

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Proliferationshemmende und Fas-Ligand-abhängige, pro-apoptotische Wirkungen von
DX5+NKT-Zellen auf CD4+CD62Lhigh-T-Lymphozyten in vitro

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Damian

2019

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE
PROF. DR. MED. HANS-JÜRGEN SCHLITT
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Proliferationshemmende und Fas-Ligand-abhängige, pro-apoptotische Wirkungen von
DX5+NKT-Zellen auf CD4+CD62Lhigh-T-Lymphozyten in vitro

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Michael Damian

2019

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: PD Dr. Matthias Hornung
2. Berichterstatter: PD Dr. Werner Krutsch
Tag der mündlichen Prüfung: 10.10.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung.....	11
1.1 Das Immunsystem	11
1.2 NKT-Zellen	13
1.2.1 Entdeckung und Namensgebung von NKT-Zellen.....	14
1.2.2 Eigenschaften und Einordnung von NKT-Zellen	15
1.2.3 Entwicklung und Vorkommen von NKT-Zellen.....	17
1.2.4 Zytokin-Produktion von NKT-Zellen.....	19
1.2.5 Zytotoxische Funktionen von NKT-Zellen	20
1.2.6 Proliferationshemmende Wirkungen von NKT-Zellen	22
1.2.7 DX5 ⁺ NKT-Zellen.....	22
1.3 CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen und CD4 ⁺ CD62L _{low} -Zellen	23
1.3.1 Stellung von naiven CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen im Immunsystem	24
1.3.2 Naive CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen bei Autoimmunerkrankungen	25
1.4 Apoptose.....	25
2 Zielsetzung der Arbeit	29
3 Materialien.....	31
3.1 Geräte.....	31
3.2 Verbrauchsmaterialien	32
3.3 Chemikalien und Fertiglösungen.....	33
3.4 Hergestellte Puffer und Zellkulturmedien	33
3.5 Antikörper und Magnetbeads	34

3.6	Software.....	36
3.7	Versuchstiere	36
4	Methoden	38
4.1	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Mäusemilz.....	38
4.2	Analyse der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie	39
4.3	Aufreinigung verschiedener Lymphozytenpopulationen	42
4.3.1	Isolierung von CD4 ⁺ CD62L _{low} - und CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen mittels magnetischer Zellseparierung (MACS).....	42
4.3.2	MACS-Isolation von CD8 ⁺ -Zellen.....	46
4.3.3	Isolation von DX5 ⁺ NKT-Zellen mit MACS und FACS-Sorting.....	47
4.4	Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) -Proliferationsassay.....	49
4.4.1	CFSE-Färbung.....	51
4.4.2	Ansetzen von Mono- und Co-Kulturen	51
4.4.3	Stimulation der Kulturen	51
4.5	FACS-Analysen der Zytokin-Produktion in Co-Kultur und Mono-Kultur	52
4.6	FACS-Analysen zur Expression von Fas-Ligand (FasL/CD95L).....	55
4.7	Caspase-3-Nachweis in CD4 ⁺ CD62L _{low} - und CD4 ⁺ CD62L _{high} - Zellen	55
4.7.1	Intrazelluläre FACS-Färbung von Caspase-3.....	56
4.7.2	Blockierung von Fas-Ligand.....	56
4.8	Datenanalyse.....	57
5	Ergebnisse	58
5.1	Einfluss von DX5 ⁺ NKT-Zellen auf die Proliferation von CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen	58

5.2	Zytokinausschüttung nach Stimulation in Mono- und Co-Kultur	63
5.3	Steigerung der Caspase-3-Aktivität in CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen nach Co-Kultur ..	68
5.4	Expression von Fas-Ligand auf DX5 ⁺ NKT-Zellen nach Co-Kultur	71
5.5	Bildung von Caspase-3 in CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen in Co-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen nach Blockade von Fas-Ligand	72
6	Diskussion	75
6.1	Einfluss von DX5 ⁺ NKT-Zellen auf die Proliferation von CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen	75
6.2	Zytokin-Produktion nach Mono- und Co-Kultur und Steigerung der Caspase-3-Aktivität in CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen nach Co-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen	80
6.3	Fas-Ligand-Abhängigkeit der pro-apoptotischen Wirkung von DX5 ⁺ NKT-Zellen auf CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen.....	85
7	Schlussfolgerung und Ausblick.....	96
8	Zusammenfassung.....	100
9	Literaturverzeichnis.....	103

Verwendete Abkürzungen

ACK	Ammonium-Chloride-Potassium
α GalCer	α -Galaktosylceramid
AK	Antikörper
AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf-I	Apoptotic protease activating factor I
APZ	antigenpräsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
β -GlcCer	β -D-Glucopyranosylceramid
Balb	Bagg Albino
BID	BH3-interacting domain
BSA	Bovines Serumalbumin
Calcein AM	Acetomethoxy calcein
CD	Cluster of differentiation
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
Cl	Chlor
Cr	Chrom
DISC	Death inducing signalling complex
DN	doppelt negativ
DNA	Deoxyribonucleic acid
DP	doppelt positiv
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-Associated protein with Death Domain
Fas	Fas-Rezeptor
FasL	Fas-Ligand
Fc	Fragment crystallizable

FCS	Fötale Kalbserum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
h	Stunden
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HPV	humanes Papillomvirus
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iv	intravenös
l	Liter
LPC	Lyso-Phosphatidylcholin
LPS	Lipopolysacharid
MACS	Magnetic activated cell sorting
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
μl	Mikroliter
Mm	Millimeter
μm	Mikrometer
μM	mikromolar
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
MORT1	Mediator of receptor-induced toxicity-1
Na	Natrium
Ni	Nickel
NiCl ₂	Nickel(II)Chlorid
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer-T-Zellen

NOD	Nonbese diabetic
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbol-3-Myristyl-4-Acetat
R	Rezeptor
rpm	rotations per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCID	severe combined immunodeficiency
SD	standard deviation
SSC	Sideward Scatter
TCGF	T-Zell Wachstumsfaktor
Th-	T-Helfer-
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing Ligand
TZR	T-Zellrezeptor
VCAM	vascular cell adhesion molecule

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: NKT-Zellen teilen Eigenschaften von T-Zellen und von NK-Zellen.	14
Abbildung 1-2: Unterschiedliche Entwicklung von konventionellen T-Zellen und NKT-Zellen	18
Abbildung 1-3: Fas/FasL-abhängige Apoptose	27
Abbildung 4-4: Schematischer Aufbau eines FACS-Gerätes.....	40
Abbildung 4-5: Beispiel für eine FACS-Analyse einer aus der Milz von Balb/c-Mäusen hergestellten Einzelzellsuspension.	41
Abbildung 4-6: Prinzip der magnetischen Zellsortierung mit Negativselektion und anschließender Positivselektion am Beispiel der Isolierung von CD4 ⁺ CD62 _{low} -Zellen und CD4 ⁺ CD62 _{high} -Zellen	43
Abbildung 4-7: Repräsentative FACS-Dotplots nach Isolierung von CD4 ⁺ CD62 _{low} -Zellen und von CD4 ⁺ CD62 _{high} -Zellen.	45
Abbildung 4-8: Repräsentative FACS-Dotplots einer Isolierung von CD8 ⁺ -Zellen.	46
Abbildung 4-9: Repräsentative Density-Plots einer Isolierung von DX5 ⁺ NKT-Zellen.	48
Abbildung 4-10: Repräsentative Dotplots bzw. Histogramme von mit CFSE-gefärbten CD4 ⁺ CD62 _{high} -Zellen direkt nach Färbung (oben) und nach 6 Tagen Stimulation in Kultur.	50
Abbildung 4-11: Darstellung repräsentativer Dotplots nach 4 Stunden Co-Kultur zwischen DX5 ⁺ NKT-Zellen und CD4 ⁺ CD62 _{high} -Zellen und intrazellulärer FACS-Färbung von IL-2.	54
Abbildung 5-12: Repräsentative Histogramme der Proliferation CFSE-gefärbter CD4 ⁺ CD62 _{high} -Zellen nach 10 Stunden, 48 Stunden, 96 Stunden und 144 Stunden Mono- und Co-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen bzw. mit CD8 ⁺ -Zellen.	59

Abbildung 5-13: Proliferation von CD4 ⁺ CD62L _{low} -Zellen in Mono-Kultur sowie in Co-Kultur mit CD8 ⁺ -Zellen bzw. DX5 ⁺ NKT-Zellen nach 96 Stunden Stimulation.	60
Abbildung 5-14: Proliferationsindices von CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen und CD4 ⁺ CD62L _{low} -Zellen jeweils in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit DX5 ⁺ -Zellen bzw. CD8 ⁺ -Zellen nach 96 h.	62
Abbildung 5-15: prozentuale Anteile IL-2-produzierender DX5 ⁺ -Zellen und CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen in deren Mono- und Co-Kulturen.....	64
Abbildung 5-16: Prozentuale Anteile IL-2-produzierender DX5 ⁺ -Zellen und CD4 ⁺ CD62L _{low} -Zellen in den verschiedenen Mono- und Co-Kulturen.	65
Abbildung 5-17: Prozentuale Anteile IFN- γ -produzierender DX5 ⁺ -Zellen und CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen in den verschiedenen Mono- und Co-Kulturen.	67
Abbildung 5-18: Prozentualen Anteile IFN- γ -produzierender DX5 ⁺ -Zellen und CD4 ⁺ CD62L _{low} -Zelle in den verschiedenen Mono- und Co-Kulturen.	68
Abbildung 5-19: Prozentuale Anteile Caspase-3-positiver CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen bzw. CD8 ⁺ -Zellen.....	69
Abbildung 5-20: Prozentualen Anteile Caspase-3-positiver CD4 ⁺ CD62L _{low} -Zellen in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen bzw. CD8 ⁺ -Zellen.....	70
Abbildung 5-21: Prozentuale Anteile Fas-Ligand-positiver DX5 ⁺ NKT-Zellen und CD8 ⁺ -Zellen nach zehn Stunden Stimulation in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen.	72
Abbildung 5-22: Prozentualer Anteil Caspase-3-positiver CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen nach 48 Stunden Co-Kultur mit DX5 ⁺ NKT-Zellen mit und ohne Blockade von Fas-Ligand.	74
Abbildung 7-23: DX5 ⁺ NKT-Zellen hemmen die Proliferation von CD4 ⁺ CD62L _{high} -Zellen durch einen FasL-abhängigen, pro-apoptischen Effekt.	97

1 Einführung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient dazu, Fremdstoffe und Mikroorganismen, die in den Körper eindringen, zu erkennen und potenziell gefährliche unschädlich zu machen. Zusätzlich richtet es sich auch gegen körpereigene Zellen, deren Integrität verloren gegangen ist, und verhindert so die Entstehung maligner Erkrankungen. Außerdem kontrolliert sich das Immunsystem selbst durch verschiedene Regulationsmechanismen und verhindert so die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Man unterscheidet zum einen humorales und zelluläres, zum anderen angeborenes und adaptives Immunsystem. Das humorale Immunsystem besteht aus verschiedenen Faktoren und Enzymen, die in den Körperflüssigkeiten gelöst und immunologisch wirksam sind. Das zelluläre Immunsystem wird von spezialisierten, immunkompetenten Zellen gebildet ¹.

Im angeborenen Immunsystem kommt es im Rahmen der zellulären Immunantwort zur schnellen und unspezifischen Reaktion von Phagozyten (Makrophagen, Granulozyten) und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) auf Antigene. Antigene sind Proteine, die in den meisten Fällen Bruchstücke von Zellmembranen pathogener Mikroorganismen darstellen. Sie binden an Antikörper oder Rezeptoren und lösen so Reaktionen von Immunzellen aus. Die Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind von Geburt an vorhanden und ermöglichen eine unspezifische Immunantwort auf eine breite Masse von Antigenen. Diese Immunantwort benötigt kein vorhergehendes „Priming“ und keine Präsentation von Antigenen durch antigenpräsentierende Zellen (APZ), bleibt dabei jedoch auch bei mehrfacher Exposition mit demselben Antigen gleich, d.h. es kommt auch bei wiederholter Exposition zu keiner schnelleren oder stärkeren Immunantwort ².

Im adaptiven Immunsystem werden in großer Vielfalt ständig neue, antigenspezifische Rezeptoren und Antikörper entwickelt. Nach Antigenkontakt werden Zellen mit passenden Rezeptoren klonal vermehrt und so große Mengen spezifischer Antikörper gebildet. Nach erfolgreicher Bekämpfung der Mikroorganismen verbleiben einige der antigenspezifischen

Zellen und Antikörper im Organismus. Zellen, bei denen es zu keiner Antigenerkennung kommt, werden durch Apoptose „aussortiert“. Bei wiederholtem Kontakt mit einem Antigen kommt es durch die verbliebenen Zellen zu einer rascheren und stärkeren Immunantwort als beim Erstkontakt³. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem wird das adaptive Immunsystem also gegen spezifische Antigene sensibilisiert, es kommt zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses.

Die zwei großen Säulen des adaptiven Immunsystems stellen die T-Zellen und die B-Zellen dar. B-Zellen produzieren Antikörper und sind somit für die humorale Immunantwort des adaptiven Immunsystems verantwortlich. T-Zellen sind für die zelluläre Immunantwort verantwortlich. Sie sind entweder CD8⁺ oder CD4⁺. CD8⁺-Zellen können zytotoxisch wirken und produzieren pro-inflammatorische Zytokine. Aus naiven CD4⁺-Zellen entwickeln sich T-Helferzellen, welche v.a. andere Immunzellen stimulieren oder inhibieren. Dies geschieht weitgehend durch die Ausschüttung von Zytokinen, wobei anhand des produzierten Zytokinmusters zwei Hauptgruppen unterschieden werden: Typ I T-Helferzellen (Th₁-Zellen) und Typ II T-Helferzellen (Th₂-Zellen)⁴.

Die dargelegten Einteilungen stellen nur ein sehr vereinfachtes, klassisches Modell des Immunsystems dar. In den letzten Jahrzehnten wurde eine Reihe weiterer Zellen entdeckt und definiert, die sich nicht einfach in eine der hier beschriebenen Populationen einordnen lassen. Ein Beispiel hierfür sind NKT-Zellen, deren Subpopulation der murinen DX5⁺NKT-Zellen in der vorliegenden Arbeit neben naiven CD4⁺-Zellen eine zentrale Rolle spielt. NKT-Zellen besitzen Rezeptoren und Eigenschaften sowohl von NK-Zellen als auch von T-Zellen und stellen somit eine Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem dar⁵. Dies verdeutlicht, dass die hier getroffenen Einteilungen keineswegs „starr“ sind, sondern einer gewissen Dynamik unterliegen, Berührungspunkte besitzen, teilweise ineinander übergehen und so in Form einer komplexen Immunantwort zusammenarbeiten⁶.

1.2 NKT-Zellen

NKT-Zellen stellen eine kleine und heterogene Lymphozytenpopulation dar. Sie besitzen zum einen Eigenschaften von T-Zellen, wie die Fähigkeit zur Ausschüttung sowohl von Th₁-Zytokinen als auch von Th₂-Zytokinen sowie dem Vorhandensein eines T-Zell-Rezeptors (CD3+). Zum anderen können sie ähnlich wie NK-Zellen unspezifisch zytotoxisch wirken und besitzen NK-Zellmarker wie NK 1.1 (CD161) ⁵. NKT-Zellen gelten deshalb als Verbindung zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem und übernehmen dabei v.a. immunregulatorische Funktionen ^{7,8}. Ähnlich wie T-Zellen sind NKT-Zellen im Gegensatz zu NK-Zellen in ihrer Entwicklung Thymus-abhängig. Ihnen fehlt dabei allerdings die für T-Zellen typische MHC-Restriktion ⁵. Sowohl NKT- und NK-Zellen können wie die CD8⁺-Zelllinie der T-Zellen zytotoxisch wirken ⁵. NKT-Zellen können sowohl indirekt immunmodulatorisch wirken als auch als Effektorzellen direkte Abwehrfunktionen ausüben ⁹. Dabei wurde ihnen eine Beteiligung an der Abwehr von infektiösen Mikroorganismen, der Kontrolle von malignem Zellwachstum, der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen und der Erhöhung der Toleranz gegenüber Transplantaten zugeschrieben ^{9,10}.

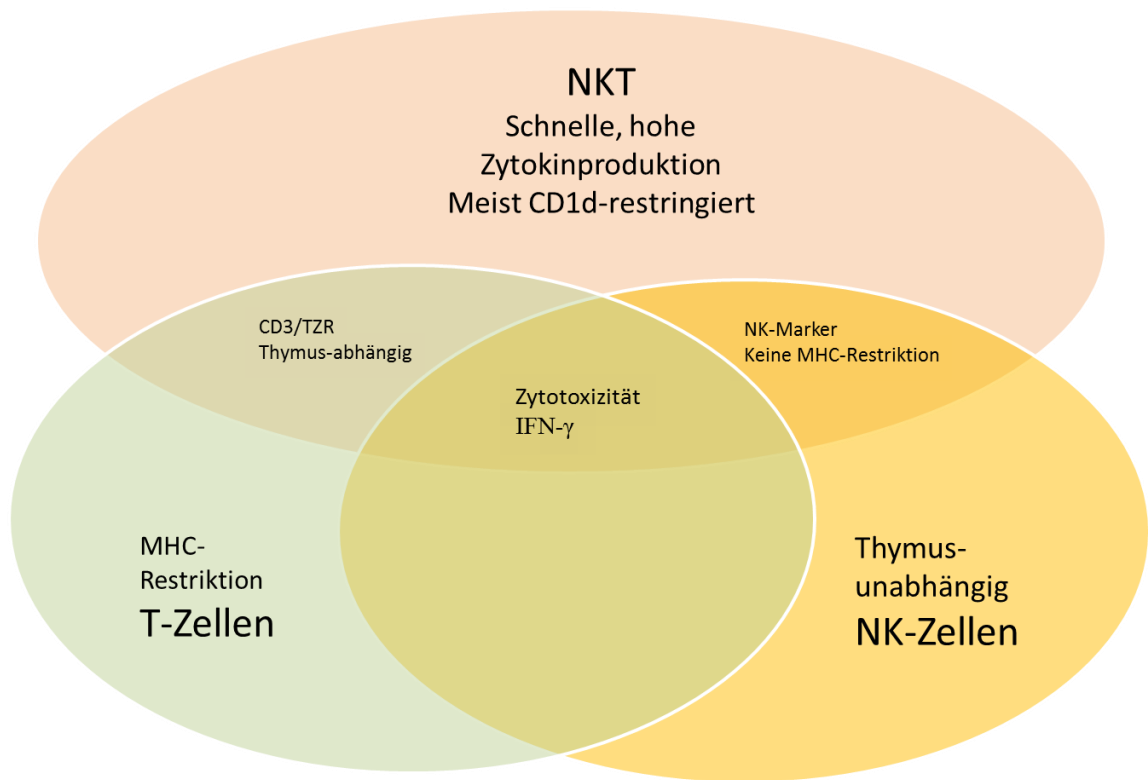


Abbildung 1-1: NKT-Zellen teilen Eigenschaften von T-Zellen und von NK-Zellen.

(Modifiziert nach Godfrey et al. ⁵)

1.2.1 Entdeckung und Namensgebung von NKT-Zellen

Erstmalig tauchten derartige Zellen 1987 unter der Bezeichnung „ α/β TZR⁺ CD4⁻CD8⁻ (doppelnegative=DN) Thymozyten“ in der Literatur auf ^{11,12}. Der Begriff „NKT-Zelle“ wurde zum ersten Mal 1995 definiert und bezog sich zunächst auf murine Zellen, die außer einem α/β T-Zellrezeptor (α/β TZR) zusätzlich den für NK-Zellen charakteristischen Marker NK1.1 (CD161 bei menschlichen Zellen) exprimieren ¹³. In der Literatur wird oft angegeben, die Abkürzung „NKT-Zelle“ leite sich von „natürliche Killer-T-Zelle“ ab. Jedoch bezogen sich die beiden Buchstaben „NK“ zunächst auf das Vorhandensein von NK1.1 und nicht etwa auf herausragende zytotoxische Eigenschaften von NKT-Zellen ¹⁴. Im Laufe der Jahre zeigten verschiedene Forschungsergebnisse, dass diese ursprüngliche

Definition von NKT-Zellen anhand des Markers NK 1.1 aus mehreren Gründen hinterfragt werden muss. Zum einen existieren Mausstämme, die gänzlich negativ für NK1.1 sind, obwohl sie Zellen mit typischen Eigenschaften von NKT-Zellen besitzen¹⁵. Zum anderen wurden NK1.1⁺ T-Zellen in Mäusen beschrieben, die keinen semiinvarianten V α 14-J α 18 T-Zellrezeptor exprimieren oder CD1d-unabhängig sind (s.u.)¹⁶⁻²². Eine heute weitgehend akzeptierte Einteilung für die verschiedenen Subpopulationen von NKT-Zellen lieferten Godfrey et al. 2004 in einem Übersichtsartikel, der Ordnung in die Vielzahl von veröffentlichten Forschungsergebnissen brachte¹⁴. Dennoch muss erwähnt werden, dass nach wie vor eine rege Diskussion über die Zugehörigkeit einzelner Zellpopulationen zu den verschiedenen Gruppen von NKT-Zellen geführt wird und immer wieder Subpopulationen auftauchen, die sich nicht eindeutig einer der beschriebenen Gruppen zuordnen lassen.

1.2.2 Eigenschaften und Einordnung von NKT-Zellen

Grundsätzlich exprimieren NKT-Zellen einen α/β TZR mit eingeschränktem Repertoire^{5,14}. Die α -Kette des TZR muriner wie auch menschlicher NKT-Zellen besteht aus variablen (V) α - und junktionalen (J) α -Segmenten. In Mäusen findet sich meist eine invariante α -Kette, die durch die Gensegmente V α 14 und J α 18 (früher J α 218) kodiert wird. Die β -Kette wird v.a. durch V β 8.2, seltener durch V β 2 oder V β 7 kodiert^{5,23}. Menschliche NKT-zellen exprimieren dagegen eine invariante α -Kette V α 24-J α 18, assoziiert mit V β 11, die auf homologe Gensegmente zu den murinen Segmenten V α 14-J α 18 und V β 8.2 zurückgehen^{5,24}. Der TZR von NKT-Zellen stellt eine Besonderheit dar, da dieser, im Gegensatz zum TZR gewöhnlicher T-Zellen, keine Peptide, die von MHC-Klasse-I/II-Molekülen präsentiert werden, erkennt. Stattdessen findet eine Interaktion mit dem MHC-Klasse-I-Molekül-ähnlichen CD1d statt. CD1d präsentiert Glykolipide und ist mit β 2-Mikroglobulin assoziiert, welches der kleinen, löslichen Untereinheit des MHC-Klasse-I-Komplexes entspricht²⁵⁻²⁷. CD1d gehört zur Familie der CD1-Moleküle, die aus zwei Hauptgruppen besteht. CD1a, b und c bilden die 1. Gruppe, CD1d unterscheidet sich von

diesen Molekülen und bildet die 2. Gruppe ²⁸. CD1e stellt als lediglich intrazellulär auftretendes Molekül eine Sonderform dar ²⁹. CD1d ist in verschiedensten Geweben des Körpers verbreitet und wird von hämatopoetischen Zellen wie B-Zellen oder APZ, aber auch von einer Vielzahl anderer Zellen, wie epithelialen oder stromalen Zellen der Haut, des Darms, der Leber, der Niere, des Pankreas und anderer Organe exprimiert ^{30,31}. Mäuse und Ratten exprimieren lediglich CD1d, ihnen fehlen die genetischen Segmente der anderen CD1-Moleküle ³². Während die Moleküle der 1. Gruppe von verschiedenen T-Zellen erkannt werden, beschränkt sich die Interaktion von CD1d weitgehend auf den semi-invarianten TZR von NKT-Zellen ³³. Bislang wurden relativ wenige Lipide identifiziert, die physiologischerweise von CD1d präsentiert werden und NKT-Zellen stimulieren. Schwache stimulatorische Wirkungen auf NKT-Zellen hat z.B. Lyso-Phosphatidylcholin (LPC), welches als Autoantigen während Entzündungsreaktionen in erhöhten Konzentrationen auftritt ³⁴. Brennan et al. beschreiben in einer aktuellen Arbeit β -D-Glucopyranosylceramid (β -GlcCer) als potentes, physiologisch relevantes Autoantigen, welches bei Reaktionen auf mikrobielle Infektionen vermehrt gebildet wird ³⁵. Brigl et al. beschreiben eine dominierende Rolle von durch Zytokine vermittelten und dem angeborenen Immunsystem entstammenden Signalen bei der Aktivierung von NKT-Zellen während mikrobieller Infektionen. Mikrobielle Antigene selbst sollen hierbei eine untergeordnete Rolle spielen ³⁶. Als insgesamt effektivstes Antigen, das bislang gefunden wurde, gilt jedoch das ursprünglich aus einem Meeresschwamm isolierte Glykolipid α -Galaktosylceramid (α GalCer). Es lagert mit hoher Affinität zwei Lipidketten in hydrophobe Taschen des CD1d von APZ ein woraufhin der α -Kohlenhydratrest durch den TZR der NKT-Zellen erkannt werden kann ³⁷. Der Komplex aus α GalCer und CD1d der APZ bindet dabei sehr stabil an den TZR von NKT-Zellen ³⁸⁻⁴⁰. Deshalb ist synthetisch hergestelltes α GalCer heute in der Forschung als spezifisches Antigen zur Stimulation von NKT-Zellen weit verbreitet. Auch diese Eigenschaften von NKT-Zellen lassen jedoch keine eindeutige Definition zu. So finden sich unter den CD1d-restringierten T-Zellen auch solche, die weder die zuvor beschriebene TZR- α -Kette besitzen, noch durch α GalCer aktiviert werden ^{41,42}.

Die zuvor erwähnte Einteilung von Godfrey et al. unterscheidet zwei Typen von NKT-Zellen, die beide CD1d-abhängig sind ¹⁴: Klassische Typ-I-NKT-Zellen [auch als invariante ($V\alpha 14^+$ bzw. $V\alpha 24^+$) NKT-Zellen bzw. iNKT-Zellen bezeichnet] exprimieren in Mäusen die invariante α -Kette $V\alpha 14$ - $J\alpha 18$ und in Menschen die invariante α -Kette $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$. Innerhalb dieser Typ-I-NKT-Zellen lassen sich zwei weitere Subpopulationen unterscheiden, nämlich $CD4^+$ Typ-I-NKT-Zellen und (DN) $CD4^-CD8^-$ Typ-I-NKT-Zellen. In Menschen wurde eine zusätzliche Subpopulation von $CD8^+$ Typ-I-NKT-Zellen beschrieben. Nicht-klassische Typ-II-NKT-Zellen (noninvariante NKT-Zellen) beinhalten alle anderen CD1d-abhängigen T-Zellen. Diese exprimieren verschiedene non- $V\alpha 14/24$ TZR und werden im Allgemeinen trotz ihrer Abhängigkeit von CD1d nicht durch α GalCer aktiviert. Auch hier werden in Mäusen zwei Subpopulationen als $CD4^+$ Typ-II-NKT-Zellen und DN Typ-II-NKT-Zellen unterschieden. Typ-I-NKT-Zellen und Typ-II-NKT-Zellen können $NK1.1^+$ oder $NK1.1^-$ sein. Außer diesen beiden beschreiben Godfrey et al. noch eine dritte Gruppe, die NKT-ähnlichen Zellen. Diese Zellen sind CD1d-unabhängig und ihre verschieden aufgebauten TZR interagieren mit klassischen MHC-Klasse-I und -II Molekülen. Sie sind $NK1.1^+$ und besitzen ähnliche Eigenschaften wie die beiden zuvor beschriebenen Typen von NKT-Zellen. Aufgrund ihrer CD1d-Unabhängigkeit zählen Godfrey et al. sie jedoch nicht direkt zu den NKT-Zellen.

1.2.3 Entwicklung und Vorkommen von NKT-Zellen

NKT-Zellen haben eine mit konventionellen T-Zellen gemeinsame Vorläuferzelle. Diese $CD4^-CD8^-$ Vorläuferzellen entwickeln sich während der Ontogenese und wandern nach der Geburt in den Thymus wo sie sich weiter differenzieren. Im murinen Thymus entwickeln sich daraus kortikale $CD4^+CD8^+$ (DP) Thymozyten ^{43,44}. Während der Selektion im Thymus interagieren dann DP kortikale Thymozyten, die erfolgreich den semi-invarianten TZR umgeformt haben, mit von anderen DP Thymozyten exprimierten endogenen Glykolipiden, die an deren CD1d gebunden sind. Dadurch treten sie in die Entwicklung der $V\alpha 14$ NKT-Zelllinie ein. Während der Reifung dieser Zelllinie werden entweder beide

Co-Rezeptoren (CD4 bzw. CD8) oder nur einer der beiden herunterreguliert, wobei CD8⁺CD4⁻ Zellen depletiert werden ⁴⁵. Es kommt zur verstärkten Expression von Aktivitätsmarkern wie CD44 und später NK-Zellmarkern wie NK 1.1 und Molekülen der Ly-49 Rezeptorfamilie ⁴⁶.

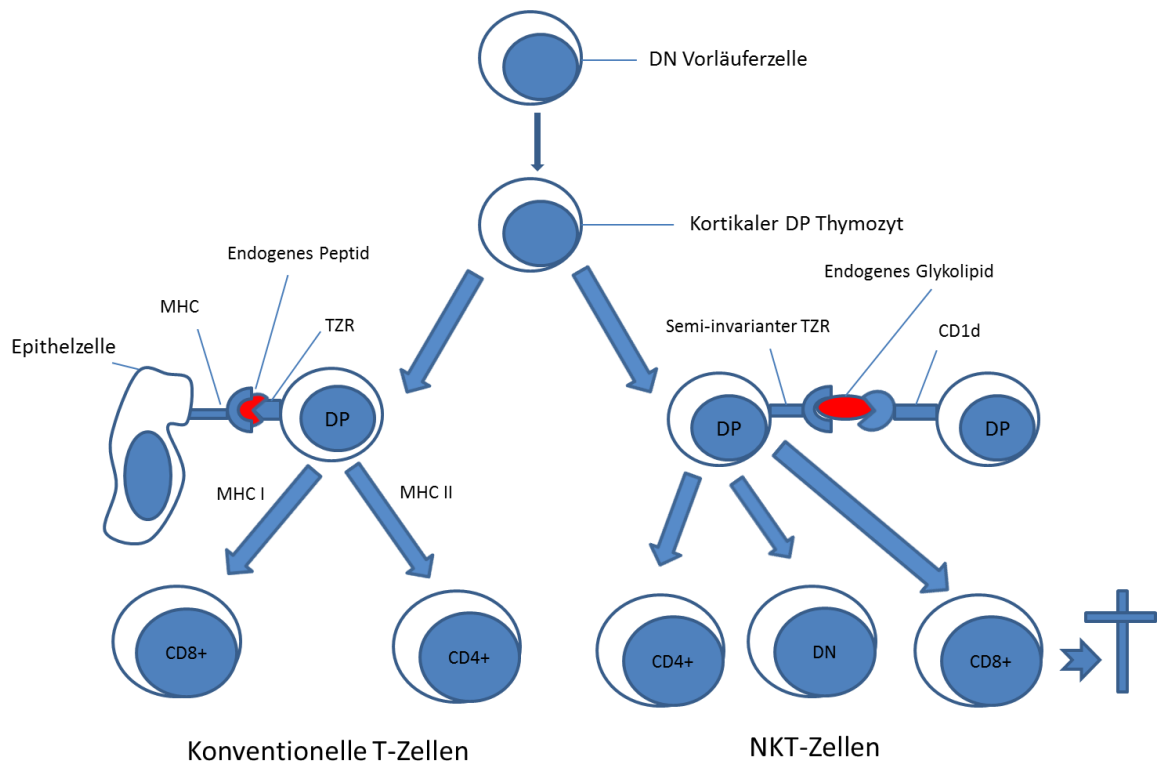


Abbildung 1-2: Unterschiedliche Entwicklung von konventionellen T-Zellen und NKT-Zellen

(Modifiziert nach Godfrey et al. ¹⁴)

In Mäusen machen NKT-Zellen in der Leber 30-50 %, im Knochenmark 20-30% und in der Milz etwa 3 % der vorhandenen T-Zellen aus. NKT-Zellen treten aber auch überall auf, wo gewöhnliche T-Zellen zu finden sind. In Lymphknoten und Blut machen sie jedoch nur einen geringen Anteil der vorhandenen T-Zellen aus ^{5,21,22}. In Menschen liegt der Anteil

von NKT-Zellen an peripheren T-Zellen im Blut bei nur ca.0,2 %, der Anteil in der Leber von Menschen ist gegenüber dem in Mäusen ebenfalls geringer^{47,48}.

1.2.4 Zytokin-Produktion von NKT-Zellen

Im Gegensatz zu gewöhnlichen T-Zellen erkennen NKT-Zellen körpereigene Glykolipide und beginnen nach Stimulation innerhalb von wenigen Stunden sowohl Th₁- als auch Th₂-Zytokine in großen Mengen zu produzieren^{5,10,49}. Dies wird offensichtlich dadurch ermöglicht, dass auch ohne vorherige Stimulation ständig mRNA für diese Zytokine in den Zellen vorhanden ist^{50,51}. Auch wenn die Stimulation in vivo stattfindet, können NKT-Zellen gleichzeitig Th₁-Zytokine und Th₂-Zytokine produzieren, was angesichts deren gegensätzlicher Wirkungen paradox erscheint^{50,52}. Dieses grundsätzlich vorhandene Th₀-Zytokinprofil kann jedoch unter bestimmten Umständen in Richtung Th₁-Antwort oder Th₂-Antwort gelenkt werden⁵³. In Einklang gebracht werden kann dies mit den verschiedenen Funktionsweisen der NKT-Zellen. Bei der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen nutzen sie Th₂-Zytokine zur Regulation des Immunsystems, während im Rahmen von Effektorzellfunktionen Th₁-Zytokine produziert werden können⁷. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass sich einzelne Subpopulationen von menschlichen NKT-Zellen teilweise deutlich in ihrem Zytokinprofil unterscheiden. Demnach werden IL-4 und IL-13 nach primärer Stimulation nur von CD4⁺ NKT-Zellen produziert, während DN NKT-Zellen Th₁-Zytokine produzieren und dabei verschiedene NK-Zellmarker exprimieren⁵⁴⁻⁵⁶. Bei murinen NKT-Zellen konnte diese Dichotomie nicht festgestellt werden, hier produzieren z.B. auch aus der Leber stammende DN NKT-Zellen IL-4⁵⁷. Es gibt also nicht nur Unterschiede in der Zytokin-Produktion zwischen einzelnen Subpopulationen, sondern auch innerhalb der Subpopulationen zwischen verschiedenen Spezies. Zudem können Unterschiede in der Zytokin-Produktion von NKT-Zellen auch zwischen verschiedenen Mäusestämmen und Organen festgestellt werden⁵⁸. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor auf das Zytokinprofil von NKT-Zellen ist die Art der Stimulation. Nach unphysiologischer Stimulation mit α GalCer oder einer Kombination aus Phorbol-3-

Myristyl-4-Acetat (PMA), Ionomycin, IL-2 und Antikörpern gegen CD3 und CD28 kommt es zu einer starken Produktion von sowohl Th₁-Zytokinen als auch Th₂-Zytokinen^{58,59}. Mit verschiedenen Analogen von αGalCer oder anderen Antigenen lässt sich jedoch eine selektivere Produktion von Th₁-Zytokinen oder Th₂-Zytokinen provozieren^{60,61}. Bei Stimulation mit an CD1d gebundenen, endogenen Antigenen kommt es nur zu einer geringen Zytokin-Produktion. Werden jedoch exogen zusätzlich Zytokine zugeführt, kommt es auch hier, je nach zugeführtem Zytokin, zu einer selektiven Produktion großer Mengen bestimmter Zytokine durch NKT-Zellen^{62,63}. Auch die Beschaffenheit der APZ scheint Einfluss auf das produzierte Zytokinprofil zu nehmen. Wird αGalCer von professionellen APZ präsentiert, kommt es zur Ausbildung eines Th₀-Zytokinprofils. Wird αGalCer dagegen von nicht professionellen APZ, wie z.B. Schwann-Zellen, präsentiert, kann es zu einer verstärkten Produktion von Th₂-Zytokinen kommen⁶⁴. Die Präsentation von αGalCer durch CD1d-exprimierende, epidermale Keratinozyten führt dagegen weder zur Produktion von IFN-γ noch von IL-4⁶⁵. Insgesamt zeigt der aktuelle Stand der Forschung, dass NKT-Zellen in der Lage sind, große Mengen sowohl von Th₁-Zytokinen als auch von Th₂-Zytokinen zu produzieren. Wie genau das gebildete Zytokinprofil aussieht, hängt davon ab, aus welchem Organ und welcher Spezies die Zellen stammen, durch welches Antigen sie stimuliert werden, mit welchen APZ sie interagieren und in welchem Umgebungsmilieu sie sich befinden. Vieles deutet darauf hin, dass es funktionelle Subpopulationen gibt, die sich in ihrem grundsätzlichen Zytokinprofil unterscheiden und in den verschiedenen Organen und Spezies unterschiedlich verteilt sind.

1.2.5 Zytotoxische Funktionen von NKT-Zellen

Außer der Fähigkeit zur Zytokin-Produktion besitzen NKT-Zellen nach Stimulation mit IL-12 oder αGalCer auch direkte und indirekte zytotoxische Aktivität, ähnlich der von NK-Zellen. Dabei können NKT-Zellen indirekt die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen durch die Produktion von IL-2 und IFN-γ steigern, aber auch direkt zytotoxisch auf andere Zellen wirken⁶⁶⁻⁸⁷. Für die direkte Zytotoxizität von NKT-Zellen werden verschiedene

Mechanismen postuliert. Grundsätzlich gibt es für Lymphozyten zwei Hauptmechanismen zytotoxisch zu wirken. Zum einen kann dies über die Interaktion von Liganden der zytotoxischen Zellen, wie in erster Linie Fas-Ligand (FasL), Tumornekrosefaktor (TNF) oder TRAIL („TNF-related apoptosis inducing Ligand“), mit Oberflächenrezeptoren („Todesrezeptoren“) der Zielzelle, wie Fas-Rezeptor (Fas = CD95), daneben Tumornekrosefaktor-Rezeptor I/II (TNFR-I/II) oder TRAILR („TNF-related apoptosis inducing Ligand Receptor“) u.a., geschehen. Zum anderen können verschiedene Lymphozyten lösliche Mediatoren, hier v.a. Perforin und Granzyme, ausschütten, die die Zielzelle lysieren⁸⁸⁻⁹⁰. Beide Mechanismen führen zur Apoptose der Zielzelle. Für die zytotoxischen Wirkungen von NKT-Zellen werden verschiedene dieser Mechanismen angegeben. Frühe Forschungsarbeiten beschreiben zytotoxische Wirkungen von NKT-Zellen über einen Perforin/Granzym B-abhängigen Mechanismus⁹¹⁻⁹⁴. Mattarollo et al. beschreiben zytotoxische Wirkungen von NKT-Zellen gegen Tumorzellen, die sowohl von TRAIL als auch von Fas-Ligand sowie von Perforin abhängig waren, je nach Art der Zieltumorzelle⁹⁵. Kaneko et al. induzierten durch Stimulation von NKT-Zellen eine Autoimmunhepatitis, welche abhängig sowohl von der Interaktion FasL/Fas als auch von Perforin/Granzymen war⁹⁶. Eine neuere Forschungsarbeit zeigte im Zusammenhang mit oraler Nickeltoleranz zytotoxische Aktivität von NKT-Zellen gegen B-Zellen durch einen FasL/Fas-abhängigen Mechanismus⁹⁷. Ferner legen Wingender et al. in einer aktuellen Arbeit mit Knockout Mäusen dar, dass die antigenspezifische Zytotoxizität von NKT-Zellen in vivo fast ausschließlich von der Interaktion zwischen Fas-Ligand und Fas-Rezeptor abhängt und komplett unabhängig von Perforin/Granzymen ist⁷⁹. Bei Blockade des FasL/Fas-Mechanismus waren NKT-Zellen in ihren Versuchen nur noch geringfügig zytotoxisch aktiv. Diese Restzytotoxizität könnte dabei auf einen TRAIL-abhängigen und/oder TNF- α -abhängigen Mechanismus zurückzuführen sein. Insgesamt herrscht noch weitgehende Unklarheit über die zytotoxischen Mechanismen von NKT-Zellen. Neuere Forschungsergebnisse legen jedoch nahe, dass der Interaktion FasL/Fas eine entscheidende Rolle zukommt^{79,97}.

1.2.6 Proliferationshemmende Wirkungen von NKT-Zellen

Eine Möglichkeit, wie NKT-Zellen Autoimmunerkrankungen oder Abstoßungsreaktionen bei Transplantaten verhindern könnten, ist deren hemmende Wirkung auf die Proliferation von autoreaktiven Zellen⁹⁸⁻¹⁰⁰. Über welche genauen Mechanismen diese Proliferationshemmung stattfindet, ist weitgehend unklar. Novak et al. beschäftigten sich in einer Forschungsarbeit mit gegen Pankreas-Inselzellen gerichteten BDC2.5 T-Zellen. Sie beschreiben darin zunächst eine untergeordnete Rolle von Zytokinen bei der Hemmung der Proliferation dieser Zellen durch NKT-Zellen. Vielmehr konnten sie zeigen, dass hierfür Zell-Zell-Kontakte zwischen NKT-Zellen und den diabetes-induzierenden T-Zellen notwendig sind¹⁰¹. Cain et al. vermuten jedoch in einer späteren, auf dem Versuchsmodell von Novak et al. aufbauenden Studie eine Schlüsselrolle des durch NKT-Zellen produzierten IFN- γ bei deren proliferationshemmender Wirkung auf diabetogene T-Zellen⁹⁹. Mattarollo et al. zeigten eine Hemmung der Proliferation antigenspezifischer CD8⁺-Zellen dadurch, dass NKT-Zellen die Antigenpräsentation von APZ an diese CD8⁺-Zellen unterbinden¹⁰⁰.

1.2.7 DX5⁺NKT-Zellen

Zur Isolierung von NKT-Zellen wird häufig die Kombination der Oberflächenmarker CD3 und NK 1.1 verwendet. In Mausstämmen, die kein NK 1.1 exprimieren, stellt das als Pan-NK-Zellmarker geltende Antigen DX5 (=CD49b) eine gebräuchliche Alternative dar¹⁵. Aufgrund widersprüchlicher, früherer Daten über die CD1d-Abhängigkeit dieser CD3⁺DX5⁺-Zellen und die generell schwierige durchflusszytometrische Nachweisbarkeit von DX5 auf NKT-Zellen, welche stark vom verwendeten Antikörper abhängt, entstand jedoch eine Diskussion darüber, ob diese Zellen grundsätzlich zu den NKT-Zellen gezählt werden können^{21,102,103}. Frühere Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe nutzten die Kombination der Marker CD3 und DX5 zur Isolierung. Für die so isolierten Zellen wurde der Begriff „DX5⁺NKT-Zelle“ eingeführt¹⁰⁴. Pelleci et al. konnten zeigen, dass die Anzahl an DX5⁺ T-Zellen sowohl in CD1d^{-/-} als auch in TZR J α 18^{-/-} knockout Mäusen normal

hoch ist ¹⁰⁵. Damit ist die Zugehörigkeit von DX5⁺NKT-Zellen zu den Gruppen I oder II nach der Einteilung von Godfrey et al. ausgeschlossen ¹⁴. Auch wenn diese DX5⁺NKT-Zellen typische Eigenschaften von klassischen NKT-Zellen besitzen, müssen sie aufgrund der Ergebnisse von Pelleci et al. dennoch der Gruppe der NKT-ähnlichen Zellen nach der Einteilung von Godfrey et al. zugeordnet werden. Wie klassische NKT-Zellen produzieren DX5⁺NKT-Zellen nach Stimulation große Mengen Th₁-Zytokine und Th₂-Zytokine und besitzen immunregulatorisches Potenzial ^{58,104,106-110}. Außerdem scheinen DX5⁺NKT-Zellen auch eine Rolle bei der Tumorbekämpfung zu spielen ¹¹¹.

1.3 CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und CD4⁺CD62L_{low}-Zellen

Die in dieser Arbeit als CD4⁺CD62L_{high} bzw. CD4⁺CD62L_{low} bezeichneten Zellpopulationen werden in der Literatur auch als CD4⁺CD62L⁺ bzw. CD4⁺CD62L⁻ bezeichnet. Sie unterscheiden sich jedoch nicht durch das „absolute“ Vorhandensein von CD62L, sondern durch dessen Dichte auf der Zelloberfläche. Die in der Literatur als CD4⁺CD62L⁻ bezeichnete Zellpopulation weist eine verhältnismäßig geringe Dichte an CD62L auf, ist jedoch nicht gänzlich negativ. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die Bezeichnungen CD4⁺CD62L_{high} und CD4⁺CD62L_{low} für diese beiden Zellpopulationen verwendet. In der Vergangenheit wurde diese Unterscheidung bereits durch unsere Arbeitsgruppe und andere Autoren getroffen ^{104,112,113}. CD4⁺CD62L_{high}-Zellen sind naive, also unreife CD4⁺-Zellen ^{112,114}. In Thymus und Knochenmark gebildete naive CD4⁺-Zellen wandern mit Hilfe des Adhäsionsmoleküls CD62L aus dem Blutkreislauf in sekundäre lymphatische Organe ein. Dort werden dann durch Antigenpräsentation Zellen mit passenden Antigenrezeptoren aktiviert und das Durchschreiten eines Reifungsprozesses initiiert. Dabei kommt es zum Verlust von CD62L ^{115,116}. Laut Bell et al. wäre es jedoch falsch, diese Zellen bereits als Effektorzellen oder Memoryzellen zu bezeichnen, vielmehr handelt es sich dabei um eine Art „intermediärer Zellen“ ¹¹⁵. Die intermediären Zellen verlassen anschließend die sekundären lymphatischen Organe und wandern über andere (teilweise unter Mithilfe von verbliebenem CD62L), bei der Reifung

ausgebildete Adhäsionsmoleküle spezifisch in das jeweilige Gewebe, in dem sie benötigt werden, ein. Im peripheren Gewebe können sie nach erneutem Antigenkontakt zu Effektorzellen heranreifen ¹¹⁵. Bei Rezirkulation in den Blutkreislauf scheint CD62L wiederum hochreguliert werden zu können, was bedeutet, dass ein Teil der im Blutkreislauf zirkulierenden CD4⁺CD62L_{high}-Zellen eigentlich im Reifungsprozess weiter fortgeschrittene, intermediäre CD4⁺CD62L_{low}-Zellen darstellen, die CD62L kurzzeitig hochregulieren, um in die sekundären lymphatischen Organe rezirkulieren zu können ^{112,117}. Diese intermediären CD4⁺-Zellen können dabei wieder für längere Zeit in den sekundären lymphatischen Organen verbleiben, sie stellen laut Bell et al. unvollständig ausgereifte „multifunktionelle T-Zellen“ dar ¹¹⁵. Bei den in der Milz vorhandenen CD4⁺CD62L_{high}-Zellen handelt es sich jedoch trotzdem zum Großteil um naive CD4⁺-Zellen, da die rezirkulierten intermediären CD4⁺-Zellen nach Wiedereintritt in sekundäre lymphatische Organe CD62L erneut rasch herunterregulieren ¹¹⁷. Anhand von Untersuchungen verschiedener Reifemarker kam auch unsere Arbeitsgruppe in früheren Versuchen zu dem Ergebnis, dass es sich bei den aus Milzen isolierten CD4⁺CD62L_{high}-Zellen um naive CD4⁺-Zellen handelt ¹⁰⁴.

1.3.1 Stellung von naiven CD4⁺CD62L_{high}-Zellen im Immunsystem

Naive CD4⁺-Zellen hatten im Gegensatz zu CD4⁺-Effektorzellen noch keinen Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen. Sie exprimieren in hoher Dichte „Naivitätsmarker“ wie CD45RA und CD62L bzw. in niedriger Dichte „Reifemarker“ wie CD45RO, CD11a und CD44 ¹¹⁸. Während CD4⁺-Effektorzellen in der Lage sind, das gesamte Spektrum an Zytokinen zu produzieren, fehlt naiven CD4⁺-Zellen v.a. die Fähigkeit zur Produktion von IL-4 und IFN- γ ¹¹⁹. Durch unspezifische Stimulation nach Antigenkontakt werden naive CD4⁺-Zellen zunächst zu Th₀-Effektorzellen aktiviert, die ein breites Zytokinprofil besitzen und der Immunantwort noch keine eindeutige Richtung geben. Zur weiteren Differenzierung in Th₁-Zellen oder Th₂-Zellen müssen die Th₀-Zellen mit ihrem TZR Antigene, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ)

präsentiert werden, erkennen und gleichzeitig muss eine Stimulation von CD28 der Th₀-Zellen durch kostimulatorische Moleküle (z.B. B7) der APZ stattfinden¹²⁰. Zu welchem T-Helferzelltyp sich die Zelle entwickelt, ist abhängig vom Antigen bzw. dessen Präsentation und vom Umgebungsmilieu, hier v.a. vom Vorhandensein bestimmter Zytokine, die durch APZ, NK-Zellen, T-Zellen und regulatorische Immunzellen produziert werden. IFN- γ und IL-12 bewirken die Differenzierung zur Th₁-Zelle, während IL-4 und IL-6 die Differenzierung in Richtung Th₂-Zelle lenken. Außerdem spielen genetische Faktoren für die Differenzierung eine Rolle¹²⁰.

1.3.2 Naive CD4⁺CD62L_{high}-Zellen bei Autoimmunerkrankungen

CD4⁺-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen, werden aber auch mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei kommt es nach Antigenkontakt zur Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen in gegen Selbstantigene gerichtete Effektorzellen^{108,121,122}. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurden Forschungsmodelle zur Erzeugung von Autoimmunerkrankungen entwickelt. So entwickelte sich im Laufe des letzten Jahrzehnts beispielsweise die Transfusion naiver CD4⁺-Zellen zu einer etablierten Methode zur Erzeugung einer sogenannten Transferkolitis in immundefizienten Mäusen, welche in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe erfolgreich angewendet wurde^{104,123}. Immundefizienten Mäusen fehlen regulatorische Immunzellen, welche die Differenzierung und Proliferation anderer Immunzellen regulieren können, weshalb das Immunsystem durch Transfusion naiver CD4⁺-Zellen leicht aus dem Gleichgewicht gebracht und die Entstehung von Autoimmunerkrankungen begünstigt werden kann.

1.4 Apoptose

Apoptose, der „programmierte Zelltod“, beschreibt das kontrollierte Absterben einer Zelle nach Auslösung einer definierten Signalkaskade. Im Gegensatz zur unkontrollierten

Zellnekrose, die durch unspezifische Zellschäden wie z.B. Hitze ausgelöst wird, werden dabei die einzelnen Zellbestandteile kontrolliert abgebaut und in Vesikel verpackt. Diese werden dann von Makrophagen oder Nachbarzellen aufgenommen und weiter abgebaut. Es kommt zu keiner Entzündungsreaktion. Apoptose ist von entscheidender Bedeutung für die Gewebshomöostase. Alte, beschädigte oder mutierte Zellen werden beseitigt, im Immunsystem werden potenziell autoreaktive oder nutzlose Zellen „aussortiert“⁹⁰.

Apoptose kann durch einen extrinsischen und einen intrinsischen Weg ausgelöst werden. Der extrinsische Weg wird durch zytotoxische Mechanismen ausgelöst. Dabei spielen v.a. die Interaktion von „Todesrezeptoren“ mit ihren Liganden und Perforin/Granzym eine bedeutende Rolle⁹⁰. Beispielhaft soll im Folgenden die Interaktion des Todesrezeptors Fas mit seinem Liganden Fas-Ligand erklärt werden. Zunächst lagert sich die zytotoxische Zelle mit ihrem Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor der Zielzelle an. Dadurch kommt es zu einer Trimerisierung der Fas-Rezeptoren, woraufhin deren intrazelluläre Todesdomänen mit den Todesdomänen des Adapters FADD/MORT1 (Fas-Associated protein with Death Domain/Mediator of receptor-induced toxicity-1) interagieren, was zu dessen Anlagerung an die Fas-Trimere führt^{124,125}. Eine Interaktion der Todeseffektordomänen von FADD und Procaspase-8 führt dann zur Bildung des den Zelltod induzierenden Komplexes (DISC, Death inducing signalling complex)¹²⁶. Es kommt daraufhin am DISC zur autokatalytischen Spaltung von Procaspase-8 zum aktiven Enzym Caspase-8. Aktive Caspase-8 ist eine Initiatorcaspase, die die Spaltung anderer Procaspasen in deren aktive Formen, den sog. Effektorcaspasen, katalysiert⁹⁰. So führt Caspase-8 in Typ-I-Apoptose-Zellen zur direkten Aktivierung von Caspase-3. In Typ-II-Apoptose-Zellen sind die DISC-Bildung und Aktivierung von Caspase-8 reduziert. Deshalb verwenden diese Zellen ihre Mitochondrien als Signalverstärker. Dabei katalysiert Caspase-8 die Spaltung des Moleküles BID (BH3-interacting domain), welches zu einer Aktivierung der Mitochondrien führt. Diese setzen daraufhin Cytochrom C frei, welches mit Apaf-I (Apoptotic protease activating factor I) ein Apoptosom bildet, das wiederum Caspase-9 aktiviert. Dieses aktiviert wiederum Caspase-3 und andere Effektorcaspasen¹²⁷. Effektorcaspasen führen daraufhin zur Spaltung von Todessubstraten, die schließlich zum

morphologischen und biochemischen Bild der Apoptose führen ⁹⁰.

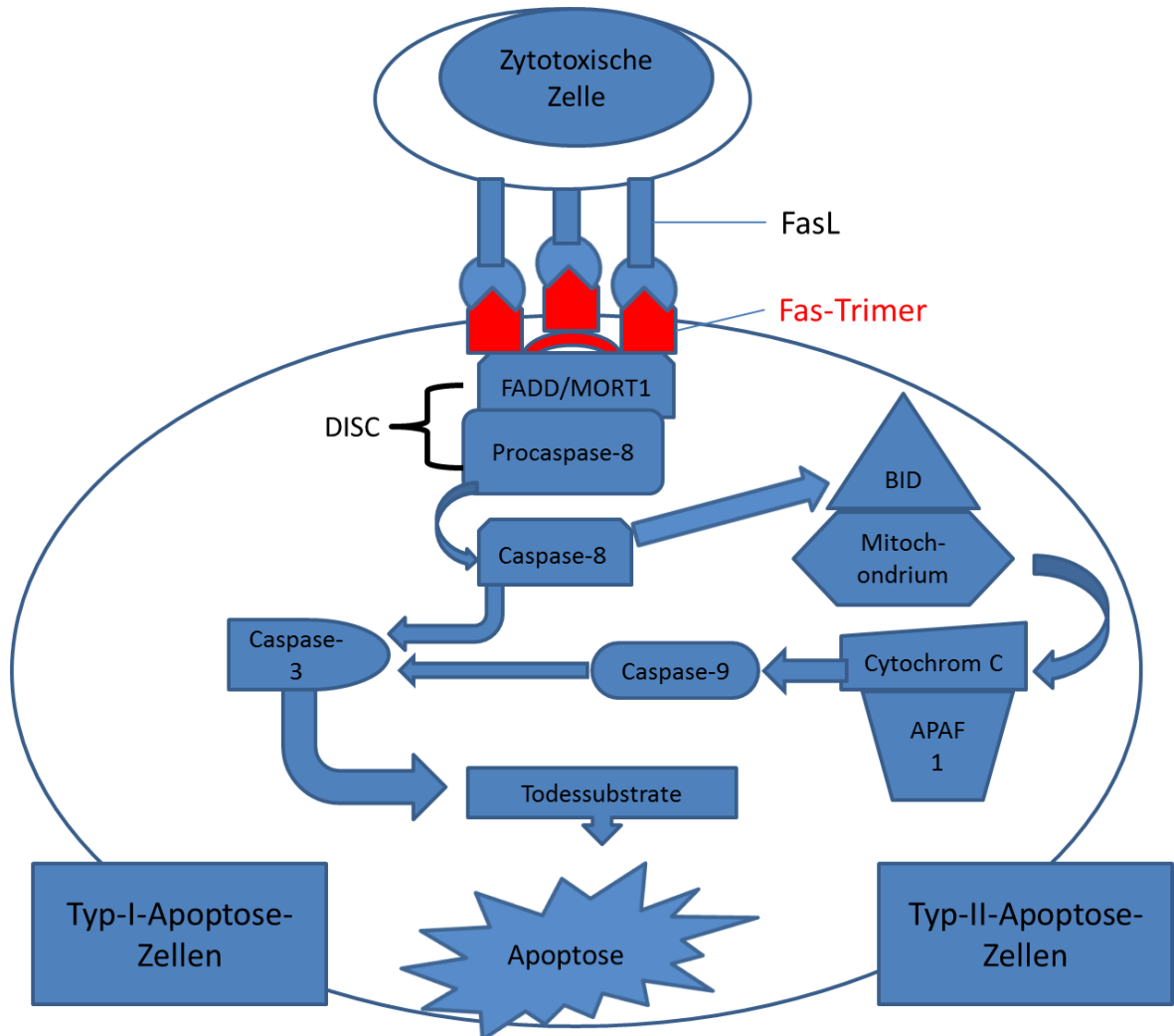


Abbildung 1-3: Fas/FasL-abhängige Apoptose

(Modifiziert nach Kramer ⁹⁰)

Beim Apoptosemechanismus, der durch Perforin/Granzyme ausgelöst wird, sind die Vorgänge unklarer. Ein ursprüngliches Modell geht davon aus, dass zunächst von zytotoxischen Zellen ausgeschüttetes Perforin polymerisiert und eine Pore in der

Zellmembran der Zielzelle bildet ¹²⁸. Durch diese Pore können die Granzyme dann ins Zellinnere gelangen ¹²⁹. Diese Theorie ist allerdings umstritten, da die Pore, die durch Perforin gebildet wird, eigentlich zu klein für den Durchtritt der Granzyme ist ¹³⁰. Weitere Modelle beschreiben eine Endozytose des durch Perforin beschädigten Abschnitts der Zellmembran durch die Zielzelle, wobei es zur Co-Endozytose von Granzymen kommt ¹³¹. Andere Arbeitsgruppen beschreiben einen Rezeptor, über den Granzyme unabhängig von Perforin ins Zellinnere gelangen. Perforin bewirkt dann lediglich die Freisetzung der Granzyme aus den Endosomen im Zellinneren. ¹³². Letztendlich aktiviert Granzym die Caspase-3 und andere Moleküle, die zur Fragmentierung der DNA führen ⁸⁸.

Intrinsische Apoptosewege werden ausgelöst durch fehlende Stimulation trophischer Rezeptoren, DNA-Schäden, Glukokortikoide oder Kontaktverlust zu Nachbarzellen im Zellverbund. Dadurch kommt es zum Funktionsverlust von Mitochondrien, Cytochrom c wird freigesetzt und aktiviert den Komplex Apaf-1/Caspase-9. Dieser führt dann zur Aktivierung der Caspase-Kaskade ⁸⁸⁻⁹⁰.

2 Zielsetzung der Arbeit

Frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe beschäftigten sich bereits mit dem Einfluss von DX5⁺NKT-Zellen auf naive CD4⁺CD62L_{high}-T-Zellen ¹⁰⁴. Im Tiermodell konnte durch die Co-Transfusion von DX5⁺NKT-Zellen die Entstehung einer Transferkolitis durch CD4⁺CD62L_{high}-Zellen verhindert und eine bereits bestehende Transferkolitis abgemildert werden. In Co-Kulturen zwischen DX5⁺NKT-Zellen und CD4⁺CD62L_{high}-Zellen wurde dabei nach 72 Stunden eine signifikante Verringerung der absoluten Anzahl von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen gegenüber entsprechenden Mono-Kulturen beobachtet. Die Verhinderung der Transferkolitis durch den Co-Transfer von DX5⁺NKT-Zellen könnte auf pro-apoptotischen Wirkungen von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen beruhen. Ein genauer Nachweis für pro-apoptotische Wirkungen und des zugrundeliegenden Mechanismus konnte jedoch bisher nicht erbracht werden. Aktuelle Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten eine deutliche Expression von Fas-Ligand auf stimulierten DX5⁺NKT-Zellen zeigen ⁵⁸. Hier könnte ein Zusammenhang zwischen der Expression von Fas-Ligand und möglichen pro-apoptotischen Wirkungen von DX5⁺NKT-Zellen bestehen.

Naive CD4⁺-Zellen können Auslöser von Autoimmunerkrankungen sein, indem sie proliferieren und sich in autoreaktive CD4⁺-Effektorzellen differenzieren ^{121,122}. NKT-Zellen wiederum können proliferationshemmend auf verschiedene autoreaktive Zellen wirken, wobei Novak et al. hierbei eine untergeordnete Rolle von Zytokinen und die Notwendigkeit von Zell-Zell-Kontakten beschreiben ¹⁰¹. In einer späteren, ähnlich aufgebauten Arbeit beschreiben jedoch Cain et. al eine Schlüsselrolle von durch NKT-Zellen produziertem IFN- γ ⁹⁹. Mattarollo et al. zeigten eine Hemmung der Proliferation antigenspezifischer CD8⁺-Zellen dadurch, dass NKT-Zellen die Antigenpräsentation von APZ an diese CD8⁺-Zellen unterbinden ¹⁰⁰. DX5⁺NKT-Zellen könnten allerdings auch die Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen hemmen indem sie durch einen Fas-Ligand-abhängigen Mechanismus einen pro-apoptotischen Effekt vermitteln.

In dieser Arbeit sollten nun Aussagen der gängigen Literatur überprüft und mögliche Zusammenhänge anhand von Co-Kulturen in vitro gezeigt werden. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

-Bestätigung der proliferationshemmenden Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen als potenzielle Ursache für die in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigte Unterdrückung einer Transferkolitits unter Verwendung eines CFSE-Proliferationsassays.

-Aufdeckung des zugrundeliegenden Mechanismus der proliferationshemmenden Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen. Dabei sollten zwei wichtige Mechanismen für proliferationshemmende Wirkungen überprüft werden:

-Veränderungen in der Produktion der die Zellproliferation beeinflussenden Zytokine der beiden Zellpopulationen in Co-Kulturen gegenüber den jeweiligen Mono-Kulturen.

-Mögliche pro-apoptotische Wirkungen von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen über einen Fas-Ligand-abhängigen Mechanismus.

-Zunächst Darstellung der Ausschüttung der die Zellproliferation beeinflussenden Zytokine IL-2 und INF- γ der einzelnen Zellpopulationen in Mono-Kulturen und Vergleich mit deren Ausschüttung in Co-Kulturen.

-Darstellung möglicher pro-apoptotischer Wirkungen von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen durch Vergleich der Aktivität von Caspase-3 in CD4⁺CD62L_{high}-Lymphozyten in Mono-Kulturen und in Co-Kulturen mit DX5⁺NKT-Zellen

-Vergleichende Darstellung der Expression von Fas-Ligand durch DX5⁺NKT-Zellen und CD8⁺-Zellen, welche v.a. durch Perforin/Granzym B zytotoxisch wirken

-Überprüfung der Abhängigkeit möglicher pro-apoptotischer Wirkungen von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen durch Vergleich der Aktivität von Caspase-3 in CD4⁺CD62L_{high}-Lymphozyten in Co-Kulturen mit DX5⁺NKT-Zellen, deren Fas-Ligand blockiert bzw. nicht blockiert wurde.

3 Materialien

3.1 Geräte

Brutschrank HeraCell	Heraeus, Langenselbold, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Research Pipetten 1000, 200, 100, 20, 10 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrische Pipette pipetus	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Aria I BD	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Intravitalmikroskop (Fluoreszenz)	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Umkehrmikroskop DM IL	Leica, Wetzlar, Deutschland
MACS MultiStand	Miltenyi, Bergisch Gladbach Deutschland
Midi-MACS Magneten „Separator“ und „QuadroMACS Separation Unit“	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Neubauer Zählkammer „bright line“ improved	Schubert+Weiss, München Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA

Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorfgefäße (0,2- 2 ml)	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
Falcons 15 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Falcons 50 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
FACS-Röhrchen steril 5ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen 5 ml unsteril	BD, Heidelberg, Deutschland
MACS Präseparationsfilter 30 µm	Miltenyi, Bergisch Gladbach Deutschland
MACS-Säulen LS	Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
Pipetten-Spitzen (0,1 - 10 µl, 2 - 200 µl, 100-1000 µl)	Corning Costar / Sarstedt / Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Steriflip Filtereinheit, 50 ml	Millipore, Billerica, USA
Steritop Filtereinheit, 500ml	Millipore, Billerica, USA
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Corning Costar / Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten, 96 Wells, mit flachem Boden	BD Falcon / Corning Costar / Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Zellsiebe 100 µm	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland

3.3 Chemikalien und Fertiglösungen

ACK-Lysepuffer	BioWhittaker , Lonza, Basel, Schweiz
BSA (Bovines Serumalbumin)	Biomol, Hamburg, Deutschland
Dulbecco's PBS Without Ca&Mg 500ml (Phosphat Pufferlösung)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) 500mM	Merck, Darmstadt
FCS (Fötale Kalbserum)	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Foxp3 Staining Buffer Set	eBioscience, San Diego, CA, USA
GIBCO RPMI1640 + Glutamin + Hepes	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
L-Glutamine	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Golgi-Plug	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Interleukin-2, rekombinant, murin	Preprotech, Rocky Hill, NJ, USA
Ionomycin	Sigma Aldrich, Steinheim
70 % Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Paisley, Großbritannien
PMA	InvivoGen, San Diego, USA
Trypanblau 0,5 %	Biochrom, Berlin, Deutschland

3.4 Hergestellte Puffer und Zellkulturmedien

Alle hergestellten Puffer und Medien wurden mit einer Steritop-Filtereinheit steril-filtriert und bei 4 ° C gelagert.

FACS-Puffer ohne Na-Azid	PBS + 2 % FCS
FACS-Puffer mit Na-Azid	PBS + 2 % FCS + 0,1 % Na-Azid
MACS-Puffer	500 ml PBS + 2,5g BSA + 0,37g EDTA
Medium für Zellkulturen	RPMI1640 + 10 % FCS + 50000U Penicillin/Streptomycin + 0,2 mM Glutamin

3.5 Antikörper und Magnetbeads

Zur Herstellung von "Working-solutions" von FACS-Antikörpern wurden die jeweiligen Antikörper jeweils mit FACS-Puffer mit Na-Azid im Verhältnis 1:25 verdünnt und in 1,5 ml Eppendorf-Cups aufbewahrt.

anti-CD49b (DX5) Magnetbeads	Miltenyi Biotec
anti-CD8 Magnetbeads	Miltenyi Biotec
CD4 ⁺ CD62L ⁺ T-Zell Isolationskit II, bestehend aus CD4 ⁺ Biotin Antikörpercocktail, anti-Biotin Magnetbeads und anti-CD62L Magnetbeads	Miltenyi Biotec
Alexa 647 anti-Maus CD3, Klon 17A2	BD, Heidelberg, Deutschland
Alexa 647 Rabbit anti-aktive Caspase-3, Klon C92-605	BD, Heidelberg, Deutschland
Alexa 647 Rabbit IgG Isotyp	ebioscience, San Diego, CA, USA

APC anti-Maus CD4, Klon RM4-5	Caltag, Hamburg, Deutschland
APC anti-Maus CD49b (PanNK), Klon DX5	BD, Heidelberg, Deutschland
APC anti-Maus CD8a, Klon 53-6.7	eBioscience, San Diego, CA, USA
APC anti-Maus CD62L, Klon MEL-14	BD, Heidelberg, Deutschland
APC Ratte IgG2a	Caltag, Hamburg, Deutschland
Caspase-3, Active Form, mAB Apoptosis kit, FITC	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus Cd49b, Klon DX5	Miltenyi Biotec
FITC anti-Maus CD3, Klon 17A2	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus IFN- γ , Klon XMG1.2	eBioscience, San Diego, CA, USA
FITC anti-Maus CD8a, Klon 53-6.7	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD3, Klon 17A2	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC anti-Maus CD62L, Klon MEL-14	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Hamster IgG1	BD, Heidelberg, Deutschland
FITC Ratte IgG2a	Caltag, Hamburg, Deutschland
FITC Ratte IgG2b	Caltag, Hamburg, Deutschland
PE anti-Maus CD62L, Klon MEL-14	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD178 (Fas-Ligand), Klon MFL3	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus IL-2, Klon JES6-5H4	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus Cd49b, Klon DX5	BD, Heidelberg, Deutschland
PE anti-Maus CD3, Klon 145-2C11	eBioscience, San Diego, CA, USA

PE Ratte IgG1	BD, Heidelberg, Deutschland
PE Ratte IgG2a	Caltag, Hamburg, Deutschland
PE Ratte IgG2b	Caltag, Hamburg, Deutschland
Purified Hamster anti-Maus CD3e, 10 µg /ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Purified NA/LE Hamster anti-Maus CD28, 5 µg/ ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Purified anti-Maus CD16/32 (Fc-Block), Klon FCR-4G8	Caltag, Towcester, UK

3.6 Software

BD FACSDiva software	BD Biosciences, CA, USA
CellQuest Pro 5.2	BD Biosciences, CA, USA
FlowJo v.7.61	Tree Star, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism 8	Graph Pad Software, CA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Corporation

3.7 Versuchstiere

Balb/c-Mäuse, Gewicht bei Lieferung 20-22g (entspricht einem Alter von ca. 10-12 Wochen) Futter und Wasser ad libitum, künstlicher Tag-/Nachtzyklus (12h/12h)	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
--	--

Die Haltung erfolgte gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes in den Tierställen der Universität Regensburg.

4 Methoden

4.1 Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Mäusemilz

Insgesamt zeigten Vorversuche, dass sich für die Zellisolationen Milzen weiblicher Balb/c-Mäuse sehr gut eignen. Isolationsversuche von DX5⁺NKT-Zellen aus Lebern dieses Mausstammes gestalteten sich als verhältnismäßig aufwändig bei sehr niedriger Zellausbeute.

Als Grundlage sämtlicher Zellisolierungen wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus den Milzen weiblicher Balb/c-Mäuse hergestellt (Gewicht zwischen 20 und 24 g, Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Dazu wurden die Mäuse mit CO₂ betäubt und anschließend durch Genickbruch getötet. Daraufhin wurde das Fell bzw. die Haut an der Entnahmestelle mit 70 %igem Isopropanol desinfiziert. Die Milz wurde entnommen und in ein 50 ml-Falcon mit MACS-Puffer gegeben. Die darauffolgenden Isolierungsarbeiten wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die Milz wurde zunächst fein zerkleinert auf ein 100 µm Zellsieb gegeben und mit einem 5 ml Spritzenstempel vorsichtig unter leichtem Druck ausgepresst. Hierbei war die Zellausbeute am Ende umso größer, je besser das Milzgewebe vor dem Auspressen zerkleinert wurde und je sanfter das Auspressen erfolgte. Währenddessen wurde das Sieb immer wieder mit MACS-Puffer gespült. Die filtrierte Suspension wurde für sechs Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Im weiteren Text wird dieser Schritt nur noch mit „zentrifugieren“ bezeichnet. Nach Absaugen des Überstandes wurde der Zellpellet zur Erythrozytenlyse in 3 ml ACK-Puffer pro verwendeter Milz resuspendiert und für drei Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von MACS-Puffer gestoppt, anschließend wurde wieder zentrifugiert. Der Zellpellet wurde dann in zwei mal 5 ml MACS-Puffer aufgenommen, über ein 30 µm Zellsieb gegeben und anschließend die Zellzahl bestimmt. Auf diese Weise ließen sich pro Milz ca. 100-200 x 10⁶ Zellen gewinnen.

4.2 Analyse der Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie

Alle isolierten Lymphozytenpopulationen wurden mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit überprüft. Dabei werden Zellen in Pufferlösung durch eine Kapillare angesaugt und passieren im Sensormodul einzeln einen Laserstrahl. Der Laserstrahl wird durch die Zellen teilweise gestreut, was mittels Photomultiplier detektiert wird. Die Menge des gestreuten Lichts hängt dabei von der Zellgröße und der Zellgranularität ab. FSC (Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht) ist dabei ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel, welche vom Zellvolumen abhängig ist. SSC (Sideward Scatter, Seitwärtsstreulicht) ist ein Maß für die Brechung des Lichts im rechten Winkel, welche abhängig von der Zellgranularität ist. Außer der Lichtstreuung lässt sich im FACS außerdem durch Fluoreszenzfarbstoffe emittiertes Licht in den mit FL-X (1,2,3, ...) bezeichneten Kanälen messen. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind bis auf wenige Ausnahmen an Antikörper gebunden, die sich gegen intrazelluläre oder extrazelluläre Antigene richten. Die gemessene Intensität der jeweiligen Fluoreszenz ist dabei proportional zur Anzahl der entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe.

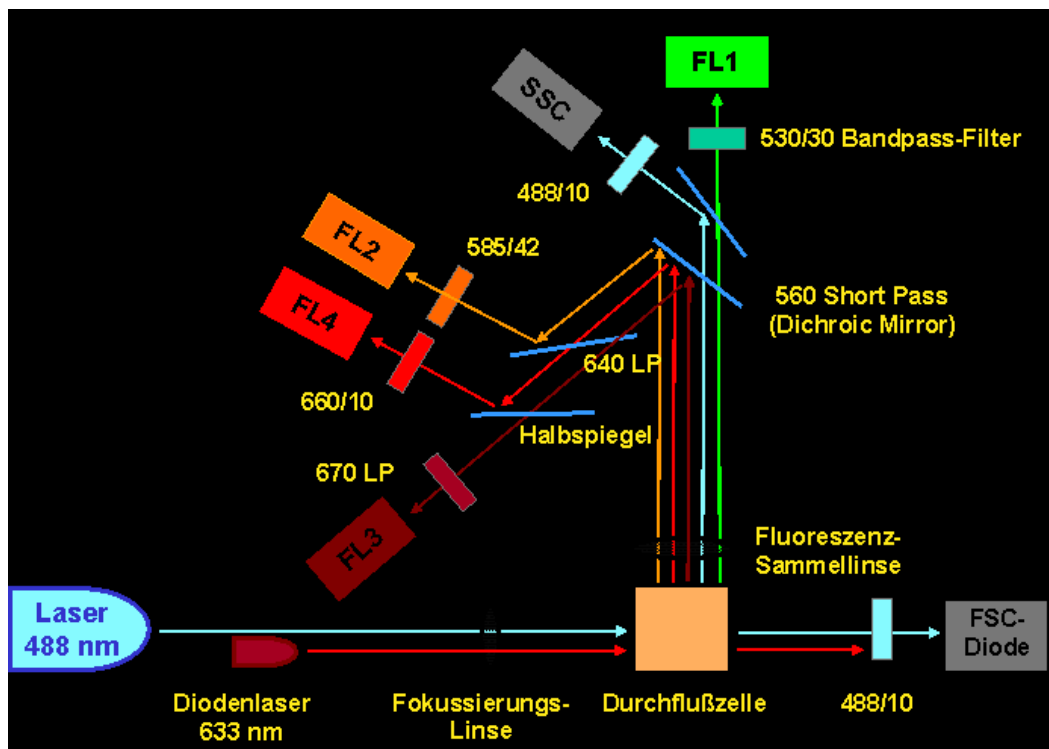


Abbildung 4-4: Schematischer Aufbau eines FACS-Gerätes

(<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytome1.gif>)

Das für diese Arbeit verwendete Gerät FACS-Calibur (BD, Heidelberg, Deutschland) ermöglicht neben der Analyse durch FSC und SSC auch die Verwendung von bis zu 4 verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen. Zur Negativkontrolle wurden Isotyp-Antikörper verwendet und dementsprechend die Gates bei der Auswertung der FACS-Bilder mit der FlowJo-Software gesetzt.

Zur Analyse wurden Zellaliquote von jeder Fraktion abgenommen, mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl MACS pro 1×10^5 Zellen aufgenommen und für zehn Minuten bei 4°C mit Fc-Block (0,2 µl / 100 µl) inkubiert. Dann wurden die Proben entweder mit den jeweiligen Antikörpern (10 µl working solution / 100 µl) oder den entsprechenden Isotypen (10 µl working solution / 100 µl) für 30 Minuten dunkel bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellen in

250 µl MACS-Puffer resuspendiert, um mit dem FACS-Calibur analysiert zu werden. Zur Auswertung der FACS-Daten wurde das Programm Flow-Jo verwendet.

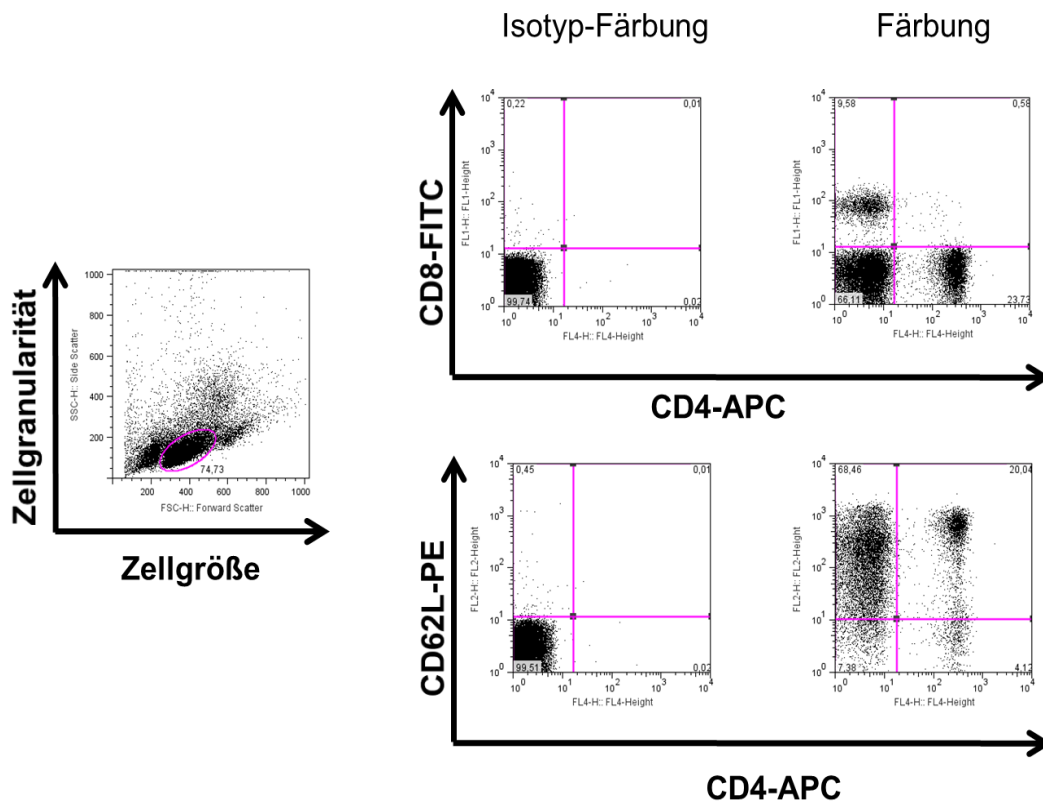


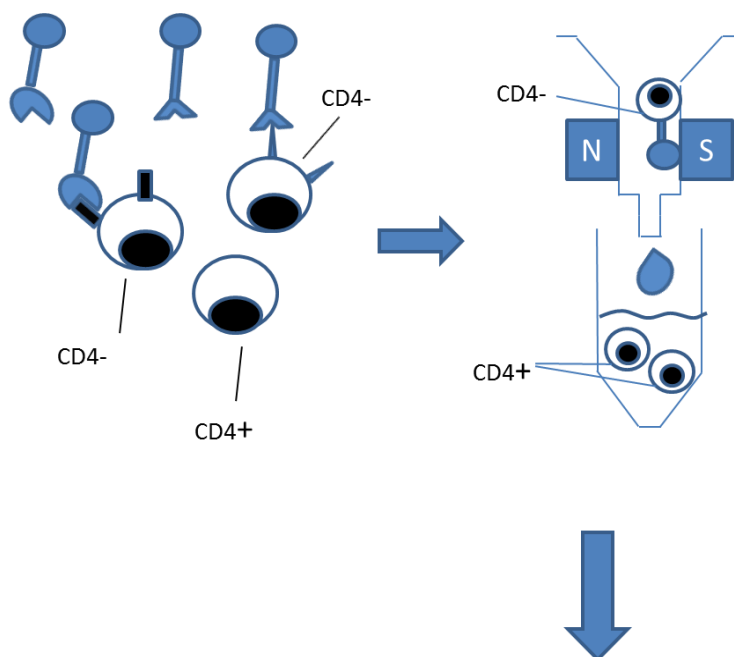
Abbildung 4-5: Beispiel für eine FACS-Analyse einer aus der Milz von Balb/c-Mäusen hergestellten Einzelzellsuspension.

Die Zellen wurden mit anti-CD8-FITC, anti-CD4-APC und anti-CD62L-PE gefärbt. Zunächst erfolgte die Identifikation von Lymphozyten anhand der typischen Darstellung von Zellgröße (FSC) und Zellgranularität (SSC). Innerhalb des Lymphozyten-Gates erfolgte die Identifikation und Differenzierung der CD4⁺- bzw. CD8⁺-Population. Die mittleren Schaubilder zeigen die Isotyp-Färbungen, anhand deren die Gates gesetzt wurden. Das obere rechte Schaubild zeigt im rechten unteren Quadranten alle CD4⁺-Zellen und im linken oberen Quadranten die CD8⁺-Zellen. Zellen im linken unteren Quadranten sind weder positiv für CD4 noch für CD8. Im rechten oberen Quadranten befinden sich Zellen, die sowohl für CD4, als auch für CD8 positiv sind. Das untere rechte Schaubild zeigt die Differenzierung der CD4⁺-Zellen in CD62L^{high}- bzw. CD62L^{low}-Zellen. Im rechten oberen Quadranten befinden sich die CD4⁺CD62L^{high}-Zellen, im rechten unteren Quadranten die CD62L^{low}-Zellen.

4.3 Aufreinigung verschiedener Lymphozytenpopulationen

4.3.1 Isolierung von $CD4^+CD62L_{low}$ - und $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen mittels magnetischer Zellseparierung (MACS)

Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde ein $CD4^+CD62L^+$ -Zellisolationsskit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) verwendet, bei dem die Zellen durch Magnetic activated cell sorting („MACS“) isoliert werden. Hierbei binden kleine Metallkügelchen („Beads“) spezifisch an bestimmte Oberflächenrezeptoren von Zellen. Anschließend werden die Zellen über eine Säule, die an einem Magneten befestigt ist, gegeben. Mit Beads beladene Zellen verbleiben in der Säule, nichtbeladene Zellen fließen hindurch. Im vorliegenden Fall werden in einem ersten Schritt $CD4^+$ -Lymphozyten durch eine Negativselektion gewonnen. Anschließend werden die Zellen durch eine $CD62L$ -Positivselektion in eine $CD62L_{high}$ - und eine $CD62L_{low}$ -Fraktion aufgetrennt.



Im ersten Schritt findet eine Negativselektion statt. Alle Zellen, die negativ für $CD4$ sind, werden mit Beads markiert und verbleiben in der LS-Säule. Die nicht markierten $CD4^+$ Zellen verbleiben nicht in der LS-Säule und befinden sich im Durchfluss.

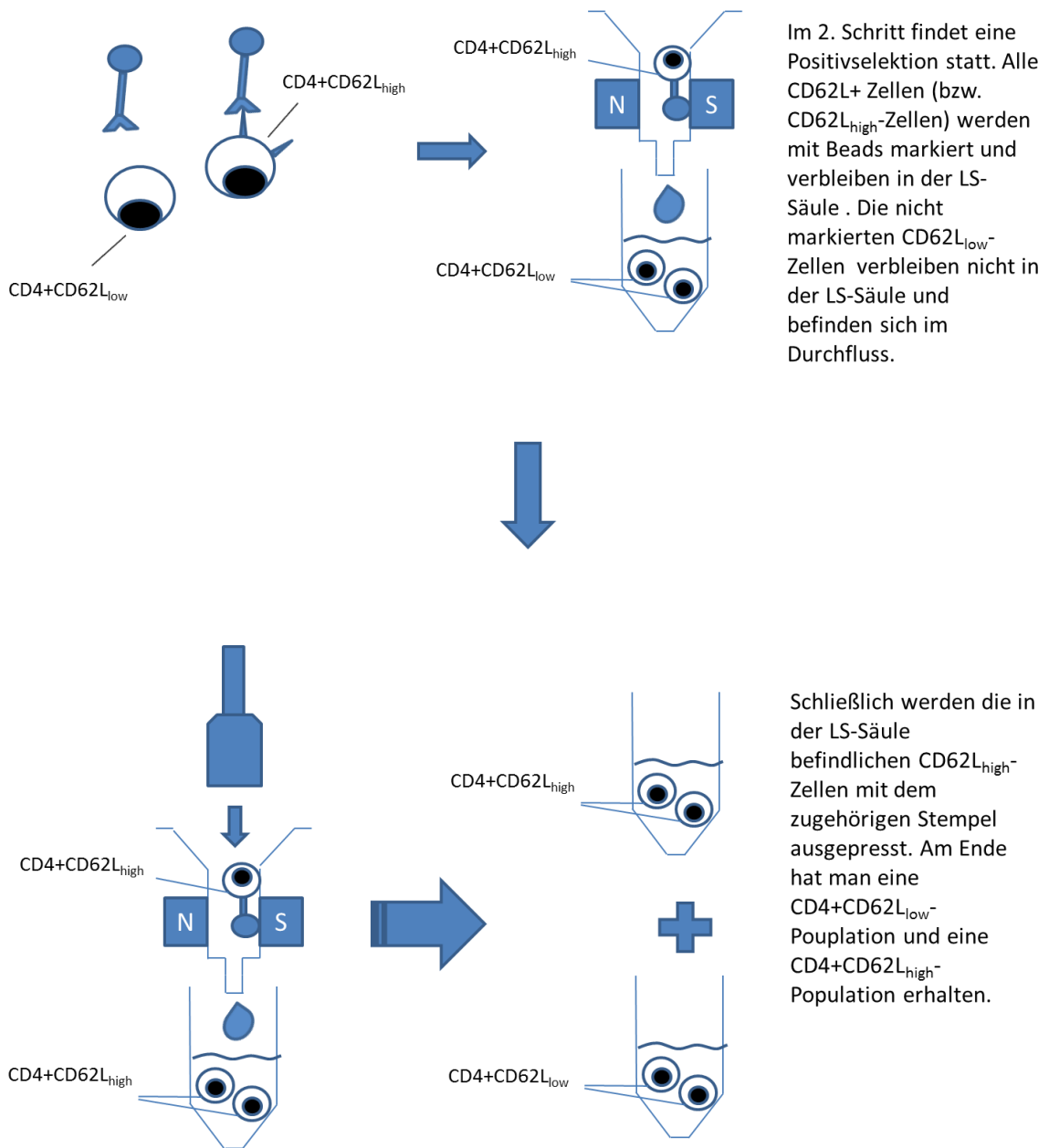


Abbildung 4-6: Prinzip der magnetischen Zellsortierung mit Negativselektion und anschließender Positivselektion am Beispiel der Isolierung von CD4⁺CD62_{low}-Zellen und CD4⁺CD62L_{high}-Zellen

Für die CD4⁺-Negativselektion wurde die Einzelzellsuspension nach Bestimmung der Zellzahl zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Zellpellet in 400 µl

MACS-Puffer pro 10^8 Zellen resuspendiert. Anschließend wurden 100 μ l Biotin-Antikörper-Cocktail pro 10^8 Zellen zugegeben. Dieser enthält Antikörper gegen mononukleäre Zellen, welche negativ für CD4 sind. Das sind in diesem Fall zytotoxische T-Zellen (CD8a/Ly-2), B-Zellen (CD45R/B220), NK-Zellen (CD49b/DX5), Monozyten/Granulozyten (CD11b/Mac-1), Erythrozyten (Ter-119), regulatorische T-Zellen (CD25) und γ/δ TZR⁺ T-Zellen (γ/δ TZR). Die Zellen wurden zehn Minuten bei 4°C mit dem Antikörpercocktail inkubiert, anschließend mit MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Zellpellet in 300 μ l MACS pro 10^8 Zellen resuspendiert und für 15 Minuten mit 200 μ l anti-Biotin-Microbeads pro 10^8 Zellen bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen, der Überstand verworfen und der Zellpellet in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde nun möglichst bläschenfrei über eine mit 3 ml MACS-Puffer vorgespülte und in einem MIDI-MACS-Magneten fixierte LS-Säule gegeben und dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gespült. Im Durchfluss befanden sich nun die gewünschten CD4⁺-Zellen. Für die weitere Isolierung wurden die CD4⁺-Zellen zentrifugiert und in 800 μ l MACS-Puffer pro 10^8 Ausgangszellen resuspendiert. Nach Zugabe von 200 μ l anti-CD62L-Microbeads pro 10^8 Ausgangszellen wurden die Zellen 15 Minuten bei 4°C inkubiert, anschließend gewaschen und zentrifugiert. Der Zellpellet wurde in 3 ml MACS-Puffer resuspendiert, über eine im Magneten fixierte LS-Säule gegeben und diese 4 Mal mit 3 ml-MACS-Puffer nachgespült. Im Durchfluss befanden sich daraufhin die CD4⁺CD62L_{low}-Zellen, in der Säule die CD4⁺CD62L_{high}-Zellen.

Aus einer Einzelzellsuspension mit ca. 150×10^6 Milzzellen konnten so etwa $4-9 \times 10^6$ CD4⁺CD62L_{Low}-Zellen und $10-20 \times 10^6$ CD4⁺CD62L_{high}-Zellen gewonnen werden, wobei sich das Verhältnis von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen zu CD4⁺CD62L_{low}-Zellen zwischen 3:1 und 2:1 bewegte. FACS-Analysen der Einzelzellsuspensionen vor Separierung ergaben einen Lymphozytenanteil von 55-72 %. Hiervon waren wiederum 18-33 % CD4⁺. Nach magnetischer Separierung waren in der CD4⁺CD62L_{low}-Fraktion 87-96 % der Zellen positiv für CD4 und negativ für CD62L. 1-11 % der Zellen waren positiv für CD4 und CD62L, allerdings mit niedriger Intensität der Fluoreszenz für CD62L. Das heißt, dass

diese Zellen CD62L in einer verhältnismäßig geringen Dichte exprimierten, so dass diese Zellen insgesamt als $CD4^+CD62L_{low}$ -Zellen bezeichnet wurden. In der Fraktion der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen waren 75-93 % positiv für CD4 und CD62L, 3-9 % waren positiv für CD4 und negativ für CD62L.

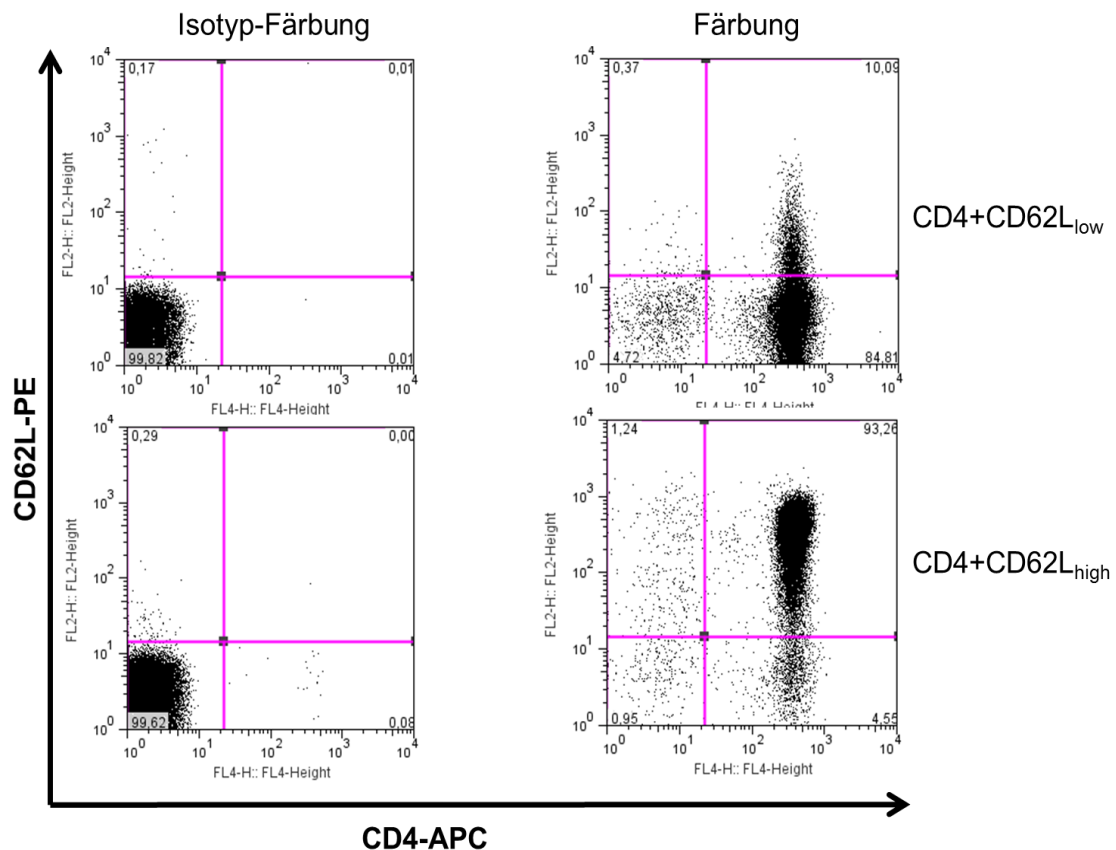


Abbildung 4-7: Repräsentative FACS-Dotplots nach Isolierung von $CD4^+CD62L_{low}$ -Zellen und von $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen.

Die Zellen wurden mit anti-CD4-APC und anti-CD62L-PE gefärbt. Links sind jeweils die Isotyp-Färbungen dargestellt, anhand derer das Gate gesetzt wurde. Im rechten oberen Quadranten sind die $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen zu finden, im rechten unteren Quadranten die $CD4^+CD62L_{low}$ -Zellen. Deutlich zeigt sich bei beiden Fraktionen eine Art „Schweif“, der sich in den oberen bzw. unteren rechten Quadranten zieht. Hieran zeigt sich, dass die Populationen sich nicht durch das absolute Vorhandensein von CD62L unterscheiden, sondern anhand dessen Dichte auf der Zelloberfläche.

4.3.2 MACS-Isolation von CD8⁺-Zellen

Das Prinzip der Isolation der CD8⁺-Zellen entsprach hier dem der Positivselektion von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen. Nach Zentrifugation einer Einzelzellsuspension und Verwerfen des Überstandes wurde der Zellpellet in 90 µl MACS-Puffer pro 10⁷ Zellen resuspendiert, 10 µl anti-CD8a-Microbeads pro 10⁷ Zellen zugegeben und 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, resuspendiert und über eine LS-Säule gegeben. In der Säulenfraktion befanden sich dann die gewünschten CD8⁺-Zellen. Innerhalb der Lymphozytenpopulation ergaben FACS-Analysen einen Anteil von CD8⁺-Zellen von 8-13 %. Nach Positivselektion durch MACS ergab sich eine Reinheit der CD8⁺-Zellen von 70-89 %. Aus 70 x 10⁶ Ausgangszellen konnten ca. 4-7 x 10⁶ CD8⁺-Zellen gewonnen werden.

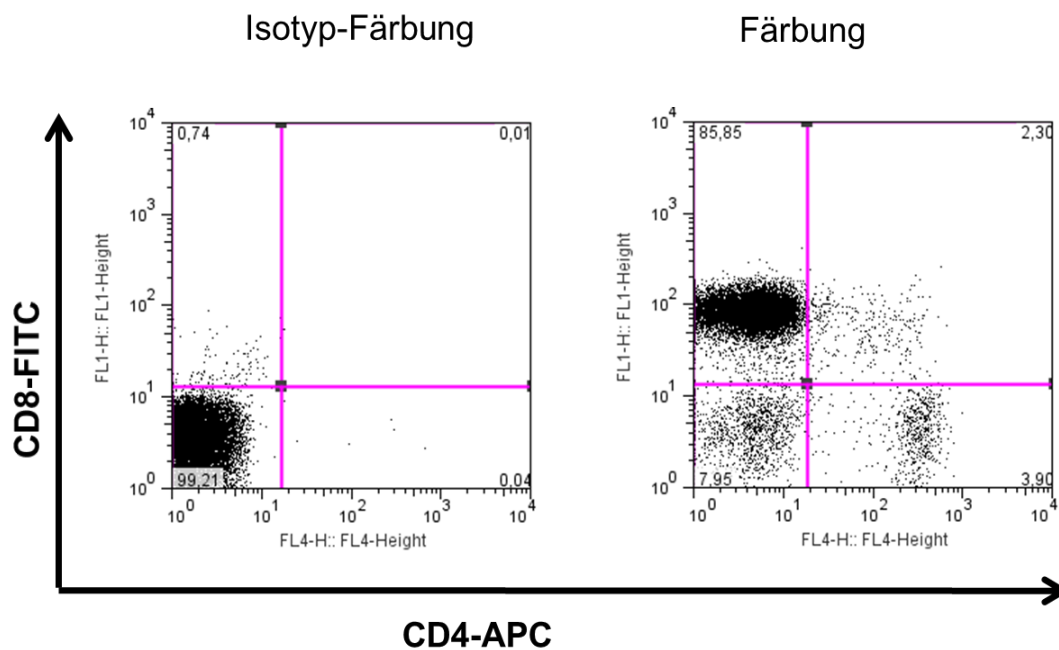


Abbildung 4-8: Repräsentative FACS-Dotplots einer Isolierung von CD8⁺-Zellen.

Die Zellen wurden mit anti-CD8-FITC und anti-CD4-APC gefärbt. Im linken Graph ist die Isotyp-Färbung dargestellt, anhand derer das Gate gesetzt wurde. Die CD8⁺-Zellen befinden sich im rechten Graphen im linken oberen Quadranten.

4.3.3 Isolation von DX5⁺NKT-Zellen mit MACS und FACS-Sorting

Um die Anzahl der Ausgangszellen für das FACS-Sorting zu verringern, wurde nach Herstellung einer Einzelzellsuspension zunächst eine MACS-Positivselektion für DX5⁺-Zellen durchgeführt. Hierauf folgte die Isolierung von DX5⁺NKT-Zellen mit Hilfe eines FACS-Sorters. Da eine Mäusemilz nur ca. 0,5-1,5 % DX5⁺NKT-Zellen enthält, war die Ausbeute bei hoher Reinheit insgesamt gering.

Die Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Zellpellet in 90 µl pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Nach Zugabe von 2 µl DX5-Microbeads pro 10⁶ Zellen wurde für 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen, resuspendiert und über eine LS-Säule gegeben. Bei Verwendung einer Zellsuspension aus mehreren Milzen wurde diese anteilig auf mehrere LS-Säulen verteilt (2-2,5 Milzen pro LS-Säule), da sonst die Säulenkapazität überschritten wurde. Die gewünschten DX5⁺-Zellen befanden sich nun in der Säule und konnten durch Auspressen der Säule gewonnen werden. Nach Bestimmung der Zellzahl und Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und der Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer ohne Na-Azid pro 4 x 10⁶ Zellen aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit anti-DX5- (1,5 µl / 100µl) und anti-CD3-Fluoreszenzfarbstoffen (1,5µl / 100µl) für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln gefärbt.

Die Verwendung des jeweilig konjugierten Fluoreszenzfarbstoffes richtete sich nach dem im Weiteren geplanten Versuchsaufbau. Im Hinblick auf die Ausbeute stellte sich die Kombination aus anti-CD3-Alexa647 und anti-DX5-Pe als optimal heraus. Nach Inkubation wurde mit FACS-Puffer ohne Na-Azid gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 800 µl FACS-Puffer ohne Na-Azid resuspendiert. Zur Vermeidung von kleinen Zellklümpchen wurden die Zellen durch ein 30 µm Zellsieb filtriert. Dann wurden die Zellen im FACS-Zellsorter anhand der Färbungen weiter aufgereinigt. Da der FACS-Sorter nur Zellen als positiv erkennt, an welche Fluoreszenzantikörper gebunden sind, ist bei den isolierten DX5⁺NKT-Zellen von einer Reinheit von nahezu 100 % auszugehen. Innerhalb der Lymphozytenpopulation einer Einzelzellsuspension aus der Milz gesunder BalbC-Mäuse betrug der Anteil an DX5⁺NKT-Zellen ca. 0,5-1,5 %. Die Zellausbeute nach dem FACS-Sorting betrug optimalerweise ca.

400.000 Zellen pro verwendeter Milz.

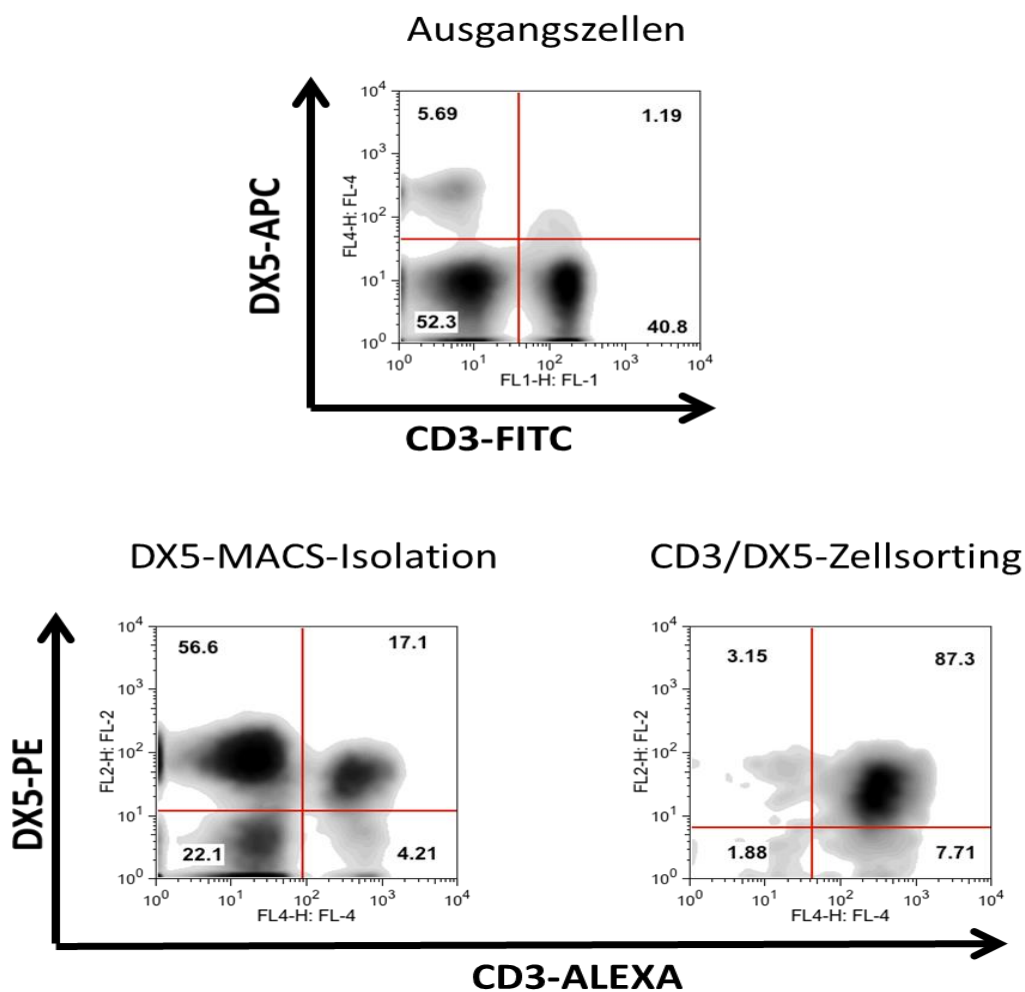


Abbildung 4-9: Repräsentative Density-Plots einer Isolierung von DX5⁺NKT-Zellen.

Die CD3⁺DX5⁺-Zellen (=DX5⁺NKT-Zellen) befinden sich jeweils im rechten oberen Quadranten. Das obere Bild zeigt eine mit anti-CD3-FITC und anti-DX5-APC gefärbte Einzelzellsuspension einer Milz. Der Anteil an DX5⁺NKT-Zellen lag in diesem Fall bei 1,19 %. Das linke untere Bild zeigt die Zellen nach einer DX5-Positivselektion mit MACS. Das untere rechte Bild zeigt schließlich die Zellen nach anschließendem FACS-Sorting mittels Färbung der DX5-Positivselektion mit anti-CD3-ALEXA647 und anti-DX5-PE.

4.4 Carboxyfluoreszein-Succinimidyl Ester (CFSE) -Proliferationsassay

Ein möglicher Einfluss der DX5⁺NKT-Zellen auf die Proliferation von CD4⁺CD62L^{high}-Zellen wurde mittels eines CFSE-Proliferationsassays untersucht. CFSE ist ein grün fluoreszierender Farbstoff, der sich im Zytoplasma der Zellen anreichert, dort enzymatisch umgesetzt wird und nicht mehr aus der Zelle gelangen kann. So lassen sich CFSE-vorgefärbte Zellen innerhalb einer Co-Kultur identifizieren. Weil CFSE an alle Proteine bindet, muss die Färbung in proteinfreiem PBS-Puffer stattfinden. Zunächst nehmen alle Zellen das CFSE gleichmäßig auf, sodass bei der FACS-Analyse ein einzelner Peak im Histogramm zu sehen ist. Kommt es nun zur Proliferation einer Zelle, wird das CFSE anteilig an die Tochterzellen weitergegeben. Es entsteht dadurch mit jeder Tochtergeneration einer Zelle ein neuer Peak im Histogramm.

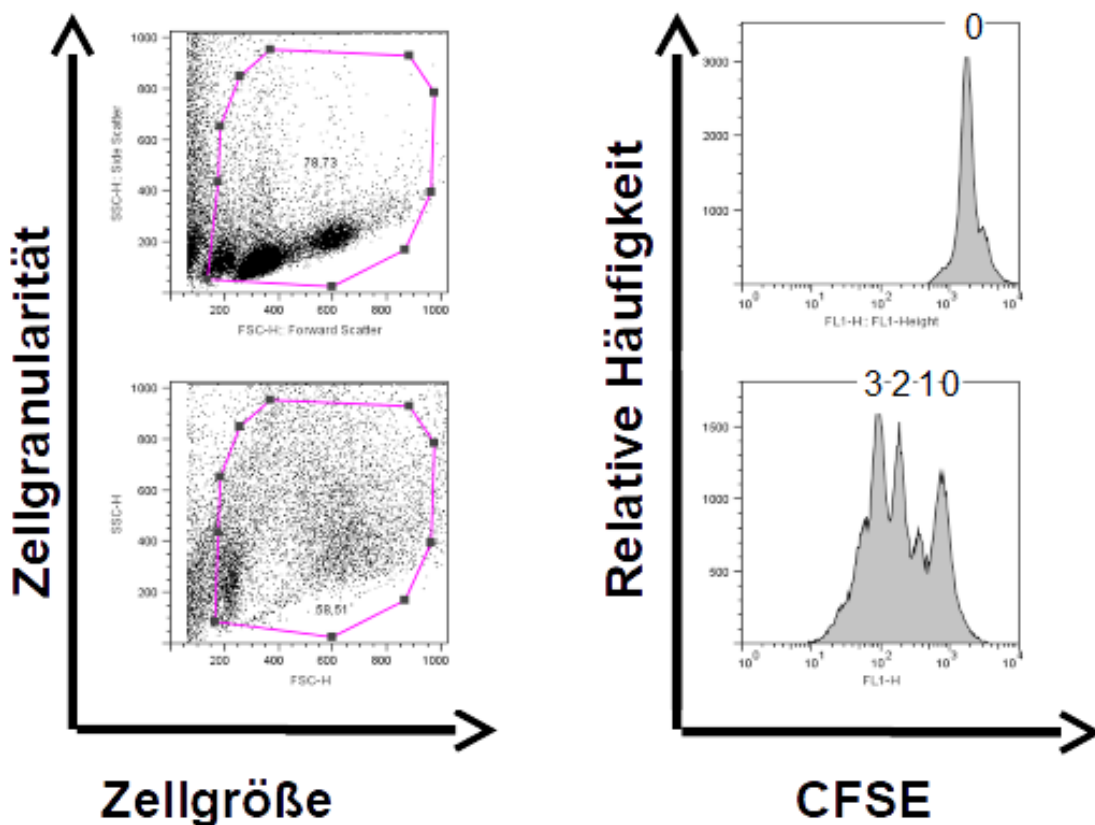


Abbildung 4-10: Repräsentative Dotplots bzw. Histogramme von mit CFSE-gefärbten $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen direkt nach Färbung (oben) und nach 6 Tagen Stimulation in Kultur.

Die Identifikation der lebenden Lymphozyten erfolgte in den links dargestellten Dotplots anhand von Zellgröße und Zellgranularität. Da sich beide Eigenschaften der Zellen durch die CFSE-Färbung und Teilungsvorgänge verändern, wurde das Lymphozyten-Gate großzügiger gesetzt. Rechts sind Histogramme der Lymphozytenpopulation zu sehen, wobei auf der X-Achse der FL-1-Kanal dargestellt ist. Er entspricht der Strahlungsintensität des CFSE in den Zellen. Im oberen Histogramm zeigt sich ein einheitliches Bild mit nur einem Peak. Hier kam es, direkt nach der Färbung, noch zu keinen Zellteilungen. Im unteren Bild lassen sich anhand der Peaks insgesamt 4 Generationen erkennen: 0 = ungeteilte Zellen, 1 = einfach geteilte Zellen, 2 = zweifach geteilte Zellen, 3 = dreifach geteilte Zellen.

Mit Hilfe der FlowJo-Software lässt sich außerdem ein Proliferationsindex berechnen, der die Anzahl an Teilungen, die jede sich teilende Zelle durchschnittlich erreicht, angibt.

4.4.1 CFSE-Färbung

Hierzu wurde das Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) verwendet. Dazu wurde das CFSE nach Herstellerangaben im mitgelieferten DMSO gelöst und anschließend mit PBS zu einer 1 μ M CFSE-Lösung verdünnt. Die Zellen wurden mit 10 ml PBS-Puffer gewaschen, zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Zellpellet in 1 ml PBS pro 10^7 Zellen resuspendiert. Dann wurden die Zellen 1:1 mit 1 μ M CFSE-Lösung vermischt und 15 Minuten in 37 °C warmem Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal mit 10 ml Medium gewaschen, in Medium resuspendiert und für weitere 60 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Zahl vitaler, gefärbter Zellen unter dem Intravitalmikroskop (Zeiss, Göttingen, 40 X Vergrößerung) bestimmt.

4.4.2 Ansetzen von Mono- und Co-Kulturen

Nach Abschluss der CFSE-Färbung wurden Mono- und Co-Kulturen angesetzt. Hierfür wurden CFSE-gefärbte CD4⁺CD62L_{low}- bzw. CD4⁺CD62L_{high}-Zellen im Verhältnis 5:1 zusammen mit DX5⁺NKT-Zellen bzw. zusammen mit CD8⁺-Zellen und als Mono-Kulturen für 10 Stunden, 48 Stunden, 96 Stunden und 144 Stunden inkubiert. Hierbei wurde ein konstantes Zell-Volumen-Verhältnis von 2×10^5 Zellen pro 150 μ l und pro Well einer 96well-Platte eingehalten.

4.4.3 Stimulation der Kulturen

Eine Hälfte der Kulturen wurde polyklonal stimuliert. Hierfür war zuvor die entsprechende Anzahl an Wells mit 10 μ g anti-CD3, gelöst in 100 μ l PBS, für mindestens drei Stunden bei 37 °C gecoatet worden. Anschließend wurden die Wells drei Mal mit PBS gewaschen. Nach Anlage der Kulturen wurde anti-CD28 (1 μ g/ml) und IL-2 (2000 U/ml) zugegeben.

Die Zellen wurden bei 37 °C für 10 Stunden, 48 Stunden, 96 Stunden und 144 Stunden im Brutschrank inkubiert, dann geerntet und gewaschen. Anschließend wurden die Proben mit

einem FACS-Calibur gemessen und die Proliferation mit Hilfe der FlowJo Software analysiert.

4.5 FACS-Analysen der Zytokin-Produktion in Co-Kultur und Mono-Kultur

Die Zytokin-Produktion der einzelnen Zellpopulationen wurde mittels intrazellulärer Färbungen für FACS untersucht. Hierbei kann nach Co-Kultur die Zytokin-Produktion durch Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen anhand von Oberflächenmarkern zelltypspezifisch bestimmt werden. Bei einer intrazellulären Färbung werden die Zellen fixiert, ihre Zellmembran permeabilisiert, und so die Bindung der verwendeten Antikörper an intrazelluläre Antigene ermöglicht. Nach Bindung verbleiben diese Antigen-Antikörper-Komplexe dann im Zellinneren und können mit einem FACS-Analysegerät detektiert werden.

Für die vorliegende Arbeit wurden zunächst Zellkulturen für vier Stunden und zehn Stunden Inkubationszeit mit einem konstanten Zell-Volumen-Verhältnis von 2×10^5 Zellen pro 150 μl angesetzt. Es wurden Mono-Kulturen von jeder Zellpopulation und jeweils Co-Kulturen von $\text{CD4}^+\text{CD62L}_{\text{low}}^-$ bzw. $\text{CD4}^+\text{CD62L}_{\text{high}}^-$ Zellen mit $\text{DX5}^+\text{NKT}$ -Zellen bzw. mit CD8^+ -Zellen im Verhältnis 1:1 angesetzt. Eine Hälfte der Kulturen wurde wie unter 4.43 beschrieben stimuliert. Zur zusätzlichen Stimulation der Zytokin-Produktion wurden vier Stunden vor Zellernte Ionomycin ($1\mu\text{g} / \text{ml}$) und PMA ($10 \text{ ng} / \text{ml}$) zugegeben. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zwei Stunden vor Zellernte wurde durch Zugabe von $1 \mu\text{l}$ GolgiPlug pro Well eine Exocytose der produzierten Zytokine verhindert.

4.5.1 Intrazelluläre FACS-Färbung der produzierten Zytokine

Hierzu wurde ein Foxp3 Staining Buffer Set (ebioscience, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden nach der Ernte mit MACS-Puffer gewaschen, in $100 \mu\text{l}$ MACS-Puffer je 1×10^5 Zellen resuspendiert und mit Fc-Block ($0,2 \mu\text{l} / 100 \mu\text{l}$) für zehn Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde gewaschen, zentrifugiert, der

Überstand restlos abgesaugt und der Zellpellet in 500 µl Fix/Perm-Lösung resuspendiert. Danach wurden die Zellen je nach Erntezeitpunkt eine Stunde oder über Nacht bei 4°C dunkel inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen, in 100 µl MACS-Puffer je 1×10^5 Zellen resuspendiert und jeweils eine Antikörperfärbung und eine Isotyp-Kontrolle hergestellt. Es wurden anti-IFN- γ -FITC (10 µl working solution / 100 µl) und anti-IL-2-Pe (10 µl working solution / 100 µl) eingesetzt. Nach Zugabe des jeweiligen Antikörpers wurde 30 Minuten dunkel bei 4°C inkubiert, jeweils einmal mit Permeabilisationspuffer und MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 100 µl MACS-Puffer je 1×10^5 Zellen resuspendiert. Proben aus Kulturen, die keine DX5⁺NKT-Zellen enthielten, wurden nun noch 30 Minuten dunkel bei 4°C mit einem Antikörper gegen CD4 bzw. CD8 inkubiert, um eine Unterscheidung der Zellpopulationen zu ermöglichen. Dann wurde nochmals gewaschen und in MACS-Puffer resuspendiert. Proben aus Kulturen mit DX5⁺NKT-Zellen wurden nicht weiter gefärbt, da die DX5⁺NKT-Zellen bereits zur Isolierung mittels FACS-Zellsorting gefärbt worden waren. Diese Färbung wurde dann zur Unterscheidung der Zellpopulationen bei der FACS-Analyse benutzt. Schließlich wurden die Zellen im FACS-Calibur gemessen.

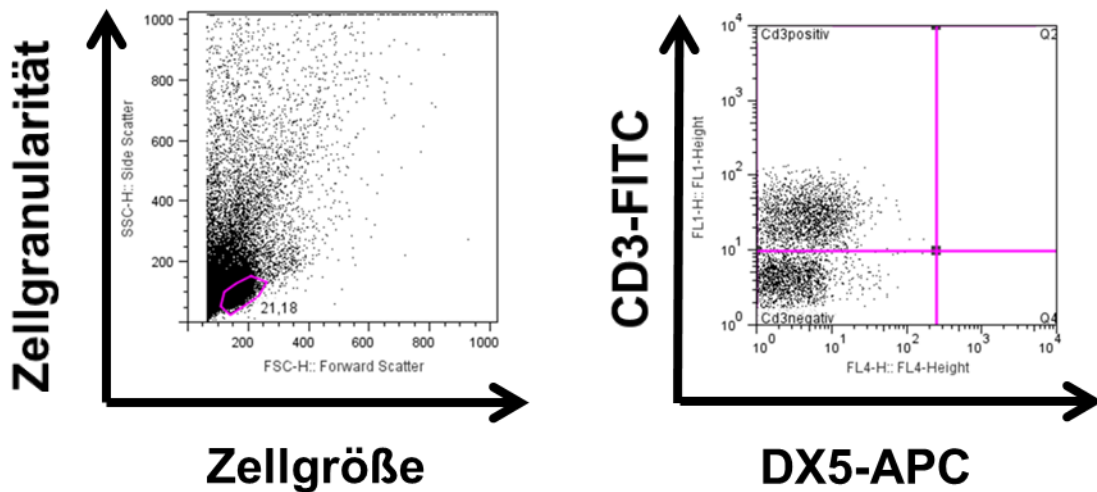


Abbildung 4-11: Darstellung repräsentativer Dotplots nach 4 Stunden Co-Kultur zwischen DX5⁺NKT-Zellen und CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und intrazellulärer FACS-Färbung von IL-2.

Die DX5⁺NKT-Zellen waren zur Isolation für den FACS-Sorter bereits vor Ansetzen der Co-Kulturen mit anti-CD3-FICT und anti-DX5-APC gefärbt worden. Nach den Co-Kulturen erfolgte keine weitere Färbung von Oberflächenmarkern der Zellen, sodass keine Oberflächenmarker der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen gefärbt waren. Im linken Schaubild ist die Identifikation der lebenden Lymphozyten anhand von Zellgranularität und Zellgröße dargestellt. Durch die Intrazelluläre Färbung nimmt die Zellgröße deutlich ab, sodass die Lymphozyten weiter links im Schaubild zu finden sind. Das rechte Schaubild zeigt die Identifikation der DX5⁺NKT-Zellen bzw. der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen anhand der für den FACS-Sorter angefertigten Färbung mit anti-CD3-FITC der DX5⁺NKT-Zellen. Im linken oberen Quadranten befinden sich die DX5⁺NKT-Zellen, im linken unteren Quadranten befinden sich die CD4⁺CD62L_{high}-Zellen. Deutlich zu erkennen ist ebenfalls, dass DX5 durch die DX5⁺-Zellen in der Kultur internalisiert wurde, hier ist die Fluoreszenz der DX5⁺NKT-Zellen nur noch sehr schwach ausgeprägt.

4.6 FACS-Analysen zur Expression von Fas-Ligand (FasL/CD95L)

Die Expression des Oberflächenrezeptors Fas-Ligand auf den jeweiligen Lymphozytenpopulationen unter verschiedenen Kulturbedingungen wurde mit Hilfe von FACS analysiert. Hierfür wurden zunächst Zellkulturen, wie unter 4.5 beschrieben, angesetzt und stimuliert. Es wurden jeweils Mono-Kulturen von DX5⁺NKT-Zellen und von CD8⁺-Zellen und Co-Kulturen beider Zelltypen mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen angesetzt. Die Zellen wurden für vier Stunden bzw. zehn Stunden bei 37 °C inkubiert, dann gewaschen, in 100 µl MACS-Puffer pro 1 x 10⁵ Zellen resuspendiert und mit Fc-Block (0,2 µl / 100 µl) zehn Minuten bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit anti-FasL-PE (10 µl working solution / 100 µl) bzw. dem entsprechenden Isotypen in gleicher Konzentration für 30 Minuten im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in MACS-Puffer resuspendiert und im FACS-Calibur gemessen. Auch hier wurde, wie unter 4.5.1 beschrieben, bei den entsprechenden Proben zur Unterscheidung der Zellpopulationen CD4 bzw. CD8 nachgefärbt. Eine Identifizierung der DX5⁺NKT-Zellen gelang wiederum über die Vorfärbung des FACS-Zellsortings. Schließlich wurden die Zellen im FACS gemessen.

4.7 Caspase-3-Nachweis in CD4⁺CD62L_{low}- und CD4⁺CD62L_{high}- Zellen

Eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität als früher Apoptosemarker wurde unter verschiedenen Kulturbedingungen mit Hilfe einer intrazellulären Färbung detektiert. Hierzu wurden Zellkulturen nach dem unter 4.4 beschriebenen Schema angelegt und 10 Stunden bzw. 48 Stunden inkubiert. Für Kulturen mit zehn Stunden Inkubationszeit war später wie bei den Versuchen zur Zytokin-Produktion eine Identifizierung der jeweiligen Zellpopulationen im FACS über die Vorfärbung der DX5⁺NKT-Zellen vom FACS-Zellsorting möglich. Für Kulturen mit 48 Stunden Inkubationszeit war der Einsatz CFSE-gefärbter CD4⁺CD62L_{low}- und CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nötig, da nach dieser Zeit eine Identifizierung über die Vorfärbung nicht mehr möglich war.

4.7.1 Intrazelluläre FACS-Färbung von Caspase-3

Hierzu wurde das FITC Active Caspase-3 Apoptosis Kit (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Zellen wurden nach Kultur gewaschen, in 100 µl MACS-Puffer pro 1×10^5 Zellen resuspendiert und mit FC-Block (0,2 µl / 100 µl) zehn Minuten bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand komplett abgesaugt. Dann wurden die Zellen in 350 µl Cytofix/Cytoperm-Lösung resuspendiert und 25 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisationspuffer gewaschen und in 100 µl Permeabilisationspuffer pro 100.000 Zellen resuspendiert. Dann wurde eine Färbung mit anti-Active-Caspase-3-FITC (nach Herstellerangabe immer 10 µl pro Probe bis zu 1×10^6 Zellen) und eine zugehörige Isotypkontrolle durchgeführt. Für Proben, die 48 Stunden inkubiert worden waren und CFSE-vorgefärbte Zellen enthielten, wurde anti-Active-Caspase-3-ALEXA 647 (nach Herstellerangabe jeweils 5 µl pro Probe bis zu 1×10^6 Zellen) verwendet (keine Überlagerung durch CFSE). Die Proben wurden 30 Minuten dunkel bei 4 °C inkubiert, anschließend mit Permeabilisationspuffer gewaschen, zentrifugiert und in MACS-Puffer resuspendiert. Wie unter Kapitel 4.5.1 beschrieben, wurden Proben entsprechender Kulturen noch auf CD4 bzw. CD8 gefärbt, um die entsprechenden Zellpopulationen im FACS identifizieren zu können. Schließlich wurden die Proben im FACS-Calibur gemessen.

4.7.2 Blockierung von Fas-Ligand

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Fas-Ligand-Expression von DX5⁺NKT-Zellen und einer Steigerung der Caspase-3-Aktivität in CD4⁺CD62L_{high}-Zellen zu untersuchen, wurde Fas-Ligand mit Hilfe eines Antikörpers blockiert. Dazu wurden zunächst DX5⁺NKT-Zellen mit dem anti-FasL-Antikörper (50µg/ml) für eine Stunde bei Raumtemperatur prä-inkubiert. Dann wurden die CFSE-gefärbten CD4⁺CD62L_{high}-Zellen zur Kultur zugegeben und die Kulturen stimuliert. Zur Kontrolle von unspezifischen Reaktionen des Blockade-Antikörpers wurde der zugehörige Isotyp-Antikörper verwendet.

Außerdem wurden Co-Kulturen ohne Zugabe von Isotyp und Blockade-Antikörper angelegt. Zudem wurden CD4⁺CD62L^{high}-Mono-Kulturen angelegt, jeweils mit und ohne Blockade-Antikörper. Nach Stimulation der Kulturen wurden diese 48 Stunden im Brutschrank inkubiert und anschließend geerntet. Die Zellen wurden dann, wie unter 4.7.1 beschrieben, intrazellulär auf Caspase-3 gefärbt.

4.8 Datenanalyse

Die Angabe aller ermittelten und statistisch analysierten Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten wurden mittels Mann-Whitney Test für unabhängige Stichproben ermittelt. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ eingestuft. Sämtliche Berechnungen wurden mit der Software GraphPad Prism (Graph Pad Software, CA, USA) durchgeführt. Bei signifikanten Graphen wurden die p-Werte direkt in den Abbildungen angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss von DX5⁺NKT-Zellen auf die Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}- Zellen

Um einen möglichen proliferationshemmenden Effekt von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen zu untersuchen, wurde die Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Mono-Kultur mit deren Proliferation in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen verglichen.

In Abbildung 5-12 sind repräsentative Histogramme der Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Mono-Kultur sowie in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen dargestellt. Co-Kulturen von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen mit CD8⁺-Zellen dienten als Kontrollen. Die Proliferation wurde jeweils nach 10 h, 48 h, 96 h und 144 h Inkubationszeit untersucht. Die Histogramme zeigen, dass CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nach 48 h bereits leicht proliferieren und die Proliferation zwischen 48 h und 96 h ihren Höhepunkt erreicht. Zwischen 96 h und 144 h nimmt die Proliferation wieder ab. Des Weiteren zeigen die Versuche, dass die Proliferation der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen deutlich gehemmt wird. In Co-Kultur mit CD8⁺-Zellen zeigt sich ebenfalls eine Hemmung der Proliferation, jedoch nicht so deutlich wie in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen.

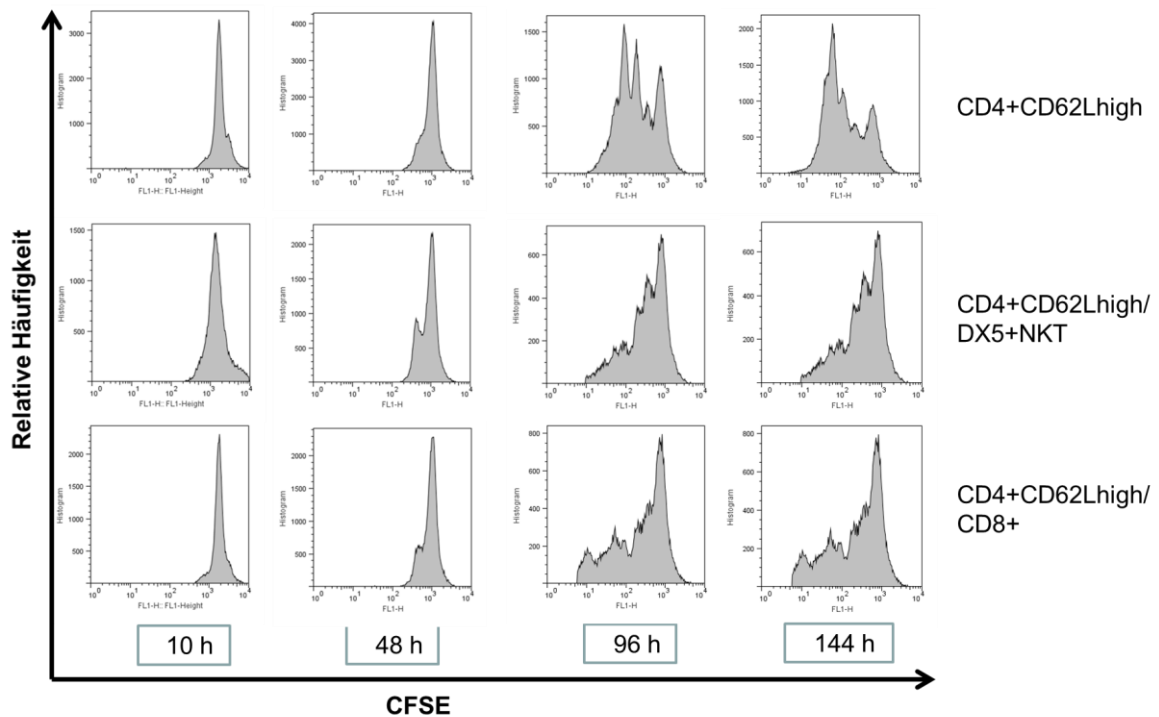


Abbildung 5-12: Repräsentative Histogramme der Proliferation CFSE-gefärbter $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen nach 10 Stunden, 48 Stunden, 96 Stunden und 144 Stunden Mono- und Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen bzw. mit $CD8^+$ -Zellen.

Man erkennt deutlich das unterschiedliche Teilungsverhalten der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen in Mono- und Co-Kultur.

Exaktere, statistisch vergleichbare Daten lässt der durch die FlowJo Software errechnete Proliferationsindex (Proliferationsindex = Anzahl an Teilungen, die jede sich teilende Zelle durchschnittlich erreicht hat) der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen zu. Er betrug nach zehn Stunden in allen drei Kulturen 1. Es fanden also nach zehn Stunden noch keine Zellteilungen statt. Nach 48 Stunden betrug er in der Mono-Kultur 1-1,29 gegenüber 1-1,15 in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen, sowie 1-1,14 in Co-Kultur mit $CD8^+$ -Zellen. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen. Nach 96 Stunden betrug der Proliferationsindex in Mono-Kultur 1,55-2,13 gegenüber 1,17-1,53 in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen und 1,23-1,69 in Co-Kultur mit $CD8^+$ -Zellen. Hier gab es einen

signifikanten Unterschied zwischen Mono-Kultur und Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen (p=0.0079). Der Unterschied der Proliferationsindices von CD4⁺CD62L^{high}-Zellen in Monokultur und in Co-Kultur mit CD8⁺-Zellen war dagegen nicht signifikant. Nach 144 Stunden betrug der Proliferationsindex in Mono-Kultur 1,56- 2,23 gegenüber 1,18-1,99 in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen und 1,16-1,95 in Co-Kultur mit CD8⁺-Zellen. Hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kulturen. Die verschiedenen Proliferationsindices nach 96 Stunden sind in Abbildung 5-14 vergleichend dargestellt.

Um zu zeigen, dass die Proliferationshemmung von DX5⁺NKT-Zellen spezifisch für CD4⁺CD62L^{high}-Zellen ist, wurde die Proliferation von CD4⁺CD62L^{low}-Zellen in Mono-Kultur mit der Proliferation in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen bzw. CD8⁺-Zellen verglichen. In Abbildung 5-13 sind repräsentative Histogramme dargestellt, die die Proliferation der CD4⁺CD62L^{low}-Zellen in den drei verschiedenen Kulturen beispielhaft nach 96 h zeigen. Wie erwartet proliferieren CD4⁺CD62L^{low}-Zellen, die bereits weiter gereifte CD4⁺-Zellen darstellen, sowohl in Mono-Kultur als auch in den Co-Kulturen kaum. Unterschiede in der Proliferation zwischen den Kulturen lassen sich nicht erkennen.

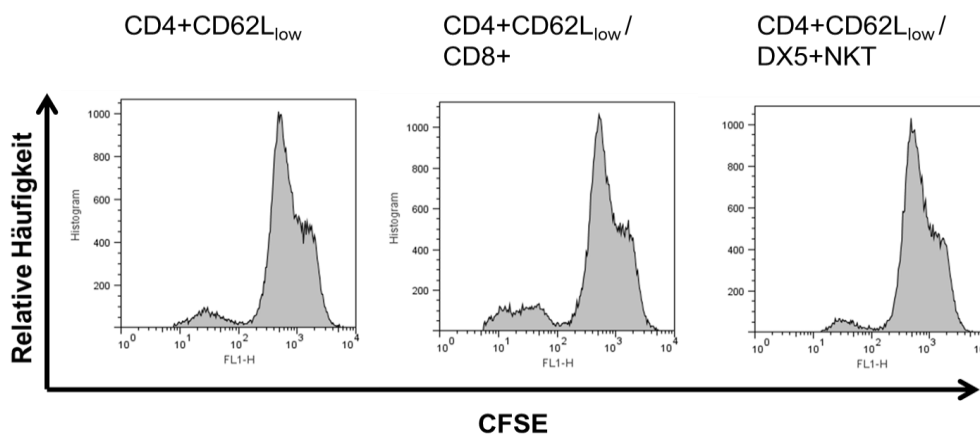


Abbildung 5-13: Proliferation von CD4⁺CD62L_{low}-Zellen in Mono-Kultur sowie in Co-Kultur mit CD8⁺-Zellen bzw. DX5⁺NKT-Zellen nach 96 Stunden Stimulation.

Unterschiede in der Proliferation der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen zwischen den unterschiedlichen Kulturen lassen sich nicht erkennen.

Auch die Proliferationsindices der $CD4^+CD62L_{low}$ -Zellen wurden berechnet. Nach 10 h betrug der Proliferationsindex in allen drei Kulturen 1. Nach 48 h betrug er in Mono-Kultur 1-1,05 im Vergleich zu 1-1,03 in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen und 1-1,23 in Co-Kultur mit $CD8^+$ -Zellen. Zwischen den einzelnen Kulturen gab es keine signifikanten Unterschiede. Nach 96 Stunden betrug der Proliferationsindex in Mono-Kultur 1-1,24 im Vergleich zu 1-1,28 in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen und 1,15-1,42 in Co-Kultur mit $CD8^+$ -Zellen. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede. Nach 144 Stunden betrug der Proliferationsindex in Mono-Kultur 1,07-1,48 im Vergleich zu 1,1,5-1,42 in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen und nach 48 Stunden bei 1-1,03, nach 96 Stunden bei 1-1,28 und 1,26-1,49 in Co-Kultur mit $CD8^+$ -Zellen. Auch hier gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen.

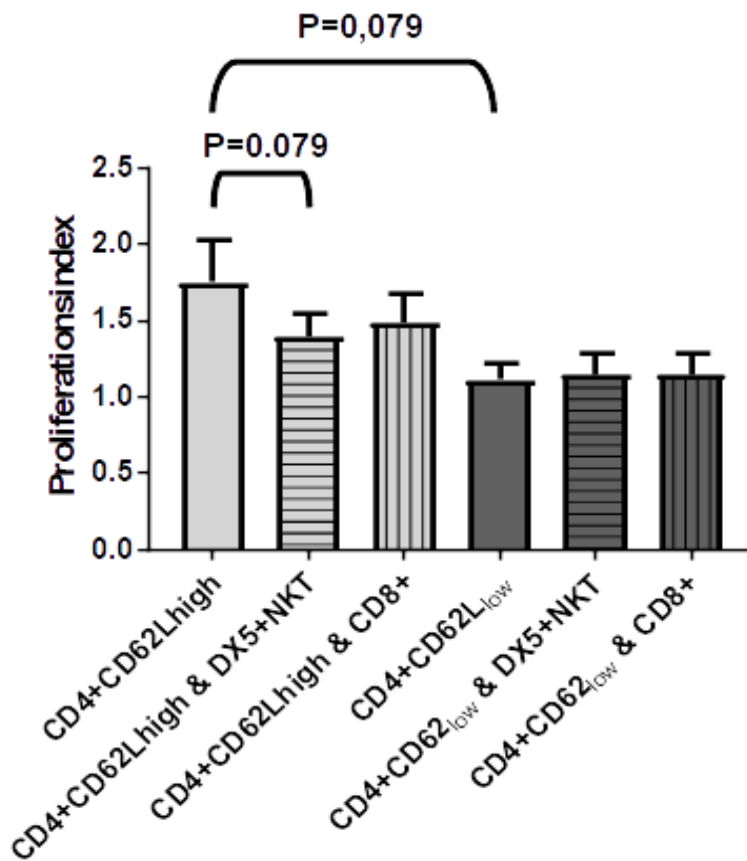


Abbildung 5-14: Proliferationsindices von $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $CD4^+CD62L_{low}$ -Zellen jeweils in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit $DX5^+$ -Zellen bzw. $CD8^+$ -Zellen nach 96 h.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen im Gegensatz zu $CD4^+CD62L_{low}$ -Zellen in Mono-Kultur deutlich proliferieren. Bereits nach 48 h zeigt sich eine leichte Proliferation, welche zwischen 48 h und 96 h deutlich zunimmt und zwischen 96 h und 144 h wieder abnimmt. Die Proliferation der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen wird durch die Anwesenheit von $DX5^+NKT$ -Zellen zum Zeitpunkt der stärksten gemessenen Proliferation, nämlich nach 96 Stunden, signifikant gehemmt. Zu früheren oder späteren Zeitpunkten ließ sich keine signifikante Hemmung der Proliferation feststellen. Die Anwesenheit von $CD8^+$ -Zellen führte zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten

Hemmung der Proliferation der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen.

5.2 Zytokinausschüttung nach Stimulation in Mono- und Co-Kultur

Verschiedene Zytokine können Einfluss auf Proliferation und Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen nehmen. Deshalb wurden mögliche Veränderungen in der Zytokin-Produktion in Co-Kulturen zwischen CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und DX5⁺NKT-Zellen gegenüber deren jeweiligen Mono-Kulturen untersucht.

IL-2 gilt als essentiell für die Proliferation und Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen¹³³. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob die Hemmung der Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen durch DX5⁺NKT-Zellen auf einer Verringerung der IL-2-Produktion in Co-Kultur gegenüber den jeweiligen Mono-Kulturen beruhen könnte.

Nach vier Stunden Mono-Kultur waren $0,7 \pm 0,42$ % der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen, und $18,7 \pm 6,98$ der DX5⁺NKT-Zellen gegenüber $0,8 \pm 0,2$ % der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und $14,7 \pm 14,26$ % der DX5⁺NKT –Zellen in Co-Kultur positiv für IL.-2. Nach zehn Stunden Mono-Kultur waren es $1,8 \pm 1,99$ % der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und $2,4 \pm 1,75$ % der DX5⁺NKT-Zellen gegenüber $3,2 \pm 1,72$ % der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und $6,3 \pm 0,74$ % der DX5⁺NKT-Zellen in Co-Kultur. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zytokin-Produktion in Co-Kultur und den jeweiligen Mono-Kulturen. (jeweils n=3)

Auch hier wurden wieder CD8⁺-Zellen als Kontrollzellen für DX5⁺NKT-Zellen eingesetzt. Nach 4 Stunden waren in den Co-Kulturen zwischen CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und CD8⁺-Zellen $0,6 \pm 0,56$ % der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und $0,1 \pm 0,06$ % der CD8⁺-Zellen positiv für IL-2. Nach zehn Stunden waren es $0,7 \pm 1,25$ % der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und $0,5 \pm 0,67$ % der CD8⁺-Zellen. Demgegenüber waren in Mono-Kultur nach 4 Stunden $1,8 \pm 1,83$ % und nach 10 Stunden $2,7 \pm 5,72$ % der CD8⁺-Zellen positiv für IL-2. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Zytokin-Produktion in Co-Kultur zwischen CD4⁺CD62L_{high}-Zellen und CD8⁺-Zellen gegenüber deren Mono-Kulturen. (jeweils n= 3)

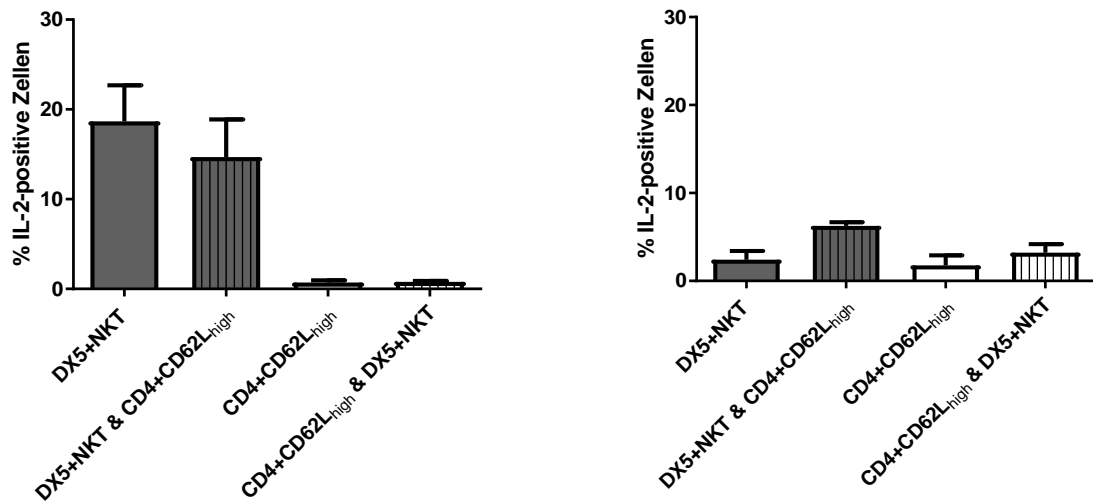


Abbildung 5-15: prozentuale Anteile IL-2-produzierender DX5⁺-Zellen und CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in deren Mono- und Co-Kulturen

Im linken Graph sind die Werte nach 4 Stunden, im rechten Graph nach 10 Stunden Stimulation in den jeweiligen Kulturen dargestellt. Die Werte der Co-Kulturen sind jeweils für den erstgenannten Zelltyp dargestellt.

Als Kontroll-Zellen für CD4⁺CD62L_{high}-Zellen wurden wieder CD4⁺CD62L_{low}-Zellen eingesetzt. In Mono-Kultur waren nach vier Stunden $11,1 \pm 7,96$ % und nach zehn Stunden $4,1 \pm 5,06$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen positiv für IL-2. In Co-Kulturen mit DX5⁺NKT-Zellen waren nach vier Stunden $6 \pm 2,12$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und $18,9 \pm 10,93$ der DX5⁺NKT-Zellen positiv für IL-2. Nach zehn Stunden waren es $8 \pm 5,5$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und $8,6 \pm 5,29$ der DX5⁺NKT-Zellen. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Zytokin-Produktion von CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und DX5⁺NKT-zellen zwischen Co-Kultur und den jeweiligen Mono-Kulturen. (jeweils n=3)

In Co-Kultur mit CD8⁺-Zellen waren nach vier Stunden $12,1 \pm 1$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und $0,6 \pm 0,99$ % der CD8⁺-Zellen positiv für IL-2. Nach zehn Stunden waren es $2,5 \pm 3,44$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und $0,1 \pm 0,15$ der CD8⁺-Zellen. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Zytokin-Produktion von CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und

CD8⁺-Zellen zwischen Co-Kultur und den jeweiligen Mono-Kulturen. (jeweils n=3)

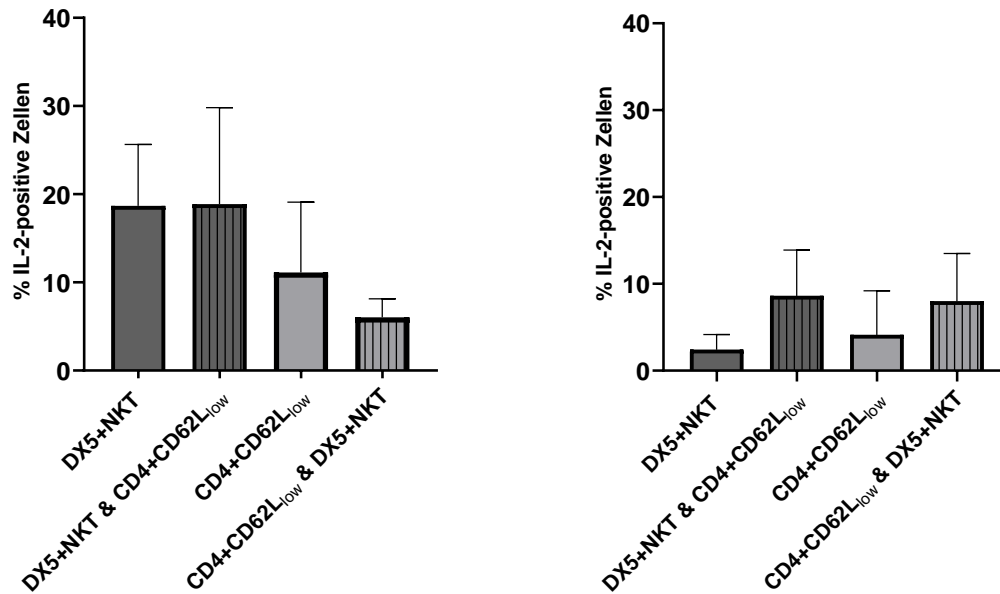


Abbildung 5-16: Prozentuale Anteile IL-2-produzierender DX5⁺-Zellen und CD4⁺CD62L_{low}-Zellen in den verschiedenen Mono- und Co-Kulturen.

Im linken Graph sind die Werte nach 4 Stunden, im rechten Graph nach 10 Stunden Stimulation in Kultur dargestellt. Die Werte der Co-Kulturen sind jeweils für den erstgenannten Zelltyp dargestellt.

Nachdem keine signifikanten Veränderungen der IL-2-Produktion von DX5⁺NKT-Zellen und CD4⁺CD62L_{high}-Zellen zwischen deren Co-Kulturen und Mono-Kulturen festgestellt werden konnten, wurde eine mögliche gegenseitige Einflussnahme auf die Produktion von IFN- γ untersucht. IFN- γ hemmt die Proliferation und Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen in Th₂-Zellen ¹³⁴. Außerdem kann IFN- γ proliferationshemmend durch Induktion eines Fas/FasL-abhängigen Mechanismus wirken ¹³⁵.

Nach vier Stunden Stimulation in Mono-Kultur waren im Mittel $2,72 \pm 0,08$ % der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen, und $28,52 \pm 1,62$ % der DX5⁺NKT-Zellen positiv für IFN- γ . Nach

vier Stunden Co-Kultur waren es demgegenüber $3,26 \pm 1,19$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $26,56 \pm 2,13$ % der $DX5^+NKT$ -Zellen. Nach zehn Stunden Stimulation waren $2,10 \pm 1,46$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $18,45 \pm 3,29$ % der $DX5^+NKT$ -Zellen in Mono-Kultur gegenüber $0,41 \pm 0,38$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $16,73 \pm 9,75$ % der $DX5^+NKT$ -Zellen in Co-Kultur positiv für $IFN-\gamma$. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der $IFN-\gamma$ -Produktion von $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $DX5^+NKT$ -Zellen zwischen Co-Kulturen und den jeweiligen Mono-Kulturen. (jeweils $n=3$)

In Mono-Kultur waren nach vier Stunden Stimulation $31,71 \pm 1,19$ % und nach zehn Stunden Stimulation $30,13 \pm 6,69$ % der $CD8^+$ -Zellen positiv für $IFN-\gamma$. In Co-Kultur zwischen $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $CD8^+$ -Zellen waren nach vier Stunden Stimulation $1,18 \pm 1,70$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $28,87 \pm 3,63$ % der $CD8^+$ -Zellen und nach zehn Stunden Stimulation $1,96 \pm 1,96$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $20,2 \pm 9,9$ % der $CD8^+$ -Zellen positiv für $IFN-\gamma$. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Zytokin-Produktion von $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $CD8^+$ -Zellen zwischen Co-Kultur und den jeweiligen Mono-Kulturen. (jeweils $n=3$)

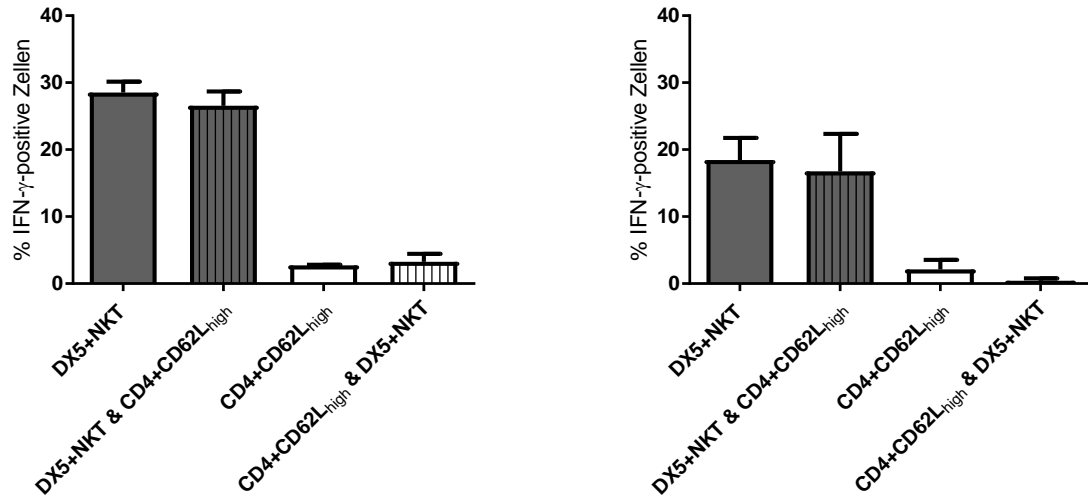


Abbildung 5-17: Prozentuale Anteile IFN- γ -produzierender DX5⁺-Zellen und CD4⁺CD62L^{high}-Zellen in den verschiedenen Mono- und Co-Kulturen.

Im linken Graph sind die Werte nach 4 Stunden, im rechten Graph nach 10 Stunden Stimulation in Kultur dargestellt. Die Werte der Co-Kulturen sind jeweils für den erstgenannten Zelltyp dargestellt.

CD4⁺CD62L_{low}-Zellen waren in Mono-Kultur nach vier Stunden Stimulation zu $33,67 \pm 1,18$ % und nach zehn Stunden Stimulation zu $22,70 \pm 7,61$ % positiv für IFN- γ . Nach vier Stunden Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und DX5⁺NKT-Zellen waren $26,10 \pm 2,84$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und $27,54 \pm 1,67$ % der DX5⁺NKT-Zellen positiv für IFN- γ . Nach zehn Stunden Co-Kultur waren es $30,65 \pm 3,21$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und $22,81 \pm 3,21$ der DX5⁺NKT-Zellen. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Zytokin-Produktion von CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und DX5⁺NKT-Zellen zwischen Co-Kultur und den jeweiligen Mono-Kulturen. (jeweils n=3)

Nach vier Stunden Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und CD8⁺-Zellen waren $30,54 \pm 3,49$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und $31,83 \pm 3,64$ % der CD8⁺-Zellen positiv für IFN- γ . Nach zehn Stunden Co-Kultur waren es $33,92 \pm 1,61$ % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und

32,44 ± 7,68 % der CD8⁺-Zellen. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Zytokin-Produktion von CD4⁺CD62L_{low}-Zellen und CD8⁺-Zellen zwischen Co-Kultur und den jeweiligen Mono-Kulturen. (alle Versuche jeweils n= 3).

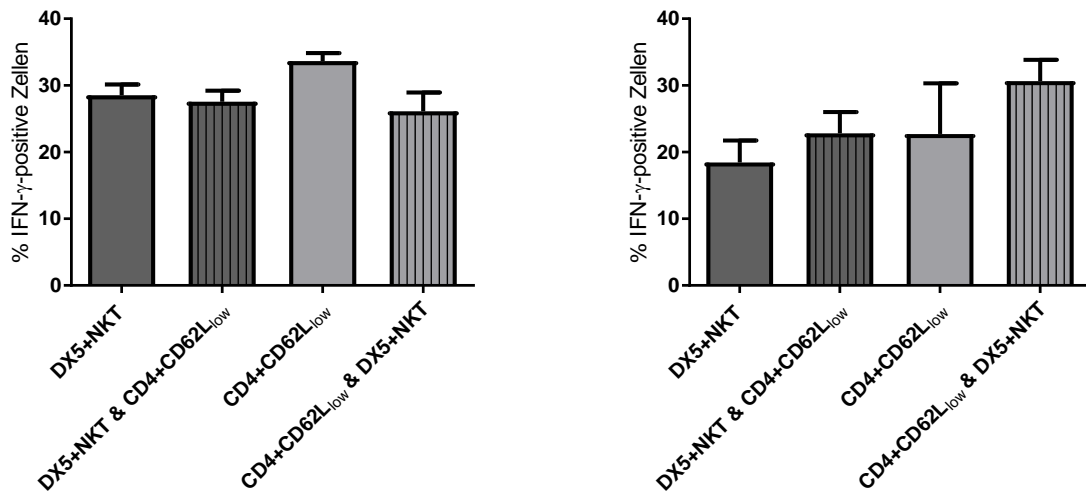


Abbildung 5-18: Prozentualen Anteile IFN- γ -produzierender DX5⁺-Zellen und CD4⁺CD62L_{low}-Zelle in den verschiedenen Mono- und Co-Kulturen.

Im linken Graph sind die Werte nach 4 Stunden, im rechten Graph nach 10 Stunden Stimulation in Kultur dargestellt. Die Werte der Co-Kulturen sind jeweils für den erstgenannten Zelltyp dargestellt.

5.3 Steigerung der Caspase-3-Aktivität in CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nach Co-Kultur

Nachdem keine signifikanten Veränderungen in der Zytokin-Produktion von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen oder DX5⁺NKT-Zellen in deren Co-Kulturen gegenüber den jeweiligen Mono-Kulturen festgestellt werden konnten, wurde untersucht, ob die proliferationshemmende Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen durch einen pro-apoptischen Mechanismus zustande kommen könnte. Dazu wurde eine mögliche Steigerung der Caspase-3-Aktivität in CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen gegenüber einer Mono-Kultur von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen untersucht. Als Kontrollzellen für DX5⁺NKT-Zellen wurden wiederum CD8⁺-Zellen eingesetzt.

In Mono-Kultur waren nach zehn Stunden Stimulation $3,90 \pm 1,34$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen gegenüber $4,34 \pm 0,76$ % in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen und $2,21 \pm 0,61$ % in Co-Kultur mit $CD8^+$ -Zellen positiv für Caspase-3. Nach 48 Stunden waren es in der Mono-Kultur $27,78 \pm 2,71$ % gegenüber $38,13 \pm 3,16$ % in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen und $32,76 \pm 3,83$ % in Co-Kultur mit $CD8^+$ -Zellen. Nach zehn Stunden gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen. Nach 48 Stunden war der Unterschied zwischen Mono-Kultur und Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen signifikant. ($p=0,0411$, jeweils $n \geq 3$) In Anwesenheit von $DX5^+NKT$ -Zellen kam es also nach 48 Stunden Co-Kultur zu einer signifikanten Steigerung der Aktivität von Caspase-3 in $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen.

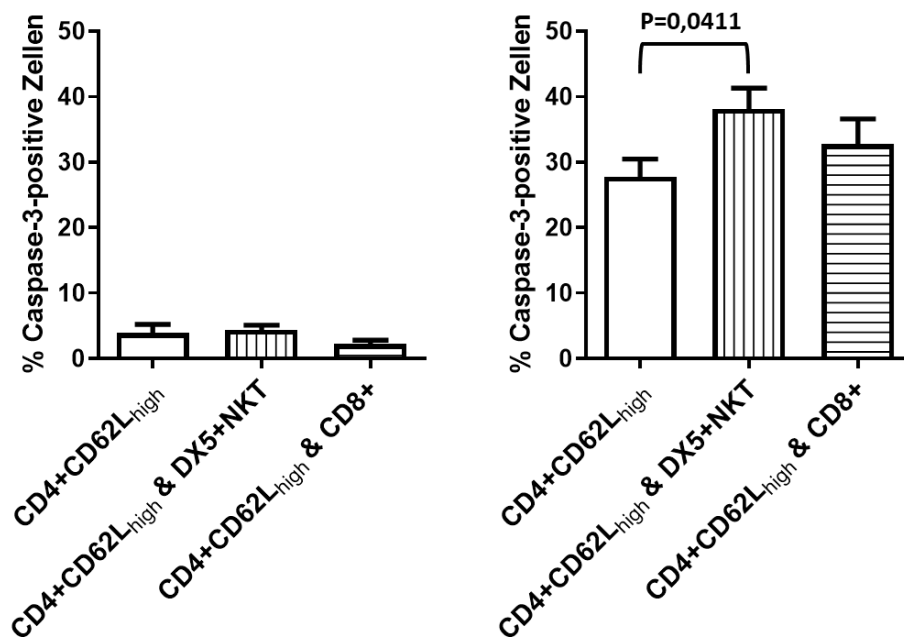


Abbildung 5-19: Prozentuale Anteile Caspase-3-positiver $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen bzw. $CD8^+$ -Zellen.

Im linken Graph sind die Werte nach 10 Stunden und im rechten Graph die Werte nach 48 Stunden Stimulation in Kultur dargestellt.

Um zu überprüfen, ob die Steigerung der Caspase-3-Aktivität durch DX5⁺NKT-Zellen spezifisch für CD4⁺CD62L^{high}-Zellen ist, wurden wiederum entsprechende Mono- und Co-Kulturen mit CD4⁺CD62L_{low}-Zellen angesetzt. Nach zehn Stunden Mono-Kultur waren 4,04 ± 0,40 % der CD4⁺CD62L_{low}-Zellen gegenüber 6,56 ± 1,24 % in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen und 3,14 ± 0,50 % in Co-Kultur mit CD8⁺-Zellen positiv für Caspase-3. Nach 48 Stunden waren es 32,44 ± 3,34 % in Mono-Kultur gegenüber 40,69 ± 3,06 % in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen und 33,35 ± 2,39 % in Co-Kultur mit CD8⁺-Zellen. Es gab weder nach zehn Stunden, noch nach 48 Stunden signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kulturen. (jeweils n ≥ 3)

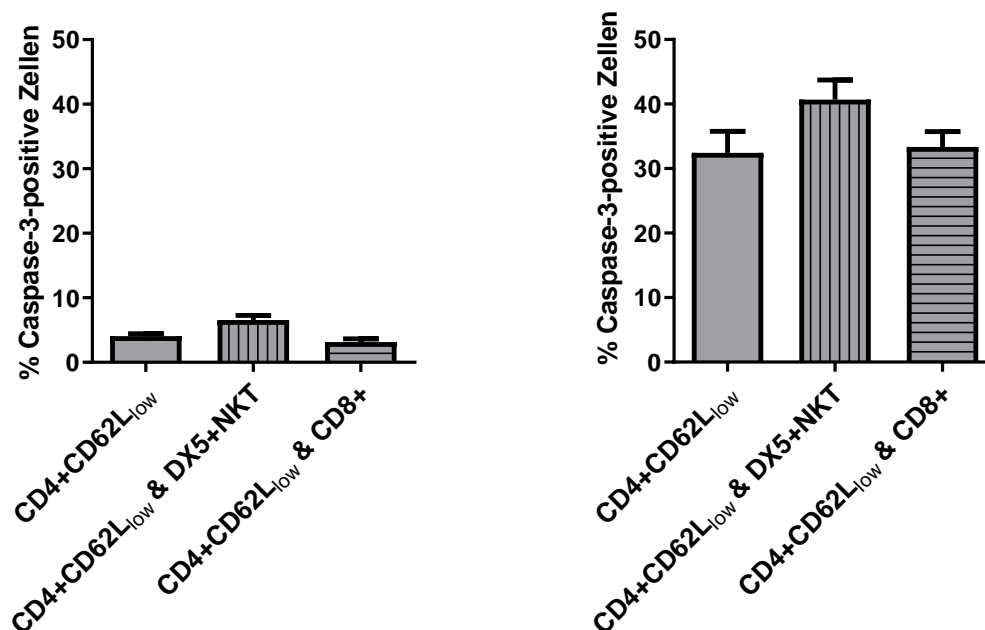


Abbildung 5-20: Prozentualen Anteile Caspase-3positiver CD4⁺CD62L_{low}-Zellen in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen bzw. CD8⁺-Zellen.

Im linken Graph sind die Werte nach 10 Stunden und im rechten Graph die Werte nach 48 Stunden Stimulation in Kultur dargestellt.

5.4 Expression von Fas-Ligand auf DX5⁺NKT-Zellen nach Co-Kultur

Obwohl die meisten früheren Studien Perforin/Granzym B-abhängige Mechanismen für die Zytotoxizität von NKT-Zellen verantwortlich sehen, vermuten neuere Arbeiten, dass der Hauptmechanismus der zytotoxischen Wirkungen von NKT-Zellen Fas-Ligand-abhängig ist, und Zytotoxizität via Perforin/Granzym eine untergeordnete Rolle spielt ^{79,97}. Deshalb wurde zunächst die Expression von Fas-Ligand durch DX5⁺NKT-Zellen nach Stimulation in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen untersucht und mit der Fas-Ligand-Expression von CD8⁺-Zellen, die v.a. über Perforin/Granzym B, weniger ausgeprägt über Fas-Ligand zytotoxisch wirken, in entsprechenden Kulturen verglichen ¹³⁶.

Nach zehn Stunden Stimulation in Mono-Kultur waren $15,00 \pm 2,36$ % der DX5⁺NKT-Zellen gegenüber $5,10 \pm 1,58$ % der CD8⁺-Zellen positiv für Fas-Ligand. Dieser Unterschied war signifikant ($p=0,0286$, $n=4$). In Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen waren es nach zehn Stunden Stimulation $16,63 \pm 4,13$ % der DX5⁺-Zellen gegenüber $6,31 \pm 4,78$ % der CD8⁺-Zellen. Auch dieser Unterschied war signifikant. ($p=0,0286$, $n=4$) NKT-Zellen zeigen also nach Stimulation sowohl in Mono-Kultur, als auch in Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen eine signifikant höhere Expression von Fas-Ligand als CD8⁺-Zellen. Dies deutet daraufhin, dass bei der Zytotoxizität von DX5⁺NKT-Zellen ein Fas-Ligand-abhängiger Mechanismus eine große Rolle spielt.

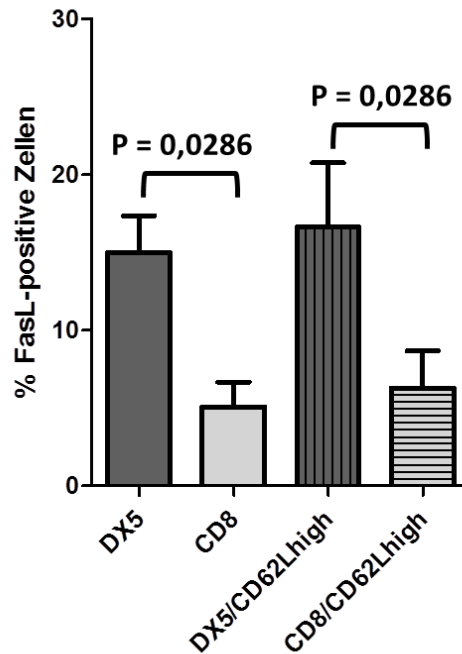


Abbildung 5-21: Prozentuale Anteile Fas-Ligand-positiver DX5⁺NKT-Zellen und CD8⁺-Zellen nach zehn Stunden Stimulation in Mono-Kultur und in Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen.

5.5 Bildung von Caspase-3 in CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen nach Blockade von Fas-Ligand

Nachdem eine hohe Expression von Fas-Ligand durch DX5⁺NKT-Zellen sowohl in Mono-Kultur als auch in Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen gezeigt werden konnte, wurde eine mögliche Abhängigkeit der Aktivitätssteigerung von Caspase-3 in CD4⁺CD62L_{high}-Zellen von Fas-Ligand der DX5⁺NKT-Zellen untersucht. Dazu wurden Co-Kulturen mit DX5⁺NKT-Zellen angelegt, deren Fas-Ligand durch einen Antikörper geblockt worden war, und nach 48 Stunden der Anteil Caspase-3-positiver CD4⁺CD62L_{high}-Zellen dieser Co-Kulturen mit dem Anteil Caspase-3-positiver CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kulturen mit DX5⁺NKT-Zellen, deren Fas-Ligand nicht geblockt wurde, verglichen.

In Mono-Kultur waren $27,78 \pm 2,71$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen positiv für Caspase-3. In Mono-Kulturen, denen anti-FasL zugegeben wurde, waren es $24,4 \pm 1,56$ %. Hier gab es keinen signifikanten Unterschied ($n \geq 3$). In Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen, deren Fas-Ligand nicht blockiert wurde, waren demgegenüber mit $38,13 \pm 3,16$ % signifikant mehr $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen positiv für Caspase-3 ($p=0,0451$, $n \geq 3$). In Co-Kulturen mit $DX5^+NKT$ -Zellen, deren Fas-Ligand blockiert wurde, waren dagegen nur $23,42 \pm 1,14$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen positiv für Caspase-3, das heißt es waren signifikant weniger $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen positiv für Caspase-3, als in Co-Kulturen mit $DX5^+NKT$ -Zellen, deren Fas-Ligand nicht geblockt wurde. ($p= 0,0080$, $n \geq 5$). Zwischen $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen aus Mono-Kulturen und $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen aus Co-Kulturen mit $DX5^+NKT$ -Zellen, deren Fas-Ligand geblockt wurde, gab es keinen signifikanten Unterschied.

Zur Kontrolle wurden Co-Kulturen zwischen $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen und $DX5^+NKT$ -Zellen angesetzt, welche zuvor mit anti-FasL-Isotyp inkubiert wurden. In diesen Co-Kulturen von $DX5^+NKT$ -Zelle waren nach 48 Stunden $38,08 \pm 3,52$ % der $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen positiv für Caspase-3. Somit waren hier sowohl signifikant mehr $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen positiv für Caspase-3, als in den entsprechenden Mono-Kulturen ($p= 0,0319$), als auch signifikant mehr $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen positiv für Caspase-3, als in Co-Kulturen mit $DX5^+NKT$ -Zellen, deren Fas-Ligand geblockt wurde ($p=0,0079$). Gegenüber $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen in Co-Kultur mit $DX5^+NKT$ -Zellen, deren Fas-Ligand nicht geblockt wurde, gab es keinen signifikanten Unterschied im Anteil Caspase-3-positiver Zellen. (jeweils $n \geq 5$)

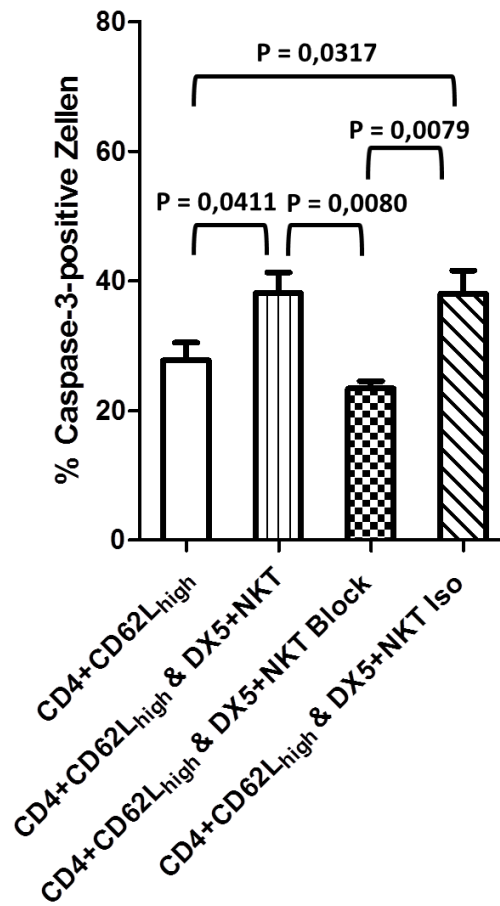


Abbildung 5-22: Prozentualer Anteil Caspase-3-positiver CD4⁺CD62L^{high}-Zellen nach 48 Stunden Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen mit und ohne Blockade von Fas-Ligand.

Außerdem ist die Kontrollkultur dargestellt, deren DX5⁺NKT-Zellen nicht mit anti-FasL, sondern dessen Iso-ty-Antikörper inkubiert wurden.

6 Diskussion

6.1 Einfluss von DX5⁺NKT-Zellen auf die Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}- Zellen

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen durch die Anwesenheit von DX5⁺NKT-Zellen in Co-Kulturen gehemmt wird. CD4⁺CD62L_{high}-Zellen stellen eine Population von naiven CD4⁺-Zellen dar und kamen dementsprechend noch nicht in Kontakt mit einem Antigen ^{112,114}. Zum einen spielen Proliferation und Differenzierung naiver CD4⁺-Zellen bei der Entwicklung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie der experimentellen Transferkolitis, der Autoimmunhepatitis oder der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis eine wichtige Rolle ^{122,123,137}. Zum anderen wurde in verschiedenen Arbeiten die Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen durch eine proliferationshemmende Wirkung von NKT-Zellen auf unterschiedliche, autoreaktive Zellen, beschrieben. Dies betrifft z.B. HPV16E7-spezifische CD8⁺-Zellen bei Abstoßungsreaktionen von Hauttransplantaten, BDC2.5 T-Zellen bei der Entstehung von Typ-I-Diabetes oder Mesangialzellen bei der Entstehung experimenteller, sichelförmiger Glomerulonephritis ^{100,101,138-140}.

In den vorliegenden Versuchen fand die Hemmung der Proliferation der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nach unspezifischer Stimulation der DX5⁺NKT-Zellen mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 sowie IL-2 statt. Eine zusätzliche antigen-spezifische Stimulation der DX5⁺NKT-Zellen z.B. durch APZ wurde im Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung eines in vitro Versuchsmodells mit hochreinen Zellpopulationen ausgeschlossen. In der Literatur wurden proliferationshemmende Effekte von NKT-Zellen meist nach spezifischer Stimulation mit z.B. α -GalCer beobachtet ^{101,140}. Diese Forschungsgruppen verwendeten für ihre Versuche jedoch großteils CD1d-abhängige, durch α -GalCer aktivierbare NKT-Zellen, welche nach der Einteilung von Godfrey et al. Typ-I-NKT-Zellen entsprechen ¹⁴. Im Gegensatz hierzu wurden für die vorliegenden Versuche DX5⁺NKT-Zellen verwendet, welche aufgrund ihrer durch Pelleci et al. gezeigten CD1d-Unabhängigkeit zur dritten Gruppe der NKT-ähnlichen Zellen nach

Godfrey et al. gezählt werden können ^{105,14}. Allerdings legen Hornung et al in einer anderen Arbeit eine CD1d-Abhängigkeit von DX5⁺NKT-Zellen nahe ¹⁰⁴. Sie lösten durch den Transfer von CD4⁺CD62L^{high}-Zellen in Versuchsmäusen eine chronische Kolitis aus. Diese konnte durch den Co-Transfer von DX5⁺NKT-Zellen verhindert werden. Der schützende Effekt der DX5⁺NKT-Zellen konnte jedoch durch Injektion von CD1d-blockierendem Antikörper vollständig unterbunden werden. Zudem zeigten Hornung et al in dieser Arbeit in vitro einen Zelltod von koloninfiltrierenden Lymphozyten, welche zuvor aus erkrankten Mäusen isoliert wurden, durch die Anwesenheit von DX5⁺NKT-Zellen in Co-Kulturen. Auch dieser Effekt wurde durch Zugabe von anti-CD1d zu den Co-Kulturen unterbunden. In jedem Fall entwickeln DX5⁺NKT-Zellen nach polyklonaler Stimulation proliferationshemmende Effekte auf autoreaktive Zellen, die mit denen von Typ-I-NKT-Zellen vergleichbar sind, die mit an CD1d-gebundenen Antigenen wie α -GalCer spezifisch stimuliert wurden.

So beschreiben Yang et al. ebenfalls in vitro einen proliferationshemmenden Effekt von mit α -GalCer aktivierten Typ-I-NKT-Zellen auf Mesangialzellen, welche wiederum durch LPS (Lipopolysaccharid) zur Proliferation angeregt wurden ¹⁴⁰. In Co-Kulturen, in denen keine zusätzliche Stimulation der Typ-I-NKT-Zellen mit α -GalCer stattfand, kam es zu keinem hemmenden Effekt der Typ-I-NKT-Zellen auf die Proliferation von mesangialen Zellen. Dies deutet zum einen daraufhin, dass LPS zur Stimulation von Typ-I-NKT-Zellen ungeeignet ist und zum anderen darauf, dass Typ-I-NKT-Zellen für ihren proliferationshemmenden Effekt grundsätzlich stimuliert werden müssen.

Andererseits beschreiben Mattarollo et al. in einer Arbeit, dass Typ-I-NKT-Zellen in vivo die Proliferation von HPV16E7-spezifischen CD8⁺-Zellen in Lymphknoten, welche Hauttransplantate drainieren, α -GalCer-unabhängig hemmen ¹⁰⁰. Sowohl Wildtyp- als auch $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ knockout Mäuse erhielten Hauttransplantate, die das Virusantigen K14E7 enthielten. Anschließend wurden diesen Mäusen E7-spezifische CD8⁺-Zellen transfundiert, die aus E7TCR $\beta^{+/+}$ transgenen Mäusen gewonnen worden waren. In den $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ knockout Mäusen, denen Typ-I-NKT-Zellen fehlten, kam es 7 Tage danach in den drainierenden Lymphknoten zur Proliferation der transfundierten E7-spezifischen CD8⁺-Zellen und zur

Transplantatabstoßung. In Wildtyp-Mäusen, die Typ-I-NKT-Zellen enthielten, wurde dagegen die Proliferation der E7-spezifischen CD8⁺-Zellen gehemmt und es kam seltener zu Transplantatabstoßungen. Eine exogene Stimulation mittels α -GalCer war für diesen Effekt nicht notwendig. Bei diesem in vivo Versuchsaufbau könnte es jedoch theoretisch anderweitig zu einer spezifischen CD1d-abhängigen Stimulation der Typ-I-NKT-Zellen z.B. mit einem durch die Hauttransplantate übertragenen Antigen gekommen sein. Interessanterweise bestand jedoch kein Unterschied in der Expression von Aktivitätsmarkern wie CD69 oder CD25 zwischen Typ-I-NKT-Zellen von transplantierten und nicht transplantierten Mäusen. Dies deutet daraufhin, dass die Typ-I-NKT-Zellen nicht durch Antigene der Hauttransplantate aktiviert wurden. Inwiefern eine zusätzliche Aktivierung der Typ-I-NKT-Zellen durch die Transfusion der E7-spezifischen CD8⁺-Zellen stattfand oder die grundsätzliche, in vivo vorhandene Aktivität der Typ-I-NKT-Zellen für deren proliferationshemmenden Effekt ausreichte, wurde in den Versuchen von Mattarollo et al. nicht hinreichend geklärt. Insgesamt deuten diese Ergebnisse jedoch auf eine untergeordnete Rolle einer spezifischen Stimulation der NKT-Zellen für die beobachteten proliferationshemmenden Effekte hin.

Differenziertere Untersuchungen wurden durch die Arbeitsgruppe um Jan Novak und Lucie Beaudoin erbracht. Diese kamen in früheren Versuchen zu dem Schluss, dass NKT-Zellen die Entwicklung von Typ-I-Diabetes verhindern, indem sie in vivo die Differenzierung von naiven BDC2.5 T-Zellen zu IFN- γ -produzierenden Zellen unterdrücken⁹⁸. Sie transferierten naive, diabetogene T-Zellen aus BDC2.5 $C\alpha^{-/-}$ Mäusen in $V\alpha 14 C\alpha^{-/-}$ Mäuse, welche NKT-Zellen enthalten, in $V\alpha 8 C\alpha^{-/-}$ Mäuse, welche zwar α/β T-Zellen, darunter jedoch keine NKT-Zellen enthalten und in $C\alpha^{-/-}$ Mäuse, welche keinerlei α/β T-Zellen enthalten. In den Mausstämmen, die keine NKT-Zellen enthielten, kam es dabei deutlich häufiger zur Entwicklung von Typ-I-Diabetes. Eine exogene Stimulation der NKT-Zellen fand in den Versuchen nicht statt. Bei Transfer zuvor in vitro aktivierter und zu Th₁-Zellen differenzierter BDC2.5 T-Zellen konnte die Entwicklung des Typ-I-Diabetes jedoch nicht verhindert werden. Dies deutet daraufhin, dass die NKT-Zellen den Typ-I-Diabetes nicht verhindern, indem sie bereits differenzierte T-Zellen inaktivieren, sondern

indem sie die Aktivierung bzw. Differenzierung naiver T-Zellen beeinflussen. Allerdings waren Proliferation und Expression von Aktivierungsmarkern der transferierten, naiven BDC2.5 T-Zellen nach 3 Tagen trotz Anwesenheit von NKT-Zellen unverändert, was bedeutet, dass die initiale Aktivierung bzw. Differenzierung der naiven BDC2.5 T-Zellen zunächst nicht gehemmt wurde. Jedoch war die IFN- γ -Produktion dieser Zellen vermindert. Nach ≥ 6 Tagen gingen die BDC2.5 T-Zellen dann in einen inaktiven Zustand über, in welchem es nach Stimulation nur noch zu reduzierter Proliferation, sowie zu geringer Produktion von IFN- γ und IL-2 kam. Auch in vitro konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Die Anwesenheit von NKT-Zellen konnte hier die starke Proliferation von mit ihrem spezifischen Antigen sowie IL-2 in Anwesenheit von APZ stimulierten, naiven BDC2.5 T-Zellen nach vier Tagen nicht verhindern. Nach fünf Tagen wurde die Produktion von IL-2 und IFN- γ durch die BDC2.5 T-Zellen untersucht und war in Anwesenheit von NKT-Zellen entsprechend den in vivo Versuchen verringert. Somit wurde auch in vitro bestätigt, dass NKT-Zellen nicht die anfängliche Proliferation der naiven BDC2.5 T-Zellen, sondern deren Differenzierung zu IFN- γ -produzierenden Zellen verhindern. In späteren Versuchen zeigte diese Arbeitsgruppe dann jedoch, dass NKT-Zellen, die mit dem spezifischen Antigen α -GalCer aktiviert wurden, in vitro die Proliferation von naiven BDC2.5 T-Zellen nach 5 Tagen hemmen. Diese Hemmung der Proliferation fand allerdings ausschließlich dann statt, wenn die NKT-Zellen mit α -GalCer stimuliert wurden¹⁰¹. Dies deutet daraufhin, dass NKT-Zellen ausreichend stark stimuliert werden müssen, um ihren vollen proliferationshemmenden Effekt entfalten zu können. Eine Stimulation nur mit IL-2 reichte in den zuvor beschrieben, früheren Versuchen dieser Arbeitsgruppe dazu nicht aus⁹⁸.

Entgegen den zuvor dargestellten Arbeiten beschreiben Mars et al. gänzlich fehlende proliferationshemmende Effekte von mit α -GalCer stimulierten iNKT-Zellen auf naive, autoreaktive CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen in einem Mausmodell für experimentelle, autoimmune Enzephalomyelitis¹³⁹. Sie verwendeten in diesem Versuchsmodell naive, autoreaktive CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen, welche einen 2D2 TZR besitzen, der sich durch das Antigen MOG (Myelin-Olygodendrozyten-Glykoprotein) spezifisch stimulieren lässt.

Diese Zellen wurden aus 2D2 transgenen Mäusen isoliert und in Wildtyp-Mäuse transfundiert. Durch zusätzliche Immunisation der Mäuse mit MOG wurden diese Zellen dann zur Differenzierung in MOG-spezifische Th₁₇-Zellen angeregt, was in den betroffenen Mäusen eine autoimmune Enzephalomyelitis auslöste. Mars et al. beschreiben in dieser Arbeit eine Hemmung der Differenzierung dieser 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen in pathogene Th₁₇-Zellen durch in vivo Stimulation von iNKT-Zellen mit α -GalCer, ohne dass hierbei grundsätzlich die Expansion der 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen beeinflusst worden wäre ¹³⁹. Allerdings sind diese Ergebnisse nur schwer mit den vorliegenden Ergebnissen vergleichbar. Zum einen fand in den Versuchen von Mars et al. kein klassischer Proliferationsassay Anwendung, sondern es wurde die absolute Anzahl der 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen in Einzelzellsuspensionen aus Milz und Lymphknoten 9 Tage nach Transfer dieser Zellen in die Versuchstiere untersucht. Es besteht also die Möglichkeit, dass nicht alle 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen erfasst wurden, da diese möglicherweise nicht alle in Milz und Lymphknoten migrierten. Allerdings war auch bei in vitro Versuchen die Anzahl der 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen in Anwesenheit von mit α -GalCer stimulierten iNKT-Zellen gegenüber den Mono-Kulturen nur leicht reduziert, während die Anzahl und die Frequenz differenzierter Th₁₇-Zellen deutlich verringert war. Zwar fand auch hier kein klassischer Proliferationsassay Anwendung, aber der in vitro Versuchsaufbau ermöglichte die Erfassung aller eingesetzter 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen. Die iNKT-Zellen scheinen somit tatsächlich keinen Einfluss auf die grundsätzliche Expansion der 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen zu nehmen. Es muss jedoch zusätzlich beachtet werden, dass die von Mars et al. verwendeten 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen eine spezielle Zellpopulation darstellen, welche sich nicht nur durch ihren speziellen TZR, sondern auch durch andere Eigenschaften von naiven CD4⁺CD62L^{high}-Zellen aus Wildtyp-Mäusen unterscheiden könnten. Daher wäre es denkbar, dass die hier verwendeten 2D2 CD4⁺CD25⁻CD62L⁺-Zellen eine gewisse Resistenz gegen proliferationshemmende Wirkungen von NKT-Zellen besitzen.

Insgesamt lässt sich der in der vorliegenden Arbeit beobachtete, proliferationshemmende Effekt von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L^{high}-Zellen gut mit bisherigen

Veröffentlichungen in Einklang bringen. In Zusammenschau zeigen einige Arbeitsgruppen proliferationshemmende Wirkungen von Typ-I-NKT-Zellen auf verschiedene autoreaktive Zellen, ähnlich den proliferationshemmenden Wirkungen der DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in den vorliegenden Versuchen. Auf diese Weise könnte die hier gezeigte Hemmung der Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen durch DX5⁺NKT-Zellen auch ursächlich für die in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigte Unterdrückung einer durch CD4⁺CD62L_{high}-Zellen verursachten Transferkolitis durch den Co-Transfer von DX5⁺NKT-Zellen sein ¹⁰⁴. Inwiefern die jeweiligen NKT-Zelltypen für ihre proliferationshemmenden Effekte stimuliert werden müssen, lässt sich nicht vollständig beurteilen. Auch wenn solche Effekte von Typ-I-NKT-Zellen teilweise ohne zusätzliche Stimulation beobachtet wurden, erfolgten diese meist erst nach zusätzlicher Stimulation der Typ-I-NKT-Zellen mit αGalCer oder sie waren nach einer solchen Stimulation zumindest deutlicher ausgeprägt. Um die Notwendigkeit einer Stimulation von Typ-I-NKT-Zellen bzw. DX5⁺NKT-Zellen für solche Effekte jedoch vergleichend beurteilen zu können, müssten Versuche mit beiden NKT-Zelltypen unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt werden.

6.2 Zytokin-Produktion nach Mono- und Co-Kultur und Steigerung der Caspase-3-Aktivität in CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nach Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen

In der Literatur werden verschiedene Mechanismen für proliferationshemmende Wirkungen von NKT-Zellen diskutiert. Prinzipiell wäre vorstellbar, dass NKT-Zellen durch die Inhibition von Mitogenen, durch die Inhibition von Zell-Zell-Kontakten, durch eine Einflussnahme auf das umgebende Zytokinmilieu oder direkt zytotoxisch durch Auslösen von Apoptose proliferationshemmend auf andere Zellen einwirken können.

Matarollo et al. setzten die zuvor dargestellten Versuche zur Rolle von Typ-I-NKT-Zellen bei der Abstoßung von Virusantigen enthaltenden Hauttransplantaten fort ¹⁰⁰. Sie zeigten eine Hemmung der Proliferation HPV16-E7-spezifischer CD8⁺-Zellen in vivo dadurch, dass Typ-I-NKT-Zellen die Antigenpräsentation von APZ an diese E7-spezifischen CD8⁺-

Zellen unterbinden. Sie transferierten E7-spezifische und mit CFSE gefärbte CD8⁺-Zellen in Wildtyp- bzw. in CD1d^{-/-} knockout oder Jα18^{-/-} knockout Mäuse, die zuvor K14E7 Hauttransplantate erhalten hatten. 7 Tage später untersuchten sie die Proliferation der E7-spezifischen CD8⁺-Zellen in den drainierenden Lymphknoten. Die Proliferation dieser Zellen war in CD1d^{-/-} knockout und Jα18^{-/-} knockout Mäusen deutlich ausgeprägter als in Wildtyp-Mäusen und wurde somit durch die Anwesenheit von Typ-I-NKT-Zellen gehemmt. In einem weiteren Schritt isolierten sie APZ aus drainierenden Lymphknoten transplantierte Wildtyp- bzw. CD1d^{-/-} knockout Mäuse, inkubierten sie mit einem E7-Peptid und setzten Co-Kulturen mit E7-spezifischen CD8⁺-Zellen an. Nach vier Tagen wurde die IFN-γ-Produktion der CD8⁺-Zellen gemessen. Sie war deutlich ausgeprägter, wenn die APZ aus CD1d^{-/-} knockout Mäusen isoliert worden waren. Typ-I-NKT-Zellen unterbinden also scheinbar die Fähigkeit von APZ, die E7-spezifischen CD8⁺-Zellen mit E7-Peptid zu stimulieren. Ein solcher Mechanismus wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da hier ein direkter, proliferationshemmender Effekt von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kulturen mit hochreinen Zellpopulationen gezeigt wurde. Die Beteiligung von APZ an den Wechselwirkungen zwischen den beiden Zellpopulationen wurde dadurch ausgeschlossen. In vivo könnten aber durchaus zusätzlich solche Mechanismen an proliferationshemmenden Effekten von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen beteiligt sein.

Für einige Zytokine sind Einflüsse auf die Proliferation verschiedener Zellen beschrieben worden ¹⁴¹. IL-2 gilt als essentiell für die Proliferation und Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen ¹³³. Eine Abnahme der IL-2-Produktion der einzelnen Zellpopulationen und damit eine Verringerung der im Umgebungsmilieu vorhandenen Menge an IL-2 könnte also für die Hemmung der Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen verantwortlich sein. IFN-γ stößt zum einen direkt die Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen zu Th₁-Zellen an ¹⁴². Zum anderen lenkt es die Differenzierung naiver CD4⁺-Zellen indirekt in Richtung Th₁-Zellen, indem es die Differenzierung von naiven CD4⁺-Zellen zu Th₂-Zellen und die weitere Proliferation der Th₂-Population hemmt ¹³⁴. Außerdem kann IFN-γ generell proliferationshemmend durch Induktion eines Fas-

Rezeptor-/ Fas-Ligand-abhängigen Mechanismus wirken¹³⁵.

Novak et al. vermuten in einer Arbeit, welche bereits zuvor beschrieben wurde, *in vitro* eine untergeordnete Rolle der Zytokine IL-4, IL-10, IL-13, und TGF- β bei der proliferationshemmenden Wirkung von NKT-Zellen auf BDC2.5 T-Zellen, da die gezeigte proliferationshemmende Wirkung auch eintrat, wenn diese Zytokine durch Zugabe von entsprechenden Antikörpern in den Kulturen blockiert wurden.¹⁰¹ Eine Aufhebung der proliferationshemmenden Wirkungen von NKT-Zellen auf BDC2.5 T-Zellen zeigte sich jedoch in Versuchen in Transwell-Systemen. In einem solchen Transwell-System wurden Zell-Zell-Kontakte zwischen den NKT-Zellen und den BDC2.5 T-Zellen durch eine semipermeable Membran, welche für sezernierte Stoffe, nicht aber für Zellen passierbar ist, unterbunden. Dies deutet auf die Notwendigkeit von Zell-Zell-Kontakten zwischen den NKT-Zellen und den BDC2.5 T-Zellen hin und spricht ebenfalls gegen eine entscheidende Rolle von Zytokinen, da diese ja die semipermeable Membran passieren konnten.

Dagegen beschreiben Cain et al. aufbauend auf einer modifizierten Version des NOD Mausmodells für autoimmunen Typ-I-Diabetes in einer späteren Arbeit *in vivo* eine Schlüsselrolle von durch NKT-Zellen sezerniertem IFN- γ bei der Unterdrückung von durch BDC2.5 T-Zellen induziertem Typ-I-Diabetes⁹⁹. Sie zeigten jedoch gleichzeitig, dass IFN- γ dabei nicht direkt auf die BDC2.5 T-Zellen einwirkt, was gegen eine unmittelbare, proliferationshemmende Wirkung von IFN- γ auf die BDC2.5 T-Zellen spricht. Cain et al. verwendeten für ihre Versuche als Empfängertiere NOD_{scid}-Mäuse, da diese im Vergleich zu konventionellen NOD-Mäusen eine geringere T-Zelldiversität besitzen und empfindlicher für die Entwicklung von autoimmunem Typ-I-Diabetes sind. Zunächst stellten sie fest, dass NKT-Zellen eine Schlüsselrolle bei der Unterdrückung des durch BDC2.5 T-Zellen induzierten Typ-I-Diabetes spielen, indem sie BDC2.5 T-Zellen entweder zusammen mit Milzzellen aus β_2 -Mikroglobulin^{-/-} knockout NOD-Mäusen oder mit Milzzellen aus β_2 -Mikroglobulin^{+/+} Mäusen in NOD_{scid}-Mäuse transferierten. Milzzellen aus β_2 -Mikroglobulin^{-/-} knockout NOD-Mäusen enthalten keine β_2 -Mikroglobulin-abhängigen (CD1d-abhängigen) NKT-Zellen. Empfängermäuse, die Milzzellen ohne NKT-Zellen als Co-Transfer erhielten, entwickelten im Gegensatz zu

Empfängermäusen, welche NKT-Zellen erhielten, Typ-I-Diabetes. Anschließend wurde die Rolle der Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ untersucht. Dazu wurden zusammen mit den BDC2.5 T-Zellen jeweils Milzzellen aus IL-4^{-/-}, IL-10^{-/-} und IFN γ ^{-/-} knockout Mäusen in NOD_{scid}-Mäuse transfundiert. Im Gegensatz zu Mäusen, die IL-4^{-/-} bzw. IL-10^{-/-}-Milzzellen erhielten, entwickelten Mäuse, die IFN- γ ^{-/-}-Milzzellen erhielten, Typ-I-Diabetes. IFN- γ spielt also eine Schlüsselrolle bei der Unterdrückung des Typ-I-Diabetes. Zudem wurde in einem nächsten Schritt gezeigt, dass das für die anti-diabetogene Wirkung verantwortliche IFN- γ aus NKT-Zellen stammt, indem IFN γ ^{-/-} BDC2.5 T-Zellen zusammen mit Wildtyp-Milzzellen jeweils IFN- γ ^{-/-} NOD_{scid}-Mäusen als auch IFN- γ ^{+/+} NOD_{scid}-Mäusen transferiert wurden. Dabei zeigte sich kein Unterschied in der Entwicklung von Typ-I-Diabetes zwischen beiden Mäusen. Zuletzt wurde noch untersucht, auf welcher Ebene das von den NKT-Zellen sezernierte IFN- γ wirksam wird. Dazu wurden zunächst BDC2.5 T-Zellen zusammen mit Milzzellen aus Mäusen, die keine IFN- γ -Rezeptor- β -Kette exprimieren und somit nicht auf IFN- γ reagieren, transfundiert. Hierbei kam es zur regulären anti-diabetogenen Wirkung der NKT-Zellen. Es ist also keine autokrine Wirkung des IFN- γ auf die anti-diabetogenen NKT-Zellen für deren Effekt nötig. Als nächstes wurden dann IFN- γ -Rezeptor- β -Ketten^{-/-} BDC2.5 T-Zellen zusammen mit Wildtyp-Milzzellen transfundiert. Auch hier kam es zur regulären anti-diabetogenen Wirkung der NKT-Zellen. Durch NKT-Zellen sezerniertes IFN- γ scheint also nicht direkt auf die BDC2.5 T-Zellen einzuwirken und somit auch keine direkten antiproliferativen Wirkungen auf diese Zellen zu entfalten. Das durch die transferierten NKT-Zellen produzierte IFN- γ scheint also seine regulierende Wirkung durch Einfluss auf das in vivo Milieu der Empfängermäuse zu entfalten. Eine Möglichkeit wären z.B. Wirkungen auf APZ, untersucht wurde dieses jedoch nicht.

Mehrere Autoren, darunter auch unsere Arbeitsgruppe, zeigten bereits, dass DX5⁺NKT-Zellen ähnlich wie Typ-I-NKT-Zellen nach Stimulation schnell große Mengen sowohl Th₁- als auch Th₂-Zytokine produzieren^{58,104,110}. In den Versuchen für diese Arbeit konnte zunächst die in der Literatur beschriebene starke Produktion von IFN- γ und IL-2 durch die DX5⁺NKT-Zellen bestätigt und zudem gezeigt werden, dass diese Zytokin-Produktion

auch in Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen besteht. Eindeutige Veränderungen in der Produktion dieser Zytokine durch die beiden Zellpopulationen in Co-Kultur gegenüber den jeweiligen Mono-Kulturen wurden jedoch nicht festgestellt. Die Ergebnisse deuten also darauf hin, dass für den proliferationshemmenden Effekt von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen keine Veränderungen in der Zytokin-Produktion der beiden Zellpopulationen in Co-Kultur gegenüber den jeweiligen Mono-Kulturen verantwortlich sind. Dies deckt sich auch mit der aktuellen Literatur, in der bisher kein direkter Zusammenhang zwischen proliferationshemmenden Wirkungen von NKT-Zellen und deren Zytokin-Produktion bzw. deren Einfluss auf das umgebende Zytokinmilieu beschrieben wurde.

Eine weitere Möglichkeit für den proliferationshemmenden Effekt von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen könnten pro-apoptotische Wirkungen der DX5⁺NKT-Zellen sein, da Zellen, die in den Vorgang der Apoptose eingetreten sind, nicht proliferieren. Zytotoxische Wirkungen von NKT-Zellen auf verschiedene Zellen wurden bereits vielfach in der Literatur beschrieben⁵⁸⁻⁶⁹. Die meisten Autoren diskutieren dabei jedoch nicht direkt einen Zusammenhang zwischen pro-apoptotischen und proliferationshemmenden Effekten von NKT-Zellen.

In den vorliegenden Versuchen konnte eine Steigerung der Caspase-3-Aktivität in CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nach 48 Stunden Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen festgestellt werden. Caspase-3 ist ein in der Signalkaskade apoptotischer Zellen früh auftretender Apoptosemarker, der Todessubstrate, die zum apoptotischen Zelltod der jeweiligen Zelle führen, spaltet und somit aktiviert⁹⁰. Daraus lässt sich schließen, dass Zellen mit nachweisbarer Aktivität von Caspase-3 in den Prozess der Apoptose eingetreten sind. Die in Co-Kultur mit NKT-Zellen gezeigte Steigerung der Caspase-3-Aktivität der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen korreliert also mit einer gesteigerten Apoptoserate dieser Zellen. Somit könnte die beobachtete proliferationshemmende Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen auf der hier gezeigten pro-apoptotischen Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen beruhen. Auch in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich die absolute Anzahl von CD4⁺CD62L_{high}-

Zellen in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen gegenüber entsprechenden Mono-Kulturen nach 72 Stunden signifikant verringerte, es also in den Co-Kulturen zu vermehrtem Zelltod der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen kam ¹⁰⁴.

Möglicherweise könnten die durch DX5⁺NKT-Zellen in den Co-Kulturen initial produzierten Zytokine unterstützend für die pro-apoptotischen Wirkungen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen sein. IFN- γ kann einen Fas/FasL-abhängigen Mechanismus und andere pro-apoptotische Moleküle induzieren ¹³⁵. Außerdem führt auch eine wiederholte Stimulation von CD4⁺-Zellen mit IL-2 zu einer verstärkten Sensibilität dieser Zellen für Fas-Rezeptor-induzierte Apoptose ¹⁴³. Beide Zytokine wurden sowohl in Mono-Kultur als auch in Co-Kultur initial in hohem Maße durch die DX5⁺NKT-Zellen produziert. Ein möglicher direkter Zusammenhang zwischen den produzierten Zytokinen und den pro-apoptotischen Wirkungen der DX5⁺NKT-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht.

6.3 Fas-Ligand-Abhängigkeit der pro-apoptotischen Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen

Für zytotoxische Wirkungen von NKT-Zellen werden in der Literatur verschiedene Mechanismen diskutiert. Nieda et al. beschreiben in ihrer Arbeit eine TRAIL-abhängige Zytotoxizität von CD4⁺V α 24 NKT-Zellen gegenüber Leukämiezellen ¹⁴⁴. Sie zeigten zunächst in vitro eine starke Expression von TRAIL auf aus humanem Blut isolierten CD4⁺V α 24 NKT-Zellen in Co-Kultur mit APZ, welche mit α GalCer beladen worden waren. PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell = mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) von Patienten mit AML Typ M4 zeigten nach 8 Stunden Co-Kultur mit solchen durch APZ stimulierten, TRAIL-exprimierenden CD4⁺V α 24 NKT-Zellen eine deutlich gesteigerte Apoptoserate gegenüber entsprechender Mono-Kultur. Die Apoptose wurde in diesen Zellen durchflusszytometrisch mittels eines AnnexinV/Propidiumjodid-Assays nachgewiesen. Zu keiner Steigerung der Apoptoserate der PBMC kam es bei Einsatz nicht aktivierter (also nicht TRAIL-exprimierender) CD4⁺V α 24 NKT-Zellen oder wenn TRAIL

durch Zugabe von anti-TRAIL zu den Co-Kulturen blockiert wurde. Interessanterweise hatten TRAIL-exprimierende CD4⁺Vα24 NKT-Zellen in Co-Kulturen keinen Einfluss auf die Apoptoserate von PBMC aus Patienten mit AML Typ Mo oder Typ M1. Der TRAIL-vermittelte pro-apoptotische Effekt von CD4⁺Vα24 NKT-Zellen auf PBMC scheint also spezifisch für AML Typ M4 zu sein.

Andere Autoren sehen in erster Linie Perforin/Granzym B-abhängige Mechanismen als ursächlich für die zytotoxischen Wirkungen von NKT-Zellen ⁹¹⁻⁹⁴.

Kawano et al. zeigten eine Perforin-abhängige Zytotoxizität von Vα14 NKT-Zellen gegen B16 Melanomzellen ⁹¹. Sie behandelten hierfür Vα14^{+/+} transgene Mäuse, welche idealerweise ausschließlich Vα14 NKT-Zellen und keine anderen Lymphozyten besitzen, mit αGalCer. 24 Stunden später setzten sie Co-Kulturen zwischen Milzzellen dieser Mäuse und mit ⁵¹Cr gelabelten B16 Melanomzellen an. Anschließend wurde die Zytotoxizität der Vα14 NKT-Zellen mittels eines ⁵¹Cr-Release-Assays ermittelt. Vα14 NKT-Zellen aus Vα14^{+/+} transgenen Mäusen, die zuvor nicht mit αGalCer behandelt worden waren, zeigten keine Zytotoxizität. Des Weiteren ließ sich die Zytotoxizität der durch αGalCer aktivierten Vα14 NKT-Zellen durch Blockade der Perforin-Produktion mittels Inkubation mit Concanamycin A aufheben.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Nicol et al. ⁹². Sie vermehrten humane Vα24 NKT-Zellen durch Co-Kultivierung von PBMC und APZ in Anwesenheit von αGalCer und IL-2. Anschließend setzten sie Co-Kulturen zwischen diesen Vα24 NKT-Zellen und mit ⁵¹Cr markierten U937 Lymphomzellen an. Anhand eines ⁵¹Cr-Release-Assays zeigte sich eine deutliche Zytotoxizität der Vα24 NKT-Zellen, welche stärker ausgeprägt war, wenn die Vα24 NKT-Zellen zuvor erneut durch mit αGalCer beladene APZ stimuliert worden waren. Auch hier ließ sich die Zytotoxizität durch Zugabe von Concanamycin A zu den Co-Kulturen fast vollständig unterbinden.

Auch Metelitsa et al. verwendeten für ihre Versuche Vα24 NKT-Zellen, die sie aus Kultivierung von PBMC mit αGalCer und IL-2 gewannen ⁹³. Sie setzten dann Co-Kulturen zwischen diesen Vα24 NKT-Zellen und mit Calcein-AM gelabelten, myeloischen

Leukämiezellen an. Anschließend wurde die Zytotoxizität der V α 24 NKT-Zellen gegen die Leukämiezellen mittels eines Calcein-AM-DIMSCAN-Assays ermittelt. Auch hier zeigte sich wieder eine deutliche zytotoxische Aktivität der V α 24 NKT-Zellen gegenüber den Leukämiezellen, die wiederum durch erneute Stimulation der V α 24 NKT-Zellen mit α GalCer gesteigert werden konnte. Die Zytotoxizität der V α 24 NKT-Zellen ließ sich wiederum durch vorherige Inkubation mit Concanamycin A deutlich reduzieren. Die nach Blockade des Perforin-Mechanismus verbleibende Zytotoxizität ließ sich durch zusätzliche Inkubation der V α 24 NKT-Zellen mit anti-TNF, anti-Fas und anti-TRAIL komplett blockieren. Der alleinige Einsatz von anti-Fas und anti-TRAIL führte dabei allerdings nur zu geringer Blockade der verbliebenen Zytotoxizität, weshalb diese Mechanismen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen schienen.

Takahashi et al. verwendeten ebenfalls aus Kultur gewonnene V α 24 NKT-Zellen und zeigten in Co-Kulturen zytotoxische Aktivität gegen U937 Lymphozyten mittels eines ⁵¹Cr-Release-Assays. Auch sie konnten die Zytotoxizität der V α 24 NKT-Zellen mittels Concanamycin A unterbinden ⁹⁴.

Mattarollo et al. beschreiben je nach Tumorzellart TRAIL-, Perforin- und Fas-Ligand-abhängige zytotoxische Mechanismen und verwendeten wie Nieda et al. für ihre Versuche zytotoxisch aktive V α 24 NKT-Zellen, die sie durch Kultivierung von PBMC unter Stimulation mit α GalCer, IL-7 und IL-15 züchteten ⁹⁵. Auf den als Zielzellen eingesetzten Tumorzellen unterschiedlicher Art induzierten sie durch Inkubation mit Chemotherapeutika die Expression von Fas-Rezeptor und TRAIL-Rezeptor-2. Anschließend wurden Co-Kulturen zwischen den V α 24 NKT-Zellen und den jeweiligen Tumorzellen angesetzt und dann die Zytotoxizität der V α 24 NKT-Zellen auf die jeweiligen Tumorzellen mittels eines MTS-Assays ermittelt. Dabei zeigten sich zytotoxische Wirkungen auf U937 Lymphomzellen, DU-145 Prostata-Tumorzellen und DLD-1 kolorektale Tumorzellen. Anschließend wurden spezifische Apoptosemechanismen in den verschiedenen Co-Kulturen durch vorherige Inkubation der V α 24 NKT-Zellen mit Concanamycin A (blockiert die Perforin-Produktion), anti-TRAIL oder anti-FasL blockiert. Dabei zeigte sich, dass die zytotoxischen Wirkungen der V α 24 NKT-Zellen auf

U937 Lymphomzellen durch Concanamycin A blockiert wurden, anti-TRAIL bzw. anti-FasL hatten keinen Effekt. Im Gegensatz hierzu konnten die zytotoxischen Wirkungen gegen DU-145 Prostata-Tumorzellen durch anti-FasL und anti-TRAIL blockiert werden, hier blieb Concanamycin A wirkungslos. Dagegen konnten die zytotoxischen Wirkungen auf DLD-1 kolorektale Tumorzellen ausschließlich durch anti-TRAIL blockiert werden. Die $V\alpha 24$ NKT-Zellen können also ihre zytotoxischen Wirkungen je nach Zieltumorzelle durch unterschiedliche Mechanismen entfalten.

Kaneko et al. beschreiben sowohl Fas/FasL- als auch Perforin/Granzym-abhängige Mechanismen bei den zytotoxischen Wirkungen von NKT-Zellen auf TLR2 Hepatozyten⁹⁶. Sie verwendeten $V\alpha 14$ NKT-Zellen, die sie durch Kultivierung von Milzzellen aus $V\alpha 14^{+/+}$ transgenen Mäusen erhielten. Zunächst wurde in vivo gezeigt, dass Wildtyp-Mäuse nach intravenöser Applikation von 0,5 mg Concanavalin A eine Autoimmunhepatitis entwickelten, was bei $V\alpha 14^{-/-}$ knockout Mäusen nicht der Fall war. Wurden diesen Mäusen jedoch zusätzlich $V\alpha 14$ NKT-Zellen transferiert, entwickelte sich auch hier eine Hepatitis. Stammten die transfundierten $V\alpha 14$ NKT-Zellen allerdings aus $FasL^{gld/gld}$ -Mäusen, die nur mutierten Fas-Ligand exprimieren, entwickelte sich keine Hepatitis. Ebenso verhielt es sich bei Transfusion von $V\alpha 14$ NKT-Zellen aus Perforin^{-/-} knockout Mäusen. Bei Transfusion von $V\alpha 14$ NKT-Zellen aus IL-4^{-/-} knockout Mäusen entwickelte sich ebenfalls keine Hepatitis, jedoch bei Transfusion von $V\alpha 14$ NKT-Zellen aus IFN- γ ^{-/-} knockout Mäusen. Für die Entwicklung der Hepatitis nach intravenöser Applikation von Concanavalin A war also die Anwesenheit von $V\alpha 14$ NKT-Zellen notwendig, welche Fas-Ligand exprimierten sowie Perforin und IL-4 produzierten. Bei in vitro Versuchen zeigte sich dann, dass mit Concanavalin A stimulierte $V\alpha 14$ NKT-Zellen deutlich mehr IL-4 produzierten als IFN- γ , was eine autokrine Wirkung des IL-4 auf die $V\alpha 14$ NKT-Zellen vermuten lässt.

Im Gegensatz hierzu beschreiben Nowak et al. in einer neueren Forschungsarbeit im Zusammenhang mit oraler Nickeltoleranz zytotoxische Aktivitäten von NKT-Zellen gegen B-Zellen in erster Linie durch einen FasL/Fas-abhängigen Mechanismus⁹⁷. Sie verwendeten für ihre Versuche ein Mausmodell zur oralen Nickel-Toleranzentwicklung.

Dabei führte die wiederholte orale Applikation von Nickel zu Ni^{high} Mäusen, bei denen es nach intradermaler Applikation von NiCl₂/H₂O₂ verglichen mit Ni^{low} Mäusen, die keine orale Applikation von Nickel erhalten hatten, zu einer reduzierten Hypersensitivitätsreaktion. In Fas_{lpr/lpr} Mäusen mit defektem Fas-Rezeptor führte die wiederholte orale Applikation von Nickel zu keiner Toleranzentwicklung, was bedeutet, dass hierfür die Expression von funktionsfähigem Fas-Rezeptor notwendig ist. Durch den Transfer von CD19⁺-B-Zellen aus den Milzen von Ni^{high} Mäusen in die Schwanzvene von Ni^{low} Mäusen ließ sich die Nickeltoleranz von Ni^{high} Mäusen auf Ni^{low} Mäuse übertragen. CD19⁺-B-Zellen aus Fas_{lpr/lpr} Ni^{high} Mäusen konnten jedoch keine Nickeltoleranz auf Ni^{low} Mäuse übertragen. Für die Nickeltoleranz sind also Ni^{high} CD19⁺-B-Zellen mit funktionierendem Fas-Rezeptor notwendig. Als nächstes wurden CD19⁺-B-Zellen aus Ni^{high} Mäusen in Jα18^{-/-} knockout Mäuse transferiert, was zunächst zu keiner Übertragung der Nickeltoleranz auf die Jα18^{-/-} knockout Mäuse führte. Erhielten die Jα18^{-/-} knockout Mäuse jedoch zusätzlich NKT-Zellen durch einen Co-Transfer von Milzzellen aus Ni^{low} Mäusen, entwickelte sich eine Nickeltoleranz. Stammten die co-transferierten Milzzellen jedoch aus Fas_{gld/gld} Mäusen mit defektem Fas-Ligand, zeigte sich keine Nickeltoleranz bei den Empfängermausen. Für die Entwicklung der Nickeltoleranz müssen also auch NKT-Zellen mit funktionierendem Fas-Ligand vorhanden sein. In einem weiteren Versuch wurden Milzzellen aus Ni^{high} bzw. Ni^{low} Mäusen mit CFSE markiert und in Ni^{low} Mäuse transferiert. 24 Stunden später wurde diesen Mäusen intradermal NiCl₂/H₂O₂ appliziert. Wiederum 24 Stunden später wurde durchflusszytometrisch mittels eines AnnexinV-Assays der Anteil apoptotischer CFSE⁺CD19⁺-B-Zellen in den Milzen bzw. drainierenden Lymphknoten dieser Mäuse ermittelt. Der Anteil apoptotischer CFSE⁺CD19⁺ B-Zellen in Ni^{high} Mäusen wurde im Gegensatz zum Anteil apoptotischer CFSE⁺CD19⁺ B-Zellen in Ni^{low} Mäusen durch die Applikation von NiCl₂/H₂O₂ deutlich gesteigert. Die Nickeltoleranz in Ni^{high} Mäusen geht also mit der Apoptose von CD19⁺-B-Zellen einher. Zusammenfassend lässt sich also aus den Versuchen von Nowak et al. schließen, dass iNKT-Zellen über einen Fas-L/Fas-abhängigen Mechanismus pro-apoptotisch auf mit Nickel beladene CD19⁺ B-Zellen einwirken.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Wingender et al., die in einer aktuellen Arbeit zeigen, dass die antigenspezifische Zytotoxizität von iNKT-Zellen gegenüber B-Zellen in vivo fast ausschließlich von der Interaktion vom Fas-Ligand der iNKT-Zellen mit dem Fas-Rezeptor der Zielzellen abhängt ⁷⁹. In ihren Versuchen kam ein Zytotoxizitäts-Assay zur Anwendung, der die antigenspezifische Zytotoxizität von iNKT-Zellen gegenüber verschiedenen, i.v. injizierten Zielzellen anhand deren Anteil in Milzzellsuspensionen darstellt. Dazu wurden mit α GalCer beladene und mit einer hohen Dosis CFSE gefärbte CFSE^{high} Zielzellen zusammen mit unbeladenen und mit einer niedrigen Dosis CFSE gefärbten CFSE^{low} Kontrollzellen des gleichen Typs i.v. in Empfängerermäuse injiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde dann der Anteil der jeweiligen Zellen in den Milzzellsuspensionen durchflusszytometrisch bestimmt und die zellspezifische Zytotoxizität der iNKT-Zellen mit folgender Formel berechnet: Spezifische Zytotoxizität (%) = $100 - [100 \times (\text{CFSE}^{\text{high}} / \text{CFSE}^{\text{low}})^{\text{Wildtyp}} / (\text{CFSE}^{\text{high}} / \text{CFSE}^{\text{low}})^{\text{iNKT-Zellfrei}}]$. Es zeigte sich so eine deutliche antigenspezifische Zytotoxizität der iNKT-Zellen gegen verschiedene Zellen, die mit der Expression von CD1d auf den jeweiligen Zielzellen korrelierte und am deutlichsten gegen B-Zellen ausgeprägt war. Daher wurden von Wingender et al. B-Zellen als Zielzellen für die weiteren in vivo Versuche verwendet. Um den Mechanismus dieser antigenspezifischen Zytotoxizität von iNKT-Zellen gegen B-Zellen zu untersuchen wurden Versuche mit verschiedenen Knockout-Mäusen durchgeführt. Waren die Empfänger der injizierten B-Zellen Perforin^{-/-} knockout Mäuse, blieb die Zytotoxizität im Vergleich zu Wildtyp-Empfängern unverändert. Waren die Empfänger jedoch FasL^{-/-} knockout Mäuse, war die Zytotoxizität auf ein geringes Maß reduziert. Ebenso verhielt es sich, wenn B-Zellen aus Fas^{-/-} knockout Mäusen in Wildtyp-Mäuse injiziert wurden. Auch hier war die Zytotoxizität auf ein geringes Maß reduziert. Des Weiteren zeigten iNKT-Zellen aus Wildtyp-Mäusen nach Injektion von mit α GalCer beladenen B-Zellen eine deutliche Steigerung der Expression von Fas-Ligand. Im Gegenzug war die Expression von Fas-Rezeptor auf den mit α GalCer beladenen B-Zellen gegenüber nicht beladenen B-Zellen ebenfalls gesteigert. Kamen also iNKT-Zellen in vivo in Kontakt mit B-Zellen, welche mit α GalCer beladen waren, wurde seitens der iNKT-

Zellen die Expression von Fas-Ligand und seitens der B-Zellen die Expression von Fas-Rezeptor gesteigert. Diese Ergebnisse lassen in Zusammenschau darauf schließen, dass die antigenspezifische Zytotoxizität von iNKT-Zellen gegenüber mit α GalCer beladenen B-Zellen in vivo fast ausschließlich von der Interaktion Fas-Ligand der iNKT-Zellen mit Fas-Rezeptor der B-Zellen abhängt. Ergänzend zu den in vivo Versuchen wurde in vitro die Zytotoxizität von iNKT-Zellen gegenüber B16 Melanomzellen untersucht. Hierzu wurden CFSE^{high} B16 Melanomzellen mit α GalCer beladen und anschließend 1:1 mit CFSE^{low} RMA T-Zelltumorzellen vermischt. Anschließend wurden Co-Kulturen zwischen dieser Zellmischung und mit iNKT-Zellen angereicherten Milzzellen angesetzt. Zunächst zeigte sich keine Zytotoxizität der iNKT-Zellen gegen die B16 Melanomzellen und es kam zu keiner Steigerung der Fas-Rezeptor-Expression auf den B16 Melanomzellen. Wurden allerdings CD1d-transgene B16 Melanomzellen, die zuverlässig CD1d exprimieren, verwendet, kam es zu deutlicher Zytotoxizität der iNKT-Zellen gegen diese CD1d⁺ B16 Melanomzellen. Außerdem wurde die Expression von Fas-Rezeptor auf den CD1d⁺ B16 Melanomzellen gesteigert. Die Zytotoxizität der iNKT-Zellen ließ sich bei diesen Versuchen durch Zugabe von anti-FasL zu den Co-Kulturen auf etwa die Hälfte reduzieren. Auch hier scheint also die Interaktion zwischen Fas-Ligand der iNKT-Zellen und Fas-Rezeptor der CD1d⁺ B16 Melanomzellen eine wichtige Rolle zu spielen.

Aktuelle Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten nach 4 Stunden Stimulation mit IL-2 und anti-CD3/anti-CD28 in vitro eine deutliche Expression von Fas-Ligand durch DX5⁺NKT-Zellen, welche sich bei unstimulierten DX5⁺NKT-Zellen nicht zeigte ⁵⁸. In den vorliegenden Versuchen zeigten DX5⁺NKT-Zellen diese Expression von Fas-Ligand nach entsprechender Stimulation nicht nur in Mono-Kultur, sondern auch in Co-Kultur mit CD4⁺CD62L^{high}-Zellen. Ein signifikanter Unterschied bei der Expression von Fas-Ligand auf DX5⁺NKT-Zellen zwischen Mono- und Co-Kultur konnte dabei nicht festgestellt werden. DX5⁺NKT-Zellen scheinen also nach polyklonaler Stimulation ihre pro-apoptischen Eigenschaften direkt zu aktivieren, ohne dass hierbei die Anwesenheit von Zielzellen notwendig ist.

Durch Blockade von Fas-Ligand der DX5⁺NKT-Zellen konnte deren pro-apoptischer

Effekt auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in den vorliegenden Versuchen unterbunden werden. Daraus lässt sich eine Abhängigkeit von Fas-Ligand bei der gezeigten, pro-apoptotischen Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in vitro ableiten.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen somit die Untersuchungen von Wingender et al., die zeigen konnten, dass die antigenspezifische Zytotoxizität von iNKT-Zellen gegenüber B-Zellen in vivo fast ausschließlich auf der Interaktion von Fas-Ligand der iNKT-Zellen mit dem Fas-Rezeptor der Zielzellen beruht ⁷⁹. Im Unterschied zu den Ergebnissen von Wingender et al. wurde in der vorliegenden Arbeit die Zytotoxizität von DX5⁺NKT-Zellen durch die Blockade von Fas-Ligand in vitro vollständig aufgehoben. Der prozentuale Anteil Caspase-3-positiver CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in einer Mono-Kultur unterschied sich nicht vom prozentualen Anteil Caspase-3-positiver CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kultur mit DX5⁺NKT-Zellen, deren Fas-Ligand blockiert worden war. Dies deutet darauf hin, dass die pro-apoptotischen Wirkungen von DX5⁺NKT-Zellen im Gegensatz zu iNKT-Zellen ausschließlich auf einem Fas-Ligand-abhängigen Mechanismus beruhen. Allerdings muss diese Schlussfolgerung aus mehreren Gründen kritisch betrachtet werden. Die Versuche für die vorliegende Arbeit fanden unter sehr speziellen Kulturbedingungen statt, bei denen stark aufgereinigte Zellpopulationen zum Einsatz kamen. Dies bedeutet, dass praktisch ausgeschlossen ist, dass andere Zellen, wie z.B. APZ, oder andere bei in vivo Versuchen mögliche Faktoren Einfluss auf die Versuche haben konnten. In vivo stellt sich die Situation naturgemäß viel komplexer dar, hier könnten also auch DX5⁺NKT-Zellen unter bestimmten Bedingungen eine gewisse Fas-Ligand-unabhängige Zytotoxizität besitzen. In vitro konnten Wingender et al. die Zytotoxizität der iNKT-Zellen gegenüber CD1d⁺ B16 Melanomzellen durch die Zugabe von anti-FasL zu den Co-Kulturen auf ca. die Hälfte reduzieren. Dass die Zytotoxizität nicht vollständig unterbunden wurde, kann mehrere Gründe haben. Zum einen wurden von Wingender et al. für die Co-Kulturen Milzzellen verwendet, die durch eine MACS NK1.1-Positivselektion mit NKT-Zellen angereichert wurden. Da auch NK-Zellen NK1.1 exprimieren, könnte also auch ein gewisser Anteil an NK-Zellen in den Co-Kulturen vorhanden gewesen sein. Diese NK-Zellen könnten nun z.B. über einen Perforin/Granzym-abhängigen Mechanismus ebenfalls

zytotoxisch auf die CD1d⁺ B16 Melanomzellen eingewirkt haben. Dagegen spricht zwar, dass gegen die CD1d⁻ B16 Melanomzellen keine Zytotoxizität beobachtet wurde. Allerdings könnte das an der mangelnden Aktivität der vorhandenen NK-Zellen gelegen haben. Für diese wurde nämlich eine Perforin-abhängige Zytotoxizität gegen Tumorzellen nach Aktivierung durch iNKT-Zellen, welche ihrerseits durch α GalCer aktiviert wurden, beschrieben¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. In Co-Kulturen mit CD1d⁻ B16 Melanomzellen werden iNKT-Zellen nicht aktiviert und damit kann hier auch keine Transaktivierung von NK-Zellen erfolgen. Generell wurde schon mehrfach beschrieben, dass NK-Zellen durch IFN- γ , welches von mit α GalCer stimulierten iNKT-Zellen sezerniert wurde, zu Zytotoxizität und Zytokin-Produktion angeregt werden¹⁴⁷⁻¹⁵¹. Zum anderen könnten die CD1d⁺ B16 Melanomzellen generell für andere zytotoxische Mechanismen der iNKT-Zellen empfänglich sein, so z.B. TRAIL- oder TNF- α -abhängige Mechanismen, auch wenn TRAIL von Wingender et al. auf den iNKT-Zellen durchflusszytometrisch nicht nachgewiesen werden konnte. Granzym B oder Perforin-Produktion seitens stimulierter iNKT-Zellen konnten Wingender et al. ebenfalls nicht nachweisen. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die iNKT-Zellen bereits zytotoxisch auf die CD1d⁺ B16 Melanomzellen eingewirkt haben, bevor der zugegebene anti-FasL den Fas-Ligand der iNKT-Zellen vollständig blockieren konnte. Um dies auszuschließen wurden die DX5⁺iNKT-Zellen in den vorliegenden Versuchen bereits vor Ansetzen der Co-Kulturen mit anti-FasL inkubiert. Außerdem besteht noch die Möglichkeit, dass die von Wingender et al. eingesetzte Konzentration von anti-FasL nicht zur vollständigen Blockade von Fas-Ligand der iNKT-Zellen ausreichte. Wingender et al. setzten anti-FasL in der Konzentration 20 μ g/ml ein, während sie in den vorliegenden Versuchen 50 μ g/ml betrug.

Der geringe Rest an Zytotoxizität der iNKT-Zellen gegen B-Zellen in den in vivo Versuchen könnte, wie von Wingender et al. vermutet, ebenfalls über einen FasLigand-unabhängigen Mechanismus stattfinden, oder auf, wie zuvor beschrieben, zytotoxische Effekte von durch die iNKT-Zellen aktivierten NK-Zellen zurückgehen. Allerdings spricht hier wiederum dagegen, dass die Zytotoxizität in Perforin^{-/-} knockout Mäusen, in den Versuchen von Wingender et al. unverändert blieb. Dies wäre jedoch der zu erwartende

Mechanismus bei einer Beteiligung transaktivierter NK-Zellen.

Wingender et al. zeigten in ihrer Arbeit nicht nur eine Fas-Ligand-Abhängigkeit der Zytotoxizität von iNKT-Zellen, sondern auch, dass hierfür auch tatsächlich eine Interaktion von Fas-Ligand der iNKT-Zellen und Fas-Rezeptor der B-Zellen stattfinden muss, da die Zytotoxizität jeweils bei Fehlen von Fas-Ligand bzw. Fas-Rezeptor auf einen geringen Rest reduziert war. Für die vorliegende Arbeit wurde ein direkter Nachweis für eine solche Interaktion zwischen Fas-Ligand der DX5⁺NKT-Zellen und Fas-Rezeptor der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nicht erbracht. Allerdings ist von einer solchen Interaktion auszugehen, da für T-Zellen wie für B-Zellen Apoptose via Interaktion von Fas-Ligand mit Fas-Rezeptor bekannt ist ^{152,153}.

Weiterführende Versuche mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen aus Fas^{-/-} knockout Mäusen könnten zur Klärung dieser Frage dienlich sein. Man würde hier keine pro-apoptischen Effekte der DX5⁺NKT-Zellen auf die CD4⁺CD62L_{high}-Zellen, die keinen Fas-Rezeptor exprimieren, erwarten. Diese Untersuchungen könnten jedoch nicht die Frage klären, ob von DX5⁺NKT-Zellen sezernierter, löslicher Fas-Ligand an der Vermittlung der Zytotoxizität beteiligt ist, da auch dieser mit Fas-Rezeptoren interagieren und so pro-apoptisch auf Fas-Rezeptor-exprimierende Zellen wirken kann ^{153,154}. Auch die Versuche von Wingender et al. konnten die Möglichkeit einer Beteiligung von löslichem Fas-Ligand nicht vollkommen ausschließen. Allerdings zeigten diese eine deutliche Korrelation zwischen CD1d-Expression verschiedener Zielzellen und deren Empfindlichkeit für den zytotoxischen Effekt der iNKT-Zellen ⁷⁹. Dies deutet darauf hin, dass Zell-Zell-Kontakte zwischen iNKT-Zellen und den jeweiligen Zielzellen notwendig sind. Ein Beweis für eine direkte Interaktion von membrangebundenem Fas-Ligand der iNKT-Zellen mit Fas-Rezeptor der B-Zellen wurde dadurch jedoch nicht erbracht. Frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten anhand eines Transwell-Assays, dass für den zytotoxischen Effekt von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen Zell-Zell-Kontakte notwendig sind. In Co-Kulturen mit DX5⁺NKT-Zellen verringerte sich hier die Anzahl der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen gegenüber deren Mono-Kulturen nach 72 Stunden signifikant. Wurden die DX5⁺NKT-Zellen durch eine semipermeable Membran von den CD4⁺CD62L_{high}-Zellen

getrennt, war die Anzahl der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen nach 72 Stunden unverändert ¹⁰⁴. Auch dies deutet darauf hin, dass eine direkte Interaktion zwischen membrangebundenem Fas-Ligand der DX5+NKT-Zellen und Fas-Rezeptor der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen für den zytotoxischen Effekt notwendig sein könnte.

7 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass DX5⁺NKT-Zellen in vitro die Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen hemmen können. In einem nächsten Schritt wurde dann ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus für diese Wirkung aufgedeckt. Hierbei konnten Veränderungen in der Produktion von IL-2 oder IFN- γ als mögliche Ursache weitgehend ausgeschlossen werden. Stattdessen konnte ein Fas-Ligand-abhängiger, pro-apoptotischer Effekt von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen als ursächlich identifiziert werden. DX5⁺NKT-Zellen exprimieren in Co-Kulturen mit CD4⁺CD62L_{high}-Zellen vermehrt Fas-Ligand, während in den CD4⁺CD62L_{high}-Zellen die Aktivität von Caspase-3 gesteigert ist, was als klares Zeichen für apoptotische Vorgänge in diesen Zellen gewertet werden kann. Wurde Fas-Ligand der DX5⁺NKT-Zellen blockiert, kam es auch zu keiner Aktivitätssteigerung von Caspase-3 in den CD4⁺CD62L_{high}-Zellen. Dieses Ergebnis dürfte somit die Schlussfolgerung unterstützen, dass die pro-apoptotische Wirkung der DX5⁺NKT-Zellen in vitro Fas-Ligand-abhängig ist. In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse und unter Berücksichtigung der gängigen Literatur kann man sich folgende Hypothese vorstellen: Nach Stimulation der DX5⁺NKT-Zellen erhöht sich die Dichte von Fas-Ligand auf deren Zelloberfläche. Mit diesem binden sie dann an Fas-Rezeptor auf der Zelloberfläche von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen. Durch die Interaktion von Fas-Ligand mit dem Fas-Rezeptor kommt es in den CD4⁺CD62L_{high}-Zellen zur Initialisierung der Apoptose (Abbildung 1-3), was mit einer Aktivitätssteigerung der Caspase-3 einhergeht. Eventuell wird diese pro-apoptotische Wirkung der DX5⁺NKT-Zellen unterstützt durch deren initiale, starke Produktion von IFN- γ und IL-2, da IFN- γ zur Induktion von Fas-Ligand-abhängigen Mechanismen und eine wiederholte Stimulation von CD4⁺-Zellen mit IL-2 zu einer verstärkten Sensibilität dieser Zellen für Fas-Rezeptor-induzierte Apoptose führen kann.

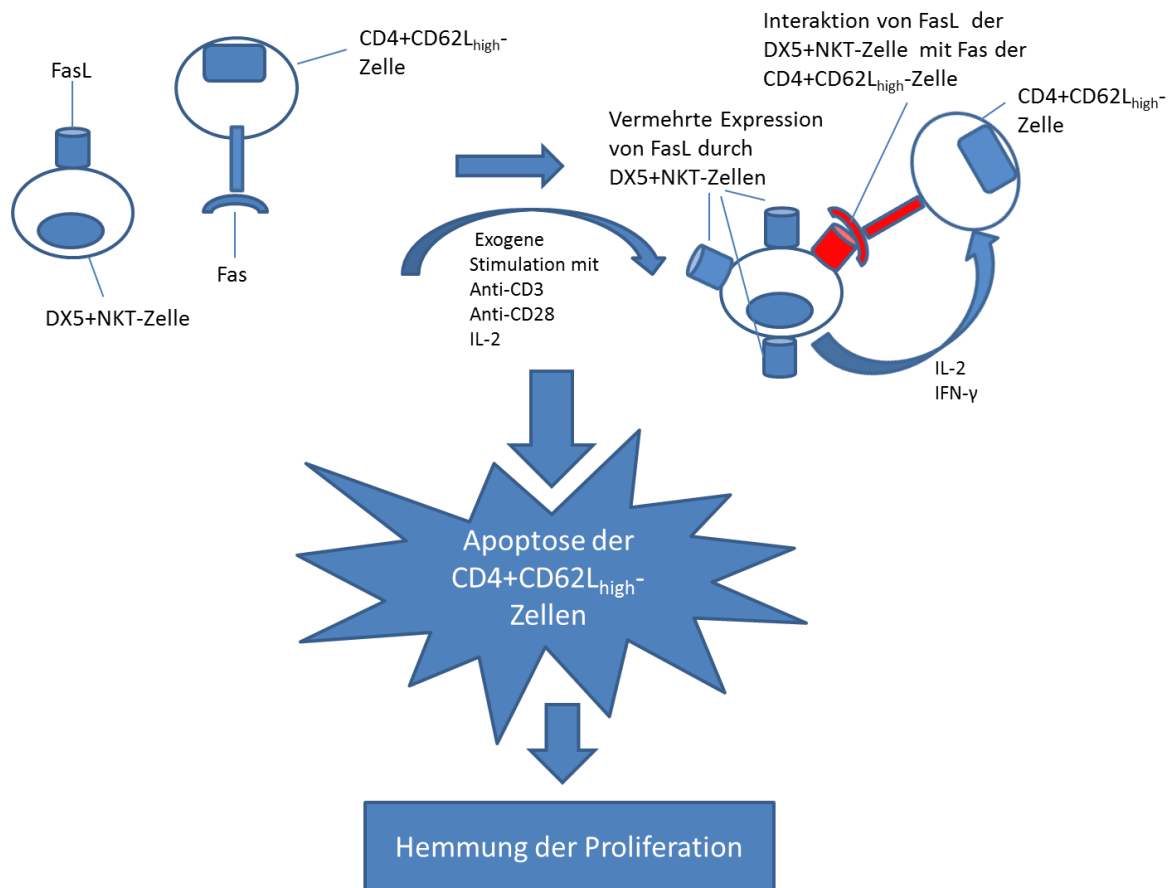


Abbildung 7-23: DX5⁺NKT-Zellen hemmen die Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}⁻Zellen durch einen FasL-abhängigen, pro-apoptischen Effekt.

DX5⁺NKT-Zellen erhöhen nach Stimulation in Co-Kultur mit CD4⁺CD62L_{high}⁻Zellen die Expression von Fas-Ligand an ihrer Zelloberfläche. Dieser interagiert mit Fas-Rezeptor der CD4⁺CD62L_{high}⁻Zellen, was zur Aktivitätssteigerung von Caspase-3 in deren Zytoplasma und somit zu deren Apoptose führt. Infolgedessen wird die Proliferation der CD4⁺CD62L_{high}⁻Zellen gehemmt.

Zur Sicherung dieser Hypothese wären verschiedene Forschungsprojekte denkbar. Zunächst könnte man einen direkten Zusammenhang zwischen pro-apoptischen und proliferationshemmenden Effekten der DX5⁺NKT-Zellen auf die CD4⁺CD62L_{high}⁻Zellen untersuchen. Dazu müsste man feststellen, ob durch eine Unterdrückung der pro-apoptischen Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}⁻Zellen auch der

proliferationshemmende Effekt unterdrückt wird.

Ebenfalls offen blieb die Frage, ob für die pro-apoptischen Wirkungen der DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen Zell-Zell-Kontakte notwendig sind. Zur Überprüfung dieser Frage könnte ein Transwell-Assay dienen, bei dem die DX5⁺NKT-Zellen von den CD4⁺CD62L_{high}-Zellen in Co-Kultur durch eine semipermeable Membran getrennt würden. Außerdem besteht noch die Möglichkeit, dass Fas-Ligand der DX5⁺NKT-Zellen nicht nur mit Fas-Rezeptor der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen interagiert, sondern auch mit einem alternativen Rezeptor. Dies könnte z.B. durch Verwendung von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen aus Fas^{-/-} knockout Mäusen oder durch Blockade von Fas-Rezeptor der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen vor Ansetzen der Co-Kulturen untersucht werden.

Durch den hier dargestellten Mechanismus könnten auch in vivo CD4⁺CD62L_{high}-Zellen an einer überschießenden Proliferation nach Antigenkontakt gehindert werden und auf diese Weise die in früheren Versuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigte Unterdrückung einer durch CD4⁺CD62L_{high}-Zellen erzeugten Transferkolitis durch DX5⁺NKT-Zellen funktionieren. Zum Beweis eines solchen Zusammenhanges könnte in zukünftigen Versuchen beispielsweise eine Kombination des in dieser Arbeit angewandten CFSE-Proliferationsassays mit einem etablierten Transferkolitismodell genutzt werden. Eine Möglichkeit wäre z.B., CD4⁺CD62L_{high}-Zellen mit CFSE zu färben und mit bzw. ohne Co-Transfer von DX5⁺NKT-Zellen in SCID-Mäuse zu transfundieren. Nach einer Inkubationszeit von mehreren Tagen könnte man versuchen, eine Zellsuspension aus der Dickdarmmukosa der Tiere zu gewinnen. Hierin sollten sich die CFSE-gefärbten, Kolitis-induzierenden CD4⁺CD62L_{high}-Zellen angereichert haben. Analog den für diese Arbeit durchgeführten in vitro Versuchen könnte anschließend die Proliferation der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen aus Mäusen mit bzw. ohne Co-Transfusion von DX5⁺NKT-Zellen in einem FACS-Analysegerät gemessen und miteinander verglichen werden. Eine Trennung der CD4⁺CD62L_{high}-Zellen von anderen Zellen der Dickdarmmukosa wäre hierbei prinzipiell nicht nötig, da sich die CFSE-gefärbten CD4⁺CD62L_{high}-Zellen problemlos im FACS-Analysegerät identifizieren ließen. Gleichzeitig könnte die Entwicklung einer Transferkolitis in Mäusen mit bzw. ohne Co-Transfusion von

DX5⁺NKT-Zellen z.B. mit Hilfe eines histologischen Scores vergleichend untersucht werden. So könnte ein Zusammenhang zwischen Hemmung der Proliferation von CD4⁺CD62L_{high}-Zellen durch DX5⁺NKT-Zellen in vivo und Unterdrückung einer Transferkolitis aufgezeigt werden.

Insgesamt lässt sich sagen, dass mit dem Nachweis der Fas-Ligand-abhängigen, pro-apoptischen Wirkung von DX5⁺NKT-Zellen auf CD4⁺CD62L_{high}-Zellen ein wichtiger Mechanismus aufgedeckt werden konnte. Die Ergebnisse lassen sich gut in die aktuelle Literatur einbetten und lassen Raum für eine Reihe von Folgeversuchen zur Untersuchung weiterer Details der beteiligten Mechanismen sowie einer möglichen Übertragbarkeit auf in vivo Versuchsbedingungen.

8 Zusammenfassung

Die Therapie von Autoimmunerkrankungen stellt ein wichtiges medizinisches Feld dar. Bisher gibt es für die Behandlung dieser Erkrankungen in erster Linie Therapiemöglichkeiten via Immunsuppressiva, die jedoch oft mit schweren Nebenwirkungen verbunden sind. Zudem müssen solche Medikamente oft dauerhaft eingenommen werden, da sie keine kausale Therapie darstellen und nur zeitweilig das Immunsystem unterdrücken.

NKT-Zellen besitzen ein großes, immunregulatorisches Potential und wurden bereits erfolgreich in diversen Mausmodellen gegen verschiedene Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Einer der Vorteile, NKT-Zellen zu therapeutischen Zwecken zu nutzen, wäre, dass sie einen regulären Bestandteil des Immunsystems darstellen und dieses somit dauerhaft regulieren können. Außerdem unterdrücken sie das Immunsystem nicht als Ganzes, sondern greifen regulatorisch ein, wenn Teile des Immunsystems in ein Ungleichgewicht geraten sind. Somit wären von einer NKT-Zell-gestützten Therapie auch vergleichsweise wenige, allgemeine Nebenwirkungen zu erwarten. Allerdings ist noch relativ wenig darüber bekannt, wie diese Zellpopulation im Einzelnen regulatorisch auf das Immunsystem einwirkt. Es wurden in der Vergangenheit bereits proliferationshemmende und zytotoxische bzw. pro-apoptotische Wirkungen von NKT-Zellen auf verschiedene, autoreaktive Zellen beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe beschäftigte sich in der Vergangenheit mit der Unterdrückung einer durch $CD4^+CD62L_{high}$ -Lymphozyten in SCID-Mäusen verursachten Transferkolitis durch den Co-Transfer von $DX5^+$ NKT-Zellen, welche eine Subpopulation der NKT-Zellen darstellen. Als mögliche Ursache für diesen Effekt wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst proliferationshemmende Wirkungen von $DX5^+$ NKT-Zellen auf $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen in vitro nachgewiesen. Daraufhin wurde ein zugrundeliegender Mechanismus evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass der anti-proliferative Effekt der $DX5^+$ NKT-Zellen auf die Induktion von Apoptosevorgängen in den $CD4^+CD62L_{high}$ -Zellen zurückzuführen ist, da ein deutlicher Anstieg der Caspase-3 Aktivität detektiert wurde. Hierbei wurde gleichzeitig eine vermehrte Expression von Fas-

Ligand der DX5⁺NKT-Zellen beobachtet. Ferner konnte der pro-apoptische der DX5⁺NKT-Zellen Zellen durch Blockade von Fas-Ligand mittels eines spezifischen Antikörpers aufgehoben werden. Diese Ergebnisse legen daher die Vermutung nahe, dass der pro-apoptische und somit anti-proliferative Effekt der DX5⁺NKT-Zellen über eine Aktivierung des Fas-Ligand-Fas-Rezeptor Komplexes vermittelt wird. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Beobachtungen zu den DX5⁺NKT-Zellen lassen sich gut mit aktuellen Veröffentlichungen über die zytotoxische Wirkungsweise von anderen NKT-Zell-Populationen in Einklang bringen. In zukünftigen Forschungsprojekten könnte eine Übertragbarkeit der Ergebnisse auf in vivo Versuchsbedingungen überprüft werden. Ein interessanter zukünftiger therapeutischer Ansatz bei Autoimmunerkrankungen wäre dementsprechend, nicht nur Immunsuppressiva einzusetzen, sondern die körpereigenen immunregulatorischen Zellen zu nutzen

9 Literaturverzeichnis

1. Gerd-Rüdiger Burmester. Taschenatlas der Immunologie. Grundlagen, Labor, Klinik. [Thieme, Stuttgart; 2. Auflage (2006) ISBN 3-13-115382-2].
2. Ezekowitz RAB, Hoffmann JA. Innate immunity. [Curr Opin Immunol. 1996 Feb 1; 8(1):1-2].
3. Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. [Science. 1996 Apr 5;272(5258):54-60].
4. Kamradt T, Ferrari-Kühne K. Das adaptive Immunsystem. [Dtsch Med Wochenschr. 2011 Aug;136(33):1678-83].
5. Dale I. Godfrey, Kirsten J.L. Hammonda, Lynn D. Poultonb, Mark J. Smythc, Alan G. Baxter. NKT cells: facts, functions and fallacies [Immunology Today Volume 21, Issue 11, 1 November 2000, Pages 573-583].
6. Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. How specific should immunological memory be? [J Immunol. 1999 Jul 15; 163(2):569-75].
7. Wilson SB, Delovitch TL. Janus-like role of regulatory iNKT cells in autoimmune disease and tumor immunity. [Nat Rev Immunol. 2003 Mar 3 (3):211-22.].
8. Van Kaer L, Joyce S. Innate immunity: NKT cells in the spotlight. [Curr Biol. 2005 Jun 7 15 (11):R429-31.].
9. Anna Balato, Derya Unutmaz and Anthony A Gaspari. Natural Killer T Cells: An Unconventional T-Cell Subset with Diverse Effector and Regulatory Functions. [Journal of Investigative Dermatology (2009) 129, 1628–1642].
10. Taniguchi M, Harada M, Kojo S, Nakayama T, Wakao H. The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response. [Annu Rev Immunol.2003;21:483 -513. Epub 2001 Dec 19].
11. Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH,

Pardoll DM. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes, which predominantly expresses a single V beta gene family. [Nature. 1987 Sep 17-23 329(6136):251-4].

12. Budd RC, Miescher GC, Howe RC, Lees RK, Bron C, MacDonald HR. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. [J Exp Med. 1987 Aug 1, 166(2):577-82].

13. Yasuhiko Makino, Rieko Kanno, Toshihiro Ito, Kazuko Higashino and Masaru Taniguchi. Predominant expression of invariant V α 14+ TCR α chain in NK1.1+ T cell populations. [International Immunology Volume 7, Issue 7 Pp. 1157-1161].

14. Dale I. Godfrey, H. Robson MacDonald, Mitchell Kronenberg, Mark J. Smyth & Luc Van Kaer. NKT cells: what's in a name? [Nature Reviews Immunology 4, 231-237 (March 2004)].

15. Arase H, Saito T, Phillips JH, Lanier LL. Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2). [J Immunol. 2001 Aug 1; 167(3):1141-4].

16. Behar SM, Podrebarac TA, Roy CJ, Wang CR, Brenner MB. Diverse TCRs recognize murine CD1. [J Immunol. 1999 Jan 1; 162(1):161-7].

17. Chiu YH, Jayawardena J, Weiss A, Lee D, Park SH, Dautry-Varsat A, Bendelac A. Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments. [J Exp Med. 1999 Jan 4; 189(1):103-10].

18. Cardell S, Tangri S, Chan S, Kronenberg M, Benoist, C., Mathis D. CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice. [J Exp Med. 1995 Oct 1; 182(4):993-1004].

19. Park SH, Weiss A, Benlagha K, Kyin T, Teyton L, Bendelac A. The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families. [J Exp Med. 2001 Apr 16; 193(8):893-904].

20. Sköld M, Faizunnessa NN, Wang CR, Cardell S. CD1d-specific NK1.1+ T cells with a

transgenic variant TCR. [J Immunol. 2000 Jul 1; 165(1):168-74].

21. Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, Smyth MJ, van Driel IR, Scollay R, Baxter AG, Godfrey DI. NKT cells are phenotypically and functionally diverse. [Eur J Immunol. 1999 Nov; 29(11):3768-81].

22. Eberl G, Lees R, Smiley ST, Taniguchi M, Grusby MJ, MacDonald HR. Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells. [J Immunol. 1999 Jun 1; 162(11):6410-9].

23. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. [J Exp Med. 1994 September 1; 180(3): 1097–1106].

24. Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. [J Exp Med. 1997 Jul 7; 186(1):109-20].

25. Brigl M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. [Annu Rev Immunol. 2004; 22:817-9].

26. Burdin N, Brossay L, Degano M, Iijima H, Gui M, Wilson IA, Kronenberg M. Structural requirements for antigen presentation by mouse CD1. [Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Aug 29; 97(18):10156-61].

27. Burdin N, Kronenberg M. CD1-mediated immune responses to glycolipids. [Curr Opin Immunol. 1999 Jun; 11(3):326-31].

28. Zajonc DM, Wilson IA. Architecture of CD1 proteins. [Curr Top Microbiol Immunol. 2007; 314:27-50].

29. Catherine Angénioux et al. The Cellular Pathway of CD1e in Immature and Maturing Dendritic Cells. [Traffic Volume 6, Issue 4, pages 286–302, April 2005].

30. P W Canchis, A K Bhan, S B Landau, L Yang, S P Balk, and R S Blumberg. Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d. [Immunology. 1993 December; 80(4): 561–565].

31. Peter A. Sieling. CD1-Restricted T Cells: T Cells with a Unique Immunological Niche. [Clinical Immunology Volume 96, Issue 1, July 2000, Pages 3- 10].
32. Christopher C. Dascher, Michael B. Brenner. Evolutionary constraints on CD1 structure: insights from comparative genomic analysis. [Trends in Immunology Volume 24, Issue 8, August 2003, Pages 412-418].
33. Jenny E. Gumperz. The Ins and Outs of CD1 Molecules: Bringing Lipids under Immunological Surveillance. [Traffic Volume 7, Issue 1, pages 2–13, January 2006].
34. Fox LM, Cox DG, Lockridge JL, Wang X, Chen X, Scharf L, Trott DL, Ndonge RM, Veerapen N, Besra GS, Howell AR, Cook ME, Adams EJ, Hildebrand WH, Gumperz JE. Recognition of lyso-phospholipids by human natural killer T lymphocytes. [PLoS Biol. 2009 Oct; 7(10)].
35. Patrick J Brennan, Raju V V Tatituri, Manfred Brigl, Edy Y Kim, Amit Tuli, Joseph P Sanderson, Stephan D Gadola, Fong-Fu Hsu, Gurdyal S Besra & Michael B Brenner. Invariant natural killer T cells recognize lipid self antigen induced by microbial danger signals. [Nature Immunology 12, 1202–1211 (2011)].
36. Brigl M, Tatituri RV, Watts GF, Bhowruth V, Leadbetter EA, Barton N, Cohen NR, Hsu FF, Besra GS, Brenner MB. Innate and cytokine-driven signals, rather than microbial antigens, dominate in natural killer T cell activation during microbial infection. [J Exp Med. 2011 Jun 6; 208(6):1163-77].
37. McCarthy C, Shepherd D, Fleire S, Stronge VS, Koch M, Illarionov PA, Bossi G, Salio M, Denkberg G, Reddington F, Tarlton A, Reddy BG, Schmidt RR, Reiter Y, Griffiths GM, van der Merwe PA, Besra GS, Jones EY, Batista FD, Cerundolo V. The length of lipids bound to human CD1d molecules modulates the affinity of NKT cell TCR and the threshold of NKT cell activation. [J Exp Med. 2007 May 14; 204(5):1131-44. Epub 2007 May 7].
38. Hong S, Scherer DC, Singh N, Mendiratta SK, Serizawa I, Koezuka Y, Van Kaer L. Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout

mice. [Immunol Rev. 1999 Jun; 169:31-44].

39. Yoshihiro Hayakawa et al. Critical contribution of IFN- γ and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of α -galactosylceramide. [European Journal of Immunology Volume 31, Issue 6, pages 1720–1727, June 2001].

40. Sidobre S, Naidenko OV, Sim BC, Gascoigne NR, Garcia KC, Kronenberg M. The V alpha 14 NKT cell TCR exhibits high-affinity binding to a glycolipid/CD1d complex. [J Immunol. 2002 Aug 1; 169(3):1340-8].

41. Terabe M, Swann J, Ambrosino E, Sinha P, Takaku S, Hayakawa Y, Godfrey DI, Ostrand-Rosenberg S, Smyth MJ, Berzofsky JA. A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. [J Exp Med. 2005 Dec 19; 202(12):1627-33].

42. Duarte N, Stenström M, Campino S, Bergman ML, Lundholm M, Holmberg D, Cardell SL. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice mediated by CD1d-restricted nonclassical NKT cells. [J Immunol. 2004 Sep 1; 173(5):3112-8].

43. Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey D. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1 (-) CD4 (+) CD1d-dependent precursor stage. [J Exp Med. 2002 Apr 1; 195(7):835-44].

44. Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, Kronenberg M. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. [Nat Immunol. 2001 Oct;2(10):971-8].

45. Benlagha K, Wei DG, Veiga J, Teyton L, Bendelac A. Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. [J Exp Med. 2005 Aug 15; 202(4):485-92. Epub 2005 Aug 8].

46. MacDonald HR, Mycko MP. Development and selection of Valpha 14i NKT cells. [Curr Top Microbiol Immunol. 2007; 314:195-212].

47. Prussin C, Foster B. TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. [J Immunol. 1997 Dec 15; 159(12):5862-70].

48. Norris S, Doherty DG, Collins C, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C. Natural T cells in the human liver: cytotoxic lymphocytes with dual T cell and natural killer cell phenotype and function are phenotypically heterogeneous and include V α 24-J α Q and $\gamma\delta$ T cell receptor bearing cells. [Human Immunology Volume 60, Issue 1, January 1999, Pages 20-31].
49. Benlagha K, Bendelac A. CD1d-restricted mouse V alpha 14 and human V alpha 24 T cells: lymphocytes of innate immunity. [Semin Immunol. 2000 Dec; 12(6):537-42].
50. Matsuda JL, Gapin L, Baron JL, Sidobre S, Stetson DB, Mohrs M, Locksley RM, Kronenberg M. Mouse V α 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. [Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jul 8; 100(14):8395-400].
51. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, Kronenberg M, Locksley RM. Constitutive Cytokine mRNAs Mark Natural Killer (NK) and NK T Cells Poised for Rapid Effector Function. [J Exp Med. 2003 Oct 6; 198(7):1069-76].
52. Crowe NY, Uldrich AP, Kyparissoudis K, Hammond KJ, Hayakawa Y, Sidobre S, Keating R, Kronenberg M, Smyth MJ, Godfrey DI. Glycolipid Antigen Drives Rapid Expansion and Sustained Cytokine Production by NK T Cells. [The Journal of Immunology, 2003, 171: 4020-4027].
53. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. [J Clin Invest. 2004 November 15; 114(10): 1379–1388].
54. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. [J Exp Med. 2002 Mar 4; 195(5):637-41].
55. Lee PT, Putnam A, Benlagha K, Teyton L, Gottlieb PA, Bendelac A. Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis. [J Clin Invest. 2002 September 15; 110(6): 793–800].
56. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally Distinct Subsets of CD1d-restricted Natural Killer T Cells Revealed by CD1d Tetramer Staining. [J Exp Med. 2002 March 4; 195(5): 625–636].

57. Mitchell Kronenberg, Laurent Gapin. The unconventional lifestyle of NKT cells. [Nature Reviews Immunology 2, 557-568 (August 2002)].
58. Jens M Werner, Elisabeth Busl, Stefan A Farkas, Hans J Schlitt, Edward K Geissler, and Matthias Hornung. DX5+NKT cells display phenotypical and functional differences between spleen and liver as well as NK1.1-Balb/c and NK1.1+ C57Bl/6 mice. [BMC Immunol. 2011; 12: 26].
59. Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ. Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application. [Curr Med Chem. 2004 Jan; 11(2):241-52].
60. Schmiege J, Yang G, Franck RW, Tsuji M. Superior Protection against Malaria and Melanoma Metastases by a C-glycoside Analogue of the Natural Killer T Cell Ligand α -Galactosylceramide. [J Exp Med. 2003 December 1; 198(11): 1631–1641].
61. Miyake S, Yamamura T. Therapeutic potential of glycolipid ligands for natural killer (NK) T cells in the suppression of autoimmune diseases. [Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 2005 Sep; 5(3):315-22].
62. Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. [Nat Immunol. 2003 Dec; 4 (12):1230-7. Epub 2003 Oct 26].
63. Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. [J Immunol. 2007 Sep 15; 179(6):3452-629].
64. Im JS, Tapinos N, Chae GT, Illarionov PA, Besra GS, DeVries GH, Modlin RL, Sieling PA, Rambukkana A, Porcelli SA. Expression of CD1d molecules by human schwann cells and potential interactions with immunoregulatory invariant NK T cells. [J Immunol. 2006 Oct 15; 177(8):5226-35].
65. Gober MD, Fischelevich R, Zhao Y, Unutmaz D, Gaspari AA. Human Natural Killer T Cells Infiltrate into the Skin at Elicitation Sites of Allergic Contact Dermatitis. [J Invest

Dermatol. 2008 June; 128(6): 1460–1469].

66. Nakagawa R, Motoki K, Nakamura H, Ueno H, Iijima R, Yamauchi A, Tsuyuki S, Inamoto T, Koezuka Y. Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with EL-4 hepatic metastasis and its cytokine production. [Oncol Res. 1998; 10(11-12):561-8].

67. Nakagawa R, Serizawa I, Motoki K, Sato M, Ueno H, Iijima R, Nakamura H, Shimosaka A, Koezuka Y. Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KRN7000, in mice with the melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells. [Oncol Res. 2000; 12(2):51-8].

68. Tetsu Kawano, Toshinori Nakayama, Noriaki Kamada, Yoshikatsu Kaneko, Michishige Harada, Nobutaka Ogura, Yasunori Akutsu, Shinichiro Motohashi, Toshihiko Iizasa, Hideharu Endo, Takehiko Fujisawa, Hiroshi Shinkai, and Masaru Taniguchi. Antitumor Cytotoxicity Mediated by Ligand-activated Human $V\alpha 24$ NKT Cells. [Cancer Res October 15, 1999 59; 5102].

69. Tetsu Kawano, Junqing Cui, Yasuhiko Koezuka, Isao Toura, Yoshikatsu Kaneko, Kazuhiro Motoki, Hitomi Ueno, Ryusuke Nakagawa, Hiroshi Sato, Eisuke Kondo, Haruhiko Koseki and Masaru Taniguchi. CD1d-Restricted and TCR-Mediated Activation of $V\alpha 14$ NKT Cells by Glycosylceramides. [Science 28 November 1997: Vol. 278 no. 5343 pp. 1626- 1629].

70. Leonid S. Metelitsa, Olga V. Naidenko, Anita Kant, Hong-Wei Wu, Matthew J. Loza, Bice Perussia, Mitchell Kronenberg and Robert C. Seeger. Human NKT Cells Mediate Antitumor Cytotoxicity Directly by Recognizing Target Cell CD1d with Bound Ligand or Indirectly by Producing IL-2 to Activate NK Cells. [The Journal of Immunology, 2001, 167: 3114-3122].

71. Isao Toura, Tetsu Kawano, Yasunori Akutsu, Toshinori Nakayama, Takenori Ochiai and Masaru Taniguchi. Inhibition of Experimental Tumor Metastasis by Dendritic Cells Pulsed with α -Galactosylceramide. [The Journal of Immunology, 1999, 163: 2387-2391].

72. Ryusuke Nakagawa, Ikuko Nagafune, Yoshiko Tazunoki, Hiromi Ehara, Hitomi Tomura, Rieko Iijima, Kazuhiro Motoki, Masaru Kamishohara and Shuhji Seki. Mechanisms of the Antimetastatic Effect in the Liver and of the Hepatocyte Injury Induced by α -Galactosylceramide in Mice. [The Journal of Immunology, 2001, 166: 6578-6584].
73. Tetsu Kawano, Junqing Cui, Yasuhiko Koezuka, Isao Toura, Yoshikatsu Kaneko, Hiroshi Sato, Eisuke Kondo, Michishige Harada, Haruhiko Koseki, Toshinori Nakayama, Yujiro Tanaka, and Masaru Taniguchi. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. [PNAS May 12, 1998 vol. 95 no. 10 5690-5693].
74. Mark J. Smyth, Nadine Y. Crowe and Dale I. Godfrey. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. [Int. Immunol. (2001) 13 (4): 459-463].
75. Morita M, Motoki K, Akimoto K, Natori T, Sakai T, Sawa E, Yamaji K, Koezuka Y, Kobayashi E, Fukushima H. Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. [J Med Chem. 1995 Jun 9; 38(12):2176-87].
76. Hidemitsu Kitamura, Kenji Iwakabe, Takashi Yahata, Shin-ichiro Nishimura, Akio Ohta, Yasushi Ohmi, Marimo Sato, Kazuyoshi Takeda, Ko Okumura, Luc Van Kaer, Tetsu Kawano, Masaru Taniguchi, and Takashi Nishimura. The Natural Killer T (NKT) Cell Ligand α -Galactosylceramide Demonstrates Its Immunopotentiating Effect by Inducing Interleukin (IL)-12 Production by Dendritic Cells and IL-12 Receptor Expression on NKT Cells. [April 5, 1999 // JEM vol. 189 no. 7 1121-1128].
77. Ryusuke Nakagawa, Kazuhiro Motoki, Hitomi Ueno, Rieko Iijima, Hiromi Nakamura, Eiichi Kobayashi, Akihiro Shimosaka, and Yasuhiko Koezuka. Treatment of hepatic metastasis of the Colon26 adenocarcinoma with an α -Galactosylceramide, KRN7000. [Cancer Res March 15, 1998 58; 1202].
78. Soichiro Ishihara, Mie Nieda, Joji Kitayama, Takuya Osada, Toshio Yabe, Akiko Kikuchi, Yasuhiko Koezuka, Steven A. Porcelli, Kenji Tadokoro, Hirokazu Nagawa and Takeo Juji. α -Glycosylceramides Enhance the Antitumor Cytotoxicity of Hepatic

Lymphocytes Obtained from Cancer Patients by Activating CD3-CD56+ NK Cells In Vitro. [The Journal of Immunology, 2000, 165: 1659-1664].

79. Gerhard Wingender, Philippe Krebs, Bruce Beutler and Mitchell Kronenberg. Antigen-Specific Cytotoxicity by Invariant NKT Cells In Vivo Is CD95/CD178-Dependent and Is Correlated with Antigenic Potency. [The Journal of Immunology September 1, 2010 vol. 185 no. 5 2721-2729].

80. Toshihiko Kawamura, Kazuyoshi Takeda, Sanjeev K. Mendiratta, Hiroki Kawamura, Luc Van Kaer, Hideo Yagita, Toru Abo and Ko Okumura. Cutting Edge: Critical Role of NK1+ T Cells in IL-12-Induced Immune Responses In Vivo. [The Journal of Immunology, 1998, 160: 16-19].

81. W Hashimoto, K Takeda, R Anzai, K Ogasawara, H Sakihara, K Sugiura, S Seki and K Kumagai. Cytotoxic NK1.1 Ag+ alpha beta T cells with intermediate TCR induced in the liver of mice by IL-12. [The Journal of Immunology, Vol 154, Issue 9 4333-4340].

82. R Anzai, S Seki, K Ogasawara, W Hashimoto, K Sugiura, M Sato, K Kumagai, and K Takeda. Interleukin-12 induces cytotoxic NK1+ alpha beta T cells in the lungs of euthymic and athymic mice. [Immunology. 1996 May; 88(1): 82–89].

83. K Takeda, S Seki, K Ogasawara, R Anzai, W Hashimoto, K Sugiura, M Takahashi, M Satoh and K Kumagai. Liver NK1.1+ CD4+ alpha beta T cells activated by IL-12 as a major effector in inhibition of experimental tumor metastasis. [The Journal of Immunology, Vol 156, Issue 9 3366-3373].

84. M Takahashi, K Ogasawara, K Takeda, W Hashimoto, H Sakihara, K Kumagai, R Anzai, M Satoh and S Seki. LPS induces NK1.1+ alpha beta T cells with potent cytotoxicity in the liver of mice via production of IL-12 from Kupffer cells. [The Journal of Immunology, Vol 156, Issue 7 2436-2442].

85. Kazuyoshi Takeda, Yoshihiro Hayakawa, Machiko Atsuta, Seokmann Hong, Luc Van Kaer, Kimio Kobayashi, Mamoru Ito, Hideo Yagita and Ko Okumura. Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. [Int. Immunol.

(2000) 12 (6): 909-914].

86. Junqing Cui, Tahiro Shin, Tetsu Kawano, Hiroshi Sato, Eisuke Kondo, Isao Toura, Yoshikatsu Kaneko, Haruhiko Koseki, Masamoto Kanno and Masaru Taniguchi. Requirement for V α 14 NKT Cells in IL-12-Mediated Rejection of Tumors. [Science 28 November 1997:Vol. 278 no. 5343 pp. 1623-1626].

87. Mark J. Smyth, Masaru Taniguchi and Shayna E. A. Street. The Anti-Tumor Activity of IL-12: Mechanisms of Innate Immunity That Are Model and Dose Dependent. [The Journal of Immunology, 2000, 165: 2665-2670].

88. Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. [Nature Reviews Immunology 2, 401-409 (June 2002)].

89. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. [Annu Rev Immunol. 2002; 20:323-70].

90. Krammer, Peter H. Apoptose. [Dt. Ärztebl 2000; 97: A-1752–1759; Heft 25].

91. Tetsu Kawano, Junqing Cui, Yasuhiko Koezuka, Isao Toura, Yoshikatsu Kaneko, Hiroshi Sato, Eisuke Kondo, Michishige Harada, Haruhiko Koseki, Toshinori Nakayama, Yujiro Tanaka, and Masaru Taniguchi. Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated V α 14 NKT cells. [PNAS May 12, 1998 vol. 95 no. 10 5690-5693].

92. Nicol A, Nieda M, Koezuka Y, Porcelli S, Suzuki K, Tadokoro K, Durrant S, Juji T. Human invariant V α 24+ natural killer T cells activated by α -galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. [Immunology. 2000 Feb;99(2):229-34].

93. Metelitsa LS, Weinberg KI, Emanuel PD, Seeger RC. Expression of CD1d by myelomonocytic leukemias provides a target for cytotoxic NKT cells. [Leukemia. 2003 Jun; 17 (6):1068-77].

94. Tsuyoshi Takahashi, Mie Nieda, Yasuhiko Koezuka, Andrew Nicol, Steven A. Porcelli, Yoshihide Ishikawa, Kenji Tadokoro, Hisamaru Hirai and Takeo Juji. Analysis of

Human $V\alpha 24^+$ $CD4^+$ NKT Cells Activated by α -Glycosylceramide-Pulsed Monocyte-Derived Dendritic Cells. [The Journal of Immunology, 2000, 164: 4458-4464].

95. Mattarollo SR, Kenna T, Nieda M, Nicol AJ. Chemotherapy pretreatment sensitizes solid tumor-derived cell lines to V alpha 24+ NKT cell-mediated cytotoxicity. [Int J Cancer. 2006 Oct 1; 119(7):1630-7].

96. Yoshikatsu Kaneko, Michishige Haradaa, Tetsu Kawanoa, Masakatsu Yamashitaa, Youichi Shibataa, Fumitake Gejyob, Toshinori Nakayamaa and Masaru Taniguchi. Augmentation of $V\alpha 14$ Nkt Cell-Mediated Cytotoxicity by Interleukin 4 in an Autocrine Mechanism Resulting in the Development of Concanavalin a-Induced Hepatitis. [January 3, 2000 // JEM vol. 191 no. 1 105-114].

97. Michael Nowak, Frank Kopp, Karin Roelofs-Haarhuis, Xianzhu Wu and Ernst Gleichmann. Oral Nickel Tolerance: Fas Ligand-Expressing Invariant NK T Cells Promote Tolerance Induction by Eliciting Apoptotic Death of Antigen-Carrying, Effete B Cells. [The Journal of Immunology, 2006, 176: 4581-4589].

98. Beaudoin L, Laloux V, Novak J, Lucas B, Lehuen A. NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. [Immunity. 2002 Dec; 17(6):725-36].

99. Judith A. Cain, Judith A. Smith, Jennifer K. Ondr, Bo Wang, and Jonathan D. Katz. NKT Cells and $IFN-\gamma$ establish the Regulatory Environment for the Control of Diabetogenic T cells in the Nonobese Diabetic Mouse. [The Journal of Immunology February 1, 2006 vol. 176 no. 3 1645-1654].

100. Stephen R. Mattarollo, Michelle Yong, Christina Gosmann, Allison Choyce, Dora Chan, Graham R. Leggatt and Ian H. Frazer. NKT Cells Inhibit Antigen-Specific Effector CD8 T cell Induction to Skin Viral Proteins. [The Journal of Immunology August 15, 2011 vol. 187 no. 4 1601-1608].

101. Jan Novak, Lucie Beaudoin, Thibault Griseri and Agnès Lehuen. Inhibition of T Cell Differentiation into Effectors by NKT Cells Requires Cell Contacts. [The Journal of

Immunology, 2005, 174: 1954-1961.].

102. Hammond KJ, Pellicci DG, Poulton LD, Naidenko OV, Scalzo AA, Baxter AG, Godfrey DI. CD1d-Restricted NKT Cells: An Interstrain Comparison. [The Journal of Immunology, 2001, 167: 1164-1173].

103. Yang Y, Ueno A, Bao M, Wang Z, Im JS, Porcelli S, Yoon JW. Control of NKT Cell Differentiation by Tissue-Specific Microenvironments. [J Immunol. 2003 Dec 1;171(11):5913-20].

104. Hornung M, Farkas SA, Sattler C, Schlitt HJ, Geissler EK. DX5+ NKT cells induce the death of colitis-associated cells: involvement of programmed death ligand-1. [Eur J Immunol. 2006 May; 36(5):1210-21].

105. Daniel G. Pellicci, Kirsten J. L. Hammond, Jonathan Coquet, Konstantinos Kyriakou, Andrew G. Brooks, Katherine Kedzierska, Rachael Keating, Stephen Turner, Stuart Berzins, Mark J. Smyth and Dale I. Godfrey. DX5/CD49b-Positive T Cells Are Not Synonymous with CD1d-Dependent NKT Cells. [The Journal of Immunology, 2005, 175: 4416-4425].

106. Angus M. Moodycliffe, Sourindra Maiti and Stephen E. Ullrich. Splenic NK1.1-Negative, TCR $\alpha\beta$ Intermediate CD4+ T Cells Exist in Naive NK1.1 Allelic Positive and Negative Mice, with the Capacity to Rapidly Secrete Large Amounts of IL-4 and IFN- γ Upon Primary TCR Stimulation. [The Journal of Immunology, 1999, 162: 5156-5163].

107. Antonio Gonzalez, Isabelle Andre-Schmutz, Claude Carnaud, Diane Mathis & Christophe Benoist. Damage control, rather than unresponsiveness, effected by protective DX5+ T cells in autoimmune diabetes. [Nature Immunology 2, 1117 - 1125 (2001)].

108. Keishi Adachi, Hiroko Tsutsui, Ekihiro Seki, Hiroki Nakano, Kazuyoshi Takeda, Ko Okumura, Luc Van Kaer and Kenji Nakanishi. Contribution of CD1d-unrestricted hepatic DX5+ NKT cells to liver injury in Plasmodium berghei-parasitized erythrocyte-injected mice. [International Immunology Volume 16, Issue 6 Pp. 787-798].

109. Louis-Marie Charbonnier, Leonie M. van Duivenvoorde, Florence Apparailly, Céline

Cantos, Wanda G. H. Han, Danièle Noël, Christophe Duperray, Tom W. J. Huizinga, René E. M. Toes, Christian Jorgensen, and Pascale Louis-Pence. Immature Dendritic Cells Suppress Collagen-Induced Arthritis by In Vivo Expansion of CD49b+ Regulatory T Cells. [The Journal of Immunology, 2006, 177: 3806-3813].

110. Yang Yang, Aito Ueno, Min Bao, Zhongying Wang, Jin Seon Im, Steven Porcelli and Ji-Won Yoon. Control of NKT Cell Differentiation by Tissue-Specific Microenvironments. [The Journal of Immunology, 2003, 171: 5913-5920].

111. Takuya Osada, corresponding author, Hirokazu Nagawa and Yoichi Shibata. Tumor-infiltrating effector cells of α -galactosylceramide-induced antitumor immunity in metastatic liver tumor. [Journal of Immune Based Therapies and Vaccines 2004, 2:7].

112. Costa RP, Gollob KJ, Machado PR, Bacellar OA, Almeida RP, Barral A, Barral-Netto M, Carvalho EM, Dutra WO. Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4+ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. [Immunol Lett. 2003 Dec 15; 90(2-3):155-9].

113. Colpitts SL, Dalton NM, Scott P. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of both CD62L^{high} central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. [J Immunol. 2009 May 1; 182(9):5702-11].

114. Mojgan Ahmadzadeh, S. Farzana Hussain and Donna L. Farber. Heterogeneity of the Memory CD4 T Cell Response: Persisting Effectors and Resting Memory T Cells. (The Journal of Immunology, 2001, 166: 926-935).

115. Eric B. Bell, Jürgen Westermann. CD4 memory T cells on trial: immunological memory without a memory T cell. [Trends in Immunology Volume 29, Issue 9, September 2008, Pages 405-411].

116. Smalley DM, Ley K. L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. [J Cell Mol Med. 2005 Apr-Jun;9(2):255-66].

117. Antje Klinger, Andreas Gebert, Katja Bieber, Kathrin Kalies, Ann Ager, Eric B. Bell and Jürgen Westermann. Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T

cells. [Int Immunol. 2009 Apr;21(4):443-55].

118. Stephen C. De Rosa, Leonard A. Herzenberg, Leonore A. Herzenberg & Mario Roederer. 11-color, 13-parameter flow cytometry: Identification of human naive T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. [Nature Medicine 7, 245 - 248 (2001)].

119. Roederer M, Raju PA, Mitra DK, Herzenberg LA, Herzenberg LA. HIV does not replicate in naive CD4 T cells stimulated with CD3/CD28. [J Clin Invest. 1997 Apr 1; 99(7):1555-64].

120. Abul K. Abbas, Kenneth M. Murphy & Alan Sher. Functional diversity of helper T lymphocytes. [Nature 383, 787 - 793 (31 October 1996)].

121. Morrissey PJ, Charrier K, Braddy S, Liggitt D, Watson JD. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. [J Exp Med. 1993 Jul 1; 178(1):237-44.].

122. Liberal R, Longhi MS, Mieli-Vergani G, Vergani D. Pathogenesis of autoimmune hepatitis. [Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2011 Dec;25 (6):653-64].

123. Mudter J, Wirtz S, Galle PR, Neurath MF. A new model of chronic colitis in SCID mice induced by adoptive transfer of CD62L+ CD4+ T cells: insights into the regulatory role of interleukin-6 on apoptosis. [Pathobiology. 2002-2003; 70(3):170-6.].

124. Banner DW, D'Arcy A, Janes W, Gentz R, Schoenfeld HJ, Broger C, Loetscher H, Lesslauer W. Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. [Cell 1993; 73: 431-445].

125. Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH. Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. [J Immunol 1992; 149: 3166-3173].

126. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. [EMBO J 1995; 14: 5579-5588].

127. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. [EMBO J 1998; 17: 1675–1687].
128. Dennert G, Podack ER. Cytolysis by H-2-specific T killer cells. Assembly of tubular complexes on target membranes. [J Exp Med. 1983 May 1; 157(5):1483-95].
129. Stinchcombe JC, Bossi G, Booth S, Griffiths GM. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges [Immunity. 2001 Nov; 15(5):751-61].
130. Browne KA, Blink E, Sutton VR, Froelich CJ, Jans DA, Trapani JA. Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. [Mol Cell Biol. 1999 Dec; 19(12):8604-15].
131. Pinkoski MJ, Hobman M, Heibein JA, Tomaselli K, Li F, Seth P, Froelich CJ, Bleackley RC. Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. [Blood. 1998 Aug 1; 92(3):1044-54].
132. Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibein JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gauldie J, Bleackley RC. Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. [Cell. 2000 Oct 27; 103(3):491-500].
133. Smith KA, Gillis S, Baker PE, McKenzie D, Ruscetti FW. T-cell growth factor-mediated T-cell proliferation. [Ann N Y Acad Sci. 1979;332:423-32].
134. Gattoni A, Parlato A, Vangieri B, Bresciani M, Derna R. Interferon-gamma: biologic functions and HCV therapy (type I/II) (2 of 2 parts). [Clin Ter. 2006 Sep-Oct;157(5):457-68].
135. Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. [Cancer Res. 1998 Jul 1; 58(13):2832-7].

136. Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. [Semin Immunol. 1997 Apr;9(2):87-92].
137. Wu D, Wang J, Pae M, Meydani SN. Green tea EGCG, T cells, and T cell-mediated autoimmune diseases. [Mol Aspects Med. 2012 Feb; 33(1):107-18].
138. Chan WL, Pejnovic N, Hamilton H, Liew TV, Popadic D, Poggi A, Khan SM. Atherosclerotic abdominal aortic aneurysm and the interaction between autologous human plaque-derived vascular smooth muscle cells, type 1 NKT, and helper T cells [Circ Res. 2005 Apr 1;96(6):675-83. Epub 2005 Feb 24].
139. Mars LT, Araujo L, Kerschen P, Diem S, Bourgeois E, Van LP, Carrié N, Dy M, Liblau RS, Herbelin A. Invariant NKT cells inhibit development of the Th17 lineage. [Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Apr 14; 106(15):6238-43].
140. Seung Hee Yang, Su Jin Kim, Nakkyung Kim, Ji Eun Oh, Jung Gil Lee, Nam Hyun Chung, Suhnggwon Kim, and Yon Su Kim. NKT Cells Inhibit the Development of Experimental Crescentic Glomerulonephritis [J Am Soc Nephrol. 2008 September; 19(9): 1663–1671].
141. Mübeccel Akdis, MD, PhD, Simone Burgler, PhD, Reto Cramer, PhD, Thomas Eiwegger, MD, Hiroyuki Fujita, MD, PhD, Enrique Gomez, PhD, Sven Klunker, PhD, Norbert Meyer, MD, Liam O'Mahony, PhD, Oscar Palomares, PhD, Claudio Rhyner, PhD, Nadia Quaked, PhD, Anna Schaffartzik, PhD, Willem Van De Veen, MSc, Sabine Zeller, PhD, Maya Zimmermann, PhD, and Cezmi A. Akdis, MD. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: Receptors, functions, and roles in diseases. [J Allergy Clin Immunol. 2011 Mar; 127(3):701-21.e1-70].
142. Cynthia A. Wenner, Mehmet Culer, Steven E. Macatonia, Anne O'Carra, and Kenneth M. Murphy. Roles of IFN-gamma and IFN-alpha in IL-12-induced T helper cell-1 development. [The Journal of Immunology February 15, 1996 vol. 156 no. 4 1442-1447].
143. Nelson BH. Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. [Curr Dir Autoimmun. 2002;5: 92-112].

144. Mie Nieda, Andrew Nicol, Yashuhiko Koezuka, Akiko Kikuchi, Natalia Lapteva, Yuji Tanaka, Katsushi Tokunaga, Kenji Suzuki, Nobuhiko Kayagaki, Hideo Yagita, Hisamaru Hirai, and Takeo Juji. TRAIL expression by activated human CD4+V α 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. [Blood April 1, 2001 vol. 97 no. 7 2067-2074].
145. Nadine Y. Crowe, Mark J. Smyth, and Dale I. Godfrey. A Critical Role for Natural Killer T Cells in Immunosurveillance of Methylcholanthrene-induced Sarcomas [J. Exp. Med. 196: 119–127].
146. Mark J. Smyth, Nadine Y. Crowe and Dale I. Godfrey. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. [Int Immunol. 2001 Apr;13 (4):459-63].
147. Mark J. Smyth, Nadine Y. Crowe, Daniel G. Pellicci, Konstantinos Kyparissoudis, Janice M. Kelly, Kazuyoshi Takeda, Hideo Yagita, and Dale I. Godfrey. Sequential production of interferon- γ by NK1.1+ T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of α -galactosylceramide. [Blood 99: 1259–1266].
148. Hayakawa, Y., K. Takeda, H. Yagita, S. Kakuta, Y. Iwakura, L. Van Kaer, I. Saiki, K. Okumura. Critical contribution of IFN- γ and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of α -galactosylceramide. [European Journal of Immunology Volume 31, Issue 6, pages 1720–1727, June 2001].
149. Kakimi, K., L. G. Guidotti, Y. Koezuka, F. V. Chisari. Natural Killer T Cell Activation Inhibits Hepatitis B Virus Replication in Vivo. [J. Exp. Med. 192: 921–930].
150. Carnaud, C., D. Lee, O. Donnars, S. H. Park, A. Beavis, Y. Koezuka, A. Bendelac. NKT Cells Rapidly Activate NK Cells. [J. Immunol. 163: 4647–4650].
151. Eberl, G., H. R. MacDonald. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. [Eur. J. Immunol. 30: 985–992].
152. Ju ST, Matsui K, Ozdemirli M. Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. [Int Rev Immunol. 1999;18(5-6):485-513].

153. Oberg HH, Lengl-Janssen B, Kabelitz D, Janssen O. Activation-induced T cell death: resistance or susceptibility correlate with cell surface fas ligand expression and T helper phenotype. [Cell Immunol. 1997 Oct 10; 181(1):93-100].

154. Linkermann A, Qian J, Lettau M, Kabelitz D, Janssen O. Considering Fas ligand as a target for therapy. [Expert Opin Ther Targets. 2005 Feb;9(1):119-34].

Danksagung

Besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Matthias Hornung für die Aufnahme in seine experimentelle Forschungsgruppe an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans Jürgen Schlitt, ferner für die Erstellung des Dissertationsthemas sowie für die hervorragende Betreuung der Dissertation. In diesem Zusammenhang möchte ich mich ebenfalls besonders bei Herrn PD Dr. med. Jens Werner für die exzellente Co-Betreuung und Korrektur der Dissertation bedanken. Er stand immer als Ansprechpartner zur Verfügung und war auch während seines Forschungsaufenthaltes in den USA stets für mich zu erreichen.

Bei Herrn Joachim Schweimer bedanke ich mich für die Einführung in diverse Methoden und Techniken im Labor, sowie für seine Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Außerdem möchte ich mich auch bei allen anderen Labormitarbeitern für ihre moralische und tatkräftige Unterstützung bedanken. Insbesondere gilt hier mein Dank den Mitarbeitern der AG Fichtner-Feigl und der AG Dahlke, die stets ein offenes Ohr für Probleme bei der Durchführung der Versuche hatten, oft mit diversen Labormaterialien aushalfen und bei Rückschlägen moralische Unterstützung boten. Hervorheben möchte ich dabei PD Dr. rer. nat. Elke Eggenhofer, die mir mit größter Geduld theoretische Sachverhalte erklärte und mich bei technischen Problemen unterstützte.

Großer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Institutes für Pathologie für das FACS-Sorting der DX5⁺NKT-Zellen, ohne das die vorliegenden Versuche nicht möglich gewesen wären. Zudem bedanke ich mich bei den Labormitarbeitern des Institutes für Anästhesie für den unkomplizierten Zugang zum FACS-Calibur und die Unterstützung bei dessen Benutzung.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich für die moralische Unterstützung.

Schließlich gilt mein größter Dank meinen Eltern, Monika und Alexander Damian, die mir mit absoluter Selbstverständlichkeit mein Studium der Humanmedizin ermöglichten, mir dabei stets vollkommenes Vertrauen entgegenbrachten und nie an mir zweifelten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Nachname Damian
Vornamen Michael Markus
Adresse Ahornstraße 15
68782 Brühl
Telefonnummer 0152/ 327 680 73
Email-Adresse miked68@web.de
Geburtsdatum/-ort 24.01.1985 in Regensburg
Familie Eltern:
Diplom-Ingenieur (univ.) Alexander Damian (*1948)
Monika Damian, geboren Braun (*1956)
Geschwister:
Diplom-Ingenieur (univ.) Alexander Damian (*1982)
Zivilstand Ledig

Schulische Ausbildung

1991-1993 Bartholomäus-Grundschule in Mannheim
1993-1995 Gustav-Wiederkehr-Grundschule in Mannheim
1995-2004 Peter-Petersen-Gymnasium in Mannheim
06/2004 Abitur (Note 1,4)
Sprachkenntnisse:
Englisch (fließend)
Spanisch (fließend)

Zivildienst

09/2004-05/2005 Krankenhaus Barmherzige Brüder Regensburg
Pflegerische Tätigkeit

Universitäre Ausbildung

<i>09/2005-06/2007</i>	Vorklinischer Abschnitt an der Universität Regensburg
<i>10/2007-10/2011</i>	Klinischer Abschnitt an der Universität Regensburg
<i>10/2011-11/2011</i>	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen) (Note 1,5; Gesamtnote Studium: 2,0)

Anstellung, Famulaturen, Praktisches Jahr

<i>03/2008-04/2008</i>	Famulatur in der Viszeral- und Transplantationschirurgie an der Universitätsklinik Regensburg
<i>09/2008</i>	Famulatur in einer internistisch geführten Praxis für hausärztliche Versorgung in Kelheim
<i>03/2009-04/2009</i>	Famulatur in der Unfallchirurgie, Clinica Sabana in Quepos, Costa Rica
<i>09/2009-10/2009</i>	Famulatur in der Inneren Medizin/ Gastroenterologie am Theresienkrankenhaus Mannheim
<i>03/2010-04/2010</i>	Famulatur in Allgemeinmedizin/Notfallmedizin, Hospital Dr. Thomas Casas Casajus, Ciudad Cortez, Costa Rica
<i>08/2010-12/2010</i>	PJ-Tertial in der Inneren Medizin an der Goldberg-Klinik Kelheim, Lehrkrankenhaus der Universität Regensburg
<i>12/2010-04/2011</i>	PJ-Tertial in der Chirurgie am Hospital Sotero del Rio, Universidad Catolica de Chile, Santiago de Chile
<i>04/2011-07/2011</i>	PJ-Tertial im Wahlfach Neurochirurgie an der Universitätsklinik Regensburg
<i>04/2012-10/2012</i>	Tätigkeit als Assistenzarzt an der Klinik für Unfallchirurgie und Orthopädie des Westpfalz-Klinikums Kaiserslautern
<i>03/2013-06/2017</i>	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Abteilung für Innere Medizin der GRN-Klinik Weinheim
<i>09/2017-11/2018</i>	Tätigkeit als Weiterbildungsassistent für Allgemeinmedizin im Hausarztzentrum Ludwigshafen

<i>01/2019-04/2019</i>	Tätigkeit als Weiterbildungsassistent für Allgemeinmedizin in der geriatrischen Schwerpunktpraxis Rhein-Neckar Dr. Hummel
<i>07/2019-10/2019</i>	Tätigkeit als Entlastungsassistent in der Praxis Dr. Hummel
<i>09/2019</i>	Facharztanerkennung als Facharzt für Allgemeinmedizin
<i>Seit 10/2019</i>	Tätigkeit als Facharzt für Allgemeinmedizin in der Praxis Dr. Hummel

Dissertation

<i>Seit 05/08</i>	Arbeiten an der Dissertation zum Thema „Proliferationshemmende und Fas-Ligand-abhängige, pro-apoptische Wirkungen von DX5+NKT-Zellen auf CD4+CD62Lhigh-T-Lymphozyten in vitro“
<i>Sport und Hobbies</i>	Tennis, Fitnesstraining, Alpinsport, Kochen, Reisen, SUP
