

Immunregulatorische Funktionen von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten



DISSERTATION

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

vorgelegt von
Christian Peters

Kiel
2013

Johann Wolfgang von Goethe (Faust I): „*Blut ist ein ganz besonderer Saft*“

Referent: Professor Dr. Thomas Roeder

Korreferent: PD. Dr. Daniela Wesch

Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2013

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	I
2.	Abkürzungen.....	IV
3.	Einleitung	1
3.1.	T-Zellen und T-Zell-Differenzierung	1
3.2.	$\gamma\delta$ T-Zellen	2
3.2.1.	$\gamma\delta$ T-Zellen zwischen angeborener und erworbener Immunität.....	2
3.3.	Regulatorische T-Zellen.....	5
3.3.1.	Verschiedene Populationen regulatorischer T-Zellen	6
3.3.2.	Phänotypische Charakterisierung von Treg.....	7
3.3.3.	Funktionsweise regulatorischer T-Zellen.....	10
3.4.	$\gamma\delta$ T-Zellen im immunregulatorischen Geschehen.....	12
3.4.1.	Kostimulatorische und antigenpräsentierende Funktionen bei $\gamma\delta$ T-Zellen	12
3.4.2.	Interaktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen und Treg	13
3.4.3.	Induzierte regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen.....	14
3.4.4.	Tumor-induzierte regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen	14
3.4.5.	Intrinsische, regulatorische Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen	15
3.5.	Suppressive und kostimulatorische Oberflächenmoleküle	17
3.5.1.	CTLA-4 : CD80/-86	18
3.5.2.	PD-1 : PD-L1/2	19
3.6.	Toll-like Rezeptoren (TLR).....	21
3.6.1.	TLR bei $\gamma\delta$ T-Zellen	22
3.6.2.	Aufbau und Signaltransduktion von TLR	23
3.7.	Fragestellung.....	26
4.	Material.....	27
4.1.	Substanzen.....	27
4.1.1.	Zytokine und Stimulanzen	27
4.1.2.	Substanzen.....	27
4.1.3.	Inhibitoren.....	28
4.2.	Puffer und Lösungen	28
4.2.1.	Für zellbiologische Arbeiten verwendete Puffer und Lösungen	28
4.2.2.	Für die Proteinbiochemie verwendete Puffer und Lösungen	29
4.3.	Kits	30
4.4.	Antikörper	30
4.4.1.	Zur Analyse von Oberflächenmolekülen verwendete mAk	30
4.4.2.	Zur Analyse intrazellulärer Moleküle verwendete monoklonale Antikörper	31
4.4.3.	Agonistische und antagonistische Antikörper	32
4.4.4.	Antagonistische Fusionsproteine	32
4.4.5.	Zur <i>Western blot</i> -Analyse verwendete Antikörper	32
4.5.	Geräte	33
4.6.	Verbrauchsmaterialien	33
4.7.	Software	34
4.8.	Statistik.....	34
5.	Methoden.....	35
5.1.	Zell-basierte Methoden	35
5.1.1.	Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut.....	35
5.1.2.	Magnetische Zellseparation (MACS).....	35
5.1.3.	Kryokonservierung	36
5.1.4.	Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität	36
5.1.5.	Kulturbedingungen.....	36
5.1.6.	Stimulation von T-Zellen	37
5.1.6.1.	Blockierende Antikörper und Fusionsproteine	38
5.1.6.2.	TLR2-Liganden-Stimulation	39

- Inhaltsverzeichnis -

5.1.7.	Proliferationsanalyse anhand von ³ H-Tymidineinbau	39
5.2.	Durchflusszytometrische Methoden	40
5.2.1.	Oberflächenantikörpermarkierung	40
5.2.2.	Intrazelluläre Antikörpermarkierungen.....	40
5.2.3.	SCDA (Standard Cell Dilution Assay).....	41
5.3.	Proteinbiochemische Methoden.....	43
5.3.1.	Herstellung von Zelllysaten.....	43
5.3.2.	Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....	44
5.3.3.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
5.3.4.	Western blot Transfer	45
5.3.5.	Entfernen von Antikörpern von Western blot-Membranen („Stripping“)	45
5.4.	Immunochemische Methoden.....	46
5.4.1.	Immunodetektion von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran	46
5.4.2.	ELISA	46
5.4.3.	Phosphorylierungs-Rasteranalyse (Phospho-Array-Analyse).....	47
6.	Ergebnisse.....	48
6.1.	Suppressive Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen.....	48
6.1.1.	Das suppressive Potential von Treg und $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich	48
6.1.2.	Expression löslicher Mediatoren bei Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen	50
6.1.3.	Die Abhängigkeit der Suppression von Zellkontakt bzw. der Konkurrenz um IL-2	52
6.1.4.	Die Expression suppressiver und kostimulatorischer Oberflächenmoleküle	53
6.1.5.	Funktionelle Analyse suppressiver Oberflächenmoleküle.....	57
6.2.	TLR(2)-Liganden-induzierte Modulationen	60
6.2.1.	Der Einfluss von TLR2-Liganden auf die Proliferation und Suppressivität	60
6.2.2.	TLR2 abhängige Modulation von Oberflächenmolekülen	61
6.2.3.	Der Einfluss von TLR2-Liganden auf die Produktion und Freisetzung verschiedener löslicher Mediatoren.....	64
6.2.4.	Einfluss von TLR2-Liganden auf verschiedene Signalwege	65
6.3.	Expression von Transkriptionsfaktoren und deren Korrelation mit suppressiver Aktivität.....	73
6.3.1.	Helios- und Foxp3-Expression in Kokulturrexperimenten	74
6.3.2.	Die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in $\gamma\delta$ T-Zellen unter unterschiedlichen Expansionsbedingungen	76
6.3.3.	Korrelation von Helios-Expression und suppressivem Potential bei $\gamma\delta$ T-Zellen	80
7.	Diskussion	86
7.1.	$\gamma\delta$ T-Zellen besitzen suppressives Potential.....	86
7.2.	$\gamma\delta$ T-Zellen weisen weder einen klassischen Treg Phänotyp auf noch induzieren sie diesen bei Responder T-Zellen	87
7.3.	Verschiedene mögliche Mechanismen könnten zur Suppression von $\alpha\beta$ T-Zellen führen	88
7.4.	Die Suppression wird durch zellkontaktabhängige Interaktionen vermittelt	90
7.5.	TLR2-Liganden modulieren die Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen.....	93
7.6.	Für die suppressive Rolle der CTLA-4 : CD86 und der PD-1 : PD-L1-Interaktion spricht auch die Modulation der beteiligten Oberflächenmoleküle nach TLR2-Liganden-Vorinkubation.....	95
7.7.	TLR2-Liganden steigern die Phosphorylierung von Signalmolekülen.....	97
7.8.	$\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren Helios	103
7.9.	Die Expression von Helios in $\gamma\delta$ T-Zellen hat keinen direkten Einfluss auf ihre regulatorische Funktion.....	104
7.10.	CD28-Kostimulation induziert die Helios-Expression	105
7.11.	Kostimulation durch CD28 steht im Zusammenhang mit der Induktion von regulatorischen Funktionen in $\gamma\delta$ T-Zellen.....	106

- Inhaltsverzeichnis -

7.12.	TGF- β führt zur Induktion von Foxp3 in $\gamma\delta$ T-Zellen, nicht aber notwendigerweise zu einem regulatorischen Phänotyp.....	107
7.13.	Helios und Foxp3 sind notwendig für die Differenzierung regulatorischer ($\gamma\delta$) T-Zellen	110
7.14.	TGF- β führt zur Differenzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen	111
7.15.	Fazit.....	116
8.	Zusammenfassung	117
8.1.	Zusammenfassung	117
8.2.	Summary	119
9.	Literatur.....	120
10.	Anhang	140
	Publikationsliste.....	140
	Eidesstattliche Erklärung	142
	Lebenslauf.....	143
	Danksagung	144

- Abkürzungen -

2. Abkürzungen

³ H-TdR/ ³ H-Thymidin		Tritium-markiertes Thymidin
AICD	<i>Activation induced cell death</i>	Aktivierungsinduzierter Zelltod
AP-1	<i>Activator protein 1</i>	
APZ	<i>Antigen presenting cell</i>	Antigenpräsentierende Zelle
AKT	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog</i>	
BCG		<i>Bacillus Calmette-Guerin; Mycobacterium bovis</i> - Impfstoff
BrHPP	<i>Bromohydrin pyrophosphat</i>	Bromohydrin-Pyrophosphat
CK2	<i>Casein kinase 2</i>	Casein Kinase 2
CCL	<i>C-C motif ligand</i>	
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CD152)</i>	
DN	<i>Double negative stage (T cell development)</i>	Doppelt negatives Stadium (T-Zell-Entwicklung; CD4 CD8 ⁻)
DP	<i>Double positive stage (T cell development)</i>	Doppelt positives Stadium (T-Zell-Entwicklung; CD4+CD8 ⁺)
DZ	<i>Dendritic cells</i>	Dendritische Zellen
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>	
Foxp3	<i>Forkhead box protein P3</i>	
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
GSK-3	<i>Glykogen synthase kinase 3</i>	
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>	
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-related protein (TNFRSF18)</i>	
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>	Histon-Deacetylase
HAT	<i>Histone acetyltransferase</i>	Histon-Acetyltransferase
HMB-PP	<i>Hydroxy-Methyl-Butenyl-Pyrophosphat</i>	Hydroxymethylbutenyl-Pyrophosphat
IDO	<i>Indolamin2,3-dioxygenase</i>	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IEL	<i>Intraepithelial lymphocyte</i>	Intraepitheliale Lymphozyten
IKK	<i>IκB kinase</i>	IκB Kinase
IL	<i>Interleukin</i>	Interleukin
IFN	<i>Interferon</i>	Interferon
IPP	<i>Isopentenyl pyrophosphate</i>	Isopentenylpyrophosphat
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>	
iTreg	<i>Induced Treg</i>	Induzierte Treg
ITSM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>	
IκB	<i>Inhibitor of NF-κB</i>	Inhibitor von NF-κB
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>	C-Jun-N-terminale Kinasen
LAP	<i>Latency-associated peptide</i>	
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>	
MSK2	<i>Mitogen- and stress-activated protein kinase 2</i>	
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>	Haupthistokompatibilitätskomplex
mAk		Monoklonaler Antikörper
MIC	<i>MHC class I polypeptide-related sequence</i>	
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>	
MIP-1α	<i>Macrophage inflammatory protein-1α (CCL3)</i>	

- Abkürzungen -

MIP-1 β	<i>Macrophage inflammatory protein-1β (CCL4)</i>	
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	
NKG2D	<i>Natural killer gene group 2, member D</i>	
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>	
NLR	<i>Nod-like receptors</i>	
NK	<i>Natural killer cell</i>	Natürliche Killerzelle
nTreg	<i>Natural Treg</i>	Natürliche Treg
NuRD	<i>Nucleosome remodeling and deacetylase (complex)</i>	
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>	Pathogenen assoziierte molekulare Strukturen
PBMZ	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>Programmed death-1 (CD279)</i>	
PDK1	<i>Phosphoinositide dependent protein kinase 1 (PDPK1)</i>	
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1 (B7-H1; CD274)</i>	
PD-L2	<i>Programmed death ligand 2 (B7-DC; CD273)</i>	
PI3K	<i>Phosphatidylinositol-3-kinase</i>	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
PP2A	<i>Protein phosphatase 2</i>	
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>	Mustererkennungsrezeptor
RANTES	<i>Regulated and normal T cell expressed and secreted (CCL5)</i>	
Responder	<i>CD4⁺CD25⁻ T cell</i>	CD4 ⁺ CD25 ⁻ T-Zellen
rcf	<i>Relative Centrifugal Force</i>	Relative Zentrifugalbeschleunigung
ROR γ	<i>Retinoic acid receptor-related orphan receptor γ</i>	
SCDA	<i>Standard cell dilution assay</i>	
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE		SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese
SHP	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase</i>	
siRNA	<i>Small interfering RNA</i>	
SE		<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>	
TAK1	<i>TGF-β activated kinase 1</i>	TGF- β aktivierte Kinase 1
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>	
T _{CM}	<i>Central memory T cell</i>	Zentrale Gedächtnis T-Zelle (CD27 ⁺ CD45RA ⁻)
T _{EM}	<i>Effektormemory T cell</i>	Effektor-Gedächtnis T-Zelle (CD27 ⁻ CD45RA ⁻)
T _{EMRA}	<i>Terminally differentiated effektor memory T cell</i>	(CD27 ⁻ CD45RA ⁺) terminal differenzierte Effektor-Gedächtnis T-Zelle
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>	
TIM-3	<i>T cell immunoglobulin mucin-3 (HAVCR2)</i>	
Th	<i>T helper cell</i>	T-Helferzelle
TIR	<i>Toll-interleukin 1 receptor (domain)</i>	Toll-IL-1 Rezeptor-(Domäne)
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>	Tumornekrosefaktor
TIRAP	<i>TIR domain containing adaptor protein (Mal)</i>	
TLR	<i>Toll-like receptor</i>	Toll-ähnlicher Rezeptor
T _{Naiv}	<i>Naive T cells</i>	Naive T-Zelle (CD27 ⁺ CD45RA ⁺)

- Abkürzungen -

TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>	
TPA	<i>12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate</i>	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Treg	<i>Regulatory T cell</i>	Regulatorische T-Zelle
TZR	<i>T cell receptor</i>	T-Zellrezeptor

3. Einleitung

Das Immunsystem lässt sich in zwei unterschiedliche Bereiche einteilen. Zum einen in die angeborene Immunität, die unmittelbar bei Kontakt mit einem Pathogen bzw. bei ausbleibender Selbsterkennung reagiert. Sie führt zur Produktion von Chemokinen, Zytokinen, antimikrobiellen Proteinen, zytotoxischen Effektorfunktionen (hauptsächlich vermittelt durch natürliche Killerzellen [NK-Zellen]), zum Auslösen der Komplementkaskade, zur Aktivierung von Phagozyten und zur Aktivierung und Reifung von dendritischen Zellen (DZ). Zum anderen in die erworbene oder auch adaptive Immunität, die sich vor allem durch die klonale Expansion von Lymphozyten auszeichnet, die spezifisch gegen den jeweiligen Erreger gerichtet sind. Ein weiteres Merkmal der adaptiven Immunität ist die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, was bei erneutem Kontakt mit dem jeweiligen Pathogen eine beschleunigte Immunantwort ermöglicht. Lymphozyten werden in B-Lymphozyten, welche die humorale und T-Lymphozyten (oder auch T-Zellen), welche die zelluläre Immunantwort vermitteln, unterteilt.

3.1. T-Zellen und T-Zell-Differenzierung

Anhand der exprimierten T-Zellrezeptorketten lassen sich $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ T-Lymphozyten unterscheiden. Die Letzteren stellen den größten Anteil der T-Zellen des peripheren Blutes dar und lassen sich anhand ihres Korezeptors in *cluster of differentiation* (CD) 8^+ und $CD4^+$ T-Zellen differenzieren.

$CD8^+$ T-Zellen erkennen durch den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC: *major histocompatibility complex*) I präsentierte Peptide mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors (TZR) und benötigen dafür das $CD8$ -Molekül als Korezeptor. Durch das MHC I-Molekül, welches auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen exprimiert wird, werden Peptide, die von in der Zelle translatierten Proteinen stammen, präsentiert. MHC I spielt daher eine Rolle bei der Abwehr intrazellulärer Pathogene. $CD8^+$ T-Zellen sind in der Lage TZR spezifisch Zytotoxizität durch Sezernierung zytotoxischer Mediatoren oder Rezeptor-Ligand-Interaktionen zu vermitteln.

Ähnlich wie $CD8^+$ können auch $CD4^+$ T-Zellen durch ihren TZR, unter Zuhilfenahme des Korezeptors $CD4$, mit einem Komplex aus MHC II und gebundenem Peptid, interagieren. MHC II-gebundene Peptide werden vor allem von antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert. Die Bindung der Peptide an MHC II erfolgt nach Degradierung von Proteinen im endolysosomalen Kompartiment, weshalb hauptsächlich Peptide endo- bzw. phagozytotischen Ursprungs präsentiert werden. $CD4^+$ T-Zellen erkennen meist Peptide von Pathogenen, die extrazellulär oder im endosomalen Kompartiment lokalisiert sind und unterstützen als T-Helferzellen die Immunantwort. Funktionell werden T-Zellen im Wesentlichen in T-Helferzellen (Th) Typ 1, welche die zellvermittelte Immunität und die Beseitigung intra-

- Einleitung -

zellulärer Pathogene fördern und in Th2-Zellen, welche die humorale Immunität und damit Eliminierung extrazellulärer Pathogene unterstützen, unterteilt. Die Differenzierung zu Th1-Zellen wird durch Interleukin (IL) -12 und Interferon (IFN) γ gesteuert, während für die zu Th2-Zellen IL-4 notwendig ist. Für eine Th1-Antwort ist die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-2, IFN- γ und Tumornekrosefaktor (TNF) α charakteristisch, für eine Th2-Antwort dagegen Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 und IL-25. Die für die unterschiedlichen Differenzierungstypen notwendigen Zytokine werden von den jeweiligen T-Helferzellen selbst hergestellt, was zu einer positiven Rückkopplung und Verstärkung der Antwort führt. Zusätzlich können IFN- γ , IL-4 und IL-10 negativ regulatorisch auf die jeweils entgegengesetzte Th-Antwort wirken. Eine weitere Differenzierungsmöglichkeit ist der Th17-Phänotyp, an dessen Induzierung im Menschen IL-6, *Transforming growth factor β* (TGF- β), IL-21 und IL-23 beteiligt sind. Dieser wird vor allem durch die Freisetzung von IL-17, IL-21, IL-22 und IL-23 charakterisiert und spielt bei Entzündung und Gewebeverletzung eine Rolle. IL-17 (IL-17A und IL-17F) ist stark proinflammatorisch, aktiviert neutrophile Granulozyten und wirkt auf diese auch chemotaktisch (Manel *et al.* 2008; Dong 2008).

Die verschiedenen Differenzierungstypen lassen sich anhand der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren charakterisieren. So sind die Transkriptionsfaktoren *T-box expressed in T cells* (T-bet) für die Th1-Antwort, *GATA binding protein 3* (GATA-3) für die Th2-Antwort und *retinoic acid receptor-related orphan receptor γ* (ROR γ t) für Th17-Antwort kennzeichnend (Bi & Yang 2012; Wilson *et al.* 2009). T-Zellen können außerdem zu regulatorischen T-Zellen (Treg) differenzieren und einer Immunantwort entgegenwirken, worauf in Kapitel 3.3 noch detaillierter eingegangen wird.

3.2. $\gamma\delta$ T-Zellen

3.2.1. $\gamma\delta$ T-Zellen zwischen angeborener und erworbener Immunität

$\gamma\delta$ T-Zellen besitzen sowohl Eigenschaften der angeborenen als auch der erworbenen Immunität. Sie erkennen wie Zellen der angeborenen Immunität Antigene direkt, wobei dies allerdings mit Hilfe ihres TZR geschieht. Anders als bei der Antigenerkennung durch $\alpha\beta$ T-Zellen werden diese MHC unabhängig erkannt und müssen zuvor nicht prozessiert worden sein. Daher werden für diesen Vorgang die Korezeptoren (CD4 bzw. CD8) auch nicht benötigt, die hiermit konform, auf den meisten $\gamma\delta$ T-Zellen nicht vorhanden sind. Theoretisch verfügen $\gamma\delta$ T-Zellen über ein ähnlich großes TZR-Repertoire wie $\alpha\beta$ T-Zellen, allerdings weisen $\gamma\delta$ T-Zellen *in vivo* eine deutlich geringere Variabilität der *complementarity determining region* (CDR) 3 auf. Dies deutet darauf hin, dass $\gamma\delta$ T-Zellen *in vivo* eine begrenzte Anzahl von Antigenen erkennen (Shin *et al.* 2005). Die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren eine V δ 1- oder V δ 2-Kette zusammen mit bestimmten V γ -Ketten. Man kann $\gamma\delta$ T-Zellen anhand der

- Einleitung -

von ihnen exprimierten variablen Ketten in verschiedene Subpopulationen unterteilen. Diese $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen weisen unterschiedliche präferentielle Lokalisationen im Körper auf, was auf unterschiedliche Aufgaben hinweist. $V\delta 1$ $\gamma\delta$ T-Zellen sind beim erwachsenen Menschen eher in Epithelien zu finden und stellen nur einen kleinen Prozentsatz der $\gamma\delta$ T-Zellen des peripheren Blutes dar. Im Gegensatz dazu sind $V\delta 2$ $\gamma\delta$ T-Zellen primär im peripheren Blut zu finden und machen dort mit 50-95% den größten Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen aus (Kabelitz & He 2012; Triebel *et al.* 1988). $V\delta 1$ $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen stressinduzierte Oberflächenmoleküle (u.a. *MHC class I polypeptide-related sequence A/B* [MICA/B]) (Groh *et al.* 1999) und $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen phosphorylierte Antigene (Isopentenylpyrophosphat [IPP], Hydroxymethylbutenyl-Pyrophosphat [HMB-PP]) (Jomaa *et al.* 1999; Altincicek *et al.* 2001). Bei HMB-PP und IPP handelt es sich um phosphorylierte Nicht-Peptide mit einem geringen Molekulargewicht, die als Phosphoantigene (pAg) bezeichnet werden. HMB-PP ist ein Zwischenprodukt des mikrobiellen Nicht-Mevalonat- (Rohmer-) Signalweges der Isoprenoidbiosynthese und findet sich in den meisten pathogenen Bakterien. HMB-PP wird von eukaryotischen Zellen nicht produziert. Außerdem erkennen $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen, allerdings mit 10.000-mal schwächerer Affinität, IPP, ein strukturell ähnliches Produkt des Mevalonat- und Nicht-Mevalonat-Signalweges. Es ist in pro- und eukaryotischen Zellen zu finden und führt aufgrund der schwächeren Affinität in physiologischen Konzentrationen nicht zur Aktivierung von $V\delta 2$ $\gamma\delta$ T-Zellen (Burk *et al.* 1995). In Tumorzellen liegt häufig eine Fehlregulation des Mevalonat-Signalweges vor, was zur Akkumulation und verstärkten Freisetzung von IPP und somit wiederum zur Aktivierung der Zellen führen kann. Es ist auch möglich $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen durch Bromohydrin-Pyrophosphat (BrHPP), das ein synthetisches Analogon von IPP ist und eine höhere biologische Aktivität besitzt, zu stimulieren (Espinosa *et al.* 2001). Auch durch Aminobisphosphonate, die zur Blockade der *farnesylpyrophosphate synthase* (FPPS) innerhalb des Isoprenoidbiosyntheseweges und dadurch zur Akkumulation von IPP führen, werden $V\delta 2$ $\gamma\delta$ T-Zellen aktiviert (van Beek *et al.* 1999). $V\gamma 9V\delta 2$ T-Zellen benötigen keinen Kontakt mit Peptid-MHC präsentierenden APZ in den Lymphknoten, um ihre Antigene zu erkennen. Sie erkennen diese zellkontaktabhängig auf Phosphoantigen-präsentierenden Zellen (z.B. Monozyten/DZ oder aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen). Zusätzlich zum TZR-Stimulus werden für die Proliferation Zytokine wie IL-2 oder IL-15 benötigt (Pechhold *et al.* 1994b; Boullier *et al.* 1999; Eberl *et al.* 2002). Bei verschiedenen mikrobiellen Infektionen kommt es zu einer Expansion von $V\delta 2$ $\gamma\delta$ T-Zellen. Beim Menschen wurde dies unter anderem für Infektionen mit *Francisella tularensis* (Tularemie), *Salmonella* (Salmonellose), *Brucella* (Brucellose), *Ehrlichia* (Ehrlichiose), *Anaplasma* (Anaplasmose), *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* (bakterielle Meningitis), *Mycobacterium avium* und *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose) beschrieben (Chen & Letvin 2003b). Eine weitere wichtige Eigenschaft von $\gamma\delta$ T-Zellen sind direkte zytotoxische Effektorfunktionen. Diese

- Einleitung -

können beispielsweise durch Bindung des V δ 1 $\gamma\delta$ TZR an den stressinduzierte Liganden MICA auf der Oberfläche von Tumorzellen ausgelöst werden (Zhao *et al.* 2006). V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen können ebenfalls zytotoxische Effektorfunktionen gegen Tumorzellen aufweisen, die durch (akkumuliertes) IPP und einen positiven Kostimulus z.B. infolge der Bindung von MICA/B an *natural killer gene 2D* (NKG2D) ausgelöst werden (Wrobel *et al.* 2007; Todaro *et al.* 2009). NK-Rezeptoren wie NKG2D sind typischerweise auf Zellen des angeborenen Immunsystems wie NK-Zellen, jedoch auch auf nahezu allen $\gamma\delta$ T-Zellen zu finden. Die verschiedenen Subpopulationen von $\gamma\delta$ T-Zellen erkennen also mit Hilfe ihres TZR bestimmte konservierte (teilweise auch pathogen assoziierte) Strukturen. Ihre TZR weisen somit eine gewisse Ähnlichkeit zu keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren (PRR: *pattern recognition receptors*) auf. Außerdem exprimieren $\gamma\delta$ T-Zellen funktionelle PRR wie z.B. *Nod-like receptors* (NLR) oder *Toll-like receptors* (TLR), aufgrund derer sie direkt auf Pathogene reagieren können, worauf in Kapitel 3.6.1 noch genauer eingegangen wird (Wesch *et al.* 2006; Pietschmann *et al.* 2009; Marischen *et al.* 2011).

$\gamma\delta$ T-Zellen besitzen allerdings auch einige Eigenschaften, aufgrund derer man sie eher der erworbenen Immunität zurechnen würde. Sie können sich z.B. zu Gedächtniszellen entwickeln und ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. Nach einer vorangegangenen mykobakteriellen Infektion in Makaken kommt es bei einer Reinfektion zu einer beschleunigten Expansion von V δ 2 T-Zellen (Shen *et al.* 2002). Außerdem weist ein Großteil der V γ 9V δ 2 T-Zellen im Blut einen *memory* Phänotyp auf. Man kann $\gamma\delta$ T-Zellen anhand ihres Phänotyps in verschiedene Subpopulationen einteilen, welche unterschiedlichen Reifungsstadien entsprechen (Dieli *et al.* 2003). Im Menschen weisen etwa 80% der V γ 9V δ 2 T-Zellen eine Expression des positiv-kostimulatorischen Oberflächenmoleküls CD27 auf, das bei Ligandenbindung die Zellen vor aktivierungsinduziertem Zelltod (AICD: *Activation induced cell death*) schützt (Dieli *et al.* 2003; DeBarros *et al.* 2011). Anhand der Oberflächenmarker CD27 und CD45RA ist es möglich $\gamma\delta$ T-Zellen in verschiedene Subpopulationen aus naiven (T_{Naiv} : CD27⁺CD45RA⁺), *central memory* (T_{CM} : CD27⁺CD45RA⁻), *effector memory* (T_{EM} : CD27⁻CD45RA⁻) und terminal differenzierte *effector memory* Zellen einzuteilen (T_{EMRA} : CD27⁻CD45RA⁺). T_{Naiv} und T_{CM} besitzen keine direkten Effektorfunktionen und exprimieren Chemokinrezeptoren für die Migration zu sekundären lymphatische Organen. T_{EM} und T_{EMRA} exprimieren Chemokinrezeptoren, die für die Migration zu Entzündungsherden essentiell sind und üben direkte Effektorfunktionen wie Zytokinproduktion bzw. Zytotoxizität aus (Dieli *et al.* 2003). Zudem können $\gamma\delta$ T-Zellen unterschiedlich differenziert sein, sie weisen jedoch vorwiegend ein Th1-Profil auf. Isolierte V γ 9V δ 2 T-Zellen, die *ex vivo* durch Phosphoantigene stimuliert wurden, setzen Th1-Zytokine wie IFN- γ , TNF- α und GM-CSF frei (Garcia *et al.* 1997). Außerdem können die proinflammatorisch wirkenden Chemokine *macrophage inflammatory protein-1 α /C-C motif ligand 3* (MIP-1 α /CCL3), *macrophage*

- Einleitung -

inflammatory protein-1 β (MIP-1 β /CCL4) und *regulated and normal T cell expressed and secreted* (RANTES/CCL5) produziert werden (Poccia *et al.* 1999). $\gamma\delta$ T-Zellen sind allerdings, wie anhand frisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen und auch anhand polyklonal aktivierter $\gamma\delta$ T-Zelllinien bzw. Klone gezeigt werden konnte, je nach verwendetem Antigenstimulus und dem umgebenden Zytokinmilieu sowohl in der Lage Th1- als auch Th2-Zytokine zu produzieren (Wesch *et al.* 2001; Ferrick *et al.* 1995; Sireci *et al.* 1997). Ebenso kann in humanen $\gamma\delta$ T-Zellen analog zu $\alpha\beta$ T-Zellen auch eine Th17-Differenzierung induziert werden (Ness-Schwickerath *et al.* 2010).

Da $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl Charakteristika der angeborenen als auch der erworbenen Immunität aufweisen, lassen sich $\gamma\delta$ T-Zellen keinem der beiden eindeutig zuordnen und werden daher oft als Bindeglied zwischen beiden Bereichen betrachtet (Wesch *et al.* 2011). Die verschiedenen immunologischen Funktionen und Interaktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

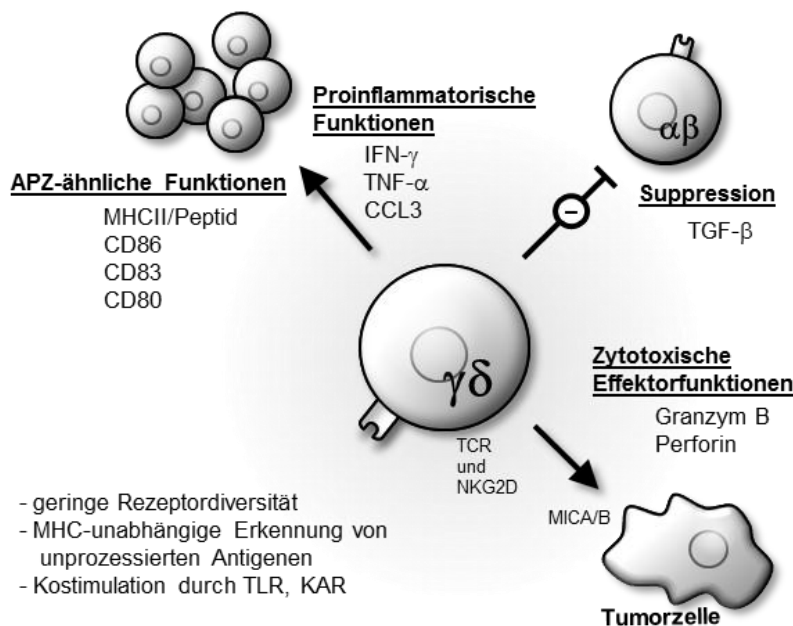


Abb. 1: Schematische Darstellung wichtiger immunologischer Interaktionen und Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen.

3.3. Regulatorische T-Zellen

Forkhead box protein 3 (Foxp3) exprimierende CD4⁺CD25⁺ Treg kontrollieren die Immunantwort in Reaktion auf Eigen- und Fremd-Antigene und sind notwendig um die Balance zwischen Immunreaktion und Toleranz zu erhalten (Belkaid & Rouse 2005; Mottet & Golshayan 2007; Sakaguchi 2004; Tang & Bluestone 2008). Durch Treg wird die Aktivität von autoreaktiven T-Zellen unter Kontrolle gehalten.

Im Menschen sind verschiedene Autoimmunerkrankheiten, wie z.B. Multiple Sklerose (Viglietta *et al.* 2004), Rheumatoide Arthritis (Ehrenstein *et al.* 2004) oder Typ 1 Diabetes (Lindley *et*

- Einleitung -

al. 2005) mit Defizienzen von Treg (bezüglich deren Qualität oder Quantität) assoziiert. Dementsprechend können im Mausmodell viele durch T-Zellen vermittelte Krankheitsbilder wie allergische Reaktionen, *graft-versus-host disease* (GvHD) und Autoimmunerkrankungen wie Typ 1 Diabetes, experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, Gastritis, Colitis, Glomerulonephritis und Polyarthrit durch die Gabe von Treg unterdrückt werden (Sakaguchi 2004). Die Depletion von Treg hingegen kann eine effektive anti-Tumor Antwort induzieren oder eine Immunantwort gegen eindringende Mikroorganismen verstärken, allerdings kann sie auch zu Autoimmunität, allergischen Reaktionen gegen harmlose Umweltfaktoren oder zur Aufhebung der fötal-maternalen Toleranz führen (Sakaguchi 2004; Kim *et al.* 2007).

Treg haben ein sehr breites Spektrum an Interaktionspartnern und können die Aktivierung, Proliferation und/oder die Effektorfunktionen einer großen Bandbreite von Immunzellen wie z.B. von konventionellen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen, Neutrophilen und Mastzellen supprimieren (Ralainirina *et al.* 2007; Lim *et al.* 2005; Lewkowicz *et al.* 2006; Taams *et al.* 2005; Kashyap *et al.* 2008; Oberg *et al.* 2010; Haeryfar *et al.* 2005; Houot *et al.* 2006). Für die Homeostase benötigen Treg die Anwesenheit eines Antigenes, eines CD28-Kostimulus sowie die von IL-2 (Garza *et al.* 2000; Setoguchi *et al.* 2005; Salomon *et al.* 2000; Tang *et al.* 2003). Für die Initiation suppressiver Funktionen ist eine antigenspezifische Aktivierung ebenfalls notwendig (Corthay 2009).

3.3.1. Verschiedene Populationen regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen unterteilt man in natürliche und induzierte Treg. Natürliche Treg (nTreg) entstehen bereits im Thymus und exprimieren konstitutiv den Transkriptionsfaktor Foxp3. Dort sind sie als Foxp3⁺ T-Zellen ab einem bestimmten Zeitpunkt zwischen dem Übergang von einem doppelt positiven (DP: CD4⁺CD8⁺) zum einfach positiven Stadium (EP: CD4⁺) nachweisbar (Fontenot *et al.* 2005). Da Treg sich im Thymus entwickeln und reifen, ist ihr TZR-Repertoire vor allem gegen Selbst-Antigene gerichtet (Vignali *et al.* 2008; Fontenot *et al.* 2005). nTreg proliferieren nach TZR Stimulation nur, wenn ausreichend IL-2 zur Verfügung steht. Der konstitutiv exprimierte Transkriptionsfaktor Foxp3 kann als Transkriptionsrepressor fungieren. Seine Interaktion mit verschiedenen Proteinen der Promotorregionen von Zytokinen wie IL-2 und IFN- γ führt dazu, dass Treg selbst nicht in der Lage sind IL-2, IFN- γ und verschiedene andere Zytokine zu produzieren (Chen *et al.* 2006; Schubert *et al.* 2001; Wu *et al.* 2006a).

Induzierte Treg (iTreg) verlassen den Thymus als CD4⁺Foxp3⁻ Zellen. Sie beginnen erst nach Antigenerkennung in Anwesenheit tolerogener Stimuli Foxp3 zu exprimieren (Curotto de Lafaille & Lafaille 2009). TGF- β ist wichtig für die Entwicklung und den Bestand von iTreg. Mäuse, die keinen TGF- β -Rezeptor II exprimieren, weisen eine reduzierte Anzahl von iTreg

- Einleitung -

auf und entwickeln autoimmune Entzündungsreaktionen in verschiedenen Organen (Marie *et al.* 2005). In Anwesenheit von IL-2 und TGF- β können iTreg *in vitro* aus Foxp3⁻ T-Zellen generiert werden (Chen *et al.* 2003; Rubtsov & Rudensky 2007; Fantini *et al.* 2004; Davidson *et al.* 2007).

Neben Foxp3⁺ gibt es noch andere Populationen von induzierten Treg, die in der Peripherie aus naiven T-Zellen entstehen und nicht spezifisch für im Thymus präsentierte Antigene sind (Cottrez & Groux 2004). Zu diesen gehören Tr1 Zellen, die *in vitro* durch Antigenstimulation in Anwesenheit von IL-10 induziert werden und die IL-10 und TGF- β sezernieren sowie Th3 Zellen, für die eine Funktion in Zusammenhang mit oraler Toleranz und mukosaler Immunität vermutet wird (Chen *et al.* 1994; Groux *et al.* 1997; Sun *et al.* 2006). Des Weiteren sind auch regulatorische Funktionen für $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben worden (siehe auch Kap. 3.4).

3.3.2. Phänotypische Charakterisierung von Treg

Treg werden anhand der Expression bestimmter Oberflächenproteine, wie z.B. CD39 (ENTPD1: Ectonucleoside triphosphate diphospho-hydrolase 1), *cytotoxic T lymphocyte antigen 4* (CTLA-4), *glucocorticoid-induced TNFR-related protein* (GITR), *Lymphocyte-activation gene 3* (LAG-3), CD25 (starke Expression) und CD127 (niedrige/keine Expression) bzw. durch Transkriptionsfaktoren wie Foxp3 oder Helios charakterisiert. Allerdings hat sich gezeigt, dass die meisten dieser charakteristischen mit Treg assoziierten Moleküle im Rahmen der T-Zell Aktivierung ebenfalls induziert werden können (Vignali *et al.* 2008). Auf konventionellen T-Zellen wird z.B. CD25 (die α -Kette des IL-2-Rezeptors) und auch das negativ-regulatorische Molekül CTLA-4 nach Aktivierung heraufreguliert (Smith 1988; Linsley *et al.* 1996; Shevach 2009). Einen Durchbruch bei der Charakterisierung von Treg brachte daher erst die Beschreibung des für sie spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3. Die für Treg charakteristischen bzw. mit diesen assoziierten Moleküle sind in Abbildung 2 schematisch zusammengefasst.

3.3.2.1. Foxp3

Die Bedeutung des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die Immunregulation wurde anhand von Mäusen, welche die Mutation *scurfy* homozygot aufweisen, erkannt. Diese Mäuse exprimieren ein funktionsloses Foxp3 Protein und weisen ein lymphoproliferatives Krankheitsbild auf, an dem sie innerhalb von vier Wochen nach Geburt sterben (Brunkow *et al.* 2001). Menschen die eine Mutation des Foxp3-Gens aufweisen, leiden an einer als *immune dysfunction/polyendocrinopathy/enteropathy/X-linked* (IPEX) bezeichneten Autoimmunerkrankung, die sich durch Diarrhö, meist auch Dermatitis und Immunreaktionen gegen verschiedene endokrine Organe (oft Typ 1 Diabetes oder Thyreoiditis) auszeichnet. Ihre Lebenserwartung liegt bei nur etwa zwei Jahren (Ziegler 2006).

- Einleitung -

Foxp3 gehört zu den *Forkhead-Box* Proteinen, einer Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die eine charakteristische DNA-Bindedomäne (*winged helix DNA-binding domain*) besitzen, welche eine Variante des Helix-Turn-Helix-Motivs darstellt. Proteine dieser Familie sind an Prozessen des Zellwachstums, der Differenzierung und der Proliferation beteiligt. Foxp3 ist für die Differenzierung von Treg innerhalb des Thymus sowie für deren Bestand und regulatorische Funktion notwendig (Zheng & Rudensky 2007; Sakaguchi *et al.* 2008). Obwohl gezeigt werden konnte, dass Foxp3 mit verschiedenen Proteinen wie z.B. *acute myeloid leukemia 1 protein/runt-related transcription factor 1* (AML1/Runx1), Histon-Acetyltransferasen (HAT), Histon-Deacetylasen (HDAC), *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) und *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- κ B) interagiert (Bettelli *et al.* 2005; Wu *et al.* 2006b; Li *et al.* 2007; Ono *et al.* 2007), ist der molekulare Mechanismus der Suppression noch weitgehend unbekannt. Von Bedeutung für die Suppression ist möglicherweise die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Eos, durch welchen die Stilllegung von Genen und Chromatinmodifikationen vermittelt werden könnte (Pan *et al.* 2009). Foxp3 wird von iTreg erst nach deren Entstehung in der Peripherie exprimiert. Eine schwache TZR-Stimulation führt oft zur Induktion von Foxp3. Bei Anwesenheit von TGF- β kommt es ebenfalls zur Foxp3-Induktion, auch wenn der TZR-Stimulus ansonsten hierfür aufgrund hoher Antigenstärke bzw. Dichte zu stark gewesen wäre (Josefowicz & Rudensky 2009). In der Maus konnte gezeigt werden, dass die TGF- β -induzierte Foxp3-Expression in iTreg im Vergleich zu nTreg weniger stabil ist. Diese Tatsache ist auf unterschiedliche Methylierungsmuster innerhalb von regulatorischen Bereichen des Foxp3-Gens zurückzuführen (Baron *et al.* 2007; Floess *et al.* 2007). In murinen T-Zellen kommt es zu keiner aktivierungsinduzierten Expression von Foxp3. Im Menschen hingegen konnte gezeigt werden, dass Foxp3 ebenso wie viele andere für Treg charakteristische Moleküle aktivierungsabhängig induziert und transient exprimiert wird (Walker *et al.* 2003). Diese Aktivierungsinduzierbarkeit von Foxp3 im Menschen wird allerdings kontrovers diskutiert und kann sich je nach Art des zum Nachweis von Foxp3 verwendeten Antikörpers qualitativ unterscheiden. Diese Unterschiede werden in Kapitel 7.2 genauer beleuchtet.

3.3.2.2. Helios

Die Expression des Transkriptionsfaktors Helios (Ikzf2) in maturen, unstimulierten T-Zellen wurde ebenfalls von mehreren Gruppen mit regulatorischen T-Zellen in Zusammenhang gebracht (Getnet *et al.* 2010; Hill *et al.* 2007; Sugimoto *et al.* 2006; Thornton *et al.* 2010; Zheng *et al.* 2007; Zheng & Rudensky 2007). Von Bedeutung ist hierbei insbesondere seine Rolle als möglicher Differenzierungsmarker zwischen Helios-exprimierenden nTreg und iTreg, die keine Expression aufweisen (Thornton *et al.* 2010). Es gibt verschiedene Hinweise auf eine wechselseitige Regulation von Helios und Foxp3 (Sugimoto *et al.* 2006). Allerdings

- Einleitung -

konnte eine Helios-Expression auch unabhängig von einer Foxp3-Expression beobachtet werden. Dies legt eine autonome oder Foxp3-regulierende Funktion von Helios nahe (Zheng & Rudensky 2007). In murinen und humanen (CD4⁺ und CD8⁺) T-Zellen konnte allerdings auch eine aktivierungsinduzierte Expression von Helios beobachtet werden (Akimova *et al.* 2011). Helios spielt zudem eine Rolle bei der Reifung von Thymozyten und wird in deren frühen Entwicklungsstadien exprimiert (Kelley *et al.* 1998; Hahm *et al.* 1998).

Helios ist ein Mitglied der Ikaros Transkriptionsfaktor-Familie, zu welcher die fünf Mitglieder Ikaros, Helios, Aiolos, Eos und Pegasus gehören (Rebollo & Schmitt 2003). Diese Transkriptionsfaktoren besitzen zwei Regionen hochkonservierter C2H2-Zinkfinger motive. Die vier Zinkfinger motive umfassende Region am N-Terminus ist verantwortlich für die sequenzspezifische Bindung an die DNA, während die aus zwei Zinkfinger motiven bestehende C-terminale Region für die Bildung von Homo- bzw. Heterodimeren mit anderen Proteinen der Ikaros-Familie notwendig ist (Cobb & Smale 2005; Cortes *et al.* 1999). Funktionell können Helios, Ikaros und Aiolos durch die Interaktion mit *nucleosome remodeling and deacetylase [complex]* (NuRD) eine Rolle beim Chromatinumbau und damit auch bei der Geneexpression spielen (Sridharan & Smale 2007; Kim *et al.* 1999). Ihre Expression ist auf Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt. Eine Expression auf nicht-hämatopoetischen Zellen ist hingegen für Eos (Gehirn, Skelettmuskulatur, Herz und Milz) sowie für Pegasus (Gehirn, Herz, Skelettmuskulatur, Niere und Leber) beschrieben (Honma *et al.* 1999; Kelley *et al.* 1998; Georgopoulos 2002). Eos kann direkt mit Foxp3 interagieren, vermittelt in Treg die transkriptionelle Stilllegung von Genen in Abhängigkeit von Foxp3 und ist auch für deren suppressive Aktivität notwendig (Pan *et al.* 2009).

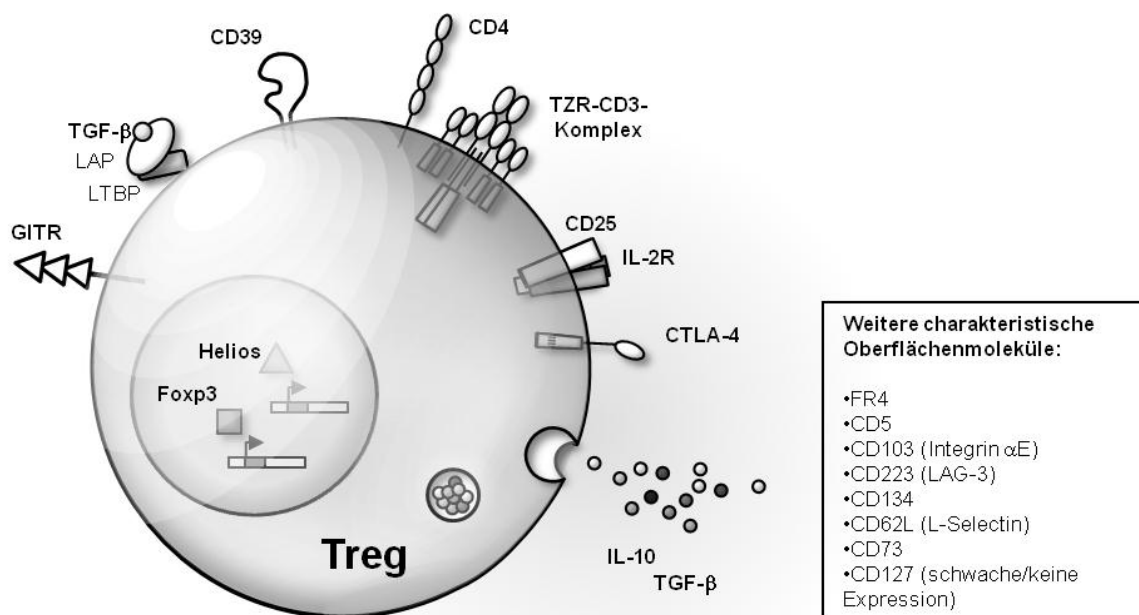


Abb. 2: Schematische Darstellung einer regulatorischen T-Zelle (Treg). Abgebildet sind diverse für Treg charakteristische Moleküle.

- Einleitung -

Ein spezifischer bzw. exklusiver Marker für humane Treg ist bisher nicht beschrieben. Da die Expression der meisten für Treg charakteristischen Moleküle auch bei anderen T-Zellen (aktivierungs-) induzierbar ist, können diese Moleküle eine Unterscheidung von Treg und aktivierten T-Zellen nicht gewährleisten. Allerdings zeigt dies auch, dass T-Zell Aktivierung und suppressive Funktion in einem engen Zusammenhang stehen.

3.3.3. Funktionsweise regulatorischer T-Zellen

Es sind zahlreiche Mechanismen beschrieben worden, durch welche Treg die Suppression von Responder Zellen herbeiführen können. Hierbei lassen sich die verschiedenen Mechanismen in fünf Hauptkategorien unterteilen, nämlich die Suppression durch (1) inhibitorische Zytokine, (2) zytotoxische Effektorfunktionen gegen Responder-Zellen, (3) inhibitorische Moleküle ((3.1) freigesetzte oder (3.2) membrangebundene), (4) Konkurrenz um Wachstumsfaktoren und (5) negative Beeinflussung der immunstimulatorischen Eigenschaften von DZ (Shevach 2009; Vignali *et al.* 2008).

Zu (1): Die im Zusammenhang mit Treg wichtigsten regulatorischen Zytokine sind IL-10 und TGF- β , welche einen wichtigen Bestandteil des suppressiven Treg-Potentials darstellen (Belkaid & Rouse 2005; McGeachy *et al.* 2005). TGF- β kann die Proliferation und Differenzierung von T-Zellen direkt negativ beeinflussen, kann aber auch eine indirekte immunsuppressive Funktion durch die Induktion von Treg ausüben (Gorelik & Flavell 2002; Cerwenka & Swain 1999). Es kann freigesetzt oder auch membranständig exprimiert werden und in löslicher Form oder zellkontaktabhängig wirken (Nakamura *et al.* 2001). Membranständiges TGF- β ist an einen Komplex aus *latency-associated peptide* (LAP) und *latent TGF- β binding protein* (LTBP) gebunden (Hyytiainen *et al.* 2004). Murine LAP⁺ Treg besitzen ein stärkeres suppressives Potential als LAP⁻ (Chen *et al.* 2008).

Zu (2): Treg können möglicherweise durch zytotoxische Effektorfunktionen immunregulatorisch wirken. Bei Infektion mit Respiratorischen-Synzytial-Viren (RSV) lässt sich in Treg eine gesteigerte Expression von Granzym B beobachten. Des Weiteren weisen Mäuse, in deren Treg spezifisch Granzym B-Gen entfernt wurde, bei RSV-Infektion eine gesteigerte zelluläre Infiltration der Lunge auf (Loebbermann *et al.* 2012). Treg aus Granzym B defizienten Mäusen sind in ihrer regulatorischen Aktivität gegenüber CD4⁺ T-Zellen eingeschränkt (Gondek *et al.* 2005). Im Menschen konnte nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD46 die Expression von Granzym A bzw. eine Granzym A- und Perforin-abhängige Zytotoxizität gegen Effektor CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden (Grossman *et al.* 2004). Allerdings scheinen bei humanen Treg Granzym B-abhängige regulatorische Funktionen keine bedeutende Rolle zu spielen. So konnten Oberg *et al.* zeigen, dass diese nach anti-CD3,-28-Stimulation im Vergleich zu Responder T-Zellen nur minimale Mengen von Granzym B freisetzen (Oberg *et al.* 2010).

- Einleitung -

Zu (3.1): Durch die auf der Zelloberfläche von Treg vorhandenen Ektoenzyme CD39 und CD73 wird extrazellulär vorhandenes Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosin abgebaut, welches die Funktionen von Effektor T-Zellen durch die Bindung an deren Adenosinrezeptor, supprimieren kann (Borsellino *et al.* 2007; Deaglio *et al.* 2007; Kobie *et al.* 2006). Außerdem scheint Adenosin durch Stimulation der TGF- β Produktion die Induktion von Treg zusätzlich zu stimulieren (Zarek *et al.* 2008). Weiterhin können Treg unter Verwendung von *gap junctions* den sekundären Botenstoff (*second messenger*) zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), welcher ein potenter Inhibitor ist, direkt in Effektor T-Zellen transportieren und sie auf diese Weise supprimieren (Bopp *et al.* 2007; Klein *et al.* 2012).

Zu (3.2): Treg exprimieren konstitutiv verschiedene Oberflächenmoleküle, die suppressive Signale vermitteln können. Sie exprimieren *programmed death-1* (PD-1) und CTLA-4, welche beide von Bedeutung für die Funktion humaner Treg sind (Baecher-Allan *et al.* 2001; Shevach 2006). Durch die Antikörper-vermittelte Blockade von PD-1 kann die *in vitro* durch humane Treg-vermittelte Suppression von Melanom-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten aufgehoben werden (Wang *et al.* 2009). Weiterhin weisen Treg aus Patienten mit rheumatischer Arthritis eine verringerte Expression von CTLA-4 auf. Durch antikörper-vermittelte Blockade von CTLA-4 kann bei gesunden Spendern die durch Treg vermittelte Suppression der IFN- γ -Produktion von Responder T-Zellen inhibiert werden (Flores-Borja *et al.* 2008). Die Interaktion von PD-1 und *programmed death ligand 1* (PD-L1) bzw. CTLA-4 und CD80/-86 ist in Kapitel 3.5.1 und 3.5.2 detaillierter beschrieben.

Zu (4): Treg weisen eine starke Expression von CD25 (IL-2R α) auf, welches zusammen mit CD122 (IL-2R β) und CD132 (IL-2R β) den hochaffinen IL-2-Rezeptor formt. Einen weiteren potentiellen Mechanismus der Suppression stellt daher die Konkurrenz um IL-2 dar (de la Rosa *et al.* 2004). Durch IL-2-Konkurrenz ist es sogar möglich in CD4⁺ Effektor T-Zellen Apoptose auszulösen (Pandiyani *et al.* 2007).

Zu (5): In der Maus konnte unter Verwendung von *intravitaler* Mikroskopie gezeigt werden, dass es *in vivo* zu direkten Interaktionen zwischen DZ und Treg kommt. Diese Interaktion verringert die Aktivierung von Effektor T-Zellen durch DZ (Tadokoro *et al.* 2006; Tang *et al.* 2006). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass Treg modulierende Effekte auf die DZ-Reifung und deren Funktion haben können (Shevach 2009; Vignali *et al.* 2008). So wird auf DZ durch die Interaktion mit Treg, die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 inhibiert bzw. herabreguliert (Cederbom *et al.* 2000; Wing *et al.* 2008). Durch den Verlust kostimulatorischer Moleküle verringert sich deren Fähigkeit T-Zellen durch die Interaktion mit CD28 zu stimulieren, was zur Suppression von Immunreaktionen führt. Das auf Treg konstitutiv exprimierte Oberflächenprotein CTLA-4 ist, wie schon erwähnt, wichtig für die Suppression von Effektor T-Zellen (Oderup *et al.* 2006; Read *et al.* 2000). Es kann durch Interaktion mit denen auf DZ vorhanden B7-Molekülen CD80 und/oder CD86 DZ

- Einleitung -

zur Produktion von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) veranlassen. IDO baut die essentielle Aminosäure Tryptophan ab und ist u.a. an immunregulatorischen Vorgängen beteiligt. Es kann die T-Zell-Proliferation negativ beeinflussen, indem es die Verfügbarkeit von Tryptophan einschränkt (Munn *et al.* 2005). Weiterhin kommt es durch IDO zur Produktion proapoptotischer Metabolite, die ebenfalls Effektor T-Zellen supprimieren können (Fallarino *et al.* 2003; Puccetti & Grohmann 2007).

Insgesamt sind diverse Suppressionsmechanismen beschrieben worden, wobei allerdings noch nicht vollständig geklärt wurde, welche Mechanismen in welchem Zusammenhang relevant sind. Hauptverantwortlich für eine Suppression durch iTreg ist vermutlich die Freisetzung der Zytokine TGF- β und IL-10, während bei nTreg vor allem zellkontakt-abhängige Mechanismen essentiell sind (Nizar *et al.* 2010).

3.4. $\gamma\delta$ T-Zellen im immunregulatorischen Geschehen

Für $\gamma\delta$ T-Zellen sind im Kontext der Immunregulation unterschiedliche Funktionen beschrieben worden. Sie können von Treg in ihrer Proliferation inhibiert werden (Kunzmann *et al.* 2009; Li & Wu 2008), aber auch der Treg-vermittelten Suppression entgegenwirken (Gong *et al.* 2009). Allerdings können $\gamma\delta$ T-Zellen selbst auch immunregulatorische Funktionen ausüben. Hier sind sowohl proinflammatorische und proliferationsstimulierende als auch die Immunantwort supprimierende Funktionen beschrieben worden (Kabelitz & He 2012; Hayday & Tigelaar 2003; Moser & Eberl 2011).

3.4.1. Kostimulatorische und antigenpräsentierende Funktionen bei $\gamma\delta$ T-Zellen

Im Menschen sind V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage in frühen Stadien einer Infektion oder Krebserkrankung durch die Freisetzung zytotoxischer Effektormoleküle schnell zu reagieren. Durch die Produktion von Zytokinen/Chemokinen und APZ-ähnliche Funktionen unterstützen sie die Differenzierung und Proliferation antigenspezifischer $\alpha\beta$ T-Zellen (Girardi 2006). $\gamma\delta$ T-Zellen sind sogar in der Lage Antigene zu präsentieren. Die Zugabe von exogenem IPP oder HMB-PP zu frisch isolierten V γ 9V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen resultiert in einer schnellen Hochregulation von Oberflächenmarkern, die typischerweise mit APZ assoziiert sind (MHC I, MHC II). Dies geschieht zeitgleich mit der Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD83, CD86) und Adhäsionsmolekülen (CD11a, CD18, CD54) (Brandes *et al.* 2005; Meuter *et al.* 2010; Brandes *et al.* 2009; Landmeier *et al.* 2009). Nach Aktivierung über den TZR besitzen sie das Potential lösliche Antigene potent und professionell zu präsentieren. Nur wenige dieser $\gamma\delta$ -APZ werden benötigt, um eine spezifische Immunantwort von $\alpha\beta$ Effektor T-Zellen auszulösen. Sie sind in der Lage die Reifung naiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu Effektor T-Zellen zu induzieren (Brandes *et al.* 2005). Ferner können $\gamma\delta$ T-Zellen, wie anhand

- Einleitung -

von opsonierten Partikeln bzw. *E. coli* gezeigt wurde, professionelle Phagozytose betreiben (Wu *et al.* 2009). $\gamma\delta$ -APZ können ähnlich wie professionelle APZ Antigene gut kreuzpräsentieren (also exogene Antigene über MHC I präsentieren) (Brandes *et al.* 2009). Im Widerspruch zu den von Brandes *et al.* demonstrierten APZ-Eigenschaften konnten Himoudi *et al.* zeigen, dass opsonierte Zielzellen bzw. die Bindung der Fc-Region eines Antikörpers an CD16 für die Ausbildung von antigenpräsentierenden Funktionen notwendig ist. Auf diese Weise aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen konnten nach direkter Interaktion mit antikörpermarkierten Zielzellen deren spezifische Antigene kreuzpräsentieren (Himoudi *et al.* 2012).

3.4.2. Interaktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen und Treg

Frisch aus dem peripheren Blut isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen weisen anders als induzierte bzw. natürliche Treg keine Expression aktivierungsinduzierter Moleküle, wie z.B. CD25, auf. Gemeinsam ist diesen Zellpopulationen allerdings, dass sie auch nach Aktivierung kaum IL-2 produzieren können (Chen *et al.* 2006; Schubert *et al.* 2001; Wu *et al.* 2006a; Chen & Letvin 2003a; Wesch *et al.* 1997). Die in der Literatur beschriebenen Interaktionen zwischen Treg- und $\gamma\delta$ T-Zellen sind nur schwierig miteinander in Einklang zu bringen. Es ist sowohl die Suppression von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Treg als auch umgekehrt die Suppression von Treg durch $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben worden.

Li und Wu *et al.* konnten zeigen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen durch Treg negativ reguliert werden können. In Anwesenheit von Treg war *in vitro* die Freisetzung von IFN- γ durch $\gamma\delta$ T-Zellen nach Kontakt mit dem *Mycobacterium tuberculosis* Antigen *6kDa early secretory antigenic target* (ESAT-6) verringert (Li & Wu 2008). Kunzmann *et al.* beschrieben einen nur für $\gamma\delta$ T-Zellen spezifischen Mechanismus der Suppression, bei dem Treg die Phosphoantigen-induzierte Proliferation durch einen bisher unbekanntes löslichen Faktor inhibieren (Kunzmann *et al.* 2009). In einem PDK1 (*phosphoinositide dependent protein kinase 1*) defizienten Mausmodell, in dem der TZR-Signalweg der CD4⁺ T-Zellen eingeschränkt ist, kommt es zu einer Expansion von CD8⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen, die wiederum für die spontane Entstehung einer Colitis verantwortlich sind. Durch adoptiven Transfer von *wildtyp* Treg konnte der Colitis entgegen gewirkt werden (Park *et al.* 2010).

Ferner konnten Gong *et al.* in Makaken zeigen, dass V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen der Funktion und Proliferation von Treg entgegenwirken können. Den Makaken wurde *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) intravenös appliziert (Gong *et al.* 2009). Bei BCG handelt es sich um einen attenuierten Lebendimpfstoff gegen Tuberkulose, der aus *Mycobacterium bovis* (Erreger der Tuberkulose des Rindes) gewonnen wurde. In ihren Studien kam es nach IL-2-Gabe zur Expansion von CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg und zur Suppression der BCG-induzierten V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zell-Expansion. Nach Stimulation mit einem Phosphoantigen (Picostim bzw. HMBPP), waren die V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage der IL-2-induzierten Expansion von Treg entgegenzuwirken.

- Einleitung -

Zusätzlich war die Fähigkeit der Treg, der antigenspezifischen antimykobakteriellen $\alpha\beta$ T-Zell Antwort entgegenzuwirken, eingeschränkt. Bei Phosphoantigen-Stimulation war aufgrund der eingeschränkten Treg-Funktion die Anzahl der IFN- γ produzierenden antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen gesteigert. Die Phosphoantigen-induzierte Expansion der V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen selbst wurde durch Zugabe von abgestuften Zellzahlen von Treg kaum beeinflusst. Die Suppression der Treg-Expansion wurde in dieser Studie vor allem durch IFN- γ vermittelt (Gong *et al.* 2009).

3.4.3. Induzierte regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen

Bei $\gamma\delta$ T-Zellen kann analog zu iTreg (siehe Kap. 3.3.1) durch die Applikation bestimmter Zytokine eine regulatorische Funktion induziert werden. Bei V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen kann es unter Einwirkung von TGF- β und IL-15 sowie eines zusätzlichen TZR-Stimulus zur Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 sowie zur Induktion aktivierungsassoziierter Oberflächenmarker (CD25, CD27, CD69, CTLA-4 und CD45RO) kommen. Nach deren Induktion inhibieren diese V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen die Proliferation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMZ) durch die Freisetzung von TGF- β (Casetti *et al.* 2009). Unter Verwendung von TGF- β und IL-2 in Verbindung mit einem TZR-Stimulus können V δ 1 T-Zellen ebenfalls in regulatorische Zellen umgewandelt werden, die einen vergleichbaren Phänotyp wie regulatorische V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen. Sie exprimieren Foxp3 und weisen CD27, CTLA-4 und GITR, aber kein CD45RA auf ihrer Oberfläche auf. Die von ihnen vermittelte Suppression anderer (CD4⁺ T-) Zellen benötigt TGF- β und ist zellkontaktabhängig. Darüber hinaus wies der CD27⁺ Anteil der Zellen die stärkste suppressive Aktivität auf (Li *et al.* 2011). Dieser (induzierte) CD25⁺CD27⁺Foxp3⁺ $\gamma\delta$ T-Zell Phänotyp spiegelt die allgemeinen Charakteristika von iTreg wider.

3.4.4. Tumor-induzierte regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen

Eine häufige Immunevasionsstrategie von Tumoren stellt die Induktion regulatorischer Funktionen oder eines immunsuppressiven Mikromilieus durch die Freisetzung von z.B. TGF- β dar (Siegel & Massague 2003). Es ist bekannt, dass $\gamma\delta$ T-Zellen durch regulatorische Funktionen zu einem immunsuppressiven Umfeld des Tumors beitragen können. V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen, die CD8 $\alpha\alpha$ auf ihrer Oberfläche exprimieren, machen den größten Anteil der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TIL) in Tumoren, die aus Epithelien hervorgegangen sind (außer bei Melanomen), aus. Diese tumorinfiltrierenden V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen regulatorische Aktivität und sind in der Lage die Proliferation bzw. die Effektorfunktionen von anderen T-Zellen zu unterdrücken. Sie sind außerdem in der Lage die Reifung von DZ sowie deren Fähigkeit zur Stimulation naiver T-Zellen zu inhibieren. In beiden Fällen kann die Suppression durch die Gabe von TLR8-Liganden (Poly G3 und ssRNA40) aufgehoben

- Einleitung -

werden. Vermittelt wird die Suppression anscheinend durch einen löslichen Faktor, wobei die im Zusammenhang mit (induzierten) Treg beschriebenen Zytokine wie TGF- β oder IL-10 allerdings keine Rolle spielen (Peng *et al.* 2007). Auch für andere Tumorarten ist eine Infiltrierung durch sowohl V δ 1 als auch V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen, die wie iTreg Foxp3 exprimieren, beschrieben worden (Kang *et al.* 2009).

3.4.5. Intrinsische, regulatorische Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen

Außer den Funktionen, die $\gamma\delta$ T-Zellen nach Induktion eines regulatorischen Phänotyps analog zu iTreg ausüben können, scheinen $\gamma\delta$ T-Zellen auch im Allgemeinen an der Immunregulation beteiligt zu sein und intrinsische immunregulatorische Eigenschaften zu besitzen.

In der Maus

So weisen $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Mäuse bei Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* oder *Klebsiella* Fehlregulationen in der Stärke und dem Verlauf der $\alpha\beta$ T-Zell Immunantwort auf, was auf eine Funktion von $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Regulation von $\alpha\beta$ T-Zellen hindeutet (Hayday & Tigelaar 2003). Immunregulatorische Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen spielen hier vor allem in Epithelien eine Rolle, wo diese hauptsächlich die $\alpha\beta$ T-Zell Antwort regulieren (Boismenu 2000; Hayday & Tigelaar 2003; Komano *et al.* 1995). Das Fehlen von $\gamma\delta$ T-Zellen kann zu Autoimmunreaktionen führen. Bestimmte $\gamma\delta$ T-Zell defiziente Mäuse neigen zu spontanen Entzündungsreaktionen der Haut (Dermatitis), wenn sie nicht unter vollständig sterilen Bedingungen gehalten oder oberflächlich mit Irritantien behandelt werden. Diese Entzündungsreaktionen können durch Rekonstitution mit $\gamma\delta$ T-Zellen unterbunden werden (Havran & Allison 1988). Wenn diese Mäuse zusätzliche zur $\gamma\delta$ T-Zell Defizienz keine $\alpha\beta$ T-Zellen besitzen, ist keine Neigung zu Entzündungen vorhanden (Girardi *et al.* 2002). Des Weiteren führt die $\gamma\delta$ T-Zell-Defizienz zu einer beschleunigten bzw. verstärkten Immunreaktion im *Lupus erythematoses*-Modell und bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis (EAE). Damit verbunden ist unter anderem eine gesteigerte Proliferation von CD4⁺ T-Zellen. Durch den Transfer von $\gamma\delta$ T-Zellen konnten die $\gamma\delta$ T-Zell-defizienten Mäuse von der EAE kuriert werden (Peng *et al.* 1996; Ponomarev & Dittel 2005). Ebenso kann eine Autoimmunreaktion (z.B. Diabetes) in thymektomisierten *non-obese diabetic* Mäusen durch Rekonstitution mit $\gamma\delta$ T-Zellen, ähnlich wie dies auch durch Treg möglich ist, verhindert werden (Hanninen & Harrison 2000). In der Epidermis vorhandene DETC (*dendritic epidermal $\gamma\delta$ T cells*) sind in der Lage eine durch autoreaktive CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen vermittelte Immunreaktionen innerhalb der Epidermis bei wiederholter Exposition zu unterdrücken (Shiohara *et al.* 1990; Shiohara *et al.* 1996). Eine weitere regulatorische Funktion in Epithelien zeigen $\gamma\delta$ T-Zellen im Modell der chronisch-entzündlichen Darm-

- Einleitung -

erkrankungen (IBD: *inflammatory bowel disease*), der durch Dextran Natrium-Sulfat (DSS) bzw. Natriumtrinitrobenzolsulfonat (TNBS: *2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid*) induzierten Colitis, wobei ein anti-inflammatorischer Effekt ebenfalls vor allem durch die Kontrolle von $\alpha\beta$ T-Zellen bzw. deren IFN- γ -Produktion vermittelt wird (Kühl *et al.* 2002; Kühl *et al.* 2007).

Ein möglicher Mechanismus der Regulation der Immunantwort durch $\gamma\delta$ T-Zellen in der Maus ist die zytotoxische Effektorfunktion gegen APZ wie z.B. gegen aktivierte Makrophagen bzw. gegen infizierte oder gestresste Zellen. Durch Depletion der APZ entfällt der Antigenstimulus für andere T-Zellen und somit deren Aktivierung (Egan & Carding 2000; Hayday & Tigelaar 2003). Auch eine Beeinflussung der Zytokinproduktion von $\alpha\beta$ T-Zellen scheint als Mechanismus möglich (Kühl *et al.* 2007).

Im Menschen bzw. Primaten

Im Menschen sind V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen hauptsächlich innerhalb von Geweben lokalisiert. In Epithelien besitzen diese humanen $\gamma\delta$ T-Zellen vergleichbare regulatorische Funktionen wie murine $\gamma\delta$ T-Zellen (Hayday & Tigelaar 2003). Im Menschen sind regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen des Darms von Bedeutung. Bei der Zöleakie/Sprue findet sich eine verminderte Anzahl intraepithelialer NKG2A- und CD8-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen. Nach einer speziellen Diät gehen die krankheitsbedingten Beschwerden zurück, was mit einer Normalisierung der $\gamma\delta$ T-Zell-Anzahl korreliert. Diese NKG2A⁺CD8⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen können in Abhängigkeit von NKG2A-Ligandenbindung durch Freisetzung von TGF- β die Produktion löslicher Mediatoren (IFN- γ und Granzym B) in CD8⁺ TZR $\alpha\beta$ ⁺ intraepithelialen Lymphozyten (IEL) verhindern und der Entzündung entgegenwirken (Bhagat *et al.* 2008). Im Zusammenhang mit anderen chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*Morbus Crohn*, *Colitis ulcerosa*) sind ebenfalls Defizienzen der IEL, welche zum Großteil aus $\gamma\delta$ T-Zellen bestehen, beschrieben worden (Pennington *et al.* 2005). Die Autoimmunerkrankung systemischer *Lupus erythematoses* (SLE) wird häufig mit eingeschränkter Funktion regulatorischer T-Zellen in Zusammenhang gebracht (Lyssuk *et al.* 2007; Mudd *et al.* 2006; Valencia *et al.* 2007). Bei dieser Erkrankung kommt es auch zu einem Rückgang von $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut, wobei vor allem der Anteil der CD27⁺CD45RA⁻ zurückgeht. Diese Abnahme korreliert mit dem Schweregrad der Krankheit. Die CD27⁺CD45RA⁻ V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren Foxp3 (Klon 259D), was eine regulatorische Funktion für sie nahelegt. Nach Behandlung der Erkrankung normalisiert sich die Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen, wobei der Anteil an V δ 1-Zellen innerhalb der $\gamma\delta$ T-Zellen zunimmt (Li *et al.* 2011).

$\gamma\delta$ T-Zellen, die aus dem humanen peripheren Blut isoliert wurden, können ähnlich wie regulatorische CD4⁺ T-Zellen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen unterdrücken. Im Gegensatz zu Treg exprimieren diese Zellen allerdings kein Foxp3 und die Suppression kann auch nicht durch die Supplementierung mit IL-2 aufgehoben werden. Vermutlich wird diese

- Einleitung -

regulatorische Funktion vor allem von $V\delta 1$ T-Zellen ausgeübt, da diese verglichen mit $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zellen größere Mengen an TGF- β und IL-10 produzieren (Kühl *et al.* 2009). Bei Aktivierung von $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zellen durch das Phosphoantigen IPP, innerhalb der PBMZ lässt sich in Anwesenheit von IL-12 produzierenden reifen DZ ein suppressiver Effekt auf die Proliferation von $CD8^+$ und $CD4^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen beobachten, die auf ein *Neo*-Antigen reagieren. Die Anwesenheit reifer DZ scheint nicht zwingend notwendig für die Entstehung der suppressiven Funktion der $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zellen zu sein. In Anwesenheit unreifer APZ sind IPP-stimulierte $V\delta 2 \gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls in der Lage, die Proliferation von $\alpha\beta$ T-Zellen, die mit Tetanus Toxoid (*recall* Antigen), *Staphylococcus aureus* Enterotoxin (SE) A bzw. SEB (Superantigene) oder Daudi-Zellen (Tumorzellen) stimuliert wurden, zu hemmen (Traxlmayr *et al.* 2010). Der Mechanismus dieser Suppression ist bislang unklar, er beruht allerdings nicht auf der Konkurrenz um IL-2 (Traxlmayr *et al.* 2010).

$\gamma\delta$ T-Zellen mit regulatorischem Phänotyp spielen auch in der Schwangerschaft eine Rolle. In der Dezipua (Teil der Plazenta) lokalisierte $\gamma\delta$ T-Zellen setzen IL-10 und TGF- β frei. Auf diese Weise üben sie eine regulatorische Funktion aus und tragen zum Erhalt der maternalen Toleranz gegenüber dem Fötus bei (Exley & Boyson 2011).

3.5. Suppressiv und kostimulatorische Oberflächenmoleküle

Für die Aktivierung von T-Zellen sind zwei Signale notwendig. Das erste Signal wird durch Bindung des TZR an das präsentierte spezifische Antigen bereitgestellt, das zweite Signal wird antigenunspezifisch über kostimulatorische Moleküle auf der APZ an die entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zelle vermittelt. Das Vorhandensein eines TZR-Signals in Abwesenheit eines kostimulatorischen Signals führt zu Anergie der T-Zelle. So wie ein kostimulatorisches Signal die T-Zell-Aktivierung fördert, kann ein zweites, negatives Signal die T-Zell Antwort inhibieren. Die Integration dieser negativen und positiven Signale innerhalb der Zelle entscheidet zwischen T-Zell-Toleranz und T-Zell-Aktivierung (Nurieva *et al.* 2009).

Eine wichtige Rolle bei der Immunregulation spielt die Interaktion von Molekülen der B7-Familie (CD80/-86 und PD-L1) mit denen der CD28-Familie (CD28, CTLA-4 und PD-1). CD28 ist ein wichtiger Rezeptor der T-Zell-Aktivierung, an welchen die Liganden CD80 und CD86 binden und so ein positiv-kostimulatorisches Signal generieren. Hierbei wird durch Tyrosinphosphorylierung eines Nicht-*immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM) -Motivs u.a. die Interaktion mit der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) (Klasse 1A) hergestellt. Nach anschließender Aktivierung der PI3K durch TZR-assoziierte Tyrosinkinase generiert PI3K den sekundären Botenstoff Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3), an welchen PDK1 und *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog* (AKT) binden. Dadurch kommt es zur Phosphorylierung von AKT am Threonin 308 durch PDK1.

- Einleitung -

Für die vollständige Aktivierung von AKT und die Induktion des PI3K/AKT-Signalweges ist zusätzlich die durch *mammalian target of rapamycin complex 2* (mTORC2) (infolge von TZR-Stimulation aktiviert) vermittelte Phosphorylierung von AKT am Serin 473 notwendig (Sarbasov *et al.* 2005; Vanhaesebroeck & Alessi 2000).

Nach der CD28-Ligandenbindung können die Src-Kinase Lck und die Tec-Kinase Itk mit Hilfe ihrer SH3-Domänen mit dem C-Terminalen Ende von CD28 interagieren, wodurch deren Kinasefunktion aktiviert und das TZR-Signal zusätzlich verstärkt wird. Ebenso kann nach Ligandenbindung *growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) mit dem intrazellulären Anteil von CD28 interagieren, was daraufhin zur Aktivierung des *rat sarcoma/mitogen-activated protein kinase* (Ras/MAP-Kinase) -Signalweges führt. Des Weiteren ist das kostimulatorische CD28-Signal wichtig für die Produktion von IL-2, welches für die Expansion von T-Zellen benötigt wird. Durch die CD28-Kostimulation werden Transkriptionsfaktoren wie AP-1, NFAT und NF- κ B aktiviert, die u.a. zu einer gesteigerten Transkription des IL-2-Gens führen. Ein zweiter, noch bedeutsamerer Effekt ist die Stabilisierung der IL-2-mRNA, wodurch die Produktion des Zytokins zusätzlich gesteigert wird.

3.5.1. CTLA-4 : CD80/-86

CTLA-4 generiert ein negatives Signal und ist auf der Oberfläche von aktivierten, Effektor- und regulatorischen T-Zellen exprimiert (Rudd 2008). Die Wichtigkeit von CTLA-4 für die Immunregulation wurde anhand von CTLA-4 defizienten Mäusen entdeckt. Diese sterben etwa 20 Tage nach der Geburt an massiver außerthymischer Lymphoproliferation und pathologischer Autoimmunität (Tivol *et al.* 1995; Chambers *et al.* 1997; Waterhouse *et al.* 1995). CTLA-4 und dessen Interaktion mit seinen Liganden ist wichtig für die Regulation und Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell Toleranz. Die Blockierung von CTLA-4 führt *in vivo* zu einer verstärkten anti-Tumor-Immunantwort sowie zur Entstehung von Autoimmunreaktionen (Sharpe & Freeman 2002).

In konventionellen T-Zellen hemmt ein CTLA-4 Signal die IL-2 Produktion und das Fortschreiten des Zellzyklus und somit die Proliferation. CTLA-4 kann grundsätzlich auf zwei verschiedene Wegen die Aktivierung von Zielzellen negativ beeinflussen. Auf der einen Seite kann dies durch Induktion von negativen Signalen, auf der anderen durch Konkurrenz um die Bindung an CD80/-86 geschehen (Carreno *et al.* 2000). CTLA-4 bindet wie der positiv-kostimulatorische Korezeptor CD28 an CD80/-86, allerdings mit einer 20fach höheren Affinität. Auf diese Weise wird die Ligandenbindung an CD28 und die Entstehung des damit verbundenen positiv-kostimulatorischen Signals verhindert (Collins *et al.* 2002). CTLA-4 transloziert in Abhängigkeit von Ligandenbindung zu den zentralen supramolekularen Aktivierungsklustern (cSMAC: *central supramolecular activation cluster*). Diese Translokation ist notwendig für die inhibitorische Funktion. In der Konkurrenzsituation mit CD28 bleibt

- Einleitung -

CD28 aufgrund der schwächeren Bindung aus diesen Bereichen ausgeschlossen (Yokosuka *et al.* 2010).

CTLA-4 ist ein Mitglied der CD28-Familie und besteht dementsprechend aus einer extrazellulären Immunglobulin (Ig) V-ähnlichen-Domäne, einer kurzen linearen Region, einer Transmembrandomäne und einem intrazellulären Anteil. Der intrazelluläre Anteil von CTLA-4 besitzt ein *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) und kann, wenn dieses phosphoryliert vorliegt, mit den SH2-Domänen der Tyrosin-Phosphatase *Src homology region 2 domain-containing phosphatase* (SHP) -2 sowie der Serin/Threonin-Phosphatase *protein phosphatase 2* (PP2A) interagieren (Marengere *et al.* 1996; Chuang *et al.* 2000). Die Rekrutierung von SHP-2 führt zur Dephosphorylierung der CD3 ζ -Ketten und inhibiert auf diese Weise die Weiterleitung des TZR-Signals (Lee *et al.* 1998). Da die Aktivierung der Phosphatase PP2A außerdem die AKT-Phosphorylierung verhindert, inhibiert CTLA-4 auch den PI3K/AKT-Signalweg, der für das Zellüberleben und die Proliferation von Bedeutung ist (Parry *et al.* 2005). Das CTLA-4-Signal kann aber auch dem Zelltod durch Induktion des anti-apoptotischen Proteins *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl-XL) entgegen wirken (Parry *et al.* 2005).

CD80 und CD86 werden von APZ exprimiert. CD86 weist auf diesen eine konstitutiv schwache Expression auf und wird nach der Aktivierung schnell heraufreguliert, während die CD80-Expression etwas später induziert wird (Hathcock *et al.* 1994). CD80 besitzt eine höhere Affinität für CTLA-4 als CD86 (Collins *et al.* 2002) und führt dadurch eher zur Induktion eines negativ-kostimulatorischen Signals. CD80 und CD86 gehören beide zur B7-Molekül-Familie und besitzen daher extrazellulär eine IgV- und eine IgC-ähnliche Domäne sowie einen kurzen zytoplasmatischen Anteil (Sharpe & Freeman 2002). Möglicherweise besitzt der zytoplasmatische Anteil trotz seiner geringen Größe eine Funktion und ist an der Entstehung eines rückwärts gerichteten (reversen) Signals beteiligt. Dafür spricht, dass die Bindung von CD80/-86 an CTLA-4 den Tryptophanstoffwechsel in APZ beeinflusst (Grohmann *et al.* 2002) (siehe Schema; Abb. 3).

3.5.2. PD-1 : PD-L1/2

Im Gegensatz zu CTLA-4-defizienten Mäusen, entwickeln PD-1 defiziente Mäuse Autoimmunreaktionen zu späteren Zeitpunkten, was darauf hindeutet, dass CTLA-4 das bedeutsamere negativ-kostimulatorische Signal bei der T-Zell-Expansion im Lymphknoten darstellt und PD-1 vor allem bei der Kontrolle von Autoimmunität in der Peripherie von Bedeutung ist (Carreno & Collins 2002). Die PD-1 : PD-L1-Interaktion führt bei chronischen Infektionen zu der mit dieser einhergehenden T-Zell- „Erschöpfung“ (*exhaustion*) und somit zu einer nicht mehr effektiven Immunabwehr gegen die Infektion. Auch bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des immunsuppressiven Tumormilieus ist die PD-1 : PD-L1-Interaktion von Bedeutung (Francisco *et al.* 2010).

- Einleitung -

PD-1 ist auf der Oberfläche von aktivierten Lymphozyten, also T- und B-Zellen, vorhanden (Agata *et al.* 1996). Die Interaktion zwischen PD1 und seinen Liganden PD-L1 und PD-L2 vermittelt ein negativ-kostimulatorisches Signal und reguliert auf diese Weise die T-Zell-Aktivierung und -Toleranz sowie Immunreaktionen in Geweben (Francisco *et al.* 2010). Ligandenbindung an PD-1 kann Zellproliferation, Zytokinausschüttung oder zytotoxische Effektorfunktionen blockieren, die Zellvitalität einschränken und wirkt der CD28-vermittelten Kostimulation entgegen (Riley 2009; Freeman *et al.* 2000). Die Bindung von PD-L1 an PD-1 kann auch indirekt regulatorisch wirken, da diese in Anwesenheit von TGF- β zu einer gesteigerten Entstehung von iTreg führt (Francisco *et al.* 2009).

PD-1 besteht aus einer extrazellulären IgV-ähnlichen Domäne, einem darauffolgenden 20 Aminosäurereste umfassenden Bereich, der einen gewissen Abstand zur Plasmamembran gewährleistet, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatische Domäne, die ein ITIM und ein *Immunoreceptor tyrosine-based switch motif* (ITSM) umfasst (Francisco *et al.* 2010). Nach Ligandenbindung kommt es zur Tyrosinphosphorylierung von ITIM und ITSM. Für die Funktion von PD-1 in T-Zellen ist vor allem das ITSM-Motiv wichtig, welches die Interaktion mit den Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 vermittelt und auf diese Weise die Phosphorylierung von ZAP-70, CD3 ζ und der Proteinkinase C (PKC) θ verhindern kann (Chemnitz *et al.* 2004; Sheppard *et al.* 2004). Hierzu ist die räumliche Nähe zwischen PD-1 und dem TZR-Komplex notwendig (Chemnitz *et al.* 2004). Außerdem wird die Aktivierung von *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und das Verlassen der G1-Phase des Zellzyklus durch ein PD-1-Signal verhindert (Patsoukis *et al.* 2012). PD-1 inhibiert ebenso wie CTLA-4 den PI3K/AKT-Signalweg, allerdings ist der Mechanismus ein anderer. PD-1

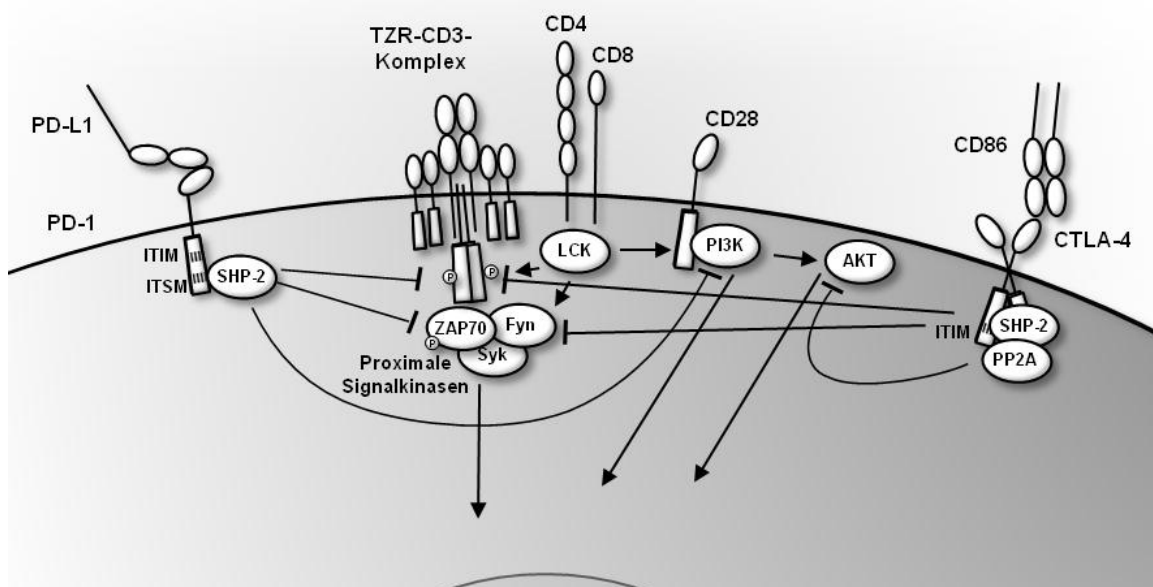


Abb. 3: Signalvermittlung und Interaktionen negativ-kostimulatorischer Oberflächenmoleküle.

- Einleitung -

blockiert den Signalweg durch Inhibition der PI3K-Aktivierung (Parry *et al.* 2005). Obwohl sowohl CTLA-4 als auch PD-1 mit dem AKT-Signalweg interferieren, sind sie nicht redundant, können aber vermutlich synergistisch wirken.

Durch Typ I und Typ II Interferone sowie durch TNF- α wird die Expression von PD-L1 in T-Zellen induziert (Keir *et al.* 2008). Sowohl die konstitutive als auch die induzierte Expression ist hierbei abhängig von *IFN regulatory factor* (IRF) -1 (Lee *et al.* 2006). Außerdem bindet auch *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 3 an die Promotorregion von PD-L1 (Marzec *et al.* 2008). Die beiden PD-1-Liganden PD-L1 und PD-L2 besitzen wie andere zur B7-Familie gehörende Proteine auch eine IgV- und eine IgC-ähnliche Domäne. PD-L1 besitzt einen kurzen zytoplasmatischen Anteil (~30 Aminosäurereste), der zwar evolutionär konserviert ist, aber keine bekannte Funktion besitzt (Dong *et al.* 1999; Freeman *et al.* 2000). Allerdings ist beschrieben worden, dass CD80 durch Interaktion mit PD-L1 zu einer bidirektionalen Inhibition der T-Zell Aktivierung und Zytokinproduktion führen kann (Butte *et al.* 2007) (siehe Schema; Abb. 3).

3.6. Toll-like Rezeptoren (TLR)

Bereits 1989 wurde von Janeway *et al.* postuliert, dass die Erkennung von (mikrobiellen) Pathogenen essentiell für die Initiation einer Immunantwort (z.B. Entzündung) ist und dies durch keimbahnkodierte PRR vermittelt wird, welche Pathogenen assoziierte molekulare Strukturen (PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns*) erkennen (Janeway, Jr. 1989). TLR, welche dem Toll-Protein in *Drosophila* homolog sind, waren die ersten PRR, die im Säuger identifiziert wurden (TLR4) (Medzhitov *et al.* 1997). Bisher sind 10 verschiedene humane TLR bekannt.

Die Erkennung von PAMP durch TLR führt zu einer unmittelbaren Immunreaktion, die auf die Beseitigung der Pathogene abzielt. In Zellen des angeborenen Immunsystems werden nach TLR-Aktivierung zytotoxische Effektorfunktionen und Phagozytose gesteigert bzw. ausgelöst. Die Freisetzung verschiedener proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und antimikrobieller Proteine führt zur Rekrutierung bzw. Aktivierung weiterer Immunzellen. Außerdem führt bei DZ die Erkennung von TLR-Liganden zu deren Reifung und einer verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle, woraufhin diese in der Lage sind eine adaptive Immunantwort gegen entsprechende Pathogene zu induzieren (Kawai & Akira 2010). Für die Entdeckung und ihren Beitrag zur Aufklärung der Rolle von TLR und DZ bei der Entstehung einer Immunantwort, wurde der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin 2011 an Bruce Beutler, Jules Hoffmann und Ralph Steinman verliehen.

TLR erkennen eine große Bandbreite von PAMP (Akira *et al.* 2006; Beutler 2009; Hoffmann 2003; Medzhitov 2007). Bakterielle Zellwandbestandteile werden vor allem von TLR erkannt die auf der Zelloberfläche exprimiert sind, wohingegen Nukleinsäuren (z.B. als virale Bestandteile) von endosomal lokalisierten TLR erkannt werden (Kawai & Akira 2011). TLR1,

- Einleitung -

-2 und -6 erkennen u.a. Lipopeptide, TLR3 doppelsträngige RNA, TLR4 Lipopolysaccharide, TLR5 Flagellin, TLR7 und TLR8 einzelsträngige RNA und TLR9 präferentiell bakterielle DNA (Akira *et al.* 2006). Durch TLR2 wird eine weite Bandbreite von PAMP wie z.B. Peptidoglykan (PGN), Zymosan, Hämagglutinin sowie verschiedene Lipopeptide, Glycolipide oder Glycosylphosphatidylinositol (GPI) -Anker-Moleküle (Lipoteichonsäure [LTA], Lipoarabomannan [LAM]) erkannt (Wesch *et al.* 2011). TLR2 ist in der Lage zusammen mit TLR1, TLR6 oder TLR10 Heterodimere zu bilden und auch mit anderen Korezeptoren wie Dectin-1 und CD36 zu interagieren, wodurch verschiedene PAMP erkannt werden können (Akira *et al.* 2006; Hasan *et al.* 2005; Govindaraj *et al.* 2010). Beispielsweise erkennen TLR1/2- (möglicherweise auch TLR2/10-) Heterodimere triacetylierte Lipopeptide und TLR2/6-Heterodimere diacetylierte Lipopeptide aus Gram-positiven Bakterien (Akira *et al.* 2006; Govindaraj *et al.* 2010). Als synthetische Analoga von TLR2-Liganden wurden in vorliegender Arbeit unter anderem FSL-1 (TLR2/6), Pam₂CSK4 (vermutlich TLR2/6) und Pam₃CSK4 (TLR1/2, vermutlich auch TLR2/10) verwendet (Govindaraj *et al.* 2010).

Der Entdeckung der TLR nachfolgend wurden verschiedene weitere PRR, wie die im Zytosol lokalisierten *RIG-I-like receptors* (RLR) und NLR sowie die membranständigen C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR) beschrieben. Die zu den RLR gehörenden Rezeptoren RIG-I, Mda5 und LGP2 erkennen RNA-Viren, während die 20 verschiedenen NLR auf verschiedene PAMP und Zellstress reagieren und CLR pilzassoziierte und bakterielle PAMP erkennen (Kawai & Akira 2010).

3.6.1. TLR bei $\gamma\delta$ T-Zellen

Die Expression von TLR ist vor allem auf Zellen, die dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden, verbreitet. So kann etwa die Funktion von DZ durch TLR moduliert werden, wodurch die Qualität der von ihnen induzierten Immunantwort ebenfalls beeinflusst wird, was wiederum zu einer verstärkten Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen führt (Wesch *et al.* 2011; Kunzmann *et al.* 2004). Die TLR (-3 und -7) -Liganden-Stimulation von Tumorzellen kann ebenfalls die zytotoxischen Effektorfunktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen verstärken (Shojaei *et al.* 2009). Inzwischen wurde allerdings die Expression verschiedener TLR auch auf Zellen des adaptiven Immunsystems nachgewiesen, u.a. auch auf T-Zellen, deren Effektorfunktionen durch diese direkt moduliert werden können. $\gamma\delta$ T-Zellen können verschiedene, funktionelle Mustererkennungsrezeptoren wie NLR und auch TLR exprimieren. Im Unterschied zu Zellen der angeborenen Immunität benötigen ($\gamma\delta$) T-Zellen allerdings einen zusätzlichen TLR-Stimulus um auf die TLR-Liganden-Stimulation zu reagieren (Marischen *et al.* 2011; Wesch *et al.* 2006; Pietschmann *et al.* 2009). In frisch aus dem peripheren Blut isolierten V δ 1 und V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen wurde die funktionelle Expression von TLR2, -3 und -5 sowie deren

- Einleitung -

verstärkender Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine beschrieben (Pietschmann *et al.* 2009; Beetz *et al.* 2008).

Die Expression von TLR2 in $\gamma\delta$ T-Zellen wurde zuerst in der Maus beschrieben (Mokuno *et al.* 2000) und konnte dann auch in expandierten humanen $\gamma\delta$ T-Zellen mit Hilfe eines *Affymetrix GeneChip* nachgewiesen werden (Hedges *et al.* 2005). In frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen konnte die TLR2- sowie die TLR1- und TLR6-Expression auf mRNA-Ebene demonstriert werden, wobei die von TLR1 und TLR2 stärker ist als die von TLR6 (Pietschmann *et al.* 2009). Auf Proteinebene weist TLR1 bei den meisten Spendern, im Gegensatz zu TLR2 und TLR6, allerdings nur eine schwache Expression auf (Pietschmann *et al.* 2009).

Funktionell ist für die Kostimulation von $\gamma\delta$ T-Zell-Linien durch den synthetischen TLR2-Liganden Pam₃CSK4 eine verstärkte Degranulation (gemessen anhand von CD107a [LAMP-1] Oberflächenexpression) sowie eine verstärkte Freisetzung von IFN- γ beschrieben worden (Deetz *et al.* 2006). Shrestha *et al.* konnten innerhalb der PBMZ bei IPP-aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen eine verstärkte Proliferation und Zytokinexpression (IFN- γ und TNF- α) feststellen, wenn zusätzlich der TLR2-Ligand LTA präsent war (Shrestha *et al.* 2005). Die direkte, von APZ unabhängige Reaktion frisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Kostimulation mit TLR2-Liganden konnte anhand der verstärkten Freisetzung der löslichen Mediatoren IFN- γ , CCL5 (RANTES) und CXCL8 (IL-8) in frisch isolierten V δ 1 und auch V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden (Pietschmann *et al.* 2009).

TLR2-Liganden besitzen in Bezug auf die Produktion löslicher Mediatoren durch $\gamma\delta$ T-Zellen also eine kostimulatorische Funktion.

3.6.2. Aufbau und Signaltransduktion von TLR

TLR sind transmembrane Proteine vom Typ I. Ihre extrazelluläre Domäne besteht aus mehreren aufeinanderfolgenden Wiederholungen des *Leucine-rich repeat* (LRR) -Motivs und dient der Erkennung von PAMP. Ferner besitzen sie eine Transmembranregion und eine zytosolische *toll-interleukin 1 receptor* (TIR) -Domäne. Die TIR-Domäne des TLR ist nach Bindung eines Liganden notwendig für die Aktivierung der spezifischen Signalwege in der Zelle. Sie dient als Basis für die Rekrutierung der jeweiligen Adaptermoleküle, die zur Interaktion mit dieser ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen (Kawai & Akira 2010). Als ein solches wird *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) von allen TLR (mit Ausnahme von TLR3) rekrutiert, was zur Aktivierung von NF- κ B und MAP-Kinasen führt und letztendlich in der Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine mündet. MyD88 bindet nicht direkt an die TIR-Domänen von TLR2 und TLR4, sondern tut dies indirekt über *TIR domain containing adaptor protein* (TIRAP), ein zusätzliches Adaptermolekül (Kawai & Akira 2010). MyD88 vermittelt anschließend die Rekrutierung der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen *IL-1*

- Einleitung -

receptor-associated kinase (IRAK) 4, IRAK1, IRAK2 und IRAK-M, wobei initial IRAK4 aktiviert wird. Die Aktivierung der IRAK-Kinasen führt zur Interaktion mit *TNF receptor-associated factor* (TRAF) 6, einer E3-Ubiquitinligase, die Lysin63 (K63) -verknüpfte Polyubiquitinketten an Zielproteine u.a. auch IRAK1 und TRAF6 anfügt. An diese Polyubiquitinketten können anschließend die Zinkfinger-Ubiquitinbindedomänen von *TAK binding protein* (TAB) 1 und TAB3, den regulatorischen Untereinheiten des *TGF- β activated kinase 1* (TAK1) Kinasekomplexes, binden. Ebenso kann die Ubiquitin-bindende Domäne von *NF- κ B essential modulator* (NEMO), eine essentielle regulatorische Komponente des I κ B Kinase (IKK) -Komplexes, mit den K63-Polyubiquitinketten interagieren. Aufgrund dieser Interaktion kommt es zur räumlichen Nähe von TAK1 und IKK β , wodurch es zur Phosphorylierung von IKK β kommt, dies wiederum führt zur Phosphorylierung von *inhibitor of NF- κ B* (I κ B) und dadurch letztlich zur Aktivierung von NF- κ B (Bhoj & Chen 2009). TAK1

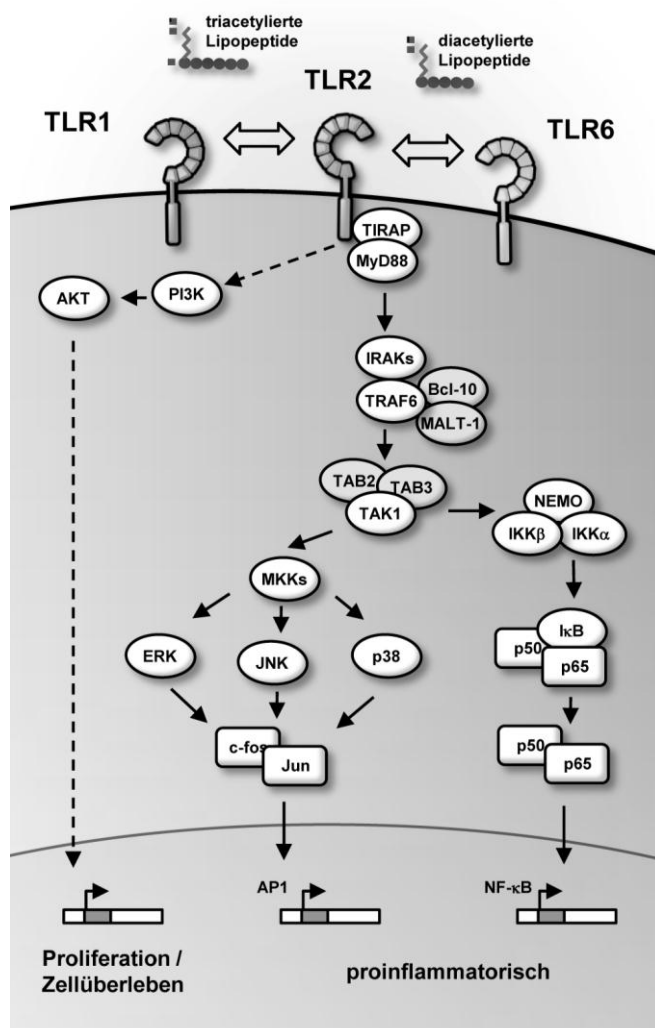


Abb. 4: Signaltransduktion von TLR2. Schematische Abbildung der an der TLR2-Signaltransduktion beteiligten Moleküle

aktiviert durch Phosphorylierung außerdem die MAP-Kinasen ERK1, ERK2, p38 und *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), die daraufhin zahlreiche Transkriptionsfaktoren, u.a. *activator protein 1* (AP-1) aktivieren (Kawai & Akira 2010) (siehe Schema; Abb. 4).

Durch einige TLR kann zusätzlich zum klassischen MyD88-abhängigen Signalweg der PI3K/AKT-Signalweg aktiviert werden. Für TLR2 ist dies beispielsweise beschrieben worden, wobei die genauen molekularen Mechanismen allerdings noch unklar sind (Hazeki *et al.* 2007). In Makrophagen wurde beispielsweise beobachtet, dass nach Ligandenbindung des TLR2/6-Heterodimers, TIRAP direkt mit der regulatorischen p85 α Untereinheit der PI3K interagieren und so zur PI3K-abhängigen Phosphorylierung von AKT führen kann (Santos-Sierra *et al.* 2009). Eine weitere Möglichkeit ist die Aktivierung dieses Signalweges durch das eine TIR-Domäne besitzende Adaptermolekül

- Einleitung -

B-cell adapter for PI3K (BCAP) (Troutman *et al.* 2012). In Abbildung 4 sind die verschiedenen am TLR2-Signalweg beteiligten Komponenten schematisch zusammengefasst.

Der TLR2-Signalweg induziert proinflammatorische Effektorfunktionen durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Er kann aber auch durch die Aktivierung von MAP-Kinasen und möglicherweise des PI3K/AKT-Signalweges die Zellproliferation bzw. das Zellüberleben beeinflussen bzw. steigern.

3.7. Fragestellung

$\gamma\delta$ T-Zellen können mit verschiedenen Zellpopulationen des Immunsystems interagieren und diese auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit konnte durch unsere Arbeitsgruppe anhand der Suppression von $\alpha\beta$ T-Zellen durch Phosphoantigen-aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen auch an der Vermittlung suppressiver Funktionen beteiligt sein können. Die Entstehung und Aufrechterhaltung regulatorischer Funktionen (vor allem in Bezug auf $\gamma\delta$ T-Zellen) ist jedoch noch unzureichend verstanden. Da $\gamma\delta$ T-Zellen eine große Bandbreite verschiedener Funktionen aufweisen, stellte sich grundsätzlich die Frage, ob ihr funktioneller Phänotyp festgelegt ist oder ob dieser je nach Kontext der Antigenerkennung moduliert werden kann.

Folgende Aspekte sollten im Rahmen dieser Arbeit näher betrachtet werden:

- (1) Eine phänotypische Charakterisierung suppressiver $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Vergleich mit Treg. Hierbei sollten sowohl intrinsische als auch induzierte regulatorische Funktionen in $\gamma\delta$ T-Zellen *in vitro* untersucht werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Rolle verschiedener Faktoren bei der Entstehung regulatorischer Funktionen in $\gamma\delta$ T-Zellen analysiert werden.
- (2) Die Aufklärung des zugrundeliegenden suppressiven Mechanismus. Es sollte untersucht werden auf welche Weise die Suppression vermittelt wird und welche immunmodulatorischen Moleküle daran beteiligt sind.
- (3) Der Effekt von TLR-Liganden auf $\gamma\delta$ T-Zellen und deren Einfluss auf das suppressive Potential von $\gamma\delta$ T-Zellen. Es sollte geprüft werden, ob ein verändertes suppressives Potential mit einer Modulation immunregulatorischer Moleküle einhergeht. Weiterhin sollte die Beteiligung verschiedener Signalwege an TLR2-vermittelten Effekten genauer beleuchtet werden.

4. Material

Verwendete Abkürzungen: APS = Ammoniumperoxodisulfat (Ammoniumpersulfat); BSA = Rinderserumalbumin; DMSO= Dimethylsulfoxid; EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure; FKS = Fetales Kälberserum; PFA = Paraformaldehyd; PI = Propidiumjodid; PHA = Phytohämagglutinin; PMSF = Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Flourid; rh = rekombinant, human; TMB = Tetramethylbenzidin, WP = FACS-Waschpuffer.

4.1. Substanzen

4.1.1. Zytokine und Stimulanzen

Substanz	Bezugsquelle	Endkonzentration
BrHPP	Innate Pharma	300 nM
FSL-1	Invivogen	1 µg/mL
Pam ₂ CSK4	Invivogen	2 µg/mL
Pam ₃ CSK4	Invivogen	2 µg/mL
rh IL-15	Biolegend	10 ng/mL
rh IL-2	Novartis	10-50 U/mL
SEA-T	Toxin Technology	1 µg/mL
SEB	Serva	1 µg/mL
SEC	Toxin Technology	1 µg/mL
SED	Serva	1 µg/mL
SEE	Chemica & Co	1 µg/mL
TGF-β	R&D Systems	1,7 ng/mL

4.1.2. Substanzen

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid	Serva
APS	Sigma
BCA Protein Assay Reagenz	Pierce
BSA	Serva
Coomassie Protein Assay Reagenz	Thermo Fisher Scientific
DMSO	Calbiochem
EDTA	Sigma
Eosin	Serva
Methanol	Roth
Milchpulver	Frema
NaN ₃	Serva
NP-40	Fluka
PFA	Sigma
PHA	Remel
PI	Sigma
SDS (10% in Wasser)	Merck
TEMED	Serva
TMB Substrat	Thermo Scientific
Tris	Roth
Triton X-100	Merck
Tween 20	Sigma

4.1.3. Inhibitoren

Substanz	Bezugsquelle
Aprotinin	Sigma
Leupeptin	Sigma
Monensin	Calbiochem
Natriumfluorid	Fluka
Natriumorthovanadat	Merck
Natriumpyrophosphat	Sigma
Pepstatin A	Sigma
PMSF	Sigma

4.2. Puffer und Lösungen

Medien/Puffer	Bezugsquelle
DMEM (<i>Dulbecco's minimum essential medium</i>)	PAA
Ficoll® Hypaque Lösung (1,077 g/mL)	Biochrom AG
FKS	Life Technologies
Methyl- ³ [H] Thymidin	Amersham
NuPAGETM 4-12% Bis-Tris-Gel (10 well, 1.5 mm)	Life Technologies
NuPAGETM 4-12% Bis-Tris-Gel (15 well, 1.5 mm)	Life Technologies
NuPAGE™ MES SDS-Laufpuffer (20x)	Life Technologies
PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺ , steril	PAA, Biochrom AG
RPMI1640	Life Technologies
X-VIVO15	Lonza

4.2.1. Für zellbiologische Arbeiten verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Substanz	Endkonzentration
Eosinlösung	Eosin	0,2 % (w/v)
	NaN ₃	0,05 % (w/v)
	NaCl	0,9 % (w/v)
	FKS	10 % (v/v)
Einfriermedium (EFM)	RPMI	
	FKS	20 % (v/v)
	DMSO	10 % (v/v)
FACS-Waschpuffer (WP)	PBS	
	BSA	1 % (w/v)
	NaN ₃	0,1 % (w/v)
MACS-Waschpuffer (MP)	PBS	
	BSA	0,5 % (w/v)
	EDTA	2 mM
Staining-Puffer (SP)	PBS	
	FKS	1 % (w/v)
	NaN ₃	0,1 % (w/v)
Standardzell-Puffer (StdZP)	WP	
	Standardzellen	0,1*10 ⁶ Zellen/mL
	PI	0,2 µg/mL

- Material -

Trypanblau	PBS Trypanblau	0,1 % (w/v)
------------	-------------------	-------------

4.2.2. Für die Proteinbiochemie verwendete Puffer und Lösungen

Puffer/Lösungen	Substanz	Endkonzentration
Elektrophoresepuffer (Bio Rad, 10x)	^{dd} H ₂ O	
	Tris	3,03 % (w/v)
	Glycin	14,4 % (w/v)
	SDS	1 % (w/v)
Elektrophoresepuffer (NuPAGE)	^{dd} H ₂ O	
	NuPAGE™ MES-Puffer	5 % (v/v)
Laufgel (Bio Rad, 10%ig)	^{dd} H ₂ O	28,7 % (v/v)
	30 %ig Acrylamid/Bisacrylamid	33 % (v/v)
	Tris-Puffer 1M, pH 8,8	36 % (v/v)
	10 %ig SDS	1 % (v/v)
	20 %ig APS	0,33 % (v/v)
	TEMED	0,066 % (v/v)
Milchpulver-Blockierungslösung	TBS	
	Magermilchpulver	5 % (w/v)
	NaCl	150 mM
NP-40 Lysepuffer	NP-40	1 % (v/v)
	Tris (pH 7,4)	20 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	5 mM
	Natriumorthovanadat	1 mM
	Natriumfluorid	10 mM
	Natriumpyrophosphat	1 M
	PMSF	1 mM
	Aprotinin	2 µg/mL
	Leupeptin	2 µg/mL
	Pepstatin	2 µg/mL
Probenpuffer (Bio Rad)	SDS	6 % (w/v)
	Glycerin	30 % (v/v)
	Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	200 mM
	Bromphenolblau	0,005 % (v/v)
	β-Mercaptoethanol	2-5 % (v/v)
Sammelgel (Bio Rad)	^{dd} H ₂ O	69,5 % (v/v)
	30 %ig Acrylamid/Bisacrylamid	16,5 % (v/v)
	Tris-Puffer 1 M, pH 6,8	12,4 % (v/v)
	10 %ig SDS	1 % (v/v)
	20 %ig APS	0,49 % (v/v)
	TEMED	0,1 % (v/v)
„Stripping“-Lösung	^{dd} H ₂ O	
	Tris pH 6,8	62,5 mM
	β-Mercaptoethanol	100 mM
	10 %ig SDS	2 % (v/v)
Tris buffered saline (TBS)	^{dd} H ₂ O	
	Tris	10 mM
	NaCl	150 mM
	auf pH 7,5-8,0 einstellen	

- Material -

Tris buffered saline-Tween (TBS-T)	TBS	
	Tween 20	0,05 % (v/v)
Western-Blot-Transferpuffer	^{dd} H ₂ O	
	Tris	25 mM
	Glycin	192 mM
	Methanol	20 % (v/v)
	10 %ig SDS	1 % (v/v)

4.3. Kits

Kit	Bezugsquelle	KatalogNr.
Anti-TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit	Miltenyi Biotec	130-050-701
Anti-TCR $\gamma\delta$ MicroBead Kit (Customized Reagent)	Miltenyi Biotec	130-092-954
BD Cytofix/Cytoperm [™]	BD Biosciences	554 714
CD4+ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec	130-091-155
Cytofix (Phosflow [™])	BD Biosciences	554655
Dynabeads [®] Regulatory CD4+CD25+ T Cell Kit	Life Technologies	11363D
ECL Advance Western Blotting Detection Kit	GE-Healthcare	RPN2135
FcR Blocking Reagent, human	Miltenyi Biotec	130-059-901
FoxP3 Staining Buffer Set	eBioscience	00-5523
Human Granzyme B-ELISA	BenderMed Systems	BMS2027
Human IFN- γ - ELISA, DuoSet	R&D Systems	DY285
Human IL-2-ELISA, DuoSet	R&D Systems	DY202
Human RANTES (CCL5) -ELISA, DuoSet	R&D Systems	DY278
Human TNF- α -ELISA, DuoSet	R&D Systems	DY210
Lysing Solution	BD Biosciences	349202
Perm Buffer III (Phosflow [™])	BD Biosciences	558050
Proteome Profiler [™] Array, Human Phospho-MAPK Array Kit	R&D Systems	ARY002
T Cell Activation/ Expansion Kit, human	Miltenyi Biotec	130091441
Protein Marker „Precision Plus“	BioRad	161-0373

4.4. Antikörper

Für Antikörper, deren Konzentration unbekannt war, wurde die verwendete Verdünnung angegeben.

Verwendete Abkürzungen: AF = Alexa Fluor; FITC = Fluoresceinisothiocyanat; PE = Phycoerythrin; phos. = phosphoryliert; HRP = Meerrettichperoxidase; rh = rekombinant, human.

4.4.1. Zur Analyse von Oberflächenmolekülen verwendete mAk

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	End- konzentration	Bezugsquelle
CD3	PE	Maus IgG ₁ , κ	SK7	2,5 μ g/mL	BD Biosciences
CD4	FITC	Maus IgG2 _B	OKT4	25 μ g/mL	ATCC
CD4	FITC	Maus IgG ₁ , κ	SK3	2,5 μ g/mL	BD Biosciences
CD25	PE	Maus IgG ₁ , κ	SA3	1,25 μ g/mL	BD Biosciences

- Material -

CD27	PE	Maus IgG ₁ , κ	M-T271	1:2	BD Biosciences
CD28	PE	Maus IgG ₁ , κ	L293	12,5 µg/mL	BD Biosciences
CD39	PE	Maus IgG ₁ , κ	A1	25 µg/mL	Biolegend
CD45RA	PE-Cy7	Maus IgG ₁ , κ	L48	25 µg/mL	BD Biosciences
CD69	PE	Maus IgG ₁ , κ	L78	40 µg/mL	BD Biosciences
CD80	PE	Maus IgG ₁ , κ	L307.4	1:2	BD Biosciences
CD83	PE	Maus IgG ₁ , κ	HB15e	1:2	BD Biosciences
CD86	PE	Maus IgG ₁ , κ	2331	1:2	BD Biosciences
			(FUN-1)		
CD152 (CTLA4)	PE	Maus IgG _{2A} , κ	BNI3	pur	BD Biosciences
CD274 (PD-L1)	PE-Cy7	Maus IgG ₁ , κ	MIH1	50 µg/mL	BD Biosciences
CD279 (PD-1)	PE	Maus IgG ₁ , κ	EH12.2H7	12,5 µg/mL	Biolegend
HLA-DR	PE	Maus IgG _{2A} , κ	G46-6	12,5 µg/mL	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Maus IgG ₁ , κ	X40	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	FITC	Maus IgG ₁ , κ	X40	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Maus IgG _{2B} , κ	27-35	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Ratte IgG _{2A} , κ	54447	entsprechend	R&D Systems
Kontrolle	PE-Cy7	Maus IgG ₁ , κ	X40	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE-Cy7	Maus IgG ₁ , κ	L48	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	APC	Maus IgG _{2A} , κ	X39	entsprechend	BD Biosciences /Beckman Coulter
Kontrolle	APC	Maus IgG _{2A} , κ	eBM2a	entsprechend	eBioscience
LAP	PE	Maus IgG ₁ , κ	TW4-2F8	pur	Biolegend
TCRγδ	FITC	Maus IgG ₁ , κ	11F2	17 µg/mL	BD Biosciences
TCRγδ	APC	Maus IgG ₁ , κ	B1	50 µg/mL	BD Biosciences
TIM3	PE	Ratte IgG _{2A}	344823	5 µg/mL	R&D Systems
Vδ1	FITC	Maus IgG ₁ , κ	T58.2	30 µg/mL	Thermo Scientific
Vδ2	PE	Maus IgG ₁ , κ	B6	50 µg/mL	BD Biosciences
Vδ2	FITC	Maus IgG ₁ , κ	IMMU 389	1:2	Beckman Coulter

4.4.2. Zur Analyse intrazellulärer Moleküle verwendete monoklonale Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Einsatzkonzentration	Bezugsquelle
Foxp3	PE	Ratte IgG _{2A} , κ	PCH101	10 µg/mL	eBioscience
Foxp3	PE	Maus IgG ₁ , κ	259D	100 µg/mL	Biolegend
GATA-3	PE	Maus IgG ₁ , κ	IC26051P	5 µg/mL	R&D Systems
Granzym B	AF647	Maus IgG ₁ , κ	GB11	2 µg/mL	BD Biosciences
Granzym B	PE	Maus IgG ₁ , κ	GB11	1:100	BD Biosciences
Helios	APC	Armenian Hamster IgG	22F6	pur	Biolegend
IFN-γ	FITC	Maus IgG ₁ , κ	4S.B3	5 µg/mL	BD Biosciences
IFN-γ	PE	Maus IgG ₁ , κ	4S.B3	5 µg/mL	BD Biosciences
Kontrolle	FITC	Maus IgG ₁ , κ	MOPC-21	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Maus IgG ₁ , κ	MOPC-21	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Maus IgG _{2A} , κ	G155-178	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	PE	Ratte IgG _{2A} , κ	R35-95	entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	AF647	Maus IgG ₁ , κ		entsprechend	BD Biosciences
Kontrolle	APC	Armenischer Hamster IgG	HTK888	entsprechend	Biolegend
MIP-1α (CCL3)	PE	Maus IgG _{2A} , κ	11A3	2 µg/mL	BD Biosciences
RANTES (CCL5)	PE	Maus IgG ₁ , κ	2D5	2 µg/mL	BD Biosciences

- Material -

T-bet	PE	Maus IgG ₁ , κ	4B10	40 µg/mL	Biolegend
TNF-α	PE	Maus IgG ₁ , κ	359-81-11	2 µg/mL	BD Biosciences
phos. AKT (pS473)	PE	Maus IgG ₁ , κ	M89-61	0,3 µg/mL	BD Biosciences
phos. AKT (pT308)	PE	Maus IgG ₁ , κ	JT-223.371	0,3 µg/mL	BD Biosciences
phos. NF-κB/p65 (pS529)	PE	Maus IgG _{2B} , κ	K10- 895.12.50	1:5	BD Biosciences
phos. p38 MAPK (pT180/pY182)	AF647	Maus IgG ₁ , κ	36/p38	1:5	BD Biosciences
phos. ERK1/2 (pT202/pY204)	PE	Maus IgG ₁ , κ	20A	1:5	BD Biosciences

4.4.3. Agonistische und antagonistische Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Einsatz- konzentration	Bezugsquelle
CD3	/	Maus	OKT3	2 µg/mL	Orthoclone
CD28	/	Maus IgG ₁ , κ	CD28.2	1 µg/mL	BD Biosciences
CD80	/	Maus IgG ₁ , κ	37711	5 µg/mL	R&D Systems
CD86	/	Maus IgG _{2B} , κ	IT2.2	5 µg/mL	Biolegend
CD152	/	Maus IgG ₁ , κ	L3D10	5 µg/mL	Biolegend
CD274	/	Maus IgG _{2B} , κ	29E.2A3	5 µg/mL	Biolegend
CD279	/	Maus IgG _{2A} , κ	EH12.2H7	5 µg/mL	Biolegend
Kontrolle	/	Maus IgG ₁ , κ	11711	5 µg/mL	R&D Systems
Kontrolle	/	Maus IgG _{2B} , κ	20116	5 µg/mL	R&D Systems

4.4.4. Antagonistische Fusionsproteine

Protein	Zusammensetzung	Einsatz- konzentration	Bezugsquelle
CTLA-4/Fc	rh CTLA-4 (Ala37-Phe162)/Fc-Fusionsprotein	5 µg/mL	R&D Systems
IgG/Fc	rh IgG1 (Pro100Lys330)/Fc-Fusionsprotein	5 µg/mL	R&D Systems
PD-1/Fc	rh PD-1 (Leu25 Gln167)/Fc-Fusionsprotein	5 µg/mL	R&D Systems

4.4.5. Zur Western blot-Analyse verwendete Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Klon	Einsatzkon- zentration	Bezugsquelle	Bestell-Nr.
ERK1/2	/	Kaninchen	polyklonal	1:1.000	Cell Signaling	9102
NF-κB/p65	/	Kaninchen	polyklonal	1:1.000	Santa Cruz	SC-372
p38 MAP-Kinase	/	Kaninchen	polyklonal	1:1.000	Cell Signaling	9212
phos. AKT (Ser473)	/	Mouse IgG _{2B}	587F11	1:1.000	Cell Signaling	4051S
phos. AKT (Thr308)	/	Kaninchen	C31E5E	1:1.000	Cell Signaling	2965S
phos. ERK1/2 (Thr202/Tyr204)	/	Kaninchen mAb	20G11	1:1.000	Cell Signaling	9101S
phos. NF-κB/p65 (Ser536)	/	Kaninchen mAb	93H1	1:1.000	Cell Signaling	93H1
phos. p38 (Thr180/Tyr182)	/	Kaninchen	3D7	1:1.000	Cell Signaling	9211S
αKaninchen	HRP	Esel		1:7.500	GE-Healthcare	NA934V
αMaus	HRP	Schaf		1:7.500	GE-Healthcare	NA931V
β-Aktin	/	Maus	AC-15	1:10.000	Sigma-Aldrich	A1978

4.5. Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Absaugvorrichtung	Filter Mate Harvester	Perkin Elmer
Bestrahlungsgerät	GammaCell40	Atomic Energie of Canada
CO ₂ -Begasungsbrutschrank	Heracell 240i	Heraeus
Durchflusszytometer	FACS Calibur™	BD Biosciences
Entwicklermaschine		Agfa, Gera
Multistepper	Nichiryo 8100	Nichiryo
Kühlzentrifuge	Biofuge 15R	Thermo Scientific
Kühlzentrifuge	Megafuge 16/16R	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Axiovert 10	Zeiss
Lichtmikroskop	Axioskop	Zeiss
Mehrkanalpipette 5-300 µL	Finnpipette	Thermo Scientific
Mikroplatten-Photometer	Infinite™ M200	Tecan
Neubauer-Zählkammer		Fischer
Netzgerät	Power Supply 250-2	Sigma
Netzgerät	Power Pack 200/300	Bio Rad
Pipetierhilfen (10, 100, 200, 1000 µL)		Eppendorf
Elektrophoresekammer	Mini-Protean® 3	BioRad
Elektrophoresekammer	Protean® II xi Cell	BioRad
Spektrophotometer	SmartSpec™3000	BioRad
Sterilbank	Lamin air™	Thermo Scientific
Thermomixer compact	Thermostat 5320	Eppendorf
Vortex-Gerät	REAX 2000	Heidolph Reax
Western Blot Transfer-Kammer	Trans-blot®	Bio Rad
Western Blot Transfer-Kammer	Mini Trans-Blot®	Bio Rad
Wipptisch	Rocky	Fröbel Labortechnik
Zentrifuge	Biofuge 13	Heraeus
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus
Zentrifuge	5417R; 5415C	Eppendorf
Zentrifuge	Multifuge 4KR	Eppendorf
Zentrifuge	Multifuge 3s-R	Heraeus
β-Szintillationszähler	1450 Microbeta	Inotech

4.6. Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
ECL-Chemolumineszenz-Film	Hyperfilm™	Amersham
Einfrierröhrchen	CryoTube™	Thermo Scientific
FACS-Röhrchen (0,6 mL)	Round base test tube	Sterilin
FACS-Röhrchen (5 mL)		BD Biosciences
Filterpapier		Whatman
MACS-LS-Säulen		Miltenyi Biotec
Mikrotiterplatte	Maxisorb	Nunc
Nitrozellulose-Membran	Hybond™ C Extra	Amersham
Parafilm	Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten ungestopft		Hecht
Pipetierhilfe	Accu-jet™ pro	Brand, Wertheim
Pipettenspitzen		Sarstedt
PS-Abdeckplatten	127,0/85/11MM, Standard	Greiner
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 mL)		Sarstedt

- Material -

Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 mL)		Greiner
Spektrometerküvetten		Sarstedt
Spektrometerküvetten		Sarstedt
Steppertips 0,6 mL		Süd-Laborbedarf
Steppertips 00,6 mL		Süd-Laborbedarf
Transwell Einsatz	Cell Culture Insert\	Nunc
	Anopore, 8 Well (0,2 µm	
	Porengröße)	
Zellkulturflaschen (50, 250, 650 mL)	Cellstar	Greiner
Zellkulturplatte, Rundboden, 96 Kavitäten	MicroWell™	Nunc
Zellkulturplatte, Spitzboden, 96 Kavitäten		Nerbe plus
Zellkulturplatten, Flachboden, (12, 24, 96 Kavitäten)	MicroWell™	Nunc
Zentrifugenröhrchen (15 mL und 50 mL, ohne Stehrand)		Greiner

4.7. Software

Software	Hersteller
Aida Image Analyzer™ 4.04	Raytest
Cell Quest Pro™	BD Biosciences
Microsoft Office 2007™	Microsoft
Weasel 3.0.2	WEHI

4.8. Statistik

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Daten wurden mit Hilfe des studentschen T-Tests für gepaarte Daten unter Verwendung von Microsoft Exel 2007 bezüglich ihrer statistischen Signifikanz analysiert.

5. Methoden

5.1. Zell-basierte Methoden

5.1.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Zur Isolierung mononukleärer Zellen aus dem humanen Blut wurden die unterschiedlichen zellulären Bestandteile von Leukozytenkonzentraten (*Buffy coats* oder Leukozytenrückhalte-system-Konzentrat (LRS-Konzentrat)) mit Hilfe einer Ficoll-Hypaque-Dichtegradientenzentrifugation anhand ihrer spezifischen Dichte separiert. Die zellulären Bestandteile mit einer relativ zum Ficoll höheren Dichte wie Granulozyten und Erythrozyten pelletierten am Boden des verwendeten 50 mL-Zentrifugationsröhrchen, während Monozyten und Lymphozyten an der Phasengrenze zwischen Ficoll-Lösung und PBS/Plasma sedimentierten. Thrombozyten verblieben zusammen mit dem Plasma im Überstand.

Zur Isolation wurden 30-35 mL mit PBS verdünnten Blutes [im Verhältnis von 1:2 (*Buffy coat*) bzw. 1:5 (LRS-Konzentrat)] über 15 mL Ficoll-Lösung (Dichte von 1,077 g/mL) geschichtet. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt (693 rcf, 20 min, ohne Bremse) wurden die im Interphasering akkumulierten Zellen in neue Zentrifugenröhrchen überführt und einem Waschschrift (444 rcf, 5 min) mit PBS unterzogen. Nach zwei weiteren Waschschriften (174 rcf, 10 min) zur Entfernung verbliebener Ficollrückstände und Thrombozyten wurden die Zellen in RPMI Zellkulturmedium mit 10 % FKS aufgenommen und bei 4°C gelagert.

Lymphozytenkonzentrate gesunder Spender wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein zur Verfügung gestellt.

5.1.2. Magnetische Zellseparation (MACS)

Mit Hilfe einer magnetischen Separation können definierte T-Zell-Subpopulation aus PBMZ isoliert werden. Hierfür wurden an magnetische Partikel gekoppelte monoklonale Antikörper (mAk) verwendet. Diese mAk sind gegen definierte Oberflächenantigene unterschiedlicher Zellpopulationen gerichtet. Auf diese Weise ist es möglich definierte Zellpopulationen magnetisch zu markieren und diese in einer Säule mit einem paramagnetischen (Miltenyi Biotec) bzw. ohne Füllmaterial (Life Technologies/Dynal) innerhalb eines starken magnetischen Feldes zurückzuhalten. Um eine bestimmte Zellpopulation spezifisch anzureichern, können sowohl die zu isolierende (positive Selektion) als auch alle anderen Zellpopulation außer dieser (negative Selektion) markiert und zurückgehalten werden. Ferner können durch positive und negative Selektion auch eine oder mehrere Zellpopulationen spezifische aus dem Gemisch entfernt werden (Depletion).

- Methoden -

In dieser Arbeit wurden $\gamma\delta$ T-Zellen mit Hilfe eines FITC-markierten anti-TZR $\gamma\delta$ *MicroBead Kit* oder eines sonderangefertigten, unkonjugierten anti-TZR $\gamma\delta$ *MicroBead Kit* der Firma Miltenyi Biotec positiv selektioniert. CD4⁺ T-Zellen wurden negativ unter Verwendung des CD4⁺ T-Zell Isolierungs Kit II der Firma Miltenyi Biotec isoliert. Nach anschließender Depletion der CD25⁺ T-Zellen innerhalb der CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von anti-CD25 Dynabeads der Firma Life Technologies wurden die verbleibenden CD4⁺CD25⁻ T-Zellen als „Responder“ T-Zellen bezeichnet. Bei den mit anti-CD25 Dynabeads positiv isolierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen handelt es sich um Treg. Vor deren weiteren Verwendung wurden die an die Zellen gebundenen Dynabeads mit Hilfe der Detachabead-Reagenz (Life Technologies) entfernt. Die in dieser Arbeit frisch isolierten Zellen wurden nur verwendet, wenn sie laut durchflusszytometrischer Analyse einen Reinheitsgrad von > 97 % besaßen.

5.1.3. Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung wurde eine definierte Anzahl von Zellen per Zentrifugation (340 rcf, 5 min) pelletiert. Die Zellen wurden in eisgekühltem Einfriermedium (EFM) resuspendiert (5-30x10⁶ Zellen/mL). Durch das im EFM enthaltene DMSO wurde die Bildung von Kristallen verhindert und die Integrität der Zellen gewährleistet. Die Einfrierröhrchen wurden mit jeweils 1 mL Zellsuspension befüllt und für 30 min bei -20°C und in einem darauf folgenden Schritt bei -80°C eingefroren. Am Folgetag wurden die Zellen zur Lagerung bei -196°C in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen zügig in 14 mL kaltes RPMI Zellkulturmedium mit 10 % FKS überführt und pelletiert (340 rcf, 5 min). Da DMSO bereits bei Raumtemperatur für Zellen toxisch ist, wurden die Zellen zum Entfernen von DMSO-Rückständen zwei weiteren Waschschrritten unterzogen. Bevor die Zellen kultiviert wurden, wurde ihre Zellzahl und Vitalität bestimmt.

5.1.4. Bestimmung von Zellzahl und Zellvitalität

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 μ L einer zweckmäßig vorverdünnten Zellsuspension mit 60 μ L Eosinlösung vermischt. Die Anzahl vitaler und toter Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

5.1.5. Kulturbedingungen

Die Kultivierung humaner T-Zellen erfolgte im CO₂-Begasungsbrutschrank bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre und einem CO₂-Gehalt von 5%. Zur Kultivierung von frisch aus PBMZ isolierten bzw. expandierten T-Zellen wurde X-VIVO15 Zellkulturmedium verwendet. Bei diesem handelt es sich um ein serumfreies Medium mit definierten Zusätzen.

Zur Untersuchung des suppressiven Potentials wurden 1-5x10⁴ $\gamma\delta$ T- oder Treg-Zellen zusammen mit einer entsprechenden Anzahl Responder T-Zellen ohne die Zugabe von

- Methoden -

Zytokinen kokultiviert. Für Untersuchungen von „solokultivierten“ $\gamma\delta$ T-Zellen und Treg wurde das Zellkulturmedium mit IL-2 (50 U/mL) supplementiert.

Zur Induktion von regulatorischen $\gamma\delta$ T-Zellen wurden, wie von Casetti *et al.* beschrieben, TGF- β 1, IL-2 und IL-15 verwendet (Casetti *et al.* 2009). Pro Kavität wurden 5×10^4 Zellen in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten kultiviert. Zu Beginn der Zellkultur und darauffolgend jeweils im Abstand von 4 Tagen wurden 1,7 ng/mL TGF- β 1, 10 ng/mL IL-15 und 10 U/mL IL-2 zur Zellkultur hinzugegeben. Zur weiteren Expansion unter diesen Bedingungen wurden die Zellen am Tag 8 der Zellkultur in 24-Kavitäten-Flachbodenplatten überführt, wobei das Medium erneuert wurde. Nach einem Zeitraum von 16 Tagen wurde die Anzahl und Vitalität der Zellen bestimmt. Anschließend wurden diese für weitere Experimente verwendet.

5.1.6. Stimulation von T-Zellen

Treg können mit Hilfe anti-CD3,-28 mAk-umhüllter Partikel in Anwesenheit von IL-2 polyklonal stimuliert und expandiert werden (Oberg *et al.* 2010; Hoffmann *et al.* 2004). Zur Untersuchung suppressiver Funktionen bei $\gamma\delta$ T-Zellen wurden entsprechende Partikel der Firma Miltenyi Biotec (*T Cell Activation/Expansion Beads* umhüllt mit 10 μ g/mL anti-CD3 mAk, 10 μ g/mL anti-CD28 mAk, 1 μ g/mL anti-CD2 mAk (= A/E-Partikel)) verwendet. Durch diese wurden sowohl die Responder- als auch $\gamma\delta$ T-Zellen über ihren TZR und einen CD28-Kostimulus polyklonal stimuliert. Die Stimulation mit Hilfe von A/E-Partikeln wurde in 96-Kavitäten-Rundbodenplatten durchgeführt, wobei die Zellen im 1:1 Verhältnis mit A/E-Partikeln eingesetzt wurden. Für die Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen wurden jeweils 1×10^4 Zellen und eine entsprechende Anzahl von A/E-Partikeln verwendet.

Eine weitere Möglichkeit der polyklonalen Stimulation stellt die Verwendung von plattengebundenem anti-CD3 mAk (2 μ g/mL; Klon OKT3) zusammen mit löslichem agonistischen anti-CD28 mAk (1 μ g/mL) dar. Die Kavitäten der 96-Kavitäten-Rundbodenplatten wurden vor Stimulationsbeginn für 4 h bei 37°C mit 100 μ L anti-CD3 mAk-Antikörperlösung beschichtet. Anschließend wurde diese entfernt und die Platten zweimal mit 200 μ L PBS gewaschen. Das PBS des zweiten Waschschritts wurde erst direkt bevor Zellen auf die Platte gegeben wurden entfernt. Der anti-CD28 mAk wurde zusammen mit den Zellen in die jeweiligen Kavitäten gegeben. Pro Kavität wurden jeweils 5×10^4 Zellen der verwendeten Zellpopulation eingesetzt.

Alternativ wurden Responder T-Zellen mit bakteriellen Superantigenen in Form eines Gemisches verschiedener SE [SE-Gemisch: SEA-T, SEB, SEC, SED und SEE mit einer Konzentration von jeweils 1 μ g/mL] stimuliert. Superantigene können MHC II auf APZ außerhalb der Antigenbindungstasche direkt mit dem TZR über dessen V β -Region verbinden. Zur (parallelen) Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen wurde BrHPP (300 nM) verwendet, welches durch V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt wird. Sowohl BrHPP- als auch die SE-Gemisch-

- Methoden -

Stimulation machten das Vorhandensein von APZ notwendig, welche in Form von bestrahlten PBMZ (2×10^4 Zellen) mit in die Zellkultur gegeben wurden. Es wurden jeweils 2×10^4 Zellen in 96-Kavitäten-Zellkulturplatten stimuliert.

Zur Kurzzeitstimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen wurden 5×10^5 - 1×10^6 Zellen verwendet. Diese befanden sich in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß in einem Volumen von 0,5 mL und wurden in Zellkulturmedium ohne Zusätze oder in Anwesenheit eines TLR2-Liganden-Gemisches für 22 h vorinkubiert. Anschließend wurden diese direkt ohne einen Waschschrift auf Eis überführt. Dort wurden agonistische gegen CD3 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und CD28 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) gerichtete mAk in einem Volumen von 10 μL hinzugegeben und mit den Zellen für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μL eiskaltem X-VIVO15 Zellkulturmedium gewaschen. Durch Zugabe von 200 μL vorgewärmten Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in X-VIVO15 wurde die Stimulation durch Quervernetzung der anti-CD3 und CD28 mAk begonnen. Für den Zeitraum der Stimulation verblieben die Zellen bei 37°C. Zum Beenden der Stimulation wurde 1 mL eiskaltes PBS hinzugegeben und die Zellen auf Eis überführt. Für die intrazelluläre, durchflusszytometrische Analyse von phosphorylierten Signalmolekülen (Kap. 5.2.2.3) wurde die Stimulation mit der Zugabe von vorgewärmtem Cytifix (1 Volumen) durch Fixierung der Zellen beendet.

Zum intrazellulären Nachweis löslicher Mediatoren in expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurde ebenfalls eine Kurzzeitstimulation vorgenommen. Die Zellen wurden in frisches Zellkulturmedium mit 10 U/mL IL-2 überführt und es wurde 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) (10 ng/mL) hinzugegeben. Nach einer Stimulationsdauer von 8 h wurden die Zellen analysiert.

5.1.6.1. Blockierende Antikörper und Fusionsproteine

Um die Interaktionen immunregulatorischer Oberflächenmoleküle genauer zu analysieren, wurden folgende die Interaktion blockierende mAk oder rekombinante Fusionsproteine verwendet: anti-CD80 (Klon 3771), CTLA-4/Fc und PD-1/Fc von R&D; CTLA-4 (Klon L3D10), anti-CD86 (Klon IT2.2), anti-PD-1 (EH12.2H7) und anti-PD-L1 (29E.2A3) von Biolegend (Brown *et al.* 2003; Rodig *et al.* 2003; Nakamoto *et al.* 2009; Radziewicz *et al.* 2007; Everts *et al.* 2010; Kapsogeorgou *et al.* 2001). Zur funktionellen Analyse wurden die Konzentration der blockierenden Entitäten (in Anlehnung an Literaturwerte) in einem Bereich zwischen 1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ austitriert. Vor Beginn der Zellkultur wurden die Zellkulturplatten für 4 h bei 37°C mit 100 μL einer die blockierenden Entitäten und den agonistischen anti-CD3 mAk enthaltenden Lösung beschichtet. Die weitere Durchführung erfolgte wie in Kapitel. 5.1.6 für die Stimulation mit plattengebundenem anti-CD3 mAK und löslichen anti-CD28 mAk beschrieben.

5.1.6.2. TLR2-Liganden-Stimulation

TLR2 kann mit TLR1 und TLR6 Heterodimere, die unterschiedliche Liganden erkennen, bilden. Da donorspezifische Unterschiede in der Expression von TLR1 beschrieben sind (Pietschmann *et al.* 2009; Oberg *et al.* 2010), wurde zur Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit TLR2-Liganden ein Gemisch aus Pam₂CSK4, Pam₃CSK4 und FSL-1 verwendet. Auf diese Weise konnte die Stimulation der verschiedenen möglichen TLR2-Heterodimere sichergestellt werden. Zur Untersuchung des Einflusses von TLR2-Liganden auf $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. deren suppressive Aktivität wurden $\gamma\delta$ T-Zellen mit TLR2-Liganden vorinkubiert. Durch die Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen konnten direkte Effekte der TLR2-Liganden auf kokultivierte Responder T-Zellen ausgeschlossen werden.

Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in 24-Kavitäten-Flachbodenplatten in X-VIVO15 mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL für 22 h vorinkubiert. Zu einem Teil der Zellen wurde für diesen Zeitraum die TLR2-Liganden Pam₂CSK4 (2 μ g/mL), Pam₃CSK4 (2 μ g/mL) und FSL-1 (1 μ g/mL) hinzugegeben, während der andere Teil in Zellkulturmedium ohne Zusätze verblieb. Nach der Vorinkubation wurden die Zellen in 15 mL Zentrifugationsröhrchen überführt, zwei Waschschritten unterzogen (340 rcf, 5 min) und für nachfolgende Versuche verwendet.

5.1.7. Proliferationsanalyse anhand von ³H-Tymidineinbau

Proliferierende Zellen verdoppeln vor der Zellteilung ihre DNA. Hierbei werden komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert. Durch Zugabe von Tritium-markiertem Thymidin (³H-Thymidin) in das Zellkulturmedium kann dieses von den proliferierenden Zellen anstelle von zelleigenem Thymidin in die (neu synthetisierte) DNA integriert werden. Obwohl der Einbau von Thymidin vor der eigentlichen Zellteilung stattfindet, ist er direkt proportional zur Zellproliferation.

Zur Bestimmung der Proliferation wurden Zellen in 96-Kavitäten-Zellkulturplatten mit Rundboden in jeweils 200 μ L Zellkulturmedium kultiviert. Die jeweiligen Ansätze erfolgten als experimentelle Triplikate. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden pro Kavität 20 μ L ³H-Thymidin in RPMI Zellkulturmedium ohne FKS mit einer Aktivität von 1 μ Ci/Kavität hinzugegeben. Für einen Zeitraum von 16 Stunden wurden die Zellen weiter kultiviert und im Anschluss bei -20°C eingefroren. Zur Bestimmung der in die DNA eingebauten Radioaktivität wurden die Proben auf eine Filtermembran übertragen. Diese wurde getrocknet und anschließend mit einem Wachs beschichtet, welches einen Szintillator beinhaltet, der die radioaktive Strahlung in Lichtenergie umsetzte. Diese Ereignisse wurden mit Hilfe eines β -Szintillationszählers in Form von *cpm* (*counts per minute*/Ereignissen pro Minute) gemessen.

5.2. Durchflusszytometrische Methoden

Mit Hilfe der fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS: *Fluorescence activated cell sorting*) ist es möglich einzelne Zellen anhand ihrer Lichtbrechung und/oder ihrer Fluoreszenz zu charakterisieren. Hierzu wird durch eine Trägerflüssigkeit eine laminare Strömung erzeugt und die Zellsuspension von dieser mitgeführt. Im Bereich der Messküvette kommt es durch die Querschnittsverringern zur hydrodynamischen Fokussierung und Vereinzelung der Zellen. Anschließend passieren die vereinzelt Zellen den Laserstrahl. Ein Teil des auftretenden Lichtes wird von den Zellen gebrochen. Das Vorwärts- (fsc) bzw. Seitwärtsstreulicht (ssc) ist jeweils proportional zu der Größe bzw. Granularität der analysierten Zelle. Durch einen Laser ist es weiterhin möglich Fluorochrome anzuregen, die daraufhin Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich emittieren, welches wiederum durch Detektoren nachgewiesen werden kann. Durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper ist es möglich bestimmte Proteine einer Zelle zu markieren und diese Zellen anschließend durchflusszytometrisch zu analysieren. Die Fluoreszenzintensität ist hierbei proportional zur Anzahl der gebundenen Fluorochrommoleküle.

5.2.1. Oberflächenantikörpermarkierung

Zur Antikörpermarkierung von Molekülen auf der Zelloberfläche wurden zwischen 1×10^4 und 1×10^6 Zellen in 96-Kavitäten-Spitzbodenplatten überführt. Diese wurden mit 200 μL eiskaltem WP gewaschen, für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 7-10 μL des spezifischen Antikörpers in angegebenen Verdünnungen/Konzentrationen (Kap. 4.4.1) zu den Zellen gegeben (auf Eis) und für 30 min bei 4°C inkubiert. Wenn der verwendete Antikörper nicht Fluorochrom-gekoppelt war, wurde nach einem weiteren Waschschriff ein Fluorochrom-gekoppelter Zweitantikörper zum Nachweis des Erstantikörpers verwendet (30 min, 4°C). Im Anschluss wurden die Zellen zwei weiteren Waschschriffen unterzogen, in WP aufgenommen und direkt durchflusszytometrisch analysiert oder optional in 1 %iger PFA-Lösung fixiert. In PFA-Lösung aufgenommen und bei 4°C gelagert, war die Fluoreszenzmarkierung für mindestens zwei Wochen stabil.

5.2.2. Intrazelluläre Antikörpermarkierungen

Die intrazelluläre Antikörpermarkierung wurde prinzipiell wie die Oberflächenmarkierung durchgeführt, nur wurden die Zellen zuvor fixiert und permeabilisiert. Um die Membranpermeabilität aufrechtzuerhalten wurden zudem die Kapitel 4.3 aufgelisteten speziellen Puffer verwendet. Intrazelluläre Antikörpermarkierungen konnten auch anschließend an eine vorhergegangene Oberflächenmarkierung vorgenommen werden. Die verwendeten Antikörper sind in Kapitel 4.4.2 aufgeführt.

5.2.2.1. Intrazellulärer Nachweis löslicher Mediatoren

Zum intrazellulären Nachweis löslicher Mediatoren wurde die Exozytose der Zellen 4 h vor der Analyse durch Zugabe von Monensin (3 μM) zum Zellkulturmedium blockiert. Zur intrazellulären Antikörpermarkierung wurde ein Puffersystem von BD-Biosciences verwendet. Zwischen 1×10^4 und 1×10^5 Zellen wurden zuerst in eine 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte überführt und nach einem Waschschrift (200 μL Staining-Puffer (SP), 300 rcf, 5 min) mit Hilfe von Cytofix/Cytoperm™ für 20 min bei 4°C fixiert bzw. permeabilisiert. Nach zwei anschließenden Waschschriften (200 μL eiskalter Perm/Wash™-Puffer, 300 rcf, 5 min) wurden die Zellen zusammen mit 100 μL in Perm/Wash™-Puffer verdünnten Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit Perm/Wash™-Puffer. Im Anschluss wurden die Zellen in SP aufgenommen und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

5.2.2.2. Intrazellulärer Nachweis von Transkriptionsfaktoren

Zur intrazellulären Markierung von Transkriptionsfaktoren wurde das FoxP3 Staining Buffer Set von eBioscience verwendet. Zwischen 1×10^4 und 5×10^5 Zellen wurden ebenfalls in eine 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte überführt und einem Waschschrift unterzogen (200 μL eiskalter SP, 300 rcf, 5 min). Anschließend wurden diese mit 100 μL Fixierungs-/Permeabilisierungs-Lösung für mindestens 1 h bei 4°C inkubiert. Nach zwei Waschschriften (200 μL Permeabilisierungs-Puffer, 300 rcf, 5 min) wurden die Zellen mit 20 μL in Permeabilisierungs-Puffer verdünntem Antikörper für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zwei weiteren Waschschriften mit Permeabilisierungs-Puffer unterzogen und in 100 μL SP aufgenommen und umgehend durchflusszytometrisch analysiert.

5.2.2.3. Intrazellulärer Nachweis phosphorylierter Signalmoleküle

Zur Analyse phosphorylierter Signalmoleküle wurde das Phosflow™-Puffersystem von BD-Biosciences verwendet. Pro Antikörpermarkierung wurden $2,5 \times 10^5$ - 1×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden direkt im Zellkulturmedium durch Zugabe von einem Volumen Cytofix fixiert. Anschließend wurden die Zellen bei 9820 rcf pelletiert und der Überstand verworfen. Durch Zugabe von 100 μL vorgekühltem (-20°C) Perm-Puffer III wurden die Zellen für 30 min auf Eis permeabilisiert. Nach zwei Waschschriften (200 μL SP, 300 rcf, 5 min) wurden die Zellen mit 25 μL in SP verdünnten Antikörper für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 100 μL SP aufgenommen und umgehend am Durchflusszytometer analysiert.

5.2.3. SCDA (Standard Cell Dilution Assay)

Zur Bestimmung der Absolutzahl verschiedener Zellpopulationen in einer heterogenen Zellkultur wurde die SCDA-Methode verwendet. Hierbei werden einzelne Zellpopulationen durch Fluorochrom-gekoppelte Antikörper differenziert. Zum Ausschluss toter Zellen aus den

- Methoden -

Messungen wird die Zellbeschaffenheit in Form von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht sowie die Markierung durch Propidiumjodid verwendet. Propidiumjodid kann durch die desintegrierte Plasmamembran toter Zellen diffundieren und dort zwischen Basen der DNA interkalieren. Da die Fluoreszenz von interkaliertem Propidiumjodid um das 20-30fache erhöht ist, lässt sich die Einlagerung in die DNA toter Zellen durchflusszytometrisch nachweisen. Zu dem untersuchten Zellgemisch wird eine definierte Anzahl fixierter, Propidiumjodid-positiver Standardzellen mit einheitlicher Größe und Fluoreszenzmarkierung (APC) (welche sich von anderen eingesetzten Markierungen unterscheidet) hinzugegeben. Durch die Zugabe einer definierten Anzahl APC-positiver Standardzellen ist es möglich die Absolutzellzahl vitaler Zellen zu ermitteln. Der Quotient der relativen Anzahl untersuchter Zellen und Standardzellen korreliert nach Ausschluss toter Zellen linear mit der Anzahl der untersuchten Zellen und ist unabhängig von der Anwesenheit von „Fütterzellen“ (Pechhold *et al.* 1994a). Durch Multiplikation des erhaltenen Quotienten mit der zugegebenen Standardzellzahl (10.000 Zellen) lässt sich die Absolutzellzahl der untersuchten Zellen bestimmen. Dies soll anhand der in Abbildung 5 dargestellten SCDA-Messung beispielhaft gezeigt werden. Wie im Punktwolkendiagramm oben rechts dargestellt ist, machen in diesem Beispiel CD4⁺ T-Zellen 62,1 % und Standardzellen 9,9 % der vitalen Zellen aus. Daraus folgt folgende Berechnung: $62,1 \% / 9,9 \% * 10000 = 62727$. Es befinden sich in diesem Beispiel also 62727 vitale CD4⁺ T-Zellen im Zellgemisch. Durch Verwendung der *Biplot*-Darstellung ist es möglich zwei unterschiedlich markierte Zellpopulationen (FITC- und PE) gleichzeitig mit Standardzellen zu betrachten.

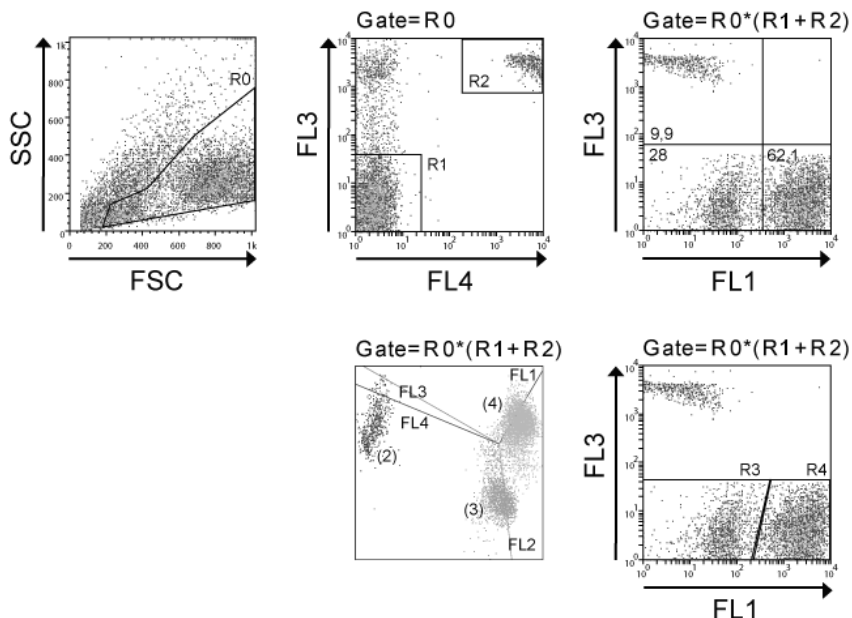


Abb. 5: Beispielhafte Darstellung einer SCDA-Messung. Obere Reihe: Punktwolkendarstellung der Analysestrategie zur Bestimmung der Absolutzellzahl. Durch die Region 1 (R1) sind lebende PI⁻ Zellen und durch die Region 2 (R2) PI⁺APC⁺ Standardzellen eingegrenzt. Unten links: Unterscheidung der verschiedenen Zellpopulationen in der *Biplot*-Darstellung. Gate (2) = R0+R2, Gate (3) = R0+R1+R3, Gate (4) = R0+R1+R4, FL1 = anti-CD4-FITC, FL2 = anti- δ 2-PE, FL3 = PI, FL4 = Standardzellen-APC.

- Methoden -

Die Bestimmung der Absolutzellzahl vitaler Zellen durch die SCDA-Methode wurde sechs bis sieben Tage nach Beginn der Zellkultur durchgeführt. Hierfür wurden die zu untersuchenden Zellen in eine 96-Kavitäten-Spitzbodenplatte übertragen. Anschließend wurde die Zellkulturplatte, um eventuell in der Zellkulturplatte verbliebene Zellen ebenfalls in die Spitzbodenplatte zu übertragen, mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit 300 rcf für 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden diese mit jeweils 8 μL der für die jeweiligen Zellpopulationen spezifischen Fluorochrom-gekoppelten mAk (anti-CD4-FITC und anti-TZR $\gamma\delta$ -PE oder anti-TZRV δ 2-PE) für 30 min bei 4°C im Dunkeln markiert. Nach einem darauffolgenden Waschschrift (200 μL WP, 300 rcf, 5 min) wurden die Zellen in 100 μL Standardzell-Puffer (StdZP) aufgenommen. Auf zusätzliche Waschschriffe wurde verzichtet, um den dadurch verursachten Verlust von Zellen zu minimieren. Anschließend wurden die Proben am Durchflusszytometer analysiert.

Herstellung von Standardzellen

CD4⁺ T-Zellen wurden unter Verwendung eines Negativisolationskits der Firma Miltenyi Biotec, dem Protokoll des Herstellers folgend, isoliert. Um einen möglichst starkes Fluoreszenzsignal zu generieren, wurden die Zellen in einem ersten Schritt mit einer Mischung verschiedener spezifischer Biotin-gekoppelter mAk für 30 min bei 4°C markiert (Gesamtvolumen 200 $\mu\text{L}/100 \times 10^6$ Zellen). Verwendet wurden anti-MHC I mAk (Klon W6/32, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-TZR(pan) $\alpha\beta$ mAk (Klon BMA031, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-CD2 mAk (Klon OKT11, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-CD3 mAk (Klon OKT3, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und anti-CD4 mAk (Klon OKT4.5, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Nach einem Waschschrift (5 mL WP, 300 rcf) wurden die mAk mit Biotin-markierten Ziege-anti-Maus-Antikörper (100 $\mu\text{L}/100 \times 10^6$ Zellen, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 20 min bei 4°C markiert. Nach zwei weiteren Waschschriften wurden die Zellen mit APC-markierten Streptavidin (50 $\mu\text{L}/100 \times 10^6$ Zellen, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 45 min bei 4°C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen über Nacht in 10 mL 1 %iger PFA-Lösung fixiert. Nach einem abschließenden Waschschrift wurden die Zellen bei einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/mL in WP resuspendiert und konnten bis zu ihrer Verwendung im Standardzell-Puffer (StdZP) für mindestens 6 Monate gelagert werden.

5.3. Proteinbiochemische Methoden

5.3.1. Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen mit PBS gewaschen, pelletiert (340 rcf, 5 min) und in NP-40-Lysepuffer mit Inhibitoren (siehe Kap. 4.2.2) aufgenommen. Mit Hilfe der Inhibitoren konnte ein Abbau der Enzyme durch Proteasen oder eine Dephosphorylierung durch Phosphatasen verhindert werden. Nach Lyse der Zellen für 30-60 min wurden

- Methoden -

unlösliche Zellbestandteile pelletiert (20000 rcf, 10 min, 4°C) und der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde das Lysat direkt weiterverarbeitet, konnte aber optional auch bei -20°C gelagert werden.

5.3.2. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford-Test verwendet. Der hierbei verwendete Farbstoff Coomassie Brilliantblau kann mit basischen Protein-Seitenketten einen Komplex bilden. Dies führt zu einer Verschiebung dessen Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm.

Zu 995 µL Coomassie Protein Assay Reagenz wurden 5 µL des Lysates gegeben, gemischt und für 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers bestimmt. Die Proteinkonzentration der Probe konnte anschließend anhand einer zuvor mit definierten Konzentrationen von BSA erstellten Kalibrierungsgeraden errechnet werden.

5.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen anhand deren Molekulargewicht wurde die SDS-PAGE verwendet. Hierzu wurden die Proteine zuerst mit 3x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Hierbei wird die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufgehoben. Aufgrund des im Probenpuffer enthaltenen β -Mercaptoethanols werden Disulphidbindungen reduziert. Da auch Proteasen und Phosphatasen denaturiert werden, konnten die Proben anschließend bei 4°C gelagert werden. Das ebenfalls enthaltene anionische Detergenz SDS lagert sich durch hydrophobe Wechselwirkungen an Proteine an, stabilisiert diese in einem linearisierten Zustand und maskiert gleichzeitig deren positive Ladungen. Da die gebundenen, negativ geladenen SDS-Moleküle zur Molekülmasse des Proteins proportional sind, ist auch die negative Ladung proportional zur Molekülmasse. Durch die Behandlung mit SDS ist es möglich Proteine unabhängig von ihrer Eigenladung anhand ihrer Größe im elektrischen Feld aufzutrennen, da große Proteine im Trenngel stärker zurückgehalten werden als kleine. Die zur SDS-PAGE verwendeten Gele bestanden aus Sammel- und Trenngel. Innerhalb des Sammelgels wurden die Proteine fokussiert, so dass diese weitgehend gleichzeitig in das Trenngel eintraten, um dort anhand ihrer Größe aufgetrennt zu werden.

Zur SDS-PAGE wurden in dieser Arbeit das NuPAGE-System der Firma Life Technologies und das Protean II-System der Firma Biorad verwendet.

Bei Verwendung des Protean II-Systems war es möglich die Konzentration des Trenngels zu variieren. Abhängig von der zu analysierenden Molekülgröße wurden Konzentrationen zwischen 10 und 15 % verwendet. Im Anschluss an das Gießen des Trenngels wurde dies mit 96 % Ethanol überschichtet. Nach dessen Polymerisation wurde das Ethanol entfernt und

- Methoden -

das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Nachdem auch dieses polymerisiert war, wurde das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit Laufpuffer überschichtet. Anschließend wurden die Proben mit jeweils 10-50 µg Protein bzw. dem Lysat von 1×10^6 Zellen aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei 55-70 V über Nacht.

Für das NuPage-System wurden Bis-Tris-Fertiggele mit 4-12 %igem Acrylamidgradienten zusammen mit dem zugehörigen MOPS-SDS-Laufpuffer verwendet. Es wurden maximal 20 µg Protein pro Bahn bzw. das Lysat von 1×10^6 Zellen pro Bahn aufgetragen. Die Proben wurden bei 25 mA für etwa 1-1,5 h aufgetrennt.

5.3.4. **Western blot Transfer**

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der *Western blot*-Technik auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wodurch sie dem Nachweis durch Antikörper zugänglich wurden. Um die Proteine auf die Nitrozellulosemembran zu übertragen, wurde eine Spannung senkrecht zum SDS-Gel angelegt, wobei die Proteine das durch die SDS-PAGE entstandene Verteilungsmuster beibehielten. Für den Transfer wurde eine Nitrozellulosemembran auf das SDS-Gel gelegt, beides wurde zwischen 4 Whatmann-Papiere und 2 Schwämme in eine Transferkassette eingespannt. Der Zusammenbau erfolgte in einer mit Transferpuffer gefüllten Schale, um den Einschluss von Luftblasen zwischen SDS-Gel und Membran bzw. Whatmann-Papieren zu verhindern. Anschließend wurde die Transferkassette in einen mit Transferpuffer gefüllten Tank gehängt, wobei die Seite des SDS-Gels, die mit der Nitrozellulosemembran bedeckt war, zur Anode (+) hin ausgerichtet wurde. Zum Transfer von NuPAGE-Gelen wurden kleine Transferkammern der Firma Life Technologies mit eingehängtem Eis-Kühlakku verwendet. Der Transfer erfolgte 1 h bei 200 V. Für die bei Nutzung des Protean II-System verwendeten SDS-Gele wurden große Transferkammern der Firma BioRad verwendet. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 0,8 A und 4°C. Um die Effizienz des Transfers zu bewerten, wurde die Membran mit Ponceau S gefärbt und dokumentiert. Anschließend wurde sie mit Wasser gespült und mit TBS-T entfärbt.

5.3.5. **Entfernen von Antikörpern von *Western blot*-Membranen („Stripping“)**

Gebundene Antikörper können mit Hilfe von Detergenzien und Reduktionsmitteln von einer *Western blot*-Membran entfernt werden. Bei der Entfernung durch „Stripping“-Lösung wurden vor allem gebundene Antikörper von der Membran entfernt, während die auf die Membran transferierten Proteine gebunden blieben.

Hierzu wurde die Membran für 25 min bei 56°C unter Schwenken mit 25 mL „Stripping“-Lösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran 4x für 10 min mit TBS-T gewaschen und danach erneut mit Milchpulver-Blockierungslösung inkubiert. Nach der „Stripping“-Prozedur konnte die Membran erneut mit Antikörpern inkubiert werden.

5.4. Immunochemische Methoden

5.4.1. Immunodetektion von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran

Zur Detektion von Proteinen, die mit Hilfe der *Western blot*-Methode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert wurden, können diese durch spezifische ungekoppelte (Primär-) Antikörper markiert werden. In einem zweiten Schritt ist es dann möglich diese durch einen Meerrettichperoxidase (HRP) -gekoppelten Sekundärantikörper nachzuweisen. Durch die Enzymaktivität der HRP wird ein Substrat (ECL-Reagenz; Luminol, Wasserstoffperoxid) umgesetzt, was zur Entstehung von Chemolumineszenz führt. Diese kann wiederum durch das Belichten eines Fotofilms festgehalten werden.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern, wurde die Membran mit Milchpulver-Blockierungslösung für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde sie mit in Milchpulver-Blockierungslösung verdünntem Primär- (ÜN, 4°C, Rollinkubator) und Sekundärantikörper (1 h, RT) inkubiert, wobei sie nach den einzelnen Inkubationsschritten jeweils dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen wurde. Die in dieser Arbeit zur Immunodetektion von Proteinen auf einer Nitrozellulosemembran verwendeten Antikörper sind in tabellarischer Form in Kapitel 4.4.5 aufgeführt. Zur Visualisierung der Proteine wurde die Membran für 1 min mit ECL-Reagenz inkubiert und die entstehende Chemolumineszenz mit Hilfe eines ECL-Chemolumineszenz-Film festgehalten.

5.4.2. ELISA

In dieser Arbeit wurden verschiedene Sandwich-ELISA zum antikörperbasierten Nachweis von Proteinen in Zellkulturüberständen verwendet. Hierzu wurden MaxiSorp™ 96-Kavitäten-Flachbodenplatten der Firma Nunc mit einem Erstantikörper zum Proteinnachweis beschichtet. In die beschichteten Kavitäten wurde der zellfreie Zellkulturüberstand gegeben. Anschließend wurden die gebundenen Proteine mit Hilfe eines Nachweis-Antikörpers, der gegen ein anderes Epitop als der Erste gerichtet ist, inkubiert. Dieser Zweitantikörper war entweder direkt an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt oder das Enzym wurde in einem weiteren Schritt mit Hilfe einer Biotin-Streptavidin-Interaktion an den Antikörper gebunden. Die Meerrettichperoxidase ist ein Enzym, welches genutzt werden kann, um die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu H₂O zu katalysieren. Die hierbei freiwerdenden Protonen oxidieren das farblose Chromogen Tetramethylbenzidin, welches ein blaues Endprodukt bildet. Nach Abstoppen der Reaktion durch Schwefelsäure bildet sich ein stabiler gelber Farbkomplex, dessen Absorption bei 450 nm photometrisch analysiert werden kann. Der entstandene Farbkomplex ist proportional zu der in den Überständen enthaltenen Proteinmenge. Durch eine Eichreihe mit definierter Proteinmenge ist es möglich die Proteinmenge in den Überständen exakt zu bestimmen.

- Methoden -

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Menge von IL-2, IFN- γ , TNF- α , Granzym B und CCL5 (RANTES) in unverdünnten Zellkulturüberständen mit Hilfe der entsprechenden DuoSet ELISA der Firma R&D Systems analysiert (Kap. 4.3). Die Versuchsdurchführung erfolgte hierbei jeweils nach Angaben des Herstellers.

5.4.3. Phosphorylierungs-Rasteranalyse (*Phospho-Array-Analyse*)

Dem zum Nachweis der Phosphorylierungszustände verschiedener Signalmoleküle verwendeten Proteome Profiler™ *Array* (Human Phospho-MAPK Array Kit) der Firma R&D Systems liegt ein ähnliches Funktionsprinzip wie einem Sandwich-ELISA zugrunde. Auf einer Nitrozellulosemembran befinden sich punktweise aufgetragene, für verschiedene Signalmoleküle spezifische Erstantikörper. Diese werden mit einem Zelllysate inkubiert, zu dem phosphorylierungsspezifische Biotin-gekoppelte Antikörper hinzugegeben werden. Ungebundenes Material wird anschließend durch Waschen entfernt. Mit Hilfe von Streptavidin-gekoppelter HRP unter Verwendung einer wie in Kapitel 5.4.1 beschriebenen Chemolumineszenz-Reaktion kann der Grad der Phosphorylierung der verschiedenen Signalmoleküle sichtbar gemacht werden.

Die für die *Phospho-Array-Analyse* verwendeten Lysate wurden aus $\gamma\delta$ T-Zellen gewonnen, die entsprechend der in Kapitel 5.1.6 beschriebenen Methode zur Kurzzeitstimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen stimuliert wurden. Die Versuchsdurchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers (Kap. 4.3).

6. Ergebnisse

6.1. Suppressive Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen

6.1.1. Das suppressive Potential von Treg und $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage sind die Proliferation anderer Lymphozyten-Populationen zu supprimieren. Grundsätzlich kann die Suppression von T-Zellen über verschiedene Mechanismen bewerkstelligt werden. Um eine indirekte Einflussnahme durch DZ auf Responder T-Zellen (Traxlmayr *et al.* 2010) auszuschließen, wurde die Interaktion von isolierten Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. Die solo- bzw. kokultivierten Zellpopulationen wurden in Abwesenheit von APZ polyklonal durch anti-CD2,-3,-28 mAk-umhüllte A/E-Partikel stimuliert. Durch die A/E-Partikel wurden die für die Aktivierung von T-Zellen notwendigen Signale in Form eines TZR-Stimulus und eines CD28-Kostimulus vermittelt. Durch Analyse des ^3H -Thymidineinbaus wurde die Proliferation bestimmt und untersucht, ob $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage sind die Proliferation von Responder ($\text{CD4}^+\text{CD25}^-$) T-Zellen in vergleichbarer Weise wie Treg zu supprimieren. Die Proliferation der Responder T-Zellen wurde durch Treg signifikant supprimiert, wobei die Stärke der Suppression positiv mit der Anzahl verwendeter Treg korrelierte. Bei Kokultur von Responder- mit $\gamma\delta$ T-Zellen kam es ebenfalls zu einer signifikanten Suppression der Responder T-Zell-Proliferation, die ebenfalls positiv mit der Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen korrelierte. Diese Suppression war ähnlich stark ausgeprägt wie die Treg-vermittelte. Sowohl Treg als auch $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen, wenn sie in Abwesenheit anderer Zellen kultiviert wurden (ohne Zusatz von IL-2), keine Proliferation auf (Abb. 6 A).

Bei Verwendung der ^3H -Thymidininkorporations-Methode ist eine Bestimmung der Proliferation einzelner Populationen innerhalb eines Zellgemisches nicht möglich. Daher wurde zusätzlich die Absolutzellzahl der kokultivierten Zellpopulationen unter Verwendung der SCDA-Methode bestimmt. Die Bestimmung der Absolutzellzahl vitaler Zellen zeigte, dass die Zellzahl der Responder T-Zellen in Kokultur im Vergleich zu der von Solokultivierten signifikant verringert war (Abb. 6 B, linke Seite). Im Gegensatz zu solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen, wiesen $\gamma\delta$ T-Zellen die mit Responder T-Zellen kokultiviert wurden oder deren Zellkulturmedium mit IL-2 supplementiert wurde, eine deutliche Proliferation auf (Abb. 6 B, rechte Seite). Lichtmikroskopisch konnte ebenfalls die Suppression von kokultivierter Responder T-Zellen beobachtet werden. Bei Kokultur von Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen ließ sich verglichen mit der Responder-Solokultur eine deutlich geringere Größe der Proliferationscluster erkennen (Abb. 6 C). Sowohl mit Hilfe der ^3H -Thymidininkorporations-Methode, der lichtmikroskopischen als auch der SCDA-Analyse zeigte sich, dass bei polyklonaler

Stimulation durch A/E-Partikel $\gamma\delta$ T-Zellen die Proliferation von Responder T-Zellen effektiv supprimieren konnten.

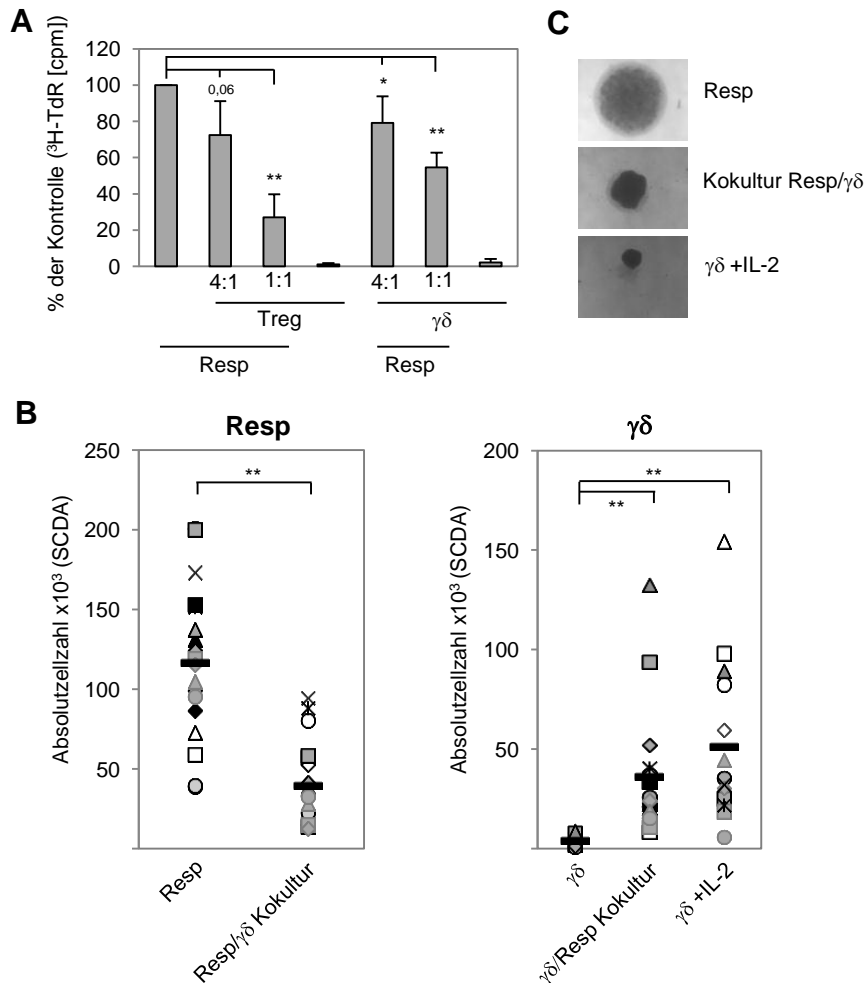


Abb. 6: Vergleich der suppressiven Aktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen und Treg. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen und Treg wurden alleine (unter Zusatz von 50 U/mL IL-2) oder zusammen mit negativ isolierten Responder ($\text{CD4}^+\text{CD25}^-$) T-Zellen kultiviert. Als Kontrolle wurden Responder T-Zellen ohne regulatorische T-Zellen kultiviert. Sämtliche Zellen wurden mit A/E-Partikeln stimuliert. **A)** Die Proliferation der solo- oder kokultivierten Zellen wurde nach drei Tagen anhand des ^3H -Tymidininkorporation ($^3\text{H-TdR}$) in die DNA in Form von experimentellen Triplikaten gemessen. Die ^3H -Tymidininkorporation wurde in Relation zu der von Responder T-Zellen in Solokultur dargestellt (auf 100% normalisiert). Abgebildet sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens vier voneinander unabhängigen Experimenten. **B)** Die Proliferation der verschiedenen solo- und kokultivierten Zellpopulationen 18 verschiedener Spender wurde durchflusszytometrisch durch Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen (Absolutzellzahl) nach sieben Tagen mit der SCDA-Methode ermittelt. **C)** Lichtmikroskopische Darstellung (50x Vergrößerung) der kultivierten Zellen in den Kavitäten der Zellkulturplatte am siebten Tag der Zellkultur. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen durch Vierfach- (Responder Solo- und Kokulturen) bzw. Dreifachbestimmung ($\gamma\delta$ Solokulturen) erhaltenen experimentellen Mittelwerten. Die Gesamtmittelwerte sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentischen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$).

6.1.2. Expression löslicher Mediatoren bei Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen können ähnlich wie Treg die Proliferation von Responder T-Zellen supprimieren. Da Treg zudem in der Lage sind auch die Zytokinproduktion von Responder T-Zellen zu inhibieren (Oberge *et al.* 2010; Shevach 2009), wurde untersucht, ob $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls einen suppressiven Einfluss auf deren Zytokin- bzw. Mediator-Produktion besitzen.

Unter Verwendung des *multiplex* Immunassays *Cytometric Bead Array*TM wurden die Konzentrationen verschiedener löslicher Mediatoren in den Zellkulturüberständen von solo- und kokultivierten Zellen analysiert (Daten nicht gezeigt). Die Produktion relevanter

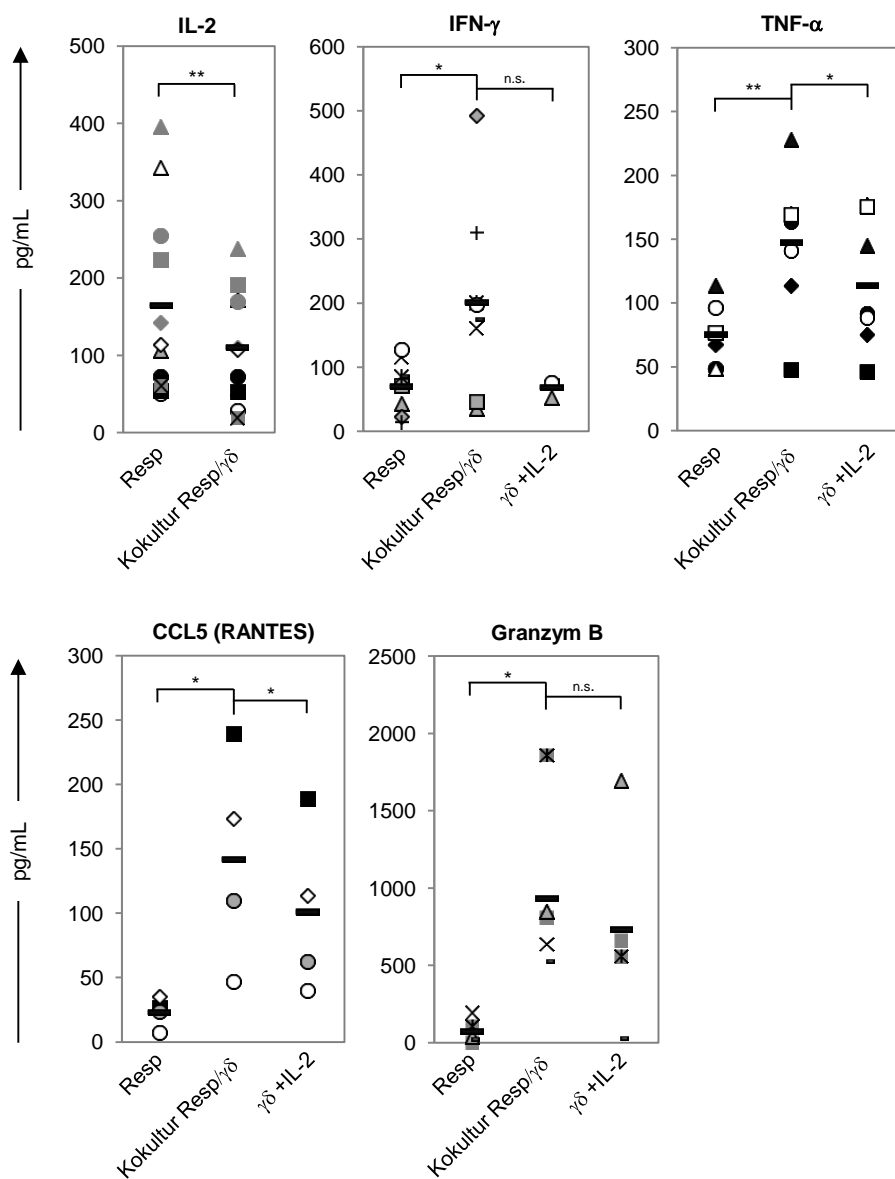


Abb. 7: Freisetzung löslicher Mediatoren in Solo- und Kokulturrexperimenten. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Medium vorinkubiert und anschließend zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Der Gehalt löslicher Mediatoren im Zellkulturmedium wurde an Tag 3 (IFN- γ , TNF- α , Granzym B) bzw. an Tag 4 (IL-2, CCL5) durch ELISA bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Mittelwerte sind durch Balken dargestellt, Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentischen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant).

Mediatoren wurde nachfolgend mit Hilfe eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) verifiziert. Hierbei wurden die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α , das Leukozyten-attraktierende Chemokin CCL5 (RANTES), die Zytotoxizität-vermittelnde Serinprotease Granzym B und der T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 analysiert. Solokultivierte $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen in Abwesenheit von IL-2 nur eine vergleichsweise schwache Produktion der analysierten Mediatoren auf. Bei solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurde diese daher im Weiteren unter IL-2-Supplementierung untersucht. Die Menge von IFN- γ und TNF- α , die im Überstand mit der ELISA-Methode festgestellt wurden, waren bei solokultivierten $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen vergleichbar hoch, bei kokultivierten Zellen waren sie insgesamt deutlich erhöht (Abb. 7). Die Menge an Granzym B und CCL5, die von solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen freigesetzt wurde, lag deutlich über der von solokultivierten Responder T-Zellen. Bei Kokultur beider Zellpopulationen war die Konzentration von IFN- γ , TNF- α , CCL5 und Granzym B im Zellkulturmedium höher als bei den Solokulturen (Abb. 7). Nur der im Überstand gemessene Gehalt an IL-2 war bei Kokultur beider Zellpopulationen geringer als bei solokultivierten Responder T-Zellen (Abb. 7).

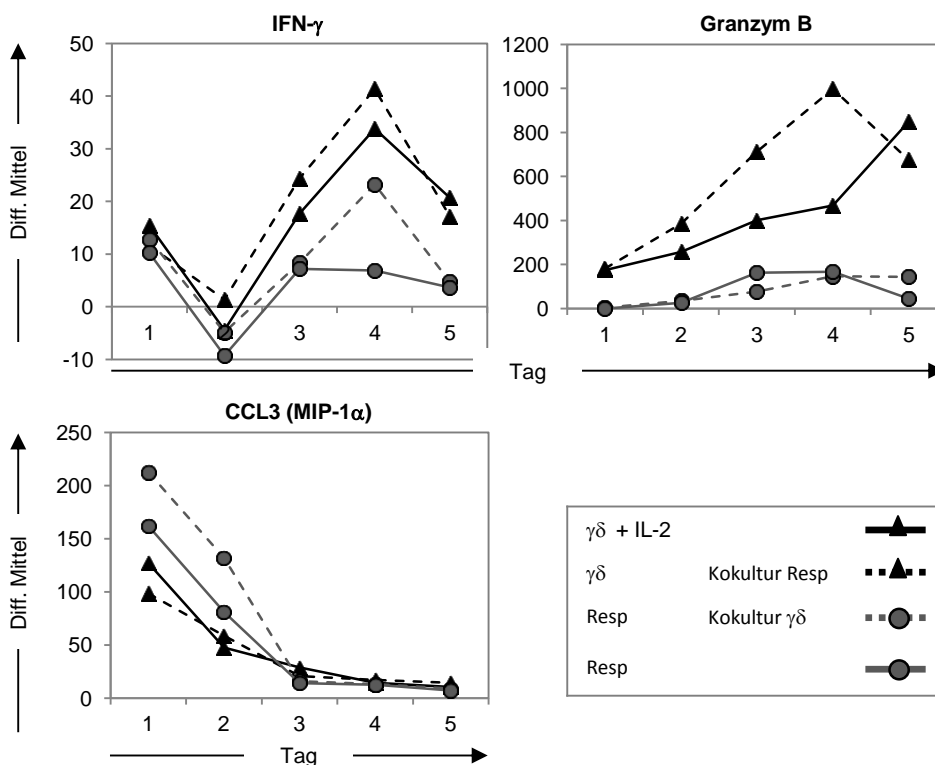


Abb. 8: Einfluss der Kokultivierung von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen auf die Proteinexpression löslicher Mediatoren. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Die Exozytose der Mediatoren wurde vier Stunden vor der Fixierung mit Hilfe von Monensin blockiert. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und der intrazelluläre Gehalt verschiedener löslicher Mediatoren durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Verlauf der Proteinexpression, repräsentiert durch die Mittelwerte der korrigierten mittleren Fluoreszenzintensität von mindestens vier verschiedenen Spender.

Um zu untersuchen, ob beide Zellpopulationen gleichermaßen in Kokultur eine gesteigerte Produktion der untersuchten Mediatoren aufwiesen, wurde deren intrazellulärer Gehalt unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Antikörpern durchflusszytometrisch bestimmt. Anstatt von CCL5 wurde der Gehalt des Chemokins CCL3 (MIP-1 α) bestimmt, das wie CCL5 an den Chemokinrezeptor *C-C chemokine receptor* (CCR) 5 bindet. Zu Beginn der Solokultur wiesen beide Zellpopulationen eine vergleichbare intrazelluläre Proteinexpression von CCL3 und IFN- γ auf, deren Menge dann im zeitlichen Verlauf abnahm. Der Gehalt von IFN- γ stieg aber im Gegensatz zu dem von CCL3 ab dem zweiten Tag wieder an. Granzym B fand sich vor allem in $\gamma\delta$ T-Zellen, wobei dessen intrazellulärer Gehalt im Laufe der Kultivierung anstieg. Bei Kokultur beider Zellpopulationen war die Menge von intrazellulärem IFN- γ in beiden Populationen im Vergleich zur Solokultivierung erhöht. In den kokultivierten Zellen war der intrazelluläre Gehalt von Granzym B vor allem in $\gamma\delta$ T-Zellen und der von CCL3 in Responder T-Zellen erhöht (Abb. 8).

Zusammenfassend war eine $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression der Mediator-Produktion von Responder T-Zellen nicht festzustellen. Bei Kokultur wurde kein negativer, sondern eher ein kostimulatorischer Einfluss auf die Menge der freigesetzten Mediatoren festgestellt. Einzig die Menge an IL-2 im Zellkulturmedium war bei Kokultur beider Populationen verringert.

6.1.3. Die Abhängigkeit der Suppression von Zellkontakt bzw. der Konkurrenz um IL-2

$\gamma\delta$ T-Zellen proliferieren in Kokultur mit Responder T-Zellen (Abb. 6 C, rechte Seite). Sie selbst produzieren allerdings, das von ihnen zur Proliferation benötigte IL-2 nicht in ausreichender Menge. Um zu untersuchen, ob sich die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression der Proliferation auf die Konkurrenz um das von den Responder T-Zellen produzierte IL-2 zurückführen lässt, wurde das Zellkulturmedium mit exogenem IL-2 supplementiert. Hierbei proliferierten die Responder T-Zellen deutlich stärker als ohne exogenes IL-2. Wenn zusätzlich $\gamma\delta$ T-Zellen präsent waren, ließ sich allerdings in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Kokultivierung (ohne Zugabe von exogenem IL-2) eine verringerte Proliferation der Responder T-Zellen beobachten (Abb. 9 A, linke Seite). $\gamma\delta$ T-Zellen proliferierten in Abwesenheit von IL-2 kaum, taten dies aber in Kokultur mit Responder T-Zellen. Nach Zugabe von IL-2 kam es zu einer starken Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen, die wiederum gesteigert war, wenn diese mit Responder T-Zellen kokultiviert wurden (Abb. 9 A, rechte Seite). Zwar war nach Supplementierung des Zellkulturmediums mit IL-2 die Proliferation gesteigert, allerdings hatte die Supplementierung keinen Einfluss auf die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression.

Mit Hilfe von Doppelkammerexperimenten sollte geklärt werden, ob für die Suppression von Responder T-Zellen der direkte Zellkontakt mit $\gamma\delta$ T-Zellen notwendig ist. Hierbei waren beide Zellpopulationen durch eine für Zellen undurchlässige, jedoch für lösliche Mediatoren permeable Membran getrennt. Bei der Mehrzahl der Spender (4/6) war die Proliferation der Responder T-Zellen nicht beeinträchtigt, wenn sie auf diese Weise mit $\gamma\delta$ T-Zellen kokultiviert wurden (Abb. 9 B). Waren die beiden Zellpopulationen durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, ließ sich demzufolge also keine Suppression der Responder T-Zellen beobachten.

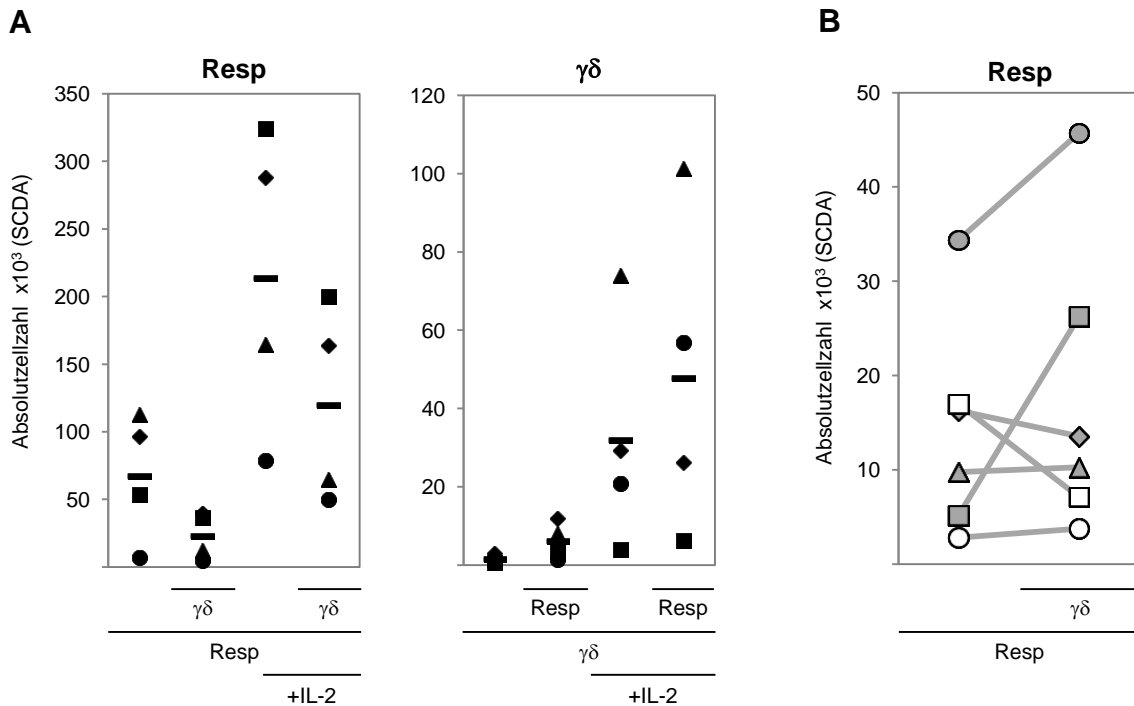


Abb. 9: Vermittlung der Suppression. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Die Proliferation der einzelnen Zellpopulationen wurde nach sieben Tagen durchflusszytometrisch durch Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen (Absolutzellzahl) mit der SCDA-Methode ermittelt. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Die einzelnen Datenpunkte entsprechen durch Vierfach- (Responder Solo- und Kokulturen) bzw. Dreifachbestimmung ($\gamma\delta$ Solo Kulturen) erhaltenen experimentellen Mittelwerten. **A**) Das Zellkulturmedium der Kokultur wurde teilweise mit IL-2 (50 U/mL) supplementiert. **B**) Die Zellpopulationen wurden in einem Doppelkammerexperiment durch eine für lösliche Mediatoren permeable Membran (0,2 μm Porengröße) voneinander getrennt. Bestimmt wurde die Absolutzellzahl der in der unteren Kammer kultivierten Responder T-Zellen.

6.1.4. Die Expression suppressiver und kostimulatorischer Oberflächenmoleküle

Da die vorangegangenen Doppelkammerexperimente den Schluss nahe legten, dass für die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression ein direkter Zellkontakt notwendig ist, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle, die bekanntermaßen an der Immunregulation beteiligt sein können, auf solo- und kokultivierten Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Für das Verständnis der suppressiven Interaktion ist (besonders) die Oberflächenexpression der

folgenden Oberflächenmoleküle auf kokultivierten Zellen von Bedeutung. Die B7-Moleküle CD80 und CD86 sind sowohl Liganden des positiv-kostimulatorischen Rezeptors CD28 als auch des negativ-kostimulatorischen Rezeptors CTLA-4 (Collins *et al.* 2002). CD80 und CD86 wurden vor allem auf der Oberfläche von $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert. Auf mit Responder T-Zellen kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen war die CD80-Expression geringer als auf solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen. Auf kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen wies diese einen kurvenförmigen Verlauf mit der höchsten Expression an Tag vier auf, während sie bei solokultivierten deutlich höher war und nicht wieder zurückging. Die CD86-Oberflächenexpression stieg vom vierten bis zum siebten Tag sowohl bei solo- als auch kokultivierten Zellen an (Abb. 10 A, B). CD28 wurde zwar auch auf der Oberfläche von $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen, war jedoch deutlich stärker auf der von Responder T-Zellen vorhanden. In Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen war die Oberflächenexpression von CD28 auf Responder T-Zellen signifikant reduziert (Abb. 10, Abb. 14). CTLA-4 wies einen kurvenförmigen Verlauf der Oberflächenexpression mit einem Maximum zwischen dem dritten und vierten Tag der Solo- bzw. Kokultur sowohl auf $\gamma\delta$ als auch von Responder T-Zellen auf. Der Vergleich von kokultivierten und solokultivierten Zellpopulationen zeigte, dass CTLA-4 in Kokultur auf beiden Populationen stärker exprimiert war (Abb. 10 A, B, Abb. 14). Das Oberflächenmolekül PD-1 vermittelt ebenfalls ein negatives immunregulatorisches Signal, wenn der Interaktionspartner PD-L1 an dieses bindet (Francisco *et al.* 2010). In Kokultur wurde PD-1 zwar auch auf $\gamma\delta$ T-Zellen, aber vor allem auf Responder T-Zellen exprimiert, während PD-L1 auf beiden Zellpopulationen gleichermaßen vorhanden war (Abb. 10 B). Bei Kokultur beider Zellpopulationen wurden PD-1 und PD-L1 im Vergleich zur Solokultur auf $\gamma\delta$ T-Zellen stärker und auf Responder T-Zellen schwächer exprimiert. Besonders deutlich ist der Anstieg der PD-L1-Expression auf kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 10 A, B, Abb. 14). Der zeitliche Verlauf der Oberflächenexpression von sowohl PD-L1 als auch PD-1 war kurvenförmig mit dem höchsten Punkt zwischen Tag drei und vier. Die für APZ typische Expression der Moleküle HLA-DR und CD83 ließ sich bei kokultivierten Zellen auf beiden Populationen beobachten, wobei die Expression von HLA-DR auf $\gamma\delta$ T-Zellen stärker ausgeprägt war (Abb. 11 A). Die Expression von CD83 wies auf solo- und kokultivierten Responder T-Zellen sowie auf solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen einen kurvenförmigen Verlauf mit der höchsten Expression zwischen Tag drei und vier auf. Auf solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen stieg die Expression bis zum Tag sieben an und war stärker als in der Kokultur. HLA-DR zeigte auf $\gamma\delta$ T-Zellen einen ähnlichen Oberflächenexpressionsverlauf wie CD86, mit einem starken Anstieg der Expression zwischen Tag vier und sieben (Abb. 11 A, B).

- Ergebnisse -

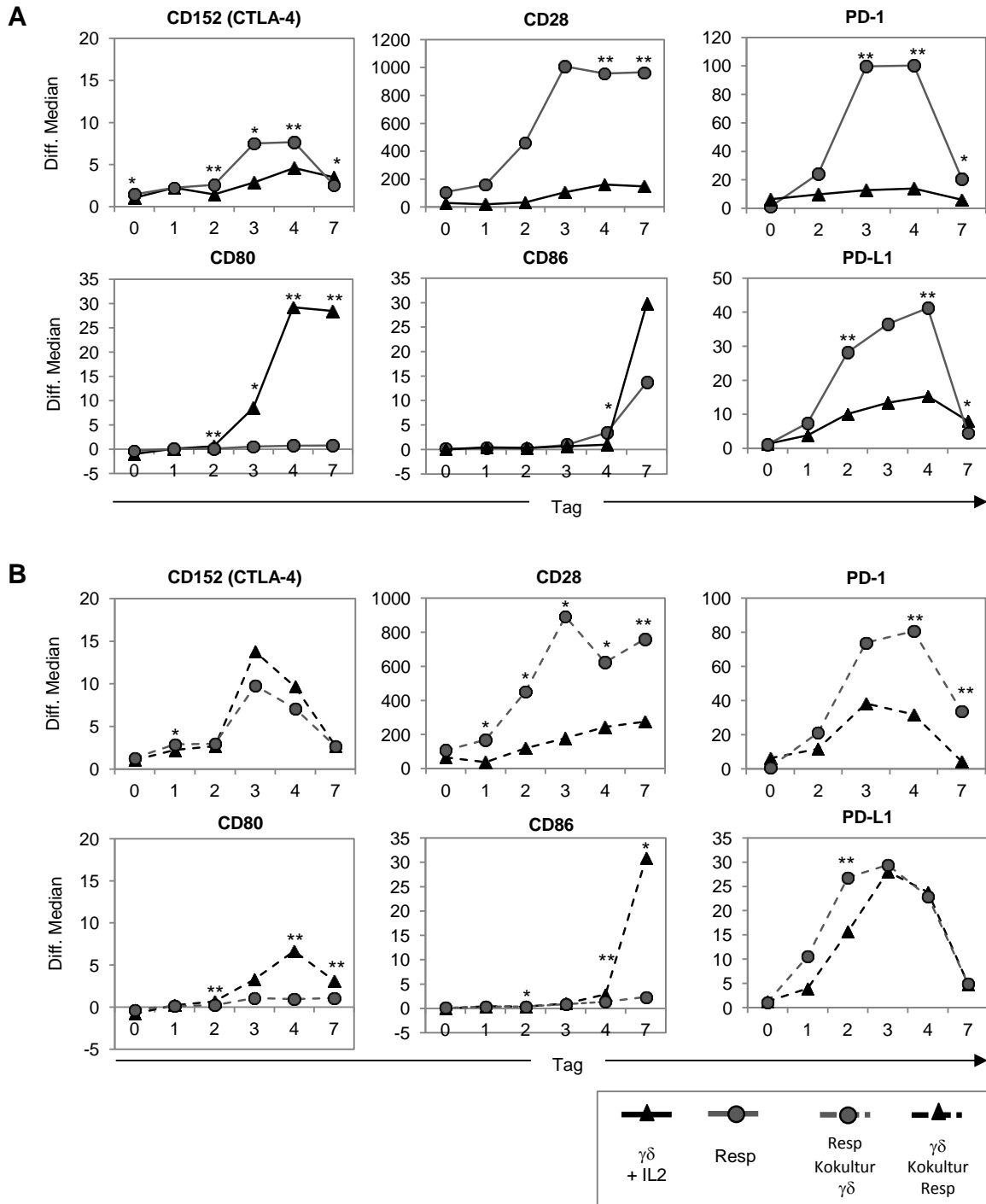


Abb. 10: Oberflächenexpression suppressiver und kostimulatorischer Moleküle der B7- bzw. CD28-Familie auf Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen in Solo- und Kokultur. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit A/E-Partikeln. Verschiedene Oberflächenmoleküle wurden durch spezifische Fluorochrom-gekoppelte mAk markiert. Dargestellt ist der Expressionsverlauf verschiedener Oberflächenmoleküle, repräsentiert durch die Mittelwerte der korrigierten medianen Fluoreszenzintensität verschiedener Spender (mindestens fünf der Spender entsprechen den in Abb. 14 dargestellten). Sterne symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Oberflächenexpression auf $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$).

- Ergebnisse -

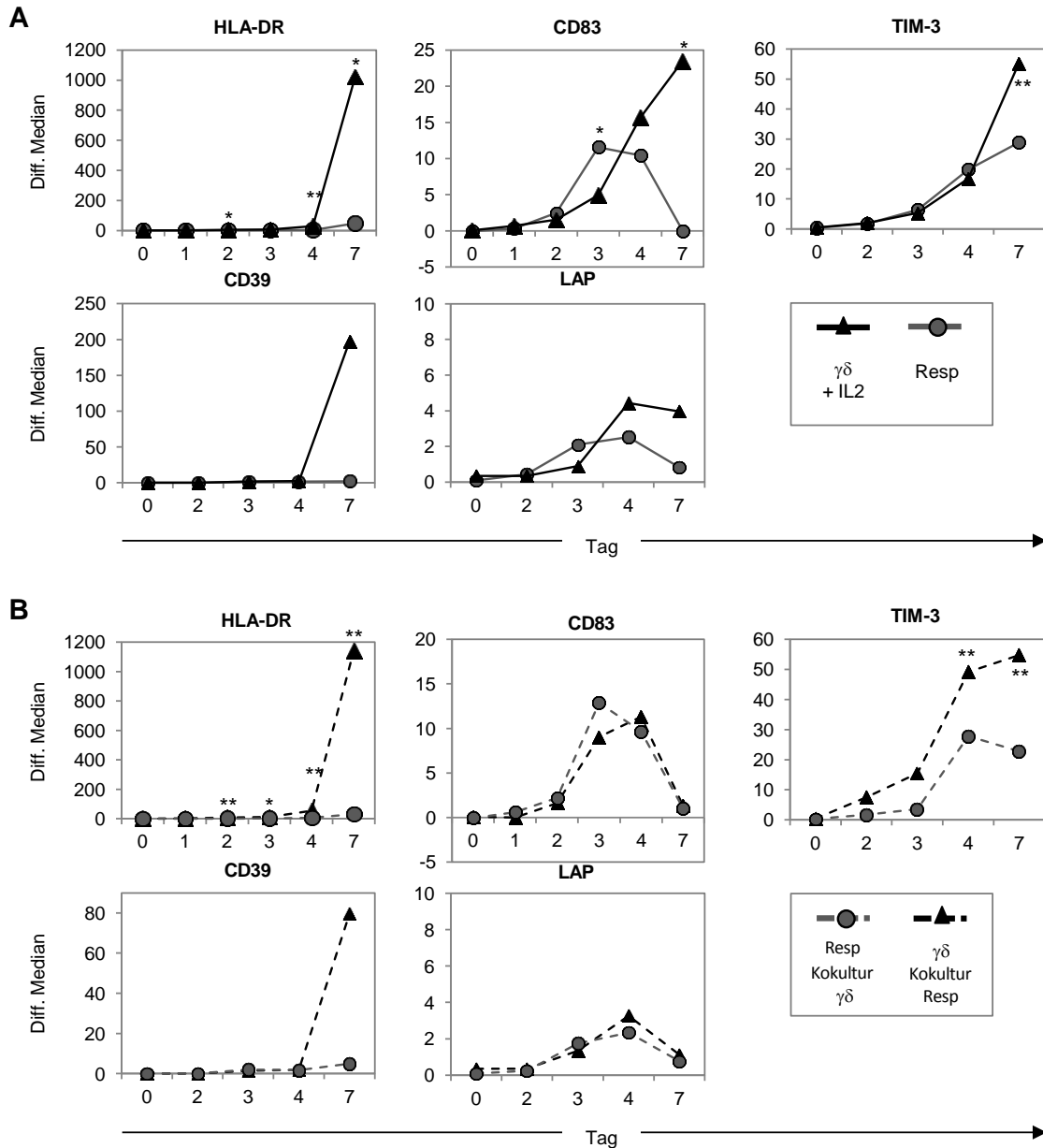


Abb. 11: Expression weiterer mit immunregulatorischen Funktionen assoziierter Oberflächenmoleküle auf Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen in Solo- und Kokultur. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Die jeweiligen Oberflächenmoleküle wurden durch spezifische Fluorochrom-gekoppelte mAk markiert. Dargestellt ist der Verlauf der Oberflächenexpression verschiedener Moleküle, repräsentiert durch die Mittelwerte der korrigierten medianen Fluoreszenzintensität verschiedener Spender. Sterne symbolisieren statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Oberflächenexpression auf $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen gemäß des studentischen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$).

Des Weiteren wurde auch die Oberflächenexpression der immunregulatorisch bedeutenden Moleküle *T cell immunoglobulin mucin-3* (TIM-3), CD39 und LAP auf $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. TIM-3, welches vor allem mit der negativen Regulation der Th1-Antwort in Verbindung gebracht wird (Zhu *et al.* 2005), war sowohl auf der Oberfläche von solo- als auch kokultivierten $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen vorhanden. Die Expression war ab dem zweiten Tag der Kultivierung nachweisbar und stieg bis zum siebten Tag an. In Kokultur war TIM-3

stärker auf $\gamma\delta$ - als auf Responder T-Zellen exprimiert (Abb. 11). Die Ektonukleotidase CD39 spaltet extrazelluläres als Entzündungsmediator relevantes ATP und wird mit der suppressiven Kapazität von Treg in Verbindung gebracht (Borsellino *et al.* 2007; Deaglio *et al.* 2007; Kobie *et al.* 2006). Eine starke Expression von CD39 wurde sowohl auf solo- als auch in kokultivierten Zellen auf $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt. Die Expression stieg auf solo- und kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen zwischen dem vierten und siebten Tag deutlich an. Responder T-Zellen wiesen nur in Kokultur eine, wenn auch wesentlich schwächere Expression auf (Abb. 11). Mit Hilfe von LAP kann TGF- β membranassoziiert präsentiert werden und so regulatorisch wirken (Hyytiainen *et al.* 2004). LAP konnte auf $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen nur sehr schwach exprimiert nachgewiesen werden. Die Expression wies hierbei einen kurvenförmigen Verlauf mit einem Höhepunkt an Tag vier auf (Abb. 11).

Die deutlichsten Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen bezüglich der Oberflächenexpression der analysierten Moleküle waren die starke Expression von CD28 und PD-1 auf den Responder- und die von CD39, CD86 und HLA-DR auf den $\gamma\delta$ T-Zellen.

6.1.5. Funktionelle Analyse suppressiver Oberflächenmoleküle

Weiterhin sollte geklärt werden, ob es zur Interaktion der verschiedenen untersuchten, potentiell immunregulatorischen Oberflächenmoleküle kommt bzw. ob diese auch funktionell relevant ist. Hierfür wurde bei kokultivierten $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen selektiv die Interaktion zwischen den verschiedenen Partnermolekülen unterbunden und untersucht, ob dies Auswirkungen auf das suppressive Potential der $\gamma\delta$ T-Zellen hatte. Um die Interaktion zwischen CD80 bzw. CD86 und CTLA-4 zu unterbinden wurden blockierende mAk (anti-CTLA-4, anti-CD80, anti-CD86) sowie ein CTLA-4/Fc-Fusionsprotein verwendet. Sowohl die Zugabe von anti-CTLA-4 mAk als auch von anti-CD86 mAk verstärkte die Proliferation der Responder T-Zellen, wobei der anti-CTLA-4 mAk außerdem die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen steigerte. Der anti-CD80 mAk ließ bei beiden Zellpopulationen keinen Einfluss auf die Proliferation erkennen. In Anwesenheit des CTLA-4/Fc-Fusionsproteins war die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen gesteigert, während die der Responder T-Zellen verringert war (Abb. 12 A).

Um die Interaktion zwischen PD-L1 und PD-1 zu unterbinden wurden ebenfalls blockierende mAk (anti-PD-1, anti-PD-L1) und ein Fusionsprotein verwendet (PD-1/Fc). Der gegen PD-L1 gerichtete mAk hatte einen deutlich positiven Effekt auf die Responder T-Zell-Proliferation, während er keinen auf die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen aufwies. Der anti-PD-1 mAk besaß keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellpopulationen und das PD-1/Fc-Fusionsprotein beeinflusste die Proliferation beider Zellpopulationen negativ (Abb. 12 A). Ob die verwendete blockierende Entität spezifisch die Proliferation einer Zellpopulation bzw. die Suppression der

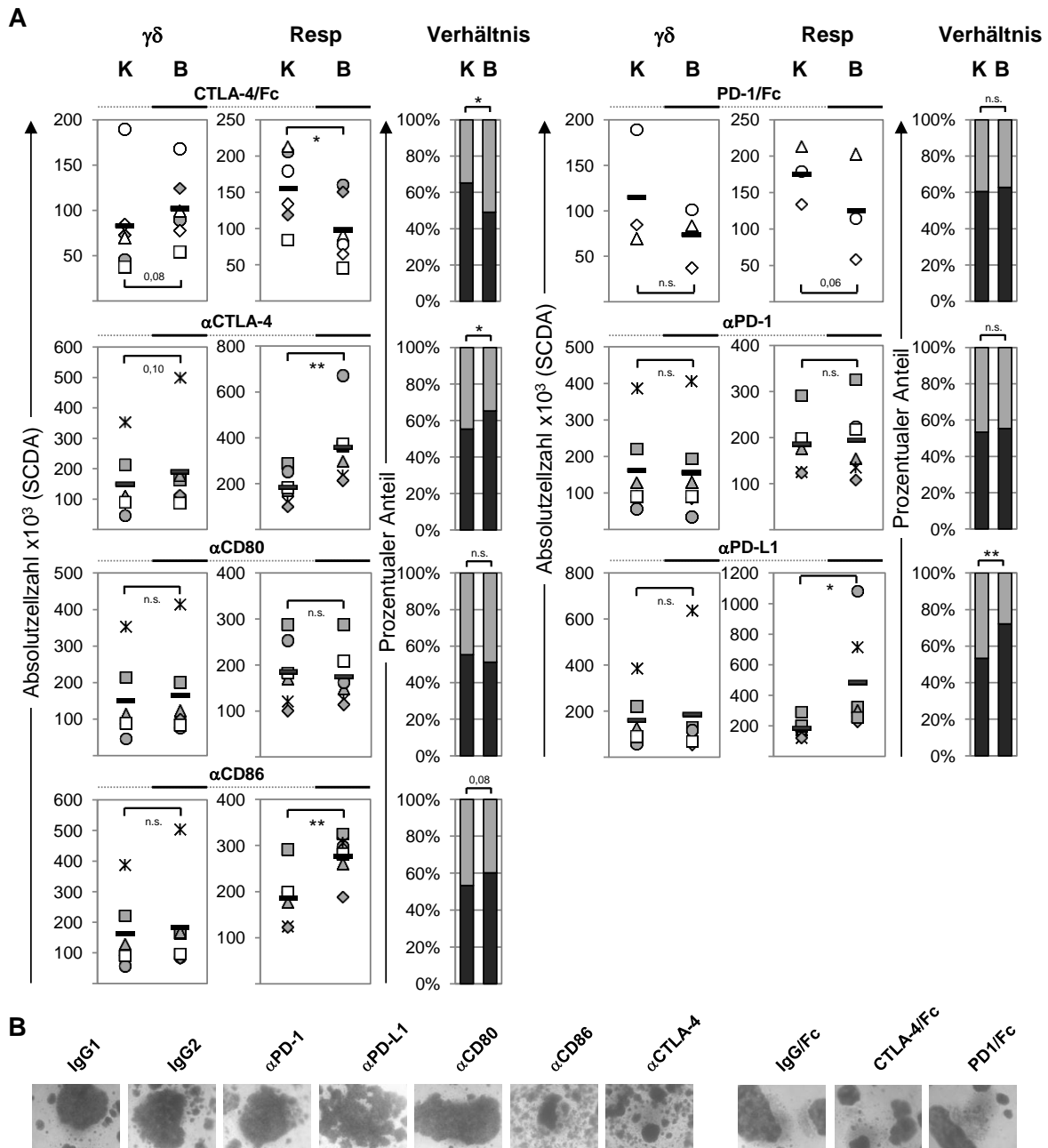


Abb. 12: Einfluss verschiedener blockierender Moleküle auf die Proliferation von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen in Kokultur. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden mit Responder T-Zellen kokultiviert. Die Zellen wurden polyklonal unter Verwendung von plattengebundenem anti-CD3 und löslichem anti-CD28 mAk stimuliert. Blockierende mAk und blockierende Fusionsproteine (= B) oder Kontrollantikörper bzw. -fusionsproteine (= K) wurden mit einer Konzentration von 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zeitgleich mit anti-CD3 und anti-CD28 mAk an die Zellkulturplatten gebunden. **A)** Die Proliferation der einzelnen Zellpopulationen wurde mit der SCDA-Methode anhand der Absolutzellzahl an Tag 6 ermittelt. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Die einzelnen Datenpunkte stellen jeweils durch Vierfachbestimmung erhaltene experimentelle Mittelwerte dar. Die Gesamtmittelwerte sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant). K = Kontrolle, B = Blockierende Entität. Das prozentuale Verhältnis der Zellpopulationen zueinander ist als Balkendiagramm dargestellt. Schwarze Balken entsprechen den Mittelwerten des Responder-, graue Balken denen des $\gamma\delta$ T-Zell-Anteils. **B)** Lichtmikroskopische Darstellung (50x Vergrößerung) der kultivierten Zellen in den Kavitäten der Zellkulturplatte, am sechsten Tag der Zellkultur.

Responder T-Zellen beeinflusste, ließ sich an einer Verschiebung des Verhältnisses der Populationen zueinander erkennen. Zu einer signifikanten Verschiebung und einem erhöhten relativen $\gamma\delta$ T-Zell-Anteil kam es nur bei Verwendung des CTLA-4/Fc-Fusionsproteins. Die gegen CTLA-4, CD86 und PD-L1 gerichteten blockierenden mAk führten zu einer signifikanten Verschiebung des Verhältnisses zwischen den Zellpopulationen, wobei bei diesen der Anteil der Responder T-Zellen erhöht war (Abb. 12, A, Säulendiagramme). Dies war mit einer geringeren Suppression durch die $\gamma\delta$ T-Zellen gleichzusetzen. Bei lichtmikroskopischer Untersuchung konnte man im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen bzw. anderen blockierenden Entitäten ebenfalls einen positiven Effekt der anti-CTLA-4-, anti-CD86- und anti-PD-L1 mAk in Form einer erkennbar gesteigerten Anzahl von Proliferationsclustern beobachten (Abb. 12 A).

Die in Abbildung 12 dargestellten Ergebnisse der Studien mit blockierenden Entitäten sind schematisch in Tabelle 1 zusammengefasst. Hierbei stellen Pfeile die Modulation der Proliferation bzw. Suppression relativ zu der entsprechenden Kontrolle dar (\downarrow = herunter; \uparrow = herauf; \sim = keine signifikante Regulation). Das Verhältnis zwischen $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen bzw. dessen Verschiebung ist durch gerichtete Pfeile dargestellt (Verschiebung zu: \nearrow = Responder, \nwarrow = $\gamma\delta$, \leftrightarrow = keine deutliche Veränderung).

Tab. 1: Einfluss verschiedener blockierender Moleküle auf die Proliferation von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen in Kokultur:

Blockierendes Molekül	Proliferation		
	$\gamma\delta$	relativ	CD4
α CTLA-4	\uparrow	\nearrow	\uparrow
CTLA-4/Fc	\uparrow	\nwarrow	\downarrow
α CD80	\sim	\leftrightarrow	\sim
α CD86	\sim	\nearrow	\uparrow
α PD-L1	\sim	\nearrow	\uparrow
α PD-1	\sim	\leftrightarrow	\sim
PD-1/Fc	\downarrow	\leftrightarrow	\downarrow

6.2. TLR(2)-Liganden-induzierte Modulationen

6.2.1. Der Einfluss von TLR2-Liganden auf die Proliferation und Suppressivität

Die Treg-vermittelte Suppression kann durch TLR-Liganden aufgehoben werden. So konnten Oberg *et al.* eine teilweise Aufhebung der Suppression der Responder ($CD4^+CD25^-$) T-Zell-Proliferation beobachten, wenn die Treg mit einer Mischung verschiedener TLR2-Liganden vorinkubiert wurden (Oberg *et al.* 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss verschiedener TLR-Liganden auf die Proliferation und das suppressive Potential von $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. Hierbei zeigte sich, dass TLR2-Liganden im Gegensatz zu anderen TLR-Liganden die suppressive Funktion und Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflussten (Abb. 13 A, Daten nicht gezeigt). Die TLR2-Oberflächenexpression konnte auf frisch isolierten $\gamma\delta$

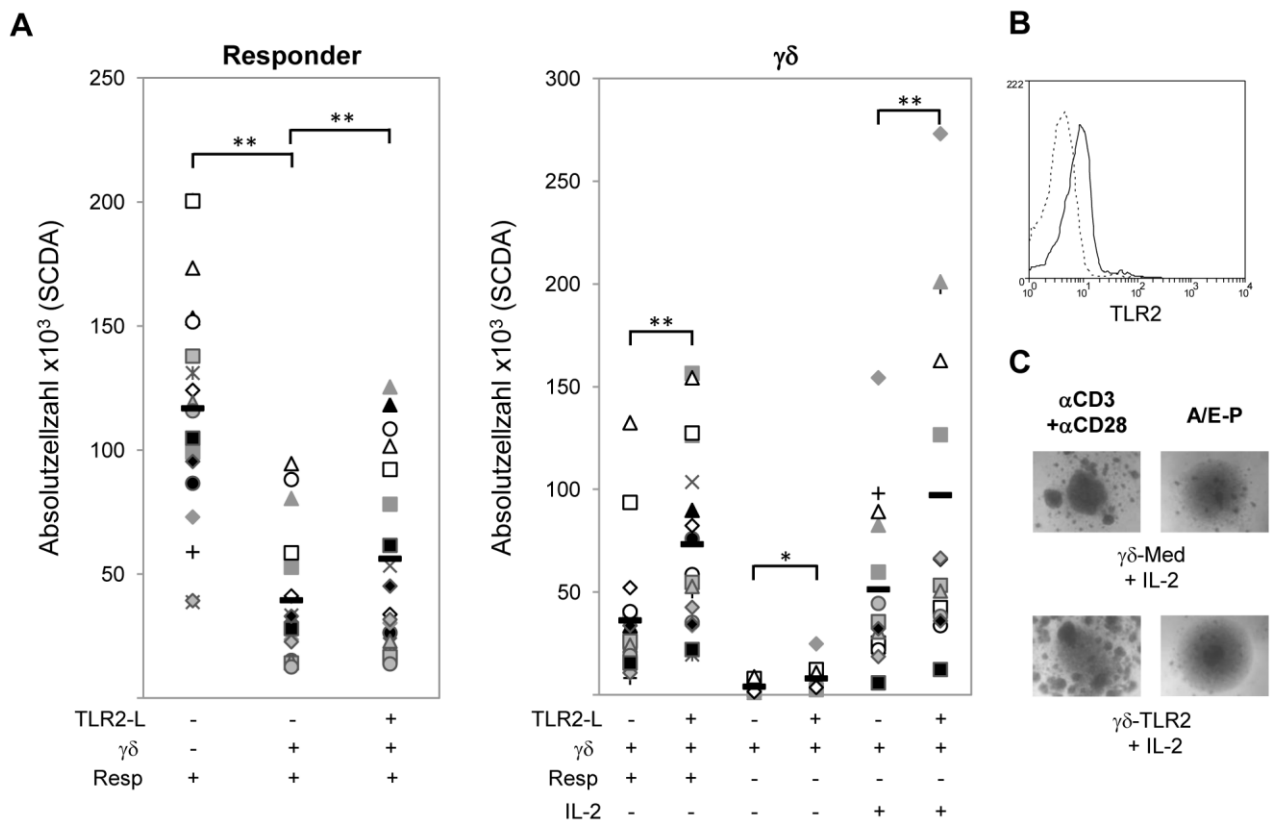


Abb. 13: Einfluss von TLR2-Liganden auf die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. auf deren suppressives Potential. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches vorinkubiert (22 h) und anschließend zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Die Zellen wurden unter Verwendung von A/E-Partikeln (A, B) oder von plattengebundenem anti-CD3- und löslichem anti-CD28 mAk (C) stimuliert. **A)** Die Proliferation wurde mit der SCDA-Methode anhand der Anzahl vitaler Zellen (Absolutzellzahl) an Tag 7 ermittelt. **B)** Die TLR2-Oberflächenexpression wurde auf frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen durch einen Fluorochrom-gekoppelten anti-TLR2 mAk markiert (durchgängige Linie) und in Relation zu einem Kontrollantikörper gleichen Isotyps (gepunktete Linie) in einem Histogramm dargestellt. **C)** Lichtmikroskopische Darstellung (50x Vergrößerung) der kultivierten Zellen in den Kavitäten der Zellkulturplatte. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Die einzelnen Datenpunkte stellen jeweils durch Vierfach- (Responder Solo- und Kokulturen) bzw. Dreifachbestimmung ($\gamma\delta$ Solokulturen) erhaltene experimentelle Mittelwerte dar. Die Gesamtmittelwerte (18 unabhängige Experimente) sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$).

T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13 B). Diese Beobachtung deckt sich mit Ergebnissen von Pietschmann *et al.*, denen zufolge $\gamma\delta$ T-Zellen TLR1, -2 und -6 exprimieren können (Pietschmann *et al.* 2009). Da TLR2 mit TLR1 oder TLR6 als Heterodimer vorliegen kann, wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen mit einer Mischung verschiedener TLR2-Liganden, die von unterschiedlichen TLR2-Heterodimeren erkannt werden, vorinkubiert [Pam₂CSK4 (TLR2/6) Pam₃CSK4 (TLR1/2, vermutlich auch TLR2/10) und FSL-1 (TLR2/6)] vorinkubiert. Wenn die $\gamma\delta$ T-Zellen mit dem TLR2-Liganden-Gemisch vorinkubiert worden waren, wiesen kokultivierte Responder T-Zellen nach sieben Tagen der Kokultivierung im Vergleich zur Kokultur mit Medium-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen eine signifikant höhere Zellzahl auf (Abb. 13 A). Die Vorinkubation übte auch auf die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen selbst einen positiven Effekt aus. TLR2-Liganden-vorinkubierte $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen nach sieben Tagen der Solo- bzw. Kokultur eine höhere Zellzahl im Vergleich zu Medium-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen auf. Es war bei TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen sogar eine leicht erhöhte Zellzahl festzustellen, wenn diese alleine, aber ohne Supplementierung des Mediums mit IL-2, kultiviert wurden (Abb. 13 A).

Lichtmikroskopisch ließ sich dieser proliferationssteigernde Effekt bei solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls erkennen. Sowohl die unter Verwendung von plattengebundenem anti-CD3- und löslichem anti-CD28 mAk stimulierten als auch die mit A/E-Partikeln stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen deutlich mehr bzw. größere Proliferationscluster auf, wenn diese zuvor mit TLR2-Liganden vorinkubiert worden waren (Abb. 13 C). Die Vorinkubation mit TLR2-Liganden beeinflusste die Suppressivität der $\gamma\delta$ T-Zellen negativ und verstärkte gleichzeitig deren Proliferation.

6.2.2. TLR2 abhängige Modulation von Oberflächenmolekülen

Da eine TLR2-Liganden-induzierte Abschwächung der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression beobachtet wurde, sollte untersucht werden, ob diese Modulation mit einer veränderten Expression der zuvor untersuchten immunregulatorischen Oberflächenmoleküle (Abb. 10, Abb. 12) korrelierte.

Direkt nach Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit TLR2-Liganden vor Beginn der Kokultorexperimente war das aktivierungsassoziierte Molekül CD69 signifikant vermehrt auf deren Oberfläche zu finden (Abb. 14). Die Expression der anderen Oberflächenmoleküle wurde detailliert zum Zeitpunkt deren höchster Expression in Kokultur betrachtet (Abb. 10). Durch TLR2-Liganden-Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde die CTLA-4-Expression auf solo- oder kokultivierten $\gamma\delta$ - oder Responder T-Zellen nicht signifikant beeinflusst. Allerdings konnte trotzdem in den meisten Fällen bei kokultivierten vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen ein negativer Effekt auf die CTLA-4-Expression festgestellt werden (7/9 Spender). Bei mit diesen kokulti-

- Ergebnisse -

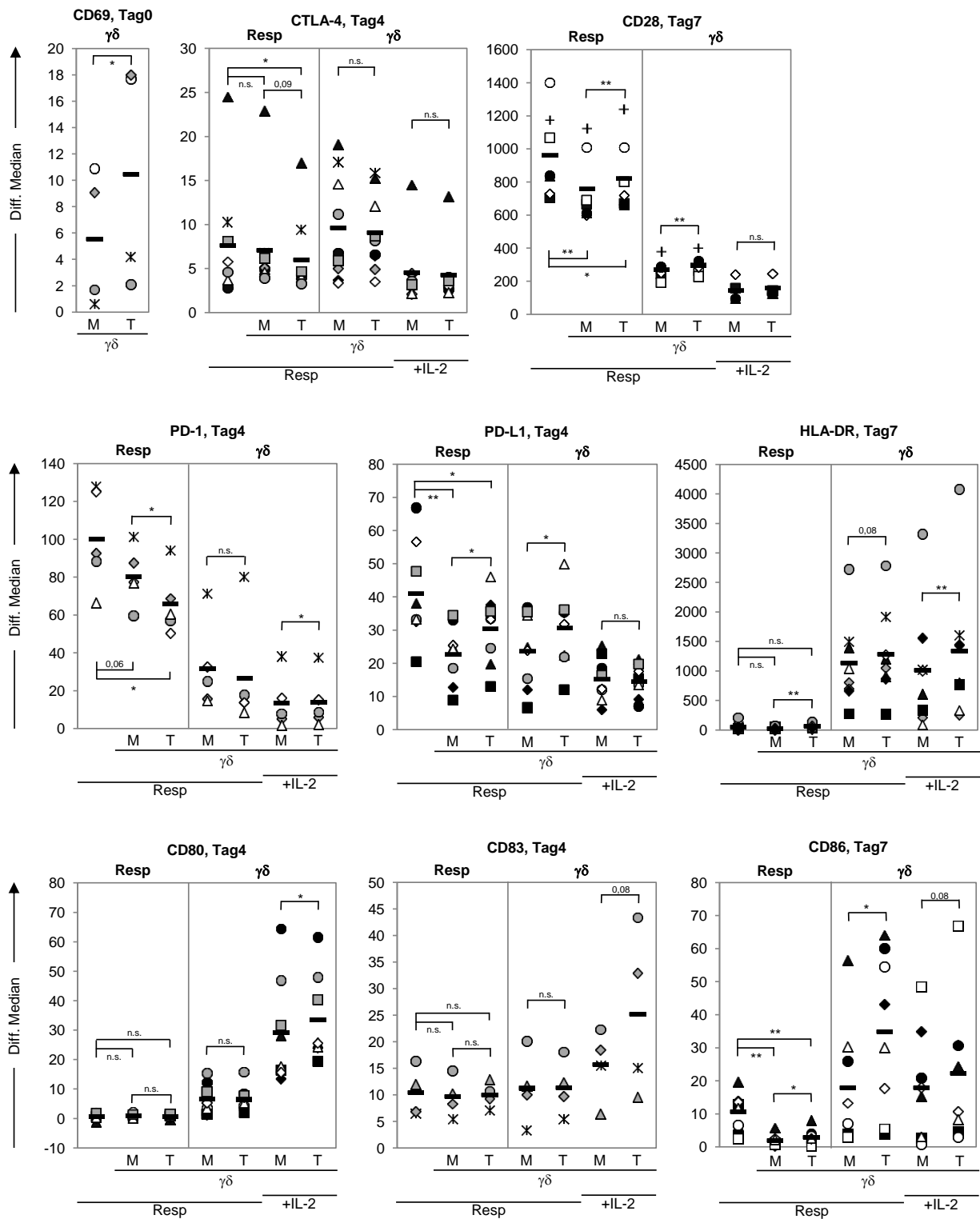


Abb. 14: TLR2-Liganden-abhängige Modulation von Oberflächenmolekülen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium (= M) oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches (= T) vorinkubiert und anschließend zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Das Vorhandensein der verschiedenen Moleküle wurde zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Dargestellt ist der Zeitpunkt mit der jeweils stärksten Oberflächenexpression. Oberhalb der Diagramme ist angegeben auf welche Zellpopulation sich die dargestellten Expressionsdaten beziehen. Dargestellt ist die korrigierte mediane Fluoreszenzintensität (Isotypkontrollen wurden subtrahiert). Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Mittelwerte sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant).

vierten Responder T-Zellen konnte ein solcher negativer Effekt (8/9 Spender) ebenfalls beobachtet werden (Abb. 14). Die TLR2-Liganden-Vorinkubation führte weiterhin sowohl auf den $\gamma\delta$ - als auch auf den mit diesen kokultivierten Responder T-Zellen zu einer signifikanten Hochregulation der CD28-Oberflächenexpression. Für solokultivierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurde dies nicht festgestellt.

Auf solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurde die Expression von CD80 und CD83 durch TLR2-Liganden-Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen verstärkt. In Kokultur mit Responder T-Zellen war auf der Oberfläche der $\gamma\delta$ T-Zellen wesentlich weniger CD80 und CD83 vorhanden. Diese Oberflächenexpression wurde durch TLR2-Liganden-Vorinkubation nicht verstärkt. Im Gegensatz zu CD80/-83 war die CD86-Oberflächenexpression auf TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen in Kokultur signifikant und in Solokultur ebenfalls deutlich gesteigert. Auf mit diesen kokultivierten Responder T-Zellen war die CD86-Oberflächenexpression ebenfalls positiv beeinflusst. Sie blieb allerdings insgesamt deutlich geringer als die Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 14). Bei vier von fünf Spendern war weniger PD-1 auf der Oberfläche von kokultivierten TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen vorhanden. Ebenso war PD-1 auch auf der Oberfläche von mit diesen kokultivierten Responder T-Zellen signifikant reduziert. Auf die ohnehin geringe PD1-Oberflächenexpression solokultivierter $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte die Vorinkubation keinen Einfluss. Im Unterschied zu PD-1 hatte die Vorinkubation mit TLR2-Liganden einen verstärkenden Einfluss auf die PD-L1-Oberflächenexpression. Sowohl auf TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen als auch auf mit diesen kokultivierten Responder T-Zellen war die Expression signifikant erhöht. Bei solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen ließ sich keine Veränderung feststellen (Abb. 14). Das MHC Klasse II Molekül HLA-DR war auf TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen in Solokultur signifikant und in Kokultur deutlich stärker exprimiert. Die schwache HLA-DR-Oberflächenexpression auf Responder T-Zellen war bei Kokultivierung mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant verstärkt.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Expression verschiedener immunregulatorischer Oberflächenmoleküle bei Kokultivierung mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen nicht nur auf diesen selbst, sondern ebenfalls auf den kokultivierten Responder T-Zellen deutlich beeinflusst wurde. Es zeigte sich auf beiden Zellpopulationen eine verstärkte Expression von CD28, HLA-DR, PD-L1 und CD86 sowie eine verringerte von PD-1- und CTLA-4. Die Ergebnisse der TLR2-Liganden-abhängigen Modulation von Oberflächenmolekülen (Abb. 14) sind schematisch in Tabelle 2 zusammengefasst. Die Oberflächenexpression wurde anhand der erhaltenen Mittelwerte der medianen Fluoreszenzintensitäten quantifiziert und tabellarisch dargestellt (- = <5; + = 5-30; ++ = 30-200; +++ = >200). Pfeile zeigen die TLR2-Liganden-abhängige Modulation der Oberflächenexpression an (\downarrow = herunter; \uparrow = herauf; ~ = keine signifikante Regulation). Der Expressionsverlauf ist durch gerichtete Pfeile dargestellt. Die Ziffern symbolisieren die entsprechenden Zeitpunkte.

Tab. 2: Oberflächenexpression und TLR2-Liganden abhängige Modulation verschiedener Oberflächenmoleküle im Suppressions-Assay:

Oberflächenmolekül	Responder			Expres-sionsver-hältnis	γδ				Expres-sions-verlauf
	Resp	Resp/γδ-Med	Resp/γδ-TLR2-L		γδ-Med/Resp	γδ-TLR2-L/Resp	γδ-Med+IL-2	γδ-TLR2-L+IL-2	
CD28	++	+	↑	CD4> γδ	~+	~	+/-	~	↗ ⁷
CD69	++	++	~	CD4> γδ	++	~↑ _{Tag0}	++	~↑ _{Tag0}	↗ ^{1,2} ↘
CD80	+/-	+/-	~	γδ>CD4	+	~	++	~	↗ ⁴ ↘
CD83	+	+/-	↑	γδ~CD4	+	~	+	↑	↗ ^{3,4} ↘
CD86	-	-	~	γδ>CD4	++	↑	+	↑	↗ ⁷
CTLA-4	+	+	~	γδ>CD4	+	↓	+	~	↗ ^{3,4} ↘
HLA-DR	+/-	+/-	↑	γδ>CD4	++	↑	++	↑	↗ ⁷
PD-1	++	++	↓	CD4> γδ	++	↓	+	~	↗ ^{3,4} ↘
PD-L1	++	+	↑	CD4~ γδ	+	↑	+	↑	↗ ^{3,4} ↘

6.2.3. Der Einfluss von TLR2-Liganden auf die Produktion und Freisetzung verschiedener löslicher Mediatoren

Wie von Pietschmann *et al.* bereits gezeigt, kann die Freisetzung der löslichen Mediatoren IFN-γ, CXCL8 (IL-8) und CCL5 in γδ T-Zellen durch TLR2-Liganden verstärkt werden (Pietschmann *et al.* 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Vorinkubation von γδ T-Zellen mit TLR2-Liganden die Produktion und Freisetzung dieser und weiterer löslicher Mediatoren beeinflusst. Hierfür wurden γδ T-Zellen in Solokultur und in Kokultur mit Responder T-Zellen betrachtet. Die intrazelluläre durchflusszytometrische Analyse ließ erkennen, dass durch die TLR2-Liganden-Vorinkubation von γδ T-Zellen sowohl deren eigene Mediator-Produktion als auch die kokultivierter Responder T-Zellen verstärkt wurde. Die Produktion in beiden Zellpopulationen war in Relation zur Kokultur mit Mediumvorinkubierten Zellen gesteigert (Daten nicht gezeigt). Die Modulation der Freisetzung von löslichen Mediatoren in das Zellkulturmedium in Folge der TLR2-Liganden-Vorinkubation wurde in Relation zu der Mediumvorinkubierter γδ T-Zellen mit Hilfe von ELISA bestimmt. Bei Kokultivierung mit Responder Zellen war die Konzentration von IFN-γ, TNF-α, IL-2 und Granzym B signifikant und die von CCL5 bei sämtlichen Spendern erhöht. Die Solokultur TLR2-Liganden-vorinkubierter γδ T-Zellen zeigte einen signifikanten Anstieg der Konzentration von IFN-γ und TNF-α, während die von CCL5 und Granzym B weitgehend konstant blieb (Abb. 15). Insgesamt ließ sich ein deutlich verstärkender Einfluss der TLR2-Liganden-Vorinkubation auf die Freisetzung unterschiedlicher Mediatoren feststellen. Dieser Anstieg war bei kokultivierten Zellpopulationen wesentlich stärker ausgeprägt als bei solokultivierten.

- Ergebnisse -

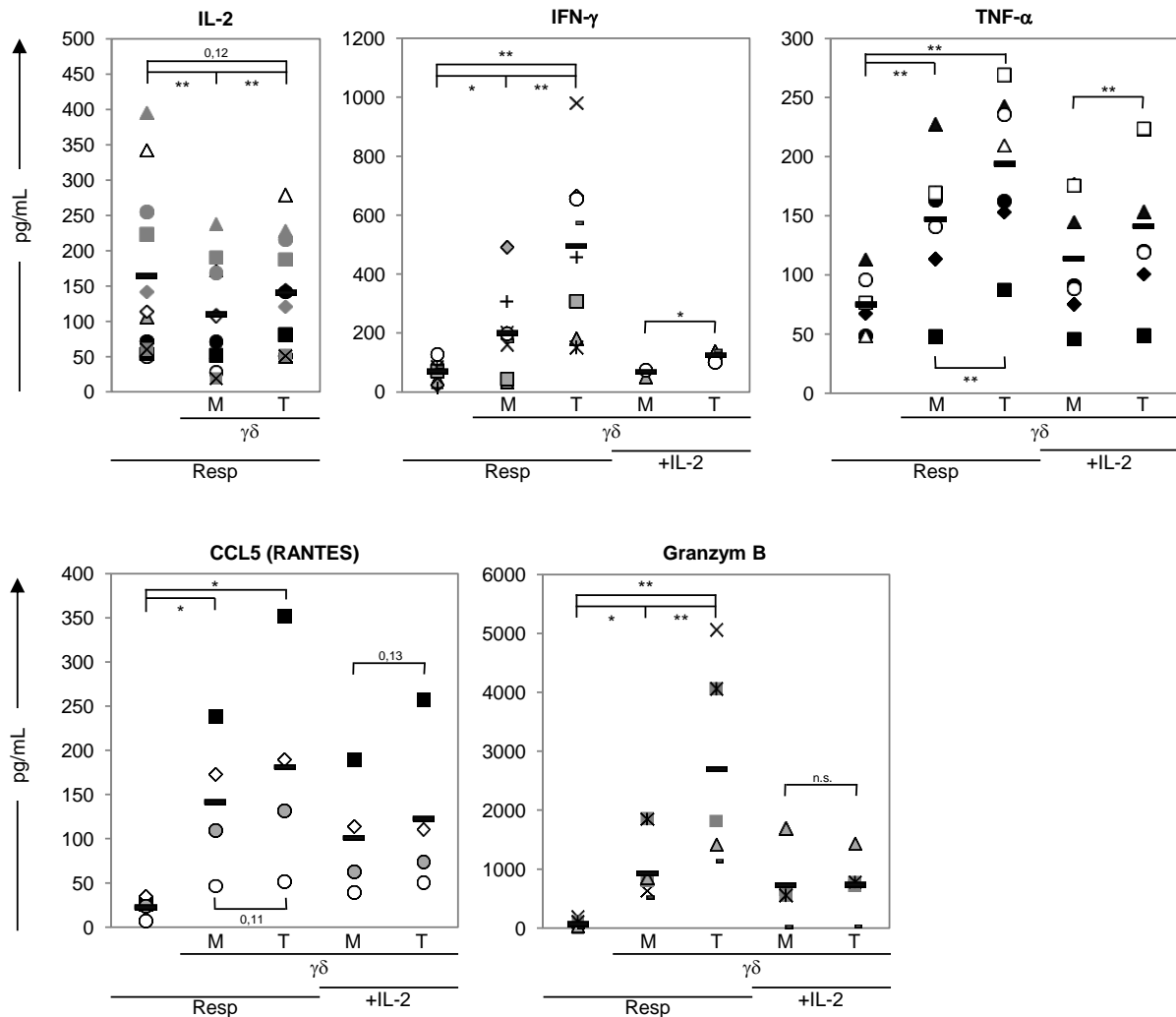


Abb. 15: Einfluss von TLR2-Liganden auf die Freisetzung löslicher Mediatoren in Solo- und Kokulturrexperimenten. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium (= M) oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches (= T) vorinkubiert und anschließend zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Der Gehalt löslicher Mediatoren im Zellkulturmedium wurde an Tag 3 (IFN- γ , TNF- α , Granzym B) bzw. an Tag 4 (IL-2, CCL5) durch ELISA bestimmt. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant).

6.2.4. Einfluss von TLR2-Liganden auf verschiedene Signalwege

Da die Vorinkubation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit TLR2-Liganden die Oberflächenexpression kostimulatorischer Moleküle und die Freisetzung von Th1-Zytokinen verstärkte, stellte sich die Frage, welche Signalwege in den Zellen durch die Vorinkubation beeinflusst werden. Für den TLR2-Signalweg ist die Beteiligung verschiedener Signalmoleküle, deren Aktivität durch Phosphorylierung gesteuert wird, beschrieben. Unter anderem sind NF- κ B, MAP-Kinasen, aber möglicherweise auch AKT darin involviert (Kawai & Akira 2010; Bhoj & Chen 2009; Santos-Sierra *et al.* 2009). Mit Hilfe einer *Phospho-Array*-Analyse wurden Phosphorylierungszustände verschiedener Signalmoleküle (hauptsächlich MAP-Kinasen) analysiert. Hierfür wurde ein *Proteome Profiler™ Phospho-MAPK Array* verwendet. Untersucht wurde der Phosphorylierungszustand verschiedener Signalmoleküle in TLR2-Liganden-

vorinkubierten verglichen mit Medium-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen nach fünfminütiger anti-CD2,-3,-28 mAk-Stimulation. Sowohl in Medium- als auch in TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte die Analyse nach Stimulation der Zellen eine in Relation zu unstimulierten Zellen verstärkte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1, ERK2 und p38 α sowie der diesen nachfolgend (*downstream*) aktivierten Kinasen 90 kDa ribosomal S6 kinase 1 (RSK1), *mitogen- and stress-activated protein kinase 2* (MSK2) und *glykogen synthase kinase* (GSK) -3 α/β . Hierbei war in TLR2-Liganden-vorinkubierten Zellen die Phosphorylierung von ERK1, ERK2, MSK2 und p38 α in Relation zu den Medium-vorinkubierten erhöht. Die Phosphorylierung von p38 α und MSK2 war zudem auch in unstimulierten TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen im Vergleich zu den korrespondierenden Medium-vorinkubierten Zellen erhöht (Abb. 16).

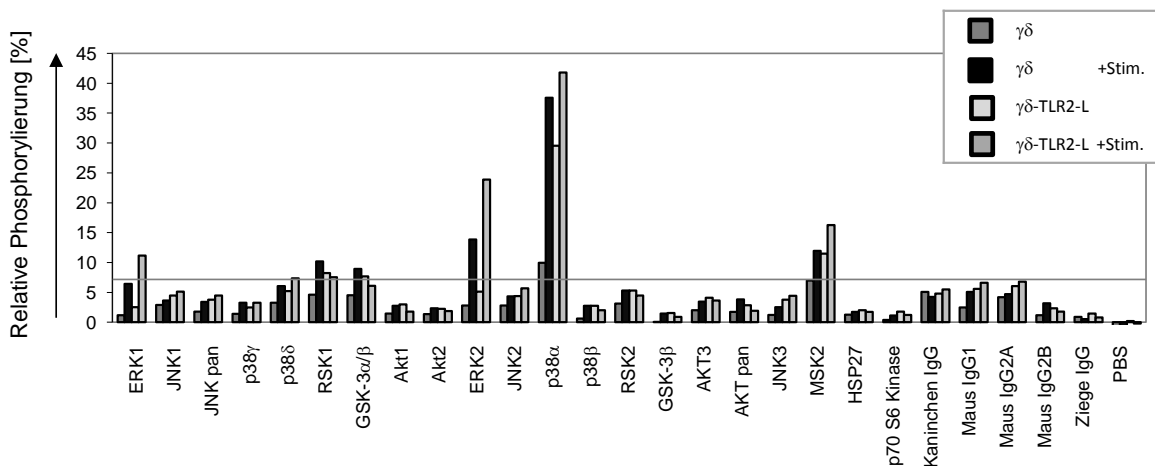


Abb. 16: Analyse des Phosphorylierungsstatus von Signalmolekülen in TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen mit Hilfe eines Proteome Profiler™ Array. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches vorinkubiert. Die Zellen wurden mit löslichem anti-CD2 mAk (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), anti-CD3 mAk (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) und anti-CD28 mAk (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Stimulation bei 37°C durch Zugabe von Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (αm , 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) gestartet und nach Ablauf von fünf Minuten durch Zugabe von eiskaltem PBS beendet. Die anschließend hergestellten Zelllysate wurden mit Hilfe eines Proteome Profiler™ Phospho-MAPK Array analysiert. Dargestellt ist eines von zwei Experimenten deren Ergebnisse miteinander deckungsgleich waren.

Durch eine Phospho-Array-Analyse (Proteome Profiler™ Phospho-MAPK Array) ergaben sich Hinweise auf Signalmoleküle, die in Abhängigkeit von TLR2-Liganden aktiviert/phosphoryliert werden. Der Einflusses von TLR2-Liganden auf die Phosphorylierung der Signalmoleküle wurde unter Verwendung einer weitaus sensitiveren durchflusszytometrischen Analyseverfahren mit Hilfe phosphorylierungsspezifischer mAk verifiziert bzw. detaillierter analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass der zeitliche Verlauf der AKT-Phosphorylierung für die beiden analysierten Phosphorylierungsstellen vergleichbar war. Nach einminütiger Aktivierung erreichte die AKT-Phosphorylierung ihren höchsten Wert und fiel danach in der Zeit zwischen fünf und 30 Minuten ab, wobei die Abnahme der Phosphorylierung von Threonin 308 deutlicher zu beobachten war, als die von Serin 473. $\gamma\delta$ T-Zellen, die nicht über

- Ergebnisse -

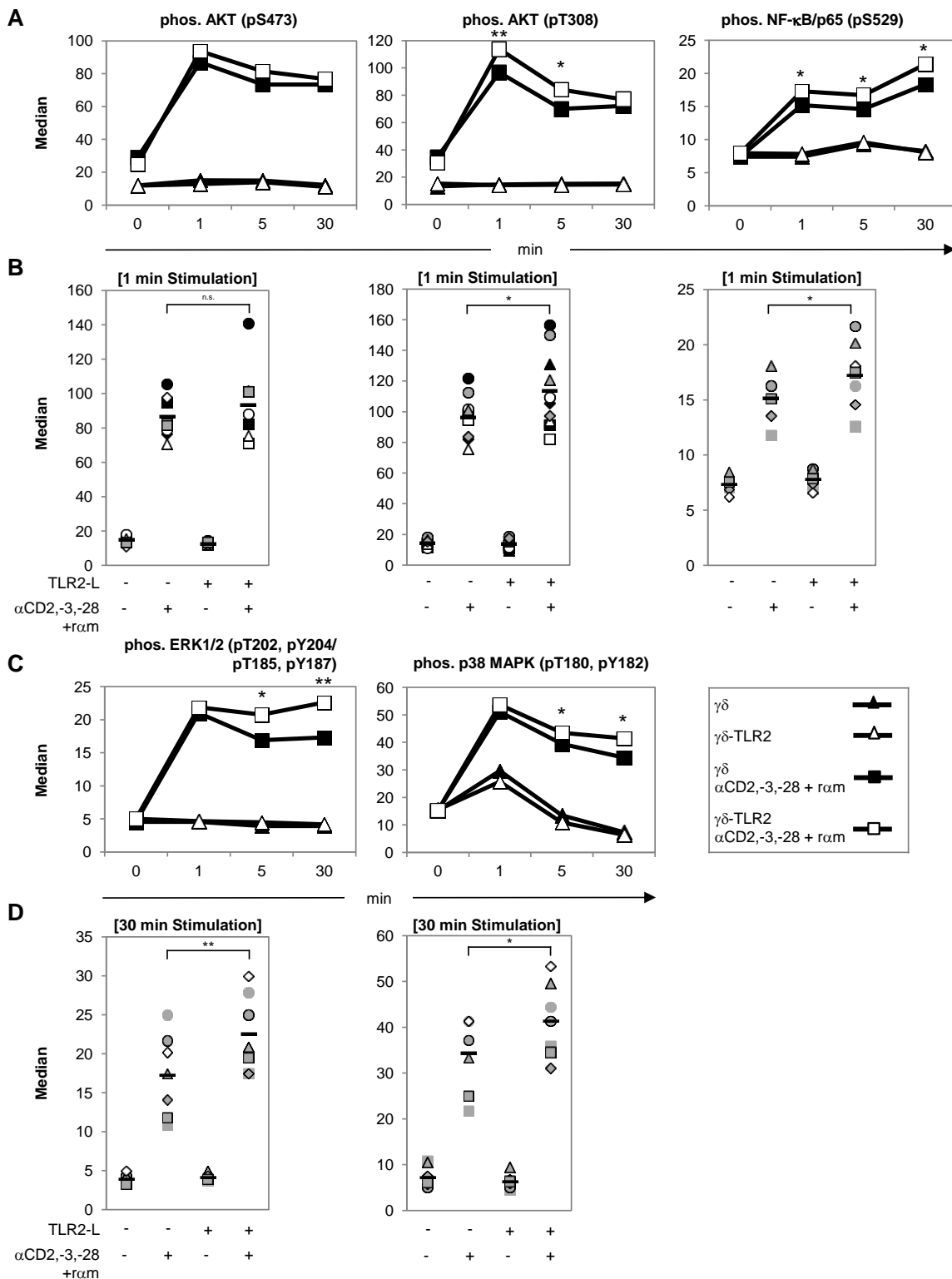


Abb. 17: Einfluss der TLR2-Liganden-Vorinkubation auf die Phosphorylierung von Signalmolekülen in $\gamma\delta$ T-Zellen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches vorinkubiert. Die Zellen wurden mit anti-CD2 mAk (1 μ g/mL), anti-CD3 mAk (2 μ g/mL) und anti-CD28 mAk (1 μ g/mL) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Stimulation wurde im Anschluss durch Zugabe von Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (α m, 10 μ g/mL) bei 37°C gestartet und zu angegebenen Zeitpunkten durch direkte Fixierung der Zellen beendet (Cytofix™). Anschließend wurden die Zellen permeabilisiert und phosphorylierte Signalmoleküle wurden durch spezifische Fluorochrom-gekoppelte mAk markiert. Der Phosphorylierungszustand der jeweiligen Signalmoleküle wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die mediane Fluoreszenzintensität unter Verwendung von anti-AKT (pS473) mAk, anti-AKT (pT308) mAk, anti-NF- κ B/p65 (pS529) mAk, anti-ERK1/2 (pT202, pY204 bzw. pT185, pY187) mAk und anti-p38 (pT180, pY182) mAk. **A, C**) Zeitlicher Verlauf der Phosphorylierung (Mittelwerte des Medians der Fluoreszenzintensität der untersuchten

Spender) der verschiedenen Signalmoleküle. **B, D**) Zustand der Signalmolekül-Phosphorylierung bei den untersuchten Spendern zum Zeitpunkt der deutlichsten Differenz zwischen Medium- und TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Mittelwerte sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant).

den TZR stimuliert wurden, wiesen keinen Anstieg der Phosphorylierung auf und taten dies auch dann nicht, wenn sie mit TLR2-Liganden vorinkubiert worden waren. Allerdings ließ sich eine verstärkte Phosphorylierung TLR2-Liganden-vorinkubierter $\gamma\delta$ T-Zellen nach anti-CD2,-3,-28 mAk-Stimulation der Zellen beobachten. Die Phosphorylierung von Serin 473 war verglichen mit Medium-vorinkubierten $\gamma\delta$ Zellen nur schwach und nicht signifikant erhöht, während sie bei Threonin 308 eine bzw. fünf Minuten nach Beginn der Stimulation signifikant anstieg (Abb. 17 A, B). NF- κ B/p65 wies an Serin 529 zwischen einer und 30 Minuten nach Stimulationsbeginn einen Anstieg der Phosphorylierung auf, während unstimulierte Zellen diesbezüglich keine Veränderung aufwiesen. Die TLR2-Liganden-Vorinkubation verstärkte die NF- κ B-Phosphorylierung (eine, fünf bzw. 30 Minuten nach Beginn der Stimulation) signifikant (Abb. 17 A, B). Die ERK1/2-Phosphorylierung an Threonin 202 und Tyrosin 204 (ERK1) bzw. Threonin 185 und Tyrosin 187 (ERK2) wurde ebenfalls erst durch die Stimulation induziert und erreichte ihr Maximum eine Minute nach Beginn der Stimulation. Waren die Zellen TLR2-Liganden-vorinkubiert, ging die Phosphorylierung im betrachteten Zeitraum kaum zurück und war nach fünf bzw. 30 Minuten noch immer signifikant höher als in Medium-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 17 C, D). p38 war schon vor Beginn der Stimulation an Threonin 180 und Tyrosin 182 zu einem gewissen Grad phosphoryliert. Unstimulierte Zellen wiesen eine Minute nach Beginn der Untersuchung eine leicht gesteigerte Phosphorylierung auf, die im weiteren Verlauf wieder zurückging. Die Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen führte auch bei p38 zu einer verstärkten Phosphorylierung, die nach einer Minute ihr Maximum erreichte und anschließend abnahm. Die TLR2-Liganden-Vorinkubation führte wie auch bei ERK1/2 zu einer verringerten Abnahme der Phosphorylierung. Nach fünf bzw. 30 Minuten war diese noch signifikant höher als die Medium-vorinkubierter $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 17 C, D). Insgesamt führte die Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit TLR2-Liganden (nur) nach deren Stimulation zur verstärkten Phosphorylierung der betrachteten Signalmoleküle.

Um die durchflusszytometrisch gewonnenen Ergebnisse zu bestätigen, wurden *Western blot*-Analysen durchgeführt, für die ebenfalls phosphorylierungsspezifische mAk verwendet wurden. Die Zellen wurden den durchflusszytometrisch analysierten Zellen entsprechend stimuliert (Abb. 17). Die Stimulation wurde durch Zugabe von eiskaltem PBS beendet und die Zellen wurden direkt im Anschluss lysiert. Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung der betrachteten Signalmoleküle unterschied sich von dem durchflusszytometrisch ermittelten

insofern, als dass die Phosphorylierung im Vergleich insgesamt schneller wieder auf ein niedriges Niveau zurückging. Die Phosphorylierung von ERK1/2, p38 und AKT (Thr 308) in stimulierten, Medium-vorinkubierten Zellen war zwischen einer und fünf, die von NF- κ B/p65 nach fünf Minuten und die von AKT (Ser 473) zwischen fünf und 30 Minuten am stärksten ausgeprägt und nahm danach wieder ab. Bei unstimulierten Zellen ließ sich nach einer Minute eine deutliche Phosphorylierung von ERK1/2, p38, NF- κ B nachweisen, die bei ERK1

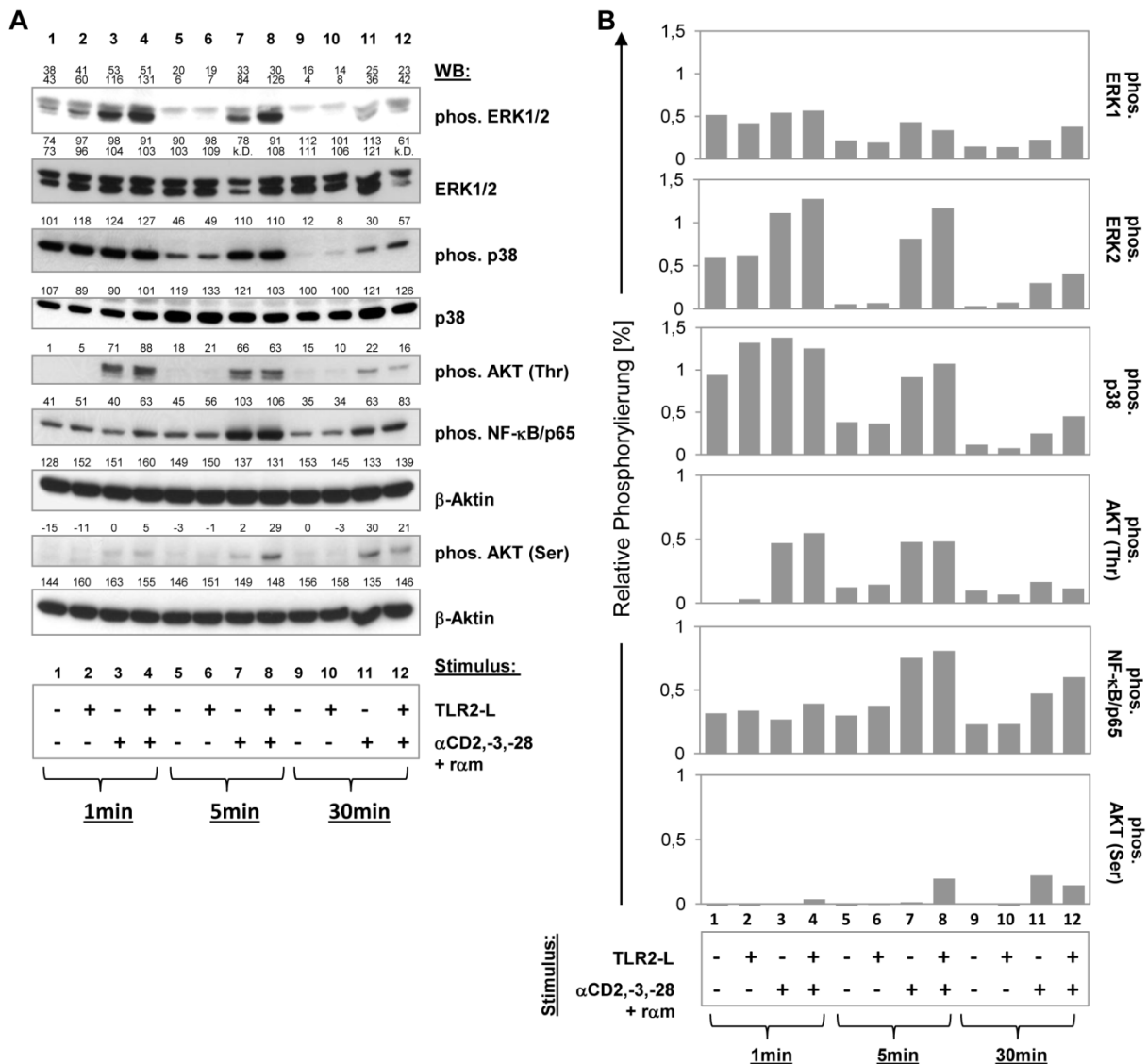


Abb. 18: Einfluss der TLR2-Liganden-Vorinkubation auf die Phosphorylierung von Signalmolekülen in $\gamma\delta$ T-Zellen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches vorinkubiert. Die Zellen wurden mit anti-CD2 mAk (1 μ g/mL), anti-CD3 mAk (2 μ g/mL) und anti-CD28 mAk (1 μ g/mL) für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Stimulation wurde durch Zugabe von Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (α m, 10 μ g/mL) bei 37°C begonnen und an angegebenen Zeitpunkten durch Zugabe von eiskaltem PBS beendet. **A)** Anschließend wurden die Zellen lysiert und der Phosphorylierungszustand verschiedener Signalmoleküle unter Verwendung von anti-NF- κ B/p65 (S536), anti-ERK1/2 (pY202, pY204), anti-p38 (pY180, pY182), anti-AKT (pT308) und anti-AKT (pS473) mAk durch *Western blot*-Analyse bestimmt. Als Beladungskontrollen wurde der Nachweis von unphosphorylierten Molekülen (anti-ERK1/2, anti-p38 Ak) bzw. β -Aktin (anti- β -Aktin mAk) verwendet. Die Ziffern über den einzelnen Banden geben jeweils die Resultate der densitometrischen Auswertung an. **B)** Graphische Darstellung der densitometrischen Auswertung des *Western blots*. Der Phosphorylierungszustand wurde in Relation zur jeweiligen Kontrolle ermittelt.

und NF- κ B ähnlich stark ausgeprägt war wie in stimulierten Zellen. Bei ERK1/2 und p38 nahm diese schnell wieder ab und war nach fünf Minuten nur noch schwach vorhanden. NF- κ B hingegen wies, auch bei unstimulierten Zellen konstant einen gewissen Grad an Phosphorylierung auf (Abb. 18). TLR2-Liganden-vorinkubierte, unstimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen eine Minute nach Untersuchungsbeginn eine erhöhte Phosphorylierung von p38 auf. Abgesehen von dem schwachen Einfluss der TLR2-Liganden-Vorinkubation auf p38 ließ sich eine verstärkte Phosphorylierung nur nach Stimulation der Zellen feststellen. Sowohl die Phosphorylierung von p38, ERK1/2, NF- κ B als auch von AKT war nach Stimulation TLR2-Liganden-vorinkubierter Zellen in Relation zu Medium-vorinkubierten Zellen gesteigert. Hierbei war die p38-, ERK2- und NF- κ B-Phosphorylierung fünf und 30 Minuten nach Beginn der Stimulation erhöht. Verstärkende Effekte der TLR2-Liganden-Vorinkubation ließen sich auch auf die AKT-Phosphorylierung feststellen, wobei die des Serin 473 fünf und die des Threonin 308 eine Minute nach Stimulationsbeginn erhöht war. Die Phosphorylierung von ERK1 hingegen war generell schwächer und es ließ sich kein Einfluss der TLR2-Liganden erkennen (Abb. 18). Im Vergleich zu dem durchflusszytometrisch bestimmten Grad der der Signalmolekül-Phosphorylierung zeigte sich eine insgesamt schnellere Abnahme. Qualitativ wurde aber durch beide Methoden in TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen eine gesteigerte Phosphorylierung von AKT (Thr 308) nach einminütiger bzw. von ERK, p38 und NF- κ B nach fünf- oder 30-minütiger Stimulation nachgewiesen.

Der Phosphorylierungsgrad der Signalmoleküle NF- κ B und AKT wurde weiterhin zu späteren Zeitpunkten der Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen bestimmt. Auf diese Weise war es möglich mit Hilfe der sensitiveren durchflusszytometrischen Methode den Phosphorylierungszustand der Signalmoleküle parallel in kokultivierten $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen zu ermitteln. Bei Verwendung dieser Methode konnten außerdem die für die Suppressionsuntersuchungen verwendeten A/E-Partikel zur Stimulation der Zellen genutzt werden. Mehrere Tage nach der initialen Stimulation ließen sich bei TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen Unterschiede in der Phosphorylierung von Signalmolekülen bei solo- und kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen beobachten. Die Phosphorylierung von AKT (Ser 473) war zwei Tage nach der initialen Stimulation in solo- und kokultivierten TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen signifikant erhöht, wobei diese Unterschiede in kokultivierten Zellen deutlicher ausfielen (Abb. 19, obere Reihe). Ebenso war nach drei Tagen die Phosphorylierung von AKT (Thr 308) und die von NF- κ B/p65 (Ser 529) bei jeweils 4/6 Spendern in kokultivierten TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich erhöht. Bei solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen war diese gesteigerte Phosphorylierung zwar auch erkennbar, aber dies wiederum nicht signifikant und weniger deutlich (Abb. 19, obere Reihe). Die Phosphorylierung der Signalmoleküle in Responder T-Zellen wies zwischen solo- und kokultivierten Zellen

deutliche Unterschiede auf. Die Phosphorylierung von AKT (Ser 473) war deutlich und die von AKT (Thr 308) und NF- κ B/p65 (Ser 529) signifikant verringert, wenn diese mit Mediumvorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen kokultiviert wurden (Abb. 19, untere Reihe). Wurden die Responder mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen kokultiviert, war die Phosphorylierung von AKT und NF- κ B/p65 auch in den Responder T-Zellen erhöht und der durch Kokultivierung mit $\gamma\delta$ T-Zellen verursachte negative Effekt teilweise aufgehoben. Dies war bei

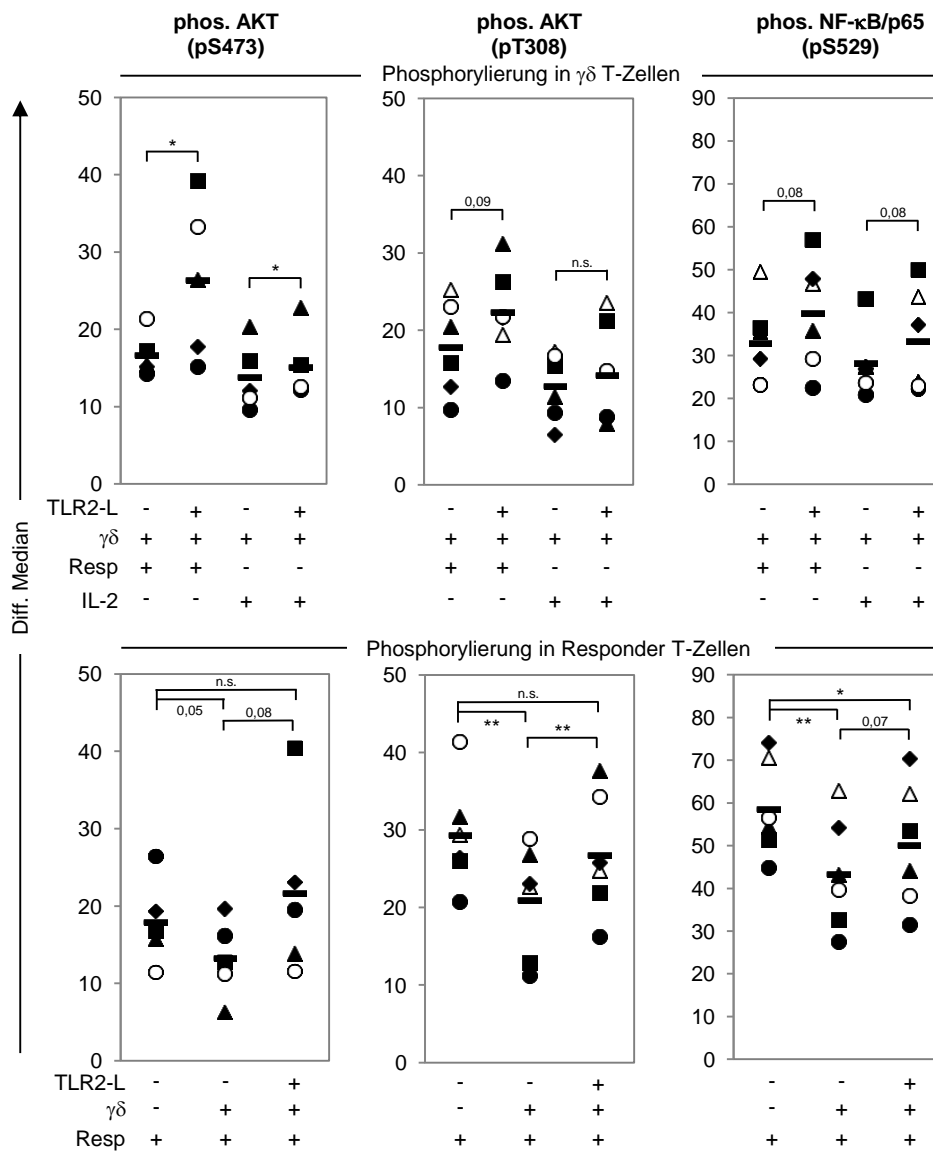


Abb. 19: Einfluss der TLR2-Liganden-Vorinkubation von $\gamma\delta$ T-Zellen auf die Phosphorylierung von Signalmolekülen in diesen und in kokultivierten Responder T-Zellen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches vorinkubiert und anschließend zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Nach 2 bzw. 3 Tagen wurden die Zellen direkt fixiert (Cytifix™), permeabilisiert und der Phosphorylierungszustand der untersuchten Signalmoleküle sowie die Zugehörigkeit zur jeweiligen Zellpopulation durchflusszytometrisch mit Hilfe spezifischer Fluorochrom-gekoppelter mAk bestimmt. Dargestellt ist der korrigierte Median der Fluoreszenzintensitäten, gemessen unter Verwendung von anti-AKT (pS473) mAk an Tag 2 sowie von anti-AKT (pT308) mAk und anti-NF- κ B/p65 (pS529) mAk an Tag 3 der Kokultur. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Mittelwerte sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant).

allen betrachteten Signalmolekülen klar erkennbar. Die Phosphorylierung von AKT (Ser 473) war in allen Spendern, die von AKT (Thr 308) signifikant und die von NF- κ B/p65 (Ser 529) in 4/6 Spendern erhöht (Abb. 19, untere Reihe). Unter Verwendung verschiedener Ansätze zur Bestimmung der Phosphorylierung ließ sich in $\gamma\delta$ T-Zellen ein deutlich positiver Effekt der TLR2-Liganden auf die Phosphorylierung der Signalmoleküle ERK, p38, NF- κ B und AKT feststellen. Bei Kokultur von Responder T-Zellen mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen war die Phosphorylierung der Signalmoleküle AKT und NF- κ B im Vergleich zur Kokultur mit Medium-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen verstärkt. Die Signalmoleküle wiesen (wieder) eine ähnlich starke Phosphorylierung wie in solokultivierten Responder T-Zellen auf.

6.3. Expression von Transkriptionsfaktoren und deren Korrelation mit suppressiver Aktivität

Wie bereits in Kapitel 6.1 gezeigt wurde, sind $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage die Proliferation von Responder T-Zellen ähnlich effektiv wie Treg zu supprimieren. Um festzustellen ob $\gamma\delta$ T-Zellen noch weitere phänotypische Gemeinsamkeiten aufweisen, wurde die Proteinexpression Treg-spezifischer Moleküle bei frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht und mit der bei Treg bzw. Responder T-Zellen verglichen. Wie bereits in den Abbildungen 10 und 11 gezeigt, wiesen ruhende $\gamma\delta$ T-Zellen die für Treg charakteristischen Oberflächenmoleküle PD-1 und PD-L1 oder CTLA-4 nicht auf, sondern taten dies erst nachdem sie aktiviert wurden (Abb. 10, 11).

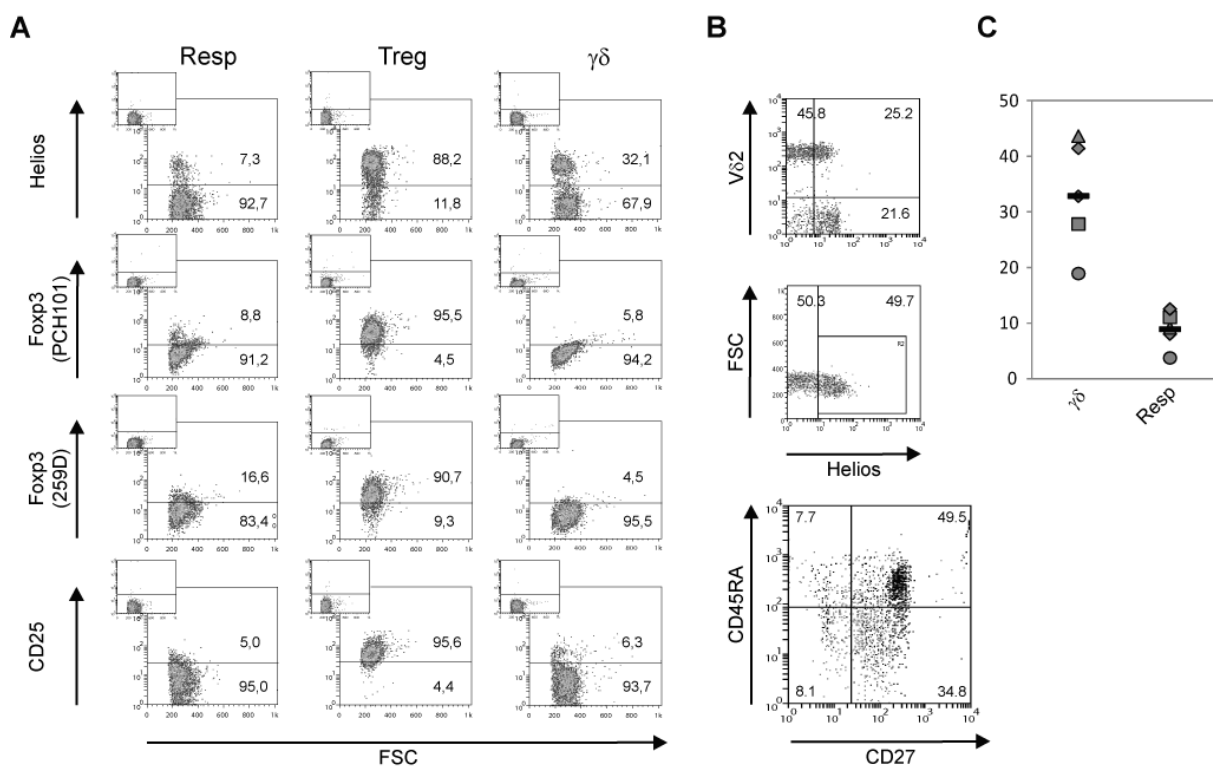


Abb. 20: Vergleich von $\gamma\delta$ T-Zellen mit Treg und Untersuchung der Helios-Expression in frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen. Die Expression Treg-spezifischer Moleküle wurde bei frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen, Treg und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen (Responder) untersucht. Auf der Zelloberfläche wurden CD25, CD27, CD45RA und TZR $V\delta$ 2 mit Hilfe Fluorochrom-gekoppelter mAk markiert. Zur intrazellulären Markierung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Transkriptionsfaktoren Fxp3 (Klon: 259D und PCH101) und Helios wurden mit Hilfe spezifischer Fluorochrom-gekoppelter mAk nachgewiesen. **A**) Gezeigt ist die Proteinexpression der verschiedenen Moleküle als Punktwolkendarstellung in einem repräsentativen von insgesamt fünf Spendern. Das kleine Punktwolkendiagramm in der jeweils linken oberen Ecke stellt die korrespondierende Isotypkontrolle dar. Die Ziffern zeigen die prozentuale Verteilung der Zellen relativ zur Isotypkontrolle. **B**) Die Helios-Expression wurde in unstimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen. In der oberen Punktwolkendarstellung ist die Helios-Proteinexpression in $V\delta$ 2-positiven und -negativen $\gamma\delta$ T-Zellen dargestellt. In der mittleren Punktwolkendarstellung wurden die Helios-positiven Zellen durch die Region 2 (R2) markiert. Diese Zellen sind in der unteren Punktwolkendarstellung dunkel hervorgehoben. **C**) Dargestellt ist die Helios-Proteinexpression in Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen verschiedener Spender. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Mittelwerte sind durch Balken dargestellt.

Zum direkten Vergleich der Proteinexpression Treg-spezifischer Moleküle wurden Treg, $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen magnetisch isoliert und durchflusszytometrisch untersucht. Treg (CD4⁺CD25⁺) wiesen wie zu erwarten und in Übereinstimmung mit der Literatur eine hohe Proteinexpression des aktivierungsassoziierten Moleküls CD25 sowie der Transkriptionsfaktoren Foxp3 und Helios auf (Abb. 20 A) (Vignali *et al.* 2008; Thornton *et al.* 2010).

In Relation zur jeweiligen Isotypkontrolle waren bei dem dargestellten Spender 96% der Treg positiv für CD25, 88% für Helios und 96% bzw. 91% für Foxp3 (Klon PCH101 bzw. 259D). CD25, Foxp3 und Helios waren bei den meisten Responder T-Zellen dieses Spenders nur marginal vorhanden. Nur etwa 5% wiesen eine schwache Proteinexpression von CD25, 8,8% bzw. 16,6% die von Foxp3 (Klon PCH101 bzw. 259D) und nur 7% die von Helios auf. Die frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen dieses Spenders wiesen ebenfalls kaum eine Proteinexpression von CD25 (6%) oder Foxp3 (Klon PCH101: 6% bzw. 259D: 5%) auf. Auffällig war allerdings, dass ein Anteil von 32% der $\gamma\delta$ T-Zellen Helios-positiv war (Abb. 20 A). Der Großteil der Helios-positiven $\gamma\delta$ T-Zellen wurde von V δ 2-negativen Zellen ausgemacht. In frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen war die Helios-Proteinexpression hauptsächlich auf die CD27⁺CD45RA⁺-Zellpopulation beschränkt (Abb. 20 B). Der Anteil Helios-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen variierte bei den untersuchten Spendern zwischen etwa 20% und 50% (Abb. 20 C). Es zeigte sich also, dass eine Zellpopulation innerhalb ruhender $\gamma\delta$ T-Zellen den für Treg charakteristischen Transkriptionsfaktor Helios aufwies

6.3.1. Helios- und Foxp3-Expression in Kokulturrexperimenten

Es ist möglich, dass regulatorische Funktionen erst im Verlauf der (Ko-)kultivierung induziert werden. $\gamma\delta$ T-Zellen könnten auch zur Induktion von Treg durch die Freisetzung tolerogener Mediatoren beitragen. Daher wurde untersucht, ob es bei $\gamma\delta$ T-Zellen oder Responder T-Zellen bei deren Kokultivierung zur Entstehung von Treg kommt. Da die für Treg charakteristischen Oberflächenmoleküle allesamt auch aktivierungsinduziert auf nicht-Treg-Zellen exprimiert werden (Vignali *et al.* 2008), wurde für beide Populationen die Proteinexpression der Treg-assoziierten Transkriptionsfaktoren Foxp3 und Helios im zeitlichen Verlauf der (Ko-)kultivierung analysiert. Wie in Abbildung 21 gezeigt, wurde Foxp3 (PCH101) sowohl in aktivierten $\gamma\delta$ - als auch Responder T-Zellen exprimiert. Unter Verwendung des Klons PCH101 stieg die Proteinexpression von Foxp3 in solokultivierten Responder T-Zellen bis zum vierten Tag nach Stimulation an und fiel dann wieder ab. Bei Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen war die maximale Foxp3-Proteinexpression geringer, zeigte aber einen entsprechenden zeitlichen Verlauf. In mit Responder T-Zellen kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen entsprach diese weitgehend der solokultivierter $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 21 A, C). Während bei Verwendung des Klons PCH101 zum Nachweis der Foxp3-Proteinexpression eine stimulationsbedingte Steigerung

- Ergebnisse -

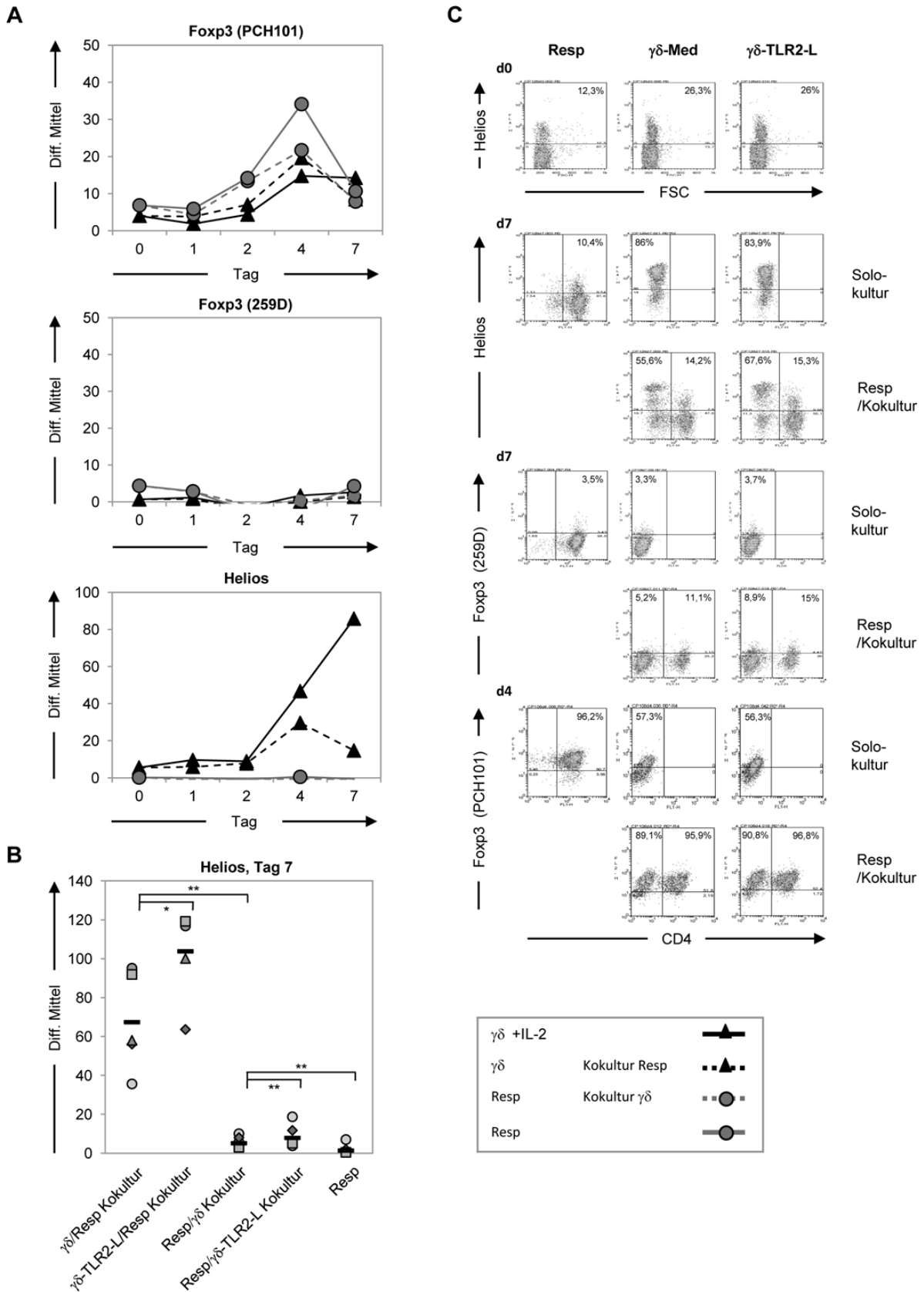


Abb. 21: Proteinexpression von Helios und Fxp3 bei Solo- und Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches vorinkubiert und anschließend zusammen mit Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Mit Hilfe spezifischer Fluorochrom-gekoppelter mAk wurden Transkriptionsfaktoren intrazellulär markiert und durchflusszytometrisch nachgewiesen. **A)** Zeitlicher Verlauf der Proteinexpression (Mittelwerte der mittleren Fluoreszenzintensität von drei bzw. fünf Spendern) der verschiedenen Transkriptionsfaktoren in Solo- und Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-

Zellen. **B)** Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität der Helios-Proteinexpression an Tag 7 der Zellkultur. Bei kokultivierten Zellen ist diese auf die in der Beschriftung zuerst genannte Population bezogen. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Mittelwerte sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$). **C)** Punktwolkendarstellung der Proteinexpression von Helios und Foxp3 (Klone 259D und PCH101) unter verschiedenen Kulturbedingungen. Die Einteilung der Quadranten wurde in Bezug zur Isotypkontrolle vorgenommen.

mit einem Maximum an Tag 4 festgestellt wurde, zeigte sich bei Verwendung des Klons 259D unter den verwendeten Kulturbedingungen in keiner Zellpopulation eine Foxp3-Induktion (Abb. 21 A, C). Nur in wenigen Responder-, aber in einem deutlichen Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen kam es zur Helios-Proteinexpression. Die Proteinexpression von Helios in solokultivierten Responder T-Zellen veränderte sich über den Zeitraum von sieben Tagen kaum. In kokultivierten Responder T-Zellen war allerdings eine leicht gesteigerte Proteinexpression zu beobachten (Abb. 21 B). Im Gegensatz dazu kam es sowohl in solo- als auch kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer deutlich verstärkten Helios-Proteinexpression. Diese stieg vom zweiten bis zum siebten Tag der Zellkultur kontinuierlich an. Bei solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen war der Anstieg der Helios-Proteinexpression stärker, als in kokultivierten (Abb. 21 A, C). Nach 22-stündiger Vorinkubation mit TLR2-Liganden wiesen die unstimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen keine Unterschiede bezüglich der Helios-Proteinexpression auf. Wurden diese Zellen aber stimuliert und anschließend kultiviert, kam es in solokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer verstärkten und in kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer signifikant erhöhten Helios-Proteinexpression (Abb. 21 B, C; Abb. 22). Außerdem führte in Responder T-Zellen die Kokultur mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer schwachen, aber signifikanten Steigerung der Helios-Proteinexpression (Abb. 21 B, C). Es kam in keiner der beiden Zellpopulationen zu einer Induktion von Foxp3 (bei Nachweis durch den Klon 259D). Allerdings konnte in $\gamma\delta$ T-Zellen die aktivierungsinduzierte Induktion des Transkriptionsfaktors Helios nachgewiesen werden.

6.3.2. Die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren in $\gamma\delta$ T-Zellen unter unterschiedlichen Expansionsbedingungen

Um die Rolle von Helios im Zusammenhang mit regulatorischen Funktionen näher zu untersuchen, wurden $\gamma\delta$ T-Zellen auf unterschiedliche Weise stimuliert und es wurde die Proteinexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren bzw. deren Proteinexpression in Korrelation mit Helios analysiert. In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass es bei Stimulation mit A/E-Partikeln (anti-CD2,-3,-28 mAk) zu keiner Foxp3-Proteinexpression (Klon 259D) kam (Abb. 21). In Übereinstimmung mit der Literatur konnte bei Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit BrHPP und zusätzlicher Supplementierung des Zellkulturmediums mit TGF- β 1 und IL-15 ab dem zweiten Tag der Zellkultur eine, signifikante Induktion von Foxp3 (Klon 259D) festgestellt werden (Abb. 22) (Casetti *et al.* 2009). Diese

korrelierte allerdings mit keiner deutlichen Helios-Proteinexpression. Helios wurde in BrHPP-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β 1 und IL-15 vergleichbar schwach exprimiert wie in Abwesenheit der Zytokine (Abb. 22 A, B). Weiterhin war die Foxp3-Proteinexpression hauptsächlich in Helios-negativen Zellen zu finden (Abb. 23). Zu einer deutlichen Induktion von Helios kam es nur unter Verwendung von A/E-Partikeln (bei Anwesenheit eines CD28-Kostimulus). Wurde zusätzlich zu diesem Stimulus das Medium mit TGF- β 1 und IL-15 supplementiert, hatte dies keinen Einfluss auf die Helios-Expression. Anders als bei der BrHPP-Stimulation konnte in diesem Fall aber auch eine Induktion von Foxp3 in Helios⁺ Zellen beobachtet werden (Abb. 22 B). In $\gamma\delta$ T-Zellen konnte also in Anwesenheit von TGF- β 1 und IL-15 unabhängig vom Stimulus (A/E-Partikel oder BrHPP) die Induktion von Foxp3 (Klon 259D) nachgewiesen werden.

Die unterschiedlichen Kulturbedingungen hatten außerdem Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD27. Bei A/E-Partikel-Stimulation (anti-CD2,-3,-28 mAk) kam es ab Tag 2 zu einer starken CD27-Oberflächenexpression, wobei CD27 und Helios koexprimiert wurden (Abb. 23). $\gamma\delta$ T-Zellen die zusätzlich zur A/E-Partikel-Stimulation unter Zusatz von IL-15 und TGF- β 1 kultiviert wurden, wiesen eine deutlich reduzierte CD27-Oberflächenexpression auf, die aber auf Helios-positive Zellen beschränkt blieb. Bei BrHPP-Stimulation kam es zu einer nur schwachen Induktion von CD27 auf Helios-negativen Zellen. Wurde bei BrHPP-Stimulation dem Zellkulturmedium IL-15 und TGF- β hinzugegeben, kam es ebenfalls zu einer schwachen CD27-Oberflächenexpression, die aber in diesem Fall auf schwach Helios-positive Zellen beschränkt war (Abb. 22 A, B, Abb. 23).

Aufgrund des von Serre *et al.* beschriebenen Zusammenhangs zwischen Helios-Proteinexpression und Prozessen der Th(2)-Differenzierung, wurde die Proteinexpression von Helios in Korrelation mit denen für die Th1- bzw. Th2-Differenzierung spezifischen Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA-3 analysiert (Serre *et al.* 2011). Hierbei zeigte sich nach Stimulation ein leichter Anstieg der GATA-3-Proteinexpression, der bei allen verschiedenen Kulturbedingungen in gleicher Weise zu beobachten war. Deutliche Unterschiede hingegen wies die Proteinexpression des für Th1-Differenzierung spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet auf. In mit A/E-Partikeln (anti-CD2,-3,-28 mAk) stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen kam es zwischen Tag 4 und 8 der Kultivierung zu einer deutlich gesteigerten Expression. Diese war etwas stärker als nach BrHPP-Stimulation. Wurden die Zellen aber in Anwesenheit von IL-15 und TGF- β 1 kultiviert, war die T-bet-Proteinexpression bei beiden Stimulationsvarianten signifikant reduziert. Diese Reduktion war besonders deutlich bei Stimulation mit A/E-Partikeln (anti-CD2,-3,-28 mAk) (Abb. 22 C, D).

- Ergebnisse -

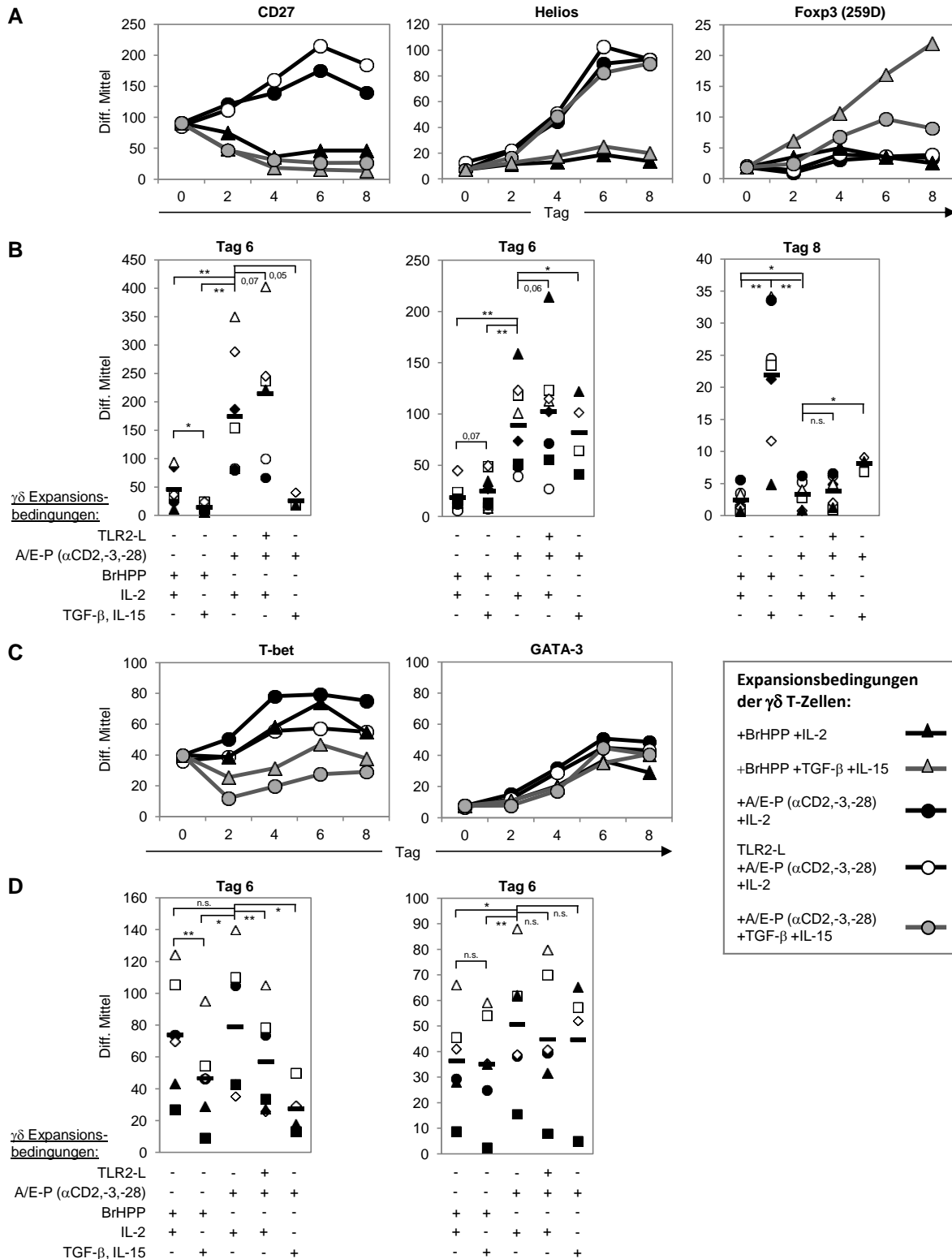


Abb. 22: Einfluss unterschiedlicher $\gamma\delta$ T-Zell-Expansionsbedingungen auf die Proteinexpression von CD27 und verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden in Zellkulturmedium oder unter Zusatz des TLR2-L-Gemisches vorinkubiert und anschließend entweder mit Hilfe von A/E-Partikeln (anti-CD2,-3,-28 mAk), A/E-Partikeln (nur anti-CD3 mAk) oder BrHPP stimuliert. Die unterschiedlich stimulierten Zellen wurden entweder in Anwesenheit von IL-2 (50 U/mL) oder von TGF- β 1 (1,7 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL) und IL-2 (10 U/mL) kultiviert. Zu angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen durch durch Fluorochrom-gekoppelte anti-CD27 mAk markiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und intrazelluläre Transkriptionsfaktoren wurden mit Hilfe von spezifischen Fluorochrom-gekoppelten mAk (u.a. anti-Foxp3 mAk: Klon 259D) markiert. Die Zellen wurden durchflusszytometrisch analysiert. **A, C**) Analyse des zeitlichen

- Ergebnisse -

Verlaufs der Proteinexpression der verschiedenen Moleküle. Die Linien stellen Mittelwerte der korrigierten, mittleren Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Spender dar. **B, D**) Proteinexpression der Moleküle bei den verschiedenen Spendern zu einem bestimmten Zeitpunkt. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Mittelwerte sind durch Balken dargestellt. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant).

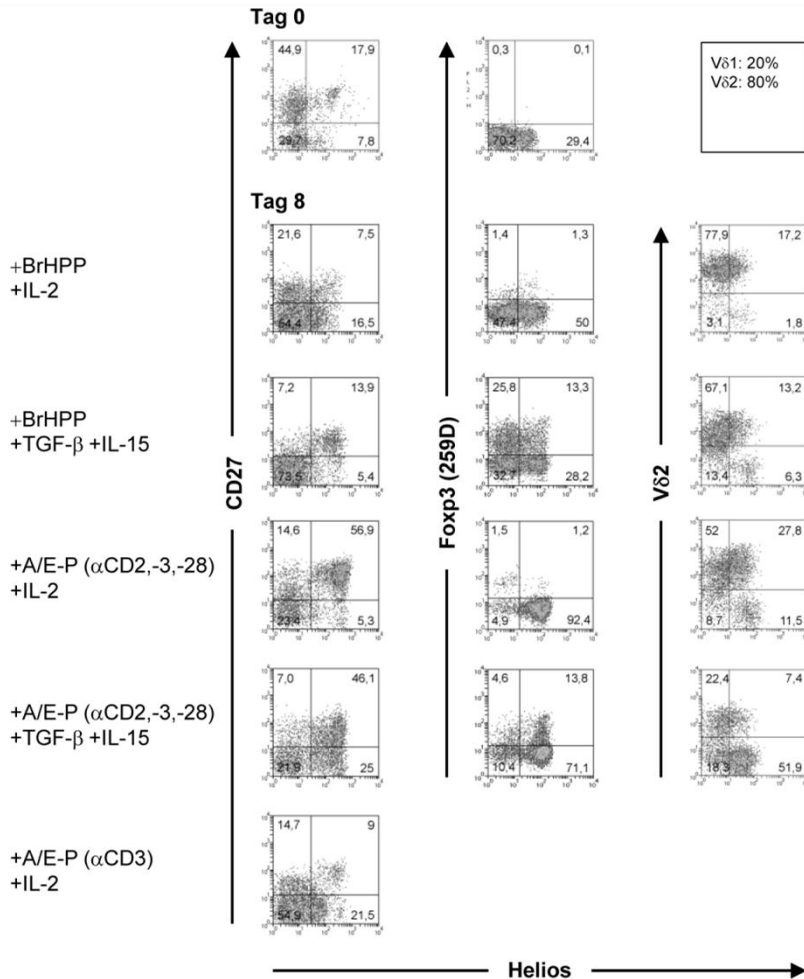


Abb. 23: Korrelation der Helios-Proteinexpression mit CD27, Foxp3 und Vδ2 bei unterschiedlichen $\gamma\delta$ T-Zell-Expansionsbedingungen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden entweder mit Hilfe von A/E-Partikeln oder von BrHPP stimuliert. Die unterschiedlich stimulierten Zellen wurden entweder in Anwesenheit von IL-2 (50 U/mL) oder von TGF-β1 (1,7 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL) und IL-2 (10 U/mL) kultiviert. Die Koexpression von CD27, Foxp3 und TZR δ 2 mit Helios ist als Punktwolken-darstellung für jeweils einen repräsentativen von insgesamt vier Spendern abgebildet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden CD27 und TZR δ 2 durch Fluorochrom-gekoppelte mAk markiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Intrazelluläre Transkriptionsfaktoren wurden durch spezifische Fluorochrom-gekoppelte mAk markiert (anti-Foxp3: Klon 259D). Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Einteilung der Quadranten wurde anhand der korrespondierenden Isotypkontrolle vorgenommen.

Wurden zur Stimulation der Zellen anstatt der anti-CD2,-3,-28 mAk-umhüllten nur anti-CD3 mAk-umhüllte A/E-Partikel verwendet, kam es zu einer mit der BrHPP-Stimulation vergleichbar schwachen Proteinexpression von Helios und CD27 (Abb. 23).

Die Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit TLR2-Liganden und deren anschließende Stimulation durch A/E-Partikel (anti-CD2,-3,-28 mAk) zeigte keinen Einfluss auf die Proteinexpression von Foxp3 oder GATA-3, führte aber zu einer deutlichen Steigerung der CD27- und Helios-

Proteinexpression (Abb. 22 A, B). Außerdem konnte ein signifikant-negativer Effekt der Vorinkubation auf die Proteinexpression von T-bet festgestellt werden (Abb. 22 C, D).

Der BrHPP-Stimulation folgend wurden V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen selektiv expandiert. Nach Stimulation mit A/E-Partikeln in Anwesenheit von IL-2 kam es ebenfalls zur präferentiellen Expansion von V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 23). Wurde das Medium mit TGF- β 1 und IL-15 supplementiert, ließ sich bei der BrHPP-Stimulation das Auftreten einer kleinen Population (6%), bei A/E-Partikel-Stimulation das einer großen Population von Helios⁺ V δ 2-negativen (V δ 1) $\gamma\delta$ T-Zellen (52%) beobachten (Abb. 23).

Zusammenfassend konnte bei Stimulation mit A/E-Partikeln eine deutlich gesteigerte Helios-Proteinexpression in $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden. Weiterhin konnte die Induzierbarkeit von Foxp3 in Helios-positiven $\gamma\delta$ T-Zellen sowie ein negativer Einfluss von TGF- β 1 und IL-15 auf die CD27- und T-bet-Proteinexpression gezeigt werden.

6.3.3. Korrelation von Helios-Expression und suppressivem Potential bei $\gamma\delta$ T-Zellen

Wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, besitzen polyklonal mit A/E-Partikeln (anti-CD2,-3,-28 mAk) stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen suppressives Potential und können die Proliferation von entsprechend stimulierten Responder T-Zellen negativ beeinflussen (Abb. 6). Die auf verschiedene Weise expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen unterschiedliche Proteinexpressionsmuster von Helios, Foxp3 (Klon 259D), CD27 und T-bet auf. Je nach verwendetem Stimulus (BrHPP oder A/E-Partikel) konnte die Proteinexpression von Treg-spezifischem Foxp3 (Klon 259D) sowohl in Korrelation als auch unabhängig von Helios induziert werden. Es sollte daher geklärt werden, ob die unterschiedlich expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen Unterschiede bezüglich ihrer suppressiven Kapazität aufweisen bzw. ob die Proteinexpression von Helios oder Foxp3 mit dieser in Zusammenhang steht.

$\gamma\delta$ T-Zellen wurden unter Bedingungen, die denen zur Untersuchung der Proteinexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren (Abb. 22) entsprachen, stimuliert und für 16 Tage expandiert. Zur Charakterisierung des Einflusses der unterschiedlichen Expansionsbedingungen wurde die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen fünf Tage nach initialer Stimulation bestimmt. Hiermit sollte u.a. auch untersucht werden, ob der initiale Stimulus in etwa die gleiche Stärke bzw. Qualität besaß. Grundsätzlich proliferierten die BrHPP-stimulierten Zellen stärker (Abb. 25 A). Fünf Tage nach initialer Stimulation (sowohl BrHPP- als auch bei A/E-Partikel-Stimulation) war die Proliferation bei Zugabe von TGF- β 1 geringer als ohne diese. Weiterhin wurden die für 16 Tage expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen mit Hilfe von TPA restimuliert und die intrazelluläre Proteinexpression verschiedener löslicher Mediatoren bestimmt. Bei keiner der verschiedenen Methoden zur Expansion der $\gamma\delta$ T-Zellen konnte intrazellulär eine nennenswerte Proteinexpression von IL-2, IL-4, IL-10 oder IL-12 nachge-

wiesen werden (Daten nicht gezeigt). IFN- γ , TNF- α , Granzym B, CCL3 und CCL5 waren jedoch in allen untersuchten $\gamma\delta$ T-Zellen vorhanden. Beim Vergleich der durch BrHPP- und A/E-Partikel- (in Anwesenheit von IL-2) expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen fiel auf, dass die Proteinexpression von Granzym B und CCL3 in A/E-Partikel-expandierten Zellen höher war, während sich deren IFN- γ -, TNF- α - und CCL5-Proteinexpression kaum von dem BrHPP-expandierter Zellen unterschied. Wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von IL-15 und TGF- β 1 anstatt von IL-2 expandiert, ließ sich nach Restimulation, bei initial A/E-Partikel-

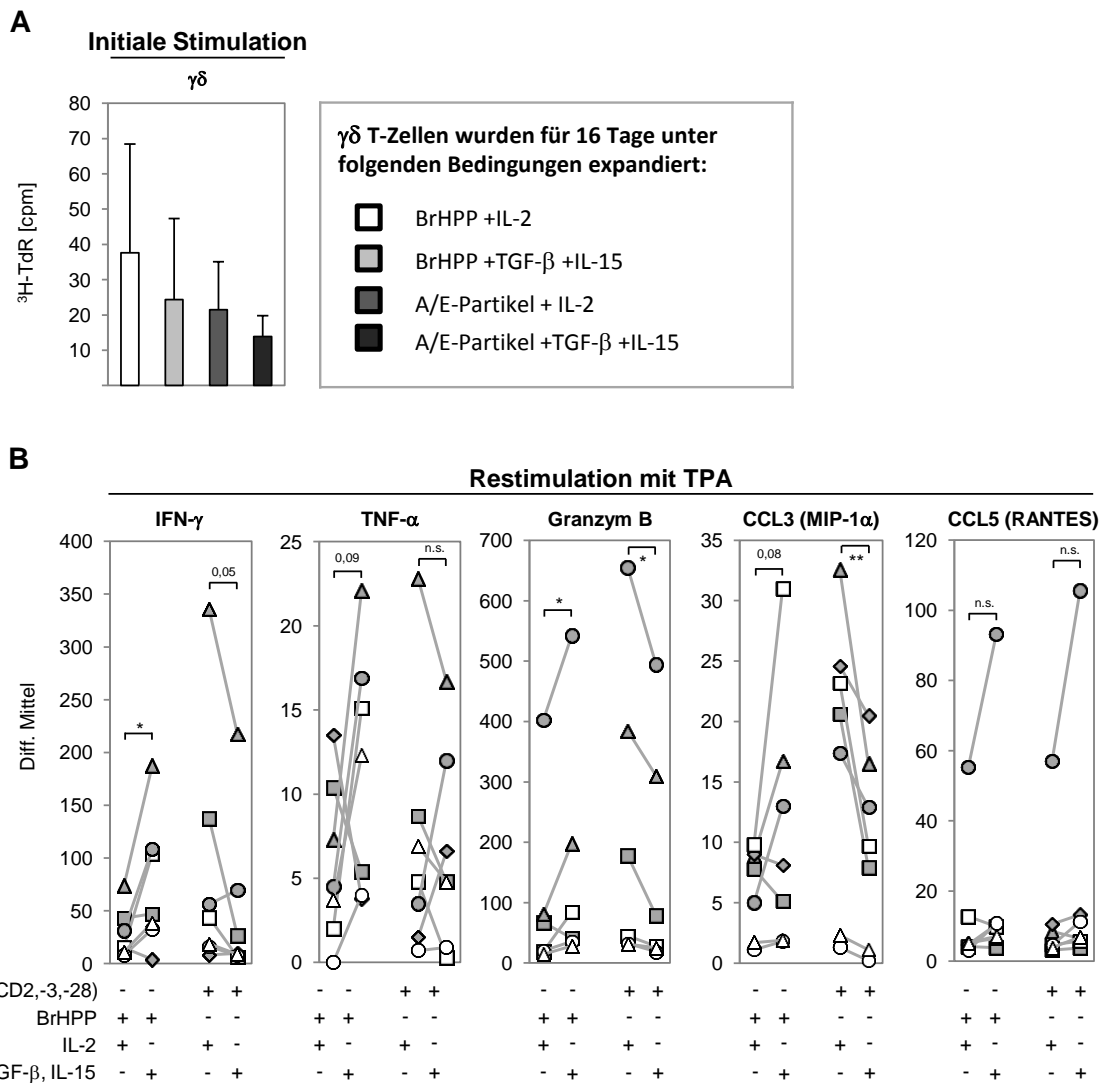


Abb. 24: Charakterisierung unterschiedlich expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden entweder mit Hilfe von A/E-Partikeln oder von BrHPP stimuliert. Die unterschiedlich stimulierten Zellen wurden entweder in Anwesenheit von IL-2 (50 U/mL) oder von TGF- β 1 (1,7 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL) und IL-2 (10 U/mL) kultiviert. **A)** Die Proliferation nach initialer Stimulation wurde nach fünf Tagen durch Bestimmung der ^3H -Thymidininkorporation [^3H -TdR] in Form von experimentellen Triplikaten quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten **B)** Nach 16-tägiger Expansion der $\gamma\delta$ T-Zellen wurden diese für acht Stunden mit TPA restimuliert. Die Exozytose löslicher Mediatoren wurde vier Stunden vor Fixierung mit Hilfe von Monensin blockiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Proteinexpression verschiedener Mediatoren intrazellulär mit Hilfe spezifischer Fluorochrom-gekoppelter mAk durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist die korrigierte mittlere Fluoreszenzintensität. Jedes Symbol repräsentiert einen Spender. Sterne symbolisieren statistische Signifikanz gemäß des studentschen T-Tests (* = $p \leq 0,05$), (** = $p \leq 0,01$), (n.s. = nicht signifikant).

stimulierten ein höherer und bei initial BrHPP-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen ein geringerer Gehalt löslicher Mediatoren feststellen. Bei A/E-Partikel-, TGF- β 1- und IL-15-expandeden $\gamma\delta$ T-Zellen war die Granzym B- (in 6/6 Spendern), CCL3- (in 7/7 Spendern), IFN- γ - (in 5/7 Spendern) sowie die TNF- α -Proteinexpression (in 4/7 Spendern) reduziert. In BrHPP-, TGF- β 1- und IL-15-expandeden $\gamma\delta$ T-Zellen kam es zu einer verstärkten Granzym B- (in 5/6 Spendern), IFN- γ - (in 6/7 Spendern), TNF- α - und CCL3-Proteinexpression (jeweils 5/7 Spender). Die CCL5-Proteinexpression schien bei $\gamma\delta$ T-Zellen unabhängig von deren initialer Stimulation erhöht zu sein, wenn diese in Anwesenheit von TGF- β 1 und IL-15 expandiert wurden.

Zur funktionellen Analyse der suppressiven Kapazität der auf unterschiedliche Weise expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurden diese zusammen mit autologen (bis zur Verwendung kryokonservierten) Responder T-Zellen kokultiviert. Es wurden zwei verschiedene Methoden der Stimulation bzw. Restimulation zur Analyse des suppressiven Potentials verwendet. Zum einen wurden die auf verschiedene Weise expandierten $\gamma\delta$ - und die kokultivierten Responder T-Zellen durch A/E-Partikel stimuliert. Diese Weise der polyklonalen Stimulation entspricht der für die Suppressionsversuche mit frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen verwendeten Methode (Abb. 6). Die auf unterschiedliche Weise expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen proliferierten in Solokultur nach Restimulation nur schwach. Eine Ausnahme stellten A/E-Partikel-, TGF- β 1- und IL-15-expandede Zellen dar, welche ein starkes proliferatives Potential besaßen. Diese wiesen gefolgt von BrHPP-, TGF- β 1- und IL-15-expandeden $\gamma\delta$ T-Zellen in Kokultur mit Responder T-Zellen die stärkste Proliferation auf. Die ohne Zusatz von TGF- β 1 und IL-15 expandierten Zellen proliferierten in Kokultur nur schwach (Abb. 25 A). Das Wachstum der kokultivierten Responder T-Zellen wurde von allen, außer von denen unter Verwendung von BrHPP, TGF- β 1 und IL-15 expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen, supprimiert (Abb. 25 A).

Als weitere Methode zur Untersuchung des suppressiven Potentials wurden beide Zellpopulationen jeweils spezifisch, in Anwesenheit antigenpräsentierender Zellen durch BrHPP und ein SE-Gemisch stimuliert. Auf diese Weise mit Responder T-Zellen kokultivierte $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen eine sehr eingeschränkte Proliferation auf. Nur die initial durch A/E-Partikel stimulierten, unter Zusatz von TGF- β 1 und IL-15 expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen proliferierten sowohl in Ko- als auch in Solokultur stark. Bei diesem methodischen Ansatz zur Suppressionsanalyse waren nur diese $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage die Proliferation der Responder T-Zellen deutlich zu supprimieren (Abb. 25 C). Zusammenfassend konnte also festgestellt werden, dass es durch Supplementierung des Zellkulturmediums mit TGF- β 1 und IL-15 (auch wenn die Treg-spezifische Foxp3-Proteinexpression (Klon 259D) festgestellt wurde) nicht zwangsläufig Treg entstanden, sondern dass die Art und Weise der initialen Stimulation hierfür ebenfalls entscheidend war.

- Ergebnisse -

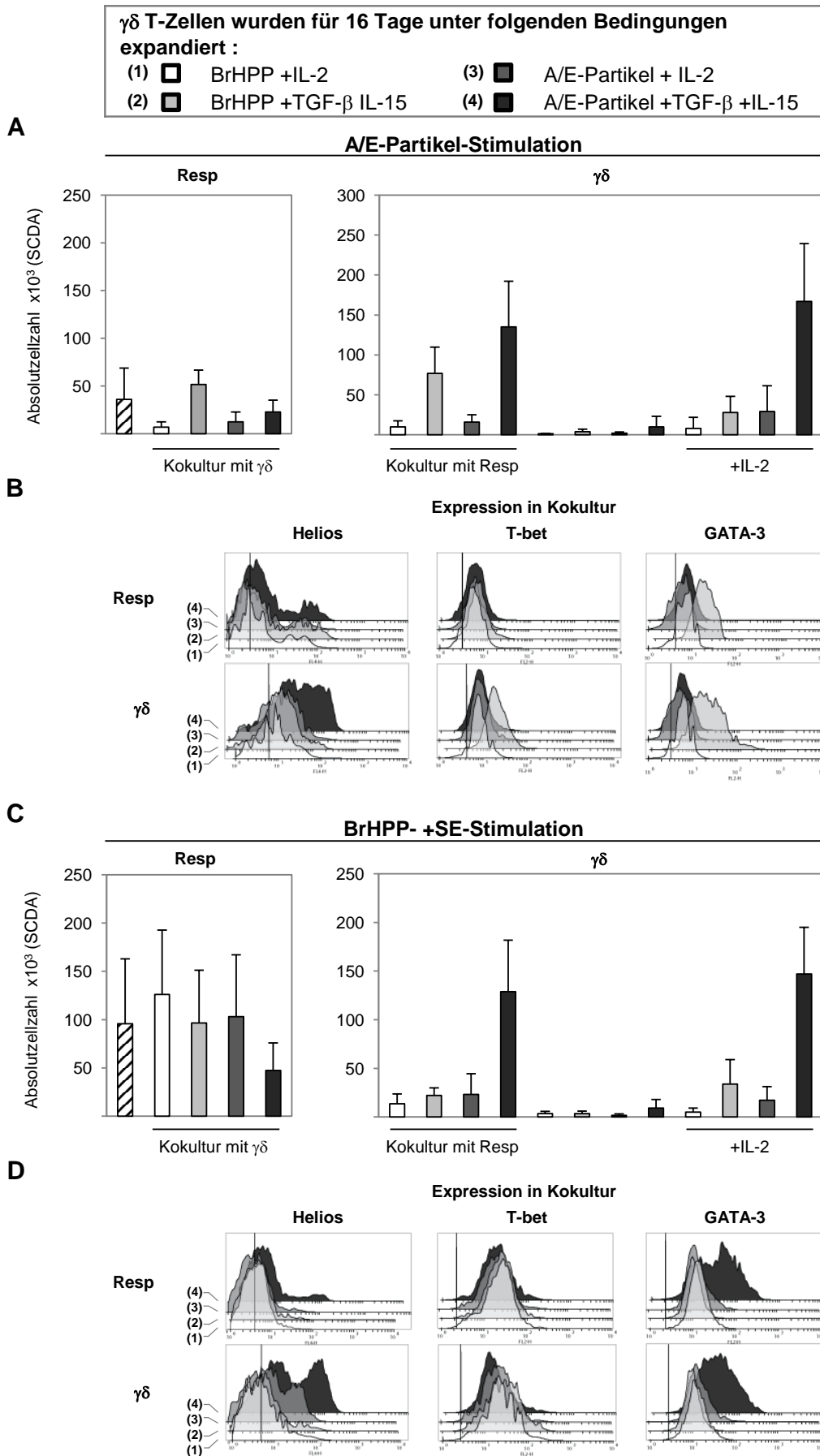


Abb. 25: Suppressives Potential der verschiedenen expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen wurden entweder mit A/E-Partikeln oder BrHPP stimuliert. Die unterschiedlich stimulierten Zellen wurden entweder in Anwesenheit von IL-2 (50 U/mL) oder von TGF- β 1 (1,7 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL) und IL-2 (10 U/mL) kultiviert. Nach einem Expansionszeitraum von 16 Tagen wurden die

unterschiedlich expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen zusammen mit autologen Responder T-Zellen oder alleine (in Anwesenheit von 50 U/mL IL-2) kultiviert. **A), B)** Zur Stimulation der solo- und kokultivierten Zellen wurden A/E-Partikel verwendet. **C), D)** Die solo- und kokultivierten Zellen wurden unter Verwendung von BrHPP und des SE-Gemisches stimuliert. Die Proliferation der einzelnen Zellpopulationen wurde nach sechs (C) bzw. sieben (A) Tagen durchflusszytometrisch anhand der Absolutzellzahl vitaler Zellen unter Verwendung der SCDA-Methode ermittelt. Im Säulendiagramm sind die Mittelwerte aus sechs (A) bzw. fünf (C) unabhängigen Experimenten mitsamt der dazugehörigen Standardabweichung dargestellt, wobei die Daten einzelner Experimente jeweils durch Vierfach- (Responder Solo- und Kokulturen) bzw. Dreifachbestimmung ($\gamma\delta$ Solokulturen) erhaltene experimentelle Mittelwerte repräsentieren. **B), D)** Dargestellt ist die Proteinexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren in Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen, an Tag 6 der Kokultur, anhand eines exemplarischen Spenders. Zur Differenzierung von Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen wurden diese durch spezifische Fluorochrom-gekoppelte mAk (anti-CD4 und anti-TZR δ 2) markiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Transkriptionsfaktoren Helios, T-bet und GATA-3 intrazellulär mit Hilfe spezifischer Fluorochrom-gekoppelter mAk markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die einzelnen Histogramme wurden anhand der vertikalen Linie, die der mittleren Fluoreszenz der jeweiligen korrespondierenden Isotypkontrollen entsprechen, ausgerichtet. B): Stimulation wie A); D): Stimulation wie C).

Um zu untersuchen, ob die festgestellten regulatorischen Funktionen (Abb. 25 A, C) mit der Expression der untersuchten Transkriptionsfaktoren (Helios, Foxp3, T-bet, GATA-3) korrelierten, wurde deren Proteinexpression in kokultivierten Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen analysiert. Nach der Restimulation war in keinem Fall mehr die Foxp3-Proteinexpression nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Eine deutliche Helios-Proteinexpression wurde in $\gamma\delta$ T-Zellen, die unter Verwendung von A/E-Partikeln, TGF- β 1 und IL-15 expandiert wurden, bei beiden verwendeten (Re-)stimulations-Methoden festgestellt. Eine vergleichsweise schwächere Helios-Proteinexpression war bei BrHPP-Restimulation von A/E-Partikel- und IL-2-expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu beobachten. Sowohl die unterschiedlich expandierten $\gamma\delta$ - als auch die Responder T-Zellen wiesen bei BrHPP-(Re-)stimulation eine in Relation zur A/E-Partikel-(Re-)stimulation leicht erhöhte Proteinexpression von T-bet und GATA-3 auf. Bei (Re-)stimulation der Zellen durch A/E-Partikel wurde nur bei Kokultivierung mit BrHPP-, TGF- β 1- und IL-15-expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen keine Suppression der Responder T-Zell-Proliferation beobachtet. Dies korrelierte sowohl mit einer gesteigerten GATA-3-Proteinexpression in Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen als auch mit der von T-bet in den $\gamma\delta$ T-Zellen. Die übrigen unterschiedlich konditionierten $\gamma\delta$ - und kokultivierten Responder T-Zellen wiesen bei dieser (Re-)stimulationmethode nur eine geringe GATA-3- und T-bet-Proteinexpression auf (Abb. 25 B). Im Gegensatz hierzu kam es bei BrHPP-/SE-Gemisch-(Re-)stimulation A/E-Partikel-, TGF- β 1- und IL-15-expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen zur Suppression der Proliferation kokultivierter Responder T-Zellen. Diese korrelierte mit einer gesteigerten GATA-3-Proteinexpression in Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 25 D).

Bei der Untersuchung des suppressiven Potentials der expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte sich, dass nach Restimulation weder die Helios- noch die Foxp3-Proteinexpression direkt mit dem suppressiven Potential der Zellen korrelierten. Für die GATA-3- (und T-bet-) Proteinexpression ließ sich eine solche Korrelation allerdings beobachten.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an den unterschiedlich expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Die korrigierten Fluoreszenzintensitäten der durchflusszytometrisch untersuchten Moleküle wurden an den in Abbildung 22 B, D (anhand der erhaltenen Mittelwerte) bzw. Abbildung 24 B, D betrachteten Zeitpunkten quantifiziert und tabellarisch dargestellt [- = <5; + = 5-50; ++ = 51-200; +++ = >200]. Die in Abbildung 25 untersuchte Proliferation solokultivierter $\gamma\delta$ T-Zellen wurde ebenfalls anhand der erhaltenen Mittelwerte quantifiziert und tabellarisch dargestellt [- = <5; + = 5-50; ++ = 51-100; +++ = >100]. Die Suppression der Responder T-Zell-Proliferation in Kokultur wurde in Relation zu ihrer Proliferation in Solokultur prozentual dargestellt.

Tab. 3: Einfluss der unterschiedlichen Expansionsbedingungen auf den Phänotyp der $\gamma\delta$ T-Zellen.

		$\gamma\delta$			
		+BrHPP +IL-2	+BrHPP +IL-15 +TGF- β 1	+A/E-Partikel +IL-2	+A/E-Partikel +IL-15 +TGF- β 1
Expression nach initialem Stimulus					
	CD27	+	+	+++	+
	Helios	+	+	++	++
	Foxp3 (259D)	-	+	-	+
	T-bet	++	+	++	+
	GATA-3	+	+	++	+
Expression löslicher Mediatoren nach Restimulation					
	IFN- γ	+	++	++	+
	TNF- α	+	+	+	+
	CCL3	+	+	+	+
	Granzym B	++	++	+++	++
	CCL5	+	+	+	+
Proliferation/Suppression					
	A/E-Partikel-Stimulation (Solokultur)	+	+	+	+++
	A/E-Partikel-Stimulation (Kokultur)	+	++	+	+++
	A/E-Partikel-Stimulation (Suppression)	81%	-43%	65%	37%
	BrHPP- +SE-Stimulation (Solokultur)	+	+	+	+++
	BrHPP- +SE-Stimulation (Kokultur)	+	+	+	++
	BrHPP- +SE-Stimulation (Suppression)	-32%	-1%	-8%	51%

7. Diskussion

7.1. $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen suppressives Potential

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass frisch isolierte humane $\gamma\delta$ -mit Responder ($CD4^+CD25^-$) T-Zellen interagieren und in der Lage sind deren Proliferation zu supprimieren. Diese Ergebnisse lassen sich mit Beobachtungen in Einklang bringen, die auf eine Regulation der $\alpha\beta$ T-Zell-Immunantwort durch $\gamma\delta$ T-Zellen hindeuten (Bhagat *et al.* 2008; Kühl *et al.* 2009; Traxlmayr *et al.* 2010). Traxlmayr *et al.* beschrieben eine $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression, welche die Anwesenheit von APZ benötigt (Traxlmayr *et al.* 2010). In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen auch in Abwesenheit von APZ die Proliferation von Responder T-Zellen supprimieren können und dass APZ für eine $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression nicht notwendig sind. Im Gegensatz zu den von Traxlmayr *et al.* durchgeführten Untersuchungen wurden $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen hierbei nicht antigenspezifisch, sondern polyklonal durch A/E-Partikel stimuliert (Abb. 6). Um auszuschließen, dass regulatorische Effekte direkt oder indirekt auf bereits in den $CD4^+$ T-Zellen vorhandene konventionelle Treg zurückzuführen sind, wurden der $CD25^+$ Anteil der $CD4^+$ T-Zellen depletiert. Erst die dadurch entstandenen Responder T-Zellen ($CD4^+CD25^-$) wurden zur Untersuchung des suppressiven Potentials von $\gamma\delta$ T-Zellen verwendet. Aufgrund der Verwendung von autologen Responder T-Zellen unterscheiden sich die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen klar von denen von Kühl *et al.* durchgeführten, die ebenfalls eine durch polyklonal stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelte Suppression beobachteten. In den von Kühl *et al.* durchgeführten Untersuchungen konnte allerdings weder der Suppressionsmechanismus aufgeklärt, noch festgestellt werden, ob nur

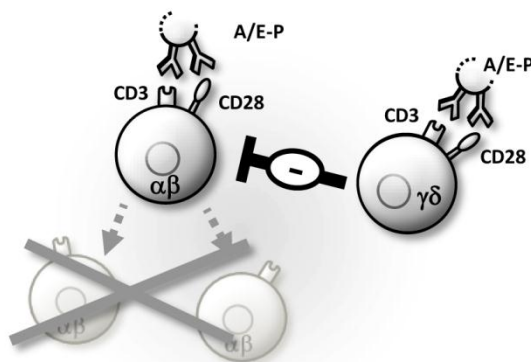


Abb. 26: Schematische Darstellung der Inhibition der Responder T-Zell-Proliferation durch $\gamma\delta$ T-Zellen.

bestimmte $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen suppressive Eigenschaften besitzen (Kühl *et al.* 2009).

In vorliegender Arbeit wurden $\gamma\delta$ T-Zellen im gleichen Mengenverhältnis mit Responder T-Zellen kokultiviert. Innerhalb der PBMZ kommen $\gamma\delta$ - und $\alpha\beta$ T-Zellen normalerweise nicht im gleichen Verhältnis zueinander vor, da $\gamma\delta$ T-Zellen nur einen geringen Anteil der PBMZ ausmachen. Ein ausgeglichenes Verhältnis beider Popula-

tionen kann sich aber innerhalb von Lymphknoten in der Mikroumgebung von DZ oder in Geweben ergeben und kann daher bei der Entstehung von Toleranz eine Rolle spielen. Die Interaktion zwischen $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ T-Zellen bei Stimulation durch anti-CD3 und -CD28 mAk ist in Abbildung 26 schematisch dargestellt.

7.2. $\gamma\delta$ T-Zellen weisen weder einen klassischen Treg Phänotyp auf noch induzieren sie diesen bei Responder T-Zellen

Obwohl $\gamma\delta$ - die Proliferation von Responder T-Zellen supprimierten, unterschieden sich diese doch von klassischen Treg. Anders als bei der Treg-vermittelten Suppression wurde bei der in vorliegender Arbeit untersuchten $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression die Expression der meisten löslichen Mediatoren in Responder T-Zellen nicht negativ beeinflusst. Durch intrazelluläre durchflusszytometrische Untersuchungen und ELISA-Analysen des Zellkulturmediums konnte festgestellt werden, dass es bei Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen zu einer verstärkten Produktion bzw. Freisetzung von IFN- γ , TNF- α , Granzym B, CCL3 und CCL5 kam. Einzig der im Zellkulturmedium festgestellte IL-2-Gehalt war bei Kokultur reduziert (Abb. 7, Abb. 8).

T-Zellen exprimieren die auf Treg konstitutiv vorhandenen Oberflächenmoleküle wie CD25 und CTLA-4 erst nach Aktivierung (Smith 1988; Vignali *et al.* 2008; Linsley *et al.* 1996). In dieser Arbeit konnte auf $\gamma\delta$ T-Zellen keine konstitutive Expression von für Treg charakteristischen Oberflächenmolekülen festgestellt werden. Erst nach A/E-Partikel-Stimulation kam es auf $\gamma\delta$ T-Zellen zur aktivierungsinduzierten Expression von CD25, CD39, LAP und CTLA-4 (Abb. 10, Abb. 11). Hinsichtlich der Oberflächenexpression dieser Moleküle unterscheiden sich $\gamma\delta$ T-Zellen also von Treg und ähneln eher Responder T-Zellen.

$\gamma\delta$ T-Zellen könnten auch indirekt z.B. durch TGF- β regulatorische Funktionen in kokultierten Responder T-Zellen induzieren. Aus dem peripheren Blut isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen, welche die Proliferation von Responder T-Zellen supprimieren, sind Kühl *et al.* zufolge in der Lage TGF- β zu produzieren. Kühl *et al.* vermuten die regulatorische Aktivität und TGF- β -Produktion innerhalb der V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulation (Kühl *et al.* 2009). Auch die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Immunregulation durch Freisetzung von IL-10 wurde, wenn auch bisher nur bei Untersuchungen in der Maus, beschrieben (Rhodes *et al.* 2008). An dem in vorliegender Arbeit untersuchten suppressiven Effekt durch frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen scheinen diese Zytokine allerdings nicht beteiligt zu sein, da diese weder im Zellkulturmedium (TGF- β ; ELISA) noch bei intrazellulärer durchflusszytometrischer Untersuchung (TGF- β und IL-10) nachgewiesen werden konnten (Daten nicht gezeigt).

Zur Charakterisierung von Treg wird häufig der Transkriptionsfaktor Foxp3 verwendet. Für dessen Nachweis können unterschiedliche mAk verwendet werden, von denen die Klone

- Diskussion -

PCH101 und 259D die allgemein gebräuchlichsten sind. Diese unterscheiden sich bezüglich der Antigenerkennung, wobei kontrovers diskutiert wird, welcher am besten zum Nachweis von Treg bzw. der Treg-spezifischen Foxp3-Expression geeignet ist (Tran *et al.* 2007; Pillai & Karandikar 2008; Fox *et al.* 2008). In dieser Arbeit konnte unter Verwendung beider mAk gezeigt werden, dass frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen im Gegensatz zu Treg kein Foxp3 exprimieren (Abb. 20). In der Maus ist eine klare Unterscheidung zwischen Foxp3⁺ Treg und Foxp3⁻ Responder T-Zellen möglich. Im Menschen hingegen wurde beim Nachweis durch den Klon PCH101 ein transienter aktivierungsinduzierter Anstieg der Foxp3-Expression beschrieben. Diese transiente Expression korreliert allerdings nicht mit einer regulatorischen Funktion der Foxp3⁺ Responder T-Zellen (Allan *et al.* 2007). In Übereinstimmung hiermit konnte im Rahmen vorliegender Arbeit nach Stimulation durch A/E-Partikel sowohl bei $\gamma\delta$ - als auch Responder T-Zellen eine transiente Induktion von Foxp3 beim Nachweis durch den Klon PCH101 beobachtet werden (Abb. 21). In der Literatur wird die Möglichkeit in Erwägung gezogen, dass dieser mAk kreuzreaktiv ist und in aktivierten T-Zellen an weitere Proteinen bindet (Tran *et al.* 2007). Der mAk PCH101 interagiert mit Foxp3 im N-Terminalen Bereich, während der andere verwendete Foxp3 Klon 259D im Bereich der Zinkfinger- und der Leucin-Zipper-Domäne (zwischen den Aminosäuren 105-235) bindet, die für die Foxp3-Funktion (Proteininteraktionen bzw. Dimerisierung) notwendig sind (Fox *et al.* 2008). Beide mAk weisen das vollständige Protein und dessen *Splice*-Varianten nach. Der Klon 259D weist allerdings im Gegensatz zu PCH101 keine aktivierungsinduzierte Foxp3-Expression in Responder T-Zellen, sondern nur die Treg-spezifische Expression nach (Tran *et al.* 2007; Fox *et al.* 2008). Bei Verwendung dieses Treg-spezifischen mAk ließ sich in vorliegender Arbeit in A/E-Partikel-stimulierten Zellen weder bei $\gamma\delta$ - noch bei Responder T-Zellen in Solo- oder Kokultur eine Induktion von Foxp3 beobachten (Abb. 21). Ebenso wurde keine Expression bei Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen durch BrHPP festgestellt (Abb. 22).

Zusammenfassend konnte weder bei $\gamma\delta$ T-Zellen noch bei kokultivierten Responder T-Zellen (CD4⁺CD25⁻) nach A/E-Partikel-Stimulation ein klassischer regulatorischer Phänotyp bzw. die Induktion eines solchen beobachtet werden.

7.3. Verschiedene mögliche Mechanismen könnten zur Suppression von $\alpha\beta$ T-Zellen führen

Treg können durch Konkurrenz um Wachstumsfaktoren und die Freisetzung bzw. Produktion suppressiver Mediatoren die Proliferation anderer Zellen supprimieren (de la Rosa *et al.* 2004; Pandiyan *et al.* 2007; Borsellino *et al.* 2007; Deaglio *et al.* 2007; Kobie *et al.* 2006; Collison *et al.* 2007; Belkaid & Rouse 2005; McGeachy *et al.* 2005). Auch für die in vorliegender Arbeit beobachtete Suppression durch $\gamma\delta$ T-Zellen wurde die Möglichkeit eines solchen Suppressionsmechanismus untersucht. Wie Treg sind $\gamma\delta$ T-Zellen auf das

- Diskussion -

Vorhandensein von exogenem IL-2 angewiesen (Chen *et al.* 2006; Schubert *et al.* 2001; Wu *et al.* 2006a; Chen & Letvin 2003a; Wesch *et al.* 1997). Da Konkurrenz um IL-2 als ein möglicher suppressiver Mechanismus von Treg beschrieben ist, könnte dieser auch für die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression relevant sein (de la Rosa *et al.* 2004; Pandiyan *et al.* 2007; Chen & Letvin 2003a; Wesch *et al.* 1997). In vorliegender Arbeit konnte bei der Kokultur von $\gamma\delta$ - mit Responder T-Zellen eine Reduktion der Menge des im Zellkulturmedium vorhandenen IL-2 festgestellt werden (Abb. 15). Durch die Gabe von exogenem IL-2 wurde die Proliferation von Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen zwar gesteigert, allerdings war weiterhin eine Suppression der Responder T-Zellen zu beobachten. Da die Proliferation beider Zellpopulationen bei Gabe von exogenem IL-2 gesteigert war, wäre es möglich, dass die eingeschränkte Proliferation bei Kokultivierung aus einer zu hohen Zelldichte in den Zellkulturkavitäten resultierte. Dies erscheint allerdings unwahrscheinlich, da bei Gabe von IL-2 die Gesamtzellzahlen bei Kokultur deutlich kleiner blieben als die höchsten bei Solokultur von Responder T-Zellen. Der Suppressionsmechanismus ist daher im Wesentlichen als IL-2-unabhängig anzusehen. Es ist allerdings nicht vollständig auszuschließen, dass die Konkurrenz um IL-2 einen Teilaspekt des Suppressionsmechanismus darstellt (Abb. 9). Die festgestellte IL-2-Unabhängigkeit der Suppression stimmt mit Ergebnissen anderer Untersuchungen zur Suppression durch frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen überein. Kühl *et al.* beschreiben beispielsweise eine Suppression der CD4⁺ T-Zell-Proliferation durch Foxp3⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen, die nicht durch Konkurrenz um IL-2 bedingt ist (Kühl *et al.* 2009). Ebenso schlossen Traxlmayr *et al.* bei einer durch mature IL-12-sezernierende DZ induzierten, V δ 2 T-Zell-vermittelten Suppression auf einen IL-2-unabhängigen Mechanismus (Traxlmayr *et al.* 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch Beobachtungen gemacht, die auf eine Rolle von löslichen Mediatoren bei der beobachteten Suppression hinweisen könnten. Erstmals konnte eine CD39-Oberflächenexpression auf (A/E-Partikel-stimulierten) $\gamma\delta$ T-Zellen nachgewiesen werden, während diese auf ko- oder solokultivierten Responder T-Zellen nur schwach vorhanden war (Abb. 11). CD39 ist stark auf der Oberfläche von Treg vorhanden. Es ist beteiligt am Abbau von extrazellulärem ATP, welches proinflammatorische Eigenschaften besitzt. Das beim Abbau entstehende Adenosin besitzt außerdem anti-inflammatorische Eigenschaften (Borsellino *et al.* 2007; Deaglio *et al.* 2007). Somit wäre es denkbar, dass CD39 zur $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression beiträgt, indem es ATP abbaut und zur Produktion von Adenosin beiträgt. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren außerdem die Serin-Protease Granzym B (Pietschmann *et al.* 2009). Durch diese können zytotoxische Effektorfunktionen, aber auch der Abbau der extrazellulären Matrix vermittelt werden. Ein weiterer für Treg beschriebener Mechanismus der Suppression wird durch Granzym B vermittelt (Gondek *et al.* 2005; Loebbermann *et al.* 2012). Diese regulatorische Funktionen wurden vor allem in murinen Treg beschrieben und spielen bei der Funktion humaner Treg wohl keine

bedeutende Rolle (Ashley & Baecher-Allan 2009). Hierfür spricht auch, dass Responder T-Zellen in Kokultur deutlich mehr Granzym B produzieren als Treg (Oberg *et al.* 2010). Man kann daher also annehmen, dass, obwohl $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit A/E-Partikeln deutlich größere Mengen Granzym B als Responder T-Zellen produzieren, dies in keinen Zusammenhang zur beobachteten Suppression steht (Abb. 7, Abb. 8). Die in vorliegender Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Suppressivität frisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen wurden im Gegensatz zu einer Studie von Kühl *et al.* anhand *autologer* Zellpopulationen durchgeführt (Kühl *et al.* 2009). Auf diese Weise wurden (zytotoxische) Effekte gegen *allogene* (CD4⁺ T-) Zellen vermieden, welche als verringerte Proliferation missinterpretiert werden könnten.

7.4. Die Suppression wird durch zellkontaktabhängige Interaktionen vermittelt

Bei Kokultur von A/E-Partikel-stimulierten $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen konnten die suppressiven Zytokine TGF- β und IL-10 nicht nachgewiesen werden. Mit der Konkurrenz um IL-2 ließ sich die beobachtete Suppression ebenfalls nicht ausreichend erklären. Zwar wurde die Expression von Granzym B und CD39 beobachtet, aber die durchgeführten Doppelkammerexperimente weisen darauf hin, dass der direkte Zellkontakt beider Zellpopulationen zur Entstehung der Suppression notwendig ist. Waren die Zellpopulationen durch eine semipermeable Membran voneinander getrennt, wurde die Proliferation der Responder T-Zellen nicht supprimiert (Abb. 9). Bei der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression spielen folglich also vor allem zellkontaktabhängige Interaktionen eine Rolle.

Im Unterschied zu Treg können $\gamma\delta$ T-Zellen auch kostimulatorische Eigenschaften wie z.B. APZ-ähnliche Funktionen aufweisen (Brandes *et al.* 2005; Brandes *et al.* 2009; Meuter *et al.* 2010; Landmeier *et al.* 2009; Himoudi *et al.* 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte die aktivierungsinduzierte Oberflächenexpression von verschiedenen APZ-typischen Molekülen wie z.B. CD80/-86 oder PD-L1 gezeigt werden (Abb. 10, Abb. 11). In diesem Punkt unterscheiden sich $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich von Treg, die keine APZ-typischen kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. Oberflächenmoleküle der B7- und CD28-Familie spielen bekanntermaßen bei der Immunregulation eine zentrale Rolle. Durch die Interaktion von PD-1 und PD-L1 bzw. CTLA-4 und CD80/-86 kann die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen negativ reguliert werden (siehe Kap. 3.5).

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass CD80/-86 auf Responder T-Zellen nur schwach, aber auf $\gamma\delta$ T-Zellen wesentlich stärker exprimiert wurde, während CTLA-4 auf $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen gleichermaßen zu finden war (Abb. 10). Durch Verwendung blockierender anti-CD86 und -CTLA-4 mAk konnte die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression teilweise aufgehoben werden. Die Verwendung eines blockierenden anti-CD80 mAk hatte

- Diskussion -

kaum Einfluss auf die Suppression, was sich entweder durch die geringere Expression von CD80 auf den $\gamma\delta$ T-Zellen oder eine schwächere Interaktion mit CTLA-4 begründen lässt (Abb. 12). Diese Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle der Interaktion von CD86 mit CTLA-4 bei der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression der Responder T-Zell-Proliferation hin. Andererseits scheint auch ein reverses Signal in Richtung der CD80/-86-exprimierenden Zelle möglich zu sein. Es ist bekannt, dass CTLA-4 direkt mit CD80/-86 auf T-Zellen interagieren und die T-Zell-Effektorfunktionen herunterregulieren kann (Paust & Cantor 2005). Die Interaktion von CTLA-4 mit CD80 und/oder CD86 spielt auch bei der Treg-vermittelten Suppression eine Rolle. Durch die Bindung von CTLA-4 kann in DZ ein reverses, CD80/-86-vermitteltes Signal induziert werden, welches den Tryptophan-Stoffwechsel von DZ beeinflusst. Bei Verwendung eines blockierenden anti-CTLA-4 mAk wird die durch Treg induzierte und DZ vermittelte Suppression von Effektor T-Zellen abgeschwächt (Fallarino *et al.* 2003; Grohmann *et al.* 2002). Die Verwendung eines solchen mAk wirkt der Expression vonIDO in DZ entgegen (Munn *et al.* 2004). IDO beeinflusst den Tryptophan-Stoffwechsel und wirkt auf diese Weise immunsuppressiv. Durch membran-gebundenes oder lösliches CTLA-4/Fc-Fusionsprotein kann in DZ ein reverses CD80/-86-Signal ausgelöst werden, welches die Expression von IDO induziert (Puccetti & Grohmann 2007; Fallarino *et al.* 2003; Grohmann *et al.* 2002). Nach Blockierung von CD80/-86 durch plattengebundenes CTLA-4/Fc ließ sich in vorliegender Arbeit eine gesteigerte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen beobachten. Weiterhin wurde die Proliferation der Responder T-Zellen durch CTLA-4/Fc negativ beeinflusst. Die durch CTLA-4/Fc gesteigerte Proliferation der CD80/-86-exprimierenden $\gamma\delta$ T-Zellen weist auf das Vorhandensein eines solchen reversen Signals hin. Die verringerte Proliferation der Responder T-Zellen wurde vermutlich durch die CTLA-4/Fc-vermittelte Blockade des kostimulatorischen CD80/-86-Signals bedingt (Abb. 12). Es wäre allerdings auch denkbar, dass ein reverses CD80/-86-Signal außerdem zur Expression von IDO in $\gamma\delta$ T-Zellen führt, welches die Responder T-Zell-Proliferation ebenfalls negativ beeinflussen könnte.

Durch Bindung von PD-L1 an PD-1 wird sowohl die Proliferation als auch die Zytokinproduktion inhibiert (Freeman *et al.* 2000). Es ist bekannt, dass es nach TZR-Stimulation auf $\gamma\delta$ T-Zellen zur Oberflächenexpression von PD-1 kommt (Agata *et al.* 1996; Iwasaki *et al.* 2011). Dies konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Die beobachtete Oberflächenexpression von PD-1 war auf $\gamma\delta$ - allerdings deutlich schwächer als auf Responder T-Zellen. Die Expression von PD-L1 (nicht aber von PD-L2) konnte ähnlich stark ausgeprägt sowohl auf Responder- als auch erstmalig auf $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden (Abb. 10). Das Expressionsmuster von Rezeptor und Ligand kann sowohl für eine $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Regulation als auch für eine durch Responder T-Zell selbst vermittelte Regulation der Proliferation sprechen. In vorliegender Arbeit konnte die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression

- Diskussion -

durch anti-PD-L1 mAk aufgehoben werden, während sie durch anti-PD-1 mAk nur schwach positiv beeinflusst wurde (Abb. 10, Daten nicht gezeigt). Diese Tatsache lässt sich auf verschiedene Weise erklären. Eine Möglichkeit könnte wie von Sharp *et al.* vermutet die Bindung von PD-L1 an einen weiteren, bisher unbekanntem (negativ-) kostimulatorischen Rezeptor sein (Sharpe & Freeman 2002). Diese Möglichkeit scheint in Anbetracht der vorhandenen Literatur zur PD-1 : PD-L1-Interaktion nicht unwahrscheinlich, da viele der funktionellen Untersuchungen dieser Interaktion nur auf der Blockierung von PD-L1 beruhen bzw. bei Nutzung beider blockierenden mAk nur Effekte durch anti-PD-L1 beobachtet wurden (Brown *et al.* 2003; Rodig *et al.* 2003; Nakamoto *et al.* 2009; Radziewicz *et al.* 2007). Die in vorliegender Arbeit gemachte Beobachtung, dass durch anti-PD-L1 mAk, nicht aber durch PD-1/Fc die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression der Responder T-Zell-Proliferation teilweise aufgehoben wurde, spricht ebenfalls für diese Hypothese (Abb. 12). Auch eine nicht effiziente Blockade der PD-1 : PD-L1-Interaktion durch den in vorliegender Arbeit verwendeten anti-PD-1 mAk wäre denkbar. Eine andere Erklärung wiederum wäre die Existenz eines PD-L1-vermittelten reversen Signals. Es ist beschrieben, dass ein solches Signal die Reifung von DZ inhibieren kann (Kuipers *et al.* 2006). Man könnte daher vermuten, dass die in vorliegender Arbeit festgestellte gesteigerte Responder T-Zell-Proliferation nach Zugabe von anti-PD-L1 mAk auf ein reverses PD-L1-Signal zurückzuführen ist. Dies erscheint allerdings unwahrscheinlich, da $\gamma\delta$ T-Zellen PD-L1 in gleichem Maße wie Responder T-Zellen auf ihrer Oberfläche exprimierten, aber ihre Proliferation durch den mAk nicht beeinflusst wurde. Des Weiteren wurde eine Interaktion von PD-L1 und CD80 beschrieben, die in einem bidirektionalen, inhibitorischen Signal mündet (Park *et al.* 2010). Allerdings ließ sich in vorliegender Arbeit (wie bereits erwähnt), bei Blockade von

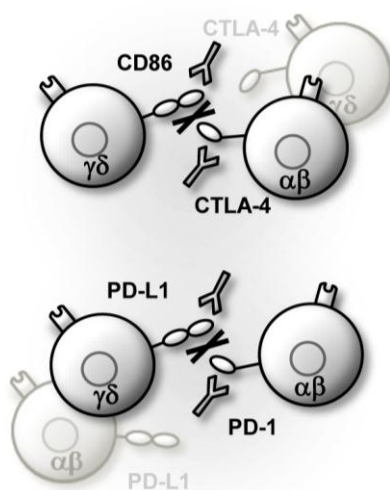


Abb. 27: Schematische Darstellung negativ-kostimulatorischer Interaktionen, zwischen $CD4^+$ und $\gamma\delta$ T-Zellen bzw. deren Blockierung.

CD80 durch einen mAk kein Einfluss auf die Suppression beobachten (Abb. 12). Man kann folglich davon ausgehen, dass die CD80 : PD-L1-Interaktion oder ein reverses PD-L1-Signal für die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression nicht von Bedeutung ist.

In dieser Arbeit konnte auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach Stimulation mit A/E-Partikeln die aktiverungsinduzierte Expression von CD28, CD80, CD86, CTLA-4, PD-1 und PD-L1 und festgestellt werden. Bis auf die Oberflächenexpression von CD80/-86 wurden diese auch auf Responder T-Zellen festgestellt. Anhand von Blockierungsstudien konnte

gezeigt werden, dass sowohl die Interaktion von CTLA-4 mit CD86 als auch die von PD-L1 mit seinem Rezeptor bei der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression von Responder T-Zellen eine Rolle spielt (Abb. 10, Abb. 12). Beide Signalwege können zum Zellzyklusarrest führen und auf diese Weise zur Suppression der Responder T-Zellen beitragen (Sharpe & Freeman 2002). Vermutlich spielt die Interaktion von PD-1 und PD-L1 bei der Regulation und Entstehung von peripherer Toleranz eine geringere Rolle als die von CTLA-4 und CD80,-86 (Sharpe & Freeman 2002). Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine zentralere Rolle der CTLA-4 : CD86-Interaktion für die Entstehung der beobachteten Suppression hin. Da CTLA-4 der CD28-vermittelten Kostimulation entgegenwirkt, wird indirekt auch die IL-2-Produktion negativ beeinflusst, während PD-1 diese nicht negativ beeinflusst (Sharpe & Freeman 2002). In vorliegender Arbeit wurde bei Kokultur von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen eine Abnahme der IL-2-Menge im Zellkulturmedium festgestellt, was auf eine verminderte Produktion von IL-2 zurückzuführen sein könnte. Bei *in situ* Experimenten mit murinen T-Zellen konnte wiederum durch die Zugabe von exogenem IL-2 die PD-L1/Fc-Fusionsprotein-vermittelte Suppression von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen aufgehoben werden (Carter *et al.* 2002). Eine Aufhebung der Suppression durch Supplementierung der Kokultur mit IL-2 konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden (Abb. 9), was wiederum für einen geringeren Einfluss der PD-1 : PD-L1-Interaktion spricht. Es lässt sich daher mutmaßen, dass die CTLA-4 : CD86-Interaktion eine bedeutendere Rolle für die in dieser Arbeit beobachtete $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression spielt.

Die durch PD-1 und CTLA-4 vermittelten Signale wirken der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges entgegen. Nach Ligandenbindung werden sowohl von PD-1 als auch CTLA-4 Phosphatasen rekrutiert, was zur Dephosphorylierung verschiedener Signalmoleküle führt (siehe Schema; Abb. 3). In dieser Arbeit ließ sich bei Kokultur von Responder- und $\gamma\delta$ T-Zellen eine entsprechend reduzierte Phosphorylierung von AKT und NF- κ B beobachten. Der zugrundeliegende Mechanismus ist in Kapitel 7.7 näher diskutiert (Abb. 19). Die Annahme, dass sowohl die Interaktion der Oberflächenmoleküle CTLA-4 : CD86 und PD-1 : PD-L1 wichtig für den $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten immunregulatorischen Effekt ist, wird zusätzlich durch den die Immunsuppression aufhebenden Effekt von TLR2-Liganden unterstützt. In Korrelation mit diesem konnte eine Modulation der Oberflächenexpression von PD-1, PD-L1, CTLA-4 und CD86 festgestellt werden (Abb. 14).

7.5. TLR2-Liganden modulieren die Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen

$\gamma\delta$ T-Zellen weisen ein breites Wirkungsspektrum und eine gewisse Plastizität in ihrer Funktionalität auf und können sowohl zytotoxische Effektorfunktionen als auch immunregulatorische oder APZ-ähnliche Funktionen ausüben (Vantourout & Hayday 2013). TLR repräsentieren einen möglichen Mechanismus zur Differenzierung zwischen immunsuppres-

- Diskussion -

siven und proinflammatorischen Funktionen. Durch die Expression von TLR sind $\gamma\delta$ T-Zellen beispielsweise in der Lage effektiv auf eine Infektion zu reagieren, was darauf hindeutet, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer Immunantwort spielen können (Wesch *et al.* 2011). Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen reagieren nicht direkt auf TLR-Stimulation, sondern benötigen einen zusätzlichen TZR-Stimulus (Pietschmann *et al.* 2009; Wesch *et al.* 2006). Neben diesen direkten kostimulatorischen Effekten sind für $\gamma\delta$ T-Zellen auch indirekte durch von TLR-exprimierenden DZ vermittelte Effekte von TLR-Liganden beschrieben worden (Pietschmann *et al.* 2009; Shrestha *et al.* 2005). In der Publikation von Deetz *et al.* ist zwar eine TLR2-Ligand-vermittelte (Pam₃CSK4) Kostimulation von $\gamma\delta$ T-Zell-Linien beschrieben, allerdings konnten in deren Untersuchungen indirekte TLR-Effekte durch in der Zellkultur verbliebene APZ nicht ausgeschlossen werden. Um indirekte Effekte ausschließen zu können, wurde in vorliegender Arbeit der Einfluss von TLR2-Liganden auf die Interaktion von $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen in Abwesenheit von APZ untersucht. Eine TLR2-Liganden-verstärkte Produktion löslicher Mediatoren (IFN- γ , CXCL8 (IL-8), CCL5) konnte zuerst in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen (Pietschmann *et al.* 2009) und im Weiteren auch in vorliegender Arbeit bestätigt werden. Es wurde eine verstärkte Produktion der Mediatoren IFN- γ , TNF- α , CCL5 und Granzym B nachgewiesen (Abb. 15). Auch bei Kokultur der TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ - mit Responder T-Zellen war die Produktion dieser Mediatoren sowie zusätzlich die von IL-2 gesteigert (Abb. 15).

Es ist bekannt, dass es durch TLR2-Liganden zur Aufhebung der durch humane Treg vermittelten Suppression der Responder (CD4⁺CD25⁻) T-Zell-Zytokinproduktion kommt (Oberg *et al.* 2010). Eine erhöhte bzw. wiederhergestellte IL-2-Produktion bei Kokultivierung mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zell in vorliegender Arbeit könnte also ebenfalls die Aufhebung der Suppression der IL-2-Produktion darstellen (Abb. 7). Allerdings folgt, wie in Kapitel 7.3 festgestellt wurde, aus einem gesteigerten IL-2-Gehalt im Zellkulturmedium nicht die Aufhebung der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression der Responder T-Zell-Proliferation. Dennoch konnte eine TLR2-Liganden-abhängige (partielle) Aufhebung der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression der Responder T-Zell-Proliferation festgestellt werden. Diesbezüglich besteht eine Analogie zu Treg, für die ebenfalls eine TLR-Liganden-induzierte Modulation der Suppression beschrieben ist. Während TLR(4,5) -Liganden die Treg-vermittelte Suppression verstärken, wird diese bei murinen und auch humanen Treg durch TLR2-Liganden aufgehoben (Caramalho *et al.* 2003; Crellin *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006; Suttmüller *et al.* 2006; Oberg *et al.* 2010).

Außerdem konnte in vorliegender Arbeit erstmals ein direkter kostimulatorischer Einfluss von TLR2-Liganden auf die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl in Solo- (in Anwesenheit von IL-2) als auch in Kokultur mit Responder T-Zellen demonstriert werden (Abb. 13). Für humane und murine CD4⁺- und CD8⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen ist bereits ein kostimulatorischer,

proliferationssteigernder Effekt von TLR2-Liganden (Pam₃CSK4) beschrieben worden (Lee *et al.* 2009; Komai-Koma *et al.* 2004). Auch die Proliferation muriner nTreg kann durch TLR2-Liganden verstärkt werden (Sutmuller *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006). Ebenso wie für diese beschrieben, konnte in vorliegender Arbeit nur in Anwesenheit von IL-2 ein deutlicher positiver Einfluss der TLR2-Liganden auf die Proliferation solokultivierter $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden (Abb. 13).

7.6. Für die suppressive Rolle der CTLA-4 : CD86 und der PD-1 : PD-L1-Interaktion spricht auch die Modulation der beteiligten Oberflächenmoleküle nach TLR2-Liganden-Vorinkubation

Die in vorliegender Arbeit beobachtete TLR2-Liganden-induzierte Abnahme des suppressiven Potentials und die damit einhergehend verstärkte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen entspricht den für Treg beschriebenen TLR2-Liganden-vermittelten Effekten (Abb. 13) (Sutmuller *et al.* 2006; Liu *et al.* 2006; Oberg *et al.* 2010). Allerdings unterscheidet sich, wie in den Kapiteln 7.1 - 7.5 festgestellt wurde, die in vorliegender Arbeit beobachtete durch frisch isolierte A/E-Partikel-stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelte Suppression von der Treg-vermittelten. Die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression wird demnach hauptsächlich durch die Interaktion von CD86 und CTLA-4 bzw. PD-L1 und seinem Liganden vermittelt und entspricht eher der durch tolerogene DZ vermittelten Suppression (Kap. 7.4). Es ist bekannt, dass auch das immunregulatorische Potential von DZ TLR-abhängig moduliert werden kann. TLR können zur Reifung von DZ beitragen, was zum Wandel von einem tolerogenen zu einem die Immunantwort stimulierenden Phänotyp führt (Steinman & Hemmi 2006; Akira & Takeda 2004). Für DZ ist die TLR2-Liganden-abhängige Modulation bzw. gesteigerte Expression von Molekülen der B7-Familie wie CD80/-86 und PD-L1 vielfach beschrieben worden. Die TLR2-Liganden Pam₂CSK4 und Pam₃CSK4 führen zur Reifung humaner DZ und zur Heraufregulation von CD83 und CD86 (Peiser *et al.* 2008). Bei murinen DZ führt die Bindung des TLR2-Liganden FSL-1 an TLR2 zur gesteigerten Expression von CD80, CD86 und MHC II (Kiura *et al.* 2006). In vorliegender Arbeit konnte ebenfalls die TLR2-Liganden-bedingte Steigerung der Oberflächenexpression von CD80 und -86 auf A/E-Partikel-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen demonstriert werden (Abb. 14). Außerdem konnte eine gesteigerte Expression des MHC II-Moleküls HLA-DR festgestellt werden, welches ebenfalls auf der Oberfläche reifer APZ exprimiert wird (Abb. 14).

Auf humanen Plasmazellen von multiplen Myelompatienten wird die PD-L1-Oberflächenexpression durch TLR2-Liganden verstärkt (Liu *et al.* 2007). Die in vorliegender Arbeit beobachtete verstärkte PD-L1-Oberflächenexpression auf TLR2-Liganden-vorinkubierten, mit Responder T-Zellen kokultivierten $\gamma\delta$ T-Zellen spricht dafür, dass TLR2-Liganden auch

- Diskussion -

bei $\gamma\delta$ T-Zellen die PD-L1-Oberflächenexpression verstärken, hier allerdings nur kostimulatorisch in Verbindung mit TZR-Stimulation (Abb. 14). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass PD-L1 außer mit dem negativ-kostimulatorischen Molekül PD-1 auch mit einem bisher nicht näher charakterisierten, positiv-kostimulatorischen Molekül interagiert (Dong *et al.* 1999; Tamura *et al.* 2001). Für eine solche Interaktion spricht u.a. dass es in

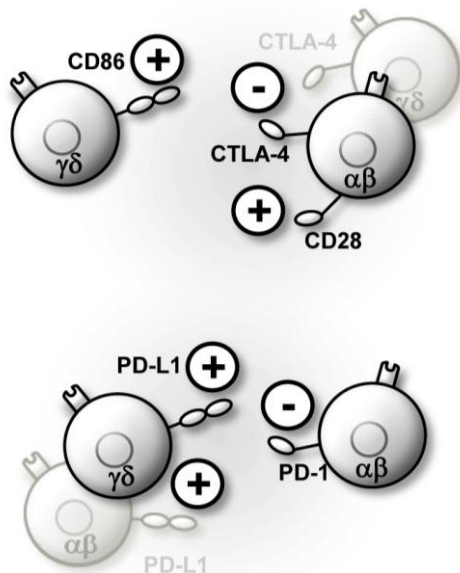


Abb. 28: Schematische Darstellung der Modulation kostimulatorischer Oberflächenmoleküle, nach TLR2-Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen.

Abhängigkeit von PD-L1-Kostimulation durch immobilisiertes PD-L1/Fc bei murinen T-Zellen zu einer gesteigerten Proliferation kommt. Außerdem konnte bei Kostimulation muriner Th-Zellen durch PD-L1/Fc die Produktion von IFN- γ in ähnlicher Weise wie bei Kostimulation durch CD28 erhöht werden (Dong *et al.* 1999; Tamura *et al.* 2001). Von einer solchen positiv-kostimulatorischen Rolle des PD-L1-Moleküls ausgehend, wäre es möglich, dass die in vorliegender Arbeit beobachtete verstärkte PD-L1-Oberflächenexpression auf TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu deren verstärkter Proliferation und der verringerten Suppression kokultivierter Responder T-Zellen beiträgt (Abb. 13, Abb. 14).

Wie Simone *et al.* anhand humaner CD4⁺ T-Zellen beschrieben, kann durch TLR-Liganden auch die Oberflächenexpression von Molekülen der CD28-Familie beeinflusst werden. Beispielsweise steigern TLR3,-4,-5-Liganden die Oberflächenexpression von PD-1 und CTLA-4 (Simone *et al.* 2009). In vorliegender Arbeit konnte nach TLR2-Liganden-Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls eine Modulation der PD-1- und CTLA-4-Expression festgestellt werden. Die verringerte Oberflächenexpression beider Moleküle auf den vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Simone *et al.*, was aber durch die Stimulation unterschiedlicher TLR erklärt werden kann (Abb. 14).

Zusammenfassend konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass ein TLR2-Stimulus bei $\gamma\delta$ T-Zellen ähnlich wie bei DZ zur verstärkten Oberflächenexpression von Molekülen wie CD80, -83, -86, PD-L1 und HLA-DR führt, die mit APZ (bzw. APZ-Funktionen) in Zusammenhang stehen (Abb. 10, Abb. 11). Diese verstärkte Expression kann zur gesteigerten Proliferation von $\gamma\delta$ - und kokultivierten Responder T-Zellen beitragen. Die Aufhebung der Suppression durch TLR2-Liganden korreliert also mit einer verstärkten Expression

kostimulatorischer Oberflächenmoleküle und weist daher eher Parallelen zu Charakteristika immunsuppressiver myeloider DZ (Amodio & Gregori 2012) als zu denen von Treg auf. In vorliegender Arbeit konnte weiterhin bei Kokultivierung von TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ - mit Responder T-Zellen in beiden Zellpopulationen eine verstärkte Phosphorylierung der Signalmoleküle AKT und NF- κ B/p65 festgestellt werden. Da die Responder T-Zellen nicht direkt mit TLR2-Liganden in Berührung kamen, muss bei diesen die verstärkte Phosphorylierung durch die vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen induziert worden sein. Dazu trug möglicherweise die TLR2-Liganden-bedingt verstärkte Expression von CD86 und PD-L1 auf $\gamma\delta$ T-Zellen bei. Außerdem war auf Responder T-Zellen die Oberflächenexpression von CD28 verstärkt und die von PD-1 und CTLA-4 verringert (Abb. 28). CTLA-4 und PD-1 verringern und CD28 verstärkt die Phosphorylierung von AKT und NF- κ B/p65. Der Mechanismus durch den die untersuchten Oberflächenmoleküle die Phosphorylierung verschiedener Signalmoleküle beeinflussen können ist in Kapitel 7.7 detailliert erläutert.

7.7. TLR2-Liganden steigern die Phosphorylierung von Signalmolekülen

TZR-Stimulation mit anti-CD3 mAk oder einem Phosphoantigen führt in $\gamma\delta$ T-Zellen zur Phosphorylierung von ERK2, p38 und AKT (an Serin 473) (Correia *et al.* 2009; Beetz *et al.* 2008; Lafont *et al.* 2001). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Phosphorylierung dieser Signalmoleküle ebenfalls nach anti-CD3,-28 mAk- bzw. A/E-Partikel-Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden. Außerdem wurde hierbei auch die Phosphorylierung von AKT am Threonin 308 sowie die von NF- κ B nachgewiesen (Abb. 17, Abb. 18). Bei den Untersuchungen zum Einfluss von TLR2-Liganden auf $\gamma\delta$ T-Zellen wurde eine verstärkte Phosphorylierung von Signalmolekülen des PI3K/AKT- (AKT), NF- κ B- (NF- κ B/p65) und MAP-Kinase-Signalweges (p38, ERK) nur festgestellt, wenn die $\gamma\delta$ T-Zellen zusätzlich über den TZR stimuliert wurden. Die TLR2-Liganden-Vorinkubation induzierte in Abwesenheit eines TZR-Stimulus keine Phosphorylierung (Daten nicht gezeigt, Abb. 17, Abb. 18). Diese Beobachtung bestätigt auf Ebene der Signalmolekül-Phosphorylierung die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und aus vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, denen zufolge TLR2-Liganden kostimulatorische Effekte (auf die Produktion verschiedener löslicher Mediatoren) besitzen, alleine aber deren Produktion nicht induzieren können (Abb. 15) (Pietschmann *et al.* 2009).

Wie bereits erwähnt, konnte wie zuvor von unserer Arbeitsgruppe für nTreg beschrieben (Oberg *et al.* 2010) in vorliegender Arbeit die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression durch TLR2-Liganden teilweise aufgehoben werden. Im Unterschied zu nTreg, kam es allerdings unmittelbar nach Stimulation TLR2-Liganden-vorinkubierter $\gamma\delta$ T-Zellen zu keiner gesteigerten AKT-Phosphorylierung an Serin 473. Stattdessen wurde eine signifikant höhere Phosphorylierung des Threonin 308 festgestellt (Abb. 17, Abb. 18). Peng *et al.* konnten

- Diskussion -

weiterhin zeigen, dass die suppressive Funktion tumorinfiltrierender $V\delta 1 \gamma\delta$ T-Zellen durch Applikation von TLR8-Liganden aufgehoben werden kann. Diese Aufhebung konnte wiederum mit Hilfe eines siRNA-vermittelten $p38\alpha$ -*knockdowns* komplett blockiert werden (Peng *et al.* 2007). Die in vorliegender Arbeit beobachtete TLR2-Liganden-abhängig verstärkte Phosphorylierung von AKT und p38 in $\gamma\delta$ T-Zellen spielt vermutlich eine zentrale Rolle bei der Aufhebung der suppressiven Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 17, Abb. 18).

TLR2 kann die Aktivierung von PI3K verstärken und somit die AKT-Phosphorylierung am Threonin 308 bewirken (Troutman *et al.* 2012; Santos-Sierra *et al.* 2009). Dementsprechend konnte in vorliegender Arbeit eine TLR2-Liganden-bedingt verstärkte Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 direkt nach Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden. Die AKT-Phosphorylierung an Serin 473 wird durch TZR-Stimulation induziert, von mTORC2 vermittelt und durch TLR-Signale nicht beeinflusst. Wie daher zu erwarten, wurde nach initialer Stimulation eine TLR2-Liganden-abhängig verstärkte Serin 473-Phosphorylierung nicht beobachtet. Für die Funktion von AKT besitzt die Phosphorylierung an Threonin 308 die größere Bedeutung. So konnten Vincent *et al.* in humanen Lungenkrebszellen (*non-small-cell lung carcinoma*) zeigen, dass nur die Phosphorylierung an Threonin 308 direkt mit der Phosphorylierung der AKT-Substrate korreliert und von größerer funktioneller Wichtigkeit ist als die an Serin 473 (Vincent *et al.* 2011).

Die festgestellte initial gesteigerte Threonin 308-Phosphorylierung von AKT korrelierte des Weiteren mit einem höheren proliferativen Potential der TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen (Abb. 13). AKT kann verschiedene Proteine (wie z.B. *cyclin-dependent inhibitor 1A* ($p21^{Cip1}$), *cyclin-dependent inhibitor 1B* ($p27^{Kip1}$) und GSK-3), die dem Fortschreiten des Zellzyklus entgegenwirken, phosphorylieren und dadurch inaktivieren. Auf diese Weise kann AKT den Zellzyklus initiieren bzw. dessen Fortschreiten gewährleisten und steht daher mit der Zellproliferation in Zusammenhang (Hers *et al.* 2011; Shin *et al.* 2002; Rossig *et al.* 2001). In TZR-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen ist die Phosphorylierung von AKT (Serin 473) sowie die von GSK-3 beschrieben worden (Correia *et al.* 2009). In vorliegender Arbeit ließ sich in proliferierenden solo- und kokultivierten $\gamma\delta$ bzw. Responder T-Zellen eine positive Korrelation zwischen AKT-Phosphorylierung und Zellvermehrung feststellen (Abb. 19). Eine erhöhte Proliferation von solo- und kokultivierten TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen ging mit einer verstärkten Phosphorylierung von AKT an Threonin 308, aber auch an Serin 473 einher. Während bei Kokultur mit $\gamma\delta$ T-Zellen die Phosphorylierung von AKT (Thr 308, Ser 473) in Responder T-Zellen reduziert war, zeigte sich bei Kokultur mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen in Responder T-Zellen eine nahezu vollständig wiederhergestellte AKT-Phosphorylierung. Wahrscheinlich war bei Kokultur die Phosphorylierung in Responder T-Zellen durch den Einfluss inhibitorischer Korezeptoren negativ beeinflusst. Infolge der TLR2-Liganden-Vorinkubation war deren Expression verringert und die von

- Diskussion -

kostimulatorischen Molekülen wie CD28 und CD86 stattdessen verstärkt (Abb. 19). CTLA-4 rekrutiert die Phosphatase PP2A, wodurch hauptsächlich die Dephosphorylierung von AKT am Threonin 308 vermittelt wird (Kuo *et al.* 2008; Parry *et al.* 2005). Des Weiteren können sowohl CTLA-4 als auch PD-1 die Phosphatase SHP-2 rekrutieren (Parry *et al.* 2005; Marengere *et al.* 1996; Chuang *et al.* 2000). Die TLR2-Liganden-bedingt verringerte Expression von CTLA-4 und PD-1 kann daher zur verstärkten Phosphorylierung von AKT an Threonin 308, aber auch zu der von PI3K und TZR-proximalen Kinasen und somit zur verstärkten Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 und Serin 473 führen. Die verstärkte Expression von CD28 auf Responder T-Zellen und von dessen Ligand CD86 auf TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen führt in Responder T-Zellen zur Aktivierung der PI3K und somit zur Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 (Abb. 19). Vermutlich wird also die Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 und Serin 473 und damit auch die Proliferation der Zellen bei Kokultivierung durch die Interaktion von positiv- und negativ-kostimulatorischen Oberflächenmolekülen moduliert. Die verstärkte Expression von positiv- und die verringerte von negativ-kostimulatorischen Oberflächenmolekülen bei Kokultur mit TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen kann daher die verstärkte AKT-Phosphorylierung und somit auch die verstärkte Proliferation bedingen.

Mit Hilfe der *Phospho-Array*-Analyse der Phosphorylierungszustände verschiedener Signalmoleküle (*Proteome Profiler™ Phospho-MAPK Array*) wurde keine gesteigerte AKT-Phosphorylierung nach TZR-Stimulation nachgewiesen. Ein Einfluss der TLR2-Liganden-Vorinkubation wurde hierbei ebenfalls nicht beobachtet (Abb. 16). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den durchflusszytometrischen und *Western blot*-Untersuchungen, die eine deutliche Zunahme der AKT-Phosphorylierung nach Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen zeigten (Abb. 17, Abb. 18). Die Unterschiede begründen sich vermutlich in einer unterschiedlichen Spezifität der Antikörper, die bei der verwendeten *Phospho-Array*-Analyse z.B. nur die AKT Serin-Phosphorylierung nachweisen konnten. Des Weiteren wurden bei der *Phospho-Array*-Analyse die Antikörper-beschichteten Platten über Nacht direkt mit den Zelllysaten inkubiert, was möglicherweise auch zu einem Rückgang der Phosphorylierung geführt haben kann. Die Analyse durch einen *Phospho-Array* kann also lediglich als ein erster Hinweis auf den Phosphorylierungszustand von Signalmolekülen gesehen werden, sollte aber in jeden Fall durch andere spezifischere Methoden überprüft werden.

Moleküle des MAP-Kinase-Signalweges spielen eine Rolle bei vielen zellulären Prozessen. p38 wird vor allem durch Zellstress oder inflammatorische Zytokine aktiviert. ERK steht vor allem mit Zellproliferation und Wachstumsfaktoren im Zusammenhang (Rincon *et al.* 2000). Anhand Druckwellen-behandelter T-Zellen konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte p38-Phosphorylierung ebenfalls mit verstärkter Proliferation korrelieren kann (Yu *et al.* 2010). In vorliegender Arbeit konnte in anti-CD3,-28 mAk-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen die Phosphorylierung

- Diskussion -

von ERK und p38 festgestellt werden (Abb. 17, Abb. 18). Mit Hilfe einer *Phospho-Array*-Analyse der Phosphorylierungszustände konnte festgestellt werden, dass spezifisch p38 α phosphoryliert wurde (Abb. 16). Die Induktion von p38 durch Zellstress konnte ebenfalls bei Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden. Obwohl die Zellen bei 37°C über Nacht ruhten, wiesen auch unstimulierte Zellen zu Beginn der Untersuchung kurzzeitig eine erhöhte p38-Phosphorylierung auf. Diese Phosphorylierung war aber im Vergleich zu der durch TZR-Stimulation induzierten deutlich weniger stabil und ging schnell wieder zurück. Da unstimulierte Zellen grundsätzlich keine Proliferation oder Effektorfunktionen aufwiesen, war die transiente p38-Expression hierfür vermutlich nicht relevant (Abb. 17, Abb. 18). Des Weiteren konnte in vorliegender Arbeit nach Stimulation TLR2-Liganden-vorinkubierter $\gamma\delta$ T-Zellen eine gesteigerte Phosphorylierung von p38(α) und ERK2 beobachtet werden (Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18). TLR-Signale können durch die Kinase TAK an MAP-Kinasen weitergegeben werden (Huang *et al.* 2009; Rincon *et al.* 2000) und auf diese Weise die Phosphorylierung von ERK und p38 verstärken. Da ERK und p38 wie bereits erwähnt in Zusammenhang mit Zellproliferation stehen, trägt deren TLR2-Liganden-bedingt gesteigerte Phosphorylierung vermutlich ebenfalls zu dem in dieser Arbeit festgestellten gesteigerten proliferativen Potential vorinkubierter Zellen bei (Abb. 13).

Die Aktivierung von ERK oder p38 kann jeweils in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 münden, der viele zelluläre Prozesse wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose beeinflussen kann (Rincon *et al.* 2000; Huang *et al.* 2009). AP-1 ist u.a. auch für die Induktion von TNF- α und IL-1 von Bedeutung (Kyriakis & Avruch 2001). In $\gamma\delta$ T-Zellen führt die Phosphorylierung der Signalmoleküle p38 und ERK2 nach TZR-Stimulus unter anderem zur Produktion von IFN- γ und TNF- α (Beetz *et al.* 2008; Correia *et al.* 2009). Die in vorliegender Arbeit festgestellte TLR2-bedingt gesteigerte ERK- und p38-Phosphorylierung in TZR-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen ließ sich ebenfalls mit einer gesteigerten Produktion von TNF- α korrelieren (Abb. 15, Abb. 17, Abb. 18). Für p38 ist eine Rolle bei der Regulation der Expression von Th1 spezifischen Zytokinen beschrieben worden. Bei Verwendung eines spezifischen p38-Inhibitors wurde die Produktion von IFN- γ in Th1-Zellen, nicht aber die Produktion spezifischer Zytokine in Th2-Zellen inhibiert (Rincon *et al.* 1998). Li *et al.* konnten anhand von murinen T-Zellen zeigen, dass die IFN- γ -Expression nach Stimulation mit anti-CD3 mAk bei zusätzlichem TLR2-Stimulus erhöht ist. Aus Ergebnissen von Inhibitor-Studien schlossen sie auf eine Beteiligung von p38 und ERK an dem TLR2-induzierten Effekt (Li *et al.* 2012). In vorliegender Arbeit konnte ebenfalls bei TLR2-Liganden-vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen eine gesteigerte Produktion und Freisetzung von IFN- γ beobachtet werden (Abb. 15). Eine mögliche Interpretation wäre, dass durch TLR2-Agonisten die Th1-Differenzierung der $\gamma\delta$ T-Zellen unterstützt wird. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass es in TLR2-

- Diskussion -

Liganden vorinkubierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu einer vergleichsweise schwächeren Expression von T-bet kam (Abb. 22).

Mitchell *et al.* konnten in murinen DZ demonstrieren, dass für deren TLR-induzierte Chemokinproduktion (u.a. CCL5 und CCL3) ebenfalls p38 und ERK eine Rolle spielen, aber vor allem NF- κ B notwendig ist (Mitchell & Olive 2010). Die in vorliegender Arbeit festgestellte TLR2-induzierte verstärkte Zytokinproduktion lässt sich Kawai und Akira zufolge vermutlich hauptsächlich auf die gesteigerte Phosphorylierung von NF- κ B zurückzuführen (Kawai & Akira 2011). In vorliegender Arbeit wurde zudem die Phosphorylierung der p65-Untereinheit von NF- κ B analysiert, da diese hauptverantwortlich für das Transkriptions-aktivierende Potential von NF- κ B ist (Schmitz & Baeuerle 1991). Es wurden die am besten charakterisierten und funktionell bedeutendsten Phosphorylierungsstellen von NF- κ B/p65 an Serin 529 und 536, die sich im Bereich der C-terminalen Transaktivierungsdomäne (TAD) befinden, analysiert. Anhand der Stimulation durch IL-1 oder TNF- α ist gezeigt worden, dass Serin 529 durch die Casein Kinase 2 (CK2), Serin 536 hingegen durch IKKs phosphoryliert wird (Chen & Greene 2004). Bei Untersuchung des Einfluss von TLR2-Liganden auf die NF- κ B-Phosphorylierung in $\gamma\delta$ T-Zellen wurde in vorliegender Arbeit vor allem eine verstärkte Phosphorylierung von Serin 536 erwartet, da beschrieben ist, dass TLR-Signale zur Aktivierung von IKKs führen (Bhoj & Chen 2009). Es wurde allerdings eine verstärkte Phosphorylierung an Serin 536, aber auch an Serin 529 beobachtet (Abb. 17, Abb. 18). Die in vorliegender Arbeit ebenfalls festgestellte TLR2-Liganden-induzierte Verstärkung der p38-Phosphorylierung kann zu einer gesteigerten Aktivierung von CK2 führen. Da CK2 NF- κ B an Serin 529 phosphoryliert, könnte auf diese Weise die NF- κ B Serin 529-Phosphorylierung durch TLR2-Liganden indirekt beeinflusst werden (Abb. 18) (Sayed *et al.* 2000; Chen & Greene 2004). TLR2-Signale können also möglicherweise über eine verstärkte p38-Phosphorylierung auch indirekt die Phosphorylierung von NF- κ B/p65 verstärken. Sowohl die Phosphorylierungen von NF- κ B/p65 an Serin 529 als auch an Serin 536 ist notwendig für eine effiziente NF- κ B-induzierte Transkription (Chen & Greene 2004). Des Weiteren ist (in humanen 293T Zellen bzw. Nagetier-Fibroblasten) eine Aktivierung von NF- κ B/p65 durch den PI3K/AKT-Signalweg beschrieben worden. Für die Aktivierung von NF- κ B ist Phosphorylierung von AKT an Threonin 308 notwendig (Madrid *et al.* 2000). Durch Aktivierung von IKK2 kann AKT die Phosphorylierung von NF- κ B/p65 initiieren bzw. steigern (Ozes *et al.* 1999; Romashkova & Makarov 1999). Die in dieser Arbeit festgestellte TLR2-bedingt gesteigerte AKT-Phosphorylierung in $\gamma\delta$ T-Zellen könnte also zu der gesteigerten NF- κ B/p65-Phosphorylierung führen. Unter Umständen lässt sich auch die verstärkte NF- κ B-Phosphorylierung in mit diesen kokultivierten Responder T-Zellen auf deren gesteigerte AKT-

- Diskussion -

Phosphorylierung zurückzuführen (Abb. 19). Der Einfluss von TLR2 auf verschiedene Signalmoleküle ist in Abbildung 29 schematisch zusammengefasst.

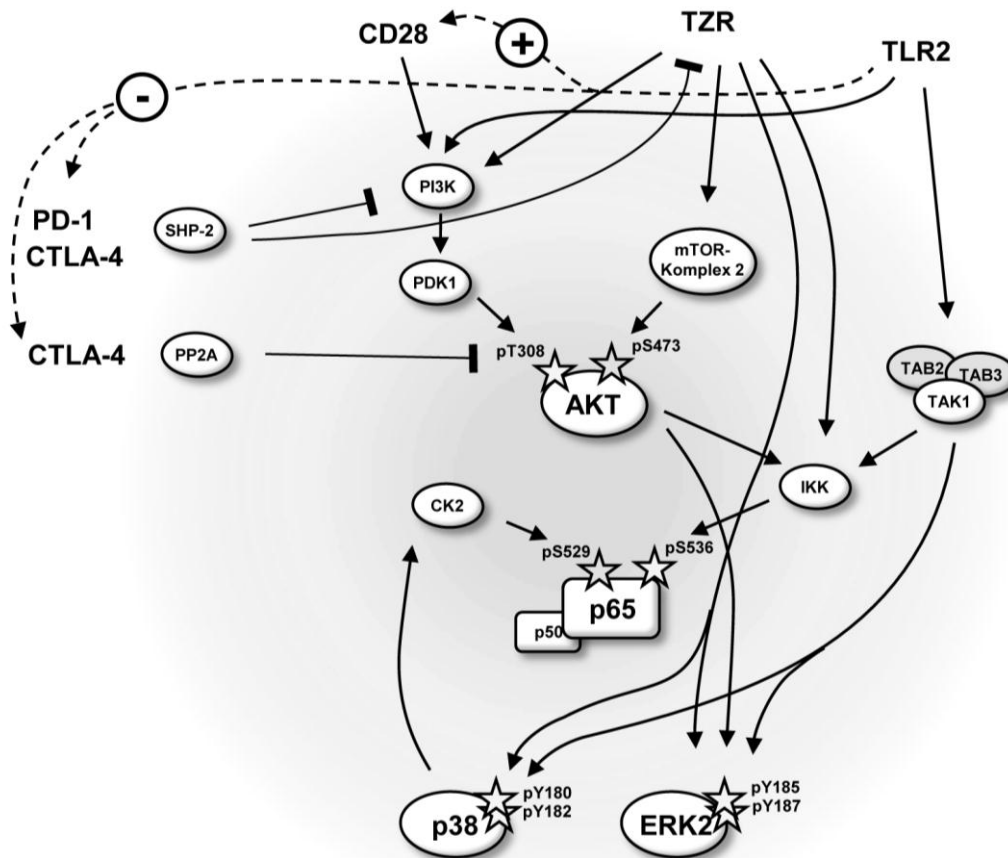


Abb. 29: Vereinfachte schematische Darstellung des Einflusses von TLR2 auf die in $\gamma\delta$ T-Zellen untersuchten Signalmoleküle und deren Interaktion mit verschiedenen Signalwegen. Sterne stellen Phosphorylierungsstellen dar, wobei die funktionell weniger bedeutsamen grau eingefärbt sind. Die gestrichelten Linien stellen indirekte Effekte durch Modulation von Oberflächenmolekülen dar.

Die Ergebnisse zur Phosphorylierung der Signalmoleküle, die durch *Western blot*-Analysen und durch durchflusszytometrische Untersuchung erhalten wurden, sind in der Qualität ihrer Aussage gleich. Allerdings konnte mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse die Signalmolekül-Phosphorylierung auch in kokultivierten Zellpopulationen untersucht werden. Außerdem scheint die durchflusszytometrische Analyse sensitiver zu sein, da anders als bei *Western blot*-Untersuchungen auch leichte Unterschiede in der Phosphorylierung der Signalmoleküle deutlich zu erkennen waren. Die Ergebnisse der beiden Untersuchungsmethoden unterscheiden sich vor allem bezüglich des zeitlichen Verlaufs der Abnahme der Phosphorylierung. Bei durchflusszytometrischer Untersuchung wurde auch nach 30 Minuten noch eine deutliche Phosphorylierung von AKT (pS473 und pT308), NF κ B/p65 (pS529), ERK1/2 (pT202, pY204 bzw. pT185, pY187) und p38 (pT180, pY182) nachgewiesen, wohingegen im *Western blot* diese bei AKT (pS473 und pT308), NF κ B/p65 (pS536), ERK1/2 (T202, Y204) und p38 (T180, Y182) zu diesem Zeitpunkt nur noch schwach vorhanden war

- Diskussion -

(Abb. 17; Abb. 18). Die beobachteten Unterschiede können unter Umständen auch auf Unterschiede in der Methodik zurückzuführen sein. Bei der *Western blot*-Analyse wurden höhere Zellzahlen ($0,5 \cdot 10^6$) als bei der durchflusszytometrischen ($0,2 \cdot 10^6$) verwendet. Außerdem wurde die Stimulation durch Hinzufügen von eiskaltem PBS, anschließendes Zentrifugieren und Lysieren der Zellen beendet, wohingegen dies für die durchflusszytometrische Untersuchung durch direkte Fixierung der Zellen geschah. Durch die direkte Fixierung wurde bei der durchflusszytometrischen Untersuchungsmethode möglicherweise die Aktivität von Phosphatasen besser und schneller inhibiert, wodurch der langsamere Rückgang der Phosphorylierung zu erklären wäre.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass TLR2-Liganden-induzierte Effekte in $\gamma\delta$ T-Zellen nur eine kostimulatorische Funktion besitzen und zusätzlich einen TZR-Stimulus benötigen. TLR2-Signale selbst konnten keine Effektorfunktionen oder Zellproliferation auslösen, waren aber in der Lage diese bei einem vorhandenen TZR-Stimulus deutlich zu verstärken, wobei sowohl der PI3K/AKT-, der MAPK- als auch der NF κ B-Signalweg involviert waren. Das erhöhte proliferative Potential in Folge der TLR2-Liganden-Vorinkubation der $\gamma\delta$ T-Zellen lässt sich durch eine erhöhte Phosphorylierung von AKT (an Threonin 308) und der MAP-Kinasen p38 und ERK begründen. Die gesteigerte Produktion proinflammatorischer bzw. Th1-charakteristischer Zytokine wie IFN- γ kann in Zusammenhang mit der verstärkten Phosphorylierung von NF- κ B und auch von p38 gesetzt werden. Die Produktion von Chemokinen wie CCL5 und CCL3 steht vor allem mit NF- κ B aber auch p38 und ERK in Zusammenhang. Die einzelnen betrachteten Signalwege weisen untereinander zahlreiche Interaktionen auf.

7.8. $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren Helios

In vorliegender Arbeit konnte, wie von Akimova *et al.* beschrieben, nur bei einem geringen Anteil (< 10 %) der frisch isolierten Responder T-Zellen eine Helios-Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 20) (Akimova *et al.* 2011). Im Gegensatz zu Responder T-Zellen wies ein größerer Teil der frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen eine Helios-Proteinexpression auf. Auch bei gleicher Stimulation beider Zellpopulationen (A/E-Partikel-Stimulation) wurde nur in $\gamma\delta$ T-Zellen die Helios-Proteinexpression induziert (Abb. 21). $\gamma\delta$ T-Zellen unterscheiden sich in ihrer Entwicklung von CD4⁺ T-Zellen und verlassen anders als diese den Thymus bereits während des DN (CD4⁻CD8⁻) -Stadiums der Thymozytenentwicklung. Im Thymus wird Helios stark im DN- und schwächer im DP (CD4⁺CD8⁺) -Stadium exprimiert (Kelley *et al.* 1998; Hahm *et al.* 1998). Cai *et al.* konnten keinen Einfluss von Helios auf die T-Zell-Entwicklung und -Funktion in Helios-defizienten Mäusen feststellen (Cai *et al.* 2009). Zhang *et al.* konnten allerdings zeigen, dass die Überexpression von Helios die Entwicklung von $\alpha\beta$ T-Zellen blockiert und zu einer erhöhten Anzahl von $\gamma\delta$ T-Zellen (und NK-Zellen) führt (Zhang *et al.*

- Diskussion -

2007). Da der Großteil Helios-defizienter Mäuse innerhalb der ersten Lebenswochen stirbt, kann man vermuten, dass in den von Cai *et al.* untersuchten adulten Mäusen die Helios-Funktion durch andere Mitglieder der Ikaros-Familie übernommen und somit kompensiert wurde. Vermutlich geben daher die Untersuchungen von Zhang *et al.* einen besseren Hinweis auf die Funktion von Helios. Die in vorliegender Arbeit festgestellten Unterschiede in der Helios-Proteinexpression zwischen $\gamma\delta$ - und Responder T-Zellen lassen sich also möglicherweise auf die unterschiedliche thymische Entwicklung zurückführen.

Akimova *et al.* beschrieben, dass murine Helios⁻ CD4⁺- bzw. CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu Helios⁺ Zellen tendenziell einen eher naiven Phänotyp aufweisen. Akimova *et al.* zeigten allerdings auch, dass bei Kokultivierung von CD4⁺ T-Zellen mit Treg Helios⁺ CD4⁺ T-Zellen eine CD45RA-Oberflächenexpression aufweisen (Akimova *et al.* 2011). In dieser Arbeit konnte bei frisch isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen innerhalb naiver $\gamma\delta$ T-Zellen (CD27⁺CD45RA⁺) eine deutliche Akkumulation von Helios⁺ Zellen beobachtet werden (Abb. 23, A). Es ist nicht auszuschließen, dass sich die Unterschiede zu den von Akimova *et al.* gemachten Beobachtungen aufgrund der abweichenden Definition für naive T-Zellen ergeben. Während Akimova *et al.* zwar ebenfalls die CD45-Oberflächenexpression zur Charakterisierung humaner naiver T-Zellen verwendeten, wurde die CD27-Oberflächenexpression hierbei nicht berücksichtigt. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass CD27⁻CD45RA⁺ T_{EMRA} in die Untersuchung der CD27⁺CD45RA⁺ naiven T-Zellen mit eingingen.

7.9. Die Expression von Helios in $\gamma\delta$ T-Zellen hat keinen direkten Einfluss auf ihre regulatorische Funktion

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass ähnlich wie nTreg auch ein erheblicher Anteil (ca. 30 %) frisch isolierter $\gamma\delta$ T-Zellen den Transkriptionsfaktor Helios exprimiert (Abb. 20). Helios wurde von verschiedenen Gruppen mit Treg in Zusammenhang gebracht (Getnet *et al.* 2010; Hill *et al.* 2007; Sugimoto *et al.* 2006; Thornton *et al.* 2010; Zheng *et al.* 2007; Zheng & Rudensky 2007). Thornton *et al.* beschrieben Helios als ein für nTreg charakteristisches Molekül, welches nicht von iTreg exprimiert wird (Thornton *et al.* 2010). Von anderen Arbeitsgruppen aber wurde festgestellt, dass Helios auch in *in vitro* induzierten iTreg exprimiert werden kann und dass die Art des verwendeten Stimulus hierfür entscheidend ist (Akimova *et al.* 2011; Gottschalk *et al.* 2012; Verhagen & Wraith 2010). In der Maus konnte die Induzierbarkeit von Helios zusammen mit Foxp3 in iTreg *in vivo* gezeigt werden. Dies und die anschließend lange stabile Helios-Proteinexpression stellen Helios als nTreg-Differenzierungsmarker in Frage (Gottschalk *et al.* 2012). Auch scheint die Proteinexpression von Helios selbst vermutlich nicht mit einer regulatorischen Funktion in direktem Zusammenhang zu stehen. Thornton *et al.* wiesen bei Treg aus Helios-defizienten Mäusen normale regulatorische Funktionen nach. Ebenso waren humane Treg, obwohl

- Diskussion -

deren Helios-Proteinexpression durch siRNA herunterreguliert war, weiterhin suppressiv (Thornton *et al.* 2010). Diese These unterstützend ist Expression von Helios nicht auf Foxp3-exprimierende Zellen beschränkt und konnte auch in CD4⁺ und CD8⁺ Foxp3⁻ T-Zellen gezeigt werden. Auch in vorliegender Arbeit wurde festgestellt, dass die Helios-Proteinexpression nicht mit der von Foxp3 korreliert. Frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren Helios unabhängig von Foxp3. Auch nach deren Aktivierung war die Helios-Proteinexpression nicht an die von Foxp3 gebunden (Abb. 20, Abb. 22). Bei Untersuchungen zur Suppressivität expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen stand bei A/E-Partikel-(Re-)stimulation der Zellen die Helios-Proteinexpression ebenfalls in keinem Zusammenhang mit deren suppressiven Potential (Abb. 25).

7.10. CD28-Kostimulation induziert die Helios-Expression

Wie bereits erwähnt ist die Induktion der Helios-Proteinexpression höchstwahrscheinlich abhängig von der verwendeten Stimulationsmethode. Es ist bekannt, dass es in Treg *ex vivo* und auch *in vivo* zu einer Abnahme der Helios-Proteinexpression kommt, die vermutlich durch die Abwesenheit von Ag-spezifischen Interaktionen mit APZ bzw. von kostimulatorischen Signalen durch diese bedingt ist. In murinen iTreg ist die Anwesenheit von APZ ebenfalls essentiell für die Induktion der Helios-Proteinexpression. Durch Stimulation mit plattengebundenem anti-CD3 mAk oder einem TZR-spezifischen Peptid kann in Anwesenheit von APZ die Helios-Proteinexpression induziert werden (Akimova *et al.* 2011; Gottschalk *et al.* 2012). Diese Untersuchungen weisen auf die Notwendigkeit eines APZ-Kostimulus für die Helios-Proteinexpression hin. Weder Gottschalk *et al.* noch Verhagen *et al.* konnten bei Generierung muriner iTreg nach Stimulation mit anti-CD3 und Kostimulation durch anti-CD28 mAk eine Induktion von Helios beobachten (Gottschalk *et al.* 2012; Verhagen & Wraith 2010). Im Widerspruch zu diesen Ergebnissen steht die Tatsache, dass Akimova *et al.* bei Stimulation muriner T-Zellen oder PBMZ durch anti-CD3 und anti-CD28 mAk die Induktion der Helios-Proteinexpression feststellen konnten. Zabransky *et al.* konnten ebenfalls eine Helios-Induktion bei Stimulation naiver muriner CD4⁺ T-Zellen mit anti-CD3,-28 mAk-umhüllten Partikeln im Zuge der Generierung von iTreg beobachten (Akimova *et al.* 2011; Zabransky *et al.* 2012).

Die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen sprechen in Übereinstimmung mit den von Akimova *et al.* und Zabansky *et al.* durchgeführten Untersuchungen für eine Induktion der Helios-Proteinexpression bei Stimulation durch anti-CD3,-28 mAk. Bei Kostimulation mit löslichem anti-CD28 mAk konnte ebenfalls die Induktion von Helios beobachtet werden, die allerdings weniger stark ausgeprägt war (Daten nicht gezeigt). Zwischen Induktion der Helios-Proteinexpression und CD28-Kostimulation konnte ein direkter Zusammenhang hergestellt werden. Bei Verwendung von A/E-Partikeln die nur mit anti-CD3 und nicht mit anti-CD28 mAk umhüllt waren, kam es anders als bei anti-CD3,-CD28 mAk-umhüllten A/E-Partikeln zu keiner gesteigerten Helios-Proteinexpression (Abb. 22, Abb. 23). Diese

Ergebnisse sprechen dafür, dass die CD28-Kostimulation für die Induktion von Helios verantwortlich ist. Diese Induktion war bei BrHPP-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen wesentlich schwächer ausgeprägt. Dies kann möglicherweise auf eine geringere CD28-Kostimulation bei der BrHPP-Stimulation (durch die hierbei anwesenden PBMZ) zurückgeführt werden (Abb. 22). In dieser Arbeit wurden zur Induktion regulatorischer $\gamma\delta$ T-Zellen u.a. vergleichbarere Zellkulturbedingungen wie in Experimenten von Gottschalk *et al.* und Verhagen *et al.* zur Induktion von iTreg verwendet. Auch unter diesen Bedingungen konnte die direkte Abhängigkeit der Helios-Induktion vom Vorhandensein eines CD28-Kostimulus festgestellt werden (Abb. 22, Abb. 23) (Gottschalk *et al.* 2012; Verhagen & Wraith 2010). Die TLR2-abhängig gesteigerte Helios-Proteinexpression unterstützt die Auffassung, dass TLR2-Stimulation einen (nur) kostimulatorischen Einfluss auf $\gamma\delta$ T-Zellen hat (Abb. 21).

Ferner ließ sich die in vorliegender Arbeit beschriebene verstärkte Helios-Proteinexpression nicht wie von Akimova *et al.* vorgeschlagen mit dem Maße der Proliferation der Zellen korrelieren (Akimova *et al.* 2011). Obwohl in vorliegender Arbeit die Responder T-Zellen in Solokultur eine im Vergleich zu $\gamma\delta$ T-Zellen stärkere Proliferation aufwiesen, konnte trotzdem weder in Solo- noch in kokultivierten Responder T-Zellen eine nennenswerte Helios-Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 21). Bei $\gamma\delta$ T-Zellen korrelierte die Helios-Proteinexpression ebenso wenig mit einer gesteigerten Proliferation. Auch die im Vergleich zur A/E-Partikel-Stimulation stärkere Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen nach BrHPP-Stimulation korrelierte nicht mit einer stärkeren Helios-Proteinexpression (Abb. 24). Auch konnte anders als von Akimova *et al.* für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen beschrieben in vorliegender Arbeit kein Helios-induzierender Einfluss von IL-2 in $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden (Akimova *et al.* 2011). Allerdings war bei Anwesenheit von IL-2 (nur in A/E-Partikel-stimulierten) in $\gamma\delta$ T-Zellen die Induktion von Helios verstärkt (Abb. 21). Möglicherweise hat IL-2 also einen positiven Einfluss auf die CD28-induzierte Helios-Proteinexpression. Die bekanntermaßen durch CD28-Kostimulation gesteigerte Stabilität der IL-2-mRNA kann möglicherweise zu einer positiven Rückkopplung führen und die Helios-Expression zusätzlich verstärken.

7.11. Kostimulation durch CD28 steht im Zusammenhang mit der Induktion von regulatorischen Funktionen in $\gamma\delta$ T-Zellen

In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass frisch isolierte, mit BrHPP stimulierte $\gamma\delta$ T-Zellen in der Lage sind in Anwesenheit von B-Zellen und Monozyten (E-APZ) die durch SEA/B induzierte Proliferation von CD4⁺ T-Zellen zu supprimieren. Es wurde gefolgert, dass für die beschriebene $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Suppression die Anwesenheit von APZ essentiell ist (Traxlmayr *et al.* 2010). Möglicherweise ist also die alleinige Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen nicht ausreichend zur Induktion von suppressiver Aktivität, sondern es ist zusätzlich ein APZ-vermittelter Kostimulus notwendig.

- Diskussion -

Statt der Stimulation in Anwesenheit von APZ wurden in dieser Arbeit zur Stimulation der Zellen u.a. A/E-Partikel verwendet. Hierbei konnte festgestellt werden, dass die Stimulation durch diese ausreichend zur Etablierung einer $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression von Responder T-Zellen war (Abb. 6). Da die Zellen zusätzlich zum TZR-Stimulus (anti-CD3 mAk) nur einen CD28-Kostimulus erhielten, kann man auf eine zentrale Rolle von CD28 bei der Entstehung der beobachteten Suppression schließen. Bei Restimulation BrHPP- oder A/E-Partikel-expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen (in Anwesenheit von IL-2) durch A/E-Partikel konnte ebenfalls ein suppressiver Effekt auf die Proliferation der Responder T-Zellen beobachtet werden. Dieser war vergleichbar mit dem durch frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelten suppressiven Effekt (Abb. 6, Abb. 25).

Im Gegensatz zur A/E-Partikel-Stimulation konnten frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen nach BrHPP-Stimulation die Proliferation kokultivierter SE-Gemisch-stimulierter Responder T-Zellen nicht supprimieren (Abb. 6, Daten nicht gezeigt). Des Weiteren waren mit Hilfe von BrHPP bzw. A/E-Partikeln (in Anwesenheit von IL-2) expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen nach BrHPP-Restimulation ebenfalls nicht in der Lage die Proliferation von SE-Gemisch-stimulierten Responder T-Zellen zu inhibieren. Stattdessen war in diesem Fall die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen selbst deutlich eingeschränkt (Abb. 25). Eine mögliche Ursache für die Unterschiede der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zu den von Traxlmayr *et al.* gemachten Beobachtungen liegt in der Verwendung eines SE-Gemisches anstatt von einzelnen SE. Durch das SE-Gemisch wurden verhältnismäßig deutlich mehr CD4⁺ T-Zellen aktiviert und es kam zu einer verstärkten Zytokinausschüttung, welche wiederum einer Suppression entgegenwirkte. Wie schon erwähnt, scheint die BrHPP-Stimulation nur mit einem schwachen CD28-Kostimulus verbunden zu sein. Möglicherweise ist dieser Kostimulus bei starker Aktivierung einer großen Anzahl von CD4⁺ T-Zellen nicht ausreichend um eine Suppression zu etablieren. Ein starker CD28-Kostimulus ist also vermutlich ein entscheidender Faktor für die Entstehung der in vorliegender Arbeit beschriebenen Suppression bei A/E-Partikel-Stimulation.

7.12. TGF- β führt zur Induktion von Foxp3 in $\gamma\delta$ T-Zellen, nicht aber notwendigerweise zu einem regulatorischen Phänotyp

Wie in vorliegender Arbeit gezeigt werden konnte exprimieren $\gamma\delta$ T-Zellen kein Treg-spezifisches Foxp3 (259D), auch nicht nach Aktivierung über den TZR oder bei einem zusätzlichem Kostimulus (Abb. 21, Abb. 23). Casetti *et al.* und Li *et al.* konnten demonstrieren, dass es möglich ist die Foxp3-Proteinexpression in V δ 2 bzw. V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen zu induzieren (Casetti *et al.* 2009; Li *et al.* 2011). In vorliegender Arbeit konnte eine solche Induktion von Foxp3 in $\gamma\delta$ T-Zellen durch Zugabe der entsprechenden Zytokine ebenfalls erreicht werden (Abb. 22).

- Diskussion -

Für die Generierung von CD4⁺ iTreg ist vor allem TGF-β1, aber auch IL-15 notwendig (Chen *et al.* 2003; Imamichi *et al.* 2008). Auch in BrHPP-stimulierten Vδ2 γδ T-Zellen induzieren IL-15 und TGF-β1 die Expression von Foxp3. Diese γδ T-Zellen sind Casetti *et al.* zufolge anschließend in der Lage die Proliferation kokultivierter PBMZ bei Stimulation durch plattengebundene anti-CD3,-28 mAk zu supprimieren (Casetti *et al.* 2009). γδ T-Zellen die im Rahmen vorliegender Arbeit unter vergleichbaren Bedingungen (durch BrHPP, TGF-β1 und IL-15) expandiert wurden, wiesen zwar während der Expansion eine Foxp3-Proteinexpression (259D) auf, waren aber bei Restimulation mit A/E-Partikeln oder BrHPP nicht in der Lage die Proliferation von Responder T-Zellen zu supprimieren (Abb. 22, Abb. 25). Dass sich in vorliegender Arbeit im Gegensatz zu den von Casetti *et al.* durchgeführten Experimenten unter ähnlichen Bedingungen keine Suppression beobachten ließ, ist möglicherweise auf Unterschiede in der Versuchsdurchführung zurückzuführen. Casetti *et al.* demonstrierten die Suppressivität anhand der Inhibition der PBMZ-Proliferation. Die innerhalb der PBMZ enthaltenden Zellpopulationen wie z.B. Treg, die ebenfalls durch den von ihnen verwendeten polyklonalen Stimulus aktiviert werden, könnten eine Erklärung für diese unterschiedlichen Beobachtungen darstellen. Da bei den in vorliegender Arbeit durchgeführten Untersuchung der (direkten) Interaktion von Responder- und γδ T-Zellen keine weiteren Zellpopulationen vorhanden waren, ließen sich hier eventuelle Einflüsse durch diese ausschließen. Außerdem wurden die von Casetti *et al.* verwendeten Vδ2 γδ T-Zellen nach einem Expansionszeitraum von nur zehn Tagen verwendet. Zu diesem Zeitpunkt war bei den in dieser Arbeit verwendeten auf unterschiedliche Weise expandierten γδ T-Zellen in allen Fällen noch eine starke Proliferation zu erkennen. Um eine Suppression durch bereits aktivierte bzw. proliferierende Zellen aufgrund von Konkurrenz um Wachstumsfaktoren ausschließen zu können, wurden in vorliegender Arbeit die expandierten γδ T-Zellen erst verwendet, als diese keine Proliferation mehr aufwiesen (nach 16 Tagen). Bei einer verfrühten Restimulation der Zellen besteht weiterhin die Gefahr AICD in diesen auszulösen. Nach BrHPP-Restimulation BrHPP-, TGF-β1- und IL-15-expandierter γδ T-Zellen wurde die Proliferation von Responder T-Zellen, die mit einem SE-Gemisch stimuliert wurden, nicht supprimiert (Abb. 25). Hierzu im Widerspruch steht die von Li *et al.* gemachte Beobachtung, dass unter Verwendung von TZR-Stimulus, TGF-β1 und IL-2 expandierte CD27⁺ Vδ1 γδ T-Zellen bei Restimulation durch anti-CD3 mAk die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen inhibieren (Li *et al.* 2011). Die unterschiedliche Suppressivität lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass es sich bei den in dieser Arbeit unter Verwendung von BrHPP, TGF-β1 und IL-15 expandierten γδ T-Zellen hauptsächlich um Vδ2 γδ T-Zellen handelt (Abb. 23). Sowohl die von Casetti *et al.* als auch die von Li *et al.* durchgeführte γδ T-Zell-Expansion zur Induktion regulatorischer Funktion fand innerhalb der PBMZ statt, wobei erstere IPP und letztere anti-TZRγδ zur initialen Stimulation der γδ T-Zellen verwendeten

- Diskussion -

(Casetti *et al.* 2009; Li *et al.* 2011). In vorliegender Arbeit wurden die $\gamma\delta$ T-Zellen vor deren Expansion magnetisch separiert, was ebenfalls eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede sein könnte. Durch die vorangegangene Isolation war es möglich die Zellen unter definierten Bedingungen zu stimulieren und Einflüsse von anderen in den PBMZ enthaltenden Zellpopulationen zu vermeiden. Ferner war es dadurch möglich, zusätzlich zur TZR-Stimulation einen CD28-Kostimulus zu applizieren ohne dabei andere Zellen unspezifisch zu aktivieren.

Die Tatsache, dass die im Rahmen vorliegender Arbeit durch BrHPP, TGF- β 1 und IL-15 expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen keine suppressive Aktivität aufwiesen, obwohl die Proteinexpression von Foxp3 (Klon 259D) induziert wurde, lässt sich mit Ergebnissen anderer Untersuchungen vereinbaren. Imamichi *et al.* konnten zeigen, dass mit anti-CD3 mAk stimulierte und mit Hilfe der erwähnten Zytokine induzierte CD4⁺ iTreg nur eine schwache regulatorische Aktivität aufweisen (Imamichi *et al.* 2008). Tran *et al.* beschrieben weiterhin, dass die Induktion von Treg-spezifischem Foxp3 in T-Zellen durch TGF- β 1 nicht zwingend zu einem anergen oder suppressiven Phänotyp führt und außerdem mit erhöhter Zytokinproduktion der Zellen einhergehen kann (Tran *et al.* 2007). Kang *et al.* stellten weiterhin fest, dass bei anti-TCR $\gamma\delta$ mAK-Stimulation in Anwesenheit von TGF- β 1 bei aus dem peripheren Blut isolierten humanen $\gamma\delta$ T-Zellen anders als bei murinen $\gamma\delta$ T-Zellen nicht die Entstehung regulatorischer $\gamma\delta$ T-Zellen induziert wird (Kang *et al.* 2009). Von Allan *et al.* durchgeführte Experimente zeigen, dass retroviral mit Foxp3 transfizierte humane CD4⁺ T-Zellen keinen suppressiven Phänotyp besitzen (Allan *et al.* 2005). Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die alleinige Expression von Foxp3 nicht ausreichend für die Induktion suppressiver Aktivität ist und noch andere Faktoren hierfür von Bedeutung sein müssen. Ferner ist bekannt, dass in mit Hilfe von TGF- β 1 induzierten CD4⁺ Treg die Foxp3-Proteinexpression weniger stabil als in nTreg ist und diese nur in Anwesenheit von TGF- β 1 aufrecht erhalten wird (Baron *et al.* 2007; Floess *et al.* 2007). Diese Tatsache deckt sich ebenfalls mit den in vorliegender Arbeit gemachten Beobachtungen. Bei Expansion der $\gamma\delta$ T-Zellen unter Zusatz von TGF- β 1 und IL-15 kam es ebenfalls nur zur transienten Proteinexpression von Foxp3, welche 16 Tage nach initialer Stimulation (zu Beginn der Kokultur zur Untersuchung der suppressiven Kapazität) kaum noch nachweisbar war (Abb. 25) (Casetti *et al.* 2009).

Weiterhin ist ein negativer Einfluss von TGF- β 1 auf die Proliferation verschiedener Lymphozyten-Populationen beschrieben worden. TGF- β 1 kann die Proliferation von T-Zellen und NK-Zellen negativ beeinflussen und wird häufig von Tumoren zur Suppression von Immunantworten freigesetzt (Gorelik & Flavell 2002; Siegel & Massague 2003). Außerdem stellt TGF- β 1 einen Bestandteil der Suppressionsmechanismen von Treg dar (Gorelik & Flavell 2002; Cerwenka & Swain 1999). Capietto *et al.* konnten einen negativen Einfluss von TGF- β 1 auf die Proliferation von V δ 2⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen feststellen, der allerdings durch Applikation

von höheren Mengen BrHPP oder IL-2 aufgehoben wurde (Capietto *et al.* 2010). Li *et al.* berichteten, dass bei anti-CD3 mAk-Stimulation expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β 1 und IL-15 diese ebenfalls eine eingeschränkte Proliferation aufwiesen (Li *et al.* 2011). Eine verringerte Expansion von $\gamma\delta$ T-Zellen in Anwesenheit von TGF- β 1 und IL-15 ließ sich in vorliegender Arbeit fünf Tage nach Stimulation durch BrHPP oder durch A/E-Partikel beobachten (Abb. 24). Zu späteren Zeitpunkten der Expansion bzw. nach Restimulation konnte allerdings eine deutlich gesteigerte Proliferation der initial mit TGF- β 1 und IL-15 behandelten $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden (Abb. 25). TGF- β 1 scheint in den hier durchgeführten Untersuchungen nicht als suppressives Zytokin zu fungieren. Die anfänglich reduzierte, später deutlich gesteigerte Proliferation lässt sich hingegen gut mit einer möglichen Rolle von TGF- β 1 bei der $\gamma\delta$ T-Zell-Differenzierung vereinbaren.

7.13. Helios und Foxp3 sind notwendig für die Differenzierung regulatorischer ($\gamma\delta$) T-Zellen

Wie bereits erwähnt, waren (BrHPP-, TGF- β - und IL-15-expandierte) $\gamma\delta$ T-Zellen, in denen die Foxp3-Proteinexpression (Klon 259D) induziert wurde, nach BrHPP-Restimulation nicht in der Lage die Proliferation von SE-stimulierten Responder T-Zellen zu supprimieren. Ebenso wenig waren (A/E-Partikel- und IL-2-expandierte) $\gamma\delta$ T-Zellen, in denen die Helios-Proteinexpression induziert wurde, nach BrHPP-Restimulation in der Lage die Proliferation dieser Responder T-Zellen zu supprimieren. Einzig (A/E-Partikel-, TGF- β - und IL-15-expandierte) $\gamma\delta$ T-Zellen, in denen sowohl die Foxp3- als auch Helios-Proteinexpression induziert wurde, supprimierten bei entsprechender (Re-)stimulation die Responder T-Zell-Proliferation (Abb. 23, Abb. 25). Diese Ergebnisse legen nahe, dass Helios nicht *per se* zu regulatorischen Funktionen führt oder diese steuert, aber vermutlich einen Faktor bei der Differenzierung zu regulatorischen Zellen darstellt. Die gleichzeitige Induktion von Helios zusammen mit weiteren Faktoren wie z.B. Foxp3 nach initialer Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen besitzt bei diesen möglicherweise einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung regulatorischer Funktionen.

Aufgrund seiner Beteiligung an epigenetischen Prozessen ist es wahrscheinlich, dass Helios bei T-Zell-Differenzierungsprozessen eine Rolle spielt. Innerhalb des NuRD-Komplexes interagiert Helios mit verschiedenen HDAC und Methyltransferasen. Aufgrund dieser Interaktion ist es möglich, dass Helios das *Chromatinremodelling* beeinflusst, welches bei verschiedenen zellulären Prozessen u.a. bei der Zellproliferation und Differenzierung eine Rolle spielt (Bruniquel & Schwartz 2003; Rao *et al.* 2003; Sridharan & Smale 2007; Kim *et al.* 1999). Durch die Beteiligung an diesen Prozessen kann Helios möglicherweise die Expression anderer Transkriptionsfaktoren epigenetisch regulieren/beeinflussen. Für Foxp3 etwa ist bekannt, dass dessen Expression bzw. Stabilität maßgeblich durch die Methylierung

- Diskussion -

des Foxp3-Gens beeinflusst und gesteuert wird. Für eine stabile Foxp3-Expression sind die Demethylierung des Foxp3-Gens, das in naiven T-Zellen methyliert vorliegt sowie die cis-aktivierender Bereiche notwendig (Floess *et al.* 2007; Hoffmann *et al.* 2009; Lal *et al.* 2009). Zur wechselseitigen Interaktion zwischen Helios und Foxp3 existieren widersprüchliche Beobachtungen, vermutlich aber wird die Foxp3-Expression durch Helios beeinflusst (Zheng & Rudensky 2007). Da Helios mit nTreg, die eine stabile Foxp3-Transkription aufweisen, in Zusammenhang gebracht wird (Thornton *et al.* 2010), scheint eine Rolle von Helios bei der epigenetischen Steuerung der stabilen Foxp3-Transkription möglich. Vermutlich übt Helios selbst keinen direkten Einfluss auf suppressive Funktion aus, spielt aber eine Rolle bei der Entstehung von Treg und bei der stabilen Expression von Foxp3. Andere Publikationen beschreiben eine Interaktion von Foxp3 mit Eos, einem anderen Transkriptionsfaktor der Ikaros-Familie. In murinen nTreg ist diese Interaktion an der Foxp3-vermittelten epigenetischen Stilllegung der Transkription verschiedener Gene beteiligt. Weiterhin scheint die Expression von Eos im Gegensatz zu der von Foxp3 notwendig für die suppressive Funktion von Treg zu sein (Pan *et al.* 2009). Erste weiterführende Ergebnisse zeigen die Induktion der Eos-Genexpression in $\gamma\delta$ T-Zellen, nachdem diese in Anwesenheit von TGF- β und IL-15 durch A/E-Partikel stimuliert wurden (Daten nicht gezeigt). In diesen Zellen wurde, wie schon erwähnt, außer der Expression von Eos auch die von Foxp3 und Helios induziert. Diese Zellen supprimierten nach BrHPP-Restimulation die Proliferation von Responder T-Zellen (Abb. 22, Abb. 25). Im Gegensatz zu der Expression von Helios oder Foxp3 wurde die von Eos nur bei Anwesenheit von sowohl TGF- β und IL-15 als auch eines CD28-Kostimulus induziert. Helios und Eos können über C-Terminal lokalisierte Zinkfinger-Domänen miteinander als Heterodimer interagieren (Cobb & Smale 2005). Diese Interaktion könnte ebenfalls eine Rolle bei bestimmten Differenzierungsvorgängen bzw. der Entstehung regulatorischer Zellen spielen.

Zusammenfassend ist für die Differenzierung von (regulatorischen) T-Zellen vermutlich eher das Zusammenspiel verschiedener Transkriptionsfaktoren von Bedeutung, als die exklusive Expression eines einzelnen. Es ist durchaus denkbar, dass in diesem Zusammenhang die gleichzeitige Expression von Foxp3, Helios und Eos eine entscheidende Rolle spielt.

7.14. TGF- β führt zur Differenzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen

Li *et al.* beschreiben für anti-TZR $\gamma\delta$ stimulierte und mit TGF- β behandelte $\gamma\delta$ T-Zellen eine leicht präferentielle Expansion der V δ 1-, während der relative Anteil der V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zell-Population leicht zurückging (Li *et al.* 2011). In vorliegender Arbeit kam es bei A/E-Partikel-Stimulation (nicht bei BrHPP-Stimulation) unter dem Einfluss von TGF- β und IL-15 zu einer Expansion von V δ 1 (V δ 2-negativen) $\gamma\delta$ T-Zellen. Bei Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit A/E-Partikeln unter IL-2-Zugabe kam es zu keiner deutlichen Verschiebung des initialen

- Diskussion -

Verhältnisses der $\gamma\delta$ T-Zellsubpopulationen untereinander. Folglich war vermutlich der zusätzliche CD28-Kostimulus in Verbindung mit TGF- β für die verstärkte Expansion von V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen verantwortlich. Weil es sich bei einem Großteil der naiven $\gamma\delta$ - um V δ 1 $\gamma\delta$ T-Zellen handelt, ist es wahrscheinlich, dass durch die A/E-Partikel-Stimulation unter Zugabe von TGF- β hauptsächlich naive $\gamma\delta$ T-Zellen proliferieren (Abb. 23). Da durch BrHPP selektiv V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen stimuliert werden, spricht die Suppression von Responder T-Zellen durch A/E-Partikel-, TGF- β - und IL-15-expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen nach BrHPP-Restimulation dafür, dass trotz des deutlich gesteigerten V δ 1- (V δ 2-negativen-) Anteils die beobachtete Suppression durch V δ 2 $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelt wurde.

Es ist bekannt, dass TGF- β als ein Faktor zur Differenzierung von T-Zellen beitragen kann (Gorelik & Flavell 2002). Yamagiwa *et al.* beschrieben weiterhin, dass TGF- β in naiven CD4⁺ T-Zellen nicht nur zur Expression von Foxp3, sondern auch zur Differenzierung von CD45RA⁺ CD4⁺ T-Zellen zu einem aktivierten CD45RO⁺ Phänotyp führt (Yamagiwa *et al.* 2001). In vorliegender Arbeit konnte (unabhängig von der Stimulationsmethode) durch TGF- β ein Rückgang der CD27-Oberflächenexpression festgestellt werden (Abb. 22). Dieser konnte vor allem innerhalb der Helios⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 23). TGF- β scheint demnach die Differenzierung von Helios⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen zu CD27⁻ Effektorzellen zu fördern. Wie von Caccamo *et al.* beschrieben, produzieren Effektorzellen (T_{EM} und T_{EMRA}) größere Mengen proinflammatorischer Zytokine (Caccamo *et al.* 2005). In vorliegender Arbeit ließ sich bei Restimulation mit einem Phorbolester (TPA) eine gesteigerte Produktion löslicher Mediatoren (von Granzym B, IFN- γ , TNF- α und CCL3) der durch BrHPP, TGF- β und IL-15 expandierten Helios⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen bestätigen (Abb. 24). Auch in Helios⁺ Zellen führte TGF- β zu einer verminderten CD27-Oberflächenexpression, war aber weiterhin vorhanden. Die durch A/E-Partikel-Stimulation induzierte Helios-Proteinexpression korrelierte mit der CD27-Oberflächenexpression (Abb. 23). Vermutlich repräsentieren diese Helios und CD27 doppelt-positiven Zellen einen naiven Phänotyp. Capietto *et al.* konnten nach TZR-Stimulation in Anwesenheit von TGF- β ebenfalls eine Zunahme proliferierender CD27⁺CD45RA⁺ $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisen (Capietto *et al.* 2010). Auch wurde beschrieben, dass TGF- β die Differenzierung von naiven zu T_{CM} fördern kann (Gorelik & Flavell 2002). Nach Phorbolester-Restimulation der A/E-Partikel-, TGF- β - und IL-15-expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurde trotz der verringerten CD27-Oberflächenexpression der vorwiegend Helios-exprimierenden Zellen eine verringerte Proteinexpression proinflammatorischer Mediatoren (Granzym B, IFN- γ , TNF- α und CCL3) festgestellt (Abb. 24). Durch TGF- β wird also vermutlich die Differenzierung von Helios⁻ $\gamma\delta$ T-Zellen zu Effektorzellen verstärkt, während es auf Helios-exprimierende $\gamma\delta$ T-Zellen anscheinend einen anderen Einfluss hat. Diese differenzieren nicht zu klassischen Effektorzellen. Die geringere Expression proinflamma-

- Diskussion -

torischer Mediatoren und das hohe proliferative Potential dieser Zellen nach Restimulation weist auf eine Differenzierung zu T_{CM} hin (Abb. 24, Abb. 25).

T-Zellen, die über den TZR und CD28 stimuliert werden, können verschiedene Transkriptionsfaktoren koexprimieren. Eine solche Koexpression wurde in aktivierten, proliferierenden T-Zellen beschrieben. Diese T-Zellen befinden sich in einem Stadium zwischen naiven und differenzierten Zellen (Malmhall *et al.* 2012). Die T-bet- und GATA-3-Expression stehen zu Beginn der Differenzierungsphase von T-Zellen miteinander in Konkurrenz. T-bet kann die Funktion von GATA-3 direkt inhibieren. GATA-3 wirkt der Th1-Differenzierung indirekt entgegen, indem es die Genexpression des IL-12-Rezeptors verhindert. Die Koexpression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren ermöglicht die Integration verschiedener Signale und bestimmt so den Phänotyp der T-Zellen (Usui *et al.* 2006; Hwang *et al.* 2005; Ansel *et al.* 2006). In vorliegender Arbeit konnte in $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl nach A/E-Partikel- als auch BrHPP-Stimulation in Anwesenheit von IL-2 die Proteinexpression von T-bet und GATA-3 festgestellt werden. Die T-bet-Proteinexpression war hierbei vergleichsweise stärker (Abb. 22).

Ferner ist bekannt, dass TGF- β der Th1- und Th2-Differenzierung entgegen wirken kann. TGF- β verhindert die Th1- und Th2-Differenzierung durch Inhibition der T-bet bzw. GATA-3-Expression (Gorelik *et al.* 2000; Gorelik *et al.* 2002; Heath *et al.* 2000; Neurath *et al.* 2002). Der antagonistische Effekt von TGF- β auf T-bet besitzt vermutlich die größere physiologische Relevanz. Murine CD4⁺ T-Zellen die keinen TGF- β -Rezeptor II exprimieren, differenzieren zu Th1-Zellen und weisen einen hyperproliferativen Phänotyp auf (Li *et al.* 2006). In vorliegender Arbeit wiesen $\gamma\delta$ T-Zellen, die in Anwesenheit von TGF- β und IL-15 expandiert wurden, unabhängig vom initial verwendeten Stimulus (BrHPP oder A/E-Partikel) eine geringere T-bet-Proteinexpression auf. Hierbei war die T-bet-Proteinexpression in A/E-Partikel-stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen besonders deutlich reduziert. Die GATA-3-Proteinexpression wurde innerhalb der ersten 8 Tage nach Stimulation durch TGF- β und IL-15 nicht beeinflusst, war aber aufgrund der verringerten T-bet-Proteinexpression in Relation zu dieser verstärkt (Abb. 22). A/E-Partikel-, TGF- β - und IL-15-expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen wiesen nach BrHPP-Restimulation eine starke GATA-3-Proteinexpression auf. Diese korrelierte mit der Suppression kokultivierter SE-Gemisch-stimulierter Responder T-Zellen. Auf andere Weise expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen waren bei BrHPP-Restimulation weder suppressiv noch exprimierten sie GATA-3 (Abb. 25). Möglicherweise ist in A/E-Partikel-, TGF- β 1- und IL-15-expandierten, BrHPP-restimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen die Expression von GATA-3 und eine damit verbundene Freisetzung von Th2-Zytokinen eine Reaktion auf die durch das SE-Gemisch induzierte, starke Th1-Antwort der kokultivierten Responder T-Zellen. Die Induktion der GATA-3-Proteinexpression in den kokultivierten Responder T-Zellen spricht für das Vorhandensein von Th2-Zytokinen. Hansmann *et al.* konnten zeigen, dass humane nTreg, die einen *memory*

- Diskussion -

Phänotyp aufweisen, nach *in vitro* Expansion die Foxp3-Proteinexpression herunterregulieren. Diese Herabregulation korrelierte mit der verstärkten GATA-3-Proteinexpression (bzw. mit der Expression von Th2-assoziierten Genen) (Hansmann *et al.* 2012). Wohlfert *et al.* konnten in (humanen und murinen) nTreg nach TZR-Stimulation ebenfalls eine verstärkte GATA-3-Proteinexpression nachweisen. Die GATA-3-Proteinexpression wirkte in Treg auch im inflammatorischen Kontext (unter Bedingungen zur Induktion einer Th1- oder Th17-Differenzierung) einer Differenzierung bzw. der Expression von Th1- und Th17-assoziierten Transkriptionsfaktoren entgegen (Wohlfert *et al.* 2011). Man kann also folgern, dass die in dieser Arbeit beobachtete GATA-3-Proteinexpression möglicherweise in Zusammenhang mit dem beobachteten suppressiven Phänotyp der $\gamma\delta$ T-Zellen steht.

Serre *et al.* stellten einen Zusammenhang zwischen Helios-Expression und Th2-Differenzierung her (Serre *et al.* 2011). Ein solcher Zusammenhang konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Obwohl A/E-Partikel-, TGF- β - und IL-15-expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen nach BrHPP-Restimulation sowohl GATA-3 als auch Helios exprimierten, wiesen A/E-Partikel- und IL-2-expandierte $\gamma\delta$ T-Zellen trotz Helios-Proteinexpression bei BrHPP-Restimulation keine GATA-3-Proteinexpression auf. Andererseits wurde GATA-3 nach A/E-Partikel-Restimulation auch von BrHPP-, TGF- β - und IL-15-expandierten $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert, die nur eine geringe Helios-Proteinexpression aufwiesen (Abb. 25). Diese Zellen waren im Übrigen die einzigen die nach A/E-Partikel-Restimulation sowohl die Proteinexpression von GATA-3 als

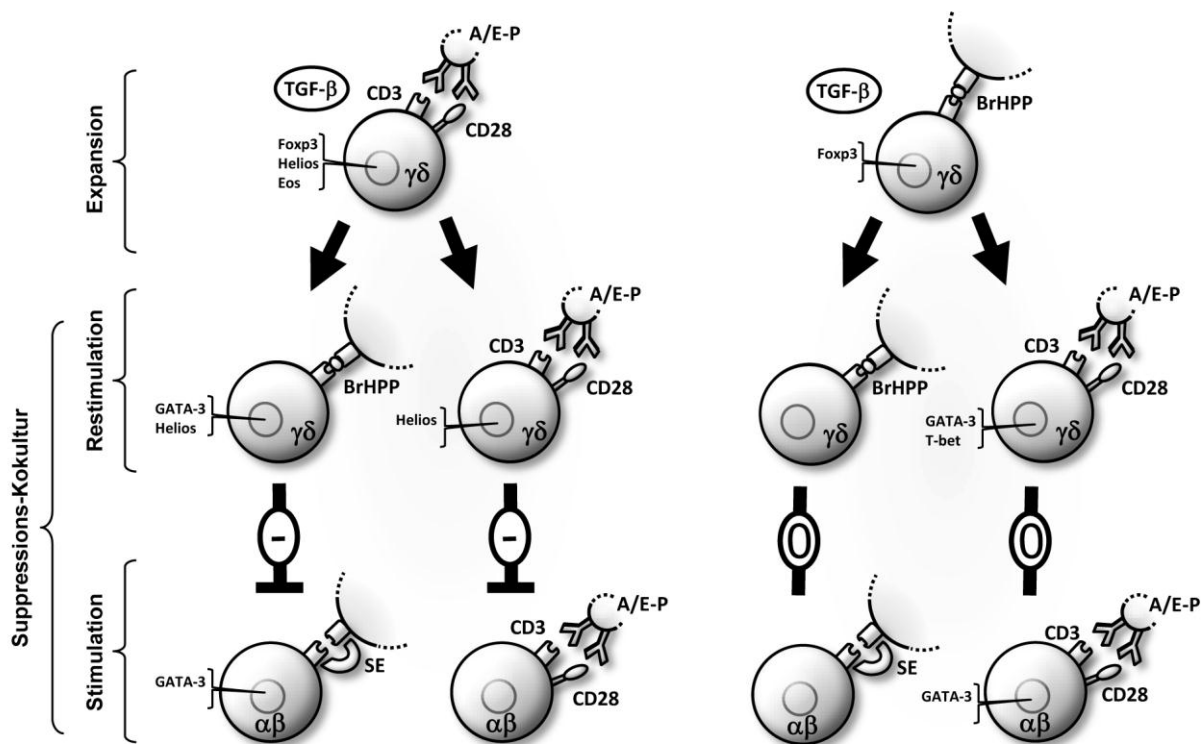


Abb. 30: Schematische Darstellung der funktionellen Unterschiede expandierter $\gamma\delta$ T-Zellen.
A/E-P = A/E-Partikel

- Diskussion -

auch von T-bet aufwiesen und die Proliferation von SE-Gemisch-stimulierten Responder T-Zellen nicht supprimierten. Die gleichzeitige Proteinexpression von GATA-3 und T-bet könnte auf einen Differenzierungsvorgang nach Restimulation dieser $\gamma\delta$ T-Zellen hindeuten. Der Einfluss von TGF- β auf die unterschiedlich stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen ist in Abbildung 30 zusammengefasst.

7.15. Fazit

$\gamma\delta$ T-Zellen unterscheiden sich phänotypisch klar von Treg. Die durch A/E-Partikel-stimulierte, frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen vermittelte Suppression der Responder T-Zell-Proliferation wird im Wesentlichen durch die Interaktion negativ-kostimulatorischer Oberflächenmoleküle mit ihren Liganden vermittelt. Beiden Zellpopulationen stehen miteinander in einer dynamischen Wechselwirkung. Diese Suppression kann durch TLR2-Liganden moduliert bzw. partiell aufgehoben werden. Dies geht einher mit einem Wandel von einem immunsuppressiven zu einem stimulatorischen $\gamma\delta$ T-Zell Phänotyp. Diese Möglichkeit zur Modulation einer Reaktion spricht für eine hohe funktionelle Plastizität von $\gamma\delta$ T-Zellen und könnte in der frühen Phase der Entstehung einer Immunantwort von Bedeutung sein. Diese starke funktionelle Plastizität wird vermutlich durch die Integration verschiedener (z.B. TZR, TLR) Signale in gemeinsamen Signalwegen (wie z.B. der PI3K/AKT-, NF- κ B- und MAP-Kinase-Signalweg) erreicht.

Auch bei der Differenzierung (TGF- β -) induzierter regulatorischer $\gamma\delta$ T-Zellen zeigte sich, dass nicht nur das Zytokinmilieu, sondern auch der Kontext der initialen Stimulation ausschlaggebend für die Differenzierung von $\gamma\delta$ T-Zellen ist. Bei der Differenzierung der induzierten regulatorischen $\gamma\delta$ T-Zellen ist wiederum die Integration verschiedener Signale bzw. die Stärke der Proteinexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren (GATA-3-, T-bet-, Foxp3 und Helios) für den entstehenden Phänotyp entscheidend.

Zusammenfassend zeigen die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse, dass $\gamma\delta$ T-Zellen im Gegensatz zu Treg keinen *per se* suppressiven Phänotyp besitzen. Vielmehr scheinen $\gamma\delta$ T-Zellen ein hohes Maß an Plastizität zu besitzen und abhängig vom Kontext ihrer Stimulation in der Lage zu sein andere Zellpopulationen zu beeinflussen. Diese Feststellung lässt sich mit einem Zitat von Göran Möller aus dem Jahre 1988 zusammenfassen, in welchem er vom Konzept einer eigenständigen „Suppressor“ T-Zell-Population Abstand nimmt (bevor man diese als Treg durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 charakterisieren konnte): *„Ich zweifel nicht an der Existenz suppressiver Phänomene oder daran, dass T-Zellen Suppressivität vermitteln können, aber ich bin skeptisch bezüglich der Auffassung, dass suppressive T-Zellen eine eigenständige Subpopulation innerhalb der T-Zellen darstellen (Möller 1988)“*. Vermutlich spiegelt ein Konzept bei dem suppressive Funktionen nicht auf eine bestimmte $\gamma\delta$ T-Zell-(Sub)population beschränkt sind, sondern je nach Kontext der Antigenerkennung initiiert werden die Verhältnisse *in vivo* realistisch wider, da es besser mit der funktionellen Diversität von $\gamma\delta$ T-Zellen vereinbar ist.

8. Zusammenfassung

8.1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Suppression der Proliferation von CD4⁺CD25⁻ (Responder) T-Zellen durch frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen gezeigt werden. Obwohl $\gamma\delta$ T-Zellen vergleichbar den Treg in der Lage waren die Proliferation der Responder T-Zellen zellzahlabhängig zu supprimieren, unterschieden sich $\gamma\delta$ T-Zellen jedoch phänotypisch von Treg. Konstitutiv von Treg exprimierte Moleküle wie CTLA-4, CD25, CD39 und andere waren auf der Oberfläche von $\gamma\delta$ T-Zellen erst nach deren Stimulation nachweisbar. Einzig der Transkriptionsfaktor Helios war bei etwa einem Drittel der $\gamma\delta$ T-Zellen konstitutiv vorhanden. Ferner wurde die Helios-Proteinexpression nach TZR-Stimulation in Verbindung mit einem CD28-Kostimulus spezifisch in $\gamma\delta$ T-Zellen induziert. Der für Treg charakteristische Transkriptionsfaktor Foxp3 (Klon 259D) wurde in $\gamma\delta$ T-Zellen nur in Anwesenheit von Treg-induzierenden Bedingungen exprimiert. Die Untersuchungen zur Induktion regulatorischer Funktionen deuten darauf hin, dass die CD28-Kostimulation eine entscheidende Rolle für die Differenzierung regulatorischer ($\gamma\delta$) T-Zellen spielt und dass sowohl die Expression von Foxp3 als auch Helios für diese Differenzierung notwendig ist.

Bei der Suppression von Responder T-Zellen durch aktivierte frisch isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen spielte die Konkurrenz um IL-2 keine entscheidende Rolle. Die festgestellte Suppression war zellkontaktabhängig und wurde durch die Interaktion der immunregulatorischen Oberflächmoleküle CD86 und CTLA-4 bzw. PD-L1 und dessen Liganden (PD-1) vermittelt. Diese Art der Suppression ähnelte eher der durch suppressive (myeloide) DZ als der durch Treg vermittelten Suppression.

Des Weiteren konnte eine partielle Aufhebung der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression durch TLR2-Liganden gezeigt werden. Die TLR2-abhängige Modulation der Oberflächenexpression von CTLA-4, CD86, PD-L1 und PD-1, die mit einer Aufhebung der Suppression einherging, spricht ebenfalls für eine Beteiligung dieser Moleküle an der $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelten Suppression. TLR2-Liganden führten bei $\gamma\delta$ T-Zellen außerdem zu einer gesteigerten Proliferation und Produktion löslicher Mediatoren (IFN- γ , TNF- α , CCL5 und Granzym B). Die TLR2-Liganden besaßen ausschließlich kostimulatorische Funktion und hatten nur in Verbindung mit einem TZR-Stimulus eine Wirkung. Durch Kostimulation mit TLR2-Liganden war die Phosphorylierung von Signalmolekülen der PI3K/AKT- (AKT), NF- κ B- (NF- κ B/p65) und MAP-Kinase-Signalwege (p38, ERK) gesteigert.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit können zu einem besseren Verständnis intrinsischer regulatorischer Funktionen von $\gamma\delta$ T-Zellen sowie von Vorgängen bei der Entstehung bzw. Induktion regulatorischer $\gamma\delta$ T-Zellen beitragen. Die Regulation der Responder T-Zell-

- Diskussion -

Proliferation durch aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen könnte dazu beitragen Autoimmunreaktionen entgegenzuwirken. Des Weiteren können diese Ergebnisse helfen suppressive Eigenschaften von $\gamma\delta$ T-Zellen, die im Rahmen einer Tumorbehandlung durch adoptiven Transfer verabreicht werden, zu unterdrücken bzw. zu vermeiden.

8.2. Summary

The aim of this doctoral thesis was to characterize human regulatory $\gamma\delta$ T cells, which can mediate suppression of CD4⁺ CD25⁻ (responder) T cell proliferation, *in vitro*. Comparable to conventional regulatory T cells (Treg) freshly isolated $\gamma\delta$ T cells inhibited responder T cell proliferation, but they differed from Treg in their phenotype. Molecules constitutively expressed on Treg including CTLA-4, CD25, CD39 and others, were detected on the surface of $\gamma\delta$ T cells only after stimulation. Among the analyzed markers, only the transcription factor Helios was constitutively present in about one-third of the $\gamma\delta$ T cells, and was further up-regulated after T cell receptor (TCR) stimulation in combination with CD28 co-stimulation. Foxp3 (clone 259D), the master transcription factor of Treg, was expressed in $\gamma\delta$ T cells only under Treg-inducing conditions. The analysis of the induction of regulatory activity indicated that CD28 co-stimulation played a crucial role in regulating the differentiation of regulatory $\gamma\delta$ T cells, and that the expression of both Foxp3 and Helios seemed to be necessary for this differentiation process.

Competition for IL-2 could be excluded as the mechanism for responder T cell suppression by freshly isolated activated $\gamma\delta$ T cells. The observed suppression was cell contact-dependent and was mediated by the reciprocal interaction of the immune regulatory surface molecules CD86 and CTLA-4, PD-L1 and its ligand (PD-1). This type of suppression resembles more the inhibition mediated by suppressive (myeloid) dendritic cells rather than the inhibition mediated by Treg.

Further studies revealed a partial abrogation of $\gamma\delta$ T cell-mediated suppression by TLR2 ligands. The TLR2-dependent modulation of CTLA-4, CD86, PD-L1 and PD-1 cell surface expression which was accompanied by the abrogation of suppression also argues for a role of these molecules in the $\gamma\delta$ T cell-mediated suppression. In $\gamma\delta$ T cells TLR2 ligands induced an increased proliferation and production of soluble mediators (IFN- γ , TNF- α , CCL5 and granzyme B). The TLR2 ligands displayed only a co-stimulatory function and thus required a TCR-stimulus. Co-stimulation with TLR2 ligands enhanced the phosphorylation of PI3K/AKT-(AKT), NF- κ B- (NF- κ B/p65) and MAP kinase (p38, ERK) pathway signalling molecules.

The results of this thesis contribute to a better understanding of the intrinsic regulatory functions of $\gamma\delta$ T cells as well as of pathways involved in the development and induction of regulatory $\gamma\delta$ T cells. The regulation of responder T cell proliferation by activated $\gamma\delta$ T cells might contribute to counteracting autoimmune reactions. Moreover, these results could help to prevent or rather avoid suppressive properties of $\gamma\delta$ T cells in conditions where $\gamma\delta$ T cells are administered therapeutically, e.g. within the frame of tumor immunotherapy.

9. Literatur

1. Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H. & Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int.Immunol.*, 8, 765-772.
2. Akimova, T., Beier, U. H., Wang, L., Levine, M. H. & Hancock, W. W. (2011). Helios expression is a marker of T cell activation and proliferation. *PLoS.One.*, 6, e24226.
3. Akira, S. & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat.Rev.Immunol.*, 4, 499-511.
4. Akira, S., Uematsu, S. & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
5. Allan, S. E., Crome, S. Q., Crellin, N. K., Passerini, L., Steiner, T. S., Bacchetta, R., Roncarolo, M. G. & Levings, M. K. (2007). Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *Int.Immunol.*, 19, 345-354.
6. Allan, S. E., Passerini, L., Bacchetta, R., Crellin, N., Dai, M., Orban, P. C., Ziegler, S. F., Roncarolo, M. G. & Levings, M. K. (2005). The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J.Clin.Invest*, 115, 3276-3284.
7. Altincicek, B., Moll, J., Campos, N., Foerster, G., Beck, E., Hoeffler, J. F., Grosdemange-Billiard, C., Rodriguez-Concepcion, M., Rohmer, M., Boronat, A., Eberl, M. & Jomaa, H. (2001). 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, 3655-3658.
8. Amodio, G. & Gregori, S. (2012). Dendritic cells a double-edge sword in autoimmune responses. *Front Immunol.*, 3, 233.
9. Ansel, K. M., Djuretic, I., Tanasa, B. & Rao, A. (2006). Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. *Annu.Rev.Immunol.*, 24, 607-656.
10. Ashley, C. W. & Baecher-Allan, C. (2009). Cutting Edge: Responder T cells regulate human DR+ effector regulatory T cell activity via granzyme B. *J.Immunol.*, 183, 4843-4847.
11. Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J. & Hafler, D. A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J.Immunol.*, 167, 1245-1253.
12. Baron, U., Floess, S., Wieczorek, G., Baumann, K., Grutzkau, A., Dong, J., Thiel, A., Boeld, T. J., Hoffmann, P., Edinger, M., Turbachova, I., Hamann, A., Olek, S. & Huehn, J. (2007). DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur.J.Immunol.*, 37, 2378-2389.
13. Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H. H. & Kabelitz, D. (2008). Innate immune functions of human gammadelta T cells. *Immunobiology*, 213, 173-182.
14. Belkaid, Y. & Rouse, B. T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat.Immunol.*, 6, 353-360.
15. Bettelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 102, 5138-5143.
16. Beutler, B. (2009). Microbe sensing, positive feedback loops, and the pathogenesis of inflammatory diseases. *Immunol.Rev.*, 227, 248-263.

- Literatur -

17. Bhagat, G., Naiyer, A. J., Shah, J. G., Harper, J., Jabri, B., Wang, T. C., Green, P. H. & Manavalan, J. S. (2008). Small intestinal CD8+TCRgammadelta+NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J.Clin.Invest*, 118, 281-293.
18. Bhoj, V. G. & Chen, Z. J. (2009). Ubiquitylation in innate and adaptive immunity. *Nature*, 458, 430-437.
19. Bi, Y. & Yang, R. (2012). Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions. *Scand.J.Immunol.*, 75, 543-552.
20. Boismenu, R. (2000). Function of intestinal gammadelta T cells. *Immunol.Res.*, 21, 123-127.
21. Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staeger, M. S., Stassen, M., Jonuleit, H. & Schmitt, E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.*, 204, 1303-1310.
22. Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di, M. D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M. L., Rossini, P. M., Battistini, L., Rotzschke, O. & Falk, K. (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110, 1225-1232.
23. Boullier, S., Poquet, Y., Debord, T., Fournie, J. J. & Gougeon, M. L. (1999). Regulation by cytokines (IL-12, IL-15, IL-4 and IL-10) of the Vgamma9Vdelta2 T cell response to mycobacterial phosphoantigens in responder and anergic HIV-infected persons. *Eur.J.Immunol.*, 29, 90-99.
24. Brandes, M., Willmann, K., Bioley, G., Levy, N., Eberl, M., Luo, M., Tampe, R., Levy, F., Romero, P. & Moser, B. (2009). Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 106, 2307-2312.
25. Brandes, M., Willmann, K. & Moser, B. (2005). Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science*, 309, 264-268.
26. Brown, J. A., Dorfman, D. M., Ma, F. R., Sullivan, E. L., Munoz, O., Wood, C. R., Greenfield, E. A. & Freeman, G. J. (2003). Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J.Immunol.*, 170, 1257-1266.
27. Bruniquel, D. & Schwartz, R. H. (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat.Immunol.*, 4, 235-240.
28. Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. & Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat.Genet.*, 27, 68-73.
29. Burk, M. R., Mori, L. & De, L. G. (1995). Human V gamma 9-V delta 2 cells are stimulated in a cross-reactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites. *Eur.J.Immunol.*, 25, 2052-2058.
30. Butte, M. J., Keir, M. E., Phamduy, T. B., Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. (2007). Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity*, 27, 111-122.
31. Caccamo, N., Meraviglia, S., Ferlazzo, V., Angelini, D., Borsellino, G., Poccia, F., Battistini, L., Dieli, F. & Salerno, A. (2005). Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur.J.Immunol.*, 35, 1764-1772.

- Literatur -

32. Cai, Q., Dierich, A., Oulad-Abdelghani, M., Chan, S. & Kastner, P. (2009). Helios deficiency has minimal impact on T cell development and function. *J.Immunol.*, 183, 2303-2311.
33. Capietto, A. H., Martinet, L., Cendron, D., Fruchon, S., Pont, F. & Fournie, J. J. (2010). Phosphoantigens overcome human TCRVgamma9+ gammadelta Cell immunosuppression by TGF-beta: relevance for cancer immunotherapy. *J.Immunol.*, 184, 6680-6687.
34. Caramalho, I., Lopes-Carvalho, T., Ostler, D., Zelenay, S., Haury, M. & Demengeot, J. (2003). Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J.Exp.Med.*, 197, 403-411.
35. Carreno, B. M., Bennett, F., Chau, T. A., Ling, V., Luxenberg, D., Jussif, J., Baroja, M. L. & Madrenas, J. (2000). CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J.Immunol.*, 165, 1352-1356.
36. Carreno, B. M. & Collins, M. (2002). The B7 family of ligands and its receptors: new pathways for costimulation and inhibition of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.*, 20, 29-53.
37. Carter, L., Fouser, L. A., Jussif, J., Fitz, L., Deng, B., Wood, C. R., Collins, M., Honjo, T., Freeman, G. J. & Carreno, B. M. (2002). PD-1:PD-L inhibitory pathway affects both CD4(+) and CD8(+) T cells and is overcome by IL-2. *Eur.J.Immunol.*, 32, 634-643.
38. Casetti, R., Agrati, C., Wallace, M., Sacchi, A., Martini, F., Martino, A., Rinaldi, A. & Malkovsky, M. (2009). Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. *J.Immunol.*, 183, 3574-3577.
39. Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.*, 30, 1538-1543.
40. Cerwenka, A. & Swain, S. L. (1999). TGF-beta1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes.Infect.*, 1, 1291-1296.
41. Chambers, C. A., Cado, D., Truong, T. & Allison, J. P. (1997). Thymocyte development is normal in CTLA-4-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94, 9296-9301.
42. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J.Immunol.*, 173, 945-954.
43. Chen, C., Rowell, E. A., Thomas, R. M., Hancock, W. W. & Wells, A. D. (2006). Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J.Biol.Chem.*, 281, 36828-36834.
44. Chen, L. F. & Greene, W. C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.*, 5, 392-401.
45. Chen, M. L., Yan, B. S., Bando, Y., Kuchroo, V. K. & Weiner, H. L. (2008). Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Immunol.*, 180, 7327-7337.
46. Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K. J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S. M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGFb induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.*, 198, 1875-1886.
47. Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A. & Weiner, H. L. (1994). Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 265, 1237-1240.

- Literatur -

48. Chen, Z. W. & Letvin, N. L. (2003a). Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2 T cells: a new paradigm. *Trends Immunol.*, 24, 213-219.
49. Chen, Z. W. & Letvin, N. L. (2003b). Vgamma2Vdelta2+ T cells and anti-microbial immune responses. *Microbes.Infect.*, 5, 491-498.
50. Chuang, E., Fisher, T. S., Morgan, R. W., Robbins, M. D., Duerr, J. M., Vander Heiden, M. G., Gardner, J. P., Hambor, J. E., Neveu, M. J. & Thompson, C. B. (2000). The CD28 and CTLA-4 receptors associate with the serine/threonine phosphatase PP2A. *Immunity.*, 13, 313-322.
51. Cobb, B. S. & Smale, S. T. (2005). Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 290, 29-47.
52. Collins, A. V., Brodie, D. W., Gilbert, R. J., Iaboni, A., Manso-Sancho, R., Walse, B., Stuart, D. I., van der Merwe, P. A. & Davis, S. J. (2002). The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity.*, 17, 201-210.
53. Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S. & Vignali, D. A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450, 566-569.
54. Correia, D. V., d'Orey, F., Cardoso, B. A., Lanca, T., Grosso, A. R., DeBarros, A., Martins, L. R., Barata, J. T. & Silva-Santos, B. (2009). Highly active microbial phosphoantigen induces rapid yet sustained MEK/Erk- and PI-3K/Akt-mediated signal transduction in anti-tumor human gammadelta T-cells. *PLoS.One.*, 4, e5657.
55. Cortes, M., Wong, E., Koipally, J. & Georgopoulos, K. (1999). Control of lymphocyte development by the Ikaros gene family. *Curr.Opin.Immunol.*, 11, 167-171.
56. Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scand.J.Immunol.*, 70, 326-336.
57. Cottrez, F. & Groux, H. (2004). Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation*, 77, S12-S15.
58. Crellin, N. K., Garcia, R. V., Hadisfar, O., Allan, S. E., Steiner, T. S. & Levings, M. K. (2005). Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J.Immunol.*, 175, 8051-8059.
59. Curotto de Lafaille, M. A. & Lafaille, J. J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity.*, 30, 626-635.
60. Davidson, T. S., DiPaolo, R. J., Andersson, J. & Shevach, E. M. (2007). Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J.Immunol.*, 178, 4022-4026.
61. de la Rosa, M., Rutz, S., Dorninger, H. & Scheffold, A. (2004). Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur.J.Immunol.*, 34, 2480-2488.
62. Deaglio, S., Dwyer, K. M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J. F., Enjoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V. K., Strom, T. B. & Robson, S. C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J.Exp.Med.*, 204, 1257-1265.
63. DeBarros, A., Chaves-Ferreira, M., d'Orey, F., Ribot, J. C. & Silva-Santos, B. (2011). CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human gammadelta peripheral blood lymphocytes. *Eur.J.Immunol.*, 41, 195-201.
64. Deetz, C. O., Hebbeler, A. M., Propp, N. A., Cairo, C., Tikhonov, I. & Pauza, C. D. (2006). Gamma interferon secretion by human Vgamma2Vdelta2 T cells after stimulation with antibody against the T-cell receptor plus the Toll-Like receptor 2 agonist Pam3Cys. *Infect.Immun.*, 74, 4505-4511.

- Literatur -

65. Dieli, F., Poccia, F., Lipp, M., Sireci, G., Caccamo, N., Di, S. C. & Salerno, A. (2003). Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *J.Exp.Med.*, 198, 391-397.
66. Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat.Rev.Immunol.*, 8, 337-348.
67. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. (1999). B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat.Med.*, 5, 1365-1369.
68. Eberl, M., Altincicek, B., Kollas, A. K., Sanderbrand, S., Bahr, U., Reichenberg, A., Beck, E., Foster, D., Wiesner, J., Hintz, M. & Jomaa, H. (2002). Accumulation of a potent gammadelta T-cell stimulator after deletion of the lytB gene in Escherichia coli. *Immunology*, 106, 200-211.
69. Egan, P. J. & Carding, S. R. (2000). Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J.Exp.Med.*, 191, 2145-2158.
70. Ehrenstein, M. R., Evans, J. G., Singh, A., Moore, S., Warnes, G., Isenberg, D. A. & Mauri, C. (2004). Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. *J.Exp.Med.*, 200, 277-285.
71. Espinosa, E., Belmont, C., Pont, F., Luciani, B., Poupot, R., Romagne, F., Brailly, H., Bonneville, M. & Fournie, J. J. (2001). Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. *J.Biol.Chem.*, 276, 18337-18344.
72. Everts, B., Adegnik, A. A., Kruize, Y. C., Smits, H. H., Kremsner, P. G. & Yazdanbakhsh, M. (2010). Functional impairment of human myeloid dendritic cells during Schistosoma haematobium infection. *PLoS.Negl.Trop.Dis.*, 4, e667.
73. Exley, M. A. & Boyson, J. E. (2011). Protective role of regulatory decidual gammadelta T cells in pregnancy. *Clin.Immunol.*, 141, 236-239.
74. Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L. & Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat.Immunol.*, 4, 1206-1212.
75. Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R. & Neurath, M. F. (2004). Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+. *J.Immunol.*, 172, 5149-5153.
76. Ferrick, D. A., Schrenzel, M. D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W. G. & Lepper, H. (1995). Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*, 373, 255-257.
77. Floess, S., Freyer, J., Siewert, C., Baron, U., Olek, S., Polansky, J., Schlawe, K., Chang, H. D., Bopp, T., Schmitt, E., Klein-Hessling, S., Serfling, E., Hamann, A. & Huehn, J. (2007). Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS.Biol.*, 5, e38.
78. Flores-Borja, F., Jury, E. C., Mauri, C. & Ehrenstein, M. R. (2008). Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 105, 19396-19401.
79. Fontenot, J. D., Dooley, J. L., Farr, A. G. & Rudensky, A. Y. (2005). Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny. *J.Exp.Med.*, 202, 901-906.
80. Fox, B. C., Bignone, P. A., Brown, P. J. & Banham, A. H. (2008). Defense of the clone: antibody 259D effectively labels human FOXP3 in a variety of applications. *Blood*, 111, 3897-3899.

- Literatur -

81. Francisco, L. M., Sage, P. T. & Sharpe, A. H. (2010). The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol.Rev.*, 236, 219-242.
82. Francisco, L. M., Salinas, V. H., Brown, K. E., Vanguri, V. K., Freeman, G. J., Kuchroo, V. K. & Sharpe, A. H. (2009). PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J.Exp.Med.*, 206, 3015-3029.
83. Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R. & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J.Exp.Med.*, 192, 1027-1034.
84. Garcia, V. E., Sieling, P. A., Gong, J., Barnes, P. F., Uyemura, K., Tanaka, Y., Bloom, B. R., Morita, C. T. & Modlin, R. L. (1997). Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. *J.Immunol.*, 159, 1328-1335.
85. Garza, K. M., Agersborg, S. S., Baker, E. & Tung, K. S. (2000). Persistence of physiological self antigen is required for the regulation of self tolerance. *J.Immunol.*, 164, 3982-3989.
86. Georgopoulos, K. (2002). Haematopoietic cell-fate decisions, chromatin regulation and ikaros. *Nat.Rev.Immunol.*, 2, 162-174.
87. Getnet, D., Grosso, J. F., Goldberg, M. V., Harris, T. J., Yen, H. R., Bruno, T. C., Durham, N. M., Hipkiss, E. L., Pyle, K. J., Wada, S., Pan, F., Pardoll, D. M. & Drake, C. G. (2010). A role for the transcription factor Helios in human CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Mol.Immunol.*, 47, 1595-1600.
88. Girardi, M. (2006). Immunosurveillance and immunoregulation by gammadelta T cells. *J.Invest Dermatol.*, 126, 25-31.
89. Girardi, M., Lewis, J., Glusac, E., Filler, R. B., Geng, L., Hayday, A. C. & Tigelaar, R. E. (2002). Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation. *J.Exp.Med.*, 195, 855-867.
90. Gondek, D. C., Lu, L. F., Quezada, S. A., Sakaguchi, S. & Noelle, R. J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J.Immunol.*, 174, 1783-1786.
91. Gong, G., Shao, L., Wang, Y., Chen, C. Y., Huang, D., Yao, S., Zhan, X., Sicard, H., Wang, R. & Chen, Z. W. (2009). Phosphoantigen-activated V gamma 2V delta 2 T cells antagonize IL-2-induced CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cells in mycobacterial infection. *Blood*, 113, 837-845.
92. Gorelik, L., Constant, S. & Flavell, R. A. (2002). Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J.Exp.Med.*, 195, 1499-1505.
93. Gorelik, L., Fields, P. E. & Flavell, R. A. (2000). Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J.Immunol.*, 165, 4773-4777.
94. Gorelik, L. & Flavell, R. A. (2002). Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat.Rev.Immunol.*, 2, 46-53.
95. Gottschalk, R. A., Corse, E. & Allison, J. P. (2012). Expression of helios in peripherally induced foxp3+ regulatory T cells. *J.Immunol.*, 188, 976-980.
96. Govindaraj, R. G., Manavalan, B., Lee, G. & Choi, S. (2010). Molecular modeling-based evaluation of hTLR10 and identification of potential ligands in Toll-like receptor signaling. *PLoS.One.*, 5, e12713.

- Literatur -

97. Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H. & Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 6879-6884.
98. Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C. & Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat.Immunol.*, 3, 1097-1101.
99. Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Barchet, W., Colonna, M., Atkinson, J. P. & Ley, T. J. (2004). Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity.*, 21, 589-601.
100. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E. & Roncarolo, M. G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389, 737-742.
101. Haeryfar, S. M., DiPaolo, R. J., Tschärke, D. C., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2005). Regulatory T cells suppress CD8+ T cell responses induced by direct priming and cross-priming and moderate immunodominance disparities. *J.Immunol.*, 174, 3344-3351.
102. Hahm, K., Cobb, B. S., McCarty, A. S., Brown, K. E., Klug, C. A., Lee, R., Akashi, K., Weissman, I. L., Fisher, A. G. & Smale, S. T. (1998). Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev.*, 12, 782-796.
103. Hanninen, A. & Harrison, L. C. (2000). Gamma delta T cells as mediators of mucosal tolerance: the autoimmune diabetes model. *Immunol.Rev.*, 173, 109-119.
104. Hansmann, L., Schmidl, C., Kett, J., Steger, L., Andreesen, R., Hoffmann, P., Rehli, M. & Edinger, M. (2012). Dominant Th2 differentiation of human regulatory T cells upon loss of FOXP3 expression. *J.Immunol.*, 188, 1275-1282.
105. Hasan, U., Chaffois, C., Gaillard, C., Saulnier, V., Merck, E., Tancredi, S., Guet, C., Briere, F., Vlach, J., Lebecque, S., Trinchieri, G. & Bates, E. E. (2005). Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J.Immunol.*, 174, 2942-2950.
106. Hathcock, K. S., Laszlo, G., Pucillo, C., Linsley, P. & Hodes, R. J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J.Exp.Med.*, 180, 631-640.
107. Havran, W. L. & Allison, J. P. (1988). Developmentally ordered appearance of thymocytes expressing different T-cell antigen receptors. *Nature*, 335, 443-445.
108. Hayday, A. & Tigelaar, R. (2003). Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat.Rev.Immunol.*, 3, 233-242.
109. Hazeki, K., Nigorikawa, K. & Hazeki, O. (2007). Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biol.Pharm.Bull.*, 30, 1617-1623.
110. Heath, V. L., Murphy, E. E., Crain, C., Tomlinson, M. G. & O'Garra, A. (2000). TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression. *Eur.J.Immunol.*, 30, 2639-2649.
111. Hedges, J. F., Lubick, K. J. & Jutila, M. A. (2005). Gamma delta T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J.Immunol.*, 174, 6045-6053.
112. Hers, I., Vincent, E. E. & Tavares, J. M. (2011). Akt signalling in health and disease. *Cell Signal.*, 23, 1515-1527.

- Literatur -

113. Hill, J. A., Feuerer, M., Tash, K., Haxhinasto, S., Perez, J., Melamed, R., Mathis, D. & Benoist, C. (2007). Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity.*, 27, 786-800.
114. Himoudi, N., Morgenstern, D. A., Yan, M., Vernay, B., Saraiva, L., Wu, Y., Cohen, C. J., Gustafsson, K. & Anderson, J. (2012). Human gammadelta T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. *J.Immunol.*, 188, 1708-1716.
115. Hoffmann, J. A. (2003). The immune response of Drosophila. *Nature*, 426, 33-38.
116. Hoffmann, P., Boeld, T. J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R. & Edinger, M. (2009). Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur.J.Immunol.*, 39, 1088-1097.
117. Hoffmann, P., Eder, R., Kunz-Schughart, L. A., Andreesen, R. & Edinger, M. (2004). Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood*, 104, 895-903.
118. Honma, Y., Kiyosawa, H., Mori, T., Oguri, A., Nikaido, T., Kanazawa, K., Tojo, M., Takeda, J., Tanno, Y., Yokoya, S., Kawabata, I., Ikeda, H. & Wanaka, A. (1999). Eos: a novel member of the Ikaros gene family expressed predominantly in the developing nervous system. *FEBS Lett.*, 447, 76-80.
119. Houot, R., Perrot, I., Garcia, E., Durand, I. & Lebecque, S. (2006). Human CD4+CD25high regulatory T cells modulate myeloid but not plasmacytoid dendritic cells activation. *J.Immunol.*, 176, 5293-5298.
120. Huang, G., Shi, L. Z. & Chi, H. (2009). Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination. *Cytokine*, 48, 161-169.
121. Hwang, E. S., Szabo, S. J., Schwartzberg, P. L. & Glimcher, L. H. (2005). T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3. *Science*, 307, 430-433.
122. Hyytiainen, M., Penttinen, C. & Keski-Oja, J. (2004). Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit Rev.Clin.Lab Sci.*, 41, 233-264.
123. Imamichi, H., Sereti, I. & Lane, H. C. (2008). IL-15 acts as a potent inducer of CD4(+)CD25(hi) cells expressing FOXP3. *Eur.J.Immunol.*, 38, 1621-1630.
124. Iwasaki, M., Tanaka, Y., Kobayashi, H., Murata-Hirai, K., Miyabe, H., Sugie, T., Toi, M. & Minato, N. (2011). Expression and function of PD-1 in human gammadelta T cells that recognize phosphoantigens. *Eur.J.Immunol.*, 41, 345-355.
125. Janeway, C. A., Jr. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.*, 54 Pt 1, 1-13.
126. Jomaa, H., Feurle, J., Luhs, K., Kunzmann, V., Tony, H. P., Herderich, M. & Wilhelm, M. (1999). 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, 371-378.
127. Josefowicz, S. Z. & Rudensky, A. (2009). Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity.*, 30, 616-625.
128. Kabelitz, D. & He, W. (2012). The multifunctionality of human Vgamma9Vdelta2 gammadelta T cells: clonal plasticity or distinct subsets? *Scand.J.Immunol.*, 76, 213-222.

- Literatur -

129. Kang, N., Tang, L., Li, X., Wu, D., Li, W., Chen, X., Cui, L., Ba, D. & He, W. (2009). Identification and characterization of Foxp3(+) gammadelta T cells in mouse and human. *Immunol.Lett.*, 125, 105-113.
130. Kapsogeorgou, E. K., Moutsopoulos, H. M. & Manoussakis, M. N. (2001). Functional expression of a costimulatory B7.2 (CD86) protein on human salivary gland epithelial cells that interacts with the CD28 receptor, but has reduced binding to CTLA4. *J.Immunol.*, 166, 3107-3113.
131. Kashyap, M., Thornton, A. M., Norton, S. K., Barnstein, B., Macey, M., Brenzovich, J., Shevach, E., Leonard, W. J. & Ryan, J. J. (2008). Cutting edge: CD4 T cell-mast cell interactions alter IgE receptor expression and signaling. *J.Immunol.*, 180, 2039-2043.
132. Kawai, T. & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat.Immunol.*, 11, 373-384.
133. Kawai, T. & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.*, 34, 637-650.
134. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol.*, 26, 677-704.
135. Kelley, C. M., Ikeda, T., Koipally, J., Avitahl, N., Wu, L., Georgopoulos, K. & Morgan, B. A. (1998). Helios, a novel dimerization partner of Ikaros expressed in the earliest hematopoietic progenitors. *Curr.Biol.*, 8, 508-515.
136. Kim, J., Sif, S., Jones, B., Jackson, A., Koipally, J., Heller, E., Winandy, S., Viel, A., Sawyer, A., Ikeda, T., Kingston, R. & Georgopoulos, K. (1999). Ikaros DNA-binding proteins direct formation of chromatin remodeling complexes in lymphocytes. *Immunity.*, 10, 345-355.
137. Kim, J. M., Rasmussen, J. P. & Rudensky, A. Y. (2007). Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat.Immunol.*, 8, 191-197.
138. Kiura, K., Kataoka, H., Nakata, T., Into, T., Yasuda, M., Akira, S., Inoue, N. & Shibata, K. (2006). The synthetic analogue of mycoplasmal lipoprotein FSL-1 induces dendritic cell maturation through Toll-like receptor 2. *FEMS Immunol.Med.Microbiol.*, 46, 78-84.
139. Klein, M., Vaeth, M., Scheel, T., Grabbe, S., Baumgrass, R., Berberich-Siebelt, F., Bopp, T., Schmitt, E. & Becker, C. (2012). Repression of cyclic adenosine monophosphate upregulation disarms and expands human regulatory T cells. *J.Immunol.*, 188, 1091-1097.
140. Kobie, J. J., Shah, P. R., Yang, L., Rebhahn, J. A., Fowell, D. J. & Mosmann, T. R. (2006). T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J.Immunol.*, 177, 6780-6786.
141. Komai-Koma, M., Jones, L., Ogg, G. S., Xu, D. & Liew, F. Y. (2004). TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 101, 3029-3034.
142. Komano, H., Fujiura, Y., Kawaguchi, M., Matsumoto, S., Hashimoto, Y., Obana, S., Mombaerts, P., Tonegawa, S., Yamamoto, H., Itohara, S. & . (1995). Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 92, 6147-6151.
143. Kühl, A. A., Loddenkemper, C., Westermann, J. & Hoffmann, J. C. (2002). Role of gamma delta T cells in inflammatory bowel disease. *Pathobiology*, 70, 150-155.
144. Kühl, A. A., Pawlowski, N. N., Grollich, K., Blessenohl, M., Westermann, J., Zeitz, M., Loddenkemper, C. & Hoffmann, J. C. (2009). Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. *Immunology*, 128, 580-588.

- Literatur -

145. Kühl, A. A., Pawlowski, N. N., Grollich, K., Loddenkemper, C., Zeitz, M. & Hoffmann, J. C. (2007). Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. *J.Leukoc.Biol.*, 81, 168-175.
146. Kuipers, H., Muskens, F., Willart, M., Hijdra, D., van Assema, F. B., Coyle, A. J., Hoogsteden, H. C. & Lambrecht, B. N. (2006). Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4+ T cell activation. *Eur.J.Immunol.*, 36, 2472-2482.
147. Kunzmann, V., Kimmel, B., Herrmann, T., Einsele, H. & Wilhelm, M. (2009). Inhibition of phosphoantigen-mediated gammadelta T-cell proliferation by CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology*, 126, 256-267.
148. Kunzmann, V., Kretzschmar, E., Herrmann, T. & Wilhelm, M. (2004). Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons. *Immunology*, 112, 369-377.
149. Kuo, Y. C., Huang, K. Y., Yang, C. H., Yang, Y. S., Lee, W. Y. & Chiang, C. W. (2008). Regulation of phosphorylation of Thr-308 of Akt, cell proliferation, and survival by the B55alpha regulatory subunit targeting of the protein phosphatase 2A holoenzyme to Akt. *J.Biol.Chem.*, 283, 1882-1892.
150. Kyriakis, J. M. & Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev.*, 81, 807-869.
151. Lafont, V., Liautard, J., Sable-Teychene, M., Sainte-Marie, Y. & Favero, J. (2001). Isopentenyl pyrophosphate, a mycobacterial non-peptidic antigen, triggers delayed and highly sustained signaling in human gamma delta T lymphocytes without inducing down-modulation of T cell antigen receptor. *J.Biol.Chem.*, 276, 15961-15967.
152. Lal, G., Zhang, N., van der Touw, W., Ding, Y., Ju, W., Bottinger, E. P., Reid, S. P., Levy, D. E. & Bromberg, J. S. (2009). Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J.Immunol.*, 182, 259-273.
153. Landmeier, S., Altvater, B., Pscherer, S., Juergens, H., Varnholt, L., Hansmeier, A., Bollard, C. M., Moosmann, A., Bisping, G. & Rossig, C. (2009). Activated human gammadelta T cells as stimulators of specific CD8+ T-cell responses to subdominant Epstein Barr virus epitopes: potential for immunotherapy of cancer. *J.Immunother.*, 32, 310-321.
154. Lee, K. M., Chuang, E., Griffin, M., Khattry, R., Hong, D. K., Zhang, W., Straus, D., Samelson, L. E., Thompson, C. B. & Bluestone, J. A. (1998). Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*, 282, 2263-2266.
155. Lee, S. J., Jang, B. C., Lee, S. W., Yang, Y. I., Suh, S. I., Park, Y. M., Oh, S., Shin, J. G., Yao, S., Chen, L. & Choi, I. H. (2006). Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). *FEBS Lett.*, 580, 755-762.
156. Lee, S. M., Joo, Y. D. & Seo, S. K. (2009). Expression and Function of TLR2 on CD4 Versus CD8 T Cells. *Immune.Netw.*, 9, 127-132.
157. Lewkowicz, P., Lewkowicz, N., Sasiak, A. & Tchorzewski, H. (2006). Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J.Immunol.*, 177, 7155-7163.
158. Li, B., Samanta, A., Song, X., Iacono, K. T., Bembas, K., Tao, R., Basu, S., Riley, J. L., Hancock, W. W., Shen, Y., Saouaf, S. J. & Greene, M. I. (2007). FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 104, 4571-4576.
159. Li, L. & Wu, C. Y. (2008). CD4+ CD25+ Treg cells inhibit human memory gammadelta T cells to produce IFN-gamma in response to M tuberculosis antigen ESAT-6. *Blood*, 111, 5629-5636.

- Literatur -

160. Li, M. O., Sanjabi, S. & Flavell, R. A. (2006). Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity*, 25, 455-471.
161. Li, X., Kang, N., Zhang, X., Dong, X., Wei, W., Cui, L., Ba, D. & He, W. (2011). Generation of Human Regulatory $\{\gamma\}\{\delta\}$ T Cells by TCR $\{\gamma\}\{\delta\}$ Stimulation in the Presence of TGF- $\{\beta\}$ and Their Involvement in the Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *J.Immunol.*
162. Li, X., Rendon, J. L., Akhtar, S. & Choudhry, M. A. (2012). Activation of TLR2 prevents suppression of T cell IFN-gamma production by modulating p38/ERK pathways following alcohol and burn injury. *Mol.Med.*
163. Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H. & Kim, C. H. (2005). Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.*, 175, 4180-4183.
164. Lindley, S., Dayan, C. M., Bishop, A., Roep, B. O., Peakman, M. & Tree, T. I. (2005). Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 54, 92-99.
165. Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K. L. & Mittler, R. S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, 4, 535-543.
166. Liu, H., Komai-Koma, M., Xu, D. & Liew, F. Y. (2006). Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103, 7048-7053.
167. Liu, J., Hamrouni, A., Wolowiec, D., Coiteux, V., Kuliczkowski, K., Hetuin, D., Saudemont, A. & Quesnel, B. (2007). Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\{\gamma\}$ and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood*, 110, 296-304.
168. Loebbermann, J., Thornton, H., Durant, L., Sparwasser, T., Webster, K. E., Sprent, J., Culley, F. J., Johansson, C. & Openshaw, P. J. (2012). Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal.Immunol.*, 5, 161-172.
169. Lyssuk, E. Y., Torgashina, A. V., Soloviev, S. K., Nasonov, E. L. & Bykovskaia, S. N. (2007). Reduced number and function of CD4+CD25highFoxP3+ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 601, 113-119.
170. Madrid, L. V., Wang, C. Y., Guttridge, D. C., Schottelius, A. J., Baldwin, A. S., Jr. & Mayo, M. W. (2000). Akt suppresses apoptosis by stimulating the transactivation potential of the RelA/p65 subunit of NF-kappaB. *Mol.Cell Biol.*, 20, 1626-1638.
171. Malmhall, C., Bossios, A., Radinger, M., Sjostrand, M., Lu, Y., Lundback, B. & Lotvall, J. (2012). Immunophenotyping of circulating T helper cells argues for multiple functions and plasticity of T cells in vivo in humans--possible role in asthma. *PLoS.One.*, 7, e40012.
172. Manel, N., Unutmaz, D. & Littman, D. R. (2008). The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ mat. *Nat.Immunol.*, 9, 641-649.
173. Marengere, L. E., Waterhouse, P., Duncan, G. S., Mittrucker, H. W., Feng, G. S. & Mak, T. W. (1996). Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. *Science*, 272, 1170-1173.
174. Marie, J. C., Letterio, J. J., Gavin, M. & Rudensky, A. Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Exp.Med.*, 201, 1061-1067.

- Literatur -

175. Marischen, L., Wesch, D., Oberg, H. H., Rosenstiel, P., Trad, A., Shomali, M., Grotzinger, J., Janssen, O., Tchikov, V., Schutze, S. & Kabelitz, D. (2011). Functional expression of NOD2 in freshly isolated human peripheral blood gammadelta T cells. *Scand.J.Immunol.*, 74, 126-134.
176. Marzec, M., Zhang, Q., Goradia, A., Raghunath, P. N., Liu, X., Paessler, M., Wang, H. Y., Wysocka, M., Cheng, M., Ruggeri, B. A. & Wasik, M. A. (2008). Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 105, 20852-20857.
177. McGeachy, M. J., Stephens, L. A. & Anderton, S. M. (2005). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J.Immunol.*, 175, 3025-3032.
178. Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449, 819-826.
179. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-397.
180. Meuter, S., Eberl, M. & Moser, B. (2010). Prolonged antigen survival and cytosolic export in cross-presenting human gammadelta T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 107, 8730-8735.
181. Mitchell, D. & Olive, C. (2010). Regulation of Toll-like receptor-induced chemokine production in murine dendritic cells by mitogen-activated protein kinases. *Mol.Immunol.*, 47, 2065-2073.
182. Mokuno, Y., Matsuguchi, T., Takano, M., Nishimura, H., Washizu, J., Ogawa, T., Takeuchi, O., Akira, S., Nimura, Y. & Yoshikai, Y. (2000). Expression of toll-like receptor 2 on gamma delta T cells bearing invariant V gamma 6/V delta 1 induced by Escherichia coli infection in mice. *J.Immunol.*, 165, 931-940.
183. Möller, G. (1988). Do suppressor T cells exist? *Scand.J.Immunol.*, 27, 247-250.
184. Moser, B. & Eberl, M. (2011). gammadelta T-APCs: a novel tool for immunotherapy? *Cell Mol.Life Sci.*, 68, 2443-2452.
185. Mottet, C. & Golshayan, D. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells: from basic research to potential therapeutic use. *Swiss.Med.Wkly.*, 137, 625-634.
186. Mudd, P. A., Teague, B. N. & Farris, A. D. (2006). Regulatory T cells and systemic lupus erythematosus. *Scand.J.Immunol.*, 64, 211-218.
187. Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. & Mellor, A. L. (2005). GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.*, 22, 633-642.
188. Munn, D. H., Sharma, M. D. & Mellor, A. L. (2004). Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J.Immunol.*, 172, 4100-4110.
189. Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M. E., Kaminski, M., Gostick, E., Price, D. A., Freeman, G. J., Wherry, E. J. & Chang, K. M. (2009). Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS.Pathog.*, 5, e1000313.
190. Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J.Exp.Med.*, 194, 629-644.
191. Ness-Schwickerath, K. J., Jin, C. & Morita, C. T. (2010). Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. *J.Immunol.*, 184, 7268-7280.

- Literatur -

192. Neurath, M. F., Weigmann, B., Finotto, S., Glickman, J., Nieuwenhuis, E., Iijima, H., Mizoguchi, A., Mizoguchi, E., Mudter, J., Galle, P. R., Bhan, A., Autschbach, F., Sullivan, B. M., Szabo, S. J., Glimcher, L. H. & Blumberg, R. S. (2002). The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J.Exp.Med.*, 195, 1129-1143.
193. Nizar, S., Meyer, B., Galustian, C., Kumar, D. & Dalgleish, A. (2010). T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. *Biochim.Biophys.Acta*, 1806, 7-17.
194. Nurieva, R. I., Liu, X. & Dong, C. (2009). Yin-Yang of costimulation: crucial controls of immune tolerance and function. *Immunol.Rev.*, 229, 88-100.
195. Oberg, H. H., Ly, T. T., Ussat, S., Meyer, T., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2010). Differential but direct abolishment of human regulatory T cell suppressive capacity by various TLR2 ligands. *J.Immunol.*, 184, 4733-4740.
196. Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C. M. & Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*, 118, 240-249.
197. Ono, M., Yaguchi, H., Ohkura, N., Kitabayashi, I., Nagamura, Y., Nomura, T., Miyachi, Y., Tsukada, T. & Sakaguchi, S. (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, 446, 685-689.
198. Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. & Donner, D. B. (1999). NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature*, 401, 82-85.
199. Pan, F., Yu, H., Dang, E. V., Barbi, J., Pan, X., Grosso, J. F., Jinasena, D., Sharma, S. M., McCadden, E. M., Getnet, D., Drake, C. G., Liu, J. O., Ostrowski, M. C. & Pardoll, D. M. (2009). Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science*, 325, 1142-1146.
200. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat.Immunol.*, 8, 1353-1362.
201. Park, S. G., Mathur, R., Long, M., Hosh, N., Hao, L., Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2010). T regulatory cells maintain intestinal homeostasis by suppressing gammadelta T cells. *Immunity.*, 33, 791-803.
202. Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B. & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol.Cell Biol.*, 25, 9543-9553.
203. Patsoukis, N., Brown, J., Petkova, V., Liu, F., Li, L. & Boussiotis, V. A. (2012). Selective Effects of PD-1 on Akt and Ras Pathways Regulate Molecular Components of the Cell Cycle and Inhibit T Cell Proliferation. *Sci.Signal.*, 5, ra46.
204. Paust, S. & Cantor, H. (2005). Regulatory T cells and autoimmune disease. *Immunol.Rev.*, 204, 195-207.
205. Pechhold, K., Pohl, T. & Kabelitz, D. (1994a). Rapid quantification of lymphocyte subsets in heterogeneous cell populations by flow cytometry. *Cytometry*, 16, 152-159.
206. Pechhold, K., Wesch, D., Schondelmaier, S. & Kabelitz, D. (1994b). Primary activation of V gamma 9-expressing gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis. Requirement for Th1-type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J.Immunol.*, 152, 4984-4992.
207. Peiser, M., Koeck, J., Kirschning, C. J., Wittig, B. & Wanner, R. (2008). Human Langerhans cells selectively activated via Toll-like receptor 2 agonists acquire migratory and CD4+T cell stimulatory capacity. *J.Leukoc.Biol.*, 83, 1118-1127.

- Literatur -

208. Peng, G., Wang, H. Y., Peng, W., Kiniwa, Y., Seo, K. H. & Wang, R. F. (2007). Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity*, 27, 334-348.
209. Peng, S. L., Madaio, M. P., Hayday, A. C. & Craft, J. (1996). Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells. *J.Immunol.*, 157, 5689-5698.
210. Pennington, D. J., Vermijlen, D., Wise, E. L., Clarke, S. L., Tigelaar, R. E. & Hayday, A. C. (2005). The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell-mediated responses. *Adv.Immunol.*, 87, 27-59.
211. Pietschmann, K., Beetz, S., Welte, S., Martens, I., Gruen, J., Oberg, H. H., Wesch, D. & Kabelitz, D. (2009). Toll-like receptor expression and function in subsets of human gammadelta T lymphocytes. *Scand.J.Immunol.*, 70, 245-255.
212. Pillai, V. & Karandikar, N. J. (2008). Attack on the clones? Human FOXP3 detection by PCH101, 236A/E7, 206D, and 259D reveals 259D as the outlier with lower sensitivity. *Blood*, 111, 463-464.
213. Poccia, F., Battistini, L., Cipriani, B., Mancino, G., Martini, F., Gougeon, M. L. & Colizzi, V. (1999). Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. *J.Infect.Dis.*, 180, 858-861.
214. Ponomarev, E. D. & Dittel, B. N. (2005). Gamma delta T cells regulate the extent and duration of inflammation in the central nervous system by a Fas ligand-dependent mechanism. *J.Immunol.*, 174, 4678-4687.
215. Puccetti, P. & Grohmann, U. (2007). IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat.Rev.Immunol.*, 7, 817-823.
216. Radziejewicz, H., Ibegbu, C. C., Fernandez, M. L., Workowski, K. A., Obideen, K., Wehbi, M., Hanson, H. L., Steinberg, J. P., Masopust, D., Wherry, E. J., Altman, J. D., Rouse, B. T., Freeman, G. J., Ahmed, R. & Grakoui, A. (2007). Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J.Virol.*, 81, 2545-2553.
217. Ralainirina, N., Poli, A., Michel, T., Poos, L., Andres, E., Hentges, F. & Zimmer, J. (2007). Control of NK cell functions by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Leukoc.Biol.*, 81, 144-153.
218. Rao, S., Gerondakis, S., Woltring, D. & Shannon, M. F. (2003). c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter. *J.Immunol.*, 170, 3724-3731.
219. Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J.Exp.Med.*, 192, 295-302.
220. Rebollo, A. & Schmitt, C. (2003). Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol.Cell Biol.*, 81, 171-175.
221. Rhodes, K. A., Andrew, E. M., Newton, D. J., Tramonti, D. & Carding, S. R. (2008). A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. *Eur.J.Immunol.*, 38, 2274-2283.
222. Riley, J. L. (2009). PD-1 signaling in primary T cells. *Immunol.Rev.*, 229, 114-125.
223. Rincon, M., Enslin, H., Raingeaud, J., Recht, M., Zapton, T., Su, M. S., Penix, L. A., Davis, R. J. & Flavell, R. A. (1998). Interferon-gamma expression by Th1 effector T cells mediated by the p38 MAP kinase signaling pathway. *EMBO J.*, 17, 2817-2829.

- Literatur -

224. Rincon, M., Flavell, R. A. & Davis, R. A. (2000). The JNK and P38 MAP kinase signaling pathways in T cell-mediated immune responses. *Free Radic.Biol.Med.*, 28, 1328-1337.
225. Rodig, N., Ryan, T., Allen, J. A., Pang, H., Gracie, N., Chernova, T., Greenfield, E. A., Liang, S. C., Sharpe, A. H., Lichtman, A. H. & Freeman, G. J. (2003). Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis. *Eur.J.Immunol.*, 33, 3117-3126.
226. Romashkova, J. A. & Makarov, S. S. (1999). NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, 401, 86-90.
227. Rossig, L., Jadidi, A. S., Urbich, C., Badorff, C., Zeiher, A. M. & Dimmeler, S. (2001). Akt-dependent phosphorylation of p21(Cip1) regulates PCNA binding and proliferation of endothelial cells. *Mol.Cell Biol.*, 21, 5644-5657.
228. Rubtsov, Y. P. & Rudensky, A. Y. (2007). TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity. *Nat.Rev.Immunol.*, 7, 443-453.
229. Rudd, C. E. (2008). The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nat.Rev.Immunol.*, 8, 153-160.
230. Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.*, 22, 531-562.
231. Sakaguchi, S., Yamaguchi, T., Nomura, T. & Ono, M. (2008). Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133, 775-787.
232. Salomon, B., Lenschow, D. J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A. & Bluestone, J. A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity.*, 12, 431-440.
233. Santos-Sierra, S., Deshmukh, S. D., Kalnitski, J., Kuenzi, P., Wymann, M. P., Golenbock, D. T. & Henneke, P. (2009). Mal connects TLR2 to PI3Kinase activation and phagocyte polarization. *EMBO J.*, 28, 2018-2027.
234. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D. M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, 1098-1101.
235. Sayed, M., Kim, S. O., Salh, B. S., Issinger, O. G. & Pelech, S. L. (2000). Stress-induced activation of protein kinase CK2 by direct interaction with p38 mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.*, 275, 16569-16573.
236. Schmitz, M. L. & Baeuerle, P. A. (1991). The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B. *EMBO J.*, 10, 3805-3817.
237. Schubert, L. A., Jeffery, E., Zhang, Y., Ramsdell, F. & Ziegler, S. F. (2001). Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J.Biol.Chem.*, 276, 37672-37679.
238. Serre, K., Benezech, C., Desanti, G., Bobat, S., Toellner, K. M., Bird, R., Chan, S., Kastner, P., Cunningham, A. F., Maclennan, I. C. & Mohr, E. (2011). Helios is associated with CD4 T cells differentiating to T helper 2 and follicular helper T cells in vivo independently of Foxp3 expression. *PLoS.One.*, 6, e20731.
239. Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J.Exp.Med.*, 201, 723-735.
240. Sharpe, A. H. & Freeman, G. J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat.Rev.Immunol.*, 2, 116-126.

- Literatur -

241. 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. (2002). Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science*, 295, 2255-2258.
242. Sheppard, K. A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R. & Chaudhary, D. (2004). PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta. *FEBS Lett.*, 574, 37-41.
243. Shevach, E. M. (2006). From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. *Immunity.*, 25, 195-201.
244. Shevach, E. M. (2009). Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity.*, 30, 636-645.
245. Shin, I., Yakes, F. M., Rojo, F., Shin, N. Y., Bakin, A. V., Baselga, J. & Arteaga, C. L. (2002). PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat.Med.*, 8, 1145-1152.
246. Shin, S., El-Diwanly, R., Schaffert, S., Adams, E. J., Garcia, K. C., Pereira, P. & Chien, Y. H. (2005). Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors. *Science*, 308, 252-255.
247. Shiohara, T., Moriya, N., Gotoh, C., Hayakawa, J., Nagashima, M., Saizawa, K. & Ishikawa, H. (1990). Loss of epidermal integrity by T cell-mediated attack induces long-term local resistance to subsequent attack. I. Induction of resistance correlates with increases in Thy-1+ epidermal cell numbers. *J.Exp.Med.*, 171, 1027-1041.
248. Shiohara, T., Moriya, N., Hayakawa, J., Itohara, S. & Ishikawa, H. (1996). Resistance to cutaneous graft-vs.-host disease is not induced in T cell receptor delta gene-mutant mice. *J.Exp.Med.*, 183, 1483-1489.
249. Shojaei, H., Oberg, H. H., Juricke, M., Marischen, L., Kunz, M., Mundhenke, C., Gieseler, F., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2009). Toll-like receptors 3 and 7 agonists enhance tumor cell lysis by human gammadelta T cells. *Cancer Res.*, 69, 8710-8717.
250. Shrestha, N., Ida, J. A., Lubinski, A. S., Pallin, M., Kaplan, G. & Haslett, P. A. (2005). Regulation of acquired immunity by gamma delta T-cell/dendritic-cell interactions. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1062, 79-94.
251. Siegel, P. M. & Massague, J. (2003). Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 3, 807-821.
252. Simone, R., Floriani, A. & Saverino, D. (2009). Stimulation of Human CD4 T Lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 Up-Regulates Expression of Costimulatory and Modulates Proliferation. *Open.Microbiol.J.*, 3, 1-8.
253. Sireci, G., Champagne, E., Fournie, J. J., Dieli, F. & Salerno, A. (1997). Patterns of phosphoantigen stimulation of human Vgamma9/Vdelta2 T cell clones include Th0 cytokines. *Hum.Immunol.*, 58, 70-82.
254. Smith, K. A. (1988). Interleukin-2: inception, impact, and implications. *Science*, 240, 1169-1176.
255. Sridharan, R. & Smale, S. T. (2007). Predominant interaction of both Ikaros and Helios with the NuRD complex in immature thymocytes. *J.Biol.Chem.*, 282, 30227-30238.
256. Steinman, R. M. & Hemmi, H. (2006). Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 311, 17-58.

- Literatur -

257. Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T. & Sakaguchi, S. (2006). Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25+CD4+ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int.Immunol.*, 18, 1197-1209.
258. Sun, J. B., Raghavan, S., Sjolting, A., Lundin, S. & Holmgren, J. (2006). Oral tolerance induction with antigen conjugated to cholera toxin B subunit generates both Foxp3+CD25+ and Foxp3-. *J.Immunol.*, 177, 7634-7644.
259. Suttmuller, R. P., den Brok, M. H., Kramer, M., Bennink, E. J., Toonen, L. W., Kullberg, B. J., Joosten, L. A., Akira, S., Netea, M. G. & Adema, G. J. (2006). Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J.Clin.Invest*, 116, 485-494.
260. Taams, L. S., van Amelsfort, J. M., Tiemessen, M. M., Jacobs, K. M., de Jong, E. C., Akbar, A. N., Bijlsma, J. W. & Lafeber, F. P. (2005). Modulation of monocyte/macrophage function by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Hum.Immunol.*, 66, 222-230.
261. Tadokoro, C. E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A. C., Maraver, A., Lafaille, J. J. & Dustin, M. L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J.Exp.Med.*, 203, 505-511.
262. Tamura, H., Dong, H., Zhu, G., Sica, G. L., Flies, D. B., Tamada, K. & Chen, L. (2001). B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function. *Blood*, 97, 1809-1816.
263. Tang, Q., Adams, J. Y., Tooley, A. J., Bi, M., Fife, B. T., Serra, P., Santamaria, P., Locksley, R. M., Krummel, M. F. & Bluestone, J. A. (2006). Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat.Immunol.*, 7, 83-92.
264. Tang, Q. & Bluestone, J. A. (2008). The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat.Immunol.*, 9, 239-244.
265. Tang, Q., Henriksen, K. J., Boden, E. K., Tooley, A. J., Ye, J., Subudhi, S. K., Zheng, X. X., Strom, T. B. & Bluestone, J. A. (2003). Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.*, 171, 3348-3352.
266. Thornton, A. M., Korty, P. E., Tran, D. Q., Wohlfert, E. A., Murray, P. E., Belkaid, Y. & Shevach, E. M. (2010). Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells. *J.Immunol.*, 184, 3433-3441.
267. Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A. & Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3, 541-547.
268. Todaro, M., D'Asaro, M., Caccamo, N., Iovino, F., Francipane, M. G., Meraviglia, S., Orlando, V., La, M. C., Gulotta, G., Salerno, A., Dieli, F. & Stassi, G. (2009). Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J.Immunol.*, 182, 7287-7296.
269. Tran, D. Q., Ramsey, H. & Shevach, E. M. (2007). Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype. *Blood*, 110, 2983-2990.
270. Traxlmayr, M. W., Wesch, D., Dohnal, A. M., Funovics, P., Fischer, M. B., Kabelitz, D. & Felzmann, T. (2010). Immune suppression by gammadelta T-cells as a potential regulatory mechanism after cancer vaccination with IL-12 secreting dendritic cells. *J.Immunother.*, 33, 40-52.
271. Triebel, F., Faure, F., Mami-Chouaib, F., Jitsukawa, S., Griscelli, A., Genevee, C., Roman-Roman, S. & Hercend, T. (1988). A novel human V delta gene expressed predominantly in the Ti gamma A fraction of gamma/delta+ peripheral lymphocytes. *Eur.J.Immunol.*, 18, 2021-2027.

- Literatur -

272. Troutman, T. D., Hu, W., Fulenchek, S., Yamazaki, T., Kurosaki, T., Bazan, J. F. & Pasare, C. (2012). Role for B-cell adapter for PI3K (BCAP) as a signaling adapter linking Toll-like receptors (TLRs) to serine/threonine kinases PI3K/Akt. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 109, 273-278.
273. Usui, T., Preiss, J. C., Kanno, Y., Yao, Z. J., Bream, J. H., O'Shea, J. J. & Strober, W. (2006). T-bet regulates Th1 responses through essential effects on GATA-3 function rather than on IFNG gene acetylation and transcription. *J.Exp.Med.*, 203, 755-766.
274. Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G. & Lipsky, P. E. (2007). Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.*, 178, 2579-2588.
275. van Beek, E., Pieterman, E., Cohen, L., Lowik, C. & Papapoulos, S. (1999). Nitrogen-containing bisphosphonates inhibit isopentenyl pyrophosphate isomerase/farnesyl pyrophosphate synthase activity with relative potencies corresponding to their antiresorptive potencies in vitro and in vivo. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 255, 491-494.
276. Vanhaesebroeck, B. & Alessi, D. R. (2000). The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem.J.*, 346 Pt 3, 561-576.
277. Vantourout, P. & Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nat.Rev.Immunol.*, 13, 88-100.
278. Verhagen, J. & Wraith, D. C. (2010). Comment on "Expression of Helios, an Ikaros transcription factor family member, differentiates thymic-derived from peripherally induced Foxp3+ T regulatory cells". *J.Immunol.*, 185, 7129.
279. Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H. L. & Hafler, D. A. (2004). Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.*, 199, 971-979.
280. Vignali, D. A., Collison, L. W. & Workman, C. J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat.Rev.Immunol.*, 8, 523-532.
281. Vincent, E. E., Elder, D. J., Thomas, E. C., Phillips, L., Morgan, C., Pawade, J., Sohail, M., May, M. T., Hetzel, M. R. & Tavaré, J. M. (2011). Akt phosphorylation on Thr308 but not on Ser473 correlates with Akt protein kinase activity in human non-small cell lung cancer. *Br.J.Cancer*, 104, 1755-1761.
282. Walker, M. R., Kasprovicz, D. J., Gersuk, V. H., Benard, A., Van, L. M., Buckner, J. H. & Ziegler, S. F. (2003). Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+. *J.Clin.Invest*, 112, 1437-1443.
283. Wang, W., Lau, R., Yu, D., Zhu, W., Korman, A. & Weber, J. (2009). PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. *Int.Immunol.*, 21, 1065-1077.
284. Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. & Mak, T. W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*, 270, 985-988.
285. Wesch, D., Beetz, S., Oberg, H. H., Marget, M., Krenzel, K. & Kabelitz, D. (2006). Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J.Immunol.*, 176, 1348-1354.
286. Wesch, D., Glatzel, A. & Kabelitz, D. (2001). Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol.*, 212, 110-117.
287. Wesch, D., Marx, S. & Kabelitz, D. (1997). Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur.J.Immunol.*, 27, 952-956.

- Literatur -

288. Wesch, D., Peters, C., Oberg, H. H., Pietschmann, K. & Kabelitz, D. (2011). Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol.Life Sci.*, 68, 2357-2370.
289. Wilson, C. B., Rowell, E. & Sekimata, M. (2009). Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. *Nat.Rev.Immunol.*, 9, 91-105.
290. Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, 322, 271-275.
291. Wohlfert, E. A., Grainger, J. R., Bouladoux, N., Konkel, J. E., Oldenhove, G., Ribeiro, C. H., Hall, J. A., Yagi, R., Naik, S., Bhairavabhotla, R., Paul, W. E., Bosselut, R., Wei, G., Zhao, K., Oukka, M., Zhu, J. & Belkaid, Y. (2011). GATA3 controls Foxp3(+) regulatory T cell fate during inflammation in mice. *J.Clin.Invest*, 121, 4503-4515.
292. Wrobel, P., Shojaei, H., Schittek, B., Gieseler, F., Wollenberg, B., Kalthoff, H., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2007). 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, 320-328.
293. Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. & Rao, A. (2006a). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126, 375-387.
294. Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A. D., Stroud, J. C., Bates, D. L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S. F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. & Rao, A. (2006b). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, 126, 375-387.
295. Wu, Y., Wu, W., Wong, W. M., Ward, E., Thrasher, A. J., Goldblatt, D., Osman, M., Digard, P., Canaday, D. H. & Gustafsson, K. (2009). Human gamma delta T cells: a lymphoid lineage cell capable of professional phagocytosis. *J.Immunol.*, 183, 5622-5629.
296. Yamagiwa, S., Gray, J. D., Hashimoto, S. & Horwitz, D. A. (2001). A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J.Immunol.*, 166, 7282-7289.
297. Yokosuka, T., Kobayashi, W., Takamatsu, M., Sakata-Sogawa, K., Zeng, H., Hashimoto-Tane, A., Yagita, H., Tokunaga, M. & Saito, T. (2010). Spatiotemporal basis of CTLA-4 costimulatory molecule-mediated negative regulation of T cell activation. *Immunity.*, 33, 326-339.
298. Yu, T., Junger, W. G., Yuan, C., Jin, A., Zhao, Y., Zheng, X., Zeng, Y. & Liu, J. (2010). Shockwaves increase T-cell proliferation and IL-2 expression through ATP release, P2X7 receptors, and FAK activation. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, 298, C457-C464.
299. Zabransky, D. J., Nirschl, C. J., Durham, N. M., Park, B. V., Ceccato, C. M., Bruno, T. C., Tam, A. J., Getnet, D. & Drake, C. G. (2012). Phenotypic and functional properties of Helios+ regulatory T cells. *PLoS.One.*, 7, e34547.
300. Zarek, P. E., Huang, C. T., Lutz, E. R., Kowalski, J., Horton, M. R., Linden, J., Drake, C. G. & Powell, J. D. (2008). A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood*, 111, 251-259.
301. Zhang, Z., Swindle, C. S., Bates, J. T., Ko, R., Cotta, C. V. & Klug, C. A. (2007). Expression of a non-DNA-binding isoform of Helios induces T-cell lymphoma in mice. *Blood*, 109, 2190-2197.
302. Zhao, J., Huang, J., Chen, H., Cui, L. & He, W. (2006). Vdelta1 T cell receptor binds specifically to MHC I chain related A: molecular and biochemical evidences. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 339, 232-240.

- Literatur -

303. Zheng, Y., Josefowicz, S. Z., Kas, A., Chu, T. T., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*, 445, 936-940.
304. Zheng, Y. & Rudensky, A. Y. (2007). Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat.Immunol.*, 8, 457-462.
305. Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B. & Kuchroo, V. K. (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat.Immunol.*, 6, 1245-1252.
306. Ziegler, S. F. (2006). FOXP3: of mice and men. *Annu.Rev.Immunol.*, 24, 209-226.

10. Anhang

Publikationsliste

Originalarbeiten

- Ohnesorge, S., Oberg, H. H., **Peters, C.**, Janssen, O., Kabelitz, D. and Wesch, D. (2009). Differential poly(I:C) responses of human VgammaVdelta2 T cells stimulated with pyrophosphates versus aminobisphosphonates. The Open Immunology Journal, 2:135-142.
- Meyer, T., Oberg, H. H., **Peters, C.**, Martens, I., Adam-Klages, S., Kabelitz, D. & Wesch, D. (2012). poly(I:C) costimulation induces a stronger antiviral chemokine and granzyme B release in human CD4 T cells than CD28 costimulation. J.Leukoc.Biol..
- **Peters, C.**, Oberg, H. H., Kabelitz, D., and Wesch, D.. Phenotype and function of immunosuppressive Vδ2-expressing γδ T cells. **Manuskript eingereicht.**

Übersichtsarbeiten (reviews)

- Wesch, D., **Peters, C.**, Oberg, H. H., Pietschmann, K. & Kabelitz, D. (2011). Modulation of gammadelta T cell responses by TLR ligands. Cell Mol.Life Sci., 68, 2357-2370.
- Kabelitz, D., **Peters, C.**, Wesch, D., Oberg, H. H. (2013). Regulatory functions of gamma delta T cells. International Immunopharmacology.

Zitable Abstracts

- **Christian Peters**, Hans-Heinrich Oberg, Lothar Marischen, Dieter Kabelitz and Daniela Wesch. TLR2 ligands abrogate suppressive function of gammadelta T cells. 4th international gammadelta T Cell Conference, Kiel, Mai 2010.
- **Christian Peters**, Hans-Heinrich Oberg, Lothar Marischen, Dieter Kabelitz and Daniela Wesch. The abolishment of gammadelta T cell mediated suppression by TLR2 ligands is accompanied by an increased phosphorylation. Norddeutsche Immunologentagung, Borstel, September 2010.
- **Christian Peters**, Hans-Heinrich Oberg, Lothar Marischen, Dieter Kabelitz and Daniela Wesch. TLR2 dependent abrogation of the gammadelta T cell mediated

- Anhang -

suppression correlates with an enhanced AKT phosphorylation. Joint Meeting – Signal Transduction Society, Weimar, Oktober 2010.

- **Christian Peters**, Hans-Heinrich Oberg, Juliane Fazio, Dieter Kabelitz and Daniela Wesch. Activation of MAP-Kinase-, NF-kappaB- and Akt-Pathways in a TLR2 dependent manner is linked to attenuation of the suppressive activity of Vdelta2 gammadelta T cells. Joint Annual Meeting - DGFI, SICA, Riccione, Italien, September 2011.
- Anne Kammel, **Christian Peters**, Hans-Heinrich Oberg, Dieter Kabelitz and Daniela Wesch. Modulation of TIM-3 expression on alphabeta and gammadelta T cells. Norddeutsche Immunologentagung, Borstel, November 2011.
- **Christian Peters**, Hans-Heinrich Oberg, Juliane Fazio, Dieter Kabelitz and Daniela Wesch. Vdelta2 can do: Suppressive vs. stimulatory functions mediated by gammadelta T cells. Norddeutsche Immunologentagung, Borstel, November 2011.,
- **Christian Peters**, Hans-Heinrich Oberg, Dieter Kabelitz and Daniela Wesch. PD-1 and CTLA-4 contribute to Vdelta2Vgamma9 T cell-mediated suppression. 5th International gammadelta T Cell Conference, Freiburg, Mai 2012.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt gemäß § 8 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 12. Mai 2009, dass ich die vorliegende Arbeit unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Dr. T. Roeder selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die Abhandlung ist nach Form und Inhalt, abgesehen von der Beratung durch PD Dr. D. Wesch und Prof. Dr. D. Kabelitz, die eigene Arbeit.

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

Ich versichere, dass ich weder an der Universität Kiel noch anderweitig versucht habe eine Dissertation einzureichen oder mich einer Promotionsprüfung zu unterziehen.

Kiel, 24.03.2013

Christian Peters

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christian Peters
Geburtsdatum: 22.10.1980
Geburtsort: Hamburg
Adresse: Saarbrückenstraße 160, 24113 Kiel

Promotionsstudium:

Seit Juli 2008 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. Kabelitz / PD. Dr. D. Wesch am Institut für Immunologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel

Hochschulstudium:

Bis März 2008 Diplomarbeit am Heinrich-Pette-Institute für experimentelle Virologie und Immunologie in Hamburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Dobner. Thema der Arbeit: „Untersuchungen zur Interaktion des adenoviralen Proteins E1B55K mit der humanen Ubiquitinligase USP7.“
2001-2008 Studium der Biologie in Hamburg

Grundwehrdienst:

2001 Grundwehrdienst, Hamburg-Fischbek

Schulbildung:

1991 – 2000 Gymnasium Grootmoor, Hamburg; Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Kiel, 24.03.2013

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich Herrn Professor Dr. Dieter Kabelitz und Frau PD Dr. Daniela Wesch für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen. Die hervorragenden Arbeitsbedingungen und das gute Betriebsklima habe ich sehr geschätzt.

Frau PD Dr. Daniela Wesch bin ich für die hervorragende tägliche Betreuung meiner Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet. Die Möglichkeit bei theoretischen und praktischen Fragen bei ihr jederzeit ein offenes Ohr zu finden haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Professor Dr. Thomas Roeder für die freundliche Übernahme der Betreuung und des Referats meiner Arbeit vor der mathematischen-naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Des Weiteren möchte ich Frau PD Dr. Daniela Wesch für die Übernahme des Korreferats danken.

Für das kritische Lesen der Arbeit gebührt Frau PD Dr. Daniela Wesch, Frau Henriette Oberdörster und Herrn Prof. Dr. Dieter Kabelitz mein Dank.

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe Dani, Heiner, Lothar, Tim, Jule, Sandra, Ina, Moni und Hoa möchte ich für die stete Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima sowie die Unterstützung bei allen technischen Fragen danken. Bei Sandra, Ina und Jule möchte ich mich besonders für die gute Zusammenarbeit und Hilfe bei Arbeiten im Labor bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei all meinen Mit-Doktoranden, vor allem bei Tim, Lothar und Jule für die wissenschaftlichen und unwissenschaftlichen Diskussionen und die schöne Zeit bedanken.

Meiner Familie möchte ich danken, dass sie mich stets auf meinem Weg unterstützt und gefördert hat und meinen Freunden dafür, dass sie immer noch mit mir reden, auch wenn ich nicht gerade viel von mir hören lasse.

Zu guter Letzt und vor allem möchte ich mich bei meiner „kleinen“ Familie, die oft ohne mich auskommen musste, für den Rückhalt und die Nachsicht mit mir bedanken. Katharina danke ich für die mentale Unterstützung und auch die Unterstützung in allen Alltagsangelegenheiten.