

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Hermann Einsele

**Stimulation von humanen $\gamma\delta$ T-Lymphozyten
durch Poly-Inosin-: Poly-Cytidyl-Säure (Poly (I:C))**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Eva Kretzschmar
aus Bozen / Italien

Würzburg, Juni 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Volker Kunzmann

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Herrmann

Dekan: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2007

Die Promovendin ist Ärztin.

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG.....	1
1. Simulation von Viruserkrankungen durch Poly (I:C)	1
2. $\gamma\delta$ T-Zellen.....	3
2.1. Antigene	4
2.2. Antigenerkennung und Aktivierung	8
2.3. Einfluss von Zytokinen auf die Aktivierung und Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen.....	10
2.4. Effektorfunktionen	11
2.4.1. Zytokin- und Chemokinproduktion.....	12
2.4.2. Zytotoxizität und Tumorabwehr	12
2.4.3. Beteiligung von $\gamma\delta$ T-Zellen an der Infektionsabwehr	14
2.4.3.1. Bakterielle und protozoonale Infektionen	14
2.4.3.2. Virale Infektionen	15
ZIELE DER UNTERSUCHUNG	19
MATERIAL UND METHODEN	20
1. Reagentien	20
1.1. $\gamma\delta$ T-Zell-spezifische Antigene und Mitogene	20
1.2. Zytokine	20
1.3. Neutralisierende Antikörper	21
2. Medien.....	21
2.1. Kultur- und Waschmedien.....	21
2.2. Klonierungsmedium.....	22
2.3. Medien für MACS	22
2.4. FACS- Puffer (zum Waschen).....	23
3. Antikörper.....	23
4. Normalspender-Zellen.....	23
5. Zellkultur von Suspensionszellen	23

6. Immunfluoreszenz.....	24
7. Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung.....	24
8. Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten.....	25
9. Gewinnung von unreifen dendritischen Zellen.....	26
10. MACS.....	26
11. Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen	28
12. Proliferationsassay	29
13. Klonierung	29
14. Zytokin-ELISA	30
ERGEBNISSE	32
1. Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung von mononukleären Zellen	32
1.1. Induktion von Aktivierungsmarkern auf $\gamma\delta$ T-Zellen	32
1.2. Induktion von Aktivierungsmarkern auf $\alpha\beta$ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und Monozyten.....	36
2. Untersuchung von weiteren Effektorfunktionen.....	39
2.1. Poly (I:C)-vermittelte Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen	39
2.2. Induktion von IFN- γ	42
2.2.1. ELISA.....	42
2.2.2. Intrazytoplasmatische Zytokinmessung	43
3. Mechanismus der Poly (I:C)-vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulation	44
3.1. Wirkung von Poly (I:C) auf $\gamma\delta$ T-Zell-Klone	44
3.2. Untersuchung indirekter Mechanismen auf die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T- Zell-Stimulation.....	46
3.2.1. Bedeutung verschiedener Subpopulationen.....	46
3.2.2. Effekt der Überstände von Poly (I:C)-stimulierten DCs	53
3.2.3. Wirkung Poly (I:C)-induzierter Zytokine.....	55
3.2.4. Poly (I:C)- vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung nach Hemmung von Zytokinen.....	59

4.	Bedeutung von verschiedenen Zellen und Zytokinen für die Poly (I:C)-vermittelte Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen	62
4.1.	Wirkung von CD11c-positiven Zellen, B-Zellen, $\alpha\beta$ T-Zellen und NK-Zellen.....	62
4.1.1.	CD11c-positive Zellen	62
4.1.2.	B-Zellen	65
4.1.3.	CD14-positive Zellen	66
4.1.4.	$\alpha\beta$ T-Zellen.....	68
4.1.5.	NK-Zellen	69
4.2.	Zytokine	71
4.2.1.	Wirkung von Überständen stimulierter iDCs	71
4.2.2.	Wirkung von Zytokinen	73
	DISKUSSION.....	75
1.	Kostimulation von PBL durch Poly (I:C).....	75
1.1.	Expression von Aktivierungsmarkern auf $\gamma\delta$ T-Zellen und Vergleich mit anderen mononukleären Zellen	75
1.2.	Bedeutung der CD69-Zunahme	77
1.3.	Effektorfunktionen von T-Zellen nach Aktivierung durch Poly (I:C).....	77
2.	Mechanismus der Poly (I:C) vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulierung.....	79
2.1.	Direkte Mechanismen	79
2.2.	Indirekte Mechanismen	81
2.2.1.	Induktion kostimulierender Moleküle durch Poly (I:C).....	81
2.2.2.	Kostimulation durch Bystanderzellen ($\alpha\beta$ T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen, CD11c-positive Zellen).....	82
2.2.3.	Kostimulation durch Zytokininduktion	86
	ZUSAMMENFASSUNG	91
	ABKÜRZUNGEN	92
	LITERATURVERZEICHNIS	96

EINLEITUNG

1. Simulation von Viruserkrankungen durch Poly (I:C)

Zur Abwehr von viralen Erkrankungen tragen verschiedene Mechanismen der angeborenen und adaptiven Immunität bei. Dazu gehören zelluläre und humorale Mechanismen. Da viele Viren Mechanismen entwickelt haben, um der Immunüberwachung zu entgehen, werden neben der klassischen T-Zell-Antwort weitere, v. a. MHC-unabhängige Abwehrsysteme benötigt.

Zur Einschränkung der Virusreplikation tragen u. a. sowohl NK-Zellen durch die Erkennung und Lyse von virusinfizierten Zellen bei als auch vielfältige Wirkungen der Interferon Typ I Zytokine: IFN- α und IFN- β hemmen die Proteinsynthese und damit die Virusvermehrung in infizierten Zellen, führen zu einer gesteigerten Expression von MHC-Klasse-I- und TAP-Transport-Proteinen oder induzieren den Abbau viraler RNS [1]. Daneben aktivieren sie T-Zellen, NK-Zellen und Makrophagen und verstärken deren Zytotoxizität [2]. Ausgelöst wird die Induktion der Interferone in vielen verschiedenen Viren durch doppelsträngige Virus-RNS: Diese Nukleinsäure wird im Infektionszyklus bestimmter Viren gebildet und kommt in normalen Säugerzellen nicht vor. *In vitro* oder *in vivo* kann so eine Virusinfektion durch die Inkubation mit einer synthetischen Doppelstrang-RNS (ds-RNS), wie Poly (I:C) (Poly-Inosin-:Poly-Cytidyl-Säure), simuliert werden [3]. Bei Anwesenheit von ds-RNS wird die Serin/Threonin-Kinase PKR (ds-RNS-abhängige Proteinkinase) aktiviert und phosphoryliert den Initiationsfaktor eIF2 der eukaryontischen Proteinsynthese, was zur Translationshemmung und damit Unterbindung der viralen Replikation führt [4, 5].

Poly (I:C) kann sowohl direkte als auch indirekte Effekte vermitteln: So wurde die Induktion einer Reihe unterschiedlicher Gene, die Aktivierung von latenten Enzymen, die Inhibition des Wachstums tumoröser Zellen sowie die Verstärkung von zellvermittelter Zytotoxizität und B-Zell-Antwort auf Antigene beschrieben. Manche dieser Effekte werden durch die Induktion von Interferonen, andere durch direkte Wirkung der RNS vermittelt (Review:

[6]).

Poly (I:C) verstärkt die zytotoxische Aktivität verschiedener Zellen wie NK-Zellen oder Monozyten [175, 176]. Im Fall der Makrophagen kann Poly (I:C) dies durch TNF- α allein oder im Kombination mit IFN I bewirken [7]. T-Zellen werden *in vitro* nicht direkt aktiviert, jedoch kann in LAK T-Zellen (Lymphokine activated killer cells: durch Zytokine aktivierte Killerzellen) durch Inkubation mit niedrig dosiertem IL-2 und ds-RNS für 3–4 Tage eine zytotoxische Aktivität induziert werden [6].

Poly (I:C) beschleunigt die Entwicklung von Diabetes in DP-BB Ratten [8, 9], was möglicherweise durch die Induktion verschiedener Zytokine verursacht wird. So zeigen antigenspezifische T-Zell-Klone, die in Gegenwart von Poly (I:C) expandiert werden, ein T_H1-Profil; werden neutralisierende Antikörper sowohl gegen IL-12 als auch IFN- α dazugegeben, kann diese Polarisierung verhindert werden [10]. Bei *in vivo* Studien an Mäusen zeigte sich, dass während viraler Infekte v. a. die Untergruppe der „Gedächtnistyp“ CD44^{high} CD8-positiven Zellen proliferiert. Dies kann auch durch die Injektion von Poly (I:C) oder Typ I IFN erreicht werden. Dabei werden weder CD25 noch CD69 heraufreguliert, was für einen nicht TZR-vermittelten Effekt spricht [11]. Induziert wird das Wachstum der CD44^{high} CD8-positiven Zellen vermutlich durch IL-15, welches nach Inkubation von Makrophagen mit IFN I oder z. B. Poly (I:C) vermehrt gebildet wird [12].

Neueste Untersuchungen beschäftigen sich eingehend mit der Wirkung von Poly (I:C) auf dendritische Zellen (DC). DCs sind professionelle APCs mit der Fähigkeit, primäre Immunantworten zu generieren. Sie besiedeln als unreife Zellen peripheres Gewebe, um dort Antigene einzufangen und anzureichern. Unreife („immature“) DCs (iDCs) reagieren auf Exposition mit Antigenen mit morphologischen und funktionellen Änderungen, Reifung genannt. Dieser Prozess ereignet sich auf dem Weg vom Gewebe in die drainierenden Lymphknoten. Dort werden die prozessierten Antigene T-Zellen präsentiert und additiv von den heraufregulierten kostimulierenden Oberflächenmolekülen oder sezernierten Zytokinen aktiviert und somit die adaptive Immunantwort eingeleitet [13]. Zu den durch DCs erkannten Antigenen gehören invariable molekulare Motive verschiedener mikrobieller Herkunft, die sogenannten „PAMPs“. Zu diesen gehört auch Poly (I:C) [14]. Mittlerweile sind ver-

schiedene Untergruppen von DCs bekannt, abhängig von ihrer Herkunft: So gibt es die lymphoiden oder myeloischen Ursprungs, die sich durch die Expression von CD11c unterscheiden [15]. Plasmazytoide, CD11c-negative DCs werden als Typ 2 DC-Vorläuferzellen bezeichnet; sie reifen nach IL-3- oder Virusexposition zu DCs aus. Auf eine virale Stimulation hin, jedoch nicht nach Inkubation mit ds-RNS, sezernieren sie 1000 mal mehr Typ I IFN als CD11c-positive DCs oder Monozyten [16, 17]. Die myeloischen DCs sind unreif, CD11c-positiv und werden über ihren TLR3-Rezeptor durch Poly (I:C) aktiviert [17, 18]. Nach Erkennen der ds-RNS durch den TLR3 werden Signale transduziert, die NF-kappaB und den IFN- β Promotor aktivieren [19]. Zunächst wurde die Expression von TLR3 mRNA, neben den DCs, nur in Fibroblasten und intestinalen Epithelzellen beschrieben [20–22]. Neuere Ergebnisse zeigen, dass auch NK-Zellen TLR3 exprimieren und somit direkt durch Poly (I:C) stimuliert werden können. TLR3 mRNA wird nach Aktivierung durch das Oligonukleotid verstärkt exprimiert [23, 24]. Durch die Stimulation der aufgereinigten NK-Zellen wird deren Zytotoxizität signifikant gesteigert, CD69 heraufreguliert und darüber hinaus die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und IFN- γ , jedoch kein IFN I, induziert. Weder die TLR3 mRNA noch die Sekretion der beschriebenen Botenstoffe konnte durch diese Arbeitsgruppe dagegen für T-Zellen gefunden werden [24]. Dem widersprechen neueste Ergebnisse [25]. Die aktivierten NK-Zellen sind wiederum in der Lage, die Reifung der iDCs zu initiieren. Dies trifft auch auf die anderen lymphatischen Effektorzellen der angeborenen Immunität zu, die NKT und $\gamma\delta$ T-Zellen.

2. $\gamma\delta$ T-Zellen

Eng mit den NK-Zellen ist eine Untergruppe von T-Zellen verwandt, die $\gamma\delta$ T-Lymphozyten. Da sie daneben auch Gemeinsamkeiten mit den $\alpha\beta$ T-Zellen teilen, kommt ihnen eine besondere Rolle in der Verknüpfung der angeborenen und erworbenen Immunität zu. Neben ihren immunmodulierenden Eigenschaften besitzen sie gegen Tumoren, Viren, Bakterien und Protozoen gerichtete Effektorfunktionen. Durch ihre schnelle und unspezifische Aktivierung wird eine zeitaufwendige klonale Expansion einzelner T-Zellen vermieden;

dies ist ein Hinweis auf eine wichtige Rolle in der „first line of defense“ (Reviews: [26, 27]).

Die $\gamma\delta$ T-Zellen wurden 1986 von Brenner bei der Sequenzierung des $\alpha\beta$ T-Zell-Rezeptors entdeckt und in Analogie TZR γ - und δ -Kette genannt [28]. Im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ T-Zellen wurden für $\gamma\delta$ T-Zellen 6 $V\gamma$ und 3-4 $V\delta$ -Gene beschrieben [29], die Anzahl der D- und J-Gensegmente von $\gamma\delta$ T-Zellen ist ebenfalls geringer. Sowohl im murinen als auch humanen System wird ein limitiertes $\gamma\delta$ TZR-Repertoire ausgebildet (Review:[26]). Der Entwicklungszeitraum des humanen $\gamma\delta$ T-Zell-Repertoires beträgt zwischen einem und 10 Jahre und ist wahrscheinlich abhängig von Umweltfaktoren wie mikrobiellen Infektionen [30]. Bei der Geburt herrschen im peripheren Blut $\gamma\delta$ T-Zellen mit der $V\delta 1$ -Kette vor, werden dann aber von denen mit $V\gamma 9V\delta 2$ -TZR ersetzt, die beim Erwachsenen ca. 70% der peripheren $\gamma\delta$ T-Zellen ausmachen. Dabei gibt es für jedes Individuum einzigartige, dominante Klone [31, 32]. Im peripheren Blut des Erwachsenen gibt es ca. 2% $\gamma\delta$ T-Zellen mit einer enormen Schwankungsbreite von 0,5–10%. Die Anzahl bleibt im Lauf des Lebens konstant, kann aber während verschiedener Infektionen enorm ansteigen und nach einigen Wochen wieder auf den Ausgangswert abfallen.

$\gamma\delta$ T-Zellen mit der $V\delta 1$ -Kette kommen beim Erwachsenen v. a. im Thymus (50–70% der $\gamma\delta$ T-Lymphozyten), in der Milz und in den Epithelien (30–60%) vor, sind meist nicht mit $V\gamma 9$ verbunden und CD45RA-positiv, was auf eine Population ohne bisherigen Antigenkontakt schließen lässt. Die Verteilung der Untergruppe $V\delta 2$ beträgt dagegen im Blut 50–90%, in den Epithelien 10–30% und 1–20% im Thymus. Sie sind meist mit $V\gamma 9$ assoziiert und CD45RO-positiv, was Memory-Effektorzellen entspricht [33]. Interessant ist, dass bereits im Alter von einem Jahr die meisten $V\delta 2$ -Zellen voraktiviert sind [34].

2.1. Antigene

Die verschiedenen Untergruppen der humanen $\gamma\delta$ T-Zellen reagieren auf eine Reihe unterschiedlicher Antigene; dies schließt potentielle Selbstantigene und Antigene mikrobieller und nicht mikrobieller Herkunft ein, Proteine und Nichtproteine.

Proteine werden von einigen $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt: neben den klassischen auch nicht- klassische MHC-Moleküle, Mitglieder der Immunglobulinen- Superfamilie wie CD1, CD48 oder Ig, aber auch Hitzeschock-Proteine (HSP) oder native virale Glykoproteine [26]. Intestinale, intraepitheliale $\delta 1$ positive $\gamma\delta$ T-Zell-Klone erkennen die mit MHC-Klasse-I verwandten Moleküle MICA und MICB, welche stressinduziert sind und nach Verletzungen oder Infektionen auftreten [35]. Eine weitere Subgruppe mit einer V $\delta 3$ -Kette wurde beschrieben, die v. a. im Intestinum angesiedelt ist [36]. Dabei wurde ein V $\delta 3$ -Klon mit starker Zytotoxizität gegen die meisten B-lymphoblastoiden Zell-Linien, verschiedene MHC-I- oder -II-defiziente B-Zell-Tumoren und verschiedene $\alpha\beta$ T-Zell-Linien entdeckt; der Ligand wurde jedoch bislang nicht identifiziert [37].

Auf der Suche nach $\gamma\delta$ -spezifischen Tumorantigenen ging man zunächst von HSPs aus, da murine und humane $\gamma\delta$ T-Zellen das mykobakterielle HSP 65 und verwandte Proteine erkennen [38]. In Infektionsmodellen mit Mykobakterien wurden dann wichtige Ergebnisse über $\gamma\delta$ T-Zell-spezifische Antigene erhoben. Erstmals wurden humane, auf Mykobakterien reagierende $\gamma\delta$ T-Zellen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis entdeckt [39]. Obwohl auch humane HSP65-reaktive $\gamma\delta$ T-Zell-Klone in geringer Anzahl existieren, konnte die starke Proliferation von $\gamma\delta$ T-Lymphozyten nach Inkubation dieser Zellen mit Extrakten aus Mykobakterien jedoch nicht allein durch die proteinspezifischen Klone erklärt werden. Auf der Suche nach weiteren Antigenen konnten extrem kleine (< 600 Da), Protease-resistente Moleküle charakterisiert werden, die zudem durch die Behandlung mit Säure, Natriumperjodat, alkalischer Phosphatase und Nukleotidpyrophosphatase inaktiviert werden konnten. Dies spricht für phosphorylierte Kohlenhydrate [40–43].

Fournie und Bonneville beschrieben 1994 vier aus Mykobakterien gewonnene Antigene, nämlich TUBag 1–4 („Tuberculosis antigen“ 1–4). TUBag 3 und 4 enthielten Nukleotidanteile, jedoch nicht TUBag 1 und 2. Der Nukleosidrest von TUBag 3 wurde als 5'UTP, der von TUBag 4 als 5'dTTP charakterisiert. Die Analyse von TUBag 1 und 2 ergab eine X-Phosphat-Struktur, wobei „X“ zunächst einen nicht näher zu bestimmenden Rest darstellte [44]. Diese Substanz wurde von Belmant und Mitarbeiter als 3-Formyl-1-butyl-Pyrophosphat beschrieben; sie ist in TUBag 1, 3 und 4 nachweisbar [45]. TUBags stimulieren bereits im nanomolaren Bereich und kommen in unterschiedlichen Mykobakterien vor.

Daneben wurde diese Substanz auch in *E. coli* nachgewiesen [46]. Darüber hinaus finden sich strukturverwandte Antigene in anderen, ebenfalls $\gamma\delta$ T-Zell-stimulierenden Pathogenen (z.B. MALag 1–2 in Schizontenlysaten von *Plasmodium falciparum* [47]).

Da für die Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen der Phosphatrest essentiell ist, wurden weiterhin synthetische Phosphate wie Monoalkylphosphate oder Kohlenhydratphosphate auf ihre Stimulationsfähigkeit hin untersucht; diese fiel jedoch sehr unterschiedlich aus [48]. Die erste sehr gut stimulierende Antigengruppe waren Prenylpyrophosphate, wozu auch Isopentenylpyrophosphat (IPP) gehört. IPP stellt das erste vollständig charakterisierte Antigen für $\gamma\delta$ T-Zellen dar, stimuliert im Bereich von 10–100 μM und wurde von Tanaka auch in Mykobakterienextrakten nachgewiesen. IPP ist ein ubiquitär vorhandenes Zwischenprodukt der Terpenbiosynthese prokaryontischer und eukaryontischer Zellen. Es ist ein essentieller Vorläufer für Cholesterin, Vitamine, Dolicholphosphate, Karotinoide, Gibberelline, Taxoide und Ubichinone, aber auch verantwortlich für die Membranverankerung von Signaltransduktionsmolekülen wie Ras [49, 50] (Review). Zunächst wird Pyruvat zu Azetyl-CoA oxidiert. Drei Azetyl-CoA-Moleküle werden zu 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA kondensiert und durch die HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat umgewandelt. Auf drei Phosphorylierungsschritte folgt eine Dekarboxylierung zu IPP. Die IPP-Isomerase wandelt IPP in sein Isomer Dimethylallyl-Pyrophosphat (DMAPP) um. Beide Moleküle werden im weiteren z. B. zu Sterolen synthetisiert.

Bislang wurden die unterschiedlichsten $\gamma\delta$ T-Zell-stimulierenden Mikroorganismen beschrieben. (Review: [51]). Das bislang stärkste natürlich vorkommende Phosphoantigen, nämlich (E)-4-Hydroxy-3-Methylbut-2-Enyl-Pyrophosphat (HDMAPP), wurde aus *E. coli*, aber auch in Pflanzen nachgewiesen [52, 53]. Diese Substanz ist ein Vorläufer des mikrobiellen, Mevalonat-unabhängigen Wegs der Isoprenoidsynthese, der in Zyanobakterien, Algen, Chloroplasten und den meisten Eubakterien nachweisbar ist [54–56]. Hierbei wird IPP aus seinem Vorläufer 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat (DOXP) gebildet. Dies wird zu 2-C-Methyl-D-Erythritol-4-Phosphat reduziert, an CDP konjugiert und zu CDP-Methyl-Erythritol-2-Phosphat phosphoryliert. Nach enzymatischer Spaltung und Reduktion entsteht HDMAPP, welches wiederum zu IPP und DMAPP reduziert wird. Interessant ist die Be-

obachtung, dass nur Bakterien, die den nichtklassischen Mevalonat-unabhängigen Weg der Isoprenoidsynthese besitzen, $\gamma\delta$ T-Zellen stimulieren können [54, 57]. Inzwischen konnte HDMAPP als X-Rest auch in TUBag1 identifiziert werden [52].

Neben Antigenen mikrobiellen Ursprungs wurden auch nichtmikrobielle, $\gamma\delta$ T-Zell-spezifische Antigene bekannt: Das Aminobisphosphonat (ABP) Pamidronat (3-Amino-1-hydroxy-propyliden-1, 1-Bisphosphonsäure) stellt eine Substanz dar, die zur Behandlung tumorassoziierter Osteolysen eingesetzt wird. Chemisch stellt es ein Phosphatase-resistentes Analogon zu endogenen Pyrophosphaten mit einer P-C-P-Gruppierung dar. Durch die Hemmung der Farnesylpyrophosphat (FPP)-Synthetase im Mevalonat-Weg der Cholesterinbiosynthese wirkt es als Inhibitor der Knochenresorption durch Induktion von Apoptose in Osteoklasten [58]. Bei erstmaliger Gabe von stickstoffhaltigen Vertretern der Bisphosphonate können jedoch bei einigen Patienten Fieber und grippeähnliche Symptome auftreten, die an eine Akut-Phase-Reaktion erinnern [59]. Durch die Strukturverwandtschaft mit IPP stellte sich die Frage, inwieweit $\gamma\delta$ T-Zellen durch ABP aktiviert werden können und dadurch zu der Anti-Myelom-Wirkung dieser Substanzen beitragen: So waren bei Patienten mit Osteoporose bzw. multiplem Myelom, die im Anschluss an die erste Infusion von Pamidronat grippeähnliche Symptomen entwickelten, die Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen im peripheren Blut deutlich erhöht [60]. Daneben konnte Pamidronat auch *in vitro* als $\gamma\delta$ T-Zell-spezifisches Antigen charakterisiert werden [61]. Erklärbar ist die Wirkung der ABP durch die Hemmung der FPP-Synthetase mit konsekutiver Anreicherung von Mevalonat-Stoffwechselmetaboliten wie IPP oder anderen $\gamma\delta$ T-Zell-spezifischen Antigenen in der Zelle [62]. Derselbe Wirkungsmechanismus ist inzwischen auch für Alkylaminverbindungen beschrieben worden. Diese kommen in Pflanzen und Tee vor, werden aber auch von Bakterien sezerniert [50 (Review), 63, 64]

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Vielzahl von phosphorylierten Antigenen für $V\gamma 9 V\delta 2$ T-Zellen existiert, die man als Phosphoantigene bezeichnet und deren Gemeinsamkeit nichtpeptidische Komponenten mit Phosphosäureester-Strukturen darstellt; diese sind für die eigentlichen TZR-Interaktionen verantwortlich. Alle bisher isolierten $V\gamma 9 V\delta 2$ -Antigene sind mit dem Mevalonat-Stoffwechselweg assoziiert. Die unterschiedlichen Antigengruppen für $V\gamma 9 V\delta 2$ - oder $V\delta 1$ - bzw. $V\delta 3$ -positive $\gamma\delta$ T-Zellen weisen auf

verschiedene biologische Funktionen dieser T-Zellen hin.

2.2. *Antigenerkennung und Aktivierung*

Wie bereits beschrieben, zeigen V γ 9V δ 2 T-Zellen einen TZR mit stark begrenzter Struktur und reagieren sowohl auf Mykobakterienextrakte als auf Daudi-Lymphomzellen [65]. Im Unterschied zu $\alpha\beta$ T-Zellen reagieren $\gamma\delta$ T-Zellen polyklonal. Dass der TZR an der Antigenerkennung beteiligt ist, konnte in Experimenten gezeigt werden, in denen die Reaktivität auf Phosphoantigene durch blockierende Antikörper verhindert wurde [48]. Weiterhin gelang es, die TZR-defiziente T-Lymphom-Zelllinie Jurkat mit dem V γ 9V δ 2-TZR zu transfizieren, die danach reaktiv für Phosphoantigene wurde [66]. Wie Phosphoantigene durch den $\gamma\delta$ T-Zell-Rezeptor erkannt werden können, ist immer noch Gegenstand der Forschung. Aus dem Vergleich der Längen der CDR3 (complementarity determining regions 3) des $\gamma\delta$ -TZR mit bekannten Sequenzen von Antikörpern und $\alpha\beta$ T-Zellen schloss man auf eine größere Ähnlichkeit zu Antikörpern [29, 67]. Durch die Röntgen-Strukturaufklärung eines Phosphoantigen-reaktiven $\gamma\delta$ -TZRs durch Allison und Mitarbeiter konnten diese Vermutungen nur zum Teil bestätigt werden: Die Strukturen der $\gamma\delta$ -TZR C-Domänen sind sehr verschieden zu denen der $\alpha\beta$ T-Zellen, was möglicherweise zu unterschiedlichen Erkennungs- oder Signaltransduktionsmechanismen führen könnte. Falls Antigene präsentiert werden, erlaubt die Struktur des Rezeptors kein bisher bekanntes MHC-Molekül [68]. Daneben sind die meisten $\gamma\delta$ T-Zell-Klone CD4- und CD8-negativ, was zur Folge hat, dass sie nicht MHC-restringiert oder alloreaktiv sind. 20–30% der $\gamma\delta$ T-Zellen exprimieren CD8, die meisten davon sind δ 1 positiv; CD4-positive $\gamma\delta$ T-Zellen sind extrem selten. Es sind zwar auch $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben, die von MHC-Genen kodierte Oberflächenmoleküle erkennen; sie spielen aber in der Anzahl eine untergeordnete Rolle [33].

Werden native $\gamma\delta$ T-Zellen ohne APC oder fixierten APCs mit einem Pyrophosphomonoester aktiviert, kommt es bereits nach 5–20 Minuten Antigenkontakt zur TNF-Sekretion, Steigerung der Zytotoxizität und Ca²⁺-Einstrom. Dies deutet darauf hin, dass keine Prozes-

sierung notwendig ist. Werden $\gamma\delta$ T-Zellen während der Aktivierung in Suspension gehalten, nehmen der Ca^{2+} -Einstrom und die TNF-Sekretion ab; dies kann auf die Notwendigkeit kostimulierender Signale oder einer vorübergehenden Selbstpräsentation der Antigene durch $\gamma\delta$ T-Zellen hinweisen. Die Suche nach antigenpräsentierenden Molekülen war jedoch erfolglos. Die bisher getesteten blockierenden Antikörper gegen klassische und nicht-klassische MHC-Moleküle können die Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen nicht hemmen. Auch die Verwendung von Zellen, die defizient für Proteine der Antigenpräsentation oder -prozessierung (MHC-Klasse-I/II, TAP, DM) sind, vermindern die Reaktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen nicht [69, 70]. Verwendet man jedoch als Antigen ein ABP, sind zur Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen APCs notwendig. Zum einen konnte u. a. eine Monozyten-Zelllinie mit dem Antigen „gepulst“ werden, was neben ihrer Aktivierung zur Zunahme der Zytotoxizität der $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber der antigenträgenden Zelle führte [71, 72]. Dabei ist die Endozytose des ABP essentiell. Die durch die Hemmung der FPP-Synthetase akkumulierenden Mevalonat-Metabolite werden im weiteren wahrscheinlich durch ein bisher unbekanntes, aber ubiquitär vorhandenes Oberflächenmolekül präsentiert [62].

Werden $\gamma\delta$ T-Zellen *in vitro* kultiviert, so verlieren sie zuerst die Proliferationskapazität in Reaktion auf schwächere Liganden hin, dann auf stärkere. Die Fähigkeit, auf Mitogene zu reagieren, bleibt jedoch erhalten, ebenso die Dichte der exprimierten $\gamma\delta$ TZ-Rezeptoren. Das heisst, dass sich die biologische Ansprechbarkeit (gemessen an der Fähigkeit zur Proliferation) mehr verändert als die Reaktivität: Substanzen, die in der Frühphase als Agonist wirken, können in der Spätphase zum Antagonisten werden [177]. Diese Form der Regulation dient der Immunmodulation während der späten Phase der Immunantwort und ist notwendig, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern.

Neben der Antigenstärke modulieren auch membranständige Rezeptoren die $\gamma\delta$ T-Zell-Funktionen, die als NKR (Natural Killer Cell Receptors) bezeichnet werden. NKR stellen eine Rezeptorenfamilie dar, die zunächst auf NK-Zellen beschrieben wurde und unterschiedliche Aufgaben hat. Für die $\gamma\delta$ T-Zellen sind v. a. KIR (Killer Cell Inhibitory Receptor), NK-Zell-inhibierende Rezeptoren von Bedeutung. Da es bestimmten Tumorzellen (wie der Lymphom-Zelllinie Daudi) an MHC-Klasse-I-Molekülen, die durch die spezifi-

schen KIRs erkannt würden, mangelt, führt dies neben der Proliferation zur gesteigerten Zytotoxizität von $V\gamma 9V\delta 2$ -Zellen [73, 74].

Die Interaktion von CD94 und HLA-Klasse-I-Molekülen bewirkt auch eine Anhebung der TZR-Aktivierungsschwelle. Dies ist besonders wirksam für niedrige Ligandkonzentrationen und stellt damit ein wichtiges Signal zur Vermeidung autoimmuner Reaktionen von ubiquitär aktivierten, zytotoxischen $\gamma\delta$ T-Zellen dar [75]. Im Gegensatz dazu kann durch eine mykobakterielle Infektion MICA auf dendritischen und epithelialen Zellen induziert werden, welches einen Liganden für den NK-aktivierenden Rezeptor NKG2D auf NK- oder T-Zellen darstellt. Dies bewirkt eine Steigerung der antigeninduzierten $V\gamma 9\delta 2$ -Effektorantwort [76, 77]. Ebenfalls können $V\delta 1$ Zellen durch dieses KAR-Molekül kostimuliert werden: Werden unreife, myeloische DCs mit Lipidextrakten von gramnegativen Bakterien aktiviert, bewirken die daraufhin exprimierten Oberflächenmoleküle MICA/B, LFA1 und 3 sowie IL-12 eine TZR-abhängige Kostimulation von $V\delta 1$ Zellen [78]. Das eigentliche Antigen für die $\gamma\delta$ T-Zellen konnte jedoch nicht identifiziert werden.

2.3. Einfluss von Zytokinen auf die Aktivierung und Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen

Zur Auslösung einer proliferativen Antwort benötigen $\gamma\delta$ T-Zellen ebenso wie $\alpha\beta$ T-Zellen zwei Signale: Neben der TZR-Stimulation ist auch Kostimulation in Form von zellvermittelten Signalen wie die Interaktion von CD80/CD86 und CD28, CD40-CD40L, CD2-LFA-3, LFA-ICAM notwendig [33]. Durch Kokultivierung mit bestrahlten APC (wie etwa B-lymphoblastoide Zellen oder CLL B-Zellen) wird die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen verstärkt [79]. Anstelle von zellvermittelten Signalen können auch verschiedene Zytokine die Proliferation, aber auch Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen induzieren. Zur Proliferation dieser T-Zellen werden IL-2 oder vergleichbare Wachstumsfaktoren exogener oder endogener Herkunft benötigt [80, 81], z. B. IL-15. In Kombination mit IL-12 wirkt es synergistisch auf die Phosphoantigen-induzierte Sekretion von IFN- γ durch $\gamma\delta$ T-Zellen; ohne Antigenkontakt induzieren die beiden Zytokine keine IFN- γ -Freisetzung [82]. Nach Kontakt mit Phosphoantigenen wird die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen auch moderat durch IL-4, IL-7

und IL-12 gesteigert [83, 84]. Die Wirkung von TNF- α auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation ist dagegen nicht eindeutig geklärt: Während es Arbeitsgruppen gibt, die keine Kostimulation bei Zugabe des Zytokins nachweisen können [83, 84], postulieren andere diesen Effekt. Werden $\gamma\delta$ T-Zellen mit TNF- α kultiviert und über Anti-CD3 aktiviert, ist die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation im Vergleich zur alleinigen Anti-CD3-Aktivierung gesteigert [85]. Unter bestimmten Versuchsbedingungen kann TNF- α CD69 und CD25 auf $\gamma\delta$ T-Zellen induzieren, jedoch auch im weiteren Kulturverlauf zur Apoptose führen [86]. Synergistisch zu TNF- α wirkt IL-12 auf $\gamma\delta$ T-Zellen. IL-12 induziert auf $\gamma\delta$ T-Zellen die Expression verschiedener TNF-Rezeptoren und, im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen, CD25 mit einem Maximum an den Tagen 4–6. Somit kann man von einer zytokininduzierten „Bystander“-Aktivierung sprechen, die unabhängig von einem spezifischen Antigen ist. Neben CD25 wird auch CD56, ein Marker für Zytotoxizität, auf $\gamma\delta$ T-Zellen induziert; beide Oberflächenmoleküle können durch IL-12 auch auf NK-Zellen induziert werden [87]. Dies weist auf eine Beteiligung beider Zelltypen in der frühen, unspezifischen Immunantwort hin. Die Untersuchung der Makrophagen-sezernierten Zytokine IL-1 β , IL-6 und GM-CSF zeigte keine Modulation der $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung oder -Proliferation [87].

2.4. Effektorfunktionen

Humane V γ 9V δ 2-Zellen, die normalerweise im Blut und in lymphatischen Organen gefunden werden, können durch die Wirkung verschiedener Chemokine lokal in Infektionsherden akkumulieren [88]. Dort können die $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl Botenstoffe sezernieren als auch infizierte Zellen lysieren [33]. Inzwischen ist bekannt, dass V δ 2-Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}) in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt werden können: die auf Phosphoantigen reagierenden Helferzellen T_{EMH} und die zytotoxischen NK-ähnlichen, CD16-positiven T_{EMRA} -Zellen. T_{EMH} -Zellen exprimieren eine Reihe von Chemokinrezeptoren, T_{EMRA} -Zellen verschiedene NKR. Während die CD16-negativen T_{EMH} -Zellen auf Phosphoantigen-Stimulation hin Zytokine sezernieren, üben T_{EMRA} -Zellen diese Funktion CD16-vermittelt aus [89].

2.4.1. Zytokin- und Chemokinproduktion

Nach Aktivierung durch Phospholipanden werden sowohl T_H1- als auch T_H2-Zytokine gebildet, was einem T_H0-Profil entspricht. Dabei handelt es sich um INF- γ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 und TNF. Dies führt physiologisch zu einer Makrophagen-Aggregation mit Granulombildung und ist damit wichtig für die Eindämmung von mykobakteriellen Infektionen. Im Mausmodell wurde eine Differenzierung peritonealer $\gamma\delta$ T-Zellen in T_H1- und T_H2-Effektorzellen abhängig vom verwendeten Stimulus beschrieben; während das intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* IFN- γ -produzierende Zellen aktiviert, induziert der Parasit *Nippostrongylus brasiliensis* IL-4 [90]. Im humanen System ist v. a. die Sekretion der T_H1- Zytokine IFN- γ und TNF- α nach Stimulation mit verschiedenen Pathogenen beschrieben [178–181]. So können von $\gamma\delta$ T-Zellen sezernierte Zytokine, die sehr früh im Verlauf von Infektionen gebildet werden, über die Entstehung von T_H1- oder T_H2-Immunantworten entscheiden. Das Auslösen verschiedener Immunantworten könnte auch ein Hinweis auf die Beteiligung von $\gamma\delta$ T-Zellen an allergischen Reaktionen sein. Die Beteiligung von $\gamma\delta$ T-Zellen an der Regulation der Hämatopoese ist ebenfalls mit der Fähigkeit zur Zytokinsekretion zu erklären, da sie die myelosuppressiv wirkenden IFN- γ und TNF- α sezernieren [91–93]. Aktivierte humane oder murine $\gamma\delta$ T-Zellen produzieren innerhalb 4–12 Stunden auch Chemokine wie MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES oder Lymphotaktin. Diverse Chemokinrezeptoren werden nach Aktivierung herunterreguliert [94, 95]. Auch dies ist ein Hinweis für die Beteiligung von $\gamma\delta$ T-Zellen an der frühen Regulation von Immunantworten.

2.4.2. Zytotoxizität und Tumorabwehr

Neben der Sekretion von verschiedenen Botenstoffen oder Wachstumsfaktoren besitzen die verschiedenen Untergruppen von $\gamma\delta$ T-Zellen auch zytotoxische Aktivität. Die Erkennung ihrer Zielzellen wie Tumoren oder mit Viren, Bakterien oder Protozoen infizierten Zellen ist nicht MHC-restringiert. V γ 9V δ 2-Zellen erkennen und lysieren bestimmte humane B-

Zell-Tumorzelllinien, wie das Daudi Burkitt-Lymphom oder die Myelom-Zelllinie RPMI 8226, was v. a. über den Perforin/Granzym-Weg vermittelt wird. Auch V δ 1-Zellen können über Perforin-abhängige Mechanismen ihre Zielzellen lysieren (Review: [96]). $\gamma\delta$ T-Zellen können daneben über den Fas (CD95)/Fas-Ligand (CD95-L)-Weg Apoptose in anderen Zellen induzieren; beide Moleküle werden nach Aktivierung auf $\gamma\delta$ T-Zellen heraufreguliert. So wurden V δ 1-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Lyme-Arthritis-Patienten beschrieben, die nach Stimulation mit *Borrelia burgdorferi* autologe CD4-positive $\alpha\beta$ T-Zellen via CD95 lysieren [97]. Werden $\gamma\delta$ T-Zell-Klone restimuliert und mit Daudi-Lymphomzellen kokultiviert, so kommt es zum Absterben von einem Teil der $\gamma\delta$ T-Zellen. Dies weist auf eine nach Stimulation veränderte Empfindlichkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen in Bezug auf Apoptose durch CD95, welches während der Kultur gleichbleibend hoch exprimiert wird, hin [98, 99]. Die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen ist damit im Sinne eines „aktivierungsinduzierten Zelltodes“ (AICD) selbstlimitierend und trägt neben der Anergie zur Beendigung der $\gamma\delta$ T-Zell-Antwort bei.

Weder die zunächst vermuteten HSPs noch andere Moleküle konnten als tumorspezifische Antigene für $\gamma\delta$ T-Zellen identifiziert werden [66, 100, 101]. Wie jedoch bereits beschrieben, spielen bei der Erkennung von Tumoren Oberflächenmoleküle eine große Rolle, v. a. die NKRs (siehe Kap. 2.2.). Dies erklärt u. a. , warum die β_2 -Mikroglobulin-defiziente Zelllinie Daudi von V γ 9V δ 2-Klonen lysiert wird. Andere HLA-I-defiziente Tumoren dagegen, wie die Melanome FO-1 und SK-MEL-33 sowie das Kolonkarzinom HCT, brachten $\gamma\delta$ T-Zellen allerdings nicht zum Auswachsen [73]. Daneben wurden weitere B-Zell-Lymphome auf ihre Fähigkeit hin untersucht, $\gamma\delta$ T-Zellen zu stimulieren oder lysiert zu werden, wie die Raji und Akata oder RPMI 8226. Keine der Zelllinien war diesbezüglich mit Daudi-Lymphomzellen vergleichbar, was durch die Anwesenheit von HLA-Klasse-I an der Oberfläche erklärt werden kann [101, 102]. Diese Beobachtung wurde von einer anderen Arbeitsgruppe nicht bestätigt: Während die Lymphome REC1 und PASC mit schwacher HLA-I-Expression nicht lysiert werden, ist dies für starkexprimierende Linien wie OCI-Ly8, DG75, RPMI8662 oder VAL der Fall [103]. Ein weiterer Ligand, auslösend für die $\gamma\delta$ T-Zell-Reaktivität, scheint somit auf verschiedenen B-Zellen exprimiert zu werden.

Dies könnten z. B. kostimulierende oder stressinduzierte Moleküle oder solche homolog zu bakteriellen Phosphoantigenen sein. Inzwischen wurden Metabolite des Mevalonat-Stoffwechselweges als Tumorantigene identifiziert. So ist in Daudi-Zellen, Mamma-Karzinomzellen oder hämatologischen Malignomen die HMGR als „rate-limiting“ Enzym mit konsekutiver Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zell-Antigenen überexprimiert. Zudem können auch viele andere Tumorzelllinien nach Inkubation mit ABP $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren [62]. Für V δ 1-Zellen scheinen MICA oder MICB eine wichtige Rolle zu spielen. Diese MHC-Moleküle sind nicht mit β_2 -Mikroglobulin assoziiert und binden nicht an Peptide [35]. Ebenso ist eine Untergruppe von V δ 1-Zellen beschrieben, die CD1 und CD1-exprimierende Tumorzellen, wie bestimmte T-ALL-Zellen, erkennt [104] (Review: [105]). Aus tumorinfiltrierenden Lymphozyten verschiedener Gewebe, wie Lungen-, Nieren- und epithelialen Tumoren konnten tumorreaktive $\gamma\delta$ T-Zellen isoliert werden. Sehr häufig waren diese Zellen V δ 1-positiv [106–108].

2.4.3. Beteiligung von $\gamma\delta$ T-Zellen an der Infektionsabwehr

2.4.3.1. Bakterielle und protozoonale Infektionen

Wie bereits beschrieben, sind $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl an der humanen als auch murinen Immunantwort gegen verschiedene bakterielle und protozoonale Infektionen beteiligt. Zu den humanen Infektionen gehören die Salmonellose, Tularaemie, Brucellose, Tuberkulose, Leishmaniose, Malaria und Toxoplasmose [109–116].

Die Bedeutung der humanen $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Abwehr bakterieller Infektionen wurde am intensivsten an durch Mykobakterien verursachten Erkrankungen untersucht. $\gamma\delta$ T-Zellen reagieren auf verschiedene Spezies wie *M. tuberculosis* oder *M. leprae* [117]. Neben der Produktion von Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen zytotoxische Aktivität gegen infizierte Monozyten [118]. Eine weitere Möglichkeit der Hilfe für Makrophagen und B-Zellen besteht in einer Kostimulation z. B. durch das CD40-CD40L-System (Review: [119]). Die genaue Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Immunantwort gegen Mykobakterien

in vivo jedoch konnte bislang nicht definitiv bestimmt werden. Die Schutzwirkung der Impfung mit BCG könnte $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelt sein, da die $\gamma\delta$ T-Zellen tuberkulinpositiver Spender nach Inkubation mit *M. tuberculosis* leichter aktivierbar sind; unklar ist jedoch, inwieweit die im einzelnen sehr variablen T-Zell-Antworten eine Protektion gegen eine Reinfektion bedeuten [84, 120].

Je nach Infektion können $\gamma\delta$ T-Zellen die Rolle von $\alpha\beta$ T-Zellen an der Infektionsabwehr ergänzen oder ersetzen. Dies wurde eingehend anhand der murinen Listerieninfektion untersucht [121–123]: Sowohl TZR β - als auch TZR γ -depletierte Tiere sind resistent gegen die Erkrankung; in Mäusen ohne jegliche T-Zellen können sich die Erreger dagegen ausbreiten [122]. Im Unterschied zu heterozygoten Kontrolltieren exazerbiert die Infektion in TZR γ -depletierten Tieren im Anfangsstadium, obwohl die Bakterienmenge im Gesamtverlauf der Krankheit in Mäusen mit und ohne $\gamma\delta$ T-Zellen vergleichbar ist. Dies spricht für die Beteiligung der $\gamma\delta$ T-Zellen in frühen Infektionsstadien (Review: [26]).

Im Verlauf von verschiedenen chronischen Bakterien- oder Parasiteninfektionen wie der Tuberkulose kommt es zur Anergie und Abnahme der V γ 9V δ 2-Zellen [124–126]. Dies stellt womöglich einen Schutzmechanismus vor autoreaktiven Effekten stimulierter $\gamma\delta$ T-Zellen dar: Während die Sekretion von Zytokinen (v. a. TNF) in der Frühphase zur Eindämmung der Infektion nötig ist, kann eine Überproduktion dieses Zytokins auch zur Auslösung eines septischen Schocks führen (z. B. im Verlauf einer Malariainfektion [115]). Daher ist das Abschalten oder eine Herunterregulierung der $\gamma\delta$ T-Zell-Antwort im Krankheitsverlauf notwendig.

2.4.3.2. Virale Infektionen

Neben einer antibakteriellen Funktion besitzen $\gamma\delta$ T-Zellen auch antivirale Wirkungen: So sind humane und murine Infektionen bekannt, wie z. B. durch HIV, Influenza-, Sendai-, Coxsackie-, Vaccinia-Viren, VSV (vesicular stomatitis virus) oder HSV-1, in denen $\gamma\delta$ T-Zellen an der Immunantwort beteiligt sind (Review: [127]). Je nach Erkrankung sind $\gamma\delta$ T-

Zellen ausreichend für eine Beseitigung der Infektion, haben aber in der Regel zu den $\alpha\beta$ T-Zellen kompensatorische Funktionen: In Mäusen sind $\gamma\delta$ T-Zellen an der Immunantwort gegen HSV-1 beteiligt und reichen aus, um HSV-1-Infektionen zu beseitigen. Des Weiteren schützen $\gamma\delta$ T-Zellen vor einer tödlichen Enzephalitis, indem sie infizierte Zellen der Haut und in den Ganglien lysieren und damit die Ausbreitung der Infektion in das ZNS verhindern, aber auch eine Viruslatenz induzieren. Als Antigen kommt das virale Hüllglykoprotein I (gI) in Frage [128, 129]. Auch aus nicht infizierten Mäusen konnten *in vitro* gI-spezifische Klone kultiviert werden, was auf einen Pool gI-reaktiver $\gamma\delta$ T-Zellen in naiven Mäusen hinweist [130]. Dies unterstreicht die Bedeutung von $\gamma\delta$ T-Zellen an der Immunabwehr der murinen HSV-1 Infektion.

Untersucht wurde auch, inwieweit $\gamma\delta$ T-Zellen an der Abwehr der murinen Influenzainfektion beteiligt sind und hat dabei festgestellt, dass sie in $\alpha\beta$ T-Zell-depletierten Mäusen nur zu einer unzureichenden Reduktion oder Elimination der Viruslast beitragen [131]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Migration verschiedener $\gamma\delta$ T-Zell-Populationen in das infizierte Lungengewebe während der späten Immunantwort, die mit einer Reduktion der Viruslast einhergeht, von Influenza-spezifischen $\alpha\beta$ T-Zellen abhängig ist [132]. Dennoch sind $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Ausheilung der murinen Influenzainfektion von Bedeutung: Einige $\gamma\delta$ T-Zell-Klone (Vg1.1) erkennen das HSP65, welches auf einer vermehrten Anzahl von Makrophagen exprimiert wird [133, 134]. In diesen $\gamma\delta$ T-Zellen konnten *in vivo* große Mengen an Zytokin-mRNS nachgewiesen werden [135]. Dies spricht für einen immunmodulatorischen Effekt von $\gamma\delta$ T-Zellen.

Werden Infektionen mit anderen Viren durchgeführt, kommt man zu vergleichbaren Ergebnissen. Neben der Lyse infizierter Zielzellen könnte die $\gamma\delta$ T-Zell-vermittelte Zytotoxizität auch eine schädigende Wirkung zeigen: So führt die Infektion mit dem Coxsackie B-Virus u. a. zu einer Myokarditis. Als Ursache hierfür kommen neben einer schädigenden Wirkung des Virus Milz- $\gamma\delta$ T-Zellen in Frage, die *in vitro* infizierte Myozyten zerstören können. Dies ist möglicherweise auf eine Expression von HSP auf Myozyten zu erklären [136].

Für murine Virusinfektionen scheinen zusammenfassend HSPs eine wichtige Rolle in der Rekrutierung zytotoxischer $\gamma\delta$ T-Zellen zu spielen. Es ist keine Virusinfektion beschrieben worden, die allein durch $\gamma\delta$ T-Zellen bekämpft wird [127].

Welche Rolle $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Abwehr humaner Virusinfektionen spielen, ist bis heute Gegenstand der Forschung. Bislang ist nicht bekannt, welche Antigene für die Erkennung virusinfizierter Zellen eine Rolle spielen. Zudem sind beim Menschen auch unterschiedliche Untergruppen der $\gamma\delta$ T-Zellen im Rahmen viraler Erkrankungen vermehrt [137]. So ist *in vivo* eine Zunahme von aktivierten V γ 9V δ 2 T-Zellen im Blut akut EBV-infizierter Personen beschrieben [138]. Auch *in vitro* proliferieren diese Zellen nach Stimulation mit EBV-transformierten B-Zell-Linien wie z.B. Daudi. [100], (Review: [139]). Die im peripheren Blut von HIV-1 seropositiven Personen vorhandenen $\gamma\delta$ T-Zellen können bis zu 75% der T-Zellen betragen [140]. Dabei ist auffällig, dass die V γ 9V δ 2-Population polyklonal vermindert, die V δ 1-Subpopulation hingegen stark vermehrt ist [127].

Versuche mit Herpes simplex-Viren ergaben, dass $\gamma\delta$ T-Zellen HSV1/2 infizierte Zellen TZR-vermittelt erkennen und lysieren. Die infizierten Zellen werden zudem ohne vorheriges Erkennen von HSV-Antigenen auch durch mittels PHA oder Phosphoantigen aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen lysiert. Daneben werden weitere, z. B. mit dem Vaccinia-Virus infizierte Zellen durch $\gamma\delta$ T-Zellen zerstört; dies weist auf die Induktion oder Modifikation von Oberflächenmolekülen durch Viren hin. Eine Assoziation zu den HSP 60 oder HSP70 konnte dabei nicht gefunden werden [141, 142]. Auch im Fall der HIV-Erkrankung sind zytotoxische $\gamma\delta$ T-Zell-Klone beschrieben worden [143]. Daneben können $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Sekretion von T_H1-Zytokinen oder anderen Botenstoffen die antivirale Immunantwort unterstützen. Die Entdeckung der KIRs lässt vermuten, dass zytopathische Viren über eine Veränderung von HLA-Klasse-I-Molekülen der Zielzellen in den $\gamma\delta$ T-Zellen v. a. eine unspezifische, NK-ähnliche Zytotoxizität induzieren. Eine weitere Erklärung hierfür besteht in der Hochregulierung von stressinduzierten Liganden für NKG2D, wie MICA/B.

Wie bereits erwähnt, werden V γ 9V δ 2-Zellen im Rahmen der HIV-Erkrankung, ebenso wie in chronischen bakteriellen Infekten, anerg oder deletiert [144]. Durch die Anergisierung der V γ 9V δ 2 T-Zellen kommt es zur Verschlechterung der antimykobakteriellen Immunität und möglicherweise auch zur Zunahme von Tumoren, wie etwa Lymphomen. Ob die $\gamma\delta$ T-Zell-Anergie die Prognose der Erkrankung insgesamt jedoch verbessert oder verschlechtert,

bleibt noch zu klären. Es gibt Hinweise darauf, dass durch die persistierende Aktivierung des Immunsystems mit Anreicherung von blastären T-Zellen potentiell autoreaktive V δ 2-Zellen aktiviert werden können [145]; daneben scheint eine chronische V γ 9V δ 2-Hyperaktivierung durch ein Übermaß an Phosphoantigenen an der HIV-Immunpathogenese beteiligt zu sein. Eine Immunvakzine mit dem Ziel, die $\gamma\delta$ T-Zellen zu anergisieren, wäre dann von Vorteil (Review: [146]).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch ihre Fähigkeit, virusinfizierte Zellen unspezifisch zu erkennen, $\gamma\delta$ T-Zellen eine wichtige antivirale Funktion erfüllen können. Nach ihrer schnellen und polyklonalen Aktivierung differenzieren $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl in zytotoxische als auch Zytokin- und Chemokin-produzierende Effektorzellen. Ob jedoch weitere, zellunabhängige Faktoren im Rahmen einer Virusinfektion $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren, wurde bisher noch nicht untersucht.

ZIELE DER UNTERSUCHUNG

Die Untergruppe der $\gamma\delta$ T-Zellen besitzt neben zahlreichen Gemeinsamkeiten zu $\alpha\beta$ T-Zellen viele Ähnlichkeiten zu NK-Zellen und scheint damit eine wichtige Rolle in der „first line of defense“ gegen verschiedene Infektionen einzunehmen. Die Beteiligung von $\gamma\delta$ T-Zellen an der Abwehr von Virusinfektionen wurde mehrfach beschrieben. Dabei scheinen virusunspezifische, Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Mechanismen entscheidend zu sein. Ob darüber hinaus auch andere, virusinduzierte Mechanismen $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren und zu Effektorzellen ausreifen lassen können, wurde bislang noch nicht untersucht. Eine Möglichkeit, die Infektion mit einem Virus *in vitro* oder *in vivo* zu simulieren, besteht in der Inkubation der peripheren Lymphozyten mit dem synthetischen doppelsträngigen Oligonukleotid Poly (I:C), da während der Vermehrung von bestimmten Viren Doppelstrang-RNS gebildet wird. Diese ds-RNS ist ein potenter Induktor von zahlreichen Zytokinen, v. a. Typ I Interferonen, besitzt darüber hinaus aber auch direkte Wirkungen auf verschiedene Zellen des Immunsystems und Endothelzellen. Untersucht wurde in dieser Arbeit, ob Poly (I:C) auch auf $\gamma\delta$ T-Zellen wirkt.

MATERIAL UND METHODEN

1. Reagentien

1.1. $\gamma\delta$ T-Zell-spezifische Antigene und Mitogene

- IPP (Isopentenyl-Pyrophosphat Ammonium-Salz), Sigma, Deisenhofen
- PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Azetat), Sigma, Deisenhofen
- Ionomycin Kalziumsalz 1 mg, 500 μg /ml in Methanol, 4°C; Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden/ Taunus
- Poly (I:C) (Poly-Inosin-: Poly-Cytidyl-Säure) Sigma, Deisenhofen

1.2. Zytokine

- IL-2: Proleukin (18×10^6 IE), Euro Cetus GmbH: wurde mit 1,2 ml Aqua dest. aufgenommen und davon 500 μl 1:2 mit 1% BSA (Fraktion V, Sigma, Deisenhofen) in RPMI verdünnt; 222 μl des verdünnten Proleukins wurden auf 100 ml mit RPMI-Medium verdünnt und in 200 Röhrchen à 500 μl aliquotiert (10^4 I.E. IL-2 pro Röhrchen)
- IL-6, ohne Azid, Pepro Tech inc., TEBU, Frankfurt; in PBS gelöst
- IL-12, ohne Azid, Pepro Tech inc., TEBU, Frankfurt; in PBS gelöst
- IL-15, ohne Azid, Endogen, Biozol, München, in Aqua dest. gelöst
- TNF- α , ohne Azid, Sigma, Deisenhofen, in PBS+ 0,1% BSA gelöst
- INF- β , ohne Azid, Pepro Tech inc., TEBU, Frankfurt; in Aqua dest. gelöst, verdünnt in 10% AB- Medium
- IFN- α 2a, ohne Azid, Hoffmann- La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, in Aqua dest. gelöst

- Fiblaferon 5 (Interferon beta), ohne Azid, Dr. Rentschler Arzneimittel, Laupheim, in Aqua dest. gelöst
- Polyferon 50 (Interferon gamma), ohne Azid, Dr. Rentschler Arzneimittel, Laupheim, in Aqua dest. gelöst

1.3. Neutralisierende Antikörper

Es wurden neutralisierende Anti-Zytokin-Antikörper ohne Azid verwendet:

- Anti-IFN- α polyklonal, Endogen, Biozol, München; 1 mg/ml unverdünnt aliquotiert
- Anti-IFN- β polyklonal, Fa. TEBU, Frankfurt; 1 mg/ml unverdünnt aliquotiert
- Anti-IFN- α / β -Rezeptor Kette 2 monoklonal, Biomedical Laboratories, New Brunswick, NJ; 500 μ g/ml
- Anti-IFN- γ -Antiserum, Pepro Tech Inc., TEBU, Frankfurt; 500 μ g in 100 μ l A. dest. gelöst
- Anti-IL-15 polyklonal, Endogen, Biozol, München; 1:10 verdünnt in 10% AB-Medium
- Gereinigter Maus IgG₁ κ , Isotypkontroll-Ig, Pharmingen, Hamburg; 500 μ g in 500 μ l PBS

2. Medien

2.1. Kultur- und Waschmedien

RPMI-Medium: In RPMI (RPMI 1640 mit 25 mM HEPES Puffer, L-Glutamin, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) wurde L-Glutamin (E_k 2 mMol/l; Gibco BRL, Paisley, Schottland) und Penicillin/Streptomycin (E_k 100 U/ml bzw. 100 μ g/ml; Seromed, Biochrom KG, Berlin) sterilfiltriert.

Kulturmedien enthielten neben RPMI-Medium auch AB-Serum (bis 02/1999 Serum aus Einzelspenden, BRK-Blutspendedienst; seit 02/1999 gepooltes AB-Serum Charge B04128-134, PAA, Cölbe) oder FCS (FCS Charge 76H3380 komplementinaktiviert, Sigma, Deisenhofen) mit einem 10%igen Serumanteil und wurden nach Zugabe des AB-Serums sterilfiltriert. Für einige Versuche wurde komplementinaktiviertes Serum (56°C, 30 Minuten; Schüttelwasserbad Fa. Köttermann) verwendet.

Waschmedien: RPMI-Medium, 1%ig FCS oder HBSS (Hank's Balanced Solution, 10x verdünnt und auf pH 7,4 eingestellt; Gibco Life Technologies, Karlsruhe), 1%ig FCS

Einfriermedien: RPMI-Medium, 40%ig FCS und RPMI-Medium, 20%ig DMSO ((Dimethylsulfoxid), Fa. Roth, Karlsruhe)

2.2. *Klonierungsmedium*

10%iges AB-Medium wurde mit 200 U/ml IL-2 und 1 µg/ml PHA-L (Lectin aus Phaseolus vulgaris, verdünnt in RPMI-Medium, Sigma, Deisenhofen) angesetzt. Nach zwei bis drei Wochen wurde die IL-2- Dosis langsam verringert und kein PHA mehr gegeben.

2.3. *Medien für MACS*

Eine 200 mM EDTA-Lösung (5,445 g EDTA (Ethylendiamintetraacetat) Dinatriumsalz Dihydrat, Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe; ad 100 ml Aqua dest.) wurde auf pH 8,0 eingestellt und sterilfiltriert. Die Stocklösung kann bei 4°C gelagert werden. In eine 500 ml-Flasche steriles 1x PBS (PBS ohne Ca²⁺, Mg²⁺ (10x), Gibco Life Technologies, Karlsruhe) wird 5 ml EDTA- Lösung und 2,5 ml steriles FCS pipettiert. Dieser MACS-Puffer wird bei 4°C gelagert.

2.4. FACS-Puffer

1x PBS mit 0,1% Na-Azid (Natrium-Azid reinst 20%, Merck, Darmstadt) und 1% FCS.

3. Antikörper

Die FITC- oder PE-markierten Antikörper bzw. Antikörpergemische wurden in der Regel von Beckman Coulter GmbH Diagnostic, Krefeld, bezogen. Der FITC-markierte Antikörper gegen CD16 wurde von der Fa. DAKO, Hamburg, erworben. FITC-markierte Antikörper gegen CD56 und den $\alpha\beta$ TZR, ein PE-markierter Anti-CD11c-Antikörper sowie ein FITC- bzw. PE-markierter IgG₁ Isotypkontroll-Antikörper wurden von der Fa. Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, erworben. Darüber hinaus wurden ein weiterer Anti- $\alpha\beta$ TZR-Antikörper (TCR 2043, Klon BMA 031) der Fa. T cell diagnostics und ein Anti-V δ 1 (δ 1-Kette des $\gamma\delta$ TZR) über Endogen Biozol, Eching, bezogen.

4. Normalspender-Zellen

Die Zellen der Normalspender wurden nach Abgabe einer Einverständniserklärung gewonnen.

5. Zellkultur von Suspensionszellen

Die EBV-transformierte B-Zell-Linie wurde als Suspensionszelllinie in 10%igem FCS-Medium kultiviert. Die Zellkonzentration betrug dabei $3-5 \cdot 10^5$ Zellen/ml. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage geteilt oder mit neuem Medium versehen.

6. Immunfluoreszenz

FACS bedeutet „Fluorescent Activated Cell Sorting“ und stellt eine Methode dar, mit spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern Zellen aufzutrennen oder einzelne Zellpopulationen, die sich durch spezifische Oberflächenmoleküle voneinander unterscheiden, in einem Zellgemisch zu bestimmen. Zur Analyse der Zellen wurden $1 \cdot 10^5$ PBL in FACS-Röhrchen pipettiert, mit 2 μ l eines spezifischen FITC- (Fluoresceinisothiocyanat, grün) und/oder PE- (Phycoerythrin, hellrot) markierten Antikörpers gemischt, gevortext und 15 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge eines irrelevanten, markierten Antikörpers gleicher Ig-Klasse (Isotypkontrolle) verwendet. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen. Nach Dekantieren des Waschpuffers wurden die Proben bis zum Messen im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Proben wurden am FACScan (FACScan Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) bei Standardeinstellung und dem Programm CellQuest gemessen und analysiert.

Zur Auswertung des $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferationsassays wurden wegen der geringen Zellzahl die verwendeten Antikörper verdünnt: Zur Herstellung des pan $\gamma\delta$ /CD3-Antikörper-Gemischs wurden 30 ml FCS in ein steriles 50-ml-Schraubgefäß vorgelegt, dazu der Inhalt je eines Fläschchens Anti-pan $\gamma\delta$ -FITC (1 ml) und Anti-CD3-PE (2 ml) sowie 50 μ l Na-Azid (20%) pipettiert und auf 50 ml mit PBS aufgefüllt. Das Schraubgefäß wurde mit Alufolie umhüllt (Lichtschutz!) und bei 4°C gelagert. Zur Färbung wurden je FACS-Röhrchen 50 μ l Antikörpergemisch verwendet und 30 Minuten im Dunkeln bei 4°C inkubiert.

7. Intrazytoplasmatische Zytokinfärbung

Für die letzten 4–6 h der Kulturzeit wurden die Proben mit Monensin (5 μ g/ml: Monensin Na-Salz, Sigma, Deisenhofen) inkubiert, was ein Ansammeln von intrazellulären Proteinen bewirkt. Dazu wurden 500 mg Monensin in 10 ml Methanol gelöst und in 50 μ l-Aliquots bei -20°C gelagert. Monensin wurde zunächst in Methanol (1:10), dann in 10%igem Kul-

turmedium (bis auf 1:10³) verdünnt. Die Zellen wurden dann mit einem Antikörper gegen pan- $\gamma\delta$ gefärbt und bei RT 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Eine Probe diente als Isotypkontrolle und wurde mit einem irrelevanten Ig-PE gefärbt. Die Zellen wurden nach der Inkubation mit 50 μ l des Fixationsreagenzes A eines Permeabilisierungskits (DAKO IntraStain, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg) versetzt, gevortext und 10 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 2 ml FACS-Puffer 5 Minuten bei RT gewaschen und bis auf 50 μ l dekantiert. Nach Zugabe von 50 μ l des Permeabilisierungsreagenzes B wurden 10 μ l Anti-Interferon-FITC (Beckman Coulter GmbH Diagnostic, Krefeld) bzw. die gleiche Menge der Isotypkontrolle dazugegeben und für 15–30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert, gewaschen und gemessen. Durch die Fixierung sind die Proben bei 2–8 °C bis zu 8 h lagerbar.

Um eine spezifische Zytokinanfärbung zu beweisen, wurden nach Zugabe der Lösung B in ein Röhrchen bis zu 5 μ g eines ungefärbten polyvalenten Anti-IFN- γ -Antikörpers (Kaninchen) bzw. in ein Kontrollröhrchen die gleiche Proteinmenge eines ungefärbten irrelevanten Kaninchen-Igs gegeben und 45 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde in beide Ansätze der gefärbte Anti-IFN- γ -Antikörper gegeben und weiter nach Protokoll verfahren.

8. Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten

Mononukleäre Zellen wurden aus heparinisierem Blut (Heparin ohne Konservierungsmittel, z. B. Liquemin, Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen oder Vetren[®], Fa. Promonta, Hamburg) nach Verdünnung mit einer Waschlösung aus HBSS oder RPMI 1640 mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Paque[™], Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) gewonnen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in das weiter verwendete Medium aufgenommen und in einer Zählkammer (Neubauer improved, Fa. Neubauer, Marienfeld) gezählt. Ebenfalls über einen Dichtegradienten wurden Zellen aus einem Zellaphereseseparat (Spender S.K.) (Transfusionsmedizinische Abteilung der Uni-

versität Würzburg) aufgereinigt. Die Zellen wurden entweder sofort verwendet oder kryokonserviert und bei Bedarf aufgetaut:

Die einzufrierenden Zellen wurden in 0,9 ml eines 40%igen FCS-Mediums aufgenommen, in Kryoröhrchen (Fa. Nunc, Wiesbaden) gefüllt und kurz vor dem Einfrieren mit einer kalten, 20%igen DMSO-Lösung vermischt. Die Zellen wurden dann in einer programmierbaren Einfriermaschine (Nicoool, Fa. Air Liquide) eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

9. Gewinnung von unreifen dendritischen Zellen

Unreife, dendritische Zellen wurden aus der Universitäts-Hautklinik von Fr. Dr. Otto bezogen: Nach Gewinnung von peripheren Blutlymphozyten wurden Monozyten mittels Adhärenz an Plastik angereichert. Nach dem Ablösen wurden sie in Flachboden 24-Napf-Platten transferiert und in RPMI-Medium (unter Zusatz von 10% autologem Serum, GM-CSF (10^3 U/ml) und IL-4 (10^3 U/ml)) für sechs Tage im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 -Zufuhr) inkubiert. Frisches Medium sowie Zytokine wurden alle drei Tage hinzugefügt. Die gewonnenen Zellen bestanden aus über 90% unreifen DCs, was anhand morphologischer und durchflusszytometrischer Kriterien überprüft wurde.

10. MACS

MACS bedeutet „Magnetic Cell Sorting“, also das Sortieren von Zellpopulationen mit Hilfe paramagnetischer Partikel in einem starken Magnetfeld. Die entscheidende Zellfraktion wird mit einem spezifischen Antikörper markiert, der bereits mit paramagnetischen Partikeln (MicroBeads: Eisenoxid und Polysaccharid, 50 nm im Durchmesser) versetzt ist oder mit Hilfe eines zweiten, MicroBead-gekoppelten Antikörper, indirekt markiert. Die Zellsuspension wird auf eine magnetisierbare Separationssäule gegeben, die in einem starken

Magnetfeld plaziert wird. Dadurch entsteht ein hochgradientes Magnetfeld. Die magnetmarkierten Zellen haften in der Säule, während die unmarkierten Zellen durchfließen können. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld können die Zellen eluiert werden.

Vorgehen:

PBL wurden über eine Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen oder aufgetaut. Zum Zählen wurden die Zellen in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 aufgenommen, gezählt und nach Bedarf aufgeteilt (für Versuche, in denen Gesamtzellen mit um eine oder mehrere Zell-Populationen depletierten Zellfraktionen verglichen werden). Die nicht separierten Zellen wurden bei 4°C im Dunkeln gelagert. Wurden Monozyten depletiert, so vermied man Adhärenz und damit Aktivierung durch Aufnahme in Polypropylenröhrchen. Die zu depletierenden Zellen wurden mit MACS-Puffer gewaschen und in 1 ml Puffer resuspendiert. Dazu wurde der spezifische Antikörper gegeben:

- Anti-CD14-FITC zur Monozytendepletion (Fa. Beckman-Coulter)
- Anti- $\alpha\beta$ -FITC zur $\alpha\beta$ T-Zell-Depletion (Fa. T cell diagnostics)
- Anti-CD19-FITC zur B-Zell-Depletion (Fa. Beckman-Coulter)
- Anti-CD16-FITC (Fa. DAKO) und Anti-CD56-FITC (Fa. Becton Dickinson) zur NK-Zell-Depletion
- Anti-CD11c-PE zur Depletion von unreifen myeloischen DCs

Die Menge des Antikörpers war abhängig von der Zellzahl. Für $1-2 \cdot 10^7$ Zellen wurden 50 μ l Anti-CD14-Antikörper, 100 μ l Anti- $\alpha\beta$ -AK, 50 μ l Anti-CD16-AK und 25 μ l Anti-CD56-AK, 80 μ l Anti-CD19-AK oder 60 μ l Anti-CD11c-AK verwendet. Die Zellen wurden 25–30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert und danach zweimal mit je 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Je $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden dann 10 μ l Anti-FITC- bzw. 20 μ l Anti-PE-MicroBeads (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach) zugegeben und mit MACS-Puffer 1:10 (Anti-FITC) bzw. 1:5 (Anti-PE) verdünnt, 25–30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert und zweimal mit je 10 ml MACS-Puffer gewaschen. Bei Depletion von $\alpha\beta$ T- Zel-

len wurde die doppelte Menge MicroBeads zugegeben. Dann wurden die Zellen in 0,5 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Zur Negativ-Zelldepletion wurden, abhängig von der zu bindenden Zellmenge, die Separationssäulen vom Typ AS, BS oder CS (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch-Gladbach) verwendet. Die v. a. verwendete BS-Säule bindet zwischen $3 \cdot 10^7$ bis zu $1 \cdot 10^8$ Zellen. Die Säulen wurden nach Vorschrift mit MACS-Puffer gespült und nach dem Spülen eine Kanüle (23G) als Flowresistor (Erhöhung der Verweildauer der Zellen auf der Säule) angebracht. Die Zellen wurden danach auf die Trennsäule pipettiert; dann wurde mit einer entsprechenden Menge an MACS-Puffer nachgespült. Zur Positivdepletion der CD11c-Fraktion wurde bei einer Zellmenge von $3 \cdot 10^7$ Zellen die LS-Säule verwendet. Diese wurde einmal mit 3 ml MACS-Puffer vorgespült, die Zellen dann in 1 ml Puffer auf die Säule gegeben und dreimal mit je 3 ml Puffer gespült. Die gesammelte Fraktion enthielt die CD11c-negativen Zellen. Nach Entnahme der Trennsäule aus dem Magnetfeld wurde die positive Fraktion mit 5 ml Puffer von der Säule eluiert.

Die gewonnenen Zellen wurden mittels FACScan auf ihre Reinheit hin untersucht, mit Kulturmedium gewaschen und für weitere Versuche verwendet.

11. Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen

PBL ($1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf) wurden nach dem Auftauen in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 in Duplikaten auf einer 96-Napf-Platte (Rundboden) (Fa. Greiner GmbH, Frickenhausen) ausplattiert und im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 -Zufuhr) inkubiert. An Tag 1, in manchen Versuchen auch an den Tagen 2 und 3, wurden die Zellen ($\gamma\delta$ T-Zellen, CD4-, CD8-positive Zellen, $\alpha\beta$ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Monozyten) im Durchflusszytometer auf ihre Aktivierung anhand von Antikörpern gegen CD25, CD54, CD69, CD80, CD86, CD95 und CD122 untersucht.

Die Wirkung von Poly (I:C), IPP, verschiedenen Zytokinen oder neutralisierenden Anti-Zytokin-Antikörpern wurde in diesem Versuchsansatz untersucht; daneben wurden in ei-

nem Teil der Ansätze zelldepletierte (ohne CD11c-, CD14-, CD16/CD56-, CD19-positive Zellen) PBL-Fraktionen eingesetzt und mit Gesamt-PBL verglichen.

12. Proliferationsassay

PBL ($5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf) wurden nach dem Auftauen in 10%igem AB-Medium, in einigen Versuchen auch in 10%igem FCS-Medium in Duplikaten ausplattiert und im Brutschrank (37°C , 5% CO_2 -Zufuhr) inkubiert. Der Zusatz von IL-2 war variabel und betrug 10, 50 oder 100 U/ml bzw. unterblieb. IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$, verdünnt in 10%igem AB-Medium) wurde als Positivkontrolle für die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation eingesetzt und z. T. auch in anderen Konzentrationen verwendet. Als Negativkontrolle diente 10 μl Verdünnungsmedium.

Am Tag 7 oder 8 wurden die Zellen mit Hilfe des FACScan auf das Auswachsen von $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht, indem jedes Röhrchen mit 50 μl des pan $\gamma\delta$ -FITC-/CD3-PE-Antikörper-Gemischs gefärbt, die Anzahl der lebenden $\gamma\delta$ T-Zellen pro 10^4 aufgenommene Zellen bestimmt und das Verhältnis aus $\gamma\delta$ T-Zellen und den gesamten CD3-positiven Zellen berechnet wurde. In Versuchen ohne $\alpha\beta$ T-Zellen wurden die Zellen gezählt und aus dem Anteil der $\gamma\delta$ TZR-positiven Zellen an den Gesamtzellen sowie der Zellzahl die Absolutzellzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen berechnet.

In diesem Assay wurden ebenfalls die in Abschnitt 10 beschriebenen Substanzen und die zelldepletierten Fraktionen analysiert.

13. Klonierung

Nach Gewinnung von PBL durch Dichtegradienten-Zentrifugation wurden $\alpha\beta$ T-Zellen und ein Teil der NK-Zellen mittels MACS depletiert sowie durch Zählen und mittels Durchflussszytometer der absolute Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt.

Als Fütterzellen wurden aufgetaute PBL mit 35 Gy, kultivierte EBV-transformierte B-Zellen mit 25 Gy bestrahlt. Pro Napf wurden $3 \cdot 10^4$ Fütterzellen in einem Verhältnis von 5/7 PBL und 2/7 EBV-Zellen ausplattiert. Die bestrahlten Fütterzellen wurden gewaschen, in Klonierungsmedium aufgenommen, gezählt und auf das Gesamtvolumen verdünnt (in der Regel ausreichend für 10 sterile 96-Napf-Rundbodenplatten). Pro Napf wurden rein rechnerisch 0,45 $\gamma\delta$ T-Zellen zu den Fütterzellen gegeben und ausplattiert. Nach ca. zwei Wochen wurden die Klone durch Zugabe neuer Fütterzellen und 10%igem AB-Medium (100 U/ml IL-2) weiterkultiviert. Ein Klon besteht am Ende der mehrwöchigen Inkubationszeit aus $1-5 \cdot 10^6$ Zellen. Zur Bestimmung des Zelltyps wurde jeder Klon mit pan $\gamma\delta$ /CD3 gefärbt und im FACS analysiert. $\gamma\delta$ - positive Klone wurden mit Anti-V δ 1-FITC/Anti-CD3-PE, Anti-V δ 2-FITC/Anti-CD3-PE und Anti-V γ 9-FITC/Anti-CD3-PE auf ihre Untergruppen untersucht.

Klone können kryokonserviert, nach dem Auftauen mit Fütterzellen gemischt und in Klonierungsmedium mit 100 U/ml IL-2 kultiviert werden.

14. Zytokin-ELISA

ELISA bedeutet „Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay“. Mit Hilfe von ein bis zwei Antikörpern wird ein spezifisches Antigen gebunden, wobei der zweite Antikörper biotinyliert ist. Streptavidin, das an ein Enzym (Alkalische Phosphatase oder HRP(eroxidase), „horse radish peroxidase“) gekoppelt ist, geht eine starke Bindung mit Biotin ein. Zum Entwickeln werden ein enzymespezifisches Substrat, nämlich die Farbstoffe p-Nitrophenyl-Phosphat oder TMB, gegeben, die Reaktion gestoppt und im ELISA-Reader ausgewertet.

Die vorgefertigten ELISA-Platten (Human IFN- γ ELISA Detektionskit, Fa. Endogen, Biozol, Eching) sind bereits mit dem ersten Antikörper beschichtet. In jeden Napf wurden 50 μ l des zu testenden Kulturüberstandes bzw. eine Verdünnung bei hoher Zytokinkonzentration in Duplikate pipettiert. Zur semiquantitativen Auswertung wurden lyophilisierte Standards mit Aqua dest. aufgelöst, in sechs Stufen (1:2,5) in Kulturmedium verdünnt und ebenfalls in Doppelansätzen pipettiert. Der als Leerwert herangezogene Ansatz enthielt e-

benfalls das zur Verdünnung der Standards benutzte Medium. Zu den Testansätzen wurden jeweils 50 µl des zweiten, biotinylierten Antikörpers gegeben und die Platte 2 h bei RT inkubiert. Mit verdünntem Waschpuffer wurde die Platte mehrfach gewaschen, danach 100 µl der Streptavidin-HRP-Lösung dazugegeben und 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 µl der TMB-Lösung dazugegeben, die Platte 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert und die Reaktion nach Zugabe von 100 µl des Stop-Reagenzes beendet. Die Platte wurde dann im ELISA-Reader (Photometer für Mikrotiterplatten: Titertek Multiskan Plus MK 2, Fa. ICN, München) bei 450 nm bzw. 450 nm/550 nm gemessen.

ERGEBNISSE

1. Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung von mononukleären Zellen

Nach ihrer Aktivierung lässt sich auf PBL eine Heraufregulierung von verschiedenen Oberflächenmarkern nachweisen. Da bei den mit den $\gamma\delta$ T-Zellen verwandten NK-Zellen eine Aktivierung durch ds-RNS Poly (I:C) beschrieben ist [6], wurden zunächst PBL und $\gamma\delta$ T-Zellen auf ihre Aktivierbarkeit durch Poly (I:C) hin untersucht.

1.1. Induktion von Aktivierungsmarkern auf $\gamma\delta$ T-Zellen

Nach Inkubation mit $\gamma\delta$ T-Zell-spezifischen Antigenen werden sowohl CD69 als auch CD25 induziert [84]. So untersuchten wir auf PBL, die mit und ohne Poly (I:C) für 1–3 Tage inkubiert wurden, die Expression verschiedener Aktivierungsmarker im FACS. Wie in Abbildung 1 gezeigt, konnten wir auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach Gabe von Poly (I:C) einen raschen Anstieg des CD69-Moleküls von Tag 0 auf Tag 1 feststellen; die Expression war ab Tag 2 wieder rückläufig. CD25 wurde nach Poly (I:C)-Gabe auf $\gamma\delta$ T-Zellen nicht induziert, gleichermaßen auch nicht CD54, CD95 oder CD122 (zu CD54 siehe Tabelle 1). In den weiteren Versuchen wurde somit die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 1 als Marker für die Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung untersucht.

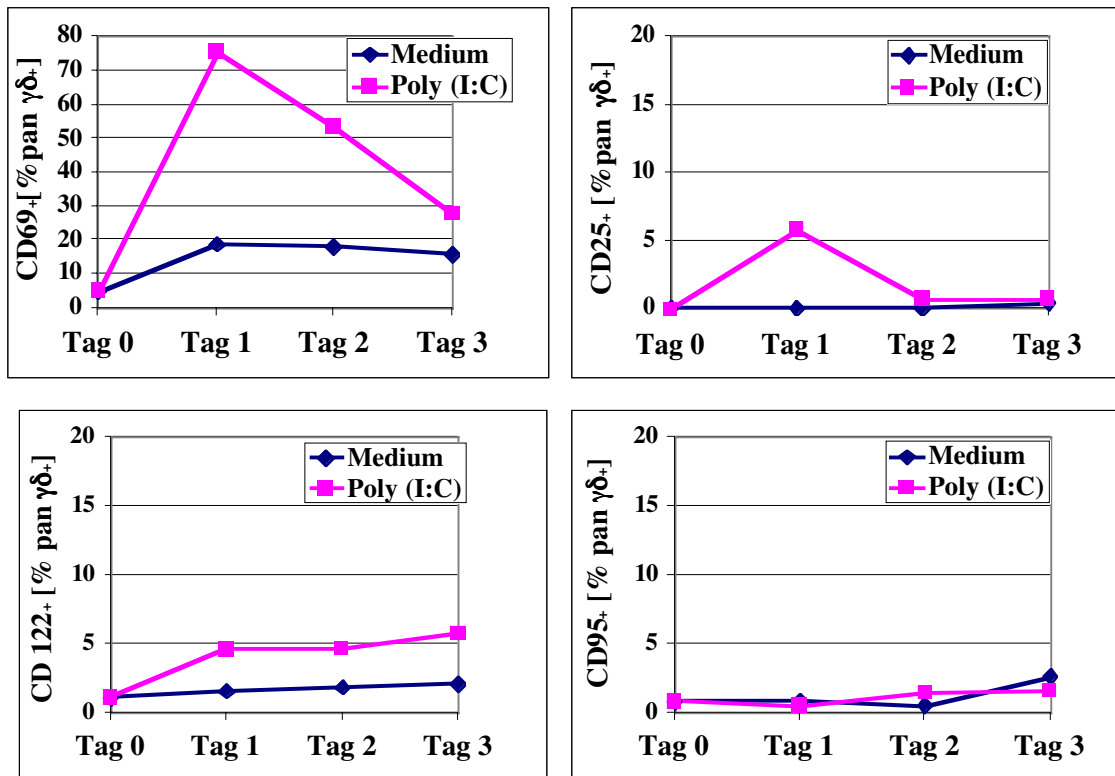


Abbildung 1: Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C): Zeitkinetik

Periphere Blutlymphozyten eines Normalspenders (PBL $1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden als Duplikate in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 ausplattiert und ihre Aktivierung mit und ohne Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) an den Tagen 1, 2 und 3 gemessen; die Zellen wurden sowohl mit einem Antikörper gegen den $\gamma\delta$ TZR (pan $\gamma\delta$ -FITC) als auch in verschiedenen Ansätzen mit Antikörper gegen die Aktivierungsmarker CD25, CD69, CD95 und CD122 gefärbt und in einem FACS untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils aktivierter Zellen an den Gesamt $\gamma\delta$ T-Zellen.

Im folgenden Versuch wurde untersucht, ob die Poly (I:C)-vermittelte CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen konzentrations- oder spenderabhängig ist. Die von drei Normalspendern gewonnenen PBL wurden mit verschiedenen Konzentrationen der ds-RNS inkubiert und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach 24 h gemessen. Der für Poly (I:C) bestimmte Wert wurde durch den Wert der Mediumkontrolle geteilt. In Abbildung 2 wird gezeigt, dass

die CD69-Induktion auf $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C) in allen drei untersuchten Normal-spendern titrierbar war. Je nach Spender war die Zunahme der CD69-positiven Zellen nach Gabe der ds-RNS unterschiedlich und war maximal 4,6- (PBL 3) bzw. 2,4-fach (PBL 1 und 2).

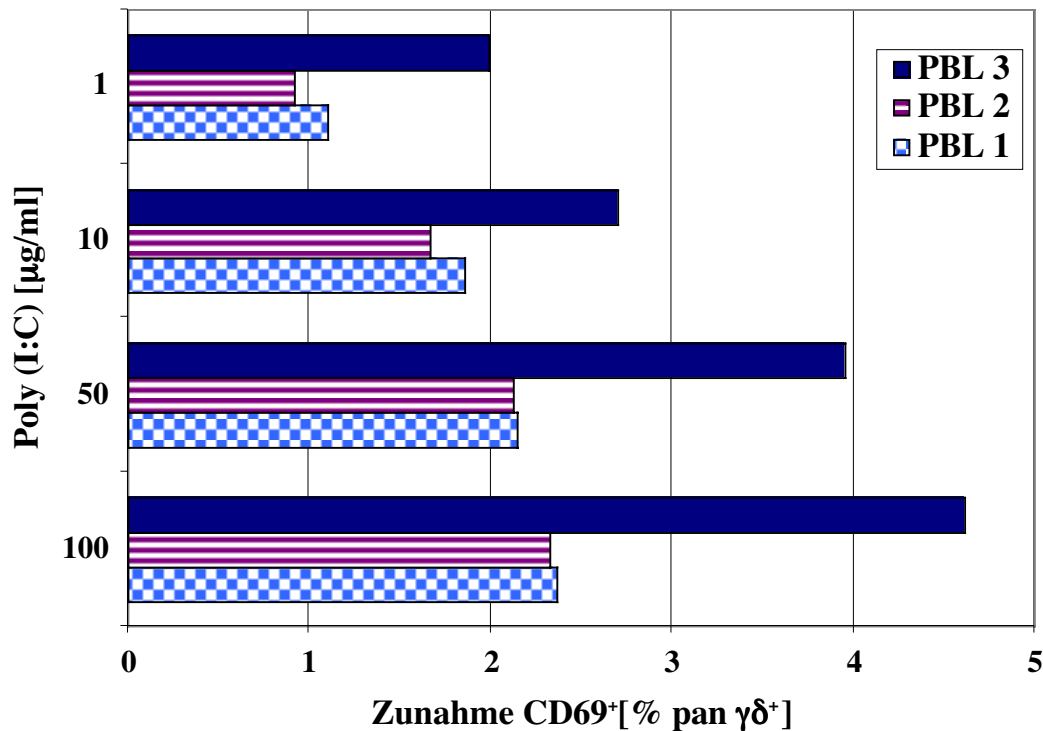


Abbildung 2: Poly (I:C)-Titration zu PBL verschiedener Spender

PBL von drei Normal Spendern ($1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden als Duplikate in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 mit Poly (I:C) in verschiedenen Konzentrationen (100/50/10/1 µg/ml) ausplattiert und die CD69-Expression an Tag 1 auf $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS gemessen. Nach Bestimmung des Mittelwertes des prozentualen Anteils der CD69-positiven $\gamma\delta$ T-Zellen wurde die stimulationsbedingte Zunahme durch Poly (I:C) wie folgt ermittelt und dargestellt:

$$\frac{\text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Poly (I:C) Tag 1}}{\text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Medium Tag 1}}$$

Um die mit Poly (I:C) erzielte Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen mit der Wirkung eines spezifischen Phosphoantigens (IPP) vergleichen zu können, wurden PBL mit IPP ohne IL-2 inkubiert und die Oberflächenmoleküle CD69 und CD25 auf $\gamma\delta$ T-Zellen an verschiedenen Tagen im FACS untersucht.

Wie in Abbildung 3 dargestellt, konnten wir für IPP bekannte Daten bestätigen: Das Antigen induzierte beide Aktivierungsmarker, jeweils mit maximaler Ausprägung an Tag 3. Dabei wurde CD69 früher exprimiert als CD25; CD69 war bereits an Tag1 deutlich nachweisbar, CD25 erst an Tag 2.

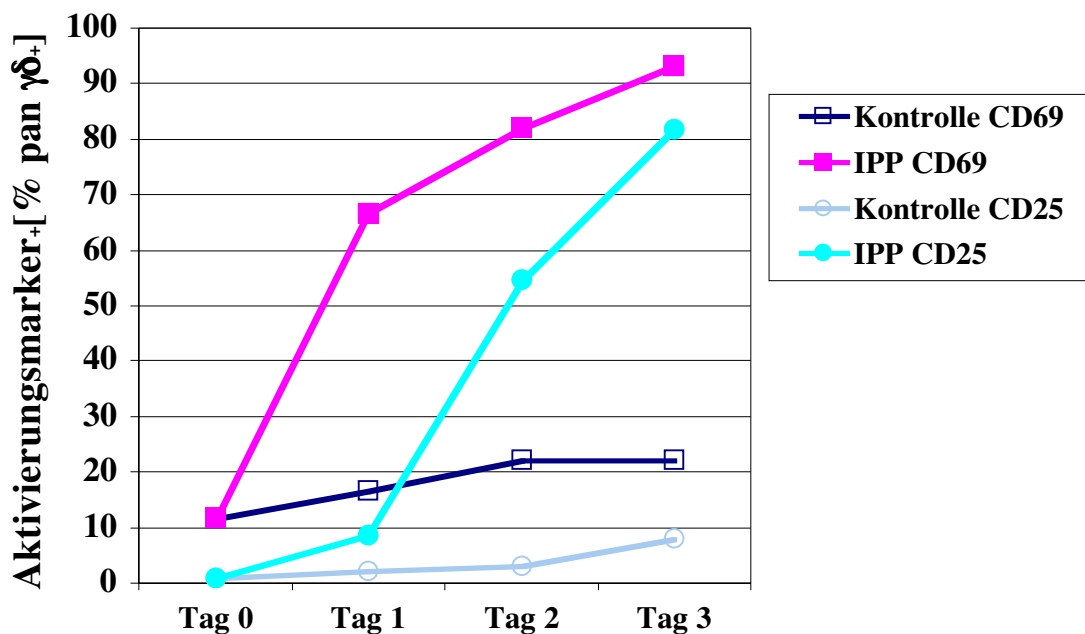


Abbildung 3: IPP-induzierte Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen

PBL ($2 \cdot 10^5$ /Napf) wurden mit Medium (Kontrolle) bzw. mit IPP (5 $\mu\text{g/ml}$) ohne IL-2 inkubiert und die Aktivierungsmarker CD69 und CD25 auf $\gamma\delta$ T-Zellen an den Tagen 0, 1, 2 und 3 im FACS gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD69- oder CD25-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen in zeitlicher Reihenfolge.

Desweiteren wurde auch die Expression von CD54 (ICAM-I) auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 1 untersucht. Dazu wurden PBL ohne IL-2 mit IPP oder Poly (I:C) inkubiert und ICAM-I an Tag 1 auf den $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS gemessen. Während an Tag 0 kein CD54 auf $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisbar war, waren durch IPP-Inkubation 21% der $\gamma\delta$ T-Zellen und durch Poly (I:C) 2,1% positiv für ICAM-I (Kontrolle: 0,6% der $\gamma\delta$ T-Zellen). Dies wird in Tabelle 1 gezeigt. Dies bedeutet, dass im Vergleich zu IPP Poly (I:C) nur eine sehr schwache CD54-Expression zu induzieren vermag.

Tabelle 1: Induktion von CD54 auf $\gamma\delta$ T-Zellen

	CD54+ [% pan- $\gamma\delta$ +]
Medium	0,6
IPP	21,0
Poly (I:C)	2,1

PBL ($1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 mit IPP ($5 \mu\text{g/ml}$) oder Poly (I:C) ($50 \mu\text{g/ml}$) inkubiert und CD54 an Tag 1 auf den $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS gemessen.

1.2. Induktion von Aktivierungsmarkern auf $\alpha\beta$ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und Monozyten

Da in der Literatur eine Poly (I:C)-vermittelte Stimulierung von T-Zellen bisher nicht beschrieben wurde, untersuchten wir, ob die auf $\gamma\delta$ T-Zellen entdeckte Aktivierung auch auf CD4-positiven und CD8-positiven $\alpha\beta$ T-Zellen nachzuweisen ist. Wie in Tabelle 2 dargestellt wird, nahm die Expression von CD69 auf CD8-positiven Zellen an Tag 1 geringfügig zu und fiel ab Tag 2 wieder ab. Dasselbe traf für CD4-positive Zellen zu. CD25 und CD122 konnte, wie auf den $\gamma\delta$ T-Zellen, nicht auf $\alpha\beta$ T-Zellen nachgewiesen werden.

Die in der Literatur beschriebene Aktivierung von NK-Zellen [6] konnten wir auch anhand des von uns untersuchten CD69-Moleküls bestätigen. Durch Poly (I:C) ließ sich auf NK-Zellen an Tag 1 CD69 induzieren; dabei blieb die CD69-Expression auf NK-Zellen im Gegensatz zu $\gamma\delta$ T-Zellen an den Tagen 2 und 3 erhöht. Auch CD25 nahm im Unterschied zu den $\gamma\delta$ T-Zellen deutlich auf NK-Zellen zu und ließ sich bis Tag 3 nachweisen. Die CD122-Expression fiel unabhängig von der Poly (I:C)-Gabe an Tag 1 ab und war auf den NK-Zellen durch die ds-RNS ab Tag 2 höher als in der Negativkontrolle. Die Expression von CD95 wurde, ebenso wie auf $\gamma\delta$ T-Zellen, auf NK- oder $\alpha\beta$ T-Zellen nicht beeinflusst. Wurde weiterhin die Untergruppe der CD16/56-positiven T-Zellen, die neben den $\gamma\delta$ T-Zellen auch $\alpha\beta$ T-Zellen enthält, untersucht, konnte Poly (I:C) einen ähnlichen Effekt erzielen wie auf NK-Zellen.

Tabelle 2a und b): Veränderung von Aktivierungsmarkern auf PBL durch Poly (I:C)

	CD69	CD25	CD122	CD95
CD4 ⁺	1,5	2,1	0,2	15,7
CD8 ⁺	3	0,2	9,1	1,7

Tab. 2a): Ausgangswerte Tag 0

	CD69	CD25	CD122	CD95
CD4 ⁺	+	0	0	- -
CD8 ⁺	+	0	0	0
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	++	+++	+	0
CD3 ⁺ /CD16 ⁺ /CD56 ⁺	++	++)	+	

Tab. 2b): Änderung der Aktivierungsmarker :

0: keine Änderung des Aktivierungsmarkers

+: 2-fache Zunahme des prozentualen Anteils aktivierter Zellen durch Poly (I:C)

++: bis 3-fache Zunahme des prozentualen Anteils aktivierter Zellen durch Poly (I:C)

+++: > 3-fache Zunahme des prozentualen Anteils aktivierter Zellen durch Poly (I:C)

- -: 2-fache Abnahme des prozentualen Anteils aktivierter Zellen durch Poly (I:C)

Tab. 2:

Versuchsdurchführung siehe Abb.1; die Zellen wurden sowohl mit einem Antikörper (FITC-) gegen spezifische Oberflächenmarker (CD4, CD8, CD3/CD16/CD56) als auch gegen Aktivierungsmarker gefärbt und in einem FACS untersucht. Dargestellt ist in Tab. 2a) der prozentuale Anteil der aktivierter Zellen an Tag 0 sowie in Tab. 2b) die Änderung des prozentualen Anteils aktivierter Zellen im Vergleich nach Inkubation mit Medium/Poly (I:C).

Neben den beschriebenen Aktivierungsmarkern sollten auf APCs (Monozyten und B-Zellen) weitere Oberflächenmoleküle untersucht werden. Typisch für APCs ist die Expression von kostimulierenden Molekülen, die oft abhängig von der Aktivierung der Zellen sind. Da Poly (I:C) Monozyten und B-Zellen stimuliert [6], wurden PBL mit der ds-RNS inkubiert und die Expression von CD80, CD86 und CD69 auf CD14- und CD19-positiven Zellen an Tag 1 und 3 im FACS analysiert. Diese Ergebnisse werden in Tabelle 3 dargestellt: CD80 wurde, gemessen am MFI, an beiden Tagen dezent auf Monozyten exprimiert, jedoch stärker ohne Poly (I:C). Auf B-Zellen wurde dieses Oberflächenmolekül weder mit noch ohne Poly (I:C) detektiert. Eine deutliche Zunahme der CD86-Expression bis Tag 3 war ohne Poly (I:C) auf den Monozyten zu finden; nach ds-RNS-Inkubation wurde dieses Molekül herunterreguliert. Auf B-Zellen konnte es nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits für T- oder NK-Zellen festgestellt, wurde auch auf Monozyten durch die Inkubation mit Poly (I:C) CD69 stärker exprimiert. Im Gegensatz dazu wurde das CD69-Molekül auf B-Zellen kaum durch die ds-RNS induziert.

Tabelle 3: Aktivierung von B-Zellen und Monozyten durch Poly (I:C) Mean

	Monozyten				B-Zellen			
	Tag 1		Tag 3		Tag 1		Tag 3	
	-PoIC	+PoIC	-PoIC	+PoIC	-PoIC	+PoIC	-PoIC	+PoIC
CD80	12,0	8,8	14,6	12,3	4,5	4,1	4,8	4,2
CD86	30,8	22,0	39,5	6,0	4,4	6,6	4,5	6,0
CD69	5,8	26,0	6,4	3,7	3,1	8,8	3,4	5,9

PBL ($5 \cdot 10^4$ /Napf) wurden in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 mit und ohne Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert und ihre Aktivierung an den Tagen 1 und 3 gemessen. Auf den CD14- positiven und den CD19-positiven Zellen wurden verschiedene Aktivierungsmarker im FACS untersucht. Dargestellt ist der MFI (Mean Fluorescence Intensity) .

Zusammenfassend bestätigt dies eine unspezifische Aktivierung verschiedener lympho- oder monozytärer Zellen, was sich in der Regel anhand einer verstärkten Expression von CD69 zeigte. Daneben wurden weder die kostimulierenden Moleküle CD80/86 induziert.

2. Untersuchung von weiteren Effektorfunktionen

2.1. Poly (I:C)-vermittelte Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen

Nach Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch spezifische Antigene, Anti-CD3 oder Mitogene kommt es zur Proliferation der Zellen, wenn ein zweites Signal (z. B. T-Zell-Wachstumsfaktoren IL-2 oder IL-15, Kostimulation über Zell-Zell-Kontakt) vorhanden ist. Da Poly (I:C) auf $\gamma\delta$ T-Zellen den Aktivierungsmarker CD69 induzieren konnte, stellte sich die Frage, ob durch ein zweites Signal die Proliferation dieser Zellen ausgelöst wird oder ob die ds-RNS in der Art eines Kostimulans die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen bei suboptimalen Dosen von Antigen (IPP) und Zytokin (IL-2) verstärkt. Zur Klärung dieser Frage wurden Proliferationsassays durchgeführt: PBL wurden mit IPP, IL-2 und Poly (I:C) inkubiert und

der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen an Tag 7 im FACS bestimmt (Abbildung 4a) sowie die absolute Zahl an $\gamma\delta$ T-Zellen ermittelt (Abbildung 4b): Bei Zugabe verschiedener Konzentrationen von Poly (I:C) konnte ein dosisabhängiger kostimulierender Effekt auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation nachgewiesen werden. Der relative Anteil von $\gamma\delta$ T-Zellen war im Mittel mit ds-RNS 50% höher als ohne ds-RNS. Die Gabe von Poly (I:C) führte bereits bei einer niedrigen IL-2 Konzentration ohne spezifisches Antigen (IPP) zu einer geringen kostimulierenden Wirkung (Anstieg von 1.800 auf 4.150 $\gamma\delta$ T-Zellen). Ohne IL-2 war kein Effekt nachweisbar (Anstieg von 2.350 auf 2.650 $\gamma\delta$ T-Zellen). Hervorzuheben ist auch, dass Poly (I:C) mit IPP bereits ohne IL-2 zu einer signifikanten Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen führt; d. h., die ds-RNS kann die Wirkung von IL-2 imitieren.

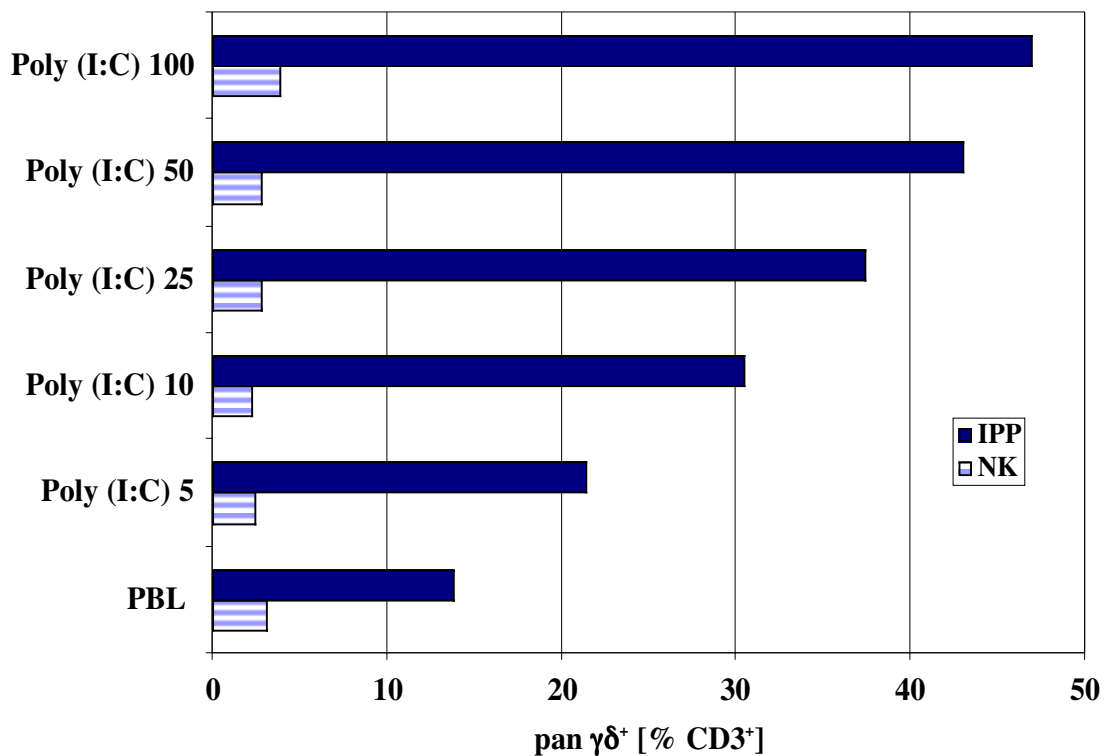


Abbildung 4a: Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen: Einfluss von Poly (I:C)

PBL ($5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf) wurden in 10%igem AB-Medium mit und ohne IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$), mit IL-2 (10 U/ml, Abb. 4a) sowie Poly (I:C) (100/50/25/10/5 $\mu\text{g/ml}$) als Duplikate inkubi-

biert und an Tag 7 der Anteil pan $\gamma\delta$ TZR-positiver CD3-positiver Zellen im FACS analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils der pan $\gamma\delta$ TZR-positiven Zellen an den Gesamt CD3-positiven Zellen.

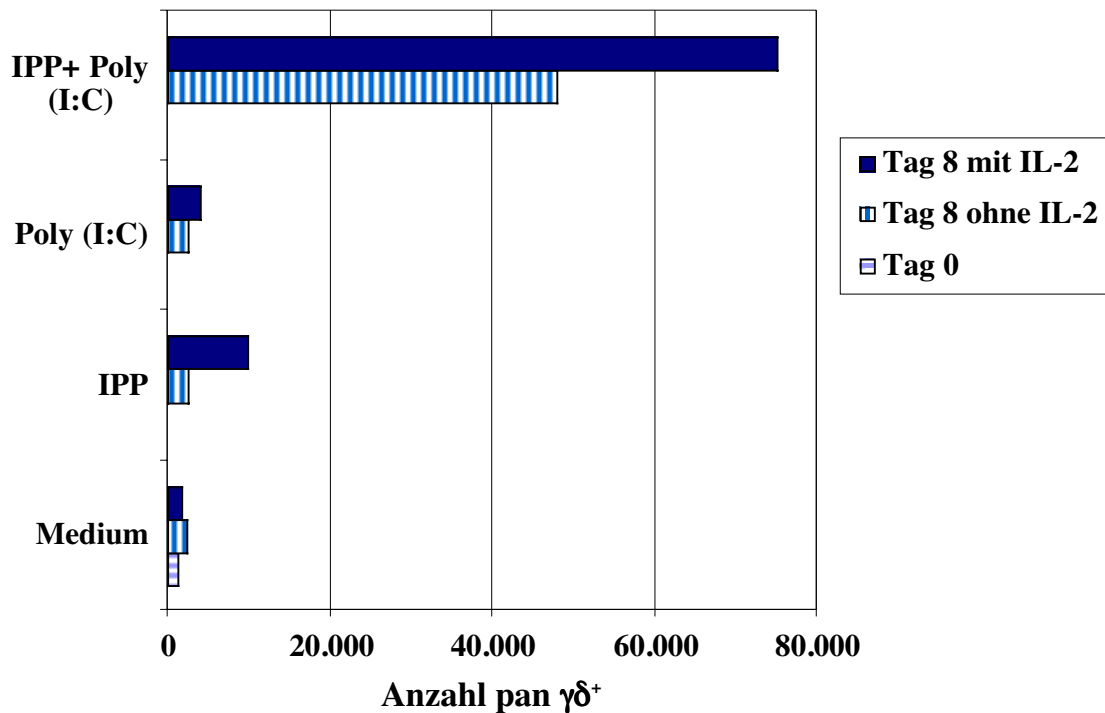


Abbildung 4b: Kostimulation durch Poly (I:C): Absolute Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen

PBL ($5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf) wurden in 10%igem AB-Medium mit und ohne IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$), sowohl mit als auch ohne IL-2 (10 U/ml) sowie Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) als Duplikate inkubiert und an Tag 7 der Anteil pan $\gamma\delta$ TZR-positiver CD3-positiver Zellen im FACS analysiert sowie in mit der Gesamtzellzahl korreliert. Dargestellt ist der Mittelwert der Gesamtzahl der pan $\gamma\delta$ TZR-positiven Zellen

2.2. *Induktion von IFN- γ*

2.2.1. *ELISA*

Nach Aktivierung von T_H1- oder NK-Zellen kommt es zur Sekretion von verschiedenen Zytokinen; ein sehr wichtiges und typisches Zytokin ist IFN- γ . Da IFN- γ auch von aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen gebildet wird, wurde die Sekretion dieses Zytokins mit den beiden folgenden Methoden bestimmt: Mittels ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) wurde in den Überständen aktivierter Lymphozyten semiquantitativ die Konzentration von IFN- γ gemessen, mittels intrazytoplasmatischer Zytokinmessung wurden $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS auf ihre spezifische IFN- γ Sekretion nach Stimulierung mit Poly (I:C) hin untersucht.

Wie in Tabelle 4 gezeigt wird, wurden Gesamt-PBL oder PBL nach Monozytendepletion mit Poly (I:C) für 24 oder 64 h inkubiert, danach die Überstände abpipettiert und die IFN- γ Konzentration mittels ELISA gemessen. Die Zugabe von Poly (I:C) führte selbst nach drei Tagen kaum zur Produktion von IFN- γ . Wurden jedoch die Monozyten entfernt, konnte deutlich mehr IFN- γ im Überstand gemessen werden. Die Gabe von Poly (I:C) induzierte im Ansatz der Gesamt-PBL kaum die Sekretion des Zytokins; nach Depletion der Monozyten jedoch konnte eine sehr ausgeprägte Zunahme an IFN- γ im Überstand gemessen werden, wobei in diesem Versuchsansatz die sezernierenden Zellen nicht untersucht wurden.

Tabelle 4: IFN- γ Sekretion nach Poly (I:C)-Gabe

IFN- γ [pg/ml] / [U/ml]	24 h		64 h	
	[pg/ml]	[U/ml]	[pg/ml]	[U/ml]
PBL allein	0	0	0	0
PBL ohne Monozyten	456	18,2	965	38,6
PBL allein mit Poly (I:C)	115	4,6	232	9,3
PBL ohne Monozyten mit Poly (I:C)	1266	50,6	6238	250

PBL mit und ohne Monozyten (nach MACS-Depletion) wurden in einer Konzentration von $5 \cdot 10^4$ /Napf ohne IL-2 und ohne IPP ausplattiert; dazu wurde Poly (I:C) (100 μ g/ml) hineinpipettiert. Nach 24 und 64 h wurden die Überstände abpipettiert und bei -20°C gelagert. Nach dem Auftauen wurde IFN- γ [pg/ml] in den Überständen mittels ELISA gemessen. Dargestellt ist die Konzentration von IFN- γ in pg/ml sowie U/ml.

1 pg Endogen Standard = 0,04 U NIAID

2.2.2. *Intrazytoplasmatische Zytokinmessung*

Mittels einer intrazytoplasmatischen Zytokinmessung können im FACS zytokinproduzierende Zellen näher charakterisiert werden. So wurde in einem PBL-Gemisch IFN- γ in $\gamma\delta$ T-Zellen nach Inkubation mit IL-2 und PMA/Ionomycin oder Poly (I:C) gemessen.

Wie in Tabelle 5 dargestellt ist, konnten die $\gamma\delta$ T-Zellen durch beide Substanzen aktiviert werden (Induktion von CD69). In einem hohen Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen konnte nach Inkubation mit PMA das Zytokin detektiert werden. Nach Poly (I:C)-Gabe waren nur wenige $\gamma\delta$ T-Zellen auch IFN- γ -positiv. Dieses Ergebnis korrelierte auch mit den ELISA-Daten, in denen keine erhöhte IFN- γ Konzentration im Überstand von Gesamt-PBL an Tag 3 (siehe Kap. 2.2.1.) zu finden war.

Tabelle 5: Intrazytoplasmatische IFN- γ Messung in $\gamma\delta$ T-Zellen

	CD69 ⁺ [% pan $\gamma\delta^+$]	IFN- γ^+ [% pan $\gamma\delta^+$]
Kontrolle	27,1	0
PMA/Ionomycin	100	83,1
Poly (I:C)	73,5	9,0

PBL ($1,5 \cdot 10^5$ /Napf) wurden mit 100 U/ml IL-2 und Poly (I:C) (50 μ g/ml) für drei Tage ausplattiert. Dabei wurde zu den Ansätzen, die mit PMA (25 ng/ml) und Ionomycin (500 ng/ml) ab Tag 3 für 6 h inkubiert werden sollten, zunächst RPMI dazugegeben. Ebenfalls wurde Monensin (5 μ g/ml) ab Tag 3 für 6 h in alle Ansätze pipettiert, in denen IFN- γ gemessen wurde. Aus je einem Napf (ohne Monensin) wurde die Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen (CD69) an Tag 3, im Ansatz mit PMA/Ionomycin nach 6 h, im FACS gemessen. Daneben wurde an Tag 3 der Anteil der IFN- γ -positiven $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS bestimmt. Dargestellt ist der Anteil der aktivierten und der IFN- γ -positiven $\gamma\delta$ T-Zellen.

3. Mechanismus der Poly (I:C)-vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulation

3.1. Wirkung von Poly (I:C) auf $\gamma\delta$ T-Zell-Klone

Da Poly (I:C) direkte und indirekte Wirkungen auf verschiedene Zellen zeigt, untersuchten wir eine direkte Wirkung von Poly (I:C) auf isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen. Da wir auf $\gamma\delta$ T-Zellen Aktivierungsmarker gemessen hatten, konnten wir zur Isolation der Zellen keine Technik einsetzen, die zur Voraktivierung der Zellen geführt hätte (z. B. MACS mit Anreicherung $\gamma\delta$ TZR-positiver Zellen nach Inkubation mit einem Anti-pan $\gamma\delta$ TZR-Antikörper). Daneben existieren keine Antikörper, die eindeutig zwischen $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen unterscheiden können. Somit war eine Depletion aller Zellen mit Anreicherung von $\gamma\delta$ T-Zellen nicht möglich, weshalb wir die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zell-Klonen untersucht haben. Auf je ei-

nem V γ 9V δ 2- bzw. δ 1-Klon wurden nach dreiwöchiger Expansionsdauer zunächst CD69 an Tag 0 bestimmt und eine konstitutive CD69-Expression von 60% (Klon 4C6 :V δ 1) bzw. 30% (Klon 7B10 : V γ 9 δ 2) nachgewiesen :

Die Zellen wurden danach für 24 h mit PHA bzw. Poly (I:C) inkubiert und wiederum die CD69-Expression gemessen. Bereits in der Negativkontrolle war nach diesem Zeitraum eine weitere Aktivierung des V δ 1-Klon auf 70% CD69-positive Zellen festzustellen. Die Expression von CD69 hatte auf dem V γ 9V δ 2-Klon um 50% abgenommen (Tag 1: 14% CD69⁺). PHA bewirkte auf dem V δ 1-Klon eine Zunahme von CD69 um 38%, auf dem V γ 9V δ 2-Klon auf den 2,7fachen Wert der Negativkontrolle an Tag 1. Die CD69-Expression nach Poly (I:C)-Inkubation blieb im Vergleich zur Kontrolle unverändert. Die Aktivierung des V γ 9V δ 2-Klones wird in Abbildung 5 dargestellt. Damit konnte keine direkte Induktion des CD69-Moleküls auf $\gamma\delta$ T-Zell-Klonen durch Poly (I:C) nachgewiesen werden.

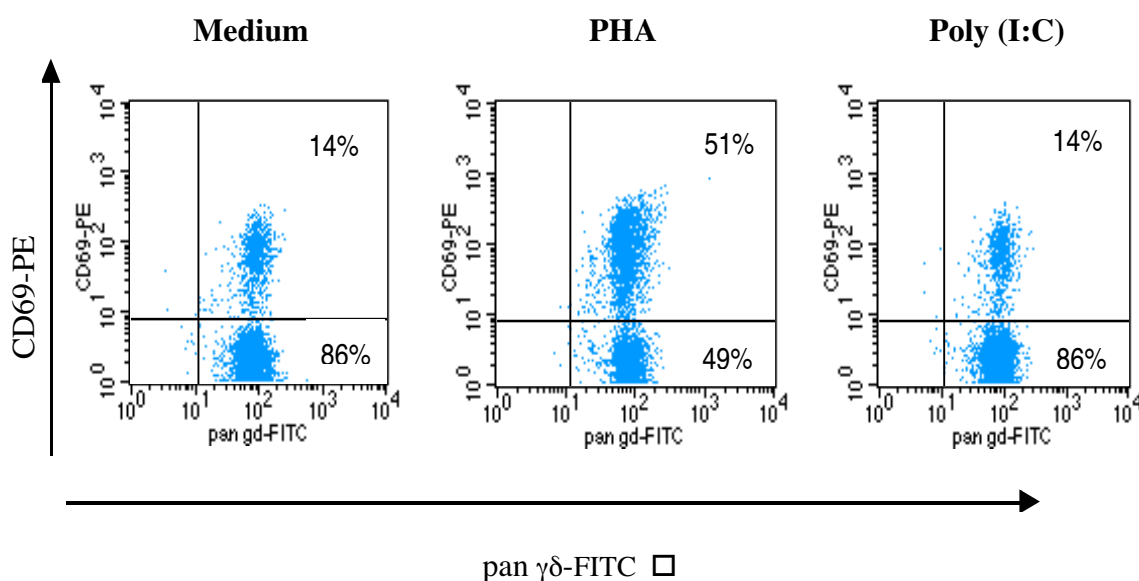


Abbildung 5: V γ 9 δ 2-Klon: Aktivierung an Tag 1

Der $\gamma\delta$ T-Zell-Klon ($3,4 \cdot 10^5$ Zellen /Napf) wurde in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 in Duplikaten ausplattiert. Als Negativkontrolle wurde Medium, als Positivkontrolle PHA (1 μ g/ml) bzw. Poly (I:C) (100 μ g/ml) dazupipettiert. Nach 24 h wurden die Zellen mit einem

Anti-pan $\gamma\delta$ -Antikörper (-FITC markiert, x-Achse) und einem Anti-CD69-Antikörper (-PE markiert, y-Achse) gefärbt und im FACS gemessen. Dargestellt sind im rechten oberen Quadranten der Anteil der CD69-positiven $\gamma\delta$ T-Zellen (doppelt gefärbt), im rechten unteren Quadranten der Anteil der CD69-negativen $\gamma\delta$ T-Zellen (FITC-gefärbt).

3.2. *Untersuchung indirekter Mechanismen auf die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulation*

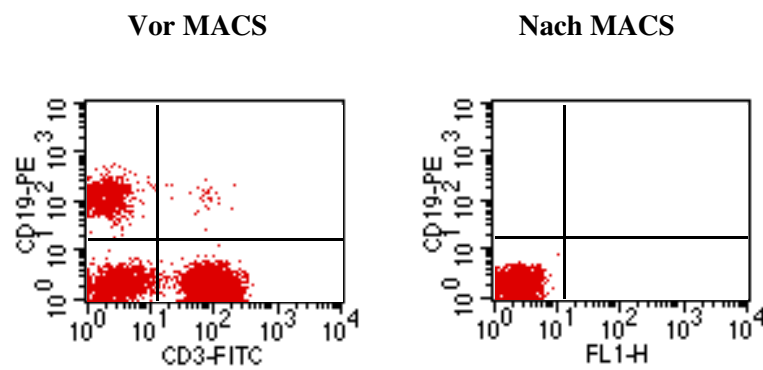
3.2.1. *Bedeutung verschiedener Subpopulationen*

Die Wirkung von Poly (I:C) umfasst, wie in der Literatur beschrieben [6, 17] und in unseren Experimenten gezeigt (Kapitel 1.1.), u. a. die Aktivierung von NK-Zellen, $\alpha\beta$ T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und CD11c-positiven DCs. Die Zellen erwerben daraufhin verschiedene Effektorfunktionen. Daneben konnten wir in Kap. 3.1. darstellen, dass Poly (I:C) CD69 nicht auf $\gamma\delta$ T-Zell-Klonen induzierte. Im folgenden wurden Experimente durchgeführt, in denen verschiedene Zelluntergruppen depletiert und das Ansprechen der $\gamma\delta$ T-Zellen auf die ds-RNS durch Bestimmung von CD69 nach 24 h in Ansätzen vor und nach Entfernen verschiedener Zellen miteinander verglichen wurde. Die Depletionseffizienz, der relative Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen sowie der Anteil CD69-positiver Zellen sind in den Abbildungen 6a–d) aufgeführt. Da nach Entfernung der Untergruppen z. T. erhebliche Schwankungen der CD69-Expression auf den $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 0 im Vergleich zu den T-Zellen im nicht separierten Ansatz zu finden waren, wurden die Stimulationsindices des prozentualen Anteils CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen (%CD69) berechnet:

$$\text{Stimulationsindex: } \frac{\text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Tag 1} - \text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Tag 0}}{\text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Tag 0}}$$

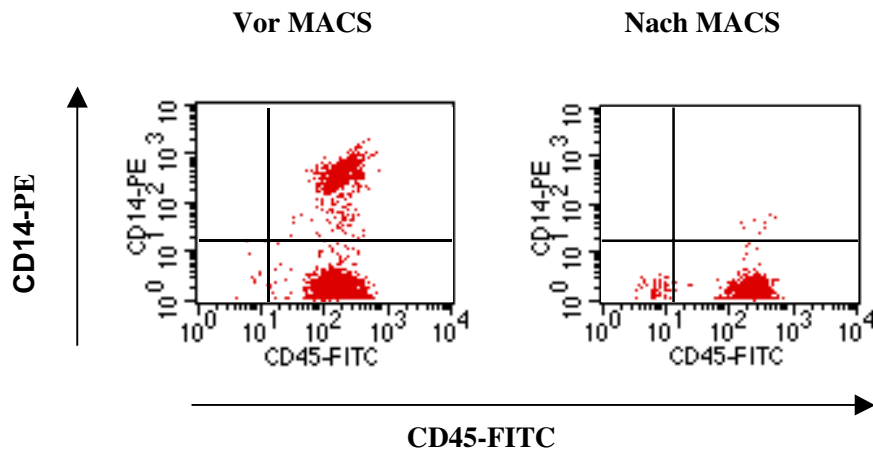
Wie in Tabelle 6 dargestellt ist, war nach Depletion einzelner Subgruppen bereits ohne Poly (I:C) im Vergleich zu den Gesamt-PBL eine Zunahme (ohne B-Zellen oder $\alpha\beta$ T-Zellen) bzw. Abnahme (ohne CD4-, CD14- oder CD16/CD56-positive Zellen) der aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen zu sehen, was auf unterschiedliche Interaktionen der restlichen Zellen mit den $\gamma\delta$ T-Zellen in der Kultur hinweist. In allen Ansätzen der depletierten und nicht depletierten Zellen konnte eine Zunahme der Stimulationsindices durch die Inkubation mit Poly (I:C) nachgewiesen werden, die z.T. erheblich schwankte. Nach der Depletion der B-Zellen kam es durch Poly (I:C) zur ausgeprägten Zunahme der $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung, nach Depletion der CD4- oder CD16/CD56-positiven Zellen zu einer deutlich geringeren Zunahme als ohne Entfernung der Zellen. Wurden CD14-positive oder $\alpha\beta$ T-Zellen entfernt, konnten $\gamma\delta$ T-Zellen weiterhin mittels ds-RNS aktiviert werden. Zu beachten ist jedoch, dass durch die Entfernung von CD16/CD56-positiven Zellen auch $\gamma\delta$ T-Zellen (v.a. $V\gamma9V\delta2$) depletiert wurden, was ebenfalls die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C) beeinflusst haben könnte.

Abbildung 6a–d): MACS-Kontrollen:



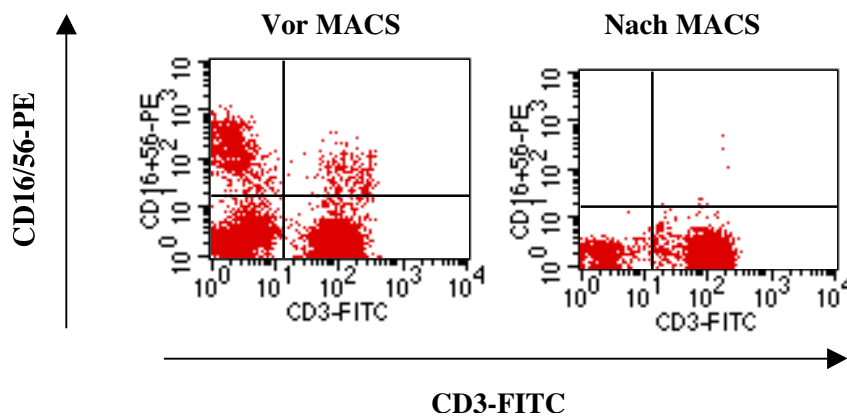
	Vor MACS	Nach MACS
Pan $\gamma\delta^+$ [% CD3 ⁺]	3,4	4,3
CD69 ⁺ [% pan $\gamma\delta^+$]	11,4	4,7

Abb. 6a): Versuch 1: Depletion von CD19-positiven Zellen



	Vor MACS	Nach MACS
Pan $\gamma\delta^+$ [% CD3 ⁺]	3,9	3,7
CD69 ⁺ [% pan $\gamma\delta^+$]	10,8	5

Abb. 6b): Versuch 2: Depletion von CD14-positiven Zellen



	Vor MACS	Nach MACS
Pan $\gamma\delta^+$ [% CD3 ⁺]	4,1	0,9
CD69 ⁺ [% pan $\gamma\delta^+$]	9,2	21,2

Abb. 6c): Versuch 3: Depletion von CD16/56-positiven Zellen

	Vor MACS	Nach MACS
% CD3 ⁺	75,5	14,7
Pan $\gamma\delta^+$ [% CD3 ⁺]	4,1	100
CD69 ⁺ [% pan $\gamma\delta^+$]	9,2	10,5

Abb. 6d): Versuch 3: $\alpha\beta$ T-Zellen

Tabelle 6: Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C) nach der Depletion von CD19-, CD14-, CD16/CD56-, CD4- oder $\alpha\beta$ TZR-positiven Zellen

Stimulationsindex SI	Negativkontrolle	Poly (I:C)	Anstieg SI
Versuch 1: PBL	0,2	2,6	13
- CD19	2,9	6,8	2,3
Versuch 2: PBL	0,7	2,8	4
- CD14	0,1	2,5	25
Versuch 3: PBL	1,1	3,3	3
- $\alpha\beta$ T-Zellen	2,2	3,7	1,7
- CD16/CD56	-0,2	0,4	-2

Gesamt-PBL und PBL nach Depletion von CD19-, CD14-, CD16/CD56- oder $\alpha\beta$ TZR-positiven Zellen wurden in der Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf in 10%igem AB-Medium ausplattiert. Dazu wurde Poly (I:C) (50 $\mu\text{g/ml}$) gegeben und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 1 im FACS analysiert. Dargestellt sind die Stimulationsindices des prozentualen Anteils CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen:

Stimulationsindex SI:

$$\frac{\text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Tag 1} - \text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Tag 0}}{\text{CD69}^+ [\% \text{ pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+] \text{ Tag 0}}$$

Da sich unreife, myeloische DCs über ihren TLR3 mittels Poly (I:C) aktivieren und zur Synthese von IFN I stimulieren lassen, wurden CD11c-positive Zellen aus den PBL entfernt und über Nacht mit der ds-RNS inkubiert. Dabei ist zu beachten, dass dieses Oberflächenmolekül nicht nur auf oben genannter Subpopulation von dendritischen Zellen, sondern auch auf Monozyten, NK-Zellen oder manchen B- und T-Zellen exprimiert wird [147]. Dargestellt wird in Abbildung 7, dass eine Expression von CD11c auf $\gamma\delta$ T-Zellen kaum vorhanden ist und sie daher durch das Depletionsverfahren nicht entfernt wurden. Die Depletionseffizienz der CD11c-positiven Zellen ist in Abbildung 8a zu sehen. Eine vollständige Entfernung dieser Zellen konnte jedoch mit dem gewählten Verfahren nicht erreicht werden.

Ebenfalls stimuliert wurden CD11c-positive DCs. Am Folgetag wurden nicht separierte Zellen bzw. die CD11c-negative Fraktion mit ds-RNS bzw. den vorstimulierten CD11c-positiven Zellen in Kultur gegeben und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach einem weiteren Tag mittels FACS gemessen. Wie in Abbildung 8b) dargestellt war nach Entfernung der CD11c-positiven Fraktion die durch Poly (I:C) vermittelte Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen in den Gesamt-PBL nicht mehr nachweisbar. Wurden an Tag 1 CD11c-Zellen hinzugefügt, konnte durch die ds-RNS Gabe bzw. durch zuvor stimulierte Zellen die Aktivierung wieder hergestellt werden. Dabei war der Effekt durch die hohe ds-RNS Dosis bei den vorstimulierten Zellen nicht mehr so deutlich ausgeprägt wie durch die niedrige Dosis. Durch Zugabe von DCs war dieser Effekt ebenfalls sichtbar, abhängig sowohl von der Konzentration der DCs (1:10/1:100) als auch der von Poly (I:C). Interessant ist, dass die Inkubation mit DC 1:100 im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Ansätzen nur dann einen aktivierenden Effekt zeigte, wenn die DCs vorstimuliert wurden.

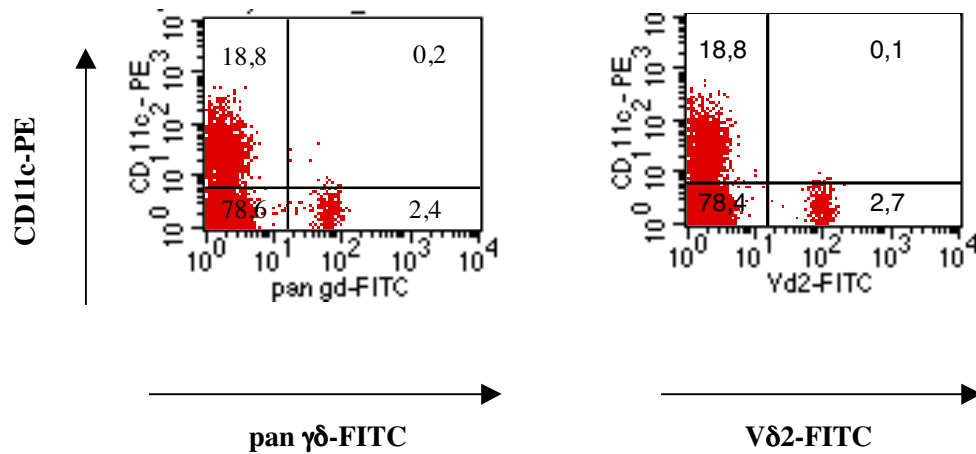


Abbildung 7: Expression von CD11c auf $\gamma\delta$ T-Zellen

PBL wurden gegen CD11c (PE-markierter Farbstoff) und pan gamma delta- bzw. Vdelta2 (FITC-markiert) gefärbt und im FACS analysiert.

Abbildung 8a–b: Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C): Bedeutung von CD11c-positiven Zellen

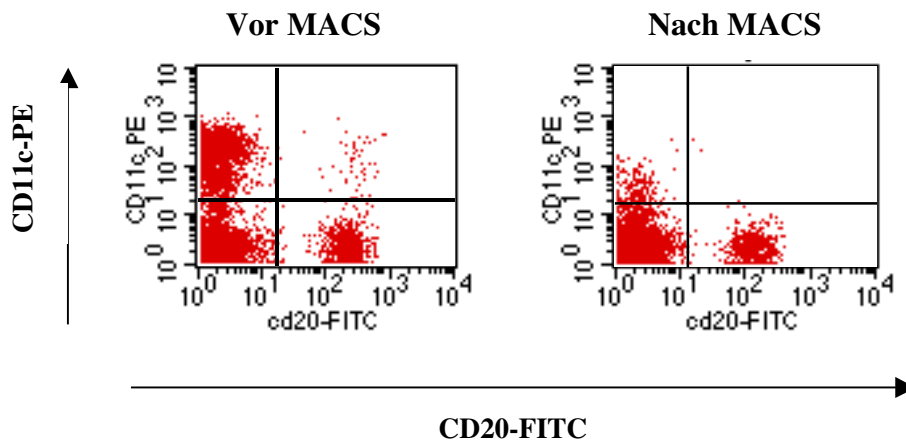


Abb. 8a: MACS-Kontrolle (Expression von CD11c/CD20)

PBL wurden gegen CD11c (PE-markierter Farbstoff) und CD20-FITC vor und nach MACS-Depletion gefärbt und im FACS analysiert.

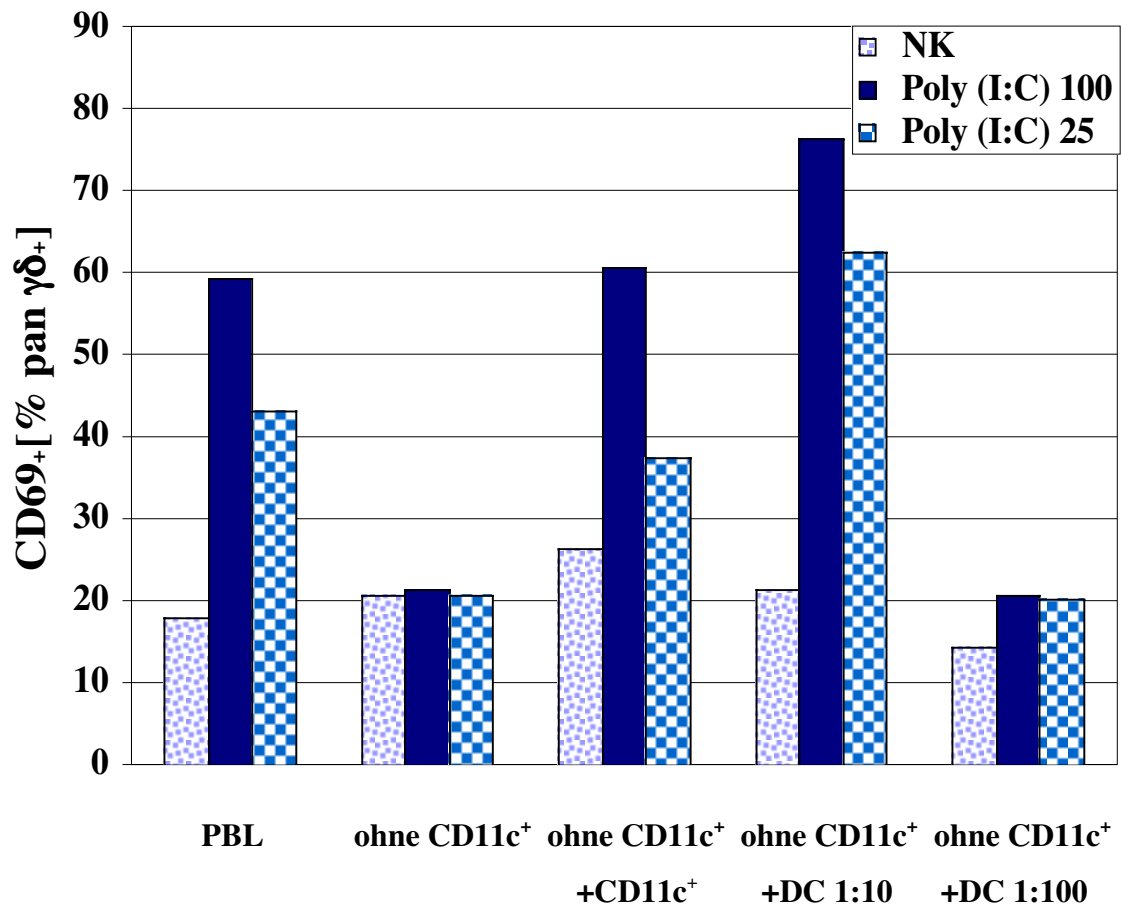


Abbildung 8b: Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C): Bedeutung von CD11c-positiven Zellen

Gesamt-PBL und PBL nach Depletion von CD11c-positiven Zellen wurden in der Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf in 50 ml 10%igem AB-Medium ohne IL-2 ausplattiert. Wurden an Tag 1 CD11c-positive Zellen dazugegeben, wurden nur $5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf ausplattiert. Die CD11c-positive Fraktion bzw. unreife, CD11c-positive DCs wurden über Nacht mit Medium inkubiert. An Tag 1 wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und in die jeweiligen Ansätze zu den zuvor ausplattierten Zellen gegeben. Die DCs wurden zu je $1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf in Konzentrationen von $1 \cdot 10^4$ (1:10) bzw. $1 \cdot 10^3$ (1:100) Zellen/Napf hinzugefügt. In so bezeichnete Ansätze wurde Poly (I:C) (100 bzw. 25 mg/ml) an Tag 1

gegeben. An Tag 2 wurde die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen.

3.2.1. Effekt der Überstände von Poly (I:C)-stimulierten DCs

Wie beschrieben, besteht ein Wirkungsmechanismus der ds-RNS stimulierten DCs in der Synthese von IFN I. Daher wurde untersucht, inwieweit bereits durch den Überstand mit Poly (I:C) aktivierter DCs eine Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen induziert werden kann. CD11c-positive DCs wurden für fünf Stunden stimuliert, gewaschen und erneut inkubiert. Am Folgetag wurden PBL mit den Überständen in verschiedenen Konzentrationen bzw. mit der ds-RNS in Kultur gegeben und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach einem weiteren Tag mittels FACS gemessen. Wie in Abbildung 9 dargestellt ist, kann auch durch den Überstand CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen induziert werden. Die Wirkung ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Inkubation der PBL mit der ds-RNS in gleicher Konzentration. Dennoch lässt sich zeigen, dass der Poly (I:C)-Effekt auf $\gamma\delta$ T-Zellen durch lösliche Substanzen imitiert werden kann.

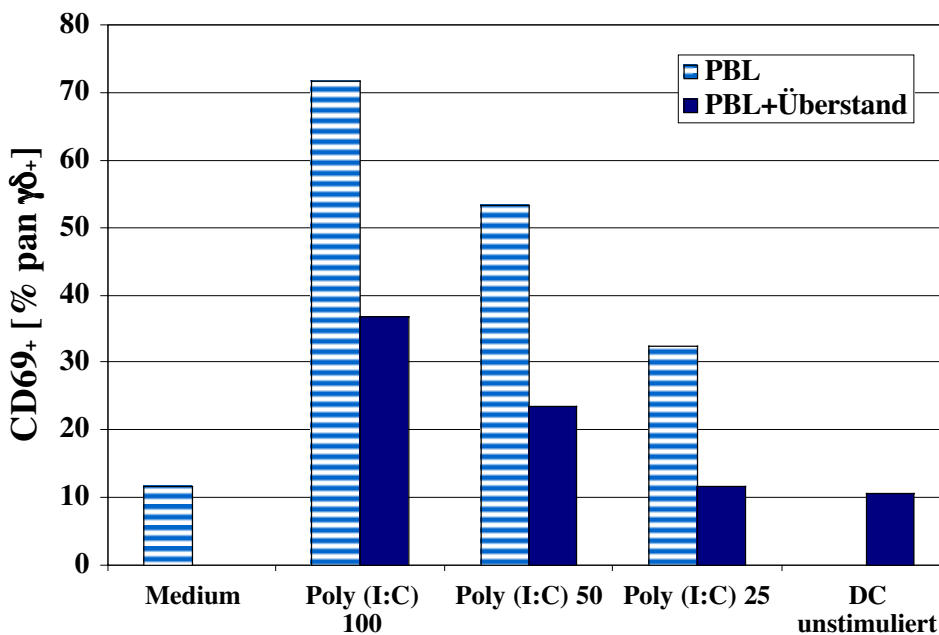


Abbildung 9: Bedeutung des Überstandes von CD11c-positiven DCs für Poly (I:C)-Wirkung

Gesamt-PBL ($1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf) wurden in $50 \mu\text{l}$ 10%igem AB-Medium ohne IL-2 ausplattiert. Unreife, CD11c-positive DCs eines Fremdspenders ($2 \cdot 10^5$) wurden in $500 \mu\text{l}$ Medium ohne IL-2 für 5 Stunden mit Poly (I:C) (100/50 bzw. $25 \mu\text{g/ml}$) oder Medium inkubiert und im Anschluss die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Die DCs wurden erneut in $500 \mu\text{l}$ Medium ohne Poly (I:C) aufgenommen und für weitere 20 Stunden inkubiert. An Tag 1 wurden die Überstände abgenommen und in die jeweiligen Ansätze zu den zuvor ausplattierten Zellen gegeben. Alternativ wurde in so bezeichnete Ansätze Poly (I:C) (100/50 bzw. $25 \mu\text{g/ml}$) bzw. Medium hinzugefügt und das Gesamtvolumen auf $100 \mu\text{l}$ ergänzt. An Tag 2 wurde die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen.

Zusammenfassend zeigen diese Experimente eine klare Abhängigkeit der Poly (I:C)-vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulierung von CD11c-positiven Zellen, insbesondere von unreifen, myeloischen DCs. Eine Beteiligung von NK-Zellen, die ebenfalls sowohl CD11c als auch den TLR3 exprimieren können, blieb grundsätzlich möglich. Diese Stimulation ist v.a.

auf lösliche, in den ersten 24 h sezernierte Faktoren zurückzuführen; eine zusätzliche, additive Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Aktivierung konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden.

3.2.3. Wirkung Poly (I:C)-induzierter Zytokine

Neben der direkten Wirkung von Poly (I:C) auf eine Reihe verschiedener Zellen werden viele Wirkungen der ds-RNS indirekt vermittelt; dies geschieht v.a. durch die Induktion von Zytokinen wie den Typ I Interferonen (IFN- α oder IFN- β)[3]. Daneben sind weitere Zytokine (wie TNF- α , IL-12 oder IL-15) bekannt, die $\gamma\delta$ T-Zellen ohne spezifisches Antigen aktivieren können [82, 85, 87]. Zunächst haben wir deshalb die Wirkung von verschiedenen Zytokinen auf $\gamma\delta$ T-Zellen direkt untersucht. PBL wurden mit folgenden Zytokinen IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, TNF- α , IFN- α , IFN- β und IFN- γ in unterschiedlichen Konzentrationen für 1–3 Tage inkubiert und die Expression von CD69 oder CD25 auf $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS analysiert.

Dabei konnten wir nur teilweise die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigen: Wie in Abbildung 10 und den Tabellen 7 bzw. 8 gezeigt, konnte in unseren Experimenten weder durch TNF- α noch durch IL-12 CD69 an Tag 1 oder CD25 an Tag 3 nachgewiesen werden. IL-2 induzierte eine mäßige CD69-Expression auf 35% bzw. 25% der $\gamma\delta$ T-Zellen (100 bzw. 1 U/ml), IL-15 eine starke CD69-Expression von 80% (100 ng/ml) und 50% (50 ng/ml) als auch von CD25 auf 25% bzw. 15% der $\gamma\delta$ T-Zellen (100 bzw. 50 ng/ml IL-15). IL-6 induzierte kein CD69 auf den $\gamma\delta$ T-Zellen.

Tabelle 7: Induktion von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen durch IL-6

	CD69⁺ [% pan-$\gamma\delta$]
NK	11,9
Poly (I:C) 100 $\mu\text{g/ml}$	72,0
IL-6 10 ng/ml	16,1
IL-6 5 ng/ml	13,6
IL-6 1 ng/ml	13,5
IL-6 0,5 ng/ml	12,9
IL-6 0,1 ng/ml	10,2

PBL ($1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden in 10%igem AB-Serum ohne bzw. mit IL-6 (10/5/1/0,5/0,1 ng/ml) oder Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 1 im FACS gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD69- positiver $\gamma\delta$ T-Zellen.

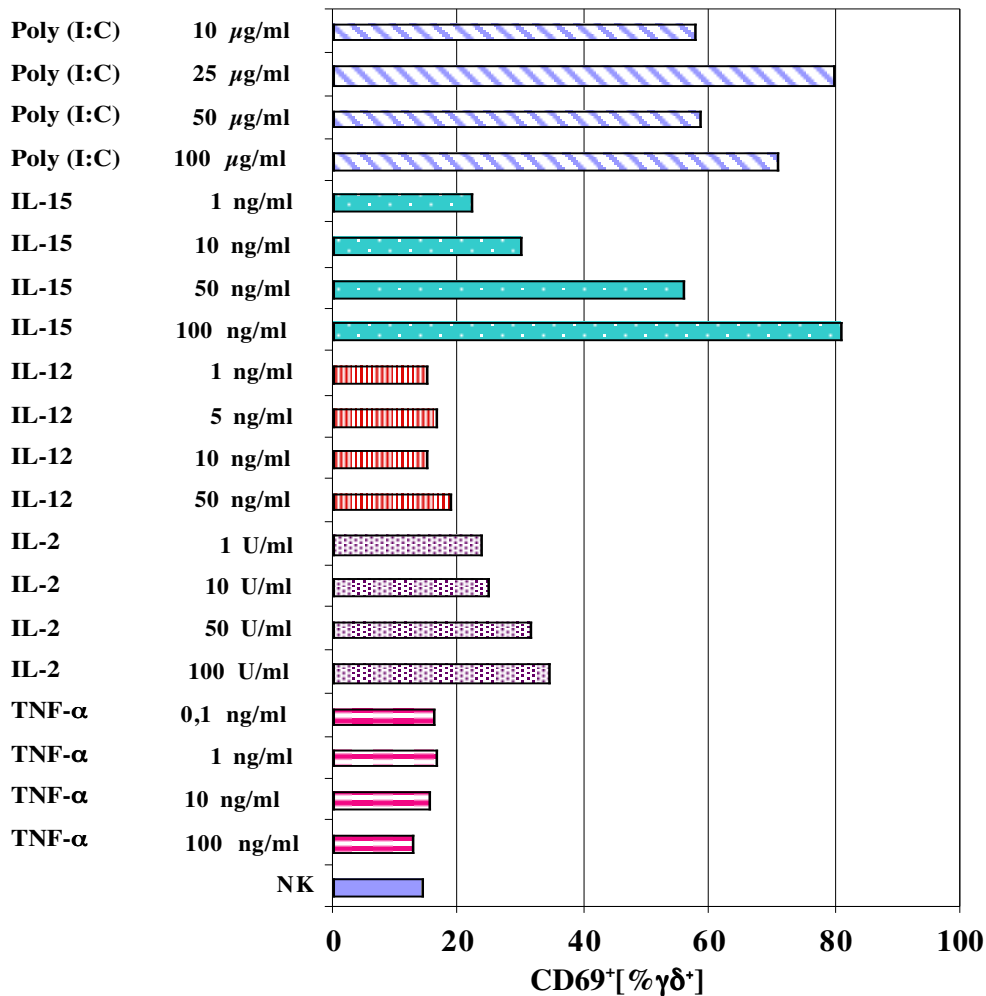


Abbildung 10: Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch Zytokine (TNF- α , IL-2, IL-12, IL-15)

PBL ($1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden in 10%igem AB-Serum mit verschiedenen Konzentrationen von TNF- α (100/10/1/0,1 ng/ml), IL-2 (100/50/10/1 U/ml), IL-12 (50/10/5/1 ng/ml), IL-15 (100/50/10/1 ng/ml) und Poly (I:C) (100/50/25/10 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 1 gemessen.

Bislang nicht untersucht wurde die Wirkung von IFN- α als auch IFN- β auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung. Beide Interferone regulierten bereits bei alleiniger Gabe die CD69-Expres-

sion stark hoch (bis 80% mit 10^4 U/ml, 70–80% mit 10^3 U/ml, 45–60% mit 100 U/ml); dabei wirkte IFN- α etwas schwächer. Die bisher publizierten Daten beschreiben nur eine Aktivierung durch die Kombination beider Interferone [148]. IFN- γ induzierte nur in einer Konzentration von 10^4 U/ml CD69 auf 30% der $\gamma\delta$ T-Zellen. Das CD25-Molekül wurde weder durch IFN- α noch IFN- β hinaufreguliert; IFN- γ induzierte den IL-2-Rezeptor nur mäßig auf 7% der $\gamma\delta$ T-Zellen in einer Konzentration von 10^4 U/ml. Dargestellt wird dies in Abbildung 11 sowie Tabelle 8.

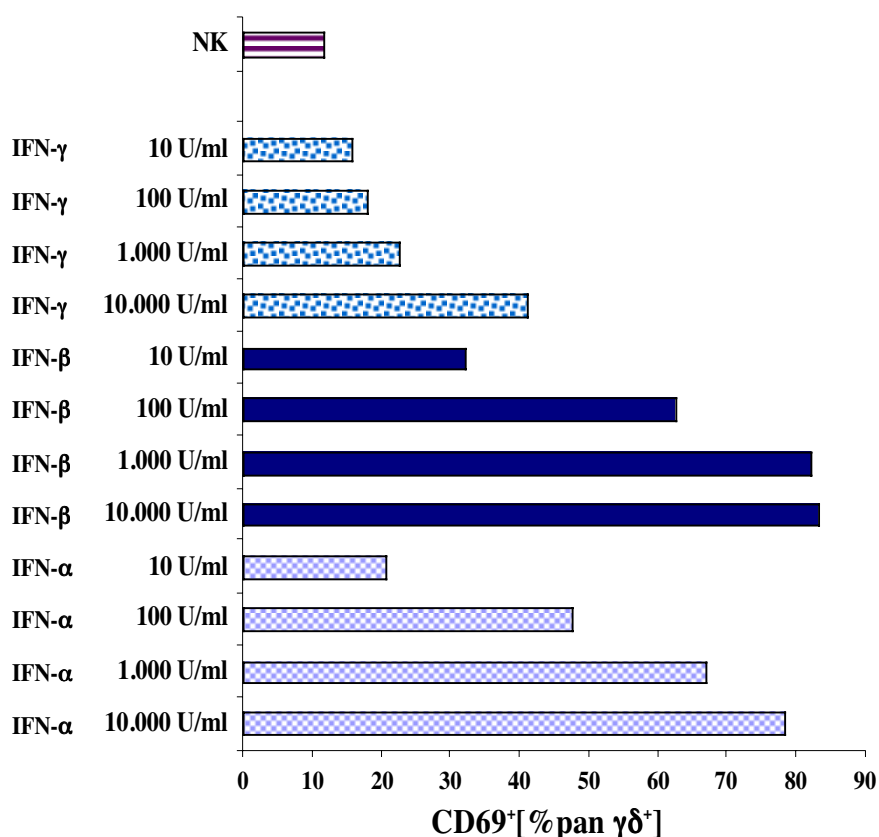


Abbildung 11: Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch IFN- α , IFN- β , IFN- γ

PBL ($1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden in 10%igem AB-Serum mit IFN- α , IFN- β und IFN- γ in den Konzentrationen von $10^4/10^3/10^2$ bzw. 10 U/ml inkubiert und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 1 im FACS gemessen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen.

Tabelle 8: Zytokinvermittelte CD25-Induktion auf $\gamma\delta$ T-Zellen

	CD 25 ⁺ [% $\gamma\delta$ T-Zellen]	Konzentration
Medium	< 1%	-
IL-2	≤ 3%	-
IL-12	≤ 2%	-
TNF- α	≤ 2%	-
IFN- α	≤ 2%	-
IFN- β	≤ 3%	-
IFN- γ	≤ 9%	10 ⁴ U/ml
IL-15	27%	10 ² ng/ml

PBL ($1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden in 10%igem AB-Serum mit den in den Abbildungen 9 und 10 verwendeten Konzentrationen von TNF- α , IL-2, IL-12, IL-15, IFN- α , IFN- β oder IFN- γ inkubiert und die CD25-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 3 im FACS gemessen. Dargestellt sind die maximalen Werte des prozentualen Anteils CD25-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen in der wirksamen Zytokinkonzentration.

3.2.4. Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung nach Hemmung von Zytokinen

Um zu untersuchen, ob Poly (I:C)-induzierte Zytokine für den Anstieg der CD69-Expression auf den $\gamma\delta$ T-Zellen verantwortlich sind, wurden in mehreren Versuchen neutralisierende Anti-Zytokin -Antikörper eingesetzt. Verwendet wurden dabei Antikörper gegen die Zytokine, die nach ds-RNS Gabe induziert werden (wie IL-12 und IFN- α [10]), die $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren können (TNF- α [85, 87]) oder in unseren Versuchen $\gamma\delta$ T-Zellen aktivierten (IFN- β , IL-15). Verschiedene mono- und polyklonale Antikörper wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zu PBL mit oder ohne zu blockierendes Zytokin gegeben. An Tag 1 wurde die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS analysiert und die Konzentration des Antikörpers bestimmt, die zur Hemmung der Zytokin-vermittelten CD69-Induktion auf $\gamma\delta$ T-Zellen geführt hatte. In den weiteren Experimenten wurde die

Konzentration des Antikörpers verwendet, der den Anteil der durch das Zytokin vermittelten, maximal aktivierten $\gamma\delta$ T-Zellen auf einen Anteil in der Größenordnung der nicht stimulierten T-Zellen senken konnte; diese Antikörperkonzentration lag bei 5–10 $\mu\text{g/ml}$. Daneben wurde durch Zugabe einer Isotypkontrolle in den Ansätzen unter Verwendung stimulierender Zytokine die Expression von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen nicht reduziert.

In mehreren Experimenten wurden die beschriebenen Antikörper allein oder in Kombination eingesetzt; Poly (I:C) wurde in der Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ verwendet. Da jedoch bereits manche Antikörper ohne ds-RNS das CD69-Molekül auf den $\gamma\delta$ T-Zellen (Wirkung von Anti-TNF- α mit Anti IL-12) induzierten oder die Ergebnisse nur z. T. reproduzierbar waren, wurde auf deren Darstellung verzichtet. Wie in den Tabellen 9a und b) gezeigt wird, induzierte die Zugabe von Poly (I:C) in diesen Versuchsansätzen eine Expression von CD69 auf 44 bzw. 53,3% der $\gamma\delta$ T-Zellen; ohne Poly (I:C) waren 11,8 bzw. 11,9% der Zellen aktiviert. Keiner der eingesetzten spezifischen oder Isotyp-Antikörper selbst aktivierte die $\gamma\delta$ T-Zellen. In den dargestellten Versuchen wurde die Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung durch die Neutralisierung von IFN- α und/oder IFN- β mittels spezifischer bzw. einen gegen den IFN-I Rezeptor gerichteten Antikörper deutlich verringert. Auch eine Kombination dieser Antikörper mit anti IL-15 konnte zur Reduktion der CD69-Expression führen. In einigen Ansätzen war jedoch das Ausmaß der Hemmung schwächer ausgeprägt. Eine vollständige Unterdrückung der ds-RNS-bedingten Aktivierung war in keinem Versuch zu erzielen. Eine ausschließliche Vermittlung des Poly (I:C)-Effekts durch IFN- α und IFN- β bzw. IL-15 sind daher unwahrscheinlich und das Vorhandensein weiterer, bisher unbekannter Faktoren naheliegend.

Tabelle 9a–b: Wirkung von Anti-Zytokin-Antikörpern auf die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung

	Medium	Isotyp-kontrolle	Anti-IFN- α	Anti-IFN- β	Anti-IFN-Rezeptor
Medium	11,9	-	9,7	10,2	9,5
Poly (I:C)	44,0	52,1	24,7	27,0	18,8
IFN-α	58,9	61,6	14,4	-	27,9
IFN-β	40,9	41,5	-	9,1	19,7

Tab. 9a)

	Medium	Isotyp-kontrolle	Anti-IFN-Rezeptor	Anti-IL-15	Anti-IFN-Rezeptor +Anti-IL-15
Medium	11,8	13,7	16,4	16,1	15,0
Poly (I:C)	53,3	54,4	40,4	52,1	38,4
IFN-α +IFN-β	41,2	35,9	15,9	-	-
IL-15	42,3	46,1	-	16,1	-

Tab. 9b)

PBL ($1 \cdot 10^5$ /Napf) wurden als Duplikate in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 in Ansätzen ohne bzw. mit Poly (I:C) (50 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Zytokin (IFN- α bzw. IFN- β 10^3 U/ml; IL-15 50 ng/ml) ausplattiert und je 5 $\mu\text{g/ml}$ neutralisierende Anti-Zytokin-Antikörper (Anti-IFN- α , Anti-IL-15, Anti-IFN- β , Anti-IFN I-Rezeptor) bzw. Isotypkontrolle (Antikörper verdünnt in 10%igem Medium) dazugegeben. An Tag 1 wurde die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen im FACS analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert des prozentualen Anteils CD69-positiver $\gamma\delta$ T-Zellen

4. Bedeutung von verschiedenen Zellen und Zytokinen für die Poly (I:C)-vermittelte Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen

4.1. Wirkung von CD11c-positiven Zellen, B-Zellen, $\alpha\beta$ T-Zellen und NK-Zellen

4.1.1. CD11c-positive Zellen

Wie in Kapitel 3.2.1. ausgeführt wird, wurde die Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen v. a. durch CD11c-positive Zellen bewirkt. Um herauszufinden, ob diese Subpopulation auch für den kostimulierenden Effekt auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation verantwortlich ist, wurde sie aus einem PBL-Gemisch mittels MACS entfernt und im Vergleich zu nicht-separierten PBL in Kultur genommen.

In diesen Versuchen, dargestellt in den Abbildungen 12 und 13, war nach Depletion der CD11c-positiven Zellen das Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen nach IPP-Stimulation stark eingeschränkt. Dieser Effekt konnte auch durch den Zusatz einer hohen IL-2-Konzentration oder von ds-RNS nicht aufgehoben werden. Dies lässt sich möglicherweise durch eine bisher unbekannte kostimulierende Wirkung von CD11c-positiven Zellen erklären. Durch die erneute Zugabe von unstimulierten CD11c-positiven Zellen konnte die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Kostimulation wiederhergestellt werden. Wurden unreife, myeloische DCs substituiert, konnte die IPP-induzierte Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen auch unabhängig vom Vorhandensein von Poly (I:C) induziert werden. Dieses Ergebnis könnte ebenso als Hinweis auf eine bisher unbekannte Beteiligung von CD11c-positiven DCs an der IPP-induzierten Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen gewertet werden, z.B. durch Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Signale.

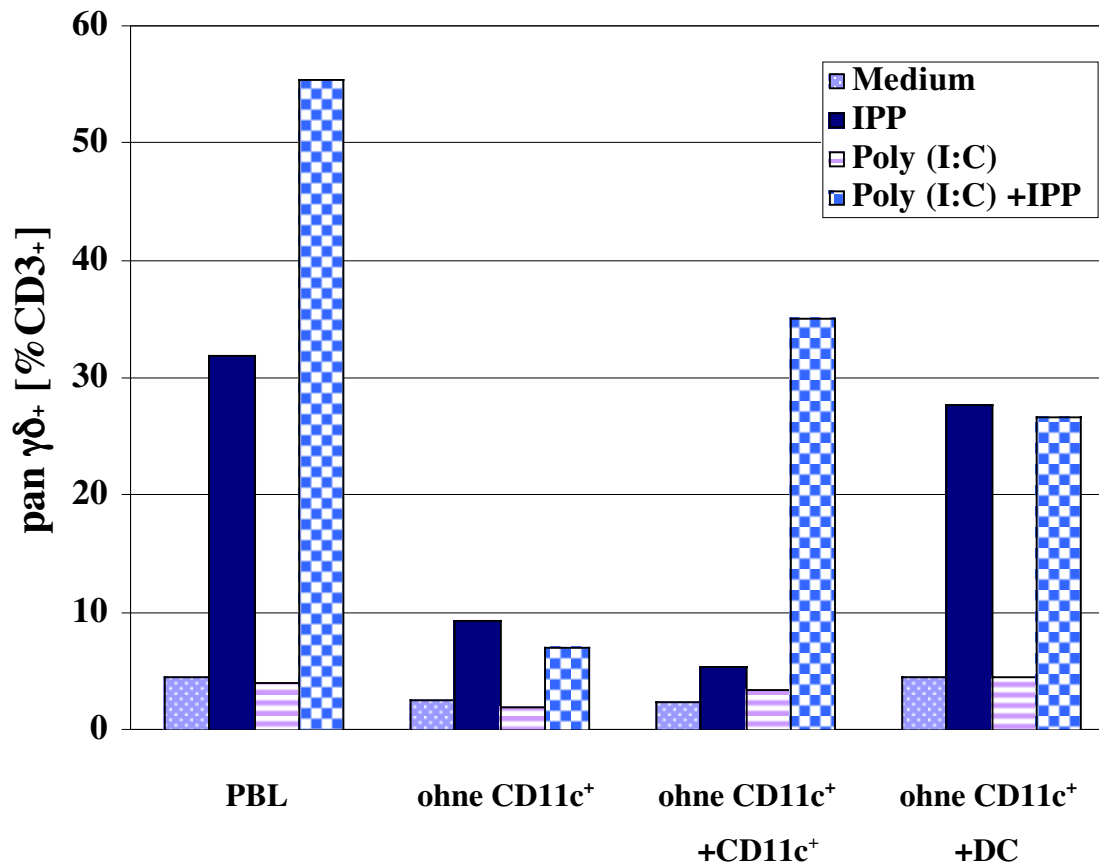


Abbildung 12: Bedeutung CD11c-positiver Zellen für die Poly (I:C)-induzierte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation

Gesamt-PBL und PBL nach Depletion von CD11c-positiven Zellen wurden in der Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf in 10%igem AB-Medium ohne IL-2 ausplattiert. Wurden an Tag 1 CD11c-positiv Zellen dazugegeben, wurden nur $5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf ausplattiert. Die CD11c-positiv Fraktion bzw. unreife, CD11c-positiv DCs wurden über Nacht mit Medium (CD11c⁺ oder DC) inkubiert. An Tag 1 wurden die Zellen zweimal mit Medium gewaschen und z. T. zu den zuvor ausplattierten Zellen hinzugegeben. Die DCs wurden zu je $1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf in Konzentrationen von $5 \cdot 10^3$ Zellen/Napf hinzugefügt. Alle Ansätze wurden mit IL-2 (10 U/ml) substituiert, als Positivkontrolle wurde IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$), als Negativkontrolle Medium verwendet. Ggf. wurde Poly (I:C) (50 $\mu\text{g/ml}$) dazugegeben. An Tag 7 wurde der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen im FACS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils $\gamma\delta$ TZR-positiver T-Zellen.

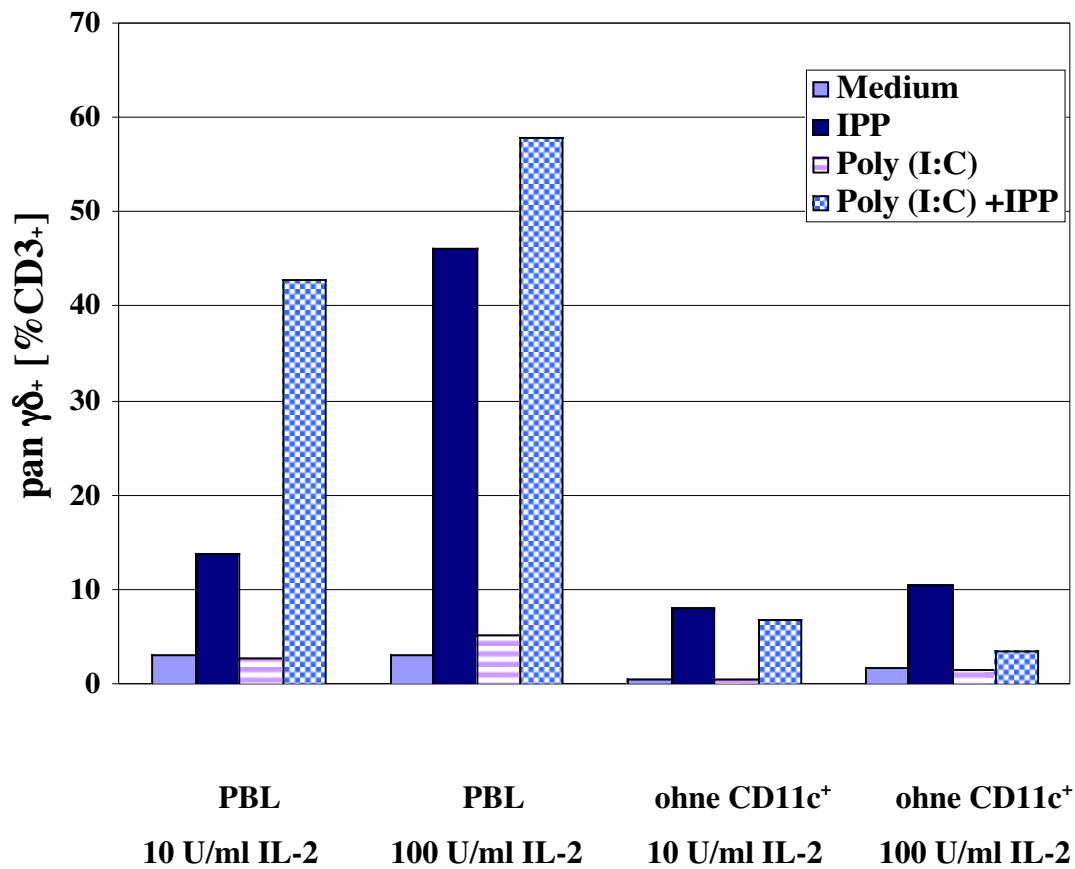


Abbildung 13: Bedeutung CD11c-positiver Zellen für die Poly (I:C)-induzierte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation

Gesamt-PBL und PBL nach Depletion von CD11c-positiven Zellen wurden in der Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf in 10%igem AB-Medium mit IL-2 (10 U/ml bzw. 100 U/ml) substituiert. Als Positivkontrolle wurde IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$), als Negativkontrolle Medium verwendet; ggf. wurde Poly (I:C) (50 $\mu\text{g/ml}$) dazugegeben. An Tag 7 wurde der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen im FACS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils $\gamma\delta$ TZR-positiver T-Zellen.

4.1.2. B-Zellen

Weiterhin wurden B-Zellen entfernt und die Wirkung von Poly (I:C) auf PBL und B-Zell-depletierte PBL in $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferationsassays untersucht, was in Tabelle 10 gezeigt ist. Dabei konnte eine verminderte IPP-induzierte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation nach B-Zell-Depletion (bei niedriger IL-2 Dosis) festgestellt werden. Durch eine Steigerung der IL-2 Dosis war dieser Effekt nicht mehr nachzuweisen. Die Wachstumshemmung könnte durch Anreicherung von Monozyten, $\alpha\beta$ T-Zellen oder NK-Zellen nach der Depletionsbehandlung erklärt werden. Eine Poly (I:C)-induzierte Kostimulation war in sehr unterschiedlichem Ausmaß sowohl unter Einschluss als auch nach Entfernen der B-Zellen in den Ansätzen mit oder ohne IPP vorhanden. Diese Subpopulation ist demnach ebenso nicht an der ds-RNS induzierten Kostimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen beteiligt.

Tabelle 10: Einfluss von Poly (I:C) auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation nach der Depletion von CD19-positiven Zellen

		Medium	IPP	Poly (I:C)	IPP+ Poly (I:C)
10 U/ml IL-2	PBL	0,3	7,1	0,2	12,4
	Ohne CD19 ⁺	0,1	3,4	1,2	9,9
50 U/ml IL-2	PBL	2,0	18,8	3,5	19,7
	Ohne CD19 ⁺	1,6	15,5	4,9	18,4

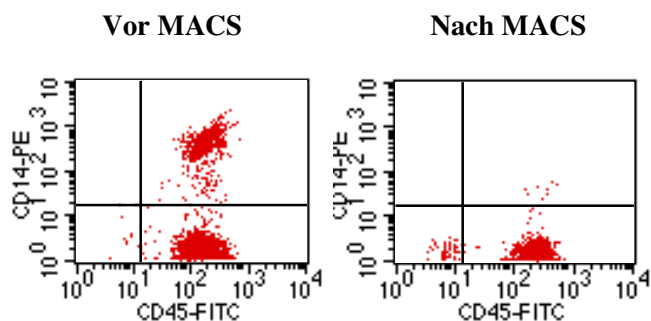
Gesamt-PBL und depletierte PBL (ohne CD19-positive Zellen) wurden in der Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf in 10%igem AB-Medium mit IL-2 (10 U/ml bzw. 50 U/ml), IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$) und/ oder Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert. An Tag 8 wurde im FACS die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Stimulationsindices des Anteils der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen.

4.1.3. *CD14-positive Zellen*

Monozyten können, abhängig von den Versuchsbedingungen, unterschiedliche Effekte auf das Wachstum von $\gamma\delta$ T-Zellen haben (sowohl proliferationsfördernd als auch -hemmend) [149, 150]. Da Poly (I:C) auch auf Monozyten einwirkt, wurden in mehreren $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferationsassays PBL, teilweise nach Depletion von CD14-positiven Zellen, mit Poly (I:C) inkubiert. Dabei waren die Depletionseffizienzen in den einzelnen Versuchen vergleichbar, was in Abbildung 14a) dargestellt wird. Weiterhin war eine kostimulierende Wirkung der ds-RNS auf das Wachstum von $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl im PBL-Ansatz als auch nach der Entfernung der Monozyten nachzuweisen (siehe Abbildung 14b)). Deutlich wird jedoch auch, dass die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen in den einzelnen Versuchen sehr unterschiedlich war. So konnte in Versuch 5 (im Ansatz ohne Monozyten) bereits eine ausgeprägte Stimulation in der Positivkontrolle ohne Poly (I:C) nachgewiesen werden, so dass durch Zugabe der ds-RNS kein zusätzlicher Effekt sichtbar war. Zum Teil konnte allein durch die Entfernung der Monozyten eine Zunahme der Proliferation (Versuche 1, 4 und 5) nachgewiesen werden, zum anderen eine Hemmung des Auswachsens (Versuch 2 und 3). Dies wäre möglicherweise auch allein durch die Depletionsbehandlung erklärbar. Vergleicht man die Zunahme der Stimulationsindices mit oder ohne Monozyten, so sind diese Werte in jedem Versuch ähnlich; in den Versuchen 1, 4 und 5 war die Zunahme ohne Monozyten jedoch geringer, im Versuch 2 etwas höher und in Versuch 3 nach Inkubation mit der ds-RNS sehr ausgeprägt. In der Regel war auch nach Entfernung der CD14-positiven Zellen eine Kostimulation der $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation durch Poly (I:C) zu sehen; die Ausprägung war jedoch davon abhängig, ob nach der Depletion das Auswachsen ohne Poly (I:C) gehemmt oder stimuliert worden war.

Abbildung 14a–b): Depletion von Monozyten: Einfluss auf die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation

CD14 ⁺		
	Vor MACS	Nach MACS
PBL 1	17,0	0,2
PBL 2	17,5	0,1
PBL 3	10,2	0,1
PBL 4	9,7	0,3



PBL 5

Abb. 14a): MACS-Kontrolle

	PBL +IPP	PBL +IPP +Poly (I:C)	-fache Zunahme SI	-CD14⁺ +IPP	-CD14⁺+IPP +Poly (I:C)	-fache Zunahme SI
PBL 1	5,68	9,30	1,64	7,92	9,70	1,23
PBL 2	2,90	15,37	5,3	1,99	12,22	6,13
PBL 3	3,52	7,79	2,21	0,37	6,15	16,40
PBL 4	2,37	13,00	5,49	3,65	16,04	4,40
PBL 5	9,22	15,61	1,69	17,71	17,98	1,02

Abb.14b):

In verschiedenen Versuchen wurden Gesamt-PBL und depletierte PBL (ohne CD14-positive Zellen) als Duplikate in der Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf in 10%igem AB-Medium mit IL-2 (10 U/ml), IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$) und Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert. An Tag 8 wurde im FACS die IPP-induzierte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt; auf eine Darstellung der Ansätze ohne IPP wurde verzichtet. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen der Einzelexperimente sowie der Mittelwert aller Versuche für jeden Ansatz.

4.1.4. $\alpha\beta$ T-Zellen

In $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferationsassays wurde der Einfluss von Poly (I:C) auf das Auswachsen der T-Zellen untersucht: Dazu wurde entweder der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den Gesamt CD3-positiven Zellen an Tag 8 im FACS oder die Absolutzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen (siehe Erläuterung zu Tabelle 11) sowie der Stimulationsindex nach Depletion der $\alpha\beta$ T-Zellen bestimmt.

In Abbildung 15 wird zunächst die Depletionseffizienz gezeigt. Wie weiterhin in der Tabelle 11 dargestellt ist, konnte durch Poly (I:C) im Vergleich zu den Ansätzen ohne ds-RNS das Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen in den Ansätzen mit IPP immer gesteigert werden, jedoch in sehr unterschiedlichem Ausmaß. Ohne IPP wurde das Wachstum der $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C) bereits ohne IL-2 und ohne $\alpha\beta$ T-Zellen gesteigert. Dies weist auf eine z. T. Antigen-unabhängige kostimulierende Wirkung von Poly (I:C) auf $\gamma\delta$ T-Zellen hin.

Weiterhin hatte die Entfernung der $\alpha\beta$ T-Zellen im allgemeinen keinen negativen, sondern einen fördernden Einfluss auf das Wachstum der $\gamma\delta$ T-Zellen. Anders verhielt es sich im Ansatz mit IPP und Poly (I:C): Nach Entfernung der $\alpha\beta$ T-Zellen nahmen die $\gamma\delta$ T-Zellen, gemessen am SI, im Vergleich zu den nichtseparierten Zellen nicht mehr so stark zu. Dies könnte als Hinweis auf eine Mitbeteiligung der $\alpha\beta$ T-Zellen am ds-RNS-Effekt auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation gedeutet werden.

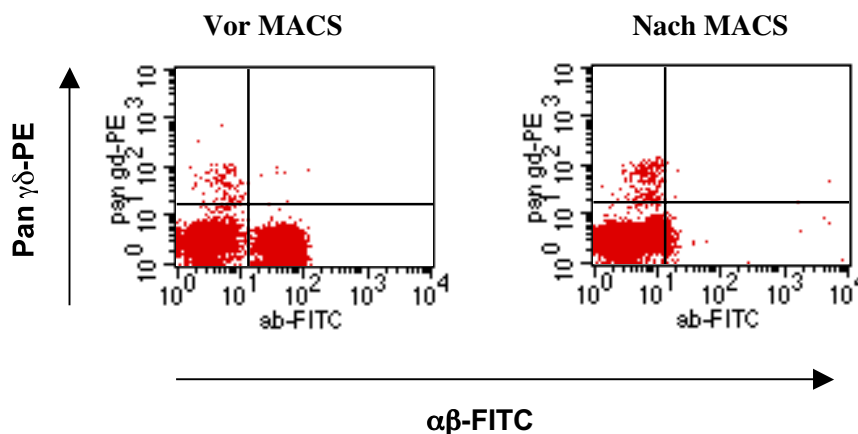


Abbildung 15: MACS-Kontrolle

Tabelle 11: Einfluss von $\alpha\beta$ T-Zellen auf die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation

	PBL			PBL ohne $\alpha\beta$ T-Zellen		
	Tag 0	Tag 8	SI	Tag 0	Tag 8	SI
Medium	1.300	2.350	0,8	3.400	5.500	0,6
IPP	1.300	2.650	1,0	3.400	13.500	3,0
Poly (I:C)	1.300	2.650	1,0	3.400	7.000	1,1
IPP+ Poly (I:C)	1.300	48.000	35,9	3.400	58.000	16,1

Aus einem Teil der durch Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnenen PBL wurden die $\alpha\beta$ T-Zellen durch MACS depletiert und im Vergleich zu nichtseparierten Zellen in einer Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf in 10%igem AB-Medium, ohne IL-2, mit oder ohne Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) bzw. IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$) in Duplikaten ausplattiert. Dabei war die Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen in beiden Ansätzen unterschiedlich. Zur Bestimmung der absoluten Zahl an $\gamma\delta$ T-Zellen wurden die Zellen an Tag 8 gezählt und mit dem im FACS gemessenen Anteil der pan $\gamma\delta$ TZR-positiven Zellen korreliert. Dargestellt sind die Mittelwerte der absoluten Anzahl der $\gamma\delta$ T-Zellen, sowie der Stimulationsindex SI:

$$\text{Stimulationsindex SI: } \frac{\text{Anzahl (pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+) \text{ Tag 8} - \text{Anzahl (pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+) \text{ Tag 0}}{\text{Anzahl (pan-}\gamma\delta \text{ TZR}^+) \text{ Tag 0}}$$

4.1.5. NK-Zellen

Wie bereits für $\alpha\beta$ T-Zellen beschrieben, wurden in $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferationsassays PBL mit und ohne Depletion von CD16/CD56-positiven Zellen nach Poly (I:C)-Gabe untersucht. Diese beiden Oberflächenmoleküle sind jedoch auch auf anderen Leukozyten nachweisbar ($\gamma\delta$ T-Zellen, CD16/56-positiven $\alpha\beta$ T-Zellen (NKT-Zellen) sowie CD16-positiven Monozyten), die durch die Depletionsbehandlung ebenfalls entfernt wurden.

($\gamma\delta$ T-Zellen, CD16/56-positiven $\alpha\beta$ T-Zellen (NKT-Zellen) sowie CD16-positiven Monozyten), die durch die Depletionsbehandlung ebenfalls entfernt wurden.

In Abbildung 16 wird zunächst die Depletionseffizienz sowie in Tabelle 12 a) der relative Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen vor und nach MACS dargestellt. Dargestellt in Tabelle 12b), konnte in diesem Versuch bereits durch die Depletion der CD16/56-positiven Zellen im Ansatz ohne ds-RNS sowohl mit als auch ohne IPP im Vergleich zu den Gesamt-PBL ein deutlich gesteigertes Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen gemessen werden. Nach Zugabe des Oligonukleotids war eine schwächere Proliferation nachzuweisen. Dieser Unterschied, gemessen am SI, könnte ebenfalls durch eine von CD16/56-positiven Zellen vermittelte Poly (I:C)-Wirkung auf das $\gamma\delta$ T-Zell-Wachstum, aber auch durch eine „Überstimulation“ der ausgeprägten $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation nach NK-Zell-Depletion durch die Poly (I:C)-Gabe bedingt sein.

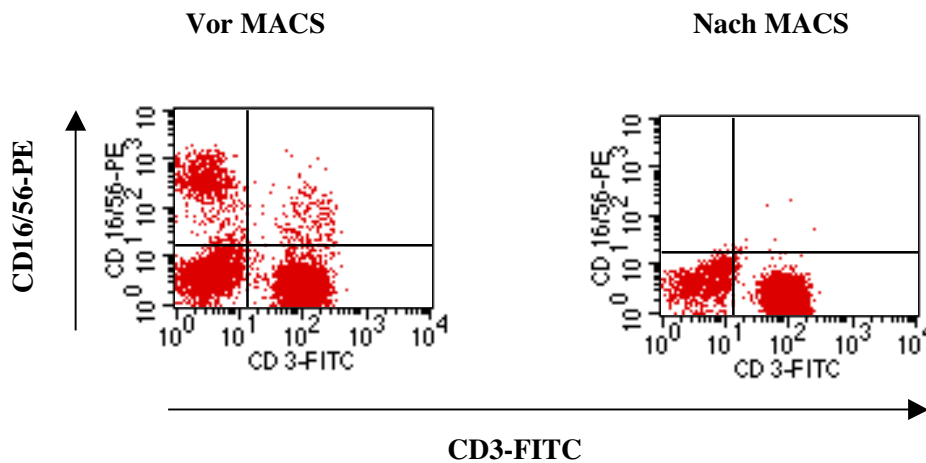


Abbildung 16: MACS-Kontrolle

Tabelle 12a): Relativer Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen

Pan $\gamma\delta$ T-Zellen [%CD3 ⁺]	
Vor MACS	Nach MACS
3,9	1,2

Tabelle 12b): Einfluss von Poly (I:C) auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation nach der Depletion von CD16/CD56-positiven Zellen

	Medium	IPP	Poly (I:C)	IPP+ Poly (I:C)
PBL	1,0	29,9	2,2	30,4
Ohne CD16/56⁺ Zellen	9,9	84,1	0,2	61,9

Gesamt-PBL und depletierte PBL (ohne CD16/CD56-positive Zellen) wurden in der Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/Napf in 10%igem AB-Medium mit IL-2 (10 U/ml), IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$) und/ oder Poly (I:C) (100 $\mu\text{g/ml}$) ausplattiert; zu beachten ist, dass auch $\gamma\delta$ T-Zellen bei der Depletion der NK-Zellen entfernt wurden. An Tag 8 wurde im FACS die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen bestimmt. Dargestellt sind die Stimulationsindices des Anteils der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen.

4.2. Zytokine

4.2.1. Wirkung von Überständen stimulierter iDCs

Da die Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen bereits durch Zugabe des Überstandes stimulierter, unreifer, myeloischer DCs imitiert werden konnte, sollte auch deren Wirkung auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation untersucht werden. Hierzu wurden CD11c-positive DCs für fünf Stunden mit der ds-RNS inkubiert, gewaschen und erneut kultiviert. Am Folgetag wurden PBL mit den Überständen bzw. mit Poly (I:C) unter Zugabe von IL-2 (10 U/ml) und IPP (2,5 $\mu\text{g/ml}$) bzw. Medium in Kultur gegeben und der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen nach sieben Tag mittels FACS gemessen. Wie in Abbildung 17 dargestellt ist, konnte durch den Überstand der aktivierten DCs kein kostimulierender Effekt auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation induziert werden. Die für die Aktivierung mitverantwortlichen löslichen Substanzen sind eher nachteilig für das Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen.

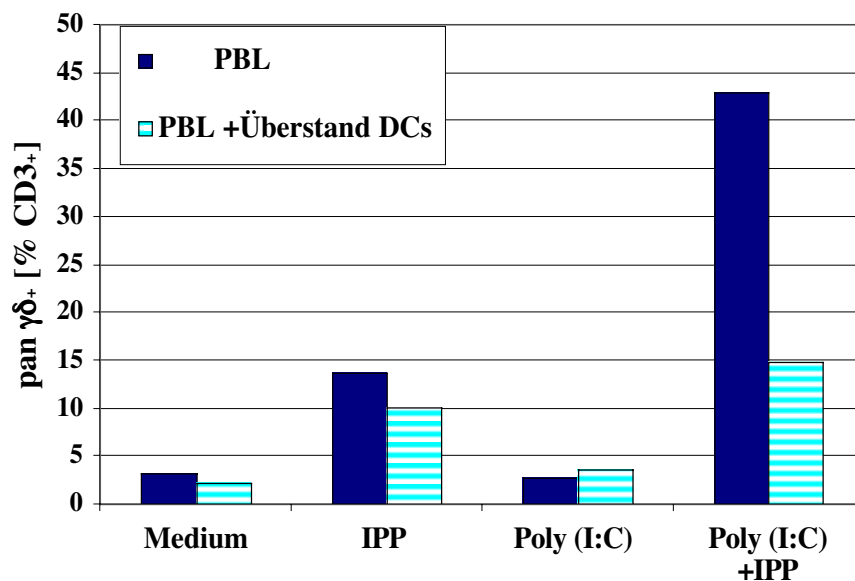


Abbildung 17: Bedeutung des Überstandes von CD11c-positiven DCs für Poly (I:C)-Wirkung

Gesamt-PBL ($1 \cdot 10^5$ Zellen/Napf) wurden in 50 μ l 10%igem AB-Medium ohne IL-2 ausplattiert. Unreife, CD11c-positive DCs eines Fremdspenders ($2 \cdot 10^5$) wurden in 500 μ l Medium ohne IL-2 für 5 Stunden mit Poly (I:C) (100 μ g/ml) oder Medium inkubiert und im Anschluss die Zellen zweimal mit Medium gewaschen. Die DCs wurden erneut in 500 μ l Medium ohne Poly (I:C) aufgenommen und für weitere 20 Stunden inkubiert. An Tag 1 wurden die Überstände abgenommen und in die jeweiligen Ansätze zu den zuvor ausplattierten Zellen in einer Verdünnung von 1:10 gegeben. Alternativ wurde in so bezeichnete Ansätze Poly (I:C) (50 μ g/ml) bzw. Medium hinzugefügt und das Gesamtvolumen auf 100 μ l ergänzt. An Tag 8 wurde der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen im FACS analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte des prozentualen Anteils $\gamma\delta$ TZR-positiver T-Zellen.

4.2.2. Wirkung von Zytokinen

Wie beschrieben, wirkt Poly (I:C) über die Induktion verschiedener Zytokine aktivierend auf $\gamma\delta$ T-Zellen. So wurde in Proliferationsexperimenten untersucht, ob der kostimulierende Effekt der ds-RNS auf $\gamma\delta$ T-Zellen ebenfalls durch Wachstumsfaktoren vermittelt wird. Dazu wurden PBL mit IPP und Zytokinen inkubiert und nach sieben Tagen der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen bestimmt. Eingesetzt wurden IFN- α , IFN- β , IFN- γ , und TNF- α . Diese Zytokine sind in der Literatur sowohl als hemmend als auch kostimulierend auf $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben worden [83, 85, 151] und sollten mit der Wirkung von Poly (I:C) verglichen werden (IFN I); daneben war von Interesse, ob ein Zusammenhang zwischen der Induktion von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen und ihrer Proliferationsfähigkeit besteht. Da für TNF- α sowohl Hemmung als auch Kostimulation beschrieben wurden, sollte der Einfluss der Kulturbedingungen auf das Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen mit diesem Zytokin untersucht werden.

Zur Untersuchung der Zytokinwirkung auf die IPP-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation wurde eine Reihe von Versuchen durchgeführt, die in Tabelle 13 zusammengefasst sind. Dabei konnten wir den wachstumshemmenden Effekt von IFN- α bestätigen, da dieses Zytokin im gesamten Konzentrationsbereich von 10 bis 10^4 U/ml die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation titrierbar verminderte. IFN- β wirkte gleichfalls in hohen Dosen hemmend; in einem Teil der Versuche war eine Kostimulation durch 10 U/ml (ohne IFN: 30% der CD3-positiven Zellen waren $\gamma\delta$ -TZR positiv; 10 U/ml IFN- β : 50%) nachweisbar, mit 50 U/ml auch ohne IL-2 Zugabe (ohne IFN: 3% der CD3-positiven Zellen waren $\gamma\delta$ -TZR positiv; 50 U/ml IFN- β : 10%). IFN- γ war wiederholbar kostimulierend wirksam, jedoch in unterschiedlichen Konzentrationen (10^2 bis 10^3 U/ml) und nur bei Anwesenheit von Monozyten. TNF- α war in einem Konzentrationsbereich von $5-10^2$ ng/ml ausschließlich in FCS-haltigem Medium kostimulierend wirksam. Dies entspricht den publizierten Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen. Interessant ist, dass die CD69-Expression nicht mit der Wirkung der einzelnen Zytokine auf das Wachstum der $\gamma\delta$ T-Zellen korreliert. Dies kann durch den Effekt der Zytokine auf eine Reihe von unterschiedlichen Zielzellen erklärt werden und bestätigt zum anderen, dass

CD25 der bislang einzige prospektive Aktivierungsmarker ist, der bereits ab Tag 3 auf ein Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen (bei ausreichender IL-2 Gabe) hinweist.

Tabelle 13: Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen nach Zytokinzugabe

	IFN-α	IFN-β	IFN-γ	TNF-α
CD69	↑↑↑	↑↑↑	↑	0
Proliferation	---	--/+	+	++
Konzentration für Kostimulation	-	10–50 U/ml	10 ² –10 ³ U/ml	5–10 ² ng/ml
Anmerkungen	-	-	Nur bei Anwesenheit von Monozyten	Nur in FCS-haltigem Medium

↑↑↑: Zytokininduziert ausgeprägte CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen (> 50% CD69⁺)

↑: Zytokininduziert gute CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen (< 40% CD69⁺)

++: gute Kostimulation (> 20% der Ausgangszellzahl)

+: mäßige Kostimulation (< 20% der Ausgangszellzahl)

0: kein Einfluss auf die Proliferation

--: Proliferationshemmung im Konzentrationsbereich > 50 U/ml

---: Proliferationshemmung im gesamten Konzentrationsbereich

PBL ($5 \cdot 10^4$ /Napf) wurden in 10%igem AB-Medium und 10 U/ml IL-2, ohne und mit IPP (2,5 μ g/ml) sowie Zytokinen in verschiedenen Konzentrationen inkubiert: IFN- α , IFN- β , IFN- γ (10⁴/10³/10²/50 bzw. 10 U/ml), TNF- α (10²/50/10/5/1/0,5/0,1 ng/ml), verdünnt in Medium. An Tag 7 wurde der Anteil der $\gamma\delta$ T-Zellen an den CD3-positiven Zellen im FACS bestimmt. Dargestellt ist die Wirkung der Zytokine auf die IPP-vermittelte Proliferation aus mehreren Einzelversuchen sowie der Konzentrationsbereich, in dem eine Kostimulation nachweisbar war. Zur Messung von CD69 siehe Kap. 3.2.3.

DISKUSSION

1. Kostimulation von PBL durch Poly (I:C)

1.1. *Expression von Aktivierungsmarkern auf $\gamma\delta$ T-Zellen und Vergleich mit anderen mononukleären Zellen*

$\gamma\delta$ T-Zellen sind, neben ihrer antibakteriellen und antiprotozoonalen Funktion, auch an der Abwehr von Virusinfektionen beteiligt (Review: [127, 139]). Die bisherigen Untersuchungen wurden sowohl im murinen als auch humanen System durchgeführt und bezogen sich auf Aktivierungsmarker, Lokalisation, Kinetik und Funktion der $\gamma\delta$ T-Zellen sowie die Beteiligung von Antigenen. Neben dem Anstieg der Aktivierungsmarker HLA-DR und CD38 wurden sowohl das Einwandern in infizierte Gewebe, eine Zunahme im peripheren Blut in der Rekonvaleszenz als auch die unspezifische Lyse von virusinfizierten Zellen beschrieben. Ein spezifisches Antigen wurde im humanen System nicht entdeckt; die Entdeckung von NK-Zell-inhibierenden und -aktivierenden Rezeptoren (wie z. B. NKG2D) lässt jedoch die virusinduzierte Modulation von Zelloberflächenmolekülen (wie die NKG2D-Liganden MICA/B oder die UL16-bindenden Proteine ULBP 1–4, [152]) vermuten, die zur Initiierung verschiedener Effektorfunktionen (wie Zytotoxizität, Zytokin- und Chemokin-Produktion) führen. Im murinen System scheinen HSPs sowie bestimmte virale Hüllproteine $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren zu können.

Da $\gamma\delta$ T-Zellen sowohl mit $\alpha\beta$ T-Zellen als auch NK-Zellen funktionelle Gemeinsamkeiten besitzen, stellt sich die Frage, ob unspezifische Mechanismen der Zellaktivierung im Rahmen von viralen Infektionen auch für die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen eine Rolle spielen. Mit der synthetischen Doppelstrang-RNS Poly (I:C) wurde in den durchgeführten Experimenten eine Substanz verwendet, die bestimmte Virusinfektionen simuliert und NK-Zellen sehr gut aktiviert [6]. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit Poly (I:C) auch $\gamma\delta$ T-Zellen aktiviert, welche Unterschiede zu anderen Zellpopulationen bestehen und welche Mechanismen der Aktivierung zugrunde liegen. Weiterhin sollte die Poly (I:C)-

vermittelte Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit der spezifischen Aktivierung durch Phosphoantigene verglichen werden.

Im Gegensatz zu den spezifischen Antigenen, die verschiedene Aktivierungsmarker (wie z.B. CD69, CD25, CD54, CD95 oder CD122) über einen mehrtägigen Zeitraum zu induzieren vermögen, stieg in unseren Untersuchungen Poly (I:C)-vermittelt allein das zu einem frühen Zeitpunkt nachweisbare CD69-Molekül an; die Expression war nach 24 Stunden maximal, fiel dann rasch wieder ab und wurde auch im Verlauf von mehreren Tagen nicht wieder hinaufreguliert [84, 138]. Dies spricht für eine suboptimale Aktivierung der T-Zellen durch die ds-RNS, da CD69 nur bei anhaltender Stimulation und damit PKC-Aktivierung an der Zelloberfläche nachweisbar bleibt (Review: [153]). Die in anderen Virusexperimenten *in vivo/in vitro* beschriebene Erhöhung von HLA-DR wurde in diesen Versuchen nicht untersucht [138].

Auch in unserem System konnte, wie beschrieben, eine Aktivierung von Monozyten gefunden werden [6, 10]. Daneben war ein Anstieg der CD69-Expression auf NK-Zellen, CD4- und CD8-positiven Zellen, insbesondere auf CD16/CD56-positiven T-Zellen, nachzuweisen. Bislang war nur die Aktivierung von NK-Zellen durch Poly (I:C), nicht aber von T-Zellen bekannt [6]. Dabei blieb, im Gegensatz zu den $\gamma\delta$ T-Zellen, die CD69-Expression auf den NK-Zellen auch an den Tagen 2 und 3 erhöht; zudem wurde auch CD25 verstärkt exprimiert. Dies steht im Einklang mit neuen Ergebnissen, die eine direkte Aktivierung der NK-Zellen durch die ds-RNS zeigen [24]. Interessant ist auch, dass mehr NK-Zellen, NKT-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C) stimuliert werden. Die durch Poly (I:C) vermittelte Zellaktivierung scheint daher ein relativ unspezifisches Geschehen zu sein und wurde bislang für T-Zellen noch nicht beschrieben. Die Reaktivität der NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Lymphozyten ist jedoch deutlich stärker ausgeprägt als die der $\alpha\beta$ T-Lymphozyten, was im Einklang mit ihrer Rolle bei der „first line of defense“ gegen Infektionen (auch viralen) steht [26].

1.2. Bedeutung der CD69-Zunahme

Die Bedeutung des CD69-Moleküls ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Als Aktivierungsmarker auf Lymphozyten und anderen Zellen in der Durchflusszytometrie etabliert, ist seine eigentliche biologische Funktion noch nicht ausreichend bekannt [154]. Beschrieben wurde die Auslösung einer Proliferation von T- und B-Zellen sowie Thymozyten mittels monoklonaler Antikörper gegen CD69 in Gegenwart von PMA. Die Quervernetzung von CD69 auf aktivierten T-Zellen erzeugt einen extrazellulären Ca^{2+} -Einstrom, der bei gleichzeitiger PKC-Stimulation die Genexpression für IL-2, IFN- γ oder TNF- α , aber auch CD25 stimuliert. Daneben wird berichtet, dass über CD69 eine zytotoxische Aktivität von NK-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen entstehen kann [155]. Bei Monozyten kann eine CD69-Stimulation ebenfalls zu zytotoxischer Aktivität führen, die über NO-Produktion und -Freisetzung vermittelt wird. Welcher natürliche zelluläre Ligand CD69 stimuliert, ist nicht bekannt. Möglicherweise wird er im Rahmen einer Virusinfektion auf der Oberfläche von infizierten Zellen exprimiert; der Kontakt mit der Zielzelle könnte in den durch Virus-RNS aktivierten, CD69-positiven T-Zellen eine gerichtete zytotoxische Aktivität auslösen. Dieser Mechanismus würde die Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Zellen als MHC-unabhängige, NK-ähnliche Zellen zur schnellen Abwehr viraler Erkrankungen unterstreichen. Da für die Induktion von CD25 mit nachfolgender Proliferation ein weiteres Signal vonnöten ist, das zur PKC-Aktivierung führt, ist ein Schutz vor einer andauernden $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung gegeben.

1.3. Effektorfunktionen von T-Zellen nach Aktivierung durch Poly (I:C)

Nach Aktivierung von T-Zellen über ihren TZR-Rezeptor durch spezifische Antigene, einen Anti-TZR/Anti-CD3-Antikörper oder Mitogene reifen sie zu Effektorzellen aus und werden zytotoxisch, sezernieren Zytokine und Chemokine und proliferieren in Abhängigkeit von einem zweiten Signal (Review: [26]). Von Interesse war daher, inwieweit eine Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung auch Effektorfunktionen von T-Zellen bedingte. Dabei wurden die Proliferation und IFN- γ Sekretion der $\gamma\delta$ T-Zellen näher untersucht.

Da Poly (I:C) auf $\gamma\delta$ T-Zellen den Aktivierungsmarker CD69 induzieren konnte, stellte sich die Frage, ob durch ein zweites Signal (wie einer suboptimalen IPP-Dosis oder durch IL-2) die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen ausgelöst bzw. verstärkt werden konnte und die ds-RNS damit in der Art eines Kostimulus wirkt. Zunächst wurde in $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferationsversuchen nachgewiesen, dass nach Zugabe von Poly (I:C) kein isolierter Effekt auf das Auswachsen der $\gamma\delta$ T-Zellen vorhanden war. Wurde die ds-RNS jedoch zusätzlich zu IPP und/oder IL-2 dazugegeben, war konzentrationsabhängig ein kostimulierender Effekt vorhanden. Dies wurde v. a. bei Vorhandensein niedriger IL-2 und IPP-Konzentrationen deutlich. Zudem korrelierte diese Beobachtung mit der Tatsache, dass durch die ds-RNS nur eine vorübergehende Expression von CD69 und nicht von CD25 (als prospektivem Marker für eine Proliferation) induziert wurde. Welches spezifische virale Antigen von $\gamma\delta$ T-Zellen erkannt wird, bleibt weiterhin unklar. Zwar wurden natürlich vorkommende, bakterielle $V\gamma9V\delta2$ T-Zell-Liganden beschrieben, die mit dem nichtklassischen Mevalonat-Weg der Isoprenoidsynthese assoziiert sind [46, 52, 54]. Weder dieser Stoffwechselweg noch Phosphoantigene wurden jedoch in Viren nachgewiesen. Des Weiteren ist die Erkennung von virusinfizierten Zellen $\gamma\delta$ TZR-abhängig und auch Poly (I:C) wirkt nur additiv zu Phosphoantigenen kostimulierend auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation [142]. Wahrscheinlicher ist ein zellulärer (Selbst-) Ligand, welcher durch eine virale Infektion induziert oder modifiziert wird [74, 152].

Wie auch für andere Substanzen mit einer unspezifischen, proliferationsfördernden Wirkung auf $\gamma\delta$ T-Zellen beschrieben, konnten zu den spezifischen Antigenen vergleichbare Effekte nur durch das Zusammenwirken verschiedener Faktoren erzielt werden, was einen Schutz vor andauernder, unspezifischer $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung und -Proliferation darstellt.

Eine wesentliche Effektorfunktion von $\gamma\delta$ T-Zellen ist die Sekretion von IFN- γ nach Aktivierung mit einem Antigen oder Stimulation z. B. durch PMA und Ionomycin. Daher wurde untersucht, ob auch Poly (I:C) die IFN- γ Freisetzung durch $\gamma\delta$ T-Zellen fördert. Dazu wurden die Überstände im ELISA von PBL bzw. Monozyten-depletierten PBL nach 24 und 64 h mit und ohne Poly (I:C) auf ihren Gehalt an IFN- γ untersucht. Die Zugabe von Poly (I:C) allein führte selbst nach drei Tagen kaum zur Produktion von IFN- γ . Wurde zu den

depletierten Zellen Poly (I:C) dazugegeben, konnte im Vergleich zum Ansatz ohne ds-RNS die höchste Konzentration von IFN- γ gemessen werden. Zielzellen für IFN- γ sind v. a. Monozyten [182]; sie könnten durch eine Aufnahme dieses Botenstoffes zu der niedrigen Konzentration im nicht separierten Ansatz geführt haben. Dies kann auch dadurch erklärt werden, dass Monozyten andere Zellen hemmen und nach ihrer Entfernung jetzt aktivierte Zellen ohne weiteren Stimulus IFN- γ sezernieren. In diesem Versuchsansatz wurden die IFN- γ produzierenden Zellen nicht untersucht. Nach neuesten Ergebnissen sind dies wahrscheinlich NK-Zellen, die nach Stimulation mit der ds-RNS große Mengen an IFN- γ sezernieren und daneben unter der Kontrolle von Monozyten stehen [24, 156]. In weiteren Versuchen wurde daher in $\gamma\delta$ T-Zellen IFN- γ intrazytoplasmatisch gemessen. Während durch PMA/Ionomycin in $\gamma\delta$ T-Zellen IFN- γ induziert wurde, konnte dies für Poly (I:C) nicht nachgewiesen werden. Dies stellt sowohl einen Gegensatz zu den bekannten Phosphoantigenen als auch der Reaktion der mit den $\gamma\delta$ T-Zellen verwandten NK-Zellen dar. In V γ 9V δ 2 T-Zell-Linien hingegen kann die ds-RNS in Gegenwart eines Anti-V γ 9-Antikörpers eine Verstärkung der IFN- γ Sekretion induzieren [25].

2. Mechanismus der Poly (I:C) vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulierung

2.1. Direkte Mechanismen

Für Poly (I:C) sind sowohl direkte als auch indirekte Wirkungsmechanismen beschrieben. Die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erzeugte Resistenz gegen verschiedene Viren [3], die Inhibierung des Zellwachstums von normalen und tumorösen Zellen sowie die Verstärkung von zellvermittelter Zytotoxizität und der B-Zell-Antwort auf Antigene lässt sich sowohl durch die Poly (I:C)-bedingte Induktion verschiedener Zytokine (v. a. Interferone) als auch die Interaktion mit ds-RNS-abhängigen Enzymen erklären [6]. Während man in der Vergangenheit davon ausging, dass Poly (I:C) nur intrazellulär wirkt (wie auf die IFN-induzierbare ds-RNS-abhängige PKR), ist inzwischen ein Mitglied der Toll-like Rezeptorfamilie (TLR) als Oberflächen-Rezeptor für die ds-RNS identifiziert worden, nämlich

TLR3 [19]. Da die mit den $\gamma\delta$ T-Zellen verwandten NK-Zellen dieses Oberflächenmolekül exprimieren und dadurch direkt aktiviert werden, stellte sich die Frage, ob dies auch für $\gamma\delta$ T-Zellen zutrifft. So wurden isolierte $\gamma\delta$ T-Zellen mit der ds-RNS inkubiert und deren Aktivierung untersucht. Die für das Experiment benötigten nicht aktivierten Zellen konnten nicht durch positive Selektionsverfahren gewonnen werden, da durch die Separation eine zu starke Voraktivierung erfolgt wäre. Zum anderen ist keine ausreichende Aufreinigung in einer negativen MACS-Selektion zu erreichen, nachdem kein Antikörper verfügbar ist, der spezifisch NK-Zellen markiert und damit zur vollständigen Depletion „verunreinigender“ NK-Zellen ohne Verlust von $\gamma\delta$ T-Zellen verwendbar wäre. Daher wurden die Untersuchungen an zwei $\gamma\delta$ T-Zell-Klonen durchgeführt: Während der Expansion der T-Zellen zu Klonen sterben andere „Bystander“-Zellen weitestgehend ab und können somit keine Zytokine mehr produzieren oder über Zelloberflächenmoleküle kostimulierende Signale an die $\gamma\delta$ T-Zellen weiterleiten. Bei diesem Versuch kam es durch Poly (I:C) nicht zur Induktion des CD69-Moleküls auf den $\gamma\delta$ T-Zellen. Das Mitogen PHA dagegen war in der Lage, die Zellen zu aktivieren. Dieses Phänomen lässt sich auf unterschiedliche Weise erklären: Klone entstehen *in vitro* durch repetitive Stimulation mit einem starken Antigen (z. B. PHA). Native T-Zellen werden bereits bei wiederholter Reaktivierung auf schwache Antigene anerg [177] und benötigen bei der Expansion als Klone dann starke Antigene. Falls Poly (I:C) ein sehr schwaches Antigen darstellt, kann deshalb eine CD69-Hinaufregulierung, im Gegensatz zur Wirkung von PHA, unterbleiben, weshalb die Aussagekraft von mit Klonen durchgeführten Experimenten eingeschränkt ist. Es kann aber auch ein Hinweis auf eine indirekte Poly (I:C)-Wirkung sein, da die für einen Poly (I:C)-Effekt benötigten „Bystander“-Zellen durch die Klonierung nur in äußerst geringem Umfang vorhanden waren.

Dieses Ergebnis wird auch durch andere Arbeitsgruppen bestätigt: Zum einen werden isolierte T-Zellen nicht direkt durch Poly (I:C) aktiviert [24]. Während der Großteil der neueren Untersuchungsergebnisse gegen eine Expression des TLR3 auf $\gamma\delta$ T-Zellen spricht ([23, 24, 157]), konnten Wesch und Mitarbeiter inzwischen TLR3 auf $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisen. Diese schwache Oberflächenexpression betrifft jedoch $\gamma\delta$ T-Zell-Linien und Klone, also vorstimulierte Zellen. TLR3 wurde in unstimulierten $\gamma\delta$ T-Zellen nur intrazellulär entdeckt, so dass eine direkte Aktivierung dieser Zellen wohl ein zeitlich nach geordnetes Phänomen

darstellt [25]. Darüber hinaus wurde TICAM 1 („Toll/IL-1R containing adapter molecule 1), welches vorzugsweise die Signaltransduktion durch TLR3 vermittelt, nur in unreifen DCs, Makrophagen und NK-Zellen detektiert [157].

2.2. Indirekte Mechanismen

Poly (I:C) wirkt auf eine Reihe unterschiedlicher Zellen, wie Zellen des Immunsystems (z. B. B-Zellen, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen sowie NK-Zellen) oder Endothelzellen und Fibroblasten. Dies konnte auch in unseren Versuchen durch die Aktivierung von NK-Zellen, Monozyten und B-Zellen gezeigt werden. Dabei werden neben verschiedenen Zytokinen, v. a. IFN Typ I, auch kostimulierende Moleküle (auf B-Zellen oder DCs) induziert [6, 10, 14, 18, 24, 158].

2.2.1. Induktion kostimulierender Moleküle durch Poly (I:C)

Sowohl im murinen als auch humanen System wurde die Kostimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Interaktion von CD28 mit CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) beschrieben. Dies führt neben einer Verstärkung der Proliferation nach Aktivierung mit spezifischen Antigenen oder durch Anti-TZR-/Anti-CD3-Antikörper auch zu einer autokrinen IL-2 Sekretion durch die $\gamma\delta$ T-Zellen [79, 159]. Ob die Aktivierung durch die kostimulierenden Moleküle allein die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen beeinflusst, ist nicht bekannt. In den gezeigten Experimenten kam es im Verlauf von drei Tagen zur Abnahme der Expression von CD86 auf Monozyten nach Inkubation mit Poly (I:C) im Vergleich zum Ansatz ohne ds-RNS. Auf B-Zellen war keine Änderung der CD80/CD86-Expression nach Poly (I:C)-Inkubation zu erkennen. Eine Kostimulation durch diese Zellen ist damit unwahrscheinlich. Bei Inkubation von unreifen myeloischen dendritischen Zellen mit ds-RNS kommt es zu einer Zunahme der Expression von CD80, CD86, CD40, CD83 und HLA-DR [14, 160]. In die-

sem System konnte jedoch die Aktivierung dieser DCs aufgrund ihrer geringen Anzahl im PBL-Gemisch nicht untersucht werden.

Grundsätzlich ist daher die Beteiligung anderer, nicht untersuchter, kostimulierender Moleküle möglich. In Frage kämen z. B. NKG2D-Liganden wie das MICA/B-Molekül, welches nach bakterieller Infektion auf dendritischen Zellen induziert wird und eine antigeninduzierte Lyse dieser Zellen erleichtert. Dieses Molekül wird auch im Rahmen von Virusinfektionen exprimiert und wirkt kostimulierend auf CD8-positive T-Zellen [76, 161].

2.2.2. *Kostimulation durch Bystanderzellen ($\alpha\beta$ T-Zellen, Monozyten, NK-Zellen, B-Zellen, CD11c-positive Zellen)*

Da in den mit $\gamma\delta$ T-Zell-Klonen durchgeführten Experimenten keine Aktivierung der T-Zellen durch Poly (I:C) mehr möglich war, wurde die Bedeutung von „Bystander“-Zellen für die Wirkung der ds-RNS untersucht. So wurden durch MACS unterschiedliche Zellen anhand ihrer Oberflächenmoleküle aus PBL entfernt und die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen an Tag 1 mit denen in Gesamt-PBL verglichen. Entfernt wurden CD11c-, CD14-, CD16/CD56-positive Zellen, $\alpha\beta$ T-Zellen oder B-Zellen.

Durch Kadowaki und Mitarbeiter konnte nachgewiesen werden, dass eine Untergruppe von dendritischen Zellen, die unreifen myeloischen CD11c-positiven DCs sowie Fibroblasten mittels ds-RNS aktiviert werden [17]. Daher wurden die CD11c-positiven Zellen aus den PBL depletiert. Diese Fraktion enthält jedoch neben den CD11c-positiven DCs auch NK-Zellen, Monozyten und eine Untergruppe von B-Zellen sowie T-Zellen [147]. Nach Entfernung dieser Zellen konnte die Wirkung von Poly (I:C) auf $\gamma\delta$ T-Zellen vollständig unterbunden werden. Wurde die CD11c-positive Fraktion bzw. wurden unreife, myeloische DCs erneut dazugegeben, konnte die Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen rekonstituiert werden. Eine Aktivierung ließ sich ebenso durch den nach eintägiger Stimulation mit der ds-RNS gewonnenen Überstand der CD11c-positiven DCs erreichen. Die Wirkung ist jedoch nicht so ausgeprägt wie bei Inkubation der PBL mit der ds-RNS in gleicher Konzentration. Dabei spielt sicherlich der Verdünnungseffekt der im Überstand enthaltenen Botenstoffe eine

Rolle. Daneben könnten bereits zu einem früheren Zeitpunkt Stoffe sezerniert worden sein, die in diesem Versuchsansatz verworfen wurden. Dennoch deuteten diese Ergebnisse bereits auf eine mittels löslicher Botenstoffen erzielte Stimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen durch CD11c-positive Zellen hin.

Wurden CD11c-positive Zellen aus dem PBL-Gemisch entfernt, führte dies zur vollständigen Hemmung der $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation unabhängig von einer Poly (I:C)-Gabe und konnte nur durch Zugabe von CD11c-positiven Zellen oder iDCs wiederhergestellt werden. Da weder durch eine hohe Dosis von IL-2 noch durch den Überstand stimulierter iDCs ein ähnlicher Effekt erzielt werden konnte, spricht dieses Ergebnis möglicherweise für eine bisher unbekannte kostimulierende Wirkung CD11c-positiver Zellen, v. a. iDCs, auf die Phosphoantigen induzierte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation. Es wurde jedoch nicht untersucht, inwieweit eine eher unwahrscheinliche Präsentation von IPP oder ausschließlich kostimulierende Moleküle für diesen Effekt verantwortlich sein könnten, da durch die Inkubation mit Poly (I:C) die u. a. Expression des Oberflächenantigens CD86 herauf reguliert wird. Dieses kostimulierende Molekül kann die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen verstärken, wenn andere wachstumsfördernde Faktoren wie IL-2 oder spezifische Antigene in suboptimalen Konzentrationen vorhanden sind [79, 159]. Gerade DCs und lymphozytäre Effektorzellen des angeborenen Immunsystems scheinen ein Netzwerk zu bilden, welches letztlich Zellen der adaptiven Immunität stimulieren; dabei tragen aktivierte $\gamma\delta$ T-Zellen v. a. durch TNF- α , aber auch IFN- γ , zur Reifung der DCs bei [162, 163]. Welche Rolle unreife myeloische DCs für die ds-RNS vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation grundsätzlich spielen, konnte jedoch in diesem Versuchssystem nicht geklärt werden.

Um auszuschließen, dass weitere Zellfraktionen innerhalb der CD11c-positiven Zellen für die Wirkung des Oligonukleotids verantwortlich sind, wurden weitere Experimente durchgeführt. Dabei konnte keine Subpopulation gefunden werden, nach deren Depletion eine so deutliche Aufhebung der Poly (I:C)-Wirkung sichtbar gewesen wäre. Besonders deutlich ließen sich die $\gamma\delta$ T-Zellen durch die ds-RNS, aber auch ohne Oligonukleotid, aktivieren, wenn zuvor die B-Zellen entfernt worden waren. Weiterhin wurden B-Zellen auf ihre Beteiligung an der Poly (I:C)-vermittelten Kostimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. In $\gamma\delta$ T-

Zell-Proliferationsassays konnte die kostimulierende Wirkung von Poly (I:C) jedoch durch eine Entfernung der B-Zellen nicht gehemmt werden. Auffallend war, dass nach der Depletion der CD19-positiven Zellen die Positivkontrolle mit niedrigen IL-2 Dosen weniger gut proliferierte. Wurden höhere Dosen von IL-2 zugesetzt, konnte kein Unterschied in der Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen mit oder ohne Poly (I:C) in B-Zell-depletierten und nicht separierten Ansätzen festgestellt werden; dies bestätigt, dass die Wirkung der ds-RNS nur unter suboptimalen Proliferationsbedingungen für die $\gamma\delta$ T-Zellen nachweisbar ist. Dieser Effekt lässt sich jedoch nicht durch die Beteiligung von B-Zellen erklären.

Auch Monozyten schienen nicht für die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung relevant zu sein. Weiterhin waren sie nicht grundsätzlich notwendig für die Poly (I:C)-bedingte Proliferationszunahme der $\gamma\delta$ T-Zellen. Dennoch waren sie am Ausmaß des Effektes beteiligt, da eine Entfernung dieser Zellen z. T. bereits fördernd auf das T-Zell-Wachstum wirkte und die ds-RNS-Wirkung daraufhin abgeschwächt wurde. Die Depletion der $\alpha\beta$ T-Zellen, die auch Tregs (T-Zell-regulierende Population) enthalten, konnte zum einen bereits deutlich die $\gamma\delta$ T-Zellen aktivieren und zum anderen die IPP-vermittelte Proliferation verstärken. Dies ließe sich durch eine Konkurrenz der T-Zellen um Wachstumsfaktoren oder die Freisetzung hemmender Zytokine durch die $\alpha\beta$ T-Zellen erklären. Aktivierung und Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen durch Poly (I:C) war auch nach Depletion der $\alpha\beta$ T-Zellen sichtbar, wenngleich v. a. im Fall der Proliferation deutlich weniger ausgeprägt. Daher könnten $\alpha\beta$ T-Zellen an der Poly (I:C)-vermittelten Kostimulation der $\gamma\delta$ T-Zellen beteiligt sein, z.B. durch eine Sekretion von IL-2.

Die Entfernung der CD16/56-positiven Zellen hatte eine deutliche Abnahme in der Stimulierbarkeit der $\gamma\delta$ T-Zellen bereits ohne Poly (I:C) zur Folge. Ebenso war der ds-RNS-Effekt nicht mehr so ausgeprägt wie im Gesamt-PBL Ansatz. Andererseits führte bereits die Depletion dieser Zellen zur Zunahme der $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation mit IPP. Die kostimulierende Wirkung von Poly (I:C) war in diesem Versuchsansatz geringer. Dabei zu beachten ist jedoch, dass durch die Entfernung CD16- bzw. CD56-positiver Zellen neben den NK-Zellen auch weitere Subpopulationen wie NKT oder $\gamma\delta$ T-Zellen depletiert wurden. Diejenigen Zellen mit geringer Oberflächenausprägung dieser Antigene waren durch die gewählte Selektionsmethode zum Teil erheblich vorstimuliert und haben möglicherweise

auf Poly (I:C) hin nicht mehr reagiert. Interessant ist, dass sich auch die Untergruppe der CD16/56-positiven T-Zellen sehr gut aktivieren ließ. Dies könnte ebenso für diese Subpopulation von $\gamma\delta$ T-Zellen zutreffen, die allerdings aufgrund ihrer geringer Anzahl schwer zu untersuchen ist; eine Depletion von CD16/56-positiven Zellen wäre besonders nachteilig, wenn die Poly (I:C)-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung untersucht werden soll.

Dass die Entfernung CD16/56-positiver Zellen hingegen vorteilhaft für das IPP-induzierte Auswachsen von $\gamma\delta$ T-Zellen ist, lässt sich dadurch erklären, dass nur CD16-negative $V\gamma 2$ Zellen auf eine Kombination von IL-2 und Phosphoantigen hin proliferieren [89]. Die CD16-positive Fraktion der Effektor-Gedächtniszellen wurde neben den NK-Zellen als „IL-2-Konsumenten“ entfernt und somit könnten gerade geringe Mengen an Wachstumsfaktoren effizienter wirken [165]. Daneben wäre dieser Effekt auch durch die Depletion von CD16/56-positiven NKT-Zellen als regulatorische T-Zellen erklärbar. Die Hemmung der Poly (I:C)-vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Stimulation und -Proliferation nach CD16/56-Depletion könnte jedoch auch ein Beleg für die Beteiligung von NK-Zellen sein, da NK-Zellen über den TLR3 direkt durch Poly (I:C) aktiviert werden können. Unklar ist jedoch, wie sie im weiteren auf $\gamma\delta$ T-Zellen wirken.

Wie auch in der Literatur beschrieben, deuten diese Ergebnisse auf ein Netzwerk von $\alpha\beta$ T-Zellen, $\gamma\delta$ T-Zellen und NK-Zellen hin. Diese Zellen wirken durch Sekretion von Zytokinen (z. B. TNF- α oder IFN- γ durch NK-Zellen) oder die Konkurrenz um Wachstumsfaktoren regulierend auf die Aktivierung und Proliferation der anderen Subpopulationen [87, 96, 164].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass CD11c-positive Zellen, insbesondere unreife myeloische dendritische Zellen, die aktivierende Wirkung der ds-RNS auf $\gamma\delta$ T-Zellen vermitteln konnten. Zu ähnlichen Ergebnissen führten Untersuchungen von Rothenfusser, der eine DC-vermittelte $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung durch bakterielle DNS-Motive (CpG ODN: synthetische Oligodeoxynukleotide (ODN) mit CpG-Motiven (unmethylierte Cytosin-p-Guanosin Dinukleotide innerhalb spezifischer flankierender Basen)) beschrieben hat [148]. Die untersuchten CpG DNA-Motive (wie AAC-30) stimulieren CD11c-negative, TLR-7- und TLR-9-positive Typ 2 DC-Vorläuferzellen [17, 18] und besitzen ähnliche immunmo-

dulierende Wirkungen wie Poly (I:C).

2.2.3. *Kostimulation durch Zytokininduktion*

Da die Poly (I:C)-Wirkung auf $\gamma\delta$ T-Zellen im wesentlichen durch lösliche Botenstoffe erklärbar war, wurde dies im weiteren untersucht. Es ist bekannt, dass durch die Inkubation mit verschiedenen Zytokinen $\gamma\delta$ T-Zellen aktiviert werden können, ohne dass ein spezifisches Antigen vorhanden ist [85, 87]. Dies wurde für TNF- α und IL-12 beschrieben. Auch NK-Zellen, die eng mit $\gamma\delta$ T-Zellen verwandt sind, können durch Zytokine wie IFN I, IL-15 oder IL-12 stimuliert werden [165]. Poly (I:C) gilt als potenter Zytokininduktor; dazu gehören die Interferone IFN- α , IFN- β und IFN- γ , sowie die Interleukine IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-8 und IL-12 [3, 10, 17, 158, 166, 167]. Daher wurden verschiedene Zytokine auf ihre Fähigkeit hin untersucht, CD69 oder CD25 auf $\gamma\delta$ T-Zellen zu induzieren. Weiterhin wurde ihre Wirkung auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation getestet.

Umfassend ist die Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch TNF- α beschrieben [85]. In den gezeigten Experimenten konnte dieser Effekt jedoch nicht nachgewiesen werden. In den bisher veröffentlichten Daten ist die Wirkung dieses Zytokins auch umstritten: Während durch die Inkubation mit TNF- α ein Anti-CD3-vermitteltes Wachstum verstärkt werden kann [85, 87], wurden diese Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt [83, 84]. Möglich wäre eine kostimulierende Wirkung von TNF- α auf die $\gamma\delta$ T-Zellen, die nur unter speziellen Kulturbedingungen auftritt. So verwendeten Lahn und Mitarbeiter ein FCS-haltiges IMDM-Medium; die dargestellten Versuche wurden dagegen in Kulturmedium unter Zusatz humanen AB-Serums durchgeführt.

Neben TNF- α wurde auch für IL-12 eine $\gamma\delta$ T-Zell-aktivierende Wirkung beschrieben [87]. Dabei wurde von Ueta und Mitarbeitern nur die Expression von CD25, nicht jedoch von CD69, nach Inkubation mit IL-12 oder TNF- α untersucht. Daher können die gezeigten Daten nicht direkt miteinander verglichen werden. Bei Messung von CD25 an Tag 3 mit IL-12 war in der vorliegenden Untersuchung kein signifikanter Anstieg der IL-2-Rezeptor α -Kette nachweisbar; da der Gipfel der CD25-Expression, abhängig vom Spender, frühestens

an Tag 4 in den Untersuchungen von Ueta sichtbar ist, widersprechen sich die dargestellten Ergebnisse nicht. Weder die für Poly (I:C) beschriebene Induktion von IL-12 [10] noch das wichtige T_H1-Zytokin TNF- α scheinen demnach entscheidend für die Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch die ds-RNS zu sein. Die Wirkung von IL-12 auf die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation, welche auch als kostimulierend beschrieben wurde, wurde nicht weiter untersucht [150].

Beschrieben ist die Beteiligung des Zytokins IL-15 an der antiviralen Immunantwort durch NK-Zellen und die Induktion durch Poly (I:C): IL-15 mRNA wird *in vitro* durch HSV-6 und HSV-7 sowie die Typ I Interferone und *in vivo* durch LCMV- und MCMV-Infektionen induziert [12, 165, 168, 169]. IL-15 kann als NK-Zell-Wachstums- und -Reifungsfaktor dienen und, neben anderen Zytokinen, synergistisch mit IL-12 die IFN- γ Sekretion durch NK-Zellen während bakterieller oder parasitärer Erkrankungen steigern [170–172]. Daneben wirkt es sehr potent auf $\gamma\delta$ T-Zellen: Neben der in der Literatur beschriebenen Verstärkung der Proliferation und Zytokinproduktion auf $\gamma\delta$ T-Zell-spezifische Antigene, wie IPP oder Malariaantigene [81, 82, 173], war auch die Induktion von CD69 und CD25 durch IL-15 nachweisbar. Interessant ist, dass allein die Inkubation mit IL-15 für die Induktion der IL-2-Rezeptor α -Kette ausreicht, was auf eine besondere Rolle dieses Zytokins für die Regulation der verschiedenen $\gamma\delta$ T-Zell-Funktionen hinweist.

Neben IL-15 sind in der Literatur auch andere Zytokine beschrieben, die NK-Zellen, messbar an CD69, aktivieren können und durch Virusinfekte induziert werden. Dazu gehören IL-2 und die Typ I Interferone IFN- α und - β (Review:[153]). Da gerade die unreifen CD11c-positiven DCs nach Stimulation mit Poly (I:C) die IFN I freisetzen [17], war eine Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen durch IFN- α oder das über den gleichen Rezeptor wirkende IFN- β nahe liegend. So zeigten die Typ I Interferone, allein eingesetzt, neben IL-15 die stärkste Induktion von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen analog zu deren Wirkung auf NK-Zellen. Eine Induktion von CD25 war jedoch nicht festzustellen. Dies wurde durch Ergebnisse von Rothenfusser und Mitarbeitern bestätigt: Sie beschreiben ebenfalls einen kostimulierenden Effekt einer Kombination von IFN- α /- β auf $\gamma\delta$ T-Zellen anhand einem CD69-Anstieg nach 48 h und darüber hinaus eine Verstärkung der IPP-induzierten CD69-Expression nach Zusatz der IFN I. Daten zur Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen durch die Einzelsubstanzen wurden jedoch bisher nicht publiziert [148]. Im Gegensatz dazu wirkten IFN- α oder IFN- β in sehr

hohen Dosen hemmend auf die IPP-vermittelte Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen. Dieser *in vitro* untersuchte IFN I-Effekt auf die T-Zell-Proliferation wurde von anderen bestätigt [151].

Von IFN- γ ist bekannt, dass die Proliferation von $\gamma\delta$ T-Zellen nach Zugabe von *M. tuberculosis* von diesem Zytokin abhängig ist [83, 150]. IFN- γ wirkte auf $\gamma\delta$ T-Zellen kostimulierend, sofern im Versuchsansatz Monozyten vorhanden waren. Nach Entfernung der Monozyten konnte durch Zugabe der vorher stimulierenden IFN- γ Konzentrationen die Proliferation der $\gamma\delta$ T-Zellen nicht gesteigert werden. Diese Ergebnisse bestätigen publizierte Daten anderer Arbeitsgruppen [83, 87].

Interessant ist, dass im Fall der beiden Typ I Interferone die CD69-Expression an Tag 1 nicht mit dem Auswachsen an Tag 7 korrelierte; bei gleich starker Aktivierung an Tag 1 durch beide Zytokine v. a. in sehr hohen Dosen hemmte IFN- α die $\gamma\delta$ T-Zell-Proliferation titrierbar, während der Effekt von IFN- β weniger stark ausgeprägt und in manchen Experimenten sogar kostimulierend war. Dieses Phänomen ist bisher für $\gamma\delta$ T-Zellen nicht beschrieben worden. Erklärt werden könnte dieser Effekt durch die Wirkung der Zytokine auf weitere Zielzellen. Daneben bestätigt sich, dass CD25 der bislang einzige prospektive Aktivierungsmarker auf $\gamma\delta$ T-Zellen ist, der bereits ab Tag 3 auf ein Auswachsen der T-Zellen (bei ausreichender IL-2 Konzentration) hinweist.

Wie schon für NK-Zellen beschrieben [174], konnte auch bei $\gamma\delta$ T-Zellen durch den Zusatz von IL-2 eine noch stärkere Expression von CD69 erzielt werden. Eine Induktion von CD25 durch IL-2 war jedoch nicht nachweisbar.

Die Reaktivität von $\gamma\delta$ T-Zellen auf NK-Zell-aktivierende Zytokine kann als weiterer Hinweis auf die Verwandtschaft von NK- und $\gamma\delta$ T-Zellen interpretiert werden und deutet auf die Art ihrer Funktion in der frühen Immunität hin.

Neben Experimenten von rekombinanten Zytokinen in unterschiedlichen Dosierungen wurden auch solche mit neutralisierenden Antikörpern gegen die Zytokine durchgeführt, die möglicherweise die Poly (I:C)-vermittelte Expression von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zellen induzieren. So wurden neutralisierende Antikörper gegen IL-15, IFN- α , IFN- β und den IFN I-Rezeptor eingesetzt.

Die verwendeten Antikörper gegen IFN- α /- β bzw. den IFN I-Rezeptor führten, allein oder

in unterschiedlichen Kombinationen zugesetzt, zur deutlichen Reduzierung der ds-RNS induzierten CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen. Während Rothenfusser eine Reduktion der durch bakterielle synthetische Oligonukleotide (CpG ODN) induzierten IFN I-Wirkung auf $\gamma\delta$ T-Zellen erst mittels zusätzlicher Gabe des gegen den IFN-Rezeptor gerichteten Antikörpers (neben blockierenden Antikörpern gegen beide Interferone) erreichen konnte [148], war diese Antikörperkombination in den gezeigten Versuchen zur vollständigen Hemmung der ds-RNS induzierten Aktivierung unzureichend. Welche zusätzlichen Faktoren die CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen vermitteln können, blieb in diesem Zusammenhang ungeklärt.

Nicht untersucht wurde die Wirkung von IL-1 α , weder durch Zugabe des Zytokins noch durch einen neutralisierenden Antikörper. Da IL-6 per se keine $\gamma\delta$ T-Zell-aktivierende Wirkung besaß, wurde auf Versuche zur Hemmung durch einen Anti-IL-6-Antikörper verzichtet. Eine Beteiligung von IL-15 an der ds-RNS vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung schien im verwendeten Versuchssystem nur eine untergeordnete Rolle zu spielen: Zum einen konnte die CD69-Induktion nach Inkubation mit einem neutralisierenden Antikörper nicht blockiert werden. Wären darüber hinaus die für die *in vitro*-Aktivierung notwendigen IL-15 Konzentrationen von 10–100 ng/ml erreicht worden, hätte diese hohe Interleukinkonzentration zu einer Induktion von CD25 an Tag 3 führen müssen; durch Poly (I:C)-Gabe wurde jedoch dieser IL-2-Rezeptor nicht auf $\gamma\delta$ T-Zellen induziert. *In vivo* hingegen könnte IL-15 eine wesentliche Rolle bei der Poly (I:C) vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung und -Proliferation spielen: So ist aus dem Mausmodell bekannt, dass Poly (I:C) oder IFN I über eine Induktion von IL-15 in Endothelzellen CD8-positive, CD44^{high} Memory T-Zellen unspezifisch zur Proliferation anregen [12]. Im Mausmodell lässt sich dagegen keine Induktion von CD69 oder CD25 auf diesen T-Zellen nachweisen [11]. Dies könnte ein Hinweis auf eine funktionelle Verwandtschaft dieser murinen Memory T-Zellen mit $\gamma\delta$ T-Zellen sein; jedoch kann dies bisher *in vitro* nicht untersucht werden, da Endothelzellen, die hauptsächlich IL-15 produzieren, im *in vitro*-Modell fehlen.

Zusammenfassend sind damit die Typ I Interferone an der Poly (I:C)-vermittelten $\gamma\delta$ T-Zell-Aktivierung, in Analogie zu bakteriellen Oligonukleotiden (CpG ODN) zu einem großen Teil beteiligt. Daneben kommen jedoch, möglicherweise je nach experimentellen Be-

dingungen, andere Faktoren wie Zell-Zell-Kontakt-vermittelte Signale hinzu.

ZUSAMMENFASSUNG

Humane V γ 9V δ 2 T-Zellen stellen eine Gruppe von T-Lymphozyten dar, die, im Gegensatz zu $\alpha\beta$ T-Zellen, durch eine Fülle von phosphorylierten Antigenen und Phosphat-Analoga aktiviert werden können. Diese sind allesamt mit dem Mevalonat-Stoffwechselweg assoziiert. Nach ihrer Stimulierung tragen sie zur schnellen, unspezifischen Infektionsabwehr, die viele Ähnlichkeiten mit der Wirkung von NK-Zellen besitzt, bei. In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von ds-RNS (Poly (I:C)) auf humane $\gamma\delta$ T-Zellen untersucht. Diese Substanz simuliert *in vivo* und *in vitro* die Infektion mit einem Virus und übt pleiotrope Effekte auf eine Reihe von verschiedenen Zellen aus, u.a. auch auf die mit den $\gamma\delta$ T-Zellen verwandten, an der schnellen Virusabwehr beteiligten, NK-Zellen.

Poly (I:C) induziert eine partielle Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen, sichtbar am Oberflächenmolekül CD69, jedoch nicht CD25, CD95 oder ICAM-I. Daneben stimuliert die ds-RNS die antigenspezifische $\gamma\delta$ T-Zell-Antwort, nachweisbar an einer Zunahme der Proliferation. Die Sekretion von IFN- γ durch $\gamma\delta$ T-Zellen ist jedoch nicht gesteigert.

Die Wirkungsmechanismen von Poly (I:C) auf $\gamma\delta$ T-Zellen sind, im Gegensatz zu den NK-Zellen, in erster Linie indirekt. Wurde die Induktion von CD69 auf $\gamma\delta$ T-Zell-Klonen nach Inkubation mit der ds-RNS untersucht, konnte keine Aktivierung nachgewiesen werden. Durch Depletion der CD11c-positiven Zellen wird die Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung der $\gamma\delta$ T-Zellen vollständig aufgehoben.

Die Inkubation von $\gamma\delta$ T-Zellen mit verschiedenen, durch Poly (I:C) induzierten Zytokinen wie IFN I oder IL-15 führt ebenfalls zur Heraufregulierung des CD69-Moleküls. Durch Neutralisierung dieser Zytokine war größtenteils eine Aufhebung der Poly (I:C)-vermittelten CD69-Expression auf $\gamma\delta$ T-Zellen möglich. Ein zumindest additiver Effekt von weiteren, z.B. Zell-Zell-Kontakt-vermittelten Faktoren ist denkbar. Somit sind die von CD11c-positiven Zellen (nämlich TLR3-positiven DCs) Typ I Interferone hauptverantwortlich für die Poly (I:C)-vermittelte Aktivierung von $\gamma\delta$ T-Zellen. Daneben spielen möglicherweise auch TLR3-positiv NK-Zellen, z.B. über die Bildung von IFN- γ oder IL-15, ebenfalls eine Rolle bei den Poly (I:C)-Effekten auf $\gamma\delta$ T-Zellen.

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABP	Aminobisphosphonat
AICD	<i>activation induced cell death</i> , aktivierungsinduzierter Zelltod
AK	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
BCG	Bacille-Calmette-Guérin Impfstoff
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungscluster
CD45RA	Isoformen von CD45 mit A-Exon
CD45RO	Isoform von CD45 ohne A-, B- oder C-Exon
C-Domäne	konstante Domäne
CDP	Cytidindiphosphat
CDR3	complementarity determining regions 3
CLL	chronisch lymphatische Leukämie
CpG-Motive	unmethylierte Cytosin-p-Guanosin Dinukleotide innerhalb spezifischer flankierender Basen
D-Domäne	<i>diversity</i> (Vielfalts-) Domäne
DCs	dendritische Zellen
DMAPP	Dimethylallyl-Pyrophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOXP	1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat
ds-RNS	Doppelstrang-RNS
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EBV	Ebstein Barr- Virus
EDTA	Ethylendiamine-tetraaceticacid Dinatriumsalz Dihydrat
eIF2	Initiationsfaktor der eukaryontischen Proteinsynthese

ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPP	Farnesylpyrophosphat
gI	virales Hüll-Glykoprotein I
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
HBSS	<i>Hank's balanced solution</i>
HDMAPP	(E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-Pyrophosphat
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA-A, -B, -C	Histokompatibilitäts-Antigen -A, -B, -C
HMG	β -Hydroxy- β -methylglutaryl
HMG-CoA-R	β -Hydroxy- β -methylglutaryl-CoA-Reduktase
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschock-Protein
HSV	Herpes simplex-Virus
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
iDCs	<i>immature DCs</i> , unreife DCs
IFN-	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL-	Interleukin
IL-2R	Interleukin 2 Rezeptor
IPP	Isopentenylpyrophosphat
J- Domäne	<i>joining</i> (verbindende) Domäne
KAR	<i>Killer Cell Activating Receptor</i> , aktivierender Rezeptor der Killerzellen
kDa	Kilodalton
KIR	<i>Killer Cell Inhibitory Receptor</i> , hemmender Rezeptor der Killerzellen
-L	Ligand

LAK	<i>Lymphokine activated killer cells</i> , durch Zytokine aktivierte Killerzellen
LCMV	lymphozytisches Choriomenigitis-Virus
LFA-3	<i>lymphocyte function-associated antigen 3</i> , Ligand für CD2
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic Cell Sorting</i>
MALag	Malaria antigen, <i>P. falciparum</i> Antigen
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MICA/B	<i>MHC class I-related chains A/B</i> , mit MHC-Klasse-I verwandte Moleküle
mRNS	<i>messenger</i> (Boten) Ribonukleinsäure
Na-Azid	Natrium-Azid
NF κ b	<i>nuclear factor κb</i>
NKR	<i>Natural Killer Cell Receptors</i> , Rezeptoren natürlicher Killerzellen
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	T-Zellen mit NK-ähnlichen Eigenschaften
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodeoxynukleotide
-P	Phosphat
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> (invariable molekulare Motive verschiedener mikrobieller Herkunft)
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	<i>Phosphate buffered solution</i>
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohämagglutinin
PKC	Proteinkinase C
PKR	ds-RNS-abhängige Proteinkinase
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat

Poly (I:C)	Poly-Inosin-: Poly-Cytidyl-Säure
PTK	Protein-Tyrosin Kinase
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Tab.	Tabelle
T-ALL	akute T-lymphatische Leukämie
TAP	Transportproteine im Rahmen der Antigenprozessierung
T _{EM}	T-Effektor-Gedächtniszellen
T _{EMH}	T _{EM} -Helferzellen
T _{EMRA}	NK-ähnliche T _{EM} -Zellen
T _H 1-Zelle	inflammatorische T-Zelle
T _H 2-Zelle	T-Helfer-Zelle
TICAM	<i>Toll/ IL-R1 containing adapter molecule 1</i>
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF-	Tumornekrosefaktor
TUBag 1-4	Tuberculosis antigen, <i>M. tuberculosis</i> Antigen, 1-4
TZR	T-Zell-Rezeptor
UTP	Udenosintriphosphat
V- Domäne	variable (variable) Domäne
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i> , viraler Erreger der vesikulären Stomatitis
ULBP	<i>UL binding protein</i>

LITERATURVERZEICHNIS

1. Hovanessian, A.G., *Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2', 5'-oligoadenylate synthetases*. J. Interferon Res., 1991. **11**: p. 199.
2. Pfeffer, L.M., *et al.*, *Biological properties of recombinant α -interferons: 40th anniversary of the discovery of interferons*. Cancer Res., 1998. **58**: p. 2489.
3. Field, A.K., *et al.*, *Inducers of interferon and host resistance, II. Multistranded synthetic polynucleotide complexes*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1967. **58**: p. 1004-1010.
4. Meurs, E., *et al.*, *Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon*. Cell, 1990. **62**: p. 379-390.
5. Bong Lee, S., *et al.*, *The interferon-induced double-stranded RNA-activated human p68 protein kinase potently inhibits protein synthesis in cultured cells*. Virology, 1993. **192**: p. 380.
6. Haines, D.S., K.I. Strauss, and D.H. Gillespie, *Cellular response to double-stranded RNA*. J. Cell. Biochem., 1991. **46**: p. 9-20.
7. Urban, J.L., *et al.*, *Tumor necrosis factor: a potent effector molecule for tumor cell killing by activated macrophages*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986. **83**(14): p. 5233-5237.
8. Ewel, C.H., *et al.*, *Poly I:C accelerates development of diabetes mellitus in diabe-*

- tes-prone BB rat. Diabetes*, 1992. **41**(8): p. 1016-1021.
9. Sobel, D.O., *et al.*, *Poly I:C induces development of diabetes mellitus in BB rat. Diabetes*, 1992. **41**(8): p. 515-520.
 10. Manetti, R., *et al.*, *Polyinosinic acid: polycytidylic acid promotes T helper type 1-specific immune response by stimulating macrophage production of interferon- α and interleukin-12. Eur. J. Immunol.*, 1995. **25**: p. 2656-2660.
 11. Tough, D.F., P. Borrow, and J. Sprent, *Induction of bystander T cell proliferation by Viruses and Type I Interferon in vivo. Science*, 1996. **272**: p. 1947-1950.
 12. Zhang, X., *et al.*, *Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. Immunity*, 1998. **8**: p. 591-599.
 13. Lanzavecchia, A. and F. Sallusto, *Regulation of T cell immunity by dendritic cells. Cell*, 2001. **106**: p. 263.
 14. Cella, M., *et al.*, *Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. J. Exp. Med.*, 1999. **189**(5): p. 821-829.
 15. O'Doherty, U., *et al.*, *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. Immunology*, 1994. **82**: p. 487.
 16. Siegal, F.P., *et al.*, *The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. Science*, 1999. **284**: p. 1835.
 17. Kadowaki, N., S. Antonenko, and Y.-J. Liu, *Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c⁻ type 2*

- dendritic cell precursors and CD11c⁺ dendritic cells to produce type I IFN.* The Journal of Immunology, 2001. **166**: p. 2291-2295.
18. Kadowaki, N., *et al.*, *Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens.* J. Exp. Med., 2001. **194**: p. 863-869.
 19. Alexopoulou, L., *et al.*, *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3.* Nature, 2001. **413**: p. 732.
 20. Matsumoto, M., *et al.*, *Establishment of a monoclonal antibody against human Toll-like receptor 3 that blocks double-stranded RNA-mediated signaling.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002. **293**: p. 1364.
 21. Muzio, M., *et al.*, *Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells.* The Journal of Immunology, 2000. **164**: p. 5998.
 22. Cario, E. and D.K. Podolsky, *Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease.* Infection and Immunity, 2000. **68**: p. 7010.
 23. Hornung, V., *et al.*, *Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides.* The Journal of Immunology, 2002. **168**: p. 4531-4537.
 24. Schmidt, K.N., *et al.*, *APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA.* The Journal of Immunology, 2004. **172**: p. 138-143.

25. Wesch, D., *et al.*, *Direct costimulatory effect of TLR3 ligand Poly(I:C) on human $\gamma\delta$ T lymphocytes*. *The Journal of Immunology*, 2006. **176**: p. 1348-54.
26. Kaufmann, S.H.E., *$\gamma\delta$ and other unconventional T lymphocytes: What do they see and what do they do?* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996. **93**: p. 2272-2279.
27. De Libero, G., *Sentinel function of broadly reactive human $\gamma\delta$ T cells*. *Immunol. Today*, 1997. **18**: p. 22-26.
28. Brenner, M.B., *et al.*, *Identification of a putative second T-cell receptor*. *Nature*, 1986. **322**: p. 145-149.
29. Porcelli, S., M.B. Brenner, and H. Band, *Biology of the human $\gamma\delta$ T-cell receptor*. *Immunol. Rev.*, 1991. **120**: p. 137-183.
30. de Libero, G., *et al.*, *Selection by two powerful antigens may account for the presence of the major population of human peripheral $\gamma\delta$ T cells*. *J. Exp. Med.*, 1991. **173**: p. 1311-1322.
31. Triebel, F. and T. Hercend, *Subpopulations of human peripheral T $\gamma\delta$ lymphocytes*. *Immunol. Today*, 1989. **10**: p. 186-188.
32. Morita, C.T., *et al.*, *TCR usage and functional capabilities of human $\gamma\delta$ cells at birth*. *J. Immunol.*, 1994. **153**: p. 3979-3988.
33. Haas, W., P. Pereira, and S. Tonegawa, *$\gamma\delta$ Cells*. *Annu. Rev. Immunol.*, 1993. **11**: p. 637-685.
34. De Rosa, S.C., *et al.*, *Ontogeny of human $\gamma\delta$ T cells*. *The Journal of Immunology*,

2004. **172**: p. 1637-45.
35. Groh, V., *et al.*, *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial $\gamma\delta$ T cells*. *Science*, 1998. **279**: p. 1737-1740.
 36. Peyrat, M., *et al.*, *Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V delta 3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor (TCR) delta-chain expressors, alpha beta T cells expressing V delta 3J C alpha-encoded TCR chains*. *J. Immunol.*, 1995. **155**: p. 3060-3067.
 37. Halary, F., J.J. Fournie, and M. Bonneville, *Activation and control of self-reactive $\gamma\delta$ T cells*. *Microbes and Infection*, 1999. **1**: p. 247-253.
 38. O'Brien, R.L., *et al.*, *Heat shock protein Hsp60-reactive $\gamma\delta$ cells: a large diversified T-lymphocyte subset with highly focused specificity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992. **89**: p. 4348-4352.
 39. Holoshitz, J., *et al.*, *Isolation of CD4⁻ CD8⁻ mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid*. *Nature*, 1989. **339**: p. 226-229.
 40. Kabelitz, D., *et al.*, *A large fraction of human peripheral blood γ/δ^+ T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein*. *J. Exp. Med.*, 1990. **171**: p. 667-679.
 41. Holoshitz, J., *et al.*, *MHC-independent presentation of mycobacteria to human $\gamma\delta$ T cells*. *International Immunology*, 1993. **5**(11): p. 1437-1443.
 42. Pfeffer, K., *et al.*, *Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of γ/δ T cells are stimulated by protease-resistant ligands*. *Eur. J. Immunol.*,

1990. **20**: p. 1175-1179.
43. Schoel, B., S. Sprenger, and S.H.E. Kaufmann, *Phosphate is essential for stimulation of V γ 9V δ 2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand*. Eur. J. Immunol, 1994. **24**: p. 1886-1892.
 44. Constant, P., *et al.*, *Stimulation of human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands*. Science, 1994. **264**: p. 267-270.
 45. Belmant, C., *et al.*, *3-Formyl-1-butyl pyrophosphate a novel mycobacterial metabolite-activating human $\gamma\delta$ T cells*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(45): p. 32079-32084.
 46. Feurle, J., *et al.*, *Escherichia coli produces phosphoantigens activating human $\gamma\delta$ T cells*. The Journal of Biological Chemistry, 2001. **277**: p. 148-154.
 47. Behr, C., *et al.*, *Plasmodium falsiparum stimuli for human $\gamma\delta$ T cells are related to phosphorylated antigens of mycobacteria*. Infect. Immun., 1996. **64**: p. 2892-2896.
 48. Tanaka, Y., *et al.*, *Nonpeptide ligands for human $\gamma\delta$ T cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**: p. 8175-8179.
 49. Tanaka, Y., *et al.*, *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human $\gamma\delta$ T cells*. Nature, 1995. **375**: p. 155-158.
 50. Poupot, M. and J.-J. Fournié, *Non-peptide antigens activating human V γ 9/V δ 2 lymphocytes*. Immunology Letters, 2004. **95**: p. 129-38.
 51. Morita, C.T., *et al.*, *Recognition of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens by*

- human $\gamma\delta$ T cells*. *Microbes and Infection*, 1999. **1**: p. 175-186.
52. Hintz, M., *et al.*, *Identification of (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate as a major activator for human $\gamma\delta$ T cells in Escherichia coli*. *FEBS Letter*, 2001. **509**: p. 317-22.
53. Adam, P., *et al.*, *Biosynthesis of terpenes: Studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 2002. **99**: p. 12108-13.
54. Altincicek, B., *et al.*, *Human $\gamma\delta$ T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis*. *The Journal of Immunology*, 2001. **166**: p. 3655-3658.
55. Rohmer, M., *The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants*. *Nat. Prod. Rep.*, 1999. **16**: p. 565-74.
56. Eisenreich, W., *et al.*, *The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms*. *Chem. Biol.*, 1998. **5**: p. 221-33.
57. Jomaa, H., *et al.*, *V γ 9/V δ 2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 1999. **25**: p. 371-378.
58. Dunford, J.E., *et al.*, *Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase in vitro and inhibition of bone resorption in vivo by nitrogen-containing bisphosphonates*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2001. **296**: p. 235-42.

59. Gallacher, S.J., *et al.*, *Side-effects of pamidronate*. *Lancet*, 1989. **2**: p. 42-43.
60. Kunzmann, V., E. Bauer, and M. Wilhelm, *γ/δ T-Cell stimulation by pamidronate*. *New Engl. J. Med*, 1999. **340**: p. 737-738.
61. Kunzmann, V., *et al.*, *Stimulation of $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma*. *Blood*, 2000. **96**(2): p. 384-392.
62. Gober, H.-J., *et al.*, *Human T cell receptor $\gamma\delta$ cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003. **197**: p. 163-168.
63. Bukowski, J.F., C.T. Morita, and M.B. Brenner, *Human $\gamma\delta$ T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implication for innate immunity*. *Immunity*, 1999. **11**: p. 57-65.
64. Thompson, K., J. Rojas-Navea, and M.J. Rogers, *Alkylamines cause $V\gamma9V\gamma2$ T cell activation and proliferation by inhibiting the mevalonate pathway*. *Blood*, 2006. **107**: p. 651-654 prepublished online September 22, 2005.
65. Bürk, M.R., L. Mori, and G.d. Libero, *Human $V\gamma9-V\delta2$ cells are stimulated in a crossreactive fashion by a variety of phosphorylated metabolites*. *Eur. J. Immunol*, 1995. **25**: p. 2025-2058.
66. Bukowski, J.F., *et al.*, *$V\gamma2V\delta2$ TCR-dependent recognition of non-peptide antigens and Daudi cells analyzed by TCR gene transfer*. *The Journal of Immunology*, 1995. **154**: p. 998-1006.
67. Arden, B., *et al.*, *Human T-cell receptor variable gene segment families*. *Immuno-*

- genetics, 1995. **42**: p. 455-500.
68. Allison, T.J., *et al.*, *Structure of a human $\gamma\delta$ T-cell antigen receptor*. Nature, 2001. **411**: p. 820-824.
 69. Lang, F., *et al.*, *Early activation of human $V\gamma 9V\delta 2$ T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands*. J. Immunol, 1995. **154**: p. 5986-5994.
 70. Morita, C.T., *et al.*, *Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human $\gamma\delta$ T cells*. Immunity, 1995. **3**: p. 495-507.
 71. Das, H., *et al.*, *$V\gamma 2V\delta 2$ T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates*. Blood, 2001. **98**(5): p. 1616-1618.
 72. Miyagawa, F., *et al.*, *Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human $\gamma\delta$ T cells by aminobisphosphonates*. The Journal of Immunology, 2001. **166**: p. 5508-5514.
 73. Fisch, P., *et al.*, *Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human $V\gamma 9/V\delta 2$ T cells in tumor immunity*. Eur. J. Immunol, 1997. **27**: p. 3368-3379.
 74. Poccia, F., *et al.*, *CD94/NKG2 inhibitory receptor complex modulates both antiviral and anti-tumoral responses of polyclonal phosphoantigen-reactive $V\gamma 9V\delta 2$ T lymphocytes*. The Journal of Immunology, 1997. **159**: p. 6009-6017.
 75. Carena, I., *et al.*, *Major histocompatibility complex class I molecules modulate activation threshold and early signaling of T cell antigen receptor- γ/δ stimulated by*

- nonpeptidic ligands*. J. Exp. Med., 1997. **186**(10): p. 1769-1774.
76. Das, H., *et al.*, *MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function*. Immunity, 2001. **15**(1): p. 83-93.
77. Bauer, S., *et al.*, *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA*. Science, 1999. **285**: p. 727.
78. Das, H., M. Sugita, and M.B. Brenner, *Mechanisms of Vdelta1 gamma delta T cell activation by microbial components*. The Journal of Immunology, 2004. **172 +173**: p. 6578-86; following 2198.
79. Wilhelm, M. and H.P. Tony, *An invitro model for the expansion of Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes during development*. Scand. J. Immunol, 1994. **40**: p. 521-528.
80. Burns, J., S. Lobo, and B. Bartholomew, *Requirement for CD4⁺ T cells in the gamma delta T cell proliferative response to Daudi Burkitt's lymphoma*. Cell. Immunol., 1996. **174**: p. 19-24.
81. Elloso, M.M., *et al.*, *Human gamma delta T cell subset-proliferative response to malarial antigen in vitro depends on CD4⁺ T cells or cytokines that signal through components of the IL-2R^l*. J. Immunol., 1996. **157**: p. 2096-2102.
82. García, V.E., *et al.*, *IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to nonpeptide microbial antigens*. J. Immunol., 1998. **160**: p. 4322-4329.
83. Pechhold, K., *et al.*, *Primary activation of Vgamma9-expression gamma delta T cells by Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Immunology, 1994. **152**: p. 4984-4992.

84. Wesch, D., S. Marx, and D. Kabelitz, *Comparative analysis of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate*. Eur. J. Immunol, 1997. **27**: p. 952-956.
85. Lahn, M., et al., *Early preferential stimulation of $\gamma\delta$ T cells by TNF- α* . The Journal of Immunology, 1998. **160**: p. 5221-5230.
86. Perussia, B., et al., *Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR- $\alpha\beta^+$, TCR- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes, and NK cells*. The Journal of Immunology, 1992. **149**(11): p. 3495-3502.
87. Ueta, C., et al., *Interleukin-12 activates human $\gamma\delta$ T cells: synergistic effect of tumor necrosis factor- α* . Eur. J. Immunol., 1996. **26**: p. 3066-3073.
88. Roth, S.J., et al., *Transendothelial chemotaxis of human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytes to chemokines*. Eur. J. Immunol., 1998. **28**: p. 104-113.
89. Angelini, D.F., et al., *Fc γ R III discriminates between two subsets of V γ 9V δ 2 effector cells with different responses and activation pathways*. Blood, 2004. **104**: p. 1801-7.
90. Ferrick, D.A., et al., *Differential production of interferon- γ and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by $\gamma\delta$ T cells in vivo*. Nature, 1995. **373**: p. 255-257.
91. Wilhelm, M., et al., *$\gamma\delta$ receptor-expressing T-cell clones from a cutaneous T-cell lymphoma suppress hematopoiesis*. Ann. Hematol., 1992. **65**: p. 111-15.
92. Geissler, R.G., et al., *$\gamma\delta$ -T cell-receptor-positive lymphocytes inhibit human hematopoietic progenitor cell growth in HIV type 1-infected patients*. AIDS Res. Hum.

Retrovir., 1996. **12**: p. 577-584.

93. Dobmeyer, T.S., *et al.*, *Mechanism of $\gamma\delta$ T-cell-mediated inhibition of stem cell differentiation in vitro: possible relevance for myeosuppression in HIV-infected individuals*. Cell. Immunol, 1998. **184**: p. 26-36.
94. Cipriani, B., *et al.*, *Activation of C-C β -chemokines in human peripheral blood $\gamma\delta$ T cells by isopentenyl pyrophosphates and regulation by cytokines*. Blood, 2000. **95**(1): p. 39-47.
95. Boismenu, R., *Chemokine expression by intraepithelial $\gamma\delta$ T cells. Implication for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia*. J. Immunol., 1996. **157**: p. 985-992.
96. Kabelitz, D., *Effector functions and control of human $\gamma\delta$ T-cell activation*. Microbes and Infection, 1999. **1**: p. 255-261.
97. Vincent, M.S., *et al.*, *Apoptosis of Fas^{high} CD4⁺ synovial T cells by Borrelia-reactive Fas-ligand^{high} $\gamma\delta$ T cells in Lyme arthritis*. J. Exp. Med., 1996. **184**: p. 2109-2117.
98. Ferrarini, M., *et al.*, *Daudi lymphoma killing triggers the programmed cell death of cytotoxic V γ 9/V δ 2 T lymphocytes*. J. Immunol., 1995. **154**: p. 3704-3712.
99. Sciorati, C., *et al.*, *Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in $\gamma\delta$ T lymphocytes*. The Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(37): p. 23211-23215.
100. Fisch, P., *et al.*, *Recognition by human V γ 9V δ 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells*. Science, 1990. **250**: p. 1269-1273.

101. Selin, L.K., *et al.*, *Reactivity of $\gamma\delta$ T cells induced by the tumor cell line RPMI 8226: functional heterogeneity of clonal populations and role of GroEL heat shock proteins.* Scand. J. Immunol., 1992. **36**: p. 107-117.
102. Fisch, P., *et al.*, *$\gamma\delta$ T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity.* J. Exp. Med., 1990. **171**: p. 1567-1579.
103. Sicard, H., *et al.*, *Synthetic phosphoantigens enhance human $V\gamma 9V\delta 2$ lymphocytes killing of non-Hodgkin's B lymphomas.* Molecular Medicine, 2001. **7**: p. 711-22.
104. Porcelli, S., *et al.*, *Recognition of cluster of differentiation 1 antigens by human $CD4^- CD8^-$ cytotoxic T lymphocytes.* Nature, 1989. **341**: p. 447-450.
105. Moris, A., *et al.*, *Role of $\gamma\delta$ T cells in tumor immunity and their control by NK receptors.* Microbes and Infection, 1999. **1**: p. 227-234.
106. Zocchi, M.R., *et al.*, *T-cell receptor $V\delta$ gene usage by tumor reactive $\gamma\delta$ lymphocytes infiltrating human lung cancer.* Immunology, 1994. **81**: p. 234-239.
107. Choudhary, A., *et al.*, *Selective analysis of autologous tumor cells by recurrent $\gamma\delta$ tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma.* J. Immunol., 1995. **154**: p. 3932-3940.
108. Maeurer, M.J., *et al.*, *Human intestinal $V\delta 1^+$ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin.* J. Exp. Med., 1996. **183**: p. 1681-1696.
109. Hara, T., *et al.*, *Predominant activation and expansion of $V\gamma 9$ -bearing $\gamma\delta$ T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection.* J. Clin. Invest, 1992. **0**: p. 204-210.

110. Sumida, T., *et al.*, *Predominant expansion of V γ 9/V δ 2 T cells in a tularemia patient.* Infect. Immun, 1992. **60**: p. 2554-2558.
111. Berdotto, A., *et al.*, *Lymphocytes bearing the $\gamma\delta$ T cell receptor in acute Brucella melitensis infection.* Eur. J. Immunol., 1993. **23**: p. 1177-1180.
112. Balbi, B., *et al.*, *T-lymphocytes with $\gamma\delta^+$ V δ 2⁺ antigen receptors are present in increased proportions in a fraction of patients with tuberculosis or with sarcoidosis.* Am. Rev. Respir. Dis., 1993. **148**: p. 1685-1690.
113. Raziuddin, S., *et al.*, *$\gamma\delta$ T cells and the immune response in visceral leishmaniasis.* Eur. J. Immunol., 1992. **22**: p. 1143-1148.
114. Ho, M., *et al.*, *Increased $\gamma\delta$ T cells in acute Plasmodium falciparum malaria.* Immunol. Lett., 1990. **25**: p. 139-142.
115. Perera, M.K., *et al.*, *Transient increase in circulating $\gamma\delta$ T cells during Plasmodium vivax malarial paroxysms.* J. Exp. Med., 1994. **179**: p. 311-315.
116. Scalise, F., *et al.*, *Lymphocytes bearing the $\gamma\delta$ T-cell receptor in acute toxoplasmosis.* Immunol, 1992. **76**: p. 668-670.
117. Modlin, R.L., *et al.*, *Lymphocytes bearing antigen-specific $\gamma\delta$ T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions.* Nature, 1989. **339**: p. 544-548.
118. Tsukaguchi, K., K.N. Balaji, and W.H. Boom, *CD4⁺ $\alpha\beta$ cell and $\gamma\delta$ cell responses to Mycobacterium tuberculosis: Similarities and differences in Ag recognition cytotoxic effector function and cytokine production.* J. Immunol., 1995. **154**: p. 1786-1796.

119. Boom, W.H., *$\gamma\delta$ T cells and Mycobacterium tuberculosis*. Microbes and Infection, 1999. **1**: p. 187-195.
120. Havlir, D.V., *et al.*, *Selective expansion of human $\gamma\delta$ T cells by monocytes infected with live Mycobacterium tuberculosis*. J. Clin. Invest., 1991. **87**: p. 729-733.
121. Tsuji, M., *et al.*, *$\gamma\delta$ T cells contribute to immunity against the liver stages of malaria in α T-cell-deficient mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**: p. 345-349.
122. Mombaerts, P., *et al.*, *Different roles of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells in immunity against intracellular bacterial pathogen*. Nature, 1993. **365**: p. 53-56.
123. Ladel, C.H., *et al.*, *Protective role of $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ T cells in tuberculosis*. Eur. J. Immunol., 1995. **25**: p. 2877-2881.
124. Li, B., *et al.*, *Disease-specific changes in $\gamma\delta$ T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis*. J. Immunol., 1996. **157**: p. 4222-4229.
125. Li, B., *et al.*, *Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human $\gamma\delta$ T cells: a mechanism for the loss of $\gamma\delta$ T cells in patients with pulmonary tuberculosis*. J. Immunol, 1998. **161**: p. 1558-1567.
126. Hara, T., *et al.*, *Human $V\delta 2^+$ $\gamma\delta$ T-cell tolerance to foreign antigens of Toxoplasma gondii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996. **93**: p. 5136-5140.
127. Sciammas, R. and J.A. Bluestone, *TCR $\gamma\delta$ cells and viruses*. Microbes and Infection, 1999. **1**: p. 203-212.
128. Johnson, R.M., *et al.*, *A murine CD4-, CD8- T cell receptor $\gamma\delta$ T lymphocyte clone*

- specific for herpes simplex virus glycoprotein I*. J. Immunol, 1992. **148**: p. 983-988.
129. Sciammas, R., *et al.*, *T cell receptor-gamma/delta cells protect mice from herpes simplex virus type 1-induced lethal encephalitis*. J. Exp. Med., 1997. **185**: p. 5392-5397.
130. Sciammas, R., *et al.*, *Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR- $\gamma\delta$ cell*. J. Immunol., 1994. **152**: p. 5392-5397.
131. Eichelberger, M., *et al.*, *Functional analysis of the TCR alpha-beta⁺ cells that accumulate in the pneumonic lung of influenza virus-infected TCR-alpha⁻/-mice*. J. Immunol., 1995. **154**: p. 1569-1576.
132. Allan, W., *et al.*, *HSP65 mRNA⁺ macrophages and gamma delta T cells in influenza virus-infected mice depleted of the CD4⁺ and CD8⁺ lymphocyte subsets*. Microb. Pathog., 1993. **14**: p. 75-84.
133. Carding, S.R., *et al.*, *Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta⁺ T cells*. J. Exp. Med., 1990. **172**: p. 1225-1231.
134. Eichelberger, M., *et al.*, *Activation status of the CD4⁻ CD8⁻ $\gamma\delta$ T cells recovered from mice with influenza pneumonia*. J. Immunol., 1991. **147**: p. 2069-2074.
135. Carding, S.R., *et al.*, *Activation of cytokine genes in T cells during primary and secondary murine influenza pneumonia*. J. Exp. Med., 1993. **177**: p. 475-482.
136. Huber, S.A., A. Morasaka, and M. Choate, *T cells expressing the gamma delta T-cell receptor potentiate coxsackievirus B3-induced myocarditis*. J. Virol., 1992. **66**: p. 6541-6546.

137. Déchanet, J., *et al.*, *Human $\gamma\delta$ T cells and viruses*. *Microbes and Infection*, 1999. **1**: p. 213-217.
138. De Paoli, P., *et al.*, *Gamma delta T cell receptor-bearing lymphocytes during Epstein-Barr virus infection*. *J. Inf. Dis.*, 1990. **161**: p. 1013-1016.
139. Wallace, M., M. Malkovsky, and S.R. Carding, *Gamma/delta T lymphocytes in viral infections*. *J. Leukoc. Biol.*, 1995. **58**: p. 277-283.
140. Autran, B., *et al.*, *T cell receptor gamma delta lymphocytes subsets during HIV infection*. *Clin. Exp. Immunol.*, 1989. **75**: p. 206-210.
141. Maccario, R., *et al.*, *HLA-unrestricted killing of HSV-1-infected mononuclear cells*. *The Journal of Immunology*, 1993. **150**: p. 1437-1445.
142. Bukowski, J.F., C.T. Morita, and M.B. Brenner, *Recognition and destruction of virus-infected cells by human $\gamma\delta$ CTL*. *The Journal of Immunology*, 1994. **153**: p. 5133-5140.
143. Wallace, M., *et al.*, *$\gamma\delta$ T lymphocyte responses to human immunodeficiency virus*. *Clin. Exp. Immunol.*, 1996. **103**: p. 177-184.
144. Poccia, F., *et al.*, *Peripheral $V\gamma 9/V\delta 2$ T cell deletion and anergy to nonpeptidic mycobacterial antigens in asymptomatic HIV-1-infected persons*. *J. Immunol*, 1996. **157**: p. 449-461.
145. Halary, F., *et al.*, *Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing $\gamma\delta$ T cell receptors by natural killer inhibitory receptors*. *Eur. J. Immunol.*, 1997. **27**: p. 2812-2821.

146. Poccia, F., *et al.*, *Possible protective and pathogenic roles of $\gamma\delta$ T lymphocytes in HIV-infections (review)*. *Int. J. Mol. Med*, 1998. **1**: p. 49-413.
147. Cabanas, C. and F. Sánchez-Madrid, *CD11c (Leukocyte integrin CR4 α subunit)*. *Journal of biological regulators & homeostatic agents*, 1999. **13**: p. 134-36.
148. Rothenfusser, S., *et al.*, *Distinct CpG oligonucleotide sequences activate human $\gamma\delta$ T cells via interferon- α / β* . *Eur. J. Immunol.*, 2001. **31**: p. 3525-3534.
149. Okragly, A.J., M. Hanby-Flarida, and C.L. Baldwin, *Monocytes control $\gamma\delta$ T-cell responses by a secreted product*. *Immunology*, 1995. **86**: p. 599-605.
150. Marx, S., D. Wesch, and D. Kabelitz, *Activation of human $\gamma\delta$ T cells by Mycobacterium tuberculosis and Daudi lymphoma cells. Differential regulatory effect of IL-10 and IL-12*. *J. Immunol.*, 1997. **158**: p. 2842-2848.
151. Petricoin, E.F.I., *et al.*, *Antiproliferative action of interferon- α requires components of T-cell-receptor signaling*. *Nature*, 1997. **390**: p. 629-632.
152. Lanier, L.L., *NK cell recognition*. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005. **23**: p. 225-74.
153. Testi, R., *et al.*, *The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells*. *Immunology Today*, 1994. **15**(10): p. 479-483.
154. Mardiney III, M., M.R. Brown, and T.A. Fleisher, *Measurement of T-cell CD69 Expression: A rapid and efficient means to assess mitogen- or antigen-induced proliferative capacity in normals*. *Cytometry*, 1996. **26**: p. 305-310.
155. Moretta, A., *et al.*, *CD69-mediated pathway of lymphocyte activation: anti-CD69 monoclonal antibodies trigger the cytolytic activity of different lymphoid effector*

- cells with the exception of cytolytic T lymphocytes expressing T cell receptor α/β .* J. Exp. Med., 1991. **174**: p. 1393-1398.
156. Hellstrand, K., *et al.*, *Histaminergic regulation of NK cells.* J. Immunol., 1994. **153**: p. 4940-4947.
157. Oshiumi, H., *et al.*, *TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction.* Nature Immunology, 2003. **4**: p. 161.
158. Garfinkel, S., *et al.*, *Interleukin-1 α mediates an alternative pathway for the antiproliferative action of poly(I:C) on human endothelial cells.* The Journal of Biological Chemistry, 1992. **267**: p. 24375-24378.
159. Sperling, A.I., *et al.*, *CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor- $\gamma\delta^+$ T lymphocytes.* J. Immunol., 1993. **151**(11): p. 6043-6050.
160. Verdijk, R.M., *et al.*, *Polyriboinosinic Polyribocytidylic Acid (Poly(I:C)) Induces stable maturation of functionally active human dendritic cells.* The Journal of Immunology, 1999. **163**: p. 57-61.
161. Groh, V., *et al.*, *Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.* Nature Immunology, 2001. **2**: p. 255-260.
162. Münz, C., R.M. Steinman, and S.-i. Fujii, *Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity.* The Journal of Experimental Medicine, 2005. **202**: p. 203-7.
163. Conti, L., *et al.*, *Reciprocal activating interaction between DCs and pamidronate-stimulated $\gamma\delta$ T cells: Role of CD86 and inflammatory cytokines.* The Journal of

- Immunology, 2005. **174**: p. 252-60.
164. Welsh, R.M., *et al.*, $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T-cell networks and their roles in natural resistance to viral infections. *Immunological Reviews*, 1997. **159**: p. 79-93.
165. Biron, C.A., *et al.*, Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999. **17**: p. 189-220.
166. Korngold, R., K.J. Blank, and D.M. Murasko, Effect of interferon on thoracic duct lymphocyte output: induction with either poly I: poly C or vaccinia virus. *J. Immunol.*, 1983. **130**: p. 2236-2240.
167. Yang, J., M.K. Hagan, and M.K. Offermann, Induction of IL-6 gene expression in Kaposi's sarcoma cells. *J. Immunol.*, 1994. **152**: p. 943-955.
168. Flamand, L., I. Stefanescu, and J. Menezes, Human herpesvirus-6 enhances natural killer cell cytotoxicity via IL-15. *J. Clin. Invest.*, 1996. **97**: p. 1373-1378.
169. Atedzoe, B.N., A. Ahmad, and J. Menezes, Enhancement of natural killer cell cytotoxicity by the human herpesvirus-7 via IL-15 induction. *J. Immunol.*, 1997. **159**: p. 4966-4972.
170. Carson, W.E., *et al.*, Endogenous production of interleukin 15 by activated human monocytes is critical for optimal production of interferon- γ by natural killer cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, 1995. **96**: p. 2578-2582.
171. Warren, H.S., *et al.*, Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *J. Immunol.*, 1996. **156**: p. 3254-3259.

172. Williams, N.S., *et al.*, *Natural killer cell differentiation: insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems*. Immunol. Rev., 1998. **165**: p. 47-61 (Review).
173. Elloso, M.M., *et al.*, *The effects of IL-15 on human gd T cell responses to Plasmodium falsiparum in vitro*. Immunol. Letters, 1998. **64**: p. 125-132.
174. Lanier, L.L., *et al.*, *Interleukin 2 activation of natural killer cells rapidly induces the expression and phosphorylation of the Leu23 activation antigen*. J. Exp. Med., 1988. **167**: p. 1572.
175. Oehler, J.R. and R.B. Herberman, *Natural cell-mediated cytotoxicity in rats. III. Effects of immunopharmacologic treatments on natural reactivity and on reactivity augmented by polyinosinic-polycytidylic acid*. Int. J. Cancer, 1978. **21**(2): p. 221-229.
176. Burleson, G.R., *et al.*, *Poly(I):poly(C)-enhanced alveolar and peritoneal macrophage phagocytosis: quantification by a new method utilizing fluorescent beads*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1987. **184**(4): p. 468-476.
177. Bürk, M.R., *et al.*, *Functional inactivation in the whole population of human V γ 9/V δ 2 T lymphocytes induced by a nonpeptidic antagonist*. J. Exp. Med., 1997. **185**(1): p. 91-97.
178. Follows, G.A., *et al.*, *Gamma interferon and interleukin 2 but not interleukin 4 are detectable in $\gamma\delta$ -cell cultures after activation with bacteria*. Infect. Immun., 1992. **60**: p. 1229-1231.
179. Goodier, M.R., *et al.*, *Cytokine profiles for human V γ 9⁺ T cells stimulated by Plasmodium falciparum*. Parasite Immunol., 1995. **17**: p. 413-423.

180. Subauste, C.S., *et al.*, *Preferential activation and expansion of human peripheral blood $\gamma\delta$ cells in response to *Toxoplasma gondii* in vitro and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells.* J. Clin. Invest., 1995. **96**: p. 610-619.
181. García, V.E., *et al.*, *Single-cell cytokine analysis of $\gamma\delta$ T cell responses to nonpeptide mycobacterial antigens.* J. Immunol., 1997. **159**: p. 1328-1335.
182. Boehm, U., *et al.*, *Cellular responses to interferon- γ .* Annu. Rev. Immunol., 1997. **15**: p. 749-95.

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med. Martin Wilhelm danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, seiner betreuenden Unterstützung, Ermutigung und Geduld während des gesamten Projekts sowie Herrn Professor Dr. med. Klaus Wilms für die Möglichkeit, die Dissertation an der Medizinischen Poliklinik durchführen zu können.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Volker Kunzmann und Frau Dr. rer. nat. Juliane Feurle danke ich besonders für die hervorragende Zusammenarbeit und Kollegialität, die mich sehr motiviert haben. Ebenso waren mir ihre Diskussionsbereitschaft und kompetenten Anmerkungen stets eine große Hilfe.

Mein Dank gilt auch dem technischen Personal des Immunologischen Labors sowie Frau Dr. med. Tanja Wässa für die freundliche Einweisung in die verschiedenen verwandten Methodiken; insbesondere erwähnen möchte ich Frau Rosemarie Ottohal für ihre unermüdliche Hilfe und freundschaftliche Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Volker Kunzmann und Professor Dr. rer. nat. Thomas Herrmann für die Erstellung der Referate.

Die Ergebnisse dieser Schrift wurden an der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg im Rahmen des dritten Graduiertenkollegs „Infektiologie“ erarbeitet. Dies war nur durch die kontinuierliche Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft möglich, wofür ich sehr zum Dank verpflichtet bin. Ich möchte mich auch bei Herrn Professor Hacker als Leiter des Graduiertenkollegs sowie den beteiligten Hochschullehrern und Mit-Stipendiaten für die vermittelten Grundlagen der Infektiologie und Immunologie sowie rege Diskussionen bedanken.

Mein Ehemann und meine Familie haben mich durch ihre Ermutigung und Verständnis entscheidend unterstützt.

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name, Vorname: Kretzschmar, Eva
Geburtsname: Kraft
Früherer Name: Bauer
Geburtsdatum und -ort: 13.10.1970 in Bozen / Italien

Schulbildung:

10/1976–06/1978 Volksschule Leifers, Provinz Bozen/Italien
09/1978–07/1980 Grundschule Essen-Gerschede
09/1980–12/1980 Mädchengymnasium Essen-Borbeck
01/1981–06/1989 Franz-Miltenberger-Gymnasium, Bad Brückenau;
Abschluss: Abitur

Berufsausbildung:

11/1989–10/1995 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität
in Würzburg
08/1991 Ärztliche Vorprüfung
08/1992 1. Staatsexamen
08/1994 2. Staatsexamen
08/1995 3. Staatsexamen

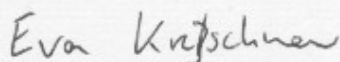
05/1996–01/1997 ÄiP im Institut für Laboratoriums- und Transfusions-
medizin, Herz- und Diabeteszentrum NRW; 32545 Bad
Oeynhaus en

02/1997–01/2000 Promotion als Stipendiatin des Graduiertenkollegs
“Infektiologie” der Universität Würzburg in der
Medizinischen Klinik und Poliklinik II

03/2001–12/2001 ÄiP an der Universitäts-Kinderklinik, 55131 Mainz
12/2001–09/2002 Weiterbildungsassistentin an der Universitäts-
Kinderklinik Mainz

Seit 04/2004 Elternzeit

Bad Brückenau, 30.06.2006



Eva Kretzschmar