

**Immunregulatorische Funktion humaner
TCR $\alpha\beta^+$ CD4 $^-$ CD8 $^-$ T-Lymphozyten**

Dissertation

zur

**Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät III -
Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg**

eingereicht von

Dipl. Biol. Simon Völkl

Regensburg, Januar 2008

Promotionsgesuch eingereicht am: 16. Januar 2008

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. A. Mackensen

Prüfungsausschuss:	1. Prüfer:	Prof. Dr. S. Modrow
	2. Prüfer:	Prof. Dr. A. Mackensen
	3. Prüfer:	Prof. Dr. A. Kurtz
	Vorsitz:	Prof. Dr. R. Warth
	Ersatz:	Prof. Dr. S. Schneuwly

„Ich habe keine besondere Begabung, sondern bin nur leidenschaftlich neugierig“

Albert Einstein

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	4
2.	Einleitung	8
2.1	Das Immunsystem	8
2.2	Autoimmunkrankheiten	9
2.3	Allogene Immunantworten	10
2.4	Toleranz	12
2.4.1	Zentrale Toleranz	12
2.4.2	Periphere Toleranz	12
2.4.2.1	Allgemeine Mechanismen der Toleranzinduktion	13
2.4.2.2	Zelluläre Toleranzinduktion	14
2.5	DN T-Zellen	18
2.5.1	Entstehung von DN T-Zellen	18
2.5.2	Charakterisierung und Aktivierung von DN T-Zellen	19
2.5.3	Funktion von DN T-Zellen	20
2.5.4	Mechanismus der DN T-Zell-vermittelten Suppression	22
2.6	Zielsetzung	24
3.	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Medien, Puffer und Lösungen	26
3.1.2	Farbstoffe	28
3.1.3	Blockadeagentien	28
3.1.4	HLA-A2-bindende Peptide	28
3.1.5	Peptid-MHC-Tetramere	29
3.1.6	Antikörper	29
3.1.7	Beads	32
3.1.8	Oligonukleotide	32
3.1.9	Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen	33
3.1.10	Zytokine	33
3.1.11	Internetdienste und Software	34

3.2	Methoden	34
3.2.1	Ermittlung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschlussfärbung	34
3.2.2	Kryokonservierung von Zellen	34
3.2.3	Auftauen von Zellen	35
3.2.4	Kultivierung von Zelllinien	35
3.2.5	Beladung der T2 Zellen	35
3.2.6	Dichtegradientenzentrifugation	36
3.2.7	Gegenstromelutriation zur Isolierung von Monozyten	36
3.2.8	Generierung von dendritischen Zellen (DC) aus Monozyten <i>in vitro</i>	37
3.2.9	Exogene Beladung von DC	37
3.2.10	Magnetische Separation	37
3.2.10.1	Zellseparation nach der Miltenyi-Methode	38
3.2.10.2	Voranreicherung nach der Dynal-Methode	39
3.2.11	Durchflusszytometrie	40
3.2.12	Fluoreszente Zellsortierung	40
3.2.13	Antikörperfärbung	41
3.2.13.1	Direkte Antikörperfärbung	41
3.2.13.2	Intrazellulärfärbung	41
3.2.14	pMHC-Tetramerfärbung	41
3.2.15	Generierung von Antigen-spezifischen CD8 ⁺ T-Zelllinien	42
3.2.16	Generierung von allogen-spezifischen CD4 ⁺ , CD8 ⁺ und DN T-Zelllinien	42
3.2.17	Klonierung von CD8 ⁺ und DN T-Zellklonen	42
3.2.18	Polyklonale Stimulation von CD4 ⁺ , CD8 ⁺ und DN T-Zellen	43
3.2.19	Cytokine-Bead-Array	43
3.2.20	Cytokine-Antibody-Array	43
3.2.21	⁵¹ Cr-Zytotoxizitätstest	44
3.2.22	CFSE-Färbung	45
3.2.23	Proliferationstest mittels Inkorporation von ³ H-Methyl-Thymidin	45
3.2.24	Transwell-Assay	46
3.2.25	PKH26 Apoptosetest	46
3.2.26	Isolierung von Gesamt-RNA	47
3.2.27	Reverse Transkription	47
3.2.28	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion	48

4.	Ergebnisse	49
4.1	Isolation und Charakterisierung von humanen DN T-Zellen	49
4.2	Charakterisierung eines Antigen-spezifischen DN T-Zellklons	50
4.2.1	Generierung von gp100-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellklonen	50
4.2.2	Phänotypisierung des DN T-Zellklons T4H2	52
4.2.3	Charakterisierung des DN T-Zellklons T4H2	57
4.2.3.1	Zytokinproduktion des DN T-Zellklons T4H2	57
4.2.3.2	Zytotoxische Aktivität des DN T-Zellklons T4H2	59
4.2.4	Suppressive Funktion des DN T-Zellklons T4H2	63
4.3	Aufreinigung und Expansion von humanen DN T-Zellen	65
4.3.1	Aufreinigung von humanen DN T-Zellen	65
4.3.2	Expansion von humanen DN T-Zellen	69
4.3.2.1	Expansion humaner DN T-Zellen mit Hilfe von anti-CD3/CD28 Beads	69
4.3.2.2	Phänotypische Charakterisierung der expandierten Zellen	71
4.3.2.3	Expansion humaner DN T-Zellen mit Hilfe von allo-genen DCs	72
4.4	Suppression von allo-genen Immunreaktionen	75
4.4.1	Modellsystem zur Untersuchung der suppressiven Funktion	75
4.4.2	Suppressive Aktivität von DN T-Zellen	77
4.4.3	DN T-Zell-vermittelte Suppression von vorstimulierten alloreaktiven CD4 ⁺ T-Zellen	80
4.4.4	Suppressive Aktivität von frisch isolierten DN T-Zellen	81
4.4.5	Generierung von immunregulatorischen DN T-Zellen	82
4.4.6	Induktion der suppressiven Aktivität von DN T-Zellen	83
4.4.7	Aktivierungszustand der supprimierten T-Zellen	85
4.4.8	Kompensation der Suppression durch exogenes IL-2	86
4.4.9	Proliferation von CD8 ⁺ T-Zellen in Anwesenheit von vorstimulierten CD8 ⁺ T-Zellen	88
4.4.10	Blockade der zytotoxischen Aktivität von DN T-Zellen	89
4.4.11	Zytokinprofil expandierter DN T-Zellen	90
4.4.12	Zell-Zell-Kontakt abhängige Suppression von alloreaktiven T-Zellen	92
4.4.13	Eliminierung allo-spezifischer T-Zellen	94
4.4.14	DN T-Zell-vermittelte Modifikation von APCs	95

5.	Diskussion	97
5.1	Isolation und Charakterisierung von humanen DN T-Zellen	97
5.2	Charakterisierung eines Antigen-spezifischen DN T-Zellklons	99
5.3	Aufreinigung und Expansion von humanen DN T-Zellen	102
5.4	Suppression von allogenen Immunantworten	104
5.4.1	Suppressive Aktivität humaner DN T-Zellen	104
5.4.2	Mechanismus der DN T-Zell-vermittelten Suppression	108
5.5	Zusammenfassung und Ausblick	115
6.	Literaturverzeichnis	118
7.	Anhang	138
7.1	Abkürzungsliste	138
7.2	Veröffentlichungen	141
7.3	Danksagung	142

2. Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem bezeichnet ein Organsystem, dessen Hauptaufgabe aus der Erkennung und Beseitigung von Krankheitserregern und entarteten körpereigenen Zellen besteht. Man unterscheidet dabei zwischen zwei miteinander interagierenden Systemen, dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem ist die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Krankheitserreger und setzt sich aus verschiedenen biochemischen und zellulären Abwehrmechanismen zusammen. Dazu zählen physikalische Barrieren wie Epithelien, aber auch zirkulierende Zellen und das Komplementsystem. Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, bestehend aus Granulozyten, Phagozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), erkennen mikrobielle Moleküle durch spezielle Keimbahn-codierte Rezeptoren. Nach Erkennung der Mikroben werden diese durch Makrophagen und Granulozyten phagozytiert und lysiert. Sezernierte Botenstoffe lösen anschließend eine Entzündungsreaktion aus. Ausschlaggebend für die Pathogenität von Mikroorganismen ist das Überwinden der angeborenen Immunantwort und der damit verbundenen Ausbreitung der Erreger (1).

Das erworbene oder adaptive Immunsystem zeichnet sich durch eine hohe Anpassungsfähigkeit gegen neue oder veränderte Krankheitserreger aus. Die Zellen des erworbenen Immunsystems, die Lymphozyten, erkennen spezifische Strukturen der Krankheitserreger, die Antigene, mit Hilfe jeweils einzigartiger Rezeptoren, die klonalen Ursprungs sind und eine sehr hohe Spezifität aufweisen. Diese Rezeptoren entstehen im Laufe der Reifung der Lymphozyten durch somatische Rekombination von verschiedenen Gensegmenten (2).

Das erworbene Immunsystem wird in eine humorale und zellvermittelte Immunantwort unterteilt. Die humorale Immunantwort wird durch spezielle Moleküle, den Antikörpern, vermittelt, die von B-Lymphozyten produziert und sezerniert werden. Die Antikörper binden an Antigene und können anschließend verschiedene Mechanismen, wie Phagozytose, Lyse und die Produktion von Botenstoffen, vermitteln. Bei der zellvermittelten Immunantwort werden viral oder bakteriell infizierte Zellen sowie entartete körpereigene Zellen von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) erkannt und lysiert. Außerdem produzieren CD4⁺ Helfer-T-Zellen nach Antigenerkennung Zytokine, die wiederum die Proliferation und Differenzierung von Effektorzellen aktivieren (3). Zur Induktion einer erworbenen

Immunantwort werden Antigen-präsentierende Zellen (APC, *antigen presenting cell*) benötigt, die pathogenes Material prozessieren und deren Antigene auf ihrer Oberfläche den T-Lymphozyten präsentieren. Naive T-Lymphozyten können über ihren T-Zellrezeptor (TCR, *T cell receptor*) das von den APCs über MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*, Haupthistokompatibilitätsantigene) präsentierte Antigen erkennen und damit aktiviert werden. Für eine vollständige Aktivierung der T-Zellen ist aber auch eine Stimulation mit kostimulatorischen Molekülen notwendig (4). Aktivierte T-Lymphozyten proliferieren und sezernieren Zytokine, die zu einer Reifung in Effektor-T-Zellen führen. Diese sind in der Lage, die Krankheitserreger zu beseitigen oder auch Zellen des angeborenen Immunsystems zu aktivieren und deren Immunantwort zu verstärken. Nachdem das Antigen im Rahmen der Immunantwort eliminiert wurde, muss das Immunsystem wieder in seinen Ausgangszustand zurückkehren, d.h. die Homöostase wieder hergestellt werden. Der Großteil der durch klonale Expansion entstandenen Lymphozyten stirbt durch den aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD, *activation induced cell death*). Dies geschieht durch einen Apoptose genannten Prozess, eine Form programmierten Zelltods, bei dem die DNA und die Zellkernmembran abgebaut werden (5). Ein kleiner Teil der aktivierten Zellen differenziert jedoch zu Gedächtniszellen, die jahrezehntelang im Körper überleben und bei erneutem Kontakt mit dem Antigen eine schnellere und wirksamere sekundäre Immunantwort auslösen können (2).

2.2 Autoimmunkrankheiten

Eine wichtige Eigenschaft des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen Selbst- und Fremdan antigenen. Eine Störung dieses Systems kann schwere Folgen für einzelne Organe oder den ganzen Organismus haben. Die durch fehlerhafte Immunantworten gegen Autoantigene verursachten Erkrankungen bezeichnet man als Autoimmunkrankheiten. Diese treten etwa bei 5% der westlichen Bevölkerung auf (6) und zeichnen sich durch die Produktion von Autoantikörpern und die Aktivierung und Expansion von T-Lymphozyten gegen autologe Zellen, Proteine und Gewebe aus (7). Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen lassen sich auch im gesunden Individuum nachweisen, ohne dass es zu einer Gewebeschädigung kommt (8;9). Eine Autoimmunkrankheit jedoch führt zu einer Zerstörung einzelner Organe oder ganzer Organsysteme durch autoreaktive Zellen oder Antikörper (10). Die Entstehung einer Autoimmunkrankheit hängt stark von den Genen des Individuums und bestimmten Umweltfaktoren ab. Einige Autoimmunkrankheiten, wie das Autoimmun Lympho-

proliferative Syndrom (ALPS) oder die polyglanduläre Autoimmun Endokrinopathie (PGAE oder Whitaker Syndrom), entstehen durch Mutationen in einem einzelnen Gen (11;12). Die meisten Autoimmunkrankheiten entwickeln sich jedoch durch das Zusammenspiel verschiedenster Gene, die unter anderem für Zytokine, Korezeptoren, Apoptosefaktoren und kostimulatorische Moleküle codieren (13;14). Weitere Auslöser für Autoimmunkrankheiten können bakterielle und virale Infektionen sein, die durch molekulare Mimikry oder „Bystander“-Effekte zur Aktivierung von autoreaktiven Immunantworten führen. Dabei verursachen Mikroben eine Aktivierung der Lymphozyten, die auch nach der Beseitigung der Infektion durch Autoantigene aufrechterhalten wird (15). Nach Entstehung einer Autoimmunkrankheit kommt es durch die Zerstörung des Gewebes oft zu einer Akkumulation weiterer Autoantigene, die wiederum durch autoreaktive T-Lymphozyten und Antikörper erkannt werden. Dieses Phänomen bezeichnet man als Epitop Streuung (*epitope spreading*) und ist ein Grund für den chronischen Verlauf der Autoimmunkrankheit (16). Eine Veränderung der Anzahl oder der Funktion von regulatorischen T-Zellen kann ebenfalls eine Autoimmunkrankheit auslösen (17). So zeigen regulatorische T-Zellen von Patienten mit Multipler Sklerose, Diabetes mellitus Typ-I und Psoriasis eine verminderte Effektorfunktion und eine schlechtere Proliferation (18-20). Eine Behandlung von Autoimmunkrankheiten erfolgt meist mit entzündungshemmenden und immunsuppressiven Medikamenten, z. B. Corticosteroiden. Diese sollen Gewebeschäden durch eine Unterdrückung der Immunantwort verhindern. Da diese Therapeutika nicht Antigen-spezifisch agieren, können sie zum Teil schwerste Nebenwirkungen verursachen (10;14).

2.3 Allogene Immunantworten

Eine Transplantation von Zellen, Gewebe oder Organen stellt bei Patienten mit funktionellen oder anatomischen Defekten eine wichtige Behandlungsmethode dar. Das Hauptproblem jeder allogenen Transplantation besteht aber in einer meist schnellen und starken Immunantwort des Empfängers gegen das fremde Gewebe. Dabei erkennt das adaptive Immunsystem polymorphe MHC-Moleküle des Transplantats und löst eine Abstoßungsreaktion gegen das fremde Gewebe aus. Man unterscheidet bei der Erkennung von Alloantigenen zwischen der direkten und der indirekten Erkennung. Bei der direkten Erkennung reagiert der TCR der T-Zelle mit dem allogenen MHC-Komplex einer APC aus dem Transplantat (21), es müssen also keine fremden Proteine aufgenommen und

anschließend von eigenen APCs präsentiert werden. Dadurch kommt es zu einer sehr schnellen Immunantwort. Ein weiterer Grund für die überschießende Immunreaktion liegt in der hohen Frequenz alloreaktiver T-Zellen. Circa 7% der T-Lymphozyten eines Individuums können auf allogene MHC-Moleküle eines anderen Individuums reagieren (22). Bei der indirekten Erkennung werden allogene MHC-Komplexe von APCs aufgenommen, prozessiert und Effektorzellen über eigene MHC-Moleküle präsentiert. Sowohl die direkte als auch die indirekte Erkennung von Alloantigenen kann zur Abstoßung des Transplantats führen (23;24). Eine andere Gruppe von Proteinen, die ebenfalls eine Abstoßungsreaktion auslösen können, bezeichnet man als mHAg (*minor histocompatibility antigens*, Nebenhistokompatibilitätsantigene)(25). mHAg sind polymorphe Proteine des fremden Gewebes, die von APCs prozessiert und den T-Zellen über MHC-Moleküle präsentiert werden.

Die Abstoßung des Transplantats wird aufgrund ihrer Geschwindigkeit, der Mediatoren und der Effektoren in drei Stadien unterteilt. Die hyperakute Abstoßung setzt innerhalb von Minuten bis Stunden nach der Transplantation ein und führt normalerweise zu einem sofortigen Organverlust. Antikörper eines Individuums binden dabei an Oberflächenantigene des Transplantats, aktivieren das Komplementsystem und lösen Thrombosen, Ischämien und auch Nekrosen im Transplantat aus (26). Die akute Abstoßung wird durch T-Zellen vermittelt und tritt etwa eine Woche nach Transplantation auf. Sie wird durch Erkennung von Alloantigenen ausgelöst und führt zur Zerstörung des Transplantats (27). Die chronische Abstoßung zeichnet sich durch ein allmähliches Organversagen aus und tritt meist erst Monate bis Jahre nach Transplantation auf. Sie wird sowohl durch T-Zellen als auch durch Antikörper vermittelt und ist durch Fibrose und veränderte Blutgefäße gekennzeichnet (28).

Um eine Abstoßung zu vermeiden, werden verschiedene Behandlungsmethoden eingesetzt. Eine wichtige Strategie ist die Reduzierung der Immunogenität des Transplantats. Dazu werden die MHC-Typen von Spender und Empfänger aufeinander abgestimmt und somit die Alloreaktivität minimiert. Eine hyperakute Abstoßung wird durch Untersuchung von Blutgruppe und Anwesenheit von Alloantikörpern verhindert (29). Da aber auch mHAg eine Abstoßung verursachen, und diese aufgrund fehlender Kenntnis der Mehrzahl der mHAg nicht angeglichen werden können, müssen zusätzlich auch immunsuppressive Medikamente eingesetzt werden. Diese können das Immunsystem über verschiedenste Mechanismen unterdrücken. Dadurch wird aber auch die Anfälligkeit des Empfängers gegenüber viralen Infektionen und Tumorerkrankungen erhöht (30). Eine weitere interessante Option zur Verhinderung der Abstoßung von Transplantaten besteht in einer Toleranzinduktion gegen Alloantigene. Dieser neue zelltherapeutische Ansatz, der sich noch in der experimentellen

Phase befindet, kann entweder über vorherige Transplantation von Blutstammzellen des Spenders oder über regulatorische T-Zellen vermittelt werden. Beide Ansätze wurden in verschiedenen Modellsystemen erfolgreich getestet (31;32).

2.4 Toleranz

Die Hauptaufgabe des Immunsystems ist die Erkennung und Beseitigung fremder Antigene, wogegen körpereigene Strukturen keine Immunantwort auslösen dürfen. Dieser Prozess wird als immunologische Selbsttoleranz bezeichnet und durch verschiedene Mechanismen, die die Reifung und Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten verhindern, aufrechterhalten. Die Selbsttoleranz wird in zentrale und periphere Toleranz unterschieden.

2.4.1 Zentrale Toleranz

Das Repertoire der TCR umfasst potentiell 25 Millionen Spezifitäten (33) und kann somit die Mehrzahl fremder Pathogene erkennen. Es besteht aber auch die Gefahr, auf körpereigene Proteine zu reagieren und damit eine Autoimmunerkrankung auszulösen. Die zentrale Toleranz soll sicherstellen, dass nur reife Lymphozyten, die keine präsentierten Autoantigene erkennen, die primären lymphatischen Organe verlassen. Dazu präsentieren APCs im Thymus unreifen T-Lymphozyten Autoantigene. Weisen diese T-Lymphozyten eine hohe Affinität gegen ein Autoantigen auf, sind sie potentiell autoreaktiv und werden deshalb durch Apoptose eliminiert (negative Selektion)(34;35). Trotzdem können in der Peripherie von gesunden Individuen autoreaktive T-Zellen nachgewiesen werden (8;9;36), da viele Autoantigene nur in spezifischen Geweben gebildet und deshalb nicht von den APCs in den primären lymphatischen Organen präsentiert werden. Die zentrale Toleranz allein ist also nicht ausreichend, um alle autoreaktiven T-Lymphozyten zu beseitigen. Deshalb müssen auch Mechanismen existieren, die in der Peripherie Toleranz induzieren können (37).

2.4.2 Periphere Toleranz

2.4.2.1 Allgemeine Mechanismen der Toleranzinduktion

Die periphere Toleranz kann durch Mechanismen, die entweder direkt (intrinsisch) oder über äußere Faktoren (extrinsisch) auf T-Zellen wirken, vermittelt werden (38). Im einfachsten Fall werden Autoantigene vom Immunsystem ignoriert. Die Ignoranz der T-Zellen kommt dadurch zustande, dass die Lymphozyten keinen Zugang zu den Autoantigenen haben (39;40). Weiterhin werden die meisten körpereigenen Antigene in zu geringer Menge exprimiert, als dass sie Lymphozyten aktivieren könnten (41). Um eine Immunantwort auszulösen, brauchen T-Zellen neben der Erkennung des Antigens ein kostimulatorisches Signal, dessen Fehlen zur Anergie führen kann (42). Anergie T-Lymphozyten sind funktionell inaktiv und können auch bei späterer optimaler Stimulation nicht mehr auf das Antigen reagieren (43). Anergie kann nicht nur durch das Fehlen des kostimulatorischen Signals, sondern auch direkt über inhibitorische Rezeptoren können Anergie ausgelöst werden. Das *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4* (CTLA-4) ist ein Rezeptor, der an seine Liganden B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) bindet, aber im Gegensatz zu seinem Homolog CD28 ein inhibitorisches Signal induziert und damit Anergie auslöst (44). Das Fehlen von CTLA-4 kann zu heftigen Autoimmunreaktionen, Infiltration und Zerstörung vieler Gewebe und letztendlich zum Tod führen (45;46), während genetische Varianten des CTLA-4 Rezeptors das Risiko, an einer Autoimmunthyreoiditis oder Diabetes mellitus Typ-I zu erkranken, erhöhen (47).

Programmed death-1 (PD-1), ein weiteres Mitglied der B7-CD28 Familie, kann ebenfalls eine T-Zellantwort verhindern und Anergie auslösen (48). PD-1 wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimiert und bindet an die Rezeptoren PD *ligand-1* und -2 (PD-L1, PD-L2) (49;50). Polymorphismen im humanen PD-1 Gen führen zu einer erhöhten Inzidenz für systemischen Lupus erythematoses und Diabetes mellitus Typ-I (51;52).

Ein weiterer Mechanismus peripherer Toleranz ist die klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen durch Fas-vermittelten aktivierungsinduzierten Zelltod. Dabei bindet der Fas Rezeptor an seinen Ligand (FasL) und löst anschließend eine Signalkaskade aus, die zur Apoptose der Lymphozyten führt (53). Eine Aktivierung von T-Zellen kann eine Koexpression von Fas und FasL bewirken und somit Apoptose sowohl in der gleichen als auch in benachbarten Zellen induzieren (54). Die Zellen des Auges und des zentralen Nervensystems exprimieren FasL sogar konstitutiv und verhindern dadurch eine Immunreaktion (55;56). Mutationen im Fas

Signalweg lösen das Autoimmun Lymphoproliferative Syndrom (ALPS) aus, das unter anderem mit Lymphadenopathie, Splenomegalie und verschiedenen Autoimmunphänomenen einhergeht (11;57).

2.4.2.2 Zelluläre Toleranzinduktion

Toleranzinduktion durch CD4⁺ T-Lymphozyten

Periphere Toleranz wird auch durch spezielle, sogenannte regulatorische T-Lymphozyten vermittelt. Diese Zellen spielen nicht nur bei der Selbsttoleranz, sondern auch bei der Kontrolle der Immunantwort gegen Tumoren, Allergene, Mikroben, Transplantate und dem Fötus während der Schwangerschaft eine wichtige Rolle (58-61). Die derzeit am Besten untersuchte Population von regulatorischen T-Zellen sind CD4⁺ T-Zellen, die die α -Kette des Interleukin-2 (IL-2) Rezeptors (CD25) konstitutiv exprimieren und im Menschen circa 2% aller CD4⁺ T-Lymphozyten ausmachen (62-64). CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen können die Aktivierung, Proliferation und Effektorfunktion von T-Lymphozyten unterdrücken(65). Eine verminderte Funktion dieser Lymphozyten kann jedoch zur Ausbildung verschiedener Autoimmunkrankheiten führen (18;19;66;67). Der Transkriptionsfaktor FOXP3 (*forkhead box p3*) wird konstitutiv von CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen exprimiert und ist für ihre Funktion und Entstehung von entscheidender Bedeutung (68;69). FOXP3 bindet an den Transkriptionsfaktor NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) und inhibiert die Transkription unterschiedlicher Gene, die unter anderem für IL-2, IL-4, TNF und Interferon- γ (IFN- γ) kodieren, während gleichzeitig die Expression von CD25 verstärkt wird (70;71). Die Bedeutung von FOXP3 zeigt sich auch darin, dass das Gen nur in CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen demethyliert ist und damit ständig abgelesen werden kann(72). Außerdem löst ein Verlust der CD4⁺ CD25⁺ T-Lymphozyten durch Mutationen im Foxp3 Gen beim Menschen die Autoimmunkrankheit IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome*) aus (73;74). Eine Überexpression von Foxp3 hingegen kann in naiven CD4⁺ T-Zellen eine suppressive Aktivität ähnlich den CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen induzieren (68).

CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen können nicht nur die Proliferation, Aktivierung und Zytokinbildung von T-Lymphozyten, sondern auch die Expansion, Immunglobulinproduktion und den Isotypwechsel (*class switch*) von B-Zellen unterdrücken (75-78). Darüber hinaus kann auch die Zytotoxizität von NK- und NKT (Natürliche Killer T)-Zellen sowie die Reifung und Funktion von dendritischen Zellen (DC) durch CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen inhibiert werden (79-

81). $CD4^+ CD25^+$ T-Lymphozyten benötigen für ihre suppressive Aktivität eine Stimulation des TCR mit dem spezifischen Antigen. Dagegen weist die Suppression der Effektorzellen keine Antigenpezifität auf. Das bedeutet auch, dass unterschiedliche Immunreaktionen durch „Bystander“-Suppression unterdrückt werden (82;83). Zur Entfaltung der suppressiven Funktion benötigen $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen einen Zell-Zell-Kontakt, jedoch ist der exakte Mechanismus der Suppression noch weitgehend ungeklärt (84). Einerseits konnte gezeigt werden, dass eine Blockade der Oberflächenmoleküle CTLA-4 und LAG-3 (*lymphocyte activation gene-3*) die suppressive Funktion der $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen vermindert (85). Andererseits zeigen LAG-3-defiziente Mäuse keine Autoimmunreaktionen, während $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen von CTLA-4-defizienten Mäusen *in vitro* eine normale suppressive Aktivität besitzen (76;86). Weiterhin gibt es Hinweise, dass die Zytokine IL-10 und TGF- β (*transforming growth factor β*) an der suppressiven Aktivität beteiligt sind. So können $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen von IL-10 Knockout-Mäusen homöostatisch proliferierende $CD4^+$ T-Lymphozyten nicht supprimieren (87). Im Gegensatz dazu produzieren murine $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen *in vitro* kein IL-10, und auch neutralisierende Antikörper gegen IL-10 können die Suppression nicht aufheben (63). $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen exprimieren membranständiges TGF- β und können damit sowohl NK- als auch T-Zellen inhibieren (79;88). Trotzdem zeigen $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen von TGF- β Knockout-Mäusen eine normale suppressive Aktivität und können auch *in vivo* Autoimmunerkrankungen verhindern (89;90). Die Ektoenzyme CD39 und CD73 spielen genauso wie der *second messenger* cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*, zyklisches Adenosin Monophosphat) ebenfalls eine wichtige Rolle bei der $CD4^+ CD25^+$ T-Zell-vermittelten Suppression. cAMP inhibiert die Proliferation und IL-2 Synthese von T-Lymphozyten und kann durch Gap Junctions von $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen zu reaktiven T-Zellen transferiert werden (91;92).

Genauso wenig wünschenswert wie eine überschießende Immunreaktion ist eine zu starke Suppression von Immunantworten, da diese den Körper anfällig für Infektionen und die Entwicklung von Malignomen machen können (58;93). Deshalb musste das Immunsystem Mechanismen entwickeln, die Aktivität der $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen zu kontrollieren. Einer dieser Mechanismen ist die Stimulation der Effektorzellen. So können $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen die Proliferation von T-Zellen nach einer schwachen Stimulation unterdrücken, während die Effektoren nach einer Stimulation mit großen Mengen an anti-CD3 Antikörper resistent gegen die Suppression sind (94). Starke kostimulatorische Signale oder hohe Konzentrationen bestimmter Zytokine, wie IL-2, IL-6 und TNF können ebenfalls die Suppression aufheben (76;95;96). Zudem beeinflussen auch GITR (*Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor*

family related receptor) und Toll-like Rezeptoren (TLR) die CD4⁺ CD25⁺ T-Zell-vermittelte Suppression. Effektor T-Zellen können nach einer Stimulation über GITR nicht mehr supprimiert werden, während eine Aktivierung der TLRs auf DCs die Produktion von IL-6 auslöst (97;98).

Regulatorische T-Zellen können sowohl im Thymus reifen als auch durch spezielle Mechanismen aus naiven CD4⁺ T-Lymphozyten in der Peripherie generiert werden (63). Nach Stimulation von naiven CD4⁺ T-Zellen entstehen nicht nur CD4⁺ Effektorzellen sondern auch CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen, die Foxp3 exprimieren und eine suppressive Aktivität aufweisen (99). Diese induzierten CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen inhibieren Immunreaktionen genauso effektiv über einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus wie natürliche im Thymus-gereifte CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen (100). Neben einer schwachen Stimulation des TCR wird für die Induktion von CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen auch ein B7-vermitteltes kostimulatorisches Signal benötigt (101). Das Zytokin TGF- β verstärkt die Differenzierung von naiven T-Zellen in regulatorische T-Lymphozyten sogar noch, während IL-2 diese abschwächt (102;103).

Andere Subpopulationen der CD4⁺ T-Lymphozyten, wie die Typ 3 (Th3) T-Helferzellen und regulatorischen T-Zellen Typ 1 (Tr1) besitzen ebenfalls suppressive Aktivität, die aber im Gegensatz zu CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen nicht über Zell-Zell-Kontakt abhängige Mechanismen, sondern über Zytokine vermittelt wird. Th3 Zellen werden aus naiven CD4⁺ T-Lymphozyten vor allem im Darm durch Stimulation ihres TCR gebildet, wobei die Zytokine TGF- β und IL-4 diese Differenzierung verstärken, während IL-12 und IFN- γ die Induktion unterdrücken (104;105). Sie sezernieren hauptsächlich TGF- β und geringere Mengen an IL-4 und IL-10. Das von Th3 Zellen gebildete TGF- β wiederum induziert die Differenzierung von naiven CD4⁺ in regulatorische CD4⁺ CD25⁺ T-Lymphozyten (106;107).

Tr1 Zellen sezernieren nach TCR-Stimulation vor allem das immunsuppressive Zytokin IL-10 und unterdrücken dadurch die Aktivierung, Zytokinproduktion und Effektorfunktion von T-Lymphozyten (108-110). Tr1 Zellen können durch wiederholte Stimulation des TCR in Gegenwart von IL-10 aus naiven CD4⁺ T-Zellen generiert werden (108). Die Differenzierung in Tr1 Zellen kann durch IFN- α noch verstärkt werden, wohingegen die Ligation von CD2 ohne Kostimulation über CD28 oder LFA-1 (*leukocyte function-associated antigen-1*) für eine Induktion ausreichend ist (111;112). Zudem kann auch eine Stimulation mit unreifen dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DC) die Differenzierung in Tr1 Zellen auslösen (109;113). Im Gegensatz zu Th2 Zellen produzieren diese Zellen IFN- γ , geringe Mengen an IL-2 und kein IL-4 (114). Tr1 Zellen spielen bei der Erhaltung der Selbsttoleranz eine wichtige Rolle. So produzieren autoreaktive T-Zellen bei Patienten mit Diabetes mellitus

Typ-I nach Antigenerkennung vorwiegend entzündungsfördernde Zytokine, während autoreaktive T-Zellen aus gesunden Individuen überwiegend IL-10 bilden (115). Zudem konnte in Patienten mit rheumatoider Arthritis eine verminderte Frequenz an Tr1 Zellen nachgewiesen werden (116). Tr1 Zellen sind aber auch an Immunreaktionen gegen Transplantate, Allergene, Infektionen und Tumore beteiligt (117-122).

Toleranzinduktion durch CD8⁺ T-Lymphozyten

Nicht nur CD4⁺ T-Zellen, sondern auch CD8⁺ T-Lymphozyten zeigen immunregulatorische Funktionen. So kann eine Subpopulation von CD8⁺ T-Zellen die Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen inhibieren und damit die Ausbildung einer experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) verhindern (123;124). Das murine Qa-1 und sein humanes Homolog HLA-E (humanes Leukozyten Antigen-E) sind MHC-Klasse Ib Moleküle, werden hauptsächlich von aktivierten T-Zellen, DCs, Makrophagen und B-Zellen exprimiert und können sowohl fremde als auch körpereigene Peptide präsentieren (125). CD8⁺ Suppressor T-Zellen erkennen diesen Qa-1/Peptid-Komplex, differenzieren in Effektorzellen und supprimieren aktivierte T-Zellen Antigen-spezifisch (124;126).

Eine weitere Subpopulation von regulatorischen T-Zellen sind CD8⁺ T-Lymphozyten, die nicht das kostimulatorische Molekül CD28 exprimieren. Deren Bedeutung zeigt sich unter anderem darin, dass CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen bei Patienten mit akzeptierten Herz-, Leber- und Nierentransplantaten nachgewiesen werden konnten, während diese Zellen bei Patienten, die eine akute Abstoßungsreaktion durchlaufen, nicht detektierbar sind (127-129). CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen können durch wiederholte Stimulation mit allophen oder xenogenen APCs generiert werden, sind MHC-Klasse I restringiert und unterdrücken die Proliferation von CD4⁺ T-Lymphozyten (130). Die suppressive Aktivität von CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen wird nicht durch Zytotoxizität gegen APCs oder CD4⁺ T-Zellen, sondern durch einen anderen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus vermittelt. Dabei unterdrücken CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen die Aktivierung der APCs, verhindern dadurch die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle wie CD80 und CD86 sowie die Expression der Adhäsionsmoleküle wie CD54 und CD58 und lösen eine Differenzierung der APC in eine tolerogene Zelle aus (130;131). Zudem exprimieren APCs nach dem Kontakt mit den CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen die inhibitorischen Oberflächenmoleküle ILT3 und ILT4 (*immunoglobulin-like transcript 3 bzw. 4*) (132;133). Diese tolerogenen APCs wiederum induzieren in Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen Anergie und verhindern dadurch eine Immunreaktion (130;132).

Eine weitere Subpopulation von $CD8^+$ T-Lymphozyten vermittelt ihre suppressive Aktivität über das Zytokin IL-10. Diese Suppressorzellen können aus $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen und nicht aus $CD8^+ CD28^+$ T-Zellen in Gegenwart von IL-10 produzierenden Monozyten generiert werden und exprimieren ähnlich den $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen den Transkriptionsfaktor FOXP3 (134;135). Suppressive $CD8^+$ T-Zellen sezernieren IL-10 und inhibieren dadurch sowohl die Aktivierung der APCs als auch die Proliferation und zytotoxische Aktivität der T-Zellen (136). Ihre funktionelle Bedeutung zeigt sich unter anderem darin, dass $CD8^+$ Suppressorzellen nur von gesunden Individuen oder von Patienten mit SLE (systemischer Lupus erythematodes) in Remission, aber nicht von Patienten mit einem aktiven SLE generiert werden konnten (134). Außerdem konnten $CD8^+$ Suppressorzellen auch in Patienten mit Lungenkrebs detektiert werden (135).

2.5 DN T-Zellen

Neben den bereits erwähnten regulatorischen T-Zellsubpopulationen weisen auch $TCR\alpha\beta^+ CD4^- CD8^-$ (doppeltnegativ, DN) T-Zellen eine immunsuppressive Funktion auf. DN T-Zellen spielen im murinen System sowohl bei der Selbsttoleranz als auch bei Immunreaktionen gegen allogene oder xenogene Transplantate, Tumore und Infektionen eine wichtige Rolle (137-140).

2.5.1 Entstehung von DN T-Zellen

Im murinen System sind ungefähr 1-5% aller peripherer T-Lymphozyten DN T-Zellen (141). Während die Herkunft von $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Lymphozyten intensiv untersucht wurde, ist die Entstehung von DN T-Zellen immer noch unklar. Die Heterogenität der Oberflächenstrukturen, die von verschiedenen DN T-Zellen exprimiert werden, legt nahe, dass mehrere Reifungswege existieren. DN T-Zellen können im Thymus aus $CD4^+ CD8^+$ T-Zellen durch Stimulation mit hochaffinen Antigenen generiert werden. Diese DN T-Zellen produzieren große Mengen an IL-10 und unterdrücken dadurch *in vitro* die Proliferation von naiven T-Zellen (142;143). Die aus dem Blut oder den lymphatischen Organen isolierten DN T-Zellen produzieren aber kein IL-10 (137). Zudem können auch in Mäusen, bei denen der Thymus entfernt wurde, noch DN T-Zellen in der Peripherie detektiert werden (144). Andere Studien zeigen, dass DN T-Zellen auch außerhalb des Thymus von der Leber, dem

Knochenmark oder dem Appendix gebildet werden (145-147). Weiterhin können in verschiedenen Mausmodellen DN T-Zellen direkt aus CD8⁺ T-Zellen hervorgehen (143;148). Die Tatsache, dass das CD8 Gen in murinen DN T-Zellen demethyliert vorliegt, spricht ebenfalls für eine enge Verwandtschaft von CD8⁺ und DN T-Zellen (149;150). Außerdem können reife murine CD8⁺ T-Zellen durch eine hohe Dosis IL-4 oder durch TCR-Stimulation zu DN T-Zellen differenziert werden (151;152). Im Gegensatz dazu konnten aber auch in CD8 Knockout Mäusen funktionelle DN T-Zellen nachgewiesen werden (144;153). Eine weitere Möglichkeit DN T-Zellen zu generieren, besteht in einer Stimulation des TCR von murinen CD4⁺ T-Zellen. Sowohl naive CD4⁺ T-Zellen als auch aktivierte CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen können durch wiederholte Stimulation mit aus dem Knochenmark gereiften DCs in DN T-Zellen differenzieren. Diese Umwandlung kann durch eine fehlende Aktivierung des CD4 Korezeptors noch verstärkt werden (154;155).

2.5.2 Charakterisierung und Aktivierung von DN T-Zellen

Murine DN T-Zellen exprimieren ein besonderes Set an Oberflächenmolekülen und weisen ein spezifisches Zytokinprofil auf. Eine Subpopulation von DN T-Zellen tragen den NK Zellrezeptor NK1.1. Diese DN NKT-Zellen zeigen eine suppressive Aktivität und können Autoimmunreaktionen oder eine GVHD (*graft versus host disease*) verhindern (156;157). Eine andere Population von DN T-Zellen unterscheidet sich von den aus dem Knochenmark stammenden DN NKT-Zellen hinsichtlich ihrer Oberflächenmoleküle, ihres Zytokinprofils und ihrer Funktion. Diese Zellen exprimieren die Rezeptoren CD3, TCR $\alpha\beta$ und CD25, tragen aber weder die Moleküle NK1.1, noch CD4 oder CD8 auf ihrer Oberfläche (137;141). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden nur noch NK1.1⁻ Zellen als DN T-Zellen bezeichnet.

DN T-Zellen exprimieren außerdem die Rezeptoren FcR γ , Ly-6A und CXCR5. FcR γ (*Fc receptor γ -chain*) ist ein Bestandteil von verschiedenen Signalkomplexen wie den FcRs und ILTs (158;159). Der zytoplasmatische Carboxyterminus von FcR γ weist eine hohe Homologie zu der ζ -Kette des TCR-Komplexes auf und kann deren Platz einnehmen (160). Eine Stimulation eines FcR γ -TCR-Komplexes führt durch eine Phosphorylierung des Proteins Syk zur Aktivierung der DN T-Zelle. Im Gegensatz dazu werden CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen durch ein CD3 ζ -TCR-Signal und anschließender Phosphorylierung des Zap-70 Proteins aktiviert (161).

Ly-6A ist ein Glycosyl-phosphatidylinositol-gebundenes Oberflächenmolekül und wird von verschiedenen Zellen, unter anderen von hämatopoetischen Stammzellen und Lymphozyten,

exprimiert (162). Die genaue Funktion von Ly-6A ist noch umstritten. Einerseits kann Ly-6A als kostimulatorisches Signal dienen und $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen aktivieren (163). Andererseits vermindert eine Stimulation von Ly-6A die IL-2 Produktion von aktivierten T-Zellen (164;165). Die Expression von funktionellem Ly-6A ist entscheidend für die suppressive Aktivität von DN T-Zellen. So können DN T-Zellen von Ly-6A Knockout Mäusen alloreaktive $CD8^+$ T-Zellen nicht eliminieren und damit die Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten nicht verhindern (166).

Der Chemokinrezeptor CXCR5 wird hauptsächlich von reifen B-Lymphozyten, einer Subpopulation von $CD4^+$ T-Zellen und murinen DN T-Zellen exprimiert (167-169). Das Chemokin CXCL13 bindet an CXCR5 und induziert Chemotaxis in Richtung des steigenden Gradienten (170). Die CXCL13-CXCR5-Interaktion spielt offensichtlich für das Einwandern von DN T-Zellen in Transplantate eine wichtige Rolle. Eine Blockade von CXCL13 mit neutralisierenden Antikörpern oder der Knockout von CXCR5 verhindert die Migration und Akkumulation von DN T-Zellen in transplantierte Gewebe. Die fehlende suppressive Aktivität der DN T-Zellen führt zu einer Immunreaktion und damit zur Abstoßung des Transplantats (169).

DN T-Zellen exprimieren nicht nur spezifische Oberflächenmoleküle sondern zeigen auch ein bestimmtes Zytokinmuster. Murine DN T-Zellen produzieren nach Aktivierung überwiegend $IFN-\gamma$ und TNF, sowie geringe Mengen an TGF- β , aber kein IL-2, IL-4, IL-10 oder IL-13 (137). DN T-Zellen zeigen auch eine erhöhte Expression von vielen IFN-regulierten Genen, woraus sich folgern lässt, dass DN T-Zellen $IFN-\gamma$ autokrin nutzen (171). DN T-Zellen benötigen für ihre Aktivierung und Proliferation exogenes IL-2 und IL-4 (137), exogenes IL-4 kann DN T-Zellen auch vor Apoptose schützen (172). Exogenes IL-10 dagegen fördert die Apoptose von DN T-Zellen und unterdrückt ihre suppressive Aktivität (173).

2.5.3 Funktion von DN T-Zellen

Periphere DN T-Zellen haben die Eigenschaft, verschiedenste Immunantworten zu regulieren. Eine Aktivierung von DN T-Zellen mit MHC-Klasse I oder -Klasse II Alloantigenen kann eine allo- oder xenoreaktive Immunantwort supprimieren und dadurch die Abstoßung von Transplantaten verhindern (137;138). DN T-Zellen, die aus Allotransplantat-tolerierenden Mäusen isoliert wurden, können *in vitro* die Proliferation von syngenen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterdrücken (138;174). Ein adoptiver Transfer der aus Allotransplantat-toleranten Mäusen gewonnenen DN T-Zellen in eine weitere Maus, der ein allogenes Transplantat

implantiert wurde, kann wiederum *in vivo* die Proliferation und Zytokinproduktion von alloreaktiven CD4⁺ supprimieren und somit eine Abstoßungsreaktion inhibieren (175). Zudem wandern aktivierte DN T-Zellen in Transplantate ein und unterdrücken lokal alloreaktive T-Zellen (174).

Weiterhin sind DN T-Zellen auch an der Erhaltung der Selbsttoleranz beteiligt. So können DN T-Zellen autoreaktive CD8⁺ T-Zellen unterdrücken und die Ausbildung von Diabetes mellitus Typ-I verhindern (176). Mutationen im Fas Signalweg lösen bei lymphoproliferativen (lpr) Mäusen Autoimmunkrankheiten aus. Charakteristisch für diese ist die erhöhte Anzahl an DN T-Zellen (177). Diese DN T-Zellen können *in vitro* als auch *in vivo* die Proliferation von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen supprimieren, wenn diese Zellen einen funktionellen Fas-Rezeptor exprimieren. Daraus lässt sich schließen, dass lpr Mäuse deshalb Autoimmunkrankheiten entwickeln, weil DN T-Zellen durch das Fehlen von Fas ihre suppressive Aktivität nicht mehr ausüben können. Möglicherweise ist die erhöhte Anzahl der DN T-Zellen zum Teil ein fehlgeschlagener Kompensationsmechanismus, autoreaktive T-Zellen zu unterdrücken und Autoimmunkrankheiten zu verhindern (178).

Des Weiteren spielen DN T-Zellen auch bei der Tumorbekämpfung eine Rolle. Eine Infusion von allogenen Lymphozyten in immundefiziente Mäuse kann eine Immunantwort gegen einen Tumor auslösen, ohne dass eine GVHD auftritt. Diese Immunreaktion wird unter anderem auch durch DN T-Zellen vermittelt. So zeigen DN T-Zellen *in vitro* eine starke zytotoxische Aktivität gegen Tumorzellen. Zudem kann die Infusion von DN T-Zellen das Auswachsen eines Tumors verhindern (139). Auf der anderen Seite können murine DN T-Zellen auch eine durch allogene Lymphozyten vermittelte GVHD verhindern (179;180). DN T-Zellen besitzen also die Eigenschaft sowohl Tumorzellen zu lysieren als auch GVHD-auslösende Zellen zu unterdrücken (139).

Murine DN T-Zellen sind auch an einer Immunantwort gegen Mikroben beteiligt. Eine intraperitoneale Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes* führt zu einer Anhäufung von DN T-Zellen in der Bauchhöhle. Die DN T-Zellen produzieren vor allem IFN- γ , MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*)(181). DN T-Zellen können ebenfalls das intrazelluläre Wachstum von *Mycobacterium tuberculosis* und *Francisella tularensis* in Makrophagen spezifisch inhibieren und dadurch das Überleben der infizierten Mäuse begünstigen (182). Des Weiteren können DN T-Zellen auch vor viralen Infektionen schützen, indem sie antivirale und Makrophagen-aktivierende Zytokine produzieren. So akkumulieren DN T-Zellen nach einer Infektion mit

dem murinen Cytomegalovirus in der Bauchhöhle, Leber und Milz und sezernieren IFN- γ , TNF, MCP-1 und Eta-1 (*early T-cell activation-1*) (140).

Die Funktion humaner DN T-Zellen ist dagegen noch weitgehend unklar. In der Literatur wurde beschrieben, dass bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten wie dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) und dem Autoimmun Lymphoproliferativen Syndrom (ALPS) eine erhöhte Frequenz von DN T-Zellen nachgewiesen werden kann (11;183). Eine weitere Studie zeigte, dass die DN T-Zellen von ALPS-Patienten nicht von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen abstammen (184). Die Population der DN T-Zellen setzt sich aus naiven als auch Antigen-erfahrenen Zellen zusammen, wobei Patienten mit SLE einen höheren Anteil an naiven Zellen aufweisen (185). Ferner wurde gezeigt, dass DN T-Zellen von gesunden Spendern überwiegend IFN- γ produzieren, wohingegen DN T-Zellen von SLE-Patienten sowohl IFN- γ als auch IL-4 sezernieren. Das gebildete IL-4 wiederum fördert die Antikörperproduktion von B-Zellen und verstärkt dadurch die Pathogenese von SLE (183). Dagegen spielen humane DN T-Zellen auch bei der Parasitenabwehr eine wichtige Rolle. So sind DN T-Zellen von Patienten mit einer kutanen Leishmaniose stark aktiviert, expandiert und produzieren hauptsächlich die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF (186;187).

2.5.4 Mechanismus der DN T-Zell-vermittelten Suppression

Im Gegensatz zu CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen oder Tr1 Zellen, die ihre suppressive Aktivität unabhängig vom Antigen vermitteln, unterdrücken murine DN T-Zellen Immunreaktionen Antigen-spezifisch. So können murine DN T-Zellen syngene aktivierte CD8⁺ T-Zellen, deren TCR die gleiche Spezifität aufweist, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* supprimieren, während CD8⁺ T-Zellen mit einer anderen TCR-Spezifität nicht inhibiert werden (137). Die suppressive Aktivität von DN T-Zellen wird nicht durch bestimmte Zytokine oder durch Veränderung der APCs, sondern durch einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus vermittelt. Dabei eliminieren DN T-Zellen aktivierte CD8⁺ T-Zellen durch Fas/FasL Interaktion. Eine Blockade von FasL auf den DN T-Zellen vermindert die suppressive Aktivität von DN T-Zellen(137;188). Außerdem zeigen DN T-Zellen von *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*) Mäusen, die ein mutiertes FasL Molekül exprimieren, eine verminderte Fähigkeit, CD8⁺ T-Zellen zu eliminieren (178).

Um ihre suppressive Funktion auszuüben, benötigen DN T-Zellen eine Interaktion zwischen den eigenen MHC-Komplexen und den TCR der CD8⁺ T-Zellen. Eine Blockade des TCR der CD8⁺ T-Zelle oder des MHC-Komplexes der DN T-Zelle mit Antikörpern verhindert die DN

T-Zell-vermittelte Suppression (137). Die notwendige Interaktion zwischen MHC-Komplex und TCR lässt dadurch erklären, dass DN T-Zellen Peptid-MHC (pMHC)-Komplexe von APCs aufnehmen, diese auf ihrer Oberfläche präsentieren und über diese Komplexe spezifisch $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen beeinflussen (141;153). Verschiedene Immunzellen, wie T-Zellen und B-Zellen, aber auch Makrophagen, NK Zellen und DCs, haben die Eigenschaft, Proteine von benachbarten Zellen aufzunehmen (189-193). Die Akquisition von pMHC-Komplexen durch $CD8^+$ T-Zellen kann zu einer Art „Brudermord“ führen. Dabei erkennen $CD8^+$ T-Zellen den transferierten MHC-Komplex auf anderen $CD8^+$ T-Zellen und eliminieren diese (191). Andererseits kann die Präsentation von akquirierten pMHC-Komplexen auch eine stimulatorische Funktion aufweisen (194). DN T-Zellen können pMHC-Komplexe von APCs aufnehmen und diese auf ihrer Oberfläche präsentieren. Im Gegensatz zu $CD8^+$ T-Zellen können die MHC-Komplexe auch nach 48 Stunden auf den DN T-Zellen detektiert werden (137). Weiterhin ist die Akquisition der pMHC-Komplexe durch die DN T-Zellen Antigen-spezifisch und kann durch eine Blockade des TCR verhindert werden (153).

Zusammenfassend lässt sich folgendes Modell für die DN T-Zell-vermittelte Antigen-spezifische Suppression aufstellen: DN T-Zellen erkennen über ihren TCR pMHC-Komplexe von APCs und akquirieren diese. Aktivierte $CD8^+$ T-Zellen erkennen die transferierten MHC-Komplexe und werden anschließend von den DN T-Zellen über Fas/FasL Interaktion eliminiert (Abb. 1).

Möglicherweise können DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität auch durch andere Mechanismen vermitteln. So können *in vitro* generierte DN T-Zellen aktivierte $CD4^+$ T-Zellen ohne Fas/FasL Interaktion supprimieren. Dabei inhibieren DN T-Zellen durch einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus die Produktion von IL-2 und die Expression des IL-2 Rezeptors von $CD4^+$ T-Zellen (195). Zudem können DN T-Zellen von FasL-defizienten *lpr* Mäusen ebenfalls in geringeren Umfang die Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterdrücken (153). Außerdem wird durch eine Blockade von FasL die suppressive Funktion von DN T-Zellen nicht vollständig aufgehoben (137). Möglicherweise sind die unterschiedlichen suppressiven Mechanismen abhängig von der Art der Aktivierung der DN T-Zelle oder auch von der zu supprimierenden Zelle.

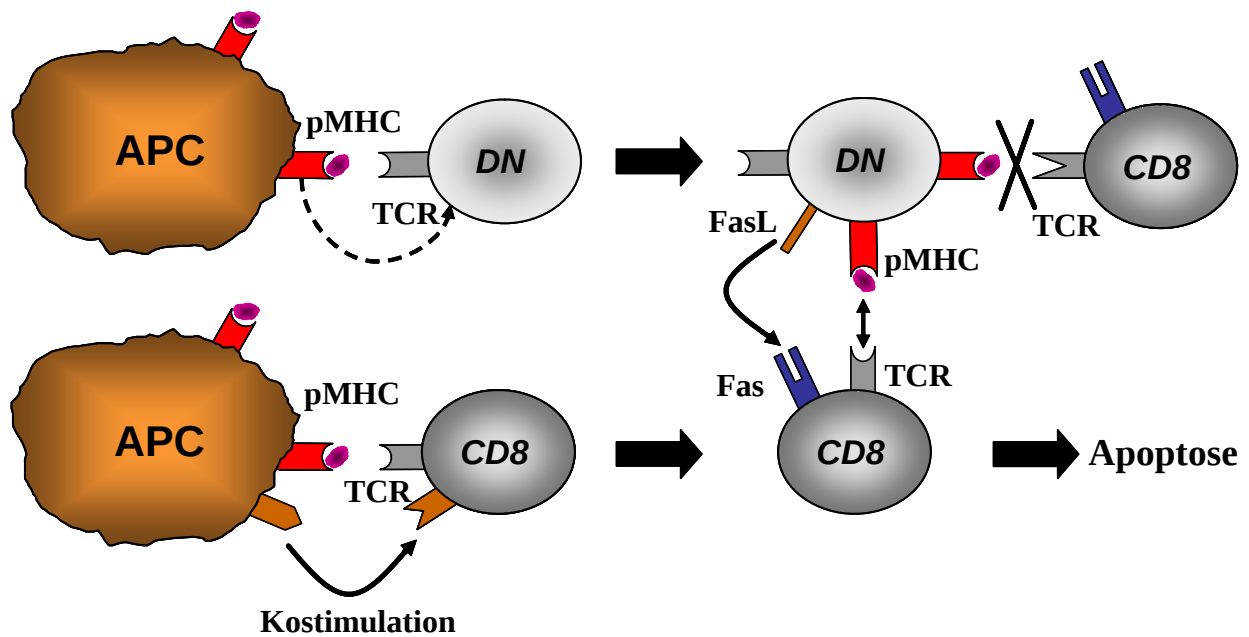


Abb. 1: Schematisches Modell der DN T-Zell-vermittelten Suppression von aktivierten $CD8^+$ T-Zellen (137). DN T-Zellen übernehmen den pMHC-Komplex von APCs nach spezifischer Erkennung durch ihren TCR. $CD8^+$ T-Zellen werden aktiviert und exprimieren anschließend Fas auf ihrer Oberfläche. $CD8^+$ T-Zellen erkennen den transferierten pMHC-Komplex auf der DN T-Zelle und werden von den DN T-Zellen durch Fas/FasL Interaktion eliminiert. Andere $CD8^+$ T-Zellen, deren TCR eine andere Spezifität aufweisen, werden nicht beeinflusst.

2.6 Zielsetzung

Im Fokus dieser Arbeit steht die periphere Toleranzinduktion des Immunsystems durch regulatorische T-Zellen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, humane $TCR\alpha\beta^+ CD4^- CD8^-$ (doppeltnegativ, DN) T-Lymphozyten zu charakterisieren und eine mögliche immunregulatorische Aktivität dieser Zellen zu evaluieren.

Im Rahmen einer Kooperation mit Prof. M. Nishimura (Medical University of South Carolina, Charleston) wurde ein DN T-Zellklon (T4H2), dessen TCR das Melanozyten-Differenzierungsantigen gp100 spezifisch erkennt, zur Verfügung gestellt. Dieser DN T-Zellklon sollte zunächst sowohl phänotypisch als auch funktionell analysiert werden. Hierfür wurden $CD8^+$ T-Zellklone, die ebenfalls das gp100 Peptid erkennen, generiert und mit dem DN Klon verglichen. Ferner sollte auch eine mögliche suppressive Aktivität des DN T-Zellklons überprüft werden.

Da humane DN T-Zellen nur in einer geringen Frequenz im peripheren Blut von gesunden Spendern vorkommen, sollten verschiedene Isolations- und Expansionsmethoden untersucht werden. Dabei wurden zwei unterschiedliche Aufreinigungsstrategien miteinander verglichen: eine kombinierte Methode bestehend aus magnetischer Separation und durchflusszytometrischer Zellsortierung und eine rein magnetische Isolation. Weiter sollte untersucht werden, ob humane DN T-Zellen *in vitro* mit artifiziellen APCs und/oder allogenen DCs expandiert werden können.

Im zweiten Teil der vorgelegten Arbeit sollte eine mögliche immunregulatorische Funktion humaner DN T-Zellen analysiert werden. Hierfür sollte zunächst ein Modellsystem für die DN T-Zell-vermittelte Suppression etabliert werden. Zudem sollte aufgeklärt werden, über welchen Mechanismus humane DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität ausüben.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Medien, Puffer und Lösungen

AB-Serum, human: PAN Biotech, Aidenbach

Adhärenzmedium: RPMI ohne Phenolrot (Biochrom, Berlin) +
40 U/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe)

Annexin-Puffer: Pharmingen/BD, Heidelberg

BSA (Bovine serum albumin): PAA, Linz (Österreich)

Diluent C: Sigma, München

Dimethylsulfoxid: Sigma, München

DYNAL-Puffer: PBS + 2% Fötales Kälberserum

Einfriermedium: 90% Fötales Kälberserum + 10% Dimethylsulfoxid

FACSClean: BD, Heidelberg

FACSflow: BD, Heidelberg

FACSRinse: BD, Heidelberg

FACS-Waschpuffer: PBS + 0,6 mg/ml Sandoglobulin

FCS (Fötales Kälberserum): Gibco/Invitrogen, Karlsruhe

FCS-haltiges Medium: Standardmedium + 10% FCS

Hanks' balanced salt solution (1x): PAA, Linz (Österreich)

HSA (Human serum albumin): Octapharma, Langenfeld

Lymphozytenseparationslösung (Ficoll): PAA, Linz (Österreich)

MACS-Puffer: PBS + 2 mM EDTA (Sigma) + 0,5% HSA

Paraformaldehyd Fixierlösung: PBS + 5 g Paraformaldehyd gelöst, pH=7

PBS (Phosphate buffered saline): Biochrom, Berlin

Sandoglobulin: Novartis, Nürnberg

Saponinlösung: PBS + 0,1% Saponin + 0,1% BSA

Standardmedium (serumfrei): insgesamt 500 ml RPMI mit Phenolrot (Biochrom, Berlin) mit folgenden Zusätzen: 200 mmol/l L-Glutamin, 2 ml Vitamine (100 x) (PAA Linz, Österreich), 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (100 x) (PAN Biotech), 100 mmol/l Natriumpyruvat (PAN Biotech), 40 U/ml Penicillin (Gibco), 40 µg/ml Streptomycin (Gibco), 50 µmol/l β-Mercaptoethanol (Gibco)

T-Zell-Medium: Standardmedium + 10% humanes AB-Serum

T-Zell-Stimulationsmedium: T-Zell-Medium + TCGF (isoliert aus Zellüberstand)

X-Vivo15-Medium: BioWhittaker, Verviers (Belgien)

3.1.2 Farbstoffe

Farbstoff	Konjugation	Hersteller
7AAD	-	Pharmingen/BD, Heidelberg
AnnexinV	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
AnnexinV	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
CFSE	-	Sigma, München
PKH-26	-	Sigma, München
Propidiumiodid	-	Calbiochem, Läfelfingen (Schweiz)

3.1.3 Blockadeagentien

Blockade-Agentien	Hersteller
CMA (Concanamycin-A)	Sigma, München
z-AAD (Granzyme B-Inhibitor)	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Anti-Fas Antikörper (Klon ZH-4)	Biomol, Hamburg
Anti-TCRV β 17 Antikörper	Immunotech, Marseille (France)
Z-DEVD-FMK (Caspase-3 Inhibitor)	BD, Heidelberg

3.1.4 HLA-A2-bindende Peptide

Peptid	Aminosäuresequenz	Lösung	Hersteller
Melan-A	ELAGIGILTV	Standardmedium 20% DMSO	Calbiochem, Läfelfingen (Schweiz)
EBV	GLCTLVAML	Standardmedium 10% DMSO	Calbiochem, Läfelfingen (Schweiz)
gp100	ITDQVPFSV	Standardmedium 5% DMSO	Bachem, Heidelberg

3.1.5 Peptid-MHC-Tetramere

Tetramer	Konjugation	Hersteller
Melan-A	PE	Beckman Coulter, Krefeld
EBV	PE	Beckman Coulter, Krefeld
gp100	PE	Beckman Coulter, Krefeld

3.1.6 Antikörper

Für den Nachweis von Oberflächen- oder intrazellulären Markern wurden folgende monoklonale Antikörper, die direkt mit Fluorochromen konjugiert sind, verwendet:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Hersteller
CCR7	IgG2a	150503	Maus	FITC	R&D, Minneapolis (USA)
CCR7	IgG2a	150503	Maus	APC	R&D, Minneapolis (USA)
CD1a	IgG1	HI149	Maus	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD3	IgG1	SK7	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD3	IgG1	SK7	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD3	IgG1	SK7	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
CD3	IgG1	UCHT1	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD4	IgG1	SK3	Maus	FITC	Dianova, Hamburg
CD4	IgG1	SK3	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD4	IgG1	SK3	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
CD4	IgG1	13B8.2	Maus	APC	Coulter, Krefeld
CD8	IgG1	SK1	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD8	IgG1	SK1	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD8	IgG1	SK1	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
CD8	IgG1	RPA-T8	Maus	APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD8 β	IgG2a	2ST8.5H7	Maus	PE	Immunotech, Marseille (France)

CD14	IgG2b	MOP9.89	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD14	IgG2b	MoP9	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
CD16	IgG1	3G8	Maus	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD25	IgG1	M-A251	Maus	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD25	IgG1	2A3	Maus	APC	BD, Heidelberg
CD28	IgG1	15E8	Maus	FITC	Caltag, Hamburg
CD45 RA	IgG1	L48	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD45 RA	IgG2b	MEM56	Maus	APC	Caltag, Hamburg
CD45RO	IgG2a	UCHL-1	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD45RO	IgG2a	UCHL1	Maus	APC	Caltag, Hamburg
CD54	IgG1	15.2	Maus	FITC	Cymbus/Millipore, Schwalbach
CD56	IgG2b	NCAM16.2	Maus	PE	BD, Heidelberg
CD58	IgG2a	BRIC5	Maus	FITC	Dianova, Hamburg
CD62L	IgG1	DREG-56	Maus	APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD69	IgG1	L78	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD69	IgG2a	CH/4	Maus	PE	Caltag, Hamburg
CD71	IgG1	YDL.1.2.2.	Maus	FITC	Immunotech, Krefeld
CD80	IgM	BB1	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD83	IgG2b	HB15a	Maus	PE	Immunotech, Krefeld
CD86	IgG1	FUN1	Maus	FITC	BD, Heidelberg
CD95 (Fas)	IgG1	DX2	Maus	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD95 (Fas)	IgG1	DX2	Maus	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
CD152	IgG2a	BNI3	Maus	APC	Pharmingen/BD, Heidelberg
FoxP3	IgG2a	PCH101	Ratte	APC	eBiosciences, Frankfurt
Granzyme B	IgG1	HC2	Maus	PE	Hözl Diagnostika, Köln
HLA-A2	IgG2b	BB7.2	Maus	PE	Serotec, Düsseldorf

HLA-ABC	IgG1	G46-2.6	Maus	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
HLA-DR	IgG2a	L243	Maus	FITC	BD, Heidelberg
IFN- γ	IgG1	B27	Maus	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
IL-2	IgG2a	MQ1-17H12	Ratte	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
IL-4	IgG1	MP4-25D2	Ratte	PE	eBiosciences, Frankfurt
IL-5	IgG1	TRFK5	Ratte	PE	eBiosciences, Frankfurt
IL-10	IgG1	JES3-9D7	Ratte	PE	Pharmingen/BD, Heidelberg
Perforin	IgG2b	delt9G9	Maus	PE	Hözl Diagnostika, Köln
PD-L1	IgG1	MIH1	Maus	PE	eBiosciences, Frankfurt
TCR $\alpha\beta$	IgG2b	BW242/412	Maus	PE	Miltenyi, Bergisch Gladbach
TCR $\alpha\beta$	IgG2b	BW242/412	Maus	APC	Miltenyi, Bergisch Gladbach
TCR $\gamma\delta$	IgG1	B1	Maus	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg

Für die Kontrollfärbungen wurden folgende Fluoreszenz-konjugierte Isotyp-Antikörper verwendet:

Isotyp	Klon	Herkunft	Fluoreszenz	Hersteller
IgG1	X40	Maus	FITC	BD, Heidelberg
IgG1	X40	Maus	PE	BD, Heidelberg
IgG1	X40	Maus	PerCP	BD, Heidelberg
IgG1	MOPC-31C	Maus	PC-5	Pharmingen/BD, Heidelberg
IgG1	679.1MC7	Maus	APC	Beckman Coulter, Krefeld
IgG2a	G155-178	Maus	FITC	Pharmingen/BD, Heidelberg
IgG2a	X39	Maus	PE	BD, Heidelberg
IgG2a	5205	Maus	APC	Caltag, Hamburg

IgG2b	MPC-11	Maus	FITC	BD, Heidelberg
IgG2b	MPC-11	Maus	PE	BD, Heidelberg
IgG2b	MOPC-195	Maus	APC	Caltag, Hamburg
IgM	MsIgM	Maus	PE	Dianova, Hamburg

3.1.7 Beads

Name	Hersteller
CD4 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD8 ⁺ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
DN T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD4 Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
CD8 Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach
anti-CD3/CD28 Dynabeads (T Cell Expander)	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
anti-CD3 Dynabeads	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
M-450 CD4 Dynabeads	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
M-450 CD8 Dynabeads	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
M-450 CD19 Dynabeads	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
M-450 CD14 Dynabeads	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)
M-450 Anti mouse IgG Dynabeads	Invitrogen/Dynal, Oslo (Norwegen)

3.1.8 Oligonukleotide

Name	Sequenz	Verwendung
CD8 α for	5'-ccc tga gca act cca tca tgt- 3'	CD8 α sense
CD8 α rev	5' -gtg ggc ttc gct ggc a- 3'	CD8 α antisense
CD8 β for	5' -caa tct cac aag cgt gaa gcc- 3'	CD8 β sense
CD8 β rev	5' -gaa gga aat caa cca cac tca gc- 3'	CD8 β antisense
18S for	5' -acc gat tgg atg gtt tag tga g- 3'	18S sense
18S rev	5' -cct acg gaa acc ttg tta cga c- 3'	18S antisense

3.1.9 Zellkulturflaschen, -platten, -röhrchen

25 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar, NY (USA)
75 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar, NY (USA)
162 cm ² Kulturflaschen	Corning/Costar, NY (USA)
96-well Rundbodenplatten	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
96-well Spitzbodenplatten	Corning/Costar, NY (USA)
24-well Platten	Corning/Costar, NY (USA)
Transwellplatten + Inserts (0,4 µm Porengrösse; Zellkultur-getestet)	Corning/Costar, NY (USA)
12-well Platten	Corning/Costar, NY (USA)
6- well Platten	Corning/Costar, NY (USA)
15 ml Zentrifugationsröhrchen	Corning/Costar, NY (USA)
50 ml Zentrifugationsröhrchen	Corning/Costar, NY (USA)
200 ml Zentrifugationsröhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
14 ml Polysytrene Röhrchen	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
Facs-Röhrchen unsteril	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
Facs-Röhrchen steril	Falcon/BD, Franklin Lakes (USA)
Einfrier-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
1,5 ml Cups	Sarstedt, Nürnbrecht
2 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
5 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
10 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
25 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)
50 ml Pipetten	Corning/Costar, NY (USA)

3.1.10 Zytokine

Zytokin	Hersteller
IL-2 (Proleukin)	Chiron B.V., Amsterdam (Niederlande)
IL-4	Promocell, Heidelberg
IL-15	Promocell, Heidelberg
TGF-β	PeproTech, Rocky Hill (USA)

TNF	CellGenix, Freiburg
PGE-2	Pharmacia & Upjohn, Erlangen
IL-1 β	Promocell, Heidelberg
IL-6	Promocell, Heidelberg
GM-CSF (Leukomax)	Novartis, Nürnberg

3.1.11 Internetdienste und Software

The National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Webcutter II: <http://www.firstmarket.com/firstmarket/cutter/cut2.html>

NEBcutter V2.0: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

3.2 Methoden

3.2.1 Ermittlung der Zellzahl durch Trypanblau-Ausschlussfärbung

Zur Ermittlung der Zellzahl wurden Zellen in einer Lösung von 0,4% Trypanblau (Gibco) in 0,9% NaCl (Merck) in Aqua bidest. verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mit Hilfe eines Mikroskops (Axiolab, Zeiss) ausgezählt. Diese Methode erlaubt die Unterscheidung von lebenden und toten Zellen, da nur abgestorbene Zellen eine Blaufärbung aufgrund fehlender Membranintegrität aufweisen. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Anzahl der lebenden Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10000 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Die Zellen wurden gezählt, in PBS gewaschen und in 1,6 ml gekühltem Einfriermedium aufgenommen. Anschließend wurde die Zellsuspension in gekühlte Einfrier-Röhrchen abgefüllt, wobei eine Zellzahl von 100×10^6 Zellen/Einfrier-Röhrchen nicht überschritten werden soll. Die befüllten Einfrier-Röhrchen werden in eine 4 °C kühle Cryobox (Nalgene

Nunc, International Hereford, U.K.) gestellt und für einige Tage bei -80 °C gelagert. Die mit Isopropanol gefüllten Einfrierboxen gewährleisteten ein definiertes Abkühlen der Zellen um -1 °C/ml pro min. Danach werden die Zellen in flüssigem N₂ gelagert.

3.2.3 Auftauen von Zellen

Die tiefgekühlten Zellen werden im 37 °C Wasserbad auf 0 ° C erwärmt. Danach wird den Zellen sukzessiv im Minutenabstand eine definierte Menge serumhaltiges Medium (je nach Zellart T-Zell-Medium oder FCS-haltiges Medium, Raumtemperatur) zugeführt. Dieses Protokoll gewährleistet ein zügiges und schonendes Auftauen der Zellen. Im Anschluss daran werden die Zellen sofort abgefügt und in frischem Medium aufgenommen.

Zeitpunkt	0 min	1 min	2 min	3 min	4 min	5 min	6 min	7 min	8 min	9 min
zugegebene Menge Medium (ml) / ml Einfriermedium	0,1	0,12	0,15	0,19	0,26	0,36	0,52	0,86	1,69	4,75

3.2.4 Kultivierung von Zelllinien

Tumorzelllinien und die T2 Zelllinie wurden in FCS-haltigem Medium kultiviert. Die Melanomzelllinien Me1300 (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. M. Nishimura, Departments of Surgery and Microbiology&Immunology, Medical University of South Carolina, USA) und Na8 (freundlicher Weise zur Verfügung gestellt von Dr. G. Spagnoli, Kantonsspital Basel, Schweiz) wurden aus Melanometastasen etabliert. Alle 3 - 4 Tage wurden die adhärennten Zellen mit Trypsin-EDTA (Gibco/Invitrogen, Karlsruhe) vom Flaschenboden gelöst, mit PBS gewaschen und gesplittet.

3.2.5 Beladung der T2 Zellen

T2 Zellen sind eine humane HLA-A*0201 lymphoide Hybridomzelllinie, die aus einer T- und einer EBV-transformierten B-Zelllinie entstanden ist. T2 Zellen weisen eine Defizienz des TAP-Transporter-Proteins auf, weshalb die HLA-A2 Moleküle auf der Zelloberfläche leere MHC-Taschen tragen. Diese unbesetzten Bindungsstellen lassen sich deshalb effektiv

mit exogenen HLA-A2-bindenden Peptiden beladen (196). T2 Zellen wurden zur Entfernung instabiler MHC Komplexe für 6 h bei Raumtemperatur in X-Vivo15 Medium inkubiert. Dann wurden die Zellen in Standardmedium bei einer Zelldichte von $1,5 - 3 \times 10^6/\text{ml}$ mit $10 \mu\text{g/ml}$ Peptid und $10 \mu\text{g/ml}$ $\beta 2$ -Mikroglobulin bei 37°C über Nacht beladen.

3.2.6 Dichtegradientenzentrifugation

Die verwendeten Zellen wurden durch Leukapherese (Blutzellseparator CS 3000 plus, Baxter) von gesunden Spendern gewonnen. Dabei wurde das Blut in eine erythrozytenreiche Fraktion, die den Spendern zurückgegeben wurde, sowie eine erythrozytenarme Fraktion aufgetrennt. Letztere Fraktion wurde anschließend mit PBS 1 : 1 verdünnt und auf Lymphozytenseparationslösung aufgetragen. Nach 20 minütiger Zentrifugation ($1900 \text{ rpm} / 4^\circ\text{C}$) hatte sich das Leukapherisat in eine schwere Fraktion (Erythrozyten), eine Interphase (mononukleäre Zellen, MNC) und den Überstand (Thrombozyten) getrennt. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgesammelt und mit PBS gewaschen ($1800 \text{ rpm} / 10 \text{ min}$). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen gezählt und entweder eingefroren oder zur Gewinnung von Monozyten verwendet.

3.2.7 Gegenstromelutriation zur Isolierung von Monozyten

Ein Teil der aus der Dichtegradientenzentrifugation gewonnenen MNC wurden in einer J6-MC Zentrifuge (Beckman) einer Elutriation unterzogen. Dabei handelte es sich um eine Gegenstrom-Zentrifugation, bei der die verschiedenen MNC gemäß ihrer Größe und Dichte aufgetrennt werden konnten. Zunächst wurde das System mit einer H_2O_2 -Lösung sterilisiert, mit PBS gewaschen und die Pumpe mit Hanks'-Puffer geeicht. Für die Elutriation wurden die Zellen in Hanks'-Puffer mit 6% autologem Plasma in das System eingebracht. Die einzelnen Zellfraktionen wurden durch Erhöhung der Durchflussrate bei einer konstanten Umdrehungszahl der Zentrifuge aufgetrennt und gesammelt. Die letzte Fraktion (III), in der sich die Monozyten befinden, wurde anschließend mit 1500 rpm für 10 min bei 4°C zentrifugiert, in Standardmedium aufgenommen und gezählt.

3.2.8 Generierung von dendritischen Zellen (DC) aus Monozyten in vitro

Die durch die Elutriation gewonnenen Monozyten wurden in FCS-haltigen Medium (10^6 Zellen/ml) unter Zugabe der Zytokine IL-4, GM-CSF (beide 500U/ml) und TGF- β (5ng/ml) über 5-6 Tage zu unreifen dendritischen Zellen (DC) differenziert. Nach der Differenzierung wurden die unreifen DC durch Zugabe verschiedener proinflammatorischer Zytokine gereift. Dieses Zytokingemisch wurde von Jonuleit *et al.* (197) beschrieben und wird auch in klinischen Studien zur Reifung von DC verwendet. Dazu wurden zu den unreifen DC die Zytokine IL-4, GM-CSF (beide 250U/ml), IL-6 (1000U/ml), IL-1 β und TNF (jeweils 10ng/ml) sowie Prostaglandin-E₂ (1 μ g/ml) für weitere 2 Tage zugegeben. Die reifen DC wurden entweder direkt in den Versuchen verwendet oder eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.9 Exogene Beladung von DC

Reife DC wurden in 10 ml Standardmedium gewaschen und auf eine Zelldichte von $1 - 3,5 \times 10^6$ Zellen/ml Standardmedium eingestellt. 30 μ g/ml des jeweiligen Peptids und 10 μ g/ml β 2-Microglobulin, welches die zu beladenden MHC-Komplexe stabilisiert, wurde zugegeben. Diese Zellsuspension wurde für 2 - 3 h bei 37 °C unter gelegentlichem Schütteln, um die Adhäsion der DC an das Plastik zu vermeiden, inkubiert. Um freies Peptid zu entfernen, wurden die beladenen DC nach der Inkubationsphase 2x mit 20 ml T-Zell-Medium gewaschen.

3.2.10 Magnetische Separation

Diese Zell-Anreicherungs-methode beruht auf der Bindung von Antikörper-beschichteten Eisenpartikeln („Beads“) an die Zelle. Das Prinzip beruht auf zwei Schritten: Im ersten Schritt werden die Eisenpartikel an die Zellen gebunden. Im zweiten Schritt wird die Zellsuspension an einem Magneten vorbeigeführt und separiert. Dabei gibt es positive Anreicherungs-methoden, in welchen die Beads an die gewünschte Subpopulation gebunden werden, und negative Anreicherungs-methoden, in denen die zu depletierenden Zellpopulationen mit Beads markiert werden. Es kamen dabei die Zellseparationssysteme von zwei verschiedenen Herstellern zum Einsatz:

3.2.10.1 Zellseparation nach der Miltenyi-Methode

Hierfür wurden die Zellen in einem Zwei-Schritt-Färbeverfahren gefärbt. Im ersten Färbeschritt wurde der mit MACS-Puffer verdünnte Hapten-Antikörper (mAK Maus anti-X) eingesetzt, im zweiten Färbeschritt der ebenfalls mit MACS-Puffer verdünnte anti-Hapten-Antikörper (mAK Beads anti-Maus-Isotyp). Da die verwendeten Beads lediglich einen Durchmesser von 50 nm („Microbeads“) aufweisen, muss die Zellsuspension über eine Säule laufen, welche dicht mit Eisenpartikeln gepackt ist. Für die Aufreinigung der Zellen wurden LS-, MS- und LD-Säulen (Fa. Miltenyi, Bergisch-Gladbach) verwendet, die in einen Permanentmagneten eingespannt werden. Vor dem Säulenlauf wurde die Säule mit MACS-Puffer gewaschen. Die Isolation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen ist eine Negativselektion, d.h. es adhären alle Zellen an der Säule, die nicht den gewünschten Phänotyp besitzen. Bei der Isolation von DN T Zellen wurden zunächst CD4⁺, CD8⁺ und CD56⁺ Zellen depletiert und in einem zweiten Schritt über einen anti-TCRαβ Antikörper positiv angereichert. Verunreinigende CD4⁺ und/oder CD8⁺ Zellen in einer DN Kultur wurden durch Zugabe von anti-CD4 und anti-CD8 Microbeads depletiert. Die verwendeten Mengen Antikörper, MACS-Puffer, sowie die Inkubationszeiten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Im Anschluss an die Aufreinigung wurden die Zellen mit einer FACS-Färbung auf ihre Reinheit untersucht.

		Selektion von CD4⁺	Selektion von CD8⁺	Isolation von DN T Zellen	Depletion von CD4⁺ und CD8⁺
Depletion von Zellpopulationen		CD8 ⁺ , CD11b ⁺ , CD16 ⁺ , CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD56 ⁺	CD4 ⁺ , CD11b ⁺ , CD16 ⁺ , CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD56 ⁺	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ , CD11b ⁺ , CD16 ⁺ , CD19 ⁺ , CD20 ⁺ , CD56 ⁺ ,	CD4 ⁺ , CD8 ⁺
1. Färbeschritt	MACS- Puffer	80 µl/10 ⁷	80 µl/10 ⁷	400 µl/10 ⁸	80 µl/10 ⁷
	1. AK	20 µl/10 ⁷	20 µl/10 ⁷	100 µl/10 ⁸	20 µl/10 ⁷
Inkubation (4 °C)		10 min	10 min	10 min	15 min
Waschen	MACS-	20 x Vol.	20 x Vol.	20 x Vol.	20 x Vol.

	Puffer				
2. Färbeschritt	MACS-Puffer	80 µl/10 ⁷	80 µl/10 ⁷	300 µl/10 ⁸	-
	2. AK	20 µl/10 ⁷	20 µl/10 ⁷	200 µl/10 ⁸ + 100µl/10 ⁸	-
Inkubation (4 °C)		15 min	15 min	15 min	-
Waschen	MACS-Puffer	20 x Vol.	20 x Vol.	20 x Vol.	-
Säule (Waschen)	MACS-Puffer	3 ml	3 ml	2 ml	2 ml
Eluieren	MACS-Puffer	3 x 3ml	3 x 3ml	2 x 1ml	2 x 1ml
Waschen	MACS-Puffer	-	-	20 x Vol.	-
3. Färbeschritt	MACS-Puffer	-	-	450 µl	-
	3. AK	-	-	50 µl	-
Inkubation (4 °C)		-	-	15 min	-
Waschen	MACS-Puffer	-	-	20 x Vol.	-
Säule (Waschen)	MACS-Puffer	-	-	500 µl	-
Eluieren	MACS-Puffer	-	-	3 x 500 µl	-
Isolation		Negativ	Negativ	Positiv	Negativ

3.2.10.2 Voranreicherung nach der Dynal-Methode

Bei dieser magnetischen Aufreinigungsmethode wurden Beads mit einer Größe von 4,5 µm verwendet. Da diese Beads einen größeren Durchmesser als die Beads der Firma Miltenyi haben, reichte für den Separationsschritt ein Handmagnet. Diese Zellseparationsmethode wurde als Voraufreinigung für die Fluoreszenzsortierung von DN T-Zellen eingesetzt. Dabei konnten DN T-Zellen bis zu einer Reinheit von 20% voraufgereinigt werden.

Direktkonjugierte Beads gegen CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ und CD14⁺ wurden von der Fa. Invitrogen/Dynal bezogen. Nach zweimaligem Waschen mit Dynal-Puffer im Magneten wurden die Beads in den angegebenen Mengen zur Markierung verwendet.

Spezifität der Beads	Menge an Beads / 50x10 ⁶ Zellen
CD4	410 µl
CD8	330 µl
CD19	150 µl
CD14	50 µl

3.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Detektion von Zell-gebundenen Farbstoffen und liefert phänotypische Aussagen über die gefärbten Zellen. Dabei werden die Zellen in einer Trägerflüssigkeit an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Im verwendeten Gerät (FACSCalibur, BD, Heidelberg) standen zwei Laser (Argon- und UV-Laser) für die Anregung der Farbstoffe zur Verfügung. Die Emission der Farbstoffe wurde in vier Kanälen gemessen. Außerdem wird die Lichtstreuung jeder Zelle detektiert: das sog. "Vorwärts-Streulicht" liefert Information über die Größe der Zellen, das sog. "Seitwärts-Streulicht" vermittelt Information über die Granularität der Zelle. Zusammengenommen werden damit für jede Zelle sechs Parameter ermittelt. Als Farbstoffkonjugate werden FITC (Fluorothioisocyanat), PE (Phycoerythrine), PerCP und APC (Allophycocyanine) verwendet. Außerdem können im FACS Membranfarbstoffe detektiert werden.

3.2.12 Fluoreszente Zellsortierung

Die fluoreszente Zellsortierung ist eine Spezialanwendung der Durchflusszytometrie und wird mit Hilfe des FACSaria (BD, Heidelberg) am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg durchgeführt. Hierbei wird das Gerät samt Schläuchen vor jedem Sortiervorgang für 15 min mit 70% Ethanol sterilisiert und mit PBS gespült. Anschließend wurde der Zellsortierer mit Accudrop-Beads (BD, Heidelberg) kalibriert. Dabei wird die Einstellung der Spiegel im Gerät, das Auftreffen des Laserpunktes und die Form des Laserpunktes adjustiert. Die gemessenen, phänotypisch charakterisierten Zellen wurden dabei

in ein Ausgabegefäß (bzw. für die Klonierung von DN T Zellen oder CD8⁺ T Zellen in 96-well Platten) gesortet. Die Frequenz gemessener Zellen lag bei durchschnittlich 6000 Zellen/s.

3.2.13 Antikörperfärbung

3.2.13.1 Direkte Antikörperfärbung

Die zu untersuchenden Zellen wurden in FACS-Röhrchen (Falcon/BD, Franklin Lakes, USA) geerntet und in FACS-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die vom Hersteller angegebene Menge an Antikörper auf das Zellpellet pipettiert und 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation mit FACS-Waschpuffer wurden die Zellen in 200-500 µl PBS oder Fixierungslösung aufgenommen. Die Analyse erfolgte mit einem FACSCalibur (BD, Heidelberg) Durchflusszytometer. Die Daten wurden mit der Software CellQuest Pro (BD, Heidelberg) oder FlowJo (Tree Star, Ashland, USA) ausgewertet.

3.2.13.2 Intrazellulärfärbung

Für die durchflusszytometrische Untersuchung von intrazellulären Molekülen wurden die Zellen geerntet und mit FACS-Waschpuffer gewaschen. Nach einer direkten Antikörperfärbung der Oberflächenmoleküle wurden die Zellen mit 250 µl Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung (BD, Heidelberg) für 20 min bei 4 °C fixiert. Die permeabilisierten Zellen wurden 2x mit BD Perm/Wash (BD, Heidelberg) gewaschen und anschließend mit dem Antikörper für die Intrazellulärfärbung für 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit BD Perm/Wash wurden die Zellen in PBS aufgenommen und im FACSCalibur analysiert.

3.2.14 pMHC-Tetramerfärbung

Zum Nachweis spezifischer T-Zellen wurden die Zellen einmal mit FACS-Waschpuffer gewaschen und danach mit der angegebenen Menge des jeweiligen pMHC-Tetramers inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Oberflächenfärbung gegen weitere Antigene mit direkt-konjugierten Antikörpern durchgeführt, ohne das pMHC-Tetramer vorher abzuwaschen. Nach der Inkubationszeit der Antikörperfärbung wurden die Zellen mit FACS-Waschpuffer gewaschen und im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.15 Generierung von Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinien

CD8⁺ T Lymphozyten wurden aus MNC durch magnetische Negativselektion nach dem Miltenyi-System angereichert. Die angereicherte Population bestand aus >90% CD8⁺ T Zellen. Als Stimulatorzellen dienten autologe, monozytengereifte, peptidbeladene DC. Für die Expansionskultur wurden jeweils 10⁵ CD8⁺ Zellen/well mit 2,5 x 10⁴ peptidbeladenen, autologen DC/well in 96-well Rundbodenplatten kultiviert. Als Medium wurde 225 µl T-Zell-Stimulationsmedium/well verwendet und alle 3 - 4 Tage gewechselt. Die CD8⁺ T-Zellen wurden wöchentlich mit peptidbeladenen, autologen DC mit den gleichen Stimulationsbedingungen restimuliert und mit Hilfe des Durchflusszytometers auf Reinheit und Antigenpezifität untersucht.

3.2.16 Generierung von allogen-spezifischen CD4⁺, CD8⁺ und DN T-Zelllinien

Die allogene Aktivierung wurde in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR, *mixed lymphocyte reaction*) durchgeführt. Dabei nutzt man die MHC-Unterschiede zwischen T-Lymphozyten- und DC-Spender (186). CD4⁺, CD8⁺ und DN T-Zellen wurden aus MNC durch magnetische Separation nach dem Miltenyi-System isoliert. Anschließend wurden die verschiedenen Zellpopulationen mit reifen DC eines anderen Spenders stimuliert. Dabei wurden 10⁵ CD4⁺, CD8⁺ oder DN T Zellen/well mit 2,5 x 10⁴ reifen DC/well in 225 µl T-Zell-Stimulationsmedium/well in 96-well Rundbodenplatten kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in neuem Medium ausgesät und einmal wöchentlich mit reifen DC restimuliert. Gleichzeitig wurde die Reinheit der Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

3.2.17 Klonierung von CD8⁺ und DN T-Zellen

Zur Klonierung von CD8⁺ und DN T-Zellen wurden folgende Feeder-Zellen verwendet: 4 x 10⁶ allogene MNC (mit 30 Gy bestrahlt) und 1 x 10⁶ Laz388 Zellen (mit 100 Gy bestrahlt) pro 96-well Platte. Laz388 ist eine immortalisierte EBV-transformierte B-Zell-Linie. Die Zellen wurden in 150 µl T-Zell-Stimulationsmedium + 0,225 µl PHA-L (1mg/ml, Sigma) ausplattiert. Um einen engen Zell-Zell-Kontakt zu gewährleisten, wurden Spitzbodenplatten verwendet. Die Zellen wurden steril mit direkten Antikörpern gefärbt und anschließend am Fluoreszenzsorter mit einer bis drei Zellen/well eingesät. Alle vier Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Wenn ab Tag 10 die Klone auswuchsen, wurden die positiven

wells abgeerntet und auf eine Reihe 96-well Rundbodenplatten aufgeteilt. Ab dem Tag des Aberntens wurden die Klone in 96-well Rundbodenplatten gehalten und alle zwei Wochen mit 6×10^5 allogenen MNC/well und $1,5 \times 10^5$ Laz388/well (beide bestrahlt) in T-Zell-Stimulationsmedium + PHA-L restimuliert. Alle 3-4 Tage wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Außerdem wurden die Klone auf Antigenspezifität und Reinheit mit Hilfe des Durchflusszytometers untersucht.

3.2.18 Polyklonale Stimulation von CD4⁺, CD8⁺ und DN T-Zellen

Zur Generierung von polyklonalen CD4⁺, CD8⁺ und DN T-Zellpopulationen wurden die Zellen mit Dynabeads (Invitrogen), an denen Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle CD3 und CD28 gebunden sind, in T-Zell-Stimulationsmedium inkubiert. Dazu wurden die verschiedenen Zellen durch magnetische Separation aus MNC isoliert. Die Dynabeads wurden zunächst in PBS mit 0,1% BSA gewaschen und anschließend im Verhältnis ein Bead pro Zelle in T-Zell-Stimulationsmedium zugegeben. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen in frisches Medium überführt und einmal wöchentlich mit neuen Beads restimuliert. Dazu wurden die Zellen geerntet und mit PBS verdünnt. Anschließend wurden die Beads mit einem Handmagneten entfernt. Die Zellen wurden ausgezählt und mit neuen Beads in T-Zell-Stimulationsmedium ausgesät.

3.2.19 Cytokine-Bead-Array

Die Quantifizierung der Zytokine im Überstand erfolgte mit Hilfe des Cytokine Bead Arrays (CBA) der Firma BD (Heidelberg). Die Beads wurden mit Anti-Zytokin-Antikörpern beschichtet und anschließend mit dem Überstand der verschiedenen Zellen inkubiert. Die Messung der unterschiedlichen Zytokine erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Aufgrund der Eigenfluoreszenz der Beads erkennt man, für welches Zytokin das Bead spezifisch ist. Die Menge eines gebundenen Zytokins drückt sich in der Fluoreszenzintensität aus, mit welcher die Beads im Zytometer leuchten.

3.2.20 Cytokine-Antibody-Array

Für eine semi-quantitative Analyse von sezernierten Zytokinen wurde der Cytokine Antibody Array V der Firma RayBiotech (Hoelzel, Köln) verwendet. Dabei wurde 1 ml des

Zellüberstands auf eine mit verschiedenen Antikörpern beschichteten Membran gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wurde die Membran gewaschen und anschließend ein biotinylierter Antikörper-Cocktail zugegeben. Die Membran wurde nochmals gewaschen und mit HRP-konjugierten Streptavidin gefärbt. Die Signale wurden auf einem Kodak x-omat AR Film detektiert.

3.2.21 ⁵¹Cr-Zytotoxizitätstest

Die Effektorzellen wurden in den angegebenen Effektor : Zielzell Verhältnissen in T-Zell-Medium ausplattiert. Die Zielzellen wurden für 1 h mit 200 µCi ⁵¹Cr markiert, zweimal gewaschen und zu den Effektoren gegeben. Für die Ermittlung der Spontanfreisetzung wurden die Zielzellen in T-Zell-Medium ohne Effektorzellen ausplattiert. Die Maximalfreisetzung wurde ermittelt, indem die Zielzellen in 100 µl/well Triton X-100 (Sigma, München) kultiviert wurden. Nach 4 Stunden Inkubation wurden 60 µl Überstand abgenommen und auf LUMA-Platten (PerkinElmer, Rodgau) pipettiert. Die cpm (*counts per minute*) wurden in einem Beta-Counter (1450 MicroBeta liquid scintillation counter, Wallac Oy/PerkinElmer) bestimmt. Die Zytotoxizität wurde in Dreifach-Ansätzen nach folgender Formel ermittelt:

$$\frac{\text{cpm}_{\text{probe}} - \text{cpm}_{\text{spontanfreisetzung}}}{\text{cpm}_{\text{maximalfreisetzung}} - \text{cpm}_{\text{spontanfreisetzung}}} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

3.2.22 CFSE-Färbung

Zur Untersuchung der Proliferation von Zellen wurde der fluoreszente Farbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) verwendet. Dieses Molekül, das im Durchflusszytometer detektiert wird, diffundiert durch die Zellmembran und bindet an zytoplasmatische Proteine. Wenn sich die Zelle teilt, wird der Farbstoff gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt. Somit können sowohl die proliferierenden Zellen als auch die Anzahl der Zellteilungen untersucht werden. Dazu wurden aus MNC CD4⁺, CD8⁺ oder DN T-Zellen separiert und gezählt. 5 x 10⁶ Zellen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in PBS gewaschen. Anschließend wurde 200 µl PBS und 500 µl Färbelösung (5 nM CFSE in PBS) auf das Zellpellet pipettiert und 4 min bei Raumtemperatur im Dunklen

inkubiert. Die gefärbten Zellen wurden einmal in PBS und einmal in T-Zellmedium gewaschen und ausgezählt.

3.2.23 CFSE-Proliferationstest

Die DN T-Zell-vermittelte Suppression von alloogenen Immunantworten wurde durch den CFSE-Proliferationstest untersucht. Dazu wurden aus MNC $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen isoliert und CFSE gefärbt. In einer modifizierten MLR wurden als Stimulatorzellen allogene reife DC verwendet. Als Suppressorzellen dienten DN T Zellen, die über mehrere Wochen (3-6) mit alloogenen DC expandiert wurden. In den Versuchen wurden 50.000 $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen/well zusammen mit 50.000 DN T-Zellen/well und 25.000 DC/well in 225µl T-Zellmedium eingesetzt. Nach einer Inkubation von 3 bis 6 Tagen wurden die Zellen abgeerntet und mit verschiedenen Antikörpern gefärbt. Da der Farbstoff CFSE gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt wird, konnten die proliferierenden Zellen als auch die supprimierten Zellen untersucht werden. Als Kontrollen dienten Ansätze, bei denen den Responderzellen keine Stimulatorzellen oder Suppressorzellen zugegeben wurden.

3.2.24 Proliferationstest mittels Inkorporation von 3H -Methyl-Thymidin

Neben dem CFSE-Proliferationstest wurde auch der 3H -Thymidin-Proliferationstest verwendet. Dazu wurden den Kulturen 3H -Methyl-Thymidin im Überschuss zugegeben, so dass die zelluläre Eigenproduktion vermindert und das markierte Molekül in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wurde. In einer MLR wurden 50.000 $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen/well als Responder zusammen mit 25.000 DC/well und 50.000 DN T-Zellen/well in T-Zellmedium verwendet. Nach 5 Tage Koinkubation wurde 3H -Methyl-Thymidin (1 µCi/well) steril zugegeben. Im Anschluss an eine 18-20 stündige Inkubation wurden die Zellen mit einem Zellernter (Vacusafe IH-280, Innotech) auf Filterplatten (Unifilter, Packard, Niederlande) gesaugt. Nach dem Trocknen wurde die Filterplatte am Boden mit Klebefolie abgedichtet und mit 50 µl/well Szintillationsflüssigkeit (Microscint-20, PerkinElmer, Rodgau) betropft. Die cpm wurde in einem Beta-Counter (1450 MicroBeta liquid scintillation counter, Wallac Oy/PerkinElmer) bestimmt.

3.2.25 Transwell-Assay

Zur Untersuchung der Zellkontaktabhängigkeit der DN T-Zell-vermittelten Suppression wurden Transwell-Experimente durchgeführt. Dazu wurden $CD4^+$ Zellen aus MNC isoliert, CFSE gefärbt und 250.000 pro well mit 125.000 allopathen DC/well in einer 24well Platte in T-Zellmedium stimuliert. 250.000 DN T Zellen/well dienten als Suppressoren und wurden entweder direkt in das well oder in das Insert eingesetzt. Der Boden des Inserts besteht aus einer Polycarbonat-Membran mit einer Porengrösse von 0,4 μm und verhindert dadurch einen Zellkontakt zwischen Respondern und Suppressoren. Gleichzeitig können Zytokine und andere Moleküle durch die Membran diffundieren.

3.2.26 PKH26 Apoptosetest

Die Beladung der Zielzellen erfolgte in 14 ml Polystyrene-Röhrchen. Es wurden jeweils eine konstante Zellzahl für die Färbung eingesetzt (siehe folgende Tabelle). Die Zellen wurden zunächst in Standardmedium gewaschen und in Diluent C aufgenommen. Die Färbelösung wurde jeweils frisch vor der Beladung hergestellt: der PKH-26 Farbstoff wurde in der angegebenen Menge Diluent C verdünnt und auf dem Vortex-Mischer vermischt. Die Menge des eingesetzten PKH-26 Farbstoffs sowie die verwendete Zellzahl wurden an die Grösse der verwendeten Zellen angepasst. Im Beladungsschritt wurde die Färbelösung tropfenweise unter Schütteln der Zellsuspension zugegeben. Anschließend wurden die Zellen 20 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

	Tumorzellen	CTL	DC
Zellzahl	$2,0 \times 10^6$	$2,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
Diluent C für Zellsuspension	200 μl	200 μl	200 μl
Diluent C für Färbelösung	200 μl	200 μl	200 μl
PKH-26 Farbstoff	0,9 μl	0,6 μl	0,75 μl
Inkubationsdauer	20 min	20 min	20 min

Die Beladung wurde mit 2 ml humanem AB-Serum drei Minuten lang abgestoppt. Danach wurde die Zellen mit serumhaltigem Medium (je nach Zellart T-Zell-Medium oder FCS-haltiges Medium) gewaschen. Es folgten zwei Waschschrirte in 40 ml serumhaltigem Medium. Danach wurde die Zellzahl der PKH-26⁺ Zielzellen ermittelt. Parallel zur Beladung

der Zielzellen wurden die Effektorzellen in den gewünschten Effektor- : Zielzell-Verhältnissen in einem Volumen von 100 µl/well in Spitzbodenplatten ausplattiert. Die Zielzellen (konstant 5000 Zielzellen/well) wurden in einem Volumen von 100 µl T-Zell-Medium dazupipettiert. Der Assay wurde für 4 h bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen (je 1 Ansatz/Röhrchen) aus den wells abgeerntet und in PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann in 150 µl Annexin-Puffer aufgenommen und mit 5 µl AnnexinV-FITC (Pharmingen) für 10 min bei Dunkelheit gefärbt.

Da AnnexinV-FITC erfahrungsgemäß die Hintergrundfärbung erhöht, d.h. die Negativpopulation leicht in den positiven Bereich verlagert, war es notwendig, die Kompensation des Durchflusszytometers unter Präsenz von AnnexinV auszuführen. Für die Kompensation wurden folgende Röhrchen präpariert: a. Annexin⁺PKH-26⁻ Zielzellen; b. Annexin⁺PKH-26⁺ Zielzellen.

3.2.27 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Gewinnung der Gesamt-RNA wurden die Zellen abzentrifugiert und einmal mit PBS gewaschen. Zur Isolierung der RNA wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurde die RNA im NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab, Erlangen) photometrisch quantifiziert.

3.2.28 Reverse Transkription

Für die Einzelstrang-cDNA-Synthese wurden 250 bis 500 ng der isolierten Gesamt-RNA mit 1 µl Random Decamers (Ambion, Austin, USA) und 1 µl 10mM dNTPs (Gibco) gemischt, die Lösung mit Wasser auf 12 µl Gesamtvolumen verdünnt, für 5 min auf 65 °C erhitzt und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe einer Lösung, bestehend aus 2 µl 0,1 M DTT, 4 µl 5x First Strand Buffer (Invitrogen, Karlsruhe) und 1 µl RNase Inhibitor Plus (Peqlab, Erlangen) wurde der Ansatz für 2 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl SuperScript II RNase H-Reverse Transkriptase (Invitrogen) dazugegeben, gemischt und für 50 min bei 42 °C und dann für 15 min bei 70 °C inkubiert. Die cDNA wurde direkt zur Amplifizierung eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung auf -20 °C gelagert.

3.2.29 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die quantitative Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen und einem LightCycler (Roche, Mannheim) durchgeführt. Alle Proben wurden in einem Reaktionsvolumen von 20 µl mit 2 µl cDNA, 10 µl QuantiTect SYBR Green PCR MasterMix, 6 µl Wasser und je 1 µl sense und antisense Primern (10pmol) vermessen. Das Protokoll bestand, nach der 15 min Aktivierung bei 95 °C, aus 40 Zyklen mit 15 s Denaturierungsphase bei 95 °C, 20 s Annealingphase bei 57 °C und 20 s Elongationsphase bei 72 °C. Die Fluoreszenzmessung erfolgte nach jedem Zyklus am Ende der Elongationsphase. Nach dem Ende des Amplifikationsprogramms wurde das Schmelzverhalten der amplifizierten DNA analysiert. Dazu wurde die DNA langsam (0,1 °C/sec) von 60 °C auf 90 °C erhitzt und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen.

4. Ergebnisse

4.1 Isolation und Charakterisierung von humanen DN T-Zellen

Titel: *Isolation and characterization of human antigen-specific $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^-CD8^-$ double-negative regulatory T cells*

Autor: Fischer K., Voelkl S., Heymann J., Przybylski G., Mondal K., Laumer M., Kunz-Schughart L., Schmidt C., Andreesen R., Mackensen A.

Journal: Blood, Band 105, Seite 2828-2835, April 2005

In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass murine DN T-Zellen sowohl bei der Selbsttoleranz als auch bei Immunreaktionen gegen allogene oder xenogene Transplantate eine wichtige Rolle spielen (137;138;176;188). Die Funktion von humanen DN T-Zellen dagegen ist weitgehend unklar. In dieser Veröffentlichung konnte unsere Arbeitsgruppe erstmalig die Existenz humaner regulatorischer DN T-Zellen nachweisen. Im peripheren Blut von gesunden Individuen sind circa 1% aller T-Lymphozyten DN T-Zellen. Diese Zellen können mit Hilfe einer Kombination aus magnetischer Separation und durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert werden. DN T-Zellen zeigen ähnlich den $CD4^+$ T-Lymphozyten ein polyklonales Verteilungsmuster ihres $TCRV\beta$ Repertoires. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Population der DN T-Zellen sowohl aus naiven als auch aus Antigen-erfahrenen Zellen besteht. TREC- (*T-cell receptor excision circles*) Analysen zeigten, dass humane DN T-Zellen Thymus-gereifte T-Zellen mit einer längeren proliferativen Geschichte darstellen.

Humane DN T-Zellen weisen ein spezifisches Zytokinprofil auf. Nach einer Stimulation mit allogenen APCs produzieren humane DN T-Zellen ähnlich den murinen DN T-Zellen große Mengen an $IFN-\gamma$, wohingegen IL-2, IL-4 oder IL-10 kaum oder gar nicht sezerniert werden. Des Weiteren sind DN T-Zellen in der Lage, nach Stimulation mit allogenen mononukleären Zellen und exogenem IL-2 *in vitro* zu proliferieren.

Darüber hinaus wurde die immunregulatorische Funktion von humanen DN T-Zellen erstmalig untersucht. Mit Hilfe eines MHC-Klasse I differentiellen Systems konnte gezeigt

werden, dass humane DN T-Zellen ebenso wie murine DN T-Zellen pMHC-Komplexe von APCs akquirieren können. Dieser Transfer ist Zell-Zell-Kontakt abhängig und wird weder durch Mikropartikel noch durch Exosomen vermittelt. Weitere Untersuchungen zeigten, dass nach dem Transfer der pMHC-Komplexe humane DN T-Zellen in der Lage sind, die Proliferation von aktivierten CD8⁺ T-Zellen *in vitro* zu inhibieren (198).

4.2 Charakterisierung eines Antigen-spezifischen DN T-Zellklons

Murine DN T-Zellen sind sowohl an der Regulation des Immunsystems als auch an der Bekämpfung von Tumoren und Infektionen beteiligt (137-139;182). Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmalig zeigen, dass humane DN T-Zellen ebenfalls eine immunregulatorische Funktion aufweisen (198). Um weitere Funktionen humaner DN T-Zellen zu entschlüsseln, sollte ein DN T-Zellklon mit bekannter TCR-Spezifität charakterisiert werden. Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. M. Nishimura (Medical University of South Carolina, Charleston) wurde uns ein DN T-Zellklon (T4H2), dessen TCR das HLA-A2 restringierte Melanozyten-Differenzierungsantigen gp100 spezifisch erkennt, zur Verfügung gestellt. Dieser DN T-Zellklon konnte aus dem peripheren Blut eines Melanom-Patienten nach Vakzinierung mit dem gp100 Peptid isoliert werden.

4.2.1 Generierung von gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellklonen

Zur funktionellen Charakterisierung des gp100-spezifischen DN T-Zellklons (T4H2), wurden als Kontrolle CD8⁺ T-Zellklone von gesunden Spendern generiert, die das identische HLA-A2 restringierte gp100 Peptid erkennen.

Insgesamt konnten 82 T-Zellklone gewonnen werden, die das HLA-A2 gp100-Tetramer binden (**Abb. 2**, vier Klone sind exemplarisch dargestellt). Darüber hinaus wurde die zytotoxische Aktivität der Klone mit Hilfe des ⁵¹Cr-Freisetzungstests bestimmt. **Abb. 3** zeigt, dass 78 der 84 generierten Klone eine starke zytotoxische Aktivität aufweisen und mindestens 20% der gp100-beladenen T2 Zellen lysieren.

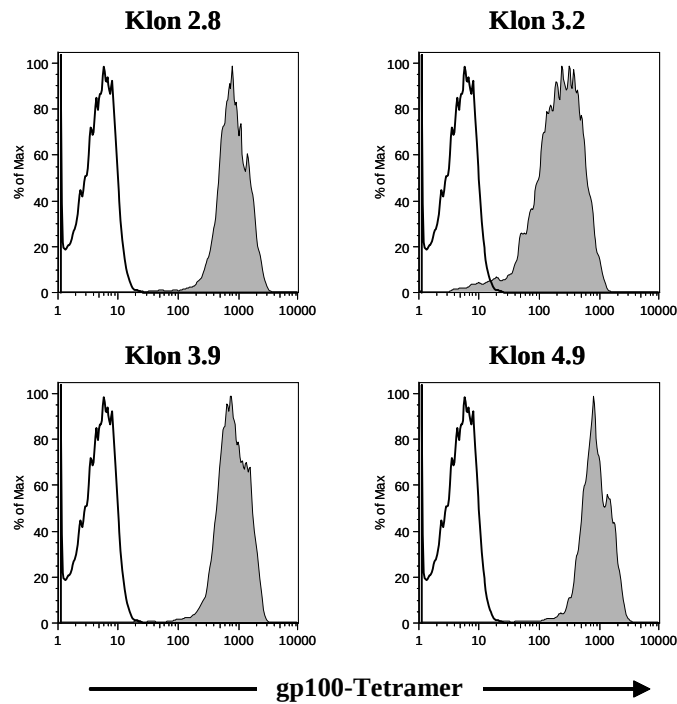


Abb. 2: TCR-Spezifität von $CD8^+$ T-Zellklonen. Die Klone wurden mit einem Antikörper gegen CD8 und mit dem gp100-Tetramer inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Exemplarisch sind vier gp100-spezifische $CD8^+$ T-Zellklone (2.8, 3.2, 3.9, 4.9) dargestellt. Als Kontrolle diente ein MelanA-Tetramer (offene Profile).

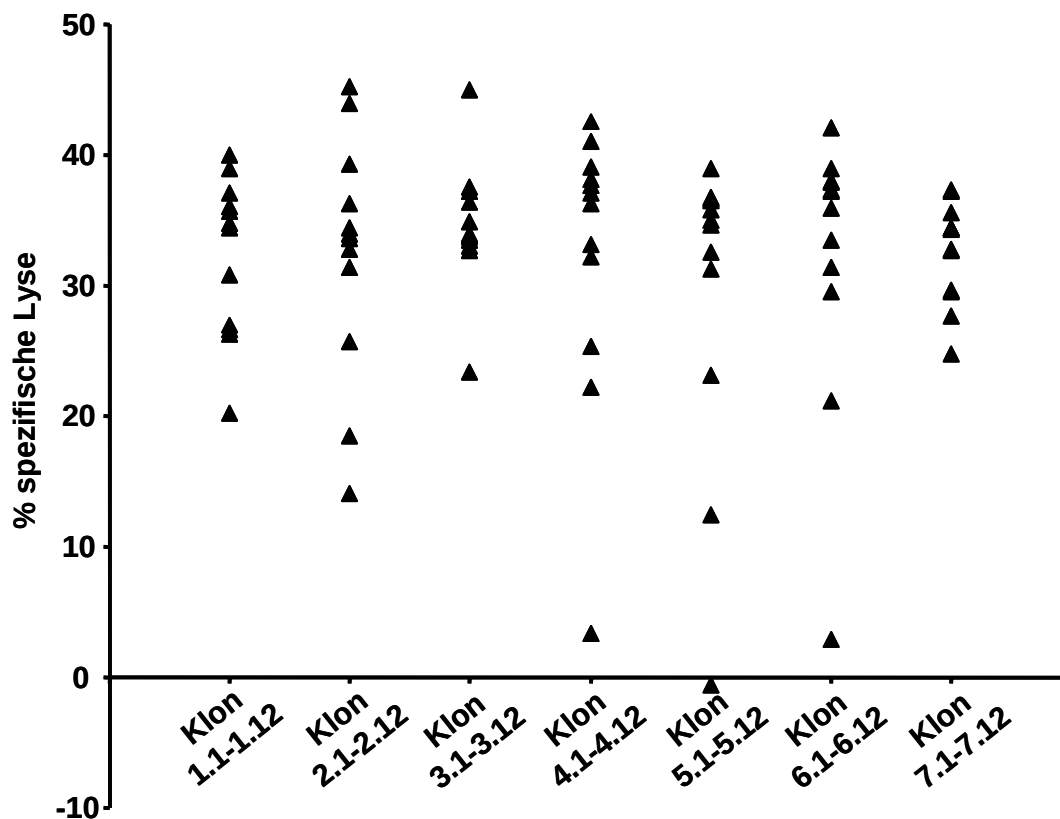
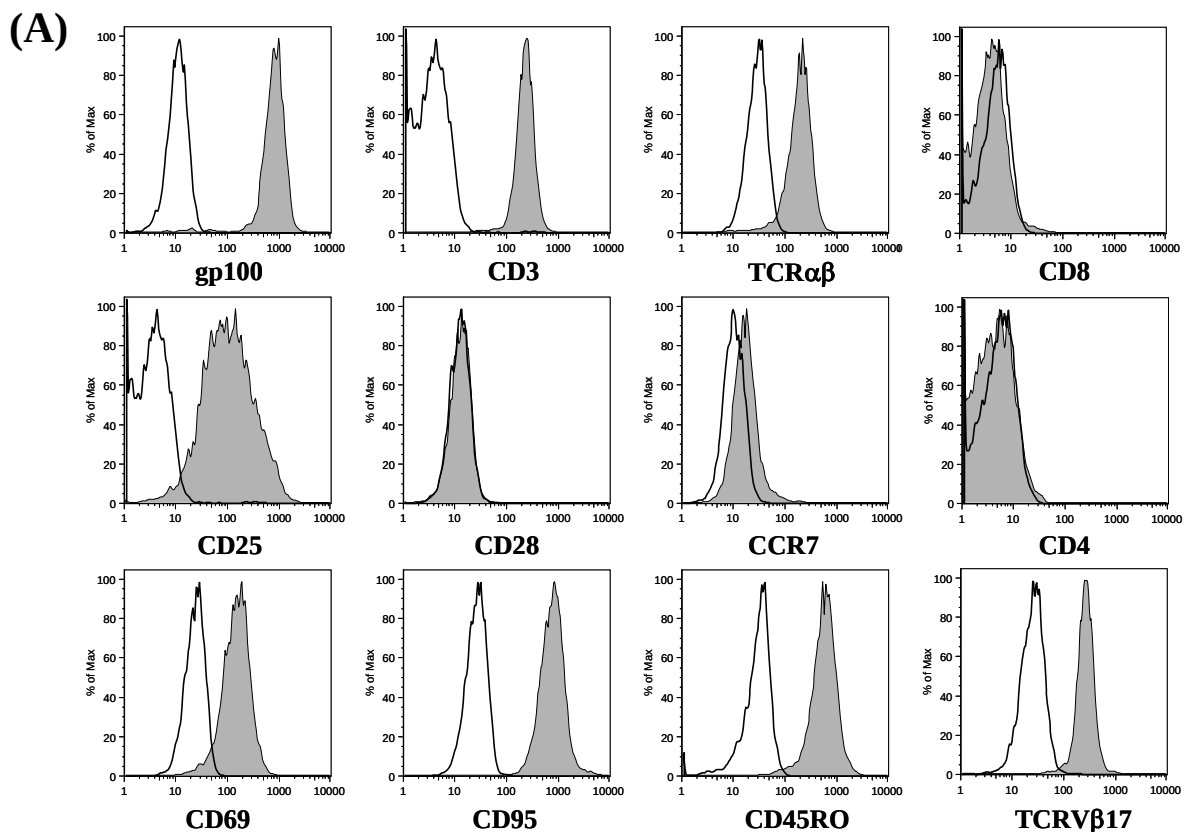


Abb. 3: Zytotoxizität der generierten $CD8^+$ T-Zellklone. T2 Zellen wurden für 2 Stunden mit dem gp100-Peptid exogen beladen und anschließend mit ^{51}Cr inkubiert. Die generierten $CD8^+$ Klone wurden in einem Ratio von 1 : 1 mit den T2 Zellen ausgesät. Nach vier Stunden wurde der Überstand vermessen. Jedes Symbol zeigt die % Zytotoxizität von jeweils einem der 84 generierten $CD8^+$ Klone.

4.2.2 Phänotypisierung des DN T-Zellklons T4H2

Eine Woche nach letzter Stimulation wurde der Phänotyp des DN T-Zellklons T4H2 durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurde der DN Klon mit fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen CD3, TCR $\alpha\beta$, CD4, CD8, CD25, CD28, CCR7, CD69, CD95, CD45RO und CD71, sowie mit dem HLA-A2 gp100-Tetramer inkubiert. Des Weiteren wurde mit Antikörpern bestimmt, zu welcher TCRV β -Familie der TCR des DN Klons gehört. Mehrere Publikationen zeigen, dass eine enge Verwandtschaft zwischen CD8⁺ T-Zellen und DN T-Zellen besteht (143;149). Deshalb wurden als Kontrolle vergleichend gp100-spezifische CD8⁺ T-Zellklone analysiert.

Wie in **Abb. 4 A** gezeigt, exprimiert der T4H2 Klon CD3 und TCR $\alpha\beta$, nicht aber die Korezeptoren CD4 oder CD8. Darüber hinaus weist der DN Klon einen aktivierten Phänotyp auf (CD25⁺, CD69⁺, CD95⁺, CD45RO⁺, CCR7). Dieser Phänotyp konnte auch noch nach mehrwöchiger Restimulation nachgewiesen werden. Der TCR des DN Klons gehört zur V β 17-Familie, wohingegen der CD8⁺ T-Zellklon einen TCR der V β 7-Familie aufweist. Dennoch binden beide TCR spezifisch das HLA-A2 gp100-Tetramer. Die gp100-spezifischen CD8⁺ Klone (der CD8⁺ Klon 3.9 ist exemplarisch dargestellt) zeigen mit Ausnahme der Expression von CD8 und CD28 ein ähnliches Expressionsprofil von Oberflächenproteinen (**Abb. 4 B**).



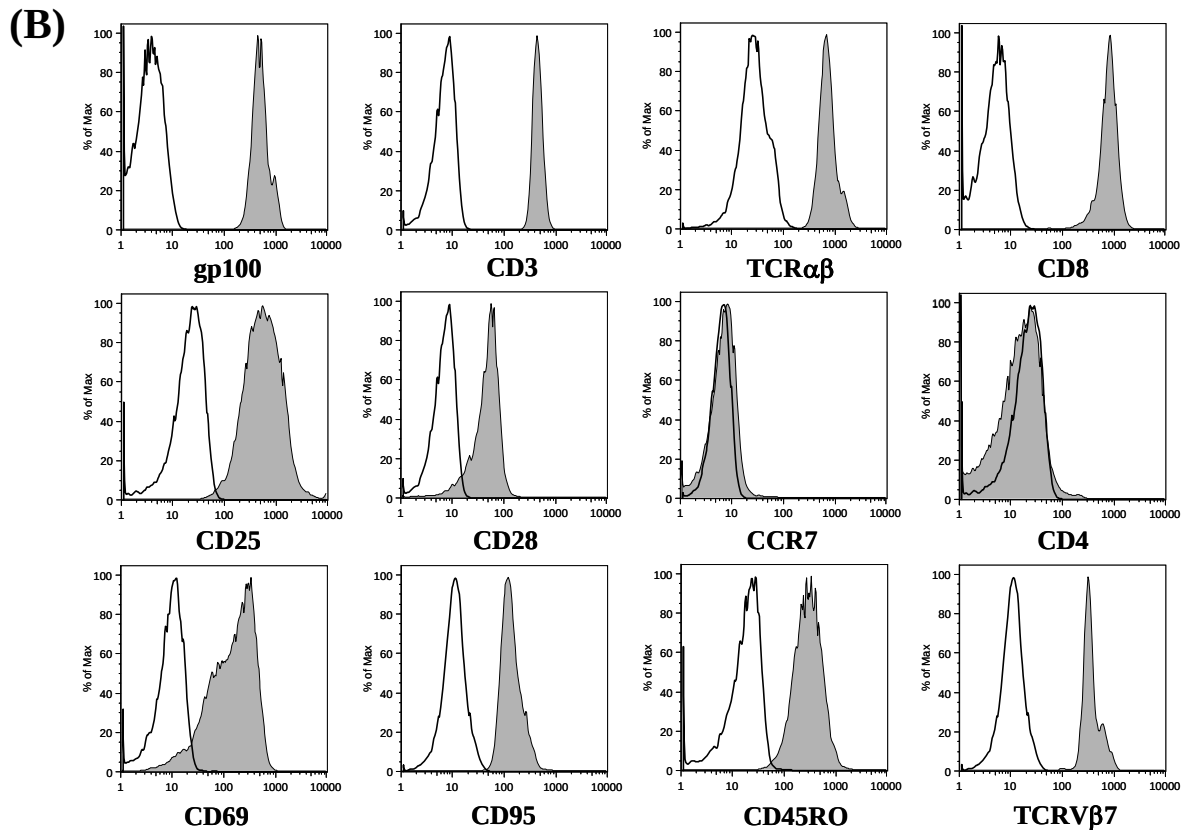


Abb. 4: Phänotyp des DN T-Zellklons T4H2 **(A)** und des CD8⁺ T-Zellklons 3.9 **(B)**. Eine Woche nach Restimulation wurden die Klone mit Antikörpern gegen CD3, TCRαβ, CD4, CD8, CD25, CD28, CCR7, CD69, CD95, CD45RO und dem gp100-Tetramer gefärbt. Zudem wurde die TCRVβ-Familie mittels eines Antikörper-Cocktails bestimmt. Die jeweiligen Isotypen der Antikörper und das MelanA-Tetramer dienten als Kontrolle (offene Profile). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

Murine DN T-Zellen gehören zu einer heterogenen Zellpopulation, die zu einem kleinen Anteil auch NKT Zellen beinhaltet (156;157). Um zu überprüfen, ob die DN T4H2 Zellen zur Population der NKT-Zellen gehören, wurde die Expression von verschiedenen Oberflächenproteinen, die spezifisch für NK Zellen sind, untersucht. Dazu wurde der Klon mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD56, CD158a, CD161, CD16, CD94, NKG2D gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in **Abb. 5** gezeigt, exprimiert der DN Klon nur das Adhäsionsmolekül CD56, nicht aber die aktivierenden oder inhibierenden Rezeptoren (*killer cell lectin-like receptors*) NKG2D, CD94 und CD161. Der Fcγ Rezeptor CD16 und der *killer cell ig-like receptor* (KIR) CD158a sind ebenfalls nicht auf der Oberfläche des DN Klons nachzuweisen.

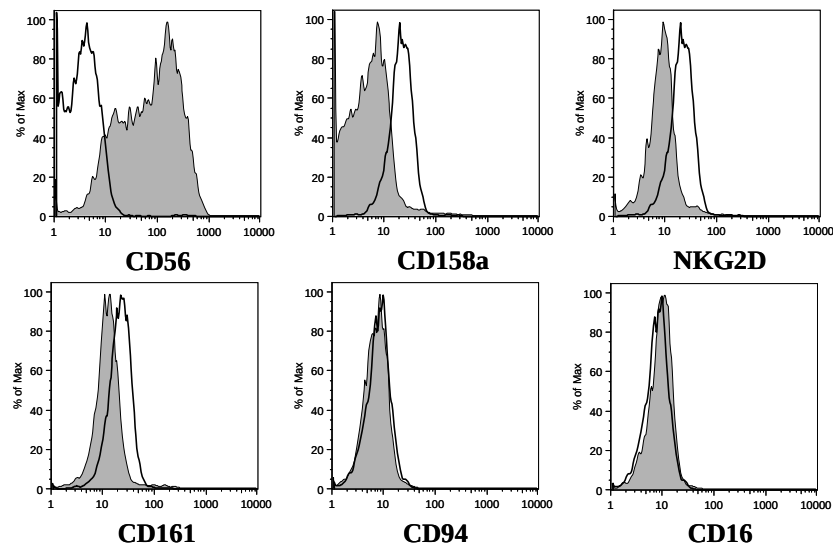


Abb. 5: Expression der NK Zell-spezifischen Oberflächenproteine. Der DN T-Zellklon T4H2 wurde mit Antikörpern gegen CD56, CD158a, NKG2D, CD161, CD94 und CD16 gefärbt. Anschließend wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert. Als Kontrolle dienten die jeweiligen Isotypen (offene Profile). Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

Um zu klären, ob die DN T4H2 Zellen monoklonalen Ursprungs sind, wurde das Repertoire der einzelnen T-Zell-Rezeptor-Ketten mit Hilfe der CDR3 Spectratyping-Methode untersucht. Um eine mögliche Verunreinigung durch Feeder-Zellen auszuschließen, wurde der DN Klon vor dem Versuch mittels Zellsorter aufgereinigt.

Die Ergebnisse der Amplifikationen sind in **Abb. 6** dargestellt. Es zeigte sich, dass der TCR des DN Klons zur V β 17-Familie gehört. Dieses Ergebnis stimmt mit der Antikörperfärbung gegen TCRV β 17 überein (**Abb. 4 A**). Darüber hinaus konnten keine weiteren TCRV β -Familien detektiert werden, so dass die DN T4H2 Zellen monoklonalen Ursprungs sind.

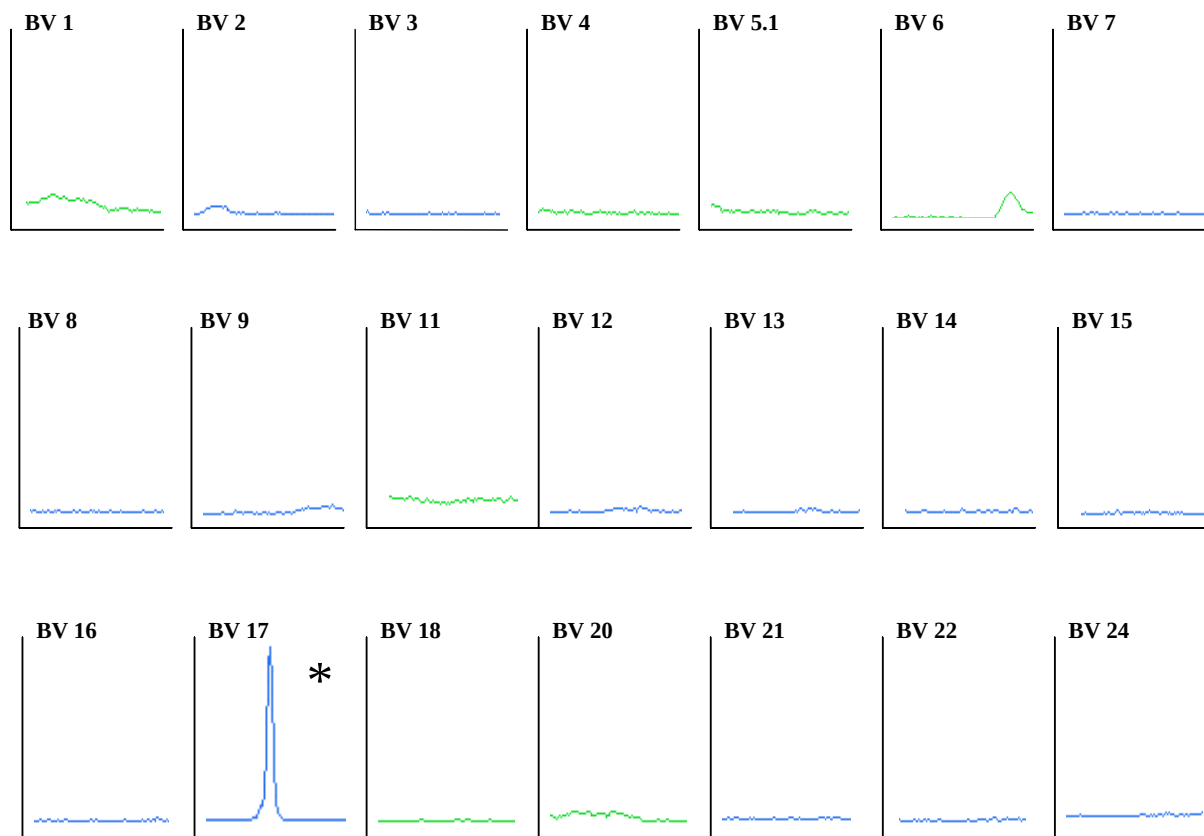


Abb. 6: Analyse der TCRV β -Familien des DN Klons T4H2 mit Hilfe der CDR3 Spectratyping-Methode. Der DN Klon wurde lysiert und seine Gesamt-RNA isoliert. Diese wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die V β -Segmente wurden mit Hilfe von 21 V β -spezifischen Primern amplifiziert. Die Produkte wurden mit einem DNA Sequenzer analysiert. Für das V β 17-Gensegment zeigte sich ein klonaler Peak (*).

In verschiedenen Publikationen wird beschrieben, dass DN T-Zellen in enger Verwandtschaft zu CD8⁺ T-Zellen stehen (143;148;149). Deshalb wurde die intrazelluläre Expression α - und β -Kette des CD8 Rezeptors genauer untersucht. Als Kontrollzellen diente der CD8⁺ Klon 3.9. Wie in **Abb. 7** gezeigt, exprimiert der DN Klon auch intrazellulär kein CD8-Protein.

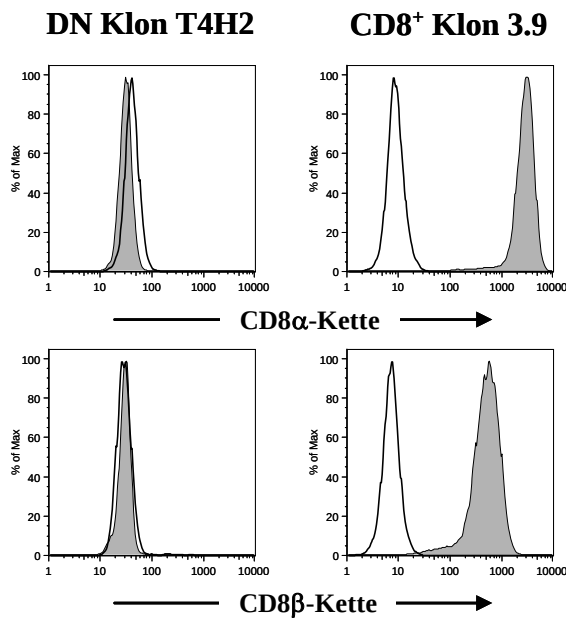


Abb 7.: Intrazelluläre Expression der CD8 α - und β -Kette. Der DN Klon T4H2 und der CD8⁺ Klon 3.9 wurden mit Fixierungs/Permeabilisierungslösung fixiert. Anschließend wurden die permeabilisierten Zellen mit Antikörpern gegen die CD8 α - oder CD8 β -Kette intrazellulär gefärbt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem jeweiligen Isotyp (offene Profile) inkubiert. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

Murine DN T-Zellen können sowohl aus CD8⁺ als auch aus CD4⁺ T-Lymphozyten generiert werden (151;154). Um ausschließen zu können, dass der DN Klon T4H2 geringe Mengen des CD4 oder CD8 Gens exprimiert, wurde mit Hilfe der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) die Transkription des CD4- und CD8-Gens untersucht. Die 18S mRNA Abundanz diente als Referenzwert für die Quantifizierung. Als Kontrolle wurden frisch isolierte CD4⁺ T-Zellen, der CD8⁺ Klon 3.9 und eine CD8⁺ zytotoxische T-Zelllinie verwendet. Wie in **Abb. 8** ersichtlich, exprimiert der DN Klon T4H2 weder das CD8 α - oder CD8 β -Gen noch das CD4-Gen.

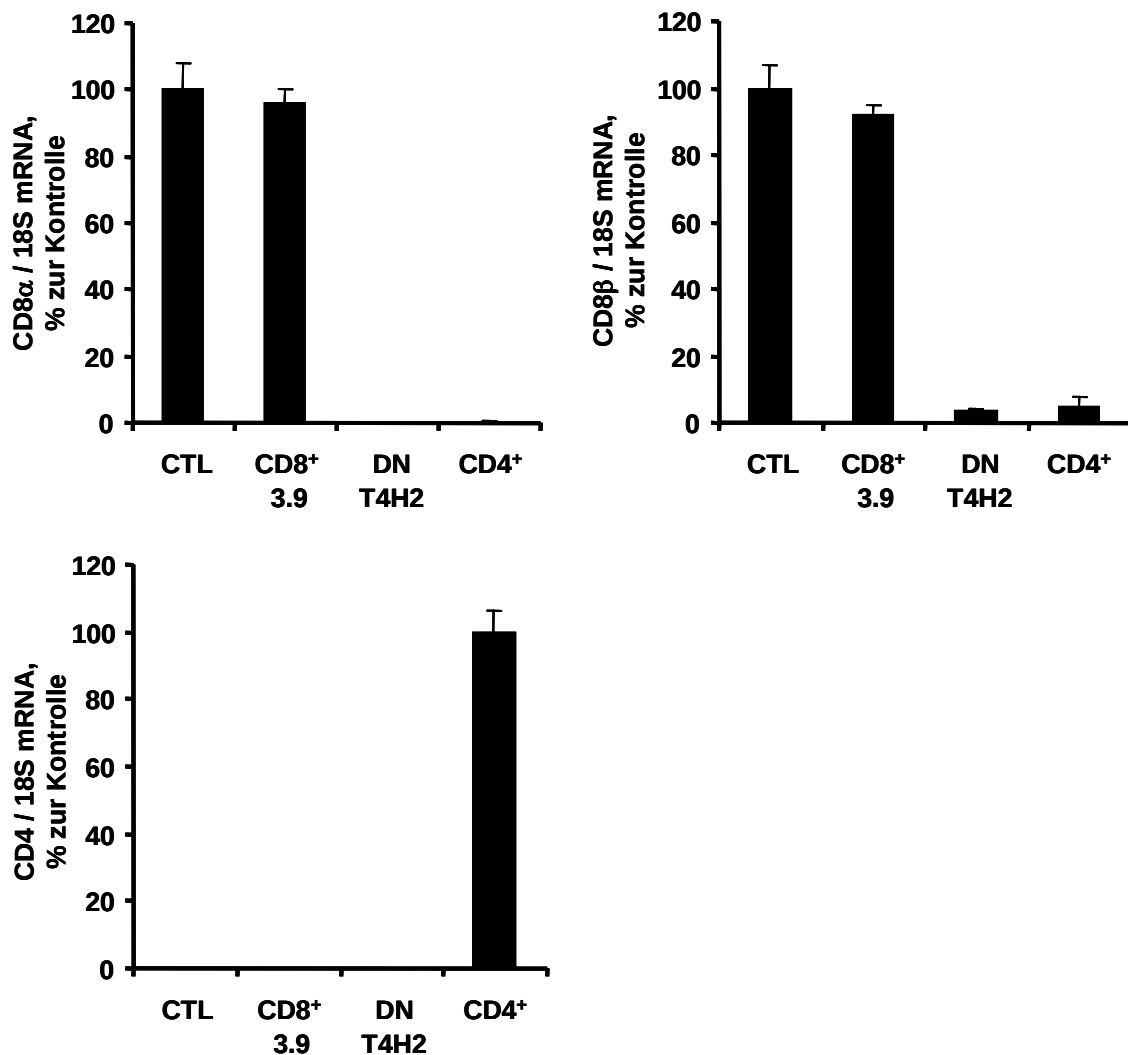


Abb. 8: CD8 α , CD8 β und CD4 mRNA Expression in T4H2 Zellen. Die Gesamt-RNA der Zellen wurde isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung der mRNA erfolgte an einem LightCycler und wurde auf die 18S mRNA bezogen. Die Kontrollen (CTL für CD8 α und CD8 β mRNA, CD4⁺ für CD4 mRNA) wurden auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten.

4.2.3 Charakterisierung des DN T-Zellklons T4H2

4.2.3.1 Zytokinproduktion des DN T-Zellklons T4H2

Murine DN T-Zellen produzieren nach Aktivierung überwiegend IFN- γ und TNF, sowie geringe Mengen an TGF- β , aber kein IL-2, IL-4, IL-10 oder IL-13 (137). Ferner konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass auch humane DN T-Zellen nach Stimulation mit allogenen APCs große Mengen an IFN- γ , nicht aber IL-2, IL-4 oder IL-10 sezernieren (s. Abschnitt 4.1). Um festzustellen, ob der DN Klon nach einer Antigen-spezifischen Stimulation ein ähnliches

Zytokinprofil aufweist, wurden die sezernierten Zytokine analysiert. Dazu wurden T2 Zellen exogen mit dem gp100 Peptid beladen. Die beladenen T2 Zellen wurden anschließend mit dem DN Klon T4H2 oder dem CD8⁺ Klon 3.9 inkubiert. Des Weiteren wurde auch die HLA-A2⁺ gp100-exprimierende Melanom-Linie Mel1300 Zellen mit den T-Zellklonen kokultiviert. Als Kontrolle dienten T2 Zellen, die mit dem irrelevanten Melan-A Peptid beladen wurden.

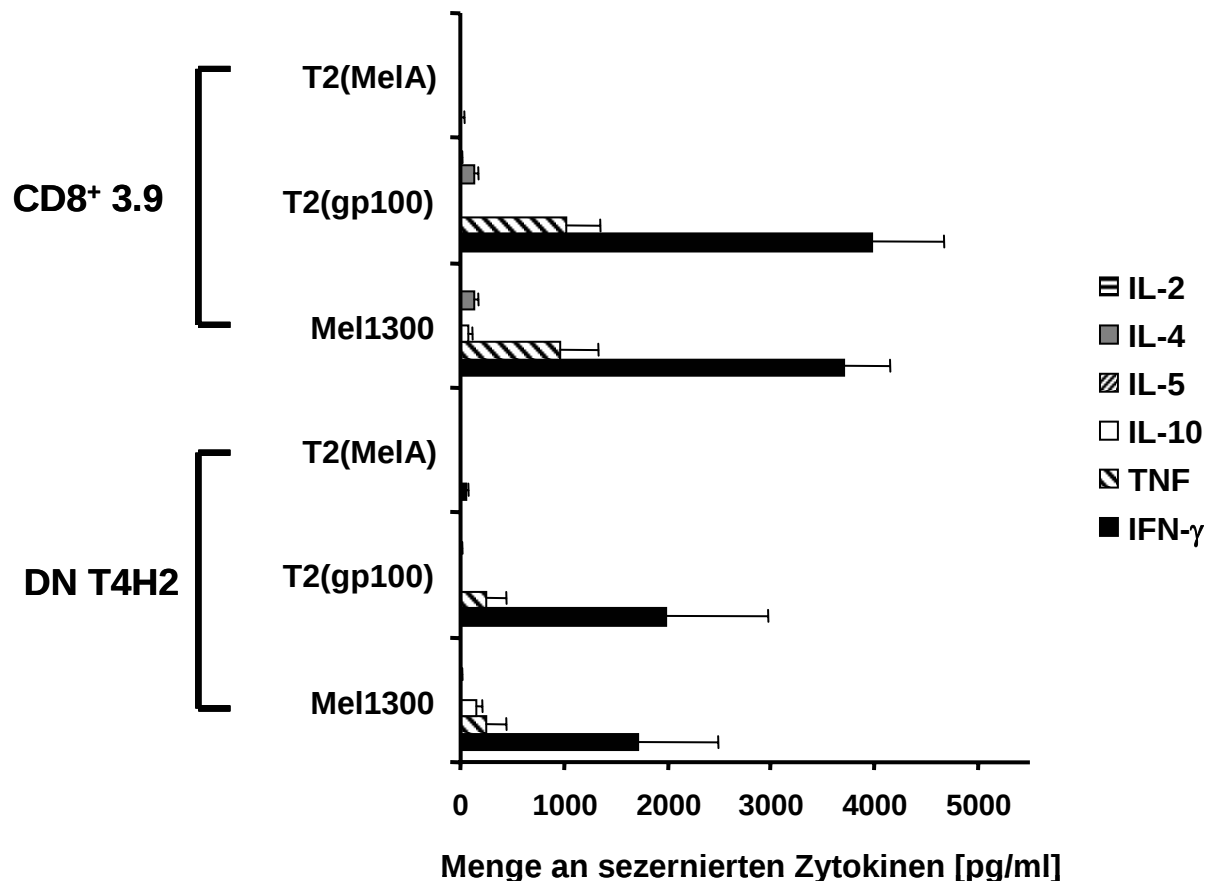


Abb. 9: Zytokinprofil des DN Klons T4H2 und des CD8⁺ Klons 3.9. Die beiden Klone wurden mit gp100-beladenen T2 Zellen und Mel1300 Zellen für vier Stunden kokultiviert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und mit Hilfe des CBA-Tests analysiert. Es wurde die Menge an sezernierten IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, TNF und IFN-γ quantifiziert. Als Kontrolle wurden T2 Zellen, die mit einem Melan-A Peptid beladen wurden, verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 3 Experimenten.

Wie in **Abb. 9** gezeigt, erkennt der DN Klon T4H2 sowohl Targetzellen, die exogen mit dem gp100 Peptid beladenen wurden, als auch endogen exprimierende gp100⁺ Melanomzellen und produziert hauptsächlich das Zytokin IFN-γ (bis zu 2000 pg/ml) und geringe Mengen an TNF (bis zu 260 pg/ml) (**Abb. 9**). Die gp100-Spezifität des T4H2 Klons zeichnet sich dadurch aus, dass weder konstitutiv noch nach einer Stimulation mit T2 Zellen, die mit einem irrelevanten Peptid beladen wurden, Zytokine sezerniert werden. Der CD8⁺ Klon 3.9 produziert nach

Aktivierung eine größere Menge an Zytokinen als der DN Klon, das Zytokinmuster der beiden Klone ähnelt sich aber sehr stark (IFN- γ bis zu 3900 pg/ml; TNF bis zu 1000 pg/ml). Die geringe Menge an IL-10 wird von der Melanom-Zelllinie Mel1300 autokrin sezerniert.

4.2.3.2 Zytotoxische Aktivität des DN T-Zellklons T4H2

Neben einer immunregulatorischen Funktion weisen murine DN T-Zellen auch eine zytotoxische Aktivität gegen Tumoren auf (139). Um eine mögliche zytolytische Funktion des DN T-Zellklons nachzuweisen, wurden ^{51}Cr -Zytotoxizitätstests durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde der CD8 $^{+}$ gp100-reaktive Klon 3.9 eingesetzt.

Wie in **Abb. 10** dargestellt, besitzt der DN Klon T4H2 eine starke zytotoxische Aktivität gegen die gp100-beladenen T2 Zellen (30% Lyse bei einer Effektor/Target Ratio von 25 : 1 und einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$ Peptid). Der CD8 $^{+}$ Klon weist eine noch stärkere Zytotoxizität gegen die Zielzellen auf (40% Lyse), die auch noch bei einer niedrigeren Peptid-Konzentrationen erhalten bleibt (40% Lyse bei einer Beladung mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Peptid; 25% Lyse bei einer Beladung mit 0,05 $\mu\text{g/ml}$ Peptid). Die zytotoxische Aktivität des DN Klons dagegen nimmt bei einer Verdünnung des Peptids kontinuierlich ab (7,5% Lyse bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Peptid).

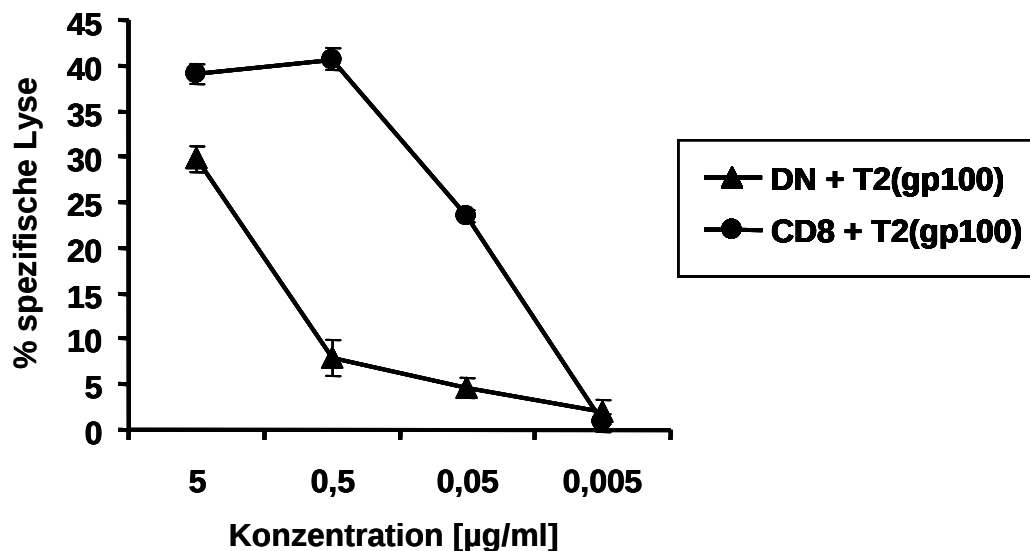


Abb. 10: Zytotoxische Aktivität des DN Klons T4H2 und des CD8 $^{+}$ Klons 3.9. T2 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des gp100 Peptids beladen und mit ^{51}Cr markiert. Anschließend wurden die Zielzellen mit dem DN Klon und dem CD8 $^{+}$ Klon in einem Effektor/Target Ratio von 25 : 1 inkubiert. Nach vier Stunden wurde der Überstand abgenommen und analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM eines dreifach Ansatzes.

Um zu überprüfen, ob die zytotoxische Aktivität des DN T-Zellklons T4H2 abhängig von der spezifischen Erkennung des Antigens ist, wurden T2 Zellen zum einen mit dem gp100 Peptid, zum anderen mit dem irrelevanten Melan-A Peptid beladen und in einen ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest als Zielzellen eingesetzt. Des Weiteren wurde untersucht, ob der gp100-reaktive DN Klon in der Lage ist, Tumorzellen zu lysieren, die endogen prozessiertes gp100 Antigen exprimieren. Hierfür wurde die HLA-A2⁺ Melanomzelllinie Mel1300 mit ^{51}Cr markiert und mit dem DN Klon T4H2 inkubiert. Als Kontrolle wurde die HLA-A2⁺ Na8 Melanomzelllinie verwendet, die keine Expression des gp100 Peptids aufweist. Außerdem wurde der TCR des DN Klons mit einem spezifischen Antikörper gegen TCRV β 17 blockiert. Als Kontrolle wurde der Isotyp des Antikörpers (IgG1) verwendet.

Wie in **Abb. 11** ersichtlich, zeigte der DN Klon T4H2 eine starke Zytotoxizität gegen gp100-beladene T2 Zellen, nicht aber gegen T2 Zellen, die mit dem Kontrollpeptid Melan-A beladen wurden. Zudem konnte der DN Klon auch Mel1300 Zellen spezifisch erkennen und lysieren, wohingegen Na8 Zellen nicht eliminiert wurden. Eine Blockade des TCRs mit Hilfe eines Antikörpers gegen TCRV β 17 konnte die zytolytische Aktivität des DN Klons komplett unterdrücken. Eine Inkubation mit dem Isotyp dagegen führte zu keiner Hemmung der zytotoxischen Aktivität.

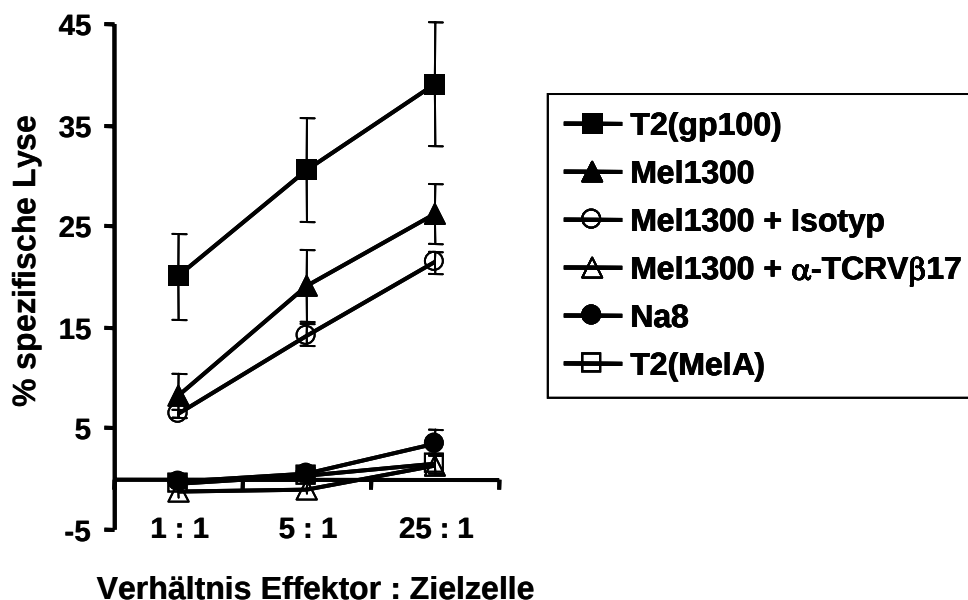


Abb. 11: Antigen-spezifische Zytotoxizität des DN T-Zellklons T4H2. T2 Zellen wurden exogen mit dem gp100 oder dem Melan-A Peptid beladen. Die beladenen Zellen wurden zusammen mit den Mel1300 Zellen und den Na8 Zellen in einen ^{51}Cr -Zytotoxizitätstest eingesetzt. Der DN Klon T4H2 wurde als Effektorzelle verwendet und in unterschiedlichen Verhältnissen zu den Zielzellen gegeben. Für die TCR Blockade wurde der DN Klon mit dem Antikörper gegen TCRV β 17 oder dem Isotyp inkubiert und anschließend in den ^{51}Cr -Freisetzungstest eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der spezifischen Lyse $\pm$ SEM eines dreifach Ansatzes.

In der Literatur wurde beschrieben, dass sowohl die suppressive Funktion als auch die zytotoxische Aktivität muriner DN T-Zellen über Fas/FasL Interaktion abläuft (137;139;188). Die Arbeitsgruppe um Xin Xiao Zheng konnte dagegen zeigen, dass die suppressive Aktivität von murinen DN T-Zellen Perforin-abhängig ist (155). Des Weiteren wurde beschrieben, dass murine DN T-Zellen aktivierte B- oder T-Lymphozyten über die Effektormoleküle Perforin und Granzyme eliminieren (199). Um den Mechanismus zu entschlüsseln, über den der DN T-Zellklon T4H2 seine Zytotoxizität vermittelt, wurde die Expression von Perforin und Granzyme-B untersucht. Als Positivkontrolle wurde eine $CD8^+$ CTL-Linie und der $CD8^+$ Klon 3.9 verwendet.

Wie in **Abb. 12** dargestellt, exprimiert der DN Klon T4H2 sowohl Perforin als auch Granzyme-B, wobei weniger Granzyme-B als in den Kontrollen enthalten ist. Der $CD8^+$ Klon 3.9 und $CD8^+$ CTL wiesen eine vergleichbare Expressionsdichte der beiden Effektormoleküle auf.

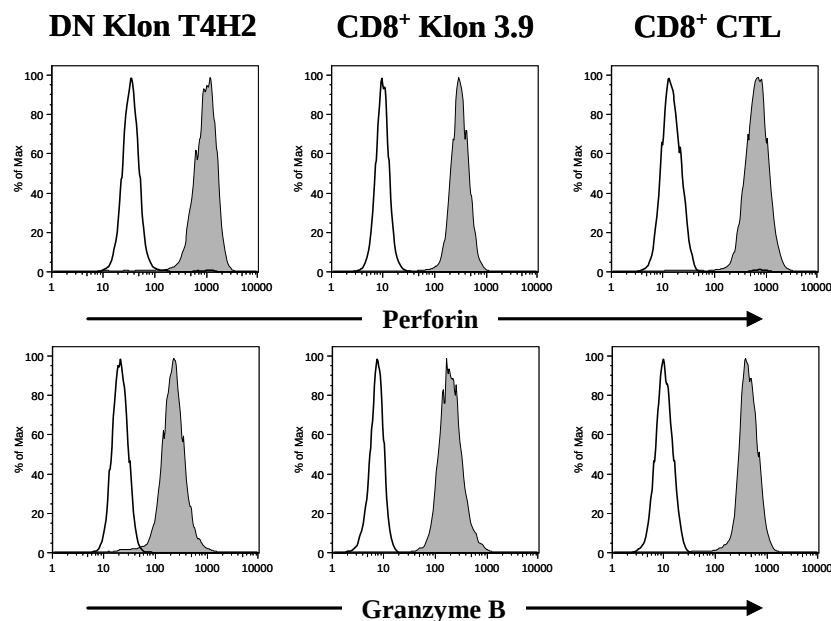


Abb. 12: Expression der Effektormoleküle Perforin und Granzyme-B. Der DN Klon T4H2 wurde eine Woche nach Stimulation mit Fixierungs/Permeabilisierungslösung fixiert und mit Antikörpern gegen Perforin und Granzyme-B oder den jeweiligen Isotypen (offene Profile) intrazellulär gefärbt. Als Positivkontrolle dienten $CD8^+$ CTL und der $CD8^+$ Klon 3.9. Die Histogramme zeigen ein repräsentatives Experiment.

Um zu klären, ob die Zytotoxizität des DN T-Zellklons T4H2 tatsächlich durch die beiden Effektormoleküle Perforin und Granzyme-B vermittelt wird, wurden Blockierungs-

experimente durchgeführt. Dazu wurde der DN Klon T4H2 zum einen mit Concanamycin A (CMA) und zum anderen mit verschiedenen Konzentrationen von z-AAD vorbehandelt. Der Serin-Protease-Inhibitor z-AAD kann die Aktivierung der Caspase-Signalkette unterdrücken und damit die Wirkung von Granzyme-B aufheben (200). Durch Inhibition der V-Typ H^+ -ATPase verhindert CMA das Ansäuern der lytischen Granula. Dadurch können diese nicht mit der Zellmembran verschmelzen und die Effektormoleküle Perforin und Granzyme-B freisetzen (201). Nach der Inkubation mit den Inhibitoren wurde der DN Klon T4H2 als Effektorzelle in einen ^{51}Cr -Freisetzungstest eingesetzt. Als Kontrolle wurden T4H2 DN T-Zellen verwendet, die nicht blockiert wurden.

Wie in **Abb. 13** gezeigt, konnte die durch den DN Klon T4H2 vermittelte Zytotoxizität durch den Granzyme-B Inhibitor z-AAD dosisabhängig vermindert werden. Eine Inkubation mit 20 μM z-AAD verringerte die zytolytische Aktivität des DN Klons um 50%, während eine Konzentration von 40 μM z-AAD diese sogar bis zu 75% inhibierte. Durch Behandlung mit CMA wurde die Zytotoxizität des DN Klons vollständig aufgehoben.

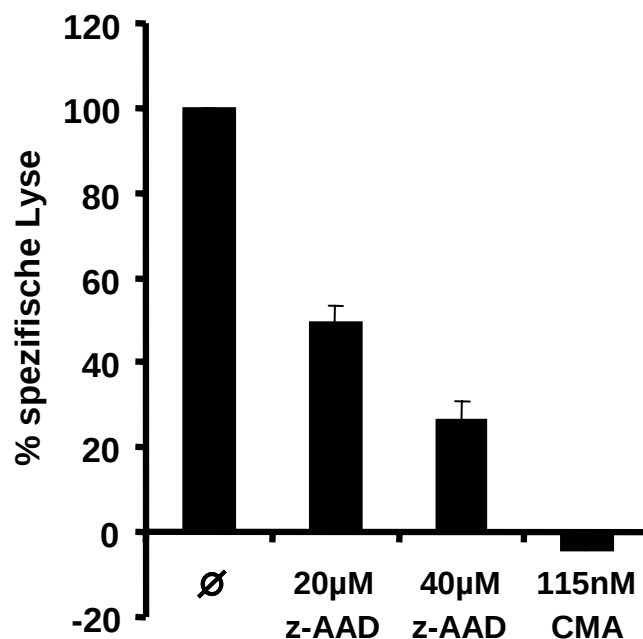


Abb. 13: Inhibition der zytotoxischen Aktivität des DN T-Zellklons T4H2 gegen gp100-beladene Zielzellen. T2 Zellen wurden exogen mit dem gp100 Peptid beladen und mit ^{51}Cr markiert. Der DN Klon wurde mit CMA oder verschiedenen Konzentrationen von z-AAD inkubiert. Anschließend wurden T2 Zellen und der DN Klon in einem ^{51}Cr -Freisetzungstest kokultiviert. Die Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM eines dreifach Ansatzes.

4.2.4 Suppressive Funktion des DN T-Zellklons T4H2

In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass DN T-Zellen eine immunregulatorische Funktion besitzen (176;188;198). Im Gegensatz zu $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen oder Tr1 Zellen, die Effektorzellen Antigen-unabhängig supprimieren, vermitteln murine DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität über einen Antigen-spezifischen Mechanismus (84;108;137). Es sollte nun überprüft werden, ob der humane DN T-Zellklon T4H2 ebenfalls eine Antigen-spezifische suppressive Wirkung aufweist.

Murine DN T-Zellen können Immunantworten unterdrücken, indem sie aktivierte $CD8^+$ T-Zellen spezifisch eliminieren (188). Deshalb wurde eine mögliche zytotoxische Aktivität des DN T-Zellklons T4H2 gegen den $CD8^+$ T-Zellklon 3.9 untersucht. Hierfür wurden zunächst DCs exogen mit dem gp100 Peptid oder einem irrelevanten MelanA Peptid beladen. Anschließend wurden die beladenen DCs mit dem $CD8^+$ Klon 3.9 allein oder mit dem $CD8^+$ Klon 3.9 und dem DN Klon T4H2 inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Annexin V und 7AAD gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Inkubation des $CD8^+$ Klons 3.9 mit den Kontrollpeptid-beladenen DCs zeigt, dass circa 30% der $CD8^+$ Zellen Annexin V positiv sind (**Abb. 14**). Die Anwesenheit des DN Klons T4H2 verstärkte diese unspezifische Apoptose nicht. Wurde der $CD8^+$ Klon 3.9 dagegen mit gp100-beladenen DCs stimuliert, konnte ein Anstieg der apoptotischen $CD8^+$ Zellen auf ca. 60% Annexin V⁺ T-Zellen festgestellt werden. Eine Kokultivierung mit dem DN Klon T4H2 führte jedoch eher zu einer Abnahme der apoptotischen $CD8^+$ Zellen auf ca. 45% Annexin V⁺ T-Zellen.

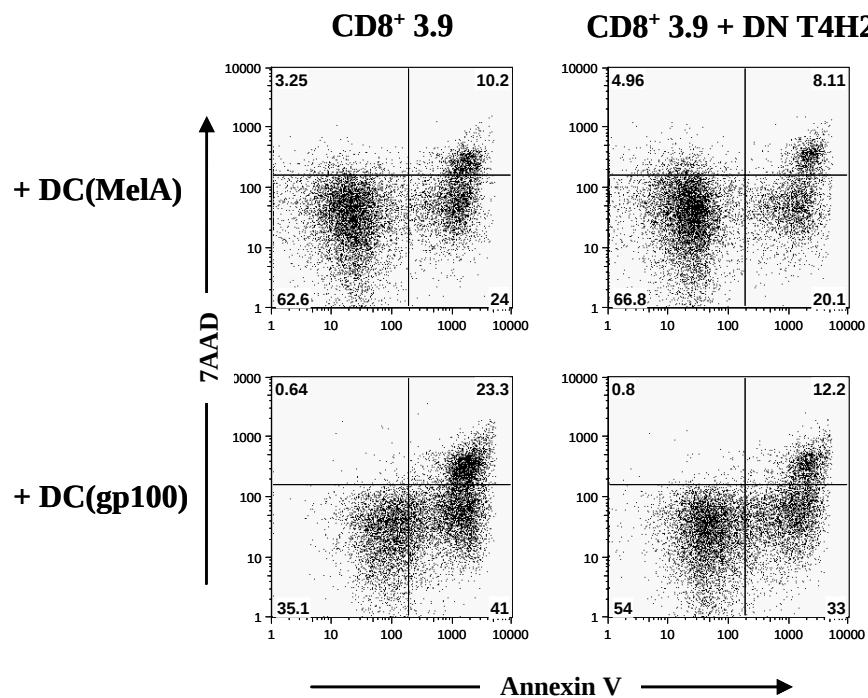


Abb. 14: Apoptoseinduktion durch den DN Klon T4H2. DCs wurden exogen mit dem gp100 oder als Kontrolle mit dem MelanA Peptid beladen. Anschließend wurden die Zellen entweder mit dem CD8⁺ Klon 3.9 oder mit dem CD8⁺ Klon 3.9 und dem DN Klon T4H2 kokultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet, mit Annexin V und 7AAD gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. In den Dotplots sind nur CD8⁺ Zellen gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Darüber hinaus wurde eine mögliche Hemmung der Proliferation von CD8⁺ T-Zellen untersucht. Dazu wurde zuerst der CD8⁺ Klon 3.9 mit CFSE gefärbt. Des Weiteren wurden DCs exogen mit dem gp100 Peptid beladen. Anschließend wurden die beladenen DCs mit den CFSE-gefärbten CD8⁺ Zellen oder mit den CD8⁺ Zellen und dem DN Klon T4H2 kokultiviert. Nach einem Tag und nach fünf Tagen wurden die Zellen geerntet und mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt. Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer.

Wie in **Abb. 15** gezeigt, konnte nach einem Tag keine Abnahme in der Expression des Farbstoffs CFSE festgestellt werden. Am fünften Tag nach Stimulation proliferierten fast 90% der CD8⁺ 3.9 Zellen. Die Kokultur mit dem DN Klon T4H2 führte jedoch zu keiner Hemmung der Proliferation (ca. 90% Proliferation).

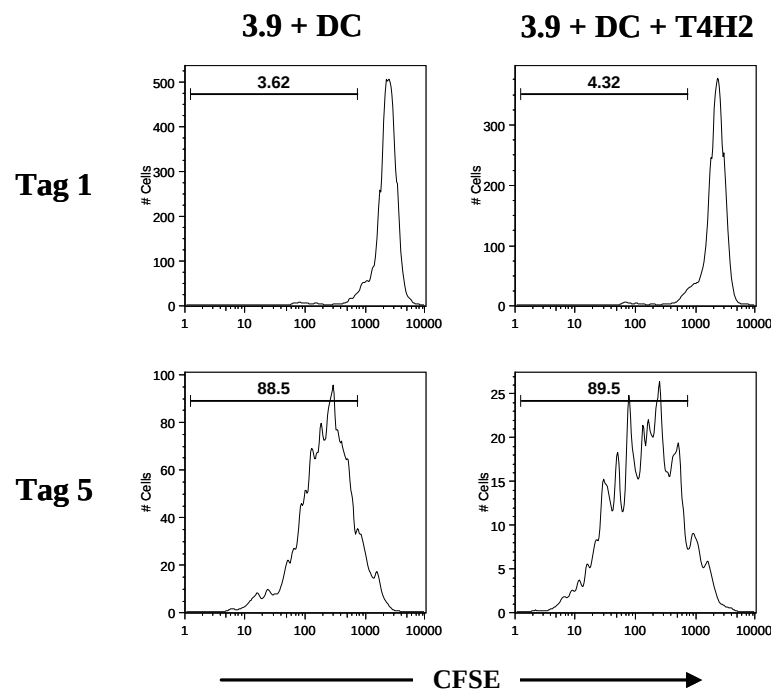


Abb. 15: Proliferation des $CD8^+$ Klon 3.9 in Kokultur mit dem DN Klon T4H2. DCs wurden exogen mit dem gp100 Peptid beladen und als Stimulatorzellen eingesetzt. Der $CD8^+$ Klon 3.9 wurde CFSE gefärbt und mit den DCs oder den DCs und den DN Klon T4H2 kokultiviert. Nach einem bzw. fünf Tagen wurden die Zellen geerntet, mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen $CD8^+$ Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.3 Aufreinigung und Expansion von humanen DN T-Zellen

4.3.1 Aufreinigung von humanen DN T-Zellen

Im peripheren Blut von gesunden Individuen sind circa 1% aller T-Lymphozyten DN T-Zellen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Zellen mit Hilfe einer Kombination aus magnetischer Separation und durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert werden können (s. Abschnitt 4.1). Diese Isolationsmethode ist jedoch sowohl sehr zeit- als auch durch den hohen Antikörperverbrauch kostenintensiv. Darüber hinaus kann ein Zellsorter die Zellen nur semi-steril aufreinigen. Deshalb sollten neue Methoden der DN T-Zellaufreinigung entwickelt werden. Der DN T-Zell-Isolations Kit der Firma Miltenyi, der gemeinsam mit unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde, beruht ausschließlich auf einer magnetischen Separation. Diese Methode wurde mit unseren Standard bestehend aus der Kombination aus einer Magnet-Separation der Firma Dynal und durchflusszytometrischer Zellsortierung verglichen. Hierfür wurden zunächst aus MNCs die $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$ und $CD19^+$ Zellen

mit Hilfe von magnetischen Beads der Firma Dynal depletiert. Die angereicherten Zellen wurden anschließend mit Antikörpern gegen CD4, CD8, CD56, TCR $\gamma\delta$ und TCR $\alpha\beta$ gefärbt und mittels eines FACS Aria-Zellsorters sortiert.

In dem experimentellen Ansatz wurden MNCs des gleichen Spenders mit dem Antikörper-Cocktail der Firma Miltenyi bestehend aus Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD56 inkubiert. Mit Hilfe einer LD-Säule wurden CD4⁺, CD8⁺ und CD56⁺ Zellen depletiert. In einem zweiten Schritt wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen TCR $\alpha\beta$ gefärbt und über MS-Säulen zweimal positiv isoliert. Die gewonnenen Zellen wurden anschließend im Durchflusszytometer analysiert.

Exemplarisch sind die Daten eines Spenders dargestellt (**Abb. 16**). Die Frequenz an DN T-Zellen lag bei 0,9% der MNC. Nach Depletion der CD4⁺, CD8⁺ und CD56⁺ Zellen mit Hilfe des Miltenyi-Antikörper-Cocktails stieg der Anteil an DN T-Zellen auf 3,8%. Eine Depletion der CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ und CD19⁺ Zellen durch Verwendung der Dynal-Beads konnte den Anteil an DN T-Zellen sogar auf 9,6% steigern. Die erste Positivselektion mittels des Miltenyi-Antikörpers gegen TCR $\alpha\beta$ erhöhte den Anteil an DN T-Zellen auf 81,9%, die zweite Positivanreicherung sogar auf 97,6%. Durch die Zellsortierung konnte keine höhere Reinheit an DN T-Zellen erzielt werden (95,1%).

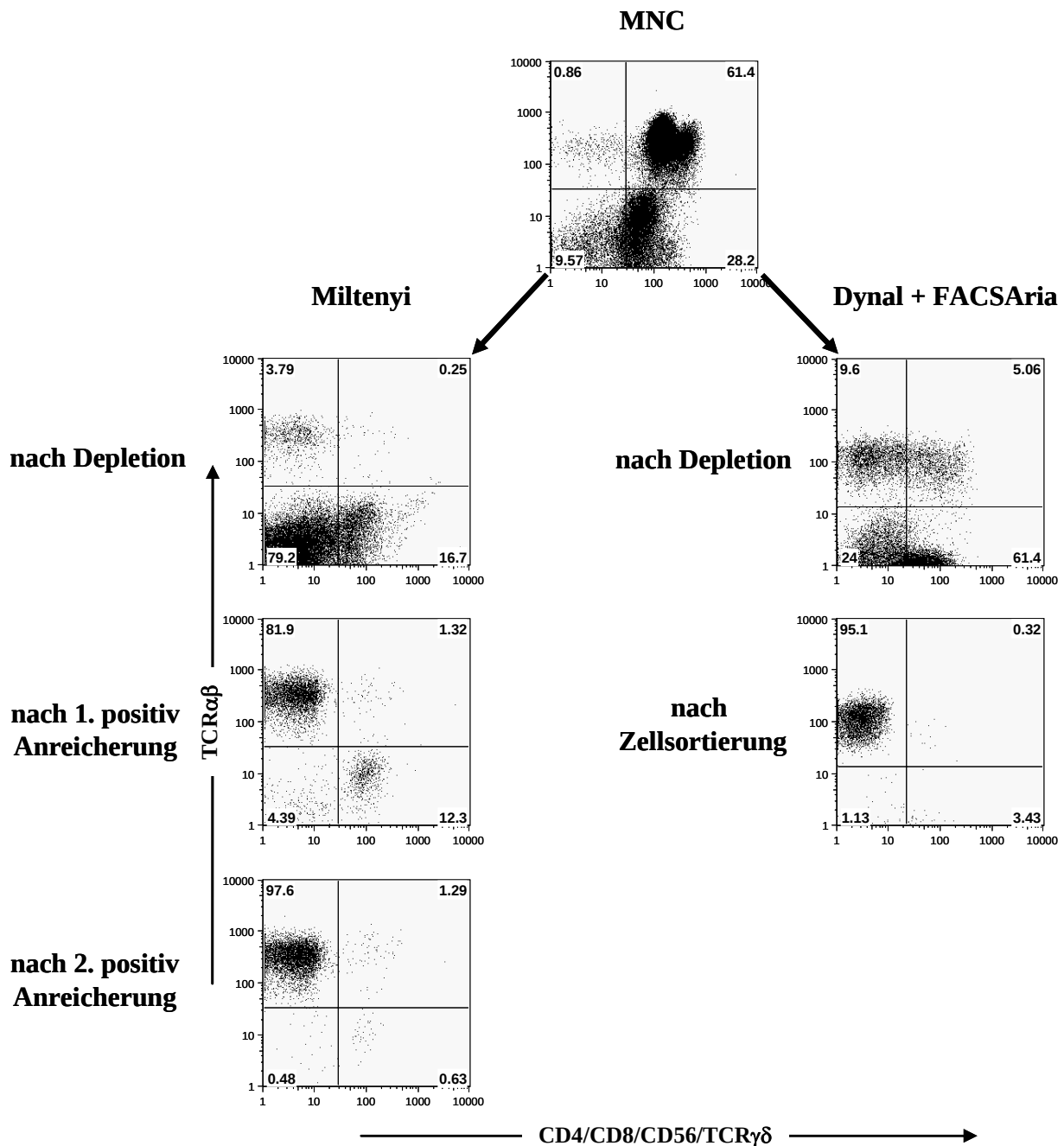


Abb. 16: Isolation von DN T-Zellen mit Hilfe des DN T-Zell-Isolations Kits (Miltenyi) oder einer Kombination aus Dynalbeads und FACSaria. MNC wurden mit einem Antikörper-Cocktail oder mit Dynalbeads inkubiert. Anschließend wurden die Zellen magnetisch separiert. Nach der Dynal-Anreicherung wurden die Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch sortiert. Nach der Depletion mit Hilfe der Miltenyi-Antikörper wurden die Zellen zweimal über einen Antikörper gegen TCR $\alpha\beta$ positiv selektioniert. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment mit Färbung der TCR $\alpha\beta$ ⁺ (y-Achse) und CD4/CD8/CD56/TCR $\gamma\delta$ ⁺ (x-Achse) Zellen. Die Zahlen stellen die Prozentwerte in den verschiedenen Quadranten dar.

Die verschiedenen Isolationsmethoden wurden insgesamt dreimal verglichen. Wie in **Abb. 17 A** gezeigt, betrug die Ausbeute durchschnittlich circa 30%. Die aufgereinigten DN T-Zellen wiesen eine Reinheit von 90% auf (**Abb. 17 B**). Mit dem Isolations Kit der Firma

Miltenyi konnte eine etwas höhere Ausbeute erzielt werden, während die Reinheit nach der Dynal-Aufreinigung und Zellsortierung etwas höher war. Jedoch waren die Unterschiede bei der Ausbeute und bei der Reinheit der Zellen nicht signifikant. Da der DN Isolationskit sowohl kostengünstiger als auch zeitsparender als die Kombination aus Dynal-Separation und durchflusszytometrischer Zellsortierung ist, wurde für die weiteren Experimente nur noch die Isolationsmethode der Firma Miltenyi verwendet.

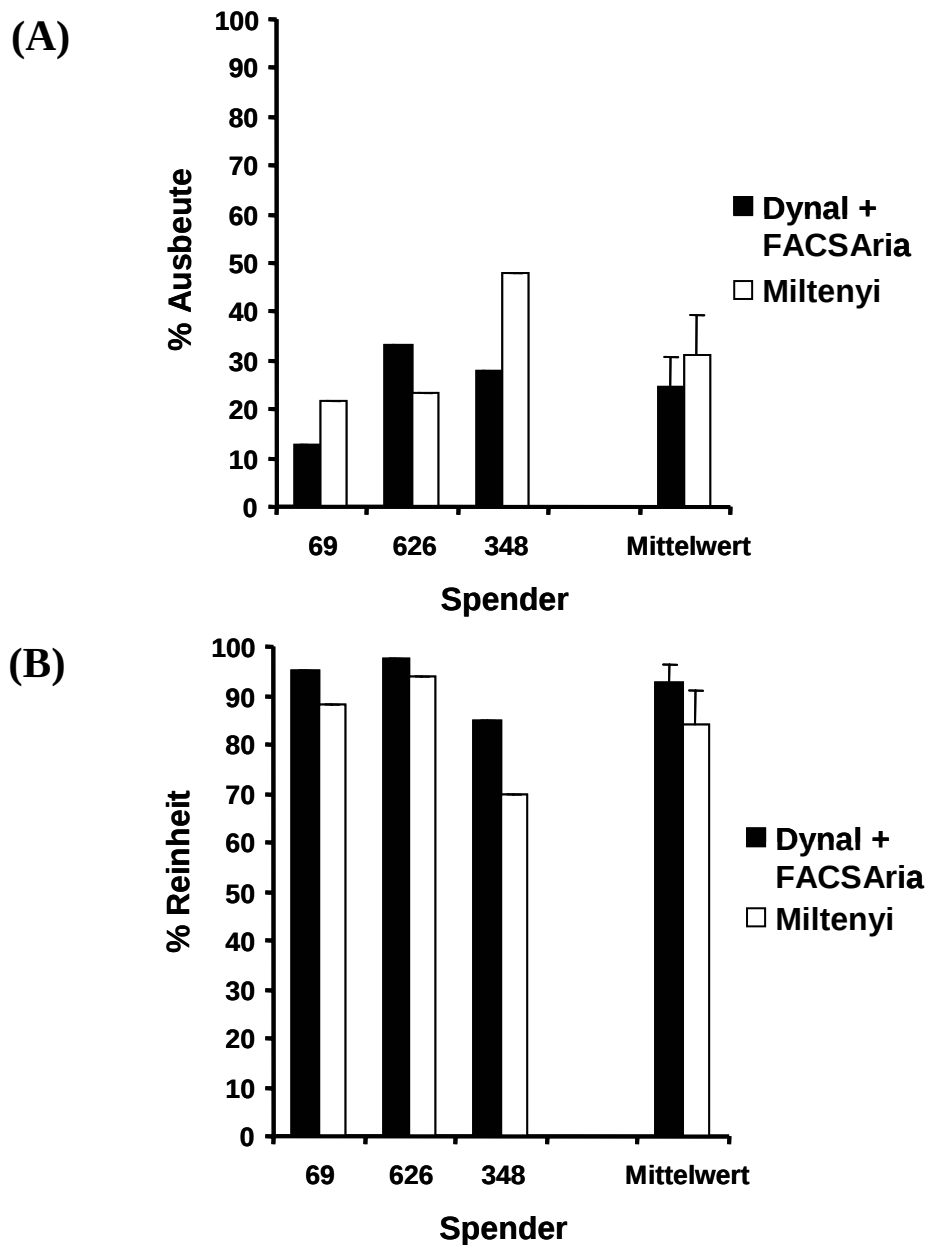


Abb. 17: Vergleich der Ausbeute (A) und Reinheit (B) der DN T-Zellen nach Isolation mit Hilfe des DN T-Zell-Isolations Kits (Miltenyi) oder der Kombination aus Dynal-Anreicherung und Zellsortierung. DN T-Zellen von drei verschiedenen Spendern wurden mittels DN Isolations Kit oder Dynal-Depletion und FACSAria aufgereinigt. Die Reinheit und Ausbeute wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Mittelwerte $\pm$ SEM sind ebenfalls dargestellt. Es konnte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

4.3.2 Expansion von humanen DN T-Zellen

Unsere Arbeitsgruppe konnte in Vorarbeiten zeigen, dass humane DN T-Zellen nach Stimulation mit allogenen MNC und exogenem IL-2 *in vitro* proliferieren können (s. Abschnitt 4.1). Es sollte nun untersucht werden, unter welchen Stimulationsbedingungen DN T-Zellen optimal expandiert werden können. Des Weiteren sollte der Phänotyp der DN T-Zellen nach Proliferation überprüft werden.

4.3.2.1 Expansion humaner DN T-Zellen mit Hilfe von anti-CD3/CD28 Beads

Anti-CD3/CD28 Dynabeads können für die Aktivierung und polyklonale Expansion von CD4⁺, CD8⁺ und CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen verwendet werden (202;203). Diese Beads bestehen aus superparamagnetischen Polystyren-Beads, an deren Oberfläche Antikörper gegen CD3 und CD28 gebunden sind und stellen somit artifizielle APCs dar, die T-Zellen stimulieren können.

DN T-Zellen wurden mit Hilfe des DN Isolations Kits aufgereinigt und mit den anti-CD3/CD28 Beads im Verhältnis 1 : 1 inkubiert. Alle sieben Tage wurden die Beads entfernt, die Zellen gezählt und mit neuen Beads in frischem Medium ausgesät. Außerdem wurde ein Teil der Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und TCRαβ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Wie in **Abb. 18** dargestellt, haben die DN T-Zellen nach Isolation eine Reinheit >95%. Nach einer einwöchigen Expansion zeigte sich, dass sowohl CD4⁺ (6,3%) aber vor allem CD8⁺ Zellen (33%) ausgewachsen sind. Die Frequenz an DN T-Zellen betrug noch ca. 60%. Nach 21 Tagen waren die CD8⁺ Zellen sogar noch weiter gewachsen (54%), während nur noch 44% der Zellen den DN T-Zell-Phänotyp aufwiesen.

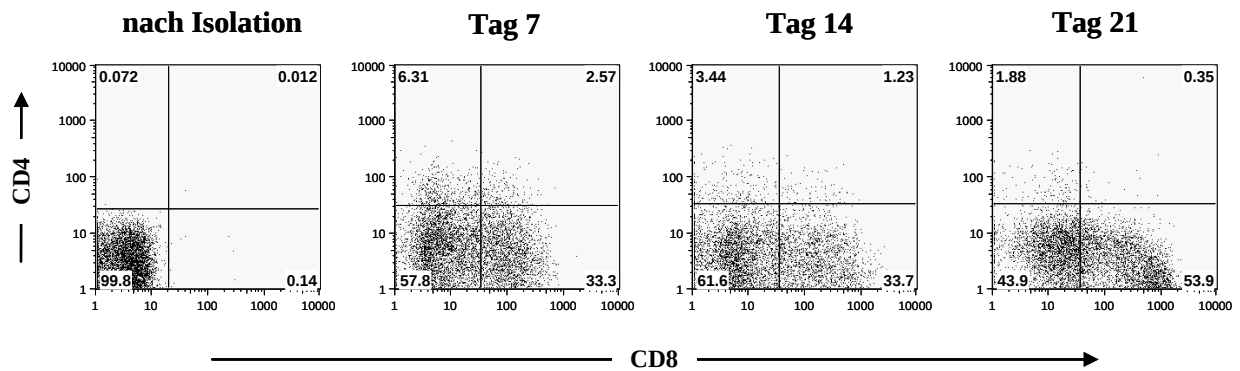


Abb. 18: Expansion von DN T-Zellen mittels anti-CD3/CD28 Beads. DN T-Zellen wurden isoliert und mit anti-CD3/CD28 Beads 1 : 1 stimuliert. Einmal wöchentlich wurden die Zellen mit neuen Beads und frischem Medium ausgesät. Die Reinheit der Zellen wurde durchflusszytometrisch mittels Antikörper gegen CD4, CD8 und TCR $\alpha\beta$ analysiert. Die Dotplots zeigen die Expression von CD4⁺ (y-Achse) und CD8⁺ (x-Achse) auf TCR $\alpha\beta$ ⁺ gatede Zellen. Dargestellt ist eines von sechs Experimenten.

Obwohl in den DN T-Zellkulturen nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads CD8⁺ T-Zellen auswachsen, konnte nach vier Wochen eine mittlere Expansion der DN T-Zellen um den Faktor 140 (minimal: 15, maximal: 250) erzielt werden (**Abb. 19**). In der Regel ließ die Expansion der DN T-Zellen nach vier Wochen nach, wenngleich auch einzelne Kulturen bis zu zwei Monate mit einer maximalen Expansionsrate von 100×10^6 vermehrt werden konnten.

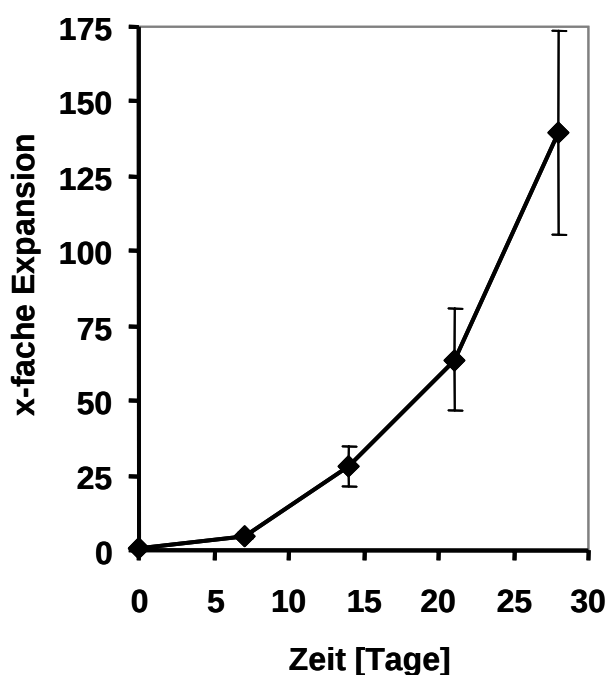


Abb. 19: Proliferation von DN T-Zellen. DN T-Zellen von 6 Spendern wurden isoliert und mit anti-CD3/CD28 Beads polyklonal stimuliert. Jede Woche wurde die Frequenz der DN T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM.

4.3.2.2 Phänotypische Charakterisierung der expandierten Zellen

Eine Expansion von DN T-Zellen führt zum Auswachsen von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (s. **Abb. 18**). Wir haben uns daher für die Herkunft dieser Zellen interessiert. Zunächst wurde überprüft, ob ein Teil der isolierten Zellen den CD8 Rezeptor nur auf ihrer Oberfläche nicht exprimieren. Hierfür wurden die isolierten DN T-Zellen mit einem Antikörper gegen CD8 oder den Isotyp intrazellulär gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Als Positivkontrolle wurden MNC verwendet. Wie aus **Abb. 20** ersichtlich, weisen die DN T-Zellen auch intrazellulär kein CD8 Protein auf. Dagegen zeigen 14% der MNC des gleichen Spenders eine Expression von intrazellulären CD8.

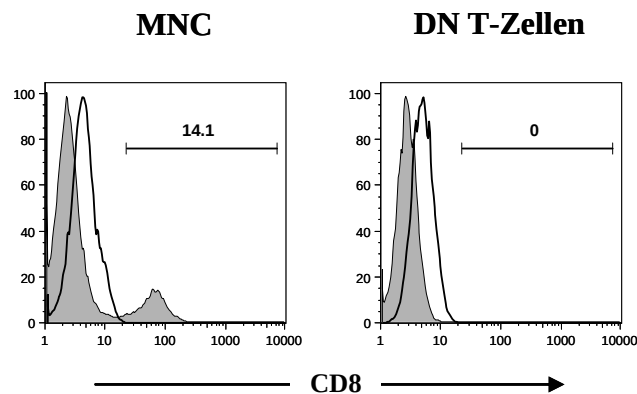


Abb. 20: Intrazelluläre CD8 Expression auf isolierten DN T-Zellen. DN T-Zellen wurden isoliert und mit Fixierungs/Permeabilisierungs-Lösung fixiert. Die Zellen wurden mit einem Antikörper gegen CD8 oder dem Isotyp (offene Profile) intrazellulär gefärbt. Anschließend wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Positivkontrolle dienten MNC. Dargestellt sind Histogramme eines repräsentativen Experiments.

Ferner wurde überprüft, ob die $CD8^+$ T-Zellen aus der DN T-Zellpopulation entstehen. Dazu wurden DN T-Zellen isoliert und auf ihre Reinheit untersucht. Anschließend wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und mit anti-CD3/CD28 Beads stimuliert. Nach einem Tag und nach drei, sechs bzw. acht Tagen wurden die Zellen geerntet, mit Antikörpern gegen CD8 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Nach der Isolation weisen die DN T-Zellen eine hohe Reinheit auf (**Abb. 21**). Einen Tag nach der Stimulation mit den anti-CD3/CD28 Beads liegt die Frequenz an DN T-Zellen immer noch bei fast 100%. Ab dem dritten Tag jedoch zeigten fast 30% der T-Zellen eine Expression des CD8 Rezeptors. Die $CD8^+$ Zellen entstehen somit aus der DN T-Zellpopulation und

proliferieren ähnlich schnell wie die DN T-Zellen. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Frequenz an $CD8^+$ Zellen ab dem dritten Tag annähernd konstant bleibt.

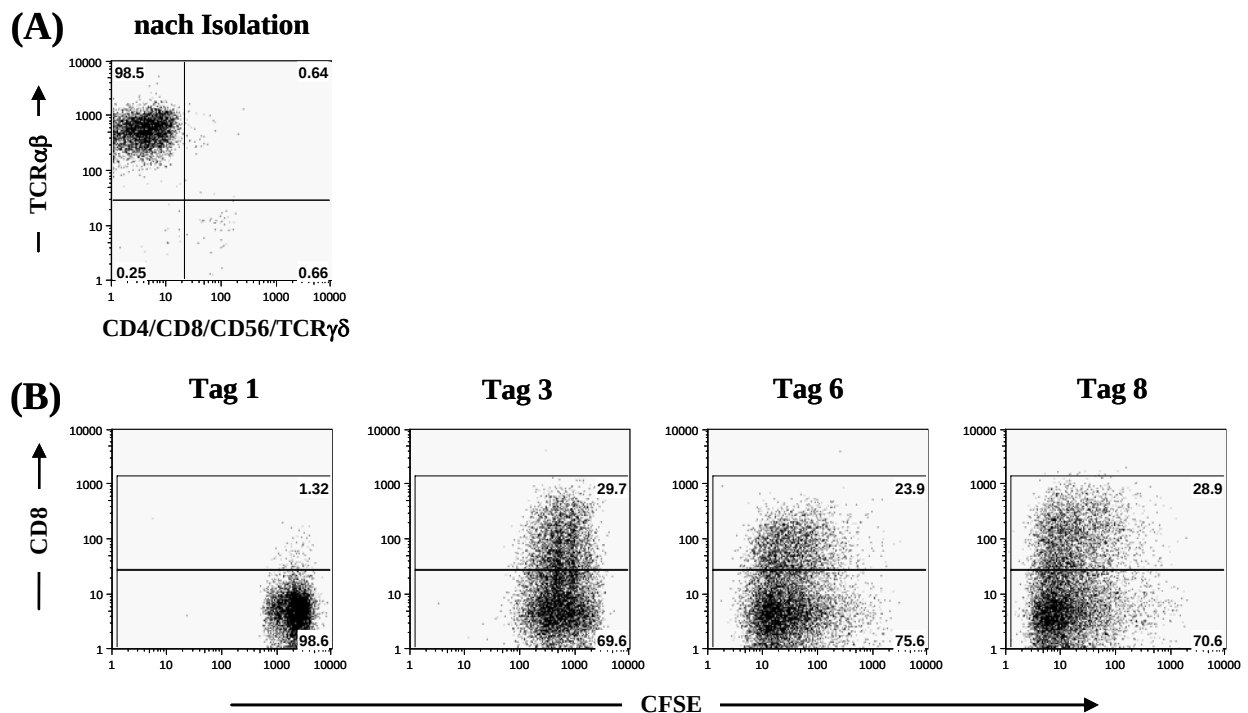


Abb. 21: Entstehung von $CD8^+$ T-Zellen aus der DN T-Zellpopulation nach Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads. DN T-Zellen wurden isoliert und auf ihre Reinheit überprüft **(A)**. Anschließend wurden die Zellen mit CFSE gefärbt und mit anti-CD3/CD28 Beads expandiert. Am ersten, dritten, sechsten und achten Tag wurden die Zellen geerntet und mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer. Dargestellt sind Dotplots eines repräsentativen Experiments.

4.3.2.3 Expansion humaner DN T-Zellen mit Hilfe von allogenen DCs

In Abschnitt 4.1 konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit allogenen MNC und exogenem IL-2 humane DN T-Zellen *in vitro* proliferieren können. DCs sind sehr effiziente Stimulatoren von B- und T-Lymphozyten (204). Deshalb sollte untersucht werden, ob humane DN T-Zellen auch mit allogenen DCs effizient expandiert werden können. Hierzu wurden DN T-Zellen isoliert und mit CFSE gefärbt. Anschließend wurden die gefärbten Zellen mit DCs eines anderen Spenders im Verhältnis DN/DC von 4 : 1 inkubiert. Am ersten, sechsten und achten Tag wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und TCR $\alpha\beta$ gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Nach einem Tag konnte keine Abnahme von CFSE festgestellt werden (**Abb. 22**). Am sechsten Tag proliferierten circa 76% der DN T-Zellen, am achten Tag sogar 84%. Ferner konnten Zellen beobachtet werden, die kein CFSE verlieren, was auf eine oligoklonale Stimulation hinweist.

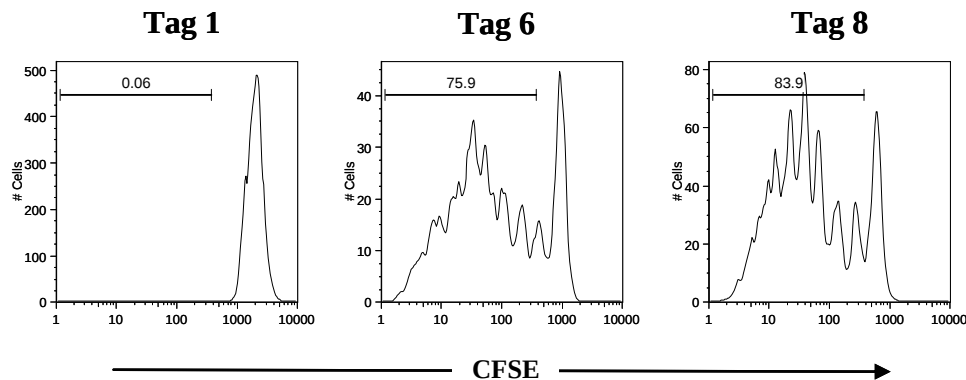


Abb. 22: Proliferation von DN T-Zellen nach Stimulation mit allo-genen DCs. DN T-Zellen wurden isoliert, CFSE gefärbt und anschließend mit allo-genen DCs stimuliert. Am Tag eins, sechs und acht wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und TCR $\alpha\beta$ gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Histogramme sind auf DN T-Zellen gated und stellen eines von insgesamt fünf durchgeführten Experimenten dar.

Des Weiteren wurde überprüft, ob durch die Expansion mit allo-genen DCs ebenfalls CD4⁺ und CD8⁺ Zellen auswachsen. Hierfür wurden DN T-Zellen isoliert und mit allo-genen DCs stimuliert. Einmal wöchentlich wurden die DN T-Zellen mit neuen DCs in frischem Medium ausgesät. Außerdem wurde die Reinheit durchflusszytometrisch bestimmt.

Die DN T-Zellen wiesen nach der Isolation eine sehr hohe Reinheit auf (**Abb. 23**). Ab dem siebten Tag konnten wiederum sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen detektiert werden. Die Frequenz an DN T-Zellen nahm bis zum Tag 21 weiter ab (40%).

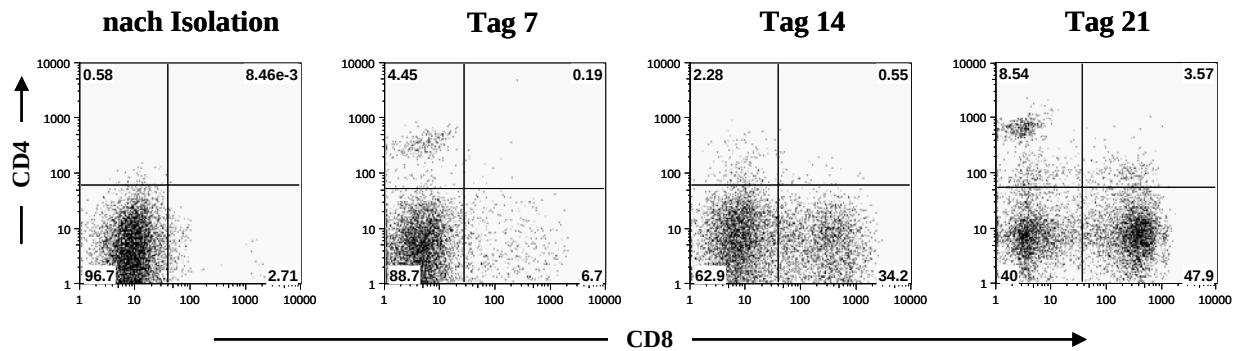


Abb. 23: Expansion von DN T-Zellen mit allogenen DCs. DN T-Zellen wurden isoliert und über mehrere Wochen mit allogenen DCs im Verhältnis DN/DC von 4 : 1 stimuliert. Nach der Isolation und nach 7, 14 und 21 Tagen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4, CD8 und TCR $\alpha\beta$ gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Dotplots zeigen TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Obwohl nach einer Stimulation mit allogenen DCs CD4⁺ und CD8⁺ Zellen aus der DN T-Zellpopulation auswachsen, konnte nach vier Wochen eine Proliferation der DN T-Zellen um den Faktor 45 (minimal: 12, maximal: 85) erzielt werden (**Abb. 24**). Nach vier Wochen ließen sich die DN T-Zellen nur noch schlecht expandieren, wenn auch einzelne Kulturen bis zu neun Wochen proliferierten.

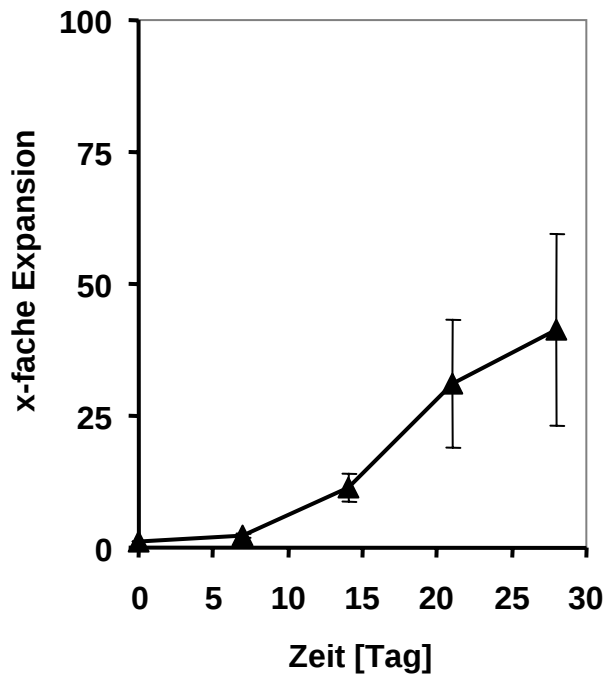


Abb. 24: Proliferation von DN T-Zellen nach Stimulation mit allogenen DCs. DN T-Zellen von verschiedenen Spendern (n=5) wurden isoliert und mit allogenen DCs stimuliert. Einmal wöchentlich wurde die Frequenz der DN T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

4.4 Suppression von alloogenen Immunreaktionen

In der Literatur wurde beschrieben, dass murine DN T-Zellen eine immunregulatorische Funktion besitzen (137;138;174;175). Der gp100-spezifische DN T-Zellklon T4H2 zeigte dagegen keine suppressive Aktivität (s. Abschnitt 4.2.4). Da DN T-Zellen in einer sehr niedrigen Frequenz im peripheren Blut vorhanden sind (s. Abschnitt 4.1), erweist sich eine Untersuchung des immunregulatorischen Potentials dieser T-Zellen als schwierig. Deshalb sollte überprüft werden, ob expandierte humane DN T-Zellen in der Lage sind Immunreaktionen zu supprimieren.

4.4.1 Modellsystem zur Untersuchung der suppressiven Funktion

Murine DN T-Zellen sind in der Lage, allogene Immunantworten zu unterdrücken und dadurch Toleranz gegen ein Transplantat auszulösen (138;174;175). Um zu klären, ob auch humane DN T-Zellen allo-spezifische Effektorzellen supprimieren können, wurde folgendes Modellsystem entwickelt: Zunächst wurden DN T-Zellen von Spender A isoliert und mit alloogenen DCs von Spender B einmal wöchentlich für mehrere Wochen stimuliert (**Abb. 25 A**). Für die Suppressionsexperimente wurden DN T-Zellen zwischen der dritten und siebten Stimulation verwendet. Die letzte Restimulation lag mindestens sechs Tage zurück.

Am Tag des Versuchsansatzes wurden aus MNC des gleichen Spenders A $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen magnetisch aufgereinigt und mit CFSE gefärbt. Anschließend wurden diese Zellen mit alloogenen DCs (Spender B) und den vorstimulierten DN T-Zellen (Spender A) im Verhältnis 2 : 1 : 2 inkubiert (**Abb. 25 B**). Als Read-out wurde die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen untersucht.

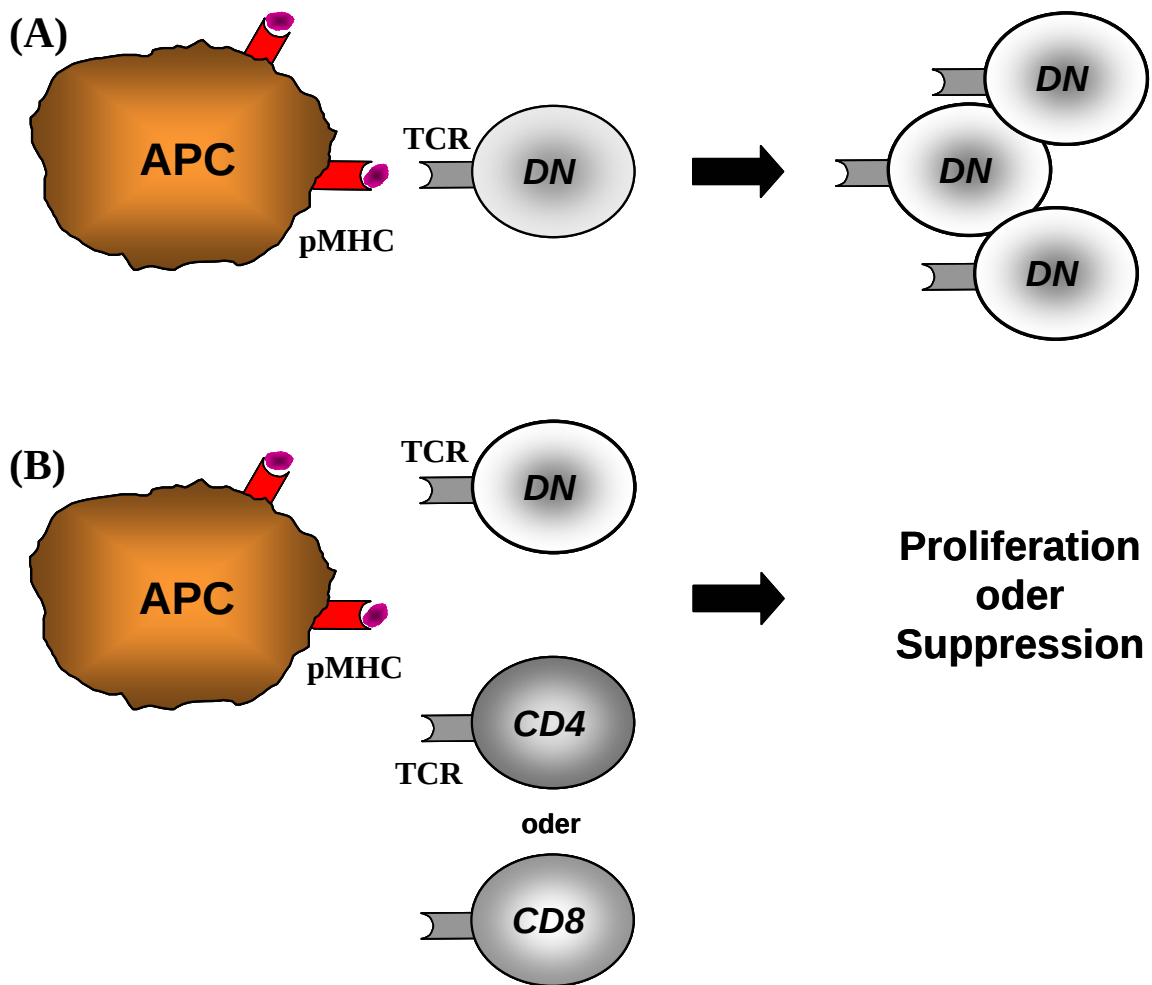
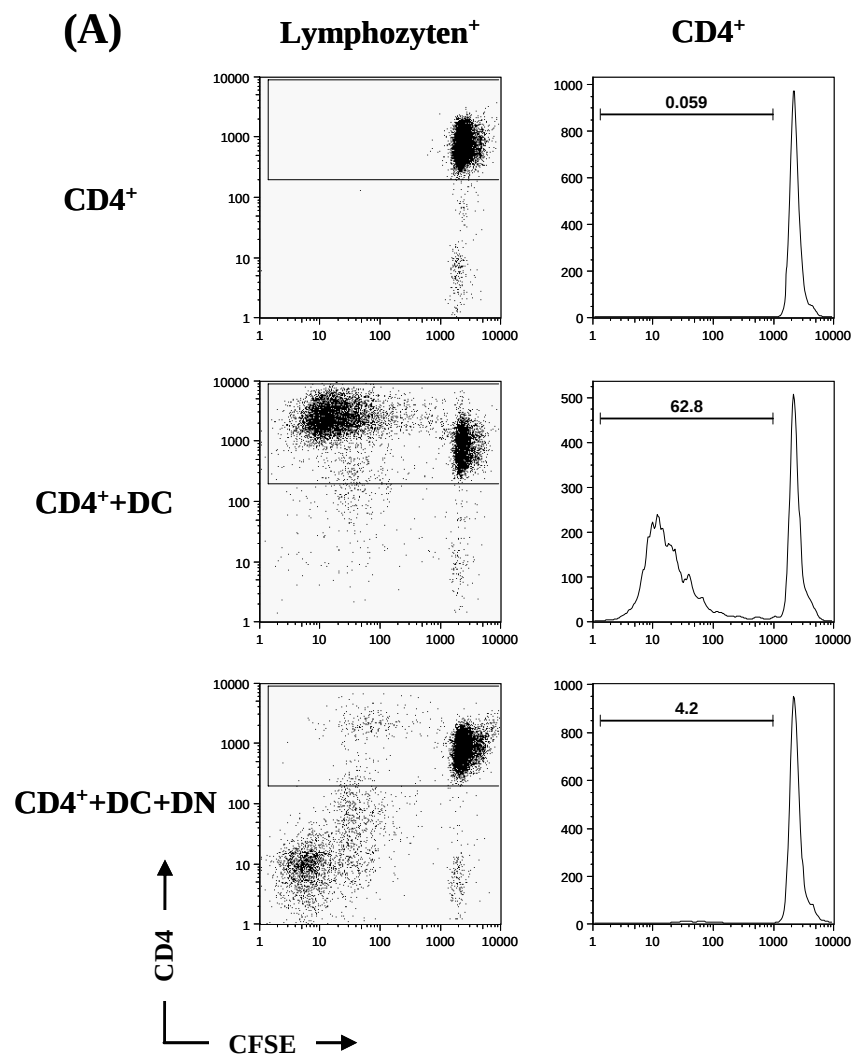


Abb. 25: Schematisches Modell des Versuchsaufbaus zur Analyse der suppressiven Aktivität von humanen DN T-Zellen. DN T-Zellen des Spenders A werden isoliert und über mehrere Wochen mit allogenen DCs des Spenders B stimuliert **(A)**. Am Versuchstag werden CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen des Spenders A isoliert und CFSE gefärbt. Anschließend werden die CD4⁺ T-Zellen zusammen mit allogenen DCs des Spenders B und den vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert **(B)**. Als Read-out System wurde die Proliferation der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen analysiert.

4.4.2 Suppressive Aktivität von DN T-Zellen

Der in **Abb. 25** dargestellte Versuchsaufbau diente als Nachweis der suppressiven Funktion von DN T-Zellen gegen allo-spezifische Effektorzellen. Frisch isolierte $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen wurden CFSE gefärbt und entweder mit allogenen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen in T-Zell-Medium inkubiert. Als Kontrolle wurden $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen ohne Stimulus ausgesät. Am sechsten Tag wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer analysiert.



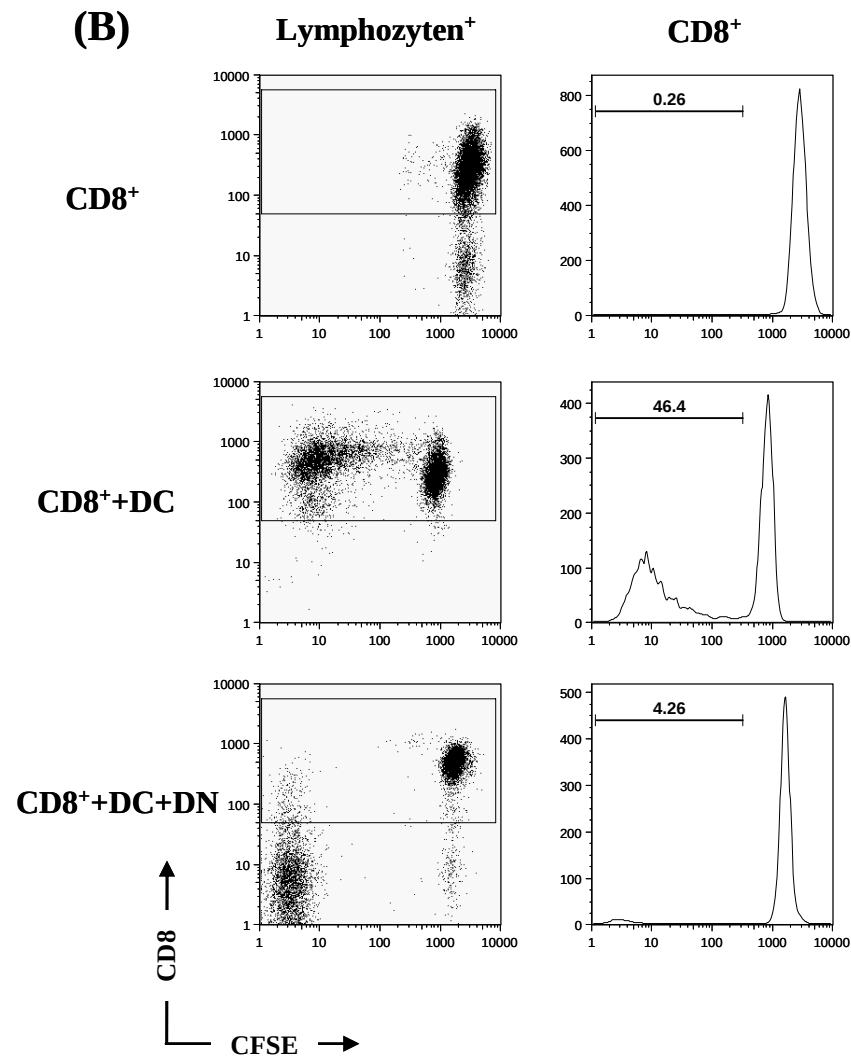


Abb. 26: Suppression alloreaktiver T-Zellantworten durch DN T-Zellen. CFSE gefärbte CD4⁺ (A) oder CD8⁺ T-Zellen (B) wurden mit allogenen DCs oder mit allogenen DCs und vorstimulierten DN T-Zellen kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen CD4 und CD8 gefärbt. Es wurde auf vitale Lymphozyten (Dotplots) und CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen (Histogramme) gated und die CFSE-Expression bestimmt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

In den **Abb. 26 A** und **B** sind Dotplots und Histogramme eines repräsentativen Experiments dargestellt. Nach sechs Tagen ohne Stimulation konnte keine Abnahme von CFSE festgestellt werden (obere Reihe). Eine Kokultur mit allogenen DCs führte zur Proliferation der alloreaktiven CD4⁺ (63%) oder CD8⁺ (46%) T-Zellen (mittlere Reihe). Durch Zugabe der vorstimulierten DN T-Zellen konnte diese Proliferation der alloreaktiven Effektorzellen fast vollständig unterdrückt werden (4%) (untere Reihe).

Die Suppression alloreaktiver T-Zellen durch DN T-Zellen wurde auch mit einem anderen Proliferationstest, dem ³H-Methyl-Thymidin-Assay, bestätigt. Wie in **Abb. 27** gezeigt, kommt

es bei $CD4^+$ (A) oder $CD8^+$ T-Zellen (B) ohne Stimulation zu keiner Aufnahme von 3H -Methyl-Thymidin. Nach Kokultur mit allogenen DCs konnte ein Einbau von 3H -Methyl-Thymidin in die $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen festgestellt werden, wobei $CD4^+$ Zellen deutlich stärker proliferierten als $CD8^+$ Zellen. Die Koinkubation mit vorstimulierten DN T-Zellen führte zu einer vollständigen Inhibition der Proliferation von $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. DN T-Zellen proliferieren nur unwesentlich nach Stimulation mit allogenen DCs

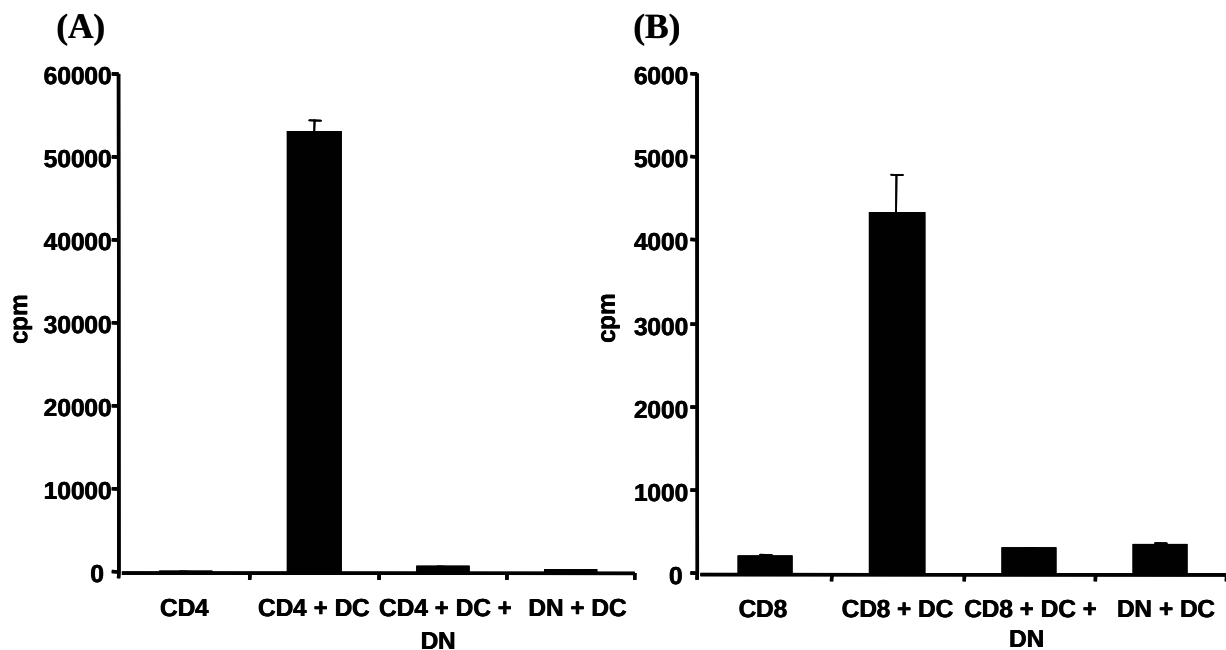


Abb. 27: Proliferation von $CD4^+$ (A) und $CD8^+$ (B) T-Zellen in Kokultur mit DN T-Zellen. Frisch isolierte $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen wurden mit allogenen DCs mit oder ohne vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Nach fünf Tagen wurde 3H -Methyl-Thymidin für 20 Stunden zugegeben. Als Kontrolle dienten $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen ohne Stimulation und eine Kokultur von DN T-Zellen und allogenen DCs. Dargestellt ist die Inkorporation von 3H -Methyl-Thymidin der Zellen als Mittelwerte der $cpm \pm SEM$.

Um das Ausmaß der suppressiven Aktivität humaner DN T-Zellen beurteilen zu können, wurde das Verhältnis von Effektor/Suppressor titriert. Dazu wurden vorstimulierte DN T-Zellen in verschiedenen Konzentrationen zu einer Kokultur aus CFSE markierten $CD4^+$ T-Zellen und allogenen DCs gegeben. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

In **Abb. 28** wurden vier unabhängige Experimente zusammengefasst. Nach fünf Tagen proliferierten durchschnittlich ca. 50% der $CD4^+$ T-Zellen. DN T-Zellen und $CD4^+$ T-Zellen

im Verhältnis 1 : 1 konnten die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen auf 10% inhibieren. Bis zu einer Verdünnung von 1 : 10 kam es noch zu einer signifikanten Inhibition der Proliferation alloreaktiver CD4⁺ T-Zellen.

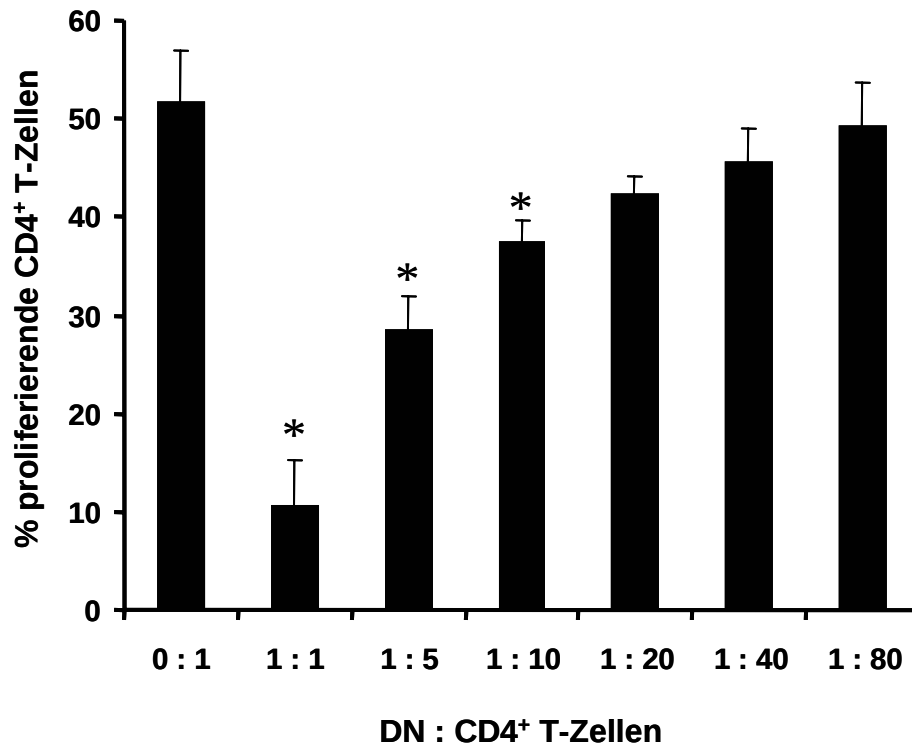


Abb. 28: DN T-Zellen supprimieren die Proliferation von alloreaktiven CD4⁺ T-Zellen dosisabhängig. CD4⁺ T-Zellen wurden CFSE gefärbt und mit allogenen DCs und verschiedenen Konzentrationen an vorstimulierten DN T-Zellen kokultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von vier unabhängigen Experimenten $\pm$ SEM. Sterne kennzeichnen die Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

4.4.3 DN T-Zell-vermittelte Suppression von vorstimulierten CD4⁺ T-Zellen

Es konnte nach allogener Stimulation gezeigt werden, dass vorstimulierte DN T-Zellen sehr effektiv frisch isolierte CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen supprimieren können (s. Abschnitt 4.4.2). Wir haben und daraufhin die Frage gestellt, ob DN T-Zellen auch die Proliferation von repetitiv stimulierten alloreaktiven Effektorzellen unterdrücken können.

In **Abb. 29** ist ein repräsentatives Experiment dargestellt. Nach Kokultur mit allogenen DCs proliferierten über 90% der vorstimulierten CD4⁺ T-Zellen. Durch Zugabe allogener vorstimulierter DN T-Zellen wurde die Proliferation der CD4⁺ Zellen stark gehemmt, wobei

ein Teil der T-Zellen trotz Anwesenheit der DN T-Zellen proliferierte. Die unstimulierten alloreaktiven T-Zellen proliferierten nicht.

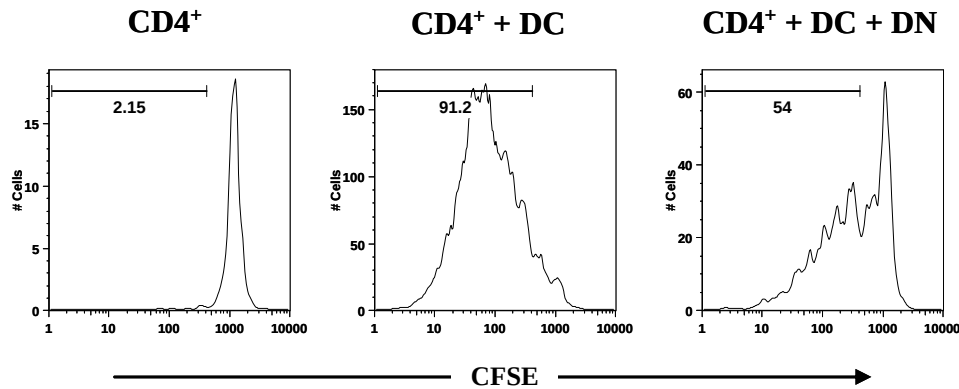


Abb. 29: DN T-Zell-vermittelte Suppression von alloreaktiven T-Zelllinien. $CD4^+$ T-Zellen wurden isoliert und vier bis sechs Wochen mit allogenen DCs stimuliert. Im Anschluss daran wurden die T-Zellen mit CFSE markiert und entweder mit allogenen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen in T-Zell-Medium ausgesät. Nach sechs Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die CFSE Expression vitaler $CD4^+$ T-Zellen. Dargestellt ist eines von insgesamt vier durchgeführten Experimenten.

4.4.4 Suppressive Aktivität von frisch isolierten DN T-Zellen

Um zu klären, ob das immunregulatorische Potential der DN T-Zellen erst durch die repetitive Stimulation mit allogenen DCs induziert wird, wurde die suppressive Aktivität von frisch isolierten DN T-Zellen untersucht. Hierfür wurden $CD4^+$ T-Zellen und DN T-Zellen magnetisch isoliert. Anschließend wurden die $CD4^+$ T-Zellen mit CFSE gefärbt und mit allogenen DCs und DN T-Zellen inkubiert. Als Kontrollen wurden unstimulierte oder mit allogenen DCs stimulierte $CD4^+$ T-Zellen verwendet. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und durchflusszytometrisch die CFSE Expression der $CD4^+$ T-Zellen bestimmt..

Wie in **Abb. 30** dargestellt, proliferierten die $CD4^+$ T-Zellen ohne Stimulation nicht. Nach Kokultur mit allogenen DCs proliferierten ca. 86% $CD4^+$ T-Zellen. Die Zugabe von frisch isolierten DN T-Zellen führte zu keiner Suppression der Proliferation.

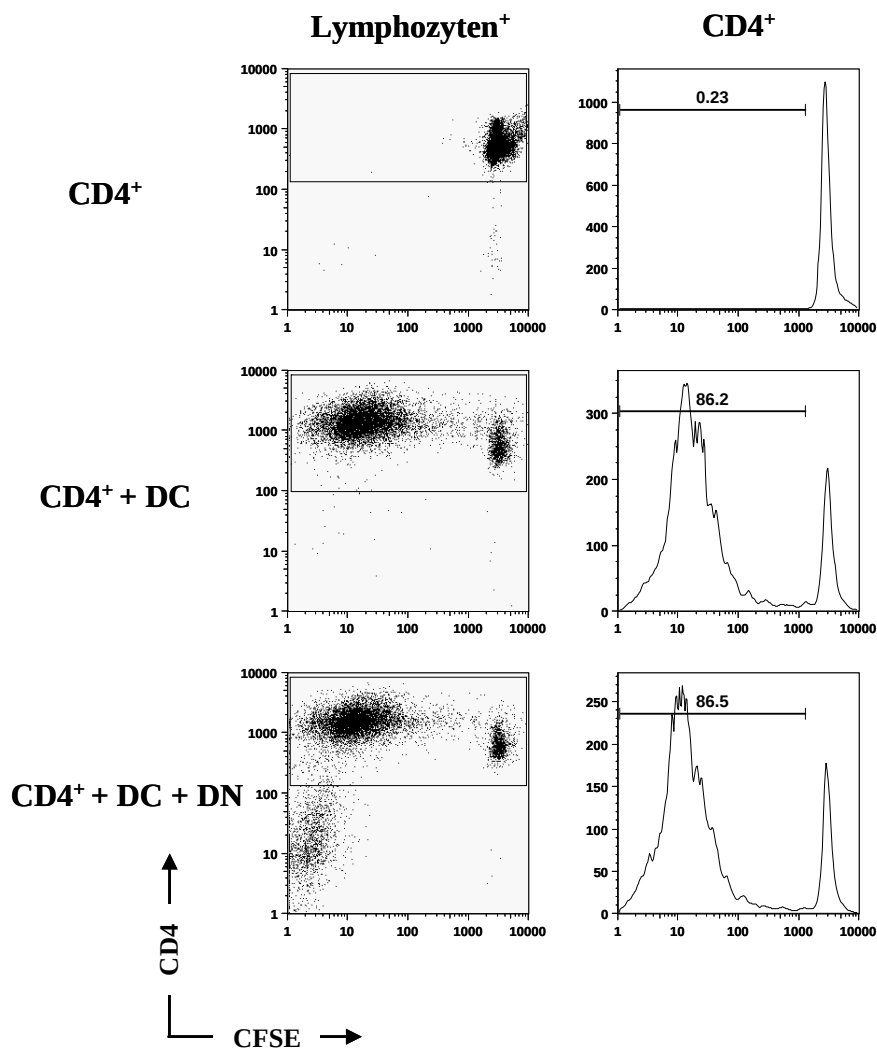


Abb. 30: Suppressive Aktivität von frisch isolierten DN T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden isoliert und CFSE gefärbt. DN T-Zellen wurden ebenfalls frisch aufgereinigt und mit den CD4⁺ T-Zellen und allogenen DCs inkubiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte oder mit allogenen DCs stimulierte CD4⁺ T-Zellen. Die Dotplots zeigen die CFSE Expression vitaler Lymphozyten, die Histogramme die CFSE Färbung von CD4⁺ T-Zellen. Dargestellt ist eines von insgesamt drei durchgeführten Experimenten.

4.4.5 Generierung von immunregulatorischen DN T-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass nur mit allogenen DCs stimulierte nicht aber frisch isolierte DN T-Zellen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen unterdrücken können (s. Abschnitt 4.4.2 und 4.4.5). Um zu überprüfen, inwieweit die Stimulation mit allogenen DCs Voraussetzung für die suppressive Aktivität der DN T-Zellen ist, wurden DN T-Zellen entweder mit anti-CD3/CD28 Beads oder mit allogenen DCs über mehrere Wochen stimuliert. Anschließend wurden die vorstimulierten DN T-Zellen mit CFSE gefärbten CD4⁺ T-Zellen und allogenen DCs kokultiviert.

Abb. 31 zeigt ein repräsentatives von insgesamt drei durchgeführten Experimenten. Die Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen mit den allo genen DCs führte zu einer Proliferation der alloreaktiven Zellen (80%). Die Zugabe von DN T-Zellen, die mit anti-CD3/CD28 Beads expandiert wurden, hatte keinen Einfluss auf die Proliferation der $CD4^+$ Zellen (82%). Im Gegensatz dazu konnten die mit allo genen DCs stimulierten DN T-Zellen die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen stark hemmen (18%).

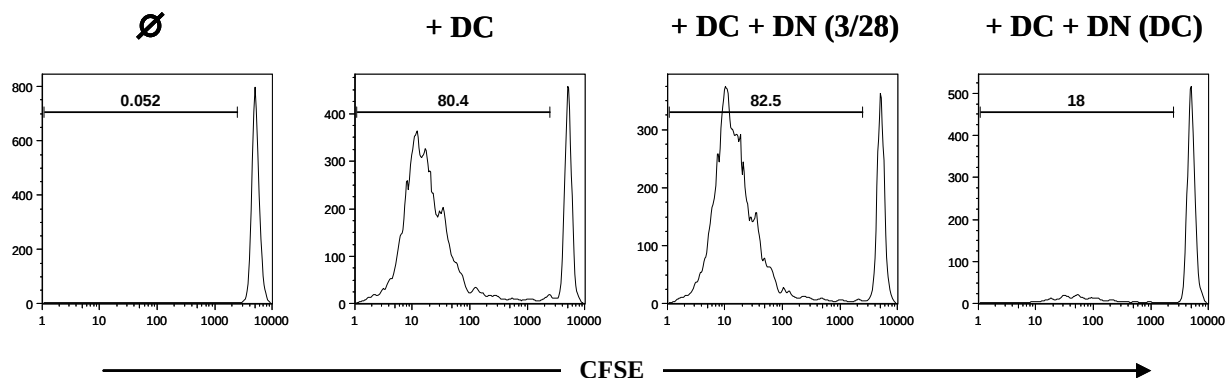


Abb. 31: Vergleich der suppressiven Aktivität von anti-CD3/CD28- und DC-stimulierten DN T-Zellen. DN T-Zellen wurden über mehrere Wochen entweder mit anti-CD3/CD28 Beads oder mit allo genen DCs stimuliert. $CD4^+$ T-Zellen wurden CFSE gefärbt und mit den expandierten DN T-Zellen und allo genen DCs kokultiviert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme zeigen die CFSE Expression von $CD4^+$ T-Zellen.

4.4.6 Induktion der suppressiven Aktivität von DN T-Zellen

Regulatorischen T-Zellen, wie $CD4^+$ $CD25^+$ T-Lymphozyten, Tr1 Zellen oder murine DN T-Zellen, benötigen für ihre suppressive Aktivität eine Stimulation des TCR mit dem spezifischen Antigen (82;108;137). Deshalb sollte untersucht werden, ob die Erkennung des Antigens die suppressive Funktion humaner DN T-Zellen auslöst. Hierzu wurde zunächst eine HLA-Typisierung von verschiedenen Spendern durchgeführt. Von zwei Spendern, die größtenteils MHC different waren, wurden DCs generiert (**Abb. 32 A**). Anschließend wurden DN T-Zellen von Spender X mit allo genen DCs von Spender A über mehrere Wochen stimuliert. Dadurch sollten DN T-Zellen generiert werden, deren TCR spezifisch die Alloantigene von Spender A erkennt, nicht aber die Alloantigene von Spender B. Hierzu wurden $CD4^+$ T-Zellen von Spender X mit CFSE gefärbt und mit den expandierten DN T-

Zellen und allo-genen DCs von Spender A oder mit den expandierten DN T-Zellen und den allo-genen DCs von Spender B kokultiviert. Als Kontrolle wurden $CD4^+$ T-Zellen in Kokultur mit allo-genen DCs von Spender A verwendet.

Wie in **Abb. 32 B** gezeigt, proliferierten nach Kokultur mit den allo-genen DCs ca. 63% der $CD4^+$ T-Zellen. Die mit den allo-genen DCs des Spenders A expandierten DN T-Zellen konnten die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen stark hemmen (ca. 6% Proliferation). Dagegen konnten die DN T-Zellen nach der Stimulation mit allo-genen DCs von Spender B die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen nur eingeschränkt unterdrücken (ca. 39%).

(A)

	HLA-A	HLA-B	HLA-Bw	HLA-Cw
Donor A	2, 24(9)	8, 62(15)	6	3, 7
Donor B	3, 3	35, 35	6	4, 4

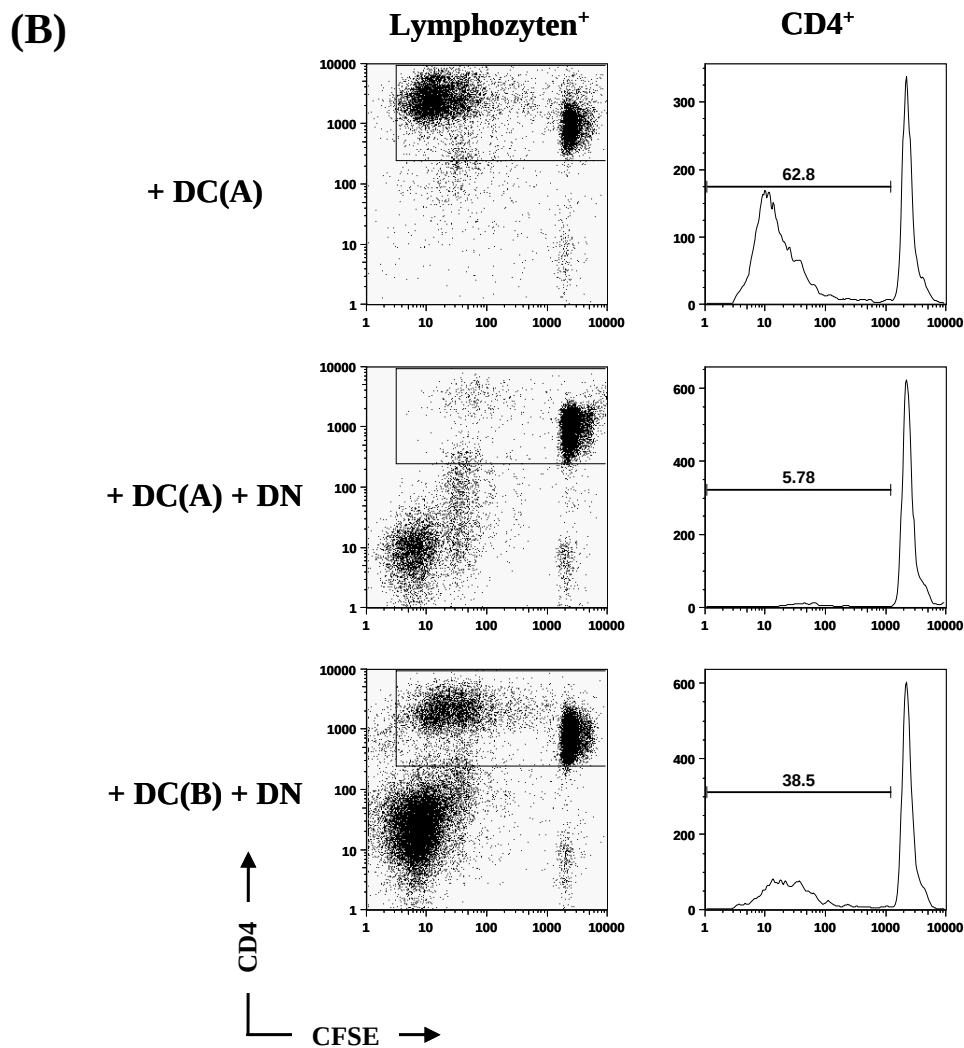


Abb. 32: Abhängigkeit der DN T-Zell-vermittelten suppressiven Aktivität von der TCR-Spezifität. **(A)** HLA-Typisierung von Spender A und B. **(B)** DN T-Zellen von Spender X wurden über mehrere Wochen mit DCs von Spender A expandiert. CD4⁺ T-Zellen von Spender X wurden CFSE gefärbt und mit den expandierten DN T-Zellen und DCs von Spender A oder mit den DN T-Zellen und DCs von Spender B inkubiert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und die CFSE Expression analysiert. Die Dotplots zeigen vitale Zellen, die Histogramme sind auf CD4⁺ Zellen gated. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.4.7 Aktivierungszustand der supprimierten T-Zellen

Als nächstes wurde der Aktivierungszustand der supprimierten T-Zellen untersucht. Hierfür wurden CD4⁺ T-Zellen CFSE gefärbt und mit allogenen DCs und vorstimulierten DN T-Zellen kokultiviert. Nach sechs und acht Tagen wurden die Zellen geerntet und mit Antikörper gegen CD4 und CD25 gefärbt. Die Expression von CD25 ist ein klassischer

Marker für aktivierte T-Zellen (205;206). Somit konnte überprüft werden, ob DN T-Zellen nur die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen oder auch ihre Aktivierung unterdrücken. Als Kontrolle wurden $CD4^+$ T-Zellen ohne Stimulation oder in Kokultur mit allogenen DCs verwendet.

Nach Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen mit allogenen DCs exprimierten die proliferierenden Zellen CD25 (**Abb. 33**). Die Zugabe von vorstimulierten DN T-Zellen konnte sowohl die Proliferation als auch die CD25 Expression auf den $CD4^+$ T-Zellen aufheben. Ohne Stimulation konnte weder eine Proliferation der $CD4^+$ Zellen noch eine Hochregulation von CD25 nachgewiesen werden.

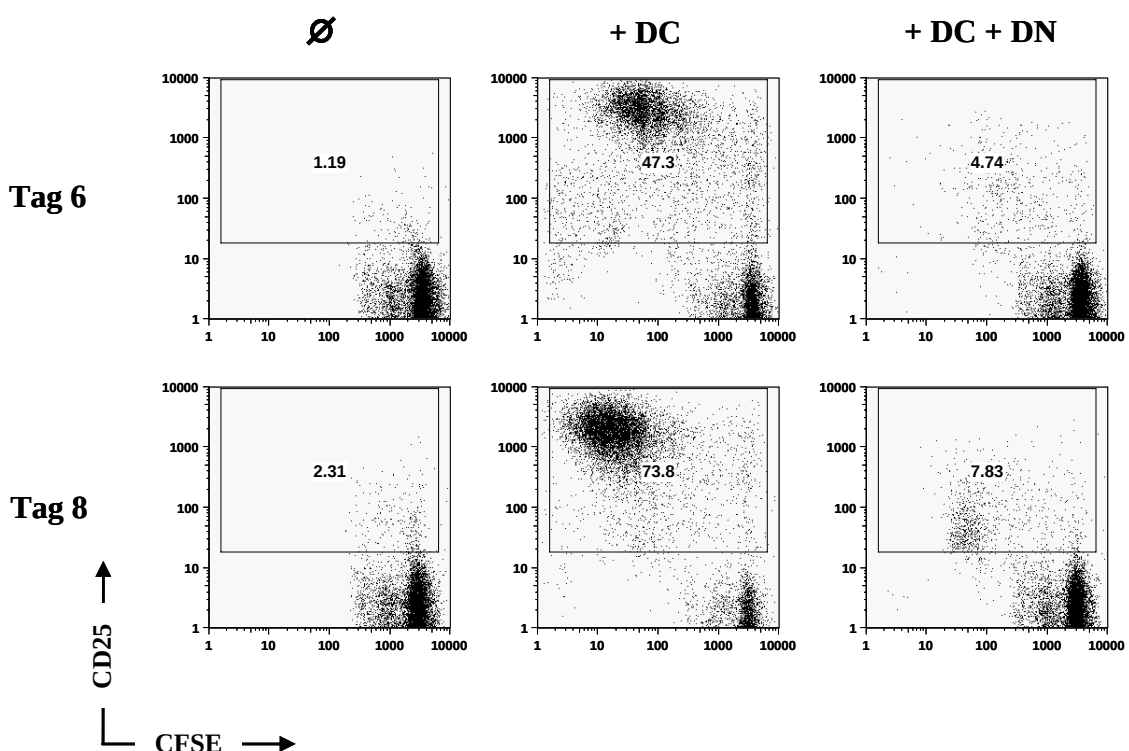


Abb. 33: Aktivierungszustand der $CD4^+$ T-Zellen. $CD4^+$ T-Zellen wurden CFSE gefärbt und mit allogenen DCs oder mit allogenen DCs und vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Am sechsten bzw. achten Tag wurden die Zellen geerntet und mit Antikörpern gegen CD4 und CD25 gefärbt. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte $CD4^+$ T-Zellen. Die Dotplots zeigen die CD25 (y-Achse) und CFSE (x-Achse) Expression auf $CD4^+$ Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.4.8 Kompensation der Suppression durch exogenes IL-2

In verschiedenen Publikationen wurde beschrieben, dass regulatorische T-Zellen die Produktion von IL-2 hemmen und dadurch die Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen unterdrücken.

Durch exogene Zugabe von IL-2 kann dieser Effekt aufgehoben werden (75;76;132;195). Es sollte nun untersucht werden, ob auch die suppressive Aktivität von humanen DN T-Zellen durch exogenes IL-2 kompensiert werden kann. Um einen maximalen proliferativen Effekt durch Zugabe von exogenen IL-2 zu erzielen, wurden für den Versuch $CD8^+$ T-Zellen verwendet. Diese wurden CFSE gefärbt und mit allogenen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen in T-Zell-Medium inkubiert. Des Weiteren wurde exogen 300 U/ml IL-2 zugegeben. Als Kontrolle wurden $CD8^+$ T-Zellen ohne Stimulus verwendet. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

Die Stimulation mit allogenen DCs führte zur Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen (**Abb. 34**), die durch Zugabe von exogenem IL-2 noch verstärkt wurde. Ohne Stimulation konnte keine Abnahme von CFSE festgestellt werden, wohingegen 300 U/ml IL-2 auch ohne TCR-Stimulus eine unspezifische Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen auslöste. Nach Kokultur mit vorstimulierten DN T-Zellen konnte eine Suppression der Proliferation beobachtet werden. Diese wurde durch Zugabe von exogenen IL-2 nicht kompensiert.

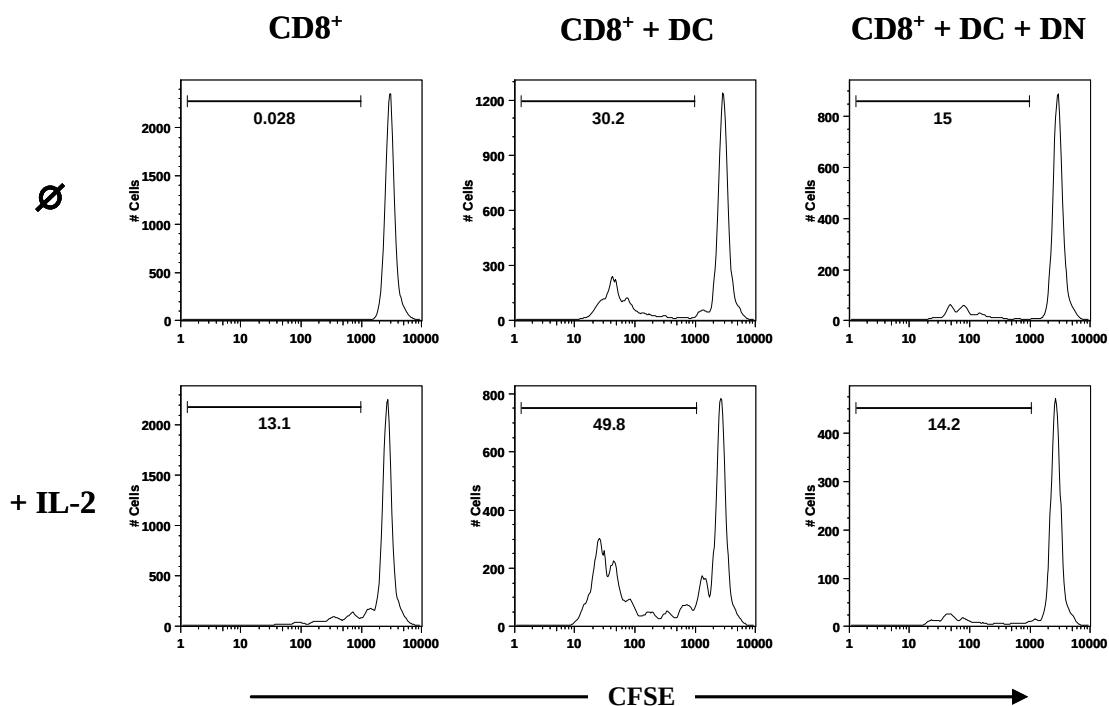


Abb. 34: Wirkung von IL-2 auf die DN T-Zell-vermittelte Suppression alloreaktiver $CD8^+$ T-Zellen. $CD8^+$ T-Zellen wurden mit CFSE markiert und mit allogenen DCs oder mit allogenen DCs und vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Zusätzlich wurde exogen 300 U/ml IL-2 zugegeben. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte $CD8^+$ T-Zellen. Nach fünf Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD8 gefärbt und analysiert. Die Histogramme zeigen die CFSE Expression von $CD8^+$ T-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.4.9 Proliferation von CD8⁺ T-Zellen in Anwesenheit von vorstimulierten CD8⁺ T-Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass anergische T-Zellen mit Antigen-spezifischen T-Zellen um die Oberflächenmoleküle der APCs konkurrieren. Dadurch kann die Proliferation der spezifischen T-Zellen gehemmt werden (207;208). Um zu klären, ob humane DN T-Zellen ebenfalls diesen Mechanismus der Suppression verwenden, sollte eine mögliche Blockade der Oberfläche von APCs durch die DN T-Zellen untersucht werden. Hierfür wurden zunächst CD8⁺ T-Zellen isoliert und über mehrere Wochen mit allogenen DCs stimuliert. Für den Versuch wurden nochmals CD8⁺ T-Zellen aufgereinigt und mit CFSE gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit allogenen DCs und expandierten DN T-Zellen oder mit allogenen DCs und den vorstimulierten CD8⁺ T-Zellen inkubiert. Als Kontrolle wurden die CFSE markierten CD8⁺ T-Zellen ohne Stimulation oder in Kokultur mit allogenen DCs verwendet.

In **Abb. 35** ist eines von drei durchgeführten Experimenten dargestellt. Nach Stimulation mit allogenen DCs konnte eine Proliferation der CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden. Die Kokultur mit DN T-Zellen verursachte eine Inhibition der Proliferation. Im Gegensatz dazu hatten die vorstimulierten CD8⁺ T-Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation der CFSE markierten Zellen.

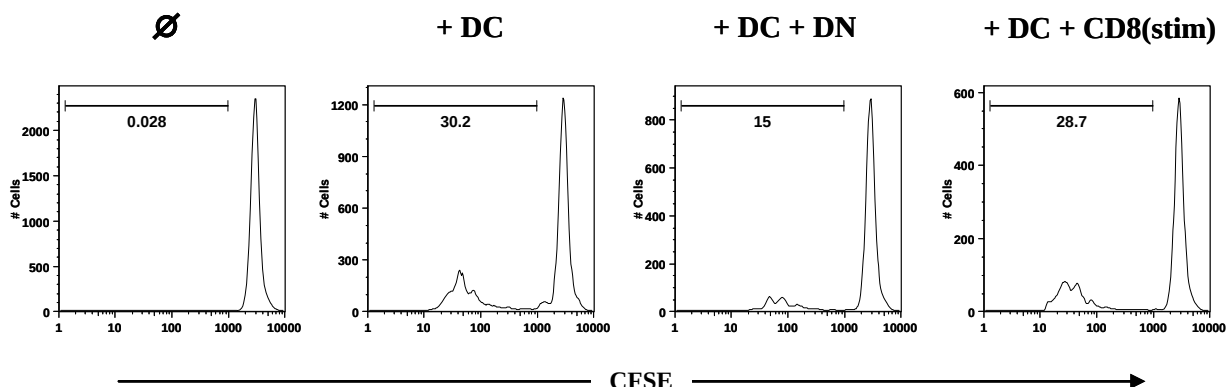


Abb. 35: Blockade der Oberflächenmoleküle von APCs durch vorstimulierte Zellen. CD8⁺ und DN T-Zellen wurden über mehrere Wochen mit allogenen DCs vorstimuliert. Anschließend wurden CD8⁺ T-Zellen frisch isoliert, mit CFSE gefärbt und mit allogenen DCs und entweder den vorstimulierten DN T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten CD8⁺ T-Zellen ohne Stimulation oder in Kokultur mit allogenen DCs. Die Histogramme zeigen die CFSE Expression von CD8⁺ Zellen.

4.4.10 Blockade der zytotoxischen Aktivität von DN T-Zellen

In Abschnitt 4.2.3.2 wurde gezeigt, dass humane DN T-Zellen eine Antigen-spezifische zytotoxische Funktion aufweisen. Nun sollte überprüft werden, ob die Zytotoxizität der DN T-Zellen bei der Suppression alloreaktiver T-Zellantworten eine Rolle spielt. Hierzu wurden vorstimulierte DN T-Zellen für 20 Stunden mit CMA oder als Kontrolle in T-Zell-Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit allophenen DCs und CFSE markierten $CD4^+$ T-Zellen kokultiviert. Als Positivkontrolle wurden $CD4^+$ T-Zellen mit allophenen DCs stimuliert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Wie in **Abb. 36** gezeigt, proliferierten die $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit allophenen DCs, wogegen die Inkubation mit den unbehandelten DN T-Zellen eine Hemmung der Proliferation verursachte. Durch Blockade der DN T-Zell-vermittelten Zytotoxizität konnten in der Kultur auch nach sechs Tagen noch DCs beobachtet werden (roter Kreis). Dennoch wurde die Proliferation der $CD8^+$ T-Zellen im gleichen Maße supprimiert.

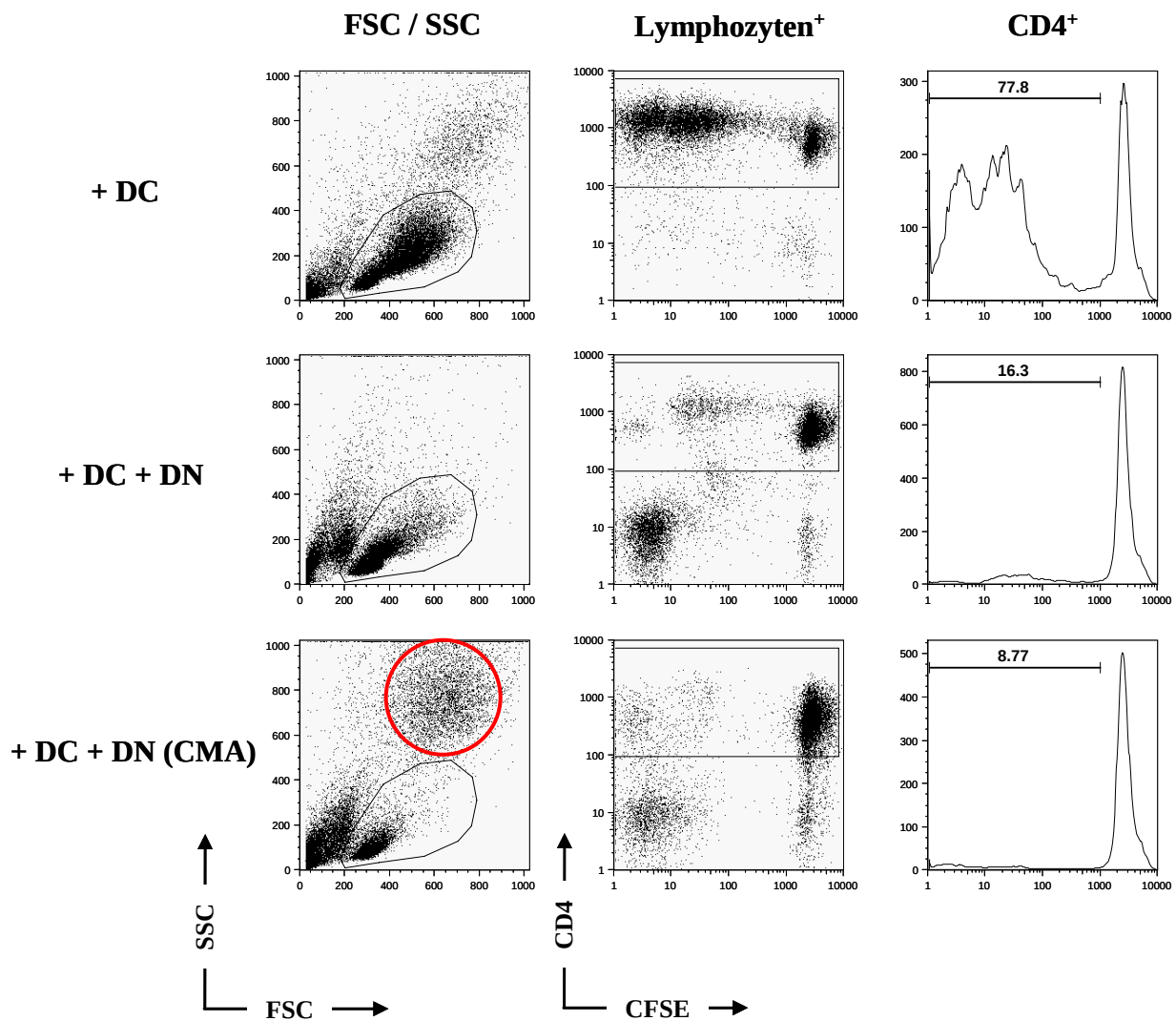


Abb. 36: Blockade der DN T-Zell-vermittelten Zytotoxizität durch CMA. Vorstimulierte DN T-Zellen wurden 20 Stunden mit CMA inkubiert und anschließend mit CFSE gefärbten CD4⁺ T-Zellen und allogenen DCs kokultiviert. Als Kontrollkulturen wurden CD4⁺ T-Zellen mit allogenen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen koinkubiert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und analysiert. Die Dotplots zeigen zum einen die Zellen im Vorwärts-Seitwärts-Scatter zum anderen vitale Lymphozyten, die Histogramme sind auf CD4⁺ Zellen gegated.

4.4.11 Zytokinprofil expandierter DN T-Zellen

Murine DN T-Zellen produzieren nach Aktivierung überwiegend IFN- γ und TNF, sowie geringe Mengen an TGF- β , aber kein IL-2, IL-4, IL-10 oder IL-13 (137). Ein ähnliches Zytokinmuster zeigen sowohl der DN T-Zellklon T4H2 als auch primäre humane DN T-Zellen nach Stimulation mit allogenen DCs (s. Abschnitt 4.1 und 4.2.3.1). Zunächst sollte untersucht werden, welches Zytokinprofil während der Suppression sezerniert werden.

Hierzu wurden $CD4^+$ T-Zellen isoliert und mit allo-genen DCs oder mit allo-genen DCs und vorstimulierten DN T-Zellen in T-Zell-Medium kokultiviert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand abgenommen und mit Hilfe des Human Cytokine Antibody Arrays analysiert.

In **Abb. 37** ist eines von zwei durchgeführten Experimenten dargestellt. Nach Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen mit allo-genen DCs konnte ein charakteristisches Zytokinmuster detektiert werden. Die Zugabe von vorstimulierten DN T-Zellen führte zu einem ähnlichen Zytokinprofil, wobei die Signale der Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 deutlich stärker waren.

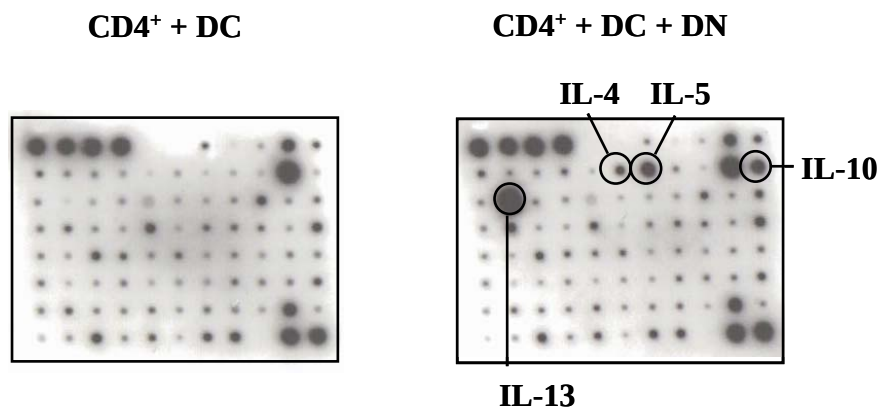


Abb. 37: Zytokinprofil von alloreaktiven $CD4^+$ T-Zellen mit bzw. ohne Zugabe von DN T-Zellen. $CD4^+$ T-Zellen wurden mit allo-genen DCs oder mit allo-genen DCs und DN T-Zellen inkubiert. Nach 24 Stunden wurde 1 ml Überstand auf Cytokine Antibody Array Membranen aufgetragen und analysiert. Jedes Signal zeigt ein spezifisches Zytokin.

Da diese Methode nur zu einem qualitativen Ergebnis führt, wurden die Zytokinsekretion auch quantitativ mittels Cytokine Bead Array (CBA) untersucht. Dazu wurden $CD4^+$ T-Zellen mit allo-genen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Des Weiteren wurden expandierte DN T-Zellen ebenfalls mit allo-genen DCs stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die sezernierten Zytokine mit Hilfe des CBA analysiert.

In **Abb. 38** wurden drei unabhängige Experimente zusammengefasst. Nach einer 24stündigen Stimulation der $CD4^+$ T-Zellen mit allo-genen DCs konnte meist nur eine geringe Produktion von Zytokinen festgestellt werden. Nur die $CD4^+$ T-Zellen eines Spenders sezernierten größere Mengen an TNF und IL-10 (ca. 3800 pg/ml bzw. 3200 pg/ml), während in Experimenten mit anderen Spendern nur sehr wenig TNF und IL-10 produziert wurde (< 100 pg/ml). Dagegen führte die Stimulation der expandierten DN T-Zellen mit allo-genen DCs zu einer starken Zytokinsekretion, wobei vor allem IL-5 (ca. 4200 pg/ml), IL-4 (ca. 1200 pg/ml) und IFN- γ (ca. 800 pg/ml) gebildet wurden. In den Kokulturen aus $CD4^+$ T-Zellen, allo-genen

DCs und DN T-Zellen wurde im Vergleich zur Stimulation der DN T-Zellen eine tendenziell höhere Zytokinproduktion beobachtet, jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

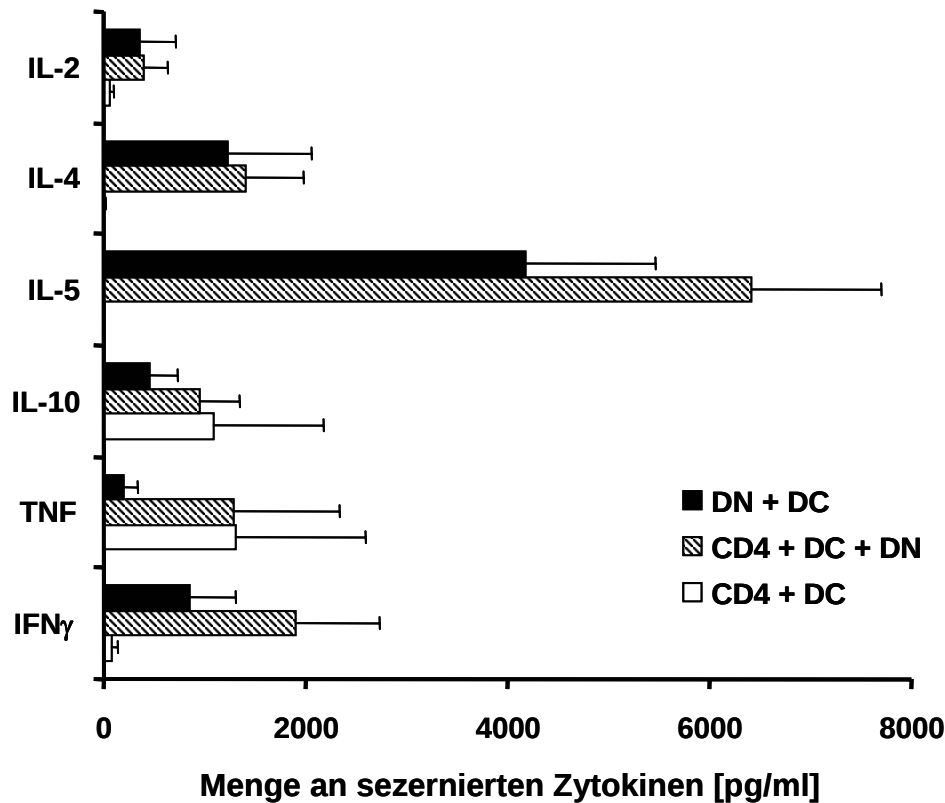


Abb. 38: Quantitative Analyse der produzierten Zytokine. CD4⁺ T-Zellen wurden mit allogenen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Darüber hinaus wurden expandierte DN T-Zellen mit allogenen DCs stimuliert. Nach 24 Stunden wurde der Überstand mit Hilfe des CBA auf die produzierten Zytokine untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ SEM von drei Experimenten.

4.4.12 Zell-Zell-Kontakt abhängige Suppression von alloreaktiven T-Zellen

Verschiedene regulatorische T-Zellpopulationen, wie Tr1 Zellen oder CD8⁺ Suppressorzellen, üben ihre suppressive Aktivität durch sezernierte Zytokine wie z.B. IL-10 aus (108;134), wohingegen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen oder CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen über Zell-Zell-Kontakt abhängige Mechanismen agieren (84;130). Um zu klären, ob humane DN T-Zellen ebenfalls durch einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus supprimieren, wurden Transwell-Experimente durchgeführt.

CD4⁺ T-Zellen wurden CFSE gefärbt und mit allogenen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen in die untere Kammer ausgesät. Darüber hinaus wurden DN T-

Zellen zusammen mit allogenen DCs in die obere Kammer einer 0,4 μm Transwell-Platte gegeben. Dadurch wurden die DN T-Zellen stimuliert, konnten aber nur indirekt mit den CD4^+ T-Zellen interagieren. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Wie in **Abb. 39** gezeigt, konnte nach Stimulation mit allogenen DCs eine Proliferation der CD4^+ T-Zellen beobachtet werden. Die Koinkubation mit den DN T-Zellen in der gleichen Kammer führte zu einer Hemmung dieser Proliferation. Wurden die DN T-Zellen jedoch von den CD4^+ T-Zellen durch die Membran voneinander getrennt, konnte keine Inhibition der Proliferation mehr festgestellt werden.

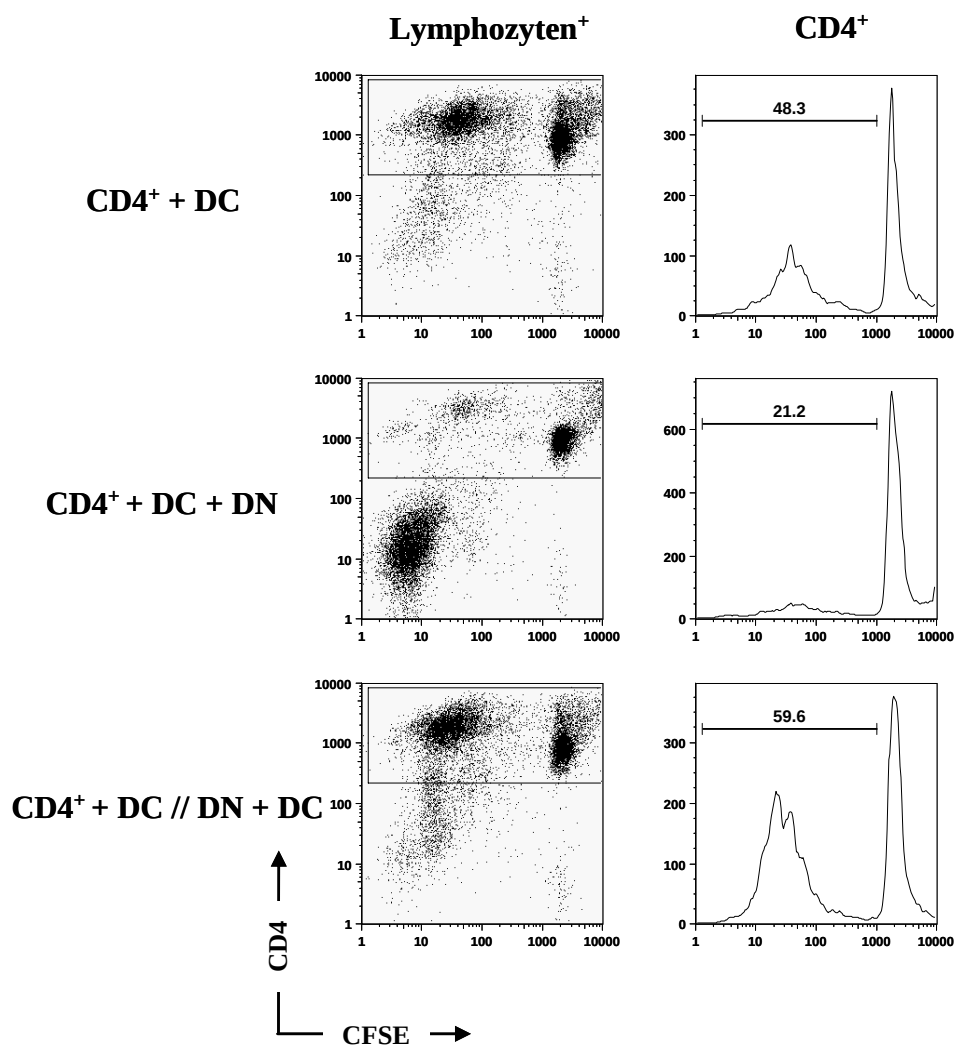


Abb. 39: Zell-Zell-Kontakt-Abhängigkeit der DN T-Zell-vermittelten Suppression. CD4^+ T-Zellen wurden CFSE gefärbt und mit allogenen DCs oder mit allogenen DCs und vorstimulierten DN T-Zellen in die untere Kammer des Transwell-Systems ausgesät. In einem Ansatz wurden zusätzlich DN T-Zellen und allogene DCs in die obere Kammer gegeben. Nach sechs Tagen wurden die Zellen der unteren Kammer analysiert. Die Dotplots zeigen vitale Lymphozyten, die Histogramme sind auf CD4^+ Zellen gegated. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.4.13 Eliminierung allo-spezifischer T-Zellen

Im Gegensatz zu $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen oder $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen, die Anergie in den Effektorzellen induzieren, unterdrücken murine DN T-Zellen Immunreaktionen durch Eliminierung der reaktiven Zellen (91;92;130;137). Deshalb sollte untersucht werden, über welchen Mechanismus humane DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität vermitteln. Hierfür wurden zunächst $CD4^+$ T-Zellen mit CFSE markiert und mit allo-genen DCs und vorstimulierten DN T-Zellen drei Tage kultiviert. Als Kontrolle wurden $CD4^+$ T-Zellen nur mit allo-genen DCs stimuliert. Anschließend wurden die $CD4^+$ Zellen mittels FACS Aria isoliert und nochmals mit allo-genen DCs kokultiviert. Wenn die DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität durch Eliminierung alloreaktiver Zellen vermitteln, sollten keine allospezifischen Zellen in der $CD4^+$ Zellpopulation mehr vorhanden sein. Nach weiteren fünf Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und im Durchflussszytometer analysiert. Wie in **Abb. 40** ersichtlich, proliferierten die $CD4^+$ T-Zellen nach Stimulation mit allo-genen DCs. Dagegen konnte durch die Inkubation mit den vorstimulierten DN T-Zellen und allo-genen DCs eine vollständige Hemmung der Proliferation von $CD4^+$ T-Zellen beobachtet werden. Nachdem die supprimierten $CD4^+$ T-Zellen aus der Kokultur durchflussszytometrisch isoliert und nochmals mit allo-genen DCs stimuliert wurden, proliferierten die $CD4^+$ Zellen jedoch wieder unvermindert.

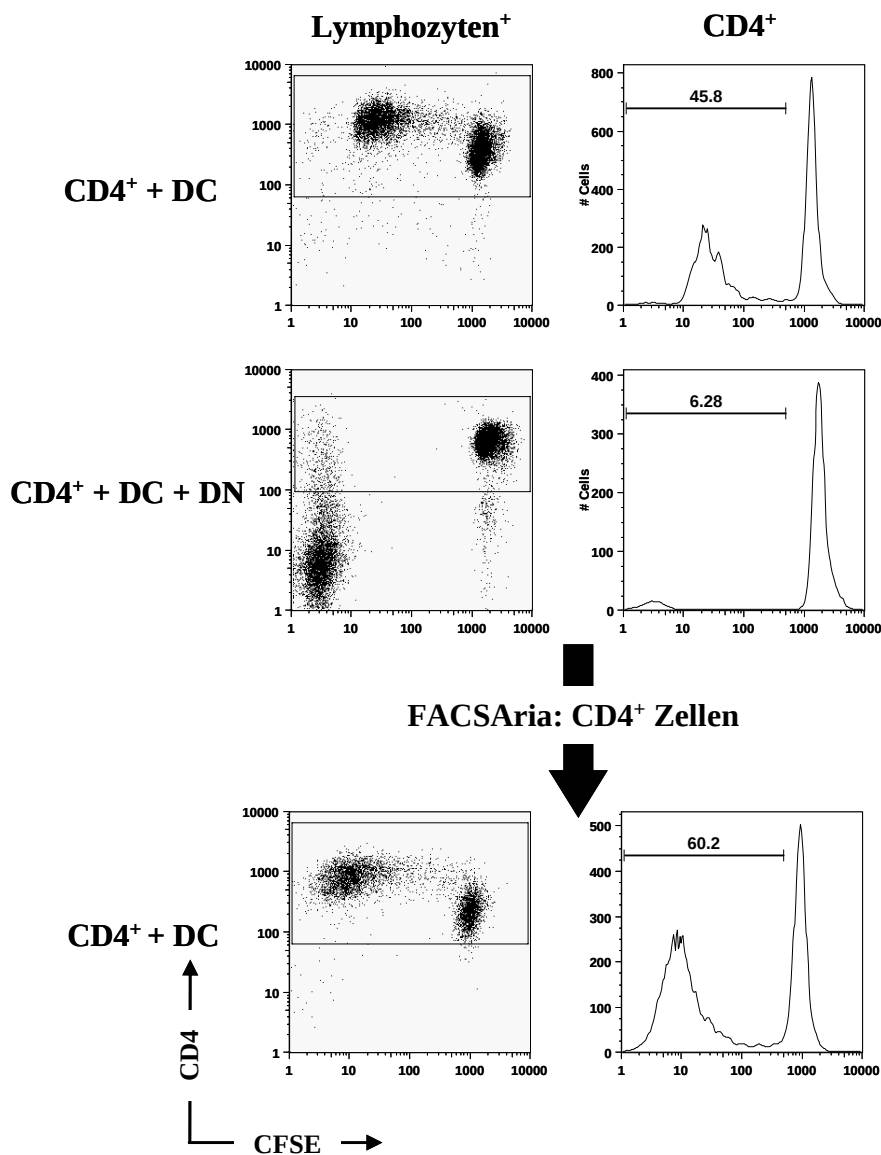


Abb. 40: Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Inkubation mit DN T-Zellen. CD4⁺ T-Zellen wurden isoliert und mit allogenen DCs oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Nach drei Tagen wurden die Zellen analysiert. Anschließend wurden die CD4⁺ Zellen aus der Kokultur mit den DN T-Zellen gesortet und nochmals mit allogenen DCs stimuliert. Nach fünf Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Die Dotplots zeigen vitale Lymphozyten, die Histogramme sind auf CD4⁺ Zellen gated. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

4.4.14 DN T-Zell-vermittelte Modifikation von APCs

Regulatorische T-Zellen können auch durch eine Modifikation der APCs Immunreaktionen unterdrücken. So hemmen CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen die Aktivierung der APCs und verhindern dadurch die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle. Stattdessen exprimieren diese tolerogenen APCs inhibitorische Oberflächenmoleküle wie ILT3 und ILT4 (130;132). Nun sollte überprüft werden, ob humane DN T-Zellen ebenfalls ihre suppressive Aktivität durch

Modifikation der APCs ausüben. Da künstliche APCs nicht von DN T-Zellen verändert werden können, wurden für die Stimulation anti-CD3/CD28 Beads anstelle von allogenen DCs verwendet. Für den Versuch wurden $CD4^+$ T-Zellen CFSE gefärbt und mit anti-CD3/CD28 Beads oder zusätzlich mit vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Als Kontrolle dienten $CD4^+$ T-Zellen ohne Stimulation. Nach sechs Tagen wurden die Beads magnetisch entfernt und im Durchflusszytometer analysiert.

Wie in **Abb. 41** gezeigt, konnte eine Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen nach polyklonaler Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads festgestellt werden. Die Koinkubation mit DN T-Zellen führte jedoch zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation. Trotzdem konnten die DN T-Zellen die $CD4^+$ T-Zellen nicht vollständig inhibieren. Unstimulierte $CD4^+$ T-Zellen zeigten keine Abnahme von CFSE.

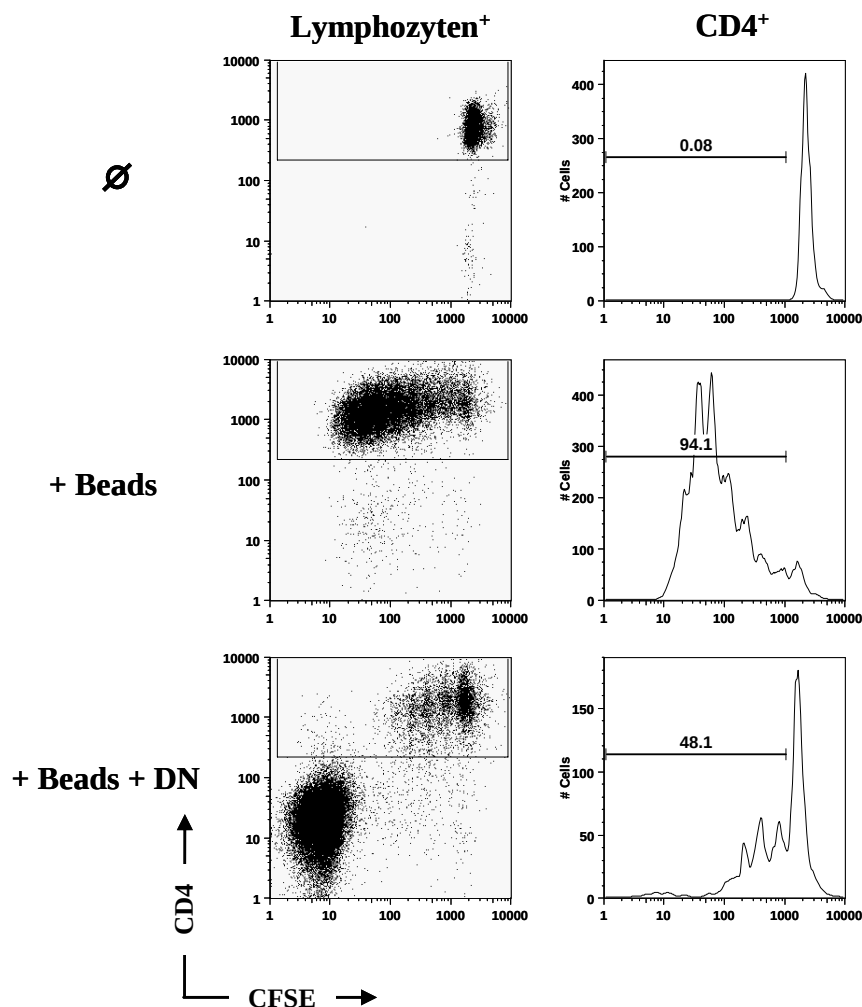


Abb. 41: Proliferation von polyklonal stimulierten $CD4^+$ T-Zellen in Kokultur mit DN T-Zellen. $CD4^+$ T-Zellen wurden mit CFSE markiert und mit anti-CD3/CD28 Beads oder mit anti-CD3/CD28 Beads und vorstimulierten DN T-Zellen inkubiert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD4 gefärbt und analysiert. Die Dotplots zeigen vitale Lymphozyten, die Histogramme sind auf $CD4^+$ Zellen gated. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

5. Diskussion

5.1 Isolation und Charakterisierung von humanen DN T-Zellen

Regulatorische T-Zellen spielen sowohl bei der Erhaltung der Selbsttoleranz als auch bei der Kontrolle der Immunantwort gegen Tumore, Allergene, Mikroben und Transplantate eine wichtige Rolle. Es wurden verschiedene Subpopulationen von regulatorischen T-Zellen beschrieben, unter anderem $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen, Tr1 Zellen und $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen, die durch unterschiedliche Mechanismen Immunreaktionen unterdrücken können (58;59;93;108;130). In verschiedenen Publikationen konnte gezeigt werden, dass die Subpopulation der $TCR\alpha\beta^+ CD4^- CD8^-$ (doppelnegativ, DN) T-Zellen im Maussystem eine suppressive Aktivität besitzen. Die Funktion humaner DN T-Zellen ist dagegen noch weitgehend unbekannt.

Die Frequenz an humanen DN T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern beträgt in etwa 1% aller T-Lymphozyten. Interessanterweise wurde bei verschiedenen Autoimmunkrankheiten wie dem systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder dem Autoimmun Lymphoproliferative Syndrom (ALPS) eine höhere Frequenz von DN T-Zellen beobachtet (11;183). Die Population der DN T-Zellen setzt sich aus naiven als auch Antigen-erfahrenen Zellen zusammen, wobei Patienten mit SLE einen höheren Anteil an naiven Zellen aufweisen (185). Durch quantitative TREC-Analysen konnten wir zeigen, dass DN T-Zellen im Vergleich zu $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen ebenso viele oder sogar mehr Zellteilungen durchlaufen haben. Daraus lässt sich schließen, dass humane DN T-Zellen nicht frisch aus dem Thymus ausgewanderte Zellen sind, sondern eine proliferative Vorgeschichte haben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass humane DN T-Zellen ähnlich den murinen DN T-Zellen hauptsächlich $IFN-\gamma$ sezernieren, wogegen IL-2, IL-4 oder IL-10 kaum oder gar nicht produziert wird (137). Dieses Zytokinprofil ist sehr spezifisch und unterscheidet DN T-Zellen von Th1, Th2, Th17 oder Tr1 Zellen (108;209;210). Es wurde aber auch beschrieben, dass murine DN T-Zellen, die aus der Milz isoliert wurden, neben $IFN-\gamma$ auch IL-4 und TNF sezernieren. Das gleiche Zytokinprofil konnte nach Stimulation von $CD4^- CD8^-$ Thymozyten beobachtet werden (211). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass DN T-Zellen von SLE-Patienten sowohl $IFN-\gamma$ als auch IL-4 produzieren, während DN T-Zellen von gesunden Spendern nur $IFN-\gamma$ sezernieren (183).

Im Gegensatz zu anderen regulatorischen T-Zellpopulationen können murine DN T-Zellen Effektorzellen Antigen-spezifisch supprimieren. Zhang *et al.* (137) stellten folgendes Modell für die DN T-Zell-vermittelte Antigen-spezifische Suppression auf: DN T-Zellen erkennen über ihren TCR pMHC-Komplexe von APCs und akquirieren diese. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen erkennen die transferierten MHC-Komplexe und werden anschließend von den DN T-Zellen über Fas/FasL Interaktion eliminiert. Mit Hilfe eines MHC-Klassen differentiellen Systems konnten wir zeigen, dass humane DN T-Zellen ebenfalls pMHC-Komplexe von APCs aufnehmen. Die Eigenschaft, Proteine von benachbarten Zellen aufzunehmen, wurde schon für verschiedene Immunzellen beschrieben (189;192). Der genaue Mechanismus des pMHC-Transfers ist jedoch noch weitgehend unbekannt. In der Literatur gibt es Hinweise, dass pMHC-Komplexe durch einen TCR-vermittelten Transfer aufgenommen werden (191;194). Der Transfer von Oberflächenmolekülen zwischen DN T-Zellen und APCs wird jedoch nicht nur über den TCR vermittelt, da alle DN T-Zellen unabhängig von der Spezifität MHC-Komplexe aufnehmen. Eine weitere Möglichkeit des Transfers ist der Transport von Proteinen in Exosomen (50-90 nm große Membranvesikel) oder Mikropartikeln (0,1-0,2 µm). So konnte ein Transport von Tumorantigenen auf DCs mittels Exosomen bereits belegt werden (212). Außerdem wurde gezeigt, dass Chemokinrezeptoren durch Mikropartikel zwischen Zellen transferiert werden (213). Transwell-Experimente zeigten jedoch, dass der Transfer zwischen APCs und humanen DN T-Zellen Zell-Zell-Kontakt abhängig ist. Önfelt *et al.* (193) konnten einen weiteren möglichen Mechanismus des Transfers beschreiben, bei dem zwischen verschiedenen Immunzellen dünne Schläuche, sogenannte „*Nanotubules*“, ausgebildet werden. Dadurch werden Membranfragmente zwischen Zellen ausgetauscht. Da diese Nanotubules jedoch sehr instabil sind, erweist sich eine genaue Untersuchung als schwierig.

Weitere Untersuchungen zeigten, dass nach dem Transfer der pMHC-Komplexe humane DN T-Zellen in der Lage sind, die Proliferation von aktivierten CD8⁺ T-Zellen *in vitro* zu inhibieren. Über welchen Mechanismus diese Suppression abläuft, ist jedoch noch unklar. Interessanterweise können DN T-Zellen nach dem Transfer nur die Effektorzellen supprimieren, die den akquirierten Antigen-MHC-Komplex erkennen. Daraus lässt sich folgern, dass humane DN T-Zellen ähnlich den murinen DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität Antigen-spezifisch vermitteln. In der Literatur wurde beschrieben, dass die transferierten pMHC-Komplexe funktionell aktiv sind und eine immunregulatorische Funktion besitzen. So kann die Akquisition von pMHC-Komplexen durch CD8⁺ T-Zellen zu einer Art „Brudermord“ führen. Dabei erkennen CD8⁺ T-Zellen den transferierten MHC-

Komplex auf anderen CD8⁺ T-Zellen und eliminieren diese (191). Andererseits kann die Präsentation von akquirierten pMHC-Komplexen auch eine stimulatorische Funktion aufweisen (194). Möglicherweise beeinflussen die präsentierten kostimulatorischen oder inhibitorischen Oberflächenmoleküle die Funktion der akquirierten MHC-Komplexe. Das Phänomen des Transfers kann sogar als Nachweismethode einer Antigen-spezifischen T-Zellerkennung verwendet werden. So konnten Beadling *et al.* zeigen, dass durch den Transfer von Oberflächenmolekülen eine Quantifizierung von LCMV (Lymphozytäres Choriomeningitis Virus)-spezifischen CD8⁺ T-Zellen möglich war. Im Gegensatz zu einer pMHC-Tetramerfärbung oder einer Intrazellulärfärbung gegen IFN- γ konnte diese Methode auch ohne bekanntes Antigen durchgeführt werden (214).

5.2 Charakterisierung eines Antigen-spezifischen DN T-Zellklons

Die bisher publizierten Daten zeigen, dass humane DN T-Zellen nach der Akquisition von Oberflächenmolekülen ein immunregulatorisches Potential erlangen. Um die suppressive Aktivität und mögliche weitere Funktionen humaner DN T-Zellen zu untersuchen, sollte ein DN T-Zellklon mit bekannter TCR-Spezifität charakterisiert werden. Der von uns analysierte DN T-Zellklon T4H2 konnte aus einem Melanom-Patienten nach Vakzinierung mit dem Melanozyten-Differenzierungsantigen gp100 isoliert werden. Dieser DN Klon weist auch über eine Expansionszeit von mehreren Monaten einen stabilen Phänotyp auf. Die Analyse von Oberflächenmarkern des DN Klons zeigte den hoch aktivierten Phänotyp einer Gedächtniszelle, der fast identisch zu dem Phänotyp von CD8⁺ T-Zellklonen ist (**Abb. 4**). Abgesehen von der fehlenden Expression des CD4 oder CD8 Rezeptors exprimiert der DN Klon nicht den kostimulatorischen Rezeptor CD28. Obwohl der DN Klon kein klassisches kostimulatorisches Signal über den CD28 Rezeptor erhält, konnte dennoch eine spezifische Effektorfunktion nachgewiesen werden (**Abb. 9-11**). In verschiedenen Veröffentlichungen wurde nachgewiesen, dass die Ligation von CD27, OX40 und 4-1BB ebenfalls als kostimulatorische Signale dienen (215-217). Inwieweit der DN T-Zellklon durch diese Rezeptoren stimuliert wird, müssen weitere Versuche zeigen. Murine DN T-Zellen gehören zu einer heterogenen Zellpopulation, die zu einem kleinen Anteil auch NKT-Zellen beinhaltet (156;157). Der DN T-Zellklon zeigte nur eine Expression des Adhäsionsmoleküls CD56, nicht aber der aktivierenden oder inhibierenden Rezeptoren NKG2D, CD94 und CD161. Darüber hinaus konnte auch keine Expression der NK-Zell-spezifischen Rezeptoren CD16

und CD158a festgestellt werden, was klar dafür spricht, dass es sich bei den DN T-Zellklon T4H2 um keine NKT-Zelle handelt (**Abb. 5**).

Sowohl durch Oberflächenfärbungen als auch durch quantitative PCR wurde keine Expression des CD8 Rezeptors nachgewiesen (**Abb. 7/8**). Trotzdem zeigte der DN T-Zellklon eine Funktion ähnlich der von CD8⁺ T-Zellen. Nach einer Antigen-spezifischen Stimulation produzierte der DN Klon ein ähnliches Zytokinrepertoire wie CD8⁺ T-Zellen, nämlich IFN- γ und TNF (**Abb. 9**). Interessanterweise wurde dieses Zytokinmuster auch schon für murine und humane DN T-Zellen beschrieben (137;198). Des Weiteren besitzt der DN T-Zellklon eine starke Antigen-spezifische Zytotoxizität, die durch die Effektormoleküle Perforin und Granzyme-B vermittelt wird (**Abb. 11-13**). Auch die Arbeitsgruppe um Robert Zhong konnte zeigen, dass murine DN T-Zellen aktivierte B- oder T-Zellen durch den Perforin-Granzyme-Signalweg eliminieren (199). Im Gegensatz dazu wurde in weiteren Publikationen beschrieben, dass sowohl die suppressive Funktion als auch die zytotoxische Aktivität von murinen DN T-Zellen über Fas/FasL Interaktion vermittelt wird (137;139;188).

Der CD4 oder CD8 Rezeptor stabilisiert den Komplex aus TCR, Peptid und MHC-Molekül und verstärkt das TCR-Signal durch Phosphorylierung von CD3 ζ und ZAP-70 (218-220). Die meisten T-Zellen benötigen das CD4- oder CD8-vermittelte Signal, um auf die Stimulation mit dem Antigen zu reagieren (221). Dennoch konnte gezeigt werden, dass CD4⁺ T-Zellen ohne Beteiligung des Korezeptors eine zytotoxische Aktivität gegen MHC-Klasse I-gebundene Antigene besitzen (222). Darüber hinaus führte ein retroviraler Transfer eines spezifischen TCR $\alpha\beta$ in TCR $\gamma\delta$ ⁺ T-Zellen auch ohne den CD4 oder CD8 Rezeptor zu einer starken Zytotoxizität gegen Leukämiezellen (223). Deshalb wurde die Hypothese aufgestellt, dass TCR, die unabhängig von dem CD8 Rezeptor auf das Antigen reagieren, eine hohe Affinität aufweisen, wohingegen die CD8 abhängigen TCR nur eine intermediäre oder geringe Affinität besitzen (224-226). Daraus lässt sich folgern, dass der DN T-Zellklon T4H2 durch die hohe Affinität des TCR auch ohne den CD8 Rezeptor funktionell aktiv ist. Ein hochaffiner TCR könnte auch eine Selektion von DN T-Zellen im Thymus erklären. So konnten Wang *et al.* demonstrieren, dass DN T-Zellen im Thymus aus CD4⁺ CD8⁺ T-Zellen durch Stimulation mit hochaffinen Antigenen entstehen (142). Im klassischen Modell jedoch werden im Thymus nur CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen positiv selektioniert (34). Eine hohe Affinität des TCR könnte dagegen das Fehlen des CD8 Rezeptors kompensieren. Zudem wird die negative Selektion von T-Zellen im Thymus durch die Bindung von B7-1/B7-2 an CD28 vermittelt (227;228). Im Falle des von uns untersuchten DN T-Zellklons war jedoch keine Expression des CD28 Rezeptors nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass

humane DN T-Zellen im Thymus gebildet werden, obwohl andere Studien belegen, dass DN T-Zellen auch außerhalb des Thymus entstehen (145;146).

Im Mausmodell wurde beschrieben, dass murine DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität durch Antigen-spezifischen Eliminierung von Effektorzellen vermitteln (84;108;137). Daher wurde zunächst eine mögliche zytotoxische Aktivität des DN T-Zellklons gegen einen gp100-spezifischen CD8⁺ T-Zellklon untersucht. Hierfür wurden die beiden Klone mit exogen beladenen DCs kokultiviert und nach 24 Stunden durchflusszytometrisch analysiert. Eine Apoptose-Färbung zeigte, dass durch die Kokultivation mit dem DN T-Zellklon die Apoptose des CD8⁺ Klons im Vergleich zur Kontrolle nicht verstärkt, sondern sogar vermindert wird (**Abb. 14**). Dies lässt sich dadurch erklären, dass eine Stimulation von T-Zellen einen aktivierungsinduzierten Zelltod auslösen kann (229). Durch die Kokultur mit dem DN Klon werden die CD8⁺ Zellen möglicherweise nicht so stark aktiviert, was zu einer verminderten Apoptoserate führt. Andere Arbeitsgruppen postulieren, dass DN T-Zellen unabhängig von ihrer zytotoxischen Aktivität die Proliferation von Effektorzellen unterdrücken (155;195). Deshalb wurde der Einfluss des DN T-Zellklons auf die Proliferation CD8⁺ T-Zellen überprüft. Hierzu wurde der CD8⁺ T-Zellklon mit dem Farbstoff CFSE markiert und mit dem DN Klon und exogen beladenen DCs inkubiert. Nach fünf Tagen Kokultur proliferierten die Mehrzahl der CD8⁺ T-Zellen, wobei die Inkubation mit dem DN T-Zellklon zu keiner Hemmung der Proliferation führte (**Abb. 15**).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der DN T-Zellklon T4H2 weder die Proliferation des CD8⁺ Klons unterdrückt noch diesen eliminiert, also keine suppressive Aktivität besitzt. In der Literatur wurde schon beschrieben, dass nach längerer Kultivierung von murinen DN T-Zellklonen spontane Mutationen auftreten, die unter anderem zu einem Verlust der suppressiven Funktion führen (169;171). Die nicht vorhandene Suppression des CD8⁺ T-Zellklons könnte aber auch durch eine Resistenz gegen Apoptose begründet sein. Strauss *et al.* (230) zeigten, dass eine Langzeitaktivierung von spezifischen T-Zellen zu einer Apoptoseresistenz der Zellen führte. Möglicherweise besteht die DN T-Zellpopulation jedoch aus verschiedenen Subpopulationen, die entweder eine zytotoxische Funktion ähnlich der von CD8⁺ T-Zellen oder eine suppressive Aktivität aufweisen.

5.3 Aufreinigung und Expansion von humanen DN T-Zellen

Die Frequenz an DN T-Zellen im peripheren Blut beträgt bei gesunden Individuen circa 1% aller T-Lymphozyten. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass diese Zellen mit Hilfe einer Kombination aus magnetischer Separation und durchflusszytometrischer Zellsortierung isoliert werden können. Hierfür wurden in einem ersten Schritt aus den MNC die $CD4^+$, $CD8^+$, $CD14^+$ und $CD19^+$ Zellen mittels Dynabeads depletiert. Dies war notwendig, da diese Zellpopulationen zahlenmäßig am größten sind. In einem zweiten Schritt wurden die restlichen Zellen mit einem fluoreszenz-markierten Antikörper gegen $TCR\alpha\beta$ gefärbt und durchflusszytometrisch sortiert (198). Diese Isolationsmethode ist jedoch sowohl zeitintensiv als auch durch den hohen Verbrauch an Dynabeads und Antikörpern sehr teuer. Darüber hinaus kann ein Zellsorter die Zellen nur semi-steril aufreinigen, was insbesondere für eine spätere klinische Anwendung ein Problem darstellt. Eine reine Negativ-Zellseparation mit Hilfe von Miltenyi-Beads oder dem RosetteSep-System war aufgrund der geringen Frequenz der DN T-Zellen nicht möglich. Der DN T-Zell-Isolations Kit der Firma Miltenyi beruht ebenfalls auf einer magnetischen Separation. Dabei werden in einem ersten Schritt die $CD4^+$, $CD8^+$ und $CD56^+$ Zellen depletiert und anschließend mit einem Antikörper gegen $TCR\alpha\beta$ gefärbt. In einem zweiten Schritt werden die $TCR\alpha\beta^+$ Zellen über zwei Säulen positiv selektioniert. Sowohl bei der Reinheit der aufgereinigten Zellen als auch bei der Ausbeute konnten keine Unterschiede zwischen den beiden Isolationsmethoden festgestellt werden (**Abb. 16/17**). Da die Aufreinigung mit dem DN T-Zell-Isolations Kit jedoch viel kostengünstiger und auch zeitsparender als die Kombination aus Dynal-Separation und Zellsortierung ist, wurde für weitere Experimente nur noch die rein magnetische Aufreinigungsmethode verwendet.

Die geringe Frequenz regulatorischer T-Zellen im peripheren Blut macht eine *in vitro* Expansion der Zellen notwendig. Deshalb wurden verschiedene Protokolle entwickelt, um die unterschiedlichen regulatorischen T-Zellpopulationen zu expandieren. So können $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen durch Stimulation mit allogenen MNC und exogenem IL-2 expandiert werden (231). Sowohl murine als auch humane DN T-Zellen proliferieren ebenfalls nach einer Stimulation mit allogenen MNC und exogenem IL-2, wobei murine DN T-Zellen noch zusätzlich das Zytokin IL-4 benötigen (137;198). Des Weiteren wurde beschrieben, dass eine wiederholte Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads zusammen mit exogenem IL-2 zu einer starken Expansion von $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen führt (203). Diese Beads bestehen aus

superparamagnetischen Polystyren-Kügelchen, an deren Oberfläche Antikörper gegen CD3 und CD28 gebunden sind. Durch Verwendung von anti-CD3/CD28 Beads zusammen mit dem Stimulationsmedium TCGF, das unter anderen auch IL-2 enthält, wurde gezeigt, dass humane DN T-Zellen *ex vivo* suffizient expandiert werden können (**Abb. 19**).

Die Expansion der DN T-Zellen führte aber gleichzeitig zum Auswachsen von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen. Diese Zellen entstehen direkt aus der DN T-Zellpopulation und proliferieren ähnlich schnell wie die DN T-Zellen (**Abb. 20/21**). Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen liegt in der Heterogenität der DN T-Zellpopulation. So ist derzeit noch kein eindeutiger Marker für DN T-Zellen bekannt. In der Literatur ist zwar beschrieben, dass murine DN T-Zellen bestimmte Oberflächenmoleküle wie FcR γ , Ly-6A und CXCR5 exprimieren, inwieweit dies jedoch auch auf humane DN T-Zellen zutrifft ist noch unbekannt (161;166;169). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass murine DN T-Zellen sowohl aus CD4⁺ als auch aus CD8⁺ T-Zellen generiert werden können (151;152;154). Im Gegensatz dazu stellten Lee *et al.* (171) fest, dass bei Langzeitkultivierung von murinen DN T-Zellen CD8⁺ Zellen entstehen. Möglicherweise kann diese Umwandlung der Zellen in beide Richtungen ablaufen.

DCs sind sehr effiziente Stimulatoren von B- und T-Lymphozyten (204). Ferner konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass regulatorische T-Zellen durch Stimulation mit DCs expandiert werden können (232;233). Die Stimulation mit allopathen DCs führte auch zu einer Expansion der humanen DN T-Zellen, jedoch deutlich geringer als bei der Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads (**Abb. 24**). Dies lässt sich dadurch erklären, dass die DN T-Zellen durch Verwendung der anti-CD3/CD28 Beads polyklonal stimuliert werden. Da aber nur ca. 7% aller T-Zellen Alloantigene erkennen, führt eine Stimulation mit allopathen DCs nur zu einer oligoklonalen Expansion der spezifischen Zellen (22). Die Expansion der DN T-Zellen führte wiederum zu einem Auswachsen von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen (**Abb. 23**). Da die verwendeten DCs aus der Monozyten-Fraktion der Elutriation generiert wurden, könnten die CD4⁺ und CD8⁺ Zellen aus einer Verunreinigung der Fraktion entstanden sein. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass das Auswachsen der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen auf das gleiche Phänomen wie bei der Expansion mit den anti-CD3/CD28 Beads zurückzuführen ist. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass humane DN T-Zellen sowohl durch die Stimulation mit artifiziellen APCs als auch mit allopathen DCs *in vitro* expandiert werden können. Inwieweit diese beiden Methoden jedoch die optimale Expansion darstellen und welche Rolle verschiedene Zytokine dabei spielen, müssen spätere Versuche zeigen. So

konnte die Arbeitsgruppe um M. G. Roncarolo demonstrieren, dass Tr1 Zellen nach einer polyklonalen oder Antigen-spezifischen Stimulation nur schlecht proliferieren, während die Zugabe von exogenem IL-15 auch ohne TCR-Stimulation zu einer starken Expansion der Zellen führt (108;114). Zudem könnte auch der Einsatz von weiteren kostimulatorischen Molekülen die Expansion der humanen DN T-Zellen verbessern. Neben dem CD28 Rezeptor sind vor allem CD27, OX-40 und 4-1BB an der Kostimulation von konventionellen und regulatorischen T-Zellen beteiligt (215;216;234). Welche dieser Rezeptoren von humanen DN T-Zellen exprimiert werden, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

5.4 Suppression von alloogenen Immunantworten

5.4.1 Suppressive Aktivität humaner DN T-Zellen

In verschiedenen Veröffentlichungen, insbesondere von der Arbeitsgruppe um Li Zhang, wurde beschrieben, dass murine DN T-Zellen eine immunregulatorische Funktion besitzen (137;138;174;175). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass nach dem Transfer von pMHC-Komplexen auch humane DN T-Zellen in der Lage sind, die Proliferation von aktivierten CD8⁺ T-Zellen *in vitro* zu inhibieren (198). Um diesen Effekt genauer zu untersuchen, wurde ein allogenisches *in vitro* Modell etabliert (**Abb. 25**). Dazu wurden in einem ersten Schritt humane DN T-Zellen des Spenders A über mehrere Wochen mit alloogenen DCs des Spenders B stimuliert. Da DN T-Zellen nur in sehr niedriger Frequenz in der Peripherie vorkommen, war eine Expansion der Zellen für weitere Versuche notwendig. Außerdem konnte durch die oligoklonale Stimulation mit alloogenen DCs eine rein allo-spezifische DN T-Zellpopulation generiert werden. In einem zweiten Schritt wurden frisch isolierte CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen des Spenders A zusammen mit alloogenen DCs und den vorstimulierten DN T-Zellen koinkubiert, wobei die letzte Restimulation der DN T-Zellen mindestens sechs Tage zurück lag. Als Read-out wurde die Proliferation der CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe des Farbstoffs CFSE oder alternativ mit einem ³H-Thymidin-Proliferationstest untersucht. Die Verwendung von CFSE hatte zwei entscheidende Vorteile: Der CFSE-Test ist eine durchflusszytometrische Methode, die eine parallele Färbung der Zellen mit monoklonalen Antikörpern ermöglicht. Somit können einzelne Populationen voneinander getrennt analysiert werden. Andererseits kann die Proliferation der Zellen auch über mehrere Tage verfolgt

werden. Mit einem ähnlichen Versuchsaufbau konnten Zhang *et al.* (155) zeigen, dass aus murinen CD4⁺ T-Zellen DN T-Zellen entstehen, die allogene Immunantworten unterdrücken. Der CFSE-Proliferationstest zeigte, dass die Kokultur mit humanen DN T-Zellen zu einer fast vollständigen Hemmung der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führte (**Abb. 26**). Auch im ³H-Methyl-Thymidin wurde die Proliferation der Effektorzellen durch die DN T-Zellen völlig inhibiert (**Abb. 27**). Somit konnte erstmalig gezeigt werden, dass humane DN T-Zellen in der Lage sind, allogene Immunreaktionen zu inhibieren. Diese Resultate stimmen mit den publizierten Daten im Maussystem überein. So konnte die Arbeitsgruppe um L. Zhang zeigen, dass murine DN T-Zellen *in vitro* die Proliferation von syngen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterdrücken (138;174). Darüber hinaus konnten murine DN T-Zellen nach Aktivierung mit Alloantigenen *in vivo* die Proliferation und Zytokinproduktion von Effektorzellen supprimieren und dadurch eine Abstoßungsreaktion verhindern (175).

Um das suppressive Potential humaner DN T-Zellen beurteilen zu können, wurde das Verhältnis von Effektor/Suppressor titriert. So führte eine Inkubation von einer DN T-Zelle mit fünf bzw. zehn CD4⁺ T-Zellen immer noch zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation (**Abb. 28**). Erst ab einem Verhältnis von einer DN T-Zelle auf 20 CD4⁺ Zellen konnte keine Inhibition der T-Zellproliferation mehr festgestellt werden. Eine ähnlich starke suppressive Aktivität weisen auch CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen auf. In der Literatur wurde beschrieben, dass sowohl murine als auch humane CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen bis zu einem Verhältnis von 1 : 16 signifikant hemmen (91;203). Die starke suppressive Aktivität der DN T-Zellen kann jedoch auch auf die hohe Allospezifität zurückzuführen sein. Durch die mehrwöchige oligoklonale Restimulation mit allogenen DCs wurden hauptsächlich allospezifische DN T-Zellen expandiert. Dagegen erkennen jedoch nur durchschnittlich 5-10% der frisch isolierten CD4⁺ T-Zellen das Alloantigen (22).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob humane DN T-Zellen auch die Proliferation von alloreaktiven Effektorzellen, die repetitiv mit allogenen DCs stimuliert wurden, supprimieren können. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass die DN T-Zellen auch die Proliferation von vorstimulierten Effektorzellen unterdrücken können (**Abb. 29**). Dieser Befund deckt sich mit den Daten im Maussystem. So können murine DN T-Zellen aktivierte CD8⁺ T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* supprimieren (137;188). Zudem konnten Zhang *et al.* (235) zeigen, dass murine DN T-Zellen auch aktivierte CD4⁺ T-Zellen inhibieren und dadurch die Abstoßung eines Transplantats verhindern (199).

Anschließend wurde das immunregulatorische Potential von frisch isolierten DN T-Zellen untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass nicht stimulierte DN T-Zellen keinen Einfluss auf die Proliferation der Effektorzellen haben (**Abb. 30**). Möglicherweise lässt sich die fehlende suppressive Aktivität der DN T-Zellen durch die geringe Frequenz allospezifischer DN T-Zellen erklären. Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die suppressive Aktivität der DN T-Zellen erst durch die mehrwöchige Stimulation induziert wird. Die Induktion einer regulatorischen Funktion von T-Zellen wurde auch schon bei anderen Zellpopulationen beobachtet. So entstehen nach der Stimulation von naiven $CD4^+$ T-Zellen nicht nur $CD4^+$ Effektorzellen sondern auch $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen, die Foxp3 exprimieren (99). Diese induzierten $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen inhibieren Immunreaktionen ebenso wie natürliche Thymus-gereifte $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen über einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus (100). Neben einer schwachen Stimulation des TCR wird für die Induktion von $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen ein B7-vermitteltes kostimulatorisches Signal benötigt (101). Durch TGF- β wird die Differenzierung von naiven in regulatorische T-Lymphozyten sogar noch verstärkt, während IL-2 diese abschwächt (102;103). Darüber hinaus wurde im murinen System gezeigt, dass DN T-Zellen erst nach Aktivierung durch eine Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) xenoreaktive $CD4^+$ T-Zellen supprimieren und damit die Abstoßung des Transplantats verhindern können (175).

In weiterführenden Experimenten sollte zunächst geklärt werden, inwieweit die verschiedenen Expansionsmethoden die suppressive Aktivität der DN T-Zellen beeinflussen. Dabei zeigte sich interessanterweise, dass nur die DN T-Zellen, die mit allogenen DCs vorstimuliert wurden, die Proliferation der Effektorzellen inhibieren konnten, wohingegen die mit anti-CD3/CD28 Beads expandierten DN T-Zellen keine suppressive Aktivität aufwiesen (**Abb. 31**). Diese Ergebnisse sprechen eindeutig dafür, dass DN T-Zellen ihre suppressive Funktion erst durch eine Stimulation mit allogenen DCs erlangen. Inwieweit andere APCs wie Monozyten, B-Zellen oder unreife DCs ebenfalls in der Lage sind suppressive DN T-Zellen zu induzieren, muss in weiteren Experimenten geklärt werden. Die Induktion regulatorischer T-Zellen durch APCs wurde auch für andere T-Zellpopulationen beschrieben. So zeigte die Arbeitsgruppe um M.G. Roncarolo, dass Tr1 Zellen durch eine Stimulation mit DCs in Gegenwart von IL-10 aus naiven $CD4^+$ T-Zellen generiert werden können (109;113). Die Differenzierung in Tr1 Zellen kann durch IFN- α noch verstärkt werden, wohingegen die Ligation von CD2 ohne Kostimulation über CD28 oder LFA-1 für eine Induktion ausreichend ist (111;112). Auch regulatorische $CD8^+ CD28^-$ T-Zellen können durch wiederholte Stimulation mit allogenen oder xenogenen DCs generiert werden (130). Welche

Oberflächenrezeptoren und welche Zytokine eine Differenzierung in regulatorische DN T-Zellen beeinflussen, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

Da verschiedene regulatorische T-Zellen wie CD4⁺ CD25⁺ T-Lymphozyten, Tr1 Zellen oder murine DN T-Zellen für ihre suppressive Aktivität eine Stimulation des TCR mit dem spezifischen Antigen benötigen (82;108;137), wurde überprüft, ob die Erkennung des Antigens ebenfalls die suppressive Funktion humaner DN T-Zellen auslöst. In einem HLA-differenten Modell konnten wir zeigen, dass DN T-Zellen nach Konditionierung mit APCs von Spender B eine Alloantwort von konventionellen T-Zellen gegen Spender B unterdrücken. Dagegen konnten die vorstimulierten DN T-Zellen die Alloantwort der CD4⁺ T-Zellen gegen DCs von Spender C nur teilweise supprimieren (**Abb. 32**). Diese Daten sind vermutlich auf die unzureichende HLA-Typisierung zurückzuführen. Zum einen konnte kein Spenderpaar mit vollkommen unterschiedlichen HLA-Typen gefunden werden. In diesem Ansatz erkennen die vorstimulierten DN T-Zellen zumindest HLA-Bw6 und werden dadurch aktiviert. Darüber hinaus wurden nur die HLA-Klasse I Antigene A, B und C serologisch bestimmt, nicht aber die HLA-Klasse II Antigene DR, DQ und DP. Die Charakterisierung des DN T-Zellklons T4H2 zeigt zwar, dass zumindest dieser Klon HLA-Klasse I restringiert ist, inwieweit dies jedoch auf humane DN T-Zellen im Allgemeinen zutrifft, wurde noch nicht untersucht. Zudem könnten auch die Nebenhistokompatibilitätsantigene (*minor histocompatibility antigens*, mHAg) bei den beiden Spendern B und C identisch sein.

Daraus lässt sich folgern, dass ein Teil der DN T-Zellen auch die Alloantigene des Spenders B erkennen kann und dadurch ihre suppressive Aktivität ausgelöst wird. Andererseits kann spekuliert werden, dass die konditionierten DN T-Zellen auch ohne TCR-Stimulation eine suppressive Aktivität aufweisen und ähnlich den murinen DN T-Zellen Alloantigen-spezifisch supprimieren. Jonuleit *et al.* (235) stellten fest, dass CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen auch nach Fixierung mit Paraformaldehyd eine Effektorzellen inhibieren können. Dennoch mussten die CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen vor der Fixierung erst durch einen Antikörper gegen CD3 stimuliert werden. In weiteren Experimenten muss geklärt werden, welche Rolle die Erkennung des Antigens für die suppressive Aktivität der DN T-Zellen darstellt. Ein geeigneter Versuch hierfür wäre eine Blockade des TCR der DN T-Zellen mit Hilfe eines Antikörpers. Ferner muss untersucht werden, ob humane DN T-Zellen Immunreaktionen Antigen-spezifisch inhibieren.

5.4.2 Mechanismus der DN T-Zell-vermittelten Suppression

Regulatorische T-Zellen können über verschiedenste Mechanismen ihre immunregulatorische Funktion ausüben. Dabei können sowohl bestimmte Oberflächenstrukturen und Zytokine als auch Zell-Zell-Kontakt abhängige Mechanismen die Suppression vermitteln (91;108;124;125). Murine DN T-Zellen nutzen einen besonderen Mechanismus, um Effektorzellen Antigen-spezifisch zu inhibieren: DN T-Zellen erkennen über ihren TCR pMHC-Komplexe von APCs und akquirieren diese. Aktivierte CD8⁺ T-Zellen erkennen die transferierten MHC-Komplexe und werden anschließend von den DN T-Zellen über Fas/FasL Interaktion eliminiert (137;188). Darüber hinaus wurde jedoch auch gezeigt, dass murine DN T-Zellen unabhängig von der Fas/FasL Interaktion CD4⁺ T-Zellen supprimieren können (155;195).

Zunächst wurde der Aktivierungszustand der supprimierten T-Zellen untersucht. Die Expression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) ist ein Kennzeichen aktivierter Zellen (205;206). Die Koinkubation mit vorstimulierten DN T-Zellen führte zu einer Hemmung der Oberflächenexpression von CD25 (**Abb. 33**). Somit konnten die DN T-Zellen sowohl die Proliferation als auch die Aktivierung der Effektorzellen unterdrücken. Ähnliche Befunde wurden schon für CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen, Tr1 Zellen und murinen DN T-Zellen beschrieben (65;108;195).

Weiter zeigen zahlreiche Untersuchungen, dass regulatorische T-Zellen die Produktion von IL-2 hemmen und dadurch die Proliferation von reaktiven Zellen inhibieren können (75;76;132;195). Durch eine exogene Zugabe von IL-2 kann dieser Effekt kompensiert werden. Zudem wurde von de la Rosa *et al.* (236) demonstriert, dass CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen mit anderen T-Zellen um IL-2 konkurrieren und dadurch ihre suppressive Aktivität ausüben. Deshalb sollte überprüft werden, ob die suppressive Aktivität humaner DN T-Zellen durch exogenes IL-2 überkommen werden kann. Da CD8⁺ T-Zellen sensibler auf exogenes IL-2 reagieren, wurden für diese Versuche CD8⁺ T-Zellen als Effektorzellen verwendet. Die Daten zeigen eindeutig, dass die Zugabe von exogenem IL-2 die DN T-Zell-vermittelte Suppression von CD8⁺ T-Zellen nicht kompensiert werden kann (**Abb. 34**). Es ist denkbar, dass DN T-Zellen eine höhere Affinität für IL-2 besitzen als ruhende CD8⁺ T-Zellen. Deshalb könnte argumentiert werden, dass das exogene IL-2 sofort von den DN T-Zellen aufgenommen wird und kein IL-2 mehr für die CD8⁺ T-Zellen verfügbar ist. Da die IL-2 Konzentration mit 300 U/ml hoch gehalten wurde, kann davon ausgegangen werden, dass DN T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen nicht um das IL-2 konkurrieren müssen. Diese Daten weisen somit darauf hin, dass die

durch humane DN T-Zellen induzierte Suppression nicht durch Inhibition der IL-2 Produktion vermittelt wird.

Experimente mit anergen T-Zellen zeigten, dass diese mit Antigen-spezifischen oder alloreaktiven T-Zellen um die Oberflächenmoleküle der APCs konkurrieren. Dadurch kann die Proliferation der Effektorzellen gehemmt werden (207;208). Um zu klären, inwieweit DN T-Zellen die Oberfläche von APCs blockieren und dadurch einen suppressiven Effekt vermitteln, wurden in einem Ansatz die DN T-Zellen durch konventionelle T-Zellen, die identisch konditioniert wurden, ersetzt. Da eine enge Verwandtschaft zwischen DN T-Zellen und CD8⁺ T-Zellen besteht (143;149), wurden für den Versuch CD8⁺ Zellen eingesetzt. Im Gegensatz zu DN T-Zellen konnten mit allogenen DCs vorstimulierte CD8⁺ T-Zellen keine Hemmung der Proliferation vermitteln (**Abb. 35**). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die DN T-Zellen nicht die Oberflächenmoleküle der DCs blockieren und damit den Effektorzellen den Stimulus nehmen, sondern direkt die Suppression vermitteln.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der humane DN T-Zellklon T4H2 eine starke Antigen-spezifische Zytotoxizität besitzt, die durch die Effektormoleküle Perforin und Granzyme-B vermittelt wird. Im murinen System konnte gezeigt werden, dass die suppressive Aktivität von DN T-Zellen in Perforin-Knockout Mäusen stark vermindert ist (155). Ferner konnte Zhang *et al.* (199) demonstrieren, dass murine DN T-Zellen aktivierte T-Zellen durch den Perforin-Granzyme-Signalweg eliminieren (199). Dagegen kann eine Beteiligung von Perforin und Granzyme-B an der suppressiven Aktivität humaner DN T-Zellen ausgeschlossen werden (**Abb. 36**). Hierfür wurden die DN T-Zellen mit Concanamycin-A (CMA), einem potenten Inhibitor des Perforin-Granzyme-Signalwegs, vorinkubiert. Aufgrund einer Hemmung der V-Typ H⁺-ATPase verhindert CMA das Ansäuern der lytischen Granula. Somit können diese nicht mit der Zellmembran verschmelzen und die Effektormoleküle freisetzen (201). Durch die Hemmung der Zytotoxizität konnten auch nach sechs Tagen vitale DCs in der Kultur beobachtet werden. Dennoch wurde eine Suppression der CD4⁺ T-Zellen festgestellt. Damit konnte gezeigt werden, dass der suppressive Effekt von DN T-Zellen nicht auf der Eliminierung der APCs beruht. Inwieweit die Zytotoxizität der DN T-Zellen gegen die Effektorzellen jedoch eine Rolle für die suppressive Aktivität spielt, müssen weitere Experimente zeigen. Apoptose kann auch durch Interaktion von Fas/FasL induziert werden. So wurde in verschiedenen Veröffentlichungen demonstriert, dass murine DN T-Zellen aktivierte CD8⁺ Zellen durch Fas/FasL Interaktion eliminieren. Eine Blockade von FasL auf den DN T-Zellen verminderte

die suppressive Aktivität von DN T-Zellen (137;188). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass Fas/FasL- und Perforin-unabhängige Apoptosewege existieren. Chrobak *et al.* (237) konnte zeigen, dass aktivierte Knochenmarkszellen von Perforin- und FasL-defizienten Mäusen Antigen-spezifische T-Zellen eliminieren.

Im Gegensatz zu $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen supprimieren viele regulatorische Zellen durch bestimmte Zytokine. Tr1 Zellen und $CD8^+$ Suppressorzellen sezernieren nach Stimulation überwiegend das immunsuppressive Zytokin IL-10 und unterdrücken dadurch die Aktivierung, Zytokinproduktion und Effektorfunktion von T-Lymphozyten (108;109;136). Dagegen inhibieren Th3 Zellen Immunreaktionen hauptsächlich über TGF- β , wobei aber auch geringe Mengen an IL-4 und IL-10 sezerniert werden (106). Die Untersuchung der humanen DN T-Zellen mit Hilfe eines qualitativen Zytokin-Arrays zeigte, dass während der Suppression große Mengen an IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 produziert werden (**Abb. 37**). In der Kontrolle wurden diese Zytokine nicht detektiert. Dieses Ergebnis widerspricht den publizierten Daten im Maussystem, nach denen murine DN T-Zellen nach Aktivierung überwiegend IFN- γ und TNF, sowie geringe Mengen an TGF- β , aber kein IL-2, IL-4, IL-10 oder IL-13 produzieren (137). Das im murinen System nachgewiesene Zytokinprofil zeigte sich auch bei dem DN T-Zellklon T4H2 und bei frisch isolierten humanen DN T-Zellen. Möglicherweise werden die DN T-Zellen durch die mehrwöchige Stimulation mit den allogenen DCs so moduliert, dass ein anderes Zytokinmuster exprimiert wird. Für diese Hypothese spricht auch die Beobachtung, dass erst durch die Stimulation mit allogenen DCs eine suppressive Funktion induziert wird.

Quantitative Zytokinbestimmungen zeigten jedoch, dass DN T-Zellen nach Stimulation mit allogenen DCs überwiegend IL-5, IL-4 und auch IFN- γ sezernieren (**Abb. 38**). Im Gegensatz zu den Daten des Cytokine Antibody Arrays wurde eine Expression von IFN- γ detektiert. Dies liegt vermutlich in den unterschiedlichen Methoden begründet: mit Hilfe des CBA-Test konnte quantitativ die Menge an sezernierten Zytokinen bestimmt werden, wohingegen beim Cytokine Antibody Array nur die Ansätze qualitativ verglichen wurden. Die Menge an sezernierten IFN- γ war möglicherweise zu gering, als dass ein Unterschied auffällig gewesen wäre. Die Produktion von IL-13 konnte mit dem Th1/Th2 Kit (BD) nicht nachgewiesen werden. Hierfür müssten die Überstände nochmals mit Hilfe des Inflammatory Kits (BD) analysiert werden. Die gleichzeitige Expression von IFN- γ und IL-4/IL-5 ist ein ungewöhnlicher Befund. Es ist bekannt, dass IL-4 die Produktion von IFN- γ unterdrückt, während IFN- γ wiederum die Sekretion von IL-4 inhibiert (238;239). Allerdings wurde auch

für murine DN T-Zellen die Produktion von IFN- γ und IL-4 beschrieben (211). Eine andere Studie zeigte, dass DN T-Zellen von SLE-Patienten sowohl IFN- γ als auch IL-4 produzieren, während DN T-Zellen von gesunden Spendern nur IFN- γ sezernieren (183). Eine Stimulation mit artifiziellen Beads könnte darüber Aufschluss geben, welche Zytokine von suppressiv agierenden DN T-Zellen sezerniert werden. Durch einen Vergleich des Zytokinmusters von DN T-Zellen, die entweder mit anti-CD3/CD28 Beads oder mit allogenen DCs stimuliert wurden, könnten die für die suppressive Funktion der DN T-Zellen entscheidenden Zytokine identifiziert werden.

Von den durch DN T-Zellen sezernierten Zytokine wurde für IL-10 eine suppressive Wirkung gegenüber CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen (240;241). Darüber hinaus kann IL-10 auch die Reifung von DCs und die Expression von kostimulatorischen Molekülen inhibieren (242). Tr1 Zellen und CD8⁺ Suppressorzellen sezernieren IL-10 und unterdrücken dadurch die Aktivierung und Effektorfunktion von T-Lymphozyten (108;136). Dagegen kann IL-10 die suppressive Funktion von murinen DN T-Zellen aufheben und die Zellen empfänglich für Apoptose machen (173). IL-4, IL-5 und IL-13 sind klassische Th2 Zytokine, die überwiegend eine humorale Immunantwort induzieren. IL-4 und IL-13 lösen einen Isotypenwechsel von B-Zellen aus und verhindern die IFN- γ -vermittelte Aktivierung von Makrophagen. Zudem ist IL-4 das zentrale Zytokin, dass eine Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in Th2 Zellen induziert (243). Zahlreiche Untersuchungen zeigten, dass verschiedene Immunzellen durch IL-4 vor Apoptose geschützt werden können (244-246). Des Weiteren wurde gezeigt, dass murine DN T-Zellen IL-4 sowohl für eine optimale Proliferation als auch für eine maximale suppressive Funktion benötigen (247). Ferner wird durch IL-4 der Apoptose-Repressor Bcl-x_L in murinen DN T-Zellen hochreguliert und damit eine Apoptoseresistenz induziert (172).

IL-5 wiederum spielt die zentrale Rolle bei der Differenzierung, Proliferation und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Des Weiteren kann IL-5 die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen auslösen, wohingegen die Reifung von DCs durch IL-5 unterdrückt wird (248;249). In der Literatur wurde beschrieben, dass IL-5 auch als Wachstumsfaktor für zytotoxische T-Zellen wirken kann (250;251). IFN- γ ist ein proinflammatorisches Zytokin, das unter anderem Makrophagen aktiviert. Zudem induziert IFN- γ die Differenzierung der CD4⁺ T-Zellen in Th1 Zellen, während eine Th2 Antwort verhindert wird (238;239). Andererseits ist IFN- γ auch an toleranzinduzierenden Mechanismen beteiligt (252;253). Dalton *et al.* (254) konnte sogar eine IFN- γ -vermittelte Apoptose in T-Zellen nachweisen. Ferner weisen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen von IFN- γ -Knockout Mäusen keine suppressive Funktion auf. Experimente mit neutralisierenden Antikörpern

gegen IFN- γ zeigen ebenfalls einen Verlust der suppressiven Aktivität von CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen (255).

Um zu klären, inwieweit der suppressive Effekt humaner DN T-Zellen auf Zytokine oder andere lösliche Faktoren zurückzuführen ist, haben wir Transwell-Experimente durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die suppressive Aktivität der DN T-Zellen nur durch direkten Zellkontakt vermittelt wird (**Abb. 39**). Wurden jeweils mit allogenen DCs stimulierte DN T-Zellen und Effektorzellen hingegen durch das Transwell getrennt, konnte Suppression festgestellt werden. Auffällig in diesem Experiment ist die schwache Hemmung der Proliferation (21%). Dieser Befund kann durch die verwendeten Platten erklärt werden. Das Transwell-Experiment musste in 24-well Flachbodenplatten durchgeführt werden, wohingegen für die restlichen Versuche 96-well Rundbodenplatte eingesetzt wurden. In den Rundbodenplatten rutschen die Zellen zusammen, somit stehen die Zellen in Kontakt zueinander. Dagegen sind in den Flachbodenplatten die Zellen verteilt, d. h. nicht alle Zellen haben einen unmittelbaren Kontakt zu anderen Zellen. Diese Beobachtung unterstützt die Theorie, dass die suppressive Funktion von DN T-Zellen über einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus vermittelt wird und Zytokine dabei wenn überhaupt nur eine sekundäre Rolle spielen.

Im Gegensatz zu CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen oder CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen, die Anergie in den Effektorzellen auslösen, unterdrücken murine DN T-Zellen Immunreaktionen durch Eliminierung der reaktiven Zellen (91;92;130;137). Dabei induzieren murinen DN T-Zellen Apoptose durch Fas/FasL Interaktion (188). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Perforin/Granzyme-B vermittelte Zytotoxizität nicht an der suppressiven Aktivität humaner DN T-Zellen beteiligt ist. Um eine mögliche Apoptoseinduktion durch Fas/FasL zu untersuchen, wurde folgender Versuchsaufbau verwendet: Zunächst wurden CD4⁺ T-Zellen mit allogenen DCs und DN T-Zellen für drei Tage koinkubiert. Dadurch konnten die DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität ausüben. Anschließend wurden die CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe des Zellsorters isoliert und nochmals mit frischen allogenen DCs restimuliert. Wenn humane DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität durch Eliminierung alloreaktiver Zellen vermitteln, sollten keine allospezifischen Zellen in der CD4⁺ Zellpopulation mehr vorhanden sein. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die CD4⁺ T-Zellen nach Aufreinigung und erneuter Stimulation mit allogenen DCs wieder proliferieren (**Abb. 40**). Damit konnte erstmalig gezeigt werden, dass humane DN T-Zellen im Gegensatz zu murinen Zellen Immunreaktionen nicht durch Eliminierung der Effektorzellen unterdrücken. Eine weitere

Möglichkeit, Effektorzellen zu supprimieren, ist die Induktion von Anergie. Anergische T-Zellen sind funktionell inaktiv und können auch bei späterer optimaler Stimulation nicht mehr auf das Antigen reagieren (43). Allerdings kann die Zugabe von exogenem IL-2 diesen Status der Zellen wieder aufheben (4). Anergie kann in T-Zellen sowohl durch das Fehlen des kostimulatorischen Signals als auch durch inhibitorische Rezeptoren wie CTLA-4 und PD-1 induziert werden (44;48). Darüber hinaus können auch verschiedene regulatorische T-Zellen Anergie in reaktiven Zellen auslösen (91;109;132). Obwohl nach Aufreinigung der CD4⁺ T-Zellen und nachfolgender Restimulation mit allogenen DCs kein IL-2 in die Kultur gegeben wurde, konnten die CD4⁺ T-Zellen in diesem Experiment wieder proliferieren. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass humane DN T-Zellen weder reaktive Effektorzellen eliminieren noch Anergie induzieren. Folglich handelt es sich bei der DN T-Zell-vermittelten Suppression um einen aktiven Prozess.

Als nächstes sollte geklärt werden, ob humane DN T-Zellen ihre suppressive Aktivität durch Modifikation der APCs ausüben. Hierfür wurden zunächst DN T-Zellen über mehrere Wochen mit allogenen DCs restimuliert und damit ihre suppressive Funktion induziert. In den Suppressionsexperimenten wurden die allogenen DCs durch künstliche APCs ersetzt. Es zeigte sich, dass DN T-Zellen auch nach einer Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen deutlich supprimierten (**Abb. 41**). Dennoch konnten die DN T-Zellen die proliferierenden CD4⁺ T-Zellen nicht vollständig inhibieren. Dieses Ergebnis kann durch die starke polyklonale Stimulation erklärt werden. Der Befund, dass auch artifizielle APCs die suppressive Aktivität der DN T-Zellen induzieren, lässt mehrere Schlussfolgerungen zu. Eine Möglichkeit Immunreaktionen zu unterdrücken ist die Modifikation der APCs. So hemmen CD8⁺ CD28⁻ T-Zellen die Aktivierung der APCs und verhindern dadurch die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle. Stattdessen exprimieren diese tolerogenen APCs inhibitorische Oberflächenmoleküle wie ILT3 und ILT4 (130;132). Da künstliche APCs nicht von den DN T-Zellen verändert werden können, kann dieser Mechanismus für die DN T-Zell-vermittelte Suppression ausgeschlossen werden. Zudem spielt auch der Transfer von pMHC-Komplexen keine Rolle bei der suppressiven Funktion humaner DN T-Zellen. Im Gegensatz dazu wurde im murinen System beschrieben, dass die Akquisition der pMHC-Komplexe durch die DN T-Zellen von entscheidender Bedeutung für die Inhibition der Effektorzellen ist (137;188).

Ferner weisen die Daten darauf hin, dass eine Stimulation des TCR und des CD28 Korezeptors für die Induktion der suppressiven Aktivität ausreicht. Dieser Befund stimmt mit

publizierten Ergebnissen überein, wonach verschiedene regulatorische T-Zellen wie $CD4^+$ $CD25^+$ T-Lymphozyten, Tr1 Zellen oder murine DN T-Zellen für ihre suppressive Aktivität eine Stimulation des TCR mit dem spezifischen Antigen benötigen (82;108;137). Dennoch könnten andere Signalmoleküle die suppressive Funktion der DN T-Zellen verstärken. So kann eine Ligation von CD27, OX-40 und 4-1BB ebenfalls als kostimulatorisches Signal dienen (215-217). Eine starke Expression von CD27 wurde auch bei DN T-Zellen von Patienten mit APLS beschrieben (256). Inwiefern andere Signalmoleküle die suppressive Aktivität humaner DN T-Zellen beeinflussen, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Andererseits kann jedoch spekuliert werden, dass die konditionierten DN T-Zellen keine TCR-Stimulation benötigen, um ihre suppressive Aktivität zu vermitteln, sondern vielmehr nur stimulierte T-Zellen supprimieren können. Deshalb muss in weiteren Experimenten geklärt werden, welche Rolle die Erkennung des Antigens für die suppressive Aktivität der DN T-Zellen darstellt. Ein geeigneter Versuch hierfür wäre eine Blockade des TCR der DN T-Zellen oder eine spezifische Aktivierung der Effektorzellen.

Im murinen System konnte gezeigt werden, dass DN T-Zellen Effektorzellen Antigen-spezifisch supprimieren (137;188). Wenn humane DN T-Zellen ebenfalls Antigen-spezifisch eine Immunantwort unterdrücken, dürfte auch bei einer polyklonalen Aktivierung der Zellen mittels anti-CD3/CD28 Beads nur eine Hemmung der alloreaktiven $CD4^+$ T-Zellen nachgewiesen werden. Dennoch wurde die Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen fast vollständig inhibiert, was eher gegen eine Antigen-spezifische Suppression sprechen würde. Die Frage der Antigenspezifität muss allerdings in weiteren Experimenten untersucht werden.

5.5 Zusammenfassung und Ausblick

1995 beschrieben Sakaguchi *et al.* eine Subpopulation von $CD4^+$ T-Zellen, die die α -Kette des IL-2 Rezeptors (CD25) exprimiert und eine starke regulatorische Aktivität aufweist (62). In zahlreichen Studien konnte seither bestätigt werden, dass $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen entscheidend an der Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz beteiligt sind. Neben den $CD4^+$ $CD25^+$ T-Zellen wurden auch weitere Zellpopulationen mit einer regulatorischen Funktion nachgewiesen, darunter unter anderem die $TCR\alpha\beta^+$ $CD4^-$ $CD8^-$ (doppeltnegativ, DN) T-Zellen. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass DN T-Zellen Effektorzellen Antigen-spezifisch supprimieren und dadurch eine Abstoßung von Transplantaten verhindern können. Eine suppressive Funktion humaner DN T-Zellen gegen Alloantigene wurden bisher jedoch noch nicht nachgewiesen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Charakterisierung humaner DN T-Zellen und die Analyse der immunregulatorischen Funktion dieser Zellen. Wir konnten zeigen, dass die Frequenz an humanen DN T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Spendern circa 1% aller T-Lymphozyten beträgt. Durch quantitative TREC-Analysen wurde nachgewiesen, dass humane DN T-Zellen nicht frisch aus dem Thymus ausgewandert sind, sondern eine proliferative Vorgeschichte aufweisen.

Zudem wurde ein DN T-Zellklon mit bekannter Antigenspezifität charakterisiert. Dieser Klon konnte aus einem Melanom-Patienten nach Vakzinierung mit dem gp100 Peptid isoliert werden. Der Phänotyp des DN Klons unterschied sich nur durch eine fehlende Expression des CD8 Proteins und des CD28 Korezeptors von gp100-spezifischen $CD8^+$ T-Zellklonen. Nach einer spezifischen Stimulation produzierte der DN Klon überwiegend die Zytokine IFN- γ und TNF. Dieses Zytokinprofil konnte auch nach Aktivierung von frisch isolierten humanen DN T-Zellen beobachtet werden. Eine Untersuchung der zytotoxischen Aktivität des DN T-Zellklons zeigte eine starke Antigen-spezifische Zytotoxizität sowohl gegen exogen beladene Zielzellen als auch gegen Tumorzellen, die das Protein endogen prozessieren und auf ihrer Oberfläche präsentieren. Im Gegensatz zu den Daten im Maussystem wird diese zytotoxische Aktivität nicht über Fas/FasL Interaktion sondern über die Effektormoleküle Perforin und Granzyme-B vermittelt. Ferner wurde eine immunregulatorische Funktion des DN T-Zellklons überprüft. Dabei zeigte sich, dass der DN Klon keine suppressive Wirkung auf die $CD8^+$ T-Zellklone hat.

Da humane DN T-Zellen nur in einer geringen Frequenz im peripheren Blut von gesunden Spendern vorkommen, wurden verschiedene Isolations- und Expansionsmethoden untersucht.

Zunächst wurden zwei unterschiedliche Aufreinigungsstrategien miteinander verglichen: eine Kombination aus magnetischer Separation und durchflusszytometrischer Zellsortierung und eine rein magnetische Isolation. Sowohl bei der Reinheit als auch bei der Ausbeute der DN T-Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Systemen festgestellt werden. Da die rein magnetische Aufreinigung jedoch viel kostengünstiger und auch zeitsparender als die Kombination aus Magnet-Separation und Zellsortierung war, wurde für die weiteren Experimente nur noch die magnetische Isolation verwendet. Durch eine Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads zusammen mit dem Stimulationsmedium TCGF (*T cell growth factor*), das unter anderem auch IL-2 enthält, konnten humanen DN T-Zellen effizient expandiert werden. Des Weiteren konnte auch eine Expansion der humanen DN T-Zellen durch die Stimulation mit allogenen DCs nachgewiesen werden. Allerdings fiel diese Expansion geringer aus als bei der Stimulation mit anti-CD3/CD28 Beads. Ein Problem der *in vitro* Expansion von DN T-Zellen besteht in dem zum Auswachsen von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Diese Zellen entstehen direkt aus der DN T-Zellpopulation und proliferieren ähnlich schnell wie die DN T-Zellen.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die immunregulatorische Funktion humaner DN T-Zellen analysiert. Wir konnten erstmalig zeigen, dass humane DN T-Zellen nach repetitiver Stimulation mit allogenen DCs in der Lage sind, alloreaktive CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu supprimieren. Zudem konnten humane DN T-Zellen auch die Proliferation von aktivierten Effektorzellen inhibieren. Weitere Untersuchungen zeigten, dass erst eine mehrwöchige Stimulation mit allogenen DCs die regulatorische Funktion der DN T-Zellen induziert. Darüber hinaus wurde der Mechanismus der DN T-Zell-vermittelten Suppression analysiert. Dabei zeigte sich, dass humane DN T-Zellen für die Induktion der suppressiven Aktivität eine Stimulation des TCR mit dem Antigen benötigen. Mit Hilfe von Transwell-Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass der suppressive Effekt humaner DN T-Zellen nicht über Zytokine oder andere lösliche Faktoren sondern über einen Zell-Zell-Kontakt abhängigen Mechanismus vermittelt wird. Ferner zeigten Blockadeexperimente, dass die Effektormoleküle Perforin und Granzyme-B nicht an der DN T-Zell-vermittelten Suppression beteiligt sind. Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, dass humane DN T-Zellen im Gegensatz zu murinen DN T-Zellen nicht die reaktiven Zellen durch Fas/FasL Interaktion eliminieren, sondern die Effektorzellen aktiv supprimieren. Auch eine Induktion von Anergie konnte ausgeschlossen werden. Darüber hinaus konnte die für murine DN T-Zellen beschriebene Antigen-spezifische Suppression für humane DN T-Zellen nicht sicher bestätigt

werden. Vielmehr weisen die Ergebnisse auf eine unspezifische suppressive Funktion ähnlich den CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen oder Tr1 Zellen hin.

T-Zell-abhängige Erkrankungen wie Autoimmunkrankheiten oder Transplantat-Abstoßungsreaktionen können derzeit lediglich mit unspezifisch wirkenden Immunsuppressiva behandelt werden, die bei Patienten zu schweren Nebenwirkungen führen. In zahlreichen Tiermodellen und *in vitro* Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass regulatorische T-Zellen eine viel versprechende neue Therapieoption darstellen. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigen erstmalig auch eine immunregulatorische Funktion humaner DN T-Zellen. Unter Berücksichtigung der gewonnenen Daten kann eine potenzielle therapeutische Anwendung von humanen DN T-Zellen postuliert werden: Vor einer Organtransplantation würden von dem Spender Monozyten gewonnen und diese *in vitro* zu DCs differenziert werden. Zudem würden DN T-Zellen des Empfängers isoliert und mit den allogenen DCs über mehrere Wochen stimuliert werden. Die vorstimulierten DN T-Zellen würden dann dem Patienten im Rahmen eines adoptiven Transfers infundiert. Mit diesem Konzept könnte möglicherweise eine Abstoßungsreaktion verhindert werden. Im Mausmodell konnte eine erfolgreiche Transplantation eines MHC-differenten Organs (Haut, Herz) durch DN T-Zellen ermöglicht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Infusion von xenogenen Spender-Lymphozyten murine DN T-Zellen aktiviert und in Kombination mit einem Antikörper gegen CD4 eine Abstoßungsreaktion verhindern kann (138). Zudem wäre ein Einsatz humaner DN T-Zellen auch bei der GVHD (*graft versus host disease*) nach allogener Stammzelltransplantation denkbar. Es muss jedoch zunächst beantwortet werden, inwieweit humane DN T-Zellen *in vivo* eine immunregulatorische Funktion aufweisen. Zusammengefasst stellen humane DN T-Zellen eine neue Familie regulatorischer T-Zellen dar, deren Funktion weiter untersucht werden sollte.

6. Literaturverzeichnis

1. Medzhitov,R. and Janeway,C., Jr. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol.Rev.* 173:89-97.:89-97.
2. Abbas,A.K. and Janeway,C.A., Jr. 2000. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell.* 100:129-138.
3. Refaeli,Y. and Abbas,A.K. 1998. Role of cytokines in autoimmunity. *Eur.Cytokine Netw.* 9:81-82.
4. Appleman,L.J. and Boussiotis,V.A. 2003. T cell anergy and costimulation. *Immunol.Rev.* 192:161-80.:161-180.
5. Van Parijs,L. and Abbas,A.K. 1998. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science.* 280:243-248.
6. Jacobson,D.L., Gange,S.J., Rose,N.R., and Graham,N.M. 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 84:223-243.
7. Ermann,J. and Fathman,C.G. 2001. Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation. *Nat.Immunol.* 2:759-761.
8. Dighiero,G. and Rose,N.R. 1999. Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity. *Immunol.Today.* 20:423-428.
9. Goldrath,A.W. and Bevan,M.J. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature.* 402:255-262.
10. Davidson,A. and Diamond,B. 2001. Autoimmune diseases. *N.Engl.J.Med.* 345:340-350.
11. Fisher,G.H., Rosenberg,F.J., Straus,S.E., Dale,J.K., Middleton,L.A., Lin,A.Y., Strober,W., Lenardo,M.J., and Puck,J.M. 1995. Dominant interfering Fas gene mutations impair apoptosis in a human autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Cell.* 81:935-946.
12. Wang,C.Y., Davoodi-Semiromi,A., Huang,W., Connor,E., Shi,J.D., and She,J.X. 1998. Characterization of mutations in patients with autoimmune polyglandular syndrome type 1 (APS1). *Hum.Genet.* 103:681-685.
13. Encinas,J.A. and Kuchroo,V.K. 2000. Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr.Opin.Immunol.* 12:691-697.
14. O'Shea,J.J., Ma,A., and Lipsky,P. 2002. Cytokines and autoimmunity. *Nat.Rev.Immunol.* 2:37-45.
15. Wucherpfennig,K.W. and Strominger,J.L. 1995. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell.* 80:695-705.

16. Lanzavecchia,A. 1995. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J.Exp.Med.* 181:1945-1948.
17. Asano,M., Toda,M., Sakaguchi,N., and Sakaguchi,S. 1996. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J.Exp.Med.* 184:387-396.
18. Viglietta,V., Baecher-Allan,C., Weiner,H.L., and Hafler,D.A. 2004. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J.Exp.Med.* 199:971-979.
19. Lindley,S., Dayan,C.M., Bishop,A., Roep,B.O., Peakman,M., and Tree,T.I. 2005. Defective suppressor function in CD4(+)CD25(+) T-cells from patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 54:92-99.
20. Sugiyama,H., Gyulai,R., Toichi,E., Garaczi,E., Shimada,S., Stevens,S.R., McCormick,T.S., and Cooper,K.D. 2005. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25high regulatory T cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T cell proliferation. *J.Immunol.* 174:164-173.
21. Fabre,J.W. 2001. The allogeneic response and tumor immunity. *Nat.Med.* 7:649-652.
22. Suchin,E.J., Langmuir,P.B., Palmer,E., Sayegh,M.H., Wells,A.D., and Turka,L.A. 2001. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J.Immunol.* 166:973-981.
23. Gould,D.S. and Auchincloss,H., Jr. 1999. Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol.Today.* 20:77-82.
24. Auchincloss,H., Jr., Lee,R., Shea,S., Markowitz,J.S., Grusby,M.J., and Glimcher,L.H. 1993. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:3373-3377.
25. BARTH,R., COUNCE,S., SMITH,P., and SNELL,G.D. 1956. Strong and weak histocompatibility gene differences in mice and their role in the rejection of homografts of tumors and skin. *Ann.Surg.* 144:198-204.
26. Afzali,B., Lechler,R.I., and Hernandez-Fuentes,M.P. 2007. Allorecognition and the alloresponse: clinical implications. *Tissue Antigens.* 69:545-556.
27. Ibrahim,S., Dawson,D.V., and Sanfilippo,F. 1995. Predominant infiltration of rejecting human renal allografts with T cells expressing CD8 and CD45RO. *Transplantation.* 59:724-728.
28. Nankivell,B.J., Borrows,R.J., Fung,C.L., O'Connell,P.J., Allen,R.D., and Chapman,J.R. 2003. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N.Engl.J.Med.* 349:2326-2333.
29. Gallon,L.G., Leventhal,J.R., and Kaufman,D.B. 2002. Pretransplant evaluation of renal transplant candidates. *Semin.Nephrol.* 22:515-525.

30. Barry, J.M. 1992. Immunosuppressive drugs in renal transplantation. A review of the regimens. *Drugs*. 44:554-566.
31. Joffre, O., Gorsse, N., Romagnoli, P., Hudrisier, D., and van Meerwijk, J.P. 2004. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood*. 103:4216-4221.
32. Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C.G., Strober, S., and Negrin, R.S. 2003. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat.Med.* 9:1144-1150.
33. Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. 1999. A direct estimate of the human alphabeta T cell receptor diversity. *Science*. 286:958-961.
34. Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St.G.B., and Vinuesa, C.G. 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature*. 435:590-597.
35. McCarty, N., Paust, S., Ikizawa, K., Dan, I., Li, X., and Cantor, H. 2005. Signaling by the kinase MINK is essential in the negative selection of autoreactive thymocytes. *Nat.Immunol.* 6:65-72.
36. Semana, G., Gausling, R., Jackson, R.A., and Hafler, D.A. 1999. T cell autoreactivity to proinsulin epitopes in diabetic patients and healthy subjects. *J.Autoimmun.* 12:259-267.
37. Li, L. and Boussiotis, V.A. 2006. Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications. *J.Mol.Med.* 84:887-899.
38. Walker, L.S. and Abbas, A.K. 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat.Rev.Immunol.* 2:11-19.
39. Zinkernagel, R.M. 1996. Immunology taught by viruses. *Science*. 271:173-178.
40. Alferink, J., Tafuri, A., Vestweber, D., Hallmann, R., Hammerling, G.J., and Arnold, B. 1998. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science*. 282:1338-1341.
41. Kurts, C., Miller, J.F., Subramaniam, R.M., Carbone, F.R., and Heath, W.R. 1998. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J.Exp.Med.* 188:409-414.
42. Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J.Exp.Med.* 165:302-319.
43. Schwartz, R.H. 1997. T cell clonal anergy. *Curr.Opin.Immunol.* 9:351-357.
44. Krummel, M.F. and Allison, J.P. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J.Exp.Med.* 182:459-465.

45. Tivol,E.A., Borriello,F., Schweitzer,A.N., Lynch,W.P., Bluestone,J.A., and Sharpe,A.H. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 3:541-547.
46. Waterhouse,P., Penninger,J.M., Timms,E., Wakeham,A., Shahinian,A., Lee,K.P., Thompson,C.B., Griesser,H., and Mak,T.W. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 270:985-988.
47. Ueda,H., Howson,J.M., Esposito,L., Heward,J., Snook,H., Chamberlain,G., Rainbow,D.B., Hunter,K.M., Smith,A.N., Di Genova,G. *et al.* 2003. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. *Nature*. 423:506-511.
48. Nishimura,H., Nose,M., Hiai,H., Minato,N., and Honjo,T. 1999. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity*. 11:141-151.
49. Agata,Y., Kawasaki,A., Nishimura,H., Ishida,Y., Tsubata,T., Yagita,H., and Honjo,T. 1996. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int.Immunol.* 8:765-772.
50. Latchman,Y., Wood,C.R., Chernova,T., Chaudhary,D., Borde,M., Chernova,I., Iwai,Y., Long,A.J., Brown,J.A., Nunes,R. *et al.* 2001. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat.Immunol.* 2:261-268.
51. Nielsen,C., Hansen,D., Husby,S., Jacobsen,B.B., and Lillevang,S.T. 2003. Association of a putative regulatory polymorphism in the PD-1 gene with susceptibility to type 1 diabetes. *Tissue Antigens*. 62:492-497.
52. Prokunina,L., Castillejo-Lopez,C., Oberg,F., Gunnarsson,I., Berg,L., Magnusson,V., Brookes,A.J., Tentler,D., Kristjansdottir,H., Grondal,G. *et al.* 2002. A regulatory polymorphism in PDCD1 is associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus in humans. *Nat.Genet.* 32:666-669.
53. Sharma,K., Wang,R.X., Zhang,L.Y., Yin,D.L., Luo,X.Y., Solomon,J.C., Jiang,R.F., Markos,K., Davidson,W., Scott,D.W. *et al.* 2000. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol.Ther.* 88:333-347.
54. Nagata,S. and Suda,T. 1995. Fas and Fas ligand: lpr and gld mutations. *Immunol.Today*. 16:39-43.
55. Griffith,T.S., Brunner,T., Fletcher,S.M., Green,D.R., and Ferguson,T.A. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 270:1189-1192.
56. Choi,C. and Benveniste,E.N. 2004. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 44:65-81.
57. Straus,S.E., Sneller,M., Lenardo,M.J., Puck,J.M., and Strober,W. 1999. An inherited disorder of lymphocyte apoptosis: the autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Ann.Intern.Med.* 130:591-601.

58. Baecher-Allan,C. and Anderson,D.E. 2006. Regulatory cells and human cancer. *Semin.Cancer Biol.* 16:98-105.
59. Chatila,T.A. 2005. Role of regulatory T cells in human diseases. *J.Allergy Clin.Immunol.* 116:949-959.
60. Zenclussen,A.C. 2006. Regulatory T cells in pregnancy. *Springer Semin.Immunopathol.* 28:31-39.
61. Wood,K.J. and Sakaguchi,S. 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* 3:199-210.
62. Sakaguchi,S., Sakaguchi,N., Asano,M., Itoh,M., and Toda,M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 155:1151-1164.
63. Sakaguchi,S. 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 22:531-62.:531-562.
64. Baecher-Allan,C. and Hafler,D.A. 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol.Rev.* 212:203-16.:203-216.
65. Sakaguchi,S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 101:455-458.
66. Takahashi,M., Nakamura,K., Honda,K., Kitamura,Y., Mizutani,T., Araki,Y., Kabemura,T., Chijiiwa,Y., Harada,N., and Nawata,H. 2006. An inverse correlation of human peripheral blood regulatory T cell frequency with the disease activity of ulcerative colitis. *Dig.Dis.Sci.* 51:677-686.
67. Kriegel,M.A., Lohmann,T., Gabler,C., Blank,N., Kalden,J.R., and Lorenz,H.M. 2004. Defective suppressor function of human CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J.Exp.Med.* 199:1285-1291.
68. Fontenot,J.D., Gavin,M.A., and Rudensky,A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4:330-336.
69. Hori,S., Nomura,T., and Sakaguchi,S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 299:1057-1061.
70. Bettelli,E., Dastrange,M., and Oukka,M. 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:5138-5143.
71. Wu,Y., Borde,M., Heissmeyer,V., Feuerer,M., Lapan,A.D., Stroud,J.C., Bates,D.L., Guo,L., Han,A., Ziegler,S.F. *et al.* 2006. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 126:375-387.

72. Baron,U., Floess,S., Wieczorek,G., Baumann,K., Grutzkau,A., Dong,J., Thiel,A., Boeld,T.J., Hoffmann,P., Edinger,M. *et al.* 2007. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur.J.Immunol.* 37:2378-2389.
73. Wildin,R.S., Ramsdell,F., Peake,J., Faravelli,F., Casanova,J.L., Buist,N., Levy-Lahad,E., Mazzella,M., Goulet,O., Perroni,L. *et al.* 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat.Genet.* 27:18-20.
74. Bennett,C.L., Christie,J., Ramsdell,F., Brunkow,M.E., Ferguson,P.J., Whitesell,L., Kelly,T.E., Saulsbury,F.T., Chance,P.F., and Ochs,H.D. 2001. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat.Genet.* 27:20-21.
75. Piccirillo,C.A. and Shevach,E.M. 2001. Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J.Immunol.* 167:1137-1140.
76. Thornton,A.M. and Shevach,E.M. 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 188:287-296.
77. Lim,H.W., HILLSAMER,P., BANHAM,A.H., and KIM,C.H. 2005. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J.Immunol.* 175:4180-4183.
78. Nakamura,K., Kitani,A., Fuss,I., Pedersen,A., Harada,N., Nawata,H., and Strober,W. 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J.Immunol.* 172:834-842.
79. Ghiringhelli,F., Menard,C., Terme,M., Flament,C., Taieb,J., Chaput,N., Puig,P.E., Novault,S., Escudier,B., Vivier,E. *et al.* 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J.Exp.Med.* 202:1075-1085.
80. Azuma,T., Takahashi,T., Kunisato,A., Kitamura,T., and Hirai,H. 2003. Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res.* 63:4516-4520.
81. Misra,N., Bayry,J., Lacroix-Desmazes,S., Kazatchkine,M.D., and Kaveri,S.V. 2004. Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J.Immunol.* 172:4676-4680.
82. Thornton,A.M. and Shevach,E.M. 2000. Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J.Immunol.* 164:183-190.
83. Karim,M., Feng,G., Wood,K.J., and Bushell,A.R. 2005. CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation. *Blood.* 105:4871-4877.

84. Kuniyasu,Y., Takahashi,T., Itoh,M., Shimizu,J., Toda,G., and Sakaguchi,S. 2000. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int.Immunol.* 12:1145-1155.
85. Read,S., Malmstrom,V., and Powrie,F. 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J.Exp.Med.* 192:295-302.
86. Huang,C.T., Workman,C.J., Flies,D., Pan,X., Marson,A.L., Zhou,G., Hipkiss,E.L., Ravi,S., Kowalski,J., Levitsky,H.I. *et al.* 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity.* 21:503-513.
87. Annacker,O., Pimenta-Araujo,R., Burlen-Defranoux,O., Barbosa,T.C., Cumano,A., and Bandeira,A. 2001. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J.Immunol.* 166:3008-3018.
88. Ostroukhova,M., Qi,Z., Oriss,T.B., Dixon-McCarthy,B., Ray,P., and Ray,A. 2006. Treg-mediated immunosuppression involves activation of the Notch-HES1 axis by membrane-bound TGF-beta. *J.Clin.Invest.* 116:996-1004.
89. Piccirillo,C.A., Letterio,J.J., Thornton,A.M., McHugh,R.S., Mamura,M., Mizuhara,H., and Shevach,E.M. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J.Exp.Med.* 196:237-246.
90. Zorn,E., Nelson,E.A., Mohseni,M., Porcheray,F., Kim,H., Litsa,D., Bellucci,R., Raderschall,E., Canning,C., Soiffer,R.J. *et al.* 2006. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. *Blood.* 108:1571-1579.
91. Deaglio,S., Dwyer,K.M., Gao,W., Friedman,D., Usheva,A., Erat,A., Chen,J.F., Enjyoji,K., Linden,J., Oukka,M. *et al.* 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J.Exp.Med.* 204:1257-1265.
92. Bopp,T., Becker,C., Klein,M., Klein-Hessling,S., Palmetshofer,A., Serfling,E., Heib,V., Becker,M., Kubach,J., Schmitt,S. *et al.* 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.* 204:1303-1310.
93. Mills,K.H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat.Rev.Immunol.* 4:841-855.
94. Baecher-Allan,C., Viglietta,V., and Hafler,D.A. 2002. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. *J.Immunol.* 169:6210-6217.
95. Suttmuller,R.P., den Brok,M.H., Kramer,M., Bennink,E.J., Toonen,L.W., Kullberg,B.J., Joosten,L.A., Akira,S., Netea,M.G., and Adema,G.J. 2006. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J.Clin.Invest.* 116:485-494.

96. Belkaid,Y. and Rouse,B.T. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat.Immunol.* 6:353-360.
97. Pasare,C. and Medzhitov,R. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 299:1033-1036.
98. Shevach,E.M. and Stephens,G.L. 2006. The GITR-GITRL interaction: co-stimulation or contrasuppression of regulatory activity? *Nat.Rev.Immunol.* 6:613-618.
99. Walker,M.R., Carson,B.D., Nepom,G.T., Ziegler,S.F., and Buckner,J.H. 2005. De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102:4103-4108.
100. Walker,M.R., Kasprowicz,D.J., Gersuk,V.H., Benard,A., Van Landeghen,M., Buckner,J.H., and Ziegler,S.F. 2003. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J.Clin.Invest.* 112:1437-1443.
101. Liang,S., Alard,P., Zhao,Y., Parnell,S., Clark,S.L., and Kosiewicz,M.M. 2005. Conversion of CD4+ CD25- cells into CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *J.Exp.Med.* 201:127-137.
102. Kretschmer,K., Apostolou,I., Hawiger,D., Khazaie,K., Nussenzweig,M.C., and von Boehmer,H. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat.Immunol.* 6:1219-1227.
103. Chen,W., Jin,W., Hardegen,N., Lei,K.J., Li,L., Marinos,N., McGrady,G., and Wahl,S.M. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J.Exp.Med.* 198:1875-1886.
104. Faria,A.M. and Weiner,H.L. 2006. Oral tolerance and TGF-beta-producing cells. *Inflamm.Allergy Drug Targets.* 5:179-190.
105. Seder,R.A., Marth,T., Sieve,M.C., Strober,W., Letterio,J.J., Roberts,A.B., and Kelsall,B. 1998. Factors involved in the differentiation of TGF-beta-producing cells from naive CD4+ T cells: IL-4 and IFN-gamma have opposing effects, while TGF-beta positively regulates its own production. *J.Immunol.* 160:5719-5728.
106. Carrier,Y., Yuan,J., Kuchroo,V.K., and Weiner,H.L. 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. I. Induction of Foxp3-positive regulatory T cells by Th3 cells derived from TGF-beta T cell-transgenic mice. *J.Immunol.* 178:179-185.
107. Carrier,Y., Yuan,J., Kuchroo,V.K., and Weiner,H.L. 2007. Th3 cells in peripheral tolerance. II. TGF-beta-transgenic Th3 cells rescue IL-2-deficient mice from autoimmunity. *J.Immunol.* 178:172-178.
108. Groux,H., O'Garra,A., Bigler,M., Rouleau,M., Antonenko,S., de Vries,J.E., and Roncarolo,M.G. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature.* 389:737-742.

109. Jonuleit,H., Schmitt,E., Schuler,G., Knop,J., and Enk,A.H. 2000. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 192:1213-1222.
110. Barrat,F.J., Cua,D.J., Boonstra,A., Richards,D.F., Crain,C., Savelkoul,H.F., Waal-Malefyt,R., Coffman,R.L., Hawrylowicz,C.M., and O'Garra,A. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J.Exp.Med.* 195:603-616.
111. Wakkach,A., Cottrez,F., and Groux,H. 2001. Differentiation of regulatory T cells 1 is induced by CD2 costimulation. *J.Immunol.* 167:3107-3113.
112. Levings,M.K., Sangregorio,R., Galbiati,F., Squadrone,S., de Waal,M.R., and Roncarolo,M.G. 2001. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J.Immunol.* 166:5530-5539.
113. Levings,M.K., Gregori,S., Tresoldi,E., Cazzaniga,S., Bonini,C., and Roncarolo,M.G. 2005. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells. *Blood.* 105:1162-1169.
114. Bacchetta,R., Sartirana,C., Levings,M.K., Bordinon,C., Narula,S., and Roncarolo,M.G. 2002. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur.J.Immunol.* 32:2237-2245.
115. Arif,S., Tree,T.I., Astill,T.P., Tremble,J.M., Bishop,A.J., Dayan,C.M., Roep,B.O., and Peakman,M. 2004. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J.Clin.Invest.* 113:451-463.
116. Yudoh,K., Matsuno,H., Nakazawa,F., Yonezawa,T., and Kimura,T. 2000. Reduced expression of the regulatory CD4+ T cell subset is related to Th1/Th2 balance and disease severity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43:617-627.
117. Weston,L.E., Geczy,A.F., and Briscoe,H. 2006. Production of IL-10 by alloreactive sibling donor cells and its influence on the development of acute GVHD. *Bone Marrow Transplant.* 37:207-212.
118. VanBuskirk,A.M., Burlingham,W.J., Jankowska-Gan,E., Chin,T., Kusaka,S., Geissler,F., Pelletier,R.P., and Orosz,C.G. 2000. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J.Clin.Invest.* 106:145-155.
119. Saloga,J., Bellinghausen,I., and Knop,J. 1999. Do Tr1 cells play a role in immunotherapy? *Int.Arch.Allergy Immunol.* 118:210-211.
120. Reefer,A.J., Carneiro,R.M., Custis,N.J., Platts-Mills,T.A., Sung,S.S., Hammer,J., and Woodfolk,J.A. 2004. A role for IL-10-mediated HLA-DR7-restricted T cell-dependent events in development of the modified Th2 response to cat allergen. *J.Immunol.* 172:2763-2772.

121. MacDonald,A.J., Duffy,M., Brady,M.T., McKiernan,S., Hall,W., Hegarty,J., Curry,M., and Mills,K.H. 2002. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J.Infect.Dis.* 185:720-727.
122. Marshall,N.A., Christie,L.E., Munro,L.R., Culligan,D.J., Johnston,P.W., Barker,R.N., and Vickers,M.A. 2004. Immunosuppressive regulatory T cells are abundant in the reactive lymphocytes of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 103:1755-1762.
123. Jiang,H., Zhang,S.I., and Pernis,B. 1992. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science.* 256:1213-1215.
124. Jiang,H., Ware,R., Stall,A., Flaherty,L., Chess,L., and Pernis,B. 1995. Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity.* 2:185-194.
125. Lu,L., Werneck,M.B., and Cantor,H. 2006. The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol.Rev.* 212:51-9.:51-59.
126. Jiang,H. 2005. The Qa-1 dependent CD8+ T cell mediated regulatory pathway. *Cell Mol.Immunol.* 2:161-167.
127. Ciubotariu,R., Vasilescu,R., Ho,E., Cinti,P., Cancedda,C., Poli,L., Late,M., Liu,Z., Berloco,P., Cortesini,R. *et al.* 2001. Detection of T suppressor cells in patients with organ allografts. *Hum.Immunol.* 62:15-20.
128. Ciubotariu,R., Liu,Z., Ho,E., Vasilescu,R., Foca-Rodi,A., Colovai,A.I., Fisher,P., Hardy,M., Rose,E.A., Cortesini,R. *et al.* 2001. Indirect allorecognition in heart allograft rejection. *Transplant.Proc.* 33:1612.
129. Bruzzone,P., Renna,M.E., Cinti,P., Evangelista,B., Peritore,D., Poli,L., Pretagostini,R., Berloco,P., Cortesini,R., and Cortesini,N.S. 2001. Organ allograft recipients develop HLA class I-specific T suppressor cells. *Transplant.Proc.* 33:78-79.
130. Liu,Z., Tugulea,S., Cortesini,R., and Suciu-Foca,N. 1998. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int.Immunol.* 10:775-783.
131. Ciubotariu,R., Colovai,A.I., Pennesi,G., Liu,Z., Smith,D., Berlocco,P., Cortesini,R., and Suciu-Foca,N. 1998. Specific suppression of human CD4+ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8+CD28- regulatory T cells. *J.Immunol.* 161:5193-5202.
132. Chang,C.C., Ciubotariu,R., Manavalan,J.S., Yuan,J., Colovai,A.I., Piazza,F., Lederman,S., Colonna,M., Cortesini,R., Dalla-Favera,R. *et al.* 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat.Immunol.* 3:237-243.
133. Ravetch,J.V. and Lanier,L.L. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science.* 290:84-89.
134. Filaci,G., Bacilieri,S., Fravega,M., Monetti,M., Contini,P., Ghio,M., Setti,M., Puppo,F., and Indiveri,F. 2001. Impairment of CD8+ T suppressor cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J.Immunol.* 166:6452-6457.

135. Meloni,F., Morosini,M., Solari,N., Passadore,I., Nascimbene,C., Novo,M., Ferrari,M., Cosentino,M., Marino,F., Pozzi,E. *et al.* 2006. Foxp3 expressing CD4+ CD25+ and CD8+CD28- T regulatory cells in the peripheral blood of patients with lung cancer and pleural mesothelioma. *Hum.Immunol.* 67:1-12.
136. Filaci,G., Fravega,M., Negrini,S., Procopio,F., Fenoglio,D., Rizzi,M., Brenci,S., Contini,P., Olive,D., Ghio,M. *et al.* 2004. Nonantigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes originate from CD8+CD28- T cells and inhibit both T-cell proliferation and CTL function. *Hum.Immunol.* 65:142-156.
137. Zhang,Z.X., Yang,L., Young,K.J., DuTemple,B., and Zhang,L. 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat.Med.* 6:782-789.
138. Chen,W., Ford,M.S., Young,K.J., Cybulsky,M.I., and Zhang,L. 2003. Role of double-negative regulatory T cells in long-term cardiac xenograft survival. *J.Immunol.* 170:1846-1853.
139. Young,K.J., Kay,L.S., Phillips,M.J., and Zhang,L. 2003. Antitumor activity mediated by double-negative T cells. *Cancer Res.* 63:8014-8021.
140. Hossain,M.S., Takimoto,H., Ninomiya,T., Yoshida,H., Kishihara,K., Matsuzaki,G., Kimura,G., and Nomoto,K. 2000. Characterization of CD4- CD8- CD3+ T-cell receptor-alphabeta+ T cells in murine cytomegalovirus infection. *Immunology.* 101:19-29.
141. Zhang,Z.X., Young,K., and Zhang,L. 2001. CD3+CD4-CD8- alphabeta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J.Mol.Med.* 79:419-427.
142. Wang,R., Wang-Zhu,Y., and Grey,H. 2002. Interactions between double positive thymocytes and high affinity ligands presented by cortical epithelial cells generate double negative thymocytes with T cell regulatory activity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 99:2181-2186.
143. Bix,M., Coles,M., and Raulet,D. 1993. Positive selection of V beta 8+ CD4-8- thymocytes by class I molecules expressed by hematopoietic cells. *J.Exp.Med.* 178:901-908.
144. Ford,M.S., Zhang,Z.X., Chen,W., and Zhang,L. 2006. Double-negative T regulatory cells can develop outside the thymus and do not mature from CD8+ T cell precursors. *J.Immunol.* 177:2803-2809.
145. Ohteki,T., Seki,S., Abo,T., and Kumagai,K. 1990. Liver is a possible site for the proliferation of abnormal CD3+4-8- double-negative lymphocytes in autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *J.Exp.Med.* 172:7-12.
146. Palathumpat,V., Dejbakhsh-Jones,S., Holm,B., and Strober,S. 1992. Different subsets of T cells in the adult mouse bone marrow and spleen induce or suppress acute graft-versus-host disease. *J.Immunol.* 149:808-817.

147. Yamagiwa,S., Sugahara,S., Shimizu,T., Iwanaga,T., Yoshida,Y., Honda,S., Watanabe,H., Suzuki,K., Asakura,H., and Abo,T. 1998. The primary site of CD4- 8- B220+ alphabeta T cells in lpr mice: the appendix in normal mice. *J.Immunol.* 160:2665-2674.
148. Herron,L.R., Eisenberg,R.A., Roper,E., Kakkanaiiah,V.N., Cohen,P.L., and Kotzin,B.L. 1993. Selection of the T cell receptor repertoire in Lpr mice. *J.Immunol.* 151:3450-3459.
149. Takahama,Y., Kosugi,A., and Singer,A. 1991. Phenotype, ontogeny, and repertoire of CD4-CD8- T cell receptor alpha beta + thymocytes. Variable influence of self-antigens on T cell receptor V beta usage. *J.Immunol.* 146:1134-1141.
150. Landolfi,M.M., Van Houten,N., Russell,J.Q., Scollay,R., Parnes,J.R., and Budd,R.C. 1993. CD2-CD4-CD8- lymph node T lymphocytes in MRL lpr/lpr mice are derived from a CD2+CD4+CD8+ thymic precursor. *J.Immunol.* 151:1086-1096.
151. Erard,F., Wild,M.T., Garcia-Sanz,J.A., and Le Gros,G. 1993. Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science.* 260:1802-1805.
152. Mehal,W.Z. and Crispe,I.N. 1998. TCR ligation on CD8+ T cells creates double-negative cells in vivo. *J.Immunol.* 161:1686-1693.
153. Thomson,C.W., Lee,B.P., and Zhang,L. 2006. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol.Res.* 35:163-178.
154. Hamad,A.R., Srikrishnan,A., Mirmonsef,P., Broeren,C.P., June,C.H., Pardoll,D., and Schneck,J.P. 2001. Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative alpha/beta T cells: implications for autoimmunity. *J.Exp.Med.* 193:1113-1121.
155. Zhang,D., Yang,W., Degauque,N., Tian,Y., Mikita,A., and Zheng,X.X. 2007. New differentiation pathway for double-negative regulatory T cells that regulates the magnitude of immune responses. *Blood.* 109:4071-4079.
156. Schwadron,R.B. and Strober,S. 1987. Cloned natural suppressor cells derived from the neonatal spleen: in vitro action and lineage. *Transplant.Proc.* 19:533-535.
157. Strober,S., Cheng,L., Zeng,D., Palathumapat,R., Dejbakhsh-Jones,S., Huie,P., and Sibley,R. 1996. Double negative (CD4-CD8- alpha beta+) T cells which promote tolerance induction and regulate autoimmunity. *Immunol.Rev.* 149:217-30.:217-230.
158. Takai,T. 2005. Fc receptors and their role in immune regulation and autoimmunity. *J.Clin.Immunol.* 25:1-18.
159. Nakajima,H., Samaridis,J., Angman,L., and Colonna,M. 1999. Human myeloid cells express an activating ILT receptor (ILT1) that associates with Fc receptor gamma-chain. *J.Immunol.* 162:5-8.

160. Koyasu,S., D'Adamio,L., Arulanandam,A.R., Abraham,S., Clayton,L.K., and Reinherz,E.L. 1992. T cell receptor complexes containing Fc epsilon RI gamma homodimers in lieu of CD3 zeta and CD3 eta components: a novel isoform expressed on large granular lymphocytes. *J.Exp.Med.* 175:203-209.
161. Thomson,C.W., Teft,W.A., Chen,W., Lee,B.P., Madrenas,J., and Zhang,L. 2006. FcR gamma presence in TCR complex of double-negative T cells is critical for their regulatory function. *J.Immunol.* 177:2250-2257.
162. Shevach,E.M. and Korty,P.E. 1989. Ly-6: a multigene family in search of a function. *Immunol.Today.* 10:195-200.
163. Malek,T.R., Ortega,G., Chan,C., Kroczeck,R.A., and Shevach,E.M. 1986. Role of Ly-6 in lymphocyte activation. II. Induction of T cell activation by monoclonal anti-Ly-6 antibodies. *J.Exp.Med.* 164:709-722.
164. Codias,E.K., Rutter,J.E., Fleming,T.J., and Malek,T.R. 1990. Down-regulation of IL-2 production by activation of T cells through Ly-6A/E. *J.Immunol.* 145:1407-1414.
165. Malek,T.R., Fleming,T.J., and Codias,E.K. 1994. Regulation of T lymphocyte function by glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins. *Semin.Immunol.* 6:105-113.
166. Zhang,Z.X., Stanford,W.L., and Zhang,L. 2002. Ly-6A is critical for the function of double negative regulatory T cells. *Eur.J.Immunol.* 32:1584-1592.
167. Forster,R., Emrich,T., Kremmer,E., and Lipp,M. 1994. Expression of the G-protein--coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood.* 84:830-840.
168. Ansel,K.M., McHeyzer-Williams,L.J., Ngo,V.N., McHeyzer-Williams,M.G., and Cyster,J.G. 1999. In vivo-activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J.Exp.Med.* 190:1123-1134.
169. Lee,B.P., Chen,W., Shi,H., Der,S.D., Forster,R., and Zhang,L. 2006. CXCR5/CXCL13 interaction is important for double-negative regulatory T cell homing to cardiac allografts. *J.Immunol.* 176:5276-5283.
170. Muller,G., Hopken,U.E., and Lipp,M. 2003. The impact of CCR7 and CXCR5 on lymphoid organ development and systemic immunity. *Immunol.Rev.* 195:117-35.:117-135.
171. Lee,B.P., Mansfield,E., Hsieh,S.C., Hernandez-Boussard,T., Chen,W., Thomson,C.W., Ford,M.S., Bosinger,S.E., Der,S., Zhang,Z.X. *et al.* 2005. Expression profiling of murine double-negative regulatory T cells suggest mechanisms for prolonged cardiac allograft survival. *J.Immunol.* 174:4535-4544.
172. Khan,Q., Penninger,J.M., Yang,L., Marra,L.E., Kozieradzki,I., and Zhang,L. 1999. Regulation of apoptosis in mature alphabeta+CD4-CD8- antigen-specific suppressor T cell clones. *J.Immunol.* 162:5860-5867.

173. Marra,L.E., Zhang,Z.X., Joe,B., Campbell,J., Levy,G.A., Penninger,J., and Zhang,L. 2004. IL-10 induces regulatory T cell apoptosis by up-regulation of the membrane form of TNF-alpha. *J.Immunol.* 172:1028-1035.
174. Young,K.J., Yang,L., Phillips,M.J., and Zhang,L. 2002. Donor-lymphocyte infusion induces transplantation tolerance by activating systemic and graft-infiltrating double-negative regulatory T cells. *Blood.* 100:3408-3414.
175. Chen,W., Zhou,D., Torrealba,J.R., Waddell,T.K., Grant,D., and Zhang,L. 2005. Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J.Immunol.* 175:3409-3416.
176. Ford,M.S., Chen,W., Wong,S., Li,C., Vanama,R., Elford,A.R., Asa,S.L., Ohashi,P.S., and Zhang,L. 2007. Peptide-activated double-negative T cells can prevent autoimmune type-1 diabetes development. *Eur.J.Immunol.* 37:2234-2241.
177. Cohen,P.L. and Eisenberg,R.A. 1991. Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu.Rev.Immunol.* 9:243-69.:243-269.
178. Ford,M.S., Young,K.J., Zhang,Z., Ohashi,P.S., and Zhang,L. 2002. The immune regulatory function of lymphoproliferative double negative T cells in vitro and in vivo. *J.Exp.Med.* 196:261-267.
179. Young,K.J., DuTemple,B., Phillips,M.J., and Zhang,L. 2003. Inhibition of graft-versus-host disease by double-negative regulatory T cells. *J.Immunol.* 171:134-141.
180. Abraham,V.S., Sachs,D.H., and Sykes,M. 1992. Mechanism of protection from graft-versus-host disease mortality by IL-2. III. Early reductions in donor T cell subsets and expansion of a CD3+CD4-CD8- cell population. *J.Immunol.* 148:3746-3752.
181. Kadena,T., Matsuzaki,G., Fujise,S., Kishihara,K., Takimoto,H., Sasaki,M., Beppu,M., Nakamura,S., and Nomoto,K. 1997. TCR alpha beta+ CD4- CD8- T cells differentiate extrathymically in an lck-independent manner and participate in early response against *Listeria monocytogenes* infection through interferon-gamma production. *Immunology.* 91:511-519.
182. Cowley,S.C., Hamilton,E., Frelinger,J.A., Su,J., Forman,J., and Elkins,K.L. 2005. CD4-CD8- T cells control intracellular bacterial infections both in vitro and in vivo. *J.Exp.Med.* 202:309-319.
183. Sieling,P.A., Porcelli,S.A., Duong,B.T., Spada,F., Bloom,B.R., Diamond,B., and Hahn,B.H. 2000. Human double-negative T cells in systemic lupus erythematosus provide help for IgG and are restricted by CD1c. *J.Immunol.* 165:5338-5344.
184. Marlies,A., Udo,G., Juergen,B., Bernd,S., Herrmann,M., and Haas,J.P. 2007. The expanded double negative T cell populations of a patient with ALPS are not clonally related to CD4+ or to CD8+ T cells. *Autoimmunity.* 40:299-301.
185. Anand,A., Dean,G.S., Quereshi,K., Isenberg,D.A., and Lydyard,P.M. 2002. Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: activation markers. *Lupus.* 11:493-500.

186. Bottrel,R.L., Dutra,W.O., Martins,F.A., Gontijo,B., Carvalho,E., Barral-Netto,M., Barral,A., Almeida,R.P., Mayrink,W., Locksley,R. *et al.* 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.* 69:3232-3239.
187. Antonelli,L.R., Dutra,W.O., Oliveira,R.R., Torres,K.C., Guimaraes,L.H., Bacellar,O., and Gollob,K.J. 2006. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect.Immun.* 74:6317-6323.
188. Young,K.J. and Zhang,L. 2002. The nature and mechanisms of DN regulatory T-cell mediated suppression. *Hum.Immunol.* 63:926-934.
189. Hudrisier,D. and Bongrand,P. 2002. Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants onto T cells: molecular mechanisms and biological significance. *FASEB J.* 16:477-486.
190. Tsang,J.Y., Chai,J.G., and Lechler,R. 2003. Antigen presentation by mouse CD4+ T cells involving acquired MHC class II:peptide complexes: another mechanism to limit clonal expansion? *Blood.* 101:2704-2710.
191. Huang,J.F., Yang,Y., Sepulveda,H., Shi,W., Hwang,I., Peterson,P.A., Jackson,M.R., Sprent,J., and Cai,Z. 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science.* 286:952-954.
192. Batista,F.D., Iber,D., and Neuberger,M.S. 2001. B cells acquire antigen from target cells after synapse formation. *Nature.* 411:489-494.
193. Onfelt,B., Nedvetzki,S., Yanagi,K., and Davis,D.M. 2004. Cutting edge: Membrane nanotubes connect immune cells. *J.Immunol.* 173:1511-1513.
194. Arnold,P.Y., Davidian,D.K., and Mannie,M.D. 1997. Antigen presentation by T cells: T cell receptor ligation promotes antigen acquisition from professional antigen-presenting cells. *Eur.J.Immunol.* 27:3198-3205.
195. Hamad,A.R., Mohamood,A.S., Trujillo,C.J., Huang,C.T., Yuan,E., and Schneck,J.P. 2003. B220+ double-negative T cells suppress polyclonal T cell activation by a Fas-independent mechanism that involves inhibition of IL-2 production. *J.Immunol.* 171:2421-2426.
196. Salter,R.D., Howell,D.N., and Cresswell,P. 1985. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics.* 21:235-246.
197. Jonuleit,H., Kuhn,U., Muller,G., Steinbrink,K., Paragnik,L., Schmitt,E., Knop,J., and Enk,A.H. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur.J.Immunol.* 27:3135-3142.
198. Fischer,K., Voelkl,S., Heymann,J., Przybylski,G.K., Mondal,K., Laumer,M., Kunz-Schughart,L., Schmidt,C.A., Andreesen,R., and Mackensen,A. 2005. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 105:2828-2835.

199. Zhang,Z.X., Ma,Y., Wang,H., Arp,J., Jiang,J., Huang,X., He,K.M., Garcia,B., Madrenas,J., and Zhong,R. 2006. Double-negative T cells, activated by xenoantigen, lyse autologous B and T cells using a perforin/granzyme-dependent, Fas-Fas ligand-independent pathway. *J.Immunol.* 177:6920-6929.
200. Gong,B., Chen,Q., Endlich,B., Mazumder,S., and Almasan,A. 1999. Ionizing radiation-induced, Bax-mediated cell death is dependent on activation of cysteine and serine proteases. *Cell Growth Differ.* 10:491-502.
201. Kataoka,T., Takaku,K., Magae,J., Shinohara,N., Takayama,H., Kondo,S., and Nagai,K. 1994. Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *J.Immunol.* 153:3938-3947.
202. Garlie,N.K., LeFever,A.V., Siebenlist,R.E., Levine,B.L., June,C.H., and Lum,L.G. 1999. T cells coactivated with immobilized anti-CD3 and anti-CD28 as potential immunotherapy for cancer. *J.Immunother.(1997).* 22:336-345.
203. Hoffmann,P., Eder,R., Kunz-Schughart,L.A., Andreessen,R., and Edinger,M. 2004. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood.* 104:895-903.
204. Banchereau,J. and Steinman,R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245-252.
205. Greene,W.C., Depper,J.M., Kronke,M., and Leonard,W.J. 1986. The human interleukin-2 receptor: analysis of structure and function. *Immunol.Rev.* 92:29-48.:29-48.
206. Jackson,A.L., Matsumoto,H., Janszen,M., Maino,V., Blidy,A., and Shye,S. 1990. Restricted expression of p55 interleukin 2 receptor (CD25) on normal T cells. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 54:126-133.
207. Lombardi,G., Sidhu,S., Batchelor,R., and Lechler,R. 1994. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science.* 264:1587-1589.
208. Diepolder,H.M., Jung,M.C., Wierenga,E., Hoffmann,R.M., Zachoval,R., Gerlach,T.J., Scholz,S., Heavner,G., Riethmuller,G., and Pape,G.R. 1996. Anergic TH1 clones specific for hepatitis B virus (HBV) core peptides are inhibitory to other HBV core-specific CD4+ T cells in vitro. *J.Virol.* 70:7540-7548.
209. Reiner,S.L. 2007. Development in motion: helper T cells at work. *Cell.* 129:33-36.
210. Del Prete,G. 1998. The concept of type-1 and type-2 helper T cells and their cytokines in humans. *Int.Rev.Immunol.* 16:427-455.
211. Zlotnik,A., Godfrey,D.I., Fischer,M., and Suda,T. 1992. Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- T cells. Alpha beta-T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J.Immunol.* 149:1211-1215.
212. Wolfers,J., Lozier,A., Raposo,G., Regnault,A., Thery,C., Masurier,C., Flament,C., Pouzieux,S., Faure,F., Tursz,T. *et al.* 2001. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat.Med.* 7:297-303.

213. Mack,M., Kleinschmidt,A., Bruhl,H., Klier,C., Nelson,P.J., Cihak,J., Plachy,J., Stangassinger,M., Erfle,V., and Schlondorff,D. 2000. Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat.Med.* 6:769-775.
214. Beadling,C. and Slifka,M.K. 2006. Quantifying viable virus-specific T cells without a priori knowledge of fine epitope specificity. *Nat.Med.* 12:1208-1212.
215. Hendriks,J., Xiao,Y., and Borst,J. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J.Exp.Med.* 198:1369-1380.
216. Weinberg,A.D., Vella,A.T., and Croft,M. 1998. OX-40: life beyond the effector T cell stage. *Semin.Immunol.* 10:471-480.
217. Cheuk,A.T., Mufti,G.J., and Guinn,B.A. 2004. Role of 4-1BB:4-1BB ligand in cancer immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 11:215-226.
218. Garcia,K.C., Scott,C.A., Brunmark,A., Carbone,F.R., Peterson,P.A., Wilson,I.A., and Teyton,L. 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature.* 384:577-581.
219. Doyle,C. and Strominger,J.L. 1987. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature.* 330:256-259.
220. Veillette,A., Bookman,M.A., Horak,E.M., and Bolen,J.B. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56lck. *Cell.* 55:301-308.
221. Shinohara,N. and Sachs,D.H. 1979. Mouse alloantibodies capable of blocking cytotoxic T-cell function. I. Relationship between the antigen reactive with blocking antibodies and the Lyt-2 locus. *J.Exp.Med.* 150:432-444.
222. Nishimura,M.I., Avichezer,D., Custer,M.C., Lee,C.S., Chen,C., Parkhurst,M.R., Diamond,R.A., Robbins,P.F., Schwartzentruber,D.J., and Rosenberg,S.A. 1999. MHC class I-restricted recognition of a melanoma antigen by a human CD4⁺ tumor infiltrating lymphocyte. *Cancer Res.* 59:6230-6238.
223. van der Veken,L.T., Hagedoorn,R.S., van Loenen,M.M., Willemze,R., Falkenburg,J.H., and Heemskerk,M.H. 2006. Alphabeta T-cell receptor engineered gammadelta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer Res.* 66:3331-3337.
224. Roszkowski,J.J., Lyons,G.E., Kast,W.M., Yee,C., Van Besien,K., and Nishimura,M.I. 2005. Simultaneous generation of CD8⁺ and CD4⁺ melanoma-reactive T cells by retroviral-mediated transfer of a single T-cell receptor. *Cancer Res.* 65:1570-1576.
225. Clay,T.M., Custer,M.C., Sachs,J., Hwu,P., Rosenberg,S.A., and Nishimura,M.I. 1999. Efficient transfer of a tumor antigen-reactive TCR to human peripheral blood lymphocytes confers anti-tumor reactivity. *J.Immunol.* 163:507-513.

226. Cole,D.J., Weil,D.P., Shilyansky,J., Custer,M., Kawakami,Y., Rosenberg,S.A., and Nishimura,M.I. 1995. Characterization of the functional specificity of a cloned T-cell receptor heterodimer recognizing the MART-1 melanoma antigen. *Cancer Res.* 55:748-752.
227. Buhlmann,J.E., Elkin,S.K., and Sharpe,A.H. 2003. A role for the B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 pathway during negative selection. *J.Immunol.* 170:5421-5428.
228. Gao,J.X., Zhang,H., Bai,X.F., Wen,J., Zheng,X., Liu,J., Zheng,P., and Liu,Y. 2002. Perinatal blockade of b7-1 and b7-2 inhibits clonal deletion of highly pathogenic autoreactive T cells. *J.Exp.Med.* 195:959-971.
229. Fischer,K., Voelkl,S., Berger,J., Andreesen,R., Pomorski,T., and Mackensen,A. 2006. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood.* 108:4094-4101.
230. Strauss,G., Knappe,I., Melzner,I., and Debatin,K.M. 2003. Constitutive caspase activation and impaired death-inducing signaling complex formation in CD95-resistant, long-term activated, antigen-specific T cells. *J.Immunol.* 171:1172-1182.
231. Levings,M.K., Sangregorio,R., and Roncarolo,M.G. 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J.Exp.Med.* 193:1295-1302.
232. Yamazaki,S., Iyoda,T., Tarbell,K., Olson,K., Velinzon,K., Inaba,K., and Steinman,R.M. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J.Exp.Med.* 198:235-247.
233. Fehervari,Z. and Sakaguchi,S. 2004. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int.Immunol.* 16:1769-1780.
234. Elpek,K.G., Yolcu,E.S., Franke,D.D., Lacelle,C., Schabowsky,R.H., and Shirwan,H. 2007. Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *J.Immunol.* 179:7295-7304.
235. Jonuleit,H., Schmitt,E., Kakirman,H., Stassen,M., Knop,J., and Enk,A.H. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J.Exp.Med.* 196:255-260.
236. de la,R.M., Rutz,S., Dorninger,H., and Scheffold,A. 2004. Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur.J.Immunol.* 34:2480-2488.
237. Chrobak,P. and Gress,R.E. 2001. Veto activity of activated bone marrow does not require perforin and Fas ligand. *Cell Immunol.* 208:80-87.
238. Ansel,K.M., Greenwald,R.J., Agarwal,S., Bassing,C.H., Monticelli,S., Interlandi,J., Djuretic,I.M., Lee,D.U., Sharpe,A.H., Alt,F.W. *et al.* 2004. Deletion of a conserved Il4 silencer impairs T helper type 1-mediated immunity. *Nat.Immunol.* 5:1251-1259.
239. Mosmann,T.R. and Sad,S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today.* 17:138-146.

240. de Waal,M.R., Yssel,H., and de Vries,J.E. 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J.Immunol.* 150:4754-4765.
241. Taga,K., Mostowski,H., and Tosato,G. 1993. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood.* 81:2964-2971.
242. Moore,K.W., de Waal,M.R., Coffman,R.L., and O'Garra,A. 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 19:683-765.:683-765.
243. Agnello,D., Lankford,C.S., Bream,J., Morinobu,A., Gadina,M., O'Shea,J.J., and Frucht,D.M. 2003. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J.Clin.Immunol.* 23:147-161.
244. Zamorano,J., Mora,A.L., Boothby,M., and Keegan,A.D. 2001. NF-kappa B activation plays an important role in the IL-4-induced protection from apoptosis. *Int.Immunol.* 13:1479-1487.
245. Wurster,A.L., Rodgers,V.L., White,M.F., Rothstein,T.L., and Grusby,M.J. 2002. Interleukin-4-mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *J.Biol.Chem.* 277:27169-27175.
246. King,C., Mueller,H.R., Malo,C.M., Murali-Krishna,K., Ahmed,R., King,E., and Sarvetnick,N. 2001. Interleukin-4 acts at the locus of the antigen-presenting dendritic cell to counter-regulate cytotoxic CD8⁺ T-cell responses. *Nat.Med.* 7:206-214.
247. Yang,L., Du,T.B., Khan,Q., and Zhang,L. 1998. Mechanisms of long-term donor-specific allograft survival induced by pretransplant infusion of lymphocytes. *Blood.* 91:324-330.
248. Abbas,A.K., Murphy,K.M., and Sher,A. 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 383:787-793.
249. Yi,H., Zhang,L., Zhen,Y., He,X., and Zhao,Y. 2007. Dendritic cells induced in the presence of GM-CSF and IL-5. *Cytokine.* 37:35-43.
250. Apostolopoulos,V., McKenzie,I.F., Lees,C., Matthaei,K.I., and Young,I.G. 2000. A role for IL-5 in the induction of cytotoxic T lymphocytes in vivo. *Eur.J.Immunol.* 30:1733-1739.
251. Takatsu,K., Kikuchi,Y., Takahashi,T., Honjo,T., Matsumoto,M., Harada,N., Yamaguchi,N., and Tominaga,A. 1987. Interleukin 5, a T-cell-derived B-cell differentiation factor also induces cytotoxic T lymphocytes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84:4234-4238.
252. Ferber,I.A., Brocke,S., Taylor-Edwards,C., Ridgway,W., Dinisco,C., Steinman,L., Dalton,D., and Fathman,C.G. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J.Immunol.* 156:5-7.

253. Chu,C.Q., Wittmer,S., and Dalton,D.K. 2000. Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J.Exp.Med.* 192:123-128.
254. Dalton,D.K., Haynes,L., Chu,C.Q., Swain,S.L., and Wittmer,S. 2000. Interferon gamma eliminates responding CD4 T cells during mycobacterial infection by inducing apoptosis of activated CD4 T cells. *J.Exp.Med.* 192:117-122.
255. Sawitzki,B., Kingsley,C.I., Oliveira,V., Karim,M., Herber,M., and Wood,K.J. 2005. IFN-gamma production by alloantigen-reactive regulatory T cells is important for their regulatory function in vivo. *J.Exp.Med.* 201:1925-1935.
256. Bleesing,J.J., Brown,M.R., Novicio,C., Guarraia,D., Dale,J.K., Straus,S.E., and Fleisher,T.A. 2002. A composite picture of TcR alpha/beta(+) CD4(-)CD8(-) T Cells (alpha/beta-DNTCs) in humans with autoimmune lymphoproliferative syndrome. *Clin.Immunol.* 104:21-30.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsliste

Ag	Antigen
AICD	Activation induced cell death (Aktivierungs-induzierter Zelltod)
AK	Antikörper
ALPS	Autoimmun Lymphoproliferatives Syndrom
Ann	AnnexinV; bindet an Phosphatidylserine
APC	Allophycocyanin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
APC	antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
Bim	Protein der bcl-2 Familie; assoziiert mit bcl-2 und induziert Apoptose
CBA	cytokine bead array (durchflusszytometrisches Verfahren der Zytokinmessung)
CD	cluster of differentiation; Oberflächenmerkmale von Zellen
CD1d	MHC-Klasse I ähnliches Antigen-Präsentations-Molekül
CMA	Concanamycin A (Folimycin)
CMV	Cytomegalie-Virus
CTL	cytotoxic T lymphocyte (zytotoxische T-Zelle)
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4; CD154
CXCR5	Chemokinrezeptor
CXCL13	Chemokin; bindet an CXCR5
DC	dendritische Zelle
DN	doppeltnegativ (bzgl. der Rezeptoren CD4 und CD8)
FACS	"fluorescence activated cell scanning"; Durchflusszytometrische Messmethode
FasL	fas-Ligand (Ligand des fas-Rezeptors)
FcR γ	Fc receptor γ -chain
FITC	Fluorescein-Isothiocyant (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
FOXP3	forkhead box P3; Transkriptionsfaktor

FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter) im Durchflusszytometer
gld	generalized lymphoproliferative disease; Autoimmunkrankheit
GVHD	graft-versus-host disease; Abstossungsreaktion nach KMT
IFN- γ	Interferon- γ ; Zytokin
IgG	Immunglobulin G; häufigster Isotyp im Blut; Verwendung für Kontrollfärbungen zur Ermittlung der unspezifischen Bindung mAK
IL-2	Interleukin-2, klassisches Th1 Zytokin
IL-4	Interleukin-4; klassisches Th2 Zytokin
IL-5	Interleukin-5; klassisches Th2 Zytokin
IL-10	Interleukin-10; immunsupprimierendes Zytokin
IL-13	Interleukin-13; klassisches Th2 Zytokin
ILT	immunoglobulin-like transcript
IPEX	immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked syndrome; Autoimmunkrankheit
KMT	Knochenmarktransplantation
LFA-1	leukocyte function-associated antigen-1 (Adhäsionsmolekül von T-Zellen)
lpr	lymphoproliverativ; Autoimmunkrankheit
LPS	Lipopolysaccharid
mHA _g	Nebenhistokompatibilitätsantigene
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigene
MHC-I	MHC-Klasse I Komplex; Bindungspartner von CD8 ⁺ Killerzellen
MLR	mixed-lymphocyte-reaction; allogene Immunantwort
Melan-A	MART-1; Selbstantigen auf Melanocyten; Überexprimiert auf Melanomzellen
MS	Multiple Sklerose
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle
PBC	primär biliäre Zirrhose, chronische Entzündung im Bereich der kleinen Gallengänge
PD-1	<i>Programmed death-1</i> ; Mitglied der B7-CD28 Familie
PE	Phycoerythrin (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein (Farbstoff-Konjugat für Antikörper)

PFA	Paraformaldehyd
PHA	Phytohämagglutinin; starkes T-Zell-Stimulans
PI	Propidium Iodid
pMHC	Genprodukt des Major-Histokompatibilitäts-Komplexes mit gebundenem Peptid
SLE	Systemischer Lupus erythemathodes
SSC	Seitwärtssteulicht (side scatter) im Durchflusszytometer
TAP	transporter associated with antigen-processing; wichtiges Peptidtransport-Protein für die MHC-Präsentation
TCGF	T-cell growth factor (Zytokin-Cocktail aus einem Zellüberstand)
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCR $\alpha\beta$	T-Zell-Rezeptor mit einer α und β Kette
TCR $\gamma\delta$	T-Zell-Rezeptor mit einer γ und δ Kette
TCRV β 17	Familie von TCRV β
TGF- β	Transforming-growth-factor- β (Zytokin)
Th3	T-Helferzelle Typ 3
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TM	MHC-Tetramer
Tr1	reulatorische T-Zelle Typ 1
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
Z-AAD	Granzyme-B Inhibitor

7.2 Veröffentlichungen

Todorov,V.T., Völkl,S., Friedrich,J., Kunz-Schughart,L.A., Hehlhans,T., Vermeulen,L., Haegeman,G., Schmitz,M.L., and Kurtz,A. 2005. Role of CREB1 and NF{ κ }B-p65 in the down-regulation of renin gene expression by tumor necrosis factor { α }. *J Biol Chem.* 280:24356-62.

Fischer,K., Voelkl,S., Heymann,J., Przybylski,G.K., Mondal,K., Laumer,M., Kunz-Schughart,L., Schmidt,C.A., Andreesen,R., and Mackensen,A. 2005. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4-CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood.* 105:2828-2835

Blank,C., Kuball,J., Voelkl,S., Wiendl,H., Becker,B., Walter,B., Majdic,O., Gajewski,T.F., Theobald,M., Andreesen,R., and Mackensen,A. 2006. Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. *Int J Cancer.* 119:317-27.

Fischer,K., Voelkl,S., Berger,J., Andreesen,R., Pomorski,T., and Mackensen,A. 2006. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. *Blood.* 108:4094-101.

Fischer,K., Hoffmann,P., Voelkl,S., Meidenbauer,N., Ammer,J., Edinger,M., Gottfried,E., Schwarz,S., Rothe,G., Hoves,S., Renner,K., Timischl,B., Mackensen,A., Kunz-Schughart,L., Andreesen,R., Krause,S.W., and Kreutz,M. 2007. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 109:3812-9.

7.3 Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt vor allem Prof. Dr. Andreas Mackensen für das in mich gesetzte Vertrauen und die Betreuung dieser Arbeit. Er förderte mich auf allen Ebenen und begeisterte mich immer wieder aufs Neue für die Forschung. Sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und seine freundschaftliche Art haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Susanne Modrow für die Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Ferner danke ich Prof. Dr. Reinhard Andreesen für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie anfertigen zu können.

Dr. Karin Fischer möchte ich für die fachliche Unterstützung und kompetente Beratung bei der Bearbeitung meines Themas danken. Sie zeigte mir die kleinen und großen Tricks, durch die der Laboralltag bewältigt werden konnte.

Jana Berger (ehemalige Heymann) möchte ich besonders für ihre motivierte Zusammenarbeit bedanken. Außerdem danke ich ihr herzlich für die Freundschaft.

Dr. Petra Hoffmann und Dr. Matthias Edinger danke ich für den konstruktiven Ideenaustausch. Danke sagen möchte ich natürlich auch den „Edinger-Mädels“ Julia, Kristina und vor allem Tina (Ich hoffe, ich krieg die Antikörper irgendwann zurück).

Rüdiger Eder danke ich für das Anschalten/Einstellen/Reparieren des Zellsorters.

Mein herzlicher Dank gebührt Sandra, Annegret, Jana, Regina, Monika, Katrin, Karin und Mike für ihre ständige Hilfsbereitschaft und ihre aufmunternden Worte in schwierigen Zeiten. Sie waren nicht nur Kollegen, sondern auch meine Freunde. Ohne euch wäre ich nicht da, wo ich jetzt bin (23:30 Carrerasbau).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen übernommenen Daten und Konzepte sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, den _____

(Simon Völkl, Dipl. Biol.)