

Die Rolle von Major-
Histocompatibility-Complex Klasse
II bei der Proliferation von $\gamma\delta$ -T-
Zellen nach (E)-4-Hydroxy-3-
Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphat-
Stimulation

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereiches Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Sandvold, Haakon

aus Trondheim (Norwegen)

Gießen 2019

Aus dem Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin unter der Leitung
von Prof. Dr. Gregor Bein des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität
Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein

Gutachter: Prof. Dr. Tilman Borggreffe

Tag der Disputation: 24.10.2019



Inhalt

1. Einleitung	1
Das Immunsystem	1
Die $\gamma\delta$ -T-Zelle	6
Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen	7
HMB-PP und IPP	7
Fragestellungen dieser Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
Materialien	14
Geräte und Zubehör	14
Verbrauchsmaterialien	15
Antikörper	16
Micro-Beads	18
Chemikalien und Lösungen	18
Weitere Reagenzien	20
Zytokine	20
Zelllinien	21
Methoden	21
Verwendete Medien	21
Vd2-Medium	21
T-Zell-Medium	21
Dendritic-Cell(DC)-Medium	21
Zellisolationmethoden	22
Gewinnung von mononuklearen Leukozyten (PBMCs)	22
Zellseparation mittels AutoMACS	24
Zellseparation mittels FACSAria III	25
CFSE-Markierung der Zellen	28
Zellisolation	29
Isolierung von Monozyten	29

Isolierung von naiven CD8 ⁺ -T-Zellen	29
Isolierung von Vd2 ⁺ -Zellen	30
Isolierung von MHC-II ⁺ -Zellen	31
Entfernung von MHC-II ⁺ -Zellen	32
Isolierung von CD4 ⁺ -Zellen	32
Isolierung von CD8 ⁺ -Zellen	33
Isolierung von CD1c ⁺ -Zellen	33
Kulturbedingungen	34
Differenzierung von dendritische Zellen aus Monozyten (<i>monocytic derived dendritic cells</i> , MoDCs)	34
Ko- und Monokulturen mit hochrein isolierten Vd2 ⁺ -Zellen	35
Vd2 ⁺ nach Inkubation mit dem Pan-MHC-II-Antikörper	36
Aktivierung von CD4 ⁺ -Zellen	38
Kokultivierung von CD8 ⁺ -Zellen und CD1c ⁺ -Zellen	39
Auswertung	40
Durchflusszytometrie	40
Zellzahlbestimmung	41
Statistik	41
3. Ergebnisse	42
HMB-PP beeinflusst nicht die Ausprägung von HLA-DR, CD40, CD83 oder CD86 an der Oberfläche von MoDC	42
MHC-II ⁺ -Zellen induzieren eine Vd2-Proliferation in Anwesenheit von HMB-PP	43
Isolierte CD4 ⁺ - oder CD8 ⁺ -Zellen können keine Vd2-Expansion auslösen	46
Variable Kapazität der MHC-II ⁺ -Zelllinien in der Expansion von Vd2 ⁺ -Zellen	47
MHC-II-Blockade kann die Vd2-Expansion verhindern	50
Aktivierte CD4 ⁺ -Zellen mit MHC-II-Expression können keine Vd2-Expansion auslösen	53
MHC-II-Antikörper beeinflussen die Funktionalität der dendritischen Zellen nicht	56
4. Diskussion	59
Die Rolle des MHC-II bei der Expansion von Vd2 ⁺ -Zellen	59

MHC-Klasse-II moduliert die Antwort der Vd2-positiven Zellen auf HMB-PP ...	60
Konfigurationsänderungen des CD277 als Basis der Aktivierung von V γ 9V δ 2-T-Zellen	62
CD277 und MHC-Klasse-II.....	63
MHC-Klasse-II ist nicht als alleiniges Merkmal der akzessorischen Zelle ausreichend.....	65
Zelllinien mit hoher MHC-II-Expression zeigen eine heterogene Expansionskapazität nach Kokulturen mit Vd2 ⁺ -Zellen.....	66
Mögliche Folgen der MHC-Modulation.....	67
Zusammenfassung	70
Abstract.....	72
5. Literaturverzeichnis.....	73
6. Anhang.....	78
Publikationsverzeichnis.....	78
Erklärung zur Dissertation.....	79
Danksagung.....	80
Erklärung zu den Abbildungen.....	81

1. Einleitung

Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem besteht aus einem Zusammenspiel unterschiedlichster Zellarten und Funktionen. Das Immunsystem wird klassischerweise in das angeborene (oder natürliche) Immunsystem, und das spezifische (oder adaptive) Immunsystem unterteilt (Male und Wand-Württenberger 2005). Es handelt sich dabei nicht um funktionell komplett getrennte und damit nebeneinander arbeitende Systeme. Das angeborene Immunsystem ist phylogenetisch deutlich älter als das spezifische Immunsystem. Das spezifische Immunsystem findet sich nur in Vertebraten (Medzhitov und Janeway 1997). Anhand der Prozesse zur Immunantwort, die nach dem Eindringen eines Bakteriums in den Körper losgetreten werden, kann man die Unterschiede, die zu dieser Aufteilung oder Klassifikation geführt haben, gut nachvollziehen. Das sogenannte angeborene Immunsystem ist nicht lernfähig. Bestimmte Reaktionen, sowohl humoraler als auch zellulärer Art, laufen unabhängig von einem früheren Kontakt mit dem Keim nach einem bestimmten Muster ab. Entscheidend dabei sind Rezeptoren, die bestimmte molekulare Muster der pathogenen Keime erkennen können (Medzhitov und Janeway, 2002). Die Rezeptoren werden dabei als „*Pattern Recognition Receptors*“ (PRR) und die dazugehörigen Antigene als „*Pathogene Associated Molecular Patterns*“ (PAMP) bezeichnet (Janeway 1989). Das angeborene Immunsystem arbeitet mit einem weiten Spektrum an löslichen (humoralen) Faktoren, die mit Fremdoberflächen interagieren und eine unspezifischen Immunantwort ermöglichen. Hierzu gehören zum Beispiel Komplementfaktoren, Lysozym, Akute-Phase-Proteine (z.B. C-Reaktives Protein (CRP)) und Interferone (Male und Wand-Württenberger 2005). Das angeborene Immunsystem reagiert unmittelbar nach Kontakt mit fremden Oberflächen und Substanzen mittels Interaktion mit PRRs (Antigen kann dabei z.B. Teer in der Lunge bei Rauchern sein) und reagiert damit deutlich schneller als das spezifische (früher auch „erworben“ genannte) Immunsystem. Zelluläre Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind unter

anderem Granulozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen (siehe Abbildung 1). Der Begriff angeborenes Immunsystem ist dabei ein sehr weit definierter Begriff. Hierunter fallen auch die natürlichen Barrieren und Begrenzungen des Körperinneren gegenüber der Außenwelt (i.e. Haut und Schleimhäute).

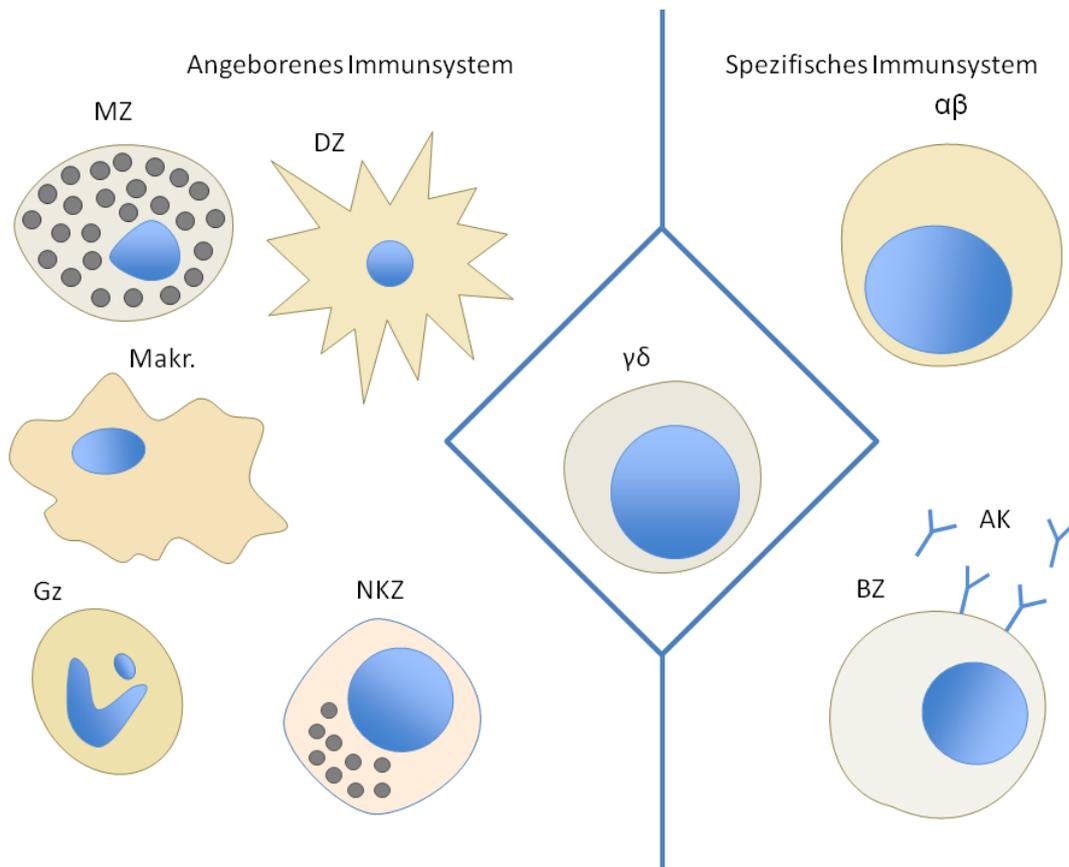


Abbildung 1: Zellen des angeborenen und des spezifischen Immunsystems

Übersicht über einige zelluläre Vertreter des angeborenen und des spezifischen Immunsystems. Die im peripheren Blut des Menschen am häufigsten vorkommenden Vertreter der $\gamma\delta$ -T-Zellen lassen sich nicht eindeutig in diese Klassifikation einordnen (Gz: Granulozyten, NKZ: natürliche Killerzellen, Makr.: Makrophagen, MZ: Mastzellen, DZ: dendritische Zellen, $\gamma\delta$: $\gamma\delta$ -T-Zellen, BZ: B-Zellen bzw -Lymphozyten, $\alpha\beta$: $\alpha\beta$ -T-Zellen bzw. -Lymphozyten, AK: Antikörper)

Eines der Hauptmerkmale für die spezifische Immunantwort und damit kennzeichnend für das sogenannte spezifische (oder erworbene) Immunsystem ist, dass es im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem einen deutlichen „Lerneffekt“ gibt. Bei

einem ersten Kontakt mit einem Antigen fällt die Immunantwort deutlich schwächer und meist zeitverzögert aus. Nach jedem weiteren Kontakt ist die Immunantwort schneller und vor allem wirkungsvoller. Dieser Unterschied wird primäre (schwächer und langsamer) und sekundäre Immunantwort (schneller und starker ausgeprägt) genannt. Der klassische Aktivierungsweg für eine spezifische Immunantwort durch klassische $\alpha\beta$ -T-Zellen lässt sich an der Reaktion nach Eindringen eines Bakteriums gut demonstrieren. Das Bakterium wird zum Beispiel durch eine dendritische Zelle phagozytiert und durch eine Vielzahl an Prozessen verdaut. Die dendritische Zelle - ab jetzt nenne ich sie auf Grund der Aufgabe, die übernommen wird, professionelle antigenpräsentierende Zelle - verändert die Oberflächenexpression der eigenen Rezeptoren. In Folge dessen „wandert“ die antigenpräsentierende Zelle in Richtung eines nahegelegenen Lymphknotens oder eines sonstigen Bestandteils der sekundären Immunorgane. Aus dem während dieser Wanderung zersetzten Bakterium werden kleine Peptide, die aus 12-15 Aminosäuren bestehen, im „*MHC Class II Compartment*“ (MIIC, Peters et al. 1991) mit dem präsentierenden Molekül MHC der Klasse II verbunden und an der Oberfläche präsentiert (Neefjes et al. 2011). In einem der sekundären Immunorgane angekommen, wird dieses Peptid einer $CD4^+$ -T-Zelle ($\alpha\beta$ -T-Zelle) innerhalb einer sogenannten immunologischen Synapse präsentiert. Das Peptid wird, gebunden an das MHC-Klasse-II-Molekül, von dem $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptor erkannt und löst zusammen mit einer Reihe weiterer essentieller kostimulatorischer Signale die Aktivierung der $\alpha\beta$ -T-Zelle aus. Die auf dieser Weise aktivierte $\alpha\beta$ -T-Zelle entwickelt sich beispielsweise in eine sog. T-Helferzelle und übt je nach Subtyp unterschiedliche Funktionen aus. (Siehe Abbildung 2). Dabei können sowohl Zellen, die ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind, als auch B-Zellen, die Funktion der antigenpräsentierenden Zelle einnehmen. Die kostimulatorischen Signale nehmen dabei eine zentrale Rolle ein. Bei Antigenpräsentation ohne weitere kostimulatorische Signale kommt es nicht zur Proliferation der $\alpha\beta$ -T-Zelle. Vielmehr kommt es zur sog. Anergie; die T-Zelle erkennt das Epitop nicht als gefährlich und bleibt inaktiv (Mueller et al. 1989).

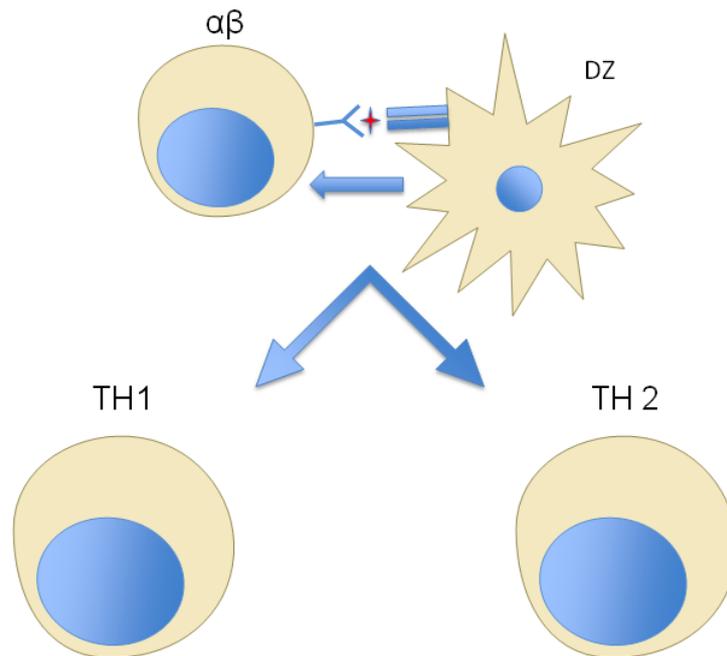


Abbildung 2: Aktivierung von $\alpha\beta$ -T-Helferzellen

Die ruhende T-Helferzelle wird nach Kontakt mit einem Antigen, welches in diesem Fall durch eine dendritische Zelle (DZ) präsentiert wird, aktiviert. Je nach Zusammensetzung der kostimulatorischen Signale kann eine T-Helfer-eins (TH1)-Zelle oder eine T-Helfer-zwei (TH2)-Zelle entstehen. (DZ: dendritische Zellen, $\alpha\beta$: $\alpha\beta$ -T-Zellen bzw. -Lymphozyten, TH1: T-Helfer-eins (TH1)-Zelle, TH2: T-Helfer-zwei (TH2)-Zelle)

Bei krankhaft veränderten körpereigenen Zellen (z.B. virusinfizierte Zellen) kann im Idealfall die Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle über die Erkennung von veränderten Peptiden, die in Verbindung mit MHC-Klasse-I präsentiert werden, erfolgen (Townsend 1986). Die aktivierte zytotoxische T-Zelle ist in der Lage, die Abtötung der Zielzelle einzuleiten. Die Antigenerkennung und damit die Aktivierung der $\alpha\beta$ -T-Zellen unterliegt der sogenannten MHC-Restriktion.

Die Aktivierung von B-Zellen ist im Gegensatz zur Aktivierung der $\alpha\beta$ -T-Zellen nicht an eine antigenpräsentierende Zelle gebunden und damit auch keiner MHC-Restriktion unterworfen. Vielmehr ist die B-Zelle in der Lage, lösliche Antigene zu erkennen und darauf zu reagieren. Die Reaktion der B-Zellen besteht in der Produktion von

Antikörpern, die spezifisch gegen das vorhandene Antigen gerichtet sind. Nach Kontakt mit dem Antigen und Kostimulation durch T-Helferzellen kommt es zur monoklonalen Expansion der B-Zellen mit passendem Rezeptor für das Antigen. Nach monoklonaler Expansion kommt es zur somatischen Hypermutation mit positiver Selektion der B-Zellen mit der höchsten Affinität zum Antigen (MacLennan und Gray 1986). Nach Verschwinden des Antigens aus der Peripherie bleiben einige B-Zellen als Gedächtniszellen bestehen, die bei einem erneuten Antigenkontakt sehr schnell, deutlich schneller und effektiver als beim ersten Kontakt, hochaffine Antikörper ausschütten können. B-Zellen sind jedoch auch in der Lage, als antigenpräsentierende Zellen zu arbeiten, nachdem sie aktiviert worden sind (Chesnut et al. 1982). Der B-Zell-Rezeptor ist ein membrangebundenes Immunglobulin. Jede B-Zelle besitzt lediglich ein spezielles Immunglobulin und kann so nur ein sehr schmales Spektrum an Antigenen erkennen. Dieses sogenannte Schlüssel-Schloss-Prinzip (jede B-Zelle erkennt ein Antigen) gilt auch für die $\alpha\beta$ -T-Zellen und stellt das namensgebende Merkmal des spezifischen Immunsystems dar.

Auch auf der genetischen Ebene unterscheiden sich die zellulären Bestandteile des angeborenen Immunsystems von denen des erworbenen Immunsystems. Die genetischen Domänen, die spezifische Rezeptoren des angeborenen Immunsystems kodieren, sind invariabel (Medzhitov und Janeway 1997). Die Rezeptoren an der Oberfläche eines bestimmten Zelltyps bleiben damit immer gleich. Ein Beispiel hierfür sind die TLR (Toll-like-Rezeptoren), die bestimmte Antigenmuster erkennen. Dagegen sind die genetischen Domänen, die die Rezeptoren an der Oberfläche von Zellen des erworbenen Immunsystems kodieren, ausgesprochen variabel. T-Lymphozyten und B-Lymphozyten, mit Ausnahme von $\gamma\delta$ -T-Zellen, werden durch variable Oberflächenrezeptoren definiert, die durch unterschiedliche Kombinationen der Gensegmente V (variable, zu Deutsch variabel), D (diversity, zu Deutsch Vielfalt), J (joining, zu Deutsch zusammenfügend) und C (constant, zu Deutsch konstant/dauerhaft) gebildet werden (Concannon 1986). Wenn ein Antigen in Kontakt mit einem passenden Rezeptor tritt, kann es unter anderem zu einer klonalen Expansion, bei der mehrere Zellen mit einer identischen Rezeptorzusammensetzung entstehen, kommen (MacLennan und Gray 1986). Bei einem ersten Kontakt mit einem bestimmten Antigen gibt es seitens des spezifischen Immunsystems per Zufall eine oder wenige Zellen, die das aufgenommene Antigen erkennen. Bei einem zweiten Kontakt mit dem Antigen bestehen bereits Gedächtniszellen die, wenn es sich um $\alpha\beta$ -T-Zellen handelt, schnell eine monoklonale Proliferation einleiten oder im Falle von B-Zellen neben der monoklonalen Proliferation unmittelbar große Mengen an

monoklonalen Antikörper freisetzen können. Bei einem ersten Kontakt ist die Immunantwort des spezifischen Immunsystems dadurch langsamer und insgesamt schwächer. Bei jedem weiteren Kontakt kommt eine schnellere und kräftigere Antwort. Das Immunsystem ist lernfähig.

Die $\gamma\delta$ -T-Zelle

$\gamma\delta$ -T-Zellen stellen im peripheren Blut des erwachsenen Menschen nur einen geringen Anteil der $CD3^+$ -T-Lymphozyten dar (0,5 -10%) (Inghirami et al. 1990; Esin et al. 1996). Die $\gamma\delta$ -T-Zellen werden über die Kombination der unterschiedlichen $V\gamma$ - und $V\delta$ -Regionen des T-Zellrezeptors definiert. Bei den humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen werden in der Literatur insgesamt drei unterschiedliche $V\delta$ -Varianten und meist sechs unterschiedliche $V\gamma$ -Varianten beschrieben (Haas et al. 1993; Hayday 2000) Obwohl hieraus potenziell viele unterschiedliche $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren resultieren können, finden sich im peripheren Blut des Menschen jedoch hauptsächlich $V\gamma9V\delta2$ -T-Zellen (auch $V\gamma2V\delta2$ -T-Zellen genannt). Insgesamt machen die $V\gamma9V\delta2$ -T-Zellen etwa 50-95% der peripheren $\gamma\delta$ -T-Zellen aus (Yoshikai et al. 1987; Bottino et al. 1988). Während oder unmittelbar nach einer Infektion mit einem breitem Spektrum von Eubakterien und Protozoen, z.B. mit *Mycobacterium tuberculosis*, Malaria, oder *E. Coli*, steigt der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an den $CD3^+$ -T-Lymphozyten stark an (Shen et al. 2002). Es wurde früh festgestellt, dass viele an sich deutlich unterschiedliche Krankheitserreger eine Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen hervorrufen konnten. Interessant dabei ist nicht nur, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen mit ein- und demselben Rezeptor Antigene unterschiedlicher Erreger erkennen können, sondern auch, dass es sich bei den Erregern sowohl um intrazelluläre als auch extrazelluläre Erreger handelt. Die Krankheitserreger, die eine Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach sich ziehen, begrenzen sich dabei auch nicht nur auf Bakterien. In dieser Dissertation werde ich mich ausschließlich mit $V\gamma9V\delta2^+$ -T-Zellen auseinandersetzen und diese abgekürzt fortan als $\gamma\delta$ -T-Zellen oder $V\delta2^+$ -Zellen bezeichnen. Im Gegensatz zu Menschen und höheren Primaten findet man bei anderen Tierarten, wie zum Beispiel den häufig im Labor eingesetzten Mäuse und Ratten, keine oder kaum $V\gamma2V\delta2$ -T-Zellen (Karunakaran und Herrmann 2014). Dies ist sicherlich auch ein Hauptfaktor dafür, warum die $\gamma\delta$ -T-Zelle nur langsam erforscht wird.

Obwohl der $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor bereits 1984 erstmalig beschrieben werden konnte, (Saito et al. 1984) und die $\gamma\delta$ -T-Zellen seither in unterschiedlichsten in-vivo- und in-vitro-Experimenten untersucht wurden, konnte bisher nicht eindeutig festgehalten werden, welche Aufgabe oder Aufgaben die Zellpopulation wahrnimmt. Die Autoren

waren sich damals nicht bewusst, dass sie eine gänzlich neue T-Zelle beschrieben hatten. In der Publikation wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem beschriebenen Rezeptor um einen neuen Subtyp der $\alpha\beta$ -T-Zelle handelte. Erst retrospektiv wurde klar, dass dies die erste Beschreibung des $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptors gewesen war.

Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen

Welche Antigene oder welches Antigen diese Zellpopulation aktivieren können, war lange Zeit nicht bekannt. 1994 konnten jedoch eindrucksvoll nicht-peptidische, phosphathaltige mykobakterielle Bestandteile mit einem sehr niedrigen Molekulargewicht als sehr effektives Antigen für $\gamma\delta$ -T-Zellen identifiziert werden (Constant et al. 1994). In der Folge gelang es, mehrere Pyrophosphate als sehr potente Liganden für $\gamma\delta$ -T-Zellen zu bestimmen. Diese Liganden werden unter dem Sammelbegriff Phosphoantigene beschrieben. Eine Reihe von Erregern führt in vivo zu einer starken Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen, vor allem kurz nach Beginn der jeweiligen Infektion. Interessanterweise waren unter den Erregern sowohl Prokaryonten wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* (Balbi et al. 1993), und Eukaryonten wie z.B. *Plasmodium falciparum* (Ho et al. 1990), als auch Viren wie das Influenzavirus Typ A (Jameson et al. 2010) vertreten. In einer Reihe von Experimenten wurde eine Aktivierung und darauffolgende Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen in vitro nach Kontakt mit unterschiedlichen Eukaryonten- oder Prokaryontenkulturen festgestellt. Schließlich gelang es, jeweils ein gemeinsames Phosphoantigen aller Pro- und auch Eukaryonten zu identifizieren. Die bisher bekannten Eukaryonten, die in der Lage sind, sowohl in vitro als auch in vivo eine Aktivierung und anschließende Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu verursachen, setzen unterschiedliche Mengen an Isopentenyl Pyrophosphat (im Nachfolgenden unter dem Begriff „IPP“ abgekürzt) frei (Tanaka et al. 1995). 2001 wurde (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-Pyrophosphat (im nachfolgenden unter dem Begriff „HMB-PP“ abgekürzt) als, im Bezug auf $\gamma\delta$ -T-Zellaktivierung, sehr potentes Phosphoantigen der Prokaryonten erkannt (Hintz et al. 2001).

HMB-PP und IPP

HMB-PP stellt ein Zwischenprodukt des Methylerythritolphosphatstoffwechselweges (in der englischsprachigen Literatur als MEP (Methyl-Erythritolphosphat-Path) abgekürzt) dar (Siehe Abbildung 3). MEP stellt einen alternativen Weg der Terpensynthese dar (Rohmer et al. 1993), welcher von sehr vielen Eubakterien, Pflanzen und Parasiten verwendet wird (Eberl et al. 2003). HMB-PP tritt dabei in eukaryonten Zellen physiologischerweise nicht auf. In der eukaryonten Zelle, also auch in unseren

humanen Zellen, wird die Terpensynthese über den Mevalonatstoffwechselweg erreicht. Ein Zwischenprodukt des Mevalonatstoffwechselweges ist unter anderem das bereits erwähnte IPP. Sowohl HMB-PP als auch IPP sind geeignet, um $\gamma\delta$ -T-Zellen in vivo und in vitro zu aktivieren und zur Proliferation zu bewegen. Jedoch ist zur Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen eine etwa um den Faktor 10000 (10^4) größere Konzentration von IPP als von HMB-PP notwendig (Hintz et al. 2001; Ali et al. 2007). Dies ermöglicht eine differenzierte Reaktion der $\gamma\delta$ -T-Zellen auf das aktivierende Antigen. IPP ist physiologischerweise im menschlichen Körper vorhanden. Eine Aktivierung darf dementsprechend erst bei Überschreiten einer physiologischen Konzentration des IPP erfolgen. HMB-PP dagegen darf im menschlichen Organismus, zumindest in der Blutbahn, nicht vorkommen. Es reichen also sehr geringe Konzentrationen aus, um eine Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu bewirken.

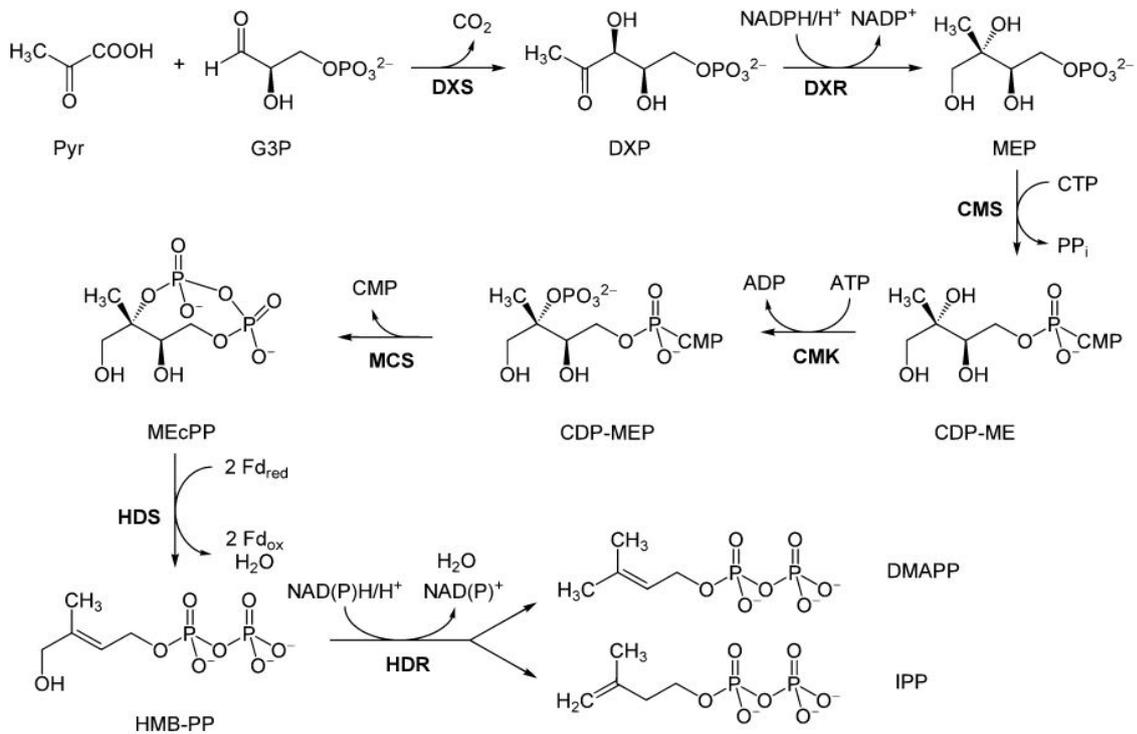


Abbildung 3: Der Methyl-Erythritolphosphat-Stoffwechselweg (MEP)

Die Terpensynthese der Prokaryonten zeigt als Zwischenprodukt neben dem hochpotenten Phosphoantigen HMB-PP und dem ebenfalls hochpotenten Phosphoantigen DMAPP zusätzlich den wesentlich niedrigpotenteren und auch in Eukaryonten vorkommenden IPP.

Quelle:

https://en.wikipedia.org/wiki/Non-mevalonate_pathway#/media/File:Non-mevalonate_pathway.svg

Wikimedia Commons und der Ersteller dieser Abbildung erlaubt explizit die Wiederverwendung dieser Abbildung für öffentlich zugängliche Publikationen

Obwohl es in mehreren Studien und Experimenten gelungen ist, die zwei Hauptaktivatoren für $\gamma\delta$ -T-Zellen zu identifizieren und wiederholt für die in-vitro-Aktivierung zu nutzen, ist nicht abschließend geklärt, wie die genaue Interaktion zwischen Phosphoantigenen und $\gamma\delta$ -T-Zellen erfolgt. In dieser Hinsicht stellte ein komplexes Experiment durch Wei et al. (Wei et al. 2008) neue Informationen zur Verfügung. In einem aufwändigen Verfahren wurde zunächst ein löslicher V γ 9V δ 2-T-Zell-Rezeptor als Tetramer (Ursprungszellen waren periphere Leukozyten eines

Rhesusaffen) hergestellt. Im nächsten Schritt wurde dann das Bindungsverhalten zu HMB-PP untersucht. Hier zeigte sich, dass das Tetramer nicht in der Lage war, an „freies“ (nicht an eine Zelloberfläche gebundenes) HMB-PP zu binden. Vielmehr konnten Wei et al. zeigen, dass APCs des Rhesusaffen, die 60 Minuten zuvor mit HMB-PP inkubiert und anschließend durch mehrere Waschgänge von überschüssigem HMB-PP befreit worden waren, hervorragende Bindungsstellen für das V γ 9V δ 2-TZR-Tetramer darstellten. Dagegen konnte keine Tetramerbindung an unbehandelte APCs nachgewiesen werden. Den APCs konnte die Fähigkeit, HMB-PP zu binden, auch genommen werden. Dazu reichte eine 30-minütige Inkubation mit 0,05% Trypsin. Im Anschluss unterschied sich die Bindung des Tetramers an die APC-Oberfläche nicht von der Bindung an die Oberfläche von APCs, die nicht mit HMB-PP vorbehandelt worden waren. Da HMB-PP in vivo in aller Regel durch Prokaryonten gebildet wird, die auch intrazellulär bestehen können, musste aus Sicht der Autoren noch nachgewiesen werden, dass intrazellulär gebildetes HMB-PP ebenfalls an der Oberfläche der APCs präsentiert werden kann. Hierzu wurden APCs mit dem Mycobacterium BCG (Bacille Calmette-Guérin) infiziert und auf anschließende Interaktion mit dem V γ 9V δ 2-TZR-Tetramer untersucht. Es konnte bereits nach 18 Stunden eindeutig nachgewiesen werden, dass das V γ 9V δ 2-TZR-Tetramer an die APC-Oberfläche mit ähnlicher Affinität gebunden wurde wie an die APCs, die mit exogenem HMB-PP vorbehandelt worden waren. Hieraus schlossen die Autoren, dass das HMB-PP aus intra- und extrazellulärer Quelle sehr wahrscheinlich auch in vivo eine Bindung zwischen APCs und $\gamma\delta$ -T-Zellen hervorrufen kann. Leider konnten die Autoren nicht feststellen, an genau welche Oberflächenstrukturen die Bindung stattfand. Jedoch scheint durch die erfolgte Trypsinbehandlung nachgewiesen zu sein, dass es sich um ein Oberflächenmolekül bzw. Oberflächenmoleküle handeln muss und nicht lediglich um unspezifische Bestandteile der Zellmembran. Die Möglichkeit und Fähigkeit der $\gamma\delta$ -TZR, an APC nach Kontakt mit HMB-PP zu binden, kann damit als gesichert gelten.

Die oben beschriebenen Ergebnisse von Wei et al. (Wei et al. 2008) stehen im Konflikt mit einer zentralen These zur Interaktion der V γ 9V δ 2-T-Zellen mit Phosphoantigenen, die unter anderem in einem Paper von Morita et al. im Jahr 1995 postuliert wurde (Morita et al. 1995). Hier wurde untersucht, unter welchen Bedingungen monoklonale humane $\gamma\delta$ -T-Zellen durch sezerniertes mycobacterielles Antigen (gemäß späteren Studien kann und wird es sich dabei um HMB-PP gehandelt haben) aktiviert werden, und es unter anderem zur Proliferation kommen kann. In der Publikation gelangten die Autoren zu der Erkenntnis, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen einen unspezifischen Zellkontakt brauchen, um auf das Phosphoantigen zu reagieren. Die Kontaktzelle muss dabei

kernhaltig sein, und es kann sich auch um eine zweite $\gamma\delta$ -T-Zelle handeln. Eine antigenpräsentierende Zelle wurde dabei explizit als nicht notwendig beschrieben.

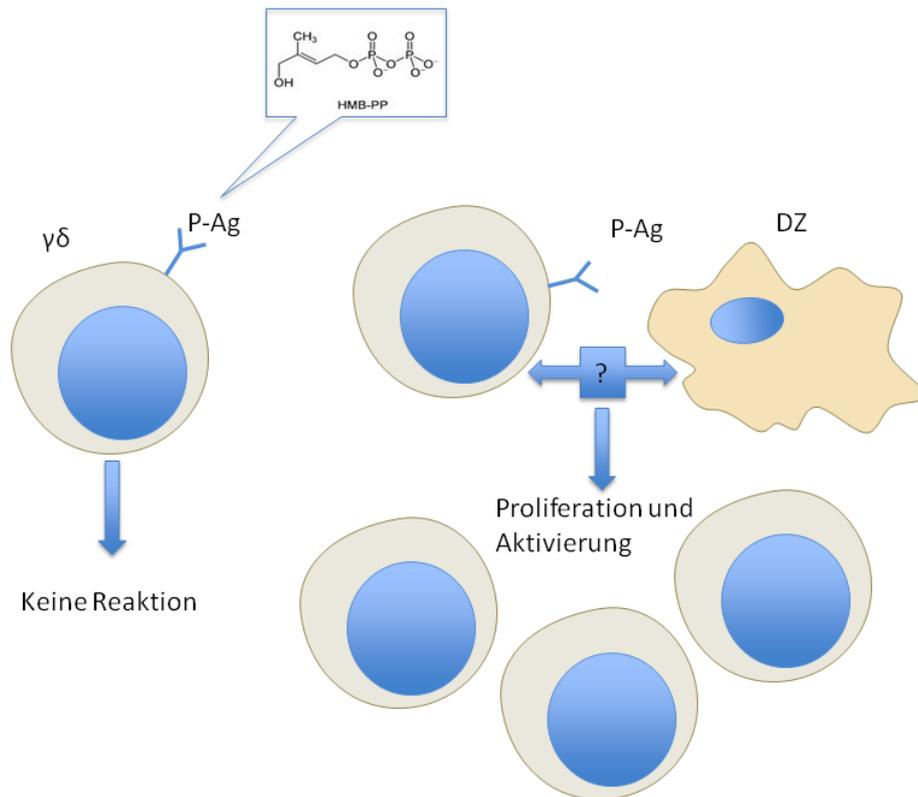


Abbildung 4: Proliferation nach Phosphoantigenkontakt

$\gamma\delta$ -T-Zellen scheinen auf Phosphoantigene wie das HMB-PP nur dann mit einer Aktivierung und Proliferation zu reagieren, wenn ein Zell-Zell-Kontakt besteht. (DZ: dendritische Zelle, $\gamma\delta$: $\gamma\delta$ -T-Zelle pAg: Phosphoantigen)

Die $\gamma\delta$ -T-Zelle anhand der oben aufgeführten Kriterien in das angeborene oder das erworbene Immunsystem einzuordnen, erweist sich als schwierig. Relativ früh wurden schon Merkmale beider Immunsysteme festgestellt. Auf der genetischen Ebene hat die $\gamma\delta$ -T-Zelle die Möglichkeit, unterschiedliche Rezeptoren zu bilden (s.u.); ähnlich, wenn auch in einem deutlich geringeren Ausmaß, wie bei klassischen Vertretern des erworbenen Immunsystems. Der $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor scheint aber andererseits, ähnlich wie typische Vertreter des angeborenen Immunsystems, bestimmte Antigenmuster und nicht nur ein einzelnes Antigen zu erkennen. Unterschiedliche Pyrophosphate können $\gamma\delta$ -T-Zellen mit demselben Rezeptor aktivieren. In einer Arbeit von 2001 zeigten Morita

und Tanaka (Morita et al. 2001), dass unter anderem Allyl-Pyrophosphat, Crotyl-Pyrophosphat, Geranyl-Pyrophosphat und Isopentenyl-Pyrophosphat eine Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen, wenn auch mit deutlich unterschiedlicher Bioaktivität, auslösen konnten. Es scheint also für die Antigenerkennung durch $\gamma\delta$ -T-Zellen nicht das klassische Schlüssel-Schloss-Prinzip zu gelten. Vielmehr scheint es sich um eine Aktivierung durch Wiedererkennung von bestimmten molekularen Mustern wie bei der Aktivierung des angeborenen Immunsystems zu handeln. Ebenfalls ähnlich wie beim angeborenen Immunsystem ist eine vorherige intrazelluläre Prozessierung und anschließender Antigenpräsentation durch eine andere Zelle bei der Antigenerkennung durch $\gamma\delta$ -T-Zellen scheinbar nicht notwendig. Vielmehr konnten Morita und Brenner 1995 zeigen, dass die bis dahin bekannten Liganden, die in der Lage waren, $\gamma\delta$ -T-Zellen zu aktivieren und eine Proliferation hervorzurufen, nicht durch eine antigenpräsentierende Zelle präsentiert werden mussten. Des Weiteren konnte auch festgestellt werden, dass die intrazelluläre Bearbeitung des Antigens durch eine zweite Zelle nicht notwendig war (siehe Diskussionsteil der Dissertation für die ausführliche Erörterung der Publikation von Morita et al. aus dem Jahr 1995). Ähnlich wie die Vertreter des angeborenen Immunsystems reagieren $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Antigenkontakt sehr schnell. Insgesamt besitzt die $\gamma\delta$ -T-Zelle Merkmale und Eigenschaften, die eine Zuordnung zu sowohl dem angeborenen wie auch dem erworbenen Immunsystem rechtfertigen würden. Eine einheitliche Zuordnung lässt sich in der Literatur nicht feststellen. Vielmehr wird eine Art Zwitterrolle und damit verbunden eine mögliche Schlüsselposition in der Kommunikation zwischen dem angeborenen und dem spezifischen Immunsystem diskutiert (siehe zum Beispiel die oben erwähnte Arbeit von Kabelitz et al. Kabelitz 2011).

Fragestellungen dieser Arbeit

Der aktuelle Stand der Forschung bezüglich der Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen im peripheren Blut des Menschen ist unbefriedigend. Eine notwendige Grundlage, um Rolle und Funktion bestimmter zellulärer Anteile des Immunsystems zu verstehen, ist es, die Aktivierungswege ausreichend verstanden zu haben. Diese Arbeit befasst sich deswegen mit der Frage, welche Merkmale eine professionelle antigenpräsentierende Zelle haben muss, damit die $\gamma\delta$ -T-Zellen HMB-PP als Antigen erkennen können und aktiviert werden.

Durch den Einsatz eines Zellsortierers (siehe Methodenteil) waren wir in der Lage, $\gamma\delta$ -T-Zellen in Monokulturen und mit der Zugabe von definierten weiteren Zellen zu

untersuchen. Wir untersuchten zunächst die Rolle von MHC-Klasse-II. MHC-Klasse-II spielt bei der Aktivierung der $\alpha\beta$ -T-Zellen eine wichtige Rolle. Auch wenn $\gamma\delta$ -T-Zellen und $\alpha\beta$ -T-Zellen deutliche Unterschiede aufweisen, gibt es einige Ähnlichkeiten. Daher hielten wir es für wahrscheinlich, dass MHC-Klasse-II eine Rolle bei der Interaktion mit der $\gamma\delta$ -T-Zelle spielt. Hieraus resultierten die Fragestellungen:

1. Sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) wichtige zelluläre Partner bei der Expansion von humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen?
2. Spielt MHC-Klasse-II eine entscheidende Rolle bei der in-vitro-Antigenpräsentation durch professionelle APCs und dadurch für die anschließende Aktivierung der humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen?

Falls die ersten Fragen bejaht werden würden, sollten zwei weitere Fragestellungen beantwortet werden:

3. Können autologe Zellen, die durch Manipulation vermehrt MHC-Klasse-II exprimieren, die Rolle der APCs in vitro übernehmen?
4. Spielt MHC-Klasse-II eine Rolle bei der Antigenerkennung durch $\gamma\delta$ -T-Zellen in Kokulturen mit allogenen, humanen Zelllinien?

Da die durchzuführenden Experimente sehr oft auch den Kontakt von dendritischen Zellen mit HMB-PP bedeuteten, wollten wir als Nebenfrage jedoch bereits an erster Stelle vor Durchführung der weiteren Experimenten den Einfluss von HMB-PP auf ebensolche Zellen untersuchen. Insbesondere interessierte uns der Einfluss von HMB-PP auf den Reifeprozess von „*Monocytic derived dendritic cells*“ (MoDCs).

Stellvertretend für den Reifegrad der dendritischen Zellen untersuchten wir die Expression von bestimmten Oberflächenmarker. Die sich hieraus ergebende fünfte Frage dieser Dissertation:

5. Kann HMB-PP die Reifung von MoDCs beschleunigen und eine erhöhte Expression von Reifemarkern an der Oberfläche der MoDCs auslösen?

2. Material und Methoden

Materialien

Geräte und Zubehör

Tabelle 1: Geräte und Zubehör

Geräte	Typ und Zubehör	Hersteller
Automatischer Hämatologieanalysator	KX21N	Sysmex, Kobe, Japan
AutoMACS	Separator + Appendix Software V1.12	Milteniy Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Durchflusszytometer	BD FACSCanto II + FACSDiva Software V6.1.2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometrischer Zellseparator	BD FACSAria III + FACSDiva Software V6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Brutschrank	HERAcell 240 CO2 Inkubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau Deutschland
Mikroskop	Leica Biomed	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Pipetten	2-1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Sterilbank	Heraeus Klasse 2 TypH	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold, Deutschland
Vortex	Reax Top	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Waagen	AE 100 S/9 und PJ 6000/9	METTLER-TOLEDO, Kirchheim Deutschland
Wasserbad	ED Klasse I	Julabo Labortechnik, Seelbach, Deutschland
Zählkammer	Neubauer improved 0,0025 mm ² / 0,1 mm	Brand GmbH, Schwerin, Deutschland
Zentrifugen	Rotina 380R <hr/> Biofuge primo	Hettich, Tuttlingen, Deutschland Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Material	Typ und Zubehör	Hersteller
FACS-Röhrchen	5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Falconröhrchen	15 und 50 ml (Polypropylen)	Corning (ehemals BD Labware) Inc., New York, USA

Glaspipetten	2-25 ml	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Zellkulturplatten	96-Well cell culture cluster U-Bottom 24-well cell culture cluster flatbottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sterilfilter	0,22 µm Millex GS	Merck Millipore (Ehem. Sigma-Aldrich), Darmstadt, Deutschland
Spritzen	20 ml	Braun, Melsungen, Deutschland
Falconröhren mit Zellsieb	5 ml Rundboden mit integriertem Zellsieb im Deckel	Corning (ehemals BD Labware) Inc., New York, USA

Antikörper

Es wurden sowohl konjugierte als auch nicht-konjugierte Antikörper verwendet. Bei den konjugierten Antikörpern wurden Antikörper, die mit den folgenden Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren, verwendet: Allophycocyanin (APC), APC-Cy7, Fluoreceinisothiocyanat (FITC), R-phycoerythrin (PE), AlexaFluor 647 und Pacific Blue.

Tabelle 3: Antikörper

Antikörper	Klon	Isotyp	Cat.No.	Hersteller
CD14	M5E2	Maus IgG _{2a} K	557153	BD Pharmingen
CD1a	HI149,	Maus IgG ₁ K,	559775	BD Pharmingen
HLA-DR	G46-6	Maus IgG _{2a} K	555812	BD Pharmingen

CD40	5C3	Maus IgG ₁ κ	555589	BD Pharmingen
CD83	HB15e	Maus IgG ₁ κ	556855	BD Pharmingen
CD86	2331 (FUN-1)	Maus IgG ₁ κ	555658	BD Pharmingen
HLA-DR, -DP, -DQ	TÜ 39	Maus IgG _{2a} κ	555557	BD Pharmingen
Maus IgG _{2a} κ- Isotypkontrolle	G155-178		555571	BD Pharmingen
CD19	LT19	Maus IgG ₁ κ	130-098- 064	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD14	HCD14	Maus IgG ₁ κ	325608	Biolegend Inc., San Diego, USA
Vd2	B6	Maus IgG ₁ κ	331407	Biolegend Inc., San Diego, USA
CD4	M-T466	Maus IgG ₁ κ	130-080- 501	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
HLA-DR	L243	Maus IgG _{2a} κ	307610	Biolegend Inc., San Diego, USA
Purified CD3	HIT3a	Maus IgG _{2a} κ	555337	BD Pharmingen,
Purified CD28	CD28.2	Maus C3H x BALB/c IgG ₁ , κ	555728	BD Pharmingen
CD8	BW135/80	Maus IgG _{2a}	130-091- 076	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CD1c	AD5—8E7	Maus IgG _{2a}	130-098- 009	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
αβTCR	IP26	Maus, IgG ₁ , κ	306714	Biolegend Inc., San Diego, USA

FcR-Blocking Reagent			130-059-901	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
----------------------	--	--	-------------	--

Micro-Beads

Tabelle 4: Micro-Beads

Beads	Cat.No.	Hersteller
CD14 Microbeads	130-050-201	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Naive CD8 ⁺ -T-Cell isolation kit	130-093-244	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
CompBead Anti-Mouse Ig, κ /Negative Control Compensation Particles Set	552843	BD Pharmingen, New Jersey, USA

Chemikalien und Lösungen

Tabelle 5: Chemikalien und Lösungen

Chemikalie/Lösung	Cat.No.	Hersteller
RPMI 1640 mit Glutamin	E15-885	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Gentamicin	P11-005	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
HEPES	15630-056	Gibco by Life Technologies, Grand Island New York, USA
Gepooltes hitzeinaktiviertes AB-Serum		Eigene Herstellung

Ficoll paque Plus, Dichte 1,077 ± 0,001 g/ml (bei 20°C)	17-2440-03	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
DPBS ohne Magnesium, ohne Calcium	P04-36500	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
EDTA (Titriplex III)	1.08418.0250	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
BSA (Bovines Albumin)	47330.03	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Fetal Bovine Serum Gold	A15-151	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
HMB-PP		Bereitgestellt von Dr. H. Jomaa
PBS	P04-36500	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	P06-07001	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Natrium-Pyruvat	11360070	Gibco by Life Technologies, Grand Island New York, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren	M7145	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Hitzeinaktiviertes FCS	A15-649	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Trypanblau 0,4%	15250061	Gibco by Life Technologies, Grand Island New York, USA
Ethanol (70% und 99,9%)	T86.8, P075.1	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
FACS Clean	340345	BD Bioscience, New Jersey, USA

FACS Flow	342003	BD Bioscience, New Jersey, USA
FACS Shutdown Solution	334224	BD Bioscience, New Jersey, USA
FACS Lysing Solution	349202	BD Bioscience, New Jersey, USA
Lysing Buffer	555899	BD Bioscience, New Jersey, USA
Aqua ad injectabilia	6724092.00.00	Braun, Melsungen, Deutschland
X-Vivo-Medium 15	04-418	Lonza Group Ltd., Basel, Schweiz

Weitere Reagenzien

Tabelle 6: weitere Reagenzien

Kit	Cat.No.	Hersteller
Vybrant CFDA SE cell tracer Kit	V12883	Molecular Probes Inc., Eugene, USA

Zytokine

Tabelle 7: Zytokine

Zytokin	Cat.No.	Hersteller
rh-IL-4	34-8049-85	eBioscience Inc., San Diego, USA
rh-IL-2	200-02	Peptotech Inc. New Jersey, USA

Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Zelllinie	Bereitgestellt durch	American Type Culture Collection Nr.
Daudi	Dr. S. Santoso Giessen	CCL-213
Raji	Dr. S. Santoso, Giessen	CCL-86
THP-1	Dr. S. Santoso, Giessen	TIB-202
KG-1a	Dr. S. Santoso, Giessen	CCL-246.1
Meg-01	Dr. S. Santoso, Giessen	CRL-2021

Methoden

Verwendete Medien

Vd2-Medium

RPMI 1640 wurde durch 1µg/ml Gentamicin und 2mM HEPES ergänzt. Anschließend wurde die Lösung durch einen sterilen 0,22µm-Filter filtriert. Nach der Filtration wurden insgesamt 10Vol.-% hitzeinaktiviertes AB-Serum hinzugegeben. Das Medium wurde innerhalb von 24 Stunden verwendet.

T-Zell-Medium

Das Medium bestand aus RPMI 1640 mit L-Glutamin (PAA Laboratories), Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100IU [International Units] Penicillin/ml und 100ng Streptomycin/ml, PAN Biotech), Natrium-Pyruvat (Endkonzentration 1mM, Life Technologies), nicht-essentiellen Aminosäuren (Sigma-Aldrich), HEPES Puffer (Endkonzentration 25nM, Invitrogen) und 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum.

Dendritic-Cell(DC)-Medium

Abweichend von dem Vd2-Medium wurde das DC-Medium mit hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum anstelle des gepoolten AB-Serums hergestellt. Die übrigen Bestandteile unterschieden sich nicht vom Vd2-Medium. Die Konzentrationen der

unterschiedlichen Bestandteile des Mediums entsprechen genau den Konzentrationen im Vd2-Medium.

Zellisolationismethoden

In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Zellseparation eingesetzt. Es handelte sich dabei um die Isolierung mithilfe des AutoMACS und FACSAria III (nähere Beschreibung unten). Nach der Zellseparation erfolgten die weiteren Zellkulturarbeiten unter einer Sterilbank mit sterilen Materialien und Geräten. Die Kultivierung der Zellen erfolge in einem CO₂-Begasungsbrutschrank bei 37°C mit 5% CO₂ und unter einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Die eingesetzten Zellen wurden aus Restblut nach informierter Zustimmung der Blutspender eingesetzt (anerkant durch die Gießener Ethik-Kommission, Referenz-Nummer 05/00). Die in unseren Experimenten eingesetzten Zellen stammen, mit Ausnahme der Zelllinien, von gesunden Blutspendern.

Gewinnung von mononuklearen Leukozyten (PBMCs)

Bei der Durchführung eines sog. Ficoll-Gradienten entstehen nach einer Zentrifugation bedingt durch die unterschiedlichen Dichten der unterschiedlichen Bestandteile des Buffy-Coats mehrere Schichten (Siehe Abbildung 6). Dabei entspricht eine der Schichten den Zielzellen (PBMCs) vermengt mit Thrombozyten. Die Thrombozyten können durch mehrere Waschgänge nahezu vollständig entfernt werden.

Vorgehensweise:

1. Der Buffy-Coat von jeweils einem gesunden Blutspender wurde mit PBS (*Phosphate buffered saline*) 2:3 verdünnt (20ml Buffy-Coat in 30ml PBS).
 - a. Der Buffy-Coat wurde kurz geschwenkt, um eine Homogenisierung zu erreichen.
 - b. 20ml Buffy-Coat wurden entnommen und in ein 5ml-Falconröhrchen aufgenommen.
 - c. 30ml raumtemperiertes PBS wurde mit dem Buffy-Coat vermengt.
2. 15ml Ficoll wurde in ein separates 50ml-Falconröhrchen mithilfe einer 25ml-Glaspipette umgefüllt.
3. 35ml des verdünnten Buffy-Coats wurden vorsichtig auf die 15ml Ficoll geschichtet.

4. Zentrifugation für 30 Minuten mit 1500 Umdrehungen/Minute bei Raumtemperatur in der Rotina-Zentrifuge von Hettich. Sehr wichtig dabei ist, dass die Zentrifuge ohne Benutzung der Bremse zum Stehen kommt.
Nach der Zentrifugation wurde mithilfe einer Pasteur-Pipette die aus Leukozyten und Thrombozyten bestehende Schicht (siehe Abbildung 6) entnommen. Die Pipette wurde dabei eingetaucht, bis die weiß-gelbliche Zellschicht erreicht wurde und direkt abgesaugt, ohne dabei die darüber liegende Plasmaschicht zu entfernen.
5. Das Zellpellet wurde in 50ml PBS in einem 50ml-Falconröhrchen gelöst und bei 1700 Umdrehungen/Minute in der Biofuge-Primo-Zentrifuge für 10 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert (erster Waschvorgang, um Thrombozyten sowie Reste des Ficolls zu entfernen).
6. Der Überstand wurde vorsichtig ausgekippt und das Zellpellet in 50ml PBS gelöst.
 - a. Dabei wurden zunächst 2ml PBS hinzugefügt und das Röhrchen geschwenkt und leicht gerüttelt, bis das Zellpellet komplett aufgelöst war.
 - b. Anschließend wurden die restlichen 48 ml PBS hinzugegeben.
7. Eine erneute Zentrifugation mit 700 Umdrehungen/Minute bei Raumtemperatur wurde durchgeführt (Biofuge Primo).
8. Punkte 7 und 8 wurden wiederholt.
9. Nach dem zweiten Waschgang bei 700 Umdrehungen/Minute wurde das Zellpellet in 5ml eiskaltem PBS-EDTA-HEPES (PBS mit 10mMol/l EDTA und 25mMol/l HEPES) gelöst und für die weitere Bearbeitung auf Eis gestellt.
10. 10 μ l der Zellsuspension wurden entnommen und in 90 μ l PBS-EDTA-HEPES verdünnt.
11. Die Gesamtzellzahl wurde mithilfe des Sysmex bestimmt.

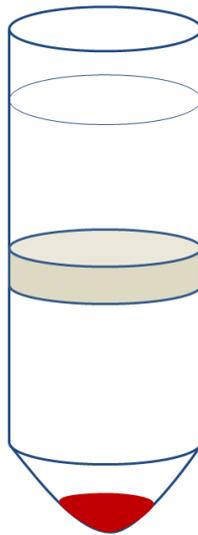


Abbildung 6: Schichten nach der Zentrifugation.

Nach der Zentrifugation sind vier Schichten klar zu erkennen. In der Spitze des Röhrchens sammeln sich die roten Blutkörperchen an. Der hier graugelb markierte Ring wird durch das Ficoll-Paque+ von den roten Blutkörperchen getrennt und nach oben hin durch das Blutplasma abgedeckt. Die graugelb markierte Schicht wurde entnommen und weiter verwendet.

Zellseparation mittels AutoMACS

Bei der Zellseparation mittels AutoMACS (*Automatic Magnetic Activated Cell Separation*) werden Zellen mit paramagnetischen Partikeln markiert und anschließend in einem magnetischen Feld festgehalten. Durch das Ein- und Ausschalten des Magnetfeldes kann man zunächst PBMCs ohne die markierten Zellen gewinnen (Magnetfeld ist aktiviert, nicht markierten Zellen laufen frei durch und können unterhalb der Kolumne aufgefangen werden) oder jedoch ausschließlich die markierten Zellen gewinnen (Magnetfeld wird ausgeschaltet und die im Magnetfeld gefangenen Zellen gezielt entnommen). Im speziellen werden die paramagnetischen Partikel, auch Beads genannt, mit einem Antikörper konjugiert. Je nach Spezifität des Antikörpers können damit gezielt unterschiedliche Zellpopulationen markiert werden. Prinzipiell ist es möglich, Antikörper gegen mehrere Oberflächenmarker gleichzeitig einzusetzen. Der AutoMACS befand sich in einer sterilen Umgebung.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden wie oben beschrieben gewonnen und nach dem letzten Waschgang auf Eis gestellt.
2. Ein Volumen, das 1×10^8 PBMCs entspricht, wurde entnommen, in ein 15ml-Falconröhrchen umgefüllt und bei 300g für fünf Minuten zentrifugiert (Biofuge Primo).
3. Während der Zentrifugation wurde ein Puffer für die weitere Verarbeitung hergestellt. Der Puffer bestand aus PBS, 0,5Vol.-% *Fetal Bovine Serum Gold* und 2mMol/l EDTA.
4. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 800µl Puffer gelöst.
5. 200µl des gewünschten mit magnetischen *Microbeads* konjugierten Antikörpers wurden hinzugefügt.
6. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert.
7. Die Zellsuspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 15ml mit Pufferlösung verdünnt und 5 Minuten bei 300g pelletiert (Biofuge Primo).
8. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1ml Pufferlösung resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf Eis im Dunkeln gestellt (Waschvorgang, um überflüssige Antikörper zu entfernen).
9. AutoMACS wurde gem. Herstellerangaben hochgefahren.
10. Die Zellseparation wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Dabei wurden die markierten Zellen im Magnetfeld zurückgehalten und entweder die Fraktion mit den zurückgehaltenen Zellen (sog. positive Selektion) oder die restlichen, nicht markierten Zellen (sog. negative Selektion oder auch Depletion genannt) weiter bearbeitet.
11. 30µl der gewonnenen Zellsuspension wurden in 60µl PBS verdünnt und die Gesamtzellzahl mithilfe des Sysmex bestimmt.
12. Die Zellsuspension wurde für 5 Minuten bei 300g pelletiert (Biofuge Primo) und der Überstand anschließend verworfen.
13. Das Zellpellet wurde in geeignetem Medium in gewählter Zelldichte resuspendiert.

Zellseparation mittels FACSAria III

FACSAria III ist ein Durchflusszytometer mit der Möglichkeit, die Zellen nach der Identifizierung einzeln zu trennen. In der Durchflusszytomtrie werden die zu untersuchenden Zellen mit einem Lichtstrahl aus monochromatischem Licht beleuchtet.

Anschließend wird das von der Zelle reflektierte und gestreute Licht von Photosensoren wahrgenommen und analysiert. Die Lichtstreuung wird klassischerweise in zwei Kategorien zusammengefasst. Das sogenannte FSC (*forward scatter*) korreliert mit der Größe der untersuchten Zelle. Das sogenannte SSC (*sideward scatter*) korreliert mit der Granularität der untersuchten Zelle. Hauptmerkmal und wichtigstes Werkzeug in der Durchflusszytometrie stellen jedoch Antikörper dar, die mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert sind. Spezifische Antikörper gegen intra- oder extrazelluläre Strukturen der Zelle, die mit unterschiedlichen Farbstoffen konjugiert sind, werden eingesetzt. Die mit solchen Antikörpern markierten Zellen werden möglichst einzeln in einer Kapillare einem monochromatischen Licht ausgesetzt (je nach eingesetzter Fluoreszenz werden unterschiedliche Wellenlängen zur Anregung gewählt). Die Fluoreszenzfarbstoffe emittieren nach der Anregung spezifische Wellenlängen. Diese werden in der Durchflusszytometrie erfasst. Dabei korreliert die Lichtintensität mit der Dichte des Farbstoffes an oder in der Zelle. Es ist dabei möglich, eine einzelne Zelle mit mehreren Farbstoffen zu markieren; vorausgesetzt, die emittierten Wellenlängen unterscheiden sich ausreichend, um eine Differenzierung vorzunehmen.

Nach der Messung verlassen die Zellen die Kapillare durch eine Düse, in welcher Tropfen entstehen, die im Idealfall jeweils genau eine Zelle beinhalten. Unmittelbar vor Verlassen der Düse werden die Tropfen je nach Beschaffenheit der darin enthaltenen Zelle elektrisch geladen. Dabei kann FACSAria III vier unterschiedliche Ladungen differenzieren (zweifach positive Ladung, einfach positive Ladung, einfach negative Ladung und zweifach negative Ladung). Diese einzelnen Tropfen gehen in den freien Fall über und fallen dabei durch ein elektrisches Spannungsfeld. Dabei können die Tropfen gezielt in eines von vier Auffangbehältnisse geleitet werden (Siehe Abbildung 7).

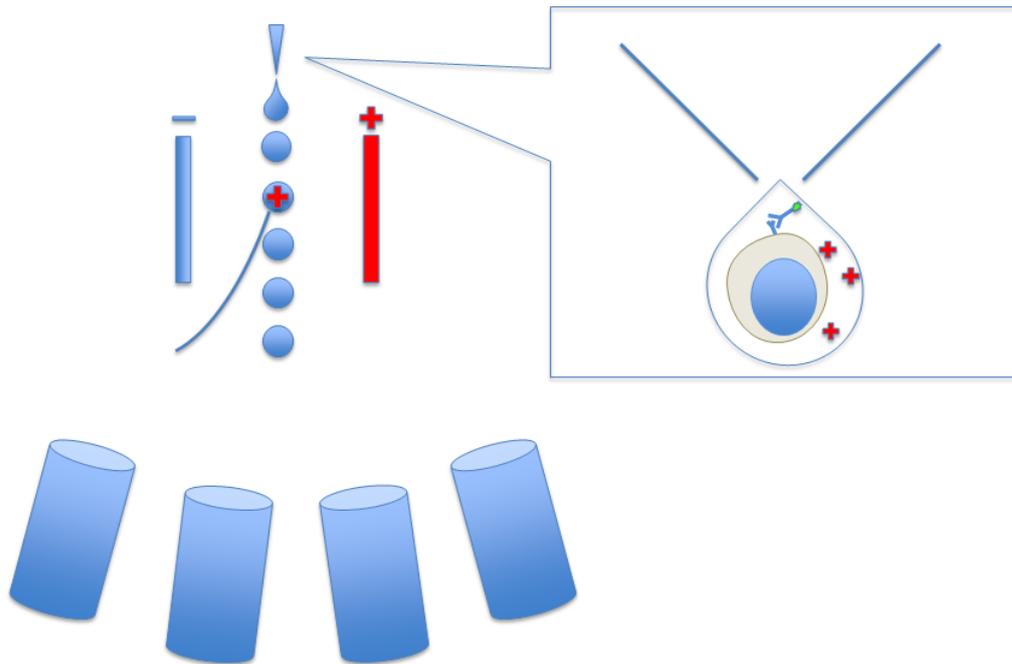


Abbildung 7: Isoliervorgang, FACS Aria III.

Nachdem die Zielzellen erkannt worden sind, werden kleinste Tropfen erzeugt. Jeder Tropfen enthält im Idealfall eine Zelle. Handelt es sich dabei um eine der Zielzellen, wird der gesamte Tropfen elektrisch geladen. Die Tropfen fallen anschließend durch ein elektrisches Feld und können dadurch aus dem freien Fall abgelenkt und gezielt in ein Auffangbehältnis gelenkt werden.

Die durchflusszytometrische Zellseparation bietet die Möglichkeit, Zellen nach mehreren Kriterien gleichzeitig (z.B. Zelle soll positiv für Fluoreszenzfarbstoff A und B aber gleichzeitig negativ für C und D sein) auszuwählen. Die Anzahl der analysierten Zellen liegen bei etwa 10000 Zellen/s, was die Isolation von seltenen Zelltypen deutlich beschleunigt.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden wie oben beschrieben gewonnen. Nach dem letzten Waschgang wurde das Zellpellet in 2ml Färbepuffer gelöst (Färbepuffer: PBS + 1Vol.-% FCS Gold).

2. Die Zellsuspension wurde durch ein 35µm-Zellsieb filtriert, um Verklumpungen zu entfernen bzw. zu lösen.
3. Die Zellzahl wurde mit dem Sysmex bestimmt.
4. Nach dem Berechnen der Gesamtzellzahl wurde die Lösung auf die erwünschte Zelldichte mit Färbepuffer verdünnt.
5. Die Zellsuspension wurde in die für das jeweilige Experiment benötigten Fraktionen aufgeteilt.
6. Der Antikörper bzw. Isotyp wurde hinzugegeben, das Röhrchen geschwenkt und anschließend für 30 Minuten im Dunkeln auf Eis gestellt.
7. Die Inkubation wurde beendet und überschüssige Antikörper abgewaschen. (Die jeweiligen Röhrchen wurden mit Färbepuffer aufgefüllt und anschließend 5 Minuten bei 1600 Umdrehungen/Minute in der Biofuge Primo-Zentrifuge pelletiert.)
8. Nach dem Waschgang wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in Färbepuffer gelöst. Dabei wurde eine Zelldichte von etwa 1×10^7 Zellen/ml angestrebt. Eine erneute Zellzählung erfolgte in diesem Arbeitsschritt nicht.
9. Bis zur Messung bzw. Zellseparierung wurden die Zellen im Dunkeln auf Eis aufbewahrt.
10. Unmittelbar bevor die Messung bzw. Separation erfolgte, wurde die Zellsuspension erneut durch ein 35µm Zellsieb filtriert.
11. Der FACSAria III wurde gem. Herstellerangaben kalibriert und die Separation durchgeführt.
12. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Separation in steril filtriertes X-Vivo-Medium aufgenommen und für die weitere Bearbeitung auf Eis gestellt.

CFSE-Markierung der Zellen

6-Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester (CFSE) bindet irreversibel an intrazelluläre Eiweiße und zeigt ein charakteristisches Fluoreszenz-Muster in der Durchflusszytometrie (i.e. im FITC-Kanal). Wenn Zellen vor Beginn der Stimulation mit CFSE markiert werden (streng genommen wird 5-Carboxy-Fluoresceindiacetat-Acetoxymethylester, CFDA, eingesetzt, welches intrazellulär erst in CFSE umgewandelt wird), kann anschließend durchflusszytometrisch bestimmt werden, zu welchem Anteil die Zellen mindestens eine Zellteilung hinter sich haben. Nach jeder Zellteilung werden stochastisch gesehen in etwa die Hälfte der markierten Eiweiße in die neue Zelle aufgenommen und die andere Hälfte der markierten Eiweiße verbleibt in

der Ursprungszelle. Damit einhergehend ist eine Reduktion der Intensität der Fluoreszenz um die Hälfte nach jeder Zellteilung.

Vorgehensweise:

- Eingesetzt wurde das „*Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit*“.
- Vorgegangen wurde dabei nach dem durch den Hersteller bereitgestellten Protokoll.

Zellisolation

Isolierung von Monozyten

Die in unseren Experimenten eingesetzten Monozyten wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Dafür wurden zunächst PBMCs, wie oben beschrieben, gewonnen und anschließend die Isolation der CD14⁺-Zellen mit Hilfe des AutoMACS durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert und in DC-Medium resuspendiert.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden nach dem oben beschriebenen Protokoll aus Buffy-Coats gewonnen.
2. Nach der Zellzählung wurden 1×10^8 Zellen entnommen und das Isolationsprotokoll für AutoMACS durchgeführt, eingesetzt wurden dabei CD14-Microbeads der Firma Milteniy Biotec.
3. Es erfolgte eine positive Selektion und die mit CD14-Microbeads markierten Zellen wurden weiter verarbeitet (Monocyten).

Isolierung von naiven CD8⁺-T-Zellen

Die in unseren Experimenten eingesetzten CD8⁺-T-Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Dafür wurden zunächst PBMCs wie oben beschrieben gewonnen und anschließend die Isolation der CD8⁺-T-Zellen mit Hilfe des AutoMACS durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert und in T-Zell-Medium resuspendiert.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden nach dem oben genannten Protokoll aus Buffy-Coats gewonnen.

2. Nach der Zellzählung wurden 1×10^8 Zellen entnommen und das Isolationsprotokoll für AutoMACS durchgeführt, eingesetzt wurden dabei 100µl eines biotinylierten Antikörpergemisches, gerichtet gegen nicht-naive T-Zellen (i.e. antihumanes biotinyliertes Anti-CD45RO, -CD56, -CD57 und -CD244).
3. Nach 10 Minuten wurde die Inkubation (im Kühlschrank bei 4°C, abgedunkelt) beendet und 200µl eines an magnetischen *Microbeads* gebundenen Anti-Biotin-Antikörpers untergemischt.
4. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation im Kühlschrank (4°C, abgedunkelt) wurde das Protokoll für Zellseparation mittels AutoMACS Punkt sieben fortgesetzt.
5. Es erfolgte ein Depletion der markierten Zellen.
6. Ohne erneute Zellzählung wurden die übrigen Zellen (ohne nicht-naive T-Zellen) pelletiert und in 800µl Puffer resuspendiert.
7. Anschließend wurde das Isolationsprotokoll für AutoMACS erneut durchgeführt, eingesetzt wurden dabei CD8-Microbeads.
8. Es erfolgte eine positive Selektion und die mit CD8-Microbeads markierten Zellen wurden weiter verarbeitet (naive CD8⁺-T-Zellen).
9. Die Gesamtzellzahl wurde manuell bestimmt.
10. Anschließend erfolgte eine Pelletierung des Zellgemisches (5 Minuten bei 300g) und die Resuspendierung in T-Zell-Medium, welches unmittelbar zuvor mit 5IU/ml IL-2 versetzt worden war.
11. Angestrebt wurde dabei eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml.

Isolierung von Vd2⁺-Zellen

Die in unseren Experimenten eingesetzten Vd2⁺-Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Dafür wurden zunächst PBMCs, wie oben beschrieben, gewonnen, und anschließend die Isolation der Vd2⁺-Zellen mit Hilfe des FACSAria III durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert und in Vd2-Medium resuspendiert. Eingesetzt wurden ausschließlich *Buffy Coats* von Blutspendern, die weniger als 6% Vd2⁺-Zellen im peripheren Blut hatten. Um dies sicherzustellen, wurde vor dem Isolationsvorgang Restblut von vier Blutspendern auf den Vd2-Gehalt untersucht. Zusammengefasst wurden dabei 200 µl Restblut mit Vd2- und CD3-Antikörpern gefärbt. Nach der Färbung wurden die kernlosen Zellen der Proben mit *FACS-lysing solution* lysiert, die Proben zweimal gewaschen mit eiskaltem PBS und anschließend durchflusszytometrisch auf den Vd2-Gehalt analysiert.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden nach oben genanntem Protokoll aus Buffy-Coats gewonnen.
2. Nach der Zellzählung wurde das Zellpellet in Färbepuffer aufgenommen, die Zelldichte wurde dabei auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt.
3. Das Protokoll für die Isolation mit Hilfe des FACSAria III wurde durchgeführt.
4. Eingesetzt wurden dabei die konjugierten Antikörper Vd2 (100µl/ml), CD3 (50µl/ml) und αβTCR (50µl/ml).
5. Isoliert wurde die Fraktion der Zellen, die positiv für Vd2 und CD3 und gleichzeitig negativ für αβTCR war.
6. Nach der Separation wurde die Gesamtzahl an vitalen Vd2⁺-Zellen manuell bestimmt.
7. Anschließend erfolgte eine Pelletierung des Zellgemisches (5 Minuten bei 300g) und die Resuspendierung in Vd2-Medium, welches unmittelbar zuvor mit 100 IU/ml IL-2 versetzt worden war.
8. Angestrebt wurde dabei eine Zellkonzentration von $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml.

Isolierung von MHC-II⁺-Zellen

Die in unseren Experimenten eingesetzten MHC-II⁺-Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Dafür wurden zunächst PBMCs wie oben beschrieben gewonnen und anschließend die Isolation der MHC-II⁺-Zellen mit Hilfe des FACSAria III durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert und in Vd2-Medium resuspendiert.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden nach dem oben genannten Protokoll aus Buffy-Coats gewonnen.
2. Nach der Zellzählung wurde das Zellpellet in Färbepuffer aufgenommen, die Zelldichte wurde dabei auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt.
3. Das Protokoll für die Isolation mit Hilfe des FACSAria III wurde durchgeführt.
4. Eingesetzt wurde dabei der konjugierte Antikörper HLA-DR (20 µl/ml).
5. Isoliert wurde die Fraktion der Zellen, die positiv für HLA-DR war.
6. Nach der Separation wurde die Gesamtzahl an vitalen HLA-DR⁺-Zellen manuell bestimmt.
7. Anschließend erfolgte eine Pelletierung des Zellgemisches (5 Minuten bei 300g) und die Resuspendierung in Vd2-Medium, welches unmittelbar zuvor mit 100 IU/ml IL-2 versetzt worden war.

8. Angestrebt wurde dabei eine Zellkonzentration von $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml.

Entfernung von MHC-II⁺-Zellen

Die in unseren Experimenten eingesetzten MHC-II⁺-Zellen wurden indirekt isoliert durch die Entfernung der MHC-II⁺-Zellen aus *Buffy Coats*. Dafür wurden zunächst PBMCs gewonnen, wie oben beschrieben, und anschließend eine Zellseparation mit Hilfe des FACSAria III durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert und in Vd2-Medium resuspendiert.

Vorgehensweise:

1. Bis auf einen Schritt war die Vorgehensweise identisch zur Vorgehensweise bei der Isolation von MHC-II⁺-Zellen.
2. Isoliert wurde nach der Färbung die Fraktion der Zellen, die *negativ* für HLA-DR war.
3. Nach der Pelletierung wurden die MHC-II⁺-Zellen in Vd2-Medium resuspendiert (Zellkonzentration $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml).

Isolierung von CD4⁺-Zellen

Die in unseren Experimenten eingesetzten CD4⁺-Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Dafür wurden zunächst PBMCs wie oben beschrieben gewonnen und anschließend die Isolation der CD4⁺-Zellen mit Hilfe des FACSAria III durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert und in T-Zell-Medium oder Vd2-Medium je nach Versuchsaufbau resuspendiert.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden nach oben genanntem Protokoll aus Buffy-Coats gewonnen.
2. Nach der Zellzählung wurde das Zellpellet in Färbepuffer aufgenommen, die Zelldichte wurde dabei auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.
3. Dabei wurden die konjugierten Antikörper CD4 (10µl/ml), αβTCR (50µl/ml) und HLA-DR (30µl/ml) eingesetzt und die Fraktion der Zellen, die positiv für αβTCR und CD4, und gleichzeitig negativ für HLA-DR war, isoliert.
4. Nach der Separation wurde die Gesamtzahl an vitalen CD4⁺-Zellen manuell bestimmt.
5. Anschließend erfolgte eine Pelletierung des Zellgemisches (5 Minuten bei 300g) und die Resuspendierung entweder in T-Zell-Medium, welches unmittelbar zuvor mit 5IU/ml IL-2 versetzt worden war, oder in Vd2-Medium, welches unmittelbar zuvor mit 100 IU/ml IL-2 versetzt worden war.

6. Angestrebt wurde dabei eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml (in T-Zell-Medium) bzw. $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml (Vd2-Medium).

Isolierung von CD8⁺-Zellen

Die in unseren Experimenten eingesetzten CD8⁺-Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Dafür wurden zunächst PBMCs wie oben beschrieben gewonnen, und anschließend die Isolation der CD8⁺-Zellen mit Hilfe des FACSAria III durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert, und in Vd2-Medium resuspendiert.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden nach oben beschriebenem Protokoll aus Buffy-Coats gewonnen.
2. Nach der Zellzählung wurde das Zellpellet in Färbepuffer aufgenommen, die Zelldichte wurde dabei auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.
3. Das Protokoll für die Isolation mit Hilfe des FACSAria III wurde durchgeführt.
4. Eingesetzt wurden dabei die konjugierten Antikörper CD8 und $\alpha\beta$ TCR (50 μ l/ml).
5. Isoliert wurde die Fraktion der Zellen, die positiv für CD8 und $\alpha\beta$ TCR war.
6. Nach der Separation wurde die Gesamtzahl an vitalen CD8⁺-Zellen manuell bestimmt.
7. Anschließend erfolgte eine Pelletierung des Zellgemisches (5 Minuten bei 300g) und die Resuspendierung in Vd2-Medium, welches unmittelbar zuvor mit 100 IU/ml IL-2 versetzt worden war.
8. Angestrebt wurde dabei eine Zellkonzentration von $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml.

Isolierung von CD1c⁺-Zellen

Die in unseren Experimenten eingesetzten CD1c⁺-Zellen wurden aus *Buffy Coats* gewonnen. Dafür wurden zunächst PBMCs wie oben beschrieben gewonnen und anschließend die Isolation der CD1c⁺-Zellen mit Hilfe des FACSAria III durchgeführt. Nach der Isolation wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen pelletiert und in T-Zell-Medium resuspendiert.

Vorgehensweise:

1. PBMCs wurden nach oben genanntem Protokoll aus Buffy-Coats gewonnen.
2. Nach der Zellzählung wurde das Zellpellet in Färbepuffer aufgenommen, die Zelldichte wurde dabei auf 1×10^7 Zellen/ml eingestellt.
3. Das Protokoll für die Isolation mit Hilfe des FACSAria III wurde durchgeführt.

4. Eingesetzt wurden dabei die konjugierten Antikörper CD1c (10µl/ml), CD14 (50µl/ml) und CD19 (50µl/ml).
5. Isoliert wurde die Fraktion der Zellen, die positiv für CD1c war bei gleichzeitiger Negativität für CD14 und CD19.
6. Nach der Separation wurde die Gesamtzahl an vitalen CD1c⁺-Zellen manuell bestimmt.
7. Anschließend erfolgte eine Pelletierung des Zellgemisches (5 Minuten bei 300g) und die Resuspendierung in T-Zell-Medium, welches unmittelbar zuvor mit 5IU/ml IL-2 versetzt worden war.
8. Angestrebt wurde dabei eine Zellkonzentration von 1×10^6 Zellen/ml.

Kulturbedingungen

Differenzierung von dendritische Zellen aus Monozyten (*monocytic derived dendritic cells, MoDCs*)

Die Differenzierung von MoDCs erfolgte nach Isolierung von Monozyten (angelehnt an eine Methode, die 1994 veröffentlicht wurde, Romani et al. 1994). Nach der Resuspendierung in DC-Medium wurden die Vertiefungen einer 24-Wells-Kulturplatte mit dem Zellgemisch bestückt. Vor Beginn der fünftägigen Inkubation im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) wurde ein Drittel der Vertiefungen mit 0,1nmol/l HMB-PP, und ein weiteres Drittel der Vertiefungen mit 10nmol/l HMB-PP versetzt. Das letzte Drittel der Vertiefungen wurde ohne HMB-PP inkubiert (Negativkontrolle). Die Zellkulturen wurden bis Tag fünf im Brutschrank belassen.

Vorgehensweise:

1. Nach der Isolierung wurde das Zellpellet in DC-Medium resuspendiert (Zieldichte: 1×10^6 Zellen/ml).
2. Das Medium wurde unmittelbar vor Aufnahme des Zellpellets mit 400IU/ml Interleukin 4 (rhIL-4) und 1000IU/ml Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) versetzt.
3. Die Zellsuspension wurde in drei volumengleiche Teilen aufgeteilt.
4. Einer der drei Teile wurde ohne weitere Zugaben in eine 24-Well-Zellkulturplatte aufgenommen (jeweils 1ml Zellsuspension pro Vertiefung).
5. Ein weiterer Teil wurde mit 0,1nmol/l HMB-PP versetzt und ebenfalls in eine 24-Well-Zellkulturplatte aufgenommen (jeweils 1ml Zellsuspension pro Vertiefung).

6. Das letzte Drittel der Zellsuspension wurde mit 10nmol/l HMB-PP versetzt und in eine 24-Well-Zellkulturplatte aufgenommen (jeweils 1ml Zellsuspension pro Vertiefung).
7. Beginnend am Tag null des Experiments wurden die Zellen bis Tag fünf im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen.
8. An Tag fünf wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten entnommen und die Platten mit eiskaltem PBS ausgespült (um noch haftende Zellen möglichst zu lösen).
9. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und einmalig in kaltem PBS gewaschen (bei 300g).

Ko- und Monokulturen mit hochrein isolierten Vd2⁺-Zellen

Falls nicht anders angegeben, wurden Vd2⁺-Zellen mit akzessorischen Zellen im Mengenverhältnis 1:4 kultiviert (in der Regel 2 x 10⁴ Vd2⁺-Zellen zusammen mit 8 x 10⁴ akzessorischen Zellen). Die Vd2⁺-Zellen wurden mit autologen akzessorischen Zellen kultiviert. Bei den Kokulturen mit den Zelllinien handelte es sich bei den akzessorischen Zellen um allogene Zellen.

Die Kulturbedingungen im Einzelnen:

1. Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁺-Zellen im Vergleich zu Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁻-Zellen
2. Vd2⁺-Zellen in Monokultur im Vergleich zu Vd2⁺-Zellen mit CD4⁺-Zellen, Vd2⁺-Zellen mit CD8⁺-Zellen und im Vergleich zur Positiv-/Negativkontrolle (Vd2⁺-Zellen + MHC-II⁺- bzw. MHC-II⁻-Zellen)
3. Vd2⁺-Zellen mit aktivierten CD4⁺-Zellen im Vergleich zu Vd2⁺ mit nicht-aktivierten CD4⁺-Zellen und im Vergleich zur Positivkontrolle (Vd2⁺-Zellen + MHC-II⁺-Zellen)
4. Vd2⁺-Zellen mit Daudi-, Raji-, KG-1a-, THP-, U937 oder Meg-Zelllinienzellen

Vorgehensweise:

1. Volumengleiche Anteile der einzusetzenden Zellsuspensionen wurden in 15ml-Falcons vermengt (z.B. 2ml Vd2-Zellsuspension mit 2ml Zellsuspension mit den akzessorischen Zellen)
2. Die Vd2/akzessorische-Zellen - Zellsuspension wurde in die für das Experiment benötigten Fraktionen aufgeteilt und HMB-PP dazugegeben. (In der Regel wurden dabei zwei Fraktionen benötigt. Der einen Fraktion wurden 100nmol/l HMB-PP beigegeben, der zweiten Fraktion wurde kein HMB-PP beigegeben.)

3. Jede der zwei Fraktionen wurde auf jeweils mindestens zwei Vertiefungen einer rundbödigen 96-Well-Zellkulturplatte aufgeteilt. Dabei wurden pro Vertiefung 200µl Zellsuspension hineinpipettiert.
4. Die 96-Well-Zellkulturplatte wurde bis Tag sechs im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen.
5. An Tag sechs wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten entnommen und die Platten mit eiskaltem PBS ausgespült (um noch haftende Zellen möglichst zu lösen).
6. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und einmalig in kaltem PBS gewaschen (bei 300g).

Vd2⁺ nach Inkubation mit dem Pan-MHC-II-Antikörper

Für die Zellkulturen mit dem Pan-MHC-II-Antikörper (HLA-DR, -DP und DQ-Antikörper) wurde unmittelbar vor der Zugabe des HMB-PP der Antikörper bzw. dessen Isotyp (Maus IgG_{2a}K-Isotypkontrolle) dazugegeben.

Die Kulturbedingungen im Einzelnen:

1. PBMCs mit 3µg/ml oder 1µg/ml Pan-MHC-II-Antikörper im Vergleich zu PBMCs mit 3µg/ml oder 1µg/ml Isotypkontrolle und im Vergleich zur Positiv-/Negativkontrolle (PBMCs ohne Antikörper/Isotyp mit HMB-PP (Positivkontrolle) bzw. ohne HMB-PP (Negativkontrolle))
2. Isolierte Vd2⁺-Zellen mit isolierten MHC-II⁺-Zellen mit 3µg/ml Pan-MHC-II-Antikörper im Vergleich zu Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁺-Zellen mit 3µg/ml Isotypkontrolle und im Vergleich zur Positivkontrolle (Vd2⁺-Zellen + MHC-II⁺-Zellen ohne Antikörper/Isotypkontrolle)

Vorgehensweise:

Für 1.:

1. PBMCs wurden gewonnen und in Vd2-Medium aufgenommen, bei einer Konzentration von 1 x 10⁶ Zellen/ml. Das Medium wurde unmittelbar vor Verwendung mit 100IU/ml IL-2 versetzt.
2. Die Zellsuspension wurde in sechs volumengleiche Teile aufgeteilt und in 5ml-Falconröhrchen aufgenommen.
3. In je ein Röhrchen wurden 1µg/ml Pan-MHC-II-Antikörper, 1µg/ml Isotypkontrolle, 3µg/ml Pan-MHC-II-Antikörper oder 3µg/ml Isotypkontrolle dazugegeben.

4. Anschließend wurden alle sechs Röhrchen für eine Stunde verschlossen im Kühlschrank (4°C) inkubiert.
5. Nach der Inkubation wurde zu den vier Röhrchen mit Antikörper bzw. dessen Isotyp sowie zu der Positivkontrolle 100nmol/l HMB-PP gegeben.
6. Anschließend wurden die sechs Röhrchen auf je zwei Vertiefungen einer rundbödigen 96-Well-Zellkulturplatte aufgeteilt (200µl pro Vertiefung) und bis Tag sechs im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen.
7. Die Negativkontrolle waren dabei die PBMCs ohne Antikörper, ohne Isotyp und ohne HMB-PP.
8. Am Tag sechs wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten entnommen und die Platten mit eiskaltem PBS ausgespült (um noch haftende Zellen möglichst zu lösen).
9. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und einmalig in kaltem PBS gewaschen (bei 300g).

Für 2.:

1. Volumengleiche Anteile der einzusetzenden Vd2⁺-Zellsuspension und der MHC-II⁺-Zellsuspension wurden in 5ml-Falconröhrchen vermengt (z.B. 2ml Vd2-Zellsuspension mit 2ml MHC-II-Zellsuspension).
2. Die Zellsuspension wurde in drei Fraktionen aufgeteilt. In je ein Röhrchen wurden 3µg/ml Pan-MHC-II-Antikörper oder 3µg/ml Isotypkontrolle dazugegeben.
3. Anschließend wurden alle drei Röhrchen für eine Stunde verschlossen im Kühlschrank (4°C) inkubiert.
4. Nach der Inkubation wurden in alle drei Röhrchen 100nmol/l HMB-PP gegeben.
5. Anschließend wurden die drei Röhrchen auf je zwei Vertiefungen einer rundbödigen 96-Well-Zellkulturplatte aufgeteilt (200µl pro Vertiefung) und bis Tag sechs im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen.
6. Am Tag sechs wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten entnommen und die Platten mit eiskaltem PBS ausgespült (um noch haftende Zellen möglichst zu lösen).
7. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und einmalig in kaltem PBS gewaschen (bei 300g).

Aktivierung von CD4⁺-Zellen

Die Aktivierung von CD4⁺-Zellen erfolgte mit isolierten $\alpha\beta$ TCR⁺/CD4⁺- und gleichzeitig HLA-DR⁻-Zellen. Die Aktivierung erfolgte mittels plattengebundener CD3-Antikörper (purified CD3) und freier CD28-Antikörper (purified CD28) bei einer Inkubationszeit von sechs Tagen (modifiziertes Protokoll nach Mukherjee et al., Mukherjee et al. 2006).

Vorgehensweise:

1. Am Tag -1 wurde der CD3-Antikörper in PBS auf eine Endkonzentration von 10 μ g/ml verdünnt.
2. 100 μ l des verdünnten Antikörpers wurden in die Vertiefungen einer rundbödigen 96-Well-Zellkulturplatte gegeben und die Platte anschließend für 24 Stunden versiegelt im Kühlschrank inkubiert.
3. Am Tag null wurde dann die Antikörperlösung abpipettiert und unmittelbar 200 μ l T-Zell-Medium in jede Vertiefung gegeben.
4. Am Tag null wurden PBMCs gewonnen und CD4⁺-Zellen isoliert.
5. Nach der Isolation wurden die CD4⁺-Zellen in T-Zellmedium aufgenommen.
6. Anschließend wurden die Vertiefungen entleert und unmittelbar, bevor die Oberfläche der Vertiefung austrocknen konnte, 200 μ l Zellsuspension dazugegeben.
7. Nach Aufnahme in die jeweiligen Vertiefungen wurde CD28-Antikörper in einer Endkonzentration von 1 μ g/ml in die einzelnen Vertiefungen gegeben.
8. Für die Vergleichsprobe mit nicht-aktivierten CD4⁺-Zellen wurden CD4⁺-Zellen in Vertiefungen ohne CD3-Antikörper und ohne CD28-Antikörper aufgenommen.
9. Die Zellkulturplatte wurde anschließend bis Tag sechs im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen.
10. Am Tag sechs wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten entnommen und die Platten mit eiskaltem PBS ausgespült (um noch haftende Zellen möglichst zu lösen).
11. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und einmalig in kaltem PBS gewaschen (bei 300g).
12. Nach der Pelletierung wurden sowohl die aktivierten CD4⁺-Zellen als auch die nicht-aktivierten CD4⁺-Zellen in Vd2-Medium bei einer Konzentration von 0,8 x 10⁶ Zellen/ml resuspendiert.

Kokultivierung von CD8⁺-Zellen und CD1c⁺-Zellen

Die mit Hilfe des AutoMACS isolierten naiven CD8⁺-T-Zellen wurden mit CFSE markiert und anschließend mit allogenen CD1c⁺-Zellen kokultiviert. Die Kulturen wurden in den Mengenverhältnissen CD1c⁺:CD8 1:5 und 1:10 durchgeführt. Am Tag null wurden die Pan-MHC-II-Antikörper oder deren Isotyp dazugegeben. Die Kulturen wurden am Tag fünf beendet.

Die Kulturbedingungen im Einzelnen:

1. Naive CD8⁺-Zellen mit isolierten-CD1c⁺-Zellen mit 1µg/ml Pan-MHC-II-Antikörper im Vergleich zur naiven CD8⁺-Zellen mit isolierten CD1c⁺-Zellen mit 1µg/ml Isotypkontrolle
2. Naive CD8⁺-Zellen stimuliert durch CD3-Antikörper und CD28-Antikörper (Positivkontrolle)
3. Naive CD8⁺-Zellen ohne weiteren Zugaben (Negativkontrolle)

Vorgehensweise:

1. Die CD8⁺-Zellsuspension wurde in sechs Fraktionen aufgeteilt (1-6):
 - a. Zwei Fraktionen (1 und 2) wurden mit CD1c⁺-Zellen im Volumenverhältnis 1:5 vermengt (z.B. 1ml CD1c⁺-Zellsuspension mit 200µl CD8⁺-Zellsuspension).
 - b. Zwei weitere Fraktionen (3 und 4) wurden mit CD1c⁺-Zellen im Volumenverhältnis 1:10 vermengt (z.B. 1ml CD1c⁺-Zellsuspension mit 100µl CD8⁺-Zellsuspension).
 - c. Eine Fraktion ausschließlich bestehend aus naiven CD8⁺-Zellen (5) wurde mit 1µg/ml CD3-Antikörper und gleichzeitig 1µg/ml CD28-Antikörper stimuliert.
 - d. Die letzte Fraktion ausschließlich bestehend aus naiven CD8⁺ Zellen (6) wurde ohne weitere Zugaben weiter verarbeitet.
2. Zu den Fraktionen eins und drei wurde 1µg/ml Pan-MHC-II-Antikörper gegeben.
3. Zu den Fraktionen zwei und vier wurde 1µg/ml Isotypkontrolle gegeben.
4. Anschließend wurden alle sechs Fraktionen in eine rundbödiges 96-Well-Zellkulturplatte verteilt und für fünf Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) belassen.
5. Am Tag fünf wurden die Zellen aus den Zellkulturplatten entnommen und die Platten mit eiskaltem PBS ausgespült (um noch haftende Zellen möglichst zu lösen).

6. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und einmalig in kaltem PBS gewaschen (bei 300g).

Auswertung

Die Auswertung der Zellkulturen erfolgte nach der jeweiligen Kulturdauer. Nach Ende der Kultivierung erfolgte eine manuelle Zellzahlbestimmung. Mit der restlichen Probe wurden durchflusszytometrisch die gewünschten Messungen durchgeführt.

Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrie wurde bereits bei der Zellseparation mittels Durchflusszytometrie ausführlich erläutert. Für alle durchflusszytometrische Messungen wurde FACSCanto II eingesetzt.

Vorgehensweise:

1. Die zu untersuchenden Zellen wurden in eiskaltem PBS gelöst. Die Zelldichte betrug dabei 1×10^6 Zellen/ml. Die Zellzahl wurde zuvor automatisch (wenn initial viele Zellen und eine hohe Zelldichte vorlagen, z.B. bei Messungen aus PBMCs) mittels Sysmex oder manuell (bei wenigen Zellen oder geringer Zelldichte) bestimmt. Dies war der Fall bei Auswertung nach Zellseparation oder nach Zellkultur.
2. Die Zellsuspension wurde in die für das jeweilige Experiment benötigten Fraktionen aufgeteilt.
3. Antikörper bzw. Isotyp wurde hinzugegeben, das Röhrchen geschwenkt und anschließend auf Eis im Dunkeln für 30 Minuten gestellt. (In unseren Experimenten wurden pro 100µl Zellsuspension 4µl konjugierte Antikörper eingesetzt.)
4. Die Inkubation wurde beendet und überschüssige Antikörper abgewaschen. (Die jeweiligen Röhrchen wurden mit eiskaltem PBS aufgefüllt und anschließend 5 Minuten bei 1600 Umdrehungen/Minute in der Biofuge-Primo-Zentrifuge pelletiert.)
5. Nach dem Waschgang wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in eiskaltem PBS entsprechend dem Volumen vor der Färbung gelöst.
6. Bis zur Messung bzw. Zellseparation wurden die Zellen auf Eis im Dunkeln aufbewahrt.
7. FACSCanto II wurde gem. Herstellerangaben kalibriert und die Durchflusszytometrie wurde durchgeführt.

Zellzahlbestimmung

Für Zellproben mit entweder wenigen Zellen insgesamt (z.B. Vd2⁺-Zellen nach Isolation) oder einer niedrigen Dichte der Zellen erfolgte eine manuelle Bestimmung der Zellzahl. Dabei wurde ein definiertes Volumen der Zellsuspension in ein definiertes Volumen Trypanblau aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl in der Zählkammer bestimmt. Dabei wurden Zellen, die intrazellulär blau angefärbt waren, ausgelassen. Diese entsprechen Zellen ohne intakte Zellmembran und damit nicht vitalen Zellen.

Bei hoher Zelldichte und insgesamt vielen verfügbaren Zielzellen wurde die Zellzahlbestimmung automatisch durchgeführt. Hierfür wurde bei sehr hoher Zelldichte ein definiertes Volumen der Zellsuspension in einer definierten Menge PBS verdünnt und die Gesamtzellzahl anschließend mit dem Sysmex KX-21N bestimmt. Bei niedrigerer Zelldichte wurde die Zelldichte in einer unverdünnten Probe bestimmt.

Statistik

Dargestellt werden die Mittelwerte und Standardmessfehler. Die statistischen Analysen wurden mit Prism 5.02 und Matlab 14a durchgeführt. Mittelwertsvergleiche wurden mit dem zweiseitigen nichtparametrischen Mann-Whitney-U-Test oder Friedmans ANOVA analysiert. Bei dem Einsatz von Friedmans ANOVA wurde anschließend für multiples Testen korrigiert. Ein Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet.

3. Ergebnisse

HMB-PP beeinflusst nicht die Ausprägung von HLA-DR, CD40, CD83 oder CD86 an der Oberfläche von MoDC

Monozyten lassen sich durch Stimulation (IL-4 und GM-CSF) in dendritischen Zellen (*monocytic derived dendritic cells, MoDC*) *in vitro* differenzieren. Nach Aktivierung durch IL-4 und GM-CSF wurden die Zellen über fünf Tage im Brutschrank kultiviert. Wir inkubierten am Tag null des Experiments die Monozyten zusätzlich mit HMB-PP, um einen eventuellen Einfluss des HMB-PPs auf den Reifeprozess der MoDCs festzustellen (Surrogatmarker: HLA-DR-, CD40-, CD83- und CD86-Expression). Die Ausprägung der Expression von CD40, CD83, CD86 und HLA-DR wurde durch die Zugabe von HMB-PP zu Beginn der Kultur nicht signifikant beeinflusst (siehe Abbildung 8). Bei großer Differenz der Messwerte in Abhängigkeit vom Spender (siehe die relativ große Standardabweichung), wurden die Daten mittels Friedmans ANOVA analysiert und für multiples Testen korrigiert. Dabei zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Einsatz von HMB-PP und der Ausprägung der unterschiedlichen Reifemarker.

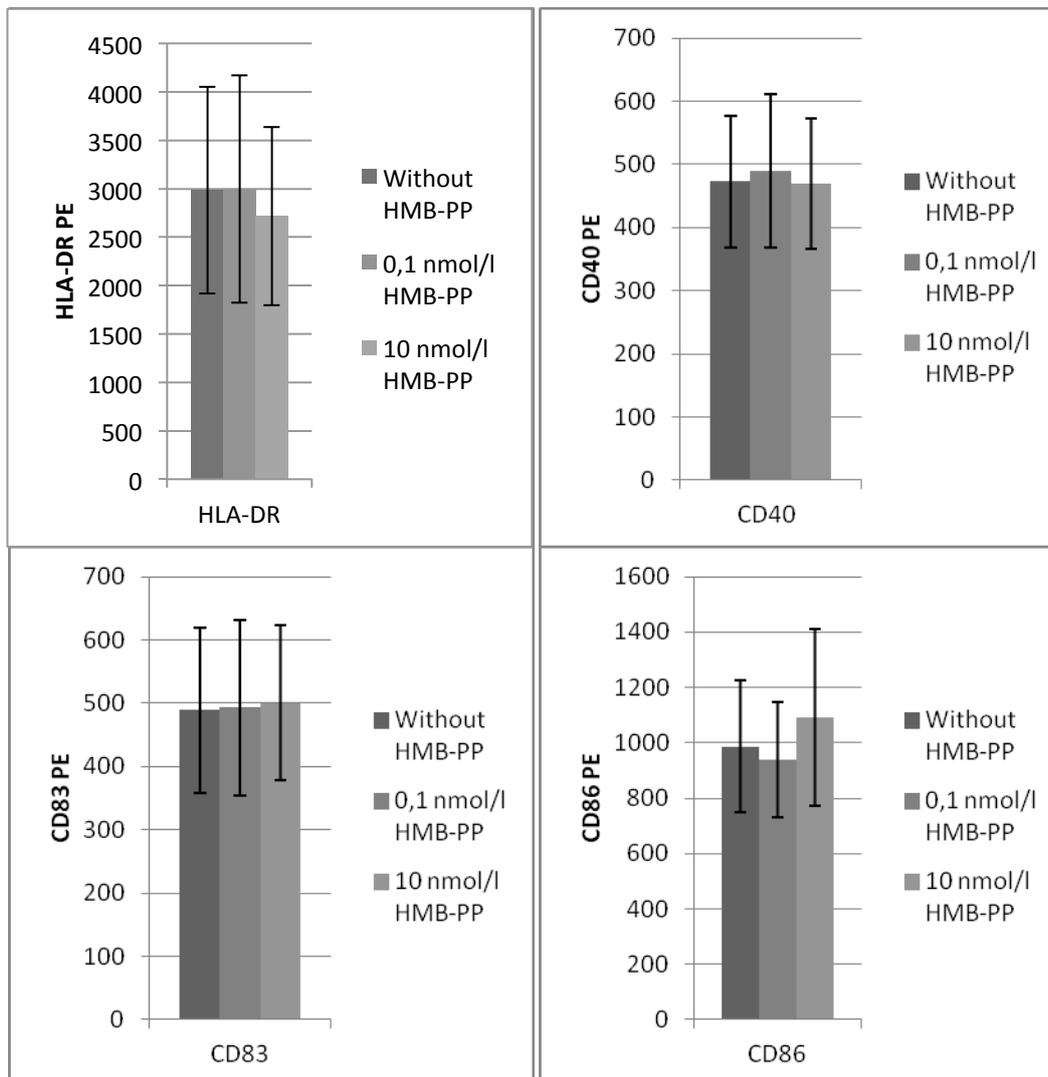


Abbildung 8: HMB-PP verändert die Expression der Reifemarker an der Oberfläche von MoDCs nicht

Die Zugabe von HMB-PP am Tag null beeinflusste die mediane Fluoreszenzintensität als Korrelat für die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle nicht. Gezeigt werden die durchschnittliche Fluoreszenzintensitäten \pm Standardabweichung für die Marker HLA-DR, CD40, CD83 und CD86 im PE-Kanal (578nm Wellenlänge der Lichtemission nach Anregung durch 488nm Argonlaser) (n=4).

MHC-II⁺-Zellen induzieren eine Vd2-Proliferation in Anwesenheit von HMB-PP.

In früheren Untersuchungen (Morita et al. 1995) wurde berichtet, dass fast alle humanen Zellen in der Lage sind, eine in-vitro-Proliferation der Vd2⁺-Zellen nach

Stimulation durch Phosphoantigene auszulösen. Diese frühe Studie wurde jedoch mit Vd2-Zelllinien durchgeführt, und nicht mit primären Zellen. Eine Überprüfung der Ergebnisse mit primären, unmittelbar zuvor isolierten Vd2⁺-Zellen aus humanem peripherem Blut liegt bisher nicht vor. Wir isolierten zunächst Vd2⁺-Zellen hochrein (Reinheit der Zellen wurde anschließend überprüft und lag stets bei über 99%, siehe Abbildung 9) und kultivierten sie in einem fixen Verhältnis zu den MHC-II⁺- oder MHC-II⁻-Zellen. Im aktuellen Experiment setzten wir 20000 Vd2⁺-Zellen mit 80000 MHC-II⁺- oder MHC-II⁻-Zellen ein. Am Tag sechs der Inkubation konnten wir nachweisen, dass eine Proliferation der Vd2⁺-Zellen als Antwort auf eine Stimulation mit HMB-PP am Tag null nur in Anwesenheit der MHC-II⁺-Zellen auftritt (siehe Abbildung 10). Gemessen wurde dabei die absolute Zahl an vitalen Vd2⁺-Zellen zu Beginn und Ende der Kokultur.

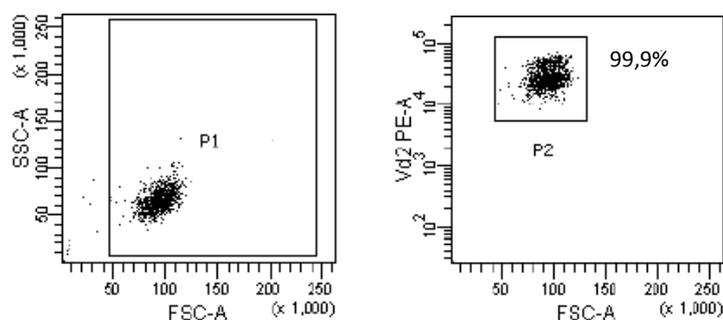


Abbildung 9: Vd2-Isolation. Exemplarisches Punktdiagramm zur Reinheitskontrolle

Nach der Isolation mi FACSAria III erfolgte einen Reinheitskontrolle der aufgereinigten Zellpopulation (SSC-A: sideward scatter, FSC-A: forward scatter, Vd2-PE-A: Fluoreszenzintensität im PE-Kanal).

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

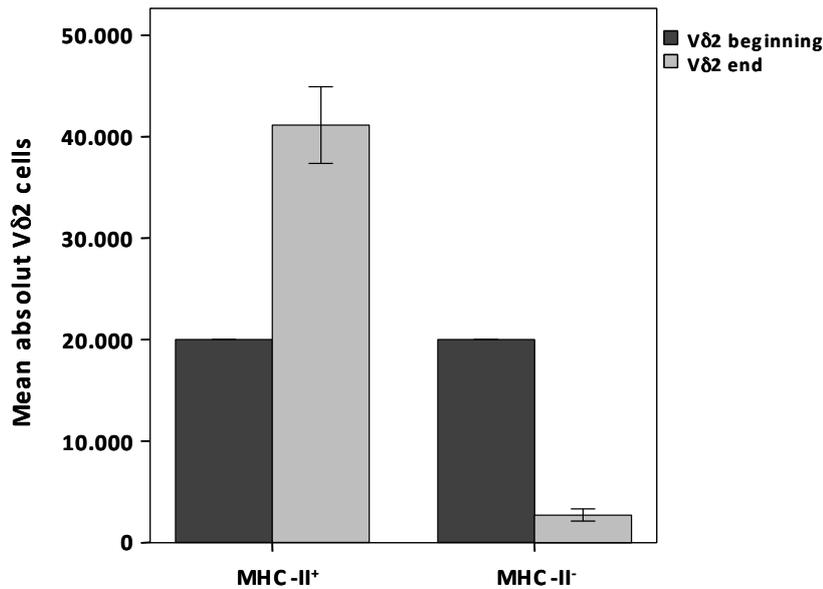


Abbildung 10: MHC-II⁺-Zellen sind für eine Expansion von Vδ2⁺-Zellen in Anwesenheit von HMB-PP erforderlich.

Vδ2⁺-Zellen zeigen eine signifikant höhere Expansion in Kokultur mit MHC-II⁺-Zellen im Vergleich zur Kokultur mit MHC-II⁻-Zellen (eingesetzt wurde der zweiseitige nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test; $p < 0,05$ wurde als signifikant erachtet). Dargestellt ist die absolute Anzahl Vδ2⁺-Zellen am Tag null (dunkelgrauer Balken) und am Tag sechs (hellgrauer Balken) nach Inkubation mit 100nmol/l HMB-PP in Kokultur mit MHC-II⁺- bzw. MHC-II⁻-Zellen. (Mittelwert ± Standardfehler, $n=4$). (MHC-II⁺: Kokultur mit MHC-II⁺-Zellen, MHC-II⁻-Zellen: Kokultur mit MHC-II⁻-Zellen, Vδ2 Beginning: Vδ2⁺-Zellen am Tag 0, Vδ2 End: Vδ2⁺-Zellen am Tag 6)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

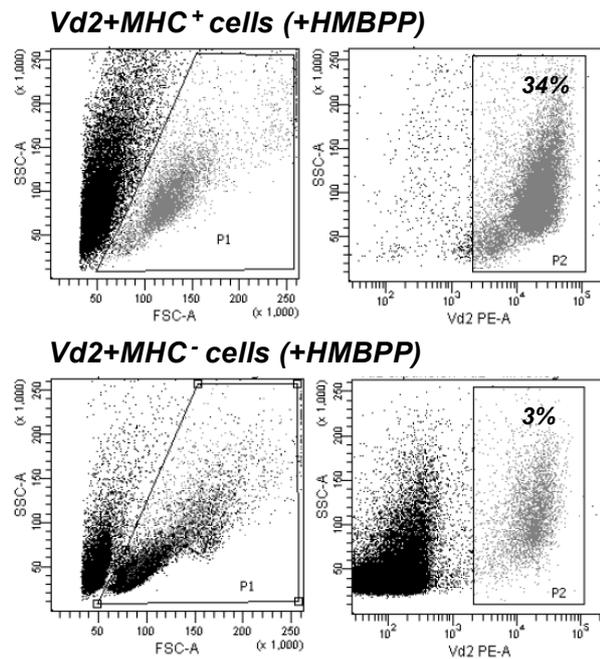


Abbildung 11: Vd2-Anteil nach Kokultur. Exemplarisches Punktdiagramm

Gezeigt wird der prozentuale Vd2⁺-Anteil der intakten Zellen. Messung an Tag sechs nach Inkubation mit HMB-PP und Kokultur mit entweder MHC-II⁺- (oberer Bildteil) oder MHC-II⁻ (unterer Bildteil) Zellen. (SSC-A: sideward scatter, FSC-A: forward scatter, Vd2-PE: Fluoreszenzintensität im PE-Kanal)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting V δ 2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

Isolierte CD4⁺- oder CD8⁺-Zellen können keine Vd2-Expansion auslösen

Die Gruppe der MHC-II⁻-Zellen, die eingesetzt wurden, bestehen aus mehreren Subpopulationen. Trotz der ersten Ergebnisse, die eine eindeutige Proliferation der Vd2⁺-Zellen nach Kokultur mit MHC-II⁺-Zellen und keine Proliferation nach Kokultur mit MHC-II⁻-Zellen zeigten, wollten wir einzelne Subpopulationen der MHC-II⁻-Gruppe untersuchen. Vd2⁺-Zellen wurden in Kokulturen mit CD4⁺-Zellen, CD8⁺-Zellen oder in Monokulturen durch HMB-PP stimuliert. Nach der Inkubation wurde die absolute Zahl an vitalen Vd2⁺-Zellen bestimmt. Obwohl wir durch den Einsatz von rundbödigen Zellkulturplatten eine Zell-Zell-Interaktion sicherstellten, kam es weder nach Kokultur

mit den CD4⁺- noch mit den CD8⁺-Zellen zu einer messbaren Proliferation der Vd2⁺-Zellen (siehe Abbildung 12). In einer Monokultur bestehend aus Vd2⁺-Zellen trat ebenfalls keine Proliferation nach HMB-PP-Stimulation auf.

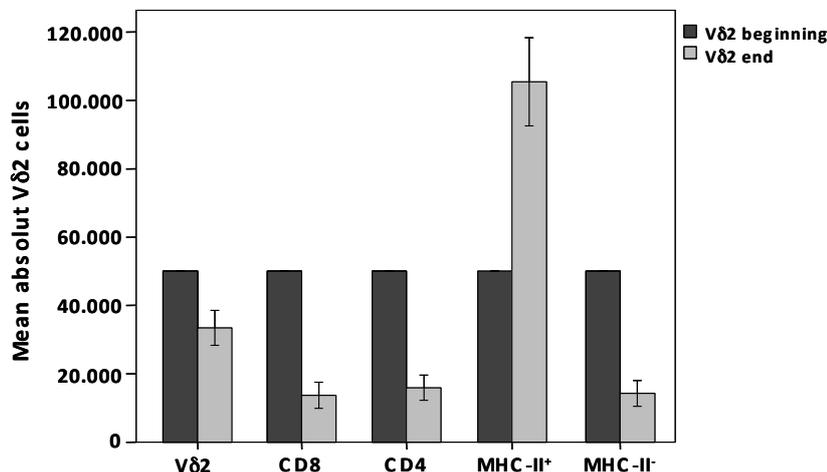


Abbildung 12: Isolierte CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen induzieren keine Expansion von Vd2⁺-Zellen in Anwesenheit von HMB-PP

Hochrein isolierte αβ-T-Zellen (Subpopulationen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen wurden eingesetzt) sind nicht in der Lage, eine Vd2-Expansion nach HMB-PP Stimulation auszulösen. Nur die Kokultur mit MHC-II-positiven Zellen führt zur Vd2-Expansion. (Mittelwert±Standardfehler, n=4) (Vδ2: Monokultur, CD8: Kokultur mit CD8⁺-Zellen, CD4: Kokultur mit CD4⁺-Zellen, MHC-II⁺: Kokultur mit MHC-II⁺-Zellen (Positivkontrolle), MHC-II⁻-Zellen: Kokultur mit MHC-II⁻-Zellen (Negativkontrolle), Vδ2 Beginning: Vd2⁺-Zellen am Tag 0, Vδ2 End: Vd2⁺-Zellen am Tag 6)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

Variable Kapazität der MHC-II⁺-Zelllinien in der Expansion von Vd2⁺-Zellen

Bisher untersuchten wir autologe Zellen, die auf natürliche Weise ein sehr hohes Maß an MHC-II-Expression zeigen. Um die Rolle des MHC-II näher einzugrenzen, wollten wir untersuchen, inwiefern Zelllinien mit unterschiedlich ausgeprägter MHC-II-

Expression in der Lage sind, eine Vd2-Expansion auszulösen. Untersucht wurde zunächst die MHC-II-Expression der unterschiedlichen Zelllinien (Siehe Abbildung 13). Daudi- und Raji-Zelllinien zeigten ein sehr hohes Maß an MHC-II-Expression (>90% der Zellen positiv für MHC-II in der Durchflusszytometrie). THP-1 ($\leq 10\%$) und U937 (<2%) zeigten eine geringe bis nicht messbare MHC-II-Expression. Zusätzlich wurden die MHC-II-negativen KG-1a und Meg-01 (beides Zelllinien, die nicht von professionellen antigenpräsentierenden Zellen stammen) Zelllinien untersucht. Die Zelllinien wurden über sechs Tage mit Vd2⁺-Zellen kokultiviert. Nach Stimulation durch HMB-PP am Tag null konnte am Tag sechs der Kulturen lediglich in der Vd2/Daudi-Kokultur eine Proliferation der Vd2⁺-Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 14).

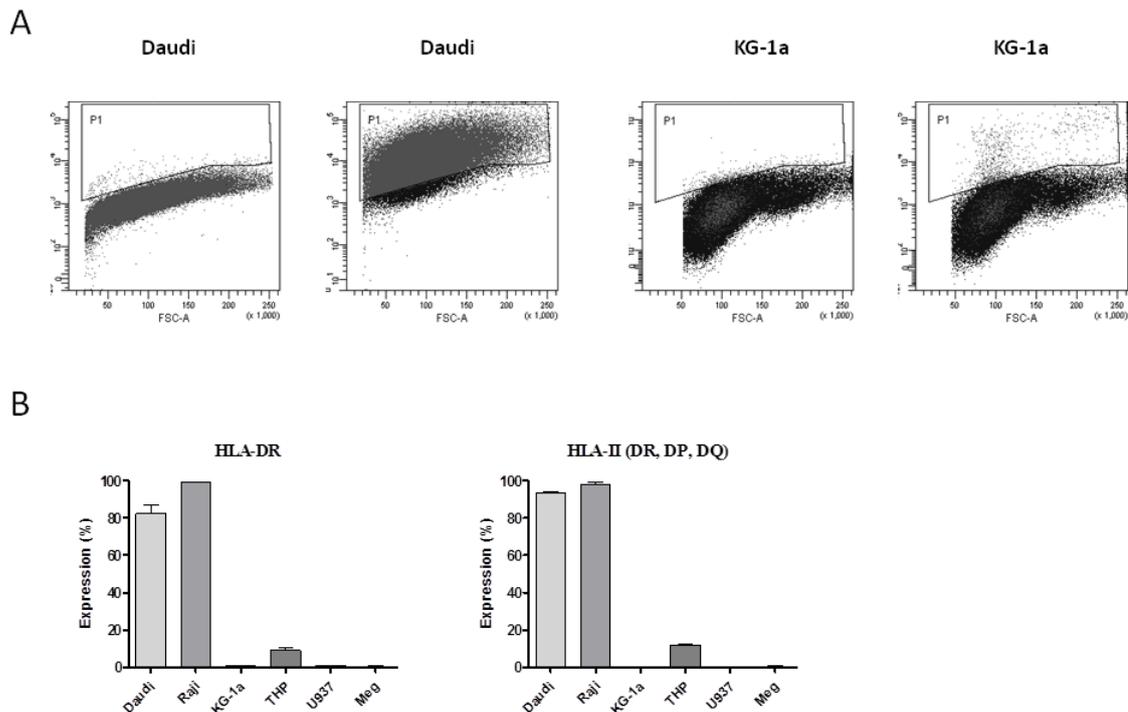


Abbildung 13: MHC-II-Expression der Zelllinien

Die eingesetzten Zelllinien Daudi, Raji, KG-1a, THP-1, U937, und Meg-01 wurden mittels Durchflusszytometrie auf die Expression von MHC-II untersucht. Die Färbung erfolgte mit HLA-DR-FITC, und zum Vergleich auch mit HLA-II-FITC (HLA-DR, -DP und DQ). Abbildung A zeigt exemplarische Punktdiagramme für Daudi und KG-1a (HLA-II FITC im Vergleich zur Isotypkontrolle). In Abbildung B werden Balkendiagramme gezeigt für den prozentualen Anteil der Zellen, die eine HLA-DR- bzw. HLA-II-Expression haben (Mittelwert \pm Standardfehler, $n=3$).

Quelle: *Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting V δ 2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate* (Soriano-Sarabia et al, *Journal of Immunology* December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

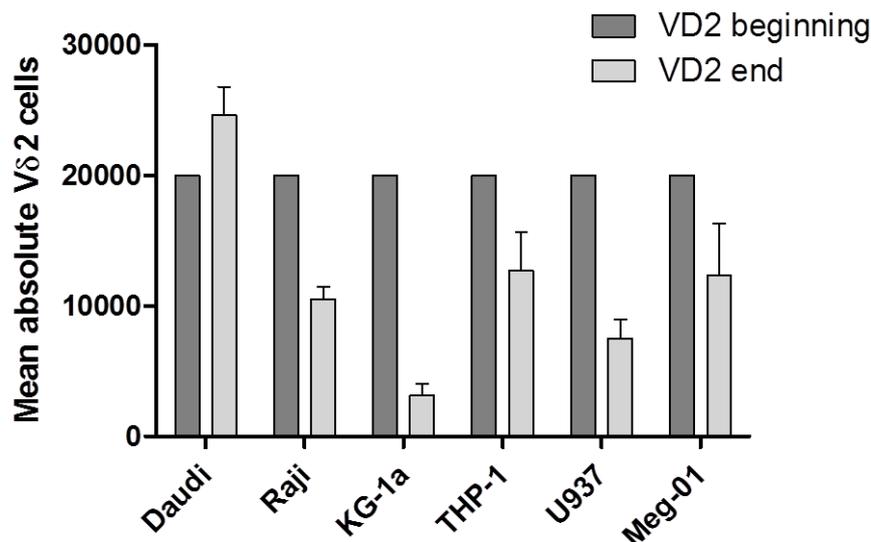


Abbildung 14: Nur Daudizellen können eine V δ 2-Expansion auslösen

Trotz hoher MHC-II-Expression und gesichertem Zell-Zell-Kontakt konnte lediglich in den Kokulturen mit Daudi-Zellen eine signifikante Proliferation der V δ 2⁺-Zellen festgestellt werden nach HMB-PP-Stimulation.

(Eingesetzt wurde der zweiseitige nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test.) Verglichen wurde dabei die V δ 2-Zellzahl an Tag null mit der an Tag 6. Als signifikant wurde $p < 0,05$ erachtet. Raji-Zellen, die eine noch höhere MHC-II-Expression zeigten, konnten keine Proliferation der V δ 2-Zellen vermitteln. Gezeigt wird die durchschnittliche absolute Anzahl an V δ 2⁺-Zellen an Tag null (dunkelgrauer Balken) und an Tag sechs (hellgrauer Balken) in Kokultur mit den entsprechenden Zelllinien (Mittelwert \pm Standardfehler, $n=7$). (Daudi: Kokultur mit Daudi-Zellen, Raji: Kokultur mit Raji-Zellen, KG-1a: Kokultur mit KG-1a-Zellen, THP-1: Kokultur mit THP-1-Zellen, U937: Kokultur mit U937-Zellen, Meg-01: Kokultur mit Meg-01-Zellen, V δ 2 Beginning: V δ 2⁺-Zellen am Tag 0, V δ 2 End: V δ 2⁺-Zellen am Tag 6)

Quelle: *Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting V δ 2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate* (Soriano-Sarabia et al, *Journal of Immunology* December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

MHC-II-Blockade kann die Vd2-Expansion verhindern

Um die Rolle des MHC-II deutlich eingrenzen zu können, wurden zunächst Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁺-Zellen kokultiviert und vor Stimulierung durch HMB-PP ein MHC-II-Antikörper (Anti-Human Anti-HLA-DR, -DP, -DQ der Maus) eingesetzt. Die Kultivierung mit Zugabe des MHC-II-Antikörpers führte im Vergleich mit der Positivkontrolle zu einer signifikant reduzierten Expansion der Vd2⁺-Zellen (Abbildung 15). Auch im Vergleich zu der entsprechenden Isotypkontrolle des Antikörpers zeigte sich dieser Effekt. Ein unspezifischer Effekt i.S. einer reduzierten Proliferation der Vd2⁺-Zellen in der Isotypkontrolle im Vergleich zu der Positivkontrolle zeigte sich jedoch zusätzlich.

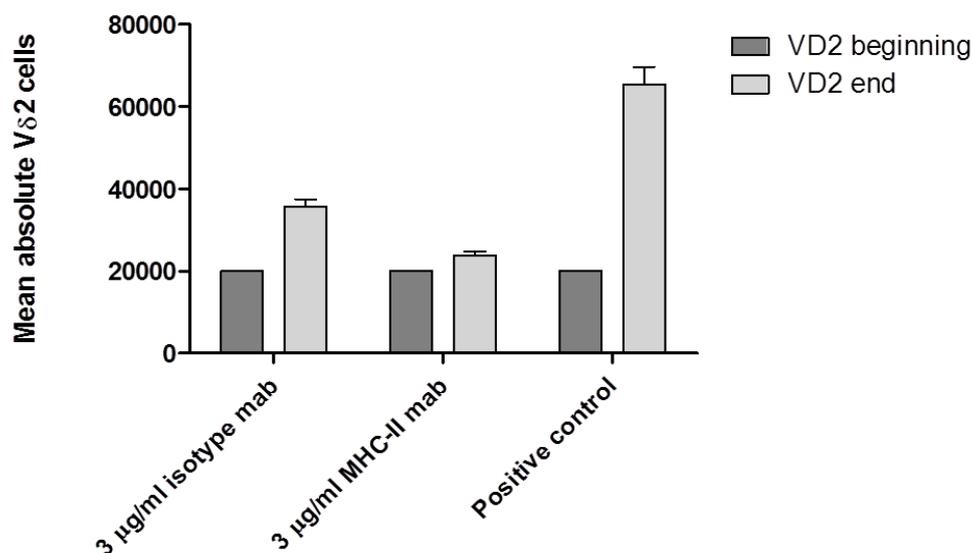


Abbildung 15: Hemmung der Vd2-Expansion durch MHC-II-Antikörper

20000 Vd2⁺-Zellen wurden zusammen mit 80000 MHC-II⁺-Zellen über sechs Tage kokultiviert. Am Tag Null wurden die Zellkulturen mit einem MHC-II-Antikörper oder dessen Isotyp behandelt. Unter beiden Bedingungen trat eine geringere Vd2-Proliferation auf. Es zeigte sich jedoch eine signifikant geringere Vd2-Zellzahl nach vorheriger Inkubation mit dem MHC-II-Antikörper im Vergleich zur Inkubation mit dem Isotyp ($p < 0,05$). Eingesetzt wurde der zweiseitige nichtparametrische Mann-

Whitney-U-Test. Gezeigt wird die durchschnittliche absolute Anzahl an Vd2⁺-Zellen an Tag null (dunkelgrauer Balken) und an Tag sechs (hellgrauer Balken) nach vorherigem Antiörpereinsatz und anschließender Stimulierung durch HMB-PP (Mittelwert±Standardfehler, n=8). (3µg/ml isotyp mab: Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁺-Zellen kokultiviert nach Inkubation mit 3µg/ml Isotypkontrolle, 3µg/ml MHC-II mab: Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁺-Zellen kokultiviert nach Inkubation mit 3µg/ml MHC-II-Antikörper, Positive control: Vd2⁺-Zellen in Kokultur mit MHC-II⁺-Zellen ohne Zugabe eines Antikörpers, Vδ2 Beginning: Vd2⁺-Zellen am Tag 0, Vδ2 End: Vd2⁺-Zellen am Tag 6)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

In PBMCs ohne vorherigem Antikörperkontakt erfolgte eine Inkubation mit den MHC-II-Antikörpern bzw. deren Isotyp über eine Stunde in jeweils zwei unterschiedlichen Konzentrationen. Nach Stimulation durch HMB-PP und anschließender Kultivierung über sechs Tage konnte eine deutlich geringere Proliferation der Vd2⁺-Zellen nach Inkubation mit dem MHC-II-Antikörper im Vergleich zur Isotypkontrolle festgestellt werden. Es zeigte sich aber auch erneut, dass die Isotypkontrolle konzentrationskorrelierend zu einer niedrigeren Vd2-Proliferation im Vergleich zur Positivkontrolle führen kann (Siehe Abbildung 16). Bei einer MHC-II-Antikörperkonzentration von 1µg/ml tritt eine signifikant niedrigere Proliferation der Vd2-Zellen im Vergleich zur Isotypkontrolle auf. Gleichzeitig besteht kein Unterschied der Vd2-Proliferation, wenn die Positivkontrolle mit der Isotypkontrolle verglichen wird.

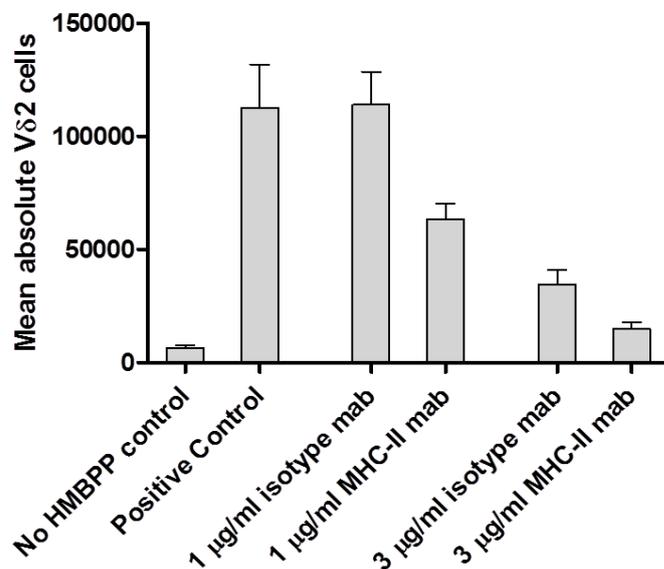


Abbildung 16: Vd2-Proliferation in PBMCs wird durch MHC-II-Antikörper unterbunden

PBMCs wurden an Tag null mit MHC-II-Antikörper bzw. dessen Isotyp in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Vd2⁺-Zellen durch HMB-PP. Es zeigt sich eine signifikant geringere Expansion der Vd2⁺-Zellen nach vorheriger Inkubation mit dem MHC-II-Antikörper. Verglichen wurde 1 µg/ml Isotyp mab mit Positive Control ($p > 0,05$), 1 µg/ml MHC-II mab mit 1 µg/ml isotype mab ($p < 0,05$), 3 µg/ml isotype mab mit Positive Control ($p < 0,05$) und 3 µg/ml MHC-II mab mit 3 µg/ml isotyp mab ($p < 0,05$). Eingesetzt wurde der zweiseitige nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test. Die Balken stellen die absolute Anzahl an Vd2-positiven Zellen an Tag sechs dar (Mittelwert ± Standardmessfehler, $n=8$). (1 µg/ml isotype mab: PBMCs mit 1 µg/ml Isotypkontrolle, 1 µg/ml MHC-II mab: PBMCs mit 1 µg/ml MHC-II-Antikörper, 3 µg/ml isotype mab: PBMCs mit 3 µg/ml Isotypkontrolle, 3 µg/ml MHC-II mab: PBMCs mit 3 µg/ml MHC-II-Antikörper, no HMBPP control: PBMCs ohne Zugabe von Antikörper und ohne HMB-PP-Stimulation (Negativkontrolle), Positive Control: PBMCs durch HMB-PP stimuliert ohne vorherige Zugabe von Antikörper (Positivkontrolle)).

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

Aktivierte CD4⁺-Zellen mit MHC-II-Expression können keine Vd2-Expansion auslösen

CD4⁺-Zellen sind, wie bereits gezeigt, nicht in der Lage, eine HMB-PP-induzierte Vd2-Proliferation zu vermitteln (siehe Abbildung 12). CD4⁺-Zellen zeigen in aller Regel keine bis eine sehr geringe MHC-II-Expression. Durch CD3/CD28-Aktivierung zuvor MHC-II-negativer CD4⁺-Zellen gelang es uns jedoch, eine MHC-II-Expression auszulösen (siehe Abbildung 17 A und B).

A

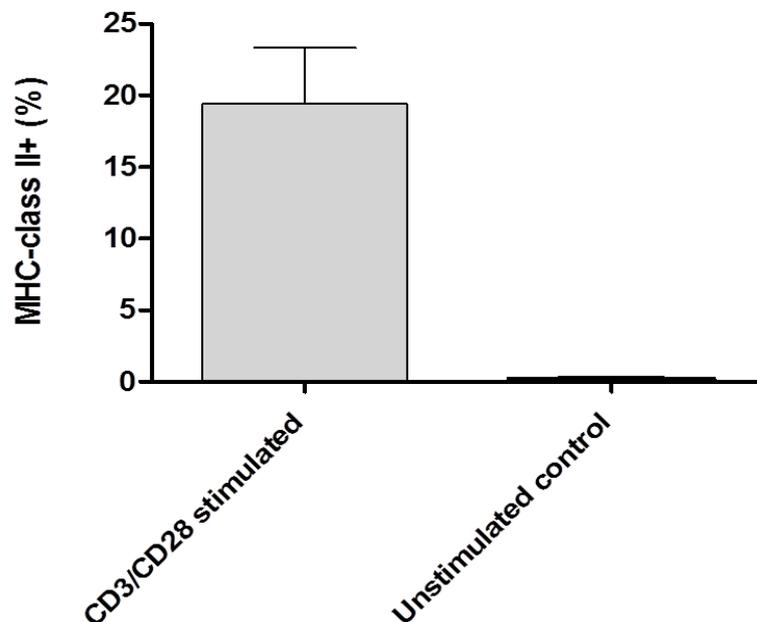


Abbildung 17A: MHC-II-Expression an stimulierten und nicht-stimulierten CD4⁺-Zellen

Nach der Isolation von CD4⁺- und gleichzeitig HLA-DR⁻-Zellen wurden diese Zellen durch die Stimulation von CD3 und CD28 aktiviert. Nach sechs Tagen zeigten die Zellen in der durchflusszytometrischen Auswertung eine deutliche MHC-II-Expression bei etwa 20% der Zellen. Gezeigt wird der durchschnittliche prozentuale Anteil der CD4⁺-Zellen, die eine MHC-II-Expression zeigen (Mittelwert±Standardmessfehler, n=3). (CD3/CD28 stimulated: CD4⁺-Zellen, die an Tag null durch CD3 und CD28 aktiviert wurden, Unstimulated control: CD4⁺-Zellen, die ohne weitere Aktivierung kultiviert wurden)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

B

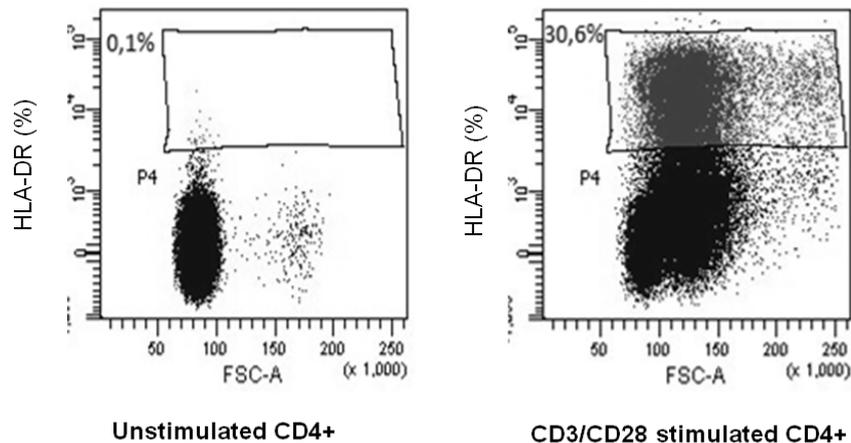


Abbildung 17B: Exemplarisches Punktdiagramm für die MHC-II-Expression an CD4⁺-Zellen

An Tag sechs nach Beginn der Kultivierung wurde einen kleiner Anteil der CD4⁺-Zellen entnommen und auf die Expression von HLA-DR (als Maß für die MHC-II-Expression) per Durchflusszytometrie untersucht. Die Abbildung zeigt zwei repräsentative Punktdiagramme eines Spenders. Links werden unstimulierte (ohne CD3 und CD28) Zellen an Tag sechs gezeigt, rechts im Vergleich die HLA-DR-Expression der CD3/CD28-aktivierten CD4⁺-Zellen. Erwartungsgemäß zeigen sich die aktivierten Zellen auch größer, erkennbar an dem deutlich höheren „forward scatter“ (FSC-A). (CD3/CD28 stimulated: CD4⁺-Zellen, die am Tag null durch CD3 und CD28 aktiviert wurden, Unstimulated control: CD4⁺-Zellen, die ohne weitere Aktivierung kultiviert wurden)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

In einem zweiten Schritt wurden Vδ2⁺-Zellen vom selben Blutspender an Tag sechs der CD4-Kultur isoliert und zusammen mit entweder CD3/CD28-stimulierten CD4⁺-Zellen oder nicht-stimulierten CD4⁺-Zellen kokultiviert. Hier zeigte sich, dass eine

Proliferation der Vd2⁺-Zellen nach HMB-PP-Stimulation durch die MHC-II⁺-CD4⁺-Zellen nicht vermittelt werden konnte (siehe Abbildung 18).

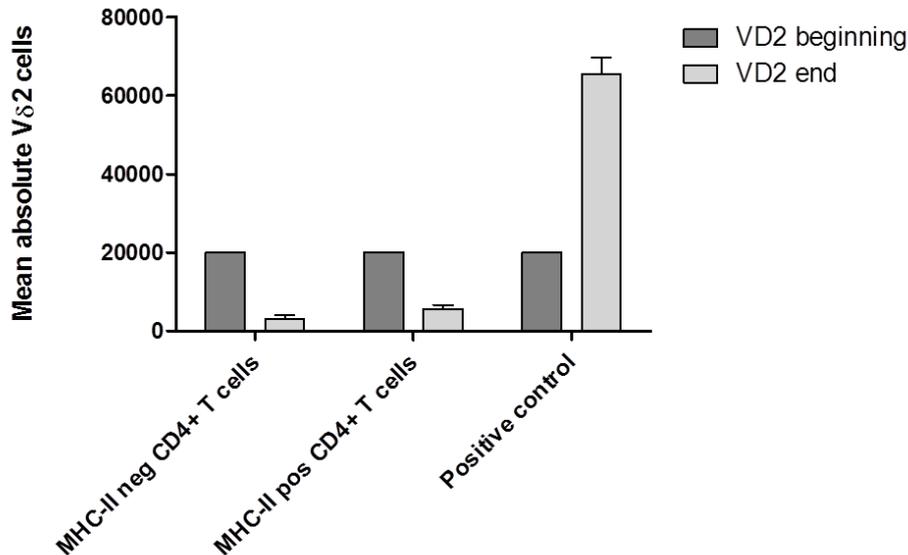


Abbildung 18: Nur primär MHC-II⁺-Zellen induzieren eine Vd2-Expansion

Isolierte Vd2⁺-Zellen wurden mit autologen CD4⁺-Zellen kokultiviert und mit HMB-PP inkubiert. CD4⁺-Zellen, die sekundär eine MHC-II-Expression zeigen, lösen keine Expansion der Vd2⁺-Zellen aus. Zum Vergleich wurde eine Positivkontrolle (Vd2⁺-Zellen in Kokultur mit primär MHC-II⁺-Zellen) mitgeführt. In allen Bedingungen wurden 20000 Vd2⁺-Zellen mit 80000 akzessorischen Zellen kokultiviert. Gezeigt wird die durchschnittliche absolute Anzahl an Vd2⁺-Zellen an Tag null (dunkelgrauer Balken) und an Tag sechs (hellgrauer Balken) (Mittelwert±Standardfehler, n=6). (MHC-II neg CD4⁺ T cells: Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁻-CD4⁺-T-Zellen kokultiviert, MHC-II pos CD4⁺ T cells: Vd2⁺-Zellen mit MHC-II⁺-CD4⁺-T-Zellen kokultiviert, Positive control: Vd2⁺-Zellen mit primär MHC-II⁺-Zellen kokultiviert (Positivkontrolle), Vδ2 Beginning: Vd2⁺-Zellen an Tag 0, Vδ2 End: Vd2⁺-Zellen an Tag 6)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

MHC-II-Antikörper beeinflussen die Funktionalität der dendritischen Zellen nicht

Um überprüfen zu können, inwieweit die eingesetzten MHC-II-Antikörper im Blockierungsexperiment die generelle Funktion der dendritischen Zellen einschränken, wurde die Proliferation von CD8⁺-Zellen nach Kokultivierung mit dendritischen Zellen nach vorheriger Inkubation mit dem MHC-II-Antikörper überprüft. Naive CD8⁺-Zellen wurden mit CD1c⁺-Zellen (als professionelle antigenpräsentierende Zelle) kokultiviert. Am Tag null des Experiments wurden die naiven CD8⁺-Zellen mit CFSE gefärbt, um abschließend die Proliferation der CD8⁺-Zellen nachweisen zu können. Bevor die naiven CD8⁺-Zellen mit CD1c⁺-Zellen zusammengefügt wurden, wurden die CD1c⁺-Zellen mit dem MHC-II-Antikörper eine Stunde lang inkubiert. Nach fünf Tagen wurde der prozentuale Anteil der CD8⁺-Zellen, die mindestens eine Zellteilung hinter sich hatten, erfasst (siehe Abbildung 19 und 20). Es zeigte sich dabei, dass CD1c⁺ dendritische Zellen unabhängig von der Vorbehandlung mit MHC-II-Antikörper in der Lage waren, eine Proliferation der CD8⁺-Zellen auszulösen.

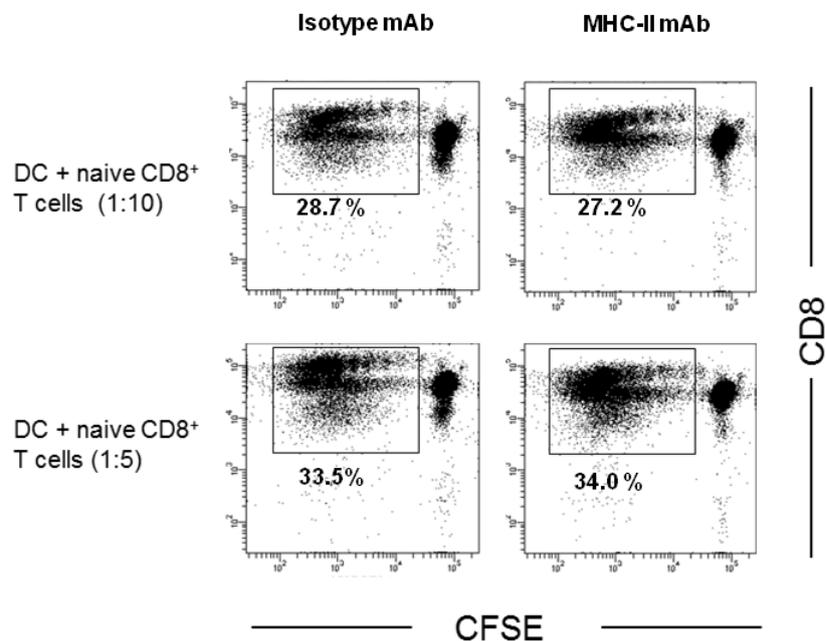


Abbildung 19: Exemplarisches Punktdiagramm für die Proliferation der CD8⁺-Zellen

In der Abbildung sind exemplarische Punktdiagramme zu sehen, die die Proliferation der CD8⁺-Zellen nach fünf Tagen in Kokultur mit dendritischen Zellen darstellen. Nach CFSE-Färbung an Tag null des Experiments. Links oben und links unten wird der prozentuale Anteil der CD8⁺-Zellen, die mindestens eine Zellteilung hinter sich haben, nach Kokultivierung mit dendritischen Zellen, die mit der Isotypkontrolle vorbehandelt wurden, dargestellt. Rechts oben und rechts unten sind die prozentualen Anteile der CD8⁺-Zellen, die mindestens eine Zellteilung hinter sich haben, nach Kokultivierung mit dendritischen Zellen, die mit dem MHC-II-Antikörper vorbehandelt wurden, zu sehen.

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting V δ 2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

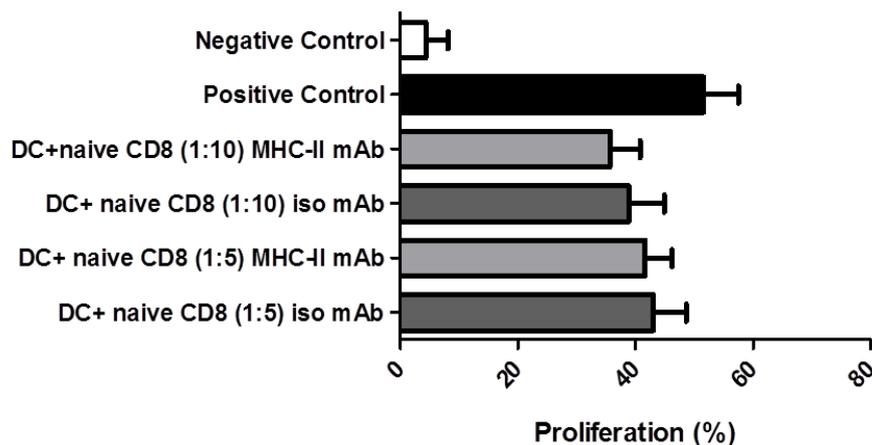


Abbildung 20: MHC-II-Antikörper führen nicht zu einer generellen Funktionseinschränkung der APCs

Nach fünf Tagen in Kokultur mit CD1c⁺-Zellen (allogene Zellen) zeigten die zuvor naiven CD8⁺-Zellen unabhängig von der Vorbehandlung mit MHC-II-Antikörper eine in etwa gleichbleibenden Proliferationsrate. Gezeigt wird der durchschnittliche prozentuale Anteil an CD8⁺-Zellen an Tag fünf, die mindestens einen Zellteilung hinter sich haben. Die hellgrauen Balken zeigen die Proliferation nach dem Einsatz von MHC-II-Antikörpern, die dunkelgrauen Balken zeigen die Proliferation nach dem Einsatz der Isotypkontrolle. Der weiße Balken zeigt die Negativkontrolle (naive CD8⁺-Zellen in Monokultur ohne weitere stimulierende Einflüsse). Der schwarze Balken zeigt die Positivkontrolle (CD8⁺-Zellen, die an Tag null durch CD3/CD28-Kostimulation aktiviert wurden und anschließend über fünf Tage in Monokultur gehalten wurden).
(Mittelwert±Standardfehler, n=3)

Quelle: Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting V δ 2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate (Soriano-Sarabia et al, Journal of Immunology December 1, 2012, 189 (11) 5212-5222). Siehe Erklärung Seite 82

4. Diskussion

Die Rolle des MHC-II bei der Expansion von Vd2⁺-Zellen

Es ist bekannt, dass Phosphoantigene in der Lage sind, Vd2⁺-Zellen zu aktivieren und zur Proliferation zu bringen. Viele unterschiedliche Vertreter der Phosphoantigene sind beschrieben worden (siehe z.B. Gober et al. 2003, oder Hintz et al. 2001). Die Phosphoantigene zeigen unterschiedliche Potenzen als Antigene der Vd2⁺-Zellen und der unmittelbar damit verbundenen Expansion der Vd2⁺-Zellen in vitro. Was bislang jedoch nicht oder nur schlecht beschrieben und verstanden worden ist, ist der Weg der Erkennung dieser zum Teil sehr flüchtigen Antigene. Als potentestes Phosphoantigen wird HMB-PP beschrieben (Hintz et al. 2001). Wir waren in der Lage, hochrein isolierte Vd2⁺-Zellen zu untersuchen und in Kokulturen mit ebenfalls hochrein isolierten Vertretern akzessorischer Zellen zu untersuchen. Unsere Daten zeigen, dass die akzessorischen Zellen primär MHC-II⁺ sein müssen, um eine Expansion der Vd2⁺-Zellen auszulösen. MHC-II⁻-Zellen waren nicht in der Lage, eine Vd2-Expansion nach HMB-PP-Inkubation auszulösen. CD4⁺-, CD8⁺- oder auch Vd2⁺-Zellen konnten das Phosphoantigen (auch nach sekundärer MHC-II-Induktion) nicht präsentieren, und entsprechend trat in den Kokulturen mit diesen Zellarten keine signifikante Expansion der Vd2⁺-Zellen auf.

MHC-II-Expression ist alleine aber nicht ausreichend für die Expansion der Vd2⁺-Zellen. Obwohl MHC-II⁺-Zellen nie eine Vd2-Expansion auszulösen vermochten, konnte nicht jede MHC-II⁺-Zelle eine Expansion auslösen. Zum Beispiel zeigen MHC-II⁺-Zelllinien eine variable Kapazität bei der Antigenerkennung und Expansion der Vd2⁺-Zellen. Des Weiteren konnten wir eine MHC-II-Expression an CD4⁺-Zellen auslösen, ohne dass diese anschließend eine Proliferation der Vd2⁺-nach sich gezogen hätte. An diesem Punkt wäre eine der möglichen Schlussfolgerungen, dass MHC-II keine direkte Rolle bei der Erkennung des Phosphoantigens spielt und lediglich als Marker für Zellen

dienen kann, die die Fähigkeit zur Antigenpräsentation besitzen. Nach Zugabe eines MHC-II-Antikörpers konnten wir jedoch die Expansion der Vd2⁺-Zellen nach der Inkubation mit HMB-PP deutlich reduzieren. Dabei hatte der MHC-II-Antikörper keinen allgemeinen hemmenden Effekt auf antigenpräsentierende Zellen. In unserem Kontrollexperiment waren CD1c⁺-Zellen noch in der Lage, eine Expansion von CD8⁺-Zellen auszulösen (CD1c⁺-Zellen aktivieren CD8⁺-T-Zellen über MHC I. Siehe z.B. Guermonprez et al. 2002). Auf einen direkten Einfluss des HMB-PPs auf dendritische Zellen haben wir ebenfalls keinen Hinweis. Dies konnten wir nachweisen, weil wir den Einfluss von HMB-PP auf die Differenzierung von MoDCs untersuchten und hier keinerlei Einfluss auf die Ausprägung der untersuchten Oberflächenmoleküle der MoDCs feststellen konnten.

Insgesamt deuten die Daten auf eine wichtige Rolle des MHC-Klasse-II in der Aktivierung und anschließenden Proliferation der Vd2⁺ hin. Einen formalen Beweis für eine direkte Rolle liefern unsere Experimente jedoch nicht. Es ist wahrscheinlich, dass MHC-II bei der Antigenerkennung nach Inkubation mit HMB-PP eine zentrale Rolle spielt, da MHC-II⁻-Zellen nie eine Expansion der Vd2⁺-Zellen auslösen konnten und die Expansion durch Zugabe eines MHC-II-Antikörpers negativ beeinflusst werden konnte. Weitere Signale der antigenpräsentierenden Zelle scheinen jedoch erforderlich zu sein, um eine Vd2⁺-Expansion zu erreichen. In späteren Arbeiten durch eine Vielzahl an Arbeitsgruppen konnte das transmembranöse Molekül Butyrophilin 3A1 als essenziell in der Aktivierung von Vd2⁺-Zellen identifiziert werden (siehe zum Beispiel Vavassori et al. 2013, Harly et al. 2012 und Wang et al. 2013).

MHC-Klasse-II moduliert die Antwort der Vd2-positiven Zellen auf HMB-PP

Wir sehen einen Zusammenhang zwischen MHC-II-Expression und der anschließenden Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen nach Inkubation mit HMB-PP. Dieses Ergebnis widerspricht deutlich der bisherigen Annahme, nämlich dass die Antigenerkennung durch $\gamma\delta$ -T-Zellen, insbesondere die Erkennung von HMB-PP, MHC-unabhängig ist. Wie Wei und Kollegen bereits 2008 nachweisen konnten, spielen APCs eine Rolle bei der Antigenpräsentation von Pyrophosphaten an $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren (Wei et al. 2008). Welches oder welche Oberflächenmoleküle dabei eine Rolle spielen, konnte die Studie nicht beantworten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Proteolyse die Fähigkeit der APCs, ein HMB-PP/Vd2-Rezeptor-Tetramer zu binden, störte. Die Studie von Wei et al. legt also sehr nahe, dass es sich bei der unbekanntenen Bindungsstelle des APCs für die Präsentation von HMB-PP um

ein Eiweiß handelt. Interessant war auch die Beobachtung, dass nicht nur professionelle APCs in der Lage waren, das dargebotene HMB-PP/Vd2-Rezeptor-Tetramer zu binden. Auch bei Monozyten, T-Zellen und B-Zellen der Primaten konnte eine erfolgreiche Bindung gezeigt werden.

2012 wurde eine Studie veröffentlicht, die eine aktivierende Oberflächenstruktur erstmalig beschreiben konnte. Harly und Kollegen gelang es, das Eiweiß Butyrophilin-3 (auch als CD277 bekannt) als essentiellen Ligand für die Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu identifizieren (Harly et al. 2012). In weiteren Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass lediglich eine Subgruppe des CD277 eine Rolle spielt, nämlich das BTN3A1 (Vavassori et al. 2013, Wang et al. 2013). In einem ausführlichen Review zu dieser Entwicklung (Gu et al. 2014) versuchen die Autoren, die neuen Erkenntnisse zu interpretieren und einzuordnen. Die ursprüngliche Entdeckung der Rolle von CD277 erfolgte nach dem Einsatz von einem Antikörper gegen eine bestimmte Domäne innerhalb des CD277 (Mausantikörper Klon 20.1). Nach Zugabe des Antikörpers in Kulturen basierend auf PBMCs kam es zu einer deutlichen Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen. Bemerkenswert dabei war, dass keine der bekannten Antistoffe, die eine Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen hervorrufen können, in der Kultur anwesend waren. In weiteren Experimenten und damit zusammenhängenden Publikationen konnte letztendlich CD277 als das für die Aktivierung verantwortliche Membranprotein nachgewiesen werden. CD277 ist ein transmembranöses Eiweiß, welches eine Immunglobulin-ähnliche Struktur besitzt. Wie der Name Butyrophilin schon verrät, gehört CD277 zu einer Gruppe transmembranöser Eiweiße, die zuerst vor allem als ein Teil des Regelkreises beim Lactationsprozess von Säugetieren bekannt geworden waren. CD277 wird aktuell jedoch in die relativ große Gruppe der immunregulatorischen Eiweiße, die unter den Namen B7 zusammengefasst werden, eingeordnet (Compte et al. 2004). B7 sind Eiweiße der Zellmembran von hauptsächlich aktivierten APCs. Die meisten Vertreter der Gruppe können als essenzielle Bestandteile der kostimulatorischen Signale bei der Aktivierung von T-Zellen zusammengefasst werden (Rhodes et al. 2016). Zum Beispiel CD80 und CD86 gehören zu dieser Gruppe und werden in der Literatur unter den Namen B7.1 und B7.2 gefunden. Dass das CD277 von den meisten Autoren als Bestandteil dieser Gruppe gesehen wird, unterstreicht die zentrale Position in der Aktivierung von Vd2-positiven Zellen.

Bis vor wenigen Jahren wurde angenommen, dass $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen ausschließlich in höheren Primaten vorkommen (siehe zum Beispiel Morita et al. 2007). Die Erkenntnis,

dass CD277 eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen spielt, eröffnet die Möglichkeit, durch genetische Analysen nach neuen Arten zu suchen, die wie höhere Primaten V γ 9V δ 2-T-Zellen besitzen. Nach dem aktuellen Wissenstand muss eine Spezies sowohl CD277-Expression als auch V γ 9V δ 2-T-Zellrezeptoren kodieren können, um funktionsfähige V γ 9V δ 2-T-Zellen zu besitzen. Diese Erkenntnis nutzten Karunakaran und Kollegen 2014, um eine Suche in der inzwischen sehr umfangreichen genetischen Datenbank, die die vollkommene Entschlüsselung des Genoms vieler Arten enthält, durchzuführen (Karunakaran et al. 2014). Die Autoren konnten insgesamt neun Arten beschreiben, die wahrscheinlich V γ 9V δ 2-T-Zellen besitzen (genetisch ausgestattet für sowohl CD277-Expression als auch für die Bildung von V γ 9V δ 2-TCR). Klassische Versuchstiere wie Mäuse, Ratten oder Kaninchen hingegen sind genetisch gesehen gar nicht in der Lage, funktionsfähige V γ 9V δ 2-T-Zell/Butyrophilin-3-Funktionseinheiten zu produzieren.

Konfigurationsänderungen des CD277 als Basis der Aktivierung von V γ 9V δ 2-T-Zellen

Nach Kontakt mit dem agonistischen Anti-CD277-Antikörper 20.1 entsteht eine bestimmte Form eines Dimers aus zwei CD277-Molekülen. Die Art der Dimerisierung scheint der Schlüssel zur Aktivierung zu sein. Bildet der extrazelluläre Anteil des CD277 ein sog. „Head-to-Tail“-Dimer, in den meisten Publikationen Dimer 2 genannt, befindet es sich in einem nicht aktivierenden Zustand. Nach Zugabe des 20.1 Antikörpers tritt der extrazelluläre Anteil des CD277 gehäuft als Dimer 1 auf. Dimer 1 ist dabei ein sogenannter Head-to-Head (oder auch Tail-to-Tail) Dimer. Dimer 2 ist nicht in der Lage, $\gamma\delta$ -T-Zellen zu aktivieren und wird als inaktive, ruhende Form des CD277 beschrieben. Dimer 1 führt dagegen zu einer Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen ähnlich der Aktivierung nach Zugabe von HMB-PP (Palakodeti et al. 2012). Es konnte nachgewiesen werden, dass die intrazelluläre Domäne B30.2 des CD277 Phosphoantigene binden kann, und dass diese Bindung zum Auftreten des Dimers 1 führt (Sandstrom et al. 2014). Eine intrazelluläre Bindungsstelle lässt sich leicht für Pyrophosphate erreichen, die primär intrazellulär auftreten. Es gilt z.B. für einen überhöhten IPP-Spiegel bei krankhaft veränderten Zellen (z.B. Tumorzellen). Gleichermaßen würde eine intrazelluläre Bindungsstelle problemlos die Aktivierung nach HMB-PP-Stimulation durch intrazelluläre Erreger erklären. Schwierig wird es aber, wenn es um die Aktivierung nach Infektionen durch ausschließlich extrazellulär lebende Erreger geht. HMB-PP ist ein negativ geladenes Molekül, welches nicht passiv die Zellmembran passieren kann. Das heißt, dass HMB-PP nicht per Diffusion die

intrazellulär gelegene B30.2-Domäne des CD277 erreichen kann. Um einen Kontakt zwischen B30.2 und dem Pyrophosphat nach Zugabe von HMB-PP in einer Zellkultur zu ermöglichen, muss ein aktiver Transport über die Zellmembran stattfinden. Ein solcher Transportmechanismus ist bislang jedoch nicht beschrieben worden.

CD277 und MHC-Klasse-II

In den ersten Publikationen, die einen Aktivierungsweg über CD277 vermuten (Harly et al. 2012), wird von einer alleinstehenden Rolle des CD277 ausgegangen. In Folgestudien konnten IL-18 und zum Teil IL-15 als für eine Aktivierung und Proliferation der $V\delta^+$ -Zellen notwendige Zusätze in den Zellkulturen beschrieben werden (Nerdal et al. 2016, Gruenbacher et al. 2014). Unsere Daten zeigen darüber hinaus eine deutliche Modulation der Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen durch MHC-Klasse-II. Spekulativ kann überlegt werden, ob MHC-Klasse-II eine Rolle für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Dimer 1 spielt. Auch vorstellbar ist, dass MHC-Klasse-II ein kostimulatorisches Signal darstellt beim Kontakt zwischen CD277 und $\gamma\delta$ -T-Zellen. In dieser Hinsicht interessant und möglicherweise relevant ist die Lokalisation des CD277-Genoms im menschlichen Gesamtgenom. Es befindet sich im kurzen Arm des Chromosom 6 und zwar im einem Genkomplex, welcher auch für MHC kodiert (Rhodes et al. 2001). Auch wenn dies nicht beweist, dass MHC und CD277 funktionell miteinander interagieren, führt die räumliche Nähe der Gene zur gemeinsamen Konservierung und macht eine gegenseitige Beeinflussung der Genprodukte wahrscheinlicher.

Wie bereits beschrieben, wurde inzwischen die wichtige Rolle von CD277 durch mehrere Arbeiten gezeigt. In der Immunregulation ist es jedoch sehr selten, dass ein einziges Signal hinreichend ist, um eine Aktivierung zu erreichen. Üblicherweise sind mehrere Signale, die sich gegenseitig beeinflussen können, notwendig. Zum Beispiel bei der Aktivierung von $CD4^+$ -Zellen. Neben dem an MHC gebundenen Antigen (Signal 1 genannt) muss eine Kostimulation erfolgen. Diese erfolgt über CD3 und CD28 (Signal 2 genannt). Des Weiteren gibt es auch ein Signal 3 bestehend aus Zytokinen und deren Interaktion mit der $CD4$ -positiven Zelle. Sollte das Signal 1 vorliegen ohne das Signal 2, bleibt eine Immunantwort aus. Diese Reaktion bzw. Nicht-Reaktion wird als Anergie bezeichnet (Male und Wand-Württenberger 2005). In Anbetracht der vielfältigen Reaktionen und Funktionen einer aktivierten $\gamma\delta$ -T-Zelle ist es nicht abwegig, dass neben CD277 als Dimer 1 weitere Signale für die Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen notwendig sind. Eine Modulation oder Kostimulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen

durch weitere Signale der antigenpräsentierenden Zelle ist trotz oder gerade wegen der starken Wirkung von CD277 möglich.

Auf der Suche nach einem solchen Signal 2 könnten wir inzwischen, obwohl zum Zeitpunkt unsere Datenerhebung noch nichts bzgl. CD277 bekannt war, bereits fündig geworden sein. Unsere Ergebnisse zeigen deutlich, dass MHC-Klasse-II bei der in-vivo-Aktivierung von Vd2⁺-T-Zellen eine wichtige Rolle zukommt. Nach Blockade des MHC-Klasse-II fällt die Reaktion der Vd2⁺-T-Zellen auf HMB-PP quantitativ gesehen deutlich niedriger aus. Wichtig ist, dabei nicht aus dem Auge zu verlieren, dass nach erfolgter MHC-II-Blockade weiterhin eine gesteigerte Proliferation verglichen mit unseren Negativkontrollen auftritt. Die Blockade des MHC-II führt also nicht zum kompletten Ausbleiben der Vd2-Proliferation. Studien, die den direkten Einfluss von MHC-II auf die Vd2-Proliferation untersuchen, sind mir nicht bekannt. Trotzdem gehen die meisten Studien von einer MHC-Unabhängigkeit bei der Erkennung von Pyrophosphaten als Antigen und der anschließenden Vd2-Proliferation aus. Eines der prominentesten Beispiele und eine häufig zitierte Studie bleibt die Arbeit von Morita und Kollegen (Morita et al. 1995). In der Studie wurden monoklonale Zelllinien eingesetzt, und wie eingehend beschrieben (siehe unten), waren die faktischen Ergebnisse nicht so eindeutig, wie später durch andere Autoren angenommen wurde bzw. wie aus den Zitationen herausgelesen werden kann. Insgesamt zeigte nur etwa die Hälfte der eingesetzten $\gamma\delta$ -T-Zelllinien eine Reaktion auf das eingesetzte Phosphoantigen in Abwesenheit von akzessorischen Zellen. Unsere Ergebnisse legen nahe, dass die Zelllinien, die damals keine Reaktion gezeigt hatten, am ehesten ein Verhalten zeigten, welches dem natürlichen Verhalten der $\gamma\delta$ -T-Zellen entspricht. Zelllinien können sich in der langen Zeit (Re-Stimulationen wurde zum Teil über mehrere Monaten durchgeführt um eine hohe Reinheit der $\gamma\delta$ -T-Zelllinien zu erreichen) von dem ursprünglichen Reaktionsverhalten der $\gamma\delta$ -T-Zellen in vivo entfernen und damit in-vitro-Reaktionen zeigen, die sonst nicht vorkommen würden. Als Rückschluss aus der Kenntnis, dass Vd2⁺-Zellen nach Stimulation mit Pyrophosphaten ohne weitere akzessorische Zellen in der Lage waren, zu proliferieren, gehen die meisten Autoren späterer Publikationen von einer MHC-unabhängigen Antigenerkennung aus. Im Gegensatz zu dieser Annahme konnten wir eine deutlich verringerte Reaktion der Vd2⁺-T-Zellen auf HMB-PP nach Zugabe des Anti-MHC-Klasse-II-Antikörpers feststellen. Dies ließ sich sowohl in Kulturen mit hochrein isolierten Vd2⁺-Zellen als auch in PBMCs beobachten. Es handelt sich dabei um Vd2⁺-T-Zellen, die keinem Stress durch den Isoliervorgang ausgesetzt worden waren. Faktisch unterschied sich die Reaktion der Vd2⁺-T-Zellen in PBMCs nicht von der Reaktion der Vd2⁺-T-Zellen,

die isoliert worden waren. Es ist also unwahrscheinlich, dass unsere Zellen in einer gravierenden Art und Weise durch den Isoliervorgang alteriert worden sind. Insgesamt deuten sowohl Vitalität als auch das vergleichbare Verhalten der Vd2⁺-T-Zellen in PBMCs und nach Sortierung mittels FACSAria III auf einen nicht relevanten Einfluss des Isolationsvorgangs auf das Verhalten der Vd2⁺-T-Zellen bzgl. der Expansion nach Inkubation mit HMB-PP hin. Es ist somit leicht zu argumentieren, dass unsere Ergebnisse bzgl. der Rolle von MHC-Klasse-II⁺ Zellen viel wahrscheinlicher der Realität in vivo entsprechen als die Befunde, die mittels Zelllinien erhoben worden sind.

Aus meiner Sicht sollte in weiteren Untersuchungen versucht werden, das Zusammenspiel zwischen MHC-Klasse-II und CD277 zu eruieren. Interessant wäre zu wissen, ob zum Beispiel MHC-Klasse-II in irgendeiner Weise das Erkennen von HMB-PP als Antigen begünstigt oder auch direkt die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Dimer 1 des CD277 erhöht. Es könnte auch untersucht werden, ob MHC-Klasse-II eine Rolle für die Aufnahme von HMB-PP und anschließende intrazelluläre Anbindung an das CD277 spielt. Denkbar ist auch, dass das MHC-Molekül nicht die Dimerisierung des CD277 beeinflusst, sondern einen direkten und modulierenden Einfluss auf die $\gamma\delta$ -T-Zellen nimmt. Eine weitere Möglichkeit ist jedoch auch, dass die Aktivierung der Vd2⁺-Zellen durch MHC-II-tragende Zellen vollkommen unabhängig von der Vd2⁺-Aktivierung durch CD277 ist und einen alternativen Aktivierungsweg darstellt. Insgesamt wird die von uns festgestellte Rolle des MHC-Klasse-II bei der Antigenerkennung eher Auswirkungen auf die Grundlagenforschung haben. Dort könnten aber durch unsere Ergebnisse wichtige Hinweise für die weitere Aufarbeitung der Erkennungsweg von Pyrophosphaten durch $\gamma\delta$ -T-Zellen geliefert werden.

MHC-Klasse-II ist nicht als alleiniges Merkmal der akzessorischen Zelle ausreichend.

Wir konnten zeigen, dass MHC-Klasse-II eine wichtige Rolle bei der Erkennung von HMB-PP und der darauffolgenden Expansion der Vd2⁺-T-Zellen spielt. Nach Stimulation von im Ruhezustand MHC-Klasse-II-negativen CD4⁺-T-Zellen zeigten diese eine deutliche MHC-Klasse-II-Expression. Das Vorhandensein von MHC-Klasse-II an der Oberfläche konnte mittels FACS-Analyse eindeutig nachgewiesen werden. Trotzdem konnten diese stimulierten CD4⁺-Zellen autologen Vd2⁺-T-Zellen nicht zur Proliferation verhelfen. HMB-PP-Stimulation führte in Anwesenheit dieser Zellen zu keiner relevanten Proliferation der Vd⁺-T-Zellen. Im Unterschied zu Zellen, die primär eine MHC-II-Expression zeigten, zeigte lediglich etwa ein Drittel der CD4⁺-T-Zellen eine deutliche MHC-Klasse-II-Expression. Dass eine hohe MHC-II-Dichte auch nicht

ausreichend ist, zeigen unsere Daten aus den Kokulturen von Zelllinien und Vd2⁺-Zellen (siehe unten). Hier zeigt sich erneut, dass MHC-Klasse-II eine Rolle bei der Erkennung und anschließenden Proliferation von Vd2⁺-T-Zellen spielt. Jedoch muss mindestens ein weiteres Kriterium der präsentierenden Zelle gegeben sein. Ob es sich dabei um ein weiteres kostimulatorisches Signal wie z.B. Zytokine (z.B. IL-18) oder weitere Oberflächenmoleküle handelt, ist nicht klar. Was aber zum Zeitpunkt der ursprünglichen Datenanalyse festgestellt werden konnte, war, dass die APCs dieses unbekannte zweite Signal besitzen und CD4⁺-Zellen eben nicht.

Die Methode, die wir einsetzten, um die CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren und die damit zur Expression von MHC-Klasse-II führte, setzte einer deutlich längere Kulturzeit der CD4⁺-T-Zellen als die der Vd2⁺-T-Zellen voraus. In der nach der Aktivierung der CD4⁺-T-Zellen durchgeführten Kontrolle, unmittelbar vor der Kokultivierung mit $\gamma\delta$ -T-Zellen, zeigten sich die CD4⁺-T-Zellen überwiegend vital. Wir hatten es also mit vitalen, CD4⁺-MHC-Klasse-II⁺-T-Zellen zu tun und es kam trotzdem nicht zu einer Proliferation der Vd2⁺-T-Zellen. Sollte bedingt durch unseren Experimentaufbau eine Veränderung der CD4⁺-T-Zellen aufgetreten sein und damit erst eine Proliferation der Vd2⁺-T-Zellen unterbunden worden sein, ändert dies dementsprechend nicht die Interpretation unserer Ergebnisse. Wir stellten eine zentrale Rolle des MHC-Klasse-II bei der Antigenerkennung und anschließenden Aktivierung von ruhenden Vd2⁺-T-Zellen fest. Jedoch müssen weitere Bedingungen im Sinne von weiteren kostimulatorischen Signalen erfüllt sein, bevor es zur Proliferation der Vd2⁺-Zellen kommt. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Nerdal und Kollegen (Nerdal et al. 2016) eine Proliferation der Vd2⁺-Zellen nach HMB-PP-Stimulation, wenn dies in Kokultur mit CD4⁺-Zellen erfolgte, zeigen. Der einzige offensichtliche Unterschied des Versuchsaufbaus im Vergleich zu unseren Experimenten war, dass wir humanes AB-Serum im Medium einsetzten, während Nerdal und Kollegen fetales Kälberserum (FCS) einsetzten. Mit dem Einsatz von humanem AB-Serum haben wir Bedingungen geschaffen, die den in-vivo-Bedingungen näherkommen. Aus unserer Sicht stellt das Reaktionsmuster in unserem Versuchsaufbau damit am ehesten das natürlich vorkommende Reaktionsmuster dar.

Zelllinien mit hoher MHC-II-Expression zeigen eine heterogene Expansionskapazität nach Kokulturen mit Vd2⁺-Zellen

Keine der von uns untersuchten Zelllinien ohne MHC-Klasse-II-Expression waren in der Lage, Vd2⁺-T-Zellen zur Proliferation nach Stimulation mit HMB-PP zu verhelfen. Dieses Ergebnis untermauert unsere bisherigen Befunde und widerlegt erneut die

Befunde von Morita und Kollegen. (Diese belegen, dass ein einfacher Zell-Zell-Kontakt ausreichend ist, um eine Proliferationsantwort zu ermöglichen. Bedingungen für die zweite Zelle gibt es in dem Modell nicht, Morita et al. 1995.) Ein einfacher Zellkontakt reicht nicht aus, um $Vd2^+$ -T-Zellen das HMB-PP als Antigen erkennen zu lassen. Die Gegenprobe, Kokultivierung der $Vd2^+$ -T-Zellen zusammen mit Zelllinien, die eine hohe MHC-Expression an der Oberfläche zeigten, zeigte ein heterogenes Bild. Zum Teil konnte eine starke Proliferation nachgewiesen werden (nach Kokultivierung mit Zellen der Daudi-Zelllinie), zum Teil war die Proliferation der $\gamma\delta$ -T-Zellen jedoch nicht höher als die der Negativkontrolle (nach Kokultivierung mit Zellen der Raji-Zelllinie). Erneut legen die Befunde in der Zusammenschau eine wichtige Rolle von MHC-Klasse-II nahe. MHC-Klasse-II ist alleine jedoch als Merkmal der zweiten Zelle in der Kokultur nicht ausreichend, um sicher eine Proliferation der $Vd2^+$ -T-Zellen auszulösen. Weitere kostimulatorische Signale müssen vorhanden sein. Auf den ersten Blick haben wir die Ergebnisse von Kaur und Kollegen (Kaur et al. 1994) bestätigt. In dieser Arbeit wurden auch Raji-Zellen eingesetzt. Im Unterschied zu unserem Experiment wurden keine weiteren Stimuli neben der jeweils zu untersuchenden Zelllinie der Kokultur mit den $\gamma\delta$ -T-Zellen dazugegeben. Daudi ist in der Lage, $\gamma\delta$ -T-Zellen ohne weitere Stimuli zu aktivieren und zur Proliferation zu verhelfen. Spätere Studien haben eine Pyrophosphatakkumulation in der Daudi-Zelle nachweisen können (siehe zum Beispiel Guber et al. 2003) als vermutliche Ursache der Aktivierung). In unserem experimentellen Aufbau lässt es sich nicht zweifelsfrei unterscheiden, ob die Aktivierung der $Vd2^+$ -T-Zellen durch das hinzugefügte HMB-PP oder durch endogenes (bezogen auf die Daudi-Zellen) IPP erfolgte. Als Telexperiment ist es interessant und lässt sich im Kontext der weiteren Experimente interpretieren. Zusammenfassend zeigen unsere Experimente bezogen auf die Tumorzelllinien eine sehr wahrscheinliche MHC-Modulation der Aktivierung von $Vd2^+$ -T-Zellen.

Mögliche Folgen der MHC-Modulation

Die Forschung zu $\gamma\delta$ -T-Zellen ist im Laufe der letzten Jahrzehnte mit stark schwankender Intensität betrieben worden. Aktuell wird im Rahmen des Querschnittsbereiches Immunologie und Onkologie ein enormer Aufwand betrieben. Die Rolle, die von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der gezielten Abtötung von Tumorzellen eingenommen werden kann, ist bislang nicht klar. Viele Arbeitsgruppen haben aber Hoffnung, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen dabei eine zentrale Rolle einnehmen können. Nachdem die Mechanismen, die zur Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen führen können, nach und nach besser verstanden werden, steigt auch die Hoffnung, eine gezielte Aktivierung und

Abtötung von bestimmten Zellen zu ermöglichen. $\gamma\delta$ -T-Zellen reagieren wie das angeborene Immunsystem sehr schnell und sind in der Lage, krankhaft veränderte Zellen, nach aktuellem Wissensstand jedoch nur, sofern diese einen erhöhten IPP-Spiegel vorweisen, abzutöten. Einer der möglichen Wege eines gezielten Eingreifens der $\gamma\delta$ -T-Zellen in die Tumorabwehr wäre z.B. eine Akkumulation von IPP intrazellulär in Tumorzellen zu bewirken.

Inzwischen stehen einige synthetische Stoffe, die in vitro als Aktivatoren von $\gamma\delta$ -T-Zellen funktionieren können, zur Verfügung. Der Aktivierungsweg ist dabei entweder direkt, der verabreichte Stoff ist dabei selber ein Phosphoantigen, oder indirekt, der verabreichte Stoff führt zu Veränderungen im Mevalonatstoffwechselweg (und damit einem erhöhten IPP-Spiegel in den betroffenen Zellen). Die Phosphoantigene, die direkt aktivierend in vivo wirken, werden aktuell nur im Rahmen von Studien eingesetzt. Hierzu zählt in erster Linie Phosphostim (Bromo-Hydrin-Pyrophosphat, BrHPP) (Espinosa et al. 2001). Obwohl dieses Phosphoantigen bereits 2001 in der Literatur erstmalig auftauchte, hat es bis heute keinen Eingang in den klinischen Alltag gefunden.

Anders verhält es sich bei den indirekten Aktivatoren. Hierzu zählt zum Beispiel die bereits seit Jahren eingesetzte Medikamentengruppe der Bisphosphonate (lediglich stickstoffhaltige Vertreter der Bisphosphonate, z.B. Pamidronat oder Zoledronat). Bisphosphonate werden zur Hemmung des Knochenabbaus bei Osteoporose sowie zur Therapie von osteolytischen Metastasen unterschiedlichster Krebsarten eingesetzt. Der genutzte Wirkmechanismus hat dabei auf den ersten Blick nichts mit der Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu tun. Vielmehr wird eine Hemmung der Osteoklasten primär genutzt, um den Knochen im Bereich einer ossären Metastase zu stabilisieren und das Wachstum vor allem osteolytischer Metastasen zu hemmen. Als eine Art Nebenwirkung blockieren stickstoffhaltige Bisphosphonate jedoch eines der Enzyme im Mevalonatstoffwechselweg und können so einen erhöhten IPP-Spiegel in körpereigenen Zellen auslösen (Kunzmann et al. 2000). Die erhöhten IPP-Spiegel führen wiederum zur Aktivierung von ruhenden $\gamma\delta$ -T-Zellen. Wie bereits durch Ali und Kollegen (Ali et al. 2007) eindrucksvoll dargestellt, entstehen nach in-vivo-Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen Gedächtniszellen. Diese Zellen geben bei erneutem Kontakt mit einem geeigneten Pyrophosphat sehr hohe Mengen an Zytokinen frei, die eine gezielte Abtötung der IPP-haltigen Zelle zur Folge haben können. Zudem reicht beim zweiten Kontakt mit dem geeigneten Antigen eine geringere Konzentration des Antigens aus, um die Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen zu erreichen. Die aktuelle Forschung zielt auf genau

diese Wirkung ab. Die Vermutung, dass der aktuelle Einsatz von stickstoffhaltigen Bisphosphonaten in der Metastasentherapie eine relativ ungerichtete Aktivierung des Immunsystems und damit eine primitive Form der Immuntherapie darstellt, liegt sehr nahe. Es ist auch möglich, dass die Tumorzellen, die sich unmittelbar im Knochen befinden, einer überdurchschnittlichen Menge an Bisphosphonat ausgesetzt werden. Bisphosphonate lagern sich vor allem dort ab, wo vermehrt Knochenabbau stattfindet. Die Tumorzellen, die sich in der Nähe von osteolytischen Bereichen befinden, werden vermutlich durch die höhere Konzentration auch höhere IPP-Spiegel vorweisen.

Die aktuellen Bemühungen zielen deswegen auf ein gezieltes Abtöten von bestimmten Tumorzellen durch $\gamma\delta$ -T-Zellen nach deren Aktivierung ab. Die von uns entdeckte Rolle von MHC-Klasse-II bei der Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen kann bei diesen Bemühungen eine wichtige Rolle spielen. Einige der aktuellen Studien versuchen, $Vd2^+$ -Zellen *in vitro* zu aktivieren, um diese anschließend den Patienten wieder (autolog) zu transfundieren (für eine Übersicht über aktuelle Studien siehe zum Beispiel Zou et al. 2017). Die Erkenntnisse dieser Arbeit kann dabei eingesetzt werden, um eine erfolgreiche und gezielte Aktivierung der $Vd2^+$ -Zellen zu erreichen.

Zusammenfassung

Humane V γ 9 δ 2-T-Zellen machen die einzige im peripheren Blut vorhandene T-Zell-Population aus, die durch sogenannte Phosphoantigene aktiviert werden können. Sie spielen eine sehr wichtige Rolle sowohl in der Immunantwort auf mikrobielle Infektionen als auch in der Tumorummunologie. Als potentestes Phosphoantigen in der Aktivierung von V γ 9 δ 2-T-Zellen ist das flüchtige Molekül (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphat (HMB-PP) identifiziert worden. Der genaue Mechanismus bei der Antigenerkennung war bislang unbekannt. Es wurde in mehreren Studien festgestellt, dass V γ 9 δ 2-T-Zellen nicht ohne weiteren zellulären Partner das HMB-PP als Antigen erkennen können. Welche Eigenschaften die dann als antigenpräsentierenden Zellen fungierenden zellulären Partner besitzen müssen, war zur Beginn dieser Arbeit nicht definiert. In dieser Arbeit konnten wir durch den Einsatz von hochrein sortierten Zellen *in vitro* die Eigenschaften der antigenpräsentierenden Zellen eingrenzen. Nach unserer Kenntnis haben wir in dieser Arbeit erstmalig zeigen können, dass primär MHC-II-positive-Zellen unabdingbar sind bei der Antigenerkennung von HMB-PP und der anschließenden Proliferation der V γ 9 δ 2-T-Zellen. Zunächst konnten wir zeigen, dass eine Expansion von V γ 9 δ 2-T-Zellen in Kokultur mit MHC-II-positiven Zellen deutlich höher ausfällt als in Kokulturen mit Zellen, die MHC-II nicht exprimieren. Nach HMB-PP-Stimulation in Kokulturen mit MHC-II-negativen Zellen (ebenfalls hochrein sortiert) konnten wir sogar nachweisen, dass eine Expansion der V γ 9 δ 2-T-Zellen gänzlich ausbleibt. In einem weiteren Schritt konnten wir nachweisen, dass eine Blockade des MHC-II zu einer deutlich niedrigeren Expansion der V γ 9 δ 2-T-Zellen als Antwort auf eine Stimulation mit HMB-PP führt. Weitere, in dieser Arbeit nicht identifizierte Eigenschaften der antigenpräsentierenden Zellen, müssen jedoch auch vorhanden sein. Dies zeigten uns unsere Experimente mit CD4-positiven Zellen, bei denen durch vorherige Stimulation ein MHC-II-Expression *in vitro* ausgelöst worden war. In Kokulturen mit diesen CD4-positiven und gleichzeitig MHC-II-positiven Zellen kam es eben nicht zu einer Expansion der V γ 9 δ 2-T-Zellen nach HMB-PP-Stimulation. Eine Bestätigung dieses Befundes konnten wir durch Kokulturen mit Zellreihen, die eine unterschiedliche MHC-II-Expression zeigten, erreichen. Eine Expansion der V γ 9 δ 2-T-Zellen trat nur in Kokulturen mit MHC-II-positiven Zellreihen auf, jedoch nicht in allen Kokulturen mit MHC-II-positiven Zellreihen. Nach Kokultur mit Raji-Zellen (MHC-II-positiver Zellreihe) kam es nicht zu einer Expansion der V γ 9 δ 2-T-Zellen. Zusammenfassend liefert diese Arbeit neue Einsichten in die Bedingungen an den

zellulären Partner der V γ 9 δ 2-T-Zellen bei der Erkennung und anschließenden Expansion nach Stimulation durch HMB-PP.

Abstract

Human V γ 9 δ 2 T cells represent a unique T cell subset in humans, primates and a handful of other vertebrates. In humans it is the only T cell subset present in the peripheral blood that can be activated by nonpeptide phosphoantigens. The V γ 9 δ 2 T cells play an important role in tumor immunity and antimicrobial immunity. Of the many known phosphoantigens able to activate the V γ 9 δ 2 T cells, (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphate (HMB-PP) is by far the most potent. The exact mechanism of antigen recognition and thus activation of the V γ 9 δ 2 T cells remain elusive. It has been known, that cell-cell-contact with another cell type than V γ 9 δ 2 T cells is necessary to initiate activation and proliferation of the V γ 9 δ 2 T cells in vitro as a response to HMB-PP stimulation. The cellular requirements for HMB-PP driven V γ 9 δ 2 T cell expansion in vivo have been unclear so far. We used high purity sorting to define the cells acting as antigen presenting cells in vitro. We were able to show, to our knowledge for the first time, that MHC-II positive cells are indispensable for HMB-PP-driven V γ 9 δ 2 T cell expansion in vitro. When cultured together with high purity sorted MHC-II positive cell we were able to show high levels of proliferation of the V γ 9 δ 2 T cells after HMB-PP stimulation. Vice versa a proliferative response did not occur when strictly MHC-II negative cells were cocultured with V γ 9 δ 2 T cells. Using an MHC-II blocking antibody we were able to decrease the proliferative response after HMB-PP stimulation. This demonstrates that MHC-II itself plays an important role in the antigen recognition and presentation in the process of activating V γ 9 δ 2 T cells. Further cellular requirements, apart from MHC-II positivity, must be fulfilled in order to activate the V γ 9 δ 2 T cells. Through activation we were able to induce an MHC-II expression on CD4 positive cells in vitro. Although we reached high levels of MHC-II expression on the CD4 positive cells, there was no proliferative response after HMB-PP stimulation when cocultured with V γ 9 δ 2 T cells. Supporting these observations, a proliferative response only occurred in some of the cocultures with different MHC-II positive cell lines. Supporting our observation of MHC-II dependency, a proliferation did not occur in any of the cocultures with MHC-II negative cell lines. Our results provide novel insights into the primary cell-specific requirements for human V γ 9 δ 2 T cell expansion.

5. Literaturverzeichnis

Ali, Zahida; Shao, Lingyun; Halliday, Lisa; Reichenberg, Armin; Hintz, Martin; Jomaa, Hassan; Chen, Zheng W. (2007): Prolonged (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate-driven antimicrobial and cytotoxic responses of pulmonary and systemic Vgamma2Vdelta2 T cells in macaques. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179 (12), S. 8287–8296.

Balbi, B.; Valle, M. T.; Oddera, S.; Giunti, D.; Manca, F.; Rossi, G. A.; Allegra, L. (1993): T-lymphocytes with gamma delta+ V delta 2+ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis. In: *The American review of respiratory disease* 148 (6 Pt 1), S. 1685–1690. DOI: 10.1164/ajrccm/148.6_Pt_1.1685.

Bottino, C.; Tambussi, G.; Ferrini, S.; Ciccone, E.; Varese, P.; Mingari, M. C. et al. (1988): Two subsets of human T lymphocytes expressing gamma/delta antigen receptor are identifiable by monoclonal antibodies directed to two distinct molecular forms of the receptor. In: *The Journal of experimental medicine* 168 (2), S. 491–505.

Chesnut, Robert; Colon, Sonia; Grey, Howard (1982): Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors, and macrophages: functional and biochemical comparison. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 128, S. 1764–1768.

Compte, Elsa; Pontarotti, Pierre; Collette, Yves; Lopez, Marc; Olive, Daniel (2004): Frontline: Characterization of BT3 molecules belonging to the B7 family expressed on immune cells. In: *European journal of immunology* 34 (8), S. 2089–2099. DOI: 10.1002/eji.200425227.

Concannon, Patrick (1986): Diversity and structure of human T-Cell receptor β -chain variable region genes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83, S. 6598–6602.

Constant, P.; Davodeau, F.; Peyrat, M. A.; Poquet, Y.; Puzo, G.; Bonneville, M.; Fournié, J. J. (1994): Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. In: *Science (New York, N.Y.)* 264 (5156), S. 267–270.

Eberl, Matthias; Hintz, Martin; Reichenberg, Armin; Kollas, Ann-Kristin; Wiesner, Jochen; Jomaa, Hassan (2003): Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation. In: *FEBS letters* 544 (1-3), S. 4–10.

Esin, S.; Shigematsu, M.; Nagai, S.; Eklund, A.; Wigzell, H.; Grunewald, J. (1996): Different percentages of peripheral blood gamma delta + T cells in healthy individuals from different areas of the world. In: *Scandinavian journal of immunology* 43 (5), S. 593–596.

Espinosa, E.; Belmont, C.; Pont, F.; Luciani, B.; Poupot, R.; Romagné, F. et al. (2001): Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent

stimulator of human gamma delta T cells. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (21), S. 18337–18344. DOI: 10.1074/jbc.M100495200.

Gober, Hans-Jürgen; Kistowska, Magdalena; Angman, Lena; Jenö, Paul; Mori, Lucia; Libero, Gennaro de (2003): Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. In: *The Journal of experimental medicine* 197 (2), S. 163–168.

Gruenbacher, Georg; Nussbaumer, Oliver; Gander, Hubert; Steiner, Bernhard; Leonhartsberger, Nicolai; Thurnher, Martin (2014): Stress-related and homeostatic cytokines regulate V γ 9V δ 2 T-cell surveillance of mevalonate metabolism. In: *Oncoimmunology* 3 (8), S. e953410. DOI: 10.4161/21624011.2014.953410.

Gu, Siyi; Nawrocka, Wioletta; Adams, Erin J. (2014): Sensing of Pyrophosphate Metabolites by V γ 9V δ 2 T Cells. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 688. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00688.

Guermonprez, Pierre; Valladeau, Jenny; Zitvogel, Laurence; Théry, Clotilde; Amigorena, Sebastian (2002): Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. In: *Annual review of immunology* 20, S. 621–667. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828.

Haas, W.; Pereira, P.; Tonegawa, S. (1993): Gamma/delta cells. In: *Annual review of immunology* 11, S. 637–685. DOI: 10.1146/annurev.iy.11.040193.003225.

Harly, Christelle; Guillaume, Yves; Nedellec, Steven; Peigné, Cassie-Marie; Mönkkönen, Hannu; Mönkkönen, Jukka et al. (2012): Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human $\gamma\delta$ T-cell subset. In: *Blood* 120 (11), S. 2269–2279. DOI: 10.1182/blood-2012-05-430470.

Hayday, A. C. (2000): [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. In: *Annual review of immunology* 18, S. 975–1026. DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.975.

Hintz, M.; Reichenberg, A.; Altincicek, B.; Bahr, U.; Gschwind, R. M.; Kollas, A. K. et al. (2001): Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human gammadelta T cells in *Escherichia coli*. In: *FEBS letters* 509 (2), S. 317–322.

Ho, M.; Webster, H. K.; Tongtawe, P.; Pattanapanyasat, K.; Weidanz, W. P. (1990): Increased gamma delta T cells in acute *Plasmodium falciparum* malaria. In: *Immunology letters* 25 (1-3), S. 139–141.

Inghirami, G.; Zhu, B. Y.; Chess, L.; Knowles, D. M. (1990): Flow cytometric and immunohistochemical characterization of the gamma/delta T-lymphocyte population in normal human lymphoid tissue and peripheral blood. In: *The American journal of pathology* 136 (2), S. 357–367.

Jameson, Julie M.; Cruz, John; Costanzo, Anne; Terajima, Masanori; Ennis, Francis A. (2010): A role for the mevalonate pathway in the induction of subtype cross-reactive immunity to influenza A virus by human gammadelta T lymphocytes. In: *Cellular immunology* 264 (1), S. 71–77. DOI: 10.1016/j.cellimm.2010.04.013.

Janeway, C. A. (1989): Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. In: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54 (0), S. 1–13. DOI: 10.1101/SQB.1989.054.01.003.

Kabelitz, Dieter (2011): $\gamma\delta$ T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68 (14), S. 2331–2333. DOI: 10.1007/s00018-011-0696-4.

Karunakaran, Mohindar M.; Göbel, Thomas W.; Starick, Lisa; Walter, Lutz; Herrmann, Thomas (2014): V γ 9 and V δ 2 T cell antigen receptor genes and butyrophilin 3 (BTN3) emerged with placental mammals and are concomitantly preserved in selected species like alpaca (*Vicugna pacos*). In: *Immunogenetics* 66 (4), S. 243–254. DOI: 10.1007/s00251-014-0763-8.

Karunakaran, Mohindar M.; Herrmann, Thomas (2014): The V γ 9V δ 2 T Cell Antigen Receptor and Butyrophilin-3 A1: Models of Interaction, the Possibility of Co-Evolution, and the Case of Dendritic Epidermal T Cells. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 648. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00648.

Kaur, I.; Jong, J. de; Schell, K.; Hank, J.; Fisch, P.; Sondel, P. M. (1994): Human peripheral gamma delta T cells are stimulated by Daudi Burkitt's lymphoma and not by any other Burkitt's lymphoma tested. In: *Cellular immunology* 156 (1), S. 54–61. DOI: 10.1006/cimm.1994.1152.

Kunzmann, V.; Bauer, E.; Feurle, J.; Weissinger, F.; Tony, H. P.; Wilhelm, M. (2000): Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. In: *Blood* 96 (2), S. 384–392.

MaClennan, Ian C. M.; Gray, David (1986): Antigen-Driven Selection of Virgin and Memory B Cells. In: *Immunol Rev* 91 (1), S. 61–86. DOI: 10.1111/j.1600-065X.1986.tb01484.x.

Male, David; Wand-Württenberger, Angela (2005): Immunologie auf einen Blick. 1. dt. Aufl., entspricht der 4. engl. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer. Online verfügbar unter http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?id=2652963&prov=M&dok_var=1&dok_ext=htm.

Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A. (1997): Innate Immunity. The Virtues of a Nonclonal System of Recognition. In: *Cell* 91 (3), S. 295–298. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80412-2.

Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A., JR (2002): Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5566), S. 298–300. DOI: 10.1126/science.1068883.

Morita, C. T.; Beckman, E. M.; Bukowski, J. F.; Tanaka, Y.; Band, H.; Bloom, B. R. et al. (1995): Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. In: *Immunity* 3 (4), S. 495–507.

Morita, C. T.; Lee, H. K.; Wang, H.; Li, H.; Mariuzza, R. A.; Tanaka, Y. (2001): Structural features of nonpeptide prenyl pyrophosphates that determine their antigenicity for human gamma delta T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 167 (1), S. 36–41.

Morita, Craig T.; Jin, Chenggang; Sarikonda, Ghanashyam; Wang, Hong (2007): Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human V γ 2V δ 2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. In: *Immunological reviews* 215, S. 59–76. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00479.x.

Mueller, D. L.; Jenkins, M. K.; Schwartz, R. H. (1989): Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. In: *Annual review of immunology* 7, S. 445–480. DOI: 10.1146/annurev.iy.07.040189.002305.

Mukherjee, Sambuddho; Ahmed, Asma; Malu, Shruti; Nandi, Dipankar (2006): Modulation of cell cycle progression by CTLA4-CD80/CD86 interactions on CD4+ T

cells depends on strength of the CD3 signal. Critical role for IL-2. In: *Journal of leukocyte biology* 80 (1), S. 66–74. DOI: 10.1189/jlb.0505260.

Neefjes, Jacques; Jongsma, Marlieke L. M.; Paul, Petra; Bakke, Oddmund (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. In: *Nature reviews. Immunology* 11 (12), S. 823–836. DOI: 10.1038/nri3084.

Nerdal, Patrik Theodor; Peters, Christian; Oberg, Hans-Heinrich; Zlatev, Hristo; Lettau, Marcus; Quabius, Elgar Susanne et al. (2016): Butyrophilin 3A/CD277-Dependent Activation of Human $\gamma\delta$ T Cells: Accessory Cell Capacity of Distinct Leukocyte Populations. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 197 (8), S. 3059–3068. DOI: 10.4049/jimmunol.1600913.

Palakodeti, Aparna; Sandstrom, Andrew; Sundaresan, Lakshmi; Harly, Christelle; Nedellec, Steven; Olive, Daniel et al. (2012): The molecular basis for modulation of human V γ 9V δ 2 T cell responses by CD277/butyrophilin-3 (BTN3A)-specific antibodies. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (39), S. 32780–32790. DOI: 10.1074/jbc.M112.384354.

Peters, Peter J.; Neefjes, Jacques J.; Oorschot, Viola; Ploegh, Hidde L.; Geuze, Hans J. (1991): Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. In: *Nature* 349 (6311), S. 669–676. DOI: 10.1038/349669a0.

Rhodes, D. A.; Stammers, M.; Malcherek, G.; Beck, S.; Trowsdale, J. (2001): The cluster of BTN genes in the extended major histocompatibility complex. In: *Genomics* 71 (3), S. 351–362. DOI: 10.1006/geno.2000.6406.

Rhodes, David A.; Reith, Walter; Trowsdale, John (2016): Regulation of Immunity by Butyrophilins. In: *Annual review of immunology* 34, S. 151–172. DOI: 10.1146/annurev-immunol-041015-055435.

Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahm, H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. In: *Biochemical Journal* 295 (Pt 2), S. 517–524.

Romani, N.; Gruner, S.; Brang, D.; Kämpgen, E.; Lenz, A.; Trockenbacher, B. et al. (1994): Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. In: *The Journal of experimental medicine* 180 (1), S. 83–93.

Saito, H.; Kranz, D. M.; Takagaki, Y.; Hayday, A. C.; Eisen, H. N.; Tonegawa, S. (1984): Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. In: *Nature* 309 (5971), S. 757–762.

Sandstrom, Andrew; Peigné, Cassie-Marie; Léger, Alexandra; Crooks, James E.; Konczak, Fabienne; Gesnel, Marie-Claude et al. (2014): The intracellular B30.2 domain of butyrophilin 3A1 binds phosphoantigens to mediate activation of human V γ 9V δ 2 T cells. In: *Immunity* 40 (4), S. 490–500. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.03.003.

Shen, Yun; Zhou, Dejiang; Qiu, Liyou; Lai, Xioamin; Simon, Meredith; Shen, Ling et al. (2002): Adaptive immune response of V γ 2V δ 2+ T cells during mycobacterial infections. In: *Science (New York, N.Y.)* 295 (5563), S. 2255–2258. DOI: 10.1126/science.1068819.

Tanaka, Y.; Morita, C. T.; Nieves, E.; Brenner, M. B.; Bloom, B. R. (1995): Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. In: *Nature* 375 (6527), S. 155–158. DOI: 10.1038/375155a0.

Townsend, A. (1986): The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. In: *Cell* 44 (6), S. 959–968. DOI: 10.1016/0092-8674(86)90019-X.

Vavassori, Stefano; Kumar, Anil; Wan, Gan Siok; Ramanjaneyulu, Gundimeda S.; Cavallari, Marco; El Daker, Sary et al. (2013): Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. In: *Nature immunology* 14 (9), S. 908–916. DOI: 10.1038/ni.2665.

Wang, Hong; Henry, Olivier; Distefano, Mark D.; Wang, Yen-Chih; Rääkkönen, Johanna; Mönkkönen, Jukka et al. (2013): Butyrophilin 3A1 plays an essential role in prenyl pyrophosphate stimulation of human V γ 2V δ 2 T cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 191 (3), S. 1029–1042. DOI: 10.4049/jimmunol.1300658.

Wei, Huiyong; Huang, Dan; Lai, Xiaomin; Chen, Meiling; Zhong, Weihua; Wang, Richard; Chen, Zheng W. (2008): Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to V γ 2V δ 2 TCR. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 181 (7), S. 4798–4806.

Yoshikai, Y.; Toyonaga, B.; Koga, Y.; Kimura, N.; Griesser, H.; Mak, T. W. (1987): Repertoire of the human T cell gamma genes: high frequency of nonfunctional transcripts in thymus and mature T cells. In: *European journal of immunology* 17 (1), S. 119–126. DOI: 10.1002/eji.1830170120.

Zou, Chang; Zhao, Pan; Xiao, Zhangang; Han, Xianghua; Fu, Fan; Fu, Li (2017): $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy. In: *Oncotarget* 8 (5), S. 8900–8909. DOI: 10.18632/oncotarget.13051.

6. Anhang

Publikationsverzeichnis

Soriano-Sarabia, Natalia; Sandvold, Hakon; Jomaa, Hassan; Kubin, Thomas; Bein, Gregor; Hackstein, Holger (2012): Primary MHC-class II(+) cells are necessary to promote resting V δ 2 cell expansion in response to (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphate and isopentenyl pyrophosphate. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189 (11), S. 5212–5222. DOI: 10.4049/jimmunol.1200093.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der JustusLiebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Dieser Arbeit ist über einen sehr langen Zeitraum entstanden. Entsprechend bin ich von sehr vielen unterschiedlichen Menschen aus unterschiedliche Fachgruppen deutlich unterstützt worden. Alle zu erwähnen die mir unter die Arme gegriffen haben ist nicht möglich, jedoch möchte ich im Einzelnen einige Personen danken. Im Labor konnte ich stets auf die Hilfe und Freundschaft von und mit Gaby Haley, Angelika Nockher, Nelli Baal und Andreas Wachtendorf zählen. Für Anregungen und fachlichen Austausch stand Natalia Soriano-Sarabia, Erhan Yakut und Hassan Jomaa stets zur Verfügung. Sachliche Unterstützung habe ich erhalten von Hassan Jomaa (bereitstellung von das HMB-PP) und Sentot Santoso (Bereitstellung der Zelllinien). Von meinen Kollegen an erster Stelle und in allen Bereichen unterstützend steht jedoch Holger Hackstein der mir die Arbeit ermöglicht hat. Ich kenne nicht viele Betreuer die über einen so langen Zeitraum hinweg eine sich eher schleichend entwickelnde Arbeit noch zu Ende betreuen. Vielen Dank für die Geduld und die hartnäckigkeit die zum Teil notwendig war.

Für die Unterstützung in allen Lebensbereichen danke ich meine Frau Elisabeth. Nicht nur hast du auf gemeinsame Zeit Verzichtet um mir die Arbeit zu ermöglichen. Du hast auch in mühsamste Arbeit mein fehlerhaftes Deutsch korrigiert und eine lesbare Arbeit so entstehen lassen. Du hast deine Erfahrung in der Wissenschaft, die meine eigene weit überragt, mit mir geteilt ohne belehrend zu sein und dabei eine endlose Geduld gezeigt. Für deine Liebe und deine Unterstützung bin ich dir sehr dankbar. Abschließen möchte ich mit den Worten meiner Tochter Hedda (vier Jahre alt) auf die Frage wie lange sie noch braucht. „Nicht so lange wie Papa mit der Doktorarbeit“.

Vielen Dank

Erklärung zu den Abbildungen die auch in der Publikation „Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate“ verwendet wurden.

Alle Abbildungen, die sowohl in dieser Dissertation als auch in der Publikation „*Primary MHC-Class II⁺ Cells Are Necessary To Promote Resting Vδ2 Cell Expansion in Response to (E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl-Pyrophosphate and Isopentenyl Pyrophosphate*“ verwendet wurden, basieren auf von mir geplanten und durchgeführten Experimenten (unterstützt durch die Labormitarbeiter*innen Gaby Haley, Nelli Baal und Andreas Wachtendorf).

Im Einzelnen:

Abbildung: 9 und 11: exemplarische Punktdiagramme aus der Datenerhebung für die Erstellung von Abbildung 10

Abbildung 10: Balkendiagramm mit der Darstellung der Vd2-Expansion nach HMB-PP-Stimulation in Abwesenheit oder Anwesenheit von MCH-II⁺-Zellen. Die Daten wurden mit punktueller Unterstützung der Labormitarbeiter*innen hauptsächlich durch mich persönlich erhoben.

Abbildung 12: Balkendiagramm mit der Darstellung der Vd2-Expansion nach HMB-PP-Stimulation in Ko-Kulturen mit CD8⁺, Cd4⁺ oder MHC-II⁺ Zellen. Zudem die Darstellung der Proliferation der Vd2⁺-Zellen in Monokultur sowie als Negativkontrolle dienend die Ko-Kulturen mit MHC-II⁻-Zellen. Die Daten wurden mit punktueller Unterstützung der Labormitarbeiter*innen hauptsächlich durch mich persönlich erhoben.

Abbildung 13: Darstellung der MHC-II-Expression unterschiedlicher Zellreihen als Balkendiagramm mit dazugehörigen beispielhaften Punktdiagrammen. Die Daten wurden nach vorheriger Planung durch mich hauptsächlich durch Gaby Haley mit punktueller Unterstützung meinerseits erhoben.

Abbildung 14: Balkendiagramm mit der Darstellung der Vd2-Expansion nach HMB-PP-Stimulation in Ko-Kulturen mit unterschiedliche Zellreihen. Die Daten wurden nach vorheriger Planung durch mich hauptsächlich durch Gaby Haley mit punktueller Unterstützung meinerseits erhoben.

Abbildung 15 und 16: Balkendiagramme mit der Darstellung der Vd2-Expansion nach HMB-PP-Stimulation nach vorheriger Blockade mit MHC-II-Antikörper. Die Daten wurden durch mich persönlich erhoben.

Abbildung 17 A und B: Balkendiagramm sowie dazugehöriges exemplarisches Punktdiagramm zur Darstellung der MHC-II-Expression an zuvor stimulierten CD4⁺-Zellen. Die Daten wurden durch mich persönlich erhoben

Abbildung 18: Balkendiagramm mit der Darstellung der Vd2-Expansion nach HMB-PP-Stimulation in Ko-Kultur mit aktivierten (und damit MHC-II⁺) autologen CD4⁺-Zellen. Die Daten wurden durch mich persönlich erhoben

Abbildung 19: Exemplarisches Punktdiagramm zur Darstellung der Proliferation von CD8⁺-Zellen nach Stimulation durch CD1c⁺-Zellen, die vorher mit MHC-II-Antikörper behandelt wurden. Die Daten wurden mit punktueller Unterstützung der Labormitarbeiter*innen hauptsächlich durch mich persönlich erhoben.

Abbildung 20: Balkendiagramm zur Darstellung der Proliferation von CD8⁺-Zellen nach Stimulation durch CD1c⁺-Zellen, die vorher mit MHC-II-Antikörper behandelt wurden. Die Daten wurden mit punktueller Unterstützung der Labormitarbeiter*innen hauptsächlich durch mich persönlich erhoben.