
V γ 9⁺/V δ 2⁺ T-LYMPHOZYTEN

**ENTWICKLUNG VON T_H1-, T_H2- SOWIE T_{FH}-ÄHNLICHEN ZELLEN NACH
ZYTOKINSTIMULATION**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Anne Katharina Klein
aus Kirschweiler (Rheinland-Pfalz)

Gießen, 2014

Aus dem Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Direktor:
Prof. Dr. med. Gregor Bein

Gutachter: PD Dr. H. Jomaa

Gutachter: Prof. Dr. M. Kracht

Tag der Disputation: 17.04.2013

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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 Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Bern (Schweiz), den 04.09.2014

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Definition
APC	Antigen-Presenting Cells (Antigen-präsentierende Zelle)
BCA	B-Cell Attracting Chemokine
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Complementary Deoxyribonucleic Acid
DMAPP	Dimethylallyl Pyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ECD	Electron Coupled Dye (Phycoerythrin-Texas Red Konjugat)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
FMR 1	Fragile X Mental Retardation 1 (Gene)
GC	Germinal Center (Keimzentrum)
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Humanes Immundefizienz-Virus)
HMB-PP	(E)-4-Hydroxy-3-Methyl-But-2-Enyl Pyrophosphat
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPP	Isopentenyl Pyrophosphat
LSM	Lymphocyte Separation Medium
MACS	Magnetic Cell Sorting
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein

MED	Medium
MEP	2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphate
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate-Buffered Saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PES	Polyethersulfon
PHA	Phytohaemagglutinin
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
ROR	Retinoid Orphan Receptor
RPMI	Zellkulturmedium entwickelt von Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction
TAE	Tris-Acetat-Ethylendiamintetraessigsäure
T _{CM}	Central Memory T-cells
TCR	T Cell Receptor (T-Zellrezeptor)
T _{EM}	Effector Memory T-cells
T _H	T-Helferzelle
T _{FH}	Follikuläre T-Helferzelle
TGF	Transforming Growth Factor
TNF	Tumor necrosis factor (Tumornekrosefaktor)
UV	Ultraviolett

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	VIII
Summary	IX
1. Einleitung	1
1.1. Das Immunsystem – ein kurzer Überblick	1
1.2. $\alpha\beta$ T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen	2
1.3. Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen.....	3
1.3.1 Die Antigenerkennung	3
1.4. Untergruppen und Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen in Analogie zu $\alpha\beta$ T-Zellen	3
1.4.1 T_H1 -, T_H2 - und T_H17 -Zellen.....	3
1.4.2 Regulatorische T-Zellen.....	4
1.4.3 T_{FH} -Zellen	5
1.5. Zielsetzung der Arbeit.....	5
2. Material	6
2.1. Blutspender (Buffy coats)	6
2.2. Chemikalien.....	6
2.3. Verwendete Stimulanzen.....	7
2.4. Lösungen und Puffer	7
2.4.1 Agarose-Gel.....	7
2.4.2 Einfriermedium.....	7
2.4.3 Lyse-Puffer.....	7
2.4.4 MACS-Puffer.....	7
2.4.5 TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA).....	7
2.4.6 Wachstumsmedium	8
2.5. Fertig –Kits	8
2.5.1 RNeasy Mini Kit (50)	8
2.5.2 Magnetic Cell Sorting of Human Leukocytes	8
2.6. Monoklonale Antikörper.....	8
2.7. Enzyme	9
2.8. Primer.....	9

2.9. Geräte	10
2.10. Sonstiges Material	11
3. Methoden	12
3.1. Lymphozytenseparation mit LSM [®] (ICN/ Cappel)	12
3.2. Zellen Einfrieren	12
3.3. Zellen auftauen	13
3.4. Zellen ansetzen	13
3.4.1 Ansätze zur Optimierung der Lymphozytenaktivierung	13
3.4.2 Ansätze zur Stimulation der Lymphozyten	14
3.5. FACS	15
3.5.1 Anteil der V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten an Gesamtlmphozyten	15
3.5.2 Überprüfung der Aktivierung von V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten	16
3.5.3 Überprüfung der Aktivierung und Isolation von V γ 9 ⁺ T-Zellen	16
3.6. RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction)	17
3.6.1 $\gamma\delta$ T-Zell Isolation mit MACS (Magnetic Cell Sorting)	17
3.6.1.1 Vorbereitung der Zellen	17
3.6.1.2 Markieren der Zellen	17
3.6.1.3 Separieren der V γ 9 ⁺ T-Zellen mit MS ⁺ /RS ⁺ -Säulen	17
3.6.2 RNA-Isolation mit RNeasy Mini Kit Size: 50 (Qiagen)	18
3.6.3 RNA- Reverse Transkription	19
3.6.4 Semiquantitative RT-PCR mit standardisierter cDNA	20
3.6.5 Gel-Elektrophorese	22
3.6.6 Auswertung mit der Bildbearbeitungssoftware Image j	22
4. Ergebnisse	23
4.1. Tests der Blutproben	23
4.1.1 Die Blutspender	23
4.1.2 Aktivierungstests	25
4.1.2.1 Nach 3 Tagen Inkubation	25
4.1.2.2 Nach 6 Tagen Inkubation	26
4.2. Zeitliche Abfolge der einzelnen Arbeitsschritte	28

4.3.	$\gamma\delta$ T-Zell Aufreinigung mit MACS (Magnetic Cell Sorting)	29
4.4.	RNA-Isolation	31
4.5.	RNA- Reverse Transkription.....	32
4.6.	RT-PCR und Gel-Elektrophorese	35
4.6.1.1	IL-4 Expression	37
4.6.1.2	IL-21 Expression	38
4.6.1.3	IL-21R Expression	39
4.6.2	Interferone	40
4.6.2.1	IFN- γ Expression	40
4.6.2.2	IL-28RA Expression	41
4.6.3	LT- α Expression.....	42
4.6.4	Chemokine.....	43
4.6.4.1	BCA-1 Expression.....	43
4.6.4.2	MCP-1 Expression	44
4.6.4.3	MIP-1 α Expression.....	45
4.6.5	Transkriptionsfaktoren	46
4.6.5.1	FoxP3 Expression.....	46
4.6.5.2	GATA-3 Expression	47
4.6.5.3	T-bet Expression.....	48
4.6.6	FMR-1 Expression	49
4.6.7	Zusammenfassung der PCR Ergebnisse.....	49
5.	Diskussion	52
5.1.	Methodenwahl und Limitierungen.....	52
5.1.1	Auswahl der Blutspender	52
5.1.2	Zusammenfassende Darstellung der Experimente	52
5.2.	Ergebnisse der RT-PCR und Image-J Analyse	56
5.2.1	IL-15 versus IL-2 stimulierte $\gamma\delta$ T-Lymphozyten	56
5.2.2	IL-4.....	59
5.2.3	IL-21.....	60
5.2.4	IFN- β	62

5.2.5	IFN- λ_2	62
5.2.6	TGF- β	64
5.3.	Zusammenfassende Darstellung der möglichen Funktionen von V γ 9 ⁺ /V δ 2 ⁺ T-Zellen	65
5.3.1	T _H 1-ähnliche Zellen.....	65
5.3.2	T _H 2-ähnliche Zellen.....	65
5.3.3	Regulatorische $\gamma\delta$ T- Zellen	65
5.3.4	T _{FH} -ähnliche Zellen	66
6.	Abbildungsverzeichnis	68
7.	Tabellenverzeichnis	71
8.	Literaturverzeichnis	72
9.	Danksagung.....	81

ZUSAMMENFASSUNG

Das menschliche Immunsystem wird, in ein unspezifisches (angeborenes) und ein spezifisches (adaptives) Immunsystem unterteilt. Während dem unspezifischen Immunsystem beispielsweise Makrophagen und NK-Zellen zugeordnet werden, zählen B-Lymphozyten und T-Lymphozyten zum spezifischen Immunsystem. Humane $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen bilden eine Untergruppe der T-Zell-Population im Blut, deren Anteil etwa 1-5% der Lymphozyten insgesamt ausmachen. Bei einer T-Zellrezeptor (TCR)-Aktivierung dieser Zellen durch nicht-peptidische Moleküle (z. B. HMB-PP), wie sie bei Infektionen mit intrazellulären Pathogenen vorkommen, steigt dieser Anteil jedoch drastisch an. Nach den heutigen Erkenntnissen nehmen humane $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen eine besondere Position innerhalb des Immunsystems ein, da sie sowohl Eigenschaften aufweisen, welche den NK-Zellen ähnlich sind, als auch Eigenschaften, welche denen der $\alpha\beta$ T-Zellen gleichen. Daher ist eine genaue Einordnung in das bisherige Modell des menschlichen Immunsystems schwierig.

In dieser Arbeit wird das Verhalten aktivierter $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen anhand ihrer Reaktion auf bestimmte Zytokine im Vergleich zu anderen Zellen des Immunsystems (insbesondere $\alpha\beta$ T-Zellen) analysiert und interpretiert. Dazu wurden Leukozyten aus PBMC isoliert, mit HMB-PP und verschiedenen Zytokinen stimuliert und anschließend die $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen isoliert. Die Genaktivität ausgewählter Zytokine wurde anhand semiquantitativer RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) untersucht und mittels Image-J Analyse ausgewertet.

Unter Stimulation mit HMB-PP und Zugabe entsprechender Zytokine konnte eine Zunahme der Polarisation in T_H1 - und T_H2 -ähnlichen $\gamma\delta$ T-Zellen festgestellt werden. Mit natürlichem Aktivator HMB-PP und IL-4 konnte ein Switch zu $\gamma\delta T_H2$ -Zellen hervorgerufen werden. Weiterhin geben die Ergebnisse dieser Arbeit Hinweise auf eine mögliche Entwicklung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit regulatorischer Funktion durch IL-21, IFN- λ_2 oder TGF- β . Allerdings ist unter Einfluss von IL-21 ebenso eine Entwicklung in Effektor-T-Gedächtniszellen (T_{EM}) nicht auszuschließen. $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen spielen scheinbar aber auch eine Rolle in der Entwicklung und Organisation sekundär lymphatischer Organe, da es insbesondere durch Stimulation mit IL-21 zu einer vermehrten Expression von BCA-1 und LT- α kommt. Dadurch können diese Zellen wie $\alpha\beta T_{FH}$ -Zellen in lymphatische Follikel einwandern und die Antikörperbildung von B-Lymphozyten unterstützen.

SUMMARY

The Human immune system is simply subdivided into unspecific (innate) and specific (acquired) immune response systems. While macrophages and NK cells form part of the innate immune response, B-lymphocytes and T-lymphocytes organize the acquired immune response. Humane $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-cells constitute a subdivision of the T-cell blood population which represents approximately 1-5% of all lymphocytes. After TCR-activation of these cells by non-peptide molecules (like HMB-PP), which occurs through infection with intracellular pathogens, the percentage occurrence increases dramatically. According to present knowledge, human $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-cells form a special position within the immune system, since they have two qualities: qualities that are similar to NK cells, as well as properties which are similar to the $\alpha\beta$ T-cells. Therefore, it is difficult to precisely classify today's model of the human immune system.

In this work the behavior of activated $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-cells are analyzed and investigated by observing their response to certain cytokines in comparison to other cells of the immune system (particularly $\alpha\beta$ T-cells). Accordingly, Lymphocytes from PBMCs were isolated and stimulated with HMB-PP and various cytokines. After that human $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T cells were isolated. The gene activity of selected cytokines were analysed by a semi quantitative RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) and Image J.

Through this method, the existence of T_H1 and T_H2 like $\gamma\delta$ T-cells was confirmed. It was also possible to cause stimulation with IL-4 to make a switch to $\gamma\delta T_H2$ -cells. Furthermore, the results of this study indicate the possible development of $\gamma\delta$ T-cells as an adjustable function via IL-21, IFN- λ_2 or TGF- β . However, it has to be noted, that under the influence of IL-21, memory side effects to $\gamma\delta$ T-cells or even the development in T_{EM} -cells cannot be excluded. Apparently, $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-cells play also a role in the formation and organization of secondary lymphoid tissues, as specific stimulation with IL-21 leads to an increased expression of BCA-1 and LT- α . This reaction allows these cells to migrate into the lymphoid follicles and thereby encourages the formation of antibodies in B-lymphocytes as well as $\alpha\beta T_{FH}$ -cells.

1. EINLEITUNG

1.1. DAS IMMUNSYSTEM – EIN KURZER ÜBERBLICK

Das Immunsystem des Menschen wird in eine unspezifische (angeborene) Immunabwehr und eine spezifische (adaptive) Immunabwehr unterteilt. Die unspezifische unterscheidet nur zwischen „gefährlich“ und „harmlos“, dadurch setzt sie sehr schnell ein. Im Gegensatz dazu wird die spezifische Immunabwehr erst nach der ersten Phase der Immunabwehr, der sogenannten Induktionsphase, wirksam. Sie leitet die zweite Phase (die Abwehr-, Effektor- und Leistungsphase) mit einer hohen Spezifität für infektiöse Agenzien und viele weitere Antigene ein. (Janeway 2005)

Weiterhin unterscheidet man zwischen der zellulären Komponente, den Leukozyten, und der humoralen Komponente, den Antikörpern und Komplementfaktoren. Die Leukozyten entstehen aus einer pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks, die sich über die myeloische und die lymphoide Stammzelle weiterentwickelt. In der myeloischen Reihe nehmen polymorphkernige Granulozyten und monozytäre Zellen (Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen etc.) ihren Ursprung. Sie sind für die teils unspezifische Eliminierung und Antigenpräsentation in der ersten Phase der Immunabwehr zuständig. Aus der lymphoiden Stammzelle entwickeln sich die Lymphozyten. Sie sind Träger der spezifischen Immunabwehr und differenzieren sich weiter aus zu B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und NK-Zellen (natural killer-cells).

Nach Ausdifferenzierung in den Reifungsorganen treten die Lymphozyten als naive Zellen, d. h. Zellen ohne Antigenkontakt, in den Blutkreislauf ein und wandern in die sekundär lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten, MALT (mucosa associated lymphoid tissue) ein. Durch die Antigenpräsentation von Dendritischen Zellen entwickeln sich die Lymphozyten weiter zu Effektorzellen, die je nach Stimulation unterschiedliche Funktionen einnehmen. Während dieser Entwicklung und Differenzierung werden eine Vielzahl von Membranproteinen exprimiert, die den Entwicklungsstand der jeweiligen Zelle beschreiben. Beispielsweise tragen reife T-Lymphozyten (auch T-Zellen genannt) immer das Membranprotein CD3 auf ihrer Oberfläche und werden als CD3⁺ Zellen bezeichnet. Die B-Lymphozyten (auch B-Zellen genannt) tragen Immunglobuline auf Ihrer Oberfläche. Sie reagieren auf Antigene mit einer Ausdifferenzierung in Richtung Plasmazelle. Plasmazellen

können Antikörper bilden und sind somit Teil der humoralen Immunität. (Janeway 2005)

Die NK-Zellen hingegen exprimieren F_c -Rezeptoren und aktivierende NK-Rezeptoren wie NKG2D, wodurch sie Tumorzellen erkennen und lysieren können (Moretta 2001; Hof 2005).

Die T-Zellen lassen sich anhand verschiedener Merkmale in diverse Untergruppen einteilen, welche nachfolgend näher beschrieben werden.

1.2. $\alpha\beta$ T-ZELLEN UND $\gamma\delta$ T-ZELLEN

T-Zellen tragen als wichtigstes Merkmal den T-Zellrezeptor (TCR), welcher zur Antigenerkennung notwendig ist.

Der strukturelle Unterschied der $\alpha\beta$ T-Zellen zu den $\gamma\delta$ T-Zellen liegt im Aufbau des jeweiligen TCR. Während der TCR der $\alpha\beta$ T-Zellen aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut ist, besteht der TCR der $\gamma\delta$ T-Zellen aus einer γ - und einer δ -Kette (Janeway 1988).

$\alpha\beta$ T-Zellen tragen zusätzlich zum TCR noch die Merkmale CD4 oder CD8, welche eine Rolle für Entwicklung und Antigenerkennung spielen (MHC I oder II (major histocompatibility complex) abhängig), während die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen CD4⁻/CD8⁻ negativ sind. (Hurez 1992). Im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T-Zellen ist zur spezifischen Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen keine klassische Antigenpräsentation mit MHC notwendig. Sie können MHC-unabhängig auf Antigene reagieren, welche von den gewöhnlichen peptidischen Antigenen der $\alpha\beta$ T-Zellen abweichen (Pfeffer 1990; Tanaka 1994).

Dadurch sind Prozessieren und Präsentieren von höher spezifischen Antigen-Rezeptoren in lymphoiden Organen, wie sie für $\alpha\beta$ T-Lymphozyten bekannt sind, nicht notwendig (Hayday 2003).

Die meisten $\gamma\delta$ T-Zellen sind CD3⁺/CD4⁻/CD8⁻ (Moretta 1991). Die am meisten im Blut des Erwachsenen vorkommenden humanen peripheren Blut- $\gamma\delta$ T-Lymphozyten sind dementsprechend die V γ 9⁺/V δ 2⁺ T-Zellen. Sie bilden mit etwa 0,5-5% eine Minderheit der peripher zirkulierenden T-Lymphozyten (Triebel 1989; Brenner 1988). Jedoch können sie infolge einer Infektion mit Erregern, welche die niedermolekulare Verbindung HMB-PP ((E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphat) produzieren (siehe Kapitel 1.3), vorübergehend bis über 50% innerhalb einer Woche expandieren.

V γ 9⁺/V δ 2⁺ T-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Infektion von mikrobiellen Pathogenen (Eberl 2003, Eberl 2004). Dazu gehören zahlreiche Viren, Bakterien, Protozoen und Tumor-Antigene, die zu einer spezifischen Aktivierung und oligoklonaler Expansion führen (Cipriani 2000). Anhand des derzeitigen Modells kann man vermuten, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eine Rolle bei der Tumorkontrolle und der Immunregulation spielen (Hayday 2003).

1.3. AKTIVIERUNG DER $\gamma\delta$ T-ZELLEN

Verschiedene mikrobiologische Pathogene können eine Aktivierung der V γ 9⁺/V δ 2⁺ T-Zellen herbeiführen. Dazu gehören Bakterien wie Bruzellen, Campylobacter, Ehrlichia, E. coli, Francisella, Listerien, Mykobakterien, Pseudomonaden, Salmonellen, Yersinien sowie Protozoen, Plasmodien und Toxoplasmen (Sicard 2000). Als potentester Aktivator der humanen peripheren Blut-V γ 9⁺/V δ 2⁺ T-Zellen gilt die niedermolekulare Verbindung HMB-PP (Gossman 2002). Sie ist ein Zwischenprodukt des alternativen Nicht-Mevalonat-Stoffwechselweges, der Isoprenoid-Biosynthese, auch MEP-Stoffwechselweg (2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate) genannt. Sie kommt in allen V γ 9⁺/V δ 2⁺ T-Zellen stimulierenden mikrobiellen Pathogenen vor und ist in nicht stimulierenden Mikroorganismen (z. B. Streptokokken, Staphylokokken und Pilzen) nicht vorhanden (Hinz et al. 2003). HMB-PP gilt als effektivster Aktivator von $\gamma\delta$ T-Zellen (Gossman 2002).

1.3.1 DIE ANTIGENERKENNUNG

Bukowski fand schon 1995 heraus, dass die Gegenwart des $\gamma\delta$ -TCRs notwendig ist (Bukowski 1995). Seit kurzem wurde herausgefunden, dass Butyrophilin 3A1 als antigen-präsentierendes Molekül fungiert und scheinbar für die Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen notwendig ist (Vavassori 2013).

1.4. UNTERGRUPPEN UND FUNKTION DER $\gamma\delta$ T-ZELLEN IN ANALOGIE ZU $\alpha\beta$ T-ZELLEN

1.4.1 T_H1-, T_H2- UND T_H17-ZELLEN

Die CD4⁺ $\alpha\beta$ T-Zellen differenzieren, abhängig vom Antigen und dem vorherrschenden Zytokinmilieu bei Antigenkontakt, aus naiven T-Zellen in T_H1-, T_H2- (Mosmann 1996) oder T_H17-Zellen (Ivanov 2006). Diese unterscheiden sich deutlich

in ihrer Zytokinproduktion und dementsprechend auch in ihrer Funktion. T_H1 -Zellen exprimieren insbesondere $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und $IL-2$ und benötigen dazu den Transkriptionsfaktor T-bet (Szabo 2000). Sie sind für die zelluläre Immunantwort gegen intrazelluläre Erreger essenziell. T_H2 -Zellen produzieren $IL-4$, $IL-5$, $IL-10$ und $IL-13$ mit Hilfe des Transkriptionsfaktors GATA-3 (Zheng 1997) und unterstützen die humorale Immunantwort zur Elimination extrazellulärer Erreger (Mosmann 1996; Wen 1998; Wurster 2002). Viele Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen sind denen der $CD4^+$ und $CD8^+$ $\alpha\beta$ T-Zellen ähnlich. So gibt es auch bei den $\gamma\delta$ T-Zellen zwei Untergruppen, die anhand ihrer Zytokinproduktion in T_H1 - und T_H2 -ähnliche Zellen unterschieden werden können (Wesch 2001). Die Differenzierung dieser Zellen ist wie bei den $\alpha\beta$ T-Zellen vom Zytokinmilieu bei Antigenkontakt abhängig (Wesch 2001; Yin 2000).

Neben T_H1 - und T_H2 -Zellen gibt es weitere $\alpha\beta$ T-Zelluntergruppen. T_H17 -Zellen produzieren $IL-17$ und $IL-22$. Sie exprimieren vermehrt den Transkriptionsfaktor ROR- γ t (retinoid orphan receptor- γ t) für $IL-17$ (Ivanov 2006) und unterstützen die Immunabwehr gegen Pilzinfektionen (Acosta-Rodriguez 2007b; Huang 2004). Die Induktion der $\alpha\beta$ T_H17 -Zellen erfolgt durch $IL-6$, $IL-1\beta$ und $IL-23$ (Wilson 2007; Acosta-Rodriguez 2007a) sowie durch niedrige Dosen von TGF- β (Yang 2008; Manel 2008).

1.4.2 REGULATORISCHE T-ZELLEN

Die regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) stellen eine weitere Untergruppe der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten dar und sind zuständig für die Regulierung der Immunantwort.

Sie werden wahrscheinlich durch TGF- β und Antigenstimulation mit darauffolgender FoxP3 (forkhead box P3) Expression aktiviert (Chen 2003), jedoch ist der genaue Vorgang noch nicht ganz geklärt (Sallusto 2009). FoxP3 encodiert den Transkriptionsfaktor Scurfin und ist essenziell für die Entwicklung der T_{Reg} -Zellen (Chen 2003). Er ist spezifisch für diese Zelllinie und wird daher auch als Marker genutzt (Khattari 2003; Schubert 2001). T_{Reg} -Zellen sekretieren große Mengen an TGF- β , wodurch die Proliferation der T-Zellen sowie die Zytokinproduktion von T_H1 - und T_H2 -Zellen inhibiert werden (Chen 2003).

Des Weiteren gibt es $\alpha\beta$ T-Zellen, die große Mengen des immunoregulatorischen Zytokins $IL-10$ produzieren. Diese Zellen exprimieren kein FoxP3 und supprimieren durch Sekretion von $IL-10$ und TGF- β . (Roncarolo 2006; Sallusto 2009).

1.4.3 T_{FH}-ZELLEN

Eine weitere Untergruppe der CD4⁺ αβ T-Zellen bilden die folliculären T-Helferzellen (T_{FH}-Zellen). Sie exprimieren den Chemokinrezeptor CXCR5, der CXCL13 erkennt, auch als BCA-1 (B-cell attracting chemokine 1) bekannt, und können aufgrund dessen in die Keimzentren lymphatischer Follikel einwandern, um B-Zellen bei der Antikörperbildung zu unterstützen (Vinuesa 2005). Nach Induktion mit IL-21 (Vogelzang 2008; Nurieva 2008) produzieren sie große Mengen an IL-21 und mäßig viel IL-10 (Vinuesa 2005). Geht man davon aus, dass es sich bei GC (germinal center) αβ T-Lymphozyten um T_{FH}-Zellen handelt, produzieren diese auch BCA-1 (CXCL13) (Kim 2004). T_{FH}-Zellen unterscheiden sich in Phänotyp und ihrer Funktion deutlich von T_H1- und T_H2 Zellen (Rasheed 2006).

1.5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Wie vorangehend beschrieben wurden bereits Experimente durchgeführt, bei denen γδ T-Zellen in verschiedenen Modellen (vorwiegend im Mausmodell) unter verschiedenen Bedingungen (unterschiedliche Zytokinstimulationen und andere Aktivatoren als die natürliche Verbindung HMB-PP) untersucht wurden. Dabei kam es zu einer Beeinflussung der γδ T-Zellen in Abhängigkeit vom Zytokinmilieu der Umgebung.

Ziel dieser Arbeit ist es, Hinweise für die Plastizität humaner Vγ9⁺/Vδ2⁺ T-Zellen nach Aktivierung mit HMB-PP und Stimulation verschiedener Zytokine zu erhalten. Dafür wird die Reaktion auf folgende Zytokine näher betrachtet: IL-15, IL-2, IL-4, IL-21, IFN-β, TGF-β und IFN-λ₂. Es ist von Interesse, ob sich γδ T-Zellen nach Stimulation ähnlich verhalten wie αβ T-Zellen. Wie aufgeführt gibt es bekannte αβ T-Zell Subtypen wie zum Beispiel T_H1- und T_H2-Zellen, welche sich in Abhängigkeit vom vorherrschenden Umgebungsmilieu entwickeln. Mit diesen Experimenten werden Hinweise gesucht, ob γδ T-Zellen die Funktion von αβ T-Zellen nachahmen und eine ähnliche Plastizität und Funktion aufweisen.

Hierzu wurden γδ T-Zellen von drei Blutspendern mit oben genannten Zytokinen sowie HMB-PP unter definierten Bedingungen stimuliert, um anschließend die Genaktivität bestimmter Zytokine und Transkriptionsfaktoren mittels RT-PCR (Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction) zu untersuchen.

2. MATERIAL

2.1. BLUTSPENDER (BUFFY COATS)

Bei dem untersuchten humanen Blut handelte es sich um Buffy coats von anonymen Blutspendern aus der Blutbank in Gießen: B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15, AK, JH, KW, ME, MZ, SW.

2.2. CHEMIKALIEN

Agarose (NuSieve GTG Agarose)	(BioScience, Cambrex, Rockland, USA)
nukleasefreies H ₂ O:	
Aqua ad iniectabilia Braun (20 x 20ml)	(B. Braun AG, Melsungen)
Aqua ad iniectabilia (Vol.: 1000ml)	(Baxter D GmbH, Unterschleißheim)
Aqua ad iniectabilia (Vol.: 20ml)	(Baxter D GmbH, Unterschleißheim)
β-Mercaptoethanol (100%)	(Buchs Chemie GmbH, Melsungen, CH)
DMSO (Dimethylsulfoxid MM 78,13g/mol)	(Fluka, Neu-Ulm)
DNA ladder 100bp Conc.: 1µg/µl	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
dNTPs (BD Advantage™ UltraPure PCR Denucleotide Mix)	
Conc.: 10mM each dNTP Vol.: 4x 100µl	(Becton Dickinson GmbH Biosciences, Heidelberg)
EDTA	(Merck KGaA, Darmstadt)
Essigsäure	(Sigma-Aldrich, Seelze)
EtBr Conc.: 10mg/ml	(Sigma, Deisenhofen)
EtOH 99,8% MM 46,07g/mol	(Merck KGaA, Darmstadt)
fetales Kälberserum (FCS)	(Sigma, Deisenhofen)
Gentamycin Conc.: 50mg/ml	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
humanes AB Serum	(BRK Augsburg)
L-Glutamin Conc.: 50mg/ml	(Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
LSM (Lymphocyte Separation Medium)	(ICN, Cappel)
Na-Acetat	(Merck KGaA, Darmstadt)
PBS (10x) (CaCl ₂ , MgCl ₂ , pH 7,4)	(GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	(GIBCO/Invitrogen, Karlsruhe)
Tris-HCl Conc.: MM 121,14g/mol	(Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

2.3. VERWENDETE STIMULANZIEN

PHA (Phytohaemagglutinin)	(Sigma, Deisenhofen)
HMB-PP ((<i>E</i>)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphat)	(Dr. Reichenberg/ Arbeitsgruppe Jomaa, Gießen)
IL-2	(Proleukin - Chiron, München)
IL-4	(Promocell, Heidelberg)
IL-15	(Promocell, Heidelberg)
IL-21	(Dr. Foster, Zymogenetics, Seattle, USA)
IFN- β	(Dr. Oschmann, Neurologie, Gießen)
IFN- λ_2	(Dr. Kotenko, New Jersey, USA)
TGF- β	(Promocell, Heidelberg)

2.4. LÖSUNGEN UND PUFFER

2.4.1 AGAROSE-GEL

TAE-Puffer supplementiert mit
3% NuSieve GTG Agarose

2.4.2 EINFRIERMEDIUM

WM supplementiert mit
20% humanes AB Serum
10% DMSO

2.4.3 LYSE-PUFFER

RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit (50)) supplementiert mit
10 μ l β -Mercaptoethanol (100%)

2.4.4 MACS-PUFFER

PBS supplementiert mit
5% FCS (fetales Kälberserum)
2mM EDTA

2.4.5 TAE-PUFFER (TRIS-ACETAT-EDTA)

H₂O supplementiert mit
40mM Tris-Puffer 40mM Na-Acetat
2mM EDTA

Mit Essigsäure den pH-Wert gegebenenfalls auf 8,3 einstellen.

2.4.6 WACHSTUMSMEDIUM

RPMI 1640 supplementiert mit
25µg/ml Gentamycin
2mM L-Glutamin
10% humanes AB Serum

2.5. FERTIG –KITS

2.5.1 RNEASY MINI KIT (50)

Size: 50 (Qiagen GmbH, Hilden)
RNeasy mini spin columns (pink) 50
Collection tubes (1,5ml) 50
Collection tubes (2ml) 50
Buffer RLT 45ml
Buffer RW1 45ml
Buffer RPE 11ml
RNase-free water 10ml

2.5.2 MAGNETIC CELL SORTING OF HUMAN LEUKOCYTES

(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach)
TCR γ/δ Hapten Antibody
MACS Anti-Hapten MicroBeads-FITC
Positive Selection Columns type MS⁺/RS⁺ MACS
Separator octo MACS

2.6. MONOKLONALE ANTIKÖRPER

V γ 9-PC5, Maus, IgG1 Klon: IMMU360 (Beckmann Coulter, Marseille, F)
CD3-ECD, Maus, IgG1 Klon: UCHT1 (Beckmann Coulter, Marseille, F)
CD25-PE, Maus, IgG1 Klon: B1.49.9 (Beckmann Coulter, Marseille, F)

2.7. ENZYME

SuperScript III RT	Conc.: 200U/μl	(Life technologies/Invitrogen)
Im Set enthalten:	5x First-Strand Buffer	0,1M
	DTT	
GoTaq DNA Polymerase	Conc.: 5U/μl	(Promega D GmbH, Mannheim)
Im Set enthalten:	5x Green Go Taq™ Buffer (final: 1,5mM MgCl ₂)	
RNase-Free DNase Set (50)		(Qiagen GmbH, Hilden)
Im Set enthalten:	DNase I, RNase-free	
	Buffer RDD	
	RNase-free water	

2.8. PRIMER

Die folgenden Primer wurden von Thermo Electron GmbH in Ulm bezogen. Es handelt sich hierbei um Intron-übergreifende Primer:

BCA-1 forw.	5'-TGA TCG AAT TCA AAT CTT GCC CCG TG-3'
BCA-1 rev.	5'-AAG CTT GAG TTT GCC CCA TCA GCT CC-3'
Cyclophilin forw.	5'-AAA GCA TAC GGG TCC TGG CAT-3'
Cyclophilin rev.	5'-CGA GTT GTC CAC AGT CAG CAA TG-3'
FMR-1 forw.	5'-CCA ACA AAC CTG CCA CAA AAG-3'
FMR-1 rev.	5'-CCT GAT CCT CTC CAT AAA TAT-3'
FoxP3 forw.	5'-ATG CCT CCT CTT CTT CCT TGA-3'
FoxP3 rev.	5'-ATT GTG CCC TGC CCT TCT CA-3'
GATA-3 forw.	5'-CTG CAA TGC CTG TGG GCT C-3'
GATA-3 rev.	5'-GAC TGC AGG GAC TCT CGC T-3'
IFN-γ forw.	5'-GCA GGT CAT TCA GAT GTA GCG G-3'
IFN-γ rev.	5'-TGT CTT CCT TGA TGG TCT CCA CAC-3'
IL-4 forw.	5'-CTC TCT CAT GAT CGT CTT TAG CCT TTC-3'
IL-4 rev.	5'-AAC ACA ACT GAG AAG GAA ACC TCT GC-3'
IL-21 forw.	5'-GGC AAC ATG GAG AGG ATT GT-3'
IL-21 rev.	5'-GTT GGG CCT TCT GAA AAC AG-3'
IL-21R forw.	5'-ACA CCG ATT ACC TCC AGA CG-3'
IL-21R rev.	5'-CAT CCA TGT GGC AGG TGT AG-3'
IL-28RA forw.	5'-GGG AAC CAA GGA GCT GCT ATG-3'
IL-28RA rev.	5'-TGG CAC TGA GGC AGT GGT GTT-3'

IL-32 forw.	5'-GGT CCT CTC TGA TGA CAT GAA-3'
IL-32 rev.	5'-TCT ATG GCC TGG TGC TGT GAA-3'
LT- α forw.	5'-CCA TTC TGC CTC CAT TCT GAC-3'
LT- α rev.	5'-TAT TCC CCT CTC TCC ATC CTC C-3'
MCP-1 forw.	5'-CAA ACT GAA GCT CGC ACT CTC GCC TC-3'
MCP-1 rev.	5'-AGC ACA GAT CTC CTT GGC CAC AAT GG-3'
MIP-1 α forw.	5'-GCC CGG TGT CAT CTT CCT AAC CAA GC-3'
MIP-1 α rev.	5'-AGG GGA CAG GGG AAC TCT CAG AGC AA-3'
T-bet forw.	5'-CCC CAA GGA ATT GAC AGT TG-3'
T-bet rev.	5'-GGG AAA CTA AAG CTC ACA AAC-3'
Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer	Conc.: 0,5 μ g/ μ l; Size: 25 μ g (Invitrogen, Karlsruhe)

2.9. GERÄTE

Zentrifuge	MIKRO 200	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
Zentrifuge	Rotina 46 R	(Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
Durchflusszytometer	EPICS® XL	(Beckmann Coulter, Krefeld)
Software: Expo32 ADC		
Brutschrank		(Haeraeus, Hanau)
PCR-Gerät	TC – 512	(Techne, Stone, Staffordshire, UK)
Cell Counter	AC. T8	(Beckmann Coulter, Krefeld)
N2-Gefäß	ARPEGE 140	(Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf)
Gefrierschrank	economi-super	(Bosch, Stuttgart)
Einfriermaschine	NICOOL Plus PC	(Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf)
sterile Werkbank	HERA safe	(Heraeus, Hanau)
Pipetten	pipetman	Size: 2, 10, 20, 100, 200, 1000 (GILSON, Bad Camberg)
Filmkassette Polaroid	667 ISO 3000 DIN 36	(Polaroid GmbH, Offenbach)
Photokamera	Kodak Land Camera MP4	(Kodak, Rochester, USA)
UV-Lampe	Transluminator UVP	(Herolab GmbH, Wiesloch)
Gelkammer	The unleakable Horizontal Minigel System	(Angewandte Gentechnologie Systeme GmbH, Heidelberg)

2.10. SONSTIGES MATERIAL

E-cups Safe-Lock

Size: 0,5ml (Fischer Scientific GmbH, Schwerte)

Size: 1,5ml (Fischer Scientific GmbH, Schwerte)

Size: 2,0ml (Fischer Scientific GmbH, Schwerte)

PCR Tubes 0,2ml Thin Wall Strip (Stratagene, Amsterdam, NL)

PCR Caps Strip of 8 (Stratagene, Amsterdam, NL)

Pipettenspitzen:

Filter Tips DFL 10 steril Size: 10µl (GILSON, Bad Camberg)

Filter Tips DF 30 steril Size: 20µl (GILSON, Bad Camberg)

Filter Tips DF 100 steril Size: 100µl (GILSON, Bad Camberg)

Spitzen steril D 200 Size: 200µl (GILSON, Bad Camberg)

Spitzen steril D 1000 Size: 1000µl (GILSON, Bad Camberg)

Spitzen DL 10 Size: 10µl (GILSON, Bad Camberg)

Spitzen D 200 Size: 200µl (GILSON, Bad Camberg)

Spitzen D 1000 Size: 1000µl (GILSON, Bad Camberg)

Mikrotiterplatten Cellstar® U-Shape, TC-Plate, 96-well, steril, DNase/ RNase free
(Greiner bio-one, Hamburg)

Filter MILLEX® GP 0,22µm Millipore Express® PES Membrane
(Millipore Carrigtwohill, Colork, Ireland)

1ml Spritzen Injekt-F 0,01ml/1ml (B. Braum AG, Melsungen)

G20 Kanüle Microlance™ 3 0,9mm x 40mm
(BD Biosciences, Heidelberg)

Röhrchen runder Boden: 17,0/100mm steril (Greiner bio-one, Hamburg)

Röhrchen für das FACS-Gerät: Polystyrene Round-bottom Tube 12 x 75mm
steril: (BD Biosciences, Heidelberg)

unsteril: (MAGV, Rabenau-Londorf)

RR-Test tubes 15ml steril Cellstar® (Greiner bio-one, Hamburg)

Micro-Schraubenröhre 2ml sterilin (Sarstedt, Nümbrecht)

3. METHODEN

3.1. LYMPHOZYTENSEPARATION MIT LSM[®] (ICN/ CAPPEL)

Für die Lymphozytenseparation wurden in ein Falcon Röhrchen 12ml LSM vorgelegt und vorsichtig mit einer Schicht aus 16ml heparinisierendem Blut bedeckt. Nach einer Zentrifugation von 30min bei 400g und Raumtemperatur wurde der entstandene Lymphozyten-Ring mit einer Pasteurpipette geerntet. Die Lymphozyten wurden zwei Waschschritten mit RPMI und Gentamycin und einer Zentrifugation von 5min bei 400g und 4°C unterzogen. Das entstandene Pellet wurde in 10ml Wachstumsmedium resuspendiert.

Anschließend wurden die Lymphozyten mit dem Cell Counter gezählt. Für den Zellansatz wurde die Konzentration auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt (siehe Kapitel 4.1.1 Tabelle 4).

Das Wachstumsmedium setzte sich zusammen aus:

- 450ml RPMI 1640
- 250µl Gentamycin (final: 25µg/ml)
- 5ml L-Glutamin (final: 2mM)
- 50ml Humanes Albumin-Serum (final: 10%)

3.2. ZELLEN EINFRIEREN

Die isolierten Lymphozyten wurden mit 10% DMSO und 20% Serum versetzt und aliquotiert. Das Einfrieren wurde mit NICOOL Plus PC (Air Liquide Kryotechnik GmbH, Düsseldorf) durchgeführt.

Die Proben wurden bei + 4°C in die Einfriermaschine NICOOL Plus PC eingesetzt und in mehreren Schritten auf -140°C herab gekühlt:

- 6.2°C für 11min
- 6.6°C für 1min
- 40°C für 16min
- 140°C für 10min

Anschließend wurden die Zellen in flüssigem N₂ gelagert.

3.3. ZELLEN AUFTAUEN

Pro Röhrchen (runder Boden, 17,0/100mm steril, Greiner Labortechnik) wurden 4-5ml Wachstumsmedium vorgelegt. Die Zellen wurden in der Hand schnell aufgetaut und sofort in die vorbereiteten Röhrchen überführt, um das DMSO zu verdünnen. Darauffolgend wurden die Röhrchen mit Wachstumsmedium auf 12 ml aufgefüllt und bei 400g und 4 C 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml Wachstumsmedium aufgenommen, um die Zellzahl mit dem Cell Counter zu bestimmen. Anschließend wurden die Röhrchen erneut mit Wachstumsmedium aufgefüllt und bei 400g und 4 C 10min zentrifugiert.

3.4. ZELLEN ANSETZEN

Die Zellen der Lymphozytenseparation, bzw. die nach der Lymphozytenseparation eingefrorenen und wieder aufgetauten Zellen, wurden nun mit verschiedenen Stimulanzen angesetzt.

Für den Zellansatz wurde die Konzentration der Lymphozyten auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt (Eberl 2002a; Eberl 2002b). Dies diente dazu maximal 2×10^5 Zellen pro well, bei 100 l aufgetragenen Lymphozyten/ Wachstumsmedium-Gemisch, zu erhalten.

3.4.1 ANSÄTZE ZUR OPTIMIERUNG DER LYMPHOZYTENAKTIVIERUNG

Pro Well auf der Mikrotiterplatte wurden jeweils 200 l pipettiert. Diese setzten sich für die Ansätze 1 bis 14 aus 100 l Zellen, 50 l IL-2 und 50 l HMB-PP in folgenden finalen Konzentrationen zusammen (siehe Tabelle 1):

Tabelle 1: Ansätze zur Optimierung der Lymphozytenaktivierung

Ansätze	Zellen	IL-2	HMB-PP	PHA
1	$2 \times 10^3/\mu\text{l}$	100 U/ml	1 μM	-
2	$2 \times 10^3/\mu\text{l}$	100 U/ml	100 nM	-
3	$2 \times 10^3/\mu\text{l}$	100 U/ml	10 nM	-
4	$2 \times 10^3/\mu\text{l}$	100 U/ml	1 nM	-
5	$2 \times 10^3/\mu\text{l}$	100 U/ml	100 pM	-
6	$2 \times 10^3/\mu\text{l}$	100 U/ml	10 pM	-
7	$2 \times 10^3/\mu\text{l}$	100 U/ml	1 pM	-

Ansätze	Zellen	IL-2	HMB-PP	PHA
8	2 x 10 ³ /µl	10 U/ml	1 µM	-
9	2 x 10 ³ /µl	10 U/ml	100 nM	-
10	2 x 10 ³ /µl	10 U/ml	10 nM	-
11	2 x 10 ³ /µl	10 U/ml	1 nM	-
12	2 x 10 ³ /µl	10 U/ml	100 pM	-
13	2 x 10 ³ /µl	10 U/ml	10 pM	-
14	2 x 10 ³ /µl	10 U/ml	1 pM	-
15	2 x 10 ³ /µl	-	-	2,5 µg/ml

Für den 15. Ansatz wurden 100µl Zellen und 100µl PHA zusammenpipettiert. Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37°C und unter CO₂ für 3 (IL-2 Konzentration von 10U/ml) und für 6 Tage (IL-2 Konzentration von 100U/ml) inkubiert. Diese Stimulationszeiten wurden gewählt, da hiermit in früheren Experimenten dieser Arbeitsgruppe gute Ergebnisse erzielt wurden. Die eingesetzte IL-2 Konzentration ergibt sich aus Erfahrungswerten unserer Arbeitsgruppe (Eberl 2002a und b).

3.4.2 ANSÄTZE ZUR STIMULATION DER LYMPHOZYTEN

Für die Ansätze zur Stimulation der Lymphozyten wurden ebenfalls 200µl pro Well auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Die gewählten Konzentrationen für die Zytokine IL-2-, IL-15- und IL-21-basierten auf vorangegangenen Experimente unserer Arbeitsgruppe (Eberl 2002a und b). Die Konzentrationen der anderen Zytokine wurden anhand folgender Literatur ausgewählt: IL-4 (Wesch 2001), TGF-β (Cipriani 2000), IFN-β (Kunzmann 2004). IFN-λ₂ war zuvor nicht getestet worden, da dieses Zytokin zum Zeitpunkt der Arbeit erst neu entdeckt worden war. Daher basierten die eingesetzten Konzentrationen auf den Erfahrungswerten mit anderen Interferonen (IFN-α und IFN-β) (Kunzmann 2004; Kotenko 2003; Sheppard 2003)

In Tabelle 2 sind die eingesetzten Konzentrationen der Zytokine dargestellt:

Tabelle 2: Ansätze zur Stimulation der Lymphozyten

Ansätze	Zellen	HMB-PP	IL-2	IL- 4	IL-15
1	2 x 10 ³ /µl	-	-	-	-
2	2 x 10 ³ /µl	1 nM	-	-	-
3	2 x 10 ³ /µl	1 nM	100 U/ml	-	-
4	2 x 10 ³ /µl	1 nM	-	10 ng/ml	-
5	2 x 10 ³ /µl	1 nM	-	-	10 ng/ml

Ansätze	Zellen	HMB-PP	IL-21	IFN-β	IFN-λ ₂	TGF-β
6	2 x 10 ³ /µl	1 nM	10 ng/ml	-	-	-
7	2 x 10 ³ /µl	1 nM	-	100 U/ml	-	-
8	2 x 10 ³ /µl	1 nM	-	-	10 ng/ml	-
9	2 x 10 ³ /µl	1 nM	-	-	-	10 ng/ml

Die Zellen wurden in einem Brutschrank (Haeraeus, Hanau) bei 37°C und unter CO₂ für 72 Stunden inkubiert.

3.5. FACS

Zur Messung wurde das Durchflusszytometer EPICS[®] XL (Beckmann Coulter, Krefeld) mit der Software Expo32 ADC verwendet.

3.5.1 ANTEIL DER Vγ9⁺ T-LYMPHOZYTEN AN GESAMTLYMPHOZYTEN

Der Anteil der Gesamtlymphozyten am Vollblut wurde zuvor mit dem Cell Counter ermittelt. Der Anteil der Vγ9⁺ T-Lymphozyten an Gesamt-T-Lymphozyten in den einzelnen Blutproben wurde vor der Aktivierung und Stimulation per Durchflusszytometrie gemessen. Hierzu wurden Proben mit Antikörpern versetzt:

CD3-ECD Conc.: 0,05µl/ml

Vγ9-PC5 Conc.: 0,05µl/ml

Die Zellen wurden 20min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden 350µl PBS pro FACS-Röhrchen hinzugefügt und kurz vor der Messung gut gemischt.

3.5.2 ÜBERPRÜFUNG DER AKTIVIERUNG VON $V\gamma 9^+$ T-LYMPHOZYTEN

Es wurde die Aktivität der angesetzten Zellen getestet (Anteil $CD25^+$ Zellen an $V\gamma 9^+$ Zellen).

Hierzu wurden nach 3 und 6 Tagen die Lymphozyten nach Stimulation mit HMB-PP und IL-2 geerntet (siehe Kapitel 3.4.1). Jeder Ansatz wurde in ein entsprechendes FACS-Röhrchen pipettiert. Die Antikörper wurden in 100 μ l Medium pro well verdünnt und zu den Zellen gegeben, so dass folgende Endkonzentrationen der Antikörper resultierten:

CD3-ECD: 0,05 μ l/ml

$V\gamma 9$ -PC5: 0,05 μ l/ml

CD25-PE: 0,10 μ l/ml

Die Zellen wurden 20min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurden 350 μ l PBS pro FACS-Röhrchen hinzugefügt und kurz vor der Messung gut gemischt.

3.5.3 ÜBERPRÜFUNG DER AKTIVIERUNG UND ISOLATION VON $V\gamma 9^+$ T-ZELLEN

Nach Inkubation der angesetzten Zellen mit den unterschiedlichen Stimulanzen (siehe Kapitel 3.4.2 Tabelle 2) wurden diese vor der $V\gamma 9^+$ T-Zell-Isolation (siehe Kapitel 3.1) per Durchflusszytometrie gemessen. Vor der Separation wurden die Zellen mit TCR $\gamma\delta$ Hapten Antibody und MACS (Magnetic cell sorting) Anti-Hapten MicroBeads-FITC inkubiert und anschließend gewaschen (siehe Kapitel 3.6.1). Von den in 500 μ l MACS-Puffer gelösten Zellen wurden 10 μ l entnommen und mit 90 μ l PBS in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Zur CD3-Bestimmung wurden CD3-ECD Antikörper hinzugegeben und 15min bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss inkubiert. Kurz vor der Messung wurden die Proben vertikutiert.

Nach der Separation wurden sowohl die $V\gamma 9^+$ TCR positiven, als auch die $V\gamma 9^-$ TCR negativen Zellen gemessen. Nach zweimaligem Waschen der Säulen mit MACS-Puffer wurden dem Durchlauf 20 μ l entnommen, mit 80 μ l PBS versetzt, vertikutiert und gemessen. Die positiven Zellen wurden am Ende der Separation in einem separaten Röhrchen aufgefangen. Diesen Zellen wurden ebenfalls 20 μ l entnommen, mit 80 μ l PBS versetzt, vertikutiert und anschließend gemessen.

3.6. RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE - POLYMERASE CHAIN REACTION)

3.6.1 $\gamma\delta$ T-ZELL ISOLATION MIT MACS (MAGNETIC CELL SORTING)

3.6.1.1 Vorbereitung der Zellen

Die Zellen wurden nach 72 Stunden Inkubation mit entsprechenden Stimulanzen (siehe Kapitel 3.4.2 Tabelle 2) geerntet. Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden durch MACS mit TCR $\gamma\delta$ MicroBeads Kit (Miltenyi Biotec) von den anderen Leukozyten separiert.

Dazu wurden die Zellen mit 10ml PBS gewaschen und 8min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt.

Der MACS-Puffer setzte sich zusammen aus:

47,5ml PBS

2,5ml FCS (final 5%) (Fetales Kälberserum, Sigma)

200 μ l EDTA 0,5M (final 2mM)

Nach einem zweiten Waschschrift mit 5ml MACS-Puffer und einer Zentrifugation von 8min bei 400g und 4°C wurde der Überstand gründlich entfernt.

3.6.1.2 Markieren der Zellen

Um die $\gamma\delta$ T-Zellen zu markieren wurde das Pellet in 40 μ l MACS-Puffer resuspendiert und 10 μ l TCR $\gamma\delta$ Hapten Antibody hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 6-12°C für 10min. Anschließend wurden 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l MACS Anti-Hapten MicroBeads-FITC hinzu pipettiert. Nach einer weiteren Inkubation bei 6-12°C für 15min, wurden die Zellen erneut mit MACS-Puffer gewaschen und 8min bei 400g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert.

10 μ l dieser Zellen wurden zu 90 μ l PBS gegeben und zur CD3-Bestimmung mit CD3-ECD (Beckmann Coulter, Marseille France) 15min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.6.1.3 Separieren der $V\gamma 9^+$ T-Zellen mit MS^+/RS^+ -Säulen

Die Säule (Positive Selection Columns, type MS^+/RS^+ MACS, separator octo MACS) wurde in das magnetische Feld eingespannt und mit 500 μ l MACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 500 μ l Zellsuspension luftblasenfrei auf die Säule aufgetragen.

Nach einem Waschvorgang mit 500µl MACS-Puffer wurden aus den jetzt 1000µl Suspension 20µl entnommen, mit 80µl PBS versetzt, und per Durchflusszytometrie gemessen. An dieser Stelle wurden die Zellen auch mit dem Cell Counter (Beckmann Coulter, Krefeld) gezählt. Anschließend wurden die Säulen noch weitere zwei Mal mit je 500µl MACS-Puffer gewaschen.

Zur Eluierung der $\gamma\delta$ T-Zellen wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entnommen. Nun wurde 1ml MACS-Puffer auf die Säule gegeben. Mit dem Stempel wurden die $\gamma\delta$ TCR positiven Zellen aus der Säule gewaschen und in einem frischen Auffangröhrchen gesammelt. Das Eluat wurde mit dem Cell Counter (Beckmann Coulter, Krefeld) gezählt. Weiterhin wurden erneut 20µl entnommen, mit 80µl PBS versetzt und per Durchflusszytometrie gemessen. Das Eluat wurde 5min mit 400g und 4°C zentrifugiert und zur RNA-Isolation verwendet.

3.6.2 RNA-ISOLATION MIT RNEASY MINI KIT SIZE: 50 (QIAGEN)

Den mit MACS isolierten $\gamma\delta$ T-Zellen wurden 500µl steriles PBS hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen bei 400g und 4°C 5min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 350µl RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit (50), Qiagen) resuspendiert, um die $\gamma\delta$ T-Zellen zu lysieren. Der RLT-Puffer wurde zuvor mit β -Mercaptoethanol (BuchS) im Verhältnis 1:100 versetzt. Nach Zugabe von 350µl Ethanol (Conc.: 99,8%, Merck) wurde das Lysat auf die Säule (RNeasy mini spin columns, Qiagen) transfundiert und bei 8000g 15sec zentrifugiert. Dann wurden 350µl RW1-Puffer (RNeasy Mini Kit (50), Qiagen) hinzu pipettiert und erneut bei 8000g 15sec zentrifugiert.

Um die RNA-Isolation zu optimieren wurde die Säule zusätzlich mit dem RNase-freien DNase Set Size: 50 (Qiagen) behandelt. Dazu wurden 10µl RNase-freie DNase I zu 70µl RDD-Puffer gegeben, vorsichtig gemischt und auf die Membranoberfläche der Säule pipettiert. Nach einer Inkubation von 15min bei Raumtemperatur wurden erneut 350µl RW1-Puffer hinzugefügt und bei 8000g 15sec zentrifugiert. Durch diese Behandlung mit DNase wurde einer Verfälschung der PCR-Ergebnisse durch eine mögliche Kontamination mit genomischer DNA vorgebeugt.

Darauf folgten zwei weitere Waschschritte mit jeweils 500µl RPE-Puffer, die bei 8000g, 15sec, bzw. 2min lang abzentrifugiert wurden.

Die Eluierung der RNA erfolgte nach einem Wechsel des Auffangröhrchens in zwei Schritten, mit jeweils 25µl nukleasefreiem H₂O (Braun), 5min Einwirkzeit und anschließender Zentrifugation mit 8000g über 1min.

3.6.3 RNA- REVERSE TRANSKRIPTION

Anschließend wurden die Proben isolierter Gesamt-RNA in cDNA revers transkribiert. Dazu wurde folgender Ansatz gewählt:

9,0µl nukleasefreies H₂O

1,0µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ Primer Conc.: 0,5µg/µl Size: 25µg (Invitrogen)

3,0µl Probe mit isolierter Gesamt-RNA

Die RNA wurde bei einer Temperatur von 70°C über einen Zeitraum von 2min denaturiert. Nach Hybridisierung der Oligo-dT-Primer, bei langsamer Abkühlung auf Raumtemperatur, wurden dem Ansatz folgende Substanzen hinzugefügt:

4,0µl 5x First-Strand Buffer Vol.: 1000µl (Invitrogen)

1,0µl 0,1M DTT Vol.: 500µl (Invitrogen)

1,0µl dNTP Conc.: 10mM (BD Advantage™ UltraPure PCR Denucleotide Mix)

1,0µl Superscript III RT Conc.: 200U/µl Vol: 50µl (Invitrogen)

Es folgte eine Inkubation von 60min bei 50°C und eine weitere von 15min bei 70°C.

3.6.4 SEMIQUANTITATIVE RT-PCR MIT STANDARDISIERTER CDNA

Die gewonnene cDNA wurde mit Hilfe der RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) amplifiziert, um eine ausreichende Menge zur Beurteilung der Genexpression in den unterschiedlich stimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu erhalten.

Die für die PCR benötigten Substanzen wurden in folgender Zusammensetzung pipettiert:

PCR-Ansatz:

4,0 μ l 5x Green Go TaqTM Buffer (7,5mM MgCl₂, final: 1,5mM MgCl₂)

0,4 μ l dNTP Conc.: 10mM (BD AdvantageTM UltraPure PCR Denucleotide Mix)

2,0 μ l Primer forw. Conc.: 2,5 μ M final: 250nM (Thermo)

2,0 μ l Primer rev. Conc.: 2,5 μ M final: 250nM (Thermo)

0,1 μ l GoTaq DNA Polymerase Conc.: 5U/ μ l Size: 100u (Promega)

Um die Proben anschließend vergleichen zu können ist es notwendig, dass in allen PCR-Ansätzen die gleiche Menge an cDNA hinzugefügt wird. Eine Quantifizierung der Gesamt-RNA wurde nicht durchgeführt, da maximal 100.000 $\gamma\delta$ T-Zellen pro Blutspender aufgereinigt werden konnte und sich daraus eine Gesamt-RNA Menge von maximal 0.1-1 μ g ergeben hatte. Laut Herstellerangaben tolerierte die verwendete Reverse Transkriptase einen sehr breiten RNA-Konzentrationsbereich. Daher wurde von einer relativ gleichbleibenden Effizienz der cDNA-Synthese ausgegangen.

Aus oben genannten Gründen war es besonders wichtig eine nachfolgende Standardisierung der PCR anhand eines Haushaltsgenes (housekeeping gene) durchzuführen. Ein Haushaltsgen ist ein Gen, welches von allen Zellen in gleichem Maße exprimiert wird, wie z.B. Cyclophilin oder Actin.

Es wurde versucht die entsprechenden Konzentrationen der einzelnen Proben anhand der Cyclophilin-Expression zu ermitteln und somit eine möglich genaue Angleichung der cDNA-Mengen zu erhalten.

Eine parallele Analyse eines weiteren Haushaltsgenes (housekeeping genes) blieb aufgrund der limitierten Menge an $\gamma\delta$ T-Zellen in den verwendeten Blutproben aus.

Die entsprechenden Mengen der einzelnen Proben mit denselben Mengen an cDNA wurden dem PCR-Ansatz hinzugefügt. Durch die Zugabe der entsprechenden Menge

an nukleasefreiem H₂O wurde das Gesamtvolumen von 20µl pro Reaktion konstant gehalten und die Mengen der cDNA für Cyclophilin angeglichen.

Die erste Denaturierung dauerte 120sec. Die Denaturierung innerhalb der Zyklen dauerte 30sec, Annealing 45sec und die Elongation 60sec. Die Temperaturen und die Anzahl der Zyklen wurden in Abhängigkeit der Primer unterschiedlich gewählt:

Tabelle 3: PCR-Schemen der verwendeten Primer

Primer		BCA-1	Cyclophilin	FMR-1	FoxP3
Erste Denaturierung		95°C	95°C	95°C	95°C
Zyklen	Denaturierung	95°C	95°C	95°C	95°C
	Annealing	62°C	59°C	52°C	55°C
	Elongation	72°C	72°C	72°C	72°C
Zyklusanzahl		29	26	35	35
Primer		GATA-3	IFN-γ	IL-4	IL-21
Erste Denaturierung		95°C	95°C	95°C	95°C
Zyklen	Denaturierung	95°C	95°C	95°C	95°C
	Annealing	59°C	57°C	55°C	55°C
	Elongation	72°C	72°C	72°C	72°C
Zyklusanzahl		30	32	35	35
Primer		IL-21R	IL-28RA	LT-α	MCP-1
Erste Denaturierung		95°C	95°C	95°C	95°C
Zyklen	Denaturierung	95°C	95°C	95°C	95°C
	Annealing	57°C	59°C	63°C	63°C
	Elongation	72°C	72°C	72°C	72°C
Zyklusanzahl		32	35	35	29
Primer		MIP-1α	T-bet		
Erste Denaturierung		95°C	95°C		
Zyklen	Denaturierung	95°C	95°C		
	Annealing	63°C	62°C		
	Elongation	72°C	72°C		
Zyklusanzahl		29	32		

3.6.5 GEL-ELEKTROPHORESE

Für die Gel-Elektrophorese wurden horizontale Agarosegele mit einer Konzentration von 3,0% verwendet. Als Laufpuffer diente TAE-Puffer. Der Farbmarker war im 5x Green Go Taq™ Buffer des PCR-Ansatzes enthalten. Der Größenmarker (DNA ladder 100bp, Conc.: 1µg/µl, Size: 250µg (Invitrogen)) wurde, wie die Proben, mit jeweils 8µl aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100V und 150mA über einen Zeitraum von 25min.

Nach dem Lauf wurden die Gele in Ethidiumbromid gefärbt, in Wasser entfärbt und anschließend unter UV-Licht fotografiert.

3.6.6 AUSWERTUNG MIT DER BILDBEARBEITUNGS SOFTWARE IMAGE J

Es wurde eine objektive Auswertung mit Hilfe der Bildbearbeitungssoftware Image J durchgeführt. Hierzu wurden die Polaroidfotos der Agarosegele eingescannt. Anschließend erfolgte die Bearbeitung durch Auswahl der zu untersuchenden Banden. Um einen optimalen Vergleich der Banden untereinander gewährleisten zu können, wurde die Funktion „Subtract background“ angewendet.

Die Messergebnisse der Intensitäten der einzelnen Banden wurden anschließend zusammengetragen. Hierbei wurden mittels T-Test die Werte für die Bandenintensitäten der Stimulanzen in Bezug zu Medium und in Bezug zu HMB-PP betrachtet. Zur Auswertung der Ergebnisse wurden die Median-Werte, arithmetische Mittelwerte und die empirischen Standardabweichungen berechnet. Eine Signifikanztestung wurde bei zu kleiner Stichprobe nicht durchgeführt. Für die Weiterverarbeitung der Daten wurde das Computerprogramm Microsoft Excel verwendet.

4. ERGEBNISSE

4.1. TESTS DER BLUTPROBEN

4.1.1 DIE BLUTSPENDER

Für die nachfolgenden Experimente ist eine hohe Anzahl von $V\gamma 9^+$ Zellen im nicht stimulierten Vollblut notwendig, da diese nach 3 Tagen Aktivierung nicht viel proliferieren. Ein zu kleiner Anteil an $V\gamma 9^+$ Zellen würde zu große Mengen an Blut benötigen, um die gleiche Ausbeute an Zellen, die die gesuchte mRNA transkriptieren, zu erreichen. Darüber hinaus ist eine gute Aktivierbarkeit der $V\gamma 9^+$ Zellen von Vorteil.

Getestet wurden Buffy coats der Blutbank Gießen. Per Durchflusszytometrie wurde der Anteil der Lymphozyten im Vollblut, der Anteil der $CD3^+$ Zellen aller Lymphozyten und der Anteil der $V\gamma 9^+$ Zellen aller T-Lymphozyten ($CD3^+$ Zellen) gemessen (siehe Tabelle 4 und Abbildung 1).

Tabelle 4: FACS-Analyse des Blutspendertests

Blutspender	BB 9	BB 10	BB 11	BB 12	BB 13	BB 14	BB 15
Anteil der Lymphozyten im Vollblut in %	31,07	41,35	37,81	32,47	21,14	41,85	37,47
Anteil der $V\gamma 9^+$ Zellen an $CD3^+$ Zellen (T-Lymphozyten) in %	4,02	4,12	1,56	2,31	3,54	3,25	2,03
Blutspender	SW	KW	JH	MZ	ME	AK	
Anteil der Lymphozyten im Vollblut in %	64,22	48,88	20,25	26,45	34,40	48,12	
Anteil der $V\gamma 9^+$ Zellen an $CD3^+$ Zellen (T-Lymphozyten) in %	20,21	41,23	5,06	6,90	2,81	6,86	

Dabei konnte beobachtet werden, dass die Anzahl der $V\gamma 9^+$ Zellen schon im unstimulierten Vollblut individuell sehr unterschiedlich sein kann. Die minimale Anzahl betrug 1,56% (BB11). Es konnten zwei Extreme abgegrenzt werden: SW mit 20,21% und KW mit 41,31%.

Für die Bestimmung der mRNA wurden daher Zellen der Spender KW, SW und MZ verwendet, um eine möglichst hohe Ausbeute an Zellen, die die gesuchte mRNA produzieren, zu erlangen.

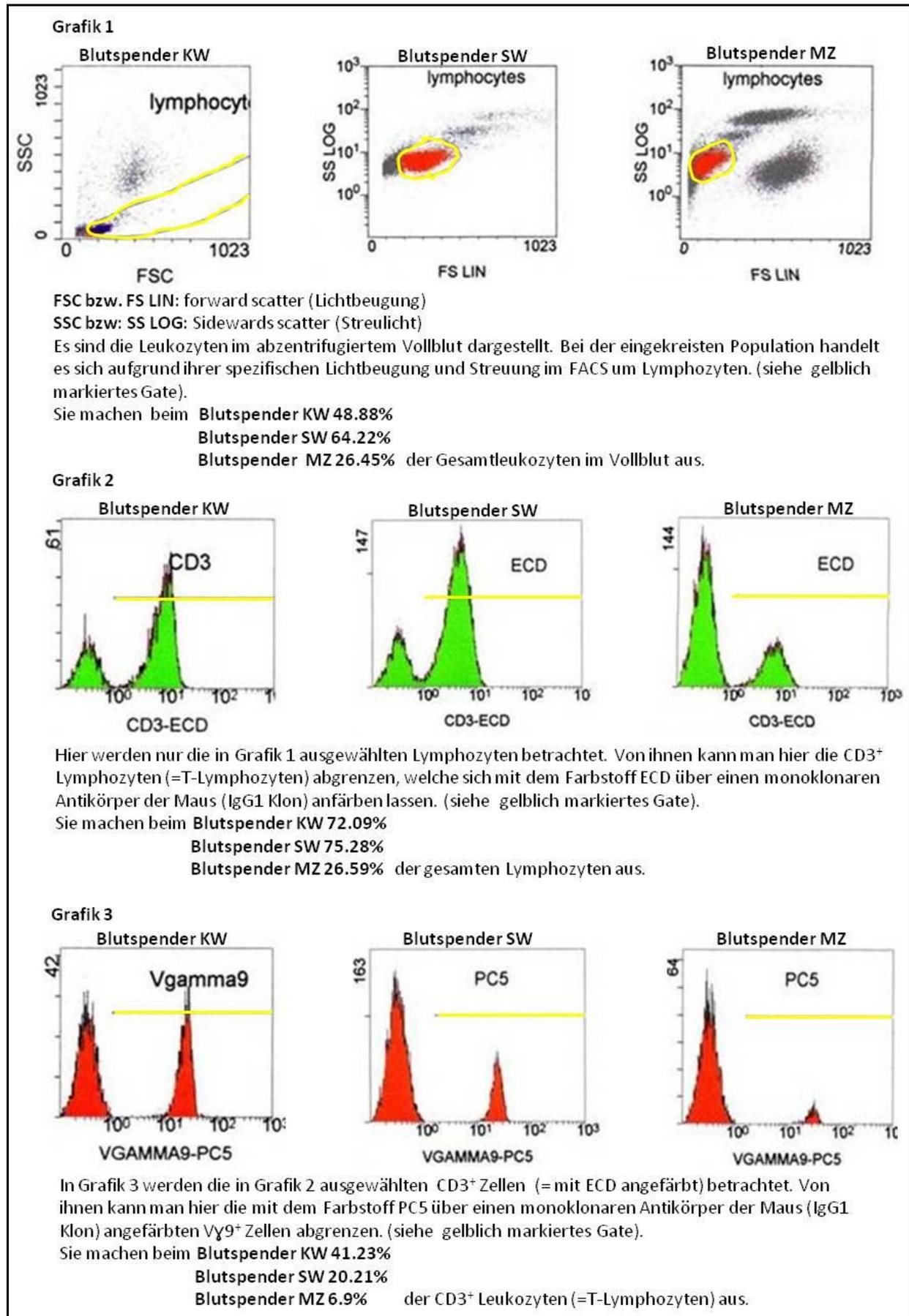


Abbildung 1: FACS-Analyse der Blutspendertests

4.1.2 AKTIVIERUNGSTESTS

Während der Aktivierungstests wurden die Lymphozyten mit LSM (Lymphocyte Separation Medium) aus dem Blut isoliert und mit IL-2 und verschiedenen Konzentrationen von HMB-PP (siehe Kapitel 3.4.2 Tabelle 1) 3 bzw. 6 Tage lang inkubiert (Eberl 2002a; Eberl 2002b). Zur Optimierung der HMB-PP Konzentration wurden die Zellen mit IL-2 angesetzt, da deren Aktivierung und Proliferation in Anwesenheit von IL-2 verbessert wird (Boullier 1999).

4.1.2.1 Nach 3 Tagen Inkubation

Die Anzahl der CD25⁺ Zellen der V γ 9⁺ Zellen (aktivierte $\gamma\delta$ T-Lymphozyten) wurden per Durchflusszytometrie (V γ 9-PC5/ CD3-ECD/ CD25-PE) bestimmt (siehe Tabelle 5 und Abbildung 2).

Tabelle 5: Nach 3 Tagen Inkubation: Prozentanteile der CD25⁺ Zellen (aktivierte Zellen) von allen V γ 9⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz in Abhängigkeit der jeweiligen HMB-PP Konzentration

IL-2	HMB-PP	Anteil der CD25 ⁺ Zellen an V γ 9 ⁺ Zellen in %				
		BB 9	BB 10	BB 11	BB 12	BB 13
10U/ml	1 μ M	76,19	62,96	14,62	57,72	68,57
	100nM	71,01	36,54	5,84	50,00	41,33
	10nM	37,21	30,00	2,40	18,18	34,62
	1nM	24,71	4,00	1,96	7,03	31,91
	100pM	2,62	2,22	1,73	2,22	4,76
	10pM	0,54	0,00	0,00	0,54	0,00
	1pM	0,00	0,63	0,57	1,06	1,12
	0	0,00	0,79	1,12	0,00	0,00

IL-2	HMB-PP	Anteil der CD25 ⁺ Zellen an V γ 9 ⁺ Zellen in %				
		BB 14	BB 15	SW	KW	MZ
10U/ml	1 μ M	46,67	23,28	56,38	57,72	-
	100nM	37,39	24,41	55,17	63,93	93,58
	10nM	27,64	13,95	24,36	67,49	94,67
	1nM	0,00	11,24	12,32	61,46	79,05
	100pM	0,65	1,14	4,13	49,53	55,2
	10pM	1,20	0,00	1,32	32,48	27,88
	1pM	0,00	0,55	0,69	9,36	31,5
	0	0,00	0,00	4,00	22,39	23,11

Dabei konnte beobachtet werden, dass die Aktivierbarkeit der Zellen unterschiedlicher Blutspender durch gleiche HMB-PP Konzentrationen, gemessen an

der Expression von CD25, unterschiedlich ist. Jedoch kommt es bei allen Zellansätzen zu einer Steigerung der Aktivität mit steigender HMB-PP Konzentration. In Abbildung 2 ist die Aktivierung anhand der CD25-Expression in Abhängigkeit von der HMB-PP Konzentration für die verwendeten Blutproben (KW, MZ und SW) dargestellt. Die Daten für die anderen getesteten Blutspender sind in Tabelle 5 dokumentiert.

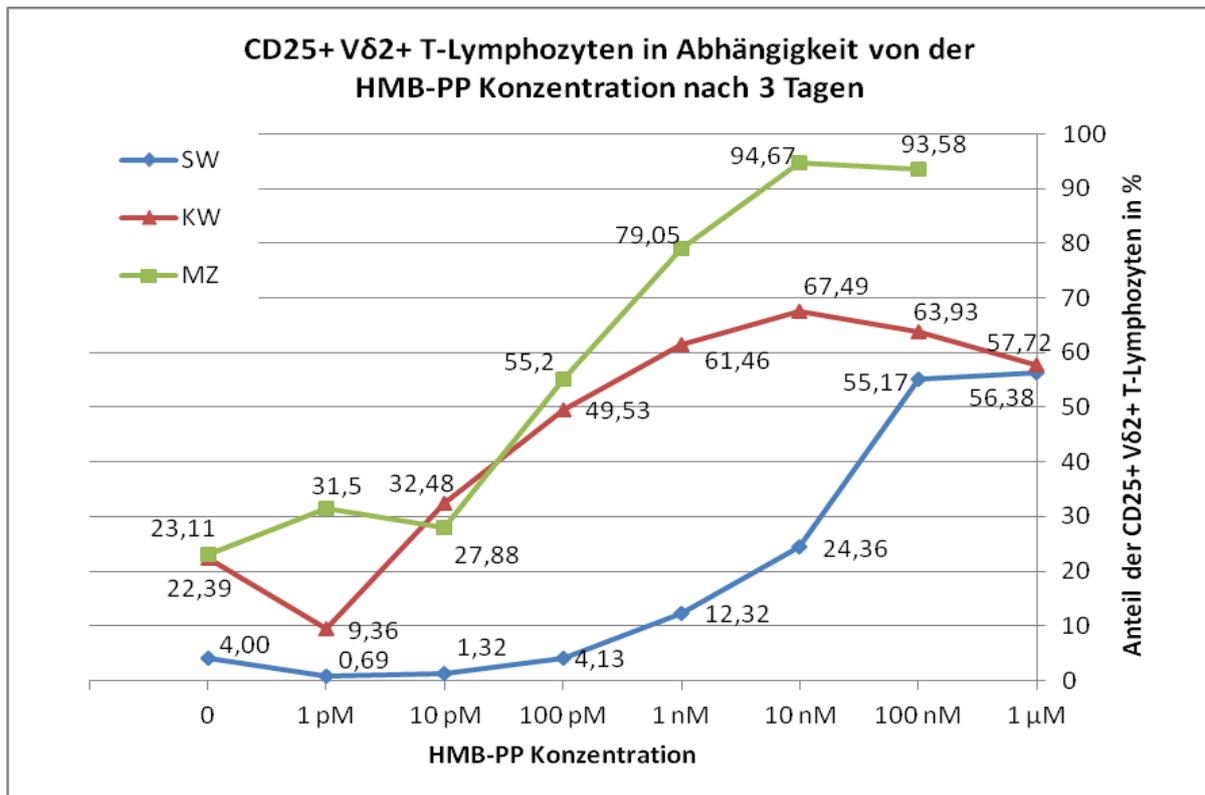


Abbildung 2: Nach 3 Tagen Inkubation: Prozentanteile von CD25⁺/Vγ9⁺ T-Lymphozyten von allen Vγ9⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz der Blutspender KW, MZ und SW in Abhängigkeit von der HMB-PP Konzentration im Zellansatz (siehe auch Tabelle 5)

4.1.2.2 Nach 6 Tagen Inkubation

Die Aktivierung der Vγ9⁺ T-Lymphozyten wurde nach 6 Tagen Inkubation mit unterschiedlichen HMB-PP Konzentrationen im Ansatz anhand der CD25 Expression per Durchflusszytometrie bestimmt. Bei niedrigeren Konzentrationen von HMB-PP blieb der Prozentanteil der aktivierten Vγ9⁺ T-Lymphozyten nahezu konstant. Erst ab einer HMB-PP Konzentration von 100pM stieg sie an. Besonders deutlich wurde dieser Anstieg in Konzentrationsbereichen von 1nM bis 10nM HMB-PP. Eine weitere Erhöhung der HMB-PP Konzentration führte jedoch nicht zur weiteren Aktivierung der Zellen, sondern zu einer Reduktion der Aktivierung, welche vermutlich auf einen vermehrten Zelltod zurück zu führen ist. (siehe Abbildung 2). Bei Vergleich der

gleichen Zellansätze nach 3 und 6 Tagen wird ebenfalls deutlich, dass eine zu lange Inkubationsdauer ebenfalls mit einer Reduktion der Aktivierung einher geht. (siehe Tabelle 6 bzw. Abbildung 3 und Abbildung 4)

Tabelle 6: Nach 6 Tagen Inkubation: Prozentanteile der CD25⁺ Zellen (aktivierte Zellen) von allen Vγ9⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz in Abhängigkeit der jeweiligen HMB-PP

IL-2	HMB-PP	Anteil der CD25 ⁺ Zellen an Vγ9 ⁺ Zellen in %						
		BB 9	BB 10	BB 11	BB 12	BB 13	BB 14	BB 15
10U/ml	1μM	21,45	7,82	16,39	11,99	6,75	14,09	13,47
	100nM	26,96	9,62	6,32	9,27	6,79	16,12	17,15
	10nM	28,18	9,66	6,45	11,68	7,67	13,18	16,48
	1nM	14,10	10,73	2,37	5,66	3,93	4,56	13,18
	100pM	3,26	2,85	2,33	4,05	2,81	1,01	2,33
	10pM	2,72	1,08	2,33	3,61	0,78	0,72	1,68
	1pM	2,89	0,86	2,43	3,41	0,75	0,77	1,57
	0	2,84	0,90	2,31	3,65	0,89	0,73	1,57

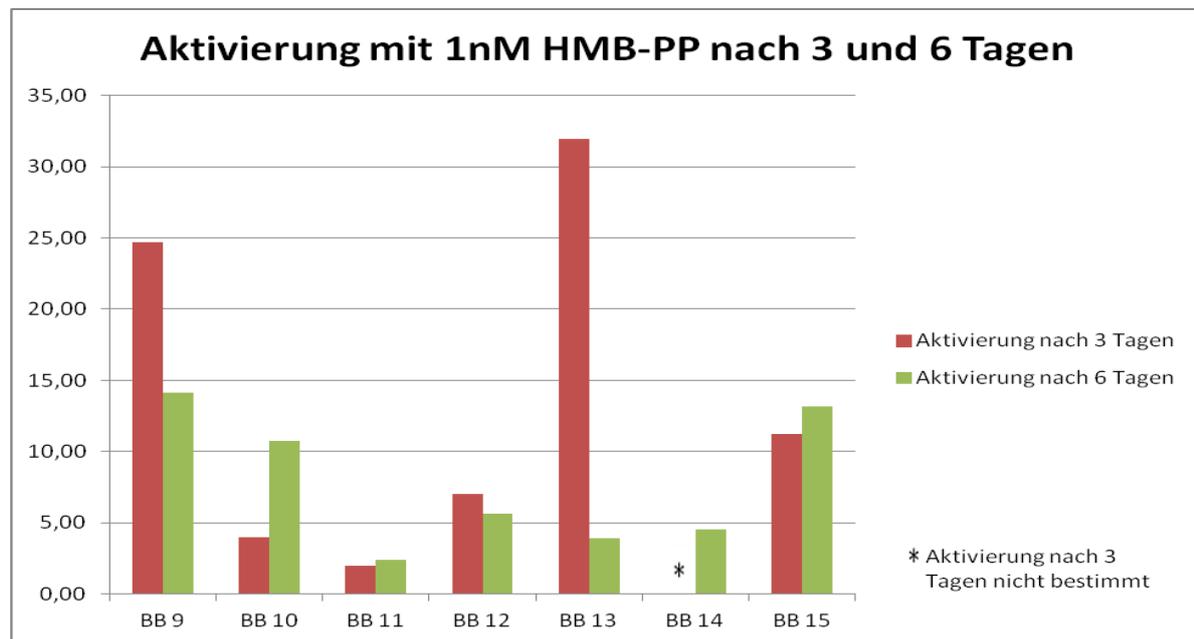


Abbildung 3: Nach 3 und 6 Tagen Inkubation: Prozentanteile von CD25⁺/Vγ9⁺ T-Lymphozyten von allen Vγ9⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz der Blutspender BB9, BB 10, BB11, BB 12, BB13, BB14 und BB15 mit 1nM HMB-PP

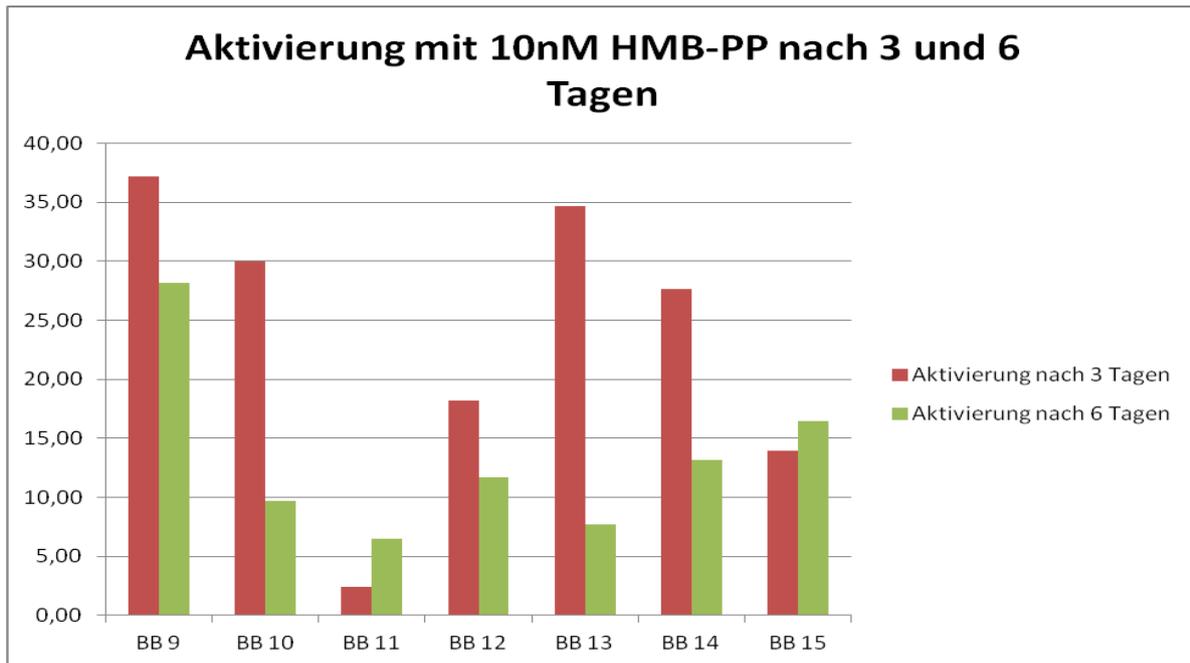


Abbildung 4: Nach 3 und 6 Tagen Inkubation: Prozentanteile von CD25⁺/Vγ9⁺ T-Lymphozyten von allen Vγ9⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz der Blutspender BB9, BB 10, BB11, BB 12, BB13, BB14 und BB15 mit 10nM HMB-PP

Die Experimente zeigen, dass schon bei einer HMB-PP Konzentration von 1nM innerhalb von 3 Tagen Inkubationszeit eine signifikante Aktivierung der Vγ9⁺ T-Zellen stattfindet. Um den durch Überstimulation mit zu hoher Konzentration an HMB-PP induzierten Zelltod zu verhindern, wurde die kleinstmögliche Konzentration gewählt, welche eine gute Aktivierung der Vγ9⁺ T-Zellen innerhalb 3 Tagen noch ausreichend gewährleistete. Dadurch sollte auch der zusätzliche Effekt der Zytokine deutlicher sichtbar werden. In den folgenden Stimulationen wurden daher die Vγ9⁺ T-Lymphozyten mit einer HMB-PP Konzentration von 1nM durchgeführt.

4.2. ZEITLICHE ABFOLGE DER EINZELNEN ARBEITSSCHRITTE

Die zeitliche Abfolge der nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte wird in Abbildung 5 verdeutlicht.



Abbildung 5: Zeitliche Abfolge der durchgeführten Experimente

4.3. $\gamma\delta$ T-ZELL AUFREINIGUNG MIT MACS (MAGNETIC CELL SORTING)

Aus den gewonnenen Blutproben wurden die Lymphozyten separiert. Anschließend wurden die Zellen mit HMB-PP und Zytokinen für 3 Tage stimuliert. Erst nach Stimulation wurden die $V\gamma 9^+$ T-Zellen mittels MACS (Magnetic Cell Sorting) isoliert (siehe Abbildung 5). Zur Überprüfung der $\gamma\delta$ T-Zell Isolation (siehe Kapitel 3.6.1) wurden die Zellen vor und nach der Aufreinigung gemessen. Zusätzlich wurde der Durchlauf, nach Auftragen der Zellen auf eine Säule im Magnetfeld, als Negativkontrolle gemessen.

Es wurden die Anzahlen aller Zellen mit dem Cell Counter ermittelt und der Anteil an $V\gamma 9^+$ T-Zellen per Durchflusszytometrie bestimmt.

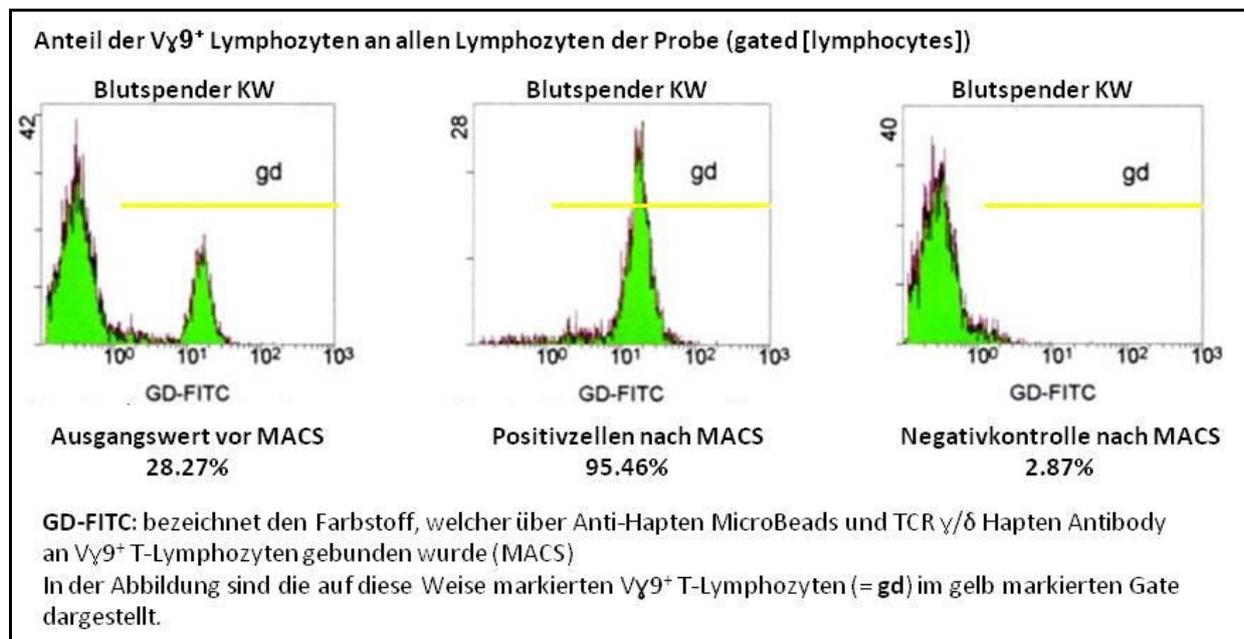


Abbildung 6: Anteil der $V\gamma 9^+$ T-Zellen an Lymphozyten in der Probe vor und nach MACS

Vor der Aufreinigung wurden die Zellen mit MACS Anti-Hapten Micro Beads-FITC, einem Marker für $V\gamma 9^+$ T-Zellen, markiert. Im dargestellten Beispiel lag der Anteil der $V\gamma 9^+$ T-Zellen an Gesamtl lymphozyten bei 28,27% (siehe Abbildung 6, Ausgangswert vor MACS).

Nach der Aufreinigung dieser Probe lag der Anteil der $V\gamma 9^+$ T-Zellen an Gesamtl lymphozyten bei 95,46% (siehe Abbildung 6, Positivzellen nach MACS).

Die Negativkontrolle zeigte im Beispiel einen Anteil an $V\gamma 9^+$ T-Zellen von 2,87% (siehe Abbildung 6, Negativkontrolle nach MACS).

In Tabelle 7 wurden die in dieser Arbeit verwendeten Zellansätze nach Reinigung mit Reinheitsgraden in Prozent aufgelistet. Es wurden 4 verschiedene Zellansätze des Blutspenders SW (SW2, SW3, SW4, SW5), drei verschiedene Ansätze des Blutspenders MZ (MZ1, MZ2, MZ3) und ein Zellansatz des Blutspenders KW (KW1) verwendet. Die unterschiedliche Anzahl der Zellansätze der jeweiligen Blutspender ergab sich aus den unterschiedlichen Blutmengen, die uns zur Verfügung standen. Mit der zur Verfügung stehenden Technik MACS wurde eine Reinheit der V γ 9⁺ T-Zellen von 87,95% bis 98,09% erzielt (siehe Tabelle 7). Weitere Aufreinigungen wären mit Zellverlusten verbunden gewesen, weshalb bei begrenzt zur Verfügung stehendem Material darauf verzichtet wurde.

Tabelle 7: Aufreinigung der V γ 9⁺ T-Zellen: Grad der Reinheit in %

Kultur	MED	HMB-PP	IL-15	IL-2	IL-4	IL-21	IFN-β	TGF-β	IFN-λ2
Spender									
SW2								97,01	
SW3	96,10	97,53		97,16	97,93	98,09	94,74		95,48
SW4	96,00					97,19	94,54	94,70	95,45
SW5		96,61		96,72	93,47				
KW1	95,49	92,82	96,78	93,10	92,83	97,82	92,91	93,45	96,73
MZ1	93,07	89,38	95,27		94,28		91,74		94,21
MZ2						87,95			
MZ3				92,51					

4.4. RNA-ISOLATION

Nach Aufreinigung der $V\gamma 9^+$ T-Zellen wurde die RNA isoliert, um anschließend mit Hilfe der RT-PCR einen Nachweis für die Produktion bestimmter Zytokine auf RNA-Ebene zu erhalten. Im Anschluss an die RNA-Isolation wurde die Probe einem DNase-Verdau unterzogen, wodurch genomische DNA, welche die Probe kontaminieren könnte, degradiert wurde. Zusätzlich wurden in der RT-PCR Intron-übergreifende Primer verwendet, so dass eine Amplifikation von genomischer DNA eine deutlich größere Bande über der eigentlichen PCR-Bande der amplifizierten cDNA ergeben hätte. Da dies nicht der Fall war (siehe Beispiel in Abbildung 7), konnte eine signifikante Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Die Analyse der RNA-Isolation per Gelelektrophorese war jedoch nicht durchführbar, da für die Durchführung der Experimente insgesamt nur sehr wenig Material zur Verfügung stand.

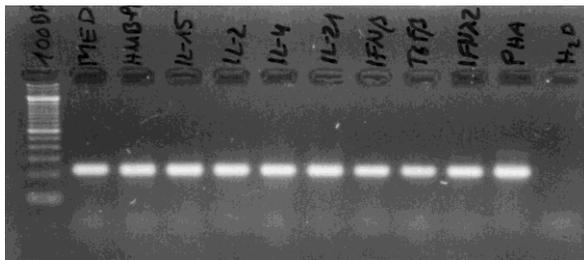


Abbildung 7: Cyclophilin-Expression des Blutspenders KW. Es konnte keine genomische DNA nachgewiesen werden.

4.5. RNA- REVERSE TRANSKRIPTION

Um bestimmte mRNA Sequenzen sichtbar zu machen, mussten diese zunächst durch PCR vervielfältigt werden. Hierzu war die reverse Transkription der mRNA in cDNA notwendig.

Die Testung der reversen Transkription der mRNA erfolgte in der RT-PCR anhand des Haushaltsgens Cyclophilin, welches unabhängig von der Art der Stimulation in allen angesetzten Zellen gleichviel produziert wird. Zum Einen wurde getestet, ob im Endprodukt (nach Isolation und reverser Transkription der mRNA) cDNA enthalten ist. Zum Anderen wurden auf diese Weise die in die PCR eingesetzten Mengen an cDNA der einzelnen Proben standardisiert. Dies erlaubte einen Vergleich der PCR-Ergebnisse der verschiedenen Zellansätze. Abbildung 8 bis Abbildung 11 zeigen die Agarosegele der Standardisierung mit Cyclophilin der einzelnen Blutspender, die für die weiteren Experimente verwendet wurden.

Die Zellen des Blutspenders KW wurden mit unterschiedlichen Substanzen angesetzt (siehe Kapitel 3.4.2), die oberhalb der Banden notiert sind (siehe Abbildung 8): Medium ohne HMB-PP, nur HMB-PP, HMB-PP mit IL-15, HMB-PP mit IL-2, HMB-PP mit IL-4, HMB-PP mit IL-21, HMB-PP mit IFN- β , HMB-PP mit TGF- β , HMB-PP mit IFN- λ_2 . Für den Zellansatz mit PHA wurde vergleichend die Probe des Blutspenders BB11 aufgetragen. Die Probe mit der Beschriftung „H₂O“ diente als Negativkontrolle der PCR und beinhaltete ausschließlich H₂O. Die Bande KW1/ Medium war auf beiden Gelen etwas vermindert, was bei der Beurteilung der Banden zu beachten ist. Um eine möglichst große Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden drei verschiedene Blutspender untersucht. Die Zellen der Blutspender wurden jeweils in unabhängigen Kulturen angelegt. Nach der Standardisierung mit Cyclophilin wurde jede PCR mindestens zweimal durchgeführt.

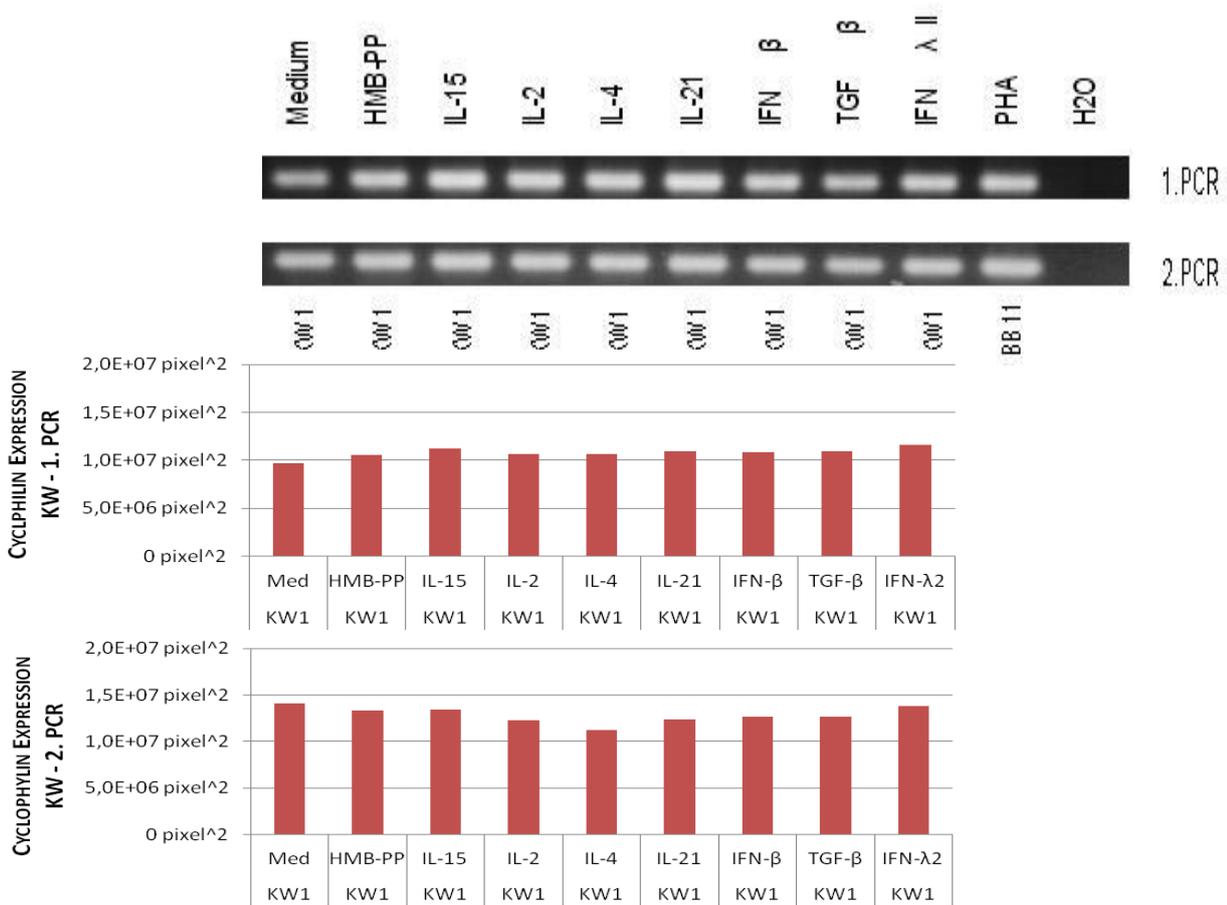


Abbildung 8: Standardisierung der Proben KW, Agarosegele und Image-J Analyse

Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen die PCR-Ergebnisse für die Standardisierung der Proben des Blutspenders MZ. Der Zellansatz mit TGF-β konnte für den Blutspender MZ aus zeittechnischen Gründen nicht durchgeführt werden. Die zeitlich unterschiedlichen Zellansätze (MZ1, MZ2, MZ3) sind jeweils unterhalb der Banden angegeben. Zum Vergleich wurde auch hier die Probe des Zellansatzes mit PHA des Blutspenders BB11 zusätzlich auf die Gele aufgetragen.

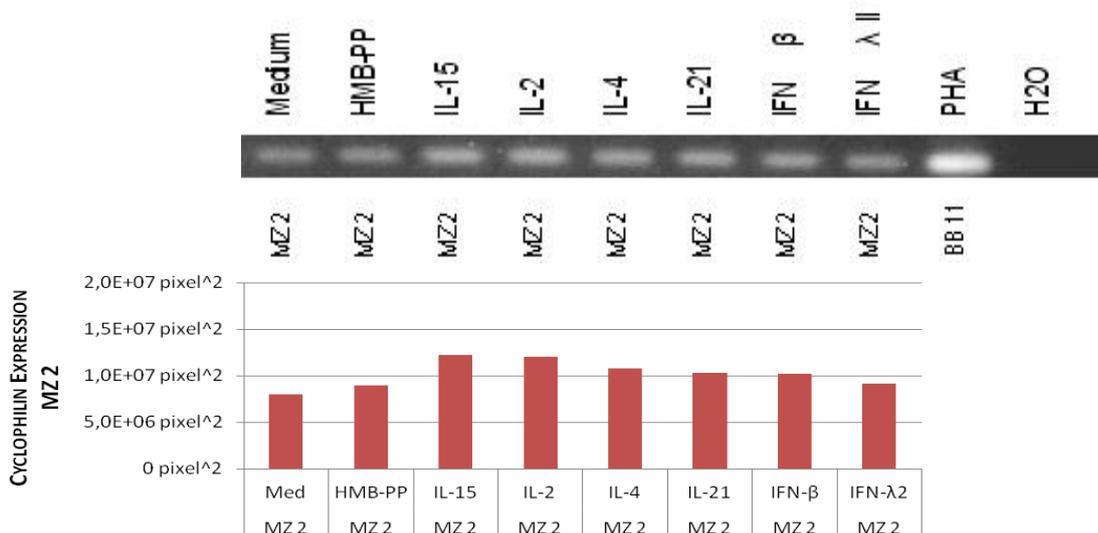


Abbildung 9: Standardisierung der Zellansätze MZ2 des Blutspenders MZ, Agarosegele und Image-J Analyse

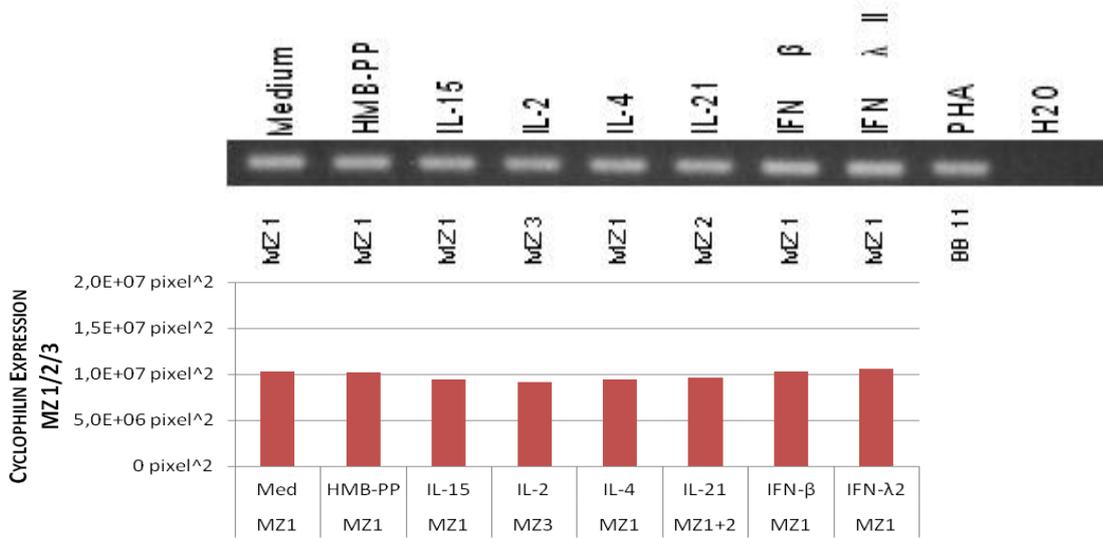


Abbildung 10: Standardisierung der Zellansätze MZ1, MZ2 und MZ3 des Blutspenders MZ, Agarosegele und Image-J Analyse

Die Standardisierung der Proben des Blutspenders SW ist in Abbildung 11 und Abbildung 12 zu sehen. Aufgrund der zeitlichen Abfolge der Experimente konnten die Zellen des Blutspenders SW mit IL-15 nicht durchgeführt werden. Auf das Gel in Abbildung 12 wurde zum Vergleich ebenfalls eine Probe des Zellansatzes mit PHA der Blutspender BB11 und BB7 aufgetragen.

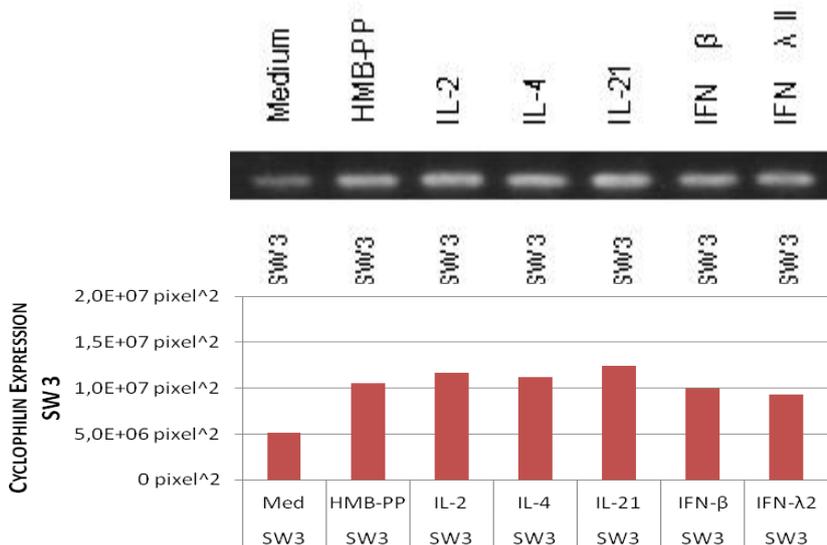


Abbildung 11: Standardisierung der Zellansätze SW2 und SW3 des Blutspenders SW, Agarosegele und Image-J Analyse

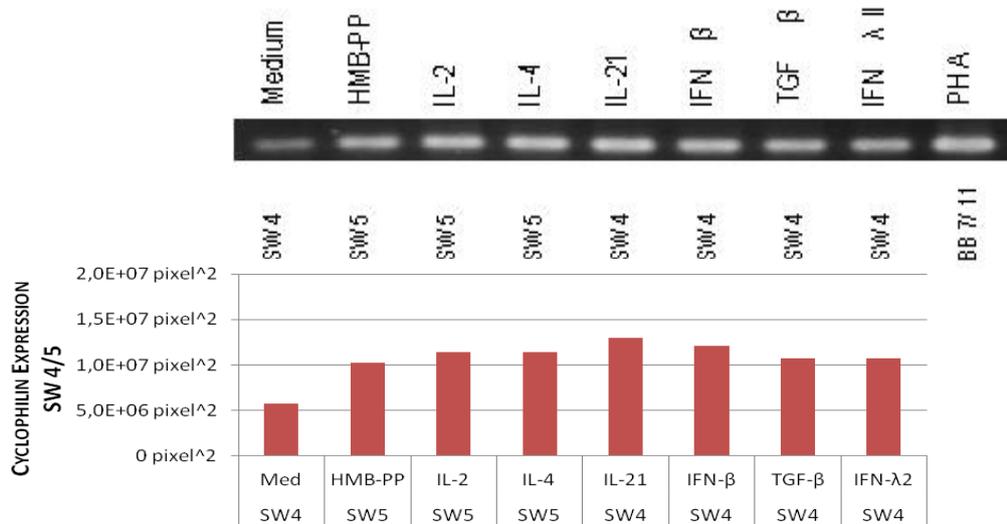


Abbildung 12: Standardisierung der Zellansätze SW4 und SW5 des Blutspenders SW, Agarosegele und Image-J Analyse

4.6. RT-PCR UND GEL-ELEKTROPHORESE

Entsprechend der Standardisierung mit Cyclophilin wurden die ermittelten Mengen, die zur Vereinheitlichung der Konzentration der cDNA der Ansätze führten, jeweils mit unterschiedlichen Intron-übergreifenden Primern in die PCR eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.2). Mit der PCR wurden Abschriften von mRNA, die für das jeweilige Protein codieren, vervielfacht und auf Agarosegelen sichtbar gemacht. Durch einen zuvor vollzogenen DNase-Verdau wurde eine Kontamination mit genomischer DNA nahezu ausgeschlossen. Durch die Intron-übergreifenden Primer wurde gewährleistet, dass sich eine Amplifikation eventuell übrig gebliebener genomischer DNA von der Amplifikation der cDNA templates, durch die Länge des Amplifikats unterscheiden lässt und somit eine Verfälschung der PCR-Ergebnisse durch eine Verunreinigung mit genomischer DNA ausgeschlossen werden kann.

Es sei hier darauf hingewiesen, dass ausschließlich die Genaktivierung mit Produktion von mRNA und nicht die Produktion der Proteine selbst nachgewiesen wurden. Es wurde jedoch angenommen, dass diese Zellen die entsprechenden Proteine der codierenden mRNA translatieren und exprimieren können. Bei anschließender Standardisierung der Proben musste auf die Methode mittels eines Haushaltsgenes zurück gegriffen werden. Eine Messung der Konzentration der totalen RNA-Präparation mittels Photometer oder Flourimeter war aufgrund der nur sehr geringen RNA-Menge der Blutspender nicht möglich. Da es sich hier um eine

quantitative RT-PCR handelte, konnten lediglich relative Mengenverhältnisse untereinander und zu den Negativkontrollen („Medium“ und „HMB-PP“) beschrieben und beurteilt werden. Der Zellansatz, der mit "Medium" bezeichnet wurde, enthielt ausschließlich Medium und damit ruhende V γ 9⁺ T-Zellen. Der Zellansatz "HMB-PP" beinhaltete ausschließlich Medium plus HMB-PP ohne kostimulatorische Zytokine und damit aktivierte V γ 9⁺ T-Zellen. Die Proben mit der Markierung "PHA" enthielten cDNA von PBMC, die ausschließlich mit Medium und PHA angesetzt wurden. Sie dienten zur Positivkontrolle der PCR, da davon ausgegangen wurde, dass die meisten der untersuchten Gene in aktivierten $\alpha\beta$ T-Zellen exprimiert werden. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit Medium, HMB-PP und den jeweiligen Stimulanzen angesetzt (siehe Kapitel 3.4.2). Die Proben mit der Markierung "H₂O" enthielten keine cDNA, sie dienten zur Negativkontrolle der PCR. Um eine Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse zu erhalten wurden alle PCR Durchläufe für jeden der drei verschiedenen Blutspender mindestens zweimalig durchgeführt. Eine Intensitätsmessung der Banden im Agarosegel nach erfolgter RT-PCR wurde mittels Image-J Software analysiert. (siehe auch Kapitel 3.6.6)

Es waren drei weitere Primer für die Experimente vorgesehen. Hierzu gehörten IL-10, TGF- β und IL-32. Diese Untersuchungen konnten aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden.

4.6.1.1 IL-4 Expression

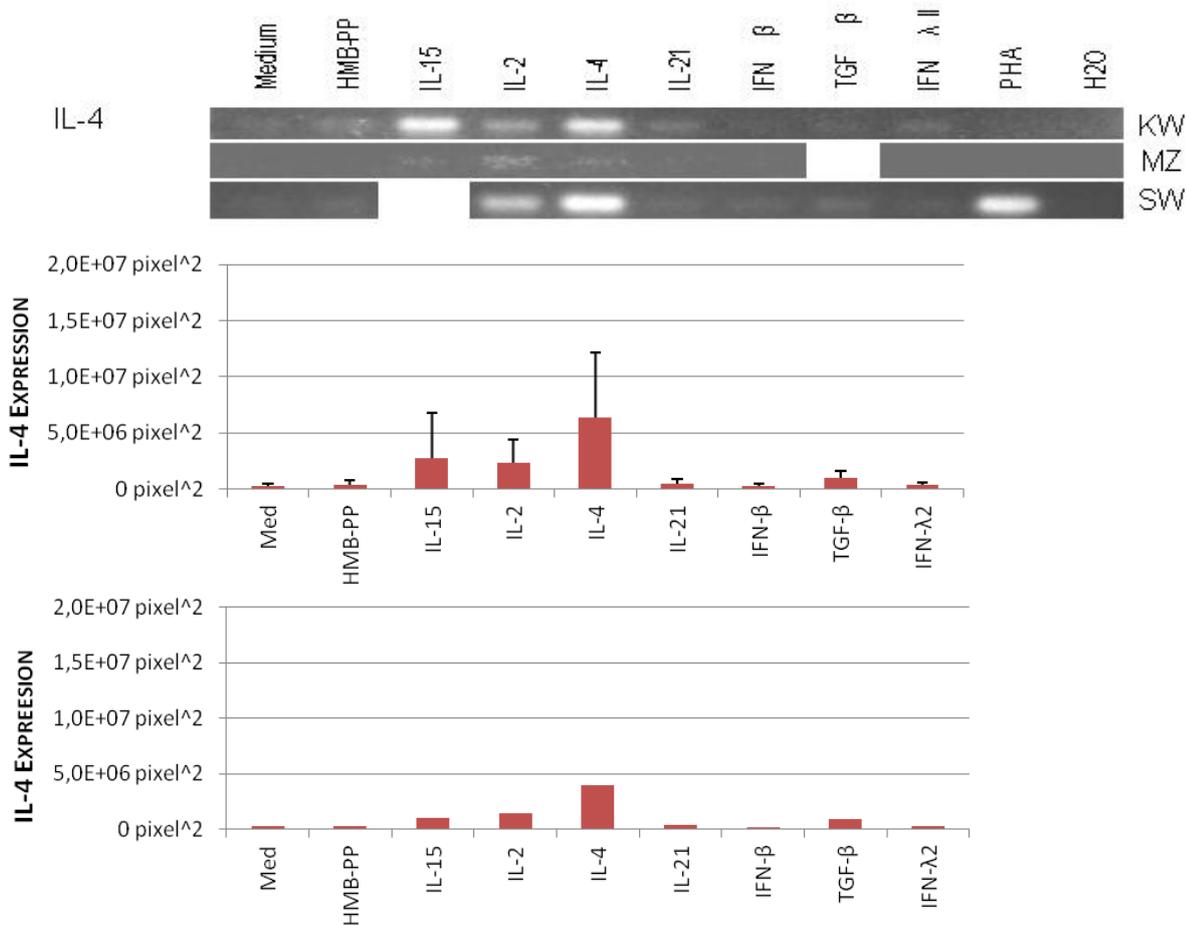


Abbildung 13: PCR Ergebnisse mit IL-4 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Die Positivkontrolle der PCR-Ergebnisse mit IL-4 spezifischen Primern der Blutspender KW und MZ war negativ, die von SW positiv (siehe Abbildung 13). Jedoch zeichneten sich deutliche PCR-Banden bei den mit IL-15 und IL-4 stimulierten Zellen ab, die beim Blutspender MZ nur durch sehr schwache Banden bestätigt werden konnten. Auch die mit IL-2 stimulierten $V\gamma 9^+$ T-Lymphozyten zeigten in allen Zellansätzen eine gut abgrenzbare, aber schwächere PCR-Bande. Die mit IL-21, IFN- β , TGF- β und die mit IFN- λ_2 stimulierten $V\gamma 9^+$ T-Lymphozyten gaben keine Hinweise für eine deutliche Expression von IL-4.

4.6.1.2 IL-21 Expression

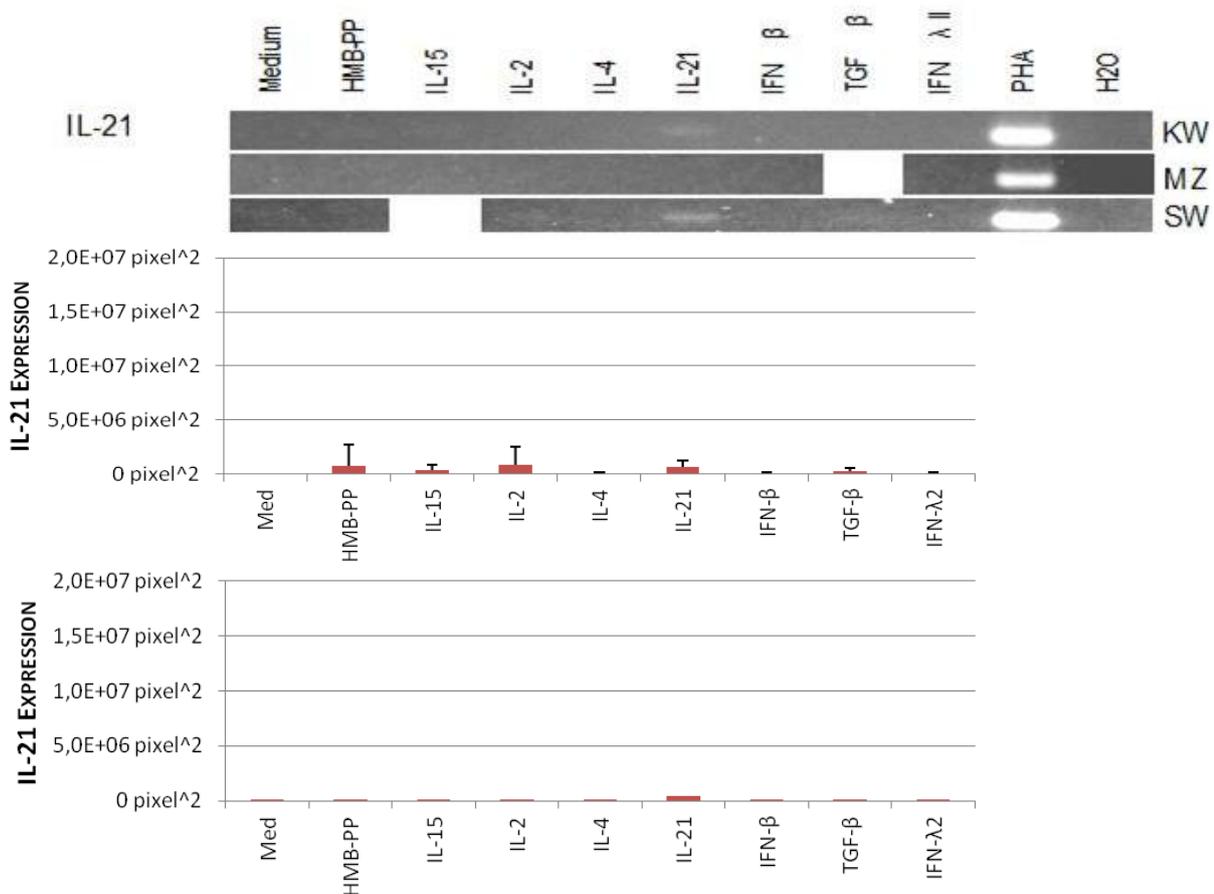


Abbildung 14: PCR Ergebnisse mit IL-21 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

In Abbildung 14 sind die PCR Ergebnisse mit IL-21 spezifischen Primern abgebildet. Die Vγ9⁺ T-Lymphozyten, die mit IL-21 stimuliert wurden, zeigten eine schwache Bande in den Zellansätze KW und SW. Die Zellansätze von MZ zeigten hingegen keine PCR-Bande für IL-21.

Mit IL-15, IL-4, IFN-β, TGF-β, und mit IFN-λ₂ induzierten Vγ9⁺ T-Lymphozyten gaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine erhöhte Expression von IL-21.

4.6.1.3 IL-21R Expression

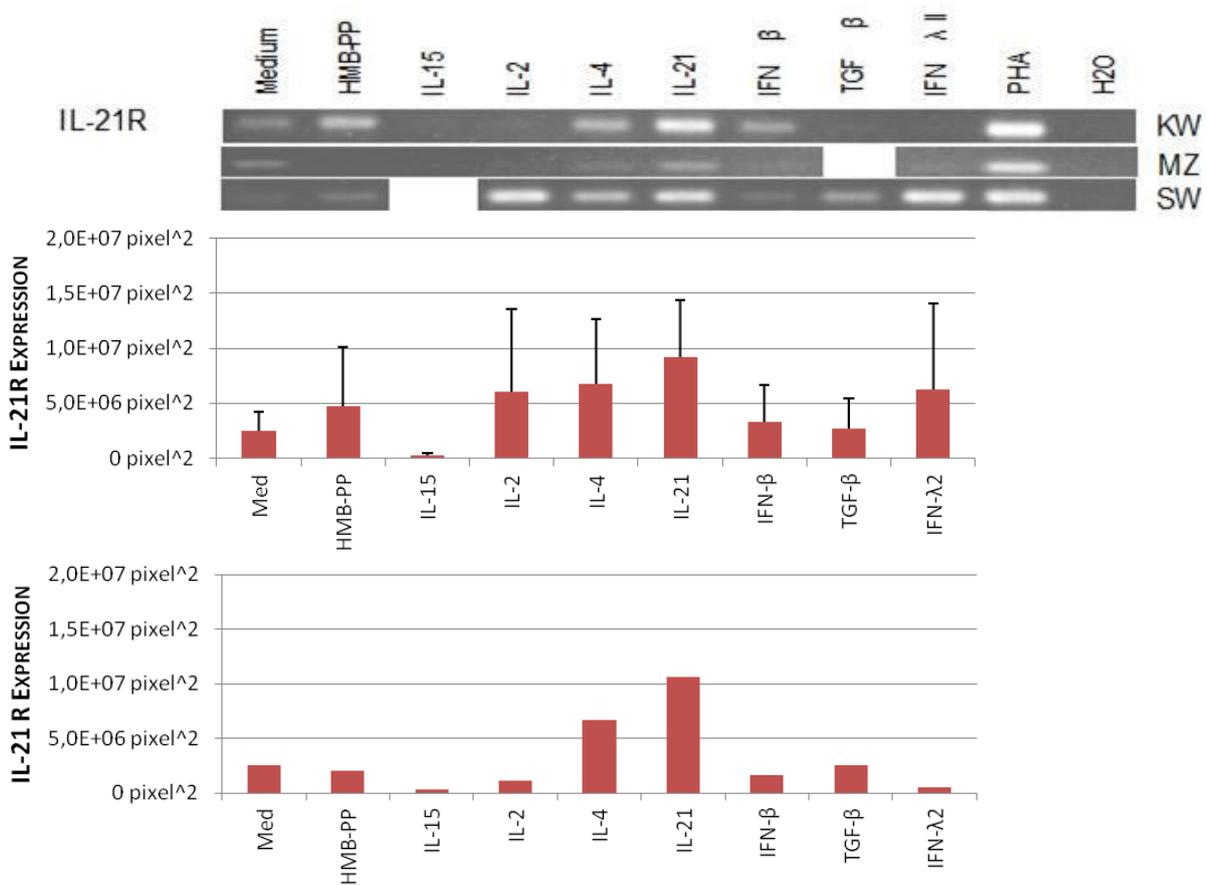


Abbildung 15: PCR Ergebnisse mit IL-21R spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Im Vergleich zu den mit „Medium“ gekennzeichneten PCR-Banden der Primer IL-21R der ruhenden Zellen (siehe Abbildung 15), sah man bei allen Blutspendern eine deutlich abgrenzbare PCR-Bande der mit IL-21 stimulierten $V\gamma 9^+V\delta 2^+$ T-Lymphozyten. Mit IFN- β und IL-4 stimulierte Zellen zeigten bei allen Blutspendern nur sehr schwache PCR-Banden, die kaum stärker waren als die Banden der Negativkontrolle ("HMB-PP") und die der ruhenden Zellen („Medium“). Die PCR Ergebnisse der Zellansätze KW und MZ gaben für die mit IL-15, IL-2 und IFN- λ_2 stimulierten $V\gamma 9^+$ T-Lymphozyten keinen Anhalt für eine mRNA-Expression. Jedoch waren in den Proben des Blutspenders SW, sowohl bei den mit IL-2, also auch bei den mit TGF- β oder IFN- λ_2 stimulierten Zellen, PCR-Banden gegenüber der Negativkontrolle („HMB-PP“) und den nicht stimulierten, ruhenden Zellen („Medium“) zu erkennen. Die PCR-Bande für TGF- β stimulierte Zellen konnte durch den Blutspender KW allerdings nicht bestätigt werden.

4.6.2 INTERFERONE

4.6.2.1 IFN- γ Expression

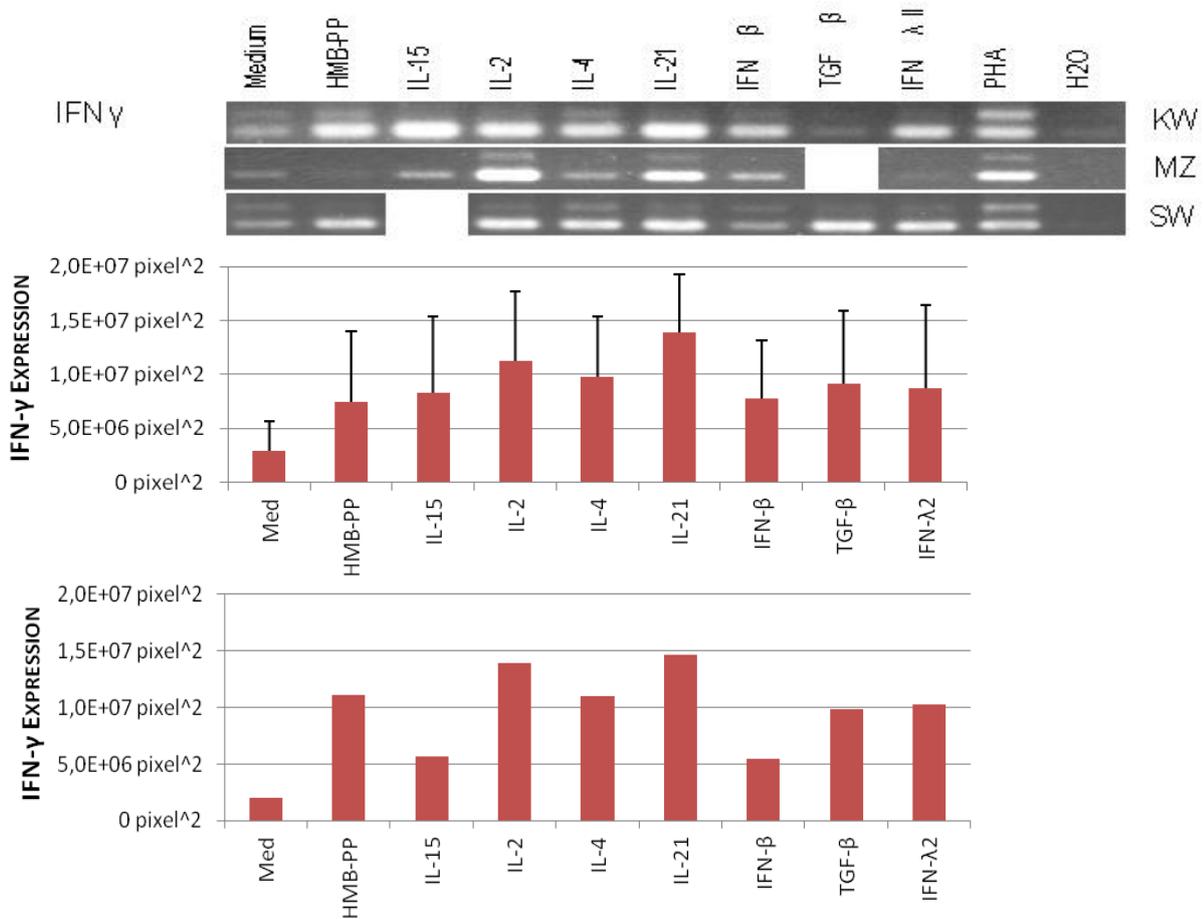


Abbildung 16: PCR Ergebnisse mit IFN- γ spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Die mit IL-2 und IL-21 stimulierten Zellen ließen eine starke PCR-Bande bei allen drei Blutspendern erkennen, während die mit IL-4 und IFN- β stimulierten $V\gamma 9^+$ T-Lymphozyten weit schwächere Banden zeigten, die jedoch im Vergleich zu den nicht stimulierten, ruhenden Zellen („Medium“) nahezu unverändert und in Bezug auf die Negativprobe „HMB-PP“ sogar leicht vermindert ausgeprägt waren. Auch die mit IL-15 stimulierten Zellen ließen visuell auf eine erhöhte Expression von IFN- γ schließen.

4.6.2.2 IL-28RA Expression

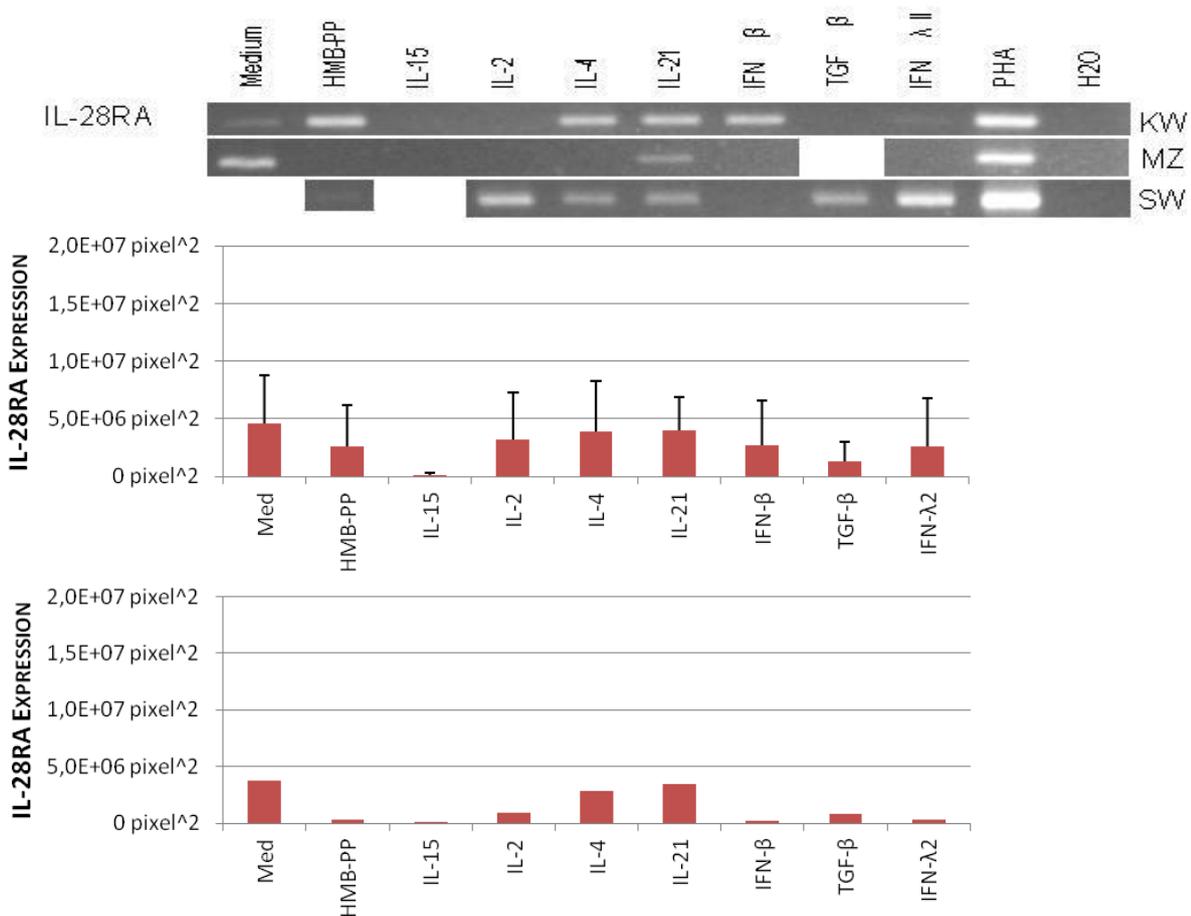


Abbildung 17: PCR Ergebnisse mit IL-28RA spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Die PCR-Banden der mit IL-21 stimulierten Zellen wiesen bei allen Blutspendern auf eine gesteigerte Expression von IL-28RA hin (siehe Abbildung 17). Auch bei den mit IL-4 stimulierten Zellen waren bei zwei von drei Spendern PCR-Banden zu erkennen. Die mit IL-2, TGF-β und IFN-λ₂ stimulierten Zellen zeigten beim Blutspender SW eine, sich von der Negativprobe („HMB-PP“) deutlich abgrenzende PCR-Bande, die jedoch durch die Zellen der anderen Blutspender nicht bestätigt werden konnte. Vγ9⁺ T-Lymphozyten, die mit IL-15 stimuliert wurden, zeigten keinen Anhalt für eine vermehrte Expression von IL-28RA.

4.6.3 LT- α EXPRESSION

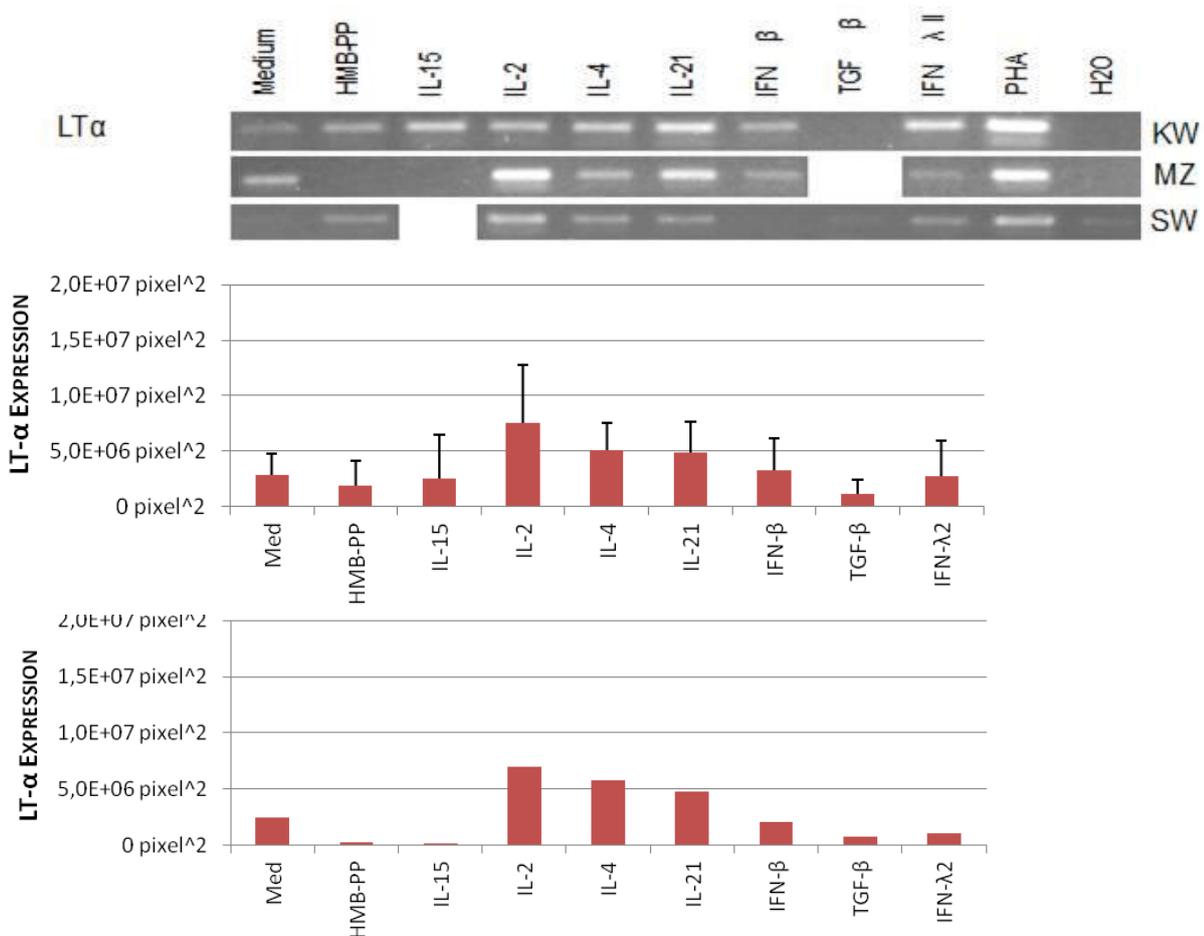


Abbildung 18: PCR Ergebnisse mit LT- α spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Abbildung 18 zeigt die PCR Ergebnisse mit LT- α spezifischen Primern. Die mit IL-2 und die mit IL-21 stimulierten V γ 9⁺ T-Lymphozyten aller Blutspender zeigten eine starke PCR-Bande, während die der mit IL-4 oder IFN- λ 2 stimulierten Zellen nur schwache PCR-Banden aufwiesen, welche sich nur teilweise von den Negativkontrollen „HMB-PP“ und „Medium“ hervorgehoben haben. In der ImageJ-Analyse ist die Expression nach Stimulation IL-4 deutlicher ausgeprägt.

4.6.4 CHEMOKINE

4.6.4.1 BCA-1 Expression

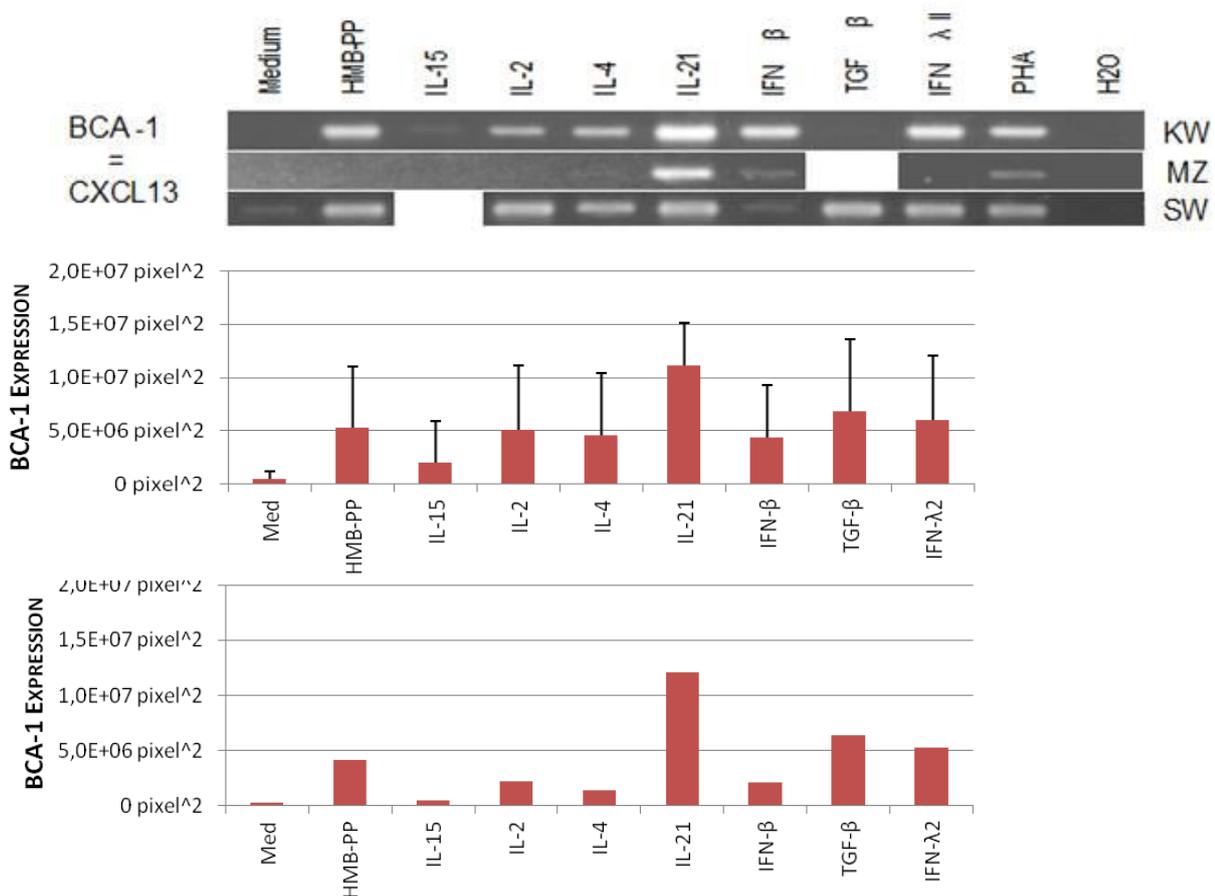


Abbildung 19: PCR Ergebnisse mit BCA-1 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Abbildung 19 zeigt die PCR Ergebnisse mit BCA-1 spezifischen Primern für die Blutspender KW, MZ und SW. $V\gamma 9^+$ Lymphozyten zeigten bei Stimulation mit IL-21 eine deutlich erhöhte Expression von BCA-1. Die Expression nach Stimulation mit IFN- β und IFN- λ_2 war weitaus schwächer ausgeprägt und im Vergleich zur Negativprobe nur bei zwei von drei Blutspendern nachweisbar. Auch die mit TGF- β stimulierten Zellen des Blutspenders SW wiesen, im Verhältnis gesehen, eine schwache PCR-Bande auf, die jedoch durch den Blutspender KW nicht bestätigt werden konnte.

4.6.4.2 MCP-1 Expression

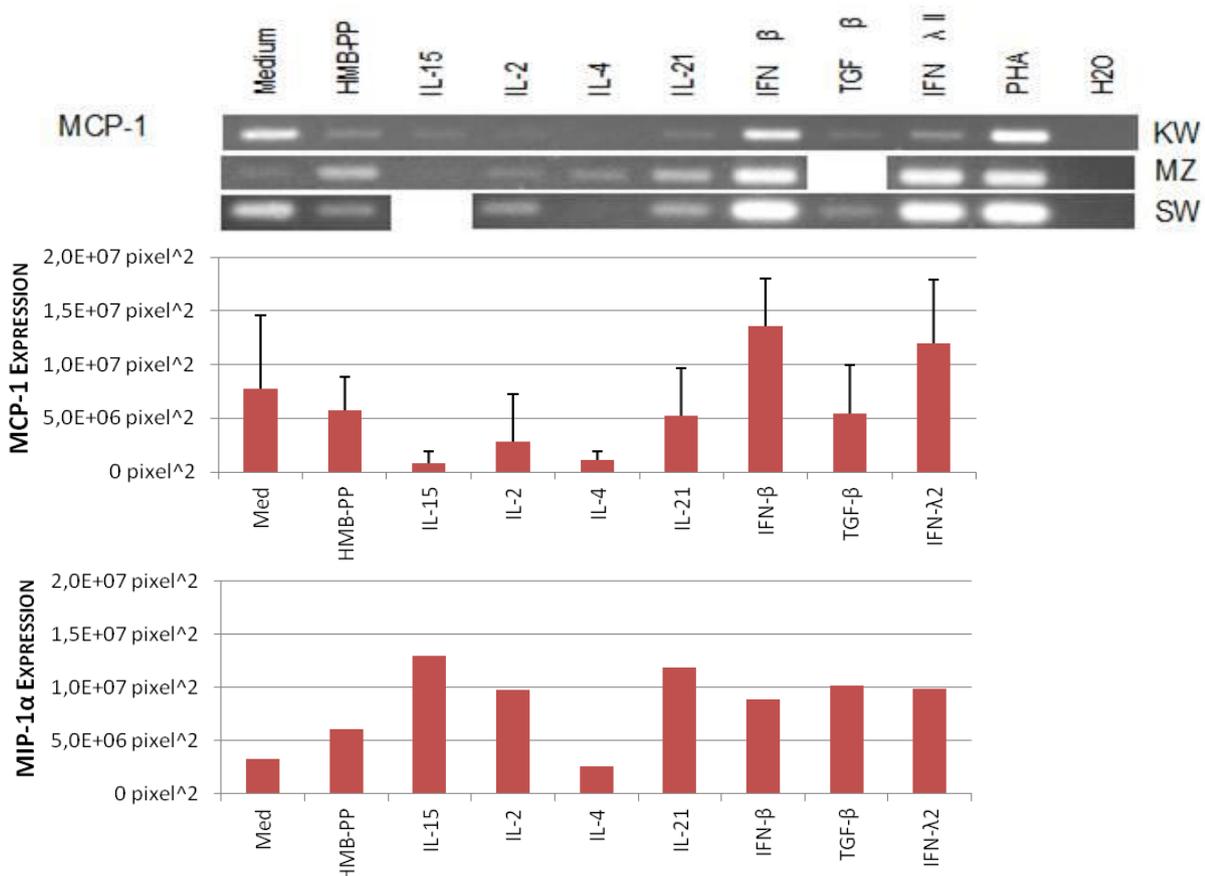


Abbildung 20: PCR Ergebnisse mit MCP-1 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Die mit IFN-β und IFN-λ₂ stimulierten Vγ9⁺ T-Lymphozyten aller Blutspender zeigten eine deutliche PCR-Bande, die jedoch bei den mit IFN-λ₂ stimulierten Zellen des Spenders KW nur schwach ausgeprägt war (siehe Abbildung 20). Weiterhin zeichnete sich bei den mit IL-21 stimulierten Zellen eine, sich von den mit „HMB-PP“ stimulierten Zellen kaum abhebende, schwache Bande ab.

Eine Verminderung der Expression von MCP-1 durch IL-15 oder IL-4 kann aufgrund der Ergebnisse vermutet werden.

4.6.4.3 MIP-1 α Expression

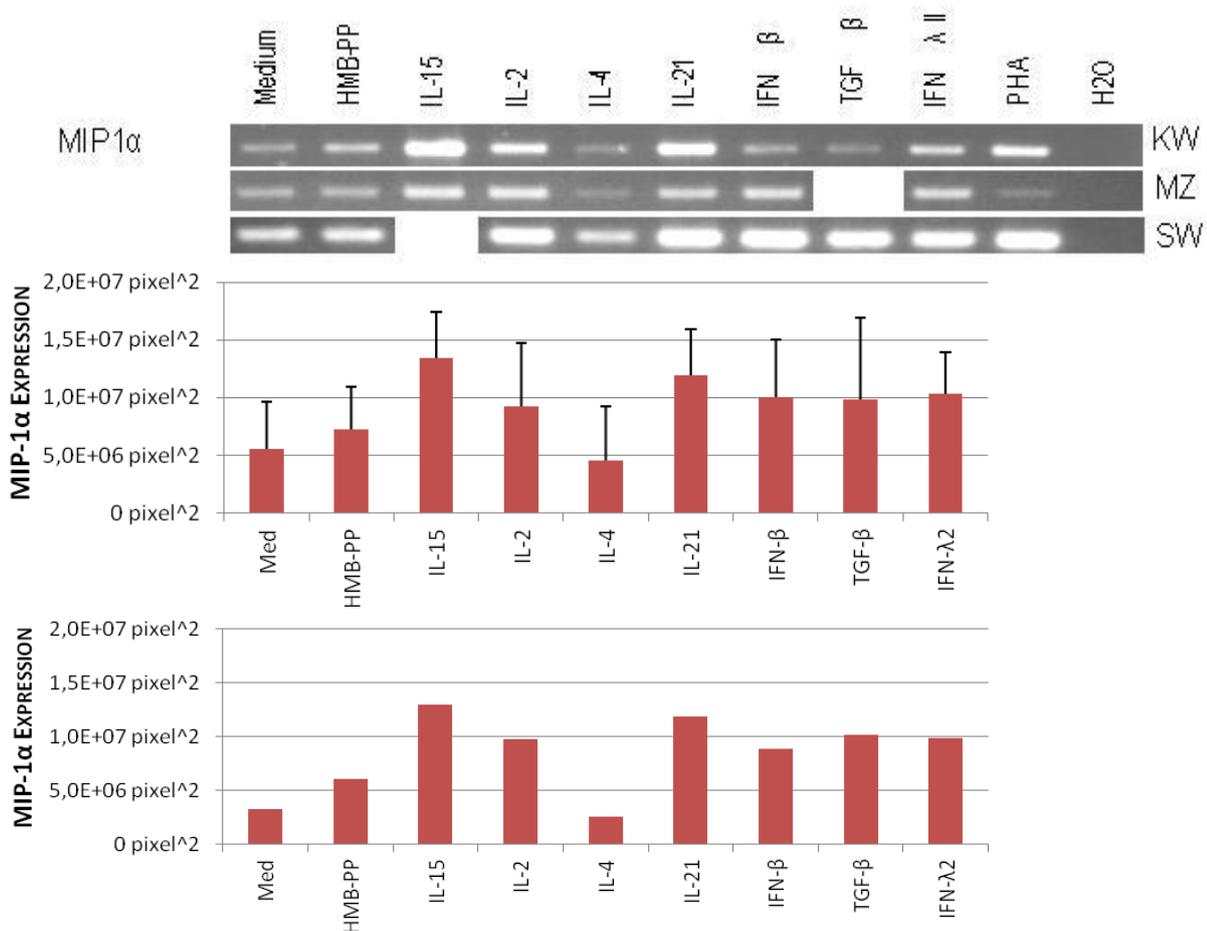


Abbildung 21: PCR Ergebnisse mit MIP-1 α spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Die PCR Ergebnisse für MIP-1 α sind in Abbildung 21 dargestellt. Die stärksten PCR-Banden zeigten die mit IL-15 stimulierten Zellen. Auch die mit IL-2 und IL-21 stimulierten Zellen aller Blutspender wiesen starke PCR-Banden auf. Während die mit IFN- β , IFN- λ_2 oder TGF- β stimulierten Zellen des Spenders SW und teils MZ ebenfalls starke Banden aufzeigten, sind die des Blutspenders KW nur schwach ausgeprägt. Die mit IL-4 stimulierten Zellen hingegen, zeigten eine Abschwächung der PCR-Banden im Vergleich zu den mit HMB-PP stimulierten („HMB-PP“) und den ruhenden Zellen („Medium“).

4.6.5 TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

4.6.5.1 FoxP3 Expression

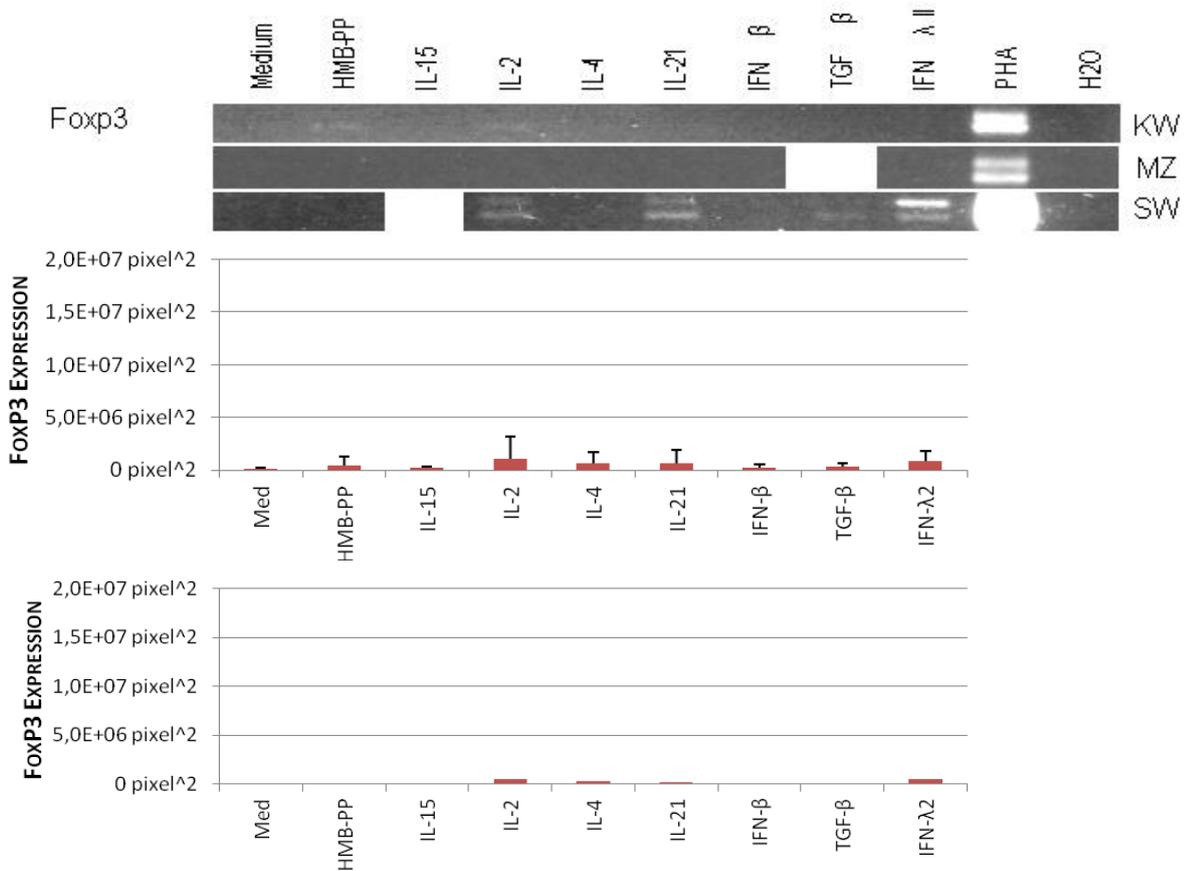


Abbildung 22: PCR Ergebnisse mit FoxP3 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse der PCR mit FoxP3 spezifischen Primers dargestellt. Wie zu erwarten, wurde FoxP3 nur von wenigen Vγ9⁺ Lymphozyten exprimiert. Die deutlichste PCR-Bande zeigten die mit IFN-λ₂ stimulierten Zellen des Blutspenders SW, die jedoch nicht durch die Blutspender KW und MZ bestätigt werden konnte. Auch die mit IL-2 und IL-21 stimulierten Zellen von SW zeigten sehr schwache PCR-Banden, die sich ebenfalls nicht bestätigen ließen. Auffällig war jedoch die sehr viel intensivere Positivkontrolle des Blutspenders SW im Vergleich zu den Blutspendern KW und MZ. Weder ruhende Zellen, HMB-PP stimulierte Zellen, noch mit IL-15, IL-4, IFN-β oder TGF-β stimulierte Zellen gaben einen Anhalt für die Expression von FoxP3.

4.6.5.2 GATA-3 Expression

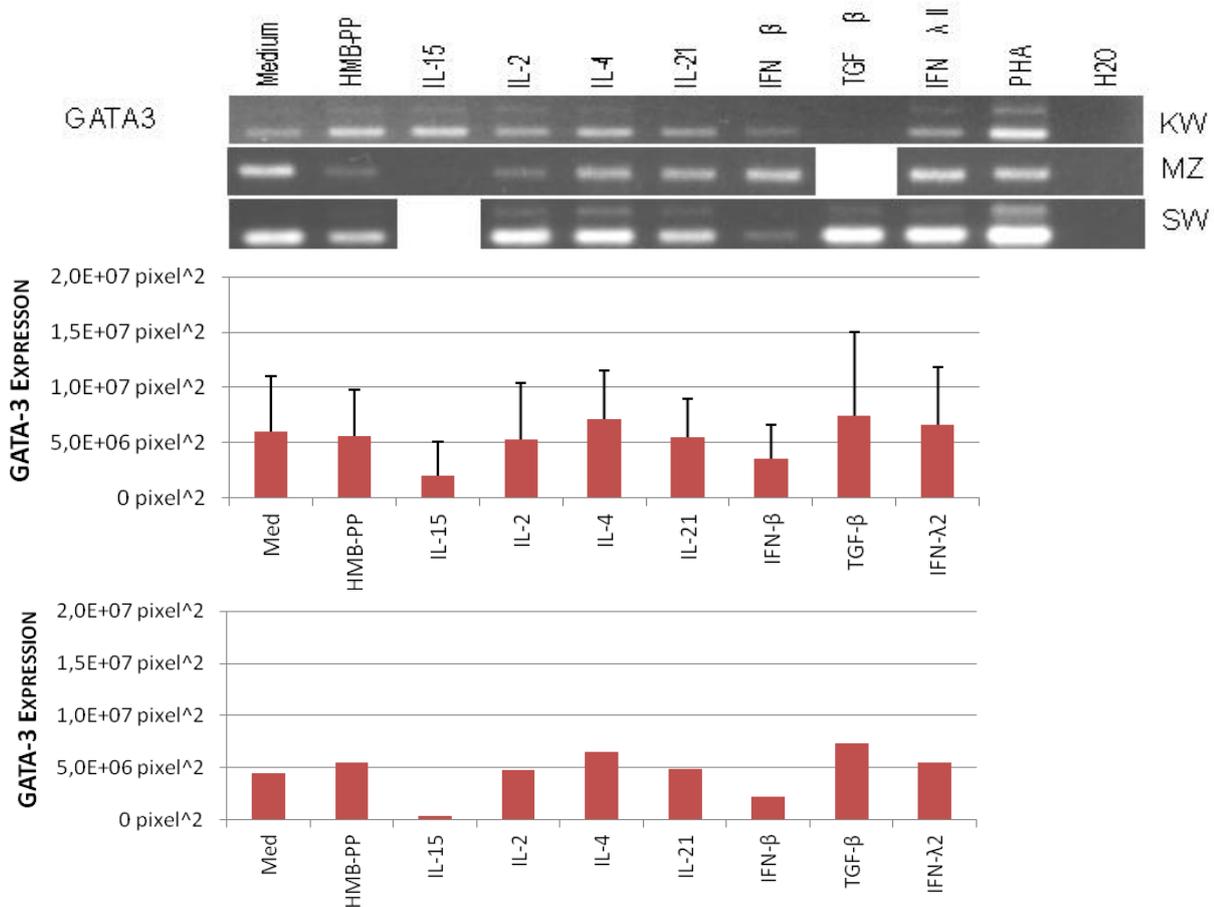


Abbildung 23: PCR Ergebnisse mit GATA-3 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Im Vergleich zu den ruhenden Zellen (Medium) sowie zu den mit HMB-PP aktivierten Zellen war keine deutliche Expressionserhöhung festzustellen. (siehe Abbildung 23)

4.6.5.3 T-bet Expression

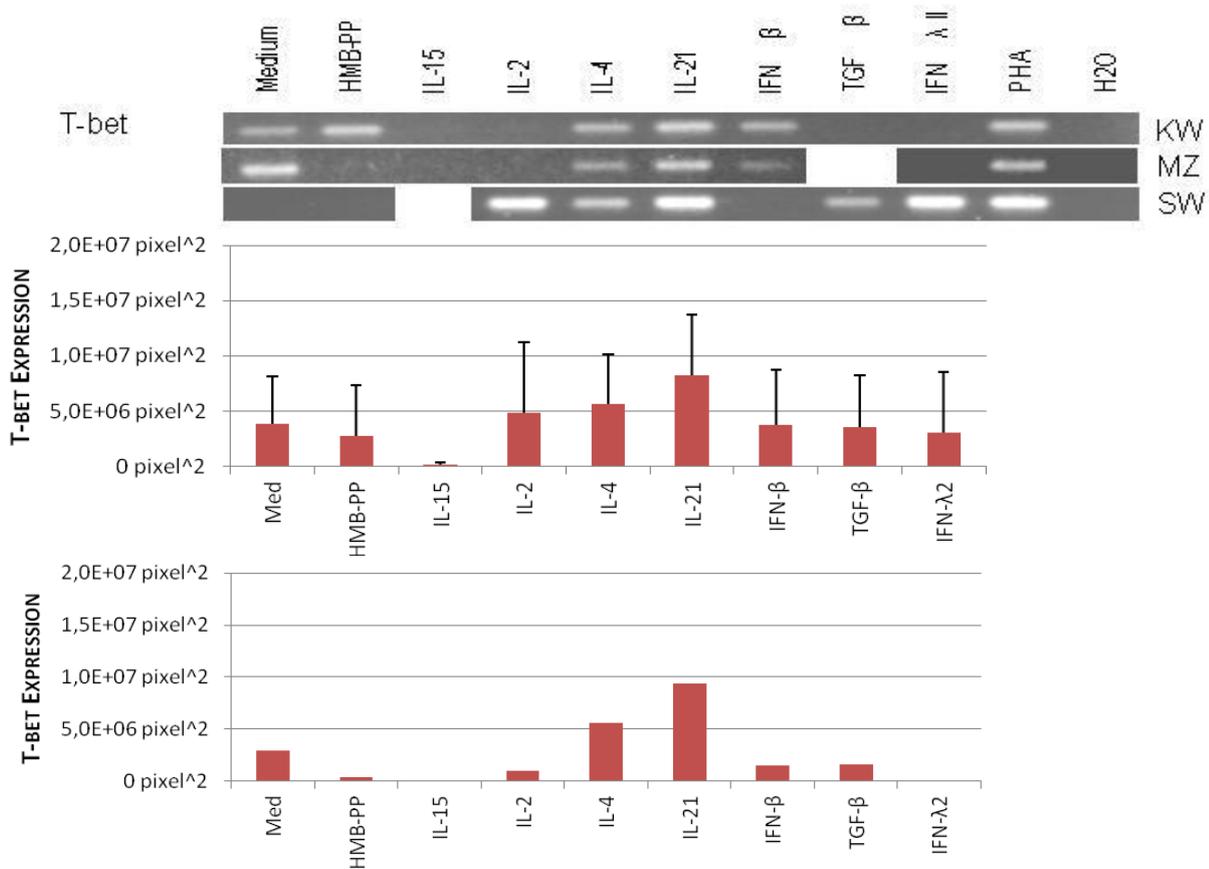


Abbildung 24: PCR Ergebnisse mit T-bet spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Das Muster der PCR-Banden in Abbildung 24 ähnelt sehr den PCR Ergebnissen mit IL-21R spezifischen Primer in Abbildung 15. Auch hier war eine starke PCR-Bande der mit IL-21 stimulierten $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Lymphozyten bei allen Blutspendern deutlich abzugrenzen. Im Vergleich zu den mit „Medium“ gekennzeichneten PCR-Banden der ruhenden Zellen konnte man bei zwei von drei Blutspendern eine Bande bei den mit IL-4 stimulierten Zellen erkennen. Die mit IFN- β stimulierten Zellen zeigten, im Vergleich zur Mediumprobe, nur bei KW eine schwache Bande, während die mit IL-2, TGF- β und IFN- λ_2 stimulierten $V\gamma 9^+$ T-Lymphozyten nur bei den Zellen des Blutspenders SW zu einer starken PCR-Bande führten, die durch die Blutspender KW und MZ nicht bestätigt werden konnte. Für die Zellen, die mit IL-15 stimuliert wurden, gab es bei den getesteten Blutspendern keinen Anhalt für eine mRNA-Expression.

4.6.6 FMR-1 EXPRESSION

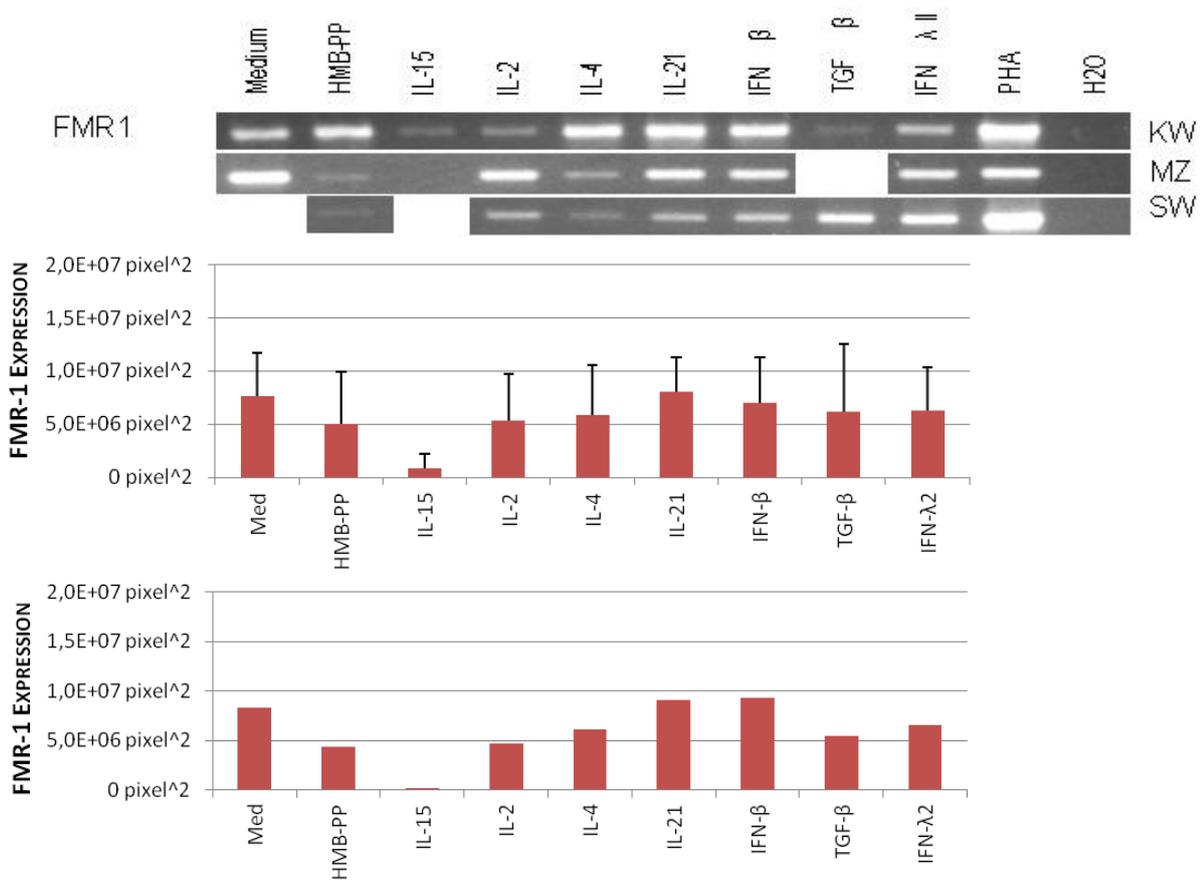


Abbildung 25: PCR Ergebnisse mit FMR-1 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.

Die Expression von FMR-1 schien in den Zellen der Blutspender KW, MZ und SW insgesamt sehr unterschiedlich zu sein (siehe Abbildung 25). Während die mit IL-21 und IFN-β stimulierten Zellen aller Blutspender eine PCR-Bande erkennen ließen, grenzten sich die PCR-Banden der mit IL-2, IL-4, TGF-β und IFN-λ₂ stimulierten Zellen jeweils nur bei einem Teil der Blutspender von ihren Negativkontrollen „HMB-PP“ ab. Die mit IL-15 stimulierten Zellen zeigten eine verminderte Expression von FMR-1.

4.6.7 ZUSAMMENFASSUNG DER PCR ERGEBNISSE

Zusätzlich zum jeweiligen Zytokin wurden die Ansätze mit HMB-PP gleichzeitig aktiviert. Um eine mögliche Polarisierung durch ein bestimmtes Zytokin beobachten zu können, ist es daher notwendig auch einen Vergleich mit allein durch HMB-PP aktivierten Zellen zu stellen. Zusammenfassend sind hier die P-Werte der Auswertung der PCR Ergebnisse in Bezug auf Medium (siehe Tabelle 8) und in Bezug auf HMB-PP (siehe Tabelle 9) aufgelistet. Eine qualitative PCR konnte nicht

durchgeführt werden. Stattdessen wurden die Fotos der Agarosegele nachträglich eingescannt und mit dem Bildbearbeitungsprogramm Image-J die Bandenintensitäten gemessen. Anschließend erfolgte eine statistische Auswertung mittels T-Test (Medianwerte) einerseits in Bezug auf die Mediumprobe sowie andererseits in Bezug auf die HMB-PP-Probe.

IL-4 wurde insbesondere durch IL-4 selbst hochreguliert, dies konnte allerdings nur bei 2 von 3 Blutspendern bestätigt werden, aber auch IL-2 führte zu einer stärkeren Expression (P-Wert 0,042). Die PCR-Ergebnisse für die Expression von IL-21 lassen optisch vermuten, dass es durch IL-21 zu einer Steigerung der Expression kommt, diese Vermutung spiegelt sich auch in den Zahlen wieder, lässt jedoch keine Schlussfolgerung auf eine erhöhte Expression zu (siehe Tabelle 9). Auch eine vermehrte Expression des IL-21R und von T-bet durch IL-21 konnte nur visuell vermutet, jedoch nicht eindeutig mit Zahlen belegt werden. Dahingegen kam es nach Stimulation mit IL-15 zu einer deutlichen Inhibition der Expression von IL-21R (P-Wert 0.026) und T-bet (P-Wert 0,015).

Das T_H1 -Zytokin IFN- γ wurde in $V\gamma9^+/V\delta2^+$ T-Lymphozyten durch IL-15, IL-2 sowie durch IL-21 verstärkt, während IL-4, IFN- β und IFN- λ_2 die Genaktivierung eher unbeeinflusst ließen oder diese sogar verminderten.

LT- α hingegen wurde durch Stimulation mit IL-2 deutlich hochreguliert (P-Wert 0.009 in Bezug auf Medium bzw. 0.030 in Bezug auf HMB-PP). Auch nach Stimulation mit IL-4, IL-21 und IFN- λ_2 kam es optisch zu einer erhöhten Genaktivierung.

MIP-1 α wurde ebenfalls durch Stimulation mit IL-15 vermehrt exprimiert. Während IL-2 und IL-21 nur optisch eine Tendenz hierzu zeigen.

Es gibt Hinweise auf die Hochregulation von MCP-1 durch IFN- β oder IFN- λ_2 . Eine Verminderung der Expression durch IL-15 oder IL-4 kann aufgrund der Ergebnisse vermutet werden.

Eindeutig, sowohl optisch als auch statistisch, war die erhöhte Genaktivierung von BCA-1 in $V\gamma9^+/V\delta2^+$ T-Lymphozyten nach Stimulation mit IL-21 (P-Wert 0.003).

FMR-1 hingegen ließ nur optisch eine vermehrte Expression durch Stimulation mit IL-21 oder IFN- β vermuten, ohne eine statistische Bestätigung der Werte. Die mit IL-15 stimulierten Zellen zeigten eine verminderte Expression von FMR-1.

Eine Beeinflussung der Genaktivierung von IL-28RA, GATA-3 und FoxP3 wurde in $V\gamma9^+/V\delta2^+$ T-Lymphozyten mit den stimulierten Zytokinen und HMB-PP nicht erzielt. Lediglich visuell lässt sich eine Tendenz zur vermehrten Expression von IL-28RA

durch Stimulation mit IL-21 sowie eine verminderte Expression durch Stimulation mit IL-15 vermuten.

Tabelle 8: Zusammenfassung der PCR Ergebnisse: P-Werte in Bezug auf Medium

Stimulanzen Primer	nur HMB-PP	IL-15 + HMB-PP	IL-2 + HMB-PP	IL-4 + HMB-PP	IL-21 + HMB-PP	IFN-β + HMB-PP	TGF-β + HMB-PP	IFN-λ ₂ + HMB-PP
GATA-3	0,989	0,950	0,964	0,715	0,926	0,340	0,954	0,698
IL-4	0,364	0,403	0,042 ↑	0,089 ↑	0,256	0,747	0,373	0,505
IL-21	0,519	0,378	0,299	0,532	0,174 ↑	0,163	0,338	0,223
IL-21R	0,447	0,026 ↓	0,628	0,359	0,113 ↑	0,608	0,872	0,027 ↓
T-bet	0,863	0,015 ↓	0,737	0,390	0,130 ↑	0,949	0,949	0,015 ↓
IFN-γ	0,268	0,450	0,144	0,128	0,015 ↑	0,149	0,496	0,625
IL-28RA	0,985	0,297	0,673	0,829	0,999	0,595		0,311
LT-α	0,814	0,819	0,009 ↑	0,117	0,139	0,734	0,705	0,960
BCA-1	0,156	0,452	0,158	0,159	0,003 ↑	0,310	0,418	0,416
MCP-1	0,495	0,395	0,341	0,127 ↓	0,502	0,425	0,145	0,634
MIP-1α	0,681	0,089 ↑	0,370	0,839	0,149	0,443	0,827	0,039 ↑
FMR-1	0,638	0,061 ↓	0,098 ↑	0,650	0,914	0,615		0,260
FoxP3	0,448	0,942	0,232	0,759	0,593	0,579		0,855

Tabelle 9: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: P-Werte in Bezug auf HMB-PP

Stimulanzen Primer	IL-15 + HMB-PP	IL-2 + HMB-PP	IL-4 + HMB-PP	IL-21 + HMB-PP	IFN-β + HMB-PP	TGF-β + HMB-PP	IFN-λ ₂ + HMB-PP
GATA-3	0,977	0,973	0,708	0,940	0,358	0,885	0,864
IL-4	0,424	0,055 ↑	0,095 ↑	0,830	0,338	0,562	0,944
IL-21	0,432	0,415	0,427	0,191 ↑	0,844	0,446	0,896
IL-21R	0,424	0,989	0,872	0,352	0,660	0,302	0,986
T-bet	0,403	0,804	0,504	0,175	0,807	0,392	0,970
IFN-γ	0,776	0,704	0,766	0,255	0,963	0,560	0,838
IL-28RA	0,429	0,738	0,934	0,873	0,672	0,269	0,984
LT-α	0,762	0,030 ↑	0,259	0,258	0,921	0,144	0,679
BCA-1	0,660	0,955	0,827	0,258 ↑	0,696	0,587	0,882
MCP-1	0,166 ↓	0,578	0,068 ↓	0,938	0,078 ↑	0,919	0,172 ↑
MIP-1α	0,136 ↑	0,557	0,553	0,222	0,633	0,976	0,472
FMR-1	0,501	0,630	0,880	0,507	0,878	0,595	0,958
FoxP3	0,442	0,948	0,994	0,988	0,986	0,934	0,932

5. DISKUSSION

5.1. METHODENWAHL UND LIMITIERUNGEN

5.1.1 AUSWAHL DER BLUTSPENDER

Aus den gewonnenen Blutproben wurden die Leukozyten separiert und anschließend mit HMB-PP und Zytokinen stimuliert. Nach 72 Stunden wurden die $V\gamma 9^+$ Zellen mittels MACS aufgereinigt und deren RNA isoliert.

Bei einer Stimulationsdauer von 72 Stunden kommt es zwar zu einer Aktivierung der Zellen, jedoch nicht zu einer deutlichen Proliferation. Darum spielt die Ausgangszahl der $V\gamma 9^+$ Zellen im nicht stimulierten Vollblut eine Rolle. Aus diesem Grund haben wir uns entschieden Blutspender mit einem großen Anteil von $V\gamma 9^+$ Zellen im unstimulierten Vollblut zu verwenden (siehe Kapitel 4.1.1).

Für diese Arbeit wurden 3 Blutspender mit jeweils einer Blutentnahme ausgewählt. Eine Überprüfung zeitversetzt entnommener Blutproben war im Zeitrahmen dieser Arbeit nicht realisierbar.

Um eine Reproduzierbarkeit der PCR-Ergebnisse gewährleisten zu können, wurde jede PCR der Zellansätze der 3 Blutspender mindestens zweimalig durchgeführt.

Die Ergebnisse der einzelnen Blutspender wurden miteinander verglichen mit dem Ziel einen Hinweis auf die Reaktion der $V\gamma 9^+$ Zellen nach Stimulation mit folgenden Zytokinen zu bekommen. Die Stimulation mit IL-2, IL-4, IL-21, IFN- β und IFN- λ_2 wurde für alle 3 Blutspender durchgeführt. Die Stimulation mit IL-15 und TFG- β war aufgrund des limitierten Blutmaterials nur bei 2 von 3 Blutspendern möglich.

5.1.2 ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER EXPERIMENTE

Nach der Lymphozytenseparation mit LSM[®] (ICN/ Cappel) wurde ein Teil der Zellen direkt angesetzt, alle weiteren Zellen wurden für die spätere Verwendung eingefroren. Um eine optimale Aktivierung und Stimulation der $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Lymphozyten zu erreichen, wurden die Zellen auf 2×10^5 Zellen pro well beschränkt und mit 1nM HMB-PP und den unterschiedlichen Stimulanzen für 72 Stunden inkubiert (siehe Kapitel 3.4 und Kapitel 3.4.2 Tabelle 2). Die Wahl der Konzentration der Stimulanzen sowie die Stimulationsdauer beruhten auf Erfahrungswerten unserer Arbeitsgruppe sowie Erfahrungswerten ähnlicher Studien anderer Arbeitsgruppen (siehe Kapitel 3.4). Eine Testung verschiedener Konzentrationen

oder Stimulationsbedingungen für alle Zytokine wurde nicht durchgeführt. Es ist nicht auszuschließen, dass nicht aktivierte Gene durch andere Bedingungen doch hätten aktiviert werden können, insbesondere da nur 3 Blutspender untersucht wurden. Dadurch sind die Ergebnisse dieser Arbeit auf diese Stimulationsbedingungen begrenzt und müssten gegebenenfalls noch unter anderen Stimulationsbedingungen wiederholt werden, um eine allgemein gültige Aussage der Wirkung der einzelnen Stimulanzen aussprechen zu können. Diese umfangreichen Folgeexperimente werden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe teilweise durchgeführt (vgl. Vermijlen 2007 und Bansal 2012). Es ist bekannt, dass eine Stimulationsdauer mit Zytokinen und HMB-PP von 3 Tagen nicht zu einer Proliferation der Zellen, sondern lediglich zu einer Aktivierung der Zellen führt. Nach neueren Erkenntnissen ist eine Dauer von 3 Tagen sogar eher zu lang, da die meisten Gene innerhalb weniger Stunden schon ihre maximale Expression erreichen und es passieren kann, dass manche Gene nach 3 Tagen eventuell schon wieder abgeschaltet werden (siehe auch: Eberl 2009). Ab einer bestimmten Konzentration an Zellen pro well gehen diese zugrunde. Daher haben wir uns für einen niedrigen Bereich entschieden, um dem Effekt der Zytokine mehr Spielraum zu lassen.

Aus den stimulierten Lymphozyten wurden anschließend die $V\gamma 9^+$ T-Zellen mit MACS (Magnetic Cell Sorting) aufgereinigt und anschließend mit RNeasy Mini Kit (Qiagen) lysiert, um mRNA, ausschließlich von $V\gamma 9^+$ T-Lymphozyten zu erhalten. Bei der Aufreinigung der Zellen wurde eine Reinheit von 87,95% bis 98,09% erzielt. Das bedeutet, dass die mRNA zu 1,01% bis 12,05% aus anderen Zellen stammt und somit einige Werte verfälscht sein könnten. Dies ist ein suboptimales Ergebnis im Vergleich zu einer Aufreinigung mittels Durchflusszytometrie, welche eine nahezu vollständige Aufreinigung ermöglichen würde. Diese Methode stand uns jedoch zum Zeitpunkt der Durchführung dieser Arbeit nicht zur Verfügung. Aufgrund des nur begrenzt zur Verfügung stehenden Materials musste auf die Durchführung weiterer Aufreinigungsschritte verzichtet werden, da diese mit Zellverlusten verbunden gewesen wären.

Eine Beeinflussung der Ergebnisse der RT-PCR durch $V\gamma 9^-$ T-Zellen ist somit nicht auszuschließen. Künftige Arbeiten sollten daher eine Aufreinigung der $V\gamma 9^+$ T-Zellen mittels Durchflusszytometrie anstreben. Jedoch sind die Stimulationsbedingungen mit gleichzeitiger Aktivierung der Zellen auf $V\gamma 9^+$ T-Zellen zugeschnitten. Zudem werden die Ergebnisse der Experimente in Relation zur HMB-PP Probe gesehen.

Wir können nicht ausschließen, dass eine Stimulation mit Zytokinen ohne Aktivierung mit HMB-PP nicht diese Effekte ausgelöst hätten, da wir keine entsprechende Kontrolle (Zytokinstimulation ohne Aktivierung mit HMB-PP) mitgeführt haben. Auch kann es sein, dass eine Aktivierung mit 10nM HMB-PP effektiver gewesen wäre.

Nach der Stimulation und Aufreinigung der $V\gamma 9^+$ T-Zellen erfolgte die Isolation der Gesamt-RNA. Durch einen gleichzeitigen DNase-Verdau wurde einer Verfälschung der PCR-Ergebnisse durch mögliche Kontamination mit genomischer DNA vorgebeugt. Zur Sicherheit wurden zusätzlich Intron-übergreifende Primer in der RT-PCR verwendet, so dass eine Amplifikation von genomischer DNA eine deutlich größere Bande über der eigentlichen PCR-Bande der amplifizierten cDNA ergeben hätte. Da dies nicht der Fall war (siehe Beispiel in Kapitel 3.6.2 Abbildung 7), konnte eine signifikante Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden. Die Analyse der RNA-Isolation per Gelelektrophorese war aufgrund der sehr begrenzten Menge an Gesamt-RNA von maximal 0.1-1 μ g pro Blutspender nicht möglich. Daher war auch eine Messung der Menge der Gesamt-RNA mittels Photometer oder Flourimeter nicht möglich. Laut Herstellerangaben tolerierte die verwendete Reverse Transkriptase einen sehr breiten RNA-Konzentrationsbereich. Daher wurde von einer relativ gleichbleibenden Effizienz der cDNA-Synthese ausgegangen.

Aus diesen Gründen musste für die Standardisierung der Proben auf die Methode mittels Haushaltgenen (housekeeping gene) wie Cyclophilin oder Actin zurück gegriffen werden. Wobei aufgrund des nur in geringer Menge zur Verfügung stehenden Materials die Standardisierung auf Cyclophilin beschränkt wurde. Die Standardisierung erfolgte mittels visueller Angleichung der Bandenintensitäten durch Angleichung der eingesetzten Konzentrationen an Gesamt-cDNA in die RT-PCR (siehe Kapitel 3.6.4). Dies wiederum geht mit einer verbleibenden Ungenauigkeit einher, die bei der Interpretation der Daten zu berücksichtigen ist.

Die Messung der Bandenintensität war zum Durchführungszeitpunkt der Arbeit noch nicht etabliert, so dass die Auswertung der Ergebnisse zunächst visuell erfolgte.

Nachträglich wurde eine objektive Auswertung durch Analyse der Bandenintensität mittels Image-J Software durchgeführt. Dazu wurden die Polaroidfotos der Agarosegele eingescannt und die Intensität der Banden gemessen (siehe Kapitel 3.6.6).

Die Zahlen wurden anschließend mittels T-Test statistisch ausgewertet. Die P-Werte wurden aus den Medianwerten der Blutspender berechnet und in Bezug auf Medium

und HMB-PP betrachtet (siehe Kapitel 4.6.7 Tabelle 8 und Tabelle 9), da es sich nur um eine kleine Stichprobe ($n=3$) handelt. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden zusätzlich die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen PCR-Ergebnisse abgebildet. Eine Signifikanztestung wurde bei zu kleiner Stichprobe nicht durchgeführt.

5.2. ERGEBNISSE DER RT-PCR UND IMAGE-J ANALYSE

Mit der RT-PCR wurde die Genaktivierung nachfolgend beschriebener Zytokine und Transkriptionsfaktoren anhand der mRNA Produktion geprüft. Ein Rückschluss auf die tatsächliche Proteinsynthese kann jedoch nicht direkt gezogen werden, da die Translation durch mehrere Faktoren beeinflusst wird. Es wird davon ausgegangen, dass die Stärke der PCR-Bande direkt mit der Menge der cDNA für das jeweilige Zytokin (bzw. der mRNA) und damit auch mit der Stärke der Genaktivierung korreliert. Jedoch kann man andere Einflüsse, die zu einer verminderten Translation und Sekretion der Proteine führen könnten nicht ausschließen. In Nachfolge-Untersuchungen von anderen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe konnten einige Ergebnisse auch mit real-time RT-PCR sowie auf Proteinebene bestätigt werden (vgl. Vermijlen 2007 und Bansal 2012).

Durch die Standardisierung mit Cyclophilin ist ein relativer Vergleich der Bandenstärke und damit der Stärke der Expression der $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen eines Blutspenders möglich.

Die Expressionsmuster der 3 Blutspender zeigten teilweise eindeutige Übereinstimmungen, welche nachfolgend dargestellt werden.

5.2.1 IL-15 VERSUS IL-2 STIMULIERTE $\gamma\delta$ T-LYMPHOZYTEN

Aufgrund der großen Sequenzhomologie von IL-2 und IL-15 (Leonard 2005) werden die Ergebnisse der PCR von $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen, die mit diesen Stimulanzen kultiviert wurden, hier im Zusammenhang diskutiert.

Interleukin 15 gehört wie IL-2 zu den γ_C -Zytokinen (Boullier 1999). Es wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten als ein potenter Aktivator der T_H1 -Immunantwort in $\alpha\beta$ T-Zellen (Körholz D 1997) sowie in $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben (García 1998; Wesch 2001).

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten ebenfalls eine mögliche Polarisierung der Zellen in T_H1 -ähnliche $\gamma\delta$ T-Zellen. Dies wird insbesondere durch eine vermehrte Expression von T_H1 -typischen Zytokinen wie LT- α (Mosmann 1996), MIP-1 α (Sallusto 1998) und dem visuellen Eindruck einer vermehrten IFN- γ Expression (Lafont 2003) deutlich. Auch die Inhibition der Expression des T_H2 -typischen Zytokins MCP-1 lässt diese Vermutung zu (Sallusto 1998).

In zuvor vorangegangenen Arbeiten wurde IFN- γ als proinflammatorisches Zytokin und Marker für T_H1 -Zellen beschrieben (Mosmann 1996), welches durch Stimulation

mit IL-2, IL-12 und Typ 1 Interferone wie IFN- α oder IFN- β induziert werden kann (Boullier 1999; Rothenfusser 2001).

Die Expression von IFN- γ nach Stimulation mit IL-2 oder IL-15 konnte in den durchgeführten Untersuchungen nur visuell nachvollzogen und nicht durch die statistische Auswertung bestätigt werden (siehe Abbildung 16). Jedoch konnten bereits in zuvor durchgeführten Experimenten unserer Arbeitsgruppe eine deutliche Expression von IFN- γ mit intrazellulärer Anfärbung beobachtet werden (Eberl 2002b). Aufgrund der vermehrten Expression von den mit IFN- γ stimulierten $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen würde man eine ebenfalls erhöhte Expression von T-bet, des Transkriptionsfaktors für IFN- γ (Wurster 2002), erwarten. Jedoch sprechen die Ergebnisse der RT-PCR eher für eine relevant verminderte Genaktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet (siehe Abbildung 24 und Tabelle 8). Da T-bet nicht in naiven T-Zellen exprimiert wird und eine eindeutige PCR-Bande von T-bet in den Zellen von SW nachzuweisen war, besteht die Möglichkeit, dass die stimulierten $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen der Blutspender KW und MZ für T-bet nicht ausreichend aktiviert wurden (Yin 2002). Ein weiterer Hinweis für eine unzureichende Aktivierung könnte die fehlende PCR-Bande der mit HMB-PP stimulierten Zellen des Blutspenders MZ für den Primer T-bet darstellen.

Eine vermehrte Expression der T_H1 -Zytokine LT- α und MIP-1 α konnte hingegen auch statistisch bestätigt werden. Während LT- α insbesondere nach Stimulation mit IL-2 exprimiert wird (siehe Abbildung 18), konnte eine erhöhte Expression von MIP-1 α v.a. nach Stimulation mit IL-15 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 21).

LT- α ist ein Lymphotoxin und gehört aufgrund der großen Strukturhomologie zur Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF). Daher wird LT- α auch manchmal als TNF- β bezeichnet (Ware 2005). Auch in $CD4^+ \alpha\beta$ T-Lymphozyten wurde die Expression von LT- α beobachtet, die sich jedoch auf unpolarisierte IL-2 sekretierende Effektorzellen und auf T_H1 -Zellen begrenzt (Gramaglia 1999).

Das inflammatorische β -Chemokin MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α), auch CCL3 genannt, wird überwiegend von Makrophagen exprimiert, um aktivierte T-Zellen über den Chemokinrezeptor CCR5 anzulocken (Schall 1993b; Taub 1993). Weiterhin aktiviert es Makrophagen, Eosinophile sowie Basophile (Baggiolini 1993). Auch eine Expression durch NK-Zellen (Fehniger 1998) und $\gamma\delta$ T-Zellen wurde bereits beschrieben (Poccia 1999). Es gilt als ein hochpotentes proinflammatorisches

Chemokin, welches vorwiegend T_H1 -assoziiert ist (Sallusto 1998) und in $V\delta 2^+$ T-Zellen innerhalb von 4 bis 12 Stunden sekretiert wird (Cipriani 2000).

Wie zu erwarten, wurde die mRNA von MIP-1 α sowohl von IL-15, als auch von IL-2 induzierten $V\gamma 9^+$ T-Zellen exprimiert. Dies ist durch deutliche PCR-Banden in Abbildung 21 erkennbar. Dabei ist auffällig, dass die mit IL-15 stimulierten Zellen des Blutspenders KW eine wesentlich stärkere Expression aufwiesen, als die mit IL-2 stimulierten Zellen. Da dieser Unterschied aber in den Zellen des Blutspenders MZ nicht zu sehen und in denen von SW nicht beurteilbar war, kann keine allgemein gültige Aussage darüber gemacht werden, welches Zytokin die Expression von MIP-1 α im größeren Maße hervorruft. Auch die, generell leicht erhöhte Expression der mit IL-15 stimulierten Zellen des Blutspenders KW kann hier eine Rolle spielen (siehe Kapitel 4.6 Abbildung 8). Demnach ist zu vermuten, dass sowohl HMB-PP plus IL-2, als auch HMB-PP plus IL-15, die Expression und Sekretion von MIP-1 α in $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen induzieren und damit für eine T_H1 -Polarisation sprechen.

Ein weiteres Argument für eine T_H1 -Polarisation durch Stimulation mit IL-2 oder IL-15 ist die verminderte Expression von MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1) (siehe Abbildung 20), welche insbesondere nach Stimulation mit IL-15 vermutet werden kann. Dieses inflammatorische β -Chemokin wird vorwiegend in aktivierten $\alpha\beta$ T_H2 -Zellen und $\alpha\beta$ T-Gedächtniszellen exprimiert (Sallusto 1998; Cipriani 2000).

Bleibt man bei dem für $\alpha\beta$ T-Zellen beschriebenen Modell von T_H1 - und T_H2 -ähnlichen Zellen, so spricht auch die fehlende eindeutige IL-4 Expression nach Stimulation mit IL-15 indirekt für eine T_H1 -Polarisation (siehe Abbildung 13), da IL-4 als T_H2 -Zytokin gilt (Boullier 1999; Mosmann 1996). Nach Stimulation mit IL-2 kommt es hingegen zu einer relevant vermehrten Expression von IL-4 (siehe Abbildung 13 und Tabelle 8). Dies könnte auf eine gesteigerte Proliferation von T_H0 -Zellen zurückzuführen sein (Sireci 1997).

T_H0 -Zellen sind Zellen, die aus T_H1 - oder T_H2 -Zellen durch Polarisation entstanden sind und sowohl IFN- γ als auch IL-4 produzieren. Sie wurden durch Restimulation mit zum Phänotyp gegenteiliger Polarisation konvertiert, ohne dass sie dabei ihr ursprünglich eingprägtes Zytokingedächtnis verloren haben (Messi 2003).

Für eine Entwicklung von T_H0 -Zellen nach Stimulation mit IL-2 und Polarisation in T_H1 -ähnliche Zellen unter Einfluss von IL-15 spricht auch die vermehrte Expression von FMR-1 in IL-2 stimulierten Zellen sowie die verminderte Expression nach Stimulation mit IL-15 (siehe Abbildung 25). Dies ist anzunehmen, da es Hinweise auf

eine suppressorische und damit regulatorische Wirkung proinflammatorischer Zytokine durch FMR-1 gibt, welches die Translation der mRNA beeinflussen kann (Garnon 2005).

Zusammenfassend kann eine T_H1 -Polarisation der mit HMB-PP plus IL-2 beziehungsweise IL-15 stimulierten $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen durch die zumindest visuell vermehrte Expression des Marker-Proteins IFN- γ , wie sie auch durch IL-2 und IL-12 hervorgerufen werden kann (Mosmann 1996), in Betracht gezogen werden. Auffällig ist, dass T-bet, der Transkriptionsfaktor für IFN- γ , nicht vermehrt exprimiert wurde.

Auch die Expression von LT- α in IL-2 stimulierten Zellen und MIP-1 α in IL-15 stimulierten Zellen sowie das Fehlen von MCP-1 unterstreicht die These der T_H1 -Polarisation (Sallusto 1998; Cipriani 2000).

Eine Entwicklung in T_H0 -Zellen unter Einfluss von IL-2 ist ebenfalls denkbar, da eine eindeutig vermehrte Expression von IL-4, dem T_H2 -typischen Zytokin (Li 2000), nachgewiesen werden konnte.

5.2.2 IL-4

Das Interleukin 4 wird vorwiegend in $\alpha\beta$ T_H2 -Lymphozyten exprimiert und wird daher auch als Marker dieser Zellen eingesetzt (Boullier 1999; Mosmann 1996). Durch Stimulation von naiven $\alpha\beta$ T-Zellen mit IL-4 kommt es zu einem T_H2 -Shift (Wurster 2002), der durch die Inhibition von IFN- γ produzierenden Zellen sowie durch eine Verstärkung der IL-4 Produktion in T_H2 -Zellen verursacht wird (Sireci 1997). Werden $\gamma\delta$ T-Lymphozyten mit IPP aktiviert, so entwickeln sich überwiegend IFN- γ produzierende Zellen und nur wenige IL-4 produzierende Zellen (García 1997). Stimuliert man diese jedoch mit IL-4, wird angenommen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen sich analog zu den $\alpha\beta$ T-Zellen verhalten und vermehrt zu T_H2 -Zellen differenzieren, was sich u. a. in einer gesteigerten Produktion von IL-4 bemerkbar machen würde.

Diese These konnte durch eine deutliche Expression von IL-4 als Reaktion auf die Stimulation mit HMB-PP plus IL-4 bestätigt werden (Abbildung 13). Der Transkriptionsfaktor von IL-4 (GATA-3) zeigte jedoch keine klar vermehrte Expression (siehe Abbildung 23).

Auch die nahezu unbeeinflusste bis verminderte Expression von IFN- γ (siehe Abbildung 16) und die fehlende Expression von MIP-1 α (siehe Abbildung 21), den T_H1 -typischen Zytokinen (Sallusto 1998; Cipriani 2000), in IL-4 induzierten $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen, spricht für eine T_H2 -Polarisation (siehe Abbildung 16).

Die trotzdem noch erkennbare, jedoch schwache PCR-Bande für IFN- γ , könnte auf die nicht 100%ige Aufreinigung der $V\gamma 9^+$ T-Zellen zurückzuführen sein oder durch eine nicht komplette Unterdrückung der IFN- γ Produktion eines kleinen Anteils noch nicht konvertierter T_H1 -Zellen. Wenn man davon ausginge, dass die vermehrte Produktion von IL-4 durch einen Anstieg der IL-4 produzierenden Zellen und einem Absinken der Anzahl von IFN- γ produzierenden T_H1 -Zellen verursacht wird, könnte auch eine längere Stimulationsdauer zu einem stärkeren T_H2 -Shift führen.

Eine weitere Erklärung könnte die schon erwähnte These der T_H0 -Zellen von *Messi 2003* darstellen, welche nach Restimulation mit IL-4 in diesem Fall von ursprünglichen T_H1 -Zellen in T_H2 -Zellen konvertieren, ohne dass sie dabei ihr ursprünglich eingprägtes Zytokingedächtnis verlieren (*Messi 2003*).

Die Synthese des Chemokins MCP-1 wurde bisher nur für $\alpha\beta$ T_H2 -, $\alpha\beta$ T-Gedächtniszellen und einige $V\delta 1^+$ T-Zellen beschrieben (*Sallusto 1998*), während die Expression in $V\delta 2^+$ T-Zellen bisher verneint wurde (*Cipriani 2000*).

Geht man von einer T_H2 -Polarisation der $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen nach Stimulation mit IL-4 aus, so würde man demnach in Analogie zu dem bekannten Modell der $\alpha\beta$ T-Zellen eine vermehrte Expression des Chemokins erwarten. In dieser Arbeit gab es hierfür jedoch keinen Hinweis (siehe Abbildung 20).

LT- α hingegen wurde überraschenderweise auch in IL-4 induzierten $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen zu einem geringen Teil synthetisiert (siehe Abbildung 18). Im Unterschied dazu exprimieren $\alpha\beta$ T_H2 -Zellen kein LT- α nach Stimulation mit IL-4 (*Gramaglia 1999*). Versucht man eine Analogie zu dem Modell der $\alpha\beta$ T-Zellen zu sehen, könnte eine Erklärung eine Umwandlung von T_H1 -Zellen in T_H0 -Zellen sein, welche die Fähigkeit zur Produktion von LT- α im Sinne einer flexiblen Zytokinproduktion noch nicht verloren haben (*Messi 2003; Sallusto 2009*).

Zusammenfassend spricht die Entwicklung der IL-4 stimulierten $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen für eine T_H2 -Polarisation mit deutlich erhöhter Expression von IL-4 (Markerprotein für T_H2 -Zellen) und verminderter oder fehlender Expression von IFN- γ und MIP-1 α (T_H1 -typische Zytokine).

5.2.3 IL-21

IL-21 wird als ein $\alpha\beta$ T_H2 -Zytokin beschrieben (*Wurster 2002*), welches auch in hohem Maße von $\alpha\beta$ T_{FH} -Zellen (follikuläre $\alpha\beta$ T-Helferzellen) produziert wird (*Vinuesa 2005*). Es begünstigt die T_H2 -Differenzierung in $\alpha\beta$ T-Zellen durch selektive Inhibition der Synthese von IFN- γ (*Wurster 2002*) und bewirkt eine frühe Proliferation

und Aktivierung von $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen mit Expression von CD69 und CD25 (Eberl 2002a, Eberl 2002b). Weiterhin existiert die These, dass sich unter Einfluss von IL-21 zentrale $\gamma\delta$ T-Gedächtniszellen (T_{CM} -Zellen) entwickeln können, welche sich durch ihre Oberflächenmarker sowie durch fehlende Zytokinexpression auszeichnen (Eberl 2002b).

Unter Einfluss von IL-21 konnte in dieser Arbeit insbesondere eine sehr deutlich vermehrte Expression von BCA-1 (B-cell attracting chemokine 1) in $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen beobachtet werden (siehe Abbildung 19).

Das α -Chemokin BCA-1, welches auch als CXCL13 bekannt ist, wird von folliculären Zellen der sekundär lymphatischen Organe sekretiert (Sallusto 1998) und leistet einen wichtigen Beitrag zur Organisation und Regulation der Entwicklung folliculärer Zellen (Ansel 2000). Über den Chemokinrezeptor CXCR5 lockt es naive B-Zellen und $\alpha\beta$ T_{FH} -Zellen an und fördert deren Migration in lymphatische Follikel (Sallusto 1998; Vinuesa 2005). Dadurch kommt es zur Aktivierung dieser naiven B-Zellen mit vermehrter Expression von $LT-\alpha_1\beta_2$ und BCA-1 (Ansel 2000), welches weitere naive B-Zellen anlockt sowie zu einer Aktivierung der T_{FH} -Zellen führt. Diese produzieren ihrerseits IL-10, IL-21 und große Mengen an BCA-1 (Kim 2004) und unterstützen, unter der Kontrolle von folliculären $\alpha\beta$ T_{Reg} -Zellen, die Differenzierung der B-Zellen (Vinuesa 2005).

Durch die vermehrte Expression von BCA-1 unter Einfluss von IL-21 kann man erahnen, dass $\gamma\delta$ T-Zellen eine bedeutende Rolle in diesem Regelkreis einnehmen könnten, vielleicht in Form von T_{FH} -ähnlichen Zellen (Kim 2004).

Auch die leicht erhöhte Expression von IL-21 bei 2 von 3 Blutspendern (siehe Abbildung 14) würde für die Entwicklung von T_{FH} -ähnlichen Zellen sprechen. Der Rezeptor für IL-21 (IL-21R) wurde dabei analog zu $\alpha\beta$ T-Zellen auch in $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen durch IL-21 hochreguliert (siehe Abbildung 15).

In den durchgeführten Experimenten konnte außerdem eine eindeutig erhöhte Expression von IFN- γ festgestellt werden (siehe Abbildung 16). Dies macht eine Entwicklung in zentrale Gedächtniszellen unter Einfluss von IL-21, wie sie bereits für $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben wurden (Eberl 2002b), unwahrscheinlich, da sich T_{CM} -Zellen u.a. durch eine fehlende Zytokinproduktion auszeichnen (Sallusto 2009).

Daher ist eine Entwicklung in T_{H1} -Zellen oder ein Shift von ehemaligen T_{H1} -Zellen in T_{FH} -ähnliche Zellen möglich. Auch die visuell erhöhte Expression von T-bet unterstützt diese These (siehe Abbildung 24).

5.2.4 IFN- β

In der Familie der Interferone unterscheidet man drei Typen: Die Typ 1 Interferone mit IFN- α und IFN- β , die Typ 2 Interferone mit IFN- γ und die Typ 3 Interferone wie IFN- λ , dessen Aktivitäten den Typ 1 Interferonen ähnlich sind (Ank 2008). Typ-1 Interferone, wie IFN- β können eine Proliferation und Verstärkung der IFN- γ Produktion in humanen $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen bewirken (Rothenfusser 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch unter Einfluss von IFN- β keine relevante Beeinflussung der IFN- γ Expression (siehe Abbildung 16). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der erhöhten Expression von FMR-1 liegen (siehe Abbildung 25), da FMR-1 an der Regulation der Translation verschiedener mRNA beteiligt ist und dadurch möglicherweise auch die Genexpression bestimmter Zytokine, wie zum Beispiel IFN- γ , supprimieren könnte (Laggerbauer 2001).

Eine Polarisierung in T_H2 -Zellen ist bei fehlender IL-4 Expression und sogar visuell verminderter Expression von GATA-3 eher unwahrscheinlich (siehe Abbildung 13 und Abbildung 23). Möglicherweise könnte auch dies durch FMR-1 beeinflusst worden sein.

Auffällig war eine übermäßige Expression von MCP-1 nach Stimulation mit IFN- β (siehe Abbildung 20). Wie schon beschrieben, ist dieses inflammatorische β -Chemokin bisher noch nicht in $V\delta 2^+$ T-Zellen nachgewiesen worden (Cipriani 2000). Es wurde jedoch in $\alpha\beta$ T_H2 -Zellen, $\alpha\beta$ T-Gedächtniszellen sowie in einigen $V\delta 1^+$ T-Zellen gefunden (Sallusto 1998). Durch MCP-1 werden selektiv aktivierte $\alpha\beta$ T-Lymphozyten sowie $\alpha\beta$ T-Gedächtniszellen angezogen, weshalb man ihnen eine wichtige Rolle zu Beginn einer Inflammation zuspricht (Sallusto 1998).

Daher ist anzunehmen, dass auch $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen zu Beginn einer Inflammation eine Rolle spielen.

5.2.5 IFN- λ_2

Bei Interferon- λ_2 handelt es sich um ein Typ 3 Interferon (Ank 2008). Es wird auch IL-28A genannt und bindet an den IL-28 Rezeptor. Dieser besteht aus einer IL-28RA Kette und einer IL-10 β Kette (Sheppard 2003). IFN- λ erhöht die MHC-I Expression und dient auf diese Weise v. a. der antiviralen Abwehr (Kotenko 2003). Darüber hinaus induziert es die Proliferation von FoxP3 $^+$ $\alpha\beta$ T_{Reg} -Zellen, welche wiederum die Proliferation von T-Lymphozyten supprimieren (Sheppard 2003; Dumoutier 2004; Ank 2008).

Durch die funktionelle Ähnlichkeit von IFN- λ_2 zu den Typ1 Interferonen (IFN- α und IFN- β) bzgl. ihrer Transduktionswege (Dumoutier 2004) ist eine T_H1-Polarisierung durch IFN- λ_2 denkbar.

Es konnte jedoch, wie schon für die mit IFN- β stimulierten Zellen, unter Einfluss von IFN- λ_2 keine vermehrte IFN- γ Expression im Vergleich zu den mit HMB-PP alleine stimulierten Zellen festgestellt werden (siehe Abbildung 16). Der Transkriptionsfaktor T-bet zeigte unter Einfluss von IFN- λ_2 ebenfalls keine eindeutigen Hinweise auf eine Beeinflussung (siehe Abbildung 24). Auch die Expression von LT- α konnte durch Stimulation mit IFN- λ_2 nicht relevant beeinflusst werden.

Lediglich MIP-1 α zeigte eine relevant erhöhte Genaktivität (siehe Abbildung 21). Das proinflammatorische Chemokin MIP-1 α ist jedoch nicht nur als T_H1-Zytokin bekannt (Sallusto 1998). Durch die Fähigkeit in der Anfangsphase einer Entzündung aktiviert werden zu können und bestimmte Zellen anzulocken, spielt es möglicherweise auch eine regulatorische Rolle (Schall 1993b; Taub 1993; Baggiolini 1993).

Dies ist insbesondere im Zusammenhang mit dem bekannten Einfluss von IFN- λ_2 auf FoxP3⁺ $\alpha\beta$ T_{Reg}-Zellen interessant, da es somit eine mögliche regulatorische Wirkung der $\gamma\delta$ T-Zellen unter Einfluss von IFN- λ_2 vermuten lässt. FoxP3 ist ein typischer Transkriptionsfaktor für $\alpha\beta$ CD4⁺ T_{Reg}-Zellen (Khattri 2003), welcher als Suppressor der Transkription dient und die T-Zellaktivierung und Differenzierung regulatorischer T-Zellen selbst reguliert (Schubert 2001).

Betrachtet man unter diesem Aspekt die Ergebnisse der hier durchgeführten PCR des Primers FoxP3 (Abbildung 22), so wäre eine erhöhte Expression von FoxP3 nach Stimulation von IFN- λ_2 naheliegend. Diese konnte jedoch nicht bestätigt werden. Lediglich bei einem von 3 Blutspendern (SW) konnte man eine Expression von FoxP3 erkennen. Dabei muss jedoch auch beachtet werden, dass die Zyklenanzahl mit 35 in einem sehr hohen Bereich gewählt wurde, was bei einer unzureichenden Reinheit von 95.4% auch eine Verfälschung der Ergebnisse durch V γ 9⁺ T-Zellen mit sich ziehen kann.

Eine Beeinflussung der Expression des eigenen Rezeptors IL-28RA besteht nach den Erkenntnissen dieser Arbeit nicht (siehe Abbildung 17).

Das β -Chemokin MCP-1 hingegen gilt eher als T_H2-Zytokin der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, so wurde es auch in $\alpha\beta$ T-Gedächtniszellen gefunden (Sallusto 1998; Cipriani 2000). Die starke Expression von MCP-1 unter Einfluss von IFN- λ_2 oder IFN- β lässt, im Gegensatz zu den mit IL-4 stimulierten Zellen (siehe Abbildung 20), vermuten, dass

MCP-1 in $\gamma\delta$ T-Zellen womöglich nicht mit T_H2 -Zellen assoziiert ist. Vielmehr kann hier auch die Entwicklung in Gedächtniszellen durch $IFN-\lambda_2$ in Betracht gezogen werden.

5.2.6 TGF- β

TGF- β ist ein inhibitorisches Zytokin, welches an der Regulation von Immunvorgängen beteiligt ist. Es inhibiert die Differenzierung von T_H1 - und T_H2 -Zellen und wird sowohl von $\alpha\beta$ T-Zellen als auch von $\gamma\delta$ T-Zellen gebildet (Weiner 2001; Wurster 2002; Mosmann 1996). $\alpha\beta$ T_H0 -Zellen differenzieren mit TGF- β zu $\alpha\beta$ T_H3 -Zellen, welche wiederum TGF- β produzieren und dadurch einen Switch der Immunglobuline in B-Lymphozyten zu IgA hervorrufen (Weiner 2001).

Daher ist die Wirkung von TGF- β mit der Frage um die Existenz von regulatorischen T-Zellen, insbesondere $\gamma\delta$ T-Zellen, von besonderer Bedeutung. 1999 wurden bereits $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben, welche TGF- β und IL-10 produzieren und weder mRNA für IL-4 noch für $IFN-\gamma$ transkriptieren. Sie wurden als Zellen mit Tr1-Phänotyp charakterisiert (Seo 1999).

Auch in dieser Arbeit gaben die Ergebnisse Anlass zur Vermutung einer Entwicklung in regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen unter Einfluss von TGF- β .

Eine Polarisation in T_H1 - oder T_H2 -ähnliche Zellen unter Einfluss von TGF- β konnte bei den hier durchgeführten Untersuchungen nicht festgestellt werden.

Die Expression von TGF- β selbst und IL-10 konnte aus technischen Gründen leider nicht untersucht werden. Es gab jedoch den visuellen Eindruck einer vermehrten Expression von MIP-1 α nach Stimulation mit TGF- β bei einem der 2 getesteten Blutspender (siehe Abbildung 21, SW). In den Zellen des Spenders KW konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Da nur 2 Blutproben mit TGF- β stimuliert wurden, ist keine allgemein gültige Aussage zu treffen. Bei der Frage um die Entwicklung von regulatorischen $\gamma\delta$ T-Zellen durch Stimulation mit TGF- β ist die Beeinflussung von FoxP3 ebenfalls interessant zu betrachten. Doch auch nach Stimulation mit TGF- β gab es keine klare Hochregulation der Genaktivität von FoxP3 in $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen (siehe Abbildung 22).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch TGF- β eine Entwicklung von $\gamma\delta$ T-Zellen in T_H1 - oder T_H2 -Phänotyp nicht gefördert oder sogar unterdrückt wird. Obwohl keine eindeutigen Nachweise für die Entwicklung von $\gamma\delta$ T_{Reg} -Zellen gefunden wurden, ist dies jedoch nicht ausgeschlossen.

5.3. ZUSAMMENFASSENDE DARSTELLUNG DER MÖGLICHEN FUNKTIONEN VON $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-ZELLEN

Analog zu $\alpha\beta$ T-Zellen versucht man auch $\gamma\delta$ T-Zellen durch ihre unterschiedlichen Zytokinprofile in verschiedene Subtypen zu unterteilen. So kann man nach den bisherigen Erkenntnissen, welche durch diese Arbeit bestätigt wurden, folgende $\gamma\delta$ T-Zell-Phänotypen voneinander abgrenzen: T_H1 -Phänotyp, T_H2 -Phänotyp, $\gamma\delta$ T-Zellen mit vermutlich regulatorischer Wirkung sowie $\gamma\delta$ T-Zellen mit T_{FH} -ähnlichem Phänotyp. Dabei zeigen $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen je nach Zytokinprofil ihrer Umgebung bei Stimulation mit HMB-PP unterschiedliche Polarisierungen und bestimmte Zytokinexpressionen (siehe Abbildung 26).

5.3.1 T_H1 -ÄHNLICHE ZELLEN

IL-2 und IL-15 führen zur Entwicklung von T_H1 -ähnlichen Zellen, welche v. a. IFN- γ , MIP1- α und LT- α exprimieren. Eine Expression von IL-4 konnte nur durch Stimulation mit IL-2 und nicht durch IL-15 hervorgerufen werden.

5.3.2 T_H2 -ÄHNLICHE ZELLEN

T_H2 -ähnliche Zellen, welche insbesondere durch eine vermehrte Genaktivität von IL-4 charakterisiert sind, konnten durch Stimulation mit IL-4 hervorgerufen werden. Der Transkriptionsfaktor GATA3 wurde unter den Bedingungen dieser Experimente jedoch nicht relevant beeinflusst. Eine Expression von T_H1 -Zytokinen blieb aus.

5.3.3 REGULATORISCHE $\gamma\delta$ T- ZELLEN

Unter Einfluss von IFN- λ_2 wurden in dieser Arbeit Hinweise auf regulatorische $\gamma\delta$ T-Zellen gewonnen. Dabei konnte insbesondere eine vermehrte Expression von MIP-1 α gezeigt werden, welches durch Anlocken bestimmter Zellen in der Anfangsphase einer Inflammation möglicherweise auch eine regulatorische Wirkung inne hat (Schall 1993b; Taub 1993; Baggiolini 1993).

Ob $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen unter Einfluss von IFN- λ_2 auch TGF- β und IL-10 produzieren konnte aus technischen Gründen nicht untersucht werden.

TGF- β selbst zeigte bei den durchgeführten Untersuchungen keine bis verminderte Expression von IL-4, IFN- γ und unterstützt somit die bestehende These einer Suppression von T_H1 - und T_H2 - ähnlichen Zellen durch TGF- β (Weiner 2001; Wurster 2002).

Letztendlich konnte jedoch die Existenz von $\gamma\delta$ T_r-Zellen, welche sich durch fehlende Expression von IL-4 und IFN- γ sowie durch erhöhte Sekretion von TGF- β_1 und IL-10 auszeichnen (Seo 1999), ohne Untersuchung der Primer für TGF- β und IL-10, nicht vollständig bestätigt werden. Eine charakterisierende Expression von FoxP3, wie sie für $\alpha\beta$ T_{Reg}-Zellen beschrieben wird, konnte nicht nachgewiesen werden.

Trotz fehlenden eindeutigen Nachweisen für die Entwicklung von $\gamma\delta$ T_{Reg}-Zellen, ist diese jedoch nicht ausgeschlossen.

5.3.4 T_{FH}-ÄHNLICHE ZELLEN

Unter Stimulation mit IL-21 kommt es zur Entwicklung von T_{FH}-ähnlichen Zellen, welche sich insbesondere durch eine sehr starke Expression des Chemokins BCA-1 (=CXCL 13) auszeichnen.

Dies ist in Nachfolge-Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe mit real-time PCR (Vermijlen 2007) sowie auf Proteinebene (Vermijlen 2007) bestätigt worden. Auch die Entwicklung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit T_{FH}-Funktion unter Einfluss von IL-21 konnte auf funktioneller Ebene kürzlich bestätigt werden (Bansal 2012).

T_{FH}-ähnlichen Zellen wandern mithilfe ihrer Oberflächenmarker CD62L und CCR7 in Lymphknoten ein, um dort in der T-Zellzone mit B-Lymphozyten und $\alpha\beta$ T_{FH}-Zellen agieren zu können. Somit bilden sie einen Teil des Keimzentrums des Lymphknotens (Brandes 2003, Vermijlen 2007 und Bansal 2012).

Durch IL-21, welches von $\alpha\beta$ T_{FH}-Zellen exprimiert wird, kommt es in $\gamma\delta$ T-Zellen zur Expression von BCA-1 (=CXCL 13), LT- α und IL-21R. Gleichzeitig stehen diese Zellen über CD40 und CD40-Liganden mit den $\alpha\beta$ T_{FH}-Zellen und den B-Lymphozyten in Verbindung. Dies fördert zum Einen die Entwicklung von CXCR5⁺ B-Zellen zu Plasmazellen und führt zum Anderen zur Hochregulation von Effektor $\alpha\beta$ T-Zellen (siehe auch Vinuesa 2005 und Ebert 2005).

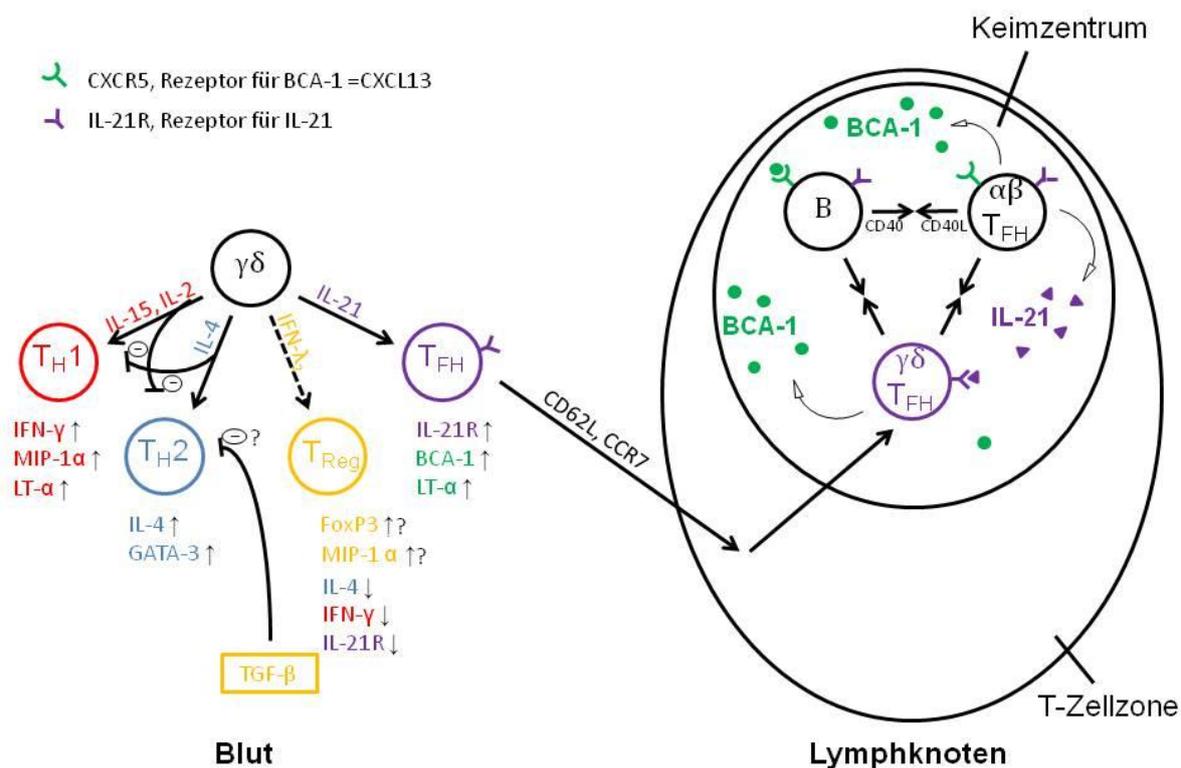


Abbildung 26: Mögliche Polarisierungen von $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen und deren Rolle in der B-Zellreifung

Bei Infektion mit mikrobiellen Pathogenen kommt es daher in $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen im peripheren Blut zur Erkennung und Aktivierung von HMB-PP und infolgedessen tragen diese zur lokalen Immunabwehr mit Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, Einwanderung in lokale Lymphknoten und Unterstützung der B-Zellen und $\alpha\beta$ T_{FH}-Zellen bei. HMB-PP getriggerte $\gamma\delta$ T-Zellen können in einer frühen Phase der Infektion mikrobielle Antigene auch direkt den T_{FH}-Zellen präsentieren (Brandes 2005).

Die oben beschriebenen Polarisierungen der $V\gamma 9^+/V\delta 2^+$ T-Zellen sind möglich, jedoch ist einzuwenden, dass die Zellen in dieser Arbeit nur unter jeweils einer Stimulationsbedingung (Dauer und Konzentration der Stimulanzen) stimuliert wurden. Auch gab es nur 3 verschiedene Blutspender. Daher sollten die Experimente durch Nachfolge-Untersuchungen bestätigt und auf Proteinebene ergänzt werden, so wie es durch Mitglieder dieser Arbeitsgruppe bereits für die IL-21 abhängige BCA-1 (CXCL13) Regulation und die T_{FH}-Funktion IL-21 stimulierter $\gamma\delta$ T-Zellen bereits durchgeführt wurde (vgl. Vermijlen 2007 und Bansal 2012).

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: FACS-Analyse der Blutspendertests	24
Abbildung 2: Nach 3 Tagen Inkubation: Prozentanteile von CD25 ⁺ /V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten von allen V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz der Blutspender KW, MZ und SW in Abhängigkeit von der HMB-PP Konzentration im Zellansatz (siehe auch Tabelle 5)	26
Abbildung 3: Nach 3 und 6 Tagen Inkubation: Prozentanteile von CD25 ⁺ /V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten von allen V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz der Blutspender BB9, BB 10, BB11, BB 12, BB13, BB14 und BB15 mit 1nM HMB-PP	27
Abbildung 4: Nach 3 und 6 Tagen Inkubation: Prozentanteile von CD25 ⁺ /V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten von allen V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz der Blutspender BB9, BB 10, BB11, BB 12, BB13, BB14 und BB15 mit 10nM HMB-PP	28
Abbildung 5: Zeitliche Abfolge der durchgeführten Experimente	28
Abbildung 6: Anteil der V γ 9 ⁺ T-Zellen an Lymphozyten in der Probe vor und nach MACS	29
Abbildung 7: Cyclophilin-Expression des Blutspenders KW. Es konnte keine genomische DNA nachgewiesen werden.	31
Abbildung 8: Standardisierung der Proben KW, Agarosegele und Image-J Analyse.	33
Abbildung 9: Standardisierung der Zellansätze MZ2 des Blutspenders MZ, Agarosegele und Image-J Analyse	33
Abbildung 10: Standardisierung der Zellansätze MZ1, MZ2 und MZ3 des Blutspenders MZ, Agarosegele und Image-J Analyse	34
Abbildung 11: Standardisierung der Zellansätze SW2 und SW3 des Blutspenders SW, Agarosegele und Image-J Analyse	34
Abbildung 12: Standardisierung der Zellansätze SW4 und SW5 des Blutspenders SW, Agarosegele und Image-J Analyse	35
Abbildung 13: PCR Ergebnisse mit IL-4 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.	37

Abbildung 14: PCR Ergebnisse mit IL-21 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....38

Abbildung 15: PCR Ergebnisse mit IL-21R spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....39

Abbildung 16: PCR Ergebnisse mit IFN- γ spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....40

Abbildung 17: PCR Ergebnisse mit IL-28RA spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....41

Abbildung 18: PCR Ergebnisse mit LT- α spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....42

Abbildung 20: PCR Ergebnisse mit MCP-1 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....44

Abbildung 21: PCR Ergebnisse mit MIP-1 α spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....45

Abbildung 22: PCR Ergebnisse mit FoxP3 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....46

Abbildung 23: PCR Ergebnisse mit GATA-3 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....47

Abbildung 24: PCR Ergebnisse mit T-bet spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....48

Abbildung 25: PCR Ergebnisse mit FMR-1 spezifischen Primern der Blutspender KW, MZ und SW. Agarosegele, Mittelwerte mit Standardabweichungen und Median.....49

Abbildung 26: Mögliche Polarisierungen von $V\gamma 9^+/\delta 2^+$ T-Zellen und deren Rolle in der B-Zellreifung	67
---	----

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Ansätze zur Optimierung der Lymphozytenaktivierung.....	13
Tabelle 2: Ansätze zur Stimulation der Lymphozyten.....	15
Tabelle 3: PCR-Schemen der verwendeten Primer.....	21
Tabelle 4: FACS-Analyse des Blutspendertests.....	23
Tabelle 5: Nach 3 Tagen Inkubation: Prozentanteile der CD25 ⁺ Zellen (aktivierte Zellen) von allen V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz in Abhängigkeit der jeweiligen HMB-PP Konzentration.....	25
Tabelle 6: Nach 6 Tagen Inkubation: Prozentanteile der CD25 ⁺ Zellen (aktivierte Zellen) von allen V γ 9 ⁺ T-Lymphozyten im Zellansatz in Abhängigkeit der jeweiligen HMB-PP.....	27
Tabelle 7: Aufreinigung der V γ 9 ⁺ T-Zellen: Grad der Reinheit in %.....	30
Tabelle 8: Zusammenfassung der PCR Ergebnisse: P-Werte in Bezug auf Medium 51	
Tabelle 9: Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse: P-Werte in Bezug auf HMB-PP.....	51

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Acosta-Rodriguez, E. V. (2007a): Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. In: *Nature Immunology*, H. 8 (9), S. 942-949.
- Acosta-Rodriguez, E. V. (2007b): Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. In: *Nature Immunology*, H. 8 (6), S. 639-646.
- Allison, T. J. (2002): Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. In: *Molecular Immunology*, H. 38 (14), S. 1051-1061.
- Ank, N. (2008): An important role for type III interferon (IFN- λ /IL-28) in TLR-induced antiviral activity. In: *Journal of Immunology*, H. 180 (4), S. 2474-2485.
- Ansel, K. M. (2000): A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles. In: *Nature*, H. 406 (6793), S. 309-314.
- Arigoni, D. (1997): Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, H. 94 (20), S. 10600-10605.
- Baggiolini, M. (1993): Interleukin-8 and Related Chemotactic Cytokines-CXC and CC Chemokines. In: *Advances of Immunology*, H. 55, S. 97-179.
- Bansal, Raj R. (2012): IL-21 enhances the potential of human $\gamma\delta$ T cells to provide B-cell help. In: *Journal of Immunology*, H. 189 (2), S. 110-119.
- Banthorpe, D. V. (1972): The biosynthesis of monoterpenes. In: *Chemical Reviews*, H. 72 (2), S. 115-155.
- Boullier, S. (1999): Regulation by cytokines (IL-12, IL-15, IL-4 and IL-10) of the V γ 9V δ 2 T cell response to mycobacterial phosphoantigens in responder and anergic HIV-infected persons. In: *European Journal of Immunology*, H. 29 (1), S. 90-99.
- Brenner, M. B. (1988): The gamma delta T cell receptor. In: *Advances of Immunology*, H. 43, S. 133-192.
- Bukowski, J. F. (1995): V γ 2V δ 2 TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer. In: *Journal of Immunology*, H. 154 (3), S. 998-1006.
- Casetti, R. (2009): Cutting Edge: TGF- β 1 and IL-15 Induce FOXP3 gamma delta Regulatory T Cells in the Presence of Antigen Stimulation. In: *Journal of Immunology*, H. 183 (6), S. 3574-3577.
- Chae, S. C. (2006): Analysis of the variations in IL-28RA gene and their association with allergic rhinitis. In: *Experimental and molecular medicine*, H. 38 (3), S. 302-309.
- Chang, H. C. (2010): The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. In: *Nature Immunology*, H. 11 (6), S. 527-534.

- Chen, W. (2003): Conversion of Peripheral CD4⁺CD25⁻ Naive T Cells to CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cells by TGF- β Induction of Transcription Factor Foxp3. In: *Journal of experimental medicine*, H. 198 (12), S. 1875-1886.
- Cipriani, B. (2000): Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. In: *Blood*, H. 95 (1), S. 39-47.
- Constant, P. (1994): Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. In: *Science*, H. 264 (5156), S. 267-270.
- Dumoutier, L. (2004): Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with type I interferon signaling. In: *Journal of Biological Chemistry*, H. 279 (31), S. 32269-33274.
- Eberl, M. (2002a): Accumulation of a potent gammadelta T-cell stimulator after deletion of the *lytB* gene in *Escherichia coli*. In: *Immunology*, H. 106 (2), S. 200-211.
- Eberl, M. (2002b): Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. In: *Cellular Immunology*, H. 218 (1-2), S. 1-6.
- Eberl, M. (2003): Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation. In: *FEBS Letters*, H. 544, S. 4-10.
- Eberl, M. (2004): Integrated immune responses to infection – cross-talk between human $\gamma\delta$ T cells and dendritic cells. In: *Immunology*, H. 112, S. 364-368.
- Eberl, M. (2009): A rapid crosstalk of human gammadelta T cells and monocytes drives the acute inflammation in bacterial infections. In: *PLoS Pathogens*, H. 5 (2).
- Fehniger, T. A. (1998): Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection. In: *Journal of Immunology*, H. 161 (11), S. 6433-6438.
- Ferrick, D. A. (1995): Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. In: *Nature*, H. 373 (6511), S. 255-257.
- García, V. E. (1997): Single-cell cytokine analysis of gamma delta T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens. In: *Journal of Immunology*, H. 159 (3), S. 1328-1335.
- García, V. E. (1998): IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide microbial antigens. In: *Journal of Immunology*, H. 160 (9), S. 4322-4329.
- Garnon, J. (2005): Fragile X-related protein FXR1P regulates proinflammatory cytokine tumor necrosis factor expression at the post-transcriptional level. In: *Journal of Biological Chemistry*, H. 280 (7), S. 5750-5763.
- Geginat, J. (2001): Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. In: *Journal of experimental medicine*, H. 194 (12), S. 1711-1719.

- Gossman, W. (2002): Quantitative structure-activity relations for gammadelta T cell activation by phosphoantigens. In: *Journal of Medicinal Chemistry*, H. 45 (22), S. 4868-4874.
- Gramaglia, I. (1999): Lymphotoxin alphabeta is expressed on recently activated naive and Th1-like CD4 cells but is down-regulated by IL-4 during Th2 differentiation. In: *Journal of Immunology*, H. 162 (3), S. 1333-1338.
- Groux, H. (1997): A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. In: *Nature*, H. 389 (6652), S. 737-742.
- Hannaert, V. (2003): Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, H. 100 (3), S. 1067-1071.
- Hayday, A. (2003): Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. In: *Nature Reviews Immunology*, H. 3 (3), S. 233-242.
- 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*, H. 18, S. 975-1026.
- Hintz, M. (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*, H. 509 (2), S. 317-322.
- Hintz, M. (2003): Replacing the pyrophosphate group of HMB-PP by a diphosphonate function abrogates its potential to activate human $\gamma\delta$ T cells but does not lead to competitive antagonism. In: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, H. 13 (7), S. 1257-1260.
- Hof, H. (2005): *Medizinische Mikrobiologie*. 3. Aufl. Unter Mitarbeit von R. Dörries. Weinheim: Georg Thieme Verlag (Duale Reihe). Seiten 52-131.
- Hu, H. (2001): CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division. In: *Nature Immunology*, H. 2 (8), S. 705-710.
- Huang, W. (2004): Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. In: *Journal of infectious diseases*, H. 190 (3), S. 624-631.
- Hurez, D. (1992): The T-lymphocyte antigen receptor. In: *Allerg Immunol (Paris)*, H. 24 (4), S. 117-121.
- Ivanov, I. I. (2006): The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. In: *Cell*, H. 126 (6), S. 1121-1133.
- Janeway, C. A. (1988): Specificity and function of T cells bearing gamma delta receptors. In: *Immunology Today*, H. 9 (12), S. 368-369.
- Janeway, Ch. A. (Autor), Mahlke, K. (Hrsg.) (2005). *Immunologie*. 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag.

- Jomaa, H. (1999): Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalaria drugs. In: *Science*, H. 285 (5433), S. 1573-1576.
- Khattari, R. (2003): An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. In: *Nature Immunology*, H. 4 (4), S. 337-342.
- Kim, C. H. (2004): Unique gene expression program of human germinal center T helper cells. In: *Blood*, H. 104 (7), S. 1952-1960.
- Kim, S. H. (2005): Interleukin-32: a cytokine and inducer of TNF α . In: *Immunity*, H. 22 (1), S. 131-142.
- Körholz D (1997): The role of interleukin-10 (IL-10) in IL-15-mediated T-cell responses. In: *Blood*, H. 90 (11), S. 4513-4521.
- Kotenko, S. V. (2003): IFN- λ s mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. In: *Nature Immunology*, H. 4 (1), S. 69-77.
- Kunzmann, V. (2004): Polyinosinic-polycytidylic acid-mediated stimulation of human gammadelta T cells via CD11c dendritic cell-derived type I interferons. In: *Immunology* H.112 (3), S. 369-77.
- Lafont, V. (2003): Specific signaling pathways triggered by IL-2 in human V gamma 9V delta 2 T cells: an amalgamation of NK and alpha beta T cell signaling. In: *Journal of Immunology*, H. 171 (10), S. 5225-5232.
- Laggerbauer, B. (2001): Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. In: *Human Molecular Genetics*, H. 10 (4), S. 329-338.
- Lang, F. (1995): Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. In: *Journal of Immunology*, H. 154 (11), S. 5986-5994.
- Le Hir, M. (1996): Differentiation of follicular dendritic cells and full antibody responses require tumor necrosis factor receptor-1 signaling. In: *Journal of experimental medicine*, H. 183 (5), S. 2367-2372.
- Leonard, W. J. (2005): Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. In: *Nature Reviews Immunology*, H. 5 (9), S. 688-698.
- Li, H. (2000): Cloning and characterization of IL-17B and IL-17C, two new members of the IL-17 cytokine family. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, H. 97 (2), S. 773-778.
- Libero, G. de (1991): Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral gamma/delta T cells. In: *Journal of experimental medicine*, H. 173 (6), S. 1311-1322.
- Lichtenthaler, H. K. (2000): Non-mevalonate isoprenoid biosynthesis: enzymes, genes and inhibitors. In: *Biochemical Society Transactions*, H. 28 (6), S. 785-789.
- Manel, N. (2008): The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR γ . In: *Nature Immunology*, H. 9 (6), S. 641-649.

- Martin, B. (2009): Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. In: *Immunity*, H. 31 (2), S. 321-330.
- Marx, S. (1997): Activation of human gamma delta T cells by *Mycobacterium tuberculosis* and Daudi lymphoma cells: differential regulatory effect of IL-10 and IL-12. In: *Journal of Immunology*, H. 158 (6), S. 2842-2848.
- Mehta, D. S. (2004): Biology of IL-21 and the IL-21 receptor. In: *Immunological Review*, H. 202, S. 84-95.
- Messi, M. (2003): Memory and flexibility of cytokine gene expression as separable properties of human T(H)1 and T(H)2 lymphocytes. In: *Nature Immunology*, H. 4 (1), S. 78-86.
- Moore, K. W. (2001): Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. In: *Annual Review of Immunology*, H. 19, S. 683-765.
- Moretta, A. (2001): Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. In: *Annual Review of Immunology*, H. 19, S. 197-223.
- Moretta, L. (1991): Molecular and cellular analysis of human T lymphocytes expressing gamma delta T-cell receptor. In: *Immunological Review*, H. 120, S. 117-135.
- Morita, C. T. (1994): TCR usage and functional capabilities of human gamma delta T cells at birth. In: *Journal of Immunology*, H. 153 (9), S. 3979-3988.
- Morita, C. T. (1995): Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. In: *Immunity*, H. 3 (4), S. 495-507.
- Mosmann, T. R. (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. In: *Immunology Today*, H. 17 (3), S. 138-146.
- Nagaeva, O. (2002): Dominant IL-10 and TGF-beta mRNA expression in gammadeltaT cells of human early pregnancy decidua suggests immunoregulatory potential. In: *American Journal of Reproductive Immunology*, H. 48 (1), S. 9-17.
- Ness-Schwickenrath, K. J. (2010): Cytokine requirements for the differentiation and expansion of IL-17A- and IL-22-producing human Vgamma2Vdelta2 T cells. Jin, C.; Morita, C. T. In: *Journal of Immunology*, H. 184 (12), S. 7268-7280.
- Nurieva, R. I. (2008): Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. In: *Immunity*, H. 29 (1), S. 138-149.
- Oostra, B. A. (2009): FMR1: a gene with three faces. In: *Biochimica Biophysica Acta*, H. 1790 (6), S. 467-477.
- Oyoshi, M. K. (2003): Preferential expansion of Vgamma9-JgammaP/Vdelta2-Jdelta3 gammadelta T cells in nasal T-cell lymphoma and chronic active Epstein-Barr virus infection. In: *American Journal of Pathology*, H. 162 (5), S. 1629-1638.
- Ozaki, K. (2002): A critical role for IL-21 in regulating immunoglobulin production. In: *Science*, H. 298 (5598), S. 1630-1634.

- Parrish-Novak, J. (2000): Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. In: *Nature*, H. 408 (6808), S. 57-63.
- Pennington, D. J. (2005): The integration of conventional and unconventional T cells that characterizes cell-mediated responses. In: *Advances in Immunology*, H. 87, S. 27-59.
- Pfeffer, K. (1990): Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands. In: *European Journal of Immunology*, H. 20 (5), S. 1175-1179.
- Poccia, F. (1996): Peripheral V gamma 9/V delta 2 T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons. In: *Journal of Immunology*, H. 157 (1), S. 449-461.
- Poccia, F. (1999): Phosphoantigen-reactive Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes suppress in vitro human immunodeficiency virus type 1 replication by cell-released antiviral factors including CC chemokines. In: *Journal of infectious diseases*, H. 180 (3), S. 858-861.
- Rasheed, A. U. (2006): Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5(hi)ICOS(hi) CD4 T cells and is independent of CD57 expression. In: *European Journal of Immunology*, H. 36 (7), S. 1892-1903.
- Rivino, L. (2004): Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4+ central memory T cells. In: *Journal of experimental medicine*, H. 200 (6), S. 725-735.
- Roark, C. L. (2008): gammadelta T cells: an important source of IL-17. In: *Current Opinion in Immunology*, H. 20 (3), S. 353-357.
- Rohdich, F. (2001): The non-mevalonate pathway of isoprenoids: genes, enzymes and intermediates. In: *Current Opinion in Immunology*, H. 5 (5), S. 535-540.
- Rohmer, M. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. In: *Biochemical Journal*, H. 295 (2), S. 517-524.
- Rojas, R. E. (1999): Regulation of human CD4(+) alphabeta T-cell-receptor-positive (TCR(+)) and gammadelta TCR(+) T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* by interleukin-10 and transforming growth factor beta. In: *Infection and Immunity*, H. 67 (12), S. 6461-6472.
- Rojas, R. E. (2002): Phosphoantigen presentation by macrophages to mycobacterium tuberculosis--reactive Vgamma9Vdelta2+ T cells: modulation by chloroquine. In: *Infection and Immunity*, H. 70 (8), S. 4019-4027.
- Roncarolo, M. G. (2000): The role of different subsets of T regulatory cells in controlling autoimmunity. In: *Current Opinion in Immunology*, H. 12 (6), S. 676-683.
- Roncarolo, M. G. (2006): Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. In: *Immunological Review*, H. 212, S. 28-50.

- Rothenfusser, S. (2001): Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human gamma delta T cells via interferon-alpha/-beta. In: *European Journal of Immunology*, H. 31 (12), S. 3525-3534.
- Sallusto, F. (1998): Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. In: *Immunology Today*, H. 19 (12), S. 568-574.
- Sallusto, F. (2004): Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. In: *Annual Review of Immunology*, H. 22, S. 745-763.
- Sallusto, F. (2009): Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. In: *European Journal of Immunology*, H. 39 (8), S. 2076-2082.
- Schall, T. J. (1993a): Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. In: *Journal of experimental medicine*, H. 177 (6), S. 1821-1826.
- Schall, T. J. (1993b): Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. In: *Journal of experimental medicine*, H. 177 (6), S. 1821-1826.
- Schubert, L. A. (2001): Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. In: *Journal of Biological Chemistry*, H. 276 (40), S. 37672-37679.
- Seo, N. (1999): Depletion of IL-10- and TGF-beta-producing regulatory gamma delta T cells by administering a daunomycin-conjugated specific monoclonal antibody in early tumor lesions augments the activity of CTLs and NK cells. In: *Journal of Immunology*, H. 163 (1), S. 242-249.
- Sheppard, P. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. In: *Nature Immunology*, H. 4 (1), S. 63-68.
- Sherry, B. (1998): Induction of the chemokine beta peptides, MIP-1 alpha and MIP-1 beta, by lipopolysaccharide is differentially regulated by immunomodulatory cytokines gamma-IFN, IL-10, IL-4, and TGF-beta. In: *Molecular Medicine*, H. 4 (10), S. 648-657.
- Shires, J. (2001): Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). In: *Immunity*, H. 15, S. 419-434.
- Sicard, H. (2000): Metabolic routes as targets for immunological discrimination of host and parasite. In: *Infection and Immunity*, H. 68 (8), S. 4375-4377.
- Silva-Santos, B. (2005): Lymphotoxin-mediated regulation of gammadelta cell differentiation by alphabeta T cell progenitors. In: *Science*, H. 307 (57711), S. 925-928.
- Sireci, G. (1997): Patterns of phosphoantigen stimulation of human Vgamma9/Vdelta2 T cell clones include Th0 cytokines. In: *Human Immunology*, H. 58 (2), S. 70-82.
- Soriano-Sarabia, N. (2012): 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. In: H. 189 (11), S. 5212-22.

- Szabo, S. J. (2000): A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. In: *Cell*, H. 100 (6), S. 655-669.
- Tamanini, F. (1997): Differential expression of FMR1, FXR1 and FXR2 proteins in human brain and testis. In: *Human Molecular Genetics*, H. 6 (8), S. 1315-1322.
- Tanaka, Y. (1994): Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. In: *Proc Natl Acad Sci USA*, H. 91 (17), S. 8175-8179.
- Tanaka, Y. (1995): Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. In: *Nature*, H. 375 (6527), S. 155-158.
- Taub, D. D. (1993): Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. In: *Science*, H. 260 (5106), S. 355-358.
- Triebel, F. (1989): Subpopulations of human peripheral T gamma delta lymphocytes. In: *Immunology Today*, H. 10 (6), S. 186-188.
- Trifari, S. (2009): Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. In: *Nature Immunology*, Jg. Nat Immunol. 2009 Aug;10(8):864-71, H. 10 (8), S. 864--871.
- Troye-Blomberg, M. (1999): Human gamma delta T cells that inhibit the in vitro growth of the asexual blood stages of the *Plasmodium falciparum* parasite express cytolytic and proinflammatory molecules. In: *Scandinavian Journal of Immunology*, H. 50 (6), S. 642-650.
- Tsukaguchi, K. (1999): Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 production by CD4(+) alpha beta TCR+ T cells and v delta 2(+) gamma delta T cells in response to monocytes infected with *Mycobacterium tuberculosis*-H37Ra. In: *Cellular Immunology*, H. 194 (1), S. 12-20.
- Vavassori, S. (2013): Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human $\gamma\delta$ T cells. In: *Nature Immunology*, H 14(9), S. 908-916.
- Veldhoen, M. (2008): Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. In: *Nature Immunology*, H. 9 (12), S. 1341-1346.
- Verheij, C. (1993): Characterization and localization of the FMR-1 gene product associated with fragile X syndrome. In: *Nature*, H. 363 (6431), S. 722-724.
- Vermijlen, D. (2007): Distinct Cytokine-Driven Responses of Activated Blood $\{\gamma\}\{\delta\}$ T Cells: Insights into Unconventional T Cell Pleiotropy. In: *Journal of Immunology*, H. 278, S. 4304-4314.
- Vinuesa, C. G. (2005): Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. In: *Nature Reviews Immunology*, H. 5 (11), S. 853-865.
- Vogelzang, A. (2008): A fundamental role for interleukin-21 in the generation of T follicular helper cells. In: *Immunity*, H. 29 (1), S. 127-137.
- Ware, C. F. (2005): Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. In: *Annual Review of Immunology*, H. 23, S. 787-819.

- Weij, H. (2008): Definition of APC presentation of phosphoantigen (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate to Vgamma2Vdelta 2 TCR. In: *Journal of Immunology*, H. 181 (7), S. 4798-4806.
- Weiner, H. L. (2001): The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and T(R)1 and T(H)3 regulatory cells. In: *Nature Immunology*, H. 2 (8), S. 671-672.
- Wen, L. (1998): Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. In: *Journal of Immunology*, H. 160 (4), S. 1965-1974.
- Wesch, D. (2001): Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. In: *Cellular Immunology*, H. 212 (2), S. 110-117.
- Wilson, N. J. (2007): Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. In: *Nature Immunology*, H. 8 (9), S. 950-907.
- Wu, C. Y. (2002): Distinct lineages of T(H)1 cells have differential capacities for memory cell generation in vivo. In: *Nature Immunology*, H. 3 (9), S. 852-858.
- Wurster, A. L. (2002): Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells. In: *Journal of experimental medicine*, H. 196 (7), S. 969-977.
- Yang, L. (2008): IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. In: *Nature*, H. 454 (7202), S. 350-352.
- Yin, Z. (2000): Dominance of IL-12 over IL-4 in gamma delta T cell differentiation leads to default production of IFN-gamma: failure to down-regulate IL-12 receptor beta 2-chain expression. In: *Journal of Immunology*, H. 164 (6), S. 3056-3064.
- Yin, Z. (2002): T-Bet expression and failure of GATA-3 cross-regulation lead to default production of IFN-gamma by gammadelta T cells. In: *Journal of Immunology*, H. 168 (4), S. 1566-1571.
- Zhang, X. (1997): Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. In: *Journal of experimental medicine*, H. 185 (10), S. 1837-1849.
- Zhang, Y. (2006): Structural studies of Vgamma2Vdelta2 T cell phosphoantigens. In: *Chemistry and Biology*, H. 13 (9), S. 985-992.
- Zheng, W. (1997): The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. In: *Cell*, H. 89 (4), S. 587-596.

9. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die mich bei meiner Arbeit unterstützt haben. Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Betreuer Dr. Matthias Eberl, der mir mit seinem fundierten Fachwissen und Ideenreichtum stets zur Seite stand und mich mit viel Geduld und konstruktiven Anregungen begleitete. Besonders möchte ich mich auch bei meinem Doktorvater PD Dr. Hassan Jomaa für die Möglichkeit der Promotion und sein fortwährendes Interesse an deren Fortschritt bedanken. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen ehemaligen Kollegen der Arbeitsgruppe für die gute Zusammenarbeit, ihre Hilfsbereitschaft und ihre Fachkompetenz, dies gilt besonders für die umfangreiche und geduldige Einarbeitung von Frau Rosel Engel. Auch bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ewald Beck für die Nutzung der Einrichtungen und die materielle Unterstützung.