigenkontakt verstärkte Expression von CCR4 auf T-Zellen wird bei deren Differenzierung zu einer T<sub>memory</sub>-Zelle beibehalten<sup>[153]</sup>. Dementsprechend weisen T<sub>memory</sub>- vs. naiven T-Zellen<sup>[133]</sup> eine erhöhte Präsenz von CCR4 auf der Zelloberfläche auf. Ebenso wird CCR4

## 1 Einleitung

durch  $T_H2$ - vs.  $T_H1$ -Zellen verstärkt exprimiert<sup>[154–156]</sup>.

Somit kann eine CCR4-vermittelte Migration von aktivierten, und im Fall von  $T_H2$ -Zellen auch für die Antikörperproduktion notwendigen, T-Zellen zu aktivierten APZs erfolgen<sup>[157,158]</sup>. CCR4/CCR4-Ligand spielt somit eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation zur Modulation einer humoralen Immunantwort<sup>[151,152,154–156]</sup>.

Darüber hinaus konnte CCR4 auch auf aktivierten  $T_H1$ -Zellen<sup>[156]</sup>,  $T_{reg}$ -Zellen<sup>[159]</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut<sup>[70]</sup> nachgewiesen werden. Außerhalb der Gruppe der T-Zellen exprimieren u.a. auch B-Zellen<sup>[160]</sup>, Mastzellen<sup>[161]</sup>, DCs<sup>[162]</sup> und Endothelzellen<sup>[163]</sup> CCR4.

## CCR6

CCL20 (auch: *macrophage inflammatory protein-3 $\alpha$*  (MIP-3 $\alpha$ ) oder *liver and activation-regulated chemokine* (LARC)) ist das einzige bekannte Chemokin, das von CCR6 gebunden wird<sup>[164,165]</sup>. CCL20/MIP-3 $\alpha$  konnte in Leber<sup>[166]</sup> und Tonsillen, aber auch in den Epithelgeweben von Lunge<sup>[165]</sup>, Haut<sup>[167,168]</sup>, Appendix und Darm<sup>[165]</sup> nachgewiesen werden. Sowohl Keratinozyten<sup>[167,168]</sup> als auch Darmepithelzellen<sup>[169,170]</sup> steigern im Rahmen einer Entzündung die Freisetzung von CCL20/MIP-3 $\alpha$ .

Die Expression von CCR6 wurde auf T- und anderen mononukleären Zellen aus dem Darm<sup>[169]</sup>, und auf  $\alpha\beta$ <sup>[168]</sup>, nicht jedoch auf  $V\delta1$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Haut<sup>[65]</sup> nachgewiesen. Weiterhin konnte CCR6 auf DCs, T-, B-<sup>[171]</sup>, Natürlichen Killer-T- (NKT-)<sup>[172]</sup>,  $T_{reg}$ -<sup>[159]</sup>,  $T_H17$ -<sup>[173]</sup> und  $V\delta2$   $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[70,99,108,174,175]</sup> aus dem Blut detektiert werden, nicht dagegen auf Monozyten oder Granulozyten<sup>[171]</sup>.

Erwartungsgemäß wurden in der Epidermis von Psoriasispatienten DCs und T-Zellen in enger Nachbarschaft zu CCL20/MIP-3 $\alpha$ -produzierenden Keratinozyten nachgewiesen<sup>[176,177]</sup>. Ein Teil dieser Leukozyten stammt vermutlich aus dem Blut. Dafür spricht die deutlich stärkere Expression von CCR6 auf mononukleären Zellen aus dem Blut (*peripheral blood mononuclear cells* (PBMZ)) von Psoriasispatienten vs. Gesunden<sup>[168]</sup>. Zusätzlich wurde eine Migration von CCR6<sup>+</sup>  $V\delta2$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut in entzündete Hautregionen beschrieben<sup>[178]</sup>.

Neben CCL20/MIP-3 $\alpha$  bindet CCR6 auch  $\beta$ -Defensin-1 und -2, die typischerweise von Gewebszellen am Ort der Entzündung freigesetzt werden<sup>[179]</sup>. Tatsächlich weist CCL20/MIP-3 $\alpha$  in seiner Tertiärstruktur und der Verteilung kationischer Ladungen Ähnlichkeiten zu  $\beta$ -Defensinen auf und hat darüber hinaus gegen bestimmte Bakterienstämme einen ähnlich starken antimikrobiellen Effekt<sup>[180]</sup>.

## CCR9

CCL25 (auch: *thymus-expressed chemokine* (TECK)) ist der einzige bekannte Ligand für CCR9<sup>[181]</sup> und wird durch epitheliale Zellen im Thymus und Dünndarm<sup>[182,183]</sup> exprimiert. Darüber hinaus gelang der Nachweis von CCL25/TECK in der Synovialflüssigkeit von Gesunden und auch Patienten mit rheumatoider Arthritis<sup>[184,185]</sup>. Das Chemokin wirkt im Thymus als Chemoattraktant für CCR9-exprimierende CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Thymozyten<sup>[186]</sup> und in der Dünndarmschleimhaut chemotaktisch für mukosale T-<sup>[183,187]</sup> und B-Lymphozyten<sup>[187]</sup>. In den Gelenken von Gesunden und Patienten mit rheumatoider Arthritis dient es zur Rekrutierung von Knorpelvorläuferzellen<sup>[184]</sup> und zur Makrophagendifferenzierung<sup>[185]</sup>.

## CXCR3

CXCR3 bindet die Chemokine CXCL9 (auch: *monokine induced by interferon- $\gamma$*  (MIG)), CXCL10 (auch: *interferon- $\gamma$ -inducible protein 10* (IP-10))<sup>[188]</sup> und CXCL11 (auch: *interferon- $\gamma$ -inducible T cell  $\alpha$  chemoattractant* (I-TAC))<sup>[189]</sup>. CXCL10/IP-10 wird durch Keratinozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten und T-Zellen freigesetzt<sup>[2]</sup>.

CXCR3 wird von DCs<sup>[190–192]</sup>, NK-<sup>[193]</sup>, B-Zellen<sup>[194]</sup> und T-Zell-Subpopulationen wie CD8<sup>+</sup><sup>[195]</sup>, T<sub>h</sub>17-<sup>[196]</sup>, T<sub>reg</sub>-<sup>[197]</sup>,  $\gamma\delta$  T-<sup>[70,99,174,198,199]</sup> und T<sub>h</sub>1-Zellen exprimiert. Dabei weisen sowohl V $\delta$ 2 vs. V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[174]</sup>, als auch T<sub>h</sub>1- vs. T<sub>h</sub>2-Zellen<sup>[154]</sup> eine deutlich stärkere CXCR3-Expression auf.

Wie die oben genannten, alternativen Bezeichnungen der CXCR3-Liganden bereits andeuten, wird ihre Freisetzung durch IFN- $\gamma$  induziert<sup>[200]</sup>. Zudem wird für die CXCR3-Expression durch T-Zellen neben einer Stimulation des TZR auch IFN- $\gamma$  benötigt<sup>[201]</sup>. Damit ermöglicht IFN- $\gamma$  die Chemotaxis von T-Zellen zu entzündetem Gewebe. Somit wird CXCR3 als inflammatorischer Chemokinrezeptor eingeordnet (s. Tab. 1.2).

Weiterhin verstärkt CXCL10/IP-10 die Ausbildung der von T<sub>h</sub>1-Zellen gegenüber T<sub>h</sub>2-Zellen dominierten Immunantwort<sup>[202]</sup>. T<sub>h</sub>1-Zellen definieren sich durch eine wiederum starke Freisetzung von IFN- $\gamma$ , das erneut die erhöhte Expression von CXCR3-Liganden induziert. Damit bewirkt IFN- $\gamma$  nicht nur direkt, sondern auch über die Induktion von CXCL10/IP-10 die Ausbildung einer Immunantwort des T<sub>h</sub>1-Typs. Es entsteht auf diese Weise ein sich selbst verstärkender inflammatorischer Prozess, der erst nach erfolgreicher Bekämpfung des Pathogens zum Erliegen kommt<sup>[203]</sup> (s. auch Seite 33, Absatz „Interferone“).

Entsprechend seiner inflammatorischen Charakteristik wurde CXCR3-Expression auf T-Zellen gefunden, die im Rahmen von Entzündungskrankheiten Haut<sup>[204]</sup>, Schleimhaut<sup>[205]</sup> oder Gelenke<sup>[206]</sup> infiltrieren.

## CXCR6

CXCL16 ist der einzige bekannte Ligand für CXCR6<sup>[207]</sup>. Dieses Chemokin wird von APZs wie CD14<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen<sup>[208]</sup> und DCs<sup>[207]</sup> membranständig exprimiert und wird durch *a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10* (ADAM10) von der Membran freigesetzt<sup>[209]</sup>. CXCL16 besitzt antimikrobielle Wirkung gegen *Staphylococcus (S.) aureus* und *Escherichia (E.) coli*<sup>[210]</sup>, die vorrangige Funktion ist jedoch die chemoattraktive Wirkung speziell auf lymphoide Zellen<sup>[211]</sup>, die CXCR6 auf der Zelloberfläche exprimieren<sup>[212]</sup>. Dazu gehören NKT-Zellen<sup>[213]</sup>, T<sub>h</sub>17-Zellen<sup>[214]</sup>, T<sub>reg</sub><sup>-</sup><sup>[215]</sup> und vor allem T<sub>h</sub>1-Zellen.

Kim und Mitarbeiter fanden darüber hinaus Hinweise, dass DCs die Expression von CXCR6 auf T<sub>h</sub>1-Zellen in Gegenwart von IL-12 induzieren können<sup>[216]</sup>. Im Blut und im Lymphknoten sind wenige CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen zu finden, dafür aber in entzündeten Bereichen des Gewebes<sup>[142]</sup>. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass von DCs freigesetztes CXCL16 CXCR6<sup>+</sup> T<sub>h</sub>1- und NKT-Zellen zur Entzündungsstelle rekrutiert<sup>[207]</sup>.

### 1.3.2 Mustererkennungsrezeptoren

Pathogenoberflächen tragen häufig repetitive Molekülmuster, die in ihrer Zusammensetzung und Orientierung der Einzelmoleküle untereinander von denen körpereigener Zellen verschieden sind. Diese Muster werden als pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)) bezeichnet. Zu den PAMPs gehören Lipoproteine, Lipopolysaccharid (LPS), Muramyl-dipeptid und Flagellin als Bestandteile der bakteriellen Zellwand bzw. des Flagellums. Weiterhin werden auch unmethylierte Desoxyribonukleinsäuren (*deoxyribonucleic acid* (DNA)) als bakterielle, sowie einzel- und doppelsträngige Ribonukleinsäuren (*ribonucleic acids* (RNAs)) als virale Moleküle den PAMPs zugerechnet.

Neben den mikrobiellen PAMPs gibt es körpereigene Moleküle, deren Auftreten auf Stress und/oder eine Schädigung des Gewebes hinweist. So deuten freies ATP und freigesetzte genomische DNA auf nekrotisierende Zellen, MIC-A, MIC-B und Hitzeschock-Proteine auf gestresste Zellen und Komplexe aus freien Hyaluronsäuren auf eine geschädigte extrazelluläre Matrix hin. Diese Moleküle werden folgerichtig als mit Gefahr assoziierte molekulare Muster (*danger-associated molecular patterns* (DAMPs)) bezeichnet.

Zur Erkennung von PAMPs und DAMPs verfügt das angeborene Immunsystem über sogenannte Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors* (PRRs)). Dazu gehören der Mannose-Rezeptor und die *Scavenger*-Rezeptoren der Makrophagen, der f-Met-Leu-Phe-Rezeptor der neutrophilen Granulozyten, das mannanbindende Lektin und andere initialisierende Proteine des Komplementsystems<sup>[2]</sup> und die Familie der *RIG-I-like*-Rezeptoren. In den letzten Jahren sind mit den *Toll-like*- und den *nucleotide-binding leucine-rich repeat*-Rezeptoren zwei weitere PRR-Familien intensiv erforscht worden<sup>[217,218]</sup>.

### **Toll-like-Rezeptoren (TLRs)**

Das Gen *toll* wurde in seiner Funktion als erstes in *Drosophila* beschrieben. Das entsprechende Protein Toll spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung des dorsoventralen Musters während der Embryonalentwicklung<sup>[219,220]</sup>. Fast zeitgleich wurde festgestellt, dass Toll außerdem als ein Rezeptor funktioniert, dessen Signalweg in der Resistenz der Fliege gegen Pilzbefall involviert ist<sup>[221]</sup>. Homologe Rezeptoren wurden sowohl bei Pflanzen als auch beim Menschen entdeckt<sup>[222]</sup>. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Toll wurden sie als „Toll-like-Rezeptoren“ bezeichnet.

TLRs registrieren die Anwesenheit von PAMPs wie z.B. Komponenten der bakteriellen Zellwand, bakterieller DNA, Produkten des bakteriellen Stoffwechsels oder Strukturproteinen von Viren, Pilzen und Parasiten. Darüber hinaus können TLRs auch mit autologen Molekülen wie Hitzeschock-Proteinen, genomischer DNA und interzellulären Matrixproteinen, also DAMPs, assoziieren<sup>[223–228]</sup>.

Die Bindung des jeweiligen Liganden durch einen TLR führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors *nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B-cells* (NF- $\kappa$ B) und/oder des Interferon regulierenden Faktors 3 (*interferon regulating factor 3* (IRF-3)). Infolgedessen kommt es zu einer Modulation von Oberflächenmolekülen wie E-Selektin und dem *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM1)<sup>[229]</sup>. Weiterhin erfolgt eine Induktion von inflammatorisch wirksamen Zytokinen, Chemokinen und Typ-1-Interferonen, die zu einer Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen zum Infektionsort führen<sup>[224,230–232]</sup>.

Beim Menschen sind die Gene für TLR1 bis TLR11 bekannt. *tlr11* enthält jedoch ein Stopcodon, das die Expression des vollständigen Gens verhindert, so dass nur TLR1 bis TLR10 als Proteine exprimiert werden<sup>[233]</sup>. TLR1, -2, -4, -5, -6 und -10 sind an der Zellaußenmembran lokalisiert und erkennen hauptsächlich PAMPs der bakteriellen Zelloberfläche<sup>[234–236]</sup>. Dagegen werden TLR3, -7, -8 und -9 intrazellulär in Endosomen, Lysosomen und im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Dort fungieren sie als Sensoren für virale oder bakterielle RNA oder DNA<sup>[234,235,237–239]</sup>.






Rezeptoren der TLR-Familie wurden initial in Zellen des angeborenen Immunsystems wie Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und DCs nachgewiesen<sup>[240]</sup>. Mittlerweile konnte die Expression von TLR1, -2, -3, -5 und -6 auch in  $\gamma\delta$  T-Zellen beschrieben werden. Desweiteren wurde eine Modulation der Freisetzung von IFN- $\gamma$ , CCL3/MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , CXCL8/IL-8 und CCL5/*Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted* (RANTES) durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach Stimulation mit TLR-Liganden gezeigt<sup>[104–106,241,242]</sup>.


In der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit TLR2-Liganden *vs.* NOD2-Liganden (s. folgendes Kap.) verglichen.


## *nucleotide-binding oligomerization domain containing 2 (NOD2)*


### Molekulare Struktur


NOD2 gehört zur Familie der *nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors* (NLRs), die sich durch die Kombination einer zentralen Nukleotid-bindenden Domäne (*nucleotide binding site* (NBS)), einer C-terminalen leuzinreichen Region (*leucine-rich repeat* (LRR)) und einer N-terminalen Protein-Protein-Interaktions-Domäne auszeichnet. Letztere kann eine Pyrindomäne (PYD), eine Baculovirus-Apoptose-Inhibitor-Protein-Domäne (*baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain* (BIR)) oder – wie bei NOD2 – eine Caspase-Rekrutierungs- und -Aktivierungs-Domäne (*caspase recruiting and activating domain* (CARD)) sein<sup>[243–246]</sup>. Eine Ausnahme bildet das erst kürzlich der NLR-Familie zugeordnete Protein NLRX1, das N-terminal über eine Domäne zur Interaktion mit der Mitochondriummembran verfügt<sup>[247,248]</sup>. Die Abbildung 1.4 gibt einen Überblick über die Anordnung der Domänen in einigen NLRs.


NLR	Domänenstruktur	Funktionen
CIITA		MHC II Expression
NLRP12		Regulation inflammatorischer Signalwege durch NF-κB-Inhibition
NLRX1		Interaktion mit Mitochondrienmembran, Modulation der NF-κB Aktivierung durch ROS
NOD1		Bindung von bakteriellen PGN-Fragmenten, Aktivierung von NF-κB
NOD2		Bindung von bakteriellen PGN-Fragmenten, Aktivierung von NF-κB


 CARD-Domäne

 Pyrin-Domäne

 mitochondriale Targetsequenz

 saure Transaktivator-Domäne

 NBS-Domäne

 leuzinreiche Region

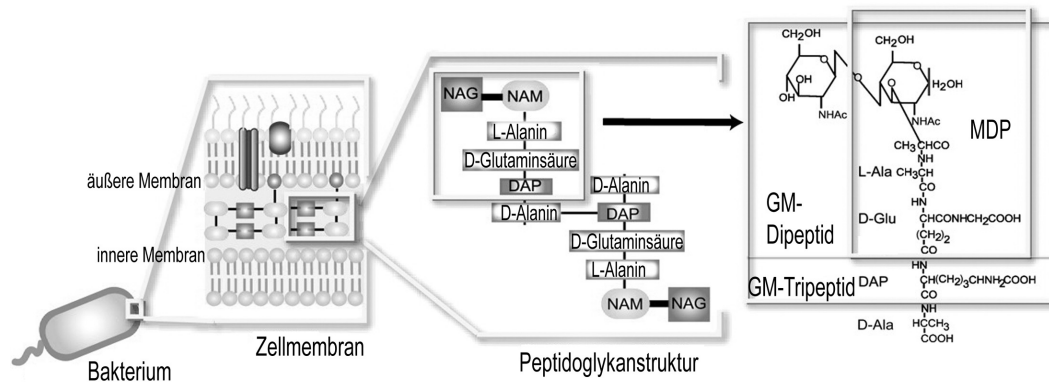
**Abb. 1.4: Struktur und Funktion einiger NLRs**

Übersicht über die Anordnung der Domänen und die primäre Funktion einiger NLR-Moleküle, die mehrheitlich aus der intrazellulären Erkennung von PAMPs besteht. CIITA = *class II MHC transactivator*, NLRP = NLR mit Pyrindomäne, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, PGN = Peptidoglykan (modifiziert nach Shaw *et al.*<sup>[247]</sup>).

Mutationen in NOD2 werden mit Morbus Crohn<sup>[249,250]</sup> und dem Blau-Syndrom<sup>[251]</sup> assoziiert. Die prominenteste Funktion von NOD2 besteht in der Bindung von PAMPs und einer nachfolgenden Aktivierung von NF-κB.

### Liganden

NOD2 bindet Fragmente von Peptidoglykan wie Glutamyl-Muramyldipeptid (GM-Dipeptid)<sup>[252]</sup> und Muramyldipeptid (MDP)<sup>[253,254]</sup>, die kleinste biologisch aktive Komponente des Freund'schen Adjuvans<sup>[255]</sup> (s. Abb. 1.5).



**Abb. 1.5: Muramyl-dipeptid (MDP): NOD2-aktivierender Bestandteil des Peptidoglykans**

Gezeigt wird eine schematische Darstellung der Komponenten einer Bakterienzellwand. Zwischen innerer und äußerer Zellmembran befindet sich das Peptidoglykan, das durch die Vernetzung von Ketten zweier alternierender Aminoglykoside (NAG = N-Acetylglucosamin, NAM = N-Acetylmuraminsäure) eine kristallgitterartige Struktur ausbildet. Beim Abbau der Zellmembran werden einzelne Peptidoglykanfragmente wie GM-Tri/Dipeptid oder MDP freigesetzt. DAP = Diaminopimelinsäure (modifiziert nach Wilmanski *et al.* [256]).

Während das Vorkommen von GM-Dipeptid *in vivo* unstrittig ist [257–259], wird das Vorhandensein von MDP unter physiologischen Umständen kontrovers diskutiert. Einige Autoren bestreiten die Existenz von MDP unter physiologischen Bedingungen [257,260] oder im Rahmen einer Immunantwort [261], andere spekulieren dagegen über ein temporäres Vorkommen von MDP bei bakteriellen Teilungsprozessen [262] oder intrazellulären Abbauprozessen in Phagolysosomen von Immunzellen [263,264].

Bei intrazellulären Bakterien kann eine Freisetzung von Peptidoglykanfragmenten ins Zytosol und damit eine direkte Erkennung durch NOD2 angenommen werden [265]. Dagegen wird die Art der Zusammenführung von extrazellulärem MDP und intrazellulärem NOD2 diskutiert. Vorgesprochen wird ein Membrantransport von MDP durch das spezifische Peptid-Transportprotein 1 (PepT1) [263,266]. Ein anderer Ansatz geht von einer initialen Endo-/Phagozytose des Bakteriums aus. Dabei könnten beim Abbau des Peptidoglykans im Phagolysosom MDP oder ähnliche, MDP enthaltende Muropeptide entstehen [264]. Diese würden anschließend aus dem Phagolysosom transportiert werden, wo sie entweder an der phagolysosomalen Membran verblieben oder ins Zytosol diffundierten [267]. Natürlich ist eine Kombination beider Mechanismen *in vivo* ebenfalls diskutabel [256]. Um eine schnelle Übergabe des MDP an NOD2 zu ermöglichen, wird beim MDP-Kontakt der extrazytosolischen Seite von Plasma- oder zellinterner Membran NOD2 an die zytosolische Seite der Membran rekrutiert [268–270].

Weiterhin interagiert NOD2 mit dem *autophagy-related protein 16-like 1* (ATG16L1) und rekrutiert weitere, zur Autophagie notwendige Proteine [271]. In humanen DCs wurde die NOD2-abhängige Induktion von Autophagie als mit entscheidend für die Zuführung von Bakterien zum Lysosom und die daran anschließende, MHC-II-abhängige Antigenpräsentation beschrieben [272].

## 1 Einleitung

Damit ist NOD2 aufgrund der vermittelten Stimulation der Zytokin- bzw. AMP-Expression<sup>[273]</sup> sowohl an der extrazellulären, als auch, durch die Induktion der Autophagie gegenüber eindringenden Bakterien, an der intrazellulären Bekämpfung von Pathogenen beteiligt<sup>[270,274]</sup>.

### NOD2-exprimierende Zellen

Die Expression von NOD2 wurde in Epithelzellen aus dem Dünndarm<sup>[275]</sup> (inklusive der Paneth-Zellen<sup>[276]</sup>), dem Mund- und Rachenraum, der Lunge und der Niere<sup>[277]</sup> beschrieben. Weiterhin konnte NOD2 in Monozyten/Makrophagen<sup>[278]</sup>, DCs<sup>[279]</sup>, Granulozyten<sup>[280]</sup>, NK-Zellen<sup>[281]</sup> und B-Zellen<sup>[282,283]</sup> nachgewiesen werden. Ebenso konnte die Expression von NOD2-*messenger*-RNA (mRNA) in humanen CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten<sup>[284]</sup>, in T-Zellen aus Tonsillen<sup>[285]</sup>, T<sub>reg</sub>-<sup>[286]</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[287,288]</sup> gezeigt werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass NOD2 von verschiedenen Epithel- und Immunzellen zur direkten Erkennung bakterieller Infektionen verwendet wird, die anschließend mit der Expression von Defensinen, Zytokinen und Chemokinen bekämpft werden können.

### 1.3.3 Zytokine und antimikrobielle Peptide

Nach Identifikation eines Pathogens werden von einer Immunzelle Maßnahmen zur Bekämpfung eingeleitet. Dazu gehört ggf. ein direktes Vorgehen mittels Phagozytose und der Freisetzung von AMPs, aber auch die Aktivierung und Rekrutierung weiterer Immunzellen durch Signalmoleküle. Die letztere Maßnahme ist umso wichtiger, je geringer die absolute Zahl der vor Ort präsenten Immunzellen ist.

#### Zytokine

Zytokine sind Proteine mit einer Größe von ca. 25 Kilodalton (kDa), die – meist als Reaktion auf einen Aktivierungsreiz – von verschiedenen Zellen freigesetzt werden, um dann durch Bindung an einen spezifischen Rezeptor der freisetzenden Zelle selbst („autokrin“) oder anderer Zellen („para-“ und/oder „endokrin“) Proliferation, Differenzierung, Bewegung oder Freisetzung weiterer Mediatoren zu beeinflussen. Die Einteilung der Zytokine erfolgt entsprechend ihrer Struktur in hämatopoetine (Wachstumshormone und zahlreiche Interleukine), der TNF-Familie zugehörige (Zytokine mit einer Funktion in angeborener und adaptiver Immunität), Chemokine (z.B. CCL2/*monocyte chemoattractant protein 1* (MCP-1), CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL4/MIP-1 $\beta$ , CCL5/RANTES, CXCL1, -2, -3 / *growth-related oncogene* (GRO)- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10) und Interferone (IFN- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$ )<sup>[2]</sup>.



## Interferone

Als Gruppe der Zytokine werden Interferone durch aktivierte Zellen gebildet, um andere Zellen in der unmittelbaren Umgebung in deren Verhalten zu beeinflussen. Die Bezeichnung „Interferone“ leitet sich vom englischen Wort *interfere* (= sich einmischen, stören, hemmen) ab, das die Hemmung einer Virusreplikation durch IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  beschreibt. Die beiden genannten Interferone gehören zu den Typ I-Interferonen und werden vermutlich als Reaktion auf doppelsträngige, virale RNA gebildet. Nach der Freisetzung werden sie durch Rezeptoren der produzierenden Zelle selbst wie auch benachbarter Zellen gebunden. Infolgedessen erhöht sich sowohl die Virenresistenz als auch die Expression von MHC-I-Molekülen, die virale Peptide präsentieren und die befallene Zelle gegenüber dem körpereigenen Immunsystem auffällig werden lassen. Darüber hinaus aktivieren freigesetzte Typ-I-Interferone auch NK-Zellen zur gezielten Tötung von virusinfizierten Zellen<sup>[2]</sup>.

Während IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  von nahezu allen Zellen produziert werden können, wurde die Synthese des einzigen Typ-II-Interferons IFN- $\gamma$  anfangs exklusiv T<sub>h</sub>1-, CD8<sup>+</sup>- und NK-Zellen zugeschrieben<sup>[289,290]</sup>. Mittlerweile wurden auch APZs wie Monozyten, Makrophagen und DCs<sup>[291,292]</sup>, außerdem B-<sup>[293,294]</sup>, NKT-<sup>[295]</sup>, T<sub>reg</sub>-<sup>[296]</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[104–106,241]</sup> als IFN- $\gamma$ -Produzenten identifiziert.

IFN- $\gamma$  bewirkt in den Zielzellen eine verstärkte Expression von MHC-I und weiteren Proteinen, die bei der Beladung von MHC-I mit Antigenpeptiden involviert sind. Ebenso ist IFN- $\gamma$  ursächlich für eine Absenkung der intrazellulären Tryptophankonzentration, was dort residierende Parasiten aushungert und sie so angreifbar macht<sup>[2]</sup>. Weiterhin stimuliert IFN- $\gamma$  in Gewebszellen die Expression von Chemokinen zur Rekrutierung mononukleärer Zellen, während es gleichzeitig die Produktion von Chemokinen, die neutrophile Zellen herbeiführen würden, inhibiert<sup>[297–308]</sup>. In Kombination mit TNF- $\alpha$  bewirkt IFN- $\gamma$  eine Formveränderung von Endothelzellen, so dass sich ebenfalls durch IFN- $\gamma$  aktivierte und rekrutierte Makrophagen zur Pathogeneintrittsstelle bewegen können<sup>[2]</sup>. Immunzellen werden von IFN- $\gamma$  in ihrer Aktivität gesteigert, in ihrer Proteinproduktion beeinflusst oder in ihrer Differenzierung gesteuert. So aktiviert IFN- $\gamma$  NK-Zellen<sup>[309]</sup> und verstärkt in mononukleären Phagozyten und DCs die Expression von MHC-II<sup>[310,311]</sup>.

In Bezug auf T-Zellen verursacht IFN- $\gamma$  die Differenzierung ruhender zu T<sub>h</sub>1-Zellen, während die Differenzierung zu T<sub>h</sub>2-Zellen unterdrückt wird. Überdies stimuliert IFN- $\gamma$  auch eine erhöhte Expression von CXCR3 und dessen Liganden CXCL9/MIG, -10/IP-10 und -11/I-TAC, die im Verbund wiederum eine durch T<sub>h</sub>1-Zellen vermittelte Immunreaktion begründen (s. auch Seite 27, Abschnitt „CXCR3“). Weil T<sub>h</sub>1-Zellen ebenfalls IFN- $\gamma$  herstellen, wird so ein sich selbst verstärkender Prozess in Gang gesetzt, der erst nach der Beseitigung des Pathogens zurückgefahren wird<sup>[2]</sup>. Somit bewirkt IFN- $\gamma$  sowohl direkt als auch indirekt eine auf T<sub>h</sub>1-Zellen begründete Immunantwort.

## Chemokine

Aus der in Kapitel 1.3.1 vorgestellten Gruppe der Chemokine sind im Rahmen der vorliegenden Arbeit CCL20/MIP-3 $\alpha$  ( $\Rightarrow$  CCR6-Ligand, s. Seite 26, Abschnitt „CCR6“) und CCL3/MIP-1 $\alpha$  von besonderem Interesse.

CCL3/MIP-1 $\alpha$  wird von Monozyten, Mastzellen, Fibroblasten, T<sub>h</sub>1-Zellen<sup>[2]</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[312]</sup> exprimiert und zeigt chemotaktische Wirkung auf Monozyten/Makrophagen<sup>[313]</sup>, neutrophile Granulozyten, DCs, NK-Zellen und T-Zellen<sup>[314]</sup>. Desweiteren trägt CCL3/MIP-1 $\alpha$  zur Differenzierung von T- zu T<sub>h</sub>1-Zellen, und damit zu einer von IFN- $\gamma$  beeinflussten Immunantwort bei<sup>[2,315–317]</sup>. Basophile und eosinophile Granulozyten weisen nach Stimulation mit CCL3/MIP-1 $\alpha$  eine erhöhte, intrazelluläre Kalziumkonzentration auf. Während basophile Granulozyten zudem Histamine und Leukotriene freisetzen<sup>[318–320]</sup>, reagieren eosinophile Granulozyten mit einer verstärkten Sezernierung des *eosinophil cationic protein*<sup>[321]</sup>.

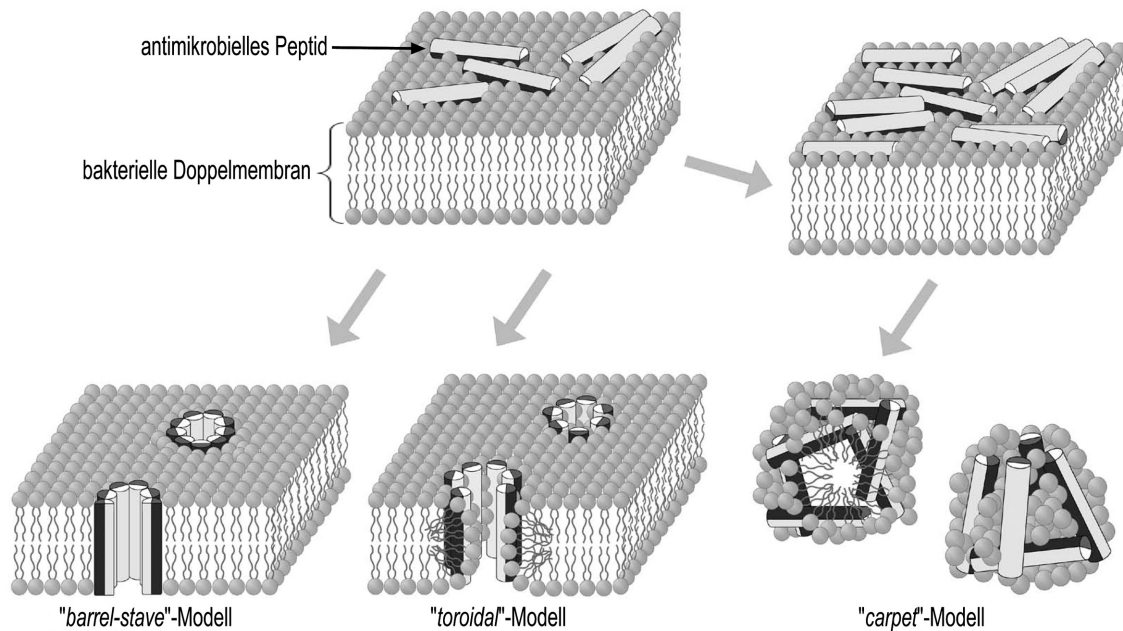
## Antimikrobielle Peptide (AMPs)

Bei AMPs handelt es sich entsprechend der Bezeichnung um Peptide, die eine mindestens wachstumshemmende, wenn nicht sogar lysierende – also „antimikrobielle“ – Wirkung auf Mikroorganismen aufweisen. Bis heute wurden mehr als 1700 verschiedene AMPs identifiziert, die durch so verschiedene Organismen wie Bakterien, Insekten, Amphibien, Menschen und anderen produziert werden (siehe dazu die Datenbank unter: <http://aps.unmc.edu/AP/> nach Wang & Wang<sup>[322]</sup>).

## Eigenschaften

AMPs bestehen typischerweise aus ca. 30 (beim Menschen: 18 – 50) Aminosäuren mit einer insgesamt kationischen Ladung. Mit Hilfe der ca. 50 % hydrophoben Aminosäuren erfolgt mittels Proteinfaltung die Ausbildung einer amphipathischen Struktur, die essentiell für die Porenbildung in einer bakteriellen Zellmembran ist<sup>[323]</sup>. Dazu werden gegenwärtig drei verschiedene Mechanismen diskutiert (s. Abb. 1.6). Die Zerstörung der Membranintegrität führt zu einem Verlust von Metaboliten, des transmembranen elektrochemischen Ionengradienten und damit letztlich zur Lyse der Zelle.

Einige AMPs ohne den für die Porenbildung entscheidenden amphipathischen Charakter translozieren direkt in das bakterielle Zytoplasma, um intrazelluläre Ziele zu erreichen. So bindet das AMP Buforin Nukleinsäuren<sup>[329]</sup>, das aus der Erbse isolierte Defensin *pisum sativum defensin 1* (Psd1) hemmt Proteine der Zellzykluskontrolle<sup>[330]</sup>, und eine Reihe von aus Insekten isolierten AMPs inaktiviert bakterielles DnaK, das zur Familie der Hitze-Schock-Proteine gehört und für die korrekte Faltung von Proteinen mitverantwortlich ist<sup>[331]</sup>.



**Abb. 1.6: Schematische Darstellung theoretischer Modelle zur AMP-vermittelten Zerstörung der bakteriellen Membran**

Bakterielle Zellmembranen sind stärker negativ geladen als eukaryontische und ziehen dementsprechend die kationischen AMPs an<sup>[324]</sup>. Diese lagern sich mit ihrer hydrophoben Domäne (schwarz) in die Lipiddoppelschicht ein. Nachfolgend aggregieren mehrere AMP-Moleküle zu einem Molekülkomplex, der sich in die Bakterienmembran „hineindreht“ und dort schließlich wie im *barrel-stave*-Modell (zu Deutsch: „Fassband-Modell“) bzw. im *toroidal*- (zu Deutsch: „Ring“) oder *worm-hole*- (zu Deutsch: „Wurmloch“) Modell beschrieben zur Ausbildung von Ionenkanälen oder transmembranen Poren führt<sup>[325]</sup>. Dabei ist die hydrophile Domäne (hellgrau) entscheidend: Die gleichartige Ladung drückt die AMP-Moleküle auseinander und lässt so in ihrer Mitte die Pore entstehen. Bedeckt – wie im *carpet*- (zu Deutsch: „Teppich“) Modell beschrieben – eine große Menge AMPs die Membranoberfläche wie einen Teppich, so kommt es bei einer kritischen Konzentration zur Ausbildung von Mizellen und kleinen AMP-Membranlipid-Aggregaten, die sich aus der Bakterienmembran herauslösen. Die entstandenen Löcher in der Membran werden von nachströmenden AMPs gefüllt, so dass die Membran im Ergebnis regelrecht zerrissen wird<sup>[326,327]</sup> (modifiziert nach Wiesner & Vilcinskas<sup>[328]</sup>).

Neben der direkten, antimikrobiellen Wirkung verfügen manche AMPs zusätzlich über chemotaktische Eigenschaften, greifen in die Expression von Zytokinen durch Epithelzellen und Lymphozyten ein oder modulieren die Reifung von DCs.

### Prototypische AMPs

Prototypische humane AMPs umfassen die Defensine und das Cathelicidin LL-37 (besteht aus 37 Aminosäuren, die Sequenz beginnt mit zwei Leuzinen (LL)). Die Struktur der **Defensine** wird durch die Präsenz von drei  $\beta$ -Faltblättern, sechs konservierten, durch Disulfidbrücken verbundenen Cysteinen und einer positiven Gesamtladung charakterisiert. Je nachdem in welchem Muster die sechs Cysteine untereinander verbunden sind, wird das betreffende Defensin als  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Defensin bezeichnet (s. Abb. 1.7).

## 1 Einleitung



**Abb. 1.7: Primärstruktur der humanen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine**

Die Disulfidbrücken zwischen den entsprechenden Cysteinen sind schematisch dargestellt (modifiziert nach Wiesner & Vilcinskas<sup>[328]</sup>).

Bisher sind sechs humane  $\alpha$ -Defensine identifiziert worden: *Human neutrophil peptide 1* (HNP-1) bis HNP-4, außerdem *human defensin 5* (HD-5) und HD-6. HNP-1 bis -4 kommen hauptsächlich in den sauren Granula neutrophiler Granulozyten vor<sup>[332]</sup>, werden aber auch z.T. von  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimiert<sup>[333,334]</sup>. HD-5 und -6 können vornehmlich in Paneth-Zellen im Dünndarm, die vier humanen  $\beta$ -Defensine (HBD-1 bis -4) bevorzugt in Schleimhaut- und Epithelzellen nachgewiesen werden. Letztere verfügen über ein breites Spektrum nicht nur an antibakteriellen, sondern auch antifugalen und antiviralen Eigenschaften<sup>[335]</sup>.

**Cathelicidine** definieren sich durch eine konservierte, N-terminale Domäne, die eine große Homologie zu Cathelin, einem Inhibitor der Cysteinprotease Cathepsin L, aufweist. Zur Prozessierung der C-terminalen, als AMP funktionierenden Domäne wird die N-terminale Domäne allerdings abgespalten<sup>[336]</sup>. Beim Menschen konnte bisher mit LL-37 nur ein Vertreter der Cathelicidine identifiziert werden. Die nicht prozessierte Proform wird als *human cationic antimicrobial protein 18 kDa* (hCAP-18, die eigentliche molekulare Masse beträgt allerdings 16 kDa) bezeichnet und kann in Leukozyten und Epithelzellen nachgewiesen werden<sup>[337]</sup>. Nach der Freisetzung wird es durch vor Ort vorhandene Proteasen oder – im Fall einer Freisetzung durch neutrophile Granulozyten – durch Proteinase 3 zu LL-37 prozessiert.

Sowohl Defensine als auch LL-37 weisen neben der porenbildenden Funktion noch verschiedene immunmodulatorische Eigenschaften auf. So werden Phagozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten, Mastzellen<sup>[338]</sup>, DCs, T<sub>memory</sub>-<sup>[328,339]</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>[340]</sup> durch verschiedene prototypische AMPs rekrutiert. Lungenepithelzellen werden durch LL-37<sup>[341,342]</sup>, Mastzellen durch  $\alpha$ -Defensine zur Freisetzung von CXCL8/IL-8 stimuliert, das wiederum neutrophile Granulozyten rekrutiert<sup>[343–346]</sup>.

AMPs greifen auch in die Kontrolle von Zytokinen ein. So kann LL-37 die Freisetzung proinflammatorischer Moleküle wie TNF- $\alpha$ , Stickoxid und Thromboplastin/*tissue factor* durch Monozyten/Makrophagen verhindern und damit eine Immunantwort abschwächen<sup>[347,348]</sup>.  $\beta$ -Defensine induzieren dagegen die Produktion von CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3 $\alpha$ , CCL5/RANTES, IL-6, IL-10, IL-18, CXCL10/IP-10, TNF- $\alpha$  und IL-1 in Keratinozyten<sup>[349,350]</sup>, sowie die Degranulation von Mastzellen<sup>[340]</sup>.

Von den erwähnten Zellpopulationen werden vor allem DCs in ihren Eigenschaften durch AMPs moduliert. So verstärkt LL-37 deren Fähigkeit zur Antigenpräsentation und damit eine von T<sub>h</sub>1-Zellen dominierte Ausrichtung der Immunantwort<sup>[351]</sup>. HBD-2 verstärkt den Reifungsprozess von DCs durch einen TLR4-abhängigen Mechanismus<sup>[226]</sup>. Damit werden AMPs auch als Mediatoren zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem charakterisiert<sup>[352,353]</sup>.

### Nicht prototypische AMPs

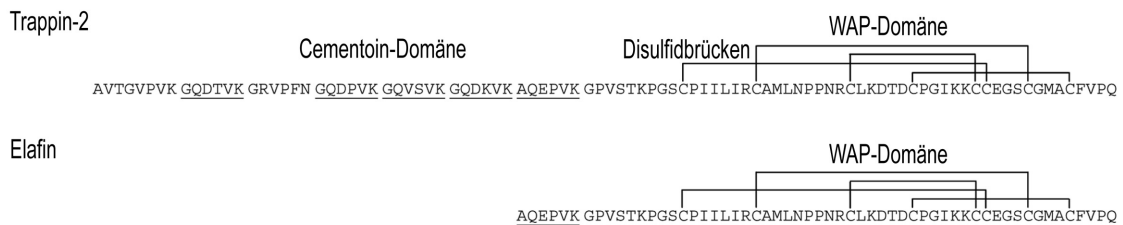
Neben den prototypischen AMPs existieren noch weitere, durch humane Zellen produzierte Moleküle mit antimikrobiellen Eigenschaften. **In der Haut** können neben den  $\beta$ -Defensinen und LL-37 typischerweise die AMPs Dermcidin, Psoriasin und RNase 7 nachgewiesen werden. Desweiteren finden sich multifunktionelle Peptide mit antimikrobiellen Eigenschaften wie die Proteaseinhibitoren *secretory leukocyte protease inhibitor* (SLPI) und Elafin, das Chemokin CCL20/MIP-3 $\alpha$ , das bakterielle Zellwand spaltende Lysozym (besitzt auch unabhängig von seiner Muramidaseaktivität antimikrobielle Eigenschaften), das in der Angiogenese genutzte Angiogenin/RNase 5 und das in der Vasodilatation eine Rolle spielende Adrenomedullin. **In den Granula** neutrophiler Granulozyten können neben den prototypischen  $\alpha$ -Defensinen und LL-37 auch Granulysin, das *bactericidal/permeability increasing protein* (BPI) und Azurocidin (= *cationic antimicrobial protein 37 kDa* (CAP-37)) nachgewiesen werden. Desweiteren finden sich ebenfalls multifunktionelle Proteine mit antimikrobiellen Eigenschaften wie Lysozym, das Eisenionen bindende Lactoferrin, die Serinprotease Cathepsin G und SLPI. Einige **house-keeping-Proteine** wie Ubiquicidin (= ribosomales Protein S30) und Buforin I (= N-terminale Domäne des Histonproteins H2A) besitzen ebenfalls antimikrobielle Eigenschaften<sup>[328]</sup>.

**Elafin** wurde als ein Inhibitor für Elastase und Proteinase 3 charakterisiert<sup>[354–356]</sup>. Aus dieser Eigenschaft ergeben sich die beiden Bezeichnungen **Elastase f** (*inire*, zu Deutsch: beenden) **inhibitor** (Elafin) und *skin-derived antileukoprotease* (SKALP) für dieses Molekül. Initial weist Elafin 117 Aminosäuren auf. Die N-terminalen 22 Aminosäuren stellen das Signalpeptid, die folgenden 38 die sogenannte Cementoindomäne und die C-terminalen 57 die eigentliche Elafindomäne dar. Nach Abspaltung des Signalpeptids wird das Protein aus den 95 C-terminalen Aminosäuren als Pre-Elafin/*transglutaminase substrate and whey acidic protein (WAP) domain containing protein* (Trappin)-2 bezeichnet. Die Primärstruktur der Cementoindomäne weist mehrfach die Aminosäuresequenz „GQDPVK“ auf. Diese Sequenz wird spezifisch von

## 1 Einleitung

einer Transglutaminase erkannt, die dementsprechend Trappin-2 kovalent an verschiedene Proteine der extrazellulären Matrix binden kann<sup>[357]</sup>.

Nach Prozessierung aus Pre-Elafin/Trappin-2 verbleibt eine der fünf Substratsequenzen der Transglutaminase bei der C-terminalen Elafindomäne. Dementsprechend kann auch das voll prozessierte Elafinmolekül an andere Proteine gebunden werden. Weiterhin weist Elafin eine zuerst im *whey acidic protein* gefundene Domäne (WAP-Domäne) auf, die durch acht Cysteine und sie verbindende Disulfidbrücken gekennzeichnet ist (s. Abb. 1.8).



**Abb. 1.8: Primärstruktur und Organisation der Domänen von Trappin-2 und Elafin**

Trappin-2 besteht aus einer N-terminalen Cementoin- und einer C-terminalen WAP-Domäne. Die Substratsequenzen der Transglutaminase sind unterstrichen. Elafin entsteht durch proteolytische Spaltung aus Pre-Elafin/Trappin-2 und entspricht dessen C-terminaler WAP-Domäne und einer Substratsequenz für die Transglutaminase (modifiziert nach Wiesner & Vilcinskas<sup>[328]</sup>).

Die molekulare Masse von Pre-Elafin/Trappin-2 beträgt 9,9 kDa, die von voll prozessiertem Elafin ca. 6 kDa. In vorhergehenden Arbeiten erstellte Western-Blot-Analysen zeigten allerdings mehrfach auch erhöhte molekulare Massen für beide Proteine. Da weder Pre-Elafin/Trappin-2 noch Elafin Ansatzpunkte für eine Glykosylierung aufweisen, wurde die vermeintliche Erhöhung der molekularen Masse auf die oben beschriebene kovalente Bindung an andere Proteine zurückgeführt<sup>[358,359]</sup>.

Elafin wurde in der Haut, der Lunge, der Mundhöhle und dem weiblichen Reproduktionstrakt nachgewiesen<sup>[355]</sup>. Neben der Inhibition von Proteasen besitzt Elafin auch antimikrobielle Funktionen gegen *Pseudomonas aeruginosa* (*Ps. aeruginosa*) und *S. aureus*<sup>[360]</sup>. Desweiteren weist Elafin eine chemotaktische und aktivierende Wirkung auf Leukozyten auf<sup>[361]</sup>. Für Pre-Elafin/Trappin-2 ist darüber hinaus eine opsonierende Wirkung gegenüber Pathogenen<sup>[362]</sup> und eine antimikrobielle Aktivität u.a. gegen *E. coli*<sup>[363]</sup> beschrieben. Auch die Cementoin-domäne allein weist eine antimikrobielle Wirkung auf<sup>[360]</sup>, die sich wahrscheinlich aufgrund ihrer amphipathischen Ladung ergibt<sup>[328]</sup>.

## 2 Fragestellung der Arbeit

Für die Funktionalität des Immunsystems ist es entscheidend, dass die Immunzellen sich (1) im vorgesehenen Gewebe aufhalten, (2) Pathogene als solche erkennen und (3) Maßnahmen zu ihrer Bekämpfung einleiten. In der vorliegenden Arbeit sollten diesbezüglich einige relevante Aspekte im Hinblick auf humane  $\gamma\delta$  T-Zellen näher beschrieben werden.

(1)  $\gamma\delta$  T-Zellen sind in unterschiedlichen Geweben wie Darm, Synovialflüssigkeit, Lunge, Haut und auch Blut nachweisbar. Für die unterschiedliche Lokalisation von T-Zellen gilt u.a. eine verschieden starke Expression bestimmter Chemokinrezeptoren als verantwortlich. Dementsprechend waren differentielle Expressionsmuster ausgewählter Chemokinrezeptoren auf V $\delta$ 1 und V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus peripherem Blut, Dünndarmbiopsien und Synovialflüssigkeit zu vermuten, und sollten in der vorliegenden Arbeit ermittelt werden. Weiterhin wurde die Expression distinkter Chemokinrezeptoren in vorhergehenden Studien mit bestimmten Zelleigenschaften korreliert (z.B. CCR5-Expression und T<sub>H</sub>1-Polarisation der betreffenden T-Zelle). Damit konnten die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Expressionsstärken ausgewählter Chemokinrezeptoren als Hinweise für entsprechende Eigenschaften von  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen interpretiert werden.

(2)  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten können mikrobielle Liganden u.a. über Mustererkennungsrezeptoren wahrnehmen. Während die Expression von funktionalen TLRs bereits beschrieben worden ist, sollte in der vorliegenden Arbeit die mögliche Expression und Funktionalität des Mustererkennungsrezeptors NOD2 in  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht werden.

(3)  $\gamma\delta$  T-Zellen reagieren auf Pathogene u.a. mit einer zytokininduzierten Aktivierung weiterer Immunzellen und/oder der Expression von AMPs. In vorhergehenden Studien konnte eine konstitutive oder spezifisch über  $\gamma\delta$  TZR und/oder TLRs induzierbare Expression von immunologischen Mediatoren gezeigt werden. Mit dem Überstand adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* wurde in der vorliegenden Arbeit eine der physiologischen Situation entsprechendere Stimulanz verwendet und die nachfolgende Expression von Zyto-/Chemokinen und AMPs charakterisiert. Aus diesen Analysen wurden Hinweise auf ein mögliches Erkennen von *Ps. aeruginosa* und eine eventuelle Produktion bestimmter AMPs durch  $\gamma\delta$  T-Zellen erwartet.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es somit, humane  $\gamma\delta$  T-Zellen im Hinblick auf ausgewählte Aspekte der frühen Immunantwort näher zu charakterisieren.





# 3 Material und Methoden

## 3.1 Material

### 3.1.1 Geräte

Gerät	Firma
<i>...für die zellbiologischen Methoden:</i>	
$\beta$ -Szintillationszähler 1450 Microbeta <sup>TM*</sup> (* <i>Trademark</i> = eingetragenes Warenzeichen)	Inotech, Schweiz
Absaugvorrichtung Filter Mate Harvester <sup>TM</sup>	Perkin Elmer, Dreieich
Bestrahlungsgerät Gammacell 40 <sup>TM</sup>	Atomic Energy of Canada Limited, Kanada
CO <sub>2</sub> -Begasungsbrutschränke	Heraeus, Osterode
Durchflusszytometer FACSCalibur <sup>TM</sup> (inklusive CellQuest <sup>TM</sup> 4.0.2)	Becton Dickinson (BD) Bioscience, NJ, <i>United States of America</i> (USA)
Durchflusszytometer FACSScan <sup>TM</sup>	BD Bioscience
Finnpipetten (8- und 12-Kanal)	Thermo Labsystems, Finnland
Lichtmikroskop ID 03 <sup>TM</sup>	Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Standard 25 <sup>TM</sup>	Zeiss
Lichtmikroskop Telaval 31 <sup>TM</sup> (Binokular)	Zeiss
Pipetierhilfe accu-jet <sup>TM</sup>	pro Brand, Wertheim
Pipetierhilfen (10, 100, 200, 1000 Mikroliter ( $\mu$ l)) (1)	Eppendorf, Hamburg
Pipetierhilfen (10, 100, 200, 1000 $\mu$ l) (2)	Gilson, WI, USA
Sterilbank Lamin air <sup>TM</sup>	Heraeus
Thermostat Haake DC10 <sup>TM</sup>	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Wasserbad Haake W19 <sup>TM</sup>	Thermo Fisher Scientific
Zellsortierungseinheit FACSAria <sup>TM</sup> (inklusive FACSDiva <sup>TM</sup> 5.0.3)	BD Bioscience
Zentrifuge Biofuge 13 <sup>TM</sup>	Heraeus
Zentrifuge Biofuge 15R <sup>TM</sup>	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0 <sup>TM</sup>	Heraeus
Zentrifuge Varifuge 3.0R <sup>TM</sup>	Heraeus

### 3 Material und Methoden

Gerät	Firma
<i>... für die molekularbiologischen Methoden:</i>	
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100 <sup>TM</sup>	Zeiss
Gelelektrophoresekammer DNA Mini Sub Cell <sup>TM</sup>	Bio-Rad, CA, USA
Gelelektrophoresekammer DNA Sub Cell <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer Mini Sub Cell GT <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer Wide Mini Sub Cell GT <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Kamera und Fotodrucker Gel Imager <sup>TM</sup>	INTAS, Göttingen
PCR-Maschine T3000 Thermocycler <sup>TM</sup>	Biometra, Göttingen
PCR-Maschine TGradient <sup>TM</sup>	Biometra
PCR-Maschine UNO II <sup>TM</sup>	Biometra
Spannungstransformator Power PAC 200 <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Spectrometer ND-1000 NanoDrop <sup>TM</sup>	peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tischzentrifuge 5415C <sup>TM</sup>	Eppendorf
Tischzentrifuge Minicentrifuge <sup>TM</sup>	National Labnet Co, NJ, USA
Quelle für ultraviolettes Licht	INTAS
Reinstwasseranlagen Milli-Q <sup>TM</sup> & ELIX-S <sup>TM</sup>	Millipore, MA, USA
<i>... für die proteinbiochemischen Methoden:</i>	
Chromatographiepapier	Whatman, <i>United Kingdom</i> (UK)
Durchlichteinheit	Leitz, Wetzlar
Entwicklermaschine CP 1000 <sup>TM</sup>	Agfa, Gera
Entwicklungskassette Hypercassette <sup>TM</sup>	General Electric (GE) Healthcare, UK
Feinwaage A120S <sup>TM</sup>	Sartorius, Göttingen
Free-flow high magnetic gradient chamber <sup>TM</sup>	Hooek GmbH, Kiel
Gelelektrophoresekammer Protean II Xi Cell <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Heizblöcke Thermostat DB-2 <sup>TM</sup> und DB-3 <sup>TM</sup>	Techne, Wertheim
Homogenisator	KONTES, NJ, USA
Mikro-ELISA-Reader Infinite M200 <sup>TM</sup> (inklusive i-Control <sup>TM</sup> 1.3)	Tecan, Schweiz
pH Meter wtw pH 315i <sup>TM</sup>	Wissenschaftlich-Technische Werk- stätten GmbH, Weilheim
Rüttler für Mikrotiterplatten VIBRAX-VXR <sup>TM</sup>	IKA, Staufen
Rüttler für Minireaktionsgefäße (1)	Cenco Instrumenten, Niederlande
Rüttler für Minireaktionsgefäße (2)	Scientific Industries, New York, USA
Schwämme Fiber Pads <sup>TM</sup> für Western-Blot	Bio-Rad

Gerät	Firma
Spannungstransformator Model 200/2.0 <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Spannungstransformator Power PAC 300 <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Tischzentrifuge 5417C <sup>TM</sup>	Eppendorf
Western-Blot Transfer-Tank Trans-Blot <sup>TM</sup>	Bio-Rad
Wipptisch Rocky <sup>TM</sup>	Fröbel Labortechnik, Lindau

### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
<sup>3</sup> H-Thymidin	GE Healthcare
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Einfrierröhrchen CryoTube <sup>TM</sup>	Thermo Fisher Scientific
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Heparin	rathiofarm, Ulm
Hyperfilm ECL <sup>TM</sup>	GE Healthcare
MACS Pre-Separation-Filter <sup>TM</sup>	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach
MACS Separation LS Column <sup>TM</sup>	Miltenyi Biotec
Mikrotiterplatte, Rundboden, 96 Kavitäten	Nunc
Mikrotiterplatte, Spitzboden, 96 Kavitäten	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Minireaktionsgefäße (1,5 und 2 Milliliter (ml))	Sarstedt, Nürnberg
Nitrozellulosemembran Hybond C Extra <sup>TM</sup>	GE Healthcare
Pasteurpipetten	Assistent, Sondheim
PCR-Röhrchen, einzeln	Sarstedt
Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (1)	Sarstedt
Pipettenspitzen (2)	Elkay, UK
Pipettenspitzen (3)	Thermo Labsystems
Spritzen und -aufsätze	BD, NJ, USA
Spritzenvorsatzfilter 0,2 $\mu$ m	Sartorius
Spritzenvorsatzfilter 0,45 $\mu$ m	Sartorius
Zellkulturflaschen Cellstar <sup>TM</sup> (50, 250, 650 ml)	Greiner
Zellkulturplatten (12, 24, 96 Kavitäten)	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (5 ml) (1)	Sarstedt
Zentrifugenröhrchen (5 ml) (2)	BD Falcon, NJ, USA
Zentrifugenröhrchen (5 ml) (3)	Nunc

### 3.1.3 Material für zellbiologische Methoden

#### Frisch isolierte Zellen

##### Herkunft

Ausgangsmaterial für frisch isolierte Zellen war frisch abgenommenes Blut freiwilliger, gesunder Spender. Weiterhin wurden Leukozytenkonzentrate („*buffy coats*“) aus dem Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein (UK S-H), Campus Kiel bezogen. Sollten alle kernhaltigen Zellen aus einem *buffy coat* isoliert werden (wie in Abb. 4.8), so wurden die Erythrozyten in einer entsprechenden Probe lysiert. Sollten **PBMZ** gewonnen werden, so wurde wie auf Seite 61 (Abschnitt „Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation“) beschrieben eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt.

Mit Hilfe von magnetisch unterstützter Zellsortierung (*magnetic-activated cell sorting* (MACS)) konnten aus PBMZ **NK-Zellen**, **CD14<sup>+</sup> Monozyten**, **CD4<sup>+</sup>** und  **$\gamma\delta$  T-Lymphozyten** isoliert werden (s. Seite 61, Abschnitt „MACS“). Die Reinheit der drei letztgenannten Zellpopulationen wurde i.a.R. durch einen weiteren Isolationsschritt mittels Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierung (*fluorescence-activated cell sorting* (FACS)) in einem FACS Aria<sup>TM</sup> auf nahezu 100 % gesteigert (s. Seite 62, Abschnitt „Zellsortierungseinheit FACS Aria<sup>TM</sup>“).

Zur Analyse von  **$\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Dünndarmgewebe** wurden von Prof. Dr. Holtmeier und Mitarbeitern (damals: Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Frankfurt am Main, gegenwärtig: Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie, Diabetologie, Stoffwechselerkrankungen und Allgemeine Innere Medizin, Krankenhaus Porz am Rhein, Köln) im Rahmen einer Vorsorgeuntersuchung Darmbiopsien aus gesundem Gewebe entnommen und mechanisch zerkleinert. Anschließend wurden vereinzelte Zellen ausgespült und mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen isoliert. Diese wurden direkt nach der Isolation eingefroren und in einem Kühlpaket an das Institut für Immunologie, UK S-H, Campus Kiel verschickt. Darüber hinaus wurde eine Darmbiopsie von Herrn Dr. Braun (Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, UK S-H, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden bis zu einer durchflusszytometrischen Analyse und/oder der Etablierung einer  $\gamma\delta$  T-Zelllinie in flüssigem Stickstoff gelagert. Ggf. musste vor der Verarbeitung der aus den Biopsien gewonnenen mononukleären Zellen erneut eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt werden.

### Material zur Zellisolation

**Lyse der Erythrozyten** Die Lyse der Erythrozyten einer *buffy coat*-Probe zur Isolation aller kernhaltigen Zellen erfolgte mit BD FACS Lysing Solution™ (Bestellnummer (Bestnr.): 349202) nach Herstellerangaben.

**Dichtegradientenzentrifugation** Zur Isolation von PBMZ mittels Dichtegradientenzentrifugation wurde Ficoll-Lösung mit einer Dichte von 1,077 Gramm/ml (g/ml) der Firma Biochrom Aktiengesellschaft (AG) aus Berlin genutzt. Zur Betrachtung im Mikroskop wurden die Zellen vorher mit Eosinlösung (2 g Eosin (Serva, Heidelberg) + 0,25 g NaN<sub>3</sub> (Merck) in 450 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung + 50 ml fetalem Kälberserum (FCS, s. Kap. 3.1.3)) angefärbt.

**MACS-Kits** Zur magnetisch unterstützten Isolation von spezifischen Zellpopulationen wurden folgende Materialien der Firma Miltenyi Biotec verwendet:

Bezeichnung	Bestnr.
FcR Blocking Reagent™	130-059-901
Pre-Separation-Filter™	130-041-407
MidiMACS Starting Kit (LS)™	130-042-301
QuadroMACS Starting Kit (LS)™	130-091-051
CD4 MicroBeads™	130-045-101
CD14 MicroBeads™	130-050-201
Anti-TCR $\gamma/\delta$ MicroBead Kit™	130-050-701

Die Zellen wurden während der Isolationsprozedur in MACS-Puffer (Phosphat-gepufferte Salzlösung (*phosphate-buffered saline* (PBS, Biochrom AG)) + 0,5 % FCS + 2 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA, Serva)) aufgenommen.

**Zellsortierungseinheit FACSAria™** Zur Steigerung der Reinheit isolierter Zellen auf nahezu 100 % wurde die entsprechende Zellpopulation mit den in Tabelle 3.5 verzeichneten Antikörpern fluoreszenzmarkiert und mittels FACSAria™ in ein separates Röhrchen sortiert (s. Seite 62, Abschnitt „Zellsortierungseinheit FACSAria™“).

## Zelllinien

### Herkunft

Die folgenden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien waren oder wurden etabliert und in der vorliegenden Arbeit genutzt:

- Blut (V $\delta$ 1): Die V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien A36DN22, DK-V $\delta$ 1, EP3-V $\delta$ 1, EP4-V $\delta$ 1, DW-SpA-V $\delta$ 1, DW-SpB-V $\delta$ 1, D768\_5 und D768\_6 lagen bereits vor. CK-V $\delta$ 1, LM-V $\delta$ 1, LT-V $\delta$ 1, MVP01, MVP02 und LM301-V $\delta$ 1 wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert.
- Blut (V $\delta$ 2): Die V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zelllinien A36DN8, DK-V $\delta$ 2, EP3-V $\delta$ 2, K989-DIPP-V $\delta$ 2 und DW- $\gamma\delta$  waren bereits vorhanden. CK-V $\delta$ 2, LM-V $\delta$ 2, AH-V $\delta$ 2, JW-V $\delta$ 2, DU-V $\delta$ 2, AV-V $\delta$ 2 und UW-V $\delta$ 2 wurden zusätzlich etabliert.
- Darmbiopsien: Die V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien 13429, TZ-IEL und LM410-IEL wurden im Verlauf dieser Arbeit generiert.
- Synovialflüssigkeit von Patienten mit Lyme-Arthritis: Die V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien JPE und TBT waren von Glatzel *et al.*<sup>[77]</sup> etabliert worden.

Desweiteren wurden folgende Zelllinien verwendet:

- Die Keratinozyten-Zelllinie *human adult low calcium temperature keratinocytes* (HaCaT) wurde von Dr. Meyer-Hoffert (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) bezogen und als Positivkontrolle zum Nachweis von Elafin eingesetzt.
- Bereits mit NOD2 oder dem entsprechenden Leervektor mittels FLP-IN-System<sup>TM</sup> stabil transfizierte *human embryonic kidney* (HEK) 293T-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe (AG) Rosenstiel (Institut für klinische Molekularbiologie der Christian-Albrechts-Universität (CAU) zu Kiel) bezogen und als Positivkontrolle beim Nachweis von NOD2 verwendet.
- HEK 293T-Zellen wurden in Kooperation mit der AG Janßen (Institut für Immunologie, UK S-H, Campus Kiel) transient mit einem *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) bzw. einem EGFP-NOD2-Fusionsprotein kodierenden Vektor (pEGFP bzw. pEGFP-NOD2) transfiziert. Diese Zellen wurden ebenfalls als Positivkontrolle beim Nachweis von NOD2 eingesetzt.
- Die NK-Tumorzelllinie YTS wurde von der AG Janßen zur Verfügung gestellt und als Positivkontrolle beim Nachweis von Granzym B mittels Western-Blot genutzt.

## Kultivierung und Kryokonservierung

Zur Kultivierung von Zellen mussten die kommerziell erhältlichen Medien vor Gebrauch häufig mit zusätzlichen Substanzen ergänzt werden.

Medium / Zusätze	Bezugsquelle
<i>Dulbecco's minimum essential medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i> Nr. 1640 (RPMI 1640)	Invitrogen
X-VIVO 15	Lonza, Belgien
Penicillin/Streptomycin (P/S) (10.000 Internationale Einheiten (IE)/10.000 $\mu\text{g}$ )	Biochrom AG
FCS	Invitrogen
IL-2	Chiron, Marburg
Phytohämagglutinin (PHA)	Murex Biotech, UK

FCS wurde vor der Verwendung bei 56 °C für 30 Minuten (min) inaktiviert und filtriert (0,22  $\mu\text{m}$ ). DMEM wurde ausschließlich zur Kultivierung der stabil mit NOD2 bzw. einem entsprechenden Leervektor transfizierten HEK 293T-Zellen verwendet. Für diesen Zweck wurde das Medium mit 1 % (Volumen/Volumen) (v/v) P/S, 10 % FCS und 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Hygromycin B (Merck, Bestnr.: 103740) versetzt. RPMI 1640 wurde vor Gebrauch mit 1 % (v/v) P/S, 5–10 % FCS und – im Fall einer Kultivierung von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten – mit 50 IE/ml IL-2 ergänzt. Bei einer Restimulation einer T-Zelllinie mittels „Feedercocktail“ (s. Seite 62, Abschnitt „Kultivierung von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien“) wurde PHA in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  verwendet. Zur Kryokonservierung wurden Zellen in RPMI 1640 mit 20 % (v/v) FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) („Einfriermedium“) aufgenommen und schrittweise bei -20 °C, -80 °C und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Zum Waschen oder kurzzeitigen Aufbewahren von Zellen, aber auch als Basis einiger Lösungen wurde PBS verwendet.

## Durchflusszytometrische Analyse

### Puffer und Chemikalien

In der Tabelle 3.3 werden die zur durchflusszytometrischen Analyse genutzten Puffer und Chemikalien aufgeführt.

**Tabelle 3.3: Puffer und Chemikalien zur durchflusszytometrischen Analyse**

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Waschpuffer	bovines Serumalbumin	1 % Gewicht/Volumen (w/v)	Roth
	NaN <sub>3</sub>	0,1 % (w/v)	Merck
	PBS	auf das vorgegebene Volumen auffüllen ( <i>ad Volumina</i> (ad Vol.))	Biochrom AG
Fixierungspuffer	Paraformaldehyd (PFA)	1 % (w/v)	Merck
	PBS	ad Vol.	Biochrom AG
Inhibitor	Monensin	2 Mikromolar ( $\mu\text{M}$ ) (final)	Calbiochem
„Perm/Wash“-Lösung „Staining Buffer“	aus dem Cytofix/Cytoperm-Kit <sup>TM</sup>		BD

### Antikörper

In den folgenden Tabellen werden die Antikörper ( $\alpha(\text{Proteinname})$ ) zur durchflusszytometrischen Analyse aufgeführt.

**Tabelle 3.4: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von Chemokinen und AMPs**

Antikörper	Klon	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle	Bestnr.	Applikation
$\alpha\text{CCL20/MIP-3}\alpha$	67310	PE	IgG <sub>1</sub>	R&D Systems, MN, USA	IC360P	25 $\mu\text{g/ml}$
Ig-Ktrl.-AK	11711	PE	IgG <sub>1</sub>	R&D Systems	IC002P	25 $\mu\text{g/ml}$
$\alpha\text{Perforin}$	delta G9	FITC	IgG <sub>2</sub>	Ancell, MN, USA	358-040	2 $\mu\text{g/ml}$
Ig-Ktrl.-AK	BPC 4	FITC	IgG <sub>2</sub>	Ancell	284-040	2 $\mu\text{g/ml}$
$\alpha\text{Granzym B}$	B18.1	FITC	IgG <sub>1</sub>	AG Scientific, CA, USA	G-1059	2 $\mu\text{g/ml}$
Ig-Ktrl.-AK	MOPC-21	FITC	IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen, CA, USA	554679	2 $\mu\text{g/ml}$
$\alpha\text{Elafin}$	TRAB2O	–	IgG <sub>1</sub>	hbt, Niederlande	HM2062	2 $\mu\text{g/ml}$
Ig-Ktrl.-AK	MOPC-21	–	IgG <sub>1</sub>	BD	555746	2 $\mu\text{g/ml}$
$\alpha\text{Elafin}$	TRAB2F	–	IgG <sub>2</sub>	hbt	HM2063	2 $\mu\text{g/ml}$
Ig-Ktrl.-AK	20116	–	IgG <sub>2</sub>	R&D Systems	MAB004	2 $\mu\text{g/ml}$
Ziege-Anti-Maus	polyklonal	PE	–	Invitrogen	A10543	17 $\mu\text{g/ml}$

Der jeweils verwendete Isotypkontrollantikörper (Ig-Ktrl.-AK) ist dem entsprechenden Antikörper nachgestellt. Beim Ziege-Anti-Maus-Antikörper handelt es sich um ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. 'Applikation' = Einsatzkonzentration des Antikörpers, IgG = Immunglobulin mit dem Isotyp G, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluoresceinisothiocyanat, hbt = Hycult Biotechnology.



Zur Überprüfung der Eignung für eine durchflusszytometrische Analyse wurde der  $\alpha$ Elafin mit dem folgenden spezifischen bzw. unspezifischen Peptid vorinkubiert und anschließend für eine FACS-Analyse von Elafin exprimierenden Keratinozyten verwendet.

Substanz	Bezugsquelle	Bestnr.
antigenes Elafinpeptid	abcam, UK	ab46834
Band-3-Protein	Bachem, Weil am Rhein	H-1598

**Tabelle 3.5: Antikörper zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozyten**

Antikörper	Klon	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle	Bestnr.	Applikation
$\alpha$ TZR- $\gamma\delta$	11F2	FITC	IgG <sub>1</sub>	BD	347903	16,6 $\mu$ g/ml
	11F2	PE	IgG <sub>1</sub>	BD	333141	25 $\mu$ g/ml
$\alpha$ V $\delta$ 1	TS8.2	FITC	IgG <sub>1</sub>	Thermo Scientific*	TCR2730	1:5
$\alpha$ V $\delta$ 2	Immu389	FITC	IgG <sub>1</sub>	Beckman Coulter <sup>§</sup>	PN IM1464	1:2
	B6	PE	IgG <sub>1</sub>	BD	555739	100 $\mu$ g/ml
$\alpha$ V $\gamma$ 9	7A5	FITC	IgG <sub>1</sub>	AG Janßen <sup>[364]</sup>	–	20 $\mu$ g/ml
$\alpha$ TZR- $\alpha\beta$	BMA031	FITC	IgG <sub>2</sub>	Caltag, Hamburg	MHAB01-4	1:8
	BMA031	PE	IgG <sub>2</sub>	Beckman Coulter	1467	1:2
$\alpha$ CD2	OKT 11	Biotin	IgG <sub>1</sub>	ATCC, MD, USA	CRL-8027 <sup>‡</sup>	300 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CD3	SK7	FITC	IgG <sub>1</sub>	BD	345763	20 $\mu$ g/ml
	SK7	PE	IgG <sub>1</sub>	BD	345765	2,5 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CD4	SK3	FITC	IgG <sub>1</sub>	BD	345768	0,6 $\mu$ g/ml
	SK3	PE	IgG <sub>1</sub>	BD	345769	0,6 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CD8	SK1	FITC	IgG <sub>1</sub>	BD	345772	2,5 $\mu$ g/ml
	SK1	PE	IgG <sub>1</sub>	BD	345773	2,5 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CD14	M $\varphi$ P9	FITC	IgG <sub>2</sub>	BD	345784	5 $\mu$ g/ml
	M $\varphi$ P9	PE	IgG <sub>2</sub>	BD	345785	10 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CD16	NKP15	FITC	IgG <sub>1</sub>	BD	335035	25 $\mu$ g/ml
	B73.1	PE	IgG <sub>1</sub>	BD	332779	5 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CD56	NCAM16.2	FITC	IgG <sub>2</sub>	BD	345811	1,2 $\mu$ g/ml
	NCAM16.2	PE	IgG <sub>2</sub>	BD	345812	2,5 $\mu$ g/ml
$\alpha$ (HLA Klasse I)	W6/32	Biotin	IgG <sub>2</sub>	ATCC	HB-95 <sup>‡</sup>	300 $\mu$ g/ml
Ziege-Anti-Maus	polyklonal	Biotin	–	Jackson Im. Res.	115-065-062	100 $\mu$ g/ml
IgG <sub>1</sub>	X40	FITC	IgG <sub>1</sub>	BD	345815	10 $\mu$ g/ml
IgG <sub>1</sub>	X40	PE	IgG <sub>1</sub>	BD	345816	10 $\mu$ g/ml
IgG <sub>2</sub>	X39	FITC	IgG <sub>2</sub>	BD	349051	10 $\mu$ g/ml
IgG <sub>2</sub>	X39	PE	IgG <sub>2</sub>	BD	349053	10 $\mu$ g/ml

Bei den hier aufgelisteten handelt es sich um in der Maus generierte, monoklonale, anti-humane Antikörper oder entsprechende Isotypkontrollantikörper. 'Applikation' gibt entweder die Einsatzkonzentration oder - sollte diese nicht zu ermitteln sein - die Verdünnung des jeweiligen Antikörpers an. Beim Biotin-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper handelt es sich um ein F(ab')<sub>2</sub>-Fragment. Zellen, die mit Biotin-konjugiertem Antikörper markiert worden waren, wurden in einem zweiten Schritt mit Avidin-FITC (BD, Bestnr.: 349011) inkubiert. \*Thermo Scientific, Karlsruhe, <sup>§</sup>Beckman Coulter, Krefeld, <sup>‡</sup>Kennung der entsprechenden Hybridomzelllinie in der *American Type Culture Collection* (ATCC), HLA = *human leucozyte antigen*, Jackson Im. Res. = Jackson Immuno Research, PA, USA.

**Tabelle 3.6: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der Chemokinrezeptorexpression**

Antikörper	Klon	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle	Bestnr.	Applikation
$\alpha$ CCR1	53504.111	PE	IgG <sub>2</sub>	R&D Systems	FAB145P	25 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CCR4	1G1	PE	IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen	551120	200 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CCR5	2D7/CCR5	PE	IgG <sub>2</sub>	BD Pharmingen	555993	20 $\mu$ l
$\alpha$ CCR6	11A9	PE	IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen	559562	200 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CCR9	112509	PE	IgG <sub>2</sub>	R&D Systems	FAB179P	50 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CXCR1	42705.111	PE	IgG <sub>2</sub>	R&D Systems	FAB330P	25 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CXCR2	48311.211	PE	IgG <sub>2</sub>	R&D Systems	FAB331P	25 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CXCR3	49801	PE	IgG <sub>1</sub>	R&D Systems	FAB160P	25 $\mu$ g/ml
$\alpha$ CXCR4	12G5	PE	IgG <sub>2</sub>	BD Pharmingen	555974	20 $\mu$ l
$\alpha$ CXCR6	56811	PE	IgG <sub>2</sub>	R&D Systems	FAB699P	25 $\mu$ g/ml

Bei den hier aufgelisteten handelt es sich um in der Maus generierte, monoklonale, anti-humane Antikörper, die in der Analyse unverdünnt eingesetzt wurden. 'Applikation' gibt die Einsatzkonzentration oder – wenn diese nicht bekannt war – das Einsatzvolumen des jeweiligen Antikörpers an.

**Tabelle 3.7: Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von Mustererkennungsrezeptoren und Signalmolekülen**

Antikörper	Klon	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle	Bestnr.	Applikation
$\alpha$ TLR2	TL2.1	APC	IgG <sub>2</sub>	eBioscience, AUT	17-9922	2 $\mu$ g/Test*
Ig-Ktrl.-AK	k.A.	APC	IgG <sub>2</sub>	eBioscience	17-4724	1 $\mu$ g/Test*
$\alpha$ CCL3/MIP-1 $\alpha$	11A3	PE	IgG <sub>2</sub>	BD Pharmingen	554730	2 $\mu$ g/ml
Ig-Ktrl.-AK	G155-178	PE	IgG <sub>2</sub>	BD Pharmingen	554648	2 $\mu$ g/ml
$\alpha$ IFN- $\gamma$	4S.B3	PE	IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen	554552	2 $\mu$ g/ml
Ig-Ktrl.-AK	MOPC-21	PE	IgG <sub>1</sub>	BD Pharmingen	551436	20 $\mu$ l
$\alpha$ NOD2	L 104	–	IgG <sub>2</sub>	AG Grötzinger <sup>§</sup>	–	5 $\mu$ g/ml
Ig-Ktrl.-AK	133303	–	IgG <sub>2</sub>	R&D Systems	MAB0041	5 $\mu$ g/ml
Ziege-Anti-Maus	polyklonal	PE	–	Invitrogen	A10543	17 $\mu$ g/ml

Zusätzlich wurde  $\alpha$ V $\delta$ 2 (Klon: Immu389, siehe Tabelle 3.5) verwendet. Der jeweils verwendete Isotypkontrollantikörper (Ig-Ktrl.-AK) ist den entsprechenden Antikörpern nachgestellt. 'Applikation' gibt die Einsatzkonzentration oder – wenn diese nicht bekannt war – das Einsatzvolumen des jeweiligen Antikörpers an. \*Die unterschiedlichen Konzentrationen von  $\alpha$ TLR2 und dem entsprechenden Isotypkontrollantikörper wurde von eBioscience so für eine vergleichende FACS-Analyse empfohlen. APC = Allophycocyanin, AUT = Österreich, k.A. = keine Angabe, <sup>§</sup>AG Grötzinger, Institut für Biochemie, CAU, Kiel.

## Substanzen zur Zellstimulation

Eine ausführliche Beschreibung der in Tab. 3.8 aufgeführten Stimulanzien und ihrer Anwendung erfolgt auf Seite 69 im Abschnitt „Stimulation von Zellen“.

**Tabelle 3.8: Substanzen zur Zellstimulation**

Stimulation <i>via</i>	Substanz	Bezugsquelle	Bestnr.	Applikation
Sig.-Trans.-Mech.	12-O-Tetradecanoyl- Phorbol-13-Acetat (TPA)	Sigma, München	P8139	10 ng/ml
	Ionomycin	Calbiochem, Bad Soden	407952	0,5 µg/ml
Vδ2 γδ TZR	BrHPP	Innate Pharma, Frankreich	k.A.	200 nM
Kreuzvernetzung	Kaninchen-Anti- Maus-AK	Jackson Immuno Research	315-005-048	1 µg/ml
TLR2	Pam <sub>2</sub> CSK4	Invivogen, Frankreich	t1rl-pam2	2 µg/ml
	Pam <sub>3</sub> CSK4	Invivogen	t1rl-pms	1 µg/ml
NOD2	Muramyl-dipeptid (MDP-LD)	Invivogen	t1rl-mdp	10 µg/ml
	Muramyl-dipeptid- Isomer (MDP-DD)	Invivogen	t1rl-mdpc	10 µg/ml

TPA stimuliert die Proteinkinase C und greift damit in einen der Hauptsignaltransduktionsmechanismen (Sig.-Trans.-Mech.) der Zelle ein<sup>[365]</sup>. Weiterhin zugegebenes Ionomycin bewirkt eine Erhöhung der Konzentration von Ca<sup>2+</sup>-Ionen, die mittelbar zur Expression von Zytokinen und Interferonen führt. Eine Stimulation mit TPA und Ionomycin in Kombination hat den Charakter einer Maximalstimulation bzw. Positivkontrolle. k.A. = keine Angabe, Pam<sub>2</sub>CSK4 = diacyliertes Lipopeptid, Pam<sub>3</sub>CSK4 = triacyliertes Lipopeptid. Das Muramyl-dipeptid-Isomer MDP-DD führt trotz Bindung nicht zu einer NOD2-vermittelten Signalweiterleitung.

Zur Stimulation von γδ T-Zelllinien wurden desweiteren das Kulturmedium und der Überstand von adhärent wachsenden *Ps. aeruginosa* von der AG Schröder (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) bezogen.

## Messung von Zellproliferation

### Standardzellen für die *Standard Cell Dilution Analysis* (SCDA)

Zur Herstellung von Standardzellen wurden folgende Substanzen benötigt:

Substanz	Bezugsquelle
Schaferythrozyten	DEMIR, Wankendorf
Neuraminidase	Dade Behring, Marburg

Die Schaferythrozyten wurden mit der Neuraminidase vorbehandelt, um Bindungsstellen für das CD2-Oberflächenantigen der später als Standardzellen verwendeten (NK- und) T-Zellen freizulegen (s. Seite 70, Abschnitt „SCDA“).

**<sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau**

Substanz	Bezugsquelle	Bestnr.
<sup>3</sup> H-Thymidin	Amersham, Freiburg	TRA.120
Szintillationswachs MeltiLex A™	Perkin Elmer	1450-441
Filtermatte Printed Filtermat A™	Perkin Elmer	1450-421
Mikrotiterplatte LumaPlate™ zur Messung der Radioaktivität	Perkin Elmer	6005630

**3.1.4 Material für molekularbiologische Methoden****RNA-Isolation**

Material	Bezugsquelle	Bestnr.
Nucleospin RNA II-Kit™	Macherey-Nagel, Düren	740 955.50
RNeasy Mini Kit™	Qiagen, Hilden	74106
$\beta$ -Mercaptoethanol	Merck	805740
Ethanol	Sigma	32205

**Herstellung von „komplementärer DNA“ (cDNA) mittels reverser Transkription**

Material	Bezugsquelle	Bestnr.
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim	M170B
M-MLV RT 5 * buffer	Promega	M531A
rRNasin	Promega	N251B
Desoxyribonukleotidtriphosphate / Nukleotidmix (dNTPs)	Promega	U1515
Oligo-(dT)-Primer	TIB MOLBIOL, Berlin	–

**Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction* (PCR))**

Zur PCR wurden Komponenten des HotStarTaq-DNA-Polymerase-Kits™ von Qiagen (Bestnr.: 203205) verwendet. Dieses beinhaltet neben der Polymerase auch 10 \* PCR-Puffer und MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM). Die ebenfalls benötigten dNTPs waren mit denen zur Reversen Transkription (RT) genutzten identisch (siehe oben). Eine Kombination aus der Herstellung von cDNA mittels reverser Transkription und anschließender PCR wird als RT-PCR bezeichnet. Primerpaare für in der vorliegenden Arbeit durchgeführte RT-PCRs sind in Tab. 3.9 verzeichnet.

Tabelle 3.9: Primerpaare für den RT-PCR-Nachweis ausgewählter mRNAs

Name	Primer	Sequenz (5' ⇒ 3')	T <sub>a</sub> [°C]	Fragment-grösse [bp]
NOD2-qPCR	NOD2-J1	GGCAAAGAACGTCATGCTAGA	60	77
	NOD2-J2	CTGCGAGAGAACATACACCTTC		
NOD2-PCR	NOD2-f	GTTTCGTCAGCCAGTATGA	55	301
	NOD2-b	CAGACCTCCAGGACATTCT		
GAPDH	OJ-17	GACCCCTTCATTGACCTC	55	404
	OJ-18	CCAAAGTTGTCATGGATG		
IFN- $\gamma$	IFNG-f	TTCAGCTCTGCATCGTTTTG	60	246
	IFNG-b	TCTTTTGGATGCTCTGGTCA		
CCL20/MIP-3 $\alpha$	CCL20-f	TGTGCTGTACCAAGAGTTTG	55	150
	CCL20-b	GTGTGAAGCCCACAATAAAT		
HNP-1-3	HNP-1-3-f	TCCCAGAAGTGGTTGTTTCC	60	161
	HNP-1-3-b	GCAGAATGCCAGAGTCTTC		
HNP-4	HNP-4-f	TTCCTTTGCATGGGATAAAA	58	196
	HNP-4-b	TCCCAGCATGACATTCTCTT		
HD-5	DEFA5-f	AAGCAGTCTGGGAAGACAA	60	225
	DEFA5-b	TGAATCTTGCACTGCTTTGG		
HD-6	DEFA6-f	AACCCTCACCATCCTCACTG	60	220
	DEFA6-b	TCTGCAATGGCAAGTGAAAG		
HBD-1	DEFB1-f	CGCCATGAGAACTTCCTACC	60	229
	DEFB1-b	CTTCTGGTCACTCCCAGCTC		
HBD-2	DEFB2-f	ATCAGCCATGAGGGTCTTGT	60	172
	DEFB2-b	GAGACCACAGGTGCCAATTT		
HBD-3	DEFB3-f	CTGTTTTTGGTGCCTGTTCC	60	163
	DEFB3-b	TCTTTCTTCGGCAGCATTTT		
HBD-4	DEFB4-f	CCAGCATTATGCAGAGACTTG	60	178
	DEFB4-b	CATGCATAGGTGTTGGGACA		
LL-37	LL-37-f	CCAGGTCCTCAGCTACAAGG	60	250
	LL-37-b	GGTCACTGTCCCCATACACC		
Granulysin	GRAN-f	TGACCAAAACACAGGAGCTG	60	227
	GRAN-b	GATCTGCTGGGCAGTTTCTC		
Granzym B	GRZB-f	GGGGACCCAGAGATTA AAAA	58	228
	GRZB-b	GCTCCAGAGAAGGTGTTTCA		
Perforin	PERF-f	ACTCACAGGCAGCCAACTTT	60	213
	PERF-b	GGGTGCCGTAGTTGGAGATA		
Elafin	ELA-f	ACCTTCTTGACACCATGAGG	60	216
	ELA-b	GACCTTTGACTGGCTCTTGC		

Alle hier aufgeführten Primer wurden von TIB MOLBIOL bezogen. NOD2-qPCR & -PCR = zwei verschiedene Primerpaare für den Nachweis von NOD2-mRNA, HNP-1-3 = Primerpaar für den Nachweis der nahezu identischen mRNAs von HNP-1, -2 und -3, bp = Basenpaare, T<sub>a</sub> = Temperatur zur Anlagerung von Primern an die zu replizierende cDNA (*annealing temperature*).

### Elektrophorese im Agarosegel

Puffer / Lösung	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
Tris/Acetat/EDTA-Puffer (TAE, 50x)	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	242 g	Merck
	Borsäure	55 g	Roth
	0,5 M EDTA	40 ml	Serva
	doppelt destilliertes Wasser ( $\text{ddH}_2\text{O}$ )	ad 1 Liter (l)	B. Braun AG, Melsungen
1,5 % Agarosegel	Agarose	1,5 % (w/v)	Merck
	1 * TAE-Puffer	50 – 100 ml	siehe oben
	Ethidiumbromid	0,5 $\mu\text{g/ml}$	Merck

Die Proben wurden vor der Gelelektrophorese in Agarosegel-Probenpuffer (Promega) aufgenommen. Zur Identifizierung der PCR-Fragmente wurde parallel zu den Proben ein DNA-Standard (Invitrogen, Bestnr.: 15628-019) aufgetragen.

### Transiente Transfektion

Verwendet wurden die Vektoren pEGFP (Invitrogen, bzw. AG Janßen) und pEGFP-NOD2 (AG Rosenstiel).

Puffer	Substanzen	Menge	Bezugsquelle
2 * BES-gepufferte Lösung (BBS)	(N,N-Bis(2-Hydroxy-Ethyl)-2-Amino-Ethan-Sulfonsäure) (BES)	50 mM	Merck
	Natriumchlorid	280 mM	Merck
	Natriumhydrogenphosphat	1,5 mM	Merck
	H <sub>2</sub> O	ad 160 ml	Millipore
	1 normale NaOH	ad pH 6,95	Merck
	H <sub>2</sub> O	ad 200 ml	Millipore

### 3.1.5 Material für proteinbiochemische Methoden

#### Analyse der Zellkulturüberstände

##### Filtration und Konzentrierung

Material	Bezugsquelle	Bestnr.
Spritzenvorsatzfilter, 0,2 $\mu\text{m}$	Millipore	SLGPR25LS
Amicon Centricon <sup>TM</sup> , YM-3	Millipore	4202
Amicon Centricon <sup>TM</sup> , YM-30	Millipore	4208

##### Agardiffusions-*Screening-Assay*

Für den Agardiffusions-*Screening-Assay* musste ein zweischichtiger Agar („*Underlay*“ und „*Overlay*“) hergestellt werden. Zur Vorbereitung wurden zusätzliche Medien und Puffer angesetzt.

Medium / Puffer	Komponenten	Menge
<i>Tryptic Soy Broth</i> - (TSB-)Medium	TSB-Medium, instant (Sigma)	3 g ad 100 ml H <sub>2</sub> O
Na-Phosphat-Puffer A	0,1 M Di-Natriumhydrogenphosphat	17,8 g ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Na-Phosphat-Puffer B	0,1 M Natriumdihydrogenphosphat	13,8 g ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Na-Phosphat-Puffer C	Stammlösung = Puffer A + Puffer B	350 ml <sub>A</sub> + 150 ml <sub>B</sub> , pH 7,2
<i>Underlay</i>	Agarose	1,0 g
	Tween 20	20 $\mu\text{l}$
	TSB-Medium	1,0 ml
	Na-Phosphat-Puffer C	10 ml
	H <sub>2</sub> O	90 ml
<i>Overlay</i>	Agarose	1,0 g
	Caseinpepton	3,4 g
	Sojamehlpepton	0,6 g
	Glukose	0,5 g
	NaCl	1,0 g
	Kaliumhydrogenphosphat	0,5 g
	H <sub>2</sub> O	ad 100 ml

Sowohl *Under-* als auch *Overlay* wurden anschließend 2,5 h autoklaviert, die *Overlay*-Lösung wurde zudem mit NaOH auf ca. pH 7,3 eingestellt. Als Positivkontrolle im Assay wurden 500 ng/ $\mu\text{l}$  humanes Lysozym (Sigma L 8405), als Negativkontrolle 0,01 %ige Essigsäure genutzt.

**Kits für *enzyme-linked immuno-sorbent assays* (ELISAs)**

Zur Bestimmung der Konzentration ausgewählter Zytokine in den Überständen von – i.a.R. stimulierten – Zellen wurden die in Tab. 3.10 aufgeführten ELISA-Kits verwendet.

**Tabelle 3.10: ELISA-Kits zur Ermittlung der Zytokinkonzentration**

Molekül	Name des Kits	Bezugsquelle	Bestnr.
CCL3/MIP-1 $\alpha$	Human CCL3/MIP-1 $\alpha$ Duo-Set™	R&D Systems	DY270
IFN- $\gamma$	Human IFN- $\gamma$ Duo-Set™	R&D Systems	DY285
IFN- $\gamma$	OptEIA Human IFN- $\gamma$ ELISA Set™	BD	555142
CCL20/MIP-3 $\alpha$	Human CCL20/MIP-3 $\alpha$ Duo-Set™	R&D Systems	DY360
Granzym B	Human Granzyme B ELISA	BenderMed Systems, AUT	BMS2027
Elafin	Human Elafin Elisa	AG Wiedow*	–

Die IFN- $\gamma$ -Freisetzung von mit NOD2-Liganden stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde mit dem Kit von R&D Systems ermittelt, die von mit *Ps. aeruginosa* stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem Kit von BD. AUT = Österreich. \*AG Wiedow, Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel.

**Western-Blot-Analyse****Lyse von Zellpellets**

Zum Nachweis von NOD2 wurden Zellen mittels Lysepuffer I, zum Nachweis von AMPs mittels Lysepuffer II lysiert.

Puffer	Substanz	Menge	Bezugsquelle
Lysepuffer I	Nonidet P 40 (NP-40)	1 % (v/v)	Fluka, Seelze
	Tris pH 7,4	50 mM	Merck
	NaCl	0,15 M	Merck
	Natriumdesoxycholat	0,25 %	Sigma
	Triton X-100	1 % (v/v)	Merck
	EDTA	1 mM	Serva

Der Lysepuffer I wurde entsprechend der Herstellerangaben mit Pepstatin (Bestnr.: 10253286001) und Proteaseinhibitorcocktail (*complete, mini, EDTA-free*, Bestnr.: 11836170001, beide von Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt.



Puffer	Substanz	Menge	Bezugsquelle
Lysepuffer II	Nonidet P 40 (NP-40)	1 % (v/v)	Fluka
	Tris pH 7,4	20 mM	Merck
	NaCl	0,15 M	Merck
	EDTA	5 mM	Serva
	Aprotinin	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Sigma
	Leupeptin	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Sigma
	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid (PMSF)	1 mM	Sigma
	Natriumorthovanadat	1 mM	Merck
	Natriumfluorid	10 mM	Fluka
	Natriumpyrophosphat	1 mM	Sigma
	Pepstatin A	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Sigma

### Immunpräzipitation (IP)

Zur immunomagnetischen Präzipitation von NOD2 kamen monoklonaler  $\alpha\text{NOD2}$  von Novus Biologicals, CO, USA (Bestnr.: NB 100-524) und mit Ziege-anti-Maus-Antikörper gekoppelte MicroBeads<sup>TM</sup> von Miltenyi Biotec (Bestnr.: 130-048-401) zum Einsatz. Zur IP von Elafin wurden polyklonaler  $\alpha\text{Elafin}$  von R&D Systems (Bestnr.: AF1747) und Protein-A- (Bestnr.: 17-0780-01) und Protein-G-Sepharose-Partikel (Bestnr.: 17-0618-02, beide von Amersham) verwendet.

**Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**

Vor Durchführung der PAGE wurden die Proben in folgendem Puffer aufgenommen:

Puffer	Substanz	Menge	Bezugsquelle
Probenpuffer	Natriumdodecylsulfat (SDS)	6 % (w/v)	Merck
	Glycerin	30 % (v/v)	Merck
	Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	200 mM	Merck
	Bromphenolblau	0,005 % (w/v)	Merck
	$\beta$ -Mercaptoethanol	5 % (v/v)	Merck

Entscheidender Bestandteil ist dabei das Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl-sulfate* (SDS)), die Methode wird deswegen auch als „SDS-PAGE“ bezeichnet. Als Proteinstandard wurden 10  $\mu$ l des Markers SeeBlue prestained Plus 2<sup>TM</sup> der Firma Bio-Rad (Bestnr.: LC 5925) verwendet. Zur Auftrennung der Proteine wurden ein auf Tris/Glycin-Basis erstellter Laufpuffer und ein aus Sammel- und Trenngel kombiniertes Polyacrylamid (PAA)-Gel verwendet (System I).

System I	Substanz	Menge	Bezugsquelle
Laufpuffer (10 *)	Tris	30,3 g	Merck
	Glycin	144 g	Merck
	SDS	1 g	Merck
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	Millipore
	HCl (25 %)	ad pH 8,25	Roth
Sammelgel, 5 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	1,67 ml	Roth
	Tris-Puffer 1M, pH 6,8	1,25 ml	Merck
	SDS 10 %	100 $\mu$ l	Merck
	ddH <sub>2</sub> O	7,03 ml	B. Braun AG
	Ammoniumperoxydisulfat (APS) 20 %	50 $\mu$ l	Merck
	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin (TEMED)	10 $\mu$ l	Merck
Trenngel, 8 %	Acrylamid/Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	8 ml	Roth
	Tris-Puffer 1M, pH 8,8	11,2 ml	Merck
	SDS 10 %	300 $\mu$ l	Merck
	ddH <sub>2</sub> O	10,7 ml	B. Braun AG
	APS 20 %	100 $\mu$ l	Merck
	TEMED	20 $\mu$ l	Merck

Zum Nachweis von Elafin wurden zusätzlich ein nach Schagger & von Jagow<sup>[366]</sup> auf Tris/Tricin-Basis produzierter Laufpuffer und ein aus Sammel-, *Spacer*- und Trenngel kombiniertes PAA-Gel genutzt (System II).

System II	Substanz	Menge	Bezugsquelle
Anodenpuffer	Tris	48 g	Merck
	H <sub>2</sub> O	ad 2 l	Millipore
	HCl (25 %)	ad pH 8,9	Roth
Kathodenpuffer	Tris	12 g	Merck
	Tricin	18 g	ICN Biochemicals, OH, USA
	SDS	1 g	Merck
	H <sub>2</sub> O	ad 1 l	Millipore
	HCl (25 %)	ad pH 8,25	Roth
Basispuffer	Tris	90 g	Merck
	SDS	0,75 g	Merck
	H <sub>2</sub> O	ad 250 ml	Millipore
	HCl (25 %)	ad pH 8,45	Roth
Sammelgel, 4 %	Acrylamid/Bisacrylamid	2,4 ml	Roth
	Basispuffer	4,5 ml	–
	ddH <sub>2</sub> O	11,1 ml	B. Braun AG
	APS 20 %	50 $\mu$ l	Merck
	TEMED	10 $\mu$ l	Merck
<i>Spacergel</i> , 10 %	Acrylamid/Bisacrylamid	5 ml	Roth
	Basispuffer	5 ml	–
	ddH <sub>2</sub> O	5 ml	B. Braun AG
	APS 20 %	50 $\mu$ l	Merck
	TEMED	10 $\mu$ l	Merck
Trenngel, 16 %	Acrylamid/Bisacrylamid	10,7 ml	Roth
	Basispuffer	6,7 ml	–
	Harnstoff (6 M)	7,2 g	ICN Biochemicals
	H <sub>2</sub> O	ad 20 ml	B. Braun AG
	APS 20 %	50 $\mu$ l	Merck
	TEMED	10 $\mu$ l	Merck

In beiden Systemen kann bei der Komposition der Trenngele das Volumen von Acrylamid/Bisacrylamid geändert werden, um eine andere Gelkonzentration zu erhalten. Zum Ausgleich muss das entsprechende Volumen von H<sub>2</sub>O angepasst werden.

**Western-Blot**

Puffer	Substanzen	Konzentration	Bezugsquelle
Western-Blot-Transferpuffer	Tris	25 mM	Merck
	Glycin	192 mM	Merck
	Methanol	20 % (v/v)	Sigma
	SDS	0,015 % (v/v)	Merck
	H <sub>2</sub> O	ad 4 l	Millipore

Für den eigentlichen Blotvorgang wurden neben dem Chromatographiepapier der Firma Whatman die Nitrozellulosemembran Hybond C Extra<sup>TM</sup> der Firma Amersham verwendet. Zur Kontrolle wurden die geblotteten Proteine mit einem Ponceau S-Färbekonzentrat der Firma Sigma angefärbt, bevor diese mit Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, siehe unten) abgespült wurde.

**Immundetektion**

Puffer	Substanz	Menge	Bezugsquelle
<i>Tris-buffered Saline</i> (TBS)	Tris	10 mM	Merck
	NaCl	150 mM	Merck
	auf pH 7,5 – 8,0 einstellen		

TBS wurde ggf. durch zusätzliche Gabe von 0,05 % (v/v) Tween 20 (Merck) zu TBST, durch weitere Zugabe von 5 % (w/v) Magermilchpulver (Frema, Lüneburg) oder bovinem Serumalbumin zu Western-Blot-Blockierungslösung ergänzt. Zur Immundetektion verwendete Antikörper sind in der Tabelle 3.11 aufgeführt.

**Tabelle 3.11: Antikörper zur Western-Blot-Analyse**

Antikörper	Klon	Konjugat	Isotyp	Bezugsquelle	Bestnr.	Applikation
$\alpha$ Granzym B	2C5/F5	–	IgG <sub>2</sub>	BD Pharmingen	550558	0,25 $\mu$ g/ml
$\alpha$ Elafin	TRAB2F	–	IgG <sub>2</sub>	hbt	HM2063	0,4 $\mu$ g/ml
$\alpha$ Elafin	TRAB2O	–	IgG <sub>1</sub>	hbt	HM2062	0,4 $\mu$ g/ml
$\alpha$ Elafin	polyklonal	–	–	R&D Systems	AF1747	0,2 $\mu$ g/ml
Ziege-Anti-Maus	polyklonal	HRP	–	GE Healthcare	NA931	1:7500
$\alpha$ NOD2	2D9	–	IgG <sub>1</sub>	Novus Biologicals	NB 100-524	9 $\mu$ g/ml
Ziege-Anti-Maus	polyklonal	HRP	–	Jackson Im. Res.	115-035-003	1:2000

HRP = *horse radish peroxidase* = Meerrettichperoxidase, Jackson Im. Res. = Jackson Immuno Research. Der verwendete Sekundärantikörper ist dem/den verwendeten Primärantikörper(n) nachgestellt.

Nach Inkubation der Nitrozellulosemembran mit dem HRP-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper wurde die Membran mit *enhanced chemiluminescence* (ECL)-Reagenz (GE Healthcare, Bestnr.: RPN2109) behandelt, für weitere Angaben zum Nachweis der gesuchten Proteine mittels Immundetektion siehe Seite 78, Abschnitt „Immundetektion“.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellbiologische Methoden

#### Isolierung von Zellen

##### Isolierung von mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut mittels Dichtegradientenzentrifugation

Zur Isolation von PBMZ wurden wahlweise 10 – 50 ml frisch abgenommenes Blut oder „*buffy coats*“ verwendet. Das Blut / der *buffy coat* wurden mit dem gleichen Volumen an PBS verdünnt und in einem Zentrifugationsröhrchen vorsichtig auf eine 1,077 g/ml dichte Separationslösung („Ficoll“) aufgeschichtet. Dabei betrug das Volumenverhältnis ca.  $\frac{1}{4}$  Ficoll zu  $\frac{3}{4}$  Blut-PBS-Lösung. In der anschließenden Zentrifugation (2000 Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute* (rpm)), 20 min) trennten sich die einzelnen Zellen entsprechend ihrer spezifischen Dichte in Granulozyten, Erythrozyten und tote PBMZ im Sediment, Thrombozyten und Blutplasmarrückstände im Überstand und PBMZ (T- und B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen) im Interphasering, der direkt auf der Ficolllösung auflag. Dabei war ein ungebremstes Auslaufen des Zentrifugenrotors für die Minimierung von Verwirbelungen im Zentrifugenröhrchen entscheidend. Anschließend konnten die PBMZ aus dem Interphasering vorsichtig abgenommen werden. In einem weiteren Zentrifugenröhrchen wurden die PBMZ zur Entfernung von Ficollrestlösung und Thrombozyten dreimal (1 \* 5 min, 1600 rpm; 2 \* 10 min, 1000 rpm) mit PBS gewaschen. Anschließend konnten die PBMZ einer durchflusszytometrischen Analyse, einem Stimulationsexperiment, einer Konservierung in flüssigem Stickstoff oder einer weiteren Separation zugeführt werden.

#### Anreicherung von Granulozyten

Zur Anreicherung von Granulozyten wurde Blut einer Dichtegradientenzentrifugation unter Verwendung der Ficolllösung (1,077 g/ml) unterzogen. Dabei lagerte sich ein Sediment aus toten PBMZ, Erythrozyten und auch Granulozyten ab. Nach Verwerfen des Überstands konnten die instabileren Erythrozyten durch mehrmalige Zugabe von kaltem H<sub>2</sub>O im Wechsel mit isotonomischer Kochsalzlösung lysiert werden, während die stabileren Granulozyten nahezu unversehrt blieben. Als Ergebnis stellten Granulozyten ca. 85 % der in Lösung vorliegenden Zellen.

#### MACS

Zur Isolation einer definierten Zellpopulation (z.B. CD14 exprimierende Monozyten, CD4<sup>+</sup> oder  $\gamma\delta$  T-Zellen) aus PBZM wurde ein MACS mit entsprechenden Kits der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt. Bei einer – im Rahmen dieser Arbeit immer „positiven“ – Selektion wurden die zu isolierenden Zellen innerhalb der PBMZ mit einem Antikörper gegen ein spe-

zifisches Oberflächenantigen (z.B.  $\alpha$ CD14) markiert. Der Antikörper war entweder direkt an superparamagnetische Partikel („MicroBeads<sup>TM</sup>“) (CD14, CD4<sup>+</sup> T-Zellen) oder mit Hapten ( $\gamma\delta$  T-Zellen) gekoppelt. Im letztgenannten Fall erfolgte in einem zweiten Schritt die Bindung an mit  $\alpha$ Hapten konjugierte MicroBeads<sup>TM</sup>. Anschließend wurden die PBMZ auf eine mit Metallgewebe gefüllte und in einem Magnetfeld befindliche Säule aufgetragen. Während die nicht markierten Zellen eluiert werden konnten, wurden die zu isolierenden Zellen durch das Magnetfeld in der Säule zurückgehalten. Nach mehreren Waschvorgängen wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die erwünschte Zellpopulation in ein separates Röhrchen eluiert. Nach Überprüfung der Reinheit der isolierten Zellen mittels Durchflusszytometrie wurden diese einem weiteren Separationsschritt, einem Stimulationsexperiment, der Generierung von Zelllinien oder der Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff zugeführt.

#### Zellsortierungseinheit FACS Aria<sup>TM</sup>

Bei der Analyse der mRNA durch RT-PCR oder der Zytokin-Produktion nach Stimulation war eine unbedingte Reinheit der zu untersuchenden Zellen erforderlich. Aus diesem Grund wurden die durch einen MACS gewonnenen Zellen ggf. mithilfe der Zellsortierungseinheit FACS Aria<sup>TM</sup> in ihrer Reinheit auf nahezu 100 % gesteigert. Die Bedienung des FACS Aria<sup>TM</sup> erfolgte durch Michaela Unmack, Jan Lenke, Sandra Ussat oder Dr. Hans-Heinrich Oberg.

Im Rahmen einer positiven Selektion wurden - wenn nicht bei Durchführung des MACS bereits geschehen - die zu isolierenden Zellen mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpers markiert. Ebenfalls vorhandene unerwünschte Zellen wurden durch entsprechende Antikörper mit einer anderen Fluoreszenz gekennzeichnet. Aus dem so behandelten Zellgemisch wurden die verschiedenen Zellpopulationen durch den FACS Aria<sup>TM</sup> entsprechend ihrer Fluoreszenz in unterschiedliche Röhrchen einsortiert. Damit konnte eine nahezu absolute Reinheit der zu untersuchenden Zellpopulation für nachfolgende Experimente erreicht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren auf frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, aber auch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten angewendet.

#### Kultivierung von $\gamma\delta$ T-Zelllinien

Zur Herstellung von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien wurden aus dem **Blut** oder dem **Darmgewebe** isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS (v/v), 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 100 IE/ml Penicillin und 50 IE/ml IL-2 überführt. Das dazu verwendete FCS wurde vor Gebrauch „inaktiviert“, das heißt darin befindliche Komponenten des Komplementsystems oder vernetzende Moleküle wie Fibrin wurden durch eine 30minütige Inkubation bei 56 °C zerstört. Die Antibiotika Streptomycin und Penicillin unterdrückten das unerwünschte Wachstum von Mikroorganismen, IL-2 förderte dagegen die Proliferation der T-Zelllinien. Zur Wachstumsstimulation wurde die  $\gamma\delta$  T-Zellkulturlösung bei einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml

mit 10 % (v/v) eines „Feedercocktails“ versetzt. Der Feedercocktail bestand aus zu den kultivierenden Zellen heterologen PBMZ mit einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  Zellen/ml, aus mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) transfizierten B-Zellen mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml und aus zugesetztem PHA mit einer Konzentration von  $0,5 \mu\text{g/ml}$ . Das für den Feedercocktail genutzte Medium entsprach dem Kultivierungsmedium für die  $\gamma\delta$  T-Zellen. Vor ihrer Verwendung im Feedercocktail wurden die PBMZ mit 40 Gray und die EBV-transfizierten B-Zellen mit 60 Gray bestrahlt. Dies bewirkte das langsame Absterben der „Feederzellen“ ohne die Integrität der Zelloberfläche zu verletzen. Die Feederzellen verursachten eine polyklonale Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten, die unter Einsatz des Mitogens PHA zu deren Proliferation führte. Alle 2 bis 3 Wochen musste diese Stimulation wiederholt werden („Restimulation“). Zwischen den Restimulationen wurden die proliferierenden Zellen alle 2 bis 3 Tage mit Medium erneut auf eine Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt („gesplittet“). Ggf. wurden kultivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen nach 5–7 Tagen mittels Dichtegradientenzentrifugation von verbliebenen Feederzellen befreit. Die Kultivierung selbst erfolgte in einem Zellinkubator bei  $37^\circ\text{C}$  in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 %  $\text{CO}_2$ . Neben den auf diese Weise neu etablierten  $\gamma\delta$  T-Zelllinien wurden auch bereits in der AG Kabelitz/Wesch vorhandene  $\gamma\delta$  T-Zelllinien zu Untersuchungen genutzt. Zur Analyse von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der **Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis** wurden die  $\gamma\delta$  T-Zelllinien JPE und TBT verwendet<sup>[77]</sup>.

### Kryokonservierung

Zur Aufbewahrung von Zellen über einen Zeitraum von mehr als 6 Wochen wurden sie in Einfriermedium (s. Seite 47) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff theoretisch unbegrenzt lange konserviert. Dazu wurden die Zellen pelletiert (5 min bei 1300 rpm) und anschließend mit einer Konzentration von bis zu  $30 \times 10^6$  Zellen/ml in eiskaltem Einfriermedium aufgenommen. Das dem Einfriermedium zugesetzte Dimethylsulfoxid (DMSO) reduzierte die Bildung von Eiskristallen und erhöhte so die Überlebensrate der Zellen. Der Einfrierprozess erfolgte im durch Luftpolsterfolie geschützten Kryoröhrchen schrittweise für mindestens 30 min bei  $-20^\circ\text{C}$ , über Nacht (ÜN) bei  $-80^\circ\text{C}$  und schließlich in flüssigem Stickstoff bei  $-196^\circ\text{C}$ . Zum Auftauen wurde das aus dem Stickstoff entnommene Röhrchen bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad erwärmt und die Kulturlösung bei Raumtemperatur in ca. 50 ml RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS und zugesetztem P/S überführt. Nach dreimaligem Waschen (5 min bei 1300 rpm) war das bei Raumtemperatur zelltoxische DMSO vollständig ausverdünnt. Die Zellen konnten in ihrem jeweiligen Kulturmedium aufgenommen und in den Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ) überführt werden.

### Bestimmung der Anzahl und Vitalität von Zellen

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 25  $\mu\text{l}$  der – ggf. verdünnten (Faktor: ZK-Verd) – Zellkulturlösung mit 75  $\mu\text{l}$  Eosinlösung (Faktor:  $4_{\text{Eosin}}$ ) gemischt. Diese Suspension wurde in eine Neubauer Zählkammer mit definiertem Kammervolumen eingebracht. Mit Hilfe eines Mikroskops wurden mit Eosin angefärbte und damit tote, und nicht angefärbte und damit vitale Zellen in zwei gegenüberliegenden Eckquadraten (Faktor:  $2_{\text{Quadrate}}$ ) der Zählkammer ermittelt (Zellzahl<sub>vital</sub>). Anschließend wurde mit Hilfe des Kammerfaktors (Faktor:  $10^4_{\text{Kammer}}$ ) die Konzentration der vitalen Zellen pro ml Kulturlösung (Konz<sub>vital</sub>) errechnet:

$$\text{Konz}_{\text{vital}} = \frac{\text{ZK-Verd} * 4_{\text{Eosin}} * \text{Zellzahl}_{\text{vital}} * 10^4_{\text{Kammer}}}{2_{\text{Quadrate}}}$$

Nach Bestimmung des Gesamtvolumens der Zellkulturlösung konnte dann die absolute Zellzahl ermittelt werden. Die gleichermaßen festgestellte Zahl der toten Zellen konnte zur Abschätzung der Vitalität der untersuchten Zellkultur genutzt werden.

### Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse diente zur Untersuchung von Größe, Granularität und der Expression bestimmter Proteine von vereinzelt in Lösung vorliegender Zellen.

### Detektion von Zelloberflächenmolekülen

Wurde ein Zellgemisch (z.B. PBMZ) untersucht, so musste die zu analysierende Zellfraktion (z.B.  $\gamma\delta$  T-Zellen) durch einen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (z.B.  $\alpha\text{TZR-}\gamma\delta\text{-FITC}$ ) gekennzeichnet werden. Desweiteren wurde das zu detektierende Protein mit einem entsprechenden, meist fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper (z.B.  $\alpha\text{CCR4-PE}$ ) markiert. Dazu wurden  $1 * 10^5$  Zellen in einer Mikrotiterplatte (96 Kavitäten) durch Zentrifugation (4 min, 1000 rpm) pelletiert und 2 \* mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30minütige Inkubation bei 4 °C mit in den Tabellen 3.5 oder 3.6 aufgeführten Antikörpern im Dunkeln. Nach zweimaligem Waschen mit je 200  $\mu\text{l}$  FACS-Waschpuffer wurden die Zellen in 100  $\mu\text{l}$  FACS-Waschpuffer zur sofortigen Analyse, oder 1 %iger PFA-Lösung zur zwischenzeitlichen Aufbewahrung bei 4 °C aufgenommen.

### Detektion von intrazellulären Molekülen

Handelte es sich nicht um ein auf der Zellmembran (z.B. ein Chemokinrezeptor) sondern um ein im Zytosol (z.B. NOD2) exprimiertes Molekül, so musste die Zellmembran vor der Zugabe des entsprechenden Antikörpers permeabilisiert und in diesem Zustand fixiert werden. Für diesen Vorgang wurden Komponenten des Cytofix/Cytoperm-Kits<sup>TM</sup> von BD verwendet (s. Tab. 3.3).



Nach Zentrifugation (4 min, 1000 rpm) von  $1 \times 10^5$  Zellen in einer Mikrotiterplatte wurden diese 2 \* mit 100  $\mu\text{l}$  kaltem *Staining Buffer* gewaschen. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung und Fixierung durch Inkubation der Zellen in 100  $\mu\text{l}$  Cytofix/Cytoperm<sup>TM</sup>-Lösung für 20 min bei 4 °C. Danach wurden die Zellen 2 \* mit 200  $\mu\text{l}$  *Perm/Wash*-Lösung gewaschen und anschließend mit in 100  $\mu\text{l}$  *Perm/Wash*-Lösung angesetzten Antikörpern für 30 min bei 4 °C inkubiert. Auf zwei weitere Waschschrte folgte die Aufnahme der Zellen in 100  $\mu\text{l}$  *Perm/Wash*-Lösung und die Analyse mittels FACSCalibur<sup>TM</sup>.

### Detektion von freizusetzenden Molekülen

In einigen Experimenten sollte die Produktion von Zytokinen oder AMPs von  $\gamma\delta$  T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert werden. Während diese Moleküle i.a.R. von den produzierenden Zellen freigesetzt werden, können sie allerdings während ihrer Produktionsphase mittels intrazellulärer FACS-Analyse (siehe oben) detektiert werden. Der Nachweis einer konstitutiven Expression wie bei Granzym B in Abb. 4.27 oder Elafin in Abb. 4.32 ist somit direkt möglich. Sollte die Produktion des gesuchten Proteins durch langzeitstimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen (wie z.B. bei IFN- $\gamma$  in Abb. 4.15) ermittelt werden, so wurde die Produktion 6 h vor der Messung mit TPA/Ionomycin (T/I) maximal angeregt und gleichzeitig die Proteinfreisetzung mit Monensin blockiert. Damit verblieben neu exprimierte Proteine innerhalb der Zelle und konnten durchflusszytometrisch nachgewiesen werden.

### Verwendung von Sekundär- und Isotypkontrollantikörpern

Zur Detektion nicht markierter Primärantikörper (z.B.  $\alpha\text{NOD2}$  oder  $\alpha\text{Elafin}$ ) wurden mit Fluorochrom konjugierte Sekundärantikörper (z.B. Ziege- $\alpha$ Maus-PE) eingesetzt.

Um der Möglichkeit einer unspezifischen Bindung der verwendeten Antikörper und damit falsch positiver Ergebnisse zu begegnen, wurden separate Analysen mit Isotypkontrollantikörpern durchgeführt. Diese wiesen den gleichen Isotyp und ggf. den gleichen Fluoreszenzfarbstoff auf wie die Antikörper für das gesuchte Molekül, allerdings keine Bindungsspezifität für humane Molekülstrukturen. Mit Isotypkontrollantikörpern versetzte, anschließend gewaschene humane Zellen fluoreszierten also idealerweise nicht. Tatsächlich lagerten sich die Isotypkontrollantikörper aber unspezifisch an die Zellen an. Dies geschah bei Isotypkontrollantikörpern und spezifischen Antikörpern in gleichem Maß. Damit konnte die bei einer Markierung mit dem Isotypkontrollantikörper gemessene Fluoreszenzintensität als „Nulllinie“ gegenüber bei einer Markierung mit dem Antikörper gegen das gesuchte Protein gemessenen Fluoreszenzintensität verwendet werden.

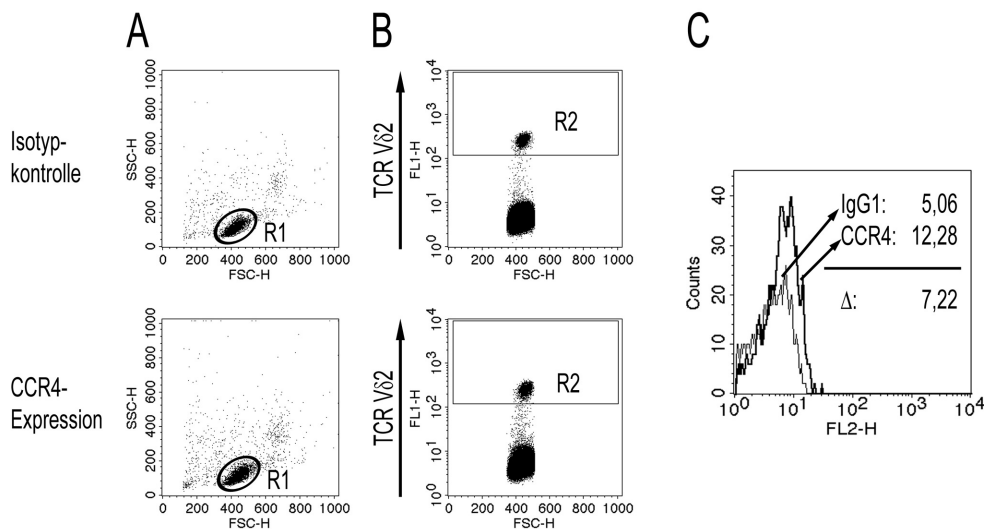
### Messprinzip im Durchflusszytometer

Nach der Markierung der zu analysierenden Zellpopulation und des zu detektierenden Proteins wurden die nicht gebundenen Antikörper durch mehrere Waschschrirte entfernt und die Zellen in einer Trägerflüssigkeit durch einen Laserstrahl im Inneren eines Durchflusszytometers geführt. Traf der Laserstrahl auf eine Zelle, so änderte sich abhängig von der Zellgröße das in Vorwärtsrichtung (*forward scatter* (FSC)), und abhängig von der Zellgranularität das seitwärts gestreute Licht (*side scatter* (SSC)). Photomultiplier erfassten als Detektoren die Laserstreuung und gaben sie als FSC- bzw. SSC-Werte an einen Computer weiter, wo diese mit dem Programm CellQuest Pro<sup>TM</sup> elektronisch verarbeitet wurden.

Aufgrund der Größe und Granularität von isolierten mononukleären Zellen konnte bereits eine erste Einteilung in tote Zellen, ruhende und aktivierte Lymphozyten, Makrophagen und Granulozyten erfolgen und gezielt eine der Zellpopulationen (z.B. Lymphozyten) ausgewählt werden. Aus der Zellpopulation konnte weiterhin eine durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper markierte Subpopulation selektiert werden. Diese wiederum wurde dann auf die Expression des zu untersuchenden Proteins (z.B. CCR4) analysiert (s. Abb. 3.1).

## Ergänzende Angaben zur durchflusszytometrischen Analyse der Expression von Chemokinrezeptoren

**Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität am Beispiel der CCR4-Expression** Zur Messung der Chemokinrezeptorexpression auf unterschiedlichen  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper gegen den jeweiligen Chemokinrezeptor oder – in einem zweiten Ansatz – mit einem entsprechenden Isotypkontrollantikörper markiert. Aus dem Vergleich der Fluoreszenzintensitäten beider Ansätze ergab sich die „mittlere Fluoreszenzintensität“ (MFI) als Maß für die Expressionsstärke des zu untersuchenden Chemokinrezeptors (s. Abb. 3.1).



**Abb. 3.1: Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität am Beispiel der Expression des Chemokinrezeptors CCR4 durch V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T Zellen**

Frisch isolierte PBMZ wurden mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  TZR markiert. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit einem PE-konjugierten Antikörper gegen CCR4 (untere Zeile), ein anderer Teil mit dem entsprechenden Isotypkontrollantikörper (obere Zeile) behandelt. (A) In der durchflusszytometrischen Analyse konnten die Lymphozyten aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Granularität (R1) zur weiteren Betrachtung ausgewählt werden. (B) Mithilfe der entsprechenden Fluoreszenzmarkierung wurden die zu untersuchenden Zellen auf V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten (R2) eingegrenzt. (C) In dieser Zellpopulation konnte anschließend die Expression von CCR4 *vs.* Isotypkontrollfärbung analysiert werden. Dazu wurde die Differenz ( $\Delta$ ) der mittleren Fluoreszenzintensität der mit dem Isotypkontrollantikörper behandelten Zellen (5,06) und der mittleren Fluoreszenzintensität der mit  $\alpha$ CCR4 markierten Zellen (12,28) bestimmt. Dieser Wert (7,22) stand für die Stärke der Expression des Chemokinrezeptors CCR4 auf den analysierten Zellen.

**Bewertung der Expressionsstärken von Chemokinrezeptoren** In der vorliegenden Arbeit wurde u.a. die Expression ausgewählter Chemokinrezeptoren durch frisch aus dem Blut isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen analysiert. In vorhergehenden Publikationen wurden z.T. ähnliche Untersuchungen durchgeführt, die Auswertung erfolgte allerdings uneinheitlich. Während Roth *et al.* die An- oder Abwesenheit eines Chemokinrezeptors durch die Messung Liganden-induzierter Migration feststellten<sup>[367]</sup>, wurde in den Publikationen von Brandes *et al.*<sup>[70]</sup>, Moser & Eberl<sup>[108]</sup>, Poggi *et al.*<sup>[199]</sup> und Laggner *et al.*<sup>[178]</sup> der Anteil der den jeweiligen Chemokinrezeptor exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen in Prozent angegeben. Dagegen wurde in den Publikationen von Dieli *et al.*<sup>[99]</sup>, Glatzel *et al.*<sup>[174]</sup>, Kabelitz & Wesch<sup>[175]</sup> und in der vorliegenden Arbeit die in der FACS-Analyse bestimmten MFI als Maß für die Expressionsstärke des jeweiligen Chemokinrezeptors verwendet. Um die Ergebnisse zumindest in grober Übersicht miteinander vergleichen zu können, wurden die Expressionsstärken bzw. deren Modulationen eingeteilt in:

- „nicht vorhanden“ (n.vh.), wenn keine Liganden-induzierte Migration feststellbar ist, der Prozentsatz der den Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen  $< 5 \%$  oder die MFI  $< 5$  beträgt,
- „vorhanden“ (vh.), wenn eine Liganden-induzierte Migration feststellbar ist,
- „schwach“, wenn der Prozentsatz der Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen  $< 15 \%$  oder die MFI  $< 15$  beträgt,
- „mittel“, wenn der Prozentsatz der Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen  $< 30 \%$  oder die MFI  $< 30$  beträgt,
- „stark“, wenn der Prozentsatz der Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen  $\geq 30 \%$  oder die MFI  $\geq 30$  beträgt,
- „keine Regulation“ ( $\Leftrightarrow$ ), wenn die Änderung im Prozentsatz der Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen  $< 5 \%$  (Brandes *et al.*) oder die Änderung der MFI  $< 5$  beträgt (vorliegende Arbeit), oder die Ansicht entsprechender Histogramme (Glatzel *et al.*) keine eindeutige Modulation erkennen lässt,
- „Zunahme“ ( $\Uparrow$ ), wenn die Erhöhung im Prozentsatz der Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen  $\geq 5 \%$  (Brandes *et al.*) oder die Erhöhung der MFI  $\geq 5$  beträgt (vorliegende Arbeit), oder die Ansicht entsprechender Histogramme (Glatzel *et al.*) eine Erhöhung erkennen lässt und
- „Abnahme“ ( $\Downarrow$ ), wenn die Verringerung im Prozentsatz der Chemokinrezeptor exprimierenden Zellen  $\geq 5 \%$  (Brandes *et al.*) oder die Verringerung der MFI  $\geq 5$  beträgt (vorliegende Arbeit), oder die Ansicht entsprechender Histogramme (Glatzel *et al.*) eine Verringerung erkennen lässt.

## Stimulation von Zellen

### Stimulation frisch isolierter Zellen aus dem peripheren Blut durch TLR2/NOD2-Liganden

Zur Untersuchung der Proliferation und/oder der Expression von Zytokinen nach Kostimulation wurden frisch isolierte PBMZ, CD14<sup>+</sup> Monozyten, CD4<sup>+</sup> oder  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten über CD14, CD4 oder den TZR aktiviert und anschließend mit TLR2- bzw. NOD2-Liganden stimuliert. Zur Aktivierung von V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten innerhalb von PBMZ wurde BrHPP (200 nM) verwendet. Hochrein isolierte CD14<sup>+</sup> Monozyten, CD4<sup>+</sup> oder  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten waren im Verlauf ihrer Isolation mittels MACS mit einem Antikörper gegen CD14, CD4 oder  $\gamma\delta$  TZR markiert worden. Diese Antikörper wurden durch auf das Plastik der Zellkulturplatten adhärierte Kaninchen-Anti-Maus-Antikörper kreuzvernetzt. Zur Stimulation über die Mustererkennungsrezeptoren wurden 2  $\mu\text{g/ml}$  Pam<sub>2</sub>CSK4, 1  $\mu\text{g/ml}$  Pam<sub>3</sub>CSK4, 10  $\mu\text{g/ml}$  MDP-LD oder 10  $\mu\text{g/ml}$  MDP-DD verwendet. Die Stimulation frisch isolierter Zellen wurde in X-VIVO 15-Medium für 24 h im Brutschrank durchgeführt.

### Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zelllinien aus peripherem Blut und Synovialflüssigkeit durch *Ps. aeruginosa*

Zur Analyse der Freisetzung von immunologischen Signalmolekülen oder antimikrobiellen Peptiden durch  $\gamma\delta$  T-Zelllinien nach Stimulation wurden folgende Substanzen genutzt:

- T/I: Zugabe von 10 ng/ml TPA und 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Ionomycin zur Maximalstimulation.
- Medium von *Ps. aeruginosa*: Zugabe des Kultivierungsmediums adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* in einer Verdünnung von 1:20.
- Überstand von *Ps. aeruginosa*: Zugabe des Überstands adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* in einer Verdünnung von 1:100.

Zur Stimulation von in RPMI 1640 mit P/S, 10 % (v/v) FCS und IL-2 kultivierten  $\gamma\delta$  T-Zelllinien werden diese nach zweimaligem Waschen in RPMI 1640 mit P/S überführt. Die anschließende Inkubation im Brutschrank erfolgt i.a.R. ÜN, das heißt in einem Zeitraum von 16 bis 24 h. Ausnahmen sind ggf. in der Legende zur jeweiligen Abbildung angegeben.

## Messung von Zellproliferation

### SCDA

Die absolute Zellzahl einer definierten Zellsubpopulation innerhalb eines Zellgemischs wurde mit einem SCDA durchflusszytometrisch bestimmt<sup>[368]</sup>. Zur Gewinnung der dazu benötigten Standardzellen wurden T-Zellen mit (mit Neuraminidase behandelten) Schaferthozyten rosettiert und über Dichtegradientenzentrifugation aus PBMZ isoliert. Nach Markierung von HLA Klasse I, CD2, CD4, CD8 und  $\alpha\beta$  TZR mit FITC-gekoppelten Antikörpern konnten sie verwendet werden.

Zur Ermittlung der absoluten Zellzahl einer definierten Population (z.B.  $\gamma\delta$  T-Zellen) in einem Zellgemisch aus heterogenen Zellen wurde die relevante Zellpopulation mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markiert (z.B.  $\alpha$ TZR- $\gamma\delta$ -PE). Zusätzlich wurde eine definierte Menge von in 1 %iger PFA-Lösung fixierten Standardzellen hinzugegeben. Schließlich wurden tote Zellen mit Propidiumjodid markiert. In der nachfolgenden FACS-Analyse konnten so tote Zellen ausgeschlossen und die Prozentanteile der zu untersuchenden Zellpopulation und der Standardzellen bestimmt werden. Weil das Verhältnis von Prozentanteil zu Absolutzellzahl bei den Standardzellen bekannt war, konnte aus dem Prozentanteil der zu untersuchenden Zellen deren Absolutzellzahl ermittelt werden.

### <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde dem Zellkulturmedium radioaktiv markiertes <sup>3</sup>H-Thymidin zugesetzt. Bei proliferierenden Zellen wurde dieses Nukleotid in die sich replizierende DNA eingebaut. Die von den Zellen nach einem geeigneten Stimulationszeitraum aufgenommene Radioaktivität konnte so als relatives Maß für deren Proliferation gewertet werden.

In den hier durchgeführten Experimenten wurden  $5 * 10^4$  Zellen in 200  $\mu$ l Kulturmedium pro Kavität einer Mikrotiterplatte stimuliert und an Tag 2 ( $CD4^+$ ) oder Tag 6 ( $\gamma\delta$  T-Zellen) mit jeweils 1  $\mu$ Curie <sup>3</sup>H-Thymidin in RPMI 1640-Medium ohne FCS versetzt. Nach 16stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Mikrotiterplatten bei -20 °C eingefroren. Zur Analyse wurden die Zellen aufgetaut und mit Hilfe einer Vakuumpumpe (FilterMate Harvester<sup>TM</sup> von Perkin Elmer) auf eine Filtermatte (Printed Filtermat A<sup>TM</sup>, Perkin Elmer) überführt. Nach einem Trocknungsvorgang wurde die Filtermatte mit Szintillationswachs (MeltiLex A<sup>TM</sup>, Perkin Elmer) überschichtet. Dieser verflüssigte sich aufgrund der weiterhin bestehenden Trocknungstemperatur von 90 °C, durchdrang den Filter und umschloss die radioaktiven Zellen. Durch das anschließende Erstarren des Wachses bei Raumtemperatur wurden die Zellen damit auf ihrer Position fixiert. Die radioaktiven Zerfallsereignisse wurden durch das Szintillationswachs in Lichtblitze umgesetzt, die durch einen  $\beta$ -Szintillationszähler (Microbeta 1450<sup>TM</sup>, Perkin Elmer) als „Ereignisse pro Minute“ (*counts per minute* (CPM)) erfasst wurden.

### 3.2.2 Molekularbiologische Methoden

#### Isolation von RNA

Die Isolation der RNA erfolgte mittels des Nucleospin RNA II-Kits<sup>TM</sup> (Macherey-Nagel) oder des RNeasy Mini Kit<sup>TM</sup> (Qiagen). Entsprechend der Herstellerangaben wurden  $2 - 5 \cdot 10^6$  Zellen in  $350 \mu\text{l}$  Lysepuffer +  $3,5 \mu\text{l}$   $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen. Das Lysat wurde nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur auf eine Filtersäule aufgetragen und bei 14000 rpm für 1 min abzentrifugiert. Der Durchlauf wurde mit  $350 \mu\text{l}$  70 %igem Ethanol versetzt, um die Löslichkeit der zu isolierenden Nukleinsäuren zu verringern. Diese konnten dann leichter an die Matrix in der zur Isolation vorgesehenen Säule binden, während andere Moleküle durch eine Zentrifugation (14000 rpm, 30 s) eluiert wurden. Nach der schrittweisen Behandlung der Säule mit entsalzendem Puffer ( $350 \mu\text{l}$  *membrane desalting buffer*) zur Erhöhung der RNA-Ausbeute, DNase ( $95 \mu\text{l}$ , 15 min Inkubation) zur Entfernung von noch vorhandener DNA und verschiedenen Waschpuffern des Herstellers konnte die RNA durch Zugabe von  $30 \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser in einer Zentrifugation (14000 rpm, 1 min) eluiert werden. Die Absorption der RNA-Lösung bei 260 nm und die daraus mittels des Lambert-Beer'schen Gesetzes zu errechnende Konzentration der isolierten RNA wurde mithilfe eines Nanodrop<sup>TM</sup>-Spektrometers ermittelt. Ggf. fand eine Lagerung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  statt.

#### Herstellung von cDNA

$1 \mu\text{g}$  der isolierten RNA wurde in  $12,5 \mu\text{l}$  RNase-freiem Wasser aufgenommen und mit  $1 \mu\text{l}$  *Random Hexamers* (Ketten aus genau 6 zufällig aneinander gereihten Einzelnukleotiden) versetzt. Während einer Inkubation von 5 min bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  lagerten sich die *Random Hexamers* an die komplementären Elemente der RNA an. Anschließend wurden dem Ansatz  $4 \mu\text{l}$  5 \* Reverse-Transkriptase-Puffer,  $1 \mu\text{l}$  dNTPs (10 mM),  $0,5 \mu\text{l}$  RNasin (RNase-Inhibitor) und  $1 \mu\text{l}$  M-MLV Reverse Transkriptase hinzugefügt. Während der folgenden Inkubation bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  verband die Reverse Transkriptase die an die RNA-Stränge angelagerten *Random Hexamers* und füllte eventuelle Lücken mit dNTPs auf. Nach 1 h war die vormals einsträngige RNA durch die Ergänzung mit einem komplementären Strang zu einer doppelsträngigen, *complementary* (c)DNA ergänzt worden. Wie die isolierte RNA wurde auch die cDNA ggf. bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

### Durchführung von PCRs

Zur Amplifikation spezifischer cDNA-Fragmente mittels PCR wurden 2  $\mu\text{l}$  der cDNA mit je 3  $\mu\text{l}$  der entsprechenden Primer (10 pmol/ $\mu\text{l}$ ), 2,5  $\mu\text{l}$  10 \* PCR-Puffer, 0,5  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25mM), 1  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM), 12,75  $\mu\text{l}$  Wasser und 0,25  $\mu\text{l}$  HotStarTaq-Polymerase<sup>TM</sup> versetzt. Zur Kontrolle wurde eine Probe ohne cDNA angesetzt (N1), eine weitere ohne cDNA und ohne Primer (N2). Das Fehlvolumen in den Kontrollproben wurde durch Wasser ergänzt, so dass alle Proben ein jeweiliges Gesamtvolumen von 25  $\mu\text{l}$  aufwiesen. Die PCR wurde mit folgenden Schritten durchgeführt:

1. Aktivierung der HotStarTaq-Polymerase<sup>TM</sup> durch 95 °C, 15 min.
2. Amplifikationsvorgang durch 30fache oder 35fache Durchführung des folgenden Zyklus:
  - a) Denaturierung der cDNA bei 95 °C für 30 s.
  - b) Sequenzspezifische Anlagerung der Primer an die cDNA bei geeigneter Temperatur (*annealing temperature* ( $T_a$ )) für 40 s.
  - c) Elongation der angelagerten Primer bei 72 °C für 30 s.
3. Finale Elongation bei 72 °C für 10 min.
4. Aufbewahrung der PCR-Fragmente bei 4 °C bis zum Entfernen aus dem Thermocycler.

Ein so durch Primer spezifiziertes und in der PCR amplifiziertes cDNA-Fragment konnte in einer nachfolgenden Elektrophorese nachgewiesen werden.

### Elektrophorese im Agarosegel

Die Elektrophorese wurde zum Nachweis von DNA-Fragmenten definierter Größe genutzt. Zur Herstellung der 2 %igen Agarosegele (w/v) wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE-Puffer durch Erhitzen gelöst und nach Abkühlung mit Ethidiumbromid versetzt. Anschließend wurde die noch flüssige Agaroselösung in eine geeignete Form überführt, in der ein vorher eingesteckter Kamm Aussparungen („Geltaschen“) in dem sich verfestigenden Gel verursachte. Nach Entfernen des Kamms und Überführung des Gels in eine mit TAE als Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer wurden die DNA-Proben mit 1 \* (Endkonzentration !) DNA-Auftragspuffer versetzt, 5 min bei 95 °C erhitzt und nach Abkühlung in die Geltaschen geladen. Zum Vergleich wurden ebenfalls 5  $\mu\text{l}$  eines DNA-Standards aufgetragen. Im elektrischen Feld mit 80 – 100 V wanderten die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe verschieden schnell zur Anode, wobei sie das sich gegenläufig bewegende Ethidiumbromid interkalierten. Sobald der blaue Farbstoff des DNA-Auftragspuffers den unteren Rand des Gels erreicht hatte wurde das elektrische Feld abgeschaltet. Anschließend wurde das in den DNA-Fragmenten interkalierte Ethidiumbromid mittels ultraviolettem Licht sichtbar gemacht und die Verteilung der DNA-Fragmente fotografiert.



### Transiente Transfektion

HEK 293T-Zellen wurden transient mit einem NOD2-kodierenden Vektor (pEGFP-NOD2) transfiziert und als Positivkontrolle für den durchflusszytometrischen Nachweis von NOD2 mittels verschiedener, von der AG Grötzinger hergestellter NOD2-Antikörper verwendet. Zur Kontrolle wurden HEK 293T-Zellen mit dem entsprechenden Leervektor (pEGFP) transient transfiziert und ebenfalls mit den erwähnten  $\alpha$ NOD2 durchflusszytometrisch untersucht.

Die Transfektion erfolgte mittels der Kalzium-Phosphat-Präzipitation. Dazu wurden je 5  $\mu$ g des jeweiligen Vektors in 450  $\mu$ l Wasser aufgenommen und mit 50  $\mu$ l einer 250 mM Kalziumchloridlösung ergänzt. Nach einer schrittweisen, durch gelegentliches, leichtes Schütteln unterbrochenen Vereinigung mit 500  $\mu$ l 2 \* BBS bildeten sich in der folgenden 10minütigen Inkubation bei Raumtemperatur Kalziumphosphat-DNA-Kristalle aus. Anschließend wurde der Reaktionsansatz zu am Vortag in DMEM-Medium ausgesäten HEK 293T-Zellen ( $1 * 10^6$  in einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser) zugetropft. Während der folgenden Kultivierung im Brutschrank für 18 – 24 h wurden die DNA-Kristalle durch Endozytose aufgenommen und die Produktion von EGFP oder EGFP-NOD2-Fusionsprotein begonnen. Bei erfolgreicher Transfektion begannen die Zellen zu fluoreszieren. Dies konnte sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch in einer FACS-Analyse überprüft werden.

### 3.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### Analyse der Zellkulturüberstände

##### Filtration und Konzentrierung

Zur Entfernung von noch vorhandenen Zellen, aber auch großen Partikeln im Zellkulturüberstand wurde dieser vor weiteren Analysen filtriert (Porengröße: 0,2  $\mu\text{m}$ ). Zum Nachweis einer geringen Freisetzung von Molekülen (z.B. Elafin) durch Zellen war es in einigen Experimenten erforderlich, den vorhandenen Überstand zu konzentrieren. Dazu wurde der Überstand zuerst durch einen Filter geführt, der alle Proteine mit einer deutlich höheren molekularen Masse als das gesuchte Protein zurückhielt (hier: „30 kDa *Cut-Off*-Filter“). Anschließend erfolgte eine Filtration mit einem Filter, dessen Porengröße nur Proteine mit einer deutlich geringeren Größe als das nachzuweisende durchließ (hier: „3 kDa *Cut-Off*-Filter“). Nachdem nahezu das gesamte Volumen des zu untersuchenden Zellkulturüberstands auf diese Weise filtriert worden war, befand sich das gesuchte Protein in dem geringen, vom zweiten Filter zurückgehaltenen Restvolumen. Das somit deutlich höher konzentrierte Protein war z.B. in ELISAs als auch in Western-Blots leichter nachzuweisen.

##### Agardiffusions-*Screening-Assay*

Um antimikrobielle Aktivität in Zellkulturüberständen verschieden stimulierter Zellen nachzuweisen, wurde von Frau Voß und Prof. Dr. Podschun (AG Podschun, Institut für Infektionsmedizin, UK S-H, Campus Kiel) ein Agardiffusions-*Screening-Assay* durchgeführt. Zur Vorbereitung wurden ÜN-Kulturen von *S. aureus*, *E. coli* und *Ps. aeruginosa* in 8 ml TSB-Medium ange-setzt (37 °C, 250 rpm auf dem Schüttler). Anschließend wurden 25 – 50  $\mu\text{l}$  dieser Kulturen in 8 ml TSB-Medium überführt und 3 h im Wasserbad bei 37 °C als Standkultur inkubiert. Ca. 25  $\mu\text{l}$  dieser Bakteriensuspension wurden mit 10 ml verflüssigter „*Underlay*“-Agarlösung gemischt und auf eine mit einem nummerierten Raster versehene Agarplatte gegeben. Nach Abkühlung des Agars (15 min bei Raumtemperatur, 30 min bei 4 °C im Kühlschrank) wurden entsprechend des Rasters Vertiefungen gestanzt. Diese Kavitäten wurden mit je 5  $\mu\text{l}$  des auf antimikrobielle Aktivität zu untersuchenden Zellkulturüberstands befüllt. In der folgenden Inkubation der Agarplatten im Brutschrank diffundierten die im Überstand befindlichen Substanzen in den umliegenden Agar, während die Bakterien sich im *Underlay*-Mangelmedium nicht vermehren konnten. Anschließend wurde die verflüssigte „*Overlay*“-Agarlösung über die *Underlay*-Agarschicht gegeben. Aufgrund der in der *Overlay*-Schicht vorhandenen Nährstoffe (Casein, Sojamehl, Glukose, Salze) begründeten die Bakterien in einer 4stündigen Inkubation im Brutschrank einen Bakterienrasen. Wo antimikrobielle Substanzen in den Agar diffundiert waren, wurden die Bakterien am Wachstum gehindert. Dort bildeten sich gut erkennbare Hemmhöfe um die jeweiligen Vertiefungen aus.

Diese Hemmhöfe wurden in ihrer Ausdehnung (Durchmesser in mm) und ihrer Qualität (von HHHH bis (H)) erfasst:

Bewertung	Bedeutung
HHHH	deutlich abgegrenzter Hemmhof ohne Wachstum darin
HHH	deutlich abgegrenzter Hemmhof, vereinzelt Wachstum darin
HH	abgegrenzter Hemmhof, gleichmäßiges, geringes Wachstum darin
H	abgegrenzter Hemmhof, deutliches Wachstum darin
(H)	Grenze des Hemmhof diffus, deutliches Wachstum darin

Als Positivkontrolle wurden 500 ng/ $\mu$ l humanes Lysozym, als Negativkontrolle 0,01 %ige Essigsäure genutzt.

## ELISA

Um die Konzentration von freigesetzten Zytokinen in den Kulturüberständen stimulierter und nicht stimulierter Zellen zu ermitteln, wurden die Zellüberstände mit Hilfe von Sandwich-ELISAs analysiert. Dabei wurden Mikrotiterplatten eingesetzt, deren 96 Kavitäten mit einem Antikörper („*catching antibody*“) gegen das zu quantifizierende Zytokin beschichtet worden waren. Bei Zugabe der zu analysierenden Zellüberstände wurde das relevante Zytokin gebunden während alle übrigen Bestandteile gewaschen werden konnten. In einem weiteren Schritt wurden die gebundenen Zytokine mit einem anderen Antikörper detektiert („*detecting antibody*“), der mit einem Biotin-Molekül verbunden war. An dieses wiederum band durch Streptavidin das daran gekoppelte Enzym Meerrettichperoxidase, das schließlich die Umsetzung des farblosen Chromogens Tetramethylbenzidin (TMB der Firma Thermo Scientific) in einen blauen Farbstoff katalysierte. Durch Schwefelsäure wurde das Enzym zersetzt und ein Farbumschlag von Blau nach Gelb bewirkt, wobei die Intensität der Farbe proportional zur initial gebundenen Menge des zu quantifizierenden Zytokins war. Die Farbintensität wurde mit einem speziell für Mikrotiterplatten vorgesehenen Photometer (Mikro-ELISA-Reader Infinite M200<sup>TM</sup>) gemessen. Durch den Vergleich mit vorgegebenen Zytokinkonzentrationen enthaltenden Proben konnten die Konzentrationen in den zu analysierenden Zellkulturüberständen ermittelt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von CCL3/MIP-1 $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , CCL20/MIP-3 $\alpha$  und Granzym B mit Hilfe von ELISA-Kits bestimmt. Die Durchführung erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Konzentration von Elafin in Zellkulturüberständen wurde von Mitarbeitern der AG Wiedow (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) durch einen kompetitiven ELISA<sup>[369]</sup> ermittelt.

## Proteinnachweis mittels Western-Blot

### Lyse von Zellpellets

Die zu lysierenden Zellen wurden mit einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ $10 \mu\text{l}$  in NP-40-Lysepuffer aufgenommen und für ca. 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden intakt gebliebene Zellen in einem Homogenisator mittels Scherkräften zerstört. Nach weiteren 15 min Inkubation auf Eis wurden unlösliche Zellbestandteile wie makromolekulare Strukturen durch Zentrifugation (14000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 10 min) pelletiert. Pellet und Überstand der homogenisierten Lösung wurden mit weiteren Methoden (Immunpräzipitation, SDS-PAGE, Western-Blot) hinsichtlich der Präsenz nachzuweisender Proteine (z.B. Granzym B, Elafin) untersucht.

### Immunpräzipitation

Zum Nachweis des NOD2-Proteins wurde von Dr. Tchikov und Prof. Dr. Schütze (AG Schütze, Institut für Immunologie, UK S-H, Campus Kiel) eine immunomagnetische Präzipitation durchgeführt. Dazu wurden  $200 \mu\text{l}$  mit Ziege-anti-Maus-Antikörper konjugierte MicroBeads<sup>TM</sup> (Miltenyi Biotec) mit  $50 \mu\text{l}$  ( $\approx 110 \mu\text{g}$ )  $\alpha\text{NOD2}$  von Novus Biologicals bei  $4^\circ\text{C}$  ÜN inkubiert. Anschließend wurden ungebundene  $\alpha\text{NOD2}$  durch Zentrifugation ( $3 * 1 \text{ ml PBS}$ , 20000 rpm) entfernt. Die mit  $\alpha\text{NOD2}$  besetzten MicroBeads<sup>TM</sup> wurden mit dem zu untersuchenden Zelllysate ÜN inkubiert. Anschließend konnte magnetisch markiertes NOD2 mittels einer Free-flow high magnetic gradient chamber<sup>TM</sup> isoliert<sup>[370,371]</sup> und im Western-Blot detektiert werden.

Zum Nachweis von Elafin mittels IP wurden Lysat und/oder Überstand mit  $2 \mu\text{g}$  polyklonalem Elafin-Antikörper und je  $15 \mu\text{l}$  Trockenvolumen von Protein-A- und Protein-G-Sepharose-Kügelchen („Beads“) versetzt. In der darauf folgenden Inkubation ÜN konnte der Antikörper sowohl spezifisch an das nachzuweisende Protein als auch über den *fragment crystallizable* (Fc)-Rezeptor an das Protein-A bzw. Protein-G der Sepharose-Beads binden. Anschließend wurden die Sepharose-Beads mit allen daran gebundenen Proteinen durch Zentrifugation pelletiert und in einer geeigneten Menge Probenpuffer zur Analyse im Western-Blot aufgenommen.

### SDS-PAGE

Zur Auftrennung eines Proteingemischs in Proteine/Proteingruppen mit unterschiedlicher molekularer Masse wurde eine SDS-PAGE verwendet. In einem ersten Schritt wurde das Proteingemisch mit einem  $\beta$ -Mercaptoethanol- und SDS-haltigen Puffer („Probenpuffer“) versetzt. Während der anschließenden 5minütigen Erhitzung auf  $95^\circ\text{C}$  bewirkte  $\beta$ -Mercaptoethanol eine Aufspaltung von Schwefelbrücken zwischen Cysteinen, und SDS eine Aufspaltung von Wasserstoffbrückenbindungen innerhalb eines Proteins. Die somit linearisierten Proteine wurden an ihrer hydrophoben Oberfläche mit SDS bedeckt, so dass der denaturierte Zustand der Proteine erhalten blieb, die Gesamtladung des mit SDS bedeckten Proteins aufgrund der Vielzahl der

angelagerten Sulfatgruppen stark negativ und die Größe der Gesamtladung i.a.R. proportional zur Größe des Proteins war. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und konnten ggf. bei 4 °C aufbewahrt werden.

Für den Nachweis von NOD2, Granzym B und Elafin wurde das auf Seite 58 als „System I“ bezeichnete Gelsystem verwendet. In die Protean II<sup>TM</sup>-Apparatur der Firma Bio-Rad wurde zuerst ein 10 %iges (NOD2), 8 %iges (Granzym B) oder fast 19 %iges (Elafin) Trenngel eingefüllt und gegen Austrocknung am oberen Rand mit 96 %igem Ethanol überschichtet. Nachdem das im PAA-Gel befindliche Acrylamid polymerisiert war, wurde der Alkohol abgespült und das Trenngel mit 5 %igen Sammelgel überschichtet. In das noch flüssige Sammelgel wurde vom oberen Rand ein Probenkamm hineingesenkt. Dieser verdrängte durch breite Zinken das Sammelgel und bewirkte so bei der anschließenden Polymerisation die Ausbildung von „Geltaschen“, die im nächsten Schritt mit Laufpuffer befüllt und danach mit Proben beschickt wurden. Die Auftrennung erfolgte bei 55 – 80 V ÜN in einem auf Tris/Glycin basierenden Laufpuffer.

Für den Nachweis von Elafin wurde zusätzlich das auf Seite 58 als „System II“ bezeichnete Gelsystem nach Schägger & von Jagow<sup>[366]</sup> genutzt, bei der die Proben vom 4 %igen Sammel- in ein zusätzliches, 10 %iges „*Spacergel*“ eintraten. Die sich bereits im Sammelgel konzentrierende Proteinbande wurde hier noch einmal verdichtet, bevor sie vom *Spacergel* in das 16 %ige Trenngel übertrat. Die kombinierte Verwendung des *Spacergels* und eines auf Tris/Tricin basierenden Laufpuffers bewirkte eine verbesserte Auflösung der Proteinbanden zwischen 5 und 20 kDa. Die Auftrennung erfolgte ebenfalls bei 55 – 80 V ÜN.

### Western-Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden in einem als „Western-Blot“ bezeichneten Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel aus der Protean II<sup>TM</sup>-Apparatur entnommen und direkt auf eine Nitrozellulose-Membran aufgelegt. Auf beiden Seiten wurden je zwei Chromatographiepapiere und ein Schwamm ergänzt. Das so entstandene Paket wurde in eine Kassette gepresst und in Western-Blot-Puffer einem elektrischen Feld mit maximal 0,8 A ausgesetzt. Dabei war die Orientierung entscheidend: Das Gel musste der Kathode zugewandt sein, damit die weiterhin SDS-bedeckten und damit stark negativ geladenen Proteine auf die der Anode zugewandten Nitrozellulose-Membran transferierten. Nach 2 h bei 4 °C wurde der Transfererfolg überprüft. Die auf die Nitrozellulose-Membran „geblotteten“ Proteine wurde mit Ponceau-S angefärbt. Nach Dokumentation dieser Anfärbung konnte das Ponceau-S mit TBS abgespült werden. In der folgenden Immundetektion wurde die Präsenz spezifischer Proteine sichtbar gemacht.

#### Immundetektion

Um spezifische Proteine auf der Nitrozellulose-Membran nachzuweisen, wurde eine Immundetektion durchgeführt. Zuerst wurden unspezifische Bindestellen durch Inkubation der Membran mit 5 % Trockenmilchpulver in TBST (w/v) über 2 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST erfolgte eine Inkubation mit dem Antikörper gegen das nachzuweisende Protein („Primärantikörper“) auf einem Rollenmischgerät ÜN. Anschließend wurde nicht gebundener Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST entfernt, bevor die Membran mit an HRP gekoppeltem Ziege-Anti-Maus-Antikörper („Sekundärantikörper“) für 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert wurde. Nach  $3 * 10$  min Waschen mit TBST wurden 10 ml ECL-Reagenz (Luminol + Wasserstoffperoxid + die Chemolumineszenz verstärkende Substanzen (z.B. Phenol)) für 1 min auf die Membran gegeben. Die nun folgende Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form (3-Amino-Phthalat) fand an genau den Positionen auf der Membran statt, an denen sich das gesuchte Protein befand. Diese Reaktion wurde durch eine schwache Lumineszenz begleitet, die durch in der ECL-Lösung vorhandenes Phenol verstärkt und somit auf einem geeigneten Röntgenfilm (Hyperfilm ECL<sup>TM</sup>) nachgewiesen werden konnte.

#### 3.2.4 Statistik

Zur Ermittlung einer ggf. vorhandenen Signifikanz wurde der „*student's t-test*“ für gepaarte Daten verwendet.

# 4 Ergebnisse

## 4.1 Expression von Chemokinrezeptoren auf $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben

Die differentielle Expression von Chemokinrezeptoren ist entscheidend für die Lokalisation von Immunzellen im Organismus. Die Verortung von  $\gamma\delta$  T-Zellen korreliert mit den exprimierten TZR- $\gamma$ - und TZR- $\delta$ -Polypeptidketten. Während V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten primär in peripheren Geweben und nur in geringer Frequenz im Blut vorhanden sind, halten sich V $\delta$ 2 exprimierende  $\gamma\delta$  T-Zellen nahezu ausschließlich im Blut auf.

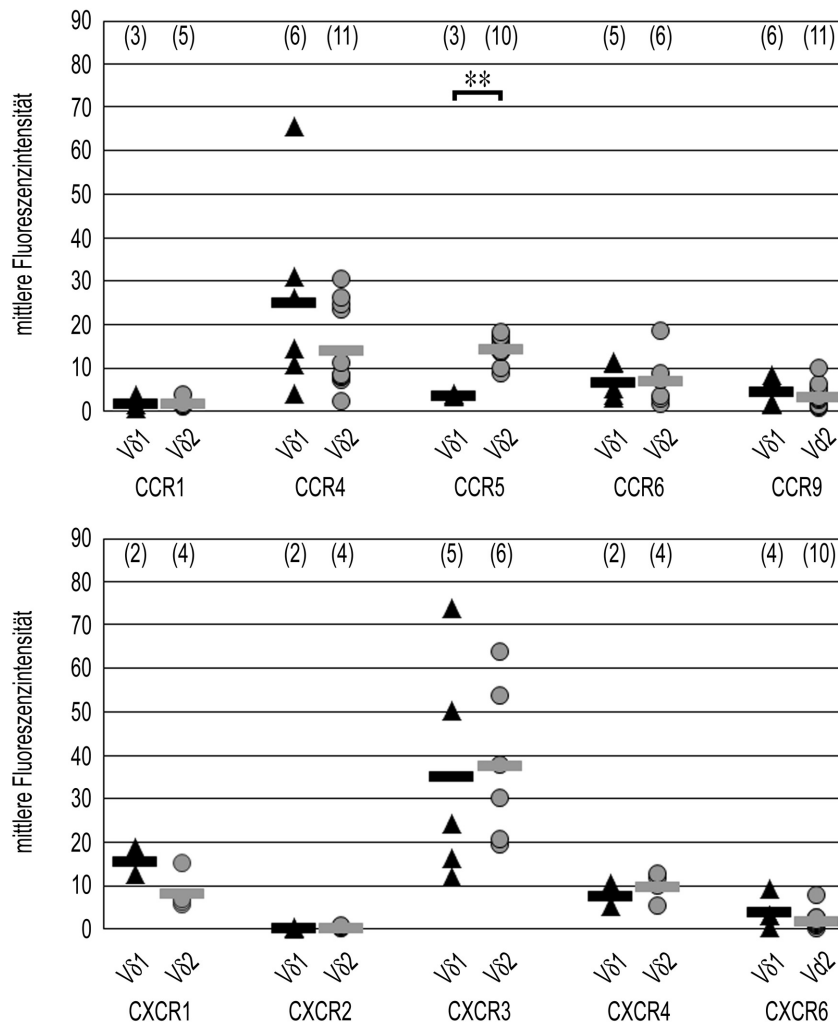
Wird von einem nur transienten Aufenthalt von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut ausgegangen, kann eine unterschiedliche Expression von Chemokinrezeptoren durch V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im Blut angenommen werden. Diese Annahme wird durch mehrere Untersuchungen in vorhergehenden Arbeiten unterstützt<sup>[174,175,199]</sup>. Um in der Diskussion (s. Kap. 5.1.1) die veröffentlichten Ergebnisse mit den eigenen Resultaten direkt vergleichen zu können, wurde die Analyse von frisch isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut in Kapitel 4.1.1 gesondert dargestellt.

In Kapitel 4.1.2 wurde die Untersuchung der Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus dem Dünndarm erweitert. Zum Vergleich wurden die in Kapitel 4.1.1 ermittelten Ergebnisse für frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und weitere Analysen von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus dem Blut und der Synovialflüssigkeit herangezogen.

### 4.1.1 Blut: Expression von Chemokinrezeptoren auf frisch isolierten V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2 $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Zur Untersuchung der Chemokinrezeptorexpression wurden frisch isolierte PBMZ von mehreren Spendern mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen Chemokinrezeptoren und gegen V $\delta$ 1 und V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  TZRs durchflusszytometrisch analysiert.

Die Ergebnisse in Abb. 4.1 bestätigen z.T. die bereits beschriebenen Erkenntnisse über die Expression von CCR5 (durch V $\delta$ 1 schwächer exprimiert als durch V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen: V $\delta$ 1  $\ll$  V $\delta$ 2), CXCR1 (V $\delta$ 1  $\gg$  V $\delta$ 2), CXCR3 (V $\delta$ 1 < V $\delta$ 2) und CXCR4 (V $\delta$ 1  $\approx$  V $\delta$ 2)<sup>[174,175]</sup>.



**Abb. 4.1: Differentielle Expression von Chemokinrezeptoren durch  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut**  
 Frisch isolierte PBMZ von zwei bis elf Spendern wurden wie in Abb. 3.1 durchflusszytometrisch analysiert. Mittels Zweifarbenanalyse konnte die Expression der genannten Chemokinrezeptoren durch V $\delta$ 1 (schwarze Dreiecke) bzw. V $\delta$ 2 (graue Kreise)  $\gamma\delta$  T-Zellen charakterisiert werden. Durchschnittswerte werden als schwarze (V $\delta$ 1) bzw. graue (V $\delta$ 2) Balken dargestellt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Spender an. \*\*p < 0,01.

Die Expression von CCR1, -6, -9, CXCR2 und -6 war zu schwach (mittlere Fluoreszenzintensität < 10), um sie einer  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulation als charakteristisch zuordnen zu können. Allerdings konnte neben CCR5 und CXCR1 mit CCR4 ein weiterer Chemokinrezeptor identifiziert werden, dessen Expressionsstärke für V $\delta$ 1 gegenüber V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen charakteristisch ist.



### 4.1.2 Dünndarm, Blut und Synovialflüssigkeit: Expression von Chemokinrezeptoren auf frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und $\gamma\delta$ T-Zelllinien

$\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus Dünndarmbiopsien sollten im Hinblick auf die Expression von Chemokinrezeptoren untersucht werden. Zum Vergleich wurde deren Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und aus der Synovialflüssigkeit ermittelt. Im Einzelnen wurden also folgende  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten untersucht:

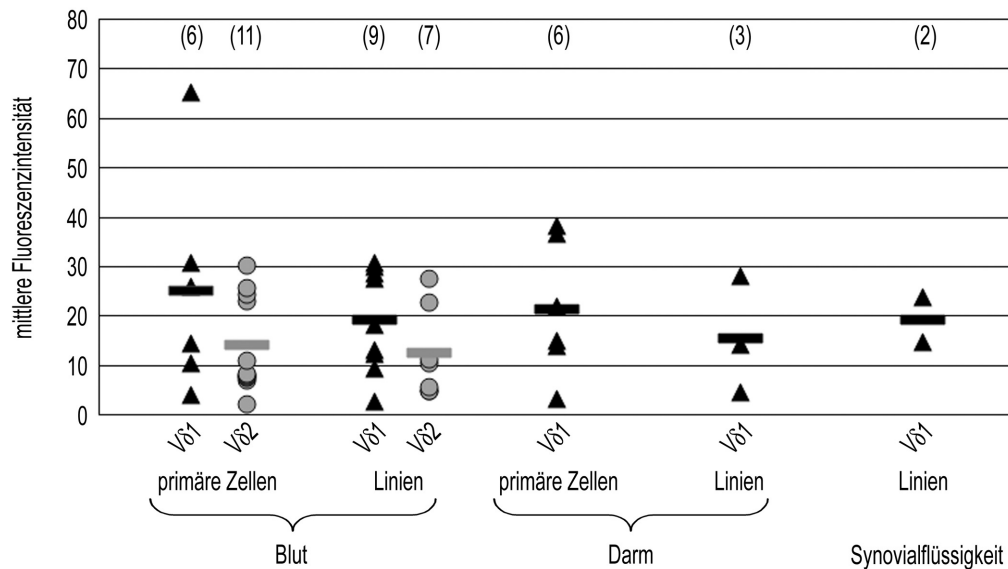
- Aus dem Blut: Die Ergebnisse der Analysen frisch isolierter  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden aus dem vorhergehenden Kapitel übernommen. Zusätzlich wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien untersucht.
- Aus Darmbiopsien: Sowohl frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen als auch  $\gamma\delta$  T-Zelllinien wurden analysiert.
- Aus der Synovialflüssigkeit: Die V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien JPE und TBT waren aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Lyme-Arthritis isoliert worden<sup>[77]</sup> und wurden im Hinblick auf die Expression ausgewählter Chemokinrezeptoren untersucht.

Die Expressionsstärken der im Folgenden aufgeführten Chemokinrezeptoren wurden analysiert:

- CCR4: Die Expression von CCR4 wurde in Abb. 4.1 als charakteristisch für V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten identifiziert. Die folgenden Untersuchungen sollten zeigen, ob die Expression von CCR4 auch bei V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen aus anderen Geweben vorhanden ist.
- CCR6: Die Expression von CCR6 durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut war in vorhergehenden Arbeiten mit widersprüchlichen Ergebnissen beschrieben worden<sup>[70,99,108,174,175]</sup> und sollte in den folgenden Analysen erneut ermittelt werden. Weiterhin sollte eine zu vermutende Expression von CCR6 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm<sup>[372]</sup> untersucht werden.
- CCR9: Die Expression von CCR9 auf im Darm ansässigen Lymphozyten war bereits beschrieben worden<sup>[183,187]</sup>. Eine deswegen zu vermutende Expression auf mukosalen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten sollte in den folgenden Analysen untersucht werden.
- CXCR3: Die Expression von CXCR3 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut wurde in jeder bisherigen Studie als stark beschrieben<sup>[70,99,108,174,175,199]</sup>. Aufgrund der Korrelation mit dem T<sub>h</sub>1-Phänotyp<sup>[155,202]</sup> kommt der CXCR3-Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm besonderes Interesse zu.
- CXCR6: Die Expression von CXCR6 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde bisher nicht untersucht und ist deshalb Bestandteil der folgenden Analysen.

## CCR4

Im letzten Abschnitt konnte CCR4 als ein für **frisch** aus dem Blut **isolierte**  $V\delta 1 \gamma\delta$  T-Lymphozyten charakteristischer Chemokinrezeptor identifiziert werden. Aus der Abbildung 4.2 geht hervor, dass dies auch für  $V\delta 1$  vs.  $V\delta 2 \gamma\delta$  T-Zell**linien** aus dem Blut zutrifft. Aus Dünndarmbiopsien und Synovialflüssigkeit isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten exklusiv den  $V\delta 1 \gamma\delta$  TZR, so dass bei diesen Geweben kein Vergleich zwischen  $V\delta 1$  und  $V\delta 2 \gamma\delta$  T-Lymphozyten möglich war.



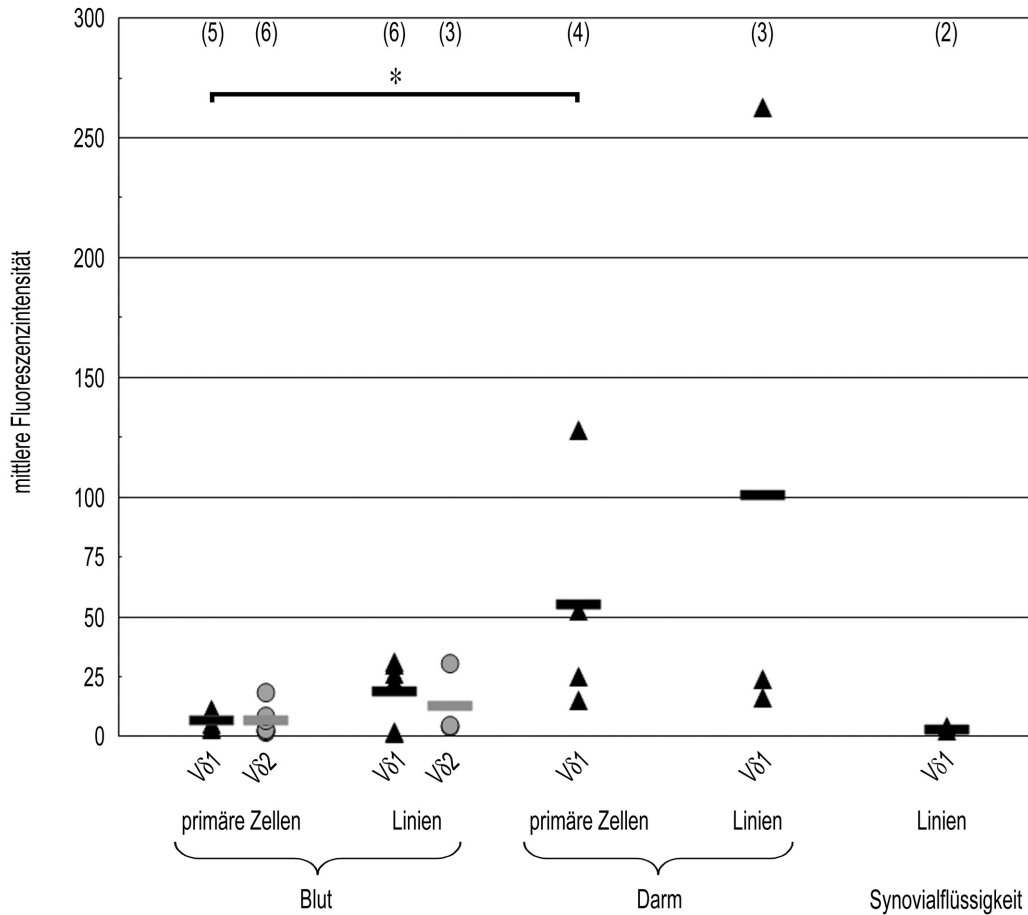
**Abb. 4.2: Expression von CCR4 durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben**

Die CCR4-Expression von frisch isolierten (primäre Zellen) und kultivierten (Linien)  $V\delta 1$  und  $V\delta 2 \gamma\delta$  T-Zellen aus Blut, Dünndarmbiopsien (Darm) und Synovialflüssigkeit wurden durchflusszytometrisch analysiert. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der untersuchten Spender bzw. Zelllinien an. Bei mehrfacher Analyse ein und derselben Zelllinie wurde nur der jeweilige Mittelwert dargestellt. Durchschnittswerte der hier aufgeführten MFI-Werte wurden als schwarze ( $V\delta 1$ ) bzw. graue ( $V\delta 2$ ) Balken wiedergegeben.

Frisch isolierte, primäre Zellen wiesen gegenüber Zelllinien sowohl im Blut als auch im Darmgewebe eine etwas stärkere Expression von CCR4 auf. Insgesamt bleibt aber festzuhalten, dass  $V\delta 1 \gamma\delta$  T-Zellen aus allen untersuchten Geweben eine nahezu gleichbleibende Expressionsstärke des Chemokinrezeptors CCR4 zeigten. Dies konnte als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, dass die Expression von CCR4 für  $V\delta 1 \gamma\delta$  T-Lymphozyten charakteristisch ist.

### CCR6

Bisherige Ergebnisse zeigten eine schwache Expression von CCR6 auf frisch isolierten V $\delta$ 1 und V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut (s. Abb. 4.1), die sich nach *in vitro* Aktivierung und Expansion zu  $\gamma\delta$  T-Zelllinien verstärkte (s. Abb. 4.3).

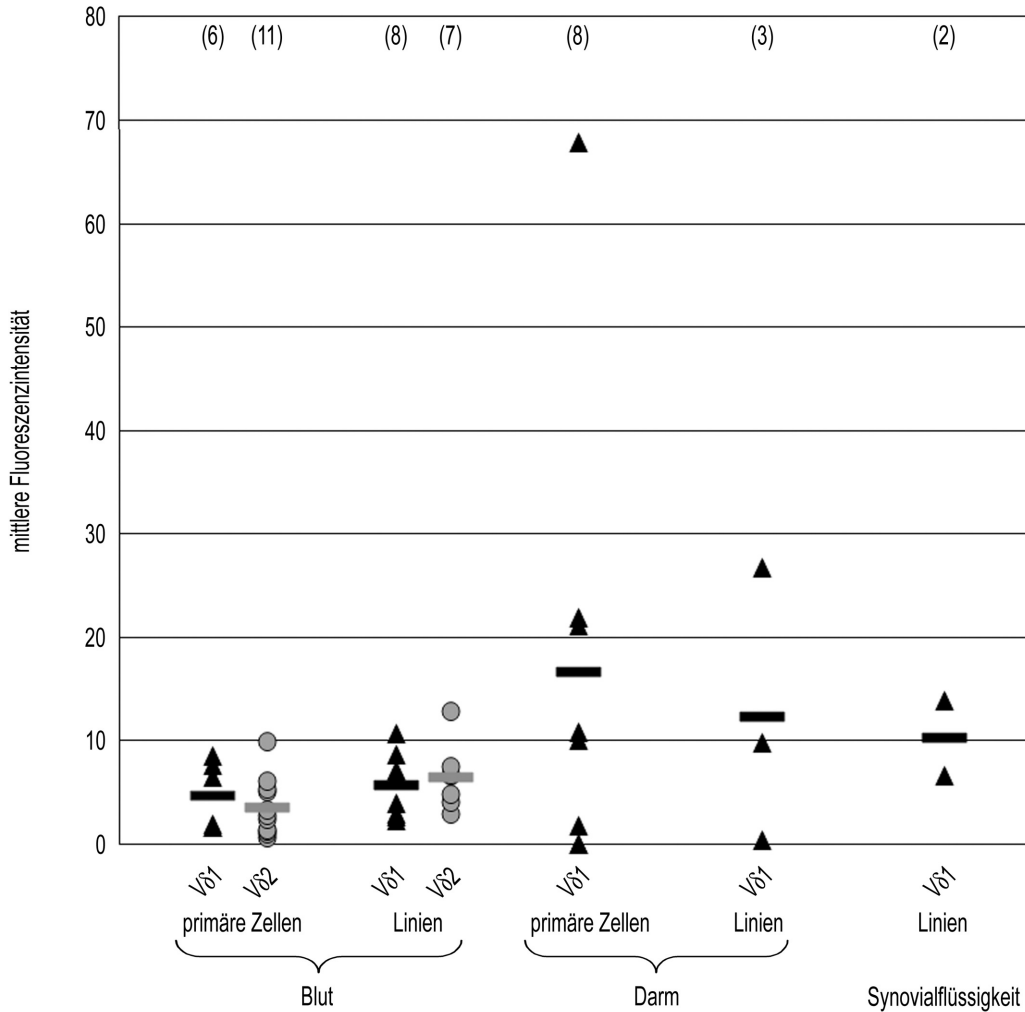


**Abb. 4.3: Expression von CCR6 durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben**  
Darstellung analog zu Abb. 4.2. \*p < 0,05.

Aufgrund der Ergebnisse in vorhergehenden Arbeiten<sup>[372]</sup> war bei aus dem Darm isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine starke Expression von CCR6 zu erwarten und konnte bei frisch aus dem Darm isolierten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten auch nachgewiesen werden. Wie bei aus dem Blut stammenden Zellen konnte auch hier eine erhöhte Expression bei entsprechenden Zelllinien festgestellt werden.  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit wiesen dagegen keine CCR6-Expression auf.

## CCR9

Der einzige bekannte CCR9-Ligand CCL25/TECK wird im Thymus und in der Dünndarmschleimhaut produziert, wo er chemotaktisch auf mukosale T- und B-Lymphozyten wirkt (s. Seite 27, Abschnitt „CCR9“). Daher wurde eine starke CCR9-Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen vermutet. Zur Überprüfung wurden  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen aus verschiedenen Geweben in Bezug auf die CCR9-Expression analysiert (s. Abb. 4.4).

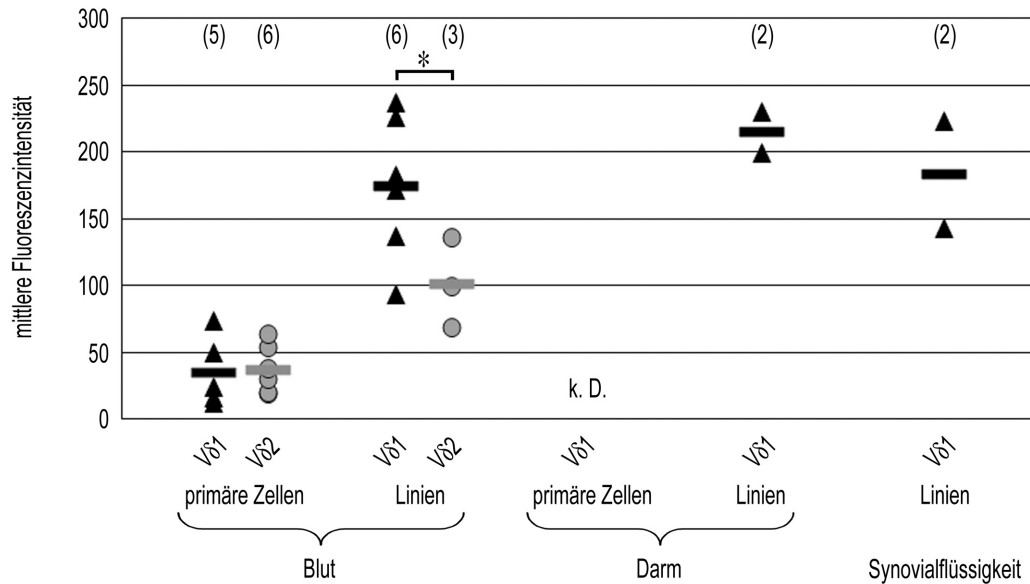


**Abb. 4.4: Expression von CCR9 durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben**  
Darstellung analog zu Abb. 4.2.

Die Expression von CCR9 auf  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem Blut war gleichbleibend schwach. Dies galt sowohl für frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen als auch etablierte Zelllinien. Aus dem Darm isolierte V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten sowohl direkt nach Isolation als auch als Zelllinien eine deutlich stärkere CCR9-Expression. Wie erwartet wiesen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus Geweben mit Barrierefunktion eine verstärkte Expression des Chemokinrezeptors CCR9 auf.

### CXCR3

Eigene Ergebnisse (s. Abb. 4.1) bestätigten die in vorhergehenden Arbeiten beschriebene starke Expression von CXCR3 auf frisch isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut<sup>[70,99,108,174,175,199]</sup>. Ergänzend wurde die CXCR3-Expression durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus anderen Geweben und durch  $\gamma\delta$  T-Zelllinien untersucht (s. Abb. 4.5).

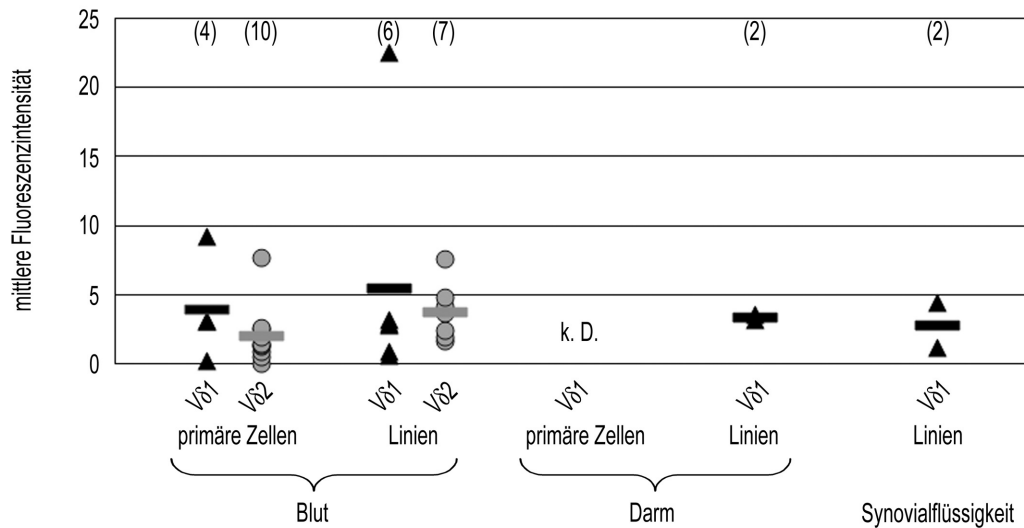


**Abb. 4.5: Expression von CXCR3 durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben**  
Darstellung analog zu Abb. 4.2, k. D. = keine Daten, \*p < 0,05.

Die Expression von CXCR3 auf primären  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut war deutlich messbar und auf etablierten  $\gamma\delta$  T-Zelllinien sogar noch stärker ausgeprägt. Beim Vergleich der V $\delta$ 1 vs. V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zelllinien ergab sich eine signifikant erhöhte CXCR3-Expression auf V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten. Sowohl aus dem Darm als auch aus der Synovialflüssigkeit generierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinien wiesen eine nochmals stärkere Expression von CXCR3 auf. Damit entspricht das Expressionsmuster von CXCR3 dem inflammatorischen – und damit stimulierbaren – Phänotyp.

### CXCR6

Die Expression von CXCR6 durch frisch aus dem Blut isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen war bisher nicht untersucht. Eigene Messungen (s. Abb. 4.1) stuften diese als äußerst schwach ein. Kim *et al.* fanden einen Hinweis auf die Induzierbarkeit von CXCR6 auf der Oberfläche von T-Zellen<sup>[216]</sup>, so dass eine Analyse von wiederholt restimulierten  $\gamma\delta$  T-Zelllinien eine nachweisbare CXCR6-Expression aufzeigen könnte. Tatsächlich war die Expression von CXCR6 auf allen primären Zellen wie auch auf etablierten Zelllinien äußerst schwach (s. Abb. 4.6).



**Abb. 4.6: Expression von CXCR6 durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben**  
Darstellung analog zu Abb. 4.2, k.D. = keine Daten.

Die initial vermutete Stimulierbarkeit der CXCR6-Expression konnte nur in geringem Umfang beim Vergleich von primären Zellen zu Zelllinien aus dem Blut aufgezeigt werden.

### 4.1.3 Fazit

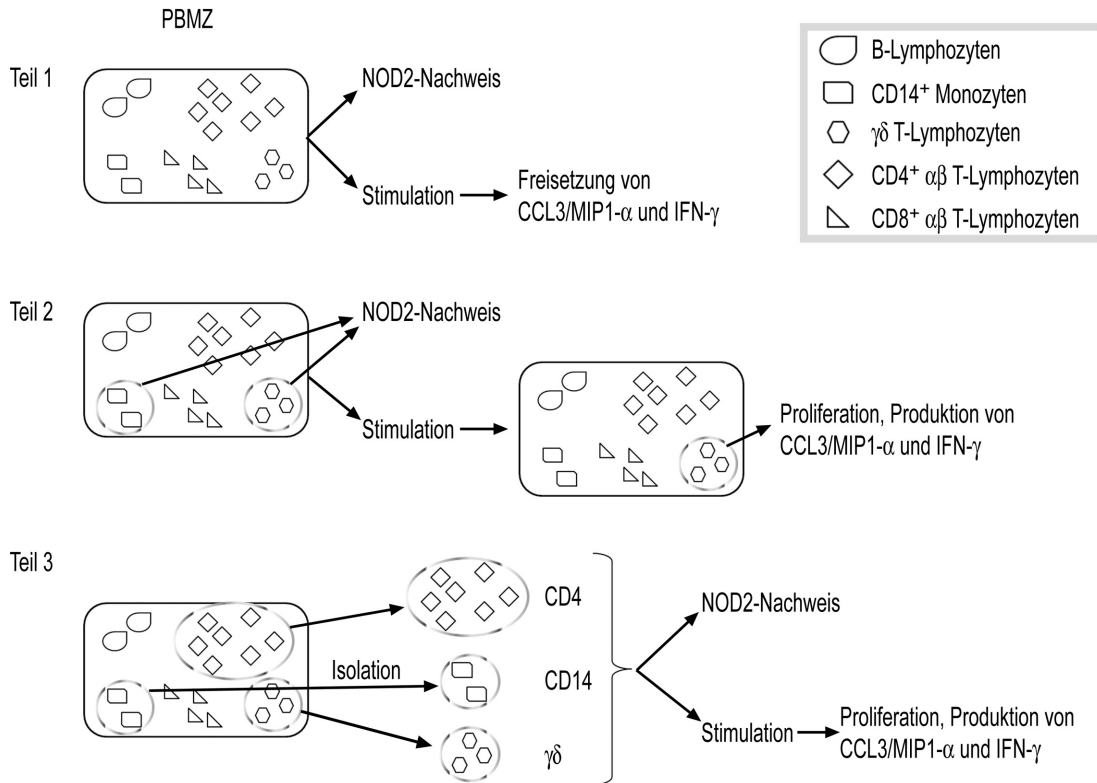
Eigene Ergebnisse konnten die bereits beschriebene differentielle Expression von CCR5, CXCR1 und -3 auf frisch isolierten V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut<sup>[174,175]</sup> bestätigen. Darüber hinaus wurde CCR4 als ein für V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten charakteristischer Chemokinrezeptor identifiziert. Sowohl CCR4 als auch CCR9 wurden auf V $\delta$ 1 stärker als auf V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zelllinien exprimiert.

Weiterhin wurde die Expression ausgewählter Chemokinrezeptoren durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus Blut, Darm und Synovialflüssigkeit untersucht. Während CCR4 auf V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen aus allen genannten Geweben ähnlich stark exprimiert wurde, war die Präsenz von CCR6 und -9 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm am ausgeprägtesten. CXCR3 stellte in frisch isolierten, primären Zellen den am stärksten exprimierten Chemokinrezeptor dar. Im Vergleich konnte in  $\gamma\delta$  T-Zelllinien ein weiterer Anstieg der CXCR3-Expression verzeichnet werden. CXCR6 wurde dagegen unabhängig von Herkunft und Aktivierungszustand nicht von  $\gamma\delta$  T-Zellen exprimiert.

Damit konnte eine differentielle Expression von Chemokinrezeptoren durch  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen aus verschiedenen Geweben beschrieben werden.

## 4.2 Expression von NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

In diesem Kapitel sollten Expression und Funktionalität der Mustererkennungsrezeptoren TLR2 und NOD2 in  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten und weiteren Immunzellen nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden zunächst an **PBMZ**, anschließend an  **$\gamma\delta$  T-Lymphozyten innerhalb von PBMZ** und abschließend mit **hochrein isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen** durchgeführt (s. Abb. 4.7).



**Abb. 4.7: Experimentelles Vorgehen zum Nachweis der NOD2-Expression in  $\gamma\delta$  T-Zellen**

Teil 1 (s. Kap. 4.2.1): Die Expression von NOD2 wurde in  $\gamma\delta$  T-Zellen enthaltende PBMZ analysiert. Weiterhin wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen enthaltende PBMZ mit BrHPP und NOD2-Liganden versetzt und hinsichtlich der Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  untersucht.

Teil 2 (s. Kap. 4.2.2): Wie in Teil 1 blieben die untersuchten Zellpopulationen (CD14<sup>+</sup> Monozyten und  $\gamma\delta$  T-Zellen) in PBMZ vergesellschaftet. Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde neben der Expression von NOD2 auch die Proliferation und die Zytokinproduktion einzelner Zellpopulationen in PBMZ untersucht.

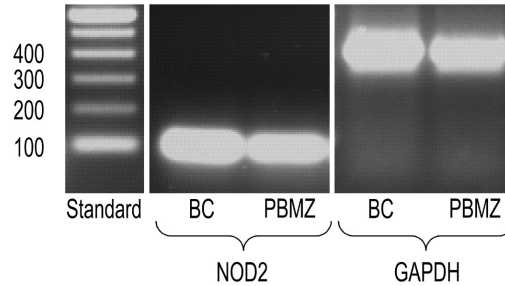
Teil 3 (s. Kap. 4.2.3): Im Gegensatz zu Teil 1 und Teil 2 wurden die zu untersuchenden Zellpopulationen initial hochrein isoliert. Anschließend wurde die Expression von NOD2 und die Reaktion auf NOD2-Liganden für jede Zellpopulation einzeln analysiert.

Eine besondere Herausforderung stellte der direkte Nachweis des NOD2-Proteins mittels durchflusszytometrischer Analyse dar. Während kommerziell erhältliche Antikörper hierfür nicht vorgesehen waren, erwies sich ein neu verfügbarer Antikörper als für FACS-Analysen geeignet (s. Abb. 4.11).



### 4.2.1 Expression von funktionalem NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten enthaltenden PBMZ

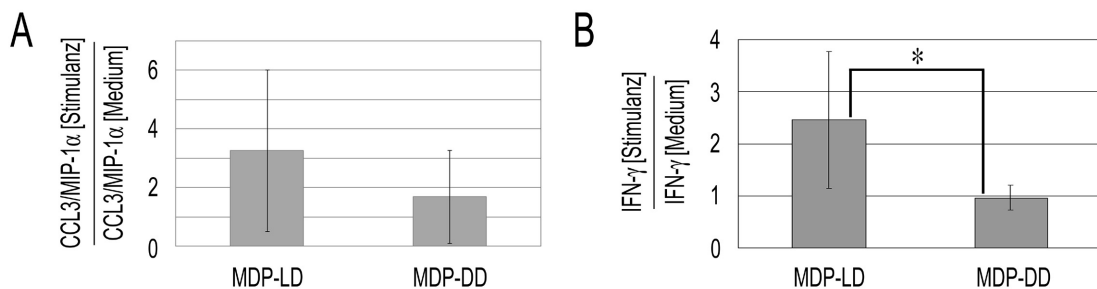
Direkt aus einem *buffy coat* entnommene Zellen wurden ebenso wie aus dem *buffy coat* durch Dichtegradientenzentrifugation isolierte PBMZ mit Hilfe einer RT-PCR auf die Expression von NOD2-mRNA überprüft. Weil sich in diesen Zellverbänden i.a.R. NOD2-exprimierende Monozyten<sup>[278,373]</sup> befinden, hatte diese Analyse den Charakter einer Positivkontrolle für die in der vorliegenden Arbeit weiterhin angewendete RT-PCR. Tatsächlich wiesen sowohl direkt aus dem *buffy coat* entnommene Zellen als auch PBMZ NOD2-mRNA auf (s. Abb. 4.8).



**Abb. 4.8: Expression von NOD2-mRNA durch PBMZ**

Direkt aus einem *buffy coat* entnommene Zellen (BC), sowie aus demselben *buffy coat* isolierte PBMZ wurden durch eine RT-PCR auf die Expression von NOD2-mRNA überprüft. Zur Kontrolle wurde die Expression der i.a.R. konstitutiv exprimierten Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-mRNA nachgewiesen. Die PCR-Produkte wurden auf einem Agarosegel in ihrer Größe mit den Banden eines vordefinierten Standards (Größen der entscheidenden Standardbanden in Basenpaaren (bp) am linken Bildrand) verglichen. Dabei korrespondierte die NOD2-Bande mit den erwarteten 77 bp, die GAPDH-Bande mit den erwarteten 404 bp.

Während der Nachweis der NOD2-mRNA in frisch isolierten PBMZ auf die wahrscheinlich vorhandenen Monozyten zurückzuführen war, sollte in einem weiteren Experiment ein Hinweis auf die Expression von NOD2 in  $\gamma\delta$  T-Zellen erbracht werden. Dazu wurden  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten enthaltende PBMZ mit dem V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  TZR-Liganden BrHPP aktiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem NOD2-Liganden MDP-LD, dessen inaktivem Isomer MDP-DD oder ohne weiteren Zusatz („Mediumkontrolle“) stimuliert. Nach vier Tagen wurden die Konzentrationen von freigesetztem CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  in den Überständen der PBMZ ermittelt. In den Überständen von mit BrHPP und MDP-LD *vs.* MDP-DD kostimulierten PBMZ wurde eine höhere Konzentration von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und – statistisch signifikant – IFN- $\gamma$  nachgewiesen (s. Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  durch MDP-stimulierte PBMZ**

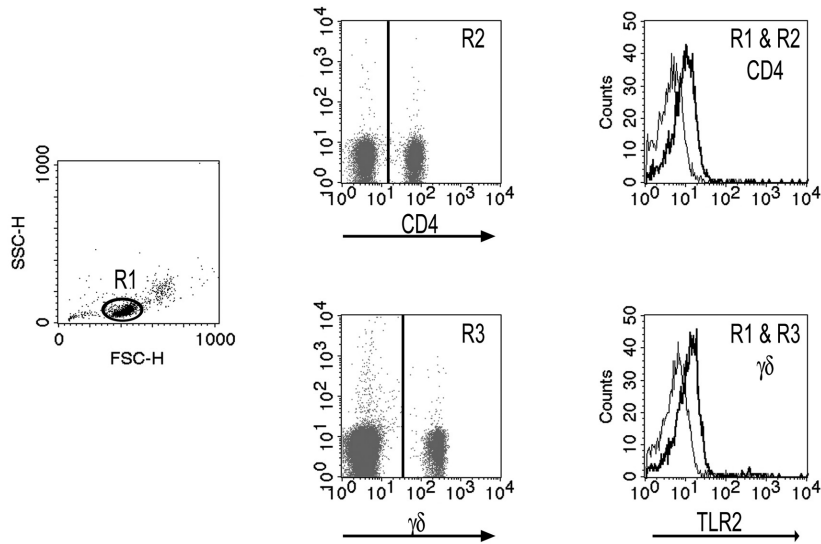
Frisch isolierte,  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten enthaltende PBMZ wurden in mit 50 IE/ml IL-2 versetztem X-VIVO 15-Medium aufgenommen und mit 200 nM BrHPP stimuliert. Zusätzlich wurden die Zellen mit 10  $\mu$ g/ml MDP-LD, dessen inaktivem Isomer MDP-DD oder ohne eine weitere Stimulanz (Medium) kultiviert. Vier Tage nach Stimulationsbeginn wurde die Konzentration von CCL3/MIP-1 $\alpha$  (A: 4 Spender) und IFN- $\gamma$  (B: 7 Spender) in den Zellüberständen analysiert. Dargestellt wird das Verhältnis der Zytokinkonzentration nach Stimulation mit MDP-LD oder MDP-DD im Verhältnis zur unstimulierten Kontrollprobe (Medium) +/- der entsprechenden Standardabweichung. \* $p < 0,05$ .

Während der viertägigen Kultivierung von PBMZ reduziert sich die Anzahl an Monozyten i.a.R. stark. Zudem handelt es sich zwar bei CCL3/MIP-1 $\alpha$  um ein auch von Monozyten produziertes Zytokin<sup>[374]</sup>, nicht jedoch bei dem nahezu exklusiv von T- und NK-Zellen freigesetzten IFN- $\gamma$ <sup>[375]</sup>. Somit konnte die durch MDP-LD gegenüber MDP-DD stimulierte Verstärkung der IFN- $\gamma$ -Expression als ein erster Hinweis auf eine mögliche funktionelle Expression von NOD2 in Lymphozyten gewertet werden. Aufgrund der zusätzlichen Aktivierung durch BrHPP war eine maßgebliche Beteiligung von V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bei der IFN- $\gamma$ -Freisetzung zu vermuten.

## 4.2.2 Expression von funktionalem TLR2 und NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im PBMZ-Verband

### Expression von TLR2 und NOD2

Die aufgrund vorhergehender Publikationen erwartete TLR2-Expression durch  $CD4^+$  [376-380] und  $\gamma\delta$  T-Zellen [105,106,241] wurde für die hier vorliegenden Zellen bestätigt (s. Abb. 4.10).

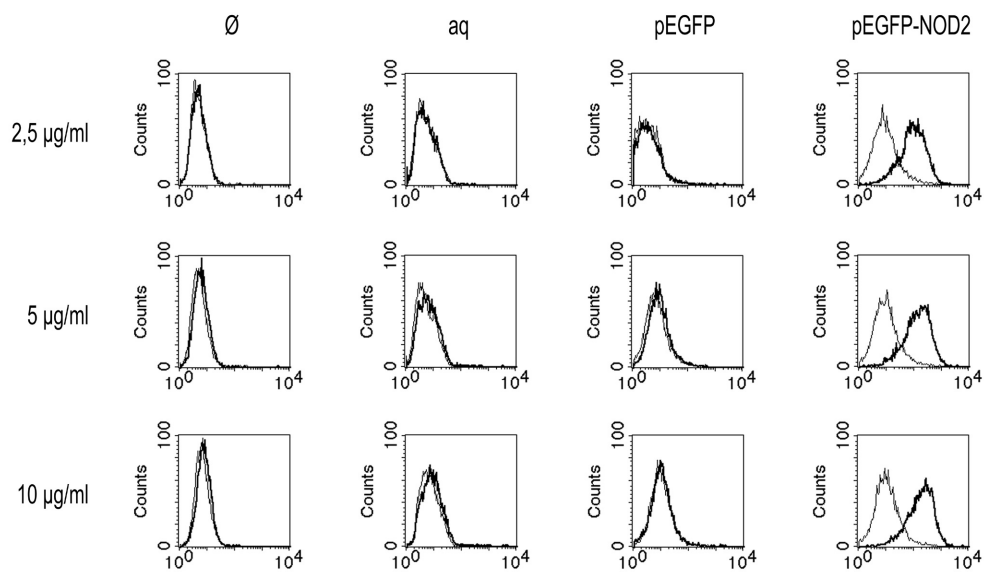


**Abb. 4.10: TLR2-Expression in  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten**

Nachweis der TLR2-Expression von in PBMZ vergesellschafteten  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen. Frisch isolierte PBMZ wurden mit  $\alpha CD4$ -FITC,  $\alpha TZR$ - $\gamma\delta$ -PE und  $\alpha TLR2$ -APC markiert. Mittels FACS-Analyse konnten die Lymphozyten aufgrund ihrer Größe und Granularität erfasst (R1) und in einem weiteren Schritt in  $CD4^+$  (R2) und  $\gamma\delta$  T-Zellen (R3) unterschieden werden. Die Expression von TLR2 konnte somit jeweils exklusiv für  $CD4^+$  (R1 & R2) und  $\gamma\delta$  T-Zellen (R1 & R3) analysiert werden. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei ( $CD4$ ) bzw. fünf ( $\gamma\delta$ ) Experimenten.

Damit konnten in folgenden Experimenten mit dem NOD2-Liganden stimulierte Zellen zu Vergleichszwecken auch mit TLR2-Liganden stimuliert werden.

Wie in Abbildung 3.1 und 4.10 demonstriert, erlaubt die FACS-Analyse eine schrittweise Diskriminierung verschiedener Zellpopulationen innerhalb eines Zellgemischs. Somit war sie die Methode der Wahl beim Nachweis des NOD2-Proteins in einer  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulation innerhalb von PBMZ. Bislang allerdings stand kein für die intrazelluläre FACS-Analyse geeigneter  $\alpha$ NOD2 zur Verfügung. Deshalb wurden die von der AG Grötzinger (Institut für Biochemie, CAU, Kiel) aus der Maus generierten, monoklonalen, anti-humanen  $\alpha$ NOD2 „L 101, -2, -3 und -4“ auf ihre Verwendbarkeit in der FACS-Analyse getestet. Dazu wurden HEK 293T-Zellen mit einem NOD2-kodierenden Plasmid transfiziert und in einer durchflusszytometrischen Analyse unter Verwendung geeigneter Negativkontrollen und der NOD2-Antikörper untersucht. Dabei erwies sich L 104 für den Nachweis von NOD2 mittels Durchflusszytometrie am geeignetsten (s. Abb. 4.11).

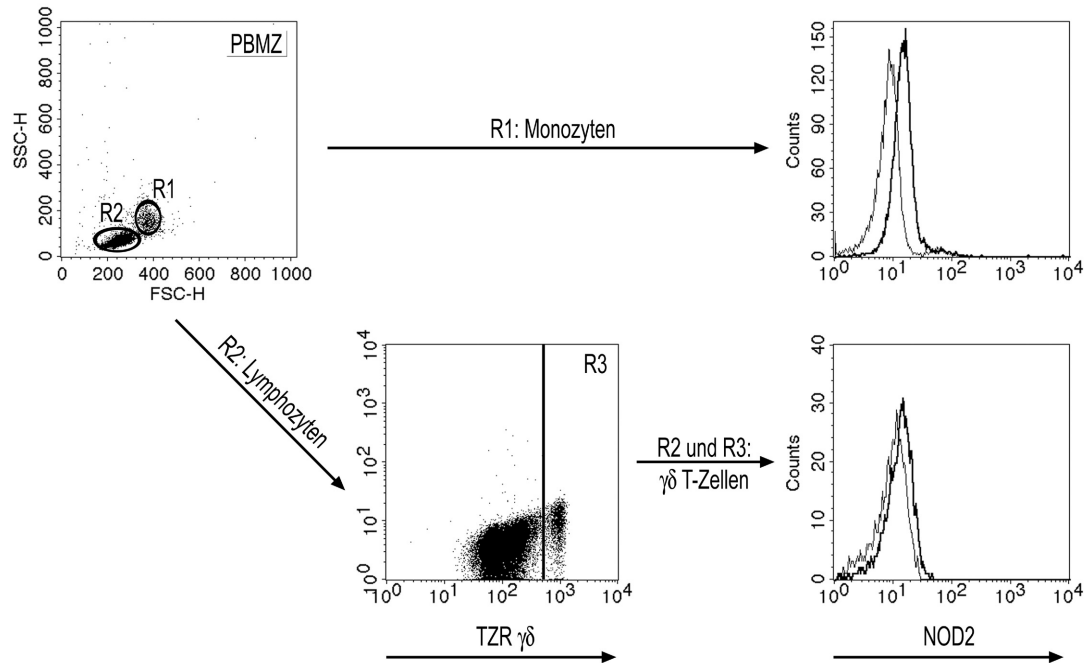


**Abb. 4.11: Spezifität des  $\alpha$ NOD2 „L 104“ in der FACS-Analyse**

HEK 293T-Zellen wurden nicht ( $\emptyset$ ), mit Wasser (aq) oder mit einem EGFP (pEGFP) oder EGFP+NOD2 (pEGFP-NOD2) enthaltenden Plasmidvektor transient transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mittels 2,5, 5 oder 10  $\mu\text{g/ml}$  L 104 (dicke Linie), einem entsprechend konzentrierten Isotypkontrollantikörper (dünne Linie) und einem PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper durchflusszytometrisch analysiert. Für nachfolgende Versuche wurde L 104 in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  verwendet.

Dementsprechend wurde der  $\alpha$ NOD2 L 104 bei der Untersuchung der Expression von NOD2 durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten enthaltende PBMZ eingesetzt.

Mittels intrazellulärer FACS-Analyse konnte die Präsenz von NOD2 in Monozyten/Makrophagen und  $\gamma\delta$  T-Zellen innerhalb der PBMZ nachgewiesen werden. Wie erwartet wiesen die Monozyten/Makrophagen eine deutliche Expression von NOD2 auf. Darüber hinaus konnte eine – wenn auch geringe – NOD2-Expression durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ermittelt werden (s. Abb. 4.12).

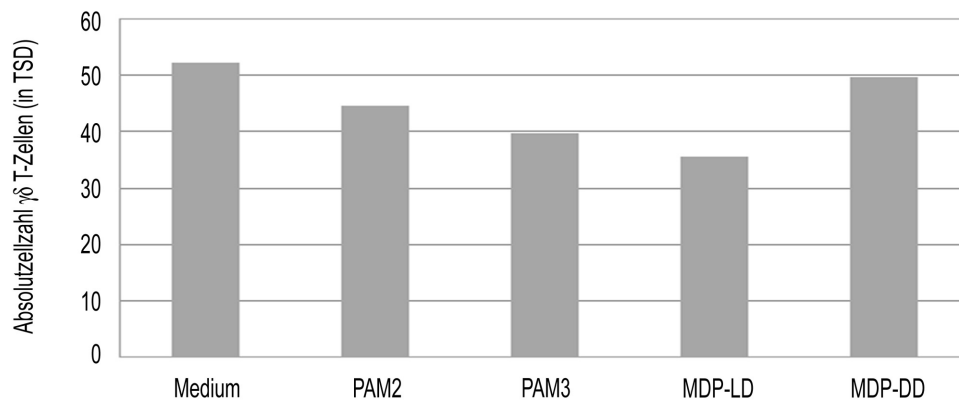


**Abb. 4.12: Nachweis der NOD2-Expression in  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten**

PBMZ wurden intrazellulär mit L 104 (dicke Linie im Histogramm) bzw. dem entsprechenden Isotypkontrollantikörper (dünne Linie), und nachfolgend mit einem PE-gekoppelten Ziege-anti-Maus-Antikörper markiert. Anschließend wurde FITC-gekoppelter  $\gamma\delta$  TZR-Antikörper zugesetzt. In der durchflusszytometrischen Analyse konnten Monozyten/Makrophagen bereits aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Granularität (links oben) identifiziert (R1) und deren NOD2-Expression verifiziert werden (rechts oben). Die Lymphozyten (R2) wurden in  $\gamma\delta$  T-Zellen diskriminiert (R3), deren NOD2-Expression schwach aber messbar nachgewiesen werden konnte (rechts unten). Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

### Modulation der Proliferation durch TLR2- und NOD2-Liganden

In vorhergehenden Publikationen wurden Expression und Funktion verschiedener TLRs durch  $\gamma\delta$  T-Zellen mehrfach charakterisiert<sup>[104–106]</sup>. Da sowohl TLRs als auch NOD2 Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität darstellen, wurden in ausgewählten Experimenten neben den NOD2-Liganden zu Vergleichszwecken auch TLR2-Liganden zur Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eingesetzt. In einem ersten Schritt sollte eine mögliche Modulation der Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen durch MDP untersucht werden. Dazu wurden frisch isolierte,  $\gamma\delta$  T-Zellen enthaltende PBMZ mit BrHPP aktiviert und mit TLR2- und NOD2-Liganden stimuliert. Nach 6 Tagen wurde die absolute Zellzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen in den verschiedenen stimulierten Ansätzen bestimmt (s. Abb. 4.13).



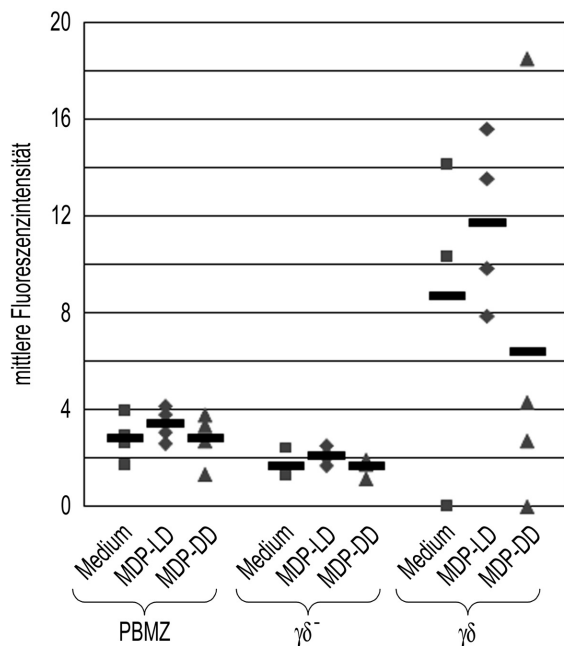
**Abb. 4.13: Modulation der Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch PAMPs**

Frisch isolierte PBMZ mit  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden in Gegenwart von IL-2 mit BrHPP aktiviert und für 5, 6 oder 8 Tage nicht (Medium) oder mit Pam<sub>2</sub>CSK4 (PAM2), Pam<sub>3</sub>CSK4 (PAM3), MDP-LD oder MDP-DD stimuliert. Anschließend wurde die Absolutzellzahl der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ermittelt. Gezeigt ist das auch für die anderen beiden Tage repräsentative Ergebnis von Tag 6. TSD = Tausend.

Die Stimulation mit den TLR2-Liganden Pam<sub>2</sub>CSK4 (Ligand für das Heterodimer aus TLR2/6), Pam<sub>3</sub>CSK4 (TLR1/2) und dem NOD2-Liganden MDP-LD bewirkte im Vergleich mit der unstimulierten oder der mit dem inaktiven Isomer MDP-DD stimulierten Probe eine Reduktion der Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die stärkste Reduktion war dabei mit über 20 % durch MDP-LD induziert worden. Dies konnte als ein weiterer Hinweis auf eine Funktionalität von NOD2 in  $\gamma\delta$  T-Zellen gewertet werden.

### Produktion von CCL3/MIP-1 $\alpha$ und IFN- $\gamma$ nach MDP-Stimulation

Bei der Induktion einer Immunantwort nach Konfrontation mit einem Pathogen ist neben der Proliferation die Freisetzung von Zytokinen eine mögliche Reaktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen. Tatsächlich konnte nach der Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit TLR-Liganden eine erhöhte Konzentration von CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  im Zellüberstand ermittelt werden<sup>[106]</sup>. Analog sollte hier die Freisetzung der Zytokine CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nach MDP-Stimulation untersucht werden. Dazu wurden frisch isolierte PBMZ mit  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl mit BrHPP als auch mit MDP-LD oder MDP-DD kostimuliert. Nach 3 Tagen wurden die PBMZ mittels durchflusszytometrischer Analyse in PBMZ<sub>gesamt</sub>,  $\gamma\delta^-$  PBMZ und  $\gamma\delta$  T-Zellen diskriminiert. Die Produktion von CCL3/MIP-1 $\alpha$  durch jede der genannten Zellpopulationen wurde durch intrazelluläre FACS-Analysen ermittelt (s. Abb. 4.14).

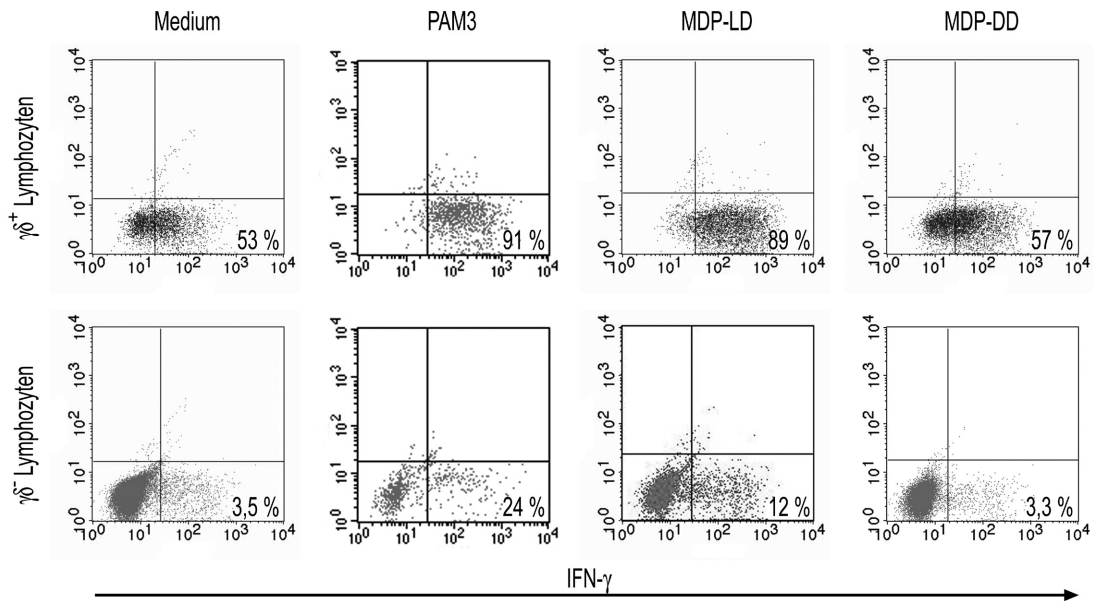


**Abb. 4.14: MDP-induzierte CCL3/MIP-1 $\alpha$ -Produktion**

Frisch isolierte,  $\gamma\delta$  T-Zellen enthaltende PBMZ von vier gesunden Spendern wurden mit 200 nM BrHPP aktiviert und für 3 Tage mit MDP-LD, MDP-DD oder nicht (Medium) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in einer durchflusszytometrischen Analyse mittels  $\alpha$ TZR- $\gamma\delta$ -FITC in PBMZ<sub>gesamt</sub> (PBMZ),  $\gamma\delta^-$  PBMZ ( $\gamma\delta^-$ ) bzw.  $\gamma\delta$  T-Zellen ( $\gamma\delta$ ) diskriminiert. Die Ermittlung der CCL3/MIP-1 $\alpha$ -Produktion erfolgte in derselben Analyse unter Verwendung von  $\alpha$ CCL3/MIP-1 $\alpha$ -PE bzw. einem entsprechenden Isotypkontrollantikörper. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Messungen (s. Abb. 3.1), schwarze Balken geben die jeweiligen Mittelwerte an.

Beim Vergleich der drei genannten Zellpopulationen wiesen  $\gamma\delta^-$  PBMZ die schwächste,  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten die stärkste MFI bei der Messung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  auf. Bei der Analyse der PBMZ<sub>gesamt</sub> ergab sich folgerichtig eine dazwischen liegende Fluoreszenzintensität. Darüber hinaus konnte in jeder der drei analysierten Zellpopulationen für sich eine erhöhte CCL3/MIP-1 $\alpha$ -Produktion nach Stimulation mit MDP-LD *vs.* MDP-DD oder Medium festgestellt werden. Mit der MDP-induzierten Modulation der CCL3/MIP-1 $\alpha$ -Produktion ergab sich ein weiterer Hinweis auf die Expression von funktionalem NOD2 in  $\gamma\delta$  T-Zellen.

Neben der MDP-induzierten Produktion von CCL3/MIP-1 $\alpha$  durch  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde ebenso die von IFN- $\gamma$  untersucht. Dazu wurden frisch isolierte,  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten enthaltende PBMZ mit BrHPP aktiviert und zusätzlich mit Pam<sub>3</sub>CSK4, MDP-LD, MDP-DD stimuliert oder zur Kontrolle unstimuliert belassen (Medium). Nach 13 Tagen wurden mit Hilfe einer FACS-Analyse  $\gamma\delta$  T-Zellen von  $\gamma\delta^-$  PBMZ unterschieden und jeweils der prozentuale Anteil an IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen bestimmt (s. Abb. 4.15).



**Abb. 4.15: Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch PAMPs**

Frisch isolierte PBMZ mit  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden mit BrHPP aktiviert und für 13 Tage mit Pam<sub>3</sub>CSK4 (PAM3), MDP-LD, MDP-DD oder keiner zusätzlichen Substanz (Medium) versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 6 h mit T/I final stimuliert, während gleichzeitig die Freisetzung von Proteinen mit Monensin blockiert wurde. Die PBMZ wurden mit  $\alpha$ TZR- $\gamma\delta$ -FITC und, nach einer Permeabilisierung, mit  $\alpha$ IFN- $\gamma$ -PE bzw. einem entsprechenden Isotypkontrollantikörper markiert. In der FACS-Analyse wurden  $\gamma\delta^+$  T-Zellen (obere Reihe) und  $\gamma\delta^-$  PBMZ ( $\gamma\delta^-$ , untere Reihe) hinsichtlich des Anteils der IFN- $\gamma$ -produzierenden Zellen analysiert. Die Quadranteneinteilung wurde entsprechend der jeweiligen Isotypkontrolle vorgenommen.

$\gamma\delta$  T-Zellen wiesen nach BrHPP-Stimulation einen deutlich höheren Anteil an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen auf als  $\gamma\delta^-$  PBMZ. Dieser Anteil konnte durch die Stimulation mit den PAMPs Pam<sub>3</sub>CSK4 und MDP-LD von 53 % auf  $\approx$  90 % erhöht werden, nicht jedoch durch die Stimulation mit dem biologisch inaktiven NOD2-Liganden MDP-DD (57 %).  $\gamma\delta^-$  PBMZ (s. Abb. 4.15, untere Reihe) zeigten ebenfalls eine Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion durch PAMPs, allerdings aufgrund der Versuchsbedingungen (spezif. Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch BrHPP) auf geringerem Niveau. Damit konnte neben CCL3/MIP-1 $\alpha$  mit IFN- $\gamma$  ein zweites Zytokin ermittelt werden, dessen Expression in  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch die Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP verstärkt wurde.

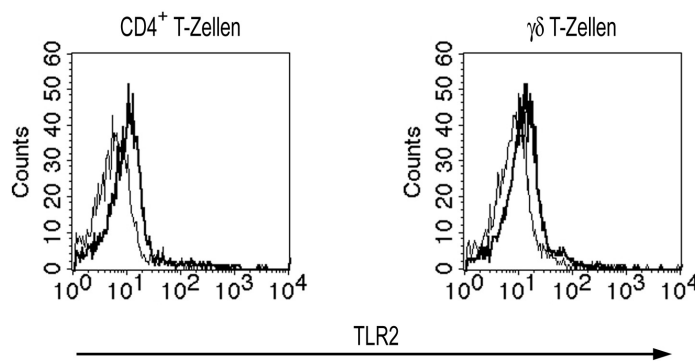


### 4.2.3 Expression von funktionalem NOD2 durch hochrein isolierte CD4<sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

In weiterführenden Experimenten sollte die Expression von TLR2 und NOD2 in hochrein isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten untersucht werden. Zum Vergleich von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gegenüber konventionellen T-Zellen wurden einige Experimente auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen ausgeweitet.

#### Expression von TLR2 und NOD2

Nachdem die Expression von TLR2 durch in PBMZ vergesellschafteten CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen bereits in Abbildung 4.10 bestätigt worden war, wurde sie für hochrein isolierte Zellen erneut verifiziert (s. Abb. 4.16).

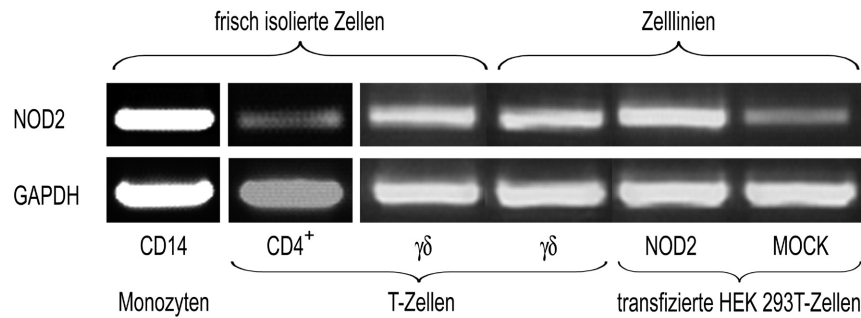


**Abb. 4.16: TLR2-Expression auf hochrein isolierten CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten**

CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden mit einer Reinheit von jeweils über 99 % isoliert und mittels durchflusszytometrischer Analyse auf die Expression von TLR2 untersucht. Gezeigt ist ein repräsentatives von 12 (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) bzw. 8 ( $\gamma\delta$  T-Zellen) verschiedenen Experimenten.

Während die Expression von NOD2 durch in PBMZ befindlichen CD14<sup>+</sup> Monozyten und  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen worden war (s. Abb. 4.12), sollten im Folgenden hochrein isolierte PBMZ-Subpopulationen untersucht werden. Dazu wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit einer Reinheit von über 99 % aus PBMZ isoliert und die Expression von NOD2-mRNA mittels RT-PCR überprüft. Vergleichend wurden eine  $\gamma\delta$  T-Zelllinie und stabil mit einem NOD2-Vektor bzw. dem entsprechenden Leervektor transfizierte HEK 293T-Zellen analysiert (s. Abb. 4.17).

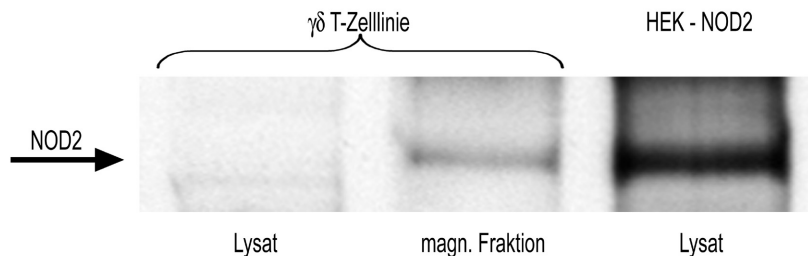
Dabei ergab sich ein deutlicher Unterschied in der Expressionsstärke von NOD2 in mit einem NOD2-Vektor *vs.* dem entsprechenden Leervektor transfizierten HEK 293T-Zellen. Das Niveau der entsprechenden GAPDH-Expressionen war dagegen nahezu identisch. Zudem konnte die NOD2-mRNA-Expression erwartungsgemäß in isolierten CD14<sup>+</sup> Monozyten und interessanterweise auch in frisch isolierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen nachgewiesen werden.



**Abb. 4.17: NOD2-Expression in isolierten PBMZ-Subpopulationen**

CD14<sup>+</sup> Monozyten, CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden mit einer Reinheit von jeweils über 99 % selektiert (frisch isolierte Zellen) und mittels RT-PCR hinsichtlich ihrer Expression von NOD2-mRNA untersucht. Zum Vergleich wurden eine etablierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinie und mit einem NOD2-Vektor (NOD2, transfizierte HEK 293T-Zellen) bzw. dem entsprechenden Leervektor (MOCK, transfizierte HEK 293T-Zellen) stabil transfizierte HEK 293T-Zellen auf die gleiche Weise analysiert. Zur Kontrolle wurde die Expression von GAPDH-mRNA nachgewiesen. Gezeigt ist eine repräsentative von mindestens 4 Analysen pro Zellpopulation.

Nachdem in Abbildung 4.12 die Expression des NOD2-Proteins in frisch isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen gezeigt worden war, konnte hier auch die Expression von NOD2-mRNA sowohl in frisch isolierten als auch als Linie kultivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen festgestellt werden. Um die Expression von NOD2-Protein auch in letzteren zu zeigen, wurde das Lysat einer  $\gamma\delta$  T-Zelllinie mittels immunomagnetischer Präzipitation und anschließendem Western-Blot auf die Präsenz von NOD2 untersucht (s. Abb. 4.18).



**Abb. 4.18: Proteinexpression von NOD2 in einer  $\gamma\delta$  T-Zelllinie**

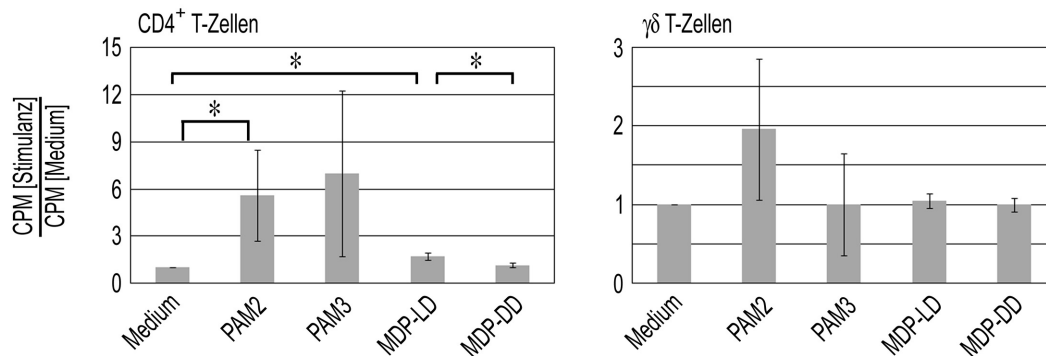
Nach der Lyse von Zellen der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie DW- $\gamma\delta$  wurde NOD2 in Proben des Totallysats und einer magnetisch immunpräzipitierten Fraktion (magn. Fraktion) in einer Western-Blot-Analyse immundetektiert. Ein Lysat von stabil mit NOD2 transfizierten HEK 293T-Zellen diente als Positivkontrolle. Der Pfeil weist auf die spezifische NOD2-Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 115 kDa hin. Das Experiment wurde von Dr. Tchikov und Prof. Dr. Schütze (AG Schütze, Institut für Immunologie, UK S-H, Campus Kiel) durchgeführt.

NOD2 konnte erwartungsgemäß im Lysat von mit NOD2 transfizierten HEK 293T-Zellen, jedoch nicht im Lysat der untersuchten  $\gamma\delta$  T-Zelllinie detektiert werden. Allerdings gelang der Nachweis von NOD2 nach Immunpräzipitation aus dem Lysat heraus. Damit konnte die Expression des NOD2-Proteins sowohl in frisch isolierten als auch als Linie kultivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen mittels FACS- und Western-Blot-Analyse beschrieben werden.

### Modulation der Proliferation durch TLR2- und NOD2-Liganden

Nachdem im letzten Kapitel sowohl die TLR2- als auch die NOD2-Expression durch hochrein isolierte  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nachgewiesen worden war, sollte wie bereits für in PBMZ befindlichen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten geschehen (s. Abb. 4.13) eine mögliche Modulation von MDP – und zu Vergleichszwecken auch von TLR2-Liganden – auf die Proliferation der jeweiligen Lymphozyten untersucht werden.

Dazu wurden aus 4 verschiedenen Spendern  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten hochrein isoliert. Nach Kreuzvernetzung des  $CD4$ -Rezeptors bzw. des  $\gamma\delta$  TZR wurden die Zellen mit Pam<sub>2</sub>CSK4, Pam<sub>3</sub>CSK4, MDP-LD oder MDP-DD stimuliert. Nach 3 ( $CD4^+$  T-Zellen) bzw. 7 ( $\gamma\delta$  T-Zellen) Tagen wurde die Proliferation über den Einbau radioaktiv markierten Thymidins bestimmt. Wie in der Abbildung 4.19 zu sehen, reagierten  $CD4^+$  T-Zellen mit verstärkter Proliferation sowohl auf die TLR2-Liganden Pam<sub>2</sub>CSK4 und Pam<sub>3</sub>CSK4, als auch – in geringerem Maße – auf den NOD2-Liganden MDP-LD, nicht jedoch auf dessen inaktives Isomer MDP-DD.



**Abb. 4.19: Proliferation isolierter  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit PAMPs**

Aus dem Blut von 4 Spendern wurden  $CD4^+$  und  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einer Reinheit von jeweils über 99 % positiv selektioniert und mittels Kreuzvernetzung von  $CD4$  bzw.  $\gamma\delta$  TZR aktiviert. Zusätzlich wurden die Zellen mit Pam<sub>2</sub>CSK4 (PAM2), Pam<sub>3</sub>CSK4 (PAM3), MDP-LD, MDP-DD oder nicht (Medium) kostimuliert. Nach 2 ( $CD4^+$  T-Zellen) bzw. 6 ( $\gamma\delta$  T-Zellen) Tagen wurden die Zellen mit <sup>3</sup>H-Thymidin versetzt und 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Menge an aufgenommener Radioaktivität gemessen. Dargestellt ist das Verhältnis der CPM der mit der jeweiligen Substanz stimulierten Zellen zu den CPM der nicht stimulierten Zellen. \*p < 0,05.

$\gamma\delta$  T-Lymphozyten wiesen dagegen nur nach Stimulation mit Pam<sub>2</sub>CSK4, nicht jedoch mit Pam<sub>3</sub>CSK4, MDP-LD oder MDP-DD eine erhöhte Proliferationsrate auf. Im Unterschied zu in PBMZ vergesellschafteten  $\gamma\delta$  T-Zellen (s. Abb. 4.13) reagieren hochrein isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten also nicht mit einer veränderten Proliferation auf eine Stimulation durch MDP.

### Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$ und IFN- $\gamma$ nach MDP-Stimulation

Im Abschnitt „Produktion von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nach MDP-Stimulation“, beginnend auf Seite 95 ist gezeigt worden, dass in PBMZ vergesellschaftete  $\gamma\delta$  T-Zellen nach BrHPP-Aktivierung durch MDP zu einer verstärkten Expression von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  stimuliert werden konnten. Weiterführend sollte untersucht werden, ob eine solche Reaktion auch bei hochrein isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nachzuweisen war. Zum Vergleich wurden NOD2-exprimierende CD14<sup>+</sup> Monozyten<sup>[278]</sup> ebenfalls isoliert und bezüglich ihrer Zytokinexpression analysiert.

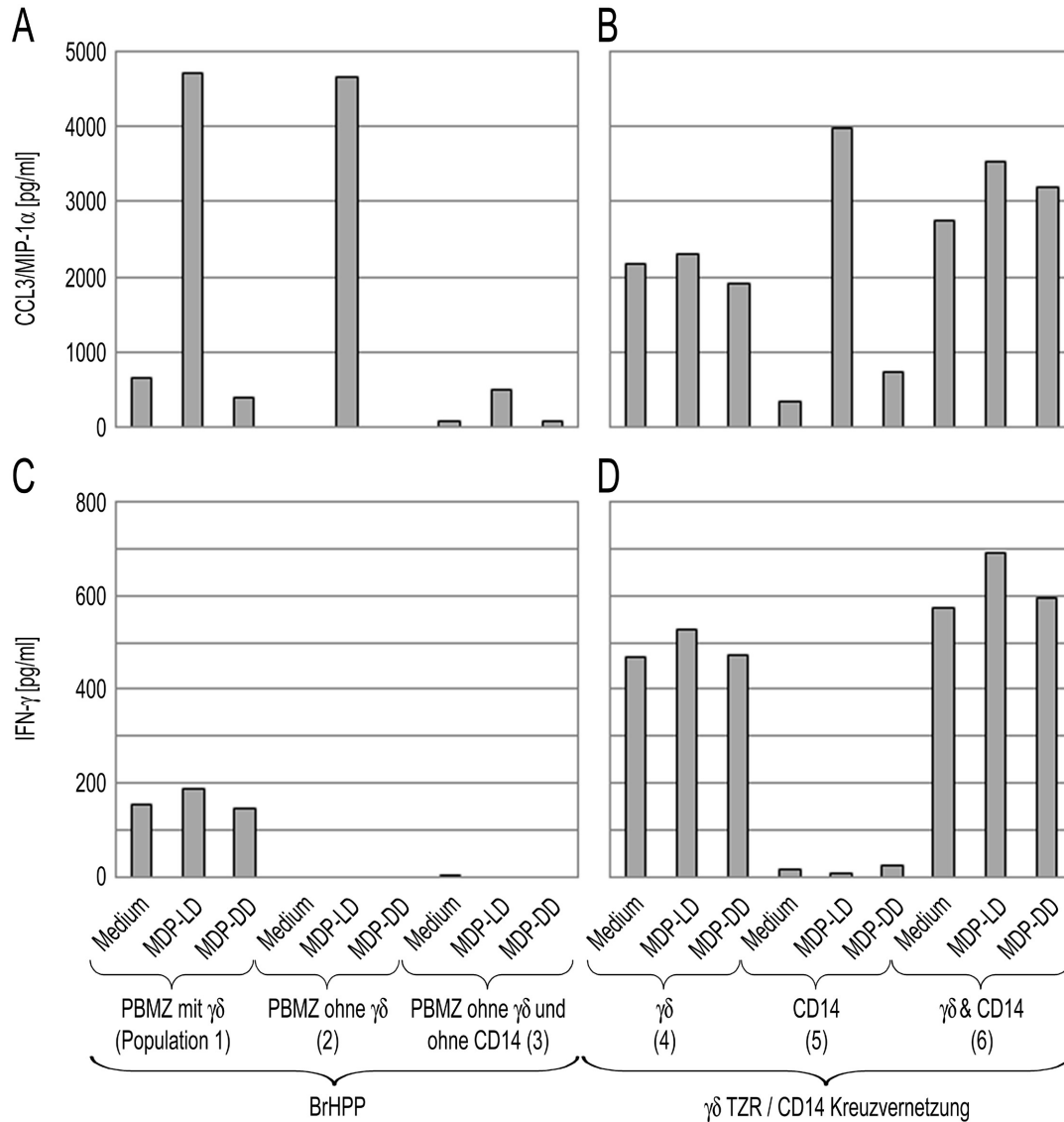
PBMZ mit  $\gamma\delta$  T-Zellen (Population 1), ohne  $\gamma\delta$  T-Zellen (2) und ohne  $\gamma\delta$  T-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten (3) wurden mit BrHPP stimuliert. Die durch positive Selektion aus denselben PBMZ gewonnenen  $\gamma\delta$  T-Zellen (4), CD14<sup>+</sup> Monozyten (5), und ein aus den Einzelpopulationen zusammgeführtes Zellgemisch aus  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten & CD14<sup>+</sup> Monozyten (6) wurden über eine Kreuzvernetzung des  $\gamma\delta$  TZR bzw. des CD14-Rezeptors aktiviert. Anschließend wurden die 6 Ansätze jeweils mit MDP-LD, MDP-DD oder zur Kontrolle nicht (Medium) stimuliert. Nach 24 h wurde die Konzentration von CCL3/MIP-1 $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$  im Zellüberstand gemessen (s. Abb. 4.20).

Bereits in der Abbildung 4.9 konnte gezeigt werden, dass MDP in  $\gamma\delta$  T-Zellen enthaltenen PBMZ ( $\cong$  Population 1) nach Aktivierung durch BrHPP eine erhöhte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induzierte. Dieser Befund konnte in der Abbildung 4.20 (Teil A und C) bestätigt werden. Nach Depletion der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten reagierten MDP-stimulierte PBMZ ohne  $\gamma\delta$  (2) mit einer nahezu unverändert starken Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$ , jedoch mit einer völligen Reduktion der IFN- $\gamma$ -Freisetzung. Unter den vorliegenden experimentellen Bedingungen sind also die  $\gamma\delta$  T-Zellen die Subpopulation, die für die IFN- $\gamma$ -Produktion verantwortlich ist.

Wurden in einem zweiten Schritt die CD14<sup>+</sup> Monozyten ebenfalls depletiert (3), reduzierte sich die Konzentration von MIP1- $\alpha$  im Überstand von  $\approx$  4500 pg/ml auf  $\approx$  500 pg/ml (s. Abb. 4.20, Teil A). Damit konnten die Monozyten als entscheidende Zellsubpopulation für die Produktion von MIP1- $\alpha$  identifiziert werden.

In vorhergehenden Abbildungen konnte bereits gezeigt werden, dass in PBMZ vergesellschaftete  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach Stimulation durch BrHPP und MDP eine erhöhte Produktion von CCL3/MIP-1 $\alpha$  (s. Abb. 4.14) und einen erhöhten Prozentsatz an IFN- $\gamma$  produzierenden Zellen (s. Abb. 4.15) aufwiesen. Im Rahmen des vorliegenden Experiments wurde durch die Isolation von  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einer Reinheit von über 99 % eine mögliche, indirekte Stimulation durch andere PBMZ nahezu ausgeschlossen (4). Auch unter diesen Bedingungen zeigten TZR-aktivierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine erhöhte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit MDP. Ebenfalls mit einer Reinheit von über 99 % isolierte CD14<sup>+</sup> Monozyten

(5) wiesen nach der Aktivierung über CD14 eine MDP-induzierte CCL3/MIP-1 $\alpha$ -, jedoch keine IFN- $\gamma$ -Expression auf.

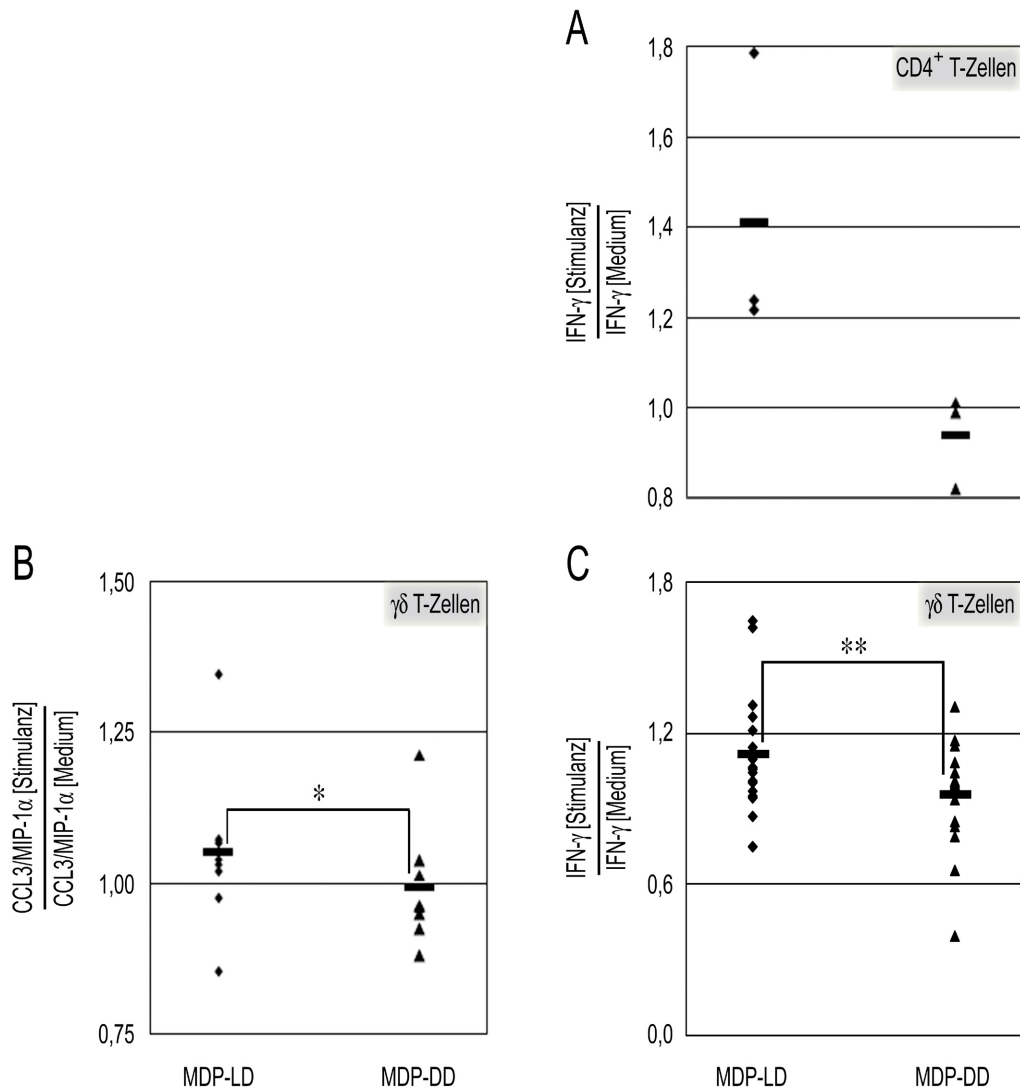


**Abb. 4.20: Zytokinfreisetzung von PBMZ-Subpopulationen nach MDP-Stimulation**

(A, C) Aus frisch isolierten,  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten enthaltenden PBMZ (PBMZ mit  $\gamma\delta$ ) wurden schrittweise  $\gamma\delta$  T-Zellen ( $\Rightarrow$  PBMZ ohne  $\gamma\delta$ ) und CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $\Rightarrow$  PBMZ ohne  $\gamma\delta$  und ohne CD14) depletiert. Anschließend wurden diese Zellpopulationen mit 200 nM BrHPP aktiviert und in Ab- (Medium) oder Anwesenheit von 10  $\mu\text{g/ml}$  MDP-LD oder MDP-DD stimuliert. Nach 24 h Inkubation wurde die Konzentration von CCL3/MIP-1 $\alpha$  (A) und IFN- $\gamma$  (C) gemessen. (B, D) Aus denselben PBMZ wurden sowohl  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als auch CD14<sup>+</sup> Monozyten mit einer Reinheit von jeweils über 99 % selektiert. Mit  $\alpha\text{TZR-}\gamma\delta$  bzw.  $\alpha\text{CD14}$  markierte  $\gamma\delta$  T-Zellen ( $\gamma\delta$ ), CD14<sup>+</sup> Monozyten (CD14) oder aus 90 %  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten und 10 % CD14<sup>+</sup> Monozyten ( $\gamma\delta$  & CD14) vereinigte Zellen wurden in mit polyklonalem Kaninchen-anti-Maus-Antikörper vorinkubierten Kavitäten für 24 h kultiviert. Zusätzlich wurden die Zellpopulationen mit 10  $\mu\text{g/ml}$  MDP-LD, MDP-DD oder nicht (Medium) stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von freigesetztem CCL3/MIP-1 $\alpha$  (B) und IFN- $\gamma$  (D) ermittelt. Gezeigt ist ein repräsentatives von 3 Experimenten.

Um eine eventuell indirekte Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch NOD2-exprimierende Monozyten experimentell nachzustellen, wurden die beiden Zellpopulationen gemischt (6) und ebenfalls nach Aktivierung des TZR bzw. des CD14-Rezeptors mit MDP stimuliert. Im Vergleich zu reinen  $\gamma\delta$  T-Zellen waren die Konzentrationen der Zytokine im Überstand der  $\gamma\delta$ -CD14-Mischpopulation höher. Allerdings veränderte sich das Verhältnis der nach MDP-LD- *vs.* MDP-DD-Stimulation ermittelten Zytokinkonzentration nur minimal, so dass unter diesen experimentellen Bedingungen nicht von einer indirekten Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch NOD2-exprimierende Monozyten ausgegangen werden konnte (s. Abb. 4.20, Teil B und D). Mit dem vorliegenden Ergebnis konnte zum ersten Mal eine direkte Reaktion von hochrein isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten auf eine Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP gezeigt werden.

Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die erhöhte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  durch MDP-stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen von verschiedenen Spendern reproduziert werden konnte. Weiterhin sollte anhand dieser Untersuchung abgeschätzt werden, inwieweit sich die Freisetzung von Zytokinen durch die MDP-Stimulation im Mittel erhöht. Zum Vergleich wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls hinsichtlich einer durch MDP stimulierten Freisetzung von IFN- $\gamma$  analysiert. Wie in der Abbildung 4.21 zu sehen, wies sowohl die Konzentration von CCL3/MIP-1 $\alpha$  als auch von IFN- $\gamma$  bei Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit MDP-LD *vs.* MDP-DD eine zwar geringe, aber signifikante Steigerung auf. Auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine deutliche Steigerung der Freisetzung von IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit MDP-LD *vs.* MDP-DD.



**Abb. 4.21: MDP-induzierte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  durch hochrein isolierte CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten**

CD4<sup>+</sup> T-Zellen von 3 Spendern (A), und  $\gamma\delta$  T-Zellen von 8 (B) bzw. 18 (C) Spendern wurden mit einer Reinheit von jeweils über 99 % isoliert. Anschließend wurden die Zellen in Ab- oder Anwesenheit von 10  $\mu\text{g/ml}$  MDP-LD oder MDP-DD durch Kreuzvernetzung des  $\gamma\delta$  TZR oder CD4 stimuliert. Nach 24 h wurden die Konzentrationen von CCL3/MIP-1 $\alpha$  (B) und IFN- $\gamma$  (A & C) im Zellüberstand bestimmt. Dargestellt ist das Verhältnis der Zytokinkonzentration bei Stimulation mit MDP-LD oder MDP-DD zur Zytokinkonzentration im unstimulierten Fall (Medium). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

#### 4.2.4 Fazit

$\gamma\delta$  T-Lymphozyten wird eine Rolle an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität zugeschrieben. Damit ist ihre Präsenz in peripheren Geweben, vor allem aber ihre Möglichkeit zur Wahrnehmung pathogener Bakterien essentiell. Dazu nutzen Immunzellen wie Monozyten/Makrophagen u.a. Mustererkennungsrezeptoren wie TLRs und NOD2. In dem vorliegenden Kapitel wurde untersucht, ob  $\gamma\delta$  T-Zellen ebenfalls NOD2 exprimieren – und ggf. auch auf den NOD2-Liganden MDP reagieren.

Dazu wurden in einem ersten Ansatz  $\gamma\delta$  T-Zellen enthaltende PBMZ in ihrer Gesamtheit hinsichtlich der Expression von NOD2 untersucht. Es konnte sowohl eine Expression von NOD2-mRNA als auch eine MDP-stimulierte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  durch PBMZ nachgewiesen werden. In einem nächsten Schritt wurden in PBMZ vergesellschaftete  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mittels diskriminierender FACS-Analyse gezielt betrachtet. So konnte die Expression von NOD2-Protein durch  $\gamma\delta$  T-Zellen gezeigt werden. Nach Stimulation mit MDP wiesen in PBMZ vergesellschaftete  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten eine verstärkte Proliferation sowie eine erhöhte Produktion von CCL3/MIP-1 $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$  auf. Um die eigenständige Reaktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen bei MDP-Stimulation zu beschreiben, wurden  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten hochrein isoliert. Während die Expression von NOD2 durch diese Zellen nachgewiesen wurde, konnte eine MDP-stimulierte Modulation der Proliferation – wie noch bei in PBMZ vergesellschafteten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten vorhanden – nicht bestätigt werden. Demgegenüber gelang allerdings der Nachweis einer durch MDP verstärkten Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  durch hochrein isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen.

Im vorliegenden Kapitel wurden  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit und ohne weitere PBMZ hinsichtlich ihrer Expression von NOD2 und ihrer Reaktion auf MDP hin untersucht. Es bleibt festzuhalten, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen – unabhängig von der Präsenz weiterer PBMZ – NOD2 exprimieren und nach Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP mit einer verstärkten Freisetzung von immunologisch bedeutsamen Mediatoren reagieren. In Gegenwart anderer PBMZ verändert sich nach MDP-Stimulation zusätzlich ihre Proliferation.



## 4.3 Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa*

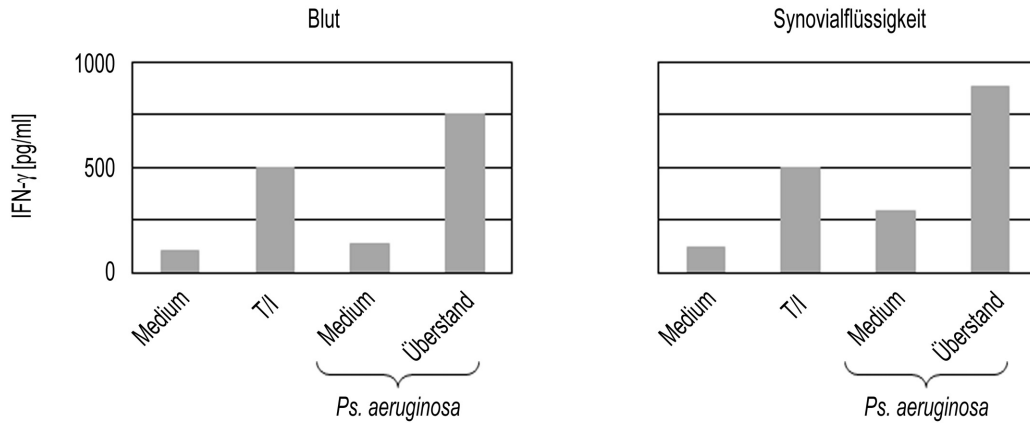
*Ps. aeruginosa* ist ein häufig auftretender Keim bei Entzündungen im peripheren Lungengewebe und steht damit in Konfrontation mit  $\gamma\delta$  T-Zellen, die an der immunologischen Überwachung peripherer Gewebe beteiligt sind. Eine Stimulationswirkung von *Ps. aeruginosa* auf die Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten konnte bereits beschrieben werden<sup>[381]</sup>. Im dritten Teil der Ergebnisse sollte überprüft werden, ob  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten darüber hinaus mit der Expression von immunologischen Mediatoren auf eine Stimulation mit *Ps. aeruginosa* reagieren. Eine solche Reaktion kann aufgrund ihrer physiologischen Lokalisation im peripheren Gewebe mit höherer Wahrscheinlichkeit von V $\delta$ 1 vs. V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen angenommen werden. Deswegen wurden in den folgenden Experimenten i.a.R. V $\delta$ 1 – und nur ggf. zusätzlich auch V $\delta$ 2 –  $\gamma\delta$  T-Zelllinien untersucht.

### 4.3.1 Induktion der Expression von Botenstoffen

Nach der Erkennung eines Pathogens besteht eine erste Reaktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Aktivierung und Rekrutierung anderer Immunzellen. So konnte u.a. bereits die induzierbare Expression der Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$ , und der Chemokine CCL3/MIP-1 $\alpha$ , CCL5/RANTES und CXCL8/IL-8 durch  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden<sup>[104–106]</sup>. Im Folgenden sollte die Freisetzung des Zytokins IFN- $\gamma$  und des Chemokins CCL20/MIP-3 $\alpha$  durch  $\gamma\delta$  T-Zelllinien nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa* untersucht werden.

#### Expression des Zytokins IFN- $\gamma$

IFN- $\gamma$  ist bereits als ein typischerweise von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach Stimulation exprimiertes T<sub>h</sub>1 Zytokin vorgestellt worden (s. Seite 20, Abschnitt „Funktionen“). Folgerichtig ist in Kap. 4.2 die verstärkte Expression von IFN- $\gamma$  durch  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Kostimulation mit MDP als Indikator für die Funktionalität des NOD2-Rezeptors gewertet worden. Hier sollte eine mögliche Induktion der IFN- $\gamma$ -Expression durch den Überstand von *Ps. aeruginosa* überprüft werden. Dazu wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit ohne zusätzliche Substanzen, mit T/I, dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* stimuliert. Anschließend wurde die Freisetzung von IFN- $\gamma$  ermittelt. Wie in Abb. 4.22 zu sehen, konnte unabhängig von der Herkunft der Zelllinien eine deutliche Konzentrationserhöhung von IFN- $\gamma$  im Überstand von mit T/I oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen beobachtet werden.

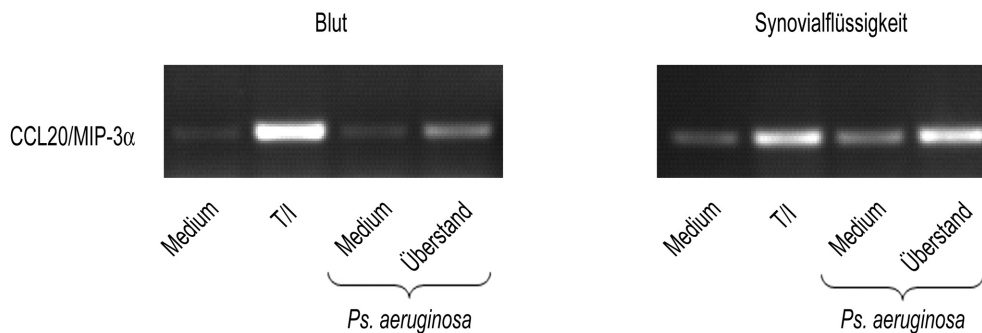


**Abb. 4.22: Freisetzung von IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa***

$\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit wurden für 8 h ohne weitere Substanzen (Medium), mit T/I, dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* inkubiert. Anschließend wurde mittels ELISA die Freisetzung von IFN- $\gamma$  quantifiziert.

### Expression des Chemokins CCL20/MIP-3 $\alpha$

CCL20/MIP-3 $\alpha$  wurde als Chemoattraktant für CCR6<sup>+</sup> DCs, B- und verschiedene T-Zellen ( $\Rightarrow \gamma\delta$  T-Zellen aus Darm, s. Abb. 4.3) charakterisiert. Weiterhin wurden CCL20/MIP-3 $\alpha$  AMP-Funktionen zugeschrieben. Aufgrund der Kombination dieser Eigenschaften war die Produktion dieses Chemokins durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien von Interesse. Zur Stimulation wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit mit T/I, dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* versetzt. Anschließend wurde die Expression der mRNA von CCL20/MIP-3 $\alpha$  mittels RT-PCR analysiert, und – wie in Abb. 4.23 zu sehen – ihre Verstärkung durch T/I und *Ps. aeruginosa* festgestellt.



**Abb. 4.23: Induktion der CCL20/MIP-3 $\alpha$ -Expression durch *Ps. aeruginosa***

$\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit wurden nicht oder mit T/I, dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* stimuliert. Die Expression von CCL20/MIP-3 $\alpha$ -mRNA wurde anschließend mittels RT-PCR ermittelt.

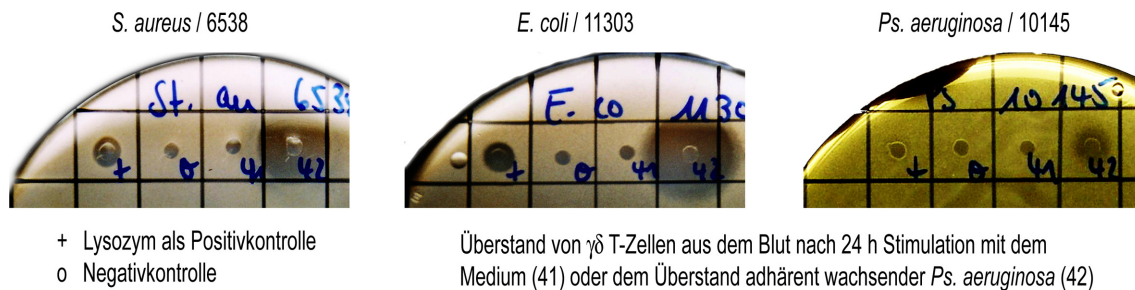
Dagegen konnte die Produktion von CCL20/MIP-3 $\alpha$ -Protein mittels intrazellulärer FACS-Analyse oder ELISA nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

### 4.3.2 Induktion der Expression von antimikrobiellen Molekülen

Vorhergehende Publikationen haben die Expression von AMPs durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten beschrieben. So konnten Agerberth *et al.* die Produktion von LL-37 durch V $\delta$ 2<sup>[333]</sup> und Mincheva *et al.* die Produktion von Granulysin und Granzym B durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[382]</sup> zeigen. In den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte untersucht werden, ob V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten konstitutiv oder nach Stimulation mit dem Überstand von *Ps. aeruginosa* auch andere AMPs exprimierten.

#### Darstellung antimikrobieller Aktivität mittels Agardiffusions-Screening-Assay

Um die Fähigkeit von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zur Freisetzung von AMPs darzustellen, wurden die Zellkulturüberstände verschieden stimulierter  $\gamma\delta$  T-Zellen – z.T. nach Konzentration – in einem Agardiffusions-Screening-Assay auf antimikrobielle Aktivität untersucht. Diese führte im Assay zu einem gut sichtbaren Hemmhof auf einer Agarplatte (s. Abb. 4.24, Probe 42).



**Abb. 4.24: Ausbildung eines Hemmhofs im Agardiffusions-Screening-Assay**

$\gamma\delta$  T-Zellen wurden für 24 h mit dem Kultivierungsmedium (Probe 41) bzw. dem Überstand von *Ps. aeruginosa* (Probe 42) stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände wie in Kap. 3.2.3, Seite 74 beschrieben in einem Agardiffusions-Screening-Assay hinsichtlich möglicher antimikrobieller Aktivität überprüft. Wie zu sehen konnte ein deutlicher Hemmhof um Probe 42 nachgewiesen werden, die analysierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinie DW SpB V $\delta$ 1 wurde also durch *Ps. aeruginosa* zur Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen stimuliert. Dargestellt sind desweiteren Positiv- und Negativkontrolle sowie die ATCC-Nummern der jeweiligen Bakterienstämme. Das Experiment wurde von Mitarbeitern der AG Podschun (Institut für Infektionsmedizin, UK S-H, Campus Kiel) durchgeführt.

Die Hemmhöfe wurde bezüglich ihres Durchmessers und der Qualität der Hemmung charakterisiert. Getestet wurden über 200 verschiedene Proben, die Tabelle 4.1 zeigt einen Auszug aus den Ergebnissen. In einigen Fällen konnte die antimikrobielle Aktivität erst nach Konzentrierung des Überstands beobachtet werden: Während die nicht einkonzentrierte Probe 187 keine antimikrobielle Aktivität aufwies, wies die Probe nach 20facher Konzentration (jetzt Probe 195) eine antimikrobielle Wirkung auf. Antimikrobielle Aktivität von  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigte sich nur nach Stimulation mit T/I oder *Ps. aeruginosa*.

Tabelle 4.1: Agardiffusions-*Screening-Assay*: Auszug aus der Ergebnisliste

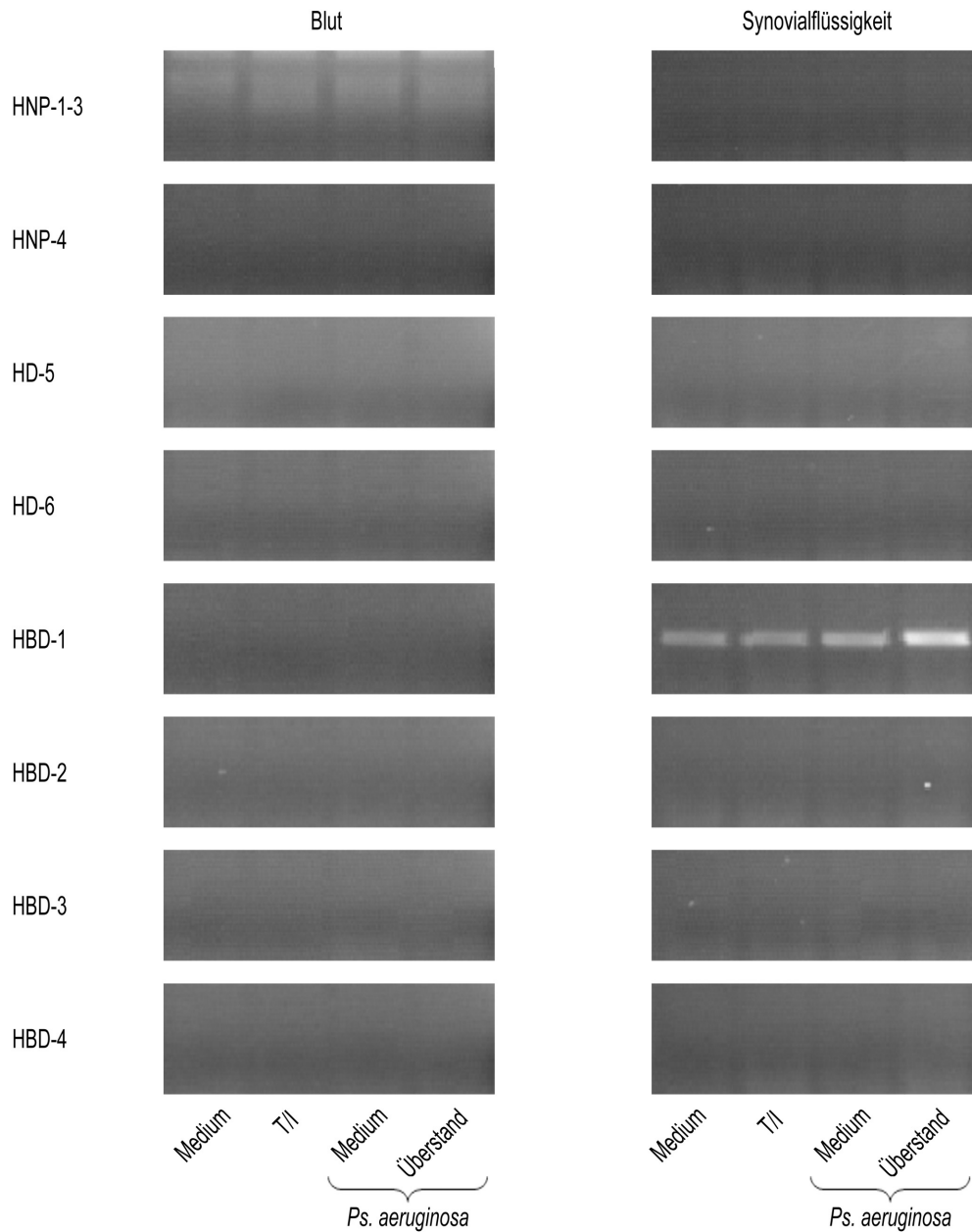
Probe	Zelllinie	Subst.	[h]	Konz.	<i>S. aureus</i> ATCC 6538		<i>E. coli</i> ATCC 11303		<i>Ps. aeruginosa</i> ATCC 10145	
					H	B	H	B	H	B
37	DW SpB V $\delta$ 1	Med	24		0		0		0	
38	DW SpB V $\delta$ 1	T/I	24		0		0		0	
41	DW SpB V $\delta$ 1	MAP	24		0		0		0	
42	DW SpB V $\delta$ 1	ÜAP	24		14	HHH	16	HHHH	6	HHHH
99	TBT	Med	4		0		0		0	
100	TBT	T/I	4		4	HH	5	HHHH	0	
185	DU V $\delta$ 2	Med	48		0		0			
186	DU V $\delta$ 2	BrHPP	48		0		0			
187	DU V $\delta$ 2	T/I	48		0		0			
191	DU V $\delta$ 2	MAP	48		0		0			
192	DU V $\delta$ 2	ÜAP	48		0		0			
193	DU V $\delta$ 2	Med	48	1:20	0		0			
194	DU V $\delta$ 2	BrHPP	48	1:20	0		0			
195	DU V $\delta$ 2	T/I	48	1:20	5	HHHH	0			
199	DU V $\delta$ 2	MAP	48	1:20	0		0			
200	DU V $\delta$ 2	ÜAP	48	1:20	0		0			
(+)	Lysozym				5		6		5	HH
(-)	Essigsäure				0		0		0	

$\gamma\delta$  T-Zelllinien aus dem Blut (DW SpB V $\delta$ 1, DU V $\delta$ 2) und der Synovialflüssigkeit (TBT) wurden 4 bis 48 h ([h]) lang mit den Substanzen (Subst.) BrHPP, T/I, dem Kultivierungsmedium (MAP) oder dem Überstand adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* (ÜAP) stimuliert. Anschließend wurde der Zellkulturüberstand direkt oder nach Konzentrierung (Proben 193 – 200) in einem Agardiffusions-*Screening-Assay* unter Verwendung der mit ihren jeweiligen ATCC-Nummern angegebenen Keime analysiert. Zusätzlich wurde Lysozym [500 ng/ $\mu$ l] als Positiv- (+), und 0,01 %ige Essigsäure als Negativkontrolle (-) verwendet. Der Durchmesser des resultierenden Hemmhofs wurde in mm („H“: Hemmhof), die Qualität („B“: Bewertung) auf einer Skala von „(H)“ (Hemmung mit diffuser Begrenzung und deutlichem Wachstum) bis zu „HHHH“ (abgegrenzter Hemmhof ohne Bewuchs) angegeben.

### $\alpha$ - & $\beta$ -Defensine

Die Ergebnisse des Agardiffusions-*Screening-Assays* legten eine induzierbare, antimikrobielle Aktivität in manchen  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit nahe. Dementsprechend wurde die mögliche induzierbare Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensinen<sup>[383–387]</sup> durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten näher untersucht. Dazu wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus dem Blut und der Synovialflüssigkeit mit T/I, dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von Pseudomonaden stimuliert. Eine RT-PCR-Analyse ergab eine erhöhte Expression von HBD-1-mRNA in  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit nach Stimulation mit dem Pseudomonadenüberstand (s. Abb. 4.25).

### 4.3 Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa*



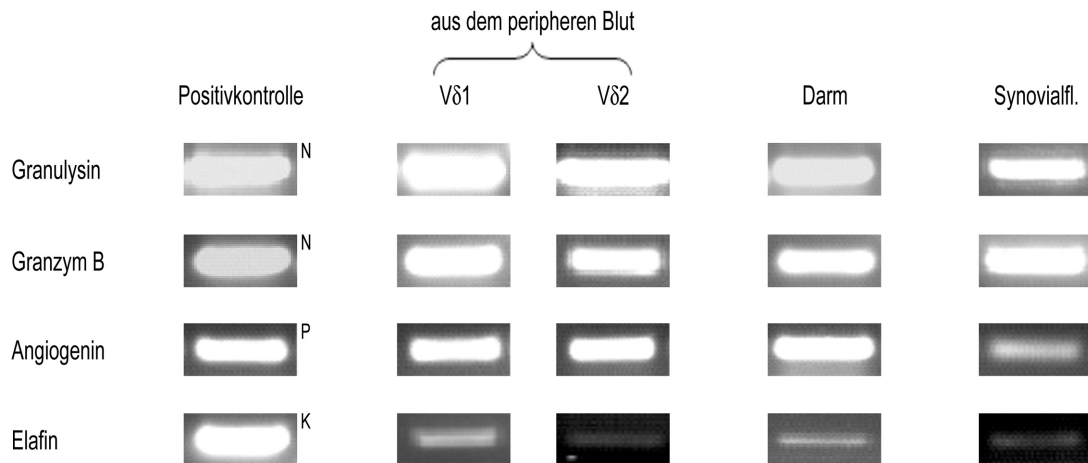
**Abb. 4.25: Expression von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensinen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen**

$\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit wurden nicht (Medium), mit T/I, dem Kulturmedium oder dem Überstand adhärent wachsender Pseudomonaden stimuliert. Anschließend wurde die Expression der  $\alpha$ -Defensine HNP-1, -2, -3, -4, HD-5, HD-6 und der  $\beta$ -Defensine HBD-1, -2, -3 und -4 mittels RT-PCR überprüft.

$\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut exprimierten unabhängig von der Stimulation kein HBD-1. Andere  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Defensine wurden weder in  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut noch aus der Synovialflüssigkeit nachgewiesen. Daher sollte in einem nächsten Schritt die mögliche Expression weiterer AMPs analysiert werden.

### Expressionsanalyse weiterer antimikrobieller Peptide

Nachdem aus der Gruppe der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine nur HBD-1, und das auch nur in  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression anderer AMPs untersucht. Dazu wurde die Produktion von mRNAs ausgewählter AMPs durch  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut, Darm und Synovialflüssigkeit analysiert (s. Abb. 4.26).



**Abb. 4.26: Expression ausgewählter AMPs durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben**  
Die mRNA von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut, Darm und Synovialflüssigkeit wurde isoliert und mittels RT-PCR auf die Expression von Granulysin, Granzym B, Angiogenin und Elafin überprüft. Gezeigt sind die im Agarosegel als PCR-Fragmente der nachzuweisenden AMP-mRNAs/cDNAs identifizierten Banden. Als Positivkontrollen wurden Natürliche Killerzellen (N)<sup>[333,388,389]</sup>, PBMZ (P)<sup>[390]</sup> und Zellen der Keratinozytenlinie HaCaT (K)<sup>[358]</sup> mitgeführt.

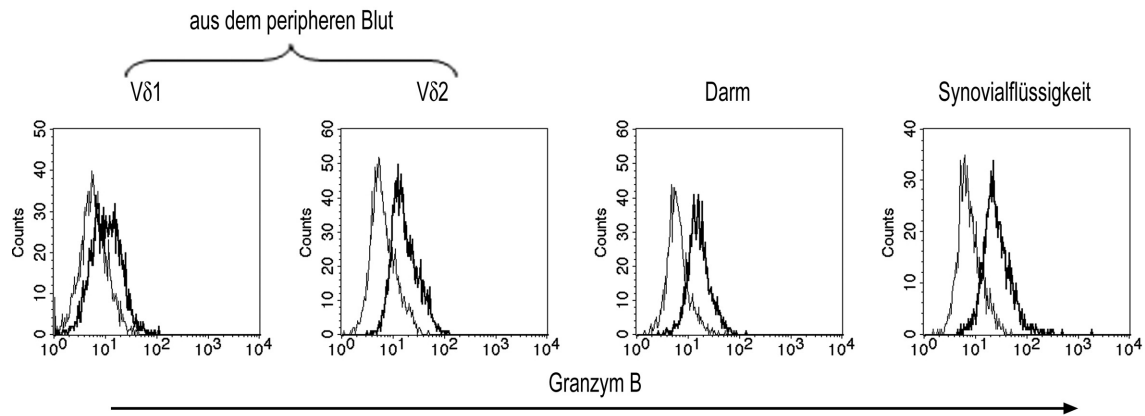
Granulysin war bei der Suche nach von aktivierten T-Zellen exprimierten Genen entdeckt worden. Neben zytotoxischen Effekten gegenüber entarteten und virusinfizierten Zellen wurde auch ein antimikrobieller Effekt gegenüber einer Reihe von mikrobiellen Pathogenen beschrieben<sup>[391,392]</sup>. Während die Expression von Granulysin, Granzym B<sup>[382]</sup> und Angiogenin<sup>[393]</sup> bereits bekannt war, war die Expression von Elafin durch  $\gamma\delta$  T-Zellen bisher nicht beschrieben worden.

### Granzym B

Granzym B ist eingehend als zytotoxisches Molekül charakterisiert worden, das – im Verbund mit Perforin – von Immunzellen zur gezielten Tötung von körpereigenen entarteten Zellen genutzt wird<sup>[394]</sup>. Wenige Veröffentlichungen haben darüber hinaus auch die Rolle von Granzym B als antimikrobielles Peptid beschrieben<sup>[395,396]</sup>. So konnten Berthou *et al.* zeigen, dass Keratinozyten Granzym B als antibakteriellen Wirkstoff gegen *S. epidermidis* sezernieren<sup>[396]</sup>. Wenn somit Epithelzellen Granzym B als AMP nutzten, konnte auch eine Induktion der Expression von Granzym B durch Mikroorganismen in intraepithelial lokalisierten und Granzym B exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten<sup>[397]</sup> vermutet werden.

### 4.3 Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa*

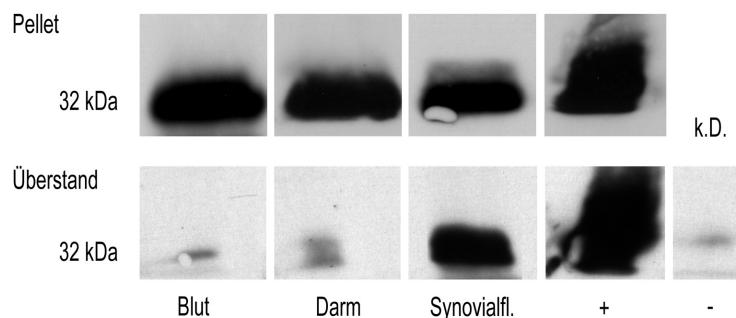
Zum Nachweis der Expression von Granzym B wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut, Darm und Synovialflüssigkeit mittels intrazellulärer FACS-Analyse untersucht. Eine deutlich messbare Expression von Granzym B konnte in allen getesteten  $\gamma\delta$  T-Zelllinien festgestellt werden (s. Abb. 4.27).



**Abb. 4.27: Durchflusszytometrische Analyse: Expression von Granzym B durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben**

Langzeitkultivierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut, Darm und Synovialflüssigkeit wurden permeabilisiert und anschließend mit FITC-gekoppeltem  $\alpha$ Granzym B (dicke Linie) oder entsprechendem Isotypkontrollantikörper (dünne Linie) markiert. Wie zu sehen, wiesen alle untersuchten Zelllinien eine messbare Expression von Granzym B auf.

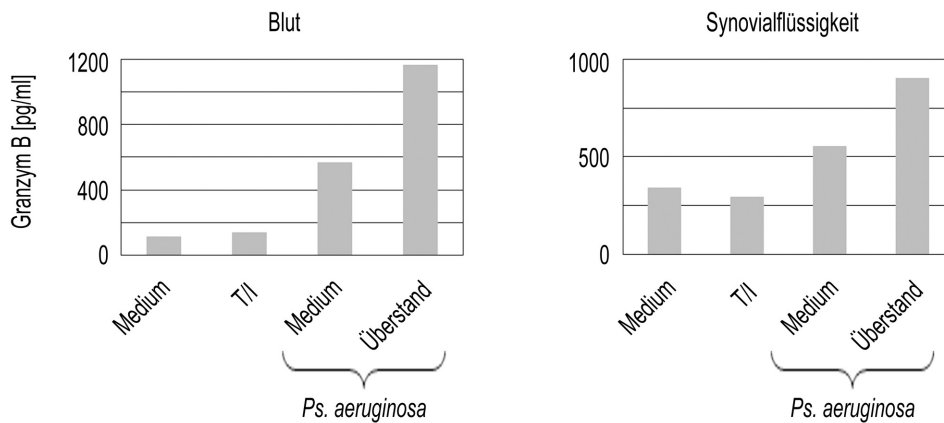
Die Proteinexpression durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus Blut, Darmgewebe und Synovialflüssigkeit wurde zusätzlich mittels Western-Blot bestätigt. Eine Freisetzung von Granzym B in den Zellkulturüberstand konnte nur bei  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden (s. Abb. 4.28).



**Abb. 4.28: Western-Blot: Expression und Freisetzung von Granzym B durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben**

Granzym B wurde in Lysat und Kulturüberstand von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut, Darm und Synovialflüssigkeit (Synovialfl.) mittels Western-Blot analysiert. Als Positivkontrolle wurde die NK Tumorzelllinie YTS, als Negativkontrolle das Zellkulturmedium (nur Überstand) mitgeführt. k.D. = keine Daten.

Im initial durchgeführten Agardiffusions-*Screening-Assay* wurde ein antimikrobieller Effekt in den Zellkulturüberständen von  $\gamma\delta$  T-Zellen erst nach Aktivierung der Zellen durch T/I oder *Ps. aeruginosa* nachgewiesen. Eine mögliche stimulationsabhängige Induktion von Granzym B sollte überprüft werden. Dazu wurden  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus dem Blut und der Synovialflüssigkeit mit T/I, dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* stimuliert, oder unstimuliert belassen. Anschließend wurde mittels ELISA die Konzentration von Granzym B im Zellkulturüberstand gemessen (s. Abb.4.29).



**Abb. 4.29: ELISA: Freisetzung von Granzym B durch stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen**

$\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit wurden nicht (Medium) oder mit T/I, dem Kulturmedium oder dem Überstand adhärent wachsender Pseudomonaden stimuliert. Anschließend wurde mittels ELISA die Konzentration von Granzym B in den Zellkulturüberständen bestimmt.

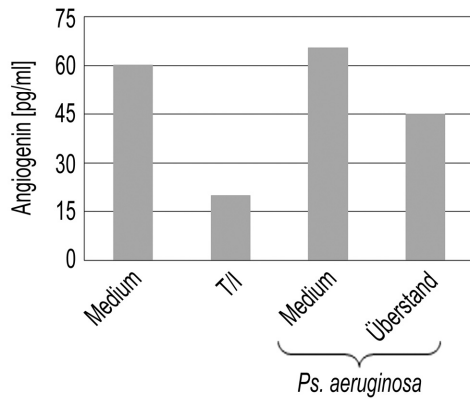
In Vorversuchen wurde die Konzentration von Granzym B in Überständen von 6 h mit *Ps. aeruginosa* stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen mit  $> 8000$  pg/ml ermittelt. Die Bestimmung der Konzentration von Granzym B bei noch längerer (eigentlich vorgesehen waren 16 – 24 h) Stimulationsdauer hätte aufgrund des eingeschränkten Messbereichs des ELISAs ( $< 1000$  pg/ml) eine mehr als 10fache Verdünnung der Proben erfordert. Um damit einhergehende Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurde die Stimulation im dargestellten Experiment auf 30 min begrenzt. Interessanterweise war dieser Zeitraum für eine Reaktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen auf *Ps. aeruginosa* ausreichend, nicht jedoch für eine Reaktion auf T/I.

Dabei konnte eine durch das Kulturmedium bzw. den Überstand von *Ps. aeruginosa* induzierbare Freisetzung von Granzym B durch  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden. Damit bleibt festzuhalten, dass in  $\gamma\delta$  T-Zellen aus Blut und Synovialflüssigkeit eine antimikrobielle Aktivität induziert werden kann, die zumindest z.T. auf eine stimulierbare Freisetzung von Granzym B zurückgeführt werden kann.



### Angiogenin

Angiogenin spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese<sup>[398]</sup>. Eine zusätzliche antimikrobielle Funktion von Angiogenin wurde in mehreren Publikationen kontrovers diskutiert<sup>[399–402]</sup>. Weil Angiogenin auch in PBMZ nachgewiesen worden ist<sup>[390]</sup>, sollte eine mögliche Produktion durch stimulierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten untersucht werden. Die Expression von Angiogenin-mRNA konnte in  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben nachgewiesen werden (s. Abb. 4.26). Weiterhin wurde die Freisetzung von Angiogenin durch  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa* untersucht (s. Abb. 4.30).



**Abb. 4.30: Freisetzung von Angiogenin durch stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen**

$\gamma\delta$  T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit wurden ohne zusätzliche Substanzen (Medium), T/I, mit dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* stimuliert. Anschließend wurde mittels ELISA die Konzentration von Angiogenin im Zellkulturüberstand ermittelt.

Während synoviale  $\gamma\delta$  T-Zellen konstitutiv geringe Mengen von Angiogenin sezernierten, war die Produktion nach Aktivierung mit T/I oder *Ps. aeruginosa* reduziert. Damit war die Verwendung von Angiogenin als AMP durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten unwahrscheinlich.

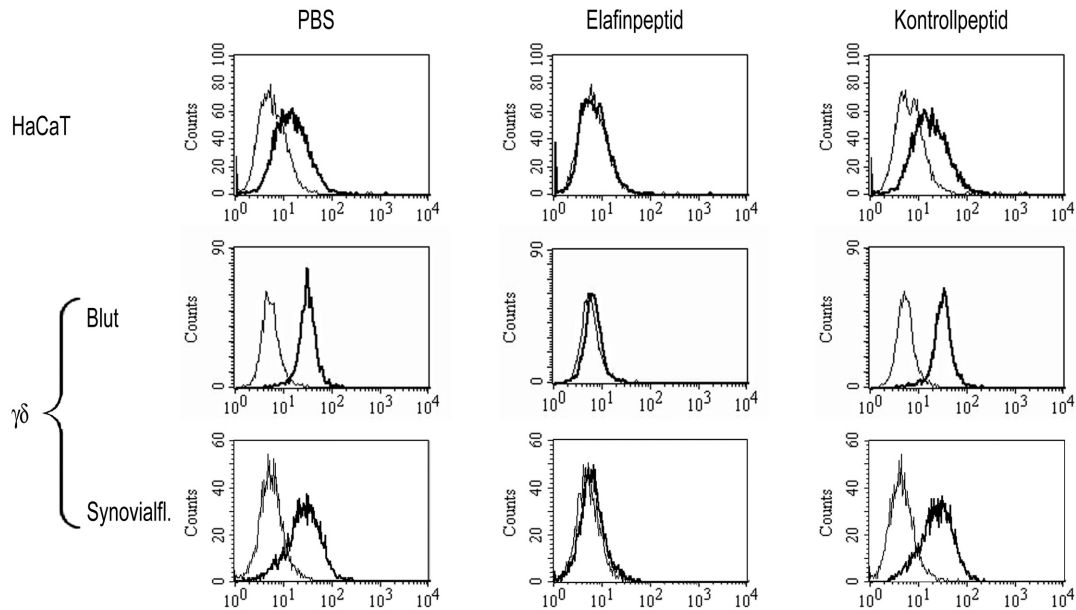
## Elafin

Die Expression von Elafin war von besonderem Interesse: Initial als Proteaseinhibitor entdeckt<sup>[354]</sup>, wurde (Pre-)Elafin in weiteren Arbeiten antimikrobielle<sup>[403]</sup> und opsonierende<sup>[362]</sup> Wirkung gegenüber Pathogenen, desweiteren chemotaktische und aktivierende<sup>[361]</sup> Wirkung auf Immunzellen zugeschrieben. Die Aufgaben von  $\gamma\delta$  T-Zellen wiederum beinhalten die Überwachung des Gewebes und ggf. die Alarmierung anderer Immunzellen. Somit entsprach (Pre-)Elafin aufgrund seiner Eigenschaften den Anforderungen an ein AMP, das typischerweise von  $\gamma\delta$  T-Zellen verwendet werden könnte.

Zur Detektion von Elafin mittels FACS-Analyse musste in einem ersten Schritt die Eignung der Elafin-Antikörper TRAB2O und TRAB2F getestet werden. Dazu wurden die genannten Antikörper in einem molekularen Verhältnis von 1:300 mit einem rekombinant hergestellten Elafinpeptid oder dem unspezifischen Band-3-Protein mit ähnlicher Größe inkubiert. Anschließend wurden diese und nicht präinkubierte Antikörperproben für eine FACS-Analyse der Elafin-Expression in einer Keratinozytenlinie (HaCaT) und in  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit genutzt. Wie in Abb. 4.31 zu sehen, konnte Elafin in allen getesteten Zelllinien nachgewiesen werden. Die Reduktion der MFI nach Vorinkubation des Antikörpers mit dem Elafinpeptid, nicht aber einem Kontrollpeptid, bestätigte die Spezifität des durchflusszytometrischen Nachweises von Elafin.

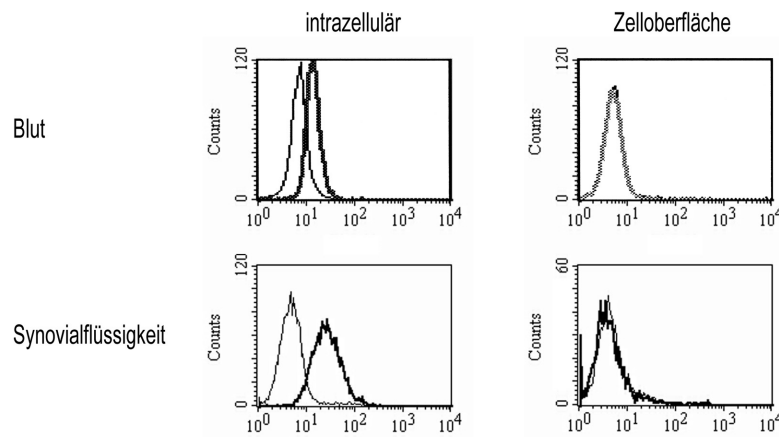
Anschließend wurde die Expression von Elafin zusätzlich auf der Zelloberfläche von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit analysiert (s. Abb. 4.32). Während die bereits in Abb. 4.31 gezeigte intrazelluläre Präsenz von Elafin bestätigt werden konnte, war eine Expression auf der Zelloberfläche nicht nachzuweisen.

### 4.3 Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa*



**Abb. 4.31: Durchflusszytometrische Analyse: Eignung des  $\alpha$ Elafin zur intrazellulären FACS-Analyse**

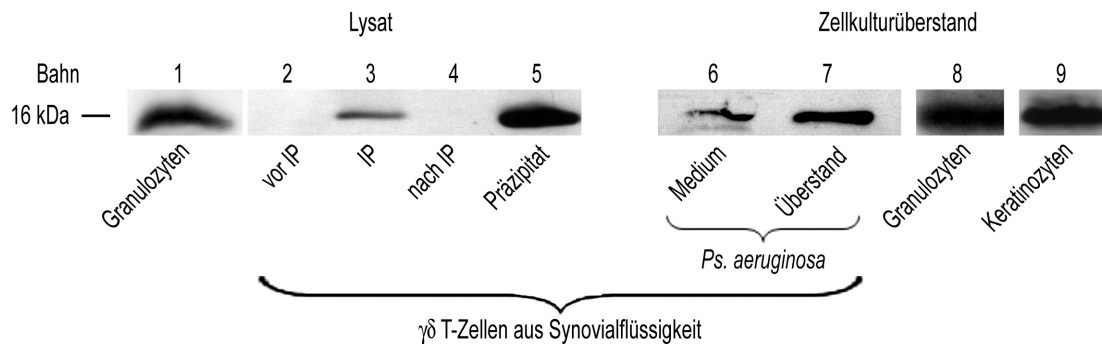
Der Elafin-Antikörper TRAB20 (dicke Linie) und ein entsprechender Isotypkontrollantikörper (dünne Linie) wurden für 45 min bei 4°C in einem molekularen Verhältnis von 1:300 mit rekombinant hergestelltem Elafin (antigenes Peptid von abcam), einem Kontrollpeptid ähnlicher Größe (Band-3-Protein von Bachem) oder – zur Kontrolle – mit PBS inkubiert. Anschließend wurden die Antikörper/Peptid-Proben zur intrazellulären FACS-Analyse von Elafin in Keratinozyten (HaCaT) und  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit (Synovialfl.) verwendet. Als Sekundärantikörper wurde PE-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Nicht gezeigt sind identische Ergebnisse mit dem auf gleiche Weise vorinkubierten Elafinantikörper TRAB2F beim Nachweis von Elafin in  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit.



**Abb. 4.32: Durchflusszytometrische Analyse: Intrazelluläre und Oberflächen-Expression von Elafin durch  $\gamma\delta$  T-Zellen**

$\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut und Synovialflüssigkeit wurden mit  $\alpha$ Elafin (dicke Linie) oder entsprechendem Isotypkontrollantikörper (dünne Linie) intrazellulär oder auf der Zelloberfläche markiert. PE-konjugierter Ziege-Anti-Maus-Antikörper wurde als Sekundärantikörper eingesetzt. Gezeigt ist die Messung einer von jeweils zwei aus Blut bzw. Synovialflüssigkeit untersuchten  $\gamma\delta$  T-Zelllinien.

In einem weiteren Schritt sollte die Expression des Elafinproteins in  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mittels Western-Blot bestätigt werden. Dazu wurden aus der Synovialflüssigkeit isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen lysiert und mittels Zentrifugation in lösliche und unlösliche Bestandteile getrennt. Aus dem Lysepufferüberstand wurde Elafin immunpräzipitiert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot detektiert. Die durch den Lysepuffer nicht zu solubilisierende Fraktion wurde ebenfalls im Western-Blot analysiert. Als Positivkontrolle wurden Granulozyten genutzt. Wie in Abbildung 4.33 (linker Teil: „Lysat“) zu sehen, konnte in der Positivkontrolle und mittels IP in  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Proteinbande von ca. 16 kDa nachgewiesen werden. Zusätzliche Proben aus dem Lysepufferüberstand vor und nach der IP zeigten keine Elafinbande und belegten damit die Spezifität der Immunpräzipitation.



**Abb. 4.33: Western-Blot: Elafin im Zytosol und Überstand von stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen**

Lysat: Frisch isolierte und direkt lysierte Granulozyten dienen als Positivkontrolle (Bahn 1). Direkt nach der Lyse einer  $\gamma\delta$  T-Zelllinie aus der Synovialflüssigkeit wurde eine Probe des Lysepufferüberstands abgenommen (Bahn 2: vor IP). Aus dem Lysepufferüberstand wurde Elafin immunpräzipitiert, und das Präzipitat analysiert (Bahn 3: IP). Ebenso wurde eine Probe des Lysepufferüberstands nach der Immunpräzipitation (IP) des Elafins aufgetragen (Bahn 4: nach IP). Die durch den Lysepuffer nicht zu solubilisierende Fraktion wurde mit Auftragspuffer versetzt, 5 min auf 95 °C erhitzt, ÜN bei 4 °C geschüttelt und anschließend analysiert (Bahn 5: Präzipitat). Elafin konnte als 16 kDa großes Protein detektiert werden. Zellkulturüberstand: Eine aus der Synovialflüssigkeit isolierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinie wurde mit dem Kulturmedium (Bahn 6) bzw. dem Überstand von *Ps. aeruginosa* (Bahn 7) stimuliert. Anschließend erfolgte eine IP von Elafin. Als Positivkontrollen wurden Granulozyten und Keratinozyten verwendet. Dazu wurden frisch isolierte Granulozyten 2 h in X-VIVO 15 kultiviert (Bahn 8). Die Keratinozytenzelllinie HaCaT lag als Langzeitkultur vor (Bahn 9). Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert. Der Zellkulturüberstand wurde filtriert (0,2  $\mu$ m) und anschließend durch die Kombination verschiedener Filter (s. Seite 74, Abschnitt „Filtration und Konzentrierung“) mit dem Faktor 20 (Granulozyten) bzw. 22 (Keratinozyten) konzentriert. Wie bei der Analyse der Zelllysate konnte Elafin in jeder Probe als 16 kDa großes Protein nachgewiesen werden.

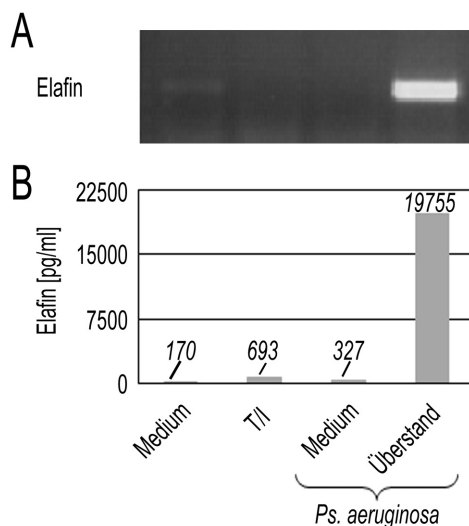
Zum Nachweis von Elafin im Zellkulturüberstand wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem Kultivierungsmedium bzw. dem Überstand von *Ps. aeruginosa* stimuliert. Anschließend wurde das im Zellkulturüberstand befindliche Elafin mittels IP präzipitiert und im Western-Blot analysiert. Als Positivkontrolle wurden konzentrierte Zellkulturüberstände von Granulozyten und Keratinozyten verwendet. Wie in Abb. 4.33 (rechte Seite: Zellkulturüberstand) zu sehen, wiesen alle Proben eine deutlich sichtbare Elafinbande bei ca. 16 kDa auf. Die Herkunft einer schwach ausgeprägten zweiten Bande knapp unterhalb von 16 kDa in der Probe der mit dem Pseudomonaden-

### 4.3 Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa*

Medium stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen bleibt allerdings ungeklärt. Beim Vergleich der Banden im Western-Blot erschien eine stärkere Elafinfreisetzung von mit dem Überstand *vs.* dem Kultivierungsmedium von *Ps. aeruginosa* stimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wahrscheinlich.

Die molekularen Massen von Pre-Elafin/Trappin-2 und Elafin liegen mit 9,9 kDa und 6 kDa deutlich unter dem gemessenen Wert von 16 kDa. Diese Diskrepanz kann wie in vorhergehenden Publikationen durch eine mögliche kovalente Bindung von Pre-Elafin/Trappin-2 bzw. Elafin an andere Proteine erklärt werden<sup>[358,359]</sup>. Allerdings ist eine Identifizierung der detektierten Bande als Pre-Elafin/Trappin-2 oder prozessiertes Elafin somit nicht möglich. Damit bleibt unklar, in welcher Form Elafin in  $\gamma\delta$  T-Zellen vorliegt bzw. ggf. freigesetzt wird.

Zur Bestätigung der erhöhten Elafinfreisetzung nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa* wurden Produktion und Freisetzung von Elafin mittels RT-PCR und ELISA untersucht. Dazu wurde eine  $\gamma\delta$  T-Zelllinie aus der Synovialflüssigkeit nicht oder mit T/I, dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* stimuliert. Anschließend wurde die Expression von Elafin mit Hilfe einer RT-PCR untersucht. Wie in Abb. 4.34 (A) zu sehen, konnte eine erhöhte Elafin-Expression durch *Ps. aeruginosa* induziert werden.



**Abb. 4.34: RT-PCR & ELISA: Freisetzung von Elafin durch stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen**

$\gamma\delta$  T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit wurden ohne zusätzliche Substanzen (Medium), mit T/I oder dem Kultivierungsmedium oder dem Überstand von *Ps. aeruginosa* stimuliert. (A) Anschließend wurde die Expression von Elafin-mRNA mittels RT-PCR untersucht. (B) Die Konzentration von Elafin im Zellkulturüberstand wurde in der AG Wiedow (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) mittels ELISA bestimmt. Die kursiv gedruckten Zahlen bezeichnen den jeweiligen Wert der Konzentration in pg/ml.

In Übereinstimmung mit den RT-PCR-Daten konnte im Zellkulturüberstand eine starke Freisetzung von Elafin nach Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zelllinie mit dem Überstand von *Ps. aeruginosa* nachgewiesen werden (s. Abb. 4.34 (B)).

Zusammen genommen konnte eine konstitutive und darüber hinaus stimulierbare Expression von (Pre-)Elafin durch  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden. Damit stellte die Produktion von Granzym B und (Pre-)Elafin eine mögliche Erklärung für die im Agardiffusions-*Screening-Assay* festgestellte antimikrobielle Wirkung von stimulierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten dar.

### 4.3.3 Fazit

Vδ1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten überwachen periphere Gewebe des menschlichen Körpers. Neben vielen anderen Pathogenen werden sie dadurch auch mit dem nosokomialen („Krankenhaus-“) Keim *Ps. aeruginosa*<sup>[404]</sup> konfrontiert. Eine bereits beschriebene Stimulationswirkung von *Ps. aeruginosa* auf die Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[381]</sup> ließ auch eine Wirkung auf die Freisetzung immunologischer Mediatoren vermuten.

Im vorliegenden Kapitel wurde dementsprechend die Expression von Zytokinen und ausgewählten AMPs durch mit *Ps. aeruginosa* stimulierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten untersucht. Dabei konnte eine induzierbare Expression von IFN- $\gamma$  und CCL20/MIP3- $\alpha$  festgestellt werden. Weiterhin gelang der Nachweis einer stimulierbaren antimikrobiellen Aktivität von  $\gamma\delta$  T-Zellen. In weiteren Untersuchungen konnte die bereits beschriebene Expression von Granulysin und Granzym B durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bestätigt, eine Expression von HBD-1, Angiogenin und Elafin zusätzlich gezeigt werden. Im Zuge dessen gelang für  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit der Nachweis einer durch *Ps. aeruginosa* induzierbaren Produktion/Freisetzung von HBD-1, Granzym B und Elafin.

# 5 Diskussion

Für die wirkungsvolle Überwachung des Organismus durch das Immunsystem ist es von entscheidender Bedeutung, welche Immunzelle *wo* im Körper *was* als körperfremd registriert und *wie* sie darauf reagiert. In der vorliegenden Arbeit wurden humane  $\gamma\delta$  T-Zellen in Teilaspekten dieser Eigenschaften näher charakterisiert.

- In Bezug auf die Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im Organismus wurde eine vergleichende Analyse der Chemokinrezeptorexpression durch verschiedene  $\gamma\delta$  T-Zellsubtypen aus unterschiedlichen Geweben durchgeführt.
- In Bezug auf die Erkennung von körperfremden Molekülen wurde die Expression und Funktion des PRR NOD2 durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in An- und Abwesenheit weiterer PBMZ charakterisiert.
- In Bezug auf die Reaktion gegenüber Pathogenen wurde die stimulierbare Expression und Freisetzung ausgewählter Zytokine und AMPs untersucht.

Insgesamt sollten die erhaltenen Erkenntnisse dazu beitragen, humane  $\gamma\delta$  T-Zellen als Komponenten der frühen Immunantwort näher zu charakterisieren.

## 5.1 Expression von Chemokinrezeptoren auf $\gamma\delta$ T-Lymphozyten

Die Präsenz von Immunzellen in epithelialen Geweben ist entscheidend für die Immunüberwachung eines Organismus. Die Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wird maßgeblich durch die Interaktion von Chemokinrezeptoren und ihren Liganden gesteuert<sup>[405]</sup>. Darüber hinaus wurde die Expression einiger Chemokinrezeptoren mit bestimmten Zelleigenschaften korreliert. So kann z.B. eine stärkere CCR4-Expression auf T<sub>memory</sub>- vs. naiven T-Zellen und auf T<sub>h</sub>2 vs. T<sub>h</sub>1 Zellen festgestellt werden (s. Seite 25, Abschnitt „CCR4“). In der vorliegenden Arbeit wurde die differentielle Expression von Chemokinrezeptoren durch  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen analysiert. Die Ergebnisse sollten Hinweise darauf geben, ob  $\gamma\delta$  T-Zellen ausgewählte Chemokinrezeptoren zur Etablierung ihrer Lokalisation in bestimmten Geweben nutzen. Weiterhin konnte möglicherweise von der Expression bestimmter Chemokinrezeptoren auf damit einhergehende Eigenschaften der Zelle geschlossen werden.

### 5.1.1 Chemokinrezeptorexpression auf frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus dem Blut

#### Reproduktion und Diskussion bestehender Erkenntnisse

Frisch isolierte V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut sind hinsichtlich ihrer Chemokinrezeptorexpression mehrfach in vorhergehenden Studien charakterisiert worden. So wiesen Roth *et al.* die Migration von magnetisch separierten  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit den Liganden für CCR1, -2, -3 und -5, jedoch nicht nach Stimulation mit den Liganden für CXCR1, -2 und -3 nach<sup>[367]</sup>. Brandes *et al.* und Moser & Eberl erweiterten die Analysen auf CCR4, -6, -7, CXCR4 und -5<sup>[70,108]</sup>, Laggner *et al.* auf CCR10<sup>[178]</sup>. Darüber hinaus stellten auch Poggi *et al.*<sup>[199]</sup>, Dieli *et al.*<sup>[99]</sup>, Glatzel *et al.*<sup>[174]</sup> und Kabelitz & Wesch<sup>[175]</sup> Untersuchungen zur Expression von Chemokinrezeptoren durch  $\gamma\delta$  T-Zellen an.

Für die Mehrheit der Chemokinrezeptoren (CCR1, -5, -6, CXCR1 und -4) wurde in der vorliegenden Arbeit eine geringere Expressionsstärke als in vorhergehenden Publikationen ermittelt. Dort beschriebene, spezifische Unterschiede in den Expressionsstärken konnten allerdings durch eigene Ergebnisse reproduziert werden. So wurde z.B. die Expression von CCR5 durch V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Glatzel *et al.* als „stark“, in der vorliegenden Arbeit nur als „schwach“ charakterisiert. Allerdings konnte in beiden Arbeiten eine stärkere CCR5-Expression auf V $\delta$ 2 *vs.* V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden. Eine vergleichende Zusammenstellung von eigenen (s. Abb. 4.1) sowie Ergebnissen aus vorhergehenden Studien ist in Tab. 5.1 aufgeführt.

In vorhergehenden Publikationen sind **CCR2**, **CCR3**, **CCR7**, **CCR10** (letzterer nur von Laggner *et al.*<sup>[178]</sup>) und **CXCR5** charakterisiert worden. Obwohl die Expression dieser Chemokinrezeptoren in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht worden ist, sollen die Analysen der Vollständigkeit halber kurz erwähnt werden. Bezüglich der Expressionsstärken von CCR2, CCR3 und CXCR5 stimmen die vorhergehenden Publikationen überein, nicht jedoch in Bezug auf den für die Migration zu Lymphknoten entscheidenden Chemokinrezeptor CCR7. Dabei ist zu beachten, dass die Expressionsstärke von CCR7 durch den Aktivierungszustand der Zellen bestimmt wird<sup>[70,108]</sup>. Möglicherweise ist also die CCR7-Expression in den verschiedenen Studien bei unterschiedlich aktivierten Zellen gemessen worden. Ein Hinweis darauf ist die Messung der stärksten CCR7-Expression auf positiv isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[99]</sup>. Im Zuge der dabei eingesetzten magnetischen Separation kommt es zur Bindung von Antikörpern an den TZR, und aufgrund der Anlagerung der mit den Antikörpern gekoppelten MicroBeads<sup>TM</sup> an das Metallgewebe der Separationssäule auch zu einer Kreuzvernetzung der TZRs. Die daraus resultierende Aktivierung könnte die Expression von CCR7 verstärkt haben.



Tabelle 5.1: In vorhergehenden Publikationen und der vorliegenden Arbeit ermittelte Expression von Chemokinrezeptoren durch frisch isolierte, humane  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut

Kriterium	Prozentsatz						MFI						
	Fkt.	Brandes, Moser 2003, 2007 [70,108]		Poggi 2004 [199]		Laggner 2011 [178]		Dieli 2003 [99]		Glatzel, Kabelitz 2002, 2003 [174,175]		Marischen 2012 s. Abb. 4.1	
Subp.	V $\delta$ 2 MACS	V $\delta$ 2 ruhend	IPP	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 2 TZR
Erstautor Jahr Referenz	Roth 1998 [367]	Brandes, Moser 2003, 2007 [70,108]		Poggi 2004 [199]		Laggner 2011 [178]		Dieli 2003 [99]		Glatzel, Kabelitz 2002, 2003 [174,175]		Marischen 2012 s. Abb. 4.1	
Zustand	V $\delta$ 2 MACS	V $\delta$ 2 ruhend	IPP	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 1 ruhend	V $\delta$ 2 ruhend	V $\delta$ 2 TZR
CCR1	vh.	mittel	$\Leftrightarrow$					schwach	$\Leftrightarrow$	n.vh.		n.vh.	
CCR2	vh.	mittel	$\Downarrow$					mittel				schwach	$\Leftrightarrow$
CCR3	vh.							schwach				schwach	
CCR4	vh.	schwach	$\Uparrow$		n.vh.		mittel	stark	$\Downarrow$	mittel	$\Uparrow$	schwach	$\Leftrightarrow$
CCR5	vh.	stark	$\Downarrow$		stark		stark	stark		n.vh.		schwach	
CCR6		mittel	$\Leftrightarrow$					stark		schwach		schwach	
CCR7		mittel	$\Uparrow$					stark		n.vh.	$\Uparrow$	n.vh.	$\Leftrightarrow$
CCR9													
CCR10					schwach					n.vh.		n.vh.	
CXCR1	n.vh.						stark	mittel		mittel		schwach	
CXCR2	n.vh.							schwach		n.vh.		n.vh.	
CXCR3	n.vh.	stark	$\Leftrightarrow$	stark	stark		stark	stark	$\Downarrow$	stark		stark	
CXCR4		stark	$\Leftrightarrow$	stark	mittel			stark		schwach		schwach	
CXCR5		n.vh.	$\Leftrightarrow$										
CXCR6			$\Leftrightarrow$					schwach		n.vh.		n.vh.	

In der Zeile „Kriterium“ wird angegeben, ob die Stärke der Chemokinrezeptorexpression aufgrund entsprechender Funktionalität (Fkt.) oder FACS-Analysen bewertet wurde. Bei letzteren wird unterschieden, ob der Prozentsatz der den Chemokinrezeptor exprimierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen oder die in der FACS-Analyse erhaltene MFI für den Chemokinrezeptor zur Bewertung genutzt wurde. Benannt werden Erstautor, Erscheinungsjahr und Referenz der zitierten Publikation, desweiteren die untersuchte  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulation (Subp.). Bezüglich des Zustands der Zellen wird zwischen per magnetischer Separation isolierten (MACS), aus frisch isolierten PBMC mittels FACS-Analyse diskriminierten (ruhend) und *via* IPP oder TZR-Kreuzvernetzung (TZR) stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen unterschieden. Die Einteilung der Expressionsstärken erfolgt in „vorhanden“ (vh.), „nicht vorhanden“ (n.vh.), „schwach“, „mittel“ und „stark“, die der Modulation in „keine Regulation“ ( $\Leftrightarrow$ ), „Zunahme“ ( $\Uparrow$ ) sowie „Abnahme“ ( $\Downarrow$ ) entsprechend des Abschnitts „Bewertung der Expressionsstärken von Chemokinrezeptoren“ auf Seite 68.

In der vorliegenden Arbeit konnte in Übereinstimmung mit den Ergebnissen vorheriger Studien eine äußerst schwache bzw. nicht vorhandene Expression von **CXCR2**, dafür aber eine starke Expression von **CXCR3** ermittelt werden. Roth *et al.* konnten zwar keine CXCR3-Expression feststellen, wiesen in ihrer Arbeit aber ausdrücklich auf fehlende Experimente bezüglich einer eventuellen Migration von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit dem CXCR3-Liganden CXCL9/MIG hin.

Weiterhin konnten Roth *et al.* eine Expression von **CXCR1** aufgrund einer fehlender Migration von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit CXCL8/IL-8 nicht nachweisen<sup>[367]</sup>. In Übereinstimmung mit Daten der vorliegenden Arbeit zeigten dagegen Glatzel *et al.* und Kabelitz & Wesch eine CXCR1-Expression, die bei V $\delta$ 1 vs. V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen verstärkt auftrat.

Die Expression von **CCR5** durch V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde übereinstimmend als stark beschrieben<sup>[70,108,174,175]</sup>. Glatzel *et al.* und Kabelitz & Wesch konnten darüber hinaus zeigen, dass CCR5 durch V $\delta$ 2 vs. V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen wesentlich stärker exprimiert wird. Letzteres Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls bestätigt werden.

Sowohl die Expression von **CCR6** als auch von **CXCR4** wurde in verschiedenen Publikationen als unterschiedlich stark charakterisiert. Ursache hierfür ist vermutlich die Verwendung von verschiedenen Antikörpern:

	Publikation	Klon	Konjugat	Firma	Bestnr.
$\alpha$ CCR6	Brandes <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>	11A9	– (vermutlich)	BD Pharmingen	559561
	Laggner <i>et al.</i> <sup>[178]</sup>	11A9	PE	BD Pharmingen	559562
	Dieli <i>et al.</i> <sup>[99]</sup>	53103	–	R&D Systems	MAB195
	Glatzel <i>et al.</i> <sup>[174]</sup>	53103	PE	R&D Systems	FAB195P
	(vorliegende Arbeit)	11A9	PE	BD Pharmingen	559562)
$\alpha$ CXCR4	Brandes <i>et al.</i> <sup>[70]</sup>	12G5	– (vermutlich)	BD Pharmingen	555972
	Poggi <i>et al.</i> <sup>[199]</sup>	12G5	PE	BD Pharmingen	555974
	Glatzel <i>et al.</i> <sup>[174]</sup>	44708	–	R&D Systems	MAB171
	(vorliegende Arbeit)	12G5	PE	BD Pharmingen	555974)

Um die Expressionsstärke von CCR6 und CXCR4 abschließend zu ermitteln, sollte künftig in parallel durchgeführten Messungen jeder der vorhandenen Antikörper bei einem einheitlichen Satz an  $\gamma\delta$  T-Zellen zum Einsatz kommen. Das Ergebnis könnte dann vor dem Hintergrund bestehender Erkenntnisse über die Rollen von CCR6 und CXCR4 diskutiert werden.

Über die Reproduktion bisheriger Messungen hinaus wurden neue Ergebnisse bezüglich der Expression von CCR4, -9 und CXCR6 durch frisch aus dem peripheren Blut isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten ermittelt.

## Weiterführende Erkenntnisse über die Expression ausgewählter Chemokinrezeptoren

### CCR4

Die Expression von CCR4 durch V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde von Laggner *et al.* als nicht vorhanden<sup>[178]</sup>, von Brandes *et al.* mit einer MFI von  $\approx 13$  als schwach identifiziert<sup>[70]</sup>. Letztere Messung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (s. Abb. 4.1). Für die Expression von CCR4 durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wurde in der vorliegenden Arbeit mit einer durchschnittlichen MFI von  $\approx 25$  ein deutlich höherer Wert ermittelt. Damit wurde CCR4 neben CXCR1<sup>[174]</sup> als weiterer Chemokinrezeptor identifiziert, der ebenfalls bevorzugt auf V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten exprimiert wird.

Aufgrund der Korrelation von CCR4-Expression und dem T<sub>h</sub>2-Typ (s. Seite 25, Abschnitt „CCR4“) kann die Ausprägung eines ebensolchen T<sub>h</sub>2-Typs durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten vermutet werden. Weitere Untersuchungen der Expression von für den T<sub>h</sub>-Subtyp entscheidenden Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und -5 sind für eine nähere Charakterisierung allerdings notwendig.

Über die T<sub>h</sub>2-Polarisation hinaus werden CCR4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls als Gedächtniszellen charakterisiert, die eine Lokalisation im oder ein Migrationsverhalten zum Hautgewebe aufweisen und die Möglichkeit zur Zell-Zell-Interaktion mit B-Zellen oder DCs besitzen. Diese Eigenschaften fügen sich stimmig in die Charakterisierung von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen ein, die in peripheren Geweben bei einer Infektion nicht nur schnell, sondern auch im Verbund mit anderen Komponenten des Immunsystems reagieren sollen.

### CCR9

Die charakteristische Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Darmgewebe<sup>[69,406]</sup> und die nahezu exklusive Produktion des CCR9-Liganden CCL25/TECK durch das Epithelgewebe im Dünndarm<sup>[183]</sup> führten folgerichtig zur Analyse der CCR9-Expression auch auf  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem Blut. Wie der CCR6-Ligand CCL20/MIP-3 $\alpha$ , so wird auch der CCR9-Ligand CCL25/TECK nicht durch Blutgefäßzellen exprimiert (s. Abschnitt „CCR9“, Seite 27). Erwartungsgemäß konnte eine Expression von CCR9 durch aus dem peripheren Blut stammenden  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 4.1).

In Vorexperimenten allerdings verstärkten V $\delta$ 1, nicht jedoch V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zelllinien die Expression von CCR9 bereits durch die geringfügige Aktivierung, die beim Umsetzen der Zellen von einer Zellkulturflasche auf eine Zellkulturplatte entsteht (nicht gezeigt). Dies kann als ein erster Hinweis auf eine bei Bedarf mögliche Migration von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut in den Dünndarm gewertet werden. Dieses Verhalten entspräche der Charakterisierung von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als vorrangig im mukosalen Gewebe lokalisierte Immunzellen (s. Abschnitt „Lokalisation“ auf Seite 19).

## CXCR6

Die Expression von CXCR6 auf frisch isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut war bisher nicht beschrieben worden. Wie CXCR3 stellt CXCR6 einen inflammatorischen Rezeptor dar, der eine Rolle bei der interzellulären Kommunikation zwischen verschiedenen T-Zellsubtypen und zwischen  $T_H1$ -Zellen und DCs bzw. Makrophagen spielt. Kim *et al.* konnten nur wenige CXCR6<sup>+</sup> T-Zellen im Blut und Lymphknoten nachweisen<sup>[216]</sup>, dementsprechend war die in der vorliegenden Arbeit ermittelte geringe CXCR6-Expression durch zirkulierende  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erwartet worden (s. Abb. 4.1). Dabei zeigten sich keine Unterschiede in der Expression durch V $\delta$ 1 vs. V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen. Somit spielt der inflammatorische Chemokinrezeptor CXCR6 nach bisherigen Erkenntnissen bei der Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut vermutlich keine Rolle.

Die bisher diskutierten Ergebnisse stammen aus Untersuchungen von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und konnten deutliche Unterschiede in der Expression von Chemokinrezeptoren zwischen mukosalen bzw. epithelialen V $\delta$ 1 und im peripheren Blut zirkulierenden V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen aufzeigen. Damit wurde die Hypothese der Chemokin/Chemokinrezeptor-gesteuerten Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten<sup>[405]</sup> in einem ersten Schritt gestützt.

### 5.1.2 Chemokinrezeptorexpression auf $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus Dünndarm und anderen Geweben

#### Expressionsstärken ausgewählter Chemokinrezeptoren im Vergleich

Die Analysen der Chemokinrezeptorexpression wurden auf die bislang wenig untersuchten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm ausgedehnt, die sowohl entsprechend eigener (s. z.B. Abb. 4.2) als auch von Spencer *et al.* erbrachten Ergebnisse bevorzugt den V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  TZR exprimieren<sup>[407]</sup>. Desweiteren wurde die Chemokinrezeptorexpression auf V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus der Synovialflüssigkeit untersucht. In der Tabelle 5.2 wurden die in den Abbildungen 4.2, 4.3, 4.4, 4.5 und 4.6 ermittelten MFI-Werte für die Expressionsstärken der Chemokinrezeptoren einander gegenübergestellt.

**Tabelle 5.2: Chemokinrezeptorexpression auf V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben**

	CCR4		CCR6		CCR9		CXCR3		CXCR6	
	fri. isol.	Linie	fri. isol.	Linie	fri. isol.	Linie	fri. isol.	Linie	fri. isol.	Linie
Blut	25,3	19,3	7,0	19,0	4,7	5,7	35,4	174,6	4,0	5,5
Darm	21,6	15,7	55,3	101,2	16,7	12,3	k.D.	214,6	k.D.	3,4
Synovialfl.	k.D.	19,5	k.D.	3,3	k.D.	10,3	k.D.	183,4	k.D.	2,8

Angegeben werden die MFI-Werte der genannten Chemokinrezeptoren auf frisch isolierten (fri. isol.) V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten und V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien (Linie) aus Blut, Darm und Synovialflüssigkeit (Synovialfl.). k.D. = keine Daten. Auf grau unterlegte Daten wird im Text genauer eingegangen.

Unabhängig von der Herkunft der V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten oder ihrem Aktivierungszustand als frisch isolierte bzw. langzeitkultivierte Zellen wies CCR4 in allen Fällen eine mittlere, CXCR3 eine hohe bis sehr hohe und CXCR6 eine niedrige Expressionsstärke auf. Allerdings variierten die Expressionsstärken von CCR6 und CCR9 abhängig von der Herkunft der untersuchten Zellen. Werden frisch isolierte und langzeitkultivierte V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen zusammen betrachtet, so ergeben sich folgende Tendenzen: Während beide Chemokinrezeptoren durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem Darm deutlich exprimiert werden, kann CCR6 bevorzugt auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut, CCR9 dagegen auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit nachgewiesen werden. Die Kombination der Expressionsstärken von CCR6 und -9 *kann* – vorbehaltlich weiterer Untersuchungen – also bereits einen Hinweis auf das Migrationsziel einer V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelle geben. Damit ergibt sich ein weiterer Hinweis auf die Nutzung einer differentiellen Chemokinrezeptorexpression durch  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Migration zu und Etablierung einer Zellpopulation in bestimmten Geweben.

### **Bedeutung einzelner Chemokinrezeptoren für $\gamma\delta$ T-Zellen aus verschiedenen Geweben**

#### **CCR4**

Die Expression des Chemokinrezeptors CCR4 war bereits in Kapitel 5.1.1 als ein selektives Merkmal von V $\delta$ 1 gegenüber V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut identifiziert worden. Die erhöhte CCR4-Expression auf V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen blieb auf den etablierten Zelllinien aus dem Blut erhalten. V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem Darm und der Synovialflüssigkeit wiesen ungefähr die gleiche Expressionsstärke von CCR4 wie die frisch aus dem peripheren Blut isolierten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen auf. Dabei war es gleichgültig, ob es sich ebenfalls um frisch isolierte oder als Linien kultivierte Zellen handelte (s. Abb. 4.2).

Während  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Haut unerwarteterweise keine CCR4-Expression zeigten<sup>[65]</sup>, exprimierten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in den hier untersuchten Geweben CCR4 unabhängig von ihrer Isolierung aus Blut, Darm oder Synovialflüssigkeit. Auch der unterschiedliche Aktivierungsstatus von frisch isolierten Zellen oder Zelllinien führte nicht zu einer geänderten CCR4-Expression. Daraus ergibt sich der Hinweis, dass CCR4 von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht für die Lokalisation genutzt wird, sondern vielmehr eine Eigenschaft oder auch eine Funktion von V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten repräsentiert. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob die Expression von CCR4 durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen auf eine stetige Konfrontation mit Mikroorganismen in den Epithelgeweben und der daraufhin erfolgten Reifung der Zellen zurückzuführen ist. Als weitere mögliche Ursache für die konstitutive Expression von CCR4 sollte die Fähigkeit zur interzellulären Kommunikation von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit DCs und/oder B-Zellen überprüft werden.

## CCR6

Der einzige bekannte CCR6-Ligand CCL20/MIP-3 $\alpha$  wird in Darm, Haut und weiteren Organen (s. Abschnitt „CCR6“, Seite 26), nicht jedoch im Blut oder in der Synovialflüssigkeit produziert. Weil die Etablierung einer ständig vorhandenen  $\gamma\delta$  T-Zellpopulation im Darmepithel („Homöostase“) bekannt ist, war die CCR6-Expression durch aus Darmgewebe, nicht jedoch durch aus Blut frisch isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erwartet worden. Tatsächlich wiesen aus dem Darm stammende V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten mit einer MFI von  $\approx 55$  eine starke Expression auf, während aus dem Blut frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen nahezu kein CCR6 exprimierten. Die Expression von CCR6 entsprach somit seiner Charakterisierung als homöostatischem Chemokinrezeptor (s. Abb. 4.3).

Wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm durch ständige Restimulation in Zelllinien expandiert, so verdoppelte sich die MFI der CCR6-Expression. Kritisch anzumerken ist das Zustandekommen des hohen MFI-Durchschnittswertes auf  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aufgrund genau eines außergewöhnlich hohen Messwerts bei nur drei Messungen. Allerdings konnte auch bei (V $\delta$ 1)  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus dem Blut eine deutliche Verstärkung der CCR6-Expression infolge fortwährender Restimulation bei der Etablierung einer Zelllinie beobachtet werden. Zusammengenommen weisen die Ergebnisse auf eine stimulierbare Expression von CCR6 hin. Somit wird CCR6 von  $\gamma\delta$  T-Zellen wahrscheinlich sowohl als homöostatischer (siehe oben) als auch inflammatorischer Chemokinrezeptor genutzt. Diese Verwendung entspricht dem CCR6 zugeschriebenen dualen Charakter für Chemokinrezeptoren (s. Tab. 1.2).

Bei Zelllinien aus dem Blut konnte beobachtet werden, dass CCR6 (wie CCR4 auch) auf V $\delta$ 1 (MFI  $\approx 19$ ) *vs.* V $\delta$ 2 (MFI  $\approx 13$ )  $\gamma\delta$  T-Zellen stärker exprimiert wurde. Von Laggner *et al.* publizierte Daten deuten allerdings darauf hin, dass aktivierte und CCR6<sup>+</sup> V $\delta$ 2, nicht jedoch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut in entzündete Haut einwandern. Zur näheren Charakterisierung ihrer Rolle in der Immunantwort sollten künftige Untersuchungen daher die (stimulierbare) CCR6-Expression und die Lokalisation der V $\delta$ 1 und V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Haut- und Darmerkrankungen genauer untersuchen bzw. in Beziehung setzen.

Für die Lokalisierung in der Synovialflüssigkeit ist CCR6 nach bisherigem Kenntnisstand weder in Homöostase noch im Entzündungsgeschehen erforderlich, so dass von dort isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen erwartungsgemäß kein CCR6 exprimierten.

## CCR9

Wie in Abschnitt „CCR9“ auf Seite 27 beschrieben, korreliert die Produktion des CCR9-Liganden CCL25/TECK im Darm und mukosalem Gewebe mit der Lokalisation von CCR9<sup>+</sup> Immunzellen. Dementsprechend war die hier gezeigte stärkere CCR9-Expression von aus Darm (MFI  $> 10$ ) gegenüber aus Blut (MFI  $< 10$ ) isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen erwartet worden (s. Abb.

4.4). Aus Darmbiopsien frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten eine stärkere Expression von CCR9 (MFI  $\approx 17$ ) als hieraus expandierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinien (MFI  $\approx 12$ ). Dies kann als Ausdruck für eine Änderung von einer lokal präsenten, ruhenden, in die Immunüberwachung eingebundenen Immunzelle zu einer aktiv in die Immunantwort involvierten  $\gamma\delta$  T-Zelle gewertet werden. Im Fall einer Überwachung ist die Lokalisation (CCR9-Expression relativ hoch), im Fall einer Immunantwort z.B. die Freisetzung immunologischer Mediatoren und weniger die Lokalisation (CCR9-Expression verringert sich) entscheidend. Somit entspricht das Expressionsmuster von CCR9 auf aus dem Darmgewebe isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten dem typischen Charakter eines homöostatischen Chemokinrezeptors.

### CXCR3

CXCR3 war bereits auf T-Zellen nachgewiesen worden, die bei chronisch entzündlicher Darmkrankheit in die Schleimhaut des Gastrointestinaltrakts<sup>[205]</sup> bzw. bei rheumatoider Arthritis in das synoviale Gewebe einwandern<sup>[206]</sup>. Eine somit zu erwartende, hohe Expression von CXCR3 durch aus dem Darm und der Synovialflüssigkeit generierten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien konnte hier bestätigt werden (MFI  $> 175$ , s. Abb. 4.5).

Im Rahmen der FACS-Analyse von frisch aus dem Blut isolierten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zeigte CXCR3 in Übereinstimmung mit in Tab. 3.2.1 genannten Publikationen die stärkste Expression aller Chemokinrezeptoren (MFI  $\approx 35$ ). Expandierte  $\gamma\delta$  T-Zelllinien wiesen eine noch stärkere Expression auf (MFI  $> 100$ ). Interessanterweise war die CXCR3-Expression auf V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zelllinien deutlich verstärkt (MFI<sub>V $\delta$ 1</sub>  $\approx 175 \gg$  MFI<sub>V $\delta$ 2</sub>  $\approx 100$ ). Weil die Ausbildung des T<sub>h</sub>1-Typs mit der Expression von CXCR3 korreliert (s. Abschnitt „CXCR3“, Seite 27), kann die stärkere, stimulationsabhängige CXCR3-Expression auf V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zelllinien als ein Hinweis für eine T<sub>h</sub>1-Polarisation von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gewertet werden.

Festzuhalten bleibt die bereits im Ruhezustand der  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten vergleichsweise starke CXCR3-Expression, die sich bei Aktivierung der Zellen entsprechend des inflammatorischen Charakters von CXCR3 noch einmal deutlich erhöht (Blut) bzw. sich konstant auf einem sehr hohen Niveau bewegt (Darm und Synovialflüssigkeit).

### CXCR6

Die Präsenz von CXCR6 wurde auf allen getesteten  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als sehr schwach ermittelt. Trotz seines inflammatorischen Charakters wurde CXCR6 auch nicht von aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut, Darm oder Synovialflüssigkeit exprimiert (s. Abb. 4.6). Dies bestärkt die bereits in Kapitel 5.1.1 angedeutete Vermutung, dass CXCR6 für die Lokalisation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als nicht entscheidend angesehen werden kann.

### 5.1.3 Fazit

Humane  $\gamma\delta$  T-Zellen können entsprechend ihrer exprimierten TZR-V $\gamma$ - und TZR-V $\delta$ -Polypeptidketten in mehrere Subpopulationen eingeteilt werden. Dabei unterscheiden sich die zwei am häufigsten vorkommenden Subpopulationen V $\delta$ 1 und V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften und Aufgaben, am offensichtlichsten jedoch in ihrer charakteristischen Lokalisation. Die Ursache war in einer differentiellen Expression von Chemokinrezeptoren durch  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen zu vermuten. Tatsächlich konnte bei der Untersuchung von V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut sowie von V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben eine differentielle Expression von Chemokinrezeptoren nachgewiesen werden.

Die Expression ausgewählter Chemokinrezeptoren kann mit bestimmten Eigenschaften der Zelle korreliert werden. So wurde z.B. die stärkere CCR5-Expression von V $\delta$ 2 gegenüber V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als Hinweis für eine T<sub>h</sub>1-Polarisation der im Blut zirkulierenden V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen interpretiert<sup>[174]</sup>. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse bieten dementsprechend ebenso Raum für im Folgenden diskutierte Auslegungen. So können V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen aufgrund ihres Expressionsmusters von Chemokinrezeptoren als T<sub>h</sub>2-Zellen mit Gedächtnisfunktion, der Möglichkeit zur interzellulären Kommunikation mit DCs oder B-Zellen und einer bevorzugten Lokalisation in den peripheren Geweben Haut, Lunge (aufgrund der Expression von CCR4) und Dünndarm (CCR6, CCR9) charakterisiert werden. Desweiteren verfügen V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zellen möglicherweise über eine erhöhte Suszeptibilität für das in Gewebszellen (u.a. von Haut und Synovialmembran) produzierte Chemokin CXCL8/IL-8 (CXCR1). Beim Vergleich von frisch isolierten zu langzeitkultivierten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte eine leicht verringerte CCR4-, dafür eine deutlich verstärkte CXCR3-Expression festgestellt werden. Die Expression von CCR4 ist mit dem T<sub>h</sub>2-, die von CXCR3 mit dem T<sub>h</sub>1-Subtyp korreliert. Daher kann vermutet werden, dass sich nach Aktivierung der V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Entwicklung von einer T<sub>h</sub>2-Polarisation (CCR4) zu einer T<sub>h</sub>1-Polarisation (CXCR3) vollzieht.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass aus unterschiedlichen Geweben stammende  $\gamma\delta$  T-Zellen wie erwartet differentielle Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren aufweisen. Diese werden offensichtlich zur Rekrutierung in bestimmte Gewebe genutzt, spiegeln wahrscheinlich aber auch spezifische funktionelle Eigenschaften der  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen wider.



## 5.2 TLRs und NOD2 in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten und anderen Immunzellen

Als Bindeglied zwischen angeborener und erworbener Immunität können  $\gamma\delta$  T-Zellen mikrobielle Erreger (PAMPs) und zellulären Stress (DAMPs) wahrnehmen. Dazu verfügen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten über mindestens zwei gut charakterisierte Mechanismen. So erkennt der (V $\delta$ 2)  $\gamma\delta$  TZR Pyrophosphate, die in erhöhtem Maße sowohl durch Tumorzellen als auch durch viele Bakterien produziert werden. Weiterhin wurde die Expression einer Gruppe von PRRs, den TLRs, durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten beschrieben<sup>[104–106]</sup>. Dies führte zur Untersuchung von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Hinblick auf eine mögliche Expression von NOD2, einem Vertreter der PRR-Familie der NLRs.

Neben der Präsenz des NOD2-Proteins wurde die funktionelle Relevanz auf der Ebene der Proliferation und der Zytokinfreisetzung durch  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP(-LD) nachgewiesen. Zu Vergleichszwecken wurde die Expression von TLR2 durch  $\gamma\delta$  T-Zellen bestätigt und deren Reaktion nach Stimulation mit TLR2-Liganden *vs.* MDP-LD untersucht. Desweiteren wurden neben  $\gamma\delta$  T-Zellen auch CD14<sup>+</sup> Monozyten und CD4<sup>+</sup> T-Zellen analysiert.

### 5.2.1 TLRs

Die Expression von funktionalem TLR2 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen war bereits in vorhergehenden Arbeiten publiziert worden<sup>[376,380,408]</sup>. So beschrieben Lancioni *et al.* neben einer verstärkten Proliferation auch eine verstärkte IFN- $\gamma$ -Expression von hochrein isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach TLR2-Stimulation<sup>[377]</sup>. Sowohl die Expression von TLR2 (s. Abb. 4.10 und 4.16), als auch die erhöhte Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit TLR2-Liganden (s. Abb. 4.19) konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Auch die Expression von funktionalen TLRs auf  $\gamma\delta$  T-Zellen war in vorhergehenden Arbeiten beschrieben worden<sup>[105,241]</sup>. So konnte z.B. eine erhöhte Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zelllinien nach Kostimulation mit TLR2-<sup>[409]</sup> und TLR3-Liganden<sup>[104]</sup> gezeigt werden. Desweiteren gelang der Nachweis einer Freisetzung von Zytokinen (u.a. CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$ ) durch frisch isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nach Stimulation mit TLR2- und TLR3-Liganden<sup>[106]</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von TLR2 auf  $\gamma\delta$  T-Zellen (s. Abb. 4.10 und 4.16), deren verstärkte Proliferation (s. Abb. 4.19) und erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  (s. Abb. 4.15) nach Kostimulation *via* TZR und TLR2 bestätigt (s. zur Übersicht Tab. 5.3).

Nachdem die Expression von funktionalem TLR2 überprüft worden war, konnte die Reaktion von CD4<sup>+</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zellen auf TLR-Liganden als Vergleich für die Reaktion auf NOD2-Liganden herangezogen werden.

## 5.2.2 NOD2

### CD14<sup>+</sup> Monozyten

Die Expression von NOD2 in CD14<sup>+</sup> Monozyten war bereits mehrfach beschrieben worden<sup>[278,410,411]</sup>. Ebenso wurde die Produktion diverser Zytokine von CD14<sup>+</sup> Monozyten nach MDP-Stimulation untersucht. So wiesen MDP-stimulierte Monozyten eine erhöhte Expression von TNF- $\alpha$ <sup>[410,411]</sup>, IL-10, CXCL8/IL-8 und IL-12p40<sup>[411]</sup> auf.

Der konstitutiv von Monozyten (und Makrophagen) exprimierte Oberflächenrezeptor CD14 stellt ebenfalls einen möglichen Bindungspartner für den NOD2-Liganden MDP dar. Seine Rolle bei der zellulären Reaktion auf NOD2-Liganden ist jedoch umstritten<sup>[412]</sup>. So weisen die Ergebnisse von Weidemann *et al.* auf eine spezifische Bindung von MDP an CD14 auf humanen Monozyten hin<sup>[413]</sup>. In einer anderen Studie zeigten humane Epithelzellen in Gegenwart des LPS-bindenden Proteins eine stärkere Aktivierung nach MDP-Stimulation, wenn lösliches CD14 präsent war<sup>[414]</sup>. Schließlich konnte in einer dritten Arbeit eine MDP-induzierte Freisetzung von IL-8 in CD14<sup>+</sup> Fibroblasten durch monoklonale  $\alpha$ CD14 inhibiert werden<sup>[415]</sup>.

Gegen einen Einfluss von CD14 auf die Reaktion von MDP-stimulierten Zellen sprachen u.a. Resultate von Wolfert *et al.* und Yang *et al.*, die keine Wirkung einer CD14-Blockierung auf die MDP- oder MDP/LPS-induzierte Zytokinfreisetzung durch Monozyten feststellen konnten<sup>[416,417]</sup>. In diesem Zusammenhang beobachteten Dziarski *et al.*, dass an Agarose gebundenes, nicht jedoch monomeres MDP von löslichem CD14 erkannt wird. Dieses Ergebnis lässt die Bindung von MDP an größere Moleküle zur Erkennung durch CD14 als notwendig erscheinen<sup>[418]</sup>. Zusammengenommen weisen die vorgestellten Studien auf eine mögliche Interaktion von MDP und CD14 hin. Die Variabilität in den Ergebnissen kann durch die Verwendung von verschiedenen MDP-Konzentrationen verursacht worden sein. Desweiteren ist eine Kontamination des MDP mit LPS, dessen Bindung an CD14 bekannt ist, nicht vollständig auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von NOD2 durch CD14<sup>+</sup> Monozyten mittels RT-PCR (s. Abb. 4.17) und durchflusszytometrischer Analyse bestätigt werden (s. Abb. 4.12). Zur Stimulation wurden die Monozyten initial *via* CD14-Kreuzvernetzung aktiviert. Damit war eine nachfolgende Bindung von MDP an CD14 unwahrscheinlich, und die MDP-induzierte Zytokin-Freisetzung sollte auf die Bindung von MDP an NOD2 zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine verstärkte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  durch Monozyten nach Stimulation mit MDP-LD *vs.* MDP-DD beschrieben werden (s. Abb. 4.20). Bei CCL3/MIP-1 $\alpha$  handelt es sich um ein Chemokin zur Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen, DCs, NK- und T-Zellen. In Bezug auf letztere trägt CCL3/MIP-1 $\alpha$  zur Differenzierung von T- zu T<sub>h</sub>1-Zellen, und damit zu einer von IFN- $\gamma$  beeinflussten Immunantwort bei.

### CD4<sup>+</sup> T-Zellen

In **murinen** CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde die Expression von NOD2 bereits mehrfach beschrieben<sup>[373,419,420]</sup>. Allerdings wird dessen eigentliche Funktion kontrovers diskutiert. Aufgrund ihrer Ergebnisse charakterisieren Shaw *et al.* NOD2 als ein T-Zell-intrinsisches Signalmolekül, dessen Mutation zu einer verringerten IFN- $\gamma$ - und IL-2-Produktion führt und damit NOD2-defiziente Mäuse anfällig für Infektionen mit *Toxoplasma gondii* werden lässt<sup>[419]</sup>. Dem widersprechen Caetano *et al.* in einer umfangreichen Arbeit. Ihren Ergebnissen zufolge ist eine intrinsische NOD2-Expression in CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten nicht notwendig für eine Entwicklung zellvermittelter Immunität des Organismus gegen *Toxoplasma gondii*. Zur Definition einer funktionellen Rolle von NOD2 in T-Zellen seien weitere Studien unverzichtbar<sup>[420]</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression von funktionalem NOD2 durch **humane** CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten beschrieben werden. Dazu erfolgte der Nachweis von NOD2-mRNA in hochrein isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (s. Abb. 4.17). CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  nach Stimulation mit MDP (s. Abb. 4.21). Weiterhin wiesen CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach MDP-Stimulation eine geringe aber signifikante, nach Stimulation mit TLR2-Liganden allerdings eine deutlichere Verstärkung der Proliferation auf (s. Abb. 4.19). Dies deutet auf eine erhöhte Suszeptibilität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen für TLR2- vs. NOD2-Liganden hin. Möglicherweise hat sich diese in der Koevolution des Immunsystems (bzw. der CD4<sup>+</sup> T-Zellen) mit bakteriellen Pathogenen ausgebildet, weil die Lokalisation von TLR2 an der Zelloberfläche gegenüber von NOD2 im Zytosol günstiger für die Wahrnehmung der jeweiligen Liganden ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass NOD2 von CD4<sup>+</sup> T-Zellen – wie von Monozyten und  $\gamma\delta$  T-Zellen auch – als ein Rezeptor für MDP genutzt werden kann. Damit würde NOD2 neben TLR2 (siehe oben) und TLR3<sup>[421,422]</sup> zur (Ko-)Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten durch PAMPs beitragen, und so ggf. die Intensität einer Immunreaktion nahe des Infektionsortes erhöhen.

### $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Expression von NOD2-mRNA in humanen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten wurde in vorhergehenden Arbeiten sowohl mittels *Microarray* als auch durch quantitative RT-PCR (qRT-PCR) nachgewiesen<sup>[287,288]</sup>. Zur Untersuchung der Funktionalität von NOD2 wurden 2 bis 3 Wochen mit IL-2 und IPP kultivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen für 24 h mit oder ohne MDP stimuliert. In den Überständen konnte eine MDP-induzierte, moderat verstärkte Freisetzung des IL-2 $\alpha$ -Rezeptors und des löslichen L-Selektins ermittelt werden<sup>[287]</sup>. Sowohl die erhöhte Expression des löslichen IL-2 $\alpha$  Rezeptors als Hinweis auf eine verstärkte Proliferationsbereitschaft<sup>[423]</sup>, als auch die erhöhte Freisetzung von L-Selektin deuteten auf die Wahrnehmung von MDP als Ligand, und damit auf ein funktionales NOD2-Protein in  $\gamma\delta$  T-Zellen hin<sup>[424]</sup>.

Im Unterschied zu vorhergehenden Studien wurden in der vorliegenden Arbeit

- **frisch isolierte**  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten,
- MDP-LD und zur Kontrolle dessen inaktives Isomer **MDP-DD** zur Stimulation
- und die Expression der Zytokine **CCL3/MIP-1 $\alpha$**  und **IFN- $\gamma$**  als Kriterium für eine erfolgte MDP-Erkennung

verwendet. Dabei konnte sowohl die Expression der NOD2-mRNA (s. Abb. 4.17) als auch erstmalig des **NOD2-Proteins** in humanen  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Dazu wurde der in der vorliegenden Arbeit etablierte  $\alpha$ NOD2 L 104 (s. Abb. 4.11) für den Nachweis von NOD2 mittels FACS-Analyse genutzt (s. Abb. 4.12). Zusätzlich wurde NOD2 mittels immunomagnetischer Präzipitation in einer V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Zelllinie nachgewiesen (s. Abb. 4.18).

Weiterhin wurde die Funktionalität von NOD2 in  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht. Dazu wurden in PBMZ vergesellschaftete bzw. hochrein isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten über den TZR aktiviert und mit MDP oder – zu Vergleichszwecken – mit TLR2-Liganden stimuliert. In Tab. 5.3 werden die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse zu Proliferation und Freisetzung von Botenstoffen durch stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen und andere Leukozyten aufgeführt.

**Tabelle 5.3: Reaktionen von Leukozyten nach Stimulation mit PRR-Liganden**

Zellen	Zustand	Proliferation			Botenstoffe	
		TLR2		NOD2	TLR2	NOD2
		Pam <sub>2</sub> CSK4	Pam <sub>3</sub> CSK4	MDP	Pam <sub>3</sub> CSK4	MDP
$\gamma\delta$	in PBMZ	↓	↓	↓	↑	↑
	hochrein isoliert	↑	↔	↔	k.D.	↑
CD4	hochrein isoliert	↑	↑	↑	k.D.	↑
CD14	hochrein isoliert	k.D.	k.D.	k.D.	k.D.	↑

Angegeben werden die untersuchten Zellen ( $\gamma\delta$  =  $\gamma\delta$  T-Zellen, CD4 = CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD14 = CD14<sup>+</sup> Monozyten), die Art der Messung (Proliferation, Botenstoffe = Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  bzw. IFN- $\gamma$ ), der stimulierte PRR, die verwendeten Liganden und die Reaktion. Bei letzterer wird zwischen Verstärkung (↑), Abschwächung (↓) oder keiner Reaktion (↔) unterschieden. k.D. = keine Daten.

### Proliferation

In PBMZ vergesellschaftete  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten bei allen verwendeten PRR-Liganden eine Reduktion der Proliferation. Die stärkste Reduktion wurde dabei durch die Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP erreicht (s. Abb. 4.13).

Hochrein isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen wiesen demgegenüber in der Proliferation keine Veränderung nach Stimulation mit dem NOD2-Liganden MDP oder dem TLR2-Liganden Pam<sub>3</sub>CSK4, allerdings eine deutliche Steigerung nach Stimulation mit dem TLR2-Liganden Pam<sub>2</sub>CSK4 auf. Dabei

ist zu beachten, dass Pam<sub>3</sub>CSK4 durch ein Heterodimer aus TLR1 und -2, Pam<sub>2</sub>CSK4 durch ein Heterodimer aus TLR2 und -6 gebunden wird. Somit deutet die erhöhte Proliferation bei Pam<sub>2</sub>CSK4- vs. Pam<sub>3</sub>CSK4-Stimulation auf eine stärkere Expression von TLR6 vs. TLR1 hin. Im Vergleich zu hochrein isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiesen  $\gamma\delta$  T-Zellen eine insgesamt geringere Proliferation auf, die zudem nicht oder – bei Stimulation durch Pam<sub>2</sub>CSK4 – nur vergleichsweise wenig verstärkt wurde. Proliferation ist dementsprechend keine bevorzugte Reaktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen bei einer Konfrontation mit einem bakteriellen Pathogen (s. Abb. 4.19).

Wie beschrieben reduzierten MDP-stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen in PBMZ ihre Proliferation (s. Abb. 4.13), während hochrein isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen kein verändertes Expansionsverhalten aufwiesen (s. Abb. 4.19). Die Ursache für diese Variabilität kann dementsprechend auf die An- oder Abwesenheit anderer Zellen zurückgeführt werden. Wie in dieser und anderen Arbeiten gezeigt, reagieren vor allem CD14<sup>+</sup> Monozyten, aber auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit der Freisetzung verschiedener Zytokine auf eine MDP-Stimulation. In Kombination mit von anderen PBMZ sezernierten Botenstoffen (etwa IL-10 und/oder *transforming growth factor*  $\beta$  (TGF- $\beta$ )) führen diese Zytokine vermutlich zu einer reduzierten Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit MDP. Auch eine Beteiligung von Zell-Zell-Interaktionen kann nicht ausgeschlossen werden. Möglicherweise werden andere Lymphozyten der PBMZ – z.B. CD4<sup>+</sup> T-Zellen – bei einer auf Proliferation basierenden Immunantwort bevorzugt. Eine Reduktion der Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten in PAMP-stimulierten PBMZ deutet somit eine Kooperation verschiedener Lymphozytenpopulationen bei der Konzertierung einer Immunantwort an.

### Botenstoffe

In PBMZ vorliegende  $\gamma\delta$  T-Zellen wiesen nach MDP-Stimulation eine erhöhte Produktion von CCL3/MIP-1 $\alpha$  (s. Abb. 4.14) und IFN- $\gamma$  auf. Dabei war der Anteil an IFN- $\gamma$ -produzierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit MDP mit ca. 90 % in etwa so hoch wie nach Stimulation mit Pam<sub>3</sub>CSK4 (s. Abb. 4.15).

Hochrein isolierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten zeigten eine schwach aber signifikant (s. Abb. 4.20 und 4.21), und hochrein isolierte CD14<sup>+</sup> Monozyten eine vielfach verstärkte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  nach MDP-Stimulation. Dagegen war die Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch CD14<sup>+</sup> Monozyten unabhängig von einer Stimulation kaum messbar (s. Abb. 4.20). CD4<sup>+</sup> T-Zellen wiesen eine deutliche,  $\gamma\delta$  T-Zellen eine schwache, aber hochsignifikante Steigerung der IFN- $\gamma$ -Freisetzung nach MDP-Stimulation auf (s. Abb. 4.21). Die Daten deuten darauf hin, dass Monozyten bei einer Konfrontation mit einem Pathogen bevorzugt CCL3/MIP-1 $\alpha$ , und T-Lymphozyten bevorzugt IFN- $\gamma$  freisetzen.

Sowohl bei Betrachtung des Proliferationsverhaltens (siehe oben) als auch der Freisetzung von Botenstoffen kann eine Kooperation der PBMZ mit dem Ziel der bestmöglichen Immunantwort angenommen werden. Auch in Gegenwart von CD4<sup>+</sup> sind  $\gamma\delta$  T-Zellen in die Freisetzung

von IFN- $\gamma$  eingebunden. Daraus kann gefolgert werden, dass die Sezernierung von Botenstoffen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Konzertierung der Immunantwort spielt. Weiterhin zeigt der Vergleich mit dem Proliferationsverhalten, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen in PBMZ bei einem Pathogenkontakt zwar die Proliferation reduzieren, die Freisetzung von Botenstoffen aber verstärken. Dieses Verhalten steht im Einklang mit der Charakterisierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen als überwachende und ggf. alarmierende Immunzellen.

Voraussetzung für die Analyse der originären Reaktion auf MDP war die hochreine Isolierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen. Für mittels FACS Aria<sup>TM</sup> sortierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten konnte erstmals eine signifikant erhöhte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$  nach MDP-Kostimulation – und damit ein direkter Effekt von MDP auf  $\gamma\delta$  T-Zellen – nachgewiesen werden. Dementsprechend konnte von einer funktionellen Expression von NOD2 in  $\gamma\delta$  T-Zellen ausgegangen werden.

### 5.2.3 Fazit

Mit der Nutzung des TZR als PRR, den bereits beschriebenen Expressionen ausgewählter TLRs und dem hier erfolgten Nachweis von NOD2 als Vertreter der NLRs kann von wenigstens drei verschiedenen Gruppen von PRRs in  $\gamma\delta$  T-Zellen ausgegangen werden. Während der V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  TZR bakterielle Pyrophosphate erkennt, bindet TLR2 bakterielle Lipopeptide und NOD2 mit MDP ein Fragment des Peptidoglykans. Die Kombination der durch die Bindung der jeweiligen Liganden hervorgerufenen Reaktionen bildet möglicherweise die Grundlage für die Bekämpfung bakterieller Infektionen durch  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[425,426]</sup>. Die Expression von PRRs qualifiziert  $\gamma\delta$  T-Zellen als zelluläre Komponenten der frühen Immunantwort.

## 5.3 Expression von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa*

Nachdem in der vorliegenden Arbeit bisher Aspekte der Lokalisation und der Pathogenerkennung von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten untersucht worden waren, wurde der Beitrag von  $\gamma\delta$  T-Zellen zur eigentlichen Immunreaktion näher charakterisiert. Dazu sollten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als physiologisch im Epithelgewebe vorhandene Immunzellen mit einem ebenfalls dort vorkommenden Pathogen stimuliert werden.

*Ps. aeruginosa* stellt einen im feuchten Milieu vorkommenden Keim dar, der bei Menschen mit geschwächtem Immunsystem (z.B. aufgrund von *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS), Mukoviszidose oder anderen Erkrankungen, die das Immunsystem stark fordern) typischerweise die Lunge besiedelt und damit eine Entzündungsreaktion auslöst. In vorhergehenden Publikationen wurde von Prof. Dr. Schröder und Mitarbeitern (Klinik für Dermatologie, Venereologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) eine stimulierende Wirkung des Überstands adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* auf die Produktion von AMPs durch Keratinozyten festgestellt<sup>[369,386]</sup>. Dieser Überstand wurde von Prof. Dr. Schröder für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Als Reaktion auf eine Stimulation konnte aufgrund vorhergehender Ergebnisse die Freisetzung des Zytokins IFN- $\gamma$  erwartet werden. Desweiteren sollte die Expression eines typischerweise in epithelialen Geweben auftretenden Chemokins untersucht werden. Deshalb wurde eine mögliche Induzierbarkeit der Expression von CCL20/MIP-3 $\alpha$  untersucht, das als einziger kanonischer Ligand für CCR6<sup>[164,165]</sup> durch die Rekrutierung von T-Zellen und DCs<sup>[168,176,177]</sup> eine Rolle bei der Immunabwehr in Haut<sup>[167]</sup> und Darmschleimhaut<sup>[165,169,372]</sup> spielt.

Neben der Freisetzung von Zyto- und Chemokinen sollte die Expression von antimikrobiellen Peptiden durch  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht werden. In vorhergehenden Arbeiten war bereits die Produktion von Granulysin<sup>[83]</sup> und der prototypischen AMPs HNP1-3 und LL-37<sup>[333,334]</sup> durch V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nachgewiesen worden. Demgegenüber war die Expression von AMPs durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten bisher wenig erforscht, obwohl die physiologische Lokalisation der Zellen im peripheren Gewebe eine solche vermuten ließ. In der vorliegenden Arbeit sollte dementsprechend die Expression von AMPs durch stimulierte V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen untersucht werden.

V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus verschiedenen Geweben wurden hinsichtlich der Expression von Zytokinen und AMPs analysiert. Tabelle 5.4 zeigt eine Übersicht der Ergebnisse.

**Tabelle 5.4: Produktion von Zytokinen und AMPs durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben**

	Protein	Methode	Herkunft der Zelllinie			
			Blut	Synovialfl.	Darm	
Zytokine	IFN- $\gamma$	ELISA	Stimulation möglich		—	
	CCL20/MIP3 $\alpha$	RT-PCR	Stimulation möglich		—	
AMPs	$\alpha$ - & $\beta$ -Defensine	RT-PCR	n.vh.	stim. (HBD-1)	—	
		RT-PCR	vh.	vh.	vh.	
	Granzym B	RT-PCR	vh.	vh.	vh.	
		FACS	vh.	vh.	vh.	
		WB <sub>Pellet</sub>	vh.	vh.	vh.	
		WB <sub>Überstand</sub>	n.vh.	vh.	n.vh.	
	Angiogenin	ELISA	Stimulation möglich			—
		RT-PCR	vh.	vh.	vh.	
	Elafin	ELISA	—	neg. stim.	—	
		RT-PCR	vh.	vh.	vh.	
FACS		vh., schwach	vh., stark	—		
RT-PCR & ELISA		—	stimulierbar	—		
WB <sub>Pellet</sub>		—	vh., stark	—		
WB <sub>Überstand</sub>	—	stim.	—			

Synovialfl. = Synovialflüssigkeit, grau unterlegte Felder weisen auf einen Unterschied in der Expression des jeweiligen Proteins durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben hin, vh. = vorhanden, n.vh. = nicht vorhanden, stim. = stimulierbar, neg. stim. = negativ stimulierbar, WB = Western-Blot, Indizes wie <sub>Pellet</sub> bezeichnen die Art der untersuchten Proben.

### 5.3.1 Produktion von Zytokinen

Die Expression des Zytokins IFN- $\gamma$  durch stimulierte V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen ist bereits mehrfach beschrieben worden<sup>[92,106,409]</sup>. In der vorliegenden Arbeit konnte eine stimulierbare Produktion von IFN- $\gamma$  bestätigt werden. Neben T/I wurde der Überstand einer *Ps. aeruginosa*-Kultur als wirksame Stimulanz identifiziert (s. Abb. 4.22). IFN- $\gamma$  spielt wie im Abschnitt „Interferone“, Seite 33 beschrieben eine Rolle bei der Aktivierung von NK-Zellen und Makrophagen, und bei der direkten und indirekten Rekrutierung von PBMZ. Weiterhin prägt IFN- $\gamma$  eine durch T<sub>H</sub>1 Zellen vermittelte Immunantwort, die sich – weil T<sub>H</sub>1 Zellen selbst IFN- $\gamma$  freisetzen – kontinuierlich bis zur Beseitigung des Pathogens fortsetzt und dabei verstärkt. Insoweit übernehmen  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Erstkontakt mit einem Pathogen einen Teil der Initiation einer Immunantwort.

Die Expression des Chemokins CCL20/MIP-3 $\alpha$  durch humane V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen ist bisher nicht beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Produktion von CCL20/MIP-3 $\alpha$ -mRNA durch mit T/I oder *Ps. aeruginosa* stimulierte  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten gezeigt werden (s. Abb. 4.23). Die durch *Ps. aeruginosa* induzierte Expression von IFN- $\gamma$  und CCL20/MIP-3 $\alpha$  deutet auf eine generelle Suszeptibilität von  $\gamma\delta$  T-Zellen für dieses Pathogen hin.



### 5.3.2 Expression von AMPs

Mit Hilfe eines Agardiffusions-*Screening-Assays* konnte eine generell vorhandene, stimulierbare antimikrobielle Aktivität durch V $\delta$ 1 (und V $\delta$ 2)  $\gamma\delta$  T-Zellen festgestellt werden (s. Abb. 4.24). In der Folge wurde die Expression ausgewählter AMPs näher untersucht, wobei anfänglich  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensinen als prototypischen AMPs besonderes Interesse galt.

#### HBD-1

HBD-1 wird von mehreren Autoren als das wichtigste AMP bezeichnet<sup>[427,428]</sup>. Es ist das einzige  $\beta$ -Defensin, das konstitutiv in Haut und Urogenitaltrakt exprimiert wird. Durch mikrobielle oder inflammatorische Stimuli kann die HBD-1-Expression noch weiter gesteigert werden<sup>[353]</sup>. HBD-1 weist antimikrobielle Aktivität gegenüber einer Vielzahl von Bakterien auf<sup>[429]</sup>. Neben *E. coli*<sup>[430]</sup> und *Mycobacterium tuberculosis*<sup>[431]</sup> ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit *Ps. aeruginosa*<sup>[430,432]</sup> zu nennen. Desweiteren aktiviert HBD-1 DCs<sup>[433]</sup> und rekrutiert CCR6<sup>+</sup> T-Zellen und DCs<sup>[434]</sup>.

Sowohl die Präsenz von HBD-1 in Synovialflüssigkeit<sup>[435]</sup> als auch eine Aktivität gegen *Ps. aeruginosa*<sup>[430,432]</sup> wurden in vorhergehenden Studien publiziert. In Übereinstimmung damit wurde in der vorliegenden Arbeit bei aus der Synovialflüssigkeit isolierten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten die Expression von HBD-1-mRNA nachgewiesen. Diese konnte durch die Stimulation mit *Ps. aeruginosa* weiter gesteigert werden (s. Abb. 4.25). Aufgrund der Daten kann die Beteiligung von  $\gamma\delta$  T-Zellen an der HBD-1-Produktion und am Entzündungsgeschehen an der Synovialmembran vermutet werden.

#### Granzym B

Über die (im Verbund mit Perforin) zytotoxische Funktion hinaus wiesen Shafer *et al.* und Berthou *et al.* eine antimikrobielle Wirkung von Granzym B nach<sup>[395,396]</sup>. Neben NK-Zellen, Makrophagen<sup>[436]</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen<sup>[437,438]</sup> und Keratinozyten<sup>[396]</sup> sind auch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>[382,397]</sup> als Produzenten von Granzym B beschrieben worden. Weiterhin wurde die Präsenz von Granzym B in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Arthritis dokumentiert<sup>[439]</sup>. Dementsprechend konnte eine starke Expression von Granzym B durch eine aus der Synovialflüssigkeit von Arthritis-Patienten isolierte V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinie vermutet, und in der vorliegenden Arbeit auch nachgewiesen werden (s. Abb. 4.27 und 4.28). Darüber hinaus konnten V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl aus Blut als auch der Synovialflüssigkeit durch Stimulation mit *Ps. aeruginosa* zur Freisetzung von Granzym B angeregt werden (s. Abb. 4.29). Bereits mit dem Pseudomonaden-Medium stimulierte Zellen wiesen eine erhöhte Konzentration von Granzym B im Zellkulturüberstand auf. Eine mögliche Erklärung könnte in der Erhöhung der Glukosekonzentration ( $\approx 15$  %) durch die Zugabe des Pseudomonaden-Mediums liegen, da Glukose ein entscheidender Faktor bei der Produktion von Granzym B durch aktivierte T-Zellen ist<sup>[440]</sup>. Festzuhalten bleibt,

dass  $\gamma\delta$  T-Zellen aus verschiedenen Geweben mit der induzierbaren Produktion des AMP Granzyms B eine Möglichkeit zur Bekämpfung von Pathogenen aufweisen.

### Angiogenin

Angiogenin ist als ein maßgeblich an der Angiogenese beteiligtes Protein charakterisiert worden<sup>[398]</sup>. In späteren Publikationen wurde eine zusätzliche antimikrobielle Aktivität von Angiogenin kontrovers diskutiert<sup>[399–402]</sup>. Schilbach *et al.* wiesen nach, dass eine konstitutiv vorhandene Expression von Angiogenin durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Konfrontation mit Neuroblastoma-Tumorzellen verringert wird<sup>[393]</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl die konstitutive Expression von Angiogenin als auch dessen Abschwächung nach Stimulation – hier mit T/I bzw. *Ps. aeruginosa* – bestätigt (s. Abb. 4.30). Damit scheint Angiogenin von  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht als antimikrobielles Peptid verwendet zu werden.

### Elafin

Elafin verfügt neben antimikrobiellen<sup>[360,403]</sup> auch über chemotaktische und andere Immunzellen aktivierende Funktionen<sup>[361]</sup>. Für Pre-Elafin/Trappin-2 ist weiterhin eine opsonierende Wirkung beschrieben worden<sup>[362]</sup>. Damit vermittelt Elafin jene überwachenden und alarmierenden Effektorfunktionen, die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Rahmen einer Immunreaktion als charakteristisch zugeschrieben werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine konstitutive Expression von Elafin mittels RT-PCR (s. Abb. 4.26) und eine starke intrazelluläre Präsenz mittels FACS-Analyse (s. Abb. 4.31 und 4.32) und Western-Blot (s. Abb. 4.33) nachgewiesen werden. Die im Western-Blot ermittelte erhöhte Masse des Elafinproteins lässt sich möglicherweise wie in vorhergehenden Publikationen auf eine kovalente Bindung an andere Proteine zurückführen<sup>[358,359]</sup>. Für eine Bindung von Elafin an andere Proteine innerhalb der Zelle spricht ebenfalls, dass die größte Menge an Elafin im Präzipitat des Zellysats und damit in den schwer löslichen, makromolekularen Strukturen der Zelle nachgewiesen worden ist (s. Abb. 4.33). Dementsprechend ist die Bedeutung von intrazellulärem, ggf. zytosolischem Elafin als AMP möglicherweise nachgeordnet. Vielmehr könnte es als Substrat einer Transglutaminase<sup>[357,359]</sup> durch die Bindung an intrazelluläre Strukturproteine als Gerüstprotein genutzt werden. Diese Vermutung wird durch die Beschreibung von Elafin als verbindendes Protein im Aufbau der epidermalen Hornschicht<sup>[441,442]</sup> und der extrazellulären Matrix<sup>[355]</sup> gestützt.

Eine andere mögliche Erklärung für die starke intrazelluläre Präsenz von Elafin ist dessen Vorhaltung in Granula. Das dann als AMP genutzte Elafin könnte ggf. rasch in großer Menge freigesetzt werden. Für diese Hypothese spricht die schnelle Freisetzung von Elafin durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa* (s. Abb. 4.34). Die Expression und stimulierbare Freisetzung von Elafin stellt somit eine weitere Option von  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Bekämpfung von Pathogenen dar.

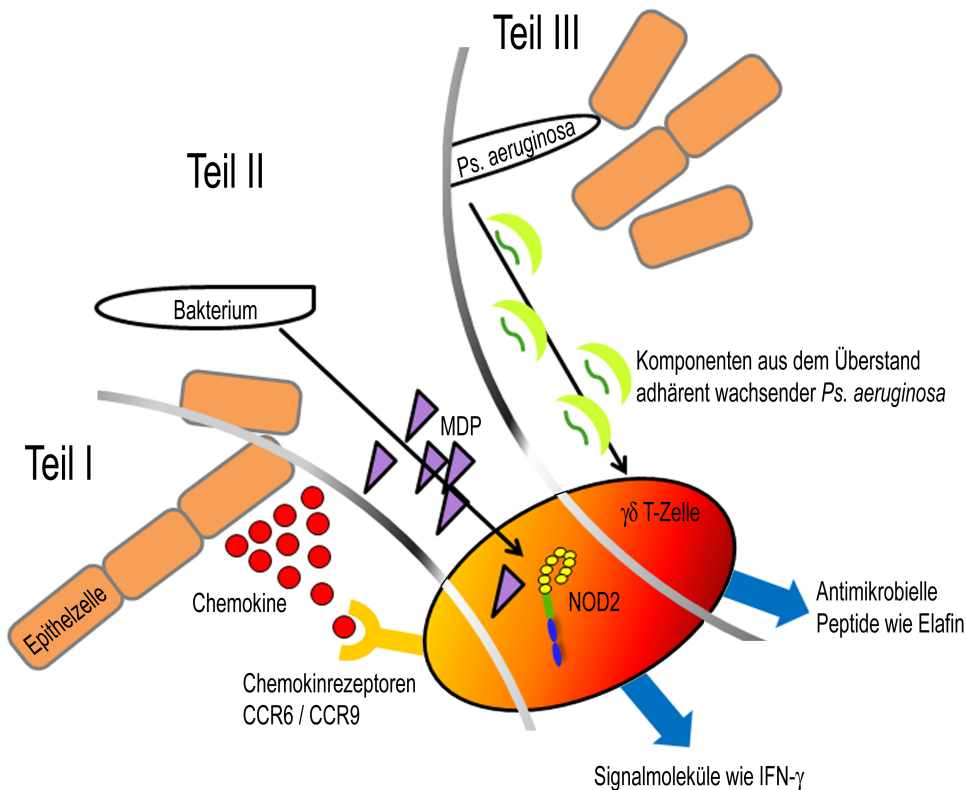
### 5.3.3 Fazit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression ausgewählter Zytokine und AMPs durch V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Zelllinien nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa* charakterisiert. Sowohl IFN- $\gamma$  als auch HBD-1, Granzym B und Elafin wurden in erhöhtem Maß produziert bzw. freigesetzt. Die Kombination der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse lässt darauf schließen, dass V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten *Ps. aeruginosa* als Pathogen erkennen und folgerichtig eine Immunantwort initiieren.

## 5.4 Charakterisierung von humanen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten als Komponenten der frühen Immunantwort

Für Immunzellen im Allgemeinen, und damit auch für  $\gamma\delta$  T-Zellen, ist entscheidend, *wo* sie im Körper *was* als Pathogen erkennen und *wie* sie darauf reagieren.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen differentielle Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren einsetzen, um ihre Lokalisation in vorgesehenen epithelialen Geweben zu etablieren. Dort befinden sich  $\gamma\delta$  T-Zellen in der vordersten Front gegen eindringende Keime (s. Abb. 5.1, Teil I).



**Abb. 5.1: Schematische Übersicht der Themengebiete in der vorliegenden Arbeit**

Die vorliegende Arbeit charakterisiert  $\gamma\delta$  T-Zellen als Komponenten der frühen Immunantwort. Dazu wurden die differenten Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren (Teil I), die Expression des Mustererkennungszepptors NOD2 (Teil II) und die Freisetzung von Elafin und anderen AMPs nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa* (Teil III) untersucht.

Weiterhin wurde erstmals die Expression des NOD2-Proteins in  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten nachgewiesen. Zusätzlich konnte eine verstärkte Expression und Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch mit dem NOD2-Liganden MDP stimulierte  $\gamma\delta$  T-Zellen gezeigt werden (s. Abb. 5.1, Teil II). IFN- $\gamma$  bewirkt neben der langsamen Ausbildung von  $T_H1$ -Zellen auch eine rasche Rekrutierung und

Aktivierung von Monozyten/Makrophagen. Die schnelle und direkte Erkennung von Pathogenen mittels PRRs wie TLRs und NOD2, und die nachfolgende Freisetzung von Botenstoffen wie IFN- $\gamma$  qualifizieren  $\gamma\delta$  T-Zellen als mit entscheidende Komponenten für eine frühe Immunantwort.

Neben MDP wurde der Überstand von *Ps. aeruginosa* zur Stimulation verwendet. Dabei konnte eine verstärkte Expression und Freisetzung von Elafin durch  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit *Ps. aeruginosa* gezeigt werden (s. Abb. 5.1, Teil III). Elafin besitzt neben der antimikrobiellen Aktivität auch das Pathogen opsonierende, wie auch andere Immunzellen aktivierende Funktionen und greift damit direkt in eine Immunreaktion ein.

Mit den vorliegenden Ergebnissen werden die Kenntnisse über die Migration von, und die Pathogenerkennung und -bekämpfung durch  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten erweitert. Die beschriebenen Eigenschaften und Funktionen charakterisieren  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten als Komponenten der frühen Immunantwort.

## 5.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren als (mit) entscheidend für die Lokalisation von humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen in Blut, Darm und Synovialflüssigkeit charakterisiert. Künftige Untersuchungen sollten das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren von  $\gamma\delta$  T-Zellen in anderen Epithelgeweben wie Haut, Lunge und Urogenitaltrakt analysieren. Im Abgleich mit bestehenden Erkenntnissen über humane  $\alpha\beta$  bzw. murine  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten könnte letztlich eine umfassende Zuordnung von Expressionsmuster und Lokalisation erstellt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, wie sich definierte Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren auf  $\gamma\delta$  T-Zellen spezifisch – ggf. auch *ex vivo* – durch Stimulation induzieren lassen. Auf diese Weise könnten  $\gamma\delta$  T-Zellen zielgerichtet zu aktuell gefährdeten Epithelgeweben dirigiert werden.

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression des NOD2-Proteins mittels durchflusszytometrischer Analyse in frisch isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen sollte die NOD2-Expression auch in  $\gamma\delta$  T-Zellen aus anderen Geweben analysiert werden. Aufgrund der Bedeutung von NOD2 für das immunologische Geschehen im Darm – NOD2-Mutationen sind mit der Entstehung von Morbus Crohn korreliert – bieten sich  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten aus diesem Gewebe als interessante Kandidatenzellen an. In einem Vorexperiment konnte die Expression des NOD2-Proteins in einer  $\gamma\delta$  T-Zelllinie aus dem Darm bereits nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

Auch für CD4<sup>+</sup> T-Zellen, für die in der vorliegenden Arbeit Hinweise auf eine Expression von NOD2 gefunden worden sind, sollte ein Nachweis des NOD2-Proteins mittels FACS-Analyse und/oder Western-Blot erbracht werden. Damit könnte die für  $\alpha\beta$  T-Zellen bisher nur durch RT-PCR ermittelte NOD2-Expression<sup>[284]</sup> bestätigt werden.

In weiteren Untersuchungen sollte die hier erstmals gezeigte, durch Kostimulation über CD14 und NOD2 *vs.* Stimulation über CD14 allein mehrfach verstärkte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  durch Monozyten reproduziert werden. In diesem Zusammenhang ist die Bedeutung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  als T<sub>h</sub>1-Zytokin<sup>[315,443]</sup> und CCR5-Ligand bei der Bekämpfung einer HIV-Infektion beachtenswert<sup>[444]</sup>.

In der vorliegenden Arbeit konnte die Expression der AMPs Granulysin, Granzym B, Angiogenin und Elafin durch  $\gamma\delta$  T-Zellen gezeigt und z.T. näher charakterisiert werden. In Vorexperimenten konnte zudem die Expression der mRNA von HBD-1 durch  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus der Synovialflüssigkeit, aber auch die Expression der mRNAs von SLPI, Lysozym, Calcitermin, Lactoferrin, Adrenomedullin, *liver expressed antimicrobial peptide-1* (LEAP-1/*hepatic bactericidal protein* (Hepcidin)), LEAP-2 und Granulin durch  $\gamma\delta$  T-Zelllinien aus Blut, Synovialflüssigkeit und/oder Darm gezeigt werden.

Zur Stimulation wurde dabei z.T. der Überstand adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* verwendet. Nach Abschluss der hier vorgestellten Experimente wurde der TLR5-Ligand Flagellin als die Komponente des Pseudomonadenüberstands identifiziert, die Keratinozyten zur Expression von HBD-2 und IL-8 stimulieren kann<sup>[445]</sup>. Möglicherweise war auch bei der hier untersuchten Stimulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen das Flagellin die entscheidende Substanz im Pseudomonadenüberstand. In diesem Zusammenhang wurde von Pietschmann *et al.* bereits eine verstärkte Freisetzung von IFN- $\gamma$  durch frisch isolierte V $\delta$ 1 (und V $\delta$ 2)  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Zusatz von Flagellin beschrieben<sup>[106]</sup>. Damit bietet sich für künftige Untersuchungen die Analyse der Expression oben genannter und weiterer AMPs in frisch isolierten und auch als Zelllinie vorliegenden  $\gamma\delta$  T-Zellen nach Stimulation mit Flagellin an.

Die vorgeschlagenen Analysen würden die vorliegende Arbeit folgerichtig weiterführen und gemeinsam mit bereits beschriebenen Funktionen von  $\gamma\delta$  T-Zellen, z.B. als zytotoxische, antigenpräsentierende oder auch regulativ wirkende Immunzellen, zu einem tieferen Verständnis ihrer Rolle in einer frühen Immunantwort beitragen.

## 6 Zusammenfassung

$\gamma\delta$  T-Lymphozyten stellen eine numerisch kleine T-Zellsubpopulation dar, deren Funktionen Zytokinproduktion, Zytotoxizität, Antigenpräsentation, Produktion von AMPs, Erkennung von PAMPs durch Mustererkennungsrezeptoren und regulatorische Wirkung umfassen.

Aufgrund der Verteilung von  $\gamma\delta$  T-Zellpopulationen in verschiedenen Geweben des Menschen war eine differentielle Chemokinrezeptorexpression zu vermuten und konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Dabei wurde die Expression von CCR4 als ein charakteristisches Merkmal für  $V\delta 1$  vs.  $V\delta 2$   $\gamma\delta$  T-Zellen identifiziert. Desweiteren konnte ein differentielles Expressionsmuster von CCR6 und CCR9 mit den Lokalisationen von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus Blut, Synovialflüssigkeit und Darmgewebe korreliert werden.

Zur schnellen Erkennung von Pathogenen verfügen  $\gamma\delta$  T-Zellen neben dem T-Zellrezeptor auch über Mustererkennungsrezeptoren wie TLRs. Vorhergehende Studien hatten zudem erste Hinweise auf eine Expression des Mustererkennungsrezeptors NOD2 beschrieben. Die Expression des NOD2-Proteins in  $\gamma\delta$  T-Zellen konnte erstmalig in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Weiterhin wurden über den TZR aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem NOD2-Liganden MDP-LD im Vergleich mit dessen MDP-DD-Isomer stimuliert. Hochrein isolierte  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten eine verstärkte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , während in PBMZ befindliche  $\gamma\delta$  T-Zellen eine schwächere Proliferation nach Stimulation mit MDP-LD vs. MDP-DD aufwiesen.

Nach Aktivierung setzen  $\gamma\delta$  T-Zellen Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und CCL5/RANTES, aber auch antimikrobielle Peptide wie LL-37 frei. In der vorliegenden Arbeit wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem Überstand adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* stimuliert um die nachfolgende Expression von Zytokinen und AMPs zu untersuchen. Dabei konnte eine induzierbare Expression der Zytokine IFN- $\gamma$  und CCL20/MIP-3 $\alpha$  festgestellt werden. Eine ebenfalls stimulierbare antimikrobielle Aktivität von  $\gamma\delta$  T-Zellen ließ sich z.T. auf die Produktion und/oder Freisetzung von Granulysin, Granzym B, HBD-1 und Elafin zurückführen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Aspekte von  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten im Hinblick auf ihre Lokalisation und die Erkennung und Bekämpfung von Pathogenen näher untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse haben somit einen Beitrag zu einem tieferen Verständnis der Bedeutung von humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen in der frühen Immunantwort erbracht.





## 7 Summary

$\gamma\delta$  T cells represent a numerical small T cell subset displaying functional activity including cytokine production, cytotoxicity, antigen presentation, production of antimicrobial peptides, recognition of PAMPs by pattern recognition receptors and regulatory functions.

According to the distribution of  $\gamma\delta$  T cell subsets in different human tissues, a differential expression of chemokine receptors was expected and could be confirmed in the present study. The expression of CCR4 was identified as a characteristic feature of V $\delta$ 1 *vs.* V $\delta$ 2  $\gamma\delta$  T cells. Furthermore, a differential expression pattern of CCR6 and CCR9 was correlated with the localizations of  $\gamma\delta$  T cells from blood, synovial fluid and intestine.

For rapid recognition of pathogens,  $\gamma\delta$  T cells are equipped with not just the T cell receptor, but with pattern recognition receptors including TLRs. Additionally, previous studies had described preliminary evidences for an expression of the pattern recognition receptor NOD2. In the present study, the expression of the NOD2-protein was described for the first time. Furthermore, T cell receptor activated  $\gamma\delta$  T cells were treated with the NOD2-ligand MDP-LD in comparison to the MDP-DD-isomer. Stimulated with MDP-LD *vs.* MDP-DD, highly purified  $\gamma\delta$  T cells showed a stronger release of CCL3/MIP-1 $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , while  $\gamma\delta$  T cells within peripheral mononuclear blood cells exhibited an attenuated proliferation.

After activation,  $\gamma\delta$  T cells release cytokines such as IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and CCL5/RANTES as well as antimicrobial peptides like LL-37. In the present study,  $\gamma\delta$  T cells were stimulated by the supernatant of adherent *Ps. aeruginosa* in order to investigate the consecutive expression of cytokines and antimicrobial peptides. An inducible expression of the cytokines IFN- $\gamma$  and CCL20/MIP-3 $\alpha$  was observed. The similarly inducible antimicrobial activity of  $\gamma\delta$  T cells was attributed partly to the production and/or release of granulysin, granzyme B, human  $\beta$ -defensin 1 and elafin.

In the present study, aspects of  $\gamma\delta$  T lymphocytes concerning their localization and the recognition of and the defense against pathogens were examined. The presented results have contributed to a deeper insight into the early immune response of human  $\gamma\delta$  T cells.



# 8 Literaturverzeichnis

- [1] IUPAC-IUB JOINT COMMISSION ON BIOCHEMICAL NOMENCLATURE: Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. *Eur. J. Biochem.* 138 (1984), S. 9–37
- [2] MURPHY, Kenneth ; TRAVERS, Paul ; WALPORT, Mark: *Janeway Immunologie*. Spektrum, 2009
- [3] JANSSEN, O. ; SANZENBACHER, R. ; KABELITZ, D.: Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res.* 301 (2000), S. 85–99
- [4] SUDA, T. ; OKAZAKI, T. ; NAITO, Y. ; YOKOTA, T. ; ARAI, N. ; OZAKI, S. ; NAKAO, K. ; NAGATA, S.: Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J. Immunol.* 154 (1995), S. 3806–3813
- [5] STEINMAN, L.: A brief history of T<sub>h</sub>17, the first major revision in the T<sub>h</sub>1/T<sub>h</sub>2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat. Med.* 13 (2007), S. 139–145
- [6] HARRINGTON, L. E. ; HATTON, R. D. ; MANGAN, P. R. ; TURNER, H. ; MURPHY, T. L. ; MURPHY, K. M. ; WEAVER, C. T.: Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat. Immunol.* 6 (2005), S. 1123–1132
- [7] STOCKINGER, B. ; VELDHONEN, M.: Differentiation and function of T<sub>h</sub>17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 19 (2007), S. 281–286
- [8] HAPPEL, K. I. ; DUBIN, P. J. ; ZHENG, M. ; GHILARDI, N. ; LOCKHART, C. ; QUINTON, L. J. ; ODDEN, A. R. ; SHELLITO, J. E. ; BAGBY, G. J. ; NELSON, S. ; KOLLS, J. K.: Divergent roles of IL-23 and IL-12 in host defense against *Klebsiella pneumoniae*. *J. Exp. Med.* 202 (2005), S. 761–769
- [9] CHUNG, D. R. ; KASPER, D. L. ; PANZO, R. J. ; CHITNIS, T. ; GRUSBY, M. J. ; SAYEGH, M. H. ; TZIANABOS, A. O. ; CHITNIS, T.: CD4<sup>+</sup> T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J. Immunol.* 170 (2003), S. 1958–1963
- [10] HUANG, W. ; NA, L. ; FIDEL, P. L. ; SCHWARZENBERGER, P.: Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.* 190 (2004), S. 624–631
- [11] INFANTE-DUARTE, C. ; HORTON, H. F. ; BYRNE, M. C. ; KAMRADT, T.: Microbial lipopeptides induce the production of IL-17 in T<sub>h</sub> cells. *J. Immunol.* 165 (2000), S. 6107–6115
- [12] VELDHONEN, M. ; HOCKING, R. J. ; FLAVELL, R. A. ; STOCKINGER, B.: Signals mediated by transforming growth factor- $\beta$  initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat. Immunol.* 7 (2006), S. 1151–1156
- [13] LIANG, S. C. ; TAN, X. Y. ; LUXENBERG, D. P. ; KARIM, R. ; DUNUSSI-JOANNOPOULOS, K. ; COLLINS, M. ; FOUSER, L. A.: Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by T<sub>h</sub>17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.* 203 (2006), S. 2271–2279
- [14] KEBIR, H. ; KREYMBORG, K. ; IFERGAN, I. ; DODELET-DEVILLERS, A. ; CAYROL, R. ; BERNARD, M. ; GIULIANI, F. ; ARBOUR, N. ; BECHER, B. ; PRAT, A.: Human T<sub>h</sub>17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13 (2007), S. 1173–1175
- [15] PETERS, A. ; LEE, Y. ; KUCHROO, V. K.: The many faces of T<sub>h</sub>17 cells. *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011), S. 1–5
- [16] KULKARNI, R. ; BEHBOUDI, S. ; SHARIF, S.: Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell Tissue Res.* 343 (2011), S. 141–152

- [17] KABELITZ, D.: Expression and function of Toll-like receptors in T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology* 19 (2007), S. 39–45
- [18] NARAYAN, K. ; KANG, J.: Disorderly conduct in  $\gamma\delta$  versus  $\alpha\beta$  T cell lineage commitment. *Semin. Immunol.* 22 (2010), S. 222–227
- [19] WONG, G. W. ; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J. C.:  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cell lineage choice: resolution by a stronger sense of being. *Semin. Immunol.* 22 (2010), S. 228–236
- [20] LEE, S.-Y. ; STADANLICK, J. ; KAPPES, D. J. ; WIEST, D. L.: Towards a molecular understanding of the differential signals regulating  $\alpha\beta/\gamma\delta$  T lineage choice. *Semin. Immunol.* 22 (2010), S. 237–246
- [21] TURCHINOVICH, G. ; PENNINGTON, D. J.: T cell receptor signalling in  $\gamma\delta$  cell development: strength isn't everything. *Trends in Immunology* 32 (2011), S. 567–573
- [22] KAZEN, A. R. ; ADAMS, E. J.: Evolution of the V, D, and J gene segments used in the primate  $\gamma\delta$  T-cell receptor reveals a dichotomy of conservation and diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (2011), S. E332–340
- [23] HATA, S. ; SATYANARAYANA, K. ; DEVLIN, P. ; BAND, H. ; MCLEAN, J. ; STROMINGER, J. L. ; BRENNER, M. B. ; KRANGEL, M. S.: Extensive junctional diversity of rearranged human T cell receptor  $\delta$  genes. *Science* 240 (1988), S. 1541–1544
- [24] SCHONDELMAIER, S. ; WESCH, D. ; PECHHOLD, K. ; KABELITZ, D.: V gamma gene usage in peripheral blood gamma delta T cells. *Immunol. Lett.* 38 (1993), S. 121–126
- [25] PORCELLI, S. ; BRENNER, M. B. ; BAND, H.: Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol. Rev.* 120 (1991), S. 137–183
- [26] KABELITZ, D. ; WESCH, D. ; HINZ, T.:  $\gamma\delta$  T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin. Immunopathol.* 21 (1999), S. 55–75
- [27] HAYES, S. M. ; LOVE, P. E.: Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. *Immunity* 16 (2002), S. 827–838
- [28] HAYDAY, A. C.:  $\gamma\delta$  cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000), S. 975–1026
- [29] KABELITZ, D. ; GLATZEL, A. ; WESCH, D.: Antigen recognition by human  $\gamma\delta$  T lymphocytes. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122 (2000), S. 1–7
- [30] FAURE, F. ; JITSUKAWA, S. ; MIOSSEC, C. ; HERCEND, T.: CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells. *Eur. J. Immunol.* 20 (1990), S. 703–706
- [31] SPADA, F. M. ; GRANT, E. P. ; PETERS, P. J. ; SUGITA, M. ; MELIÁN, A. ; LESLIE, D. S. ; LEE, H. K. ; VAN DONSELAAR, E. ; HANSON, D. A. ; KRENSKY, A. M. ; MAJDIC, O. ; PORCELLI, S. A. ; MORITA, C. T. ; BRENNER, M. B.: Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J. Exp. Med.* 191 (2000), S. 937–948
- [32] DÉCHANET, J. ; MERVILLE, P. ; LIM, A. ; RETIERE, C. ; PITARD, V. ; LAFARGE, X. ; MICHELSON, S. ; MÉRIC, C. ; HALLET, M. M. ; KOURILSKY, P. ; POTAU, L. ; BONNEVILLE, M. ; MOREAU, J. F.: Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J. Clin. Invest.* 103 (1999), S. 1437–1449
- [33] BEETZ, S. ; MARISCHEN, L. ; KABELITZ, D. ; WESCH, D.: Human gamma delta T cells: candidates for the development of immunotherapeutic strategies. *Immunol. Res.* 37 (2007), S. 97–111
- [34] RUSSANO, A. M. ; BASSOTTI, G. ; AGEA, E. ; BISTONI, O. ; MAZZOCCHI, A. ; MORELLI, A. ; PORCELLI, S. A. ; SPINOZZI, F.: CD1-restricted recognition of exogenous and self-lipid antigens by duodenal gammadelta<sup>+</sup> T lymphocytes. *J. Immunol.* 178 (2007), S. 3620–3626

- [35] DAS, H. ; SUGITA, M. ; BRENNER, M. B.: Mechanisms of Vdelta1 gammadelta T cell activation by microbial components. *J. Immunol.* 172 (2004), S. 6578–6586
- [36] GROH, V. ; STEINLE, A. ; BAUER, S. ; SPIES, T.: Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279 (1998), S. 1737–1740
- [37] STEINLE, A. ; GROH, V. ; SPIES, T.: Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998), S. 12510–12515
- [38] GROH, V. ; BAHRAM, S. ; BAUER, S. ; HERMAN, A. ; BEAUCHAMP, M. ; SPIES, T.: Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93 (1996), S. 12445–12450
- [39] LI, P. ; WILLIE, S. T. ; BAUER, S. ; MORRIS, D. L. ; SPIES, T. ; STRONG, R. K.: Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity* 10 (1999), S. 577–584
- [40] WU, J. ; GROH, V. ; SPIES, T.: T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *J. Immunol.* 169 (2002), S. 1236–1240
- [41] MAEURER, M. ; ZITVOGEL, L. ; ELDER, E. ; STORKUS, W. J. ; LOTZE, M. T.: Human intestinal V delta 1<sup>+</sup> T cells obtained from patients with colon cancer respond exclusively to SEB but not to SEA. *Nat. Immun.* 14 (1995), S. 188–197
- [42] VINCENT, M. S. ; ROESSNER, K. ; SELLATI, T. ; HUSTON, C. D. ; SIGAL, L. H. ; BEHAR, S. M. ; RADDOLF, J. D. ; BUDD, R. C.: Lyme arthritis synovial gamma delta T cells respond to *Borrelia burgdorferi* lipoproteins and lipidated hexapeptides. *J. Immunol.* 161 (1998), S. 5762–5771
- [43] 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 (1999), S. 57–65
- [44] CONSTANT, P. ; DAVODEAU, F. ; PEYRAT, M. A. ; POQUET, Y. ; PUZO, G. ; BONNEVILLE, M. ; FOURNIÉ, J. J.: Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264 (1994), S. 267–270
- [45] TANAKA, Y. ; SANO, S. ; NIEVES, E. ; DE LIBERO, G. ; ROSA, D. ; MODLIN, R. L. ; BRENNER, M. B. ; BLOOM, B. R. ; MORITA, C. T.: Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994), S. 8175–8179
- [46] TANAKA, Y. ; MORITA, C. T. ; TANAKA, Y. ; NIEVES, E. ; BRENNER, M. B. ; BLOOM, B. R.: Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* 375 (1995), S. 155–158
- [47] JOMAA, H. ; FEURLE, J. ; LÜHS, K. ; KUNZMANN, V. ; TONY, H. P. ; HERDERICH, M. ; WILHELM, M.: Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 25 (1999), S. 371–378
- [48] BELMANT, C. ; ESPINOSA, E. ; POUPOT, R. ; PEYRAT, M. A. ; GUIRAUD, M. ; POQUET, Y. ; BONNEVILLE, M. ; FOURNIÉ, J. J.: 3-Formyl-1-butyl pyrophosphate: A novel mycobacterial metabolite-activating human gammadelta T cells. *J. Biol. Chem.* 274 (1999), S. 32079–32084
- [49] ALTINCICEK, B. ; MOLL, J. ; CAMPOS, N. ; FOERSTER, G. ; BECK, E. ; HOEFFLER, J. F. ; GROSDÉMANGE-BILLIARD, C. ; RODRIGUEZ-CONCEPCIÓN, M. ; ROHMER, M. ; BORONAT, A. ; EBERL, M. ; JOMAA, H.: Cutting edge: human gamma delta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J. Immunol.* 166 (2001), S. 3655–3658
- [50] FEURLE, J. ; ESPINOSA, E. ; ECKSTEIN, S. ; PONT, F. ; KUNZMANN, V. ; FOURNIÉ, J. J. ; HERDERICH, M. ; WILHELM, M.: *Escherichia coli* produces phosphoantigens activating human gamma delta T cells. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 148–154

- [51] POQUET, Y. ; KROCA, M. ; HALARY, F. ; STENMARK, S. ; PEYRAT, M. A. ; BONNEVILLE, M. ; FOURNIÉ, J. J. ; SJÖSTEDT, A.: Expansion of Vgamma9 Vdelta2 T cells is triggered by *Francisella tularensis*-derived phosphoantigens in tularemia but not after tularemia vaccination. *Infect. Immun.* 66 (1998), S. 2107–2114
- [52] BEHR, C. ; POUPOT, R. ; PEYRAT, M. A. ; POQUET, Y. ; CONSTANT, P. ; DUBOIS, P. ; BONNEVILLE, M. ; FOURNIÉ, J. J.: *Plasmodium falciparum* stimuli for human gammadelta T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria. *Infect. Immun.* 64 (1996), S. 2892–2896
- [53] FISCHER, S. ; SCHEFFLER, A. ; KABELITZ, D.: Activation of human gamma delta T-cells by heat-treated mistletoe plant extracts. *Immunol. Lett.* 52 (1996), S. 69–72
- [54] PUAN, K. J. ; JIN, C. ; WANG, H. ; SARIKONDA, G. ; RAKER, A. M. ; LEE, H. K. ; SAMUELSON, M. I. ; MÄRKER-HERMANN, E. ; PASA-TOLIC, L. ; NIEVES, E. ; GINER, J. L. ; KUZUYAMA, T. ; MORITA, C. T.: Preferential recognition of a microbial metabolite by human Vgamma2Vdelta2 T cells. *Int. Immunol.* 19 (2007), S. 657–673
- [55] MORITA, C. T. ; MARIUZZA, R. A. ; BRENNER, M. B.: Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin. Immunopathol.* 22 (2000), S. 191–217
- [56] WROBEL, P.: *Tumorreaktivität humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen: T-Zell-Rezeptor- versus NKG2D-abhängige Erkennung und Modulation durch Aminobisphosphonate, Statine und  $\gamma\delta$  T-Zell-Aktivierung*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Diss., 2007
- [57] GOBER, H. J. ; KISTOWSKA, M. ; ANGMAN, L. ; JENÖ, P. ; MORI, L. ; DE LIBERO, G.: Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J. Exp. Med.* 197 (2003), S. 163–168
- [58] KABELITZ, D. ; WESCH, D. ; PITTERS, E. ; ZÖLLER, M.: Characterization of tumor reactivity of human Vgamma9 Vdelta2 gamma delta T cells *in vitro* and in SCID mice *in vivo*. *J. Immunol.* 173 (2004), S. 6767–6776
- [59] WROBEL, P. ; SHOJAEI, H. ; SCHITTEK, B. ; GIESELER, F. ; WOLLENBERG, B. ; KALTHOFF, H. ; KABELITZ, D. ; WESCH, D.: Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scand. J. Immunol.* 66 (2007), S. 320–328
- [60] ESPINOSA, E. ; BELMANT, C. ; PONT, F. ; LUCIANI, B. ; POUPOT, R. ; ROMAGNÉ, F. ; BRAILLY, H. ; BONNEVILLE, M. ; FOURNIÉ, J. J.: Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 18337–18344
- [61] MCVAY, L. D. ; JASWAL, S. S. ; KENNEDY, C. ; HAYDAY, A. ; CARDING, S. R.: The generation of human gammadelta T cell repertoires during fetal development. *J. Immunol.* 160 (1998), S. 5851–5860
- [62] JIN, Y. ; XIA, M. ; SAYLOR, C. M. ; NARAYAN, K. ; KANG, J. ; WIEST, D. L. ; WANG, Y. ; XIONG, N.: Cutting edge: intrinsic programming of thymic  $\gamma\delta$  T cells for specific peripheral tissue localization. *J. Immunol.* 185 (2010), S. 7156–7160
- [63] HOLTMEIER, W. ; PFÄNDER, M. ; HENNEMANN, A. ; ZOLLNER, T. M. ; KAUFMANN, R. ; CASPARY, W. F.: The TCR-delta repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR-delta repertoire in the peripheral blood. *J. Invest. Dermatol.* 116 (2001), S. 275–280
- [64] PAYER, E. ; ELBE, A. ; STINGL, G.: Epidermal T lymphocytes—ontogeny, features and function. *Springer Semin. Immunopathol.* 13 (1992), S. 315–331
- [65] EBERT, L. M. ; MEUTER, S. ; MOSER, B.: Homing and function of human skin gammadelta T cells and NK cells: relevance for tumor surveillance. *J. Immunol.* 176 (2006), S. 4331–4336
- [66] WISNEWSKI, A. V. ; CAIN, H. ; MAGOSKI, N. ; WANG, H. ; HOLM, C. T. ; REDLICH, C. A.: Human gamma/delta T-cell lines derived from airway biopsies. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24 (2001), S. 332–338

- [67] MINCHEVA-NILSSON, L. ; HAMMARSTRÖM, S. ; HAMMARSTRÖM, M. L.: Human decidual leucocytes from early pregnancy contain high numbers of  $\gamma\delta^+$  cells and show selective down-regulation of alloreactivity. *J. Immunol.* 149 (1992), S. 2203–2211
- [68] KOMORI, H. K. ; MEEHAN, T. F. ; HAVRAN, W. L.: Epithelial and mucosal gamma delta T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 18 (2006), S. 534–538
- [69] DEUSCH, K. ; LULING, F. ; REICH, K. ; CLASSEN, M. ; WAGNER, H. ; PFEFFER, K.: 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 (1991), S. 1053–1059
- [70] BRANDES, M. ; WILLIMANN, K. ; LANG, A. B. ; NAM, K. H. ; JIN, C. ; BRENNER, M. B. ; MORITA, C. T. ; MOSER, B.: Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood* 102 (2003), S. 3693–3701
- [71] CACCAMO, N. ; BATTISTINI, L. ; BONNEVILLE, M. ; POCCHIA, F. ; FOURNIÉ, J. J. ; MERAVIGLIA, S. ; BORSELLINO, G. ; KROCZEK, R. A. ; LA MENDOLA, C. ; SCOTET, E. ; DIELI, F. ; SALERNO, A.: CXCR5 identifies a subset of Vgamma9/Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. *J. Immunol.* 177 (2006), S. 5290–5295
- [72] EBERL, M. ; JOMAA, H.: A genetic basis for human gammadelta T-cell reactivity towards microbial pathogens. *Trends Immunol.* 24 (2003), S. 407–409
- [73] GOODMAN, T. ; LEFRANÇOIS, L.: Expression of the gamma-delta T-cell receptor on intestinal CD8<sup>+</sup> intraepithelial lymphocytes. *Nature* 333 (1988), S. 855–858
- [74] HAYDAY, A. ; VINEY, J. L.: The ins and outs of body surface immunology. *Science* 290 (2000), S. 97–100
- [75] BRENNAN, F. M. ; LONDEI, M. ; JACKSON, A. M. ; HERCEND, T. ; BRENNER, M. B. ; MAINI, R. N. ; FELDMANN, M.: T cells expressing gamma delta chain receptors in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 1 (1988), S. 319–326
- [76] MELICONI, R. ; UGUCCIONI, M. ; D'ERRICO, A. ; CASSISA, A. ; FRIZZIERO, L. ; FACCHINI, A.: T-cell receptor gamma-delta positive lymphocytes in synovial membrane. *Br. J. Rheumatol.* 31 (1992), S. 59–61
- [77] GLATZEL, A. ; ENTSCHLADEN, F. ; ZOLLNER, T. M. ; KRAICZY, P. ; BRADE, V. ; KAUFMANN, R. ; JANSSEN, O. ; LENGEL-JANSSEN, B. ; WESCH, D. ; KABELITZ, D.: 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 (2002), S. 1043–1046
- [78] HAAS, W. ; TONEGAWA, S.: Development and selection of gamma delta T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 4 (1992), S. 147–155
- [79] HINZ, T. ; WESCH, D. ; HALARY, F. ; MARX, S. ; CHOUDHARY, A. ; ARDEN, B. ; JANSSEN, O. ; BONNEVILLE, M. ; KABELITZ, D.: Identification of the complete expressed human TCR V gamma repertoire by flow cytometry. *Int. Immunol.* 9 (1997), S. 1065–1072
- [80] NESS-SCHWICKERATH, K. J. ; MORITA, C. T.: Regulation and function of IL-17A- and IL-22-producing  $\gamma\delta$  T cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011), S. 2371–2390
- [81] OLIARO, J. ; DUDAL, S. ; LIAUTARD, J. ; ANDRAULT, J. B. ; LIAUTARD, J. P. ; LAFONT, V.: Vgamma9 Vdelta2 T cells use a combination of mechanisms to limit the spread of the pathogenic bacteria *Brucella*. *J. Leukoc. Biol.* 77 (2005), S. 652–660
- [82] KOIZUMI, H. ; LIU, C. C. ; ZHENG, L. M. ; JOAG, S. V. ; BAYNE, N. K. ; HOLOSHITZ, J. ; YOUNG, J. D.: Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells. *J. Exp. Med.* 173 (1991), S. 499–502

- [83] DIELI, F. ; TROYE-BLOMBERG, M. ; IVANYI, J. ; FOURNIÉ, J. J. ; KRENSKY, A. M. ; BONNEVILLE, M. ; PEYRAT, M. A. ; CACCAMO, N. ; SIRECI, G. ; SALERNO, A.: Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular *Mycobacterium tuberculosis* by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J. Infect. Dis.* 184 (2001), S. 1082–1085
- [84] VINCENT, M. S. ; ROESSNER, K. ; LYNCH, D. ; WILSON, D. ; COOPER, S. M. ; TSCHOPP, J. ; SIGAL, L. H. ; BUDD, R. C.: Apoptosis of Fas<sup>high</sup> CD4<sup>+</sup> synovial T cells by *Borrelia*-reactive Fas-ligand<sup>high</sup>  $\gamma\delta$  T cells in Lyme arthritis. *J. Exp. Med.* 184 (1996), S. 2109–2117
- [85] GARCIA, V. E. ; SIELING, P. A. ; GONG, J. ; BARNES, P. F. ; UYEMURA, K. ; TANAKA, Y. ; BLOOM, B. R. ; MORITA, C. T. ; MODLIN, R. L.: Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J. Immunol.* 159 (1997), S. 1328–1335
- [86] WANG, L. ; DAS, H. ; KAMATH, A. ; BUKOWSKI, J. F.: Human Vgamma2 Vdelta2 T cells produce IFN-gamma and TNF-alpha with an on/off/on cycling pattern in response to live bacterial products. *J. Immunol.* 167 (2001), S. 6195–6201
- [87] SPINOZZI, F. ; AGEA, E. ; BISTONI, O. ; FORENZA, N. ; MONACO, A. ; FALINI, B. ; BASSOTTI, G. ; DE BENEDICTIS, F. ; GRIGNANI, F. ; BERTOTTO, A.: Local expansion of allergen-specific CD30<sup>+</sup> T<sub>h</sub>2-type gamma delta T cells in bronchial asthma. *Mol. Med.* 1 (1995), S. 821–826
- [88] WESCH, D. ; GLATZEL, A. ; KABELITZ, D.: Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward T<sub>h</sub>1- or T<sub>h</sub>2-phenotype. *Cell. Immunol.* 212 (2001), S. 110–117
- [89] CUA, D. J. ; TATO, C. M.: Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010), S. 479–489
- [90] MARTIN, B. ; HIROTA, K. ; CUA, D. J. ; STOCKINGER, B. ; VELDHUEN, M.: Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity* 31 (2009), S. 321–330
- [91] PENG, M. Y. ; WANG, Z. H. ; YAO, C. Y. ; JIANG, L. N. ; JIN, Q. L. ; WANG, J. ; LI, B. Q.: Interleukin 17-producing gamma delta T cells increased in patients with active pulmonary tuberculosis. *Cell. Mol. Immunol.* 5 (2008), S. 203–208
- [92] FENOGLIO, D. ; POGGI, A. ; CATELLANI, S. ; BATTAGLIA, F. ; FERRERA, A. ; SETTI, M. ; MURDACA, G. ; ZOCCHI, M. R.: Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to *Candida albicans*. *Blood* 113 (2009), S. 6611–6618
- [93] CASETTI, R. ; AGRATI, C. ; WALLACE, M. ; SACCHI, A. ; MARTINI, F. ; MARTINO, A. ; RINALDI, A. ; MALKOVSKY, M.: Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3<sup>+</sup> gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J. Immunol.* 183 (2009), S. 3574–3577
- [94] LI, X. ; KANG, N. ; ZHANG, X. ; DONG, X. ; WEI, W. ; CUI, L. ; BA, D. ; HE, W.: Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGF-beta and their involvement in the pathogenesis of systemic *lupus erythematosus*. *J. Immunol.* 186 (2011), S. 6693–6700
- [95] KÜHL, A. A. ; PAWLOWSKI, N. N. ; GROLICH, K. ; BLESSENOHL, M. ; WESTERMANN, J. ; ZEITZ, M. ; LODDENKEMPER, C. ; HOFFMANN, J. C.: Human peripheral  $\gamma\delta$  T cells possess regulatory potential. *Immunology* 128 (2009), S. 580–588
- [96] SHEN, Y. ; ZHOU, D. ; QIU, L. ; LAI, X. ; SIMON, M. ; SHEN, L. ; KOU, Z. ; WANG, Q. ; JIANG, L. ; ESTEP, J. ; HUNT, R. ; CLAGETT, M. ; SEHGAL, P. K. ; LI, Y. ; ZENG, X. ; MORITA, C.T. ; BRENNER, M. B. ; LETVIN, N. L. ; CHEN, Z. W.: Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2<sup>+</sup> T cells during mycobacterial infections. *Science* 295 (2002), S. 2255–2258
- [97] HOGG, A. E. ; WORTH, A. ; BEVERLEY, P. ; HOWARD, C. J. ; VILLARREAL-RAMOS, B.: The antigen-specific memory CD8<sup>+</sup> T-cell response induced by BCG in cattle resides in the CD8<sup>+</sup> $\gamma/\delta$ TCR<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> T-cell population. *Vaccine* 27 (2009), S. 270–279



- [98] BORN, W. K. ; JIN, N. ; AYDINTUG, M. K. ; WANDS, J. M. ; FRENCH, J. D. ; ROARK, C. L. ; O'BRIEN, R. L.:  $\gamma\delta$  T lymphocytes – selectable cells within the innate system ? *J. Clin. Immunol.* 27 (2007), S. 133–144
- [99] DIELI, F. ; POCCIA, F. ; LIPP, M. ; SIRECI, G. ; CACCAMO, N. ; DI SANO, C. ; SALERNO, A.: Differentiation of effector/memory V $\delta$ 2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J. Exp. Med.* 198 (2003), S. 391–397
- [100] CASETTI, R. ; MARTINO, A.: The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy. *Cell. Mol. Immunol.* 5 (2008), S. 161–170
- [101] MERAVIGLIA, S. ; DAKER, S. E. ; DIELI, F. ; MARTINI, F. ; MARTINO, A.:  $\gamma\delta$  T cells cross-link innate and adaptive immunity in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology* 2011 (2011)
- [102] PARKER, C. M. ; GROH, V. ; BAND, H. ; PORCELLI, S. A. ; MORITA, C. ; FABBI, M. ; GLASS, D. ; STROMINGER, J. L. ; BRENNER, M. B.: Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J. Exp. Med.* 171 (1990), S. 1597–1612
- [103] MIYAWAKI, T. ; KASAHARA, Y. ; TAGA, K. ; YACHIE, A. ; TANIGUCHI, N.: Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR-gamma/delta<sup>+</sup> lymphocytes. *J. Exp. Med.* 171 (1990), S. 1833–1838
- [104] WESCH, D. ; BEETZ, S. ; OBERG, H.-H. ; MARGET, M. ; KRENGEL, K. ; KABELITZ, D.: Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J. Immunol.* 176 (2006), S. 1348–1354
- [105] BEETZ, S. ; WESCH, D. ; MARISCHEN, L. ; WELTE, S. ; OBERG, H.-H. ; KABELITZ, D.: Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology* 213 (2008), S. 173–182
- [106] PIETSCHMANN, K. ; BEETZ, S. ; WELTE, S. ; MARTENS, I. ; GRUEN, J. ; OBERG, H.-H. ; WESCH, D. ; KABELITZ, D.: Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 70 (2009), S. 245–255
- [107] BRANDES, M. ; WILLIMANN, K. ; MOSER, B.: Professional antigen-presentation function by human gamma-delta T Cells. *Science* 309 (2005), S. 264–268
- [108] MOSER, B. ; EBERL, M.:  $\gamma\delta$  T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunological Reviews* 215 (2007), S. 89–102
- [109] BRANDES, M. ; WILLIMANN, K. ; BIOLEY, G. ; LÉVY, N. ; EBERL, M. ; LUO, M. ; TAMPE, R. ; LÉVY, F. ; ROMERO, P. ; MOSER, B.: Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8<sup>+</sup> alphabeta T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009), S. 2307–2312
- [110] EBERL, M. ; ROBERTS, G. W. ; MEUTER, S. ; WILLIAMS, J. D. ; TOPLEY, N. ; MOSER, B.: A rapid crosstalk of human gammadelta T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections. *PLoS Pathog.* 5 (2009), Nr. e1000308
- [111] WANDS, J. M. ; ROARK, C. L. ; AYDINTUG, M. K. ; JIN, N. ; HAHN, Y. S. ; COOK, L. ; YIN, X. ; DAL PORTO, J. ; LAHN, M. ; HYDE, D. M. ; GELFAND, E. W. ; MASON, R. J. ; O'BRIEN, R. L. ; BORN, W. K.: Distribution and leukocyte contacts of gammadelta T cells in the lung. *J. Leukoc. Biol.* 78 (2005), S. 1086–1096
- [112] LADEL, C. H. ; BLUM, C. ; KAUFMANN, S. H.: Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by gamma/delta T lymphocytes. *Infect. Immun.* 64 (1996), S. 1744–1749
- [113] PETERMANN, F. ; ROTHHAMMER, V. ; CLAUSSEN, M. C. ; HAAS, J. D. ; BLANCO, L. R. ; HEINK, S. ; PRINZ, I. ; HEMMER, B. ; KUCHROO, V. K. ; OUKKA, M. ; KORN, T.:  $\gamma\delta$  T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses *via* an interleukin-23-dependent mechanism. *Immunity* 33 (2010), S. 351–363

- [114] SHICHITA, T. ; SUGIYAMA, Y. ; OOBOSHI, H. ; SUGIMORI, H. ; NAKAGAWA, R. ; TAKADA, I. ; IWAKI, T. ; OKADA, Y. ; IIDA, M. ; CUA, D. J. ; IWAKURA, Y. ; YOSHIMURA, A.: Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadelta T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* 15 (2009), S. 946–950
- [115] CHO, J. S. ; PIETRAS, E. M. ; GARCIA, N. C. ; RAMOS, R. I. ; FARZAM, D. M. ; MONROE, H. R. ; MAGORIEN, J. E. ; BLAUVELT, A. ; KOLLS, J. K. ; CHEUNG, A. L. ; CHENG, G. ; MODLIN, R. L. ; MILLER, L. S.: IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J. Clin. Invest.* 120 (2010), S. 1762–1773
- [116] HAHN, Y. S. ; JI, X. Y. ; WOO, S. I. ; CHOI, Y. K. ; SONG, M. S. ; SHIN, K. S. ; JIN, N. ; O'BRIEN, R. L. ; BORN, W. K.: Vgamma1<sup>+</sup> gammadelta T cells reduce IL-10-producing CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the lung of ovalbumin-sensitized and challenged mice. *Immunol. Lett.* 121 (2008), S. 87–92
- [117] GONG, G. ; SHAO, L. ; WANG, Y. ; CHEN, C. Y. ; HUANG, D. ; YAO, S. ; ZHAN, X. ; SICARD, H. ; WANG, R. ; CHEN, Z. W.: Phosphoantigen-activated Vgamma2 Vdelta2 T cells antagonize IL-2-induced CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells in mycobacterial infection. *Blood* 113 (2009), S. 837–845
- [118] LIU, W. ; HUBER, S. A.: Cross-talk between CD1d-restricted NKT cells and  $\gamma\delta$  cells in T regulatory cell response. *Viro. J.* 8 (2011), Nr. 32
- [119] KUNZMANN, V. ; KIMMEL, B. ; HERRMANN, T. ; EINSELE, H. ; WILHELM, M.: Inhibition of phosphoantigen-mediated gammadelta T-cell proliferation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Immunology* 126 (2009), S. 256–267
- [120] GONCALVES-SOUSA, N. ; RIBOT, J. C. ; DEBARROS, A. ; CORREIA, D. V. ; CARAMALHO, I. ; SILVA-SANTOS, B.: Inhibition of murine gammadelta lymphocyte expansion and effector function by regulatory alphabeta T cells is cell-contact-dependent and sensitive to GITR modulation. *Eur. J. Immunol.* 40 (2010), S. 61–70
- [121] PARK, S. G. ; MATHUR, R. ; LONG, M. ; HOSH, N. ; HAO, L. ; HAYDEN, M. S. ; GHOSH, S.: T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing  $\gamma\delta$  T cells. *Immunity* 33 (2010), S. 791–803
- [122] HORNER, A. A. ; JABARA, H. ; RAMESH, N. ; GEHA, R. S.:  $\gamma/\delta$  T lymphocytes express CD40 ligand and induce isotype switching in B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181 (1995), S. 1239–1244
- [123] BANK, I. ; DEPINHO, R. A. ; BRENNER, M. B. ; CASSIMERIS, J. ; ALT, F. W. ; CHESSE, L.: A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322 (1986), S. 179–181
- [124] JANEWAY, C. A. ; JONES, B. ; HAYDAY, A.: Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. *Immunol. Today* 9 (1988), S. 73–76
- [125] KIM, C. H.: The greater chemotactic network for lymphocyte trafficking: chemokines and beyond. *Curr. Opin. Hematol.* 12 (2005), S. 298–304
- [126] ALLEN, S. J. ; CROWN, S. E. ; HANDEL, T. M.: Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007), S. 787–820
- [127] ROSSI, D. ; ZLOTNIK, A.: The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000), S. 217–242
- [128] KELNER, G. S. ; KENNEDY, J. ; BACON, K. B. ; KLEYENSTEUBER, S. ; LARGAESPADA, D. A. ; JENKINS, N. A. ; COPELAND, N. G. ; BAZAN, J. F. ; MOORE, K. W. ; SCHALL, T. J. ; ZLOTNIK, A.: Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266 (1994), S. 1395–1399
- [129] FREDERICK, M. J. ; CLAYMAN, G. L.: Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* 3 (2001), S. 1–18
- [130] ZLOTNIK, A. ; YOSHIE, O. ; NOMIYAMA, H.: The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 7 (2006), S. 243.1–243.11
- [131] MOSER, B. ; LOETSCHER, P.: Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.* 2 (2001), S. 123–128

- [132] LOETSCHER, P. ; MOSER, B. ; BAGGIOLINI, M.: Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv. Immunol.* 74 (2000), S. 127–180
- [133] SALLUSTO, F. ; MACKAY, C. R. ; LANZAVECCHIA, A.: The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 18 (2000), S. 593–620
- [134] VON ANDRIAN, U. H. ; MACKAY, C. R.: T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N. Engl. J. Med.* 343 (2000), S. 1020–1034
- [135] CYSTER, J. G.: Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286 (1999), S. 2098–2102
- [136] CAMPBELL, J. J. ; BUTCHER, E. C.: Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr. Opin. Immunol.* 12 (2000), S. 336–341
- [137] IUIS/WHO SUBCOMMITTEE ON CHEMOKINE NOMENCLATURE: Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001), S. 465–466
- [138] IUIS/WHO SUBCOMMITTEE ON CHEMOKINE NOMENCLATURE: Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Interferon Cytokine Res.* 22 (2002), S. 1067–1068
- [139] IUIS/WHO SUBCOMMITTEE ON CHEMOKINE NOMENCLATURE: Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J. Immunol. Methods* 262 (2002), S. 1–3
- [140] IUIS/WHO SUBCOMMITTEE ON CHEMOKINE NOMENCLATURE: Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 21 (2003), S. 48–49
- [141] NOMIYAMA, H. ; OSADA, N. ; YOSHIE, O.: A family tree of vertebrate chemokine receptors for a unified nomenclature. *Dev. Comp. Immunol.* 35 (2011), S. 705–715
- [142] OLSON, T. S. ; LEY, K.: Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 283 (2002), S. 7–28
- [143] MARELLI-BERG, F. M. ; CANNELLA, L. ; DAZZI, F. ; MIRENDA, V.: The highway code of T cell trafficking. *J. Pathol.* 214 (2008), S. 179–189
- [144] BROMLEY, S. K. ; MEMPEL, T. R. ; LUSTER, A. D.: Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. *Nat. Immunol.* 9 (2008), S. 970–980
- [145] ABI-YOUNES, S. ; SI-TAHAR, M. ; LUSTER, A. D.: The CC chemokines MDC and TARC induce platelet activation *via* CCR4. *Thromb. Res.* 101 (2001), S. 279–289
- [146] MOSER, B. ; WOLF, M. ; WALZ, A. ; LOETSCHER, P.: Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 25 (2004), S. 75–84
- [147] CAMPBELL, J. J. ; HARALDSEN, G. ; PAN, J. ; ROTTMAN, J. ; QIN, S. ; PONATH, P. ; ANDREW, D. P. ; WARNKE, R. ; RUFFING, N. ; KASSAM, N. ; WU, L. ; BUTCHER, E. C.: The chemokine receptor CCR4 in vascular recognition by cutaneous but not intestinal memory T cells. *Nature* 400 (1999), S. 776–780
- [148] MORALES, J. ; HOMEY, B. ; VICARI, A. P. ; HUDAK, S. ; OLDHAM, E. ; HEDRICK, J. ; OROZCO, R. ; COPELAND, N. G. ; JENKINS, N. A. ; McEVOY, L. M. ; ZLOTNIK, A.: CTACK, a skin-associated chemokine that preferentially attracts skin-homing memory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (1999), S. 14470–14475
- [149] GONZALO, J. A. ; PAN, Y. ; LLOYD, C. M. ; JIA, G. Q. ; YU, G. ; DUSSAULT, B. ; POWERS, C. A. ; PROUDFOOT, A. E. ; COYLE, A. J. ; GEARING, D. ; GUTIERREZ-RAMOS, J. C.: Mouse monocyte-derived chemokine is involved in airway hyperreactivity and lung inflammation. *J. Immunol.* 163 (1999), S. 403–411
- [150] YONEYAMA, H. ; HARADA, A. ; IMAI, T. ; BABA, M. ; YOSHIE, O. ; ZHANG, Y. ; HIGASHI, H. ; MURAI, M. ; ASAKURA, H. ; MATSUSHIMA, K.: Pivotal role of TARC, a CC chemokine, in bacteria-induced fulminant hepatic failure in mice. *J. Clin. Invest.* 102 (1998), S. 1933–1941

- [151] TANG, H. L. ; CYSTER, J. G.: Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284 (1999), S. 819–822
- [152] MELCHERS, F. ; ROLINK, A. G. ; SCHANIEL, C.: The role of chemokines in regulating cell migration during humoral immune responses. *Cell* 99 (1999), S. 351–354
- [153] SALLUSTO, F. ; KREMMER, E. ; PALERMO, B. ; HOY, A. ; PONATH, P. ; QIN, S. ; FÖRSTER, R. ; LIPP, M. ; LANZAVECCHIA, A.: Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur. J. Immunol.* 29 (1999), S. 2037–2045
- [154] SALLUSTO, F. ; LENIG, D. ; MACKAY, C. R. ; LANZAVECCHIA, A.: Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187 (1998), S. 875–883
- [155] BONECCHI, R. ; BIANCHI, G. ; BORDIGNON, P. P. ; D'AMBROSIO, D. ; LANG, R. ; BORSATTI, A. ; SOZZANI, S. ; ALLAVENA, P. ; GRAY, P. A. ; MANTOVANI, A. ; SINIGAGLIA, F.: Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (T<sub>h</sub>1s) and T<sub>h</sub>2s. *J. Exp. Med.* 187 (1998), S. 129–134
- [156] D'AMBROSIO, D. ; IELEEM, A. ; BONECCHI, R. ; MAZZEO, D. ; SOZZANI, S. ; MANTOVANI, A. ; SINIGAGLIA, F.: Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 T<sub>h</sub> cells. *J. Immunol.* 161 (1998), S. 5111–5115
- [157] SCHANIEL, C. ; PARDALI, E. ; SALLUSTO, F. ; SPELETAS, M. ; RUEDL, C. ; SHIMIZU, T. ; SEIDL, T. ; ANDERSSON, J. ; MELCHERS, F. ; ROLINK, A. G. ; SIDERAS, P.: Activated murine B lymphocytes and dendritic cells produce a novel CC chemokine which acts selectively on activated T cells. *J. Exp. Med.* 188 (1998), S. 451–463
- [158] KATOU, F. ; OHTANI, H. ; NAKAYAMA, T. ; ONO, K. ; MATSUSHIMA, K. ; SAARISTO, A. ; NAGURA, H. ; YOSHIE, O. ; MOTEGI, K.: Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and CCR4 are involved in the formation of T lymphocyte-dendritic cell clusters in human inflamed skin and secondary lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* 158 (2001), S. 1263–1270
- [159] CHEN, D. ; BROMBERG, J. S.: T regulatory cells and migration. *Am. J. Transplant.* 6 (2006), S. 1518–1523
- [160] CORCIONE, A. ; TORTOLINA, G. ; BONECCHI, R. ; BATTILANA, N. ; TABORELLI, G. ; MALAVASI, F. ; SOZZANI, S. ; OTTONELLO, L. ; DALLEGRI, F. ; PISTOIA, V.: Chemotaxis of human tonsil B lymphocytes to CC chemokine receptor (CCR) 1, CCR2 and CCR4 ligands is restricted to non-germinal center cells. *Int. Immunol.* 14 (2002), S. 883–892
- [161] JUREMALM, M. ; OLSSON, N. ; NILSSON, G.: Selective CCL5/RANTES-induced mast cell migration through interactions with chemokine receptors CCR1 and CCR4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 297 (2002), S. 480–485
- [162] AYEHUNIE, S. ; GARCIA-ZEPEDA, E. A. ; HOXIE, J. A. ; HORUK, R. ; KUPPER, T. S. ; LUSTER, A. D. ; RUPRECHT, R. M.: Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors. *Blood* 90 (1997), S. 1379–1386
- [163] SALCEDO, R. ; YOUNG, H. A. ; PONCE, M. L. ; WARD, J. M. ; KLEINMAN, H. K. ; MURPHY, W. J. ; OPPENHEIM, J. J.: Eotaxin (CCL11) induces *in vivo* angiogenic responses by human CCR3<sup>+</sup> endothelial cells. *J. Immunol.* 166 (2001), S. 7571–7578
- [164] BABA, M. ; IMAI, T. ; NISHIMURA, M. ; KAKIZAKI, M. ; TAKAGI, S. ; HIESHIMA, K. ; NOMIYAMA, H. ; YOSHIE, O.: Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), S. 14893–14898
- [165] POWER, C. A. ; CHURCH, D. J. ; MEYER, A. ; ALOUANI, S. ; PROUDFOOT, A. E. ; CLARK-LEWIS, I. ; SOZZANI, S. ; MANTOVANI, A. ; WELLS, T. N.: Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3alpha from lung dendritic cells. *J. Exp. Med.* 186 (1997), S. 825–835

- [166] HIESHIMA, K. ; IMAI, T. ; OPDENAKKER, G. ; VAN DAMME, J. ; KUSUDA, J. ; TEI, H. ; SAKAKI, Y. ; TAKATSUKI, K. ; MIURA, R. ; YOSHIE, O. ; NOMIYAMA, H.: Molecular cloning of a novel human CC chemokine liver and activation-regulated chemokine (LARC) expressed in liver. Chemotactic activity for lymphocytes and gene localization on chromosome 2. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), S. 5846–5853
- [167] TOHYAMA, M. ; SHIRAKARA, Y. ; YAMASAKI, K. ; SAYAMA, K. ; HASHIMOTO, K.: Differentiated keratinocytes are responsible for TNF-alpha regulated production of macrophage inflammatory protein 3alpha/CCL20, a potent chemokine for Langerhans cells. *J. Dermatol. Sci.* 27 (2001), S. 130–139
- [168] SCHMUTH, M. ; NEYER, S. ; RAINER, C. ; GRASSEGGER, A. ; FRITSCH, P. ; ROMANI, N. ; HEUFLER, C.: Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp. Dermatol.* 11 (2002), S. 135–142
- [169] IZADPANAH, A. ; DWINELL, M. B. ; ECKMANN, L. ; VARKI, N. M. ; KAGNOFF, M. F.: Regulated MIP-3alpha/CCL20 production by human intestinal epithelium: mechanism for modulating mucosal immunity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280 (2001), S. G710–719
- [170] KWON, J. H. ; KEATES, S. ; BASSANI, L. ; MAYER, L. F. ; KEATES, A. C.: Colonic epithelial cells are a major site of macrophage inflammatory protein 3alpha (MIP-3alpha) production in normal colon and inflammatory bowel disease. *Gut* 51 (2002), S. 818–826
- [171] LIAO, F. ; RABIN, R. L. ; SMITH, C. S. ; SHARMA, G. ; NUTMAN, T. B. ; FARBER, J. M.: CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 alpha. *J. Immunol.* 162 (1999), S. 186–194
- [172] KIM, C. H. ; JOHNSTON, B. ; BUTCHER, E. C.: Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100 (2002), S. 11–16
- [173] SINGH, S. P. ; ZHANG, H. H. ; FOLEY, J. F. ; HEDRICK, M. N. ; FARBER, J. M.: Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. *J. Immunol.* 180 (2008), S. 214–221
- [174] GLATZEL, A. ; WESCH, D. ; SCHIEMANN, F. ; BRANDT, E. ; JANSSEN, O. ; KABELITZ, D.: Patterns of chemokine receptor expression on peripheral blood  $\gamma\delta$  T lymphocytes: strong expression of CCR5 is a selective feature of V $\delta$ 2/V $\gamma$ 9  $\gamma\delta$  T cells. *J. Immunol.* 168 (2002), S. 4920–4929
- [175] KABELITZ, D. ; WESCH, D.: Features and functions of  $\gamma\delta$  T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit. Rev. Immunol.* 23 (2003), S. 339–370
- [176] DIEU-NOSJEAN, M. C. ; MASSACRIER, C. ; HOMEY, B. ; VANBERVLIET, B. ; PIN, J. J. ; VICARI, A. ; LEBECQUE, S. ; DEZUTTER-DAMBUYANT, C. ; SCHMITT, D. ; ZLOTNIK, A. ; CAUX, C.: Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J. Exp. Med.* 192 (2000), S. 705–718
- [177] HOMEY, B. ; DIEU-NOSJEAN, M. C. ; WIESENBNORN, A. ; MASSACRIER, C. ; PIN, J. J. ; OLDDHAM, E. ; CATRON, D. ; BUCHANAN, M. E. ; MÜLLER, A. ; MALEFYT, R. deWaal ; DENG, G. ; OROZCO, R. ; RUZICKA, T. ; LEHMANN, P. ; LEBECQUE, S. ; CAUX, C. ; ZLOTNIK, A.: Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J. Immunol.* 164 (2000), S. 6621–6632
- [178] LAGGNER, U. ; DI MEGLIO, P. ; PERERA, G. K. ; HUNDHAUSEN, C. ; LACY, K. E. ; ALI, N. ; SMITH, C. H. ; HAYDAY, A. C. ; NICKOLOFF, B. J. ; NESTLE, F. O.: Identification of a novel proinflammatory human skin-homing V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cell subset with a potential role in psoriasis. *J. Immunol.* 187 (2011), S. 2783–2793
- [179] YANG, D. ; CHERTOV, O. ; BYKOVSKAIA, S. N. ; CHEN, Q. ; BUFFO, M. J. ; SHOGAN, J. ; ANDERSON, M. ; SCHRÖDER, J. M. ; WANG, J. M. ; HOWARD, O. M. ; OPPENHEIM, J. J.: Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 286 (1999), S. 525–528

- [180] HOOVER, D. M. ; BOULEGUE, C. ; YANG, D. ; OPPENHEIM, J. J. ; TUCKER, K. ; LU, W. ; LUBKOWSKI, J.: The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 37647–37654
- [181] ZABALLOS, A. ; GUTIÉRREZ, J. ; VARONA, R. ; ARDAVIN, C. ; MÁRQUEZ, G.: Cutting edge: identification of the orphan chemokine receptor GPR-9-6 as CCR9, the receptor for the chemokine TECK. *J. Immunol.* 162 (1999), S. 5671–5675
- [182] WURBEL, M. A. ; PHILIPPE, J. M. ; NGUYEN, C. ; VICTORERO, G. ; FREEMAN, T. ; WOODING, P. ; MIAZEK, A. ; MATTEI, M. G. ; MALISSEN, M. ; JORDAN, B. R. ; MALISSEN, B. ; CARRIER, A. ; NAQUET, P.: The chemokine TECK is expressed by thymic and intestinal epithelial cells and attracts double- and single-positive thymocytes expressing the TECK receptor CCR9. *Eur. J. Immunol.* 30 (2000), S. 262–271
- [183] PAPADAKIS, K. A. ; PREHN, J. ; NELSON, V. ; CHENG, L. ; BINDER, S. W. ; PONATH, P. D. ; ANDREW, D. P. ; TARGAN, S. R.: The role of thymus-expressed chemokine and its receptor CCR9 on lymphocytes in the regional specialization of the mucosal immune system. *J. Immunol.* 165 (2000), S. 5069–5076
- [184] ENDRES, M. ; ANDREAS, K. ; KALWITZ, G. ; FREYMAN, U. ; NEUMANN, K. ; RINGE, J. ; SITTINGER, M. ; HAUPL, T. ; KAPS, C.: Chemokine profile of synovial fluid from normal, osteoarthritis and rheumatoid arthritis patients: CCL25, CXCL10 and XCL1 recruit human subchondral mesenchymal progenitor cells. *Osteoarthr. Cartil.* 18 (2010), S. 1458–1466
- [185] SCHMUTZ, C. ; CARTWRIGHT, A. ; WILLIAMS, H. ; HAWORTH, O. ; WILLIAMS, J. H. ; FILER, A. ; SALMON, M. ; BUCKLEY, C. D. ; MIDDLETON, J.: Monocytes/macrophages express chemokine receptor CCR9 in rheumatoid arthritis and CCL25 stimulates their differentiation. *Arthritis Res. Ther.* 12 (2010), Nr. R161
- [186] YU, C. R. ; PEDEN, K. W. ; ZAITSEVA, M. B. ; GOLDING, H. ; FARBER, J. M.: CCR9A and CCR9B: two receptors for the chemokine CCL25/TECK/Ck beta-15 that differ in their sensitivities to ligand. *J. Immunol.* 164 (2000), S. 1293–1305
- [187] ZABEL, B. A. ; AGACE, W. W. ; CAMPBELL, J. J. ; HEATH, H. M. ; PARENT, D. ; ROBERTS, A. I. ; EBERT, E. C. ; KASSAM, N. ; QIN, S. ; ZOVKO, M. ; LAROSA, G. J. ; YANG, L. L. ; SOLER, D. ; BUTCHER, E. C. ; PONATH, P. D. ; PARKER, C. M. ; ANDREW, D. P.: Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J. Exp. Med.* 190 (1999), S. 1241–1256
- [188] FARBER, J. M.: Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997), S. 246–257
- [189] COLE, K. E. ; STRICK, C. A. ; PARADIS, T. J. ; OGBORNE, K. T. ; LOETSCHER, M. ; GLADUE, R. P. ; LIN, W. ; BOYD, J. G. ; MOSER, B. ; WOOD, D. E. ; SAHAGAN, B. G. ; NEOTE, K.: Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J. Exp. Med.* 187 (1998), S. 2009–2021
- [190] CHEN, S. C. ; DE GROOT, M. ; KINSLEY, D. ; LAVERTY, M. ; McCLANAHAN, T. ; ARREAZA, M. ; GUSTAFSON, E. L. ; TEUNISSEN, M. B. ; DE RIE, M. A. ; FINE, J. S. ; KRAAN, M.: Expression of chemokine receptor CXCR3 by lymphocytes and plasmacytoid dendritic cells in human psoriatic lesions. *Arch. Dermatol. Res.* 302 (2010), S. 113–123
- [191] HOWARD, O. M. ; DONG, H. F. ; SU, S. B. ; CASPI, R. R. ; CHEN, X. ; PLOTZ, P. ; OPPENHEIM, J. J.: Autoantigens signal through chemokine receptors: uveitis antigens induce CXCR3- and CXCR5-expressing lymphocytes and immature dendritic cells to migrate. *Blood* 105 (2005), S. 4207–4214
- [192] KOHRGRUBER, N. ; GRÖGER, M. ; MERANER, P. ; KRIEHLER, E. ; PETZELBAUER, P. ; BRANDT, S. ; STINGL, G. ; ROT, A. ; MAURER, D.: Plasmacytoid dendritic cell recruitment by immobilized CXCR3 ligands. *J. Immunol.* 173 (2004), S. 6592–6602
- [193] INNGJERDINGEN, M. ; DAMAJ, B. ; MAGHAZACHI, A. A.: Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97 (2001), S. 367–375

- [194] KUNKEL, E. J. ; BUTCHER, E. C.: Plasma-cell homing. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003), S. 822–829
- [195] GUARDA, G. ; HONS, M. ; SORIANO, S. F. ; HUANG, A. Y. ; POLLEY, R. ; MARTIN-FONTECHA, A. ; STEIN, J. V. ; GERMAIN, R. N. ; LANZAVECCHIA, A. ; SALLUSTO, F.: L-selectin-negative CCR7- effector and memory CD8<sup>+</sup> T cells enter reactive lymph nodes and kill dendritic cells. *Nat. Immunol.* 8 (2007), S. 743–752
- [196] ACOSTA-RODRIGUEZ, E. V. ; RIVINO, L. ; GEGINAT, J. ; JARROSSAY, D. ; GATTORNO, M. ; LANZAVECCHIA, A. ; SALLUSTO, F. ; NAPOLITANI, G.: Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat. Immunol.* 8 (2007), S. 639–646
- [197] MÜLLER, M. ; CARTER, S. L. ; HOFER, M. J. ; MANDERS, P. ; GETTS, D. R. ; GETTS, M. T. ; DREYKLUFT, A. ; LU, B. ; GERARD, C. ; KING, N. J. ; CAMPBELL, I. L.: CXCR3 signaling reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling the parenchymal distribution of effector and regulatory T cells in the central nervous system. *J. Immunol.* 179 (2007), S. 2774–2786
- [198] ROMAGNANI, P. ; ANNUNZIATO, F. ; LAZZERI, E. ; COSMI, L. ; BELTRAME, C. ; LASAGNI, L. ; GALLI, G. ; FRANCALANCI, M. ; MANETTI, R. ; MARRA, F. ; VANINI, V. ; MAGGI, E. ; ROMAGNANI, S.: Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> single-positive T cells, TCRgammadelta<sup>+</sup> T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood* 97 (2001), S. 601–607
- [199] POGGI, A. ; CAROSIO, R. ; FENOGLIO, D. ; BRENCI, S. ; MURDACA, G. ; SETTI, M. ; INDIVERI, F. ; SCABINI, S. ; FERRERO, E. ; ZOCCHI, M. R.: Migration of Vdelta1 and Vdelta2 T cells in response to CXCR3 and CXCR4 ligands in healthy donors and HIV-1-infected patients: competition by HIV-1 Tat. *blood* 103 (2004), S. 2205–2213
- [200] DWINELL, M. B. ; LUGERING, N. ; ECKMANN, L. ; KAGNOFF, M. F.: Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120 (2001), S. 49–59
- [201] NAKAJIMA, C. ; MUKAI, T. ; YAMAGUCHI, N. ; MORIMOTO, Y. ; PARK, W. R. ; IWASAKI, M. ; GAO, P. ; ONO, S. ; FUJIWARA, H. ; HAMAOKA, T.: Induction of the chemokine receptor CXCR3 on TCR-stimulated T cells: dependence on the release from persistent TCR-triggering and requirement for IFN-gamma stimulation. *Eur. J. Immunol.* 32 (2002), S. 1792–1801
- [202] GANGUR, V. ; SIMONS, F. E. ; HAYGLASS, K. T.: Human IP-10 selectively promotes dominance of polyclonally activated and environmental antigen-driven IFN-gamma over IL-4 responses. *FASEB J.* 12 (1998), S. 705–713
- [203] LACOTTE, S. ; BRUN, S. ; MULLER, S. ; DUMORTIER, H.: CXCR3, inflammation, and autoimmune diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1173 (2009), S. 310–317
- [204] FLIER, J. ; BOORSMA, D. M. ; VAN BEEK, P. J. ; NIEBOER, C. ; STOOF, T. J. ; WILLEMZE, R. ; TENSEN, C. P.: Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J. Pathol.* 194 (2001), S. 398–405
- [205] YUAN, Y. H. ; TEN HOVE, T. ; THE, F. O. ; SLORS, J. F. ; VAN DEVENTER, S. J. ; TE VELDE, A. A.: Chemokine receptor CXCR3 expression in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 7 (2001), S. 281–286
- [206] QIN, S. ; ROTTMAN, J. B. ; MYERS, P. ; KASSAM, N. ; WEINBLATT, M. ; LOETSCHER, M. ; KOCH, A. E. ; MOSER, B. ; MACKAY, C. R.: The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions. *J. Clin. Invest.* 101 (1998), S. 746–754
- [207] MATLOUBIAN, M. ; DAVID, A. ; ENGEL, S. ; RYAN, J. E. ; CYSTER, J. G.: A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat. Immunol.* 1 (2000), S. 298–304

- [208] VAN DER VOORT, R. ; VAN LIESHOUT, A. W. ; TOONEN, L. W. ; SLÖETJES, A. W. ; VAN DEN BERG, W. B. ; FIGDOR, C. G. ; RADSTAKE, T. R. ; ADEMA, G. J.: Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum.* 52 (2005), S. 1381–1391
- [209] ABEL, S. ; HUNDHAUSEN, C. ; MENTLEIN, R. ; SCHULTE, A. ; BERKHOUT, T. A. ; BROADWAY, N. ; HARTMANN, D. ; SEDLACEK, R. ; DIETRICH, S. ; MUETZE, B. ; SCHUSTER, B. ; KALLEN, K. J. ; SAFTIG, P. ; ROSE-JOHN, S. ; LUDWIG, A.: The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immunol.* 172 (2004), S. 6362–6372
- [210] TOHYAMA, M. ; SAYAMA, K. ; KOMATSUZAWA, H. ; HANAKAWA, Y. ; SHIRAKATA, Y. ; DAI, X. ; YANG, L. ; TOKUMARU, S. ; NAGAI, H. ; HIRAKAWA, S. ; SUGAI, M. ; HASHIMOTO, K.: CXCL16 is a novel mediator of the innate immunity of epidermal keratinocytes. *Int. Immunol.* 19 (2007), S. 1095–1102
- [211] VAN DER VOORT, R. ; VERWEIJ, V. ; DE WITTE, T. M. ; LASONDER, E. ; ADEMA, G. J. ; DOLSTRA, H.: An alternatively spliced CXCL16 isoform expressed by dendritic cells is a secreted chemoattractant for CXCR6<sup>+</sup> cells. *J. Leukoc. Biol.* 87 (2010), S. 1029–1039
- [212] UNUTMAZ, D. ; XIANG, W. ; SUNSHINE, M. J. ; CAMPBELL, J. ; BUTCHER, E. ; LITTMAN, D. R.: The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its expression pattern is conserved between human and mouse. *J. Immunol.* 165 (2000), S. 3284–3292
- [213] THOMAS, S. Y. ; HOU, R. ; BOYSON, J. E. ; MEANS, T. K. ; HESS, C. ; OLSON, D. P. ; STROMINGER, J. L. ; BRENNER, M. B. ; GUMPERZ, J. E. ; WILSON, S. B. ; LUSTER, A. D.: CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of T<sub>H</sub>1-type inflammatory homing cells. *J. Immunol.* 171 (2003), S. 2571–2580
- [214] LIM, H. W. ; LEE, J. ; HILLSAMER, P. ; KIM, C. H.: Human T<sub>H</sub>17 cells share major trafficking receptors with both polarized effector T cells and FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* 180 (2008), S. 122–129
- [215] LIM, H. W. ; BROXMEYER, H. E. ; KIM, C. H.: Regulation of trafficking receptor expression in human forkhead box P3<sup>+</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* 177 (2006), S. 840–851
- [216] KIM, C. H. ; KUNKEL, E. J. ; BOISVERT, J. ; JOHNSTON, B. ; CAMPBELL, J. J. ; GENOVESE, M. C. ; GREENBERG, H. B. ; BUTCHER, E. C.: Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J. Clin. Invest.* 107 (2001), S. 595–601
- [217] KUMAR, H. ; KAWAI, T. ; AKIRA, S.: Pathogen recognition by the innate immune system. *Int. Rev. Immunol.* 30 (2011), S. 16–34
- [218] OPITZ, B. ; EITEL, J. ; MEIXENBERGER, K. ; SUTTORP, N.: Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections. *Thromb. Haemost.* 102 (2009), S. 1103–1109
- [219] BELVIN, M. P. ; ANDERSON, K. V.: A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12 (1996), S. 393–416
- [220] BASSETT, E. H. ; RICH, T.: Toll Receptors and the Renaissance of Innate Immunity. In: RICH, T. (Hrsg.): *Toll and Toll-Like Receptors: An Immunologic Perspective*. Georgetown: Landes Bioscience / Eurekah.com, New York: Kluwer Academic / Plenum Publisher, 2005, S. 1–17
- [221] LEMAITRE, B. ; NICOLAS, E. ; MICHAUT, L. ; REICHHART, J. M. ; HOFFMANN, J. A.: The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86 (1996), S. 973–983
- [222] LIGOXYGAKIS, P. ; BULET, P. ; REICHHART, J. M.: Critical evaluation of the role of the Toll-like receptor 18-Wheeler in the host defense of *Drosophila*. *EMBO Rep.* 3 (2002), S. 666–673
- [223] O'NEILL, L. A. ; BRYANT, C. E. ; DOYLE, S. L.: Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer. *Pharmacol. Rev.* 61 (2009), S. 177–197



- [224] RAKOFF-NAHOUM, S. ; MEDZHITOV, R.: Toll-like receptors and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 9 (2009), S. 57–63
- [225] MATZINGER, P.: The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296 (2002), S. 301–305
- [226] BIRAGYN, A. ; RUFFINI, P. A. ; LEIFER, C. A. ; KLYUSHNENKOVA, E. ; SHAKHOV, A. ; CHERTOV, O. ; SHIRAKAWA, A. K. ; FARBER, J. M. ; SEGAL, D. M. ; OPPENHEIM, J. J. ; KWAK, L. W.: Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 298 (2002), S. 1025–1029
- [227] HOLD, G. L. ; EL-OMAR, E. M.: Genetic aspects of inflammation and cancer. *Biochem. J.* 410 (2008), S. 225–235
- [228] ROELOFS, M. F. ; BOELENS, W. C. ; JOOSTEN, L. A. ; ABDOLLAHI-ROODSAZ, S. ; GEURTS, J. ; WUNDERINK, L. U. ; SCHREURS, B. W. ; VAN DEN BERG, W. B. ; RADSTAKE, T. R.: Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 176 (2006), S. 7021–7027
- [229] CHANG, Z. L.: Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm. Res.* 59 (2010), S. 791–808
- [230] FUKATA, M. ; CHEN, A. ; KLEPPER, A. ; KRISHNAREDDY, S. ; VAMADEVAN, A. S. ; THOMAS, L. S. ; XU, R. ; INOUE, H. ; ARDITI, M. ; DANNENBERG, A. J. ; ABREU, M. T.: Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 131 (2006), S. 862–877
- [231] KIM, D. ; KIM, M. A. ; CHO, I. H. ; KIM, M. S. ; LEE, S. ; JO, E. K. ; CHOI, S. Y. ; PARK, K. ; KIM, J. S. ; AKIRA, S. ; NA, H. S. ; OH, S. B. ; LEE, S. J.: A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J. Biol. Chem.* 282 (2007), S. 14975–14983
- [232] RAKOFF-NAHOUM, S. ; MEDZHITOV, R.: Role of toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochemistry Mosc.* 73 (2008), S. 555–561
- [233] ZHANG, D. ; ZHANG, G. ; HAYDEN, M. S. ; GREENBLATT, M. B. ; BUSSEY, C. ; FLAVELL, R. A. ; GHOSH, S.: A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 303 (2004), S. 1522–1526
- [234] UEMATSU, S. ; AKIRA, S.: Toll-like receptors and Type I interferons. *J. Biol. Chem.* 282 (2007), S. 15319–15323
- [235] KUMAR, H. ; KAWAI, T. ; AKIRA, S.: Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388 (2009), S. 621–625
- [236] HASAN, U. ; CHAFFOIS, C. ; GAILLARD, C. ; SAULNIER, V. ; MERCK, E. ; TANCREDI, S. ; GUIET, C. ; BRIÈRE, F. ; VLACH, J. ; LEBECQUE, S. ; TRINCHIERI, G. ; BATES, E. E.: Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.* 174 (2005), S. 2942–2950
- [237] CHATURVEDI, A. ; PIERCE, S. K.: How location governs toll-like receptor signaling. *Traffic* 10 (2009), S. 621–628
- [238] LATZ, E. ; SCHOENEMEYER, A. ; VISINTIN, A. ; FITZGERALD, K. A. ; MONKS, B. G. ; KNETTER, C. F. ; LIEN, E. ; NILSEN, N. J. ; ESPEVIK, T. ; GOLENBOCK, D. T.: TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 5 (2004), S. 190–198
- [239] NISHIYA, T. ; KAJITA, E. ; MIWA, S. ; DEFRANCO, A. L.: TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J. Biol. Chem.* 280 (2005), S. 37107–37117
- [240] FLUHR, R. ; KAPLAN-LEVY, R. N.: Plant disease resistance: commonality and novelty in multicellular innate immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270 (2002), S. 23–46
- [241] DEETZ, C. O. ; HEBBELER, A. M. ; PROPP, N. A. ; CAIRO, C. ; TIKHONOV, I. ; PAUZA, C. D.: Gamma interferon secretion by human Vgamma2/Vdelta2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-Like receptor 2 agonist Pam<sub>3</sub>Cys. *Infect. Immun.* 74 (2006), S. 4505–4511

- [242] KUNZMANN, V. ; KRETZSCHMAR, E. ; HERRMANN, T. ; WILHELM, M.: Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells *via* CD11c dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology* 112 (2004), S. 369–377
- [243] GIRARDIN, S. E. ; SANSONETTI, P. J. ; PHILPOTT, D. J.: Intracellular *vs* extracellular recognition of pathogens—common concepts in mammals and flies. *Trends Microbiol.* 10 (2002), S. 193–199
- [244] INOHARA, N. ; OGURA, Y. ; NUÑEZ, G.: Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 5 (2002), S. 76–80
- [245] INOHARA, N. ; NUÑEZ, G.: NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003), S. 371–382
- [246] TSCHOPP, J. ; MARTINON, F. ; BURNS, K.: NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003), S. 95–104
- [247] SHAW, P. J. ; LAMKANFI, M. ; KANNEGANTI, T. D.: NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. *Eur. J. Immunol.* 40 (2010), S. 624–627
- [248] MOORE, C. B. ; BERGSTRALH, D. T. ; DUNCAN, J. A. ; LEI, Y. ; MORRISON, T. E. ; ZIMMERMANN, A. G. ; ACCAVITTI-LOPER, M. A. ; MADDEN, V. J. ; SUN, L. ; YE, Z. ; LICH, J. D. ; HEISE, M. T. ; CHEN, Z. ; TING, J. P.: NLRX1 is a regulator of mitochondrial antiviral immunity. *Nature* 451 (2008), S. 573–577
- [249] OGURA, Y. ; BONEN, D. K. ; INOHARA, N. ; NICOLAE, D. L. ; CHEN, F. F. ; RAMOS, R. ; BRITTON, H. ; MORAN, T. ; KARALIUSKAS, R. ; DUERR, R. H. ; ACHKAR, J. P. ; BRANT, S. R. ; BAYLESS, T. M. ; KIRSCHNER, B. S. ; HANAUER, S. B. ; NUÑEZ, G. ; CHO, J. H.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn’s disease. *Nature* 411 (2001), S. 603–606
- [250] HUGOT, J. P.: CARD15/NOD2 mutations in Crohn’s disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072 (2006), S. 9–18
- [251] MICELI-RICHARD, C. ; LESAGE, S. ; RYBOJAD, M. ; PRIEUR, A. M. ; MANOUVRIER-HANU, S. ; HÄFNER, R. ; CHAMAILLARD, M. ; ZOUALI, H. ; THOMAS, G. ; HUGOT, J. P.: CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat. Genet.* 29 (2001), S. 19–20
- [252] HUMANN, J. ; LENZ, L. L.: Bacterial peptidoglycan degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *J. Innate Immun* 1 (2009), S. 88–97
- [253] GIRARDIN, S. E. ; BONECA, I. G. ; VIALA, J. ; CHAMAILLARD, M. ; LABIGNE, A. ; THOMAS, G. ; PHILPOTT, D. J. ; SANSONETTI, P. J.: Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.* 278 (2003), S. 8869–8872
- [254] INOHARA, N. ; OGURA, Y. ; FONTALBA, A. ; GUTIERREZ, O. ; PONS, F. ; CRESPO, J. ; FUKASE, K. ; INAMURA, S. ; KUSUMOTO, S. ; HASHIMOTO, M. ; FOSTER, S. J. ; MORAN, A. P. ; FERNANDEZ-LUNA, J. L. ; NUÑEZ, G.: Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn’s disease. *J. Biol. Chem.* 278 (2003), S. 5509–5512
- [255] ELLOUZ, F. ; ADAM, A. ; CIORBARU, R. ; LEDERER, E.: Minimal structural requirements for adjuvant activity of bacterial peptidoglycan derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 59 (1974), S. 1317–1325
- [256] WILMANSKI, J. M. ; PETNICKI-OCWIEJA, T. ; KOBAYASHI, K. S.: NLR proteins: integral members of innate immunity and mediators of inflammatory diseases. *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008), S. 13–30
- [257] FRITZ, J. H. ; GIRARDIN, S. E.: How Toll-like receptors and Nod-like receptors contribute to innate immunity in mammals. *J. Endotoxin Res.* 11 (2005), S. 390–394
- [258] GIRARDIN, S. E. ; BONECA, I. G. ; CARNEIRO, L. A. ; ANTIGNAC, A. ; JÉHANNO, M. ; VIALA, J. ; TEDIN, K. ; TAHA, M. K. ; LABIGNE, A. ; ZÄHRINGER, U. ; COYLE, A. J. ; DiSTEFANO, P. S. ; BERTIN, J. ; SANSONETTI, P. J. ; PHILPOTT, D. J.: Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science* 300 (2003), S. 1584–1587

- [259] GUPTA, D. K. ; THEISEN, N. ; VON FIGURA, K. ; HASILIK, A.: Comparison of biosynthesis and subcellular distribution of lysozyme and lysosomal enzymes in U937 monocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 847 (1985), S. 217–222
- [260] BAUE, Arthur E. (Hrsg.) ; FRY, Donald (Hrsg.) ; FAIST, Eugen (Hrsg.): *Multiple Organ Failure: Pathophysiology, Prevention and Therapy*. 1. Springer, 2000
- [261] VERMEULEN, M. W. ; GRAY, G. R.: Processing of *Bacillus subtilis* peptidoglycan by a mouse macrophage cell line. *Infect. Immun.* 46 (1984), S. 476–483
- [262] MEYLAN, E. ; TSCHOPP, J. ; KARIN, M.: Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 442 (2006), S. 39–44
- [263] VAVRICKA, S. R. ; MUSCH, M. W. ; CHANG, J. E. ; NAKAGAWA, Y. ; PHANVIJHITSIRI, K. ; WAYPA, T. S. ; MERLIN, D. ; SCHNEEWIND, O. ; CHANG, E. B.: hPepT1 transports muramyl dipeptide, activating NF-kappaB and stimulating IL-8 secretion in human colonic Caco2/bbe cells. *Gastroenterology* 127 (2004), S. 1401–1409
- [264] HERSKOVITS, A. A. ; AUERBUCH, V. ; PORTNOY, D. A.: Bacterial ligands generated in a phagosome are targets of the cytosolic innate immune system. *PLoS Pathog.* 3 (2007), S. 431–443
- [265] WERTS, C. ; GIRARDIN, S. E. ; PHILPOTT, D. J.: TIR, CARD and PYRIN: three domains for an antimicrobial triad. *Cell Death Differ.* 13 (2006), S. 798–815
- [266] ISMAIR, M. G. ; VAVRICKA, S. R. ; KULLAK-UBLUCK, G. A. ; FRIED, M. ; MENGIN-LECREULX, D. ; GIRARDIN, S. E.: hPepT1 selectively transports muramyl dipeptide but not Nod1-activating muramyl peptides. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84 (2006), S. 1313–1319
- [267] KOBAYASHI, K. S. ; EYNON, E. E. ; FLAVELL, R. A.: Intracellular debugging. *Nat. Immunol.* 4 (2003), S. 652–654
- [268] BARNICH, N. ; AGUIRRE, J. E. ; REINECKER, H. C. ; XAVIER, R. ; PODOLSKY, D. K.: Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor-kappaB activation in muramyl dipeptide recognition. *J. Cell Biol.* 170 (2005), S. 21–26
- [269] LÉCINE, P. ; ESMIOL, S. ; MÉTAIS, J. Y. ; NICOLETTI, C. ; NOURRY, C. ; McDONALD, C. ; NUÑEZ, G. ; HUGOT, J. P. ; BORG, J. P. ; OLLENDORFF, V.: The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 282 (2007), S. 15197–15207
- [270] PHILPOTT, D. J. ; GIRARDIN, S. E.: Nod-like receptors: sentinels at host membranes. *Curr. Opin. Immunol.* 22 (2010), S. 428–434
- [271] TRAVASSOS, L. H. ; CARNEIRO, L. A. ; RAMJEET, M. ; HUSSEY, S. ; KIM, Y. G. ; MAGALHÃES, J. G. ; YUAN, L. ; SOARES, F. ; CHEA, E. ; LE BOURHIS, L. ; BONECA, I. G. ; ALLAOUI, A. ; JONES, N. L. ; NUÑEZ, G. ; GIRARDIN, S. E. ; PHILPOTT, D. J.: Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* 11 (2010), S. 55–62
- [272] COONEY, R. ; BAKER, J. ; BRAIN, O. ; DANIS, B. ; PICHULIK, T. ; ALLAN, P. ; FERGUSON, D. J. ; CAMPBELL, B. J. ; JEWELL, D. ; SIMMONS, A.: NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* 16 (2010), S. 90–97
- [273] TING, J. P. ; DUNCAN, J. A. ; LEI, Y.: How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. *Science* 327 (2010), S. 286–290
- [274] MAGALHAES, J. G. ; SORBARA, M. T. ; GIRARDIN, S. E. ; PHILPOTT, D. J.: What is new with Nods? *Curr. Opin. Immunol.* 23 (2011), S. 29–34
- [275] ROSENSTIEL, P. ; FANTINI, M. ; BRÄUTIGAM, K. ; KÜHBACHER, T. ; WAETZIG, G. H. ; SEEGERT, D. ; SCHREIBER, S.: TNF-alpha and IFN-gamma regulate the expression of the NOD2 (CARD15) gene in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 124 (2003), S. 1001–1009

- [276] LALA, S. ; OGURA, Y. ; OSBORNE, C. ; HOR, S. Y. ; BROMFIELD, A. ; DAVIES, S. ; OGUNBIYI, O. ; NUÑEZ, G. ; KESHAV, S.: Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 125 (2003), S. 47–57
- [277] UEHARA, A. ; FUJIMOTO, Y. ; FUKASE, K. ; TAKADA, H.: Various human epithelial cells express functional Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 to produce anti-microbial peptides, but not proinflammatory cytokines. *Mol. Immunol.* 44 (2007), S. 3100–3111
- [278] OGURA, Y. ; INOHARA, N. ; BENITO, A. ; CHEN, F. F. ; YAMAOKA, S. ; NUÑEZ, G.: Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 4812–4818
- [279] FRITZ, J. H. ; GIRARDIN, S. E. ; FITTING, C. ; WERTS, C. ; MENGIN-LECREULX, D. ; CAROFF, M. ; CAVAILLON, J. M. ; PHILPOTT, D. J. ; ADIB-CONQUY, M.: Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur. J. Immunol.* 35 (2005), S. 2459–2470
- [280] GUTIERREZ, O. ; PIPAON, C. ; INOHARA, N. ; FONTALBA, A. ; OGURA, Y. ; PROSPER, F. ; NUÑEZ, G. ; FERNANDEZ-LUNA, J. L.: Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells *via* nuclear factor-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 41701–41705
- [281] ATHIÉ-MORALES, V. ; O'CONNOR, G. M. ; GARDINER, C. M.: Activation of human NK cells by the bacterial pathogen-associated molecular pattern muramyl dipeptide. *J. Immunol.* 180 (2008), S. 4082–4089
- [282] PETTERSON, T. ; JENDHOLM, J. ; MÅNSSON, A. ; BJARTELL, A. ; RIESBECK, K. ; CARDELL, L. O.: Effects of NOD-like receptors in human B lymphocytes and crosstalk between NOD1/NOD2 and Toll-like receptors. *J. Leukoc. Biol.* 89 (2011), S. 177–187
- [283] O'NEILL, L. A.: Synergism between NOD-like receptors and Toll-like receptors in human B lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 89 (2011), S. 173–175
- [284] LECH, M. ; AVILA-FERRUFINO, A. ; SKUGINNA, V. ; SUSANTI, H. E. ; ANDERS, H. J.: Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int. Immunol.* 22 (2010), S. 717–728
- [285] PETTERSON, T. ; MÅNSSON, A. ; RIESBECK, K. ; CARDELL, L. O.: Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptors and retinoic acid inducible gene-like receptors in human tonsillar T lymphocytes. *Immunology* 133 (2011), S. 84–93
- [286] RAHMAN, M. K. ; MIDTLING, E. H. ; SVINGEN, P. A. ; XIONG, Y. ; BELL, M. P. ; TUNG, J. ; SMYRK, T. ; EGAN, L. J. ; FAUBION, W. A.: The pathogen recognition receptor NOD2 regulates human FOXP3<sup>+</sup> T cell survival. *J. Immunol.* 184 (2010), S. 7247–7256
- [287] KERNS, H. M. ; JUTILA, M. A. ; HEDGES, J. F.: The distinct response of gammadelta T cells to the Nod2 agonist muramyl dipeptide. *Cell. Immunol.* 257 (2009), S. 38–43
- [288] HEDGES, J. F. ; LUBICK, K. J. ; JUTILA, M. A.:  $\gamma\delta$  T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J. Immunol.* 174 (2005), S. 6045–6053
- [289] BACH, E. A. ; AGUET, M. ; SCHREIBER, R. D.: The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997), S. 563–591
- [290] YOUNG, H. A.: Regulation of interferon-gamma gene expression. *J. Interferon Cytokine Res.* 16 (1996), S. 563–568
- [291] FRUCHT, D. M. ; FUKAO, T. ; BOGDAN, C. ; SCHINDLER, H. ; O'SHEA, J. J. ; KOYASU, S.: IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22 (2001), S. 556–560
- [292] GESSANI, S. ; BELARDELLI, F.: IFN-gamma expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 (1998), S. 117–123

- [293] FLAISHON, L. ; HERSHKOVIZ, R. ; LANTNER, F. ; LIDER, O. ; ALON, R. ; LEVO, Y. ; FLAVELL, R. A. ; SHACHAR, I.: Autocrine secretion of interferon gamma negatively regulates homing of immature B cells. *J. Exp. Med.* 192 (2000), S. 1381–1388
- [294] HARRIS, D. P. ; HAYNES, L. ; SAYLES, P. C. ; DUSO, D. K. ; EATON, S. M. ; LEPAK, N. M. ; JOHNSON, L. L. ; SWAIN, S. L. ; LUND, F. E.: Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 1 (2000), S. 475–482
- [295] CARNAUD, C. ; LEE, D. ; DONNARS, O. ; PARK, S. H. ; BEAVIS, A. ; KOEZUKA, Y. ; BENDELAC, A.: Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J. Immunol.* 163 (1999), S. 4647–4650
- [296] WOOD, K. J. ; SAWITZKI, B.: Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells *in vivo*. *Trends Immunol.* 27 (2006), S. 183–187
- [297] OLIVEIRA, I. C. ; SCIAVOLINO, P. J. ; LEE, T. H. ; VILCEK, J.: Downregulation of interleukin 8 gene expression in human fibroblasts: unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992), S. 9049–9053
- [298] RATHANASWAMI, P. ; HACHICHA, M. ; SADICK, M. ; SCHALL, T. J. ; MCCOLL, S. R.: Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), S. 5834–5839
- [299] GUSELLA, G. L. ; MUSSO, T. ; BOSCO, M. C. ; ESPINOZA-DELGADO, I. ; MATSUSHIMA, K. ; VARESI, L.: IL-2 up-regulates but IFN-gamma suppresses IL-8 expression in human monocytes. *J. Immunol.* 151 (1993), S. 2725–2732
- [300] OLIVEIRA, I. C. ; MUKAIDA, N. ; MATSUSHIMA, K. ; VILCEK, J.: Transcriptional inhibition of the interleukin-8 gene by interferon is mediated by the NF-kappa B site. *Mol. Cell. Biol.* 14 (1994), S. 5300–5308
- [301] TRAN, E. H. ; PRINCE, E. N. ; OWENS, T.: IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system *via* regulation of chemokines. *J. Immunol.* 164 (2000), S. 2759–2768
- [302] ROBSON, R. L. ; MCLOUGHLIN, R. M. ; WITOWSKI, J. ; LOETSCHER, P. ; WILKINSON, T. S. ; JONES, S. A. ; TOPLEY, N.: Differential regulation of chemokine production in human peritoneal mesothelial cells: IFN-gamma controls neutrophil migration across the mesothelium *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* 167 (2001), S. 1028–1038
- [303] KELCHTERMANS, H. ; STRUYF, S. ; DE KLERCK, B. ; MITERA, T. ; ALEN, M. ; GEBOES, L. ; VAN BALEN, M. ; DILLEN, C. ; PUT, W. ; GYSEMANS, C. ; BILLIAU, A. ; VAN DAMME, J. ; MATTHYS, P.: Protective role of IFN-gamma in collagen-induced arthritis conferred by inhibition of mycobacteria-induced granulocyte chemotactic protein-2 production. *J. Leukoc. Biol.* 81 (2007), S. 1044–1053
- [304] HACHICHA, M. ; RATHANASWAMI, P. ; SCHALL, T. J. ; MCCOLL, S. R.: Production of monocyte chemotactic protein-1 in human type B synoviocytes. Synergistic effect of tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma. *Arthritis Rheum.* 36 (1993), S. 26–34
- [305] MARFAING-KOKA, A. ; DEVERGNE, O. ; GORGONE, G. ; PORTIER, A. ; SCHALL, T. J. ; GALANAUD, P. ; EMILIE, D.: Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 154 (1995), S. 1870–1878
- [306] MEDA, L. ; BERNASCONI, S. ; BONAIUTO, C. ; SOZZANI, S. ; ZHOU, D. ; OTVOS, L. ; MANTOVANI, A. ; ROSSI, F. ; CASSATELLA, M. A.: Beta-amyloid (25-35) peptide and IFN-gamma synergistically induce the production of the chemotactic cytokine MCP-1/JE in monocytes and microglial cells. *J. Immunol.* 157 (1996), S. 1213–1218
- [307] ZHOU, Z. H. ; CHATURVEDI, P. ; HAN, Y. L. ; ARAS, S. ; LI, Y. S. ; KOLATTUKUDY, P. E. ; PING, D. ; BOSS, J. M. ; RANSOHOFF, R. M.: IFN-gamma induction of the human monocyte chemoattractant protein (hMCP)-1 gene in astrocytoma cells: functional interaction between an IFN-gamma-activated site and a GC-rich element. *J. Immunol.* 160 (1998), S. 3908–3916

- [308] MOHAMMED, K. A. ; NASREEN, N. ; WARD, M. J. ; ANTONY, V. B.: Helper T cell type 1 and 2 cytokines regulate C-C chemokine expression in mouse pleural mesothelial cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159 (1999), S. 1653–1659
- [309] SENIK, A. ; STEFANOS, S. ; KOLB, J. P. ; LUCERO, M. ; FALCOFF, E.: Enhancement of mouse natural killer cell activity by type II interferon. *Ann. Immunol. (Paris)* 131C (1980), S. 349–361
- [310] STEEG, P. S. ; MOORE, R. N. ; JOHNSON, H. M. ; OPPENHEIM, J. J.: Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by a lymphokine with immune interferon activity. *J. Exp. Med.* 156 (1982), S. 1780–1793
- [311] AKBAR, S. M. ; INABA, K. ; ONJI, M.: Upregulation of MHC class II antigen on dendritic cells from hepatitis B virus transgenic mice by interferon-gamma: abrogation of immune response defect to a T-cell-dependent antigen. *Immunology* 87 (1996), S. 519–527
- [312] CIPRIANI, B. ; BORSELLINO, G. ; POCCIA, F. ; PLACIDO, R. ; TRAMONTI, D. ; BACH, S. ; BATTISTINI, L. ; BROSNAN, C. F.: Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood* 95 (2000), S. 39–47
- [313] PROOST, P. ; MENTEN, P. ; STRUYF, S. ; SCHUTYSER, E. ; DE MEESTER, I. ; VAN DAMME, J.: Cleavage by CD26/dipeptidyl peptidase IV converts the chemokine LD78beta into a most efficient monocyte attractant and CCR1 agonist. *Blood* 96 (2000), S. 1674–1680
- [314] MENTEN, P. ; WUYTS, A. ; VAN DAMME, J.: Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13 (2002), S. 455–481
- [315] LUTHER, S. A. ; CYSTER, J. G.: Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2 (2001), S. 102–107
- [316] ANDRES, P. G. ; BECK, P. L. ; MIZOGUCHI, E. ; MIZOGUCHI, A. ; BHAN, A. K. ; DAWSON, T. ; KUZIEL, W. A. ; MAEDA, N. ; MACDERMOTT, R. P. ; PODOLSKY, D. K. ; REINECKER, H. C.: Mice with a selective deletion of the CC chemokine receptors 5 or 2 are protected from dextran sodium sulfate-mediated colitis: lack of CC chemokine receptor 5 expression results in a NK1.1<sup>+</sup> lymphocyte-associated T<sub>h</sub>2-type immune response in the intestine. *J. Immunol.* 164 (2000), S. 6303–6312
- [317] KARPUS, W. J. ; LUKACS, N. W. ; KENNEDY, K. J. ; SMITH, W. S. ; HURST, S. D. ; BARRETT, T. A.: Differential CC chemokine-induced enhancement of T helper cell cytokine production. *J. Immunol.* 158 (1997), S. 4129–4136
- [318] DAHINDEN, C. A. ; GEISER, T. ; BRUNNER, T. ; VON TSCHARNER, V. ; CAPUT, D. ; FERRARA, P. ; MINTY, A. ; BAGGIOLINI, M.: Monocyte chemotactic protein 3 is a most effective basophil- and eosinophil-activating chemokine. *J. Exp. Med.* 179 (1994), S. 751–756
- [319] ALAM, R. ; FORSYTHE, P. A. ; STAFFORD, S. ; LETT-BROWN, M. A. ; GRANT, J. A.: Macrophage inflammatory protein-1 alpha activates basophils and mast cells. *J. Exp. Med.* 176 (1992), S. 781–786
- [320] BISCHOFF, S. C. ; KRIEGER, M. ; BRUNNER, T. ; ROT, A. ; VON TSCHARNER, V. ; BAGGIOLINI, M. ; DAHINDEN, C. A.: RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur. J. Immunol.* 23 (1993), S. 761–767
- [321] ROT, A. ; KRIEGER, M. ; BRUNNER, T. ; BISCHOFF, S. C. ; SCHALL, T. J. ; DAHINDEN, C. A.: RANTES and macrophage inflammatory protein 1 alpha induce the migration and activation of normal human eosinophil granulocytes. *J. Exp. Med.* 176 (1992), S. 1489–1495
- [322] WANG, Z. ; WANG, G.: APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Res.* 32 (2004), S. D590–592
- [323] YEAMAN, M. R. ; YOUNT, N. Y.: Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 55 (2003), S. 27–55

- [324] MATSUZAKI, K.: Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim. Biophys. Acta* 1462 (1999), S. 1–10
- [325] YANG, L. ; HARROUN, T. A. ; WEISS, T. M. ; DING, L. ; HUANG, H. W.: Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81 (2001), S. 1475–1485
- [326] BROGDEN, K. A.: Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3 (2005), S. 238–250
- [327] CHANG, W. K. ; WIMLEY, W. C. ; SEARSON, P. C. ; HRISTOVA, K. ; MERZLYAKOV, M.: Characterization of antimicrobial peptide activity by electrochemical impedance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1778 (2008), S. 2430–2436
- [328] WIESNER, J. ; VILCINSKAS, A.: Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* 1 (2010), S. 440–464
- [329] LEE, H. S. ; PARK, C. B. ; KIM, J. M. ; JANG, S. A. ; PARK, I. Y. ; KIM, M. S. ; CHO, J. H. ; KIM, S. C.: Mechanism of anticancer activity of buforin IIb, a histone H2A-derived peptide. *Cancer Lett.* 271 (2008), S. 47–55
- [330] LOBO, D. S. ; PEREIRA, I. B. ; FRAGEL-MADEIRA, L. ; MEDEIROS, L. N. ; CABRAL, L. M. ; FARIA, J. ; BELLIO, M. ; CAMPOS, R. C. ; LINDEN, R. ; KURTENBACH, E.: Antifungal *Pisum sativum* defensin 1 interacts with *Neurospora crassa* cyclin F related to the cell cycle. *Biochemistry* 46 (2007), S. 987–996
- [331] KRAGOL, G. ; LOVAS, S. ; VARADI, G. ; CONDIE, B. A. ; HOFFMANN, R. ; OTVOS, L.: The antibacterial peptide pyrrolicorin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* 40 (2001), S. 3016–3026
- [332] LEHRER, R. I.: Multispecific myeloid defensins. *Curr. Opin. Hematol.* 14 (2007), S. 16–21
- [333] AGERBERTH, B. ; CHARO, J. ; WERR, J. ; OLSSON, B. ; IDALI, F. ; LINDBOM, L. ; KIESSLING, R. ; JÖRNVALL, H. ; WIGZELL, H. ; GUDMUNDSSON, G. H.: The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96 (2000), S. 3086–3093
- [334] DUDAL, S. ; TURRIERE, C. ; BESSOLES, S. ; FONTES, P. ; SANCHEZ, F. ; LIAUTARD, J. ; LIAUTARD, J. P. ; LAFONT, V.: Release of LL-37 by activated human Vgamma9/Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*. *J. Immunol.* 177 (2006), S. 5533–5539
- [335] YAMASAKI, K. ; GALLO, R. L.: Antimicrobial peptides in human skin disease. *Eur J Dermatol* 18 (2008), S. 11–21
- [336] JENSSEN, H. ; HAMILL, P. ; HANCOCK, R. E.: Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006), S. 491–511
- [337] BOMAN, H. G.: Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts. *J. Intern. Med.* 254 (2003), S. 197–215
- [338] NIZET, V. ; OHTAKE, T. ; LAUTH, X. ; TROWBRIDGE, J. ; RUDISILL, J. ; DORSCHNER, R. A. ; PESTON-JAMASP, V. ; PIRAINO, J. ; HUTTNER, K. ; GALLO, R. L.: Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414 (2001), S. 454–457
- [339] LAI, Y. ; GALLO, R. L.: AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30 (2009), S. 131–141
- [340] NIYONSABA, F. ; IWABUCHI, K. ; MATSUDA, H. ; OGAWA, H. ; NAGAOKA, I.: Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int. Immunol.* 14 (2002), S. 421–426

- [341] TJABRINGA, G. S. ; AARBIOU, J. ; NINABER, D. K. ; DRIJFHOUT, J. W. ; SØRENSEN, O. E. ; BORREGAARD, N. ; RABE, K. F. ; HIEMSTRA, P. S.: The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J. Immunol.* 171 (2003), S. 6690–6696
- [342] SCOTT, M. G. ; DAVIDSON, D. J. ; GOLD, M. R. ; BOWDISH, D. ; HANCOCK, R. E.: The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J. Immunol.* 169 (2002), S. 3883–3891
- [343] BEFUS, A. D. ; MOWAT, C. ; GILCHRIST, M. ; HU, J. ; SOLOMON, S. ; BATEMAN, A.: Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J. Immunol.* 163 (1999), S. 947–953
- [344] NIYONSABA, F. ; SOMEYA, A. ; HIRATA, M. ; OGAWA, H. ; NAGAOKA, I.: Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur. J. Immunol.* 31 (2001), S. 1066–1075
- [345] MALAVIYA, R. ; IKEDA, T. ; ROSS, E. ; ABRAHAM, S. N.: Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* 381 (1996), S. 77–80
- [346] ECHTENACHER, B. ; MÄNNEL, D. N. ; HÜLTNER, L.: Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* 381 (1996), S. 75–77
- [347] SCOTT, M. G. ; VREUGDENHIL, A. C. ; BUURMAN, W. A. ; HANCOCK, R. E. ; GOLD, M. R.: Cutting edge: cationic antimicrobial peptides block the binding of lipopolysaccharide (LPS) to LPS binding protein. *J. Immunol.* 164 (2000), S. 549–553
- [348] SCOTT, M. G. ; GOLD, M. R. ; HANCOCK, R. E.: Interaction of cationic peptides with lipoteichoic acid and gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* 67 (1999), S. 6445–6453
- [349] NIYONSABA, F. ; USHIO, H. ; NAGAOKA, I. ; OKUMURA, K. ; OGAWA, H.: The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin LL-37 induce IL-18 secretion through p38 and ERK MAPK activation in primary human keratinocytes. *J. Immunol.* 175 (2005), S. 1776–1784
- [350] NIYONSABA, F. ; USHIO, H. ; NAKANO, N. ; NG, W. ; SAYAMA, K. ; HASHIMOTO, K. ; NAGAOKA, I. ; OKUMURA, K. ; OGAWA, H.: Antimicrobial peptides human beta-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007), S. 594–604
- [351] DAVIDSON, D. J. ; CURRIE, A. J. ; REID, G. S. ; BOWDISH, D. M. ; MACDONALD, K. L. ; MA, R. C. ; HANCOCK, R. E. ; SPEERT, D. P.: The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J. Immunol.* 172 (2004), S. 1146–1156
- [352] OPPENHEIM, J. J. ; BIRAGYN, A. ; KWAK, L. W. ; YANG, D.: Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann. Rheum. Dis.* 62 Suppl 2 (2003), S. 17–21
- [353] YANG, D. ; LIU, Z. H. ; TEWARY, P. ; CHEN, Q. ; DE LA ROSA, G. ; OPPENHEIM, J. J.: Defensin participation in innate and adaptive immunity. *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007), S. 3131–3139
- [354] WIEDOW, O. ; SCHRÖDER, J. M. ; GREGORY, H. ; YOUNG, J. A. ; CHRISTOPHERS, E.: Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 265 (1990), S. 14791–14795
- [355] MOREAU, T. ; BARANGER, K. ; DADÉ, S. ; DALLET-CHOISY, S. ; GUYOT, N. ; ZANI, M. L.: Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie* 90 (2008), S. 284–295
- [356] MEYER-HOFFERT, U.: Reddish, scaly, and itchy: how proteases and their inhibitors contribute to inflammatory skin diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 57 (2009), S. 345–354



- [357] ZEEUWEN, P. L. ; HENDRIKS, W. ; DE JONG, W. W. ; SCHALKWIJK, J.: Identification and sequence analysis of two new members of the SKALP/elafin and SPAI-2 gene family. Biochemical properties of the transglutaminase substrate motif and suggestions for a new nomenclature. *J. Biol. Chem.* 272 (1997), S. 20471–20478
- [358] MOLHUIZEN, H. O. ; ALKEMADE, H. A. ; ZEEUWEN, P. L. ; DE JONGH, G. J. ; WIERINGA, B. ; SCHALKWIJK, J.: SKALP/elafin: an elastase inhibitor from cultured human keratinocytes. Purification, cDNA sequence, and evidence for transglutaminase cross-linking. *J. Biol. Chem.* 268 (1993), S. 12028–12032
- [359] NARA, K. ; ITO, S. ; ITO, T. ; SUZUKI, Y. ; GHONEIM, M. A. ; TACHIBANA, S. ; HIROSE, S.: Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed 'cementoin'. *J. Biochem.* 115 (1994), S. 441–448
- [360] SIMPSON, A. J. ; MAXWELL, A. I. ; GOVAN, J. R. ; HASLETT, C. ; SALLENAVE, J. M.: Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett.* 452 (1999), S. 309–313
- [361] ROGHANIAN, A. ; WILLIAMS, S. E. ; SHELDRAKE, T. A. ; BROWN, T. I. ; OBERHEIM, K. ; XING, Z. ; HOWIE, S. E. ; SALLENAVE, J. M.: The antimicrobial/elastase inhibitor elafin regulates lung dendritic cells and adaptive immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34 (2006), S. 634–642
- [362] WILKINSON, T. S. ; DHALIWAL, K. ; HAMILTON, T. W. ; LIPKA, A. F. ; FARRELL, L. ; DAVIDSON, D. J. ; DUFFIN, R. ; MORRIS, A. C. ; HASLETT, C. ; GOVAN, J. R. ; GREGORY, C. D. ; SALLENAVE, J. M. ; SIMPSON, A. J.: Trappin-2 promotes early clearance of *Pseudomonas aeruginosa* through CD14-dependent macrophage activation and neutrophil recruitment. *Am. J. Pathol.* 174 (2009), S. 1338–1346
- [363] BARANGER, K. ; ZANI, M. L. ; CHANDENIER, J. ; DALLET-CHOISY, S. ; MOREAU, T.: The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J.* 275 (2008), S. 2008–2020
- [364] JANSSEN, O. ; WESSELBORG, S. ; HECKL-OSTREICHER, B. ; PECHHOLD, K. ; BENDER, A. ; SCHONDELMAIER, S. ; MOLDENHAUER, G. ; KABELITZ, D.: T cell receptor/CD3-signaling induces death by apoptosis in human T cell receptor gamma delta + T cells. *J. Immunol.* 146 (1991), S. 35–39
- [365] BLUMBERG, P. M.: Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: sixth Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res.* 48 (1988), S. 1–8
- [366] SCHÄGGER, H. ; VON JAGOW, G.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166 (1987), S. 368–379
- [367] ROTH, S. J. ; DIACOVO, T. G. ; BRENNER, M. B. ; ROSAT, J. P. ; BUCCOLA, J. ; MORITA, C. T. ; SPRINGER, T. A.: Transendothelial chemotaxis of human  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T lymphocytes to chemokines. *Eur. J. Immunol.* 28 (1998), S. 104–113
- [368] PECHHOLD, K. ; POHL, T. ; KABELITZ, D.: Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. *Cytometry* 16 (1994), S. 152–159
- [369] MEYER-HOFFERT, U. ; WICHMANN, N. ; SCHWICHTENBERG, L. ; WHITE, P. C. ; WIEDOW, O.: Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 12 (2003), S. 418–425
- [370] TCHIKOV, V. ; SCHÜTZE, S.: Immunomagnetic isolation of tumor necrosis factor receptosomes. *Meth. Enzymol.* 442 (2008), S. 101–123
- [371] TCHIKOV, V. ; FRITSCH, J. ; KABELITZ, D. ; SCHÜTZE, S.: Immunomagnetic isolation of subcellular compartments. In: KABELITZ, D. (Hrsg.) ; KAUFMANN, S.H.E. (Hrsg.): *Methods in Microbiology* Bd. 37. Amsterdam: Elsevier, 2010, S. 21–33
- [372] SCHUTYSER, E. ; STRUYF, S. ; VAN DAMME, J.: The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (2003), S. 409–426

- [373] PAULEAU, A. L. ; MURRAY, P. J.: Role of Nod2 in the response of macrophages to toll-like receptor agonists. *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003), S. 7531–7539
- [374] GUAN, E. ; WANG, J. ; NORCROSS, M. A.: Identification of human macrophage inflammatory proteins 1alpha and 1beta as a native secreted heterodimer. *J. Biol. Chem.* 276 (2001), S. 12404–12409
- [375] SCHOENBORN, J. R. ; WILSON, C. B.: Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv. Immunol.* 96 (2007), S. 41–101
- [376] KOMAI-KOMA, M. ; JONES, L. ; OGG, G. S. ; XU, D. ; LIEW, F. Y.: TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004), S. 3029–3034
- [377] LANCIONI, C. L. ; THOMAS, J. J. ; ROJAS, R. E.: Activation requirements and responses to TLR ligands in human CD4<sup>+</sup> T cells: comparison of two T cell isolation techniques. *J. Immunol. Methods* 344 (2009), S. 15–25
- [378] HAMMOND, T. ; LEE, S. ; WATSON, M. W. ; FLEXMAN, J. P. ; CHENG, W. ; FERNANDEZ, S. ; PRICE, P.: Toll-like receptor (TLR) expression on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cells in patients chronically infected with hepatitis C virus. *Cell. Immunol.* 264 (2010), S. 150–155
- [379] CARON, G. ; DULUC, D. ; FRÉMAUX, I. ; JEANNIN, P. ; DAVID, C. ; GASCAN, H. ; DELNESTE, Y.: Direct stimulation of human T cells *via* TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 175 (2005), S. 1551–1557
- [380] LIU, H. ; KOMAI-KOMA, M. ; XU, D. ; LIEW, F. Y.: Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006), S. 7048–7053
- [381] KERSTEN, C. M. ; McCLUSKEY, R. T. ; BOYLE, L. A. ; KURNICK, J. T.: *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* induce expansion of Vdelta2 cells in adult peripheral blood, but of Vdelta1 cells in cord blood. *J. Immunol.* 157 (1996), S. 1613–1619
- [382] MINCHEVA-NILSSON, L. ; NAGAEVA, O. ; SUNDQVIST, K. G. ; HAMMARSTRÖM, M. L. ; HAMMARSTRÖM, S. ; BARANOV, V.:  $\gamma\delta$  T cells of human early pregnancy decidua: evidence for cytotoxic potency. *Int. Immunol.* 12 (2000), S. 585–596
- [383] SENGELOV, H. ; FOLLIN, P. ; KJELDSSEN, L. ; LOLLIKE, K. ; DAHLGREN, C. ; BORREGAARD, N.: Mobilization of granules and secretory vesicles during *in vivo* exudation of human neutrophils. *J. Immunol.* 154 (1995), S. 4157–4165
- [384] O’NEIL, D. A. ; PORTER, E. M. ; ELEWAUT, D. ; ANDERSON, G. M. ; ECKMANN, L. ; GANZ, T. ; KAGNOFF, M. F.: Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J. Immunol.* 163 (1999), S. 6718–6724
- [385] MENZIES, B. E. ; KENOYER, A.: *Staphylococcus aureus* infection of epidermal keratinocytes promotes expression of innate antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 73 (2005), S. 5241–5244
- [386] WEHKAMP, K. ; SCHWICHTENBERG, L. ; SCHRÖDER, J. M. ; HARDER, J.: *Pseudomonas aeruginosa*- and IL-1beta-mediated induction of human beta-defensin-2 in keratinocytes is controlled by NF-kappaB and AP-1. *J. Invest. Dermatol.* 126 (2006), S. 121–127
- [387] ZANGER, P. ; HOLZER, J. ; SCHLEUCHER, R. ; SCHERBAUM, H. ; SCHITTEK, B. ; GABRYSCH, S.: Severity of *Staphylococcus aureus* infection of the skin is associated with inducibility of human beta-defensin 3 but not human beta-defensin 2. *Infect. Immun.* 78 (2010), S. 3112–3117
- [388] DÜRR, U. H. ; SUDHEENDRA, U. S. ; RAMAMOORTHY, A.: LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758 (2006), S. 1408–1425
- [389] THIERY, J. ; WALCH, M. ; JENSEN, D. K. ; MARTINVALET, D. ; LIEBERMAN, J.: Isolation of cytotoxic T cell and NK granules and purification of their effector proteins. *Current Protocols in Cell Biology* 47 (2010), S. 3.37.1–3.37.29

- [390] RYBAK, S. M. ; FETT, J. W. ; YAO, Q. Z. ; VALLEE, B. L.: Angiogenin mRNA in human tumor and normal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 146 (1987), S. 1240–1248
- [391] KRENSKY, A. M. ; CLAYBERGER, C.: Granulysin: a novel host defense molecule. *Am. J. Transplant.* 5 (2005), S. 1789–1792
- [392] STENGER, S. ; HANSON, D. A. ; TEITELBAUM, R. ; DEWAN, P. ; NIAZI, K. R. ; FROELICH, C. J. ; GANZ, T. ; THOMA-USZYNSKI, S. ; MELIÁN, A. ; BOGDAN, C. ; PORCELLI, S. A. ; BLOOM, B. R. ; KRENSKY, A. M. ; MODLIN, R. L.: An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282 (1998), S. 121–125
- [393] SCHILBACH, K. ; FROMMER, K. ; MEIER, S. ; HANDGRETINGER, R. ; EYRICH, M.: Immune response of human propagated gammadelta-T-cells to neuroblastoma recommend the Vdelta1<sup>+</sup> subset for gammadelta-T-cell-based immunotherapy. *J. Immunother.* 31 (2008), S. 896–905
- [394] TRAPANI, J. A.: Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B. *Aust. N. Z. J. Med.* 25 (1995), S. 793–799
- [395] SHAFER, W. M. ; POHL, J. ; ONUNKA, V. C. ; BANGALORE, N. ; TRAVIS, J.: Human lysosomal cathepsin G and granzyme B share a functionally conserved broad spectrum antibacterial peptide. *Journal of Biological Chemistry* 266 (1991), S. 112–116
- [396] BERTHOU, C. ; MICHEL, L. ; SOULIÉ, A. ; JEAN-LOUIS, F. ; FLAGEUL, B. ; DUBERTRET, L. ; SIGAUX, F. ; ZHANG, Y. ; SASPORTES, M.: Acquisition of granzyme B and Fas ligand proteins by human keratinocytes contributes to epidermal cell defense. *The Journal of Immunology* 159 (1997), S. 5293–5300
- [397] CHATTOPADHYAY, P. K. ; BETTS, M. R. ; PRICE, D. A. ; GOSTICK, E. ; HORTON, H. ; ROEDERER, M. ; DE ROSA, S. C.: The cytolytic enzymes granzyme A, granzyme B, and perforin: expression patterns, cell distribution, and their relationship to cell maturity and bright CD57 expression. *J. Leukoc. Biol.* 85 (2009), S. 88–97
- [398] BADET, J.: Angiogenin, a potent mediator of angiogenesis. Biological, biochemical and structural properties. *Pathol. Biol.* 47 (1999), S. 345–351
- [399] GANZ, T.: Angiogenin: an antimicrobial ribonuclease. *Nat. Immunol.* 4 (2003), S. 213–214
- [400] DYER, K. D. ; ROSENBERG, H. F.: The RNase A superfamily: generation of diversity and innate host defense. *Mol. Divers.* 10 (2006), S. 585–597
- [401] HOOPER, L. V. ; STAPPENBECK, T. S. ; HONG, C. V. ; GORDON, J. I.: Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat. Immunol.* 4 (2003), S. 269–273
- [402] AVDEEVA, S. V. ; CHERNUKHA, M. U. ; SHAGINYAN, I. A. ; TARANTUL, V. Z. ; NARODITSKY, B. S.: Human angiogenin lacks specific antimicrobial activity. *Curr. Microbiol.* 53 (2006), S. 477–478
- [403] SALLENAVE, J. M.: Secretory leukocyte protease inhibitor and elafin/trappin-2: versatile mucosal antimicrobials and regulators of immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42 (2010), S. 635–643
- [404] Kapitel 24.6.1. In: BÖCKER, Werner (Hrsg.) ; DENK, Helmut (Hrsg.) ; HEITZ, Philipp U. (Hrsg.) ; MOCH, Holger (Hrsg.): *Pathologie*. Urban & Fischer Verlag / Elsevier GmbH, 2008, S. 632
- [405] KABELITZ, D. ; MARISCHEN, L. ; OBERG, H.-H. ; HOLTMEIER, W. ; WESCH, D.: Epithelial defence by gamma delta T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137 (2005), S. 73–81
- [406] HOLTMEIER, W.: Compartmentalization of  $\gamma/\delta$  T cells and their putative role in mucosal immunity. *Crit. Rev. Immunol.* 23 (2003), S. 473–488
- [407] SPENCER, J. ; DISS, T. C. ; ISAACSON, P. G. ; MACDONALD, T. T.: Expression of disulphidelinked and non-disulphide linked forms of the gamma/delta T cell receptor in human small intestinal epithelium. *Eur. J. Immunol.* 19 (1989), S. 1335–8

- [408] MANSSON, A. ; ADNER, M. ; CARDELL, L. O.: Toll-like receptors in cellular subsets of human tonsil T cells: altered expression during recurrent tonsillitis. *Respir. Res.* 7 (2006), Nr. 36
- [409] WESCH, D. ; PETERS, C. ; OBERG, H.-H. ; PIETSCHMANN, K. ; KABELITZ, D.: Modulation of  $\gamma\delta$  T cell response by TLR ligands. *Cell. Mol. Life Sci.* 68 (2011), S. 2357–2370
- [410] PASHENKOV, M. V. ; POPILYUK, S. F. ; ALKHAZOVA, B. I. ; L'VOV, V. L. ; MURUGIN, V. V. ; FEDENKO, E. S. ; KHAITOV, R. M. ; PINEGIN, B. V.: Muropeptides trigger distinct activation profiles in macrophages and dendritic cells. *Int. Immunopharmacol.* 10 (2010), S. 875–882
- [411] BEYNON, V. ; COTOFANA, S. ; BRAND, S. ; LOHSE, P. ; MAIR, A. ; WAGNER, S. ; MUSSACK, T. ; OCHSENKÜHN, T. ; FOLWACZNY, M. ; FOLWACZNY, C. ; GLAS, J. ; TÖRÖK, H. P.: NOD2/CARD15 genotype influences MDP-induced cytokine release and basal IL-12p40 levels in primary isolated peripheral blood monocytes. *Inflamm. Bowel Dis.* 14 (2008), S. 1033–1040
- [412] TRAUB, S. ; VON AULOCK, S. ; HARTUNG, T. ; HERMANN, C.: MDP and other muropeptides—direct and synergistic effects on the immune system. *J. Endotoxin Res.* 12 (2006), S. 69–85
- [413] WEIDEMANN, B. ; SCHLETTER, J. ; DZIARSKI, R. ; KUSUMOTO, S. ; STELTER, F. ; RIETSCHEL, E. T. ; FLAD, H. D. ; ULMER, A. J.: Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *Infect. Immun.* 65 (1997), S. 858–864
- [414] ASAI, Y. ; OHYAMA, Y. ; GEN, K. ; OGAWA, T.: Bacterial fimbriae and their peptides activate human gingival epithelial cells through Toll-like receptor 2. *Infect. Immun.* 69 (2001), S. 7387–7395
- [415] HATAKEYAMA, J. ; TAMAI, R. ; SUGIYAMA, A. ; AKASHI, S. ; SUGAWARA, S. ; TAKADA, H.: Contrasting responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts to bacterial cell-surface components through the CD14/Toll-like receptor system. *Oral Microbiol. Immunol.* 18 (2003), S. 14–23
- [416] YANG, S. ; TAMAI, R. ; AKASHI, S. ; TAKEUCHI, O. ; AKIRA, S. ; SUGAWARA, S. ; TAKADA, H.: Synergistic effect of muramyl dipeptide with lipopolysaccharide or lipoteichoic acid to induce inflammatory cytokines in human monocytic cells in culture. *Infect. Immun.* 69 (2001), S. 2045–2053
- [417] WOLFERT, M. A. ; MURRAY, T. F. ; BOONS, G. J. ; MOORE, J. N.: The origin of the synergistic effect of muramyl dipeptide with endotoxin and peptidoglycan. *J. Biol. Chem.* 277 (2002), S. 39179–39186
- [418] DZIARSKI, R. ; TAPPING, R. I. ; TOBIAS, P. S.: Binding of bacterial peptidoglycan to CD14. *J. Biol. Chem.* 273 (1998), S. 8680–8690
- [419] SHAW, M. H. ; REIMER, T. ; SÁNCHEZ-VALDEPEÑAS, C. ; WARNER, N. ; KIM, Y. G. ; FRESNO, M. ; NUÑEZ, G.: T cell-intrinsic role of Nod2 in promoting type 1 immunity to *Toxoplasma gondii*. *Nat. Immunol.* 10 (2009), S. 1267–1274
- [420] CAETANO, B. C. ; BISWAS, A. ; LIMA, D. S. ; BENEVIDES, L. ; MINEO, T. W. ; HORTA, C. V. ; LEE, K. H. ; SILVA, J. S. ; GAZZINELLI, R. T. ; ZAMBONI, D. S. ; KOBAYASHI, K. S.: Intrinsic expression of Nod2 in CD4<sup>+</sup> T lymphocytes is not necessary for the development of cell-mediated immunity and host resistance to *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Immunol.* 41 (2011), S. 3627–3631
- [421] MEYER, T.: *Die Rolle von Toll-like Rezeptor 3 bei der Aktivierung primärer humaner CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten*, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Diss., 2011
- [422] MEYER, T. ; OBERG, H.-H. ; PETERS, C. ; MARTENS, I. ; ADAM-KLAGES, S. ; KABELITZ, D. ; WESCH, D.: Poly(I:C) costimulation induces a stronger antiviral chemokine and granzyme B release in human CD4 T cells than CD28 costimulation. *J. Leukoc. Biol.* 92 (2012)
- [423] MORRIS, J. C. ; WALDMANN, T. A.: Advances in interleukin 2 receptor targeted treatment. *Ann. Rheum. Dis.* 59 Suppl 1 (2000), S. 109–114
- [424] SANCHEZ-GARCIA, J. ; ATKINS, C. ; PASVOL, G. ; WILKINSON, R. J. ; COLSTON, M. J.: Antigen-driven shedding of L-selectin from human gamma delta T cells. *Immunology* 89 (1996), S. 213–219

- [425] WANG, L. ; KAMATH, A. ; DAS, H. ; LI, L. ; BUKOWSKI, J. F.: Antibacterial effect of human Vgamma2 Vdelta2 T cells *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 108 (2001), S. 1349–1357
- [426] KISTOWSKA, M. ; ROSSY, E. ; SANSANO, S. ; GOBER, H. J. ; LANDMANN, R. ; MORI, L. ; DE LIBERO, G.: Dysregulation of the host mevalonate pathway during early bacterial infection activates human TCR gamma delta cells. *Eur. J. Immunol.* 38 (2008), S. 2200–2209
- [427] ZHU, B. D. ; FENG, Y. ; HUANG, N. ; WU, Q. ; WANG, B. Y.: *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) enhances human beta-defensin-1 gene transcription in human pulmonary gland epithelial cells. *Acta Pharmacol. Sin.* 24 (2003), S. 907–912
- [428] PRADO-MONTES DE OCA, E.: Human beta-defensin 1: a restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 42 (2010), S. 800–804
- [429] PAZGIER, M. ; HOOVER, D. M. ; YANG, D. ; LU, W. ; LUBKOWSKI, J.: Human beta-defensins. *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (2006), S. 1294–1313
- [430] SINGH, P. K. ; JIA, H. P. ; WILES, K. ; HESSELBERTH, J. ; LIU, L. ; CONWAY, B. A. ; GREENBERG, E. P. ; VALORE, E. V. ; WELSH, M. J. ; GANZ, T. ; TACK, B. F. ; MCCRAY, P. B.: Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95 (1998), S. 14961–14966
- [431] FATTORINI, L. ; GENNARO, R. ; ZANETTI, M. ; TAN, D. ; BRUNORI, L. ; GIANNONI, F. ; PARDINI, M. ; OREFICI, G.: *In vitro* activity of protegrin-1 and beta-defensin-1, alone and in combination with isoniazid, against *Mycobacterium tuberculosis*. *Peptides* 25 (2004), S. 1075–1077
- [432] GOLDMAN, M. J. ; ANDERSON, G. M. ; STOLZENBERG, E. D. ; KARI, U. P. ; ZASLOFF, M. ; WILSON, J. M.: Human beta-defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis. *Cell* 88 (1997), S. 553–560
- [433] PRESICCE, P. ; GIANNELLI, S. ; TADDEO, A. ; VILLA, M. L. ; DELLA BELLA, S.: Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91. *J. Leukoc. Biol.* 86 (2009), S. 941–948
- [434] PRADO-MONTES DE OCA, E. ; GARCIA-VARGAS, A. ; LOZANO-INOCENCIO, R. ; GALLEGOS-ARREOLA, M. P. ; SANDOVAL-RAMIREZ, L. ; DÁVALOS-RODRIGUEZ, N. O. ; FIGUERA, L. E.: Association of beta-defensin 1 single nucleotide polymorphisms with atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 142 (2007), S. 211–218
- [435] PAULSEN, F. ; PUFE, T. ; PETERSEN, W. ; TILLMANN, B.: Expression of natural peptide antibiotics in human articular cartilage and synovial membrane. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8 (2001), S. 1021–1023
- [436] KIM, W. J. ; KIM, H. ; SUK, K. ; LEE, W. H.: Macrophages express granzyme B in the lesion areas of atherosclerosis and rheumatoid arthritis. *Immunol. Lett.* 111 (2007), S. 57–65
- [437] YOUNG, L. H. ; JOAG, S. V. ; LIN, P. Y. ; LUO, S. F. ; ZHENG, L. M. ; LIU, C. C. ; YOUNG, J. D.: Expression of cytolytic mediators by synovial fluid lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Am. J. Pathol.* 140 (1992), S. 1261–1268
- [438] KUMMER, J. A. ; TAK, P. P. ; BRINKMAN, B. M. ; VAN TILBORG, A. A. ; KAMP, A. M. ; VERWEIJ, C. L. ; DAHA, M. R. ; MEINDERS, A. E. ; HACK, C. E. ; BREEDVELD, F. C.: Expression of granzymes A and B in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73 (1994), S. 88–95
- [439] TAK, P. P. ; SPAENY-DEKING, L. ; KRAAN, M. C. ; BREEDVELD, F. C. ; FROELICH, C. J. ; HACK, C. E.: The levels of soluble granzyme A and B are elevated in plasma and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin. Exp. Immunol.* 116 (1999), S. 366–370
- [440] CHAM, C. M. ; DRIESSENS, G. ; O'KEEFE, J. P. ; GAJEWSKI, T. F.: Glucose deprivation inhibits multiple key gene expression events and effector functions in CD8<sup>+</sup> T cells. *Eur. J. Immunol.* 38 (2008), S. 2438–2450

## 8 Literaturverzeichnis

- [441] STEINERT, P. M. ; MAREKOV, L. N.: The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *J. Biol. Chem.* 270 (1995), S. 17702–17711
- [442] NAKANE, H. ; ISHIDA-YAMAMOTO, A. ; TAKAHASHI, H. ; IIZUKA, H.: Elafin, a secretory protein, is cross-linked into the cornified cell envelopes from the inside of psoriatic keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002), S. 50–55
- [443] LOETSCHER, P. ; UGUCCIONI, M. ; BORDOLI, L. ; BAGGIOLINI, M. ; MOSER, B. ; CHIZZOLINI, C. ; DAYER, J. M.: CCR5 is characteristic of T<sub>h</sub>1 lymphocytes. *Nature* 391 (1998), S. 344–345
- [444] COCCHI, F. ; DEVICO, A. L. ; GARZINO-DEMO, A. ; ARYA, S. K. ; GALLO, R. C. ; LUSO, P.: Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8<sup>+</sup> T cells. *Science* 270 (1995), S. 1811–1815
- [445] GERSTEL, U. ; CZAPP, M. ; BARTELS, J. ; SCHRÖDER, J.-M.: Rhamnolipid-induced shedding of flagellin from *Pseudomonas aeruginosa* provokes hBD-2 and IL-8 response in human keratinocytes. *Cellular Microbiology* 11 (2009), S. 842–853

# 9 Anhang

## 9.1 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematischer Vergleich der Steroidsynthesewege in Eu- und Prokaryonten . . . . .	18
1.2	Netzwerk chemotaktischer Moleküle . . . . .	23
1.3	Struktur motive der Chemokinfamilien . . . . .	24
1.4	Struktur und Funktion einiger NLRs . . . . .	30
1.5	Muramyldipeptid (MDP): NOD2-aktivierender Bestandteil des Peptidoglykans . . . . .	31
1.6	Schematische Darstellung theoretischer Modelle zur AMP-vermittelten Zerstörung der bakteriellen Membran . . . . .	35
1.7	Primärstruktur der humanen $\alpha$ - und $\beta$ -Defensine . . . . .	36
1.8	Primärstruktur und Organisation der Domänen von Trappin-2 und Elafin . . . . .	38
3.1	Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität am Beispiel der Expression des Chemokinrezeptors CCR4 durch V $\delta$ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	67
4.1	Differentielle Expression von Chemokinrezeptoren durch $\gamma\delta$ T-Zellen im Blut . . . . .	80
4.2	Expression von CCR4 durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben . . . . .	82
4.3	Expression von CCR6 durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben . . . . .	83
4.4	Expression von CCR9 durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben . . . . .	84
4.5	Expression von CXCR3 durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben . . . . .	85
4.6	Expression von CXCR6 durch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus verschiedenen Geweben . . . . .	86
4.7	Experimentelles Vorgehen zum Nachweis der NOD2-Expression in $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	88
4.8	Expression von NOD2-mRNA durch PBMZ . . . . .	89
4.9	Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$ und IFN- $\gamma$ durch MDP-stimulierte PBMZ . . . . .	90
4.10	TLR2-Expression in CD4 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten . . . . .	91
4.11	Spezifität des $\alpha$ NOD2 „L 104“ in der FACS-Analyse . . . . .	92
4.12	Nachweis der NOD2-Expression in $\gamma\delta$ T-Lymphozyten . . . . .	93
4.13	Modulation der Proliferation von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten durch PAMPs . . . . .	94
4.14	MDP-induzierte CCL3/MIP-1 $\alpha$ -Produktion . . . . .	95
4.15	Induktion der IFN- $\gamma$ -Produktion von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten durch PAMPs . . . . .	96
4.16	TLR2-Expression auf hochrein isolierten CD4 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten . . . . .	97
4.17	NOD2-Expression in isolierten PBMZ-Subpopulationen . . . . .	98
4.18	Proteinexpression von NOD2 in einer $\gamma\delta$ T-Zelllinie . . . . .	98
4.19	Proliferation isolierter CD4 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit PAMPs . . . . .	99
4.20	Zytokinfreisetzung von PBMZ-Subpopulationen nach MDP-Stimulation . . . . .	101
4.21	MDP-induzierte Freisetzung von CCL3/MIP-1 $\alpha$ und IFN- $\gamma$ durch hochrein isolierte CD4 <sup>+</sup> und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten . . . . .	103
4.22	Freisetzung von IFN- $\gamma$ nach Stimulation mit <i>Ps. aeruginosa</i> . . . . .	106
4.23	Induktion der CCL20/MIP-3 $\alpha$ -Expression durch <i>Ps. aeruginosa</i> . . . . .	106
4.24	Ausbildung eines Hemmhofs im Agardiffusions-Screening-Assay . . . . .	107
4.25	Expression von $\alpha$ - und $\beta$ -Defensinen durch $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	109
4.26	Expression ausgewählter AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen aus verschiedenen Geweben . . . . .	110
4.27	Durchflusszytometrische Analyse: Expression von Granzym B durch $\gamma\delta$ T-Zellen aus verschiedenen Geweben . . . . .	111
4.28	Western-Blot: Expression und Freisetzung von Granzym B durch $\gamma\delta$ T-Zellen aus verschiedenen Geweben . . . . .	111
4.29	ELISA: Freisetzung von Granzym B durch stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	112
4.30	Freisetzung von Angiogenin durch stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	113
4.31	Durchflusszytometrische Analyse: Eignung des $\alpha$ Elafin zur intrazellulären FACS-Analyse . . . . .	115

4.32	Durchflusszytometrische Analyse: Intrazelluläre und Oberflächen-Expression von Elafin durch $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	115
4.33	Western-Blot: Elafin im Zytosol und Überstand von stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	116
4.34	RT-PCR & ELISA: Freisetzung von Elafin durch stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen . . . . .	117
5.1	Schematische Übersicht der Themengebiete in der vorliegenden Arbeit . . . . .	140

## 9.2 Tabellenverzeichnis

1.1	Anzahl der V-, D- und J-Segmente von $\alpha\beta$ und $\gamma\delta$ TZRs . . . . .	16
1.2	Ausgewählte homöostatische und inflammatorische Chemokine . . . . .	25
3.3	Puffer und Chemikalien zur durchflusszytometrischen Analyse . . . . .	48
3.4	Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von Chemokinen und AMPs . . . . .	48
3.5	Antikörper zur durchflusszytometrischen Charakterisierung der Lymphozyten . . . . .	49
3.6	Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse der Chemokinrezeptorexpression . . . . .	50
3.7	Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse von Mustererkennungsrezeptoren und Signalmolekülen . . . . .	50
3.8	Substanzen zur Zellstimulation . . . . .	51
3.9	Primerpaare für den RT-PCR-Nachweis ausgewählter mRNAs . . . . .	53
3.10	ELISA-Kits zur Ermittlung der Zytokinkonzentration . . . . .	56
3.11	Antikörper zur Western-Blot-Analyse . . . . .	60
4.1	Agardiffusions- <i>Screening-Assay</i> : Auszug aus der Ergebnisliste . . . . .	108
5.1	In vorhergehenden Publikationen und der vorliegenden Arbeit ermittelte Expression von Chemokinrezeptoren durch frisch isolierte, humane $\gamma\delta$ T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut . . . . .	121
5.2	Chemokinrezeptorexpression auf V $\delta$ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen aus verschiedenen Geweben . . . . .	124
5.3	Reaktionen von Leukozyten nach Stimulation mit PRR-Liganden . . . . .	132
5.4	Produktion von Zytokinen und AMPs durch $\gamma\delta$ T-Zellen aus verschiedenen Geweben . . . . .	136



## 9.3 Publikationsliste

### Originalarbeiten

Schulz-Juergensen, S.\*; **Marischen, L.\***; Wesch, D.; Oberg, H.-H.; Fändrich, F.; Kabelitz, D. and Burdelski, M.: Markers of operational immune tolerance after pediatric liver transplantation in patients under immunosuppression. *Ped. Transplant.* 17 (2013), 348–354, (\*gleichberechtigte Erstautoren).

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Oberg, H.-H.; Rosenstiel, P.; Trad, A.; Shomali, M.; Grötzinger, J.; Janssen, O.; Tchikov, V.; Schütze, S. and Kabelitz, D.: Functional expression of NOD2 in freshly isolated human peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells. *Scand. J. Immunol.* 74 (2011), 126–134.

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Schröder, J.-M.; Wiedow, O. and Kabelitz, D.: Human  $\gamma\delta$  T cells produce the protease inhibitor and antimicrobial peptide elafin. *Scand. J. Immunol.* 70 (2009), 547–552.

Shojaei, H.; Oberg, H.-H.; Juricke, M.; **Marischen, L.**; Kunz, M.; Mundhenke, C.; Gieseler, F.; Kabelitz, D. and Wesch, D.: Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human  $\gamma\delta$  T cells. *Cancer Res.* 69 (2009), 8710–8717.

Linde, D.\*; **Marischen, L.\*** and Müller, J. P.: Characterisation of preYvaY export reveals differences in the substrate specificities of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* leader peptidases. *FEMS Microbiol. Lett.* 227 (2003), 149–156, (\*gleichberechtigte Erstautoren).

### Übersichtsartikel

Beetz, S.\*; Wesch, D.\*; **Marischen, L.**; Welte, S.; Oberg, H.-H. and Kabelitz, D.: Innate immune functions of human  $\gamma\delta$  T cells. *Immunobiology* 213 (2007), 173–182, (\*gleichberechtigte Erstautoren).

Beetz, S.; **Marischen, L.**; Kabelitz, D. and Wesch, D.: Human  $\gamma\delta$  T Cells – candidates for the development of immunotherapeutic strategies. *Immunol. Res.* 37 (2007), 97–111.

Kabelitz, D.; **Marischen, L.**; Oberg, H.-H.; Holtmeier, W. and Wesch, D.: Epithelial defence by  $\gamma\delta$  T cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 137 (2005), 73–81.

Wesch, D.; **Marischen, L.** and Kabelitz, D.: Regulation of cytokine production by  $\gamma\delta$  T cells. *Curr. Med. Chem. – Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 4 (2005), 153–160.

## Sonstige Artikel

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Oberg, H.-H.; Peters, C.; Ussat, S.; Ly, H. and Kabelitz, D.: Highly purified peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells isolated by MACS<sup>TM</sup> separation respond to NOD2 ligand. *MACS & more* 15-1 (2013), 20–23.

Wesch, D.; **Marischen, L.** and Kabelitz, D.: Expression von Chemokinrezeptoren. In: Sack, U. (Ed.); Tárnok, A. (Ed.) and Rothe, G. (Ed.): *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger (2007), 424–436.

## Tagungsbeiträge

### Vorträge

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Harder, J.; Schröder, J.-M. and Kabelitz, D.:  $\gamma\delta$  T-cells are on duty as a first line of defense. *Immunobiology* 210 (6–8) (2005), 575.

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Harder, J.; Schröder, J.-M. and Kabelitz, D.:  $\gamma\delta$  T-cells as a potential link between the innate and adaptive immune system. *Immunobiology* 209 (4–6) (2004), 329.

### Poster

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Peters, C.; Rosenstiel, P.; Till, A. and Kabelitz, D.: Alone or in alliance:  $\gamma\delta$  T cells contribute to the immune response against the NOD2-ligand muramyl dipeptide. D12. (2010).  $\gamma\delta$  T Cell Conference, Kiel.

Peters, C.; Oberg, H.-H.; **Marischen, L.**; Kabelitz, D. and Wesch, D.: TLR2 ligands abrogate suppressive function of  $\gamma\delta$  T cells. B6. (2010).  $\gamma\delta$  T Cell Conference, Kiel.

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Rosenstiel, P.; Till, A. and Kabelitz, D.:  $\gamma\delta$  T cells respond to the NOD2-ligand muramyl dipeptide by increased IFN $\gamma$ -secretion. *Eur. J. Immunol.* 39 (S1) (2009), 115.

Welte, S.; Pietschmann, K.; **Marischen, L.**; Beetz, S.; Martens, I.; Wesch, D. and Kabelitz, D.: Human  $\gamma\delta$  T lymphocytes express pattern recognition receptors. (2007). 37th Annual Meeting of the German Society for Immunology, Heidelberg.

### Posterpreis der ÖGAI und DGfI

**Marischen, L.**; Wesch, D.; Wiedow, O. and Kabelitz, D.:  $\gamma\delta$  T-cells produce the antimicrobial peptide (AMP) elafin/SKALP in response to *Ps. aeruginosa*. *Wiener Klinische Wochenschrift* 120 (S1, 15–16) (2008), 73.

## 9.4 Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 31. August 2012, dass die vorliegende Arbeit unter wissenschaftlicher Leitung von Prof. Dr. Dr. h.c. Bosch selbstständig und ohne fremde Hilfe von mir verfasst worden ist. Die Abhandlung ist nach Form und Inhalt – abgesehen von der Beratung durch Prof. Dr. Kabelitz und PD Dr. Wesch – die eigene Arbeit.

Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Auszüge der Dissertation wurden in Fachzeitschriften veröffentlicht. Die Arbeit wurde bisher weder an der Universität Kiel noch an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Kiel, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Lothar Marischen)

## 9.5 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kabelitz danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Institut für Immunologie durchführen zu können, seine Offenheit für notwendige Veränderungen im Verlauf der Arbeit, seinen entscheidenden Anteil am Zustandekommen der publizierten Originalarbeiten, das Korrekturlesen der Arbeit und die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens meiner Arbeit gegenüber der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel.

Frau PD Dr. Wesch danke ich für die Betreuung der praktischen Arbeit im und um das Labor, die theoretische und praktische Einführung in experimentelle Techniken und ihre Hilfe bei der Präsentation der wissenschaftlichen Daten auf Kongressen.

Herr Prof. Dr. Dr. h.c. Bosch hat nicht gezögert die Betreuung und das Erstgutachten meiner Arbeit vor der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät der CAU zu Kiel zu übernehmen. Dafür gebührt ihm mein herzlicher Dank. Auch erinnere ich mich gerne an die von ihm präsentierte Weltpremiere bei einer Tagung des SFB 617.

Für den Erfolg der Arbeit war die Kooperation mit Wissenschaftlern aus anderen Instituten unerlässlich. So danke ich Herrn Prof. Dr. Holtmeier (damals: Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Frankfurt am Main, gegenwärtig: Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie, Diabetologie, Stoffwechselerkrankungen und Allgemeine Innere Medizin, Krankenhaus Porz am Rhein, Köln) und Herrn Dr. Braun (Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie, UK S-H, Campus Kiel) für die Überlassung von aus Darmbiopsien isolierten Leukozyten.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Rosenstiel und Herrn Dr. Till (Institut für klinische Molekularbiologie, CAU, Kiel) für die Bereitstellung von mit NOD2 stabil transfizierten HEK 293T-Zellen und NOD2 kodierenden Plasmidvektoren. Ebenso bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Grötzinger (Institut für Biochemie, CAU, Kiel), der den  $\alpha$ NOD2 L 104 zur Verfügung stellte, sowie bei Herrn Dr. Meyer-Hoffert (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) für die Überlassung der Zelllinie HaCaT.

Bei Herrn Prof. Dr. Schröder und PD Dr. Harder (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) möchte ich mich herzlich für den Überstand adhärent wachsender *Ps. aeruginosa* und für informative Gespräche über AMPs im Allgemeinen und PCR-Primern zum Nachweis der entsprechenden mRNAs im Besonderen bedanken. Zu Dank verpflichtet bin ich ebenfalls Frau Voß und Herrn Prof. Dr. Podschun (Institut für Infektionsmedizin, UK S-H, Campus Kiel) für die Durchführung des Agardiffusions-*Screening-Assay*, sowie Herrn Prof. Dr. Wiedow und Mitarbeitern (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, UK S-H, Campus Kiel) für die Ermittlung der Elafinkonzentration mittels ELISA.

Innerhalb des Instituts für Immunologie danke ich besonders den Mitgliedern der AG Janßen, vor allem Alyn Gerneth, Dr. Marcus Lettau und Prof. Dr. Ottmar Janßen, sowie den Mitgliedern der AG Schütze, vor allem Dr. Vladimir Tchikov und Prof. Dr. Stefan Schütze für die

fruchtbare Zusammenarbeit. Ein besonderer Dank geht an Herrn Dr. Wottge, der mir trotz seiner vielfältigen Aufgaben in Lehre und Logistik wertvolle Hilfe bei meinen Aufgaben für die Betreuung des Hörsaals und diverser Wasseraufbereitungsanlagen leistete.

Innerhalb der AG Kabelitz/Wesch bin ich Frau Hoa Ly für die geduldige Vermittlung der Grundsätze bei Zellkultur und FACS-Analyse in den ersten Wochen im Labor zu besonderem Dank verpflichtet. Weiterhin bedanke ich mich bei Michaela Unmack, Jan Lenke, Sandra Usat und Dr. Hans-Heinrich Oberg für die Sortierung der Zellen am FACSAria<sup>TM</sup>. Dr. Susann Beetz gebührt mein Dank für lehrreiche Diskussionen über experimentelle Methodik und wissenschaftliche Recherche. Bei Ina Martens, Monika Kunz, Bärbel Reimann, Katrin Köbsch und Kirsten Krengel möchte ich mich für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung der Experimente bedanken.

Jule, Kathrin, Maren, Marten, Pit und Tim haben sich mit der kritischen Durchsicht der vorliegenden Arbeit ein herzliches Dankeschön verdient. Für lehrreiche und nicht immer ganz fachliche Diskussionen, die gute Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung in vielerlei Hinsicht danke ich neben den oben genannten Personen auch Anja, Bärbel, Biny, Birgit, Elke, Graziella, Hamed, Heike, Hendrik, Mario, Matthias, Melanie, Sandra, Signe, Stefan, Stefanie, Susann, Ulrike und allen die hier aufgeführt sein sollten und ich vergessen habe.

Allen Blutspendern inner- und außerhalb des Instituts gilt mein Dank für ihren Dienst bei der Verbesserung der Lebensqualität von Patienten und die Unterstützung der medizinischen Forschung.

Für die Finanzierung meines Lebensunterhalts während der letzten zweieinhalb Jahre, in denen experimentelle Arbeiten, die Mitarbeit an drei Publikationen, die Betreuung eines Praktikums und die Erstellung der vorliegenden Arbeit zu leisten waren, danke ich insbesondere meinen Eltern, meiner Freundin Kathrin und meiner Leidenschaft fürs Motorradfahren, die mich in der Hoffnung auf den Erwerb einer „Maschine“ in der Vergangenheit Ersparnis zusammengetragen ließ. Darüber hinaus gilt meinen Eltern und meinem Bruder besonderer Dank für die fortwährende Unterstützung auch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Kathrin für fachliche und kulinarische, insbesondere aber für emotionale und zukunftsgestaltende Unterstützung in jeder Lebenssituation danken.