

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Immunologie
Vorstand: Professor Dr. T. Hünig

Analyse der Expression und möglicher signalinduzierender Eigenschaften des CD1d-Moleküls der Ratte

Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Holger Clemen
aus Böblingen

Würzburg, August 2010

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

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christoph Otto

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2011

Der Promovend ist Arzt

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG.....	1
2. MATERIAL UND METHODEN.....	34
2.1 Material	34
2.1.1 Versuchstiere.....	34
2.1.2 Zellen.....	34
2.1.3 Vektoren	34
2.1.4 Serologische Reagenzien.....	35
2.1.5 Chemikalien.....	36
2.1.6 Standardlösungen, Puffer und Medien	36
2.1.7 Gerätschaften	38
2.2 Zellbiologische Methoden	39
2.2.1 Kultivierung von Zellen	39
2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	39
2.2.3 Isolierung primärer Zellen.....	39
2.2.4 Immunfluoreszenzanalyse im Durchflusszytometer (FACS).....	40
2.2.5 Anreicherung von Zellpopulationen durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACSort).....	41
2.2.6 Inkubation und Untersuchung von Zelltod und Aggregatbildung	41
2.3 Molekularbiologische Methoden	42
2.3.1 Transduktion von Genen in eukaryotische Zellen durch virale Vektoren .	42
3. ERGEBNISSE	44
3.1 CD1d-Expression	44
3.1.1 Färbungen des LEW-Thymus	44
3.1.1.1 CD1d-Expression des LEW-Thymus in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression	45
3.1.1.2 CD1d-Expression DN Thymozyten der LEW-Ratte	49
3.1.2 Färbungen des BALB/c-Thymus	52

3.1.2.1 CD1d-Expression des BALB/c-Thymus in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression	52
3.1.2.2 CD1d-Expression DN Thymozyten der BALB/c-Maus	53
3.1.3 Färbungen der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz	53
3.1.3.1 CD1d-Expression der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression	54
3.1.3.2 CD4 ^{schwach+} /CD8 ⁻ /TCR ⁻ /OX42 ⁺ Zellen der LEW-/F344-Milz exprimieren CD1d verstärkt	59
3.1.3.3 Klassische CD4 ⁺ DC sind die Zellen der LEW-Milz mit der höchsten CD1d-Expression.....	64
3.1.3.4 Marginalzonen-B-Zellen bilden den Großteil der CD1d stark positiven Zellen der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz	68
3.1.4 Färbungen der LEW-Lymphknoten.....	73
3.1.4.1 CD1d-Expression der LEW-LK in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression	73
3.1.4.2 Darstellung von Makrophagen und DC der LEW-LK	75
3.1.4.3 Darstellung von B-Zellen der LEW-LK mit starker CD1d-Expression	77
3.1.5 Vergleich der CD1d-Expression von LEW-/F344-Ratte und BALB/c-Maus	78
3.2 Effekte von Anti-CD1d-Antikörpern auf rCD1d⁺ Transduktanten	81
3.2.1 Effekte von Anti-CD1d-Antikörpern auf rCD1d ⁺ Raji-Zellen	81
3.2.1.1 Die Anti-CD1d-Antikörper zeigen Unterschiede in der Induktion von Aggregatbildung und Reduktion der Zellzahl	81
3.2.1.2 Bestätigung der Effekte durch Zellzählung	82
3.2.1.3 Quantifizierung toter Zellen mittels Propidiumiodid und FACS- Analyse.....	83
3.2.1.4 Titration von 58/4 und der Einfluss vermehrter Zellkontakte	86
3.2.1.5 58/4 zeigt bei 37°C innerhalb weniger Minuten und bei 4°C nach wenigen Stunden erste Effekte	87
3.2.1.6 Die 58/4-induzierten Effekte ähneln denen von Anti-MHCII- Antikörpern	89
3.2.1.7 Die Wirkung von 58/4 auf rCD1d ⁺ Raji-Zellen ist CD1d-spezifisch und unabhängig von HLA-DR-Molekülen	90

3.2.1.8 Veränderung der CD1d-/HLA-DR-Expression von Raji-Zellen durch Bindung verschiedener Antikörper.....	91
3.2.1.9 Beeinflussung der Anfälligkeit für den 58/4- bzw. HB55- vermittelten Zelltod durch antiapoptotische Moleküle oder GFP...94	
3.2.2 58/4 induziert auch Effekte in malignen Maus-B-Zellen, jedoch nicht in malignen T-Zellen.....	96
4. DISKUSSION	99
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	112
6. LITERATURVERZEICHNIS	103

1. EINLEITUNG

Das Immunsystem

Das Immunsystem schützt den Menschen beziehungsweise die Säugetiere vor Schädigung durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten. Die Abwehrfunktion wird von Leukozyten und akzessorischen Zellen übernommen, die im ganzen Körper verteilt vorkommen, sich aber insbesondere in den lymphatischen Organen, einschließlich Knochenmark, Thymus, Milz, Lymphknoten und des Mukosa-assoziierten Lymphsystems finden. Die Zellen des Immunsystems zirkulieren zwischen diesen Geweben über den Blutstrom und das lymphatische System. Währenddessen reagieren sie miteinander, so dass eine koordinierte Immunantwort entsteht, die das Eindringen von Krankheitserregern in den Körper verhindert, deren Stoffwechselprodukte eliminiert oder zumindest den durch eine Infektion entstehenden Schaden begrenzt. Zusätzlich werden auch transformierte Körperzellen, das heißt gealterte, infizierte oder neoplastisch veränderte Zellen erkannt und entfernt. Neben der kontrollierten Immunantwort gegen körperfremde Stoffe (= Immunität) wird die Gesundheit des Organismus auch durch die Fähigkeit des Körpers gewährleistet, eine Immunantwort gegen körpereigene Stoffe zu hemmen (= Toleranz, Anergie). Wo immer das Gleichgewicht zwischen Immunität und Toleranz gestört wird, entsteht Krankheit.

Die Immunität ist zum Teil antigen-unspezifisch (angeborene oder natürliche Immunantwort) und zu einem anderen Teil antigen-spezifisch (erworbene oder adaptive Immunantwort). Beide Systeme ergänzen sich und arbeiten sowohl mit humoralen als auch mit zellulären Komponenten. Diese wirken innerhalb eines Systems sowie jeweils mit Elementen des anderen Systems zusammen, so dass ein komplexes Netz aus Interaktionen mit konsekutiver Regulierung der Immunantwort entsteht.

Die unspezifische Immunität ist die „erste Linie“ der Abwehr, da sie zur schnellen, direkten Immunantwort ohne Vorprozessierung des Antigens befähigt ist. Aufgrund einer Infektion, physikalischer oder chemischer Noxen und der daraus folgenden Gewebeschädigung wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst. Ziel des Organismus ist es, den Auslöser mit Hilfe pro-inflammatorischer Mediatoren zu beseitigen und durch Freisetzung anti-inflammatorischer Reaktionen, die Ausbreitung der

Immunreaktion zu verhindern. Wegen der mangelnden Spezifität und besonders bei unbalancierter Freisetzung von an sich wirtsprotektiver Zytokine kann es im Rahmen der unspezifischen Abwehr leicht zu einer zusätzlichen Schädigung des Wirtsorganismus kommen.

Die natürliche Immunantwort besteht aus den zellulären Komponenten Phagozyten, Granulozyten und NK-Zellen in Zusammenarbeit mit humoralen Elementen wie den pro-inflammatorischen Zytokinen Interleukin-1 (IL-1), IL-6 oder Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) sowie den Akute Phase-Proteinen, Interferon- α (INF- α) oder Bestandteilen des Komplementsystems. Im Gegensatz zur spezifischen Immunität können nicht-lösliche Antigene und damit ganze Fremdorganismen erkannt und eliminiert werden, jedoch entwickelt die unspezifische Immunität kein erregerspezifisches „Gedächtnis“, so dass die Leistung bei wiederholtem Antigenkontakt nicht verbessert wird. Das natürliche Immunsystem erkennt unter anderem durch TLR (toll-like receptors) eine bestimmte Auswahl an mikrobiellen Molekülen. TLR finden sich besonders auf der Oberfläche von mononukleären Phagozyten. Die Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien oder von Peptidoglykan grampositiver Bakterien führt zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Steigerung der Zytotoxizität oder Antigenpräsentation.

Die Kennzeichen der adaptiven Immunantwort sind dagegen Spezifität und immunologisches Gedächtnis, die durch T- und B-Zellen und ihren Produkten wie z. B. die Zytokine IL-2, -4, -5, -10, INF- γ bzw. im Fall der B-Zellen die sezernierten Immunglobuline der Klassen IgM, IgG, IgA, IgE vermittelt werden. Das spezifische Immunsystem kann mit Hilfe verschiedener Subpopulationen durch Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine (z. B. IL-4, -10) eine Entzündungsreaktion limitieren oder durch Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren (z. B. INF- γ) die natürliche Immunantwort stimulieren.

Die Voraussetzungen für eine spezifische Antigenerkennung sind die Zerlegung (= Prozessierung) der Proteinantigene in lösliche Peptide durch Zellen des unspezifischen Systems, die Antigenpräsentation und zelluläre Interaktionen. Daran sind neben Makrophagen besonders Dendritische Zellen (DC) beteiligt, die ein entscheidendes Bindeglied zwischen beiden Systemen bilden.

Der spezifische Antigenkontakt induziert eine Produktion von Antikörpern (Immunglobuline), die das Antigen, welches ihre Entstehung ausgelöst hatte, mit der spezifischen Antigenbindungsregion der variablen Anteile des F_{ab}-Fragments binden.

Sie bilden die humorale Komponente des adaptiven Immunsystems. Die Bindung eines löslichen Antigen-Antikörper-Komplexes über den konstanten Anteil (F_c -Fragment) durch die F_c -Rezeptoren von Effektorzellen induziert die Phagozytose und den Abbau des Komplexes [1].

Identifizierung von Immunzellen

Die zellulären Komponenten des Immunsystems (Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, NK-Zellen, DC, Mastzellen und Thrombozyten) können anhand ihrer Oberflächenantigene durch spezifische Antikörper identifiziert werden. Neben dem jeweiligen Antigenrezeptor von B- und T-Zellen gibt es auch noch einige andere Marker, die spezifisch für bestimmte Zellpopulationen oder bestimmte Phasen der zellulären Entwicklung sind. Die meisten Marker werden nach dem CD-System (CD = cluster of differentiation) charakterisiert. Viele der CD-Marker sind allerdings in unterschiedlicher Dichte auf verschiedenen Zelltypen nachweisbar, so dass jede Untergruppe ein typisches Gesamtprofil an Oberflächenmarkern aufweist. Besonders wichtig sind somit die Antigene, anhand derer die T-Zellen (CD2, CD3), die Hauptuntergruppen der T-Zellen (CD4, CD8), die aktivierten T-Zellen (CD25), die B-Zellen (CD19, CD20) und die mononukleären Phagozyten (CD64, CD68) unterschieden werden können. Gefragt sind also diejenigen Marker, die alleine oder in kleiner Kombination die Identifizierung der einzelnen Untergruppen ermöglichen.

CD45 (LCA = leukocyte common antigen) ist eine Phosphatase, die von Leukozyten in verschiedenen Isoformen exprimiert wird, um die Signaltransduktion der Zelldifferenzierung und Zellaktivierung zu vermitteln. In der Ratte werden CD45 und damit die meisten B-, T- und NK-Zellen, bestimmte DC, Makrophagen und Granulozyten durch den monoklonalen Antikörper OX1 markiert. CD45R ist ein restringiertes LCA, das nur von bestimmten T-Zellen, aber von den meisten B-Zellen exprimiert wird, so dass HIS24 in der Ratte und B220 in der Maus als Pan-B-Zell-Marker verwendet wird. Von CD45R gibt es wiederum verschiedene Isoformen, die in der Ratte in Abhängigkeit der Expression des Exons A (CD45RA) durch OX33 und des Exons C (CD45RC) durch OX22 markiert werden. CD45RA wird von den meisten B-Zellen und CD45RC von den meisten B-Zellen sowie bestimmten T-Zellen exprimiert [1].

NK-Zellen

NK(natürliche Killer)-Zellen besitzen keine T- oder B-Zell-Rezeptoren und bilden eine erste Abwehrfront der natürlichen Immunantwort gegen virusinfizierte oder transformierte Zellen. Durch Bindung von Zellen, die eine reduzierte/fehlende oder allogene MHC I-Expression aufweisen, entsteht ein Übergewicht aktivierender Signale, wodurch zytotoxische Mechanismen ausgelöst werden. Diese ähneln denen der zytotoxischen T-Zellen. So kann durch Freisetzung von in den zytotoxischen Granula gespeicherten Perforin und Granzymen oder durch Bindung von FasL an Fas Apoptose in der Zielzelle ausgelöst werden. Außerdem sind NK-Zellen wichtige Produzenten des pro-inflammatorischen Zytokins INF- γ .

Dendritische Zellen

Im Menschen wurden zwei DC-Untergruppen identifiziert, die aus Vorläuferzellen des Knochenmarks (myeloide DC = mDC) oder aus lymphatischen Zellen (lymphoide bzw. plasmazytoide DC = pDC) entstehen und die sich in ihrer Morphologie und ihrem Expressionsmuster sowie Migrationsverhalten unterscheiden. mDC weisen die typische dendritische Morphologie mit Zellfortsätzen auf und erreichen nach Antigenaufnahme regionale Lymphknoten über die Lymphe, während pDC über den Blutstrom und „high endothelial venules“ (HEV) zu diesem Ziel gelangen und morphologisch Plasmazellen ähneln.

Unreife mDC nehmen in peripheren Geweben, z. B. der Haut, Antigene auf und folgen inflammatorischen Signalen in lymphatischen Organen (LK, Milz), in denen sie durch Antigenpräsentation die spezifische Immunantwort stimulieren. Hierfür ist eine Reifung erforderlich, die bei mDC durch TNF- α , TLR-Agonisten und CD40L erfolgt. Sie kann entweder durch mikrobielle Produkte und Interaktion mit Fremdartigen-spezifischen T-Zellen oder durch Interaktion mit Selbstantigen-spezifischen T-Zellen sowie durch deren Zusammenspiel beeinflusst werden.

Die DC-Reifung besteht aus einer steigenden Expression kostimulatorischer und antigenpräsentierender Moleküle sowie der abnehmenden Kapazität, weitere Antigene aufzunehmen. Nach Aktivierung interagierender Zellen (T-Zellen, DC) erfolgt die Auslösung vermutlich des MHC II-vermittelten Zelltods der DC zur Regulierung der Immunantwort.

Bis zur Entdeckung verschiedener Marker (CD11b, CD11c, CD103), die mehr oder weniger spezifisch für bestimmte DC-Subpopulationen sind, wurden DC anhand ihrer Morphologie und der starken MHC II-Expression identifiziert.

Antigenerkennung

Lymphozyten sind Schlüsselzellen der adaptiven Immunantwort und erkennen körperfremde (allogene) Strukturen spezifisch über Antigenrezeptoren auf der Zelloberfläche. Normalerweise reagieren sie nicht auf körpereigenes Material. Die Rezeptoren der verschiedenen Lymphozytenklone unterscheiden sich jeweils voneinander, so dass dem Körper mit der gesamten Lymphozytenpopulation ein sehr breites Spektrum an Antigenrezeptoren unterschiedlichster Spezifität zur Verfügung steht, um die enorme Vielfalt der Fremdartigen zu registrieren. Jeder Lymphozyt trägt dabei nur einen bestimmten Antigenrezeptortyp, weshalb er nur eine sehr begrenzte Anzahl von Antigenen erkennen kann. Nach Kontakt mit ihrem Antigen entwickeln sich die durch klonale Selektion bzw. Expansion entstandenen Lymphozytenklone - also identische Zellen - zu spezifischen Effektorzellen.

Die zwei Hauptgruppen von Lymphozyten werden durch B- und T-Zellen gebildet.

Der T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) besteht aus einem heterodimeren Glykoprotein, das bei der überwiegenden Mehrzahl der T-Zellen aus einer α - und einer β -Polypeptidkette und bei einer bestimmten Subpopulation aus einer γ - und einer δ -Kette gebildet wird. $\gamma\delta$ -T-Zellen machen in Menschen und Nagern weniger als 5% der T-Zellen aus. Über ihre Antigen-spezifität ist noch nicht viel bekannt. Bestimmte Populationen dieser T-Zellen erkennen Antigene in Assoziation mit CD1-Molekülen.

$\alpha\beta$ -TCR und $\gamma\delta$ -TCR sind mit mehreren invarianten Polypeptidketten assoziiert, die in ihrer Gesamtheit als CD3-Komplex bezeichnet werden. Dieser CD3-Komplex spielt eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der Signaltransduktion und beim Transport des TCR an die Zelloberfläche.

Aufgrund ihrer Spezifität und ihrer Diversität unterscheiden sich die Rezeptoren der adaptiven Immunität grundlegend von den Rezeptoren der natürlichen Immunität, die wie im Falle von TLR jeweils nur ein schmales Spektrum konservierter Moleküle einer bestimmten Gruppe von Pathogenen erkennen. Der geringe Anteil der Lymphozyten (z. B. B1-B-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen oder Typ I-NKT-Zellen), die zur

natürlichen Immunantwort beitragen, verfügt über semi-invariante B- oder T-Zell-Rezeptoren.

Die Vielfalt der TCR und der B-Zell-Antigenrezeptoren (BCR) bzw. Immunglobuline (Ig) kommt durch genetische Rekombination, also aufgrund beliebiger Kombination von V(D)J-(variable-, diversity-, joining-)Segmenten, zustande. Die entstandene Diversität der variablen V-Region wird zudem durch die große Anzahl der V-Gene und der beliebigen Kombination der Polypeptidketten erreicht.

TCR-Gene werden nach einer etablierten Nomenklatur mit den Buchstaben des Segments und der Kette sowie gemäß der Nummerierung der Segmentfamilie, die Segmente aufgrund von Ähnlichkeiten zusammenfasst, bezeichnet [2], [3].

Die Entwicklung der Rezeptoren findet während der Reifung von T- bzw. B-Zellen unabhängig von der Anwesenheit eines Antigenes im Thymus bzw. Knochenmark statt. Die Spezifität der Ig wird zusätzlich in Keimzentren der durch Antigenstimulation entwickelten Sekundärfollikel der Lymphknoten modifiziert. Aus einem Zellklon mit einer einheitlichen Spezifität entstehen durch rasche Proliferation mit somatischen Mutationen in den Ig-Genen Zellpopulationen mit einem verbreiteten Spektrum an Antigenrezeptoren. Durch Interaktion mit follikulären DC werden die B-Zellen mit hochaffinen Antigenrezeptoren selektiert, wohingegen die B-Zellen mit niederaffinen Rezeptoren absterben.

Antigene werden als immunogen bezeichnet, wenn sie eine starke Immunantwort hervorrufen. Da hierfür häufig nur ein kleiner Teil (Epitop) eines Makromoleküls ausreicht und somit auf einem Protein eine größere Zahl derartiger Epitope vorhanden ist, können mehrere spezifische Interaktionen und Effekte, unter anderem die Aktivierung unterschiedlicher B-Zellen und die Entstehung verschiedener Plasmazellklone, durch ein einzelnes Protein ausgelöst werden. Die dabei gebildeten Antikörper werden in ihrer Gesamtheit auch als polyklonale Antikörper bezeichnet. Monoklonale Antikörper (mAk) erkennen jeweils nur ein Epitop eines Antigenes. Sie werden für experimentelle und diagnostische Zwecke hergestellt, um eine einheitliche, nur von einem B-Zellklon produzierte Antikörperspezies zur Verfügung zu haben. B-Zellen erkennen mit Hilfe ihres Immunglobulin-Rezeptors intaktes Antigen oder große Fragmente mit der ursprünglichen räumlichen Struktur, während T-Zellen nur Peptidfragmente erkennen. T-Zell-abhängige Antigene (TD-Antigene) müssen sowohl von B- als auch von T-Zellen erkannt werden. Die meisten Proteinantigene gehören zu dieser Kategorie. Immunantworten auf TD-Antigene

zeigen einen Wechsel der Immunglobulin-Klasse (Ig-Klassen-Switch) mit gleicher Antigen-spezifität aber steigender Antikörper-Affinität im Verlauf und eventuell spezieller Funktion. Dagegen können T-Zell-unabhängige Antigene (TI-Antigene) B-Zellen ohne T-Zell-Hilfe zur Produktion von Antikörpern stimulieren. Hierzu gehören vor allem große Polymere mit repetitiven Epitopen wie z. B. Zellwandpolysaccharide, die Ig auf der Oberfläche

der B-Zellen vernetzen (crosslinken) können. Wenn Antikörper nicht nur mit dem Antigen reagieren, das ihre Produktion induziert hat, sondern auch mit verwandten Antigenen, wird von Kreuzreaktivität gesprochen. Die Ursache beruht entweder auf gemeinsamen Epitopen der beiden Antigene oder auf ähnlichen molekularen Strukturen der kreuzreagierenden Antigene.

$\alpha\beta$ -T- Zellen und B-Zellen

Die verschiedenen Subpopulationen von T- und B-Zellen unterscheiden sich in ihrem Phänotyp und in ihrer Funktion. Beide Lymphozytengruppen leiten sich aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab.

B-Zellen entwickeln sich primär in der fötalen Leber und später im Knochenmark. Reife B-Zellen, die besonders in Follikeln der Lymphknoten und der Milz vorkommen, exprimieren auf ihrer Oberfläche monomere Ig (IgM oder IgD), die den spezifischen Antigenrezeptor darstellen und worüber die entsprechenden Antigene gebunden und aufgenommen werden können. Bei Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen durch direkte Erkennung oder durch Antigenpräsentation und der Interaktion mit T-Zellen teilen sie sich und differenzieren zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen.

Beim Erwachsenen bilden B2-B-Zellen den Großteil der B-Zellpopulation. Sie reagieren gut auf TD-Antigene und Kostimulation durch CD40. Kostimulierende Signale sind bei vielen zellulären Interaktionen notwendig, um für die Effekte des Zell-zu-Zell-Kontaktes empfänglich zu werden. Einige der hierfür benötigten Oberflächenmoleküle (CTLA-CD28, B7-CD28, CD40-CD40L) werden nur durch eine vorangegangene Aktivierung exprimiert.

Eine Alternative zur Differenzierung in Plasmazellen ist die Umwandlung der aktivierten B-Zellen in Gedächtnis-B-Zellen, die wie Gedächtnis-T-Zellen durch einen früheren Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen stimuliert wurden und bei erneutem Kontakt eine schnellere und intensivere Immunantwort auslösen können.

Prä-T-Zellen gelangen in unreifer Form während der Embryonalentwicklung aus dem Knochenmark in den Thymus, wo sie ihre jeweiligen TCR entwickeln und sich in die beiden Hauptuntergruppen konventioneller, peripherer T-Zellen differenzieren. So entwickeln sich CD4⁻/CD8⁻ (doppelt negative = DN) Prä-T-Zellen der subkapsulären Region des Thymus zu einer schnell proliferierenden CD4⁺/CD8⁺ (doppelt positiven = DP) kortikalen Population, die die Mehrheit der Thymozyten darstellt. Diese entwickelt ihren TCR und durchläuft die Stadien der positiven und negativen Selektion. Zellen werden positiv selektiert, wenn sie mit MHC-Molekülen auf der Oberfläche der Epithelzellen des Thymus interagieren, und negativ selektiert, wenn sie Autoantigene auf den MHC-Molekülen der als APC agierenden dendritischen Zellen erkennen. In Zellen, denen es entweder nicht gelingt einen funktionsfähigen TCR zu exprimieren oder, die nicht mit körpereigenen MHC-Molekülen interagieren können oder, die Autoantigene erkennen, wird während der Entwicklungsschritte im Kortex Apoptose, ein programmierter Zelltod, ausgelöst (klonale Deletion). Die sich ausdifferenzierenden Thymozyten verlieren entweder CD4 oder CD8, so dass sie als reife T-Zellen einfach positiv sind und entweder CD4 oder CD8 als Oberflächenmarker tragen.

Die Antigenerkennung durch T-Zellen erfolgt in Assoziation mit bestimmten MHC-Molekülen und ist daher MHC-restringiert. T-Helfer-Zellen (T_H-Zellen) exprimieren meist den CD4-Korezeptor auf der Oberfläche und erkennen ihr Antigen in Verbindung mit MHC-Klasse 2-Molekülen (MHC II-Moleküle) auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC), also von B-Zellen, DC und Monozyten/Makrophagen. Dagegen exprimieren zytotoxische T-Zellen meist den CD8-Korezeptor und sind MHC-Klasse 1 (MHC I)-restringiert. MHC I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten.

MHC

MHC-Moleküle wurden ursprünglich bei Transplantationsexperimenten identifiziert, weshalb deren Gene als Haupthistokompatibilitätskomplex (engl. major histocompatibility complex = MHC) bezeichnet wurden. Da sie vermehrt auf der Oberfläche von Leukozyten vorzufinden sind, wurden sie humane Leukozytenantigene (HLA) genannt. Dementsprechend wird der MHC-Lokus des

Menschen als HLA bezeichnet. Die MHC von Maus bzw. Ratte werden H-2 bzw. RT1 genannt. Der HLA-Lokus besteht aus mehreren Hauptabschnitten. HLA-A, -B und -C kodieren klassische MHC I-Moleküle und HLA-DP, -DQ und -DR kodieren MHC II-Moleküle. Die Gene für die Proteine des MHC-Komplexes kommen in einer Vielzahl verschiedener Allele vor, durch die sich einzelne Menschen voneinander unterscheiden. Praktische jede Art von Erkrankung, die mit einer Immunreaktion einhergeht, ist bevorzugt mit bestimmten MHC-Haplotypen assoziiert. Unterschiede in der individuellen Ausstattung mit MHC-Molekülen sind für Abstoßungsreaktionen bei Transplantationen verantwortlich.

Darüber hinaus gibt es verschiedene mit dem klassischen MHC I-Molekülen strukturverwandte Moleküle (Klasse Ib). Diese können wie im Falle des CD1 auch außerhalb des MHC kodiert sein. Sie zeichnen sich durch einen begrenzten Polymorphismus und in vielen Fällen durch eine geringere und gewebsspezifische Expression aus [4]. Von mehreren dieser Moleküle ist bekannt, dass sie $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ -T-Zellen Antigene präsentieren [5].

MHC I- und MHC II-Moleküle

MHC I-Moleküle präsentieren Peptide intrazellulär synthetisierter Antigene, wie virale oder zelleigene Proteine. Die zytosolischen Proteine werden im Proteasom gespalten. Die entstandenen Peptide gelangen unter Vermittlung des Transport-Komplexes TAP-1/-2 vom Zytosol in das endoplasmatische Retikulum (ER). Im Gegensatz zum MHC II-Weg erfolgt schon hier die Zusammensetzung des MHC I-Antigen-Komplexes [6]. Der Austritt aus dem ER erfordert wie beim MHC II-Weg die Bindung bzw. Blockierung der Peptid-Bindungsstelle, die bei MHC I-Molekülen allerdings durch das antigene Peptidfragment erfolgt [7]. Anschließend wird der MHC I-Antigen-Komplex vesikulär an die Zelloberfläche transportiert.

Einige Tumoren und Viren haben Mechanismen entwickelt, die ihre MHC-Expression herunterregulieren, um der Immunantwort zu entgehen.

MHC II-Moleküle sind Heterodimere aus zwei Glykoproteinen, einer α - und einer β -Kette. Jede Kette besteht aus zwei extrazellulären Domänen, einer hydrophoben Transmembransequenz und einem kurzen intrazytoplasmatischen Schwanz. Die Peptidbindungsstelle besteht im HLA-DR-Molekül aus einer hydrophoben

Haupttasche und aus zusätzlichen Taschen mit polymorphen Resten, die wie bei MHC I-Molekülen zur Allel-abhängigen Peptidspezifität beitragen.

Aufgenommene Antigene werden in Endosomen durch Antigenprozessoren teilweise abgebaut. In MIIH-Kompartimenten fusionieren die Endosomen mit Vesikeln, die einen Komplex aus MHC II-Molekülen und invarianten Ketten enthalten [8]. Die invariante Kette (CD74) verhindert, dass Peptide schon im ER oder nach dem Austritt an die MHC II-Moleküle binden. Denn die Peptidbindungsstelle wird durch ein kleines Fragment der invarianten Kette, das Klasse II-assoziierte invariante Ketten-Peptid CLIP, blockiert. Die zytoplasmatische Sequenz der invarianten Kette vermittelt die Internalisierung und den endosomalen Transport zum MIIIC-Kompartiment, in dem der Austausch von CLIP gegen das exogene Peptidfragment und die letzten Prozessierungsschritte des MHC II-Antigen-Komplexes erfolgen [9]. Anschließend wird dieser innerhalb des MIIIC zur Oberfläche transportiert.

T-Zellantwort und Immunregulation

Die zentrale Aufgabe der $\alpha\beta$ -T-Zellen ist es, Antigene zu erkennen, die in prozessierter Form über MHC-Moleküle auf der Oberfläche der jeweiligen Körperzelle präsentiert werden. Die Antigenerkennung resultiert in unterschiedlichen Effekten. So helfen die $\alpha\beta$ -T-Zellen unter anderem den B-Zellen, sich zu antikörperproduzierenden Zellen zu entwickeln (vor allem T-Helfer-2-Zellen = $CD4^+$ T_H2 -Zellen). Sie erkennen und zerstören virusinfizierte Zellen (zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen), aktivieren Phagozyten, damit diese effektiv phagozytierte Pathogene abtöten ($CD4^+$ T_H1 -Zellen) und kontrollieren die Intensität und Qualität der Immunantwort (Suppressor-T-Zellen und/oder regulatorische T-Zellen). In Abhängigkeit des synthetisierten Zytokingemisches entwickeln sich aus T_H0 -Zellen, die durch Interaktion mit APC und Freisetzung des Zytokins IL-2 aus naiven $CD4^+$ T-Zellen entstanden, unterschiedliche Subpopulationen mit unterschiedlichen Expressionsmustern und Funktionen. Unter dem Einfluss von IL-12 entstehen vor allem T_H1 -Zellen, die durch Produktion von $INF-\gamma$ insbesondere Phagozyten aktivieren und den Klassenwechsel zu opsonisierenden Antikörpern fördern. Dagegen begünstigt IL-4 die Entstehung von T_H2 -Zellen, die durch Sekretion von IL-4 und IL-5, -9, -10, -13 die Differenzierung von B-Zellen ermöglichen. Demnach fördert die T_H1 -Subpopulation eine Zell-vermittelte Immunantwort, während die T_H2 -

Subpopulation Antikörper-vermittelte Antworten auslöst. Zwischen einer T_H1 - und T_H2 -Antwort besteht eine negative Rückkopplung, d. h. die eine Art der Antwort unterdrückt die andere. So begrenzt von T_H1 -Zellen produziertes $INF-\gamma$ die Proliferation von T_H2 -Zellen. Umgekehrt unterdrückt $IL-10$ aus T_H2 -Zellen die Zytokinproduktion von T_H1 -Zellen und $IL-13$ inhibiert die Zytokinproduktion von Makrophagen. Auf diese Weise wird die Immunantwort in eine Richtung gelenkt.

Eine unkontrollierte Aktivierung der $CD4^+$ T_H -Effektorzellen kann pathologische Immunreaktionen verursachen. Generell sind exzessive T_H1 -Antworten eher mit autoimmunen und inflammatorischen Störungen assoziiert, während verstärkte T_H2 -Antworten in allergischen Reaktionen und Verminderung der Tumorabwehr resultieren können.

In jüngster Zeit sind neben den T_H1 - und T_H2 -Zellen die $IL-17$ produzierenden T_H17 -Zellen in den Blickpunkt des Interesses gerückt. Diesen wird insbesondere eine Rolle bei der Kontrolle von Pilzinfektionen zugeschrieben. Darüber hinaus können sie zur Entwicklung organspezifischer Autoimmunerkrankungen beitragen. Eine weitere physiologisch wichtige Population der $CD4^+$ T-Zellen sind die sogenannten T_{Reg} -Zellen. Diese Zellen spielen eine Schlüsselrolle bei Unterdrückung und Terminierung von (Auto-)Immunreaktionen. T_{Reg} -Zellen sind in Überleben und Wachstum im besonderen Maße $IL-2$ -abhängig. Dementsprechend exprimieren T_{Reg} -Zellen auch die normalerweise nur auf aktivierten T-Zellen zu findende α -Kette des $IL-2$ -Rezeptors ($CD25$).

mDC und pDC sind in der Lage die T_H -Zelldifferenzierung in Abhängigkeit des Stimulus und des Phänotyps der interagierenden Subpopulation in eine bestimmte Richtung zu lenken. mDC scheinen die Immunantwort vor allem in T_H1 -Richtung zu stimulieren, während pDC sogar $IL-4$ -unabhängig die T_H2 -Antwort, sowie auch die T_H1 -Antwort induzieren kann.

CD1d-Erkennungssystem und NKT-Zellen

Lange Zeit waren Peptide die einzig bekannten Ziele der T-Zell-vermittelten Immunantwort. Die Entdeckung der $CD1$ -abhängigen Antigenpräsentation lieferte einen Mechanismus, mit dem eine Auswahl von Lipiden und Glykolipiden aus den Membranen von Säugetierzellen oder mikrobiellen Erregern von bestimmten T-Zellen

erkannt werden kann. Die CD1-restringierte Antigenerkennung erfolgt wie bei der MHC I-/II-abhängigen Antigenpräsentation über spezifische TCR.

Das CD1d1 der Maus und das CD1d des Menschen wird jeweils unter anderem von T-Zell-Untergruppen erkannt, die sowohl den für natürliche Killerzellen typischen Rezeptor NK1.1 bzw. CD161 als auch T-Zellrezeptoren exprimieren und natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) genannt werden [10], [11].

Es werden zwei Hauptgruppen von NKT-Zellen unterschieden. Invariante NKT-Zellen (iNKT-Zellen) oder Typ I-NKT-Zellen besitzen ein sehr eingeschränktes TCR-Repertoire, während non/nicht-invariante oder Typ II-NKT-Zellen diverse TCR α - und - β -Ketten exprimieren. Der semiinvariante Rezeptor der Typ I-NKT-Zellen besteht aus der invarianten V α -Kette (im Menschen V α 24 plus bevorzugt J α 18, in der Maus V α 14J α 18), die bevorzugt mit einer bestimmten β -Kette (im Menschen V β 11, in der Maus V β 8.2, V β 7, V β 2) kombiniert wird [12].

Deshalb werden Typ I-NKT-Zellen auch V α 24NKT-Zellen bzw. V α 14NKT-Zellen genannt. Der Rezeptor bindet sehr spezifisch und hochaffin über CD1d präsentierte α -Galactosylceramid (α -GalCer), einem aus dem Meeresschwamm *Agelas mauritanus* gewonnenen Glykosphingolipid, wodurch eine Zytokinproduktion induziert wird [13], [11]. Aufgrund der schnellen und massiven Produktion von IL-4, gefolgt von einer länger anhaltenden INF γ Sekretion in vivo und der Aktivierung verschiedener Immunzellen durch Typ I-NKT-Zellen, werden das natürliche und das adaptive Immunsystem aktiviert. Unterschiedliche α -GalCer-Analoga verschieben je nach Modifikation die Immunantwort mehr in T_H1- bzw. T_H2-Richtung [14], [15]. Eine noch effizientere Immunantwort wird durch Injektion von α -GalCer-beladenen DC erreicht, wonach eine anhaltende Aktivierung von Typ I-NKT-Zellen und ein Anstieg von Gedächtnis-CD8⁺-T-Zellen des Menschen in vivo beobachtet wurde [16].

CD1d-defiziente Mäuse wiesen zwar einen absoluten Mangel an NKT-Zellen, jedoch eine normale Anzahl konventioneller T-Zellen auf. Trotz des Fehlens einer schnellen IL-4-Freisetzung konnten sie eine effektive T_H2-Antwort vermitteln [17]. Demnach ist das CD1d-Erkennungssystem eines von mehreren Mechanismen, die die Immunantwort konventioneller T-Zellen steuern.

Insgesamt machen Typ I-NKT-Zellen in der Maus weniger als 1% aller Lymphozyten aus. Typ I-NKT-Zellen akkumulieren hauptsächlich in der Leber, wo sie in der Maus bis zu 30% der T-Zellen repräsentieren, während sie in der Milz und im Lymphknoten nur etwa 2,5% der T-Zellen darstellen. Ihre Entwicklung ist thymusabhängig [18] und

sie sind CD4⁺ oder DN. Im Menschen sind sie jeweils von etwa 10-mal geringerer Anzahl und exprimieren häufig auch das CD8 α -Homodimer. Ihre Anzahl im Blut von Testpersonen variiert um das 100-fache, wobei Zwillingsstudien zeigten, dass die unterschiedlichen Frequenzen unter strenger genetischer Kontrolle stehen [19].

Da es MHC-restringierte T-Zellen gibt, die nach Aktivierung oder im Verlauf der Immunabwehr von Viren NK-Rezeptoren exprimieren [20], [21], die Expression von NK-Rezeptoren innerhalb der Mausstämmen (BALB/c ohne NK1.1 gegenüber C57BL/6, SJL) variiert und manche reife, aktivierte Typ I-NKT-Zellen NK1.1 herunterregulieren, ist die Identifizierung von NKT-Zellen mit invarianter α -Kette mittels α -GalCer-beladenen CD1d-Tetrameren zuverlässiger als die Benutzung von NK-Zellmarkern. Sie erlauben mittels FACS-Analyse eine sensitive und hoch spezifische Quantifizierung der Typ I-NKT-Zellen [22].

Interessanterweise können α -GalCer-beladene Maus-CD1d-Tetramere auch V α 24NKT-Zellen und α -GalCer-beladene CD1d-Tetramere des Menschen ebenso V α 14NKT-Zellen markieren [22], [23]. Dagegen werden Typ II-NKT-Zellen und nicht-CD1d-restringierte T-Zellen, die NK-Rezeptoren exprimieren, nicht durch α -GalCer-beladene CD1d-Oligomere dargestellt.

Auch wenn Typ I-NKT-Zellen der Maus das CD1d der Maus besser binden als menschliches CD1d [24], deutet diese bidirektionale Kreuzreaktivität und die Tatsache, dass im Gegensatz zur ersten CD1-Genuntergruppe (CD1a-c) Gene der zweiten Untergruppe (CD1d) bisher in allen untersuchten Säugetieren, außer bei Rindern, festgestellt wurden, auf den hohen Grad der evolutionären Konservierung des CD1d-Erkennungssystems hin.

Überraschenderweise können Typ I-NKT-Zellen der F344-Ratte nicht durch α -GalCer-beladene Maus-CD1d-Tetramere markiert werden. Sie reagieren nur auf α -GalCer-Moleküle, wenn diese von CD1d-Molekülen der Ratte und nicht von denen der Maus präsentiert werden, wohingegen Typ I-NKT-Zellen der Maus auch durch α -GalCer-Moleküle aktiviert werden, die von CD1d-Molekülen der Ratte angeboten werden. Folglich erkennen Typ I-NKT-Zellen der Ratte nur CD1d-Moleküle der gleichen Spezies. Des Weiteren zeigten Analysen von Ratten-Typ I-NKT-Zellrezeptoren die besondere Bedeutung der CDR-2-Region der V β 8.2-Kette für die Erkennung von α -GalCer durch Typ I-NKT-Zellen [25].

Entwicklung und Funktion der NKT-Zellen

In der Entwicklung von Typ I-NKT-Zellen gibt es mehrere Besonderheiten. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen erfolgt die positive Selektion nicht MHC-vermittelt und nicht durch kortikale Epithelzellen, sondern über das CD1d kortikaler DP Thymozyten [26]. Ähnlich wie bei der thymischen Reifung der immunregulatorischen T_{Reg}-Zellen, die MHC II-vermittelte Autoreaktivität gegen Epithelzellen des Thymus zeigen, führt die CD1d-Reaktivität der CD1d-restringierten NKT-Zellen nicht zur negativen Selektion, wobei die NKT-Zellen schon im Thymus den Phänotyp von Gedächtniszellen entwickeln. Haben die Typ I-NKT-Zellen den Thymus verlassen, erlangen sie den Status von nicht teilenden, sesshaften, gewebstypischen und lang lebenden Zellen [27].

Typ I-NKT-Zellen ähneln aufgrund ihres semiinvarianten Rezeptors, ihrer Autoreaktivität, des Phänotyps aktivierter Zellen, der möglichen Rekrutierung durch inflammatorische Faktoren und der selektive Anreicherung in bestimmten Geweben (Leber, Thymus) Zellen der natürlichen Immunität (B1-B-Zellen, NK-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen). Diese Zellen exprimieren gehäuft hemmende Rezeptoren, die die Schwelle der Antigenrezeptoraktivierung regulieren. Es wird angenommen, dass Antigene, die durch Gewebeschaden oder -stress verändert wurden, erkannt werden und so eine transiente, selektive Autoreaktivität entsteht [28], [29].

Jedoch ist bisher nicht bekannt, ob CD1d-restringierte T-Zellen an einer solchen Regulierung der Gewebs-Homeostase beteiligt sind.

Typ I-NKT-Zellen verfügen über lytische Aktivität durch die Expression von Fas-Ligand und die Sekretion von Perforin und Granzym B (Caspasen-unabhängig) [30]. Auf diese Weise könnte die Zytolyse von CD1d⁺ Tumorzellen direkt nach Erkennung des CD1d-Liganden α -GalCer durch NKT-Zellen ausgelöst werden oder sie erfolgt indirekt nach NKT-Zellaktivierung und deren IL-2-vermittelten Stimulierung von NK-Zellen [31]. Durch die lytische Aktivität kann die Antitumor-Immunität reguliert, aber auch die DC-vermittelte Immunantwort supprimiert werden. CD1d⁺ mDC stimulieren IL-12-abhängig V α 24NKT-Zellen zur T_H1-Antwort und sind selbst anfällig für deren Lyse. Somit begrenzt dieser Feedbackmechanismus die DC-vermittelte Immunantwort und reguliert das T_H1-/T_H2-Gleichgewicht [32].

Sowohl die Typ I- und die Typ II-NKT-Zellen [33], [34] als auch die Subpopulationen der Typ I-NKT-Zellen [35] unterscheiden sich in ihrer bevorzugten Zytokinausschüttung. Dieses Phänomen war bereits bei der MHC II-vermittelten T_H-Aktivierung durch mDC bzw. pDC beobachtet worden. So scheinen NKT-Zellpopulationen in Abhängigkeit des Stimulus, des APC-Typs und lokaler Faktoren [36], [37], [38] unterschiedlich aktiviert zu werden. Z. B. konnten verschiedene Typ I-NKT-Zellpopulationen durch den gleichen Stimulus gemeinsam mit unterschiedlichen, möglicherweise gegensätzlichen T_H-Auswirkungen oder durch verschiedene Stimuli separat aktiviert und mit entsprechenden Effekten beeinflusst werden [39].

Spezifische Stimuli könnten die Immunabwehr gezielt steuern und würden deshalb potentielle therapeutische Optionen repräsentieren.

Aufgrund ihres initialen Beitrages in der Immunabwehr und der Interaktion mit einer Reihe von anderen Zellen des Immunsystems [40], [41], [42], [43], [44], [45] sind Typ I-NKT-Zellen, besonders durch Lenkung der T_H-Richtung, in der Lage immunologische Abläufe zu regulieren und stellen attraktive Ziele für die Entwicklung von Immuntherapien dar. Infektions- und Tumormodelle mit Applikation von α -GalCer und die Analyse Typ I-NKT-Zell- oder CD1d-defizienter Mäuse zeigten, dass sie eine wichtige Rolle in der Immunabwehr einiger Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten [45], [46], [47], [48], [49], [50], [51], [52] in der Tumorumabwehr [53] sowie in der Aufrechterhaltung von Toleranz [54], [55], [56], [57] spielen.

So gibt es bereits positive Ergebnisse von Phase 1-Studien über die Behandlung von Tumorpatienten mit α -GalCer-Injektionen bzw. von mit α -GalCer-stimulierten DC in Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien [58], [59], [16].

Zugleich scheinen Typ I-NKT-Zellen aber auch an der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten und Hyperreaktivitätsreaktionen beteiligt zu sein oder die Tumorumabwehr auch negativ beeinflussen zu können [60], [61], [62], [63].

Sowohl die Bedeutung der reduzierten Anzahl an Typ I-NKT-Zellen in Patienten mit Autoimmunkrankheiten [64], [65] als auch der Beitrag zum Verlauf des Typ I Diabetes [64], [66], [63], [67] werden kontrovers diskutiert.

Typ II-NKT-Zellen wurden unter anderem dadurch identifiziert, da α -GalCer-defiziente Mäuse im Gegensatz zu CD1d-defizienten Mäusen noch eine NKT-Zell typische Funktion mit CD1d-Restriktion aufwiesen [68], [69].

Sie sind seltener als Typ I-NKT-Zellen, finden sich, mit oder ohne NK-Rezeptoren, besonders im Knochenmark [70], [71] und zeigten ebenfalls CD1d-Autoreaktivität, jedoch im Gegensatz zu Typ I-NKT-Zellen unabhängig von der zytoplasmatischen Zielsequenz des CD1d-Moleküls (siehe unten) [72].

Bisher konnte nicht gezeigt werden, dass es α -GalCer-reaktive Typ II-NKT-Zellen gibt. Bestimmte Populationen der Typ II-NKT-Zellen produzierten nach intravenöser Gabe von Anti-CD3-Antikörpern ebenfalls Zytokine der T_H1 -/ T_H2 -Antwort [72] und zeigten zytolytische Aktivität [73], [70]. Welche T_H -Richtung bevorzugt aktiviert wird entscheiden wohl das Antigen oder der Stimulationsweg [33], [34]. Typ II-NKT-Zellen, die auf den endogenen Ligand Sulfatid reaktiv sind, induzierten vor allem die T_H1 -Antwort und scheinen besonders pDC zu aktivieren, während Typ I-NKT-Zellen bevorzugt mDC stimulieren [54]. Die Verabreichung von Sulfatid kann in der Maus das Fortschreiten der experimentellen allergischen Encephalomyelitis EAE, einem Tiermodell der multiplen Sklerose, verhindern [74].

Neueste Berichte einer Studie, in der die Rolle der beiden NKT-Zelltypen im gleichen Tumormodell nach selektiver und simultaner Stimulierung verglichen wurde, deuten neben ihrer gegensätzlichen Rolle auf eine Interaktion der beiden Zelltypen in vivo hin, wodurch Typ I-NKT-Zellen durch Typ II-NKT-Zellen in ihrer Tumoralabwehr gehemmt werden [75].

CD1-Moleküle

CD1-Moleküle weisen eine dem MHC I-Molekül ähnliche Struktur auf und gehören zu den MHC-Klasse Ib-Molekülen [5]. Sie besitzen als Transmembranproteine drei extrazelluläre Domänen und können mit β_2 -Mikroglobulin assoziiert sein [76]. Jedoch verfügen sie nur über einen begrenzten Polymorphismus. Deshalb wurde schon früh vermutet, dass sie nur bestimmten T-Zellen einen eingeschränkten Antigentypus präsentieren und keine Ziele von Transplantatreaktionen sind [5].

Im Menschen kodieren fünf CD1-Gene jeweils CD1a, -b, -c, -d und -e [4]. Dabei werden anhand homologer Sequenzen zwei Untergruppen unterschieden: CD1a-c und CD1d [77], [78]. CD1e stellt eventuell einen dritten Typus dar, da es sich nur in

intrazellulären Kompartimenten anreichert und es verschiedene Allele mit unterschiedlichen Merkmalen gibt [79]. In der Maus kodieren zwei Gene die stark homologen CD1d1 und CD1d2-Moleküle, wohingegen in der Ratte nur ein Gen vorhanden ist, dessen Produkt etwas mehr dem CD1d1-Molekül ähnelt [78]. Die CD1-Genprodukte von Maus und Ratte sowie das CD1d-Protein des Menschen zeigen eine hohe Sequenzhomologie, sodass zwischen diesen Molekülen mehr Ähnlichkeit besteht als zwischen denen der zwei Untergruppen des Menschen [78], [80]. Die beiden CD1-Gene der Maus sind zu 95% identisch, so dass die meisten Anti-Maus-CD1-Antikörper die Produkte beider Gene erkennen. Es gibt Mausstämmen, die aufgrund einer Punktmutation CD1d2 nicht (C57BL/6) oder nur gering exprimieren. Da viele Versuche im C57BL/6-System durchgeführt wurden, bezieht sich der Großteil der Studien generell auf das CD1d1-Genprodukt. Deshalb wird meist nur vom „CD1“ oder „CD1d“ der Maus gesprochen [81].

Maus und Ratte sind bisher die einzigen bekannten Säugetiere, die nur die CD1d-Isoform exprimieren. Dagegen wurden in einem Rinderstamm nur CD1a, -b, und -e, aber kein funktionelles CD1d sowie keine Reaktivität auf α -GalCer nachgewiesen [82].

Endogene und exogene CD1d-Antigene

Die CD1-Proteine beider Untergruppen besitzen bis zu vier hydrophobe Kanäle im Bindungsbereich, die eine im Vergleich zu MHC I-/II- Molekülen ungewöhnliche Antigenbindung ermöglichen [76], [83].

CD1a-c präsentieren unter anderem Glykolipide von Mykobakterien [84], [85] und das Glykosphingolipid Sulfatid [86]. Als Liganden von CD1d wurden zuerst das Glykosphingolipid α -GalCer [13] und natürliche endogene Lipide wie z. B. (Glykosyl-)Phosphatidylinositol oder Phosphatidylcholin [87], [88], [89] beschrieben. Später wurden Lipide von Tumorzellen [90], exogene Glykolipide von *Sphingomonas capsulata* [91], [92] und Lipide von Pflanzenpollen [93] als CD1d-präsentierte Antigene identifiziert.

Allerdings führte die Bindung der genannten endogenen Liganden durch CD1d nur selten zu einer Aktivierung von Zellen [90]. Zwar konnte in vitro Autoreaktivität beobachtet werden [10], die präsentierte Antigene erforderte [90], jedoch konnte

noch kein endogener Ligand, der sowohl thymische als auch extrathymische Funktionen determiniert, nachhaltig bestimmt werden.

Die Annahme, dass die Zytokinproduktion von APC nach Kontakt mit mikrobiellen Produkten die grundsätzlich schwache Reaktivität der NKT-Zellen auf endogene Liganden verstärkt und in der schnellen Aktivierung der NKT-Zellen im Verlauf verschiedener Infektionen resultiert [94], [95], [96], [97], scheint aber bestätigt werden zu können. Denn autoreaktive CD1d-restringierte T-Zellen können je nach Potenz des Antigens unabhängig von oder zusammen mit TLR-Signalen die DC-Reifung induzieren und regulieren und so entscheidend zur Immunantwort beitragen [98].

Die Beobachtung, dass Typ I-NKT-Zellen in Mäusen mit Mangel an β -Glucosylceramid-Synthase keine Reaktivität auf CD1d zeigten, deutet weiterhin auf ein Glykosphingolipid als endogenen Liganden hin [99].

Auf der Suche nach exogenen CD1d-Liganden zeigten neueste Entdeckungen, dass bestimmte Glykosphingolipide (GSL-1-4) von *Sphingomonas capsulata* für eine starke Stimulierung von Typ I-NKT-Zellen der Maus und des Menschen verantwortlich sind. Diese α -verknüpften Lipide befinden sich anstelle von LPS in der Zellwand und sind α -GalCer strukturell sehr ähnlich [91]. *Sphingomonas* ist ein gramnegatives Bakterium und häufiger Symbiont des Meeresschwammes. Es verursacht bei Immunschwäche akute Infektionen und ist vermutlich an der Pathogenese der Autoimmunkrankheit PBC (primäre biliäre Zirrhose) beteiligt, wahrscheinlich durch Auslösung einer abnormen Immunantwort von NKT-Zellen [41], [100]. Demnach könnte die CD1d-vermittelte Stimulierung von NKT-Zellen einen neuen Immunmechanismus gegen gramnegative Bakterien darstellen, die von TLR schlecht erfasst werden.

α -glycosidische Sphingolipide wie das α -GalCer wurden bisher nicht in Säugetierzellen nachgewiesen. Verbindungen, die diesen sehr ähneln, wurden vereinzelt in fetalen Zellen, Tumorzellen und in Zellen des Darmes und der Niere [13] gefunden. Die β -glycosidische Verknüpfung von Sphingolipiden ist dagegen unter bestimmten Gangliosiden, Cerebrosiden und Sulfatiden weit verbreitet, von denen wie bereits erwähnt nur in wenigen Fällen eine CD1d-Bindung oder sogar eine CD1d-vermittelte Aktivierung beschrieben wurde. β -GalCer wird zwar von CD1d gebunden, führte aber zu keiner Stimulierung [13].

CD1d-vermittelte Antigenpräsentation

Der intrazelluläre Transport des CD1d-Moleküls zur Antigenpräsentation kann endosomal und nicht-endosomal erfolgen und verfügt über Gemeinsamkeiten mit dem Transportweg sowohl des MHC I-Moleküls als auch des MHC II-Moleküls.

Jedoch ist die CD1d-Expression nicht von TAP [81] abhängig und auch die Entwicklung CD1d-restringierter NKT-Zellen ist sowohl TAP- als auch MHC II-unabhängig [73].

Im endoplasmatischen Retikulum assoziiert CD1d mit β_2 -Mikroglobulin und wird wahrscheinlich durch das mikrosomale Triglyceridtransferprotein MTP mit einem endogenen Lipid (z. B. Phosphatidylinositol) beladen, das die Antigenbindungsstelle stabilisiert [101], [102], [88]. β_2 -Mikroglobulin ist wie bei MHC I-Molekülen für den Austritt aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) erforderlich. Über das trans-Golgi-Netzwerk und Transportvesikel wird die Zellmembran zur möglichen Antigenpräsentation erreicht.

Es wird vermutet, dass sowohl die meisten CD1d-Moleküle als auch die anderen CD1-Isoformen diesen sekretorischen Transportweg durchlaufen. Es gibt zwar auch CD1d-Moleküle, die ohne β_2 -Mikroglobulin die Zelloberfläche erreichen, diese weisen aber Eigenschaften von Glykoproteinen mit unvollständig prozessiertem Zuckeranteil auf [103].

Von der Zelloberfläche können CD1-Moleküle mit Hilfe einer aus vier Aminosäuren bestehenden Tyrosin-Zielsequenz im zytoplasmatischen Schwanz des Moleküls reinternalisiert und intrazellulär transportiert werden. Diese Sequenz ist Bestandteil des CD1 der Maus und, mit Ausnahme des CD1a, auch der CD1-Moleküle des Menschen. Durch sie wird auch ein schnelles Recycling von CD1-Molekülen zwischen Zellmembran und Endosom ermöglicht [104]. Der weiterführende intrazelluläre Weg ist von der CD1-Isoform und von der Art des Adapterproteins abhängig.

Nach Internalisierung können CD1d-Moleküle, wie bereits für MHC II-Moleküle beschrieben, in saure endosomale Kompartimente gelangen. Dort kann das endogene Lipid durch die als Saposine bezeichneten Sphingolipid-Aktivator-Proteine gegen ein exogenes Lipid ausgetauscht werden, um dann zusammen mit CD1d über Lysosome an die Zelloberfläche transportiert zu werden [105], [106]. Ein Austausch

mit einem anderen endogenen Lipid oder eine erforderliche Antigenbearbeitung kann in den frühen Endosomstadien oder in Lysosomen stattfinden [7], [107].

In welchem Maße und auf welchem Wege exogene Lipide in die unterschiedlichen lysosomalen Kompartimente gelangen, ist derzeit noch unklar.

Im Gegensatz zur Maus besitzt das CD1d-Molekül des Menschen noch eine weitere Leucin-haltige Zielsequenz, die auch den Transport von MHC II-Molekülen und der invarianten Kette regelt [108].

Nachdem CD1d-Moleküle im Menschen nachgewiesen wurden, die sowohl auf der Zelloberfläche als auch in lysosomalen Kompartimenten mit MHC II-Molekülen assoziiert waren, wurde auch ein möglicher direkter Transport von CD1d in saure Kompartimente beschrieben. Im ER bildet sich wahrscheinlich ein Komplex aus CD1d, dem MHC II-Molekül und der invarianten Kette, der dafür verantwortlich ist, dass auch CD1d-Moleküle ohne Tyrosinsequenz im zytoplasmatischen Schwanz lysosomale Kompartimente in APC erreichen [109]. Hierbei werden der Transportweg und die Internalisierung wie bei der MHC II-Peptidpräsentation durch die invariante Kette vermittelt, vermutlich in Abhängigkeit der Leucinsequenz [104]. Andere Untersuchungen lassen vermuten, dass dieser Komplex vor Eintritt ins endosomale System zuerst die Zelloberfläche erreicht, oder zumindest diese Option besitzt [110]. Auch in der Maus kann CD1d mit der invarianten Kette assoziieren, so dass mit Hilfe verschiedener endosomaler Transportwege unabhängig voneinander Antigene präsentiert werden können [104].

Verschiedene Studien zeigten, dass die CD1d-vermittelte Präsentation je nachdem, ob endogene oder exogene Antigene transportiert werden, von bestimmten Komponenten abhängen und sich diese Bedingungen im Menschen von denen in der Maus unterscheiden [111], [110], [106], [105]. So scheint im Menschen nur der Transport endogener Antigene vom zytoplasmatischen Schwanz unabhängig zu sein. Demgegenüber ist in der Maus die Erkennung sowohl von endogenen Antigenen als auch von α -GalCer von endosomalen Transportwegen abhängig, die den zytoplasmatischen Schwanz erfordern [72].

Expression von CD1a-c im Menschen

Menschliches CD1a, -b, und -c werden konstitutiv von der Mehrzahl der Thymozyten und bestimmter APC exprimiert, wie z. B. CD1a und -c von Langerhans-Zellen [112],

CD1c von B-Zellen und einigen B-Tunorzellen [113], CD1b von Makrophagen in chronischen Entzündungen [86] und CD1a-c von DC [76].

Demnach beschränkt sich die Expression von CD1a-c vor allem auf hämatolymphatische Zellen. Das Expressionsmuster scheint jedoch sehr dynamisch zu sein, da Monozyten im Blut CD1a-c nur nach in-vitro Induktion der Differenzierung zu DC exprimieren [97], [114].

CD1a-c präsentieren CD1-restringierten $\alpha\beta$ - und vereinzelt $\gamma\delta$ -T-Zellen endogene Lipide (Sulfatid, Gangliosid GM1) oder Fremdartigene [115], [86]. Die Erkennung von Fremdartigen resultierte dabei in einer bevorzugten T_H1 -Zytokinproduktion und/oder Zytolyse [116]. Bei der Stimulierung von T-Zellen durch Sulfatid, zeigte sich, dass vor allem die CD1a-Vermittlung zu einer lang andauernden Zytokinproduktion in vitro führte [86].

CD1d-Expression in der Maus und im Menschen

Dendritische Zellen, B-Zellen der Marginalzone der Milz und Makrophagen stellen in der Maus die Zellen mit der höchsten CD1d-Expression und damit die potentiellen Interaktionspartner von CD1d-restringierten NKT-Zellen dar. Dagegen schienen im Menschen die meisten APC keine stark erhöhte CD1d-Expression aufzuweisen. Sogar nach Zugabe bestimmter Zytokine konnte im Gegensatz zu CD1a-c Molekülen keine gesteigerte Expression von CD1d-Molekülen erzielt werden [117], [118]. In diesen Studien wurden jedoch nur Blutzellen und Zellen der Lymphknoten untersucht.

In beiden Spezies konnte nachgewiesen werden, dass auch extralymphatisches Gewebe, besonders Leber und Darm, CD1d exprimieren.

Das CD1d1- und das CD1d2-Gen der Maus sind zwar zu 95% identisch, aber CD1d2 wird im Unterschied zu CD1d1 nur im Thymus exprimiert [119]. Die meisten Anti-Maus-CD1d-Antikörper erkennen die Produkte beider Gene, unabhängig davon, ob sie mit der Antigenbindung bzw. -präsentation interferieren.

Bemerkenswert ist, dass sowohl das CD1d der Maus als auch das CD1d des Menschen nicht nur auf DC, Makrophagen, B-Zellen, reifen T-Zellen [120], [81] und Thymozyten [26], [117] nachgewiesen wurde. Denn abgesehen von der konstitutiven, wenn auch zum Teil schwachen, CD1d-Expression lymphatischer Zellen wurde CD1d jeweils auch in verschiedenen nicht-lymphatischen Geweben festgestellt. So

exprimieren im Menschen Epithelzellen (Darm, Haut, Endometrium, Konjunktiven), glatte Muskelzellen (Gefäße) und Parenchymzellen (Hepatozyten, Nierentubuli) verschiedener Organe CD1d, wobei es einige Unterschiede zwischen den verschiedenen Anti-CD1d-Antikörpern gab [121].

Periphere T-Zellen des Menschen zeigten im Gegensatz zu denen der Maus keine bzw. nur eine sehr geringe CD1d-Expression, die aber durch Aktivierung induziert werden konnte. Schon bei medullären Thymozyten konnte beim Menschen eine Herunterregulierung der CD1d-Expression beobachtet werden [118], während bei Thymozyten der C57BL/6-Maus keine unterschiedlichen Level festgestellt wurden [120].

Darmepithelien exprimieren menschliches CD1d meist in β_2 -Mikroglobulin-unabhängiger Form [122]. Neuere Untersuchungen deckten weitere CD1d positive Gewebe im Menschen auf und gaben damit Hinweise für die Bedeutung der Funktion CD1d-abhängiger NKT-Zellen. So wurde eine Steigerung der konstitutiven CD1d-Expression menschlicher Keratinozyten durch physikalische Traumata und entzündlicher Dermatosen wie z. B. Psoriasis induziert [123]. Außerdem konnten CD1d positive Schwannzellen der Myelinscheiden peripherer Nerven α -GalCer-vermittelt Typ I-NKT-Zellen stimulieren [124]. Auch Schleimhautepithelzellen des Urogenitaltraktes des Menschen, besonders der Vagina, exprimieren CD1d verstärkt und produzieren nach Bindung von Anti-CD1d-Antikörpern IL-12 und IL-15 [125]. Typ I-NKT-Zellen sind entscheidend an der Entwicklung der Plazenta während der frühen Schwangerschaft beteiligt, wobei die Differenzierung von Trophoblasten durch eine Abnahme ihrer CD1d-Expression gekennzeichnet war [126].

In der Maus sind die B-Zellen der Marginalzone der Milz (7-mal höher gg. Großteil der B-Zellen) und DC der Milz (3-mal höher gg. Großteil der B-Zellen) die Zelltypen mit der stärksten CD1d-Expression. Auch aktivierte Makrophagen exprimieren CD1d verstärkt [81].

Im ZNS der Maus befindliche Mikroglia-Zellen, Makrophagen und T-Zellen exprimieren CD1d in einer geringeren Intensität als Makrophagen oder T-Zellen der Milz. Im Verlauf einer EAE steigen die Anzahl und die CD1d-Expression der Mikroglia-Zellen. Außerdem kann eine auf das ZNS begrenzte unterschiedliche Zunahme der CD1d-Expression von infiltrierenden Makrophagen, die CD1d am stärksten hochregulieren, und von T-Zellen beobachtet werden [127].

Somit wird durch eine Entzündung die CD1d-Expression je nach Gewebs- und Zelltyp unterschiedlich stark induziert. Die Funktion der CD1d⁺ T-Zellen des ZNS sowie derjenigen aus der Milz bleibt ungewiss. Neben einer Antigenpräsentation wurde die Aktivierung dieser T-Zellen als Grund für die Hochregulierung der CD1d-Expression diskutiert [127].

Extralymphatisch wurde CD1d in der Maus zuerst auf gastrointestinalem Epithel und im Zytoplasma von Hepatozyten festgestellt [128]. Die CD1d-Expression im Gastrointestinaltrakt konnte allerdings in einer anderen Studie mit anderen Anti-CD1d-Antikörpern nicht bestätigt werden. Folglich scheint CD1d in der Maus in extralymphatischen Geweben abgesehen von der Leber schwer nachweisbar zu sein [120]. Hepatozyten der Maus exprimieren CD1d konstitutiv, wohingegen im Menschen nur im Verlauf von Krankheiten, wie z. B. Hepatitis C, eine CD1d-Expression festgestellt werden kann [129]. Zusätzlich sind in der Leber, die in der Maus das Gewebe mit der größten NKT-Zellzahl darstellt, Zellen der Lebersinusoide (Kupfer-Zellen, Ito-Zellen und Endothelzellen) CD1d stark positiv. Jedoch ist die CD1d-Expression der Leber nicht für die Anreicherung mit NKT-Zellen erforderlich [26].

Ähnlich dem MHC II-System exprimieren die meisten anderen Gewebe und die nicht-antigenpräsentierenden hämatopoetischen Zellen CD1d schwach oder es ist nicht nachweisbar.

Die Intensität der CD1d-Expression variiert sowohl innerhalb der lymphatischen Subpopulationen eines Gewebes als auch innerhalb der verschiedenen lymphatischen Gewebe.

In der Milz der SJL-Maus exprimierten CD4⁺ T-Zellen CD1d stärker als CD8⁺ T-Zellen [127]. Im Thymus der C57BL/6-Maus waren die CD1d-Expressionslevel von DP und CD4⁺ T-Zellen vergleichbar hoch, aber doppelt so ausgeprägt wie von CD8⁺ T-Zellen. Reife periphere T-Zellen der Milz und des Lymphknoten zeigen jeweils halb so hohe CD1d-Level wie T-Zellen des Thymus, so dass periphere CD4⁺ T-Zellen erneut CD1d doppelt so stark exprimieren wie CD8⁺ T-Zellen. Die CD1d-Expression der reifen Zellen nimmt also ab. Auch die unreifen B-Zellen des Knochenmarks exprimieren CD1d etwas stärker als die B-Zellen des LK und der Großteil der B-Zellen der Milz [81].

Beeinflussung der CD1d-Expression in der Maus

β_2 -Mikroglobulin-defiziente Mäuse wiesen eine geringe bis negative CD1d-Expression und eine stark reduzierte NKT-Zellzahl auf [130], [131]. Allerdings muss beachtet werden, dass die Anti-CD1d-Antikörper dieser Studien nur die β_2 -Mikroglobulin-abhängigen Form erkannt haben.

Weitere Untersuchungen deckten auf, dass Typ I-NKT-Zellen nur mit der überwiegenden, β_2 -Mikroglobulin-abhängigen Form von CD1d reagieren konnten. So waren β_2 -Mikroglobulin-defiziente DC nicht in der Lage, Typ I-NKT-Zellen α -GalCer- vermittelt zu stimulieren [13]. Es gibt jedoch T-Zellpopulationen (bestimmte Typ II-NKT-Zellen), die Autoreaktivität auch gegenüber B-Zellen der Milz β_2 -Mikroglobulin-defizienter Mäuse zeigten und demnach sowohl mit der β_2 -Mikroglobulin-unabhängigen als auch mit der β_2 -Mikroglobulin-abhängigen Form von CD1d reagieren [73]. Diese Aktivierung konnte nur von Anti-CD1d-Antikörpern gehemmt werden, die auch die β_2 -Mikroglobulin-unabhängige Form erkennen [120]. Solche Antikörper färbten in Studien über die CD1d-Expression von Milzzellen β_2 -Mikroglobulin-defizienter Mäuse aber nur einen sehr kleinen Anteil der B-Zellen (3%), die CD1d gering exprimierten, während unter T-Zellen keine CD1d positiven Zellen vorzufinden waren [132].

Demgegenüber ließ sich in Ja18-defizienten Mäusen, die durch ein Fehlen von Typ I-NKT-Zellen gekennzeichnet sind, eine normale CD1d-Expression feststellen [69].

Mäuse mit CD1d-Molekülen ohne zytoplasmatische Schwanz (trunkierte CD1d-Moleküle) zeigten aufgrund einer defekten Oberflächeninternalisierung sogar eine 1,5-fach erhöhte CD1d-Expression auf lymphatischen Zellen sowie eine Präsenz der invarianten Kette, aber Störungen der Antigenpräsentation, des intrazellulären Transports und der Typ I-NKT-Zellentwicklung. Dagegen wurden die Anzahl und die Autoreaktivität bestimmter Typ II-NKT-Zellen nicht beeinflusst, so dass die positive Selektion dieser Zellen wohl durch ein anderes Antigen erfolgt [133].

Vergleichbar mit Beobachtungen von MHC II-Molekülen scheint auch der zytoplasmatische Schwanz der CD1d-Moleküle an der Transduktion extrazellulärer Signale in intrazelluläre Reaktionen beteiligt zu sein [134].

CD1d-Expression und Typ I-NKT-Zellen in der Ratte

In der Ratte wurden per in situ Hybridisierung und Immunhistochemie mit einem CD1d-spezifischen polyklonalen Antiserum sowohl in den Zellen des lymphatischen Gewebes von Lymphknoten, Thymus und Milz als auch in Alveolarzellen, im Myokard, im Nierentubulus, in Enterozyten des Dünndarms und in Keratinozyten der Haut CD1d-mRNA und CD1d-Expression nachgewiesen [135]. Demnach scheint sich das CD1d-Vorkommen der Ratte dem des CD1d des Menschen zu ähneln. Untersuchungen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD1d-Moleküle der Ratte wurden noch nicht durchgeführt, da hierfür bisher noch kein geeigneter Antikörper zur Verfügung stand.

Die Produkte der CD1d-, V α 14-, und V β 8-Gene der Ratte und der Maus besitzen mehr als 80% gleiche Sequenzen. Doch entgegen der bidirektionalen Kreuzreaktivität zwischen Typ I-NKT-Zellen und CD1d-Molekülen von Mensch und Maus können Typ I-NKT-Zellen der F344-Ratte nicht durch α -GalCer-beladene Maus-CD1d-Tetramere markiert werden.

Im Gegensatz zur Maus besitzt die Ratte bis zu 10 verschiedene funktionelle V α 14-Gene, die anhand unterschiedlicher Sequenzen in der CDR-2-Region in 2 Typen mit gewebsspezifischen Vorkommen unterteilt werden können, wodurch die Typ I-NKT-Zellsubpopulationen noch variabler als diejenigen der Maus erscheinen. Typ 1-Gene wurden überwiegend von den TCR der intrahepatischen Lymphozyten (IHL) benutzt, während Typ 2-Gene vermehrt in der Milz, im Knochenmark und im Thymus festgestellt wurden [136]. Der Vergleich von NKR-P1A (Ratten-Homolog von NK1.1 der Maus) positiven T-Zellen mit NKT-Zellen der Maus hinsichtlich Phänotyp und Funktion deckte weitere Unterschiede auf, wodurch die äquivalente Bedeutung dieser Zellen in Frage gestellt wird. Denn NKR-P1A⁺ T-Zellen sind von geringerer Anzahl, zeigen meist einen CD8 $\alpha\beta$ -Phänotyp ohne bevorzugte V β -Benutzung und setzen nach Stimulierung mit Anti-CD3-Antikörpern in vitro INF- γ , aber kein IL-4 frei [137]. Dagegen produzieren IHL der F344-Ratte nach α -GalCer-Aktivierung Zytokine der T_H1- und der T_H2-Antwort, wobei die Menge von IL-4 nur 15% von der von Typ I-NKT-Zellen der Maus entsprach [25].

Dies deutet auf die Existenz typischer Typ I-NKT-Zellen hin, die höchstwahrscheinlich mit Hilfe von α -GalCer-beladenen Ratten-CD1d-Oligomeren untersucht werden kann, jedoch derzeit phänotypisch nicht nachweisbar ist.

Inwieweit die alleleischen Unterschiede des CD1d und der V β 8-Gene zwischen der Lewis(LEW)- und der Fischer(F344)-Ratte sich auf die α -GalCer-Reaktivität auswirken ist zurzeit unklar.

Apoptose und CICD

Apoptose ist als programmierter Zelltod essentiell für die normale Entwicklung mehrzelliger Organismen, die Regulierung der Gewebs-Homeostase und des physiologischen Zellumsatzes, für die Limitierung der Immunantwort und die Eliminierung transformierter Zellen. Eine Fehlfunktion dieser Mechanismen resultiert in Neoplasien oder Autoimmunkrankheiten. Ein Ziel der Tumorforschung ist es, kontrollierte Apoptose bei entarteten Zellen auszulösen.

Apoptose ist klassischerweise durch typische morphologische und biochemische Kennzeichen der betroffenen Zellen charakterisiert: Verdichtung des Chromatins, Fragmentierung des Zellkerns, DNA-Laddering, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Plasmamembran-Asymmetrie mit Ausbildung von Protrusionen, Verlagerung von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, Abhängigkeit von Caspasen.

Die Art der Signaltransduktion entscheidet über eine intrinsische oder extrinsische Form der Apoptose.

Der intrinsische oder mitochondriale Mechanismus wird durch Zellstress (DNA-Schädigung durch UV-/Röntgenstrahlen, zytotoxische Medikamente), Verlust der Zellkontakte, mangelnde Stimulierung durch pro-überlebende Faktoren (GH, TSH, ACTH) oder aufgrund der genetischen Kontrolle von Zellentwicklung und Gewebs-Homeostase ausgelöst. Er führt über eine Aktivierung von pro-apoptischen Proteinen (Bax, Bak im Gegensatz zu Bcl2) der Bcl2-Familie (und durch Calcium, Sauerstoffradikale ROS, p53) zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials („point of no return“) und zu einer gesteigerten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran. Die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Zwischenraum der Mitochondrienmembranen resultiert mit Hilfe verschiedener Faktoren und der Caspase-9 in der Formierung eines Apoptosoms, das sogenannte „ausführende Caspasen“ (unter anderem Caspase-3) aktiviert.

Dagegen induziert die Bindung von TNF oder FasL an ihre jeweiligen Todes-Rezeptoren (TNF-R, CD95/Fas) den extrinsischen Mechanismus und ermöglicht dem

Immunsystem eine selektive Entfernung von Zellen. Über eine Rekrutierung jeweiliger Adaptermoleküle und der Procaspase-8 wird die Caspase-8 aktiviert, die wiederum „ausführende Caspasen“ aktiviert. Einige Zellen benötigen für diesen Mechanismus noch die zusätzliche Freisetzung von Zytochrom C unter Vermittlung von BID und konsekutiver Aktivierung anderer pro-apoptotischer Proteinen, wodurch „ausführende Caspasen“ aktiviert werden.

Diese bewirken eine Degradation des Zytoskeletts sowie der nukleären Proteine. Aktivierte Endonukleasen spalten die DNA, deren Fragmente bei der DNA-Elektrophorese ein charakteristisches, aber nicht Apoptose-spezifisches, leiterartiges Muster (DNA-Laddering) ergeben.

Studien belegen, dass die „Initiator“-Caspasen-8 und -9 sowohl bei der intrinsischen als auch der extrinsischen Form entscheidend beteiligt sind [138].

Die Translokation von Phosphatidylserin von der Innenseite der Zellmembran an die Oberfläche sterbender Zellen und der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials sind Kennzeichen der frühen Phase der Apoptose.

Die Phosphatidylserin-Expression ermöglicht die Erkennung und Entfernung der Apoptosekörperchen durch Makrophagen, um eine Immunantwort und Entzündungsreaktion im Gegensatz zu vielen Formen der Nekrose zu verhindern. Die entstandenen Apoptosekörperchen sind entweder stark geschrumpfte Zellen oder deren Fragmente. Die zelloberflächenexprimierten Phosphatidylserine können durch Färbung mit fluochrommarkiertem Annexin V nachgewiesen werden.

Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials kann unter anderem durch den Marker DiOC₆(3) (3,3` Dihexyloxacarbocyaniniodid) dargestellt werden.

Der Caspasen-unabhängige Zelltod (CICD) wird durch die gleichen Signale, die Apoptose auslösen können, induziert. Allerdings geschieht dieser Prozess eben unabhängig von Caspasen (gehemmt durch Caspase-Inhibitoren oder genetisch bedingt), sondern wahrscheinlich unter Beteiligung des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF), der Endonuklease G und der Serinprotease HTRA2/OMI, die auch zur Apoptose beitragen können. Jedoch sind deren Unabhängigkeit von Caspasen und ihr Beitrag zum CICD noch nicht zuverlässig gesichert. Es wird vermutet, dass sie jeweils, vergleichbar mit Zytochrom C, nicht nur aufgrund einer gesteigerten Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran als Konsequenz des Funktionsverlustes der Mitochondrien freigesetzt werden. Außerdem konnten

Proteine der Bcl2-Familie (z. B. Bax) bei gesteigerter Expression auch unabhängig von Caspasen Effekte erzielen, die schließlich zum Zelltod führen. Es ist also wichtig zu wissen, wie der mutmaßliche CICD in den jeweiligen Studien untersucht und erklärt wurde.

Die morphologischen und biochemischen Kennzeichen der vom CICD betroffenen Zellen unterscheiden sich von denen apoptotischer Zellen, wobei sich erst spät deutliche Veränderungen feststellen lassen. Während beim CICD umliegende Zellen durch O₂-Radikale (ROS) zerstört werden, limitiert in apoptotischen Zellen ein Caspasen-abhängiger Mechanismus die mitochondriale Bildung von ROS [139].

Mehrere Studien berichten vom CICD menschlicher B- oder T-(Tumor-)Zellen, der durch die Bindung verschiedenster Oberflächenmarker (CD2, CD4, CD20, CD45, CD47, CD99, MHC I, MHC II), meist selektiv für einen Zelltyp oder Differenzierungsgrad (außer bei MHC II), ausgelöst werden konnte (zusammengefasst in [140]). Der Zelltod, der durch Bindung von Antikörpern an MHC II-Molekülen, besonders an HLA-DR, ausgelöst wird, ist hierunter der effektivste und der am meisten untersuchte.

Unter normalen physiologischen Bedingungen werden MHC II-Moleküle nur auf Zellen des Immunsystems exprimiert (B-Zellen, DC, Makrophagen, Langerhans-Zellen, aktivierte T-Zellen), jedoch induzieren infektiöse, autoimmune und neoplastische Zustände die Expression auf einer Vielzahl von Zellen.

Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass MHC II-Moleküle nicht nur Antigene präsentieren, sondern auch als Rezeptor fungieren können, um Signale in die Zelle zu transduzieren und unterschiedliche Effekte auszulösen. So kann die Bindung von MHC II durch bestimmte monoklonale Antikörper stimulierende oder inhibierende Effekte hinsichtlich Differenzierung oder Aktivierungsgrad nach sich ziehen und sogar Zelltod auslösen. Je nach Herkunft der APC und deren Aktivierungsgrad können manche Anti-MHC II-Antikörper, Superantigene oder CD4 durch Bindung von MHC II die Produktion von Zytokinen induzieren oder die Expression von verschiedenen Zellrezeptoren (GH-R, LFA-1, B7) modulieren.

Der MHC II-vermittelte Zelltod kann sehr wohl auf unterschiedlichen Wegen stattfinden, allerdings ist die Caspasen-unabhängige Form viel häufiger als z. B. die Induktion oder die erhöhte Empfänglichkeit für die Fas/FasL-Interaktion mit konsekutiver Abhängigkeit von Caspasen [141]. Deshalb bezieht sich die weitere Ausführung auf den MHC II-vermittelten CICD.

Anti-MHC II-Antikörper können durch Bindung der N-terminalen Domäne der α - oder der β -Kette Zelltod auslösen. Hierfür sind bivalente Interaktionen durch IgG-Antikörper ausreichend, wobei der Effekt durch kreuz-vernetzende Anti-Immunglobuline, gleichbedeutend einer multivalenten Interaktion von IgM-Antikörpern, gesteigert werden kann. Für die Signaltransduktion ins Zellinnere sind der zytoplasmatische Schwanz (vor allem der β -Kette), Isoenzyme der Proteinkinase C und weitere Faktoren erforderlich, die durch das Aktin-Zytoskelett organisiert werden. Welche der mitochondrialen Effektorproteine beteiligt sind, war lange unklar. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass AIF eine Rolle spielt [138]. AIF scheint früher als Zytocrom C freigesetzt zu werden, da bei schnellem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, wie z. B. durch Bindung von Anti-HLA-DR-Antikörpern oder beim schnellen Caspasen-unabhängigen Mechanismus des Granulysin zytotoxischer T-Zellen [142], Zytocrom C noch in den Mitochondrien zurückbleibt. Die Phosphatidylinositol-3-Kinase scheint aber im Gegensatz zum MHC I-vermittelten CICD von T-Zellen nicht beteiligt zu sein [143].

Der MHC II-vermittelte CICD ist schneller als klassische Apoptose (je nach Zelllinie 0,5 bis 4h) und ist durch einen raschen Zellzerfall (Annexin V⁺, PI⁺) gekennzeichnet, weshalb die Quantifizierung sterbender (Annexin V⁺, PI⁻) Zellen schwierig sein kann [144], [143].

Die morphologischen und biochemischen Kennzeichen dieses CICD sind: geringfügige Chromatinverdichtung, Verkleinerung des Zellkerns, nicht-oligosomale DNA-Fragmentierung (kein DNA-Laddering), Verlust des mitochondrialen Membranpotentials [145], [138], Verlagerung von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche, Unabhängigkeit von Caspase-3, -7, -8, -9, und BID (in B-Zellen und DC: [138], [146]). Einige dieser Kennzeichen können bei anders ausgelöstem CICD fehlen [140].

Die wenigen überlebenden Zellen zeigten nach in-vitro Antikörpergabe eine bis zu 90%ige MHC II-isotyp-spezifische Abnahme der MHC II-Expression und (LFA-1-abhängig und -unabhängig) homotypische Zell-Adhäsionen [147], [148]. Diese Zell-Adhäsionen scheinen unter DC durch Umgruppierung des Zytoskeletts dynamisch zu sein, da sie durch Zytocalasin D gehemmt werden konnten [145]. Der Grad an Zelladhäsionen der DC korrelierte mit der Effektivität des MHC II-vermittelten Zelltodes. Zwar konnten die zellulären Interaktionen alleine keinen Zelltod auslösen, jedoch scheinen sie im Menschen und in der Maus eine entscheidende Rolle in der

Induktion des Prozesses zu spielen, auch wenn in Untersuchungen keiner der gegen Adhäsionsmoleküle (LFA-1, ICAM-1/-2, α - β -Integrine, Lektine) gerichteten Antikörper den Zelltod gehemmt haben [146]. Diese Beobachtungen könnten auf eine physiologische Relevanz der Interaktion mit großflächigem Membrankontakt zwischen DC und T-Zellen sowie möglicher akzessorischer Signale hinweisen.

Allerdings gibt es Zellen wie unreife DC, Monozyten/Makrophagen, Stammzellen und ruhende B-Zellen, die relativ resistent gegen diese Art des Zelltodes sind. Dagegen zeigen aktivierte B- und T-Zellen, reife DC und maligne Zellen (MHC II positive Zellen der Lymphome, Leukämie, Plasmozytome) eine hohe Anfälligkeit, wobei sich die Zellen nicht in der Proliferationsphase befinden müssen. Somit scheinen Zellaktivierung und Intensität der Expression kostimulatorischer Moleküle Faktoren für die Empfänglichkeit für den MHC II-vermittelten Zelltod zu sein [144], [149].

Auch die MHC II-Expression von DC, die während der Reifung hochreguliert wird, korrelierte mit der Anfälligkeit für den MHC II-vermittelten Zelltod [146]. Jedoch wiesen einige empfängliche Tumor-B-Zelllinien eine geringere HLA-DR-Expression auf als eine bestimmte Non-Hodgkin-Lymphom(NHL)-B-Zelllinie, die nur nach Aktivierung mit INF γ oder LPS und konsekutivem Anstieg der Expression von HLA-DR und CD40 für diesen Prozess anfällig waren [144]. Demnach ist für eine Empfänglichkeit wohl nicht das Erreichen eines generellen Schwellenwertes, sondern die relative zelllinienspezifische Intensität der HLA-DR-Expression entscheidend.

Die Bindung von CD40 durch agonistische Anti-CD40-Antikörper führte zur kompletten Resistenz reifer DC der Maus gegen den MHC II-vermittelten Zelltod [145]. So könnte ein abnehmendes physiologisches CD40/CD40L-Signal, wie z. B. die Beendigung der Interaktion mit aktivierten T-Zellen, die Auslösung des Zelltods in DC ermöglichen. Demgegenüber gibt es Hinweise dafür, dass die Bindung mancher Anti-CD40-Antikörper oder von CD40L-spezifischen T-Zellen, die Fas-vermittelte Apoptose von inkomplett aktivierten B-Zellen erleichtert, während komplett aktivierte B-Zellen resistent sind [150].

Eine vermehrte Expression von Bcl2 reduzierte den HLA-DR-vermittelten Zelltod von B-Zellen deutlich, aber nicht komplett, weshalb Zellen des follikulären Lymphoms (Bcl2-Überexpression durch t(14,18) Translokation), eines der häufigsten NHL, in vitro vermindert auf Anti-HLA-DR-Antikörper ansprechen [144], [138]. Allerdings spricht der Anti-HLA-DR-Antikörper Hu1D10 (Apolizumab) auch in Patienten mit

follikulärem Lymphom an. Der HLA-DR-vermittelte Zelltod reifer DC kann hingegen nicht durch Bcl2-Überexpression gehemmt werden [146].

Es wurden Anti-HLA-DR-Antikörper des Menschen entwickelt, die durch eine selektive Eliminierung maligner B-/T-Zellen durch MHC II-vermittelten CICD therapeutisch genutzt werden können, wobei ruhende Zellen kaum beeinflusst werden. Selbst hohe Dosen erzeugen in Primaten keine irreversiblen hämatologischen Schäden. Zudem erfordern diese Antikörper durch ihre direkten Effekte keine zusätzlichen immunologischen Komponenten, was sie z. B. von dem zur Therapie von NHL eingesetzten Anti-CD20-Antikörper Rituximab unterscheidet. Zusätzlich scheint dieser die Funktion bzw. die Expression pro-apoptotischer Moleküle zu stimulieren und anti-apoptotischer Moleküle zu hemmen [144], [151].

Der Antikörper Apolizumab bindet eine polymorphe Determinante von HLA-DR, eine Variante der HLA-DR β -Kette (1D10), die ungefähr von 60% der B-Zell-Malignome exprimiert werden. Dieser monoklonale Antikörper erzielte in Phase 1-Studien bei Patienten mit NHL oder B-CLL (B-zelluläre chronisch lymphatische Leukämie) bei geringen Nebenwirkungen vereinzelt Tumorreduktion. Die Ergebnisse der Phase 2 waren jedoch enttäuschend, so dass der Fokus nun auf die Kombination von Apolizumab mit Rituximab oder G-CSF gerichtet ist [152].

Die aufgeführten Beobachtungen deuten darauf hin, dass der MHC II-vermittelte Zelltod vermutlich an der physiologischen Regulierung der DC-/Lymphozyten-Populationen beteiligt ist. Der Prozess beendet spezifische Interaktionen und Aktivierungen, wodurch die Immunantwort limitiert wird. Eventuell stellt dieser Mechanismus auch eine der Möglichkeiten dar, unspezifische Aktivierungen oder eine Dysregulierung auszugleichen.

Interessanterweise ist der MHC II-vermittelte Zelltod möglicherweise an der Pathogenese der Infektion durch *Helicobacter pylori* beteiligt. Die bakterielle Urease bindet MHC II-Moleküle, wodurch in den Magenschleimhautzellen Zelltod ausgelöst wird, die aufgrund der T_H1-Antwort vermehrt MHC II exprimieren [153].

Allerdings konnte die physiologische Relevanz des MHC II-vermittelten Zelltodes nach Bindung physiologischer Liganden, wie TCR und CD4, noch nicht eindeutig definiert werden. Erste Untersuchungen wiesen darauf hin, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen nach TCR-Antigen-Interaktion über MHC II und unter Beteiligung von CD2 eine verminderte Expression von MHC II auf APC induzieren [154]. Später konnte

demonstriert werden, dass die peptidspezifische Interaktion zwischen T-Zellen und B-Zellen Zelltod in letzteren auslöst [155]. Dagegen kann die Interaktion von T-Zellen mit unbeladenen B-Zellen oder mit B-Zellen, die mono-substituierte Peptide präsentieren, keinen Zelltod induzieren. Somit ist die Antigenpräsentation, die in einer T-Zellaktivierung resultiert, mit der Induktion des Zelltodes der APC koordiniert. Dieser physiologische Zelltod ist aber ein Caspasen-abhängiger Mechanismus mit Beteiligung der Caspase-8. Folglich unterscheidet sich dieser Prozess, der durch eine MHC II-restringierte Interaktion spezifischer T-Zellen vermittelt wird, vom Anti-MHC II-Antikörper-vermittelten CICD [155]. Demnach scheinen die untersuchten Antikörper die Effekte der zellulären Interaktion nicht ganz kopieren zu können. Neuere Studien berichten vom CICD bestimmter humaner Leukämie- [156] und Myelom-Zellen [157] nach Bindung von Anti-CD1d-Antikörpern. Dieser CD1d-vermittelte Zelltod schien dem MHC II-vermittelten Zelltod zu ähneln, so dass diese beiden Moleküle nicht nur die Funktion der Antigenpräsentation gemeinsam haben, sondern möglicherweise auch ähnliche Signale induzieren. Die erstmalige Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen das CD1d-Molekül der Ratte ermöglichte uns die Analyse antikörperinduzierter Effekte auf Ratten-CD1d positive Zellen.

Ziel dieser Arbeit

Um die Funktion und die Bedeutung von CD1d besser zu verstehen, müssen die Expressionslevel der verschiedenen Zellen und des gesunden Gewebes bekannt sein. Vor allem ist es von Bedeutung, die Zellen mit der höchsten CD1d-Expression zu identifizieren, da diese sehr wahrscheinlich mit CD1d-restringierten T-Zellen interagieren.

In der Maus wird, vergleichbar mit dem MHC II-Erkennungssystem, CD1d am stärksten von APC und konstitutiv mit geringerer Intensität von lymphatischen Zellen exprimiert. Die Intensität der CD1d-Expression variierte dabei sowohl innerhalb der lymphatischen Subpopulationen eines Gewebes als auch innerhalb der verschiedenen lymphatischen Gewebe. Bisher war unbekannt, inwieweit sich diese Beobachtungen auf die Ratte übertragen lassen.

Zur Untersuchung der CD1d-Expression in der Ratte wurden erstmalig Anti-CD1d-Antikörper entwickelt, die CD1d-Moleküle der Ratte erkennen können. Da einige

auch die CD1d-Moleküle der Maus färben, ist der direkte Vergleich dieser beiden Spezies möglich. Dieser Vergleich sollte für die CD1d-Expression der lymphatischen Gewebe der Lewis(LEW)-Ratte und der BALB/c-Maus durchgeführt werden. Da die LEW-Ratte ein anderes CD1d-Allel besitzt als die Fischer(F344)-Ratte, wurden auch diese miteinander verglichen, wobei für all diese Untersuchungen der Anti-CD1d-Antikörper 232 verwendet wurde, der CD1d-Moleküle von Ratte und Maus erkennt.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten Effekte verschiedener Anti-CD1d-Antikörper auf mit Ratten-CD1d transduzierten Zellen und auf primäre CD1d positive Zellen untersucht und z. T. mit denen von Anti-MHC II-Antikörpern verglichen werden. Dabei zeigten sich für die Antikörper 58/4 und 244/1 Effekte (Induktion von Zellaggregaten und Zelltod), die im Hinblick auf einer möglichen Anwendung von Anti-CD1d-Antikörpern in immunmodulatorischen oder zytostatischen Therapien bzw. einer physiologischen Bedeutung der CD1d-vermittelten Signaltransduktion analysiert wurden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Versuchstiere

Die Lewis-Ratten (LEW/Crl) und Fischer-Ratten (F344/NCrl) wurden, ausgehend von Zuchtpaaren des Zentralinstitutes für Versuchstierkunde (Hannover) und Charles River Deutschland (Sulzfeld), in den Tierställen des Institutes für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg gezüchtet.

BALB/c-Mäuse (BALB/c OlaHsd) wurden über die Firma Harlan-Winkelmann bestellt.

2.1.2. Zellen

Raji	humane Tumor-B-Zellen des Burkitt-Lymphoms
RJ 2.2.5	HLA-DR negative Raji-Zellen
A20	Zelllinie eines Maus-B-Zell-Lymphoms
M12	Zelllinie eines Maus-B-Zell-Lymphoms
M12D β	14-4-4s positive M12-Zellen
Wehi	Maus-Zelllinie einer B-Zell-Leukämie (Reifungsstadium entspricht dem von unreifen B-Zellen)
Jurkat	Zelllinie einer humanen T-Zell-Leukämie
BW	Zelllinie eines Maus-T-Zell-Lymphoms
C58	Zelllinie eines Ratten-T-Zell-Lymphoms
293T	Variante der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK) mit SV40 large T-Antigenen
P3/2	L929-Zellen, die mit HLA-DR1 transduziert waren
Milz-DC der Ratte	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Otto, ZOM, Universität Würzburg

2.1.3 Vektoren

pVSV-G	pCZVSV-G wt enthält env von Vesicular Stomatitis Virus (VSV)
--------	---

pHIT-60	pHIT60—CMV-MVV-gag-pol-SV40ori enthält gag und pol aus Moloney Murine Leukemia Virus (MoMLV) unter Kontrolle des humanen Cytomegalievirus (CMV)-Promoters
A1	enthält das anti-apoptotische Molekül A1 der Bcl2-Familie
Caspase-9dn	enthält ein Caspase-9 Molekül ohne funktionsfähiges katalytisches Zentrum, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. I. Berberich, Institut für Virologie und Immunbiologie Universität Würzburg
rCD1d	enthält Ratten-CD1d
rCD1d tru	enthält Ratten-CD1d-Molekül ohne zytoplasmatischen Schwanz
SFG-GFP	enthält Green Fluorescence Protein (GFP)

2.1.4 Serologische Reagenzien

mAk gegen Ratten- und Maus-CD1d:

232 (FITC-markiert, unkonjugiert, biotinyliert)	aus eigener Herstellung
58/4 (FITC-markiert, unkonjugiert)	aus eigener Herstellung
244/1 (unkonjugiert)	aus eigener Herstellung
35/24 (FITC-markiert)	aus eigener Herstellung

mAk gegen Ratten-Antigene:

$\alpha\beta$ -TCR (R73; FITC-markiert, unkonjugiert)	BD Pharmingen™
CD4 (OX35; FITC-markiert, unkonjugiert)	BD Pharmingen™
CD8 (G28, FITC-markiert, unkonjugiert)	BD Pharmingen™
CD2 (OX34, FITC-markiert)	BD Pharmingen™
CD45RC (OX22, PE-konjugiert)	BD Pharmingen™
CD45RA (OX33, PE-konjugiert)	BD Pharmingen™
unbekanntes CD (HIS57, biotinyliert)	BD Pharmingen™
RT1B (OX6, PE-konjugiert, biotinyliert)	BD Pharmingen™
CD11b/c (OX42, FITC-markiert, biotinyliert)	aus eigener Herstellung
CD103 (OX62, unkonjugiert)	BD Pharmingen™

mAk gegen Maus-Antigene:

$\alpha\beta$ -TCR (FITC-markiert)	BD Pharmingen™
CD3 (FITC-markiert)	BD Pharmingen™
CD4 (L3T4, FITC-markiert, PE-konjugiert)	BD Pharmingen™
CD8 α (Ly-2, PE-konjugiert)	BD Pharmingen™
CD11b (PE-konjugiert)	BD Pharmingen™
CD45R (B220, PE-konjugiert)	BD Pharmingen™

Sekundärantikörper und polyklonale Seren:

D α Mlg-PE (Esel-Anti-Maus-Ig, PE-konjugiert)	Dianova (Hamburg, D)
NMIg (Normales Maus-Ig)	Sigma (Deisenhofen, D)
Cy5-PE (Streptavidin mit Phycoerythrin gekoppelt)	BD Pharmingen™
FCS (Fötales Kälberserum)	Gibco (Eggenstein, D)
Rattenserum	aus eigener Herstellung

2.1.5 Chemikalien

Calciumchlorid CaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ethanol	Roth (Karlsruhe, D)
Etoposid	AG Berberich, Uni Würzburg
Isopropanol	Roth (Karlsruhe, D)
Natriumbutyrat	Sigma (Deisenhofen, D)
Penizillin	Gibco (Eggenstein, D)
Polybrene	Sigma (Deisenhofen, D)
Propidiumiodid	Sigma (Deisenhofen, D)
Streptomycin	Gibco (Eggenstein, D)
Tris-Ammoniumchlorid	Roth (Karlsruhe, D)
Trypanblau	Sigma (Deisenhofen, D)

2.1.6 Standardlösungen, Puffer und Medien

Zellkulturmedien, von Gibco BRL (Eggenstein, Deutschland):

RPMI 1640 L-Glutamin mit 50ml SC-Supplement

DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) mit 4500 mg/l Glukose, GlutaMAX™ I, Pyruvate, 10% FCS, Penicillin und Steptomycin

DMEM⁺ (Dulbecco`s Modified Eagle Medium) mit 4500 mg/l Glukose, GlutaMAX™ I, 25mM Hepes, Pyruvat, 10% FCS, Penicillin und Steptomycin

SC-Supplement (50ml für 500ml Zellkulturmedium):

	500ml	hitzeinaktiviertes FCS
	100ml	Natriumpyruvat 100mM
	100ml	nichtessentielle Aminosäuren
	100ml	Penizillin-Streptomycin (10000U/ml)
	5ml	β-Mercaptoethanol 50mM
	58,4ml	Glutaminlösung 5%
ATV:	0,05%	Trypsin
	0,02%	EDTA in PBS
BSS:	125ml	BSS I
	125ml	BSS II
	750ml	destilliertes Wasser
BSS I:	50g	Glukose
	3g	KH ₂ PO ₄
	11,9g	NaH ₂ PO ₄
	0,4g	Phenolrot
	5l	destilliertes Wasser
BSS II:	9,25g	CaCl ₂
	20g	KCl
	320g	NaCl
	10g	MgCl ₂
	10g	MgSO ₄
	5l	destilliertes Wasser

BSS/BSA:	0,2%	BSA in BSS
2xHBS:	50mM	Hepes pH 7,05
	10mM	KCl
	12mM	Glukose
	280mM	NaCl
	1,5mM	NaH ₂ PO ₄
PBS (Phosphat bovine saline):	4mM	KH ₂ PO ₄
	16mM	NaH ₂ PO ₄
	115mM	CaCl ₂
	pH 7,3	
PBS/BSA/ NaN ₃ :	0,1%	BSA
	0,01%	NaN ₃
		in PBS
TAC (Tris-Ammoniumchlorid):	20mM	Tris pH 7,2
	0,83%	NH ₄ Cl

2.1.7 Gerätschaften

Durchflusszytometer "FACScan II"	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)
Cellsorter FACS vantage	Becton Dickinson (San Jose, CA, USA)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung von Zellen

Die Zelllinien wurden mit Ausnahme von 293T-Zellen in RPMI+SC bei 37°C und 5% CO₂ in einer H₂O-gesättigten Atmosphäre in üblichen Plastik-Zellkulturgefäßen kultiviert. Zur Expansion oder Passagierung der Zellen wurden sie mit einer Pipette resuspendiert und in ein neues Kulturgefäß mit Medium transferiert. Adhärente Zelllinien wie 293T oder P3/2 wurden mit einem kleinen Volumen von ATV-Lösung bedeckt. Die Ablösung der Zellen wurde mit dem Mikroskop kontrolliert. Nach Überführung der Zellen in BSS/BSA und Zentrifugation für 6min bei 1600rpm konnten sie im entsprechenden Medium resuspendiert und kultiviert werden.

Die Anzahl lebender Zellen in einer Kultur wurde durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Da der Farbstoff nur tote Zellen anfärbt, konnten diese unter dem Lichtmikroskop leicht von lebenden Zellen unterschieden werden. Die Verwendung der Neubauer-Zählkammer ermöglichte die Ermittlung der ungefähren Zellzahl.

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zelllinien wurden bei -140°C in einer Gefriertruhe aufbewahrt. Um die Bildung von zellzerstörenden Kristallen beim Einfrieren weitgehend zu vermeiden, wurden 10⁶ Zellen in Einfriermedium (50% FCS, 40% RPMI, 10% DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen auf -80°C gebracht und dann in die -140°C-Gefriertruhe überführt. Zum Auftauen der Zelllinien wurden sie in ein möglichst großes Volumen an BSS/BSA aufgenommen und 6min bei 1600rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in RPMI resuspendiert und im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

2.2.3 Isolierung primärer Zellen

Die Versuchstiere wurden durch CO₂-Begasung getötet und je nach Bedarf Thymus, Milz und Lymphknoten (cervical, axillär, inguinal und mesenterial) entnommen und umgehend durch kleine Metallsiebe in eine Petrischale mit kaltem BSS/BSA gerieben. Die Zellsuspensionen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt, damit gröbere Gewebesteile sedimentieren. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen

pipettiert und zentrifugiert (6min, 1600rpm). Dann konnte das Pellet in Medium oder Puffer resuspendiert werden, so dass die Zellzählung und Immunfluoreszenz-Färbungen erfolgen konnten.

Die in der Milz zahlreich enthaltenden Erythrozyten wurden durch eine 10-minütige Inkubation mit Tris-Ammoniumchlorid (TAC) bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit BSS/BSA gewaschen.

2.2.4 Immunfluoreszenzanalyse im Durchflusszytometer (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann die Expression von zellulären Oberflächenantigenen quantitativ erfasst werden. In den hierfür verwendeten FACScan II-Gerät (Becton Dickinson, Heidelberg) werden Zellen durch ein Laserstrahl geleitet und dabei Farbstoffe, die über Antikörper an die Zelle gekoppelt sind, zur Fluoreszenz angeregt. Neben drei verschiedenen Wellenlängen kann das Gerät die Größe der Zellen (Forward Scatter) und die Granularität (Side Scatter) messen.

Zur Registrierung der Marker primärer Zellen wurden bis zu 100000 Zellen gemessen, wobei mit Hilfe eines sogenannten Fensters (gate) ausschließlich lebende Zellen berücksichtigt wurden. Die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurde anhand der Parameter Größe und Granularität getroffen.

Zur Untersuchung eines möglichen antikörperinduzierten Zelltods wurden 5000-20000 Zellen gemessen und dementsprechend auch tote Zellen berücksichtigt.

Die Auswertung der aufgenommenen Daten erfolgte anhand eindimensionaler Histogramme oder zweidimensionaler Dot-Plots unter Verwendung des Programms Cell Quest.

Pro Ansatz wurden $1-5 \times 10^5$ Zellen gefärbt. Das Färbeprotokoll variierte mit der Anzahl und der Art der verwendeten monoklonalen Antikörper.

Die Analyse von drei Oberflächenantigenen mittels Dreifarbenimmunfluoreszenz wurde wie folgt durchgeführt:

1. Zugabe des unkonjugierten 1. Ak oder des PE(Phycoerythrin)-konjugierten 1. Ak
2. Waschen
3. Zugabe von DaMlg-PE in die Proben mit unkonjugiertem Ak
4. Waschen

5. Zugabe von MNlg (Normales Maus Ig) zur Blockade von F_C-Rezeptoren sowie freien Bindungsstellen an DaMIg-PE; nicht waschen
6. Zugabe des biotinylierten 2. Ak
7. Waschen
8. Zugabe des FITC(Fluoresceinisothiocyanat)-markierten 3. Ak
9. Waschen
10. Zugabe von Streptavidin-PE (Cy5-PE) zur Darstellung biotinylierter Ak
11. Waschen und FACS-Analyse

Die Ak wurden jeweils in FACS-Röhrchen für 25min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Der Waschvorgang sollte überschüssige Ak entfernen und bestand aus der Zugabe von 3-4ml FACS-Puffer (0,1% BSA; 0,01% Na-Azid in PBS) und anschließender Zentrifugation (8min, 1600rpm).

2.2.5 Anreicherung von Zellpopulationen durch fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)

Zunächst wurden die zu sortierenden Zellen in möglichst großer Anzahl entsprechend dem Protokoll für Immunfluoreszenzanalyse (2.2.4) mit dem Antikörper inkubiert, der das Oberflächenantigen der gewünschten Zellpopulation markiert. Die Durchflussgeschwindigkeit des FACS-Gerätes ist so eingestellt, dass sich in jedem den Laserstrahl passierenden Tropfen nur eine Zelle befindet. Weist diese Zelle den an einen Farbstoff gekoppelten Oberflächenmarker auf, wird der Tropfen in ein Sammelgefäß umgelenkt. Die Sortierung erfolgte direkt in das für die Zellen geeignete Medium, so dass die angereicherten Zellen sofort in Kultur genommen werden konnten. Hierfür musste der Einsatz steriler Antikörper und das Arbeiten unter sterilen Bedingungen eingehalten werden.

2.2.6 Induktion und Untersuchung von Zelltod und Aggregatbildung

Zur Induktion und Untersuchung von Zelltod und Aggregatbildung wurden 1×10^5 rCD1d⁺ Transduktanten in 100µl RPMI plus HEPES 25mM (pH 7,15) mit Antikörpern inkubiert, die auf signalinduzierende Effekte getestet werden sollten.

So wurden z. B. rCD1d⁺ Raji-Zellen mit 5µl 58/4 (0,5µl/ml) in FACS-Röhrchen für 1-5 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation folgte kein

Waschvorgang, sondern die direkte Färbung toter Zellen mit 10µl Propidiumiodid (0,1mg/ml) und nach 30sec Warten unmittelbar die FACS-Analyse.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Transduktion von Genen in eukaryotische Zellen durch virale Vektoren

Mittels Kalziumphosphat-Präzipitation werden in die Verpackungszelllinie 293T Plasmide transfiziert, die die für die Virusproduktion notwendigen Elemente gag (kodiert ein gruppenspezifisches Antigen), pol (kodiert eine Polymerase), und env (kodiert ein Hüllprotein) sowie das sogenannte „gene of interest“, dessen Genprodukt letztendlich zur Expression gebracht werden soll, enthalten. Nachdem die Zielzelle mit virushaltigem Überstand der Verpackungszelllinie infiziert wurde, wird das „gen of interest“ in das Ziel-Genom eingebaut und exprimiert. Wenn es sich dabei um ein Gen handelt, das ein Oberflächenmolekül kodiert, kann die Expression permanent auf der Zelloberfläche u. a. mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden. Während gag und pol retrovirale Gene des Moloney Murine Leukemia Virus sind, entstammt env dem Vesicular Stomatitis Virus (VSV). Das gebildete Virus besteht folglich aus einem retroviralen Genom in einem VSV-Kapsid [158], [159].

Je 5µg der Plasmide (pHIT60 mit gag und pol, pVSV mit env und der entsprechende Vektor mit dem „gen of interest“) wurden mit 500µl Iso-propanol präzipitiert (30-minütige Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit bei 4°C), durch Waschen mit 70% Ethanol sterilisiert (erneut 30-minütige Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit bei 4°C) und in trockenem Zustand in 100µl destilliertem Wasser aufgenommen. Die DNA kann am nächsten Tag (Lagerung bei 4°C) oder später (Lagerung bei -20°C) verwendet werden.

Tag1:

$1,5 \times 10^6$ 293T Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 6cm Durchmesser in 5ml DMEM⁺ (10% FCS, je 100µg/ml Penizillin und Streptavidin, plus Hepes) kultiviert. Um eine effiziente Transfektion zu erzielen, sollte die Zellsuspension gleichmäßig in der Schale verteilt werden.

Tag2: Transfektion

Es folgte ein vorsichtiger Austausch des Mediums mit DMEM ohne HEPES, da im DMEM⁺ enthaltendes HEPES den für die Präzipitatbildung kritischen pH beeinflussen würde. Zu den Röhrchen mit der DNA wurden 338µl destilliertes Wasser und 62µl 2M CaCl₂ gegeben (Endvolumen 500µl). Danach wurden die Plasmidansätze einem mit 500µl 2xHBS (pH 7,1) enthaltenden sterilen Röhrchen unter Blasenbildung beigefügt. Direkt anschließend musste dieses Präzipitat gleichmäßig auf die Kulturschale der 293T Zellen getropft und durch leichtes Schwenken mit dem Medium vermischt werden. Nun folgte die Inkubation der Kultur für 6-8 Stunden bei 37°C, 5% CO₂. Nach einem vorsichtigen Waschvorgang mit 3ml vorgewärmtem PBS wurden die Zellen über Nacht in 5ml DMEM⁺ bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Tag3:

Das Medium wurde erneut vorsichtig abgenommen, um die Zellen mit 5ml DMEM⁺ zu kultivieren, dem 10mM Natriumbutyrat zugegeben worden waren. Natriumbutyrat aktiviert den CMV-Promoter der viralen Plasmide, der durch Induktion der Expression zu einer Erhöhung des Virustiters führt. Nach 6-8-stündiger Inkubation und erneutem Waschvorgang mit DMEM⁺ wurden die Zellen über Nacht in 5ml DMEM⁺ bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert.

Tag4: Infektion

Die Zelllinien, die infiziert werden sollen, wurden in 12-well-Platten überführt (1x10⁵ Zellen pro 0,5ml Medium). Der virushaltige Überstand wurde abgenommen, durch einen 0,45µm großen Spritzenaufsatzfilter in ein 15ml-Röhrchen filtriert und mit 4µg/ml Polybren versetzt. Mit dieser Suspension erfolgte die Infektion der Zelllinien, wobei das Endvolumen pro well nicht 3ml überschreiten sollte. Nach einer 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen in den Kulturplatten 3 Stunden zentrifugiert (37°C, 2000rpm), um nach einer erneuten 30-minütigen Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und Entfernung der viralen Suspension in 3ml RPMI kultiviert zu werden.

Frühestens 2 Tage nach Infektion wurden die Zelllinien durch Immunfluoreszenzanalyse im Durchflusszytometer auf die Expression des transduzierten Gens getestet.

3. ERGEBNISSE

3.1 CD1d-Expression

Ausgangspunkt der Arbeit waren erstmals generierte, gegen das CD1d-Molekül der Ratte gerichtete monoklonale Antikörper. Einige dieser Antikörper reagierten sowohl mit Ratten- als auch mit Maus-CD1d, so dass der direkte Vergleich der CD1d-Expression dieser beiden Spezies möglich war. Der 58/4-Antikörper bindet CD1d, das von primären Ratten-, aber nicht von primären Mauszellen exprimiert wird, und schien etwas besser zu färben als der 232-Antikörper, der CD1d sowohl auf primären Maus- als auch auf primären Rattenzellen erkennt. Beide Antikörper wurden ursprünglich als Maus-IgG2b typisiert, spätere Untersuchungen ergaben jedoch IgG2a als korrekten Isotyp. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit IgG2b-Antikörper als isotypspezifische Kontrolle verwendet.

Zur Beurteilung der CD1d-Expression der Ratte wurden mehrere Immunfluoreszenzmehrfachfärbungen verwendet. Es standen 3 Methoden zur Verfügung: FITC-markierte 232-Antikörper (Fluoreszenz = FL1), unkonjugierte 232-Antikörper mit sekundärem PE-Antikörper (FL2) und biotinylierte 232-Antikörper mit sekundärem SA-PE-Antikörper (FL3). Die stärkste Färbung wurde mit biotinylierten 232-Antikörpern und sekundärem SA-PE-Antikörper erzielt. Hierdurch ließen sich die verschieden starken, CD1d positiven Populationen aufgrund einer breiteren Expressionskurve im CD1d-Histogramm am besten abgrenzen.

Ein wichtiges Ziel der nachfolgenden Experimente war ein erster Vergleich der CD1d-Expression der verschiedenen lymphatischen Organe der Spezies Ratte und Maus, der keine detaillierte statistisch valide Quantifizierung erforderte. Allerdings konnte eine erstaunliche Übereinstimmung zwischen den verschiedenen Experimenten beobachtet werden.

3.1.1 Färbungen des LEW-Thymus

Es wurden mehrere Färbungen durchgeführt, um verschiedene Populationen des LEW-Thymus zu identifizieren (s. Tab. 1) und deren CD1d-Expression zu bestimmen.

Dadurch sollte herausgefunden werden, welche Populationen des Thymus CD1d vermindert oder erhöht gegenüber dem Großteil der Thymozyten exprimieren.

Thymus	TCR-	CD4+/ CD8+	CD4+/ CD8-	CD8+/ CD4-	OX22+	CD2+	OX6++	OX42+
LEW	5%	82%	6%	7%	1-2%	95- 97%	0,4%	0,2%
BALB/c	4%	81%	8%	5%	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht	nicht untersucht

Tab. 1. Verschiedene Populationen des LEW- und des BALB/c-Thymus. Zur Beurteilung prozentualer Anteile der Populationen an der Gesamtheit der untersuchten Zellen wurden entsprechende Gates in den Dotplot-Diagrammen der später beschriebenen Färbungen gesetzt.

3.1.1.1 CD1d-Expression des LEW-Thymus in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression

Bis auf wenige Ausnahmen waren alle Thymozyten der LEW-Ratte CD1d positiv. Besonders ein Teil der TCRstark⁺ Thymozyten wies nur eine geringe oder gar keine CD1d-Expression auf. Dies war am besten im Dotplot-Diagramm der TCR/CD1d-Färbung zu erkennen (s. Abb. 1a). Auch unter TCR negativen sowie unter TCRschwach⁺ Thymozyten gab es solche Zellen, wobei einige von Letzteren eher noch zu TCR negativen Thymozyten gehörten (s. Abb. 1b).

Die CD4/CD8/CD1d-Färbung (s. Abb. 1c) deutete darauf hin, dass sich unter den Zellen mit verminderter CD1d-Expression besonders DP Thymozyten und mehr CD8⁺/CD4⁻ als CD4⁺/CD8⁻ Thymozyten befanden. Der MFI-Wert (mean fluorescence intensity) dieser Populationen lag jeweils im Bereich von 6-10.

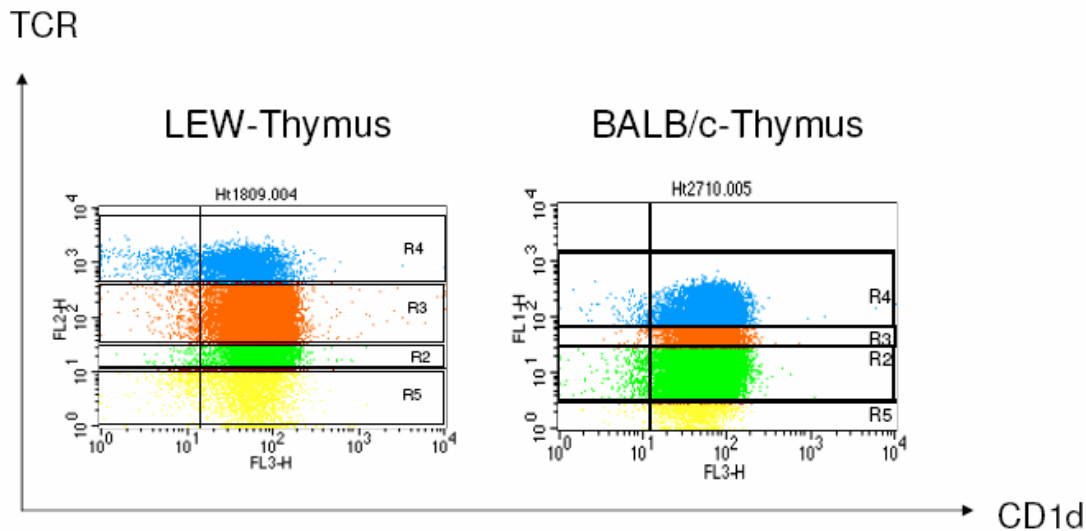


Abb. 1a. FACS-Analyse isolierter Zellen des Thymus auf Expression von CD1d und TCR. Thymozyten der LEW-Ratte und der BALB/c-Maus wurden mit einem gegen $\alpha\beta$ -TCR (R73 unkonjugiert) gerichteten mAk und einem biotinylierten mAk gegen CD1d (232) gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Bei der Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die anhand der Parameter Größe und Granularität als Lymphozyten eingestuft wurden. Zur Beurteilung der CD1d-Expression in Abhängigkeit der TCR-Expression wurden in den Dotplot-Diagrammen entsprechende Gates gesetzt.

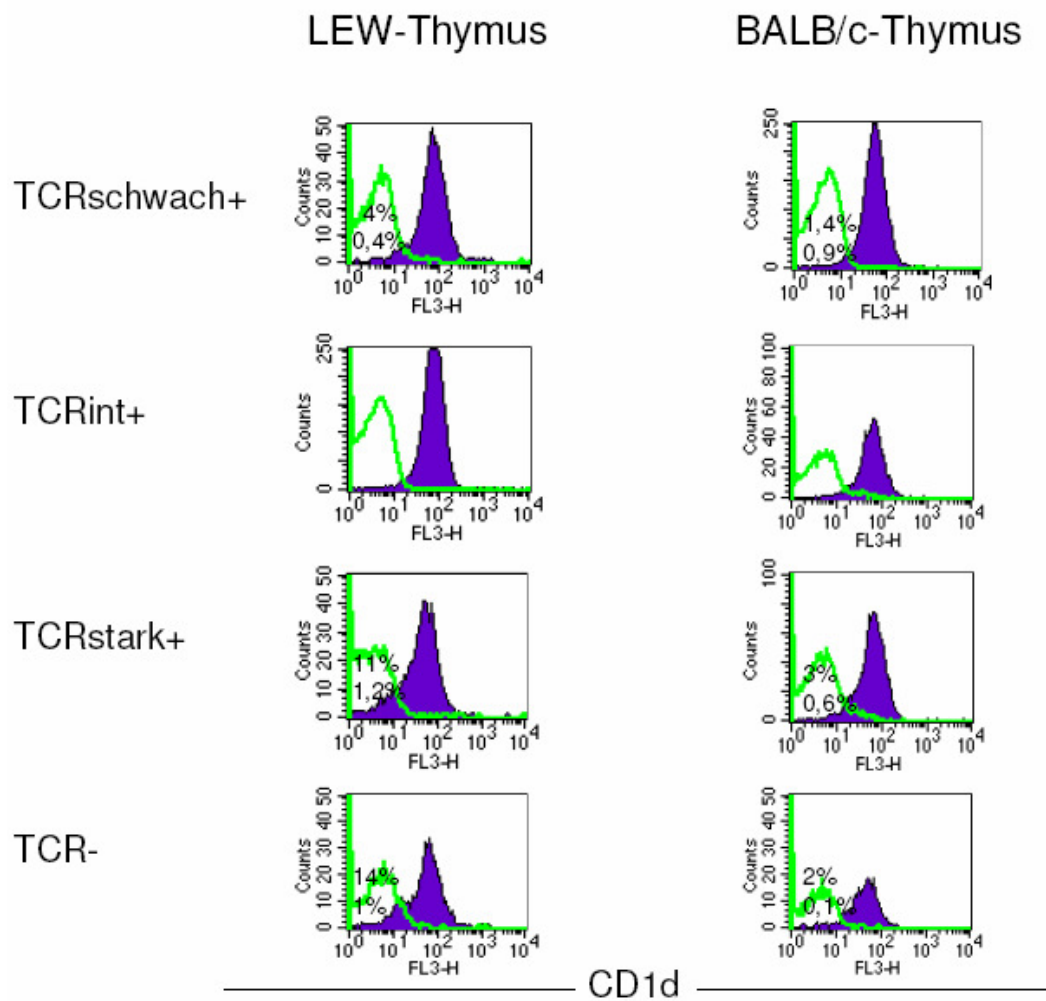


Abb. 1b. CD1d-Expression von LEW- und BALB/c-Thymozyten in Abhängigkeit der TCR-Expression. In den Histogrammen sind verschieden stark TCR positive bzw. TCR negative Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation mit verminderter CD1d-Expression an der jeweiligen TCR positiven bzw. negativen Population (oberer Wert) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (unterer Wert).

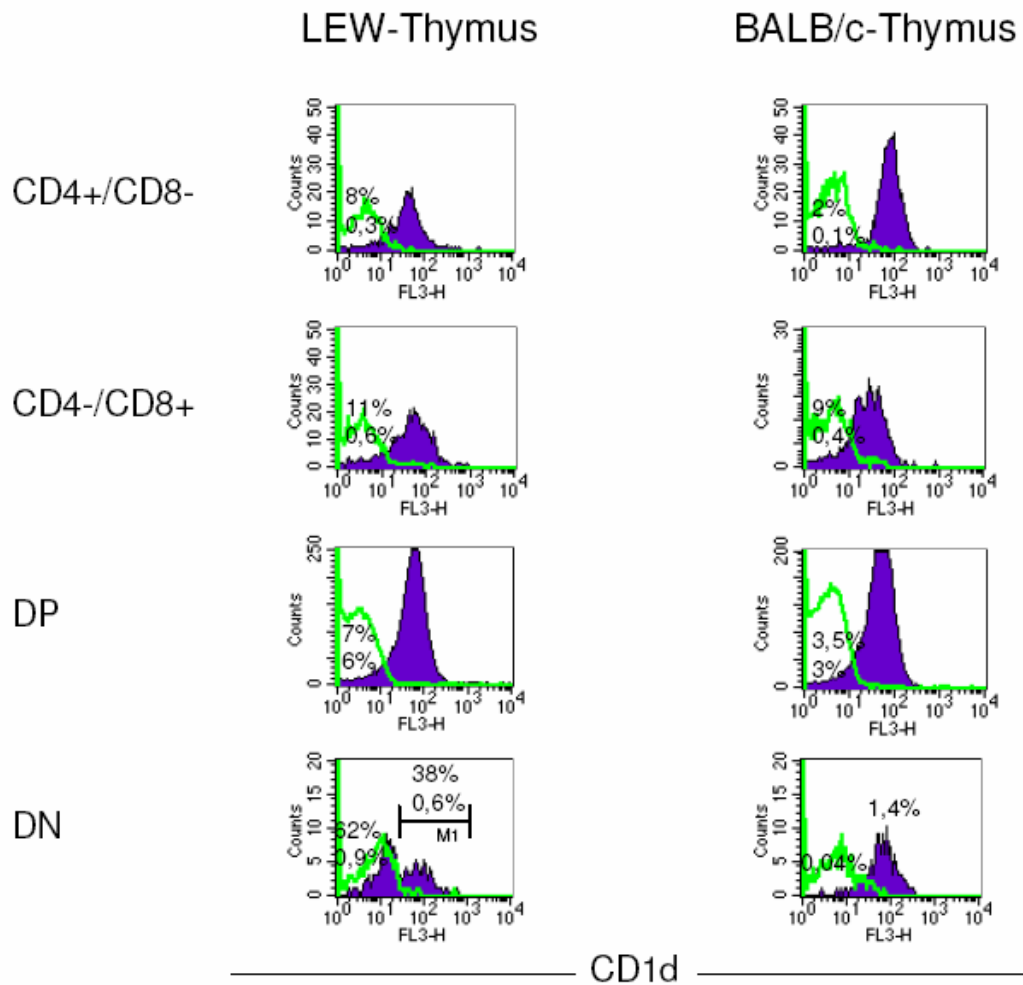


Abb. 1c. CD1d-Expression von LEW- und BALB/c-Thymozyten in Abhängigkeit der CD4- und CD8-Expression. In den Histogrammen sind CD4 und/oder CD8 positive bzw. doppelt negative Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation an der jeweiligen CD4 und/oder CD8 positiven bzw. negativen Population (oberer Wert) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (unterer oder alleiniger Wert).

Thymus MFI CD1d FL3	TCR-	TCR schwach+	TCR int+	TCR stark+	CD4+/ CD8+	CD4+/ CD8-	CD8+/ CD4-
LEW	73	79	76	58	61	47	64
BALB/c	47	57	64	69	51	80	36

Tab. 2. Vergleich der CD1d-Expression bestimmter Populationen des LEW- und BALB/c-Thymus. Es wurden nur MFI-Werte (mean fluorescence intensity) der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) des Hauptteils der gefärbten Population abgebildet, also kleinere Populationen mit verminderter bzw. erhöhter CD1d-Expression werden nicht gezeigt. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten TCR/CD1d- und CD4/CD8/CD1d-Färbungen.

Die Intensität der CD1d-Expression des Hauptteils TCR negativer Thymozyten war nur etwas geringer als die von TCRschwach⁺ und TCRint⁺ Thymozyten, aber höher als die von TCRstark⁺ Thymozyten (s. Tab. 2). Der Hauptteil der CD8⁺ Thymozyten exprimierte CD1d mit ähnlicher Intensität wie DP Thymozyten und stärker als CD4⁺ Thymozyten, jedoch geringer als CD1d⁺/DN Thymozyten (s. Tab. 2).

In den Dotplot-Diagrammen und Histogrammen der TCR/CD1d-Färbung ließen sich nur sehr kleine Populationen mit erhöhter CD1d-Expression abgrenzen. Weitere Färbungen deckten auf, dass es sich hierbei wohl um OX6stark⁺ und/oder OX42⁺ Zellen, wie z. B. DC, handelt (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.2 CD1d-Expression von DN Thymozyten der LEW-Ratte

1,5% der Thymozyten waren sowohl CD4 als auch CD8 negativ (1,2-1,7% in anderen Versuchen). Sie werden deshalb als doppelt negativ (DN) bezeichnet. Von diesen waren knapp zwei Drittel CD1d negativ (s. Abb. 1c).

DN Thymozyten durchlaufen bestimmte Differenzierungsstadien, bis sie ihren TCR und die Korezeptoren CD4 und CD8 erwerben. Eine Methode zur Identifizierung dieser Entwicklungsschritte ist die Bestimmung der Expression von CD2 und CD45RC, die sich in der Abfolge CD45RC⁺/CD2⁻ → CD45RC⁺/CD2⁺ → CD45RC⁻

/CD2⁺ verändert. Je nach Rattenstamm unterscheiden sich die prozentualen Anteile dieser Populationen [160].

CD2 wird von den meisten T-Zellen, bestimmten NK-Zellen und DC exprimiert. Es trägt zur Adhäsion zwischen diesen Zellen und APC bei und verstärkt so die Aktivierungssignale. Der monoklonale Antikörper OX22 erkennt ein Ratten-Epitop des LCA, CD45RC, das von den meisten peripheren T- und B-Zellen exprimiert wird. Der erneute Erwerb dieses Oberflächenmoleküls erfolgt vermutlich kurz vor Verlassen des Thymus oder in der Peripherie.

Der Zeitpunkt der Expression von CD1d könnte neue Informationen zur Differenzierung von Thymozyten liefern.

So zeigte sich in einer weiteren Färbung, dass drei Viertel der DN Thymozyten nicht durch OX22 markiert wurden. Diese waren wiederum zu zwei Drittel CD1d negativ und zu einem Drittel CD1d positiv (s. Abb. 2, Tab. 3). OX22⁺/DN Thymozyten, die das restliche Viertel der DN Thymozyten repräsentierten, waren CD1d positiv.

Im Vergleich zu anderen Rattenstämmen stellte der Anteil an CD2⁺ DN Thymozyten in der LEW-Ratte ebenfalls die Mehrheit dar, jedoch war der Anteil an OX22⁺ DN Thymozyten noch kleiner. Die Gesamtzahl der OX22 positiven Zellen war aber nur etwas geringer.

In der CD2/CD4/CD8/CD1d-Färbung ließ sich erkennen, dass die CD1d negativen DN Thymozyten kein CD2, aber die CD1d positiven DN Thymozyten CD2 exprimierten. Somit schien die CD1d-Expression der DN Thymozyten des LEW-Thymus mit der CD2-Expression zu korrelieren.

Die CD1d negative Population der CD2⁻/DN Thymozyten zeigte einen identischen Kurvenverlauf im Histogramm wie die Isotypkontrolle. Dies konnte in TCR/CD1d-, CD4/CD8/CD1d- und OX22/CD4/CD8/CD1d-Färbungen jeweils nicht beobachtet werden.

Allerdings scheiterte der Versuch diese OX22⁻/CD2⁻/CD1d⁻/DN Thymus-Population mit OX1, einem Anti-CD45-Antikörper, zu färben.

Daher bleibt unklar, ob es sich bei diesen Zellen überhaupt um Thymozyten handelt.

LEW-Thymus

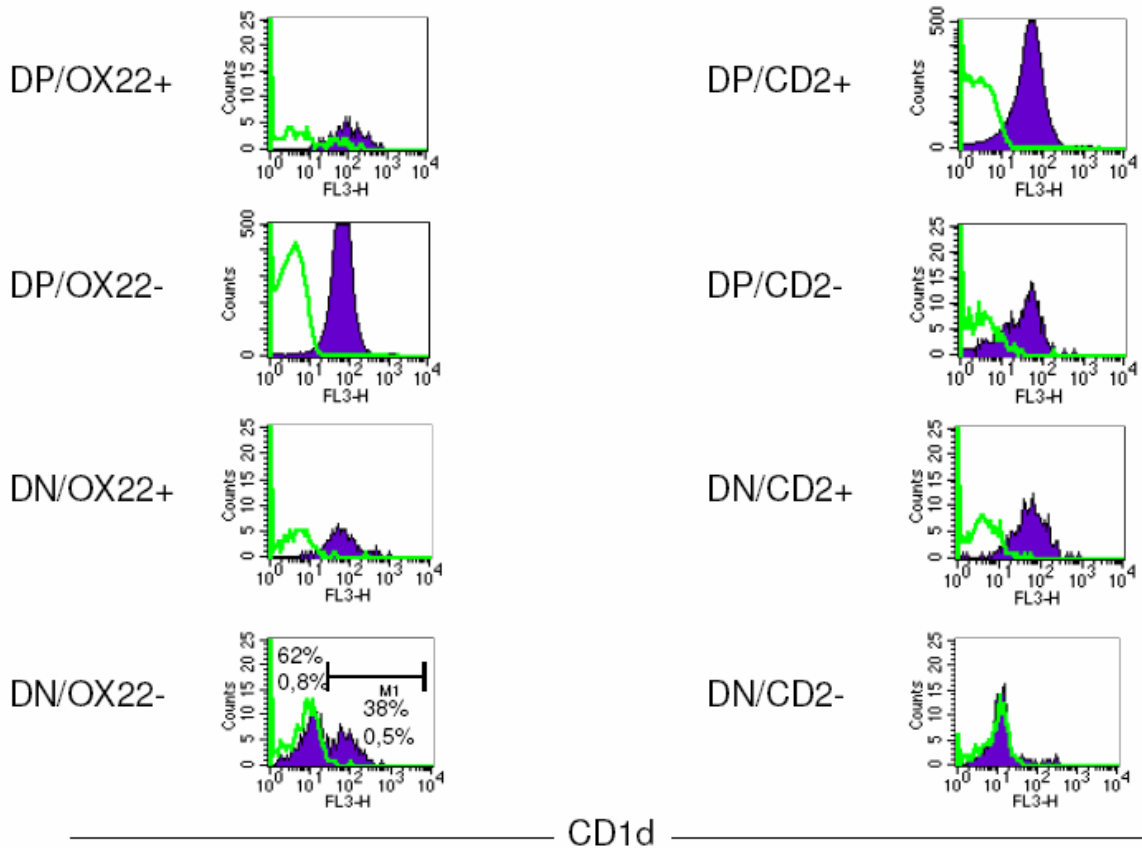


Abb. 2. CD1d-Expression von DN oder DP LEW-Thymozyten in Abhängigkeit der CD2- und OX22-Expression. In den Histogrammen sind doppelt negative und doppelt positive Populationen mit oder ohne CD2- bzw. OX22-Expression als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation an der OX22 negativen DN-Population (oberer Wert) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (unterer Wert).

LEW	DN/ OX22-/ CD1d-	DN/ OX22-/ CD1d+	DN/ OX22+	DN/ CD2+	DN/ CD2-	DP/ OX22+	DP/ CD2-
% aller Thymozyten	0,8	0,5	0,4	1,0	0,7	0,35	1,3
MFI CD1d FL3	11	84	69	63	12	118	46

Tab. 3. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl bestimmter DN und DP Populationen des LEW-Thymus. Es wurden nur MFI-Werte der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) des Hauptteils der gefärbten Population sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen abgebildet. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten CD4/CD8/CD2/CD1d- und CD4/CD8/OX22/CD1d-Färbung.

Der Großteil der Thymozyten hatte wie erwartet einen CD45RC(OX22)⁻, CD2⁺, DP Phänotyp mit einer CD1d-Expression im Bereich aus vorherigen Färbungen.

Erneut gab es vor allem unter OX22⁻/CD2⁺/TCRstark⁺/DP Thymozyten Zellen, die CD1d schwach oder gar nicht exprimierten, aber je nach Färbung in unterschiedlicher Anzahl dargestellt wurden.

Interessanterweise wurde eine sehr kleine DP Thymus-Population mit OX22 markiert, die CD1d sogar verstärkt exprimierte (s. Tab. 3). Des Weiteren stellte sich eine kleine Gruppe DP/CD2⁻ Thymozyten dar, von denen ein geringer Teil CD1d vermindert exprimierte (s. Abb. 2).

3.1.2 Färbungen des BALB/c-Thymus

Auch mit den isolierten Zellen des BALB/c-Thymus wurden mehrere Färbungen durchgeführt, um verschiedene Populationen zu identifizieren (s. Tab. 1) und deren CD1d-Expression zu bestimmen. Da der gleiche monoklonale Anti-CD1d-Antikörper verwendet werden konnte wie bei den LEW-Färbungen, ist erstmals ein direkter Vergleich dieser beiden Spezies möglich.

3.1.2.1 CD1d-Expression des BALB/c-Thymus in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression

Der Anteil CD1d positiver Zellen war im BALB/c-Thymus noch größer als im LEW-Thymus. Denn unter TCRstark⁺ Thymozyten des BALB/c-Thymus waren sowohl im CD1d-Histogramm (s. Abb. 1b) als auch im Dotplot-Diagramm der TCR/CD1d-Färbung (s. Abb. 1a) weniger Zellen zu erkennen, die CD1d nicht oder nur schwach exprimierten. Dagegen gab es unter TCRschwach⁺ Thymozyten etwas mehr Zellen mit verminderter CD1d-Expression. Allerdings ist die Bestimmung der verschiedenen

starken TCR positiven Populationen und damit der Vergleich der prozentualen Anteile mit denen des LEW-Thymus schwierig, da die TCR-Färbung in den beiden Spezies unterschiedlich sensitiv war.

Die CD4/CD8/CD1d-Färbung deutete darauf hin, dass sich unter den Zellen mit verminderter CD1d-Expression vergleichbar mit dem LEW-Thymus besonders DP Thymozyten und mehr CD8⁺/CD4⁻ als CD4⁺/CD8⁻ Thymozyten befanden (s. Abb. 1c). Die Zellen des BALB/c-Thymus exprimierten CD1d etwas schwächer als die Zellen des LEW-Thymus (s. Tab. 2). Da die CD1d-Expression des Hauptteils der Populationen mit zunehmender TCR-Expression stieg (s. Tab. 2), korrelierte die CD1d-Expression in der TCR/CD1d-Färbung mit der TCR-Expression. In den anderen Geweben lag die CD1d-Expression des Hauptteils TCR negativer Zellen jeweils oberhalb der des Hauptteils TCR positiver Zellen.

Im Gegensatz zur LEW-Ratte exprimierten CD4⁺ Thymozyten stärker CD1d als CD8⁺ und DP Thymozyten. Die Intensität der CD1d-Expression von CD4⁺ Thymozyten lag doppelt so hoch wie die von CD8⁺ Thymozyten und höher als die von DP Thymozyten, aber im Bereich der von DN Thymozyten (s. Tab. 2).

Außerdem ließen sich in TCR/CD1d- und CD4/CD8/CD1d-Färbungen so gut wie keine Zellen mit erhöhter CD1d-Expression erkennen.

3.1.2.2 CD1d-Expression DN Thymozyten der BALB/c-Maus

Unter den Thymozyten der BALB/c-Maus befanden sich ebenfalls 1,5% DN Thymozyten. Diese waren jedoch so gut wie alle CD1d positiv (s. Abb. 1c). Deshalb waren auch unter TCR negativen Zellen so gut wie gar keine Thymozyten mit verminderter CD1d-Expression vorzufinden.

Insofern besteht also ein entscheidender Unterschied zwischen Thymozyten der BALB/c-Maus und der LEW-Ratte.

3.1.3 Färbungen der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz

Mit Hilfe verschiedener Färbungen (s. Tab. 4) von Milzzellen der LEW-/F344-Ratte und der BALB/c-Maus konnte die CD1d-Expression der beiden Rattenstämme und der beiden Spezies verglichen werden. Hierbei war es das Ziel, diejenige Population näher zu identifizieren, die eine verminderte bzw. erhöhte CD1d-Expression aufwies.

Für beide Spezies konnte der monoklonale Anti-CD1d-Antikörper 232 verwendet werden.

Milz	TCR+	CD4+	CD8+	OX33+	HIS57+	OX6+	OX42+	OX62+
LEW	42%	38%	16%	40%	10%	24%	5-8%	1-2%
F344	33%	30%	15%	53%	21%	nicht untersucht	5-7%	nicht untersucht
BALB/c	CD3+ 37%	30%	14%	B220+ 55%	nicht untersucht	nicht untersucht	CD11b+ 2%	nicht untersucht

Tab. 4. Verschiedene Populationen der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz. Zur Beurteilung prozentualer Anteile der Populationen an der Gesamtheit der untersuchten Zellen wurden entsprechende Gates in den Dotplot-Diagrammen der später beschriebenen Färbungen gesetzt.

3.1.3.1 CD1d-Expression der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression

Generell zeigten TCR bzw. CD3 negative Milzzellen eine höhere CD1d-Expression als TCR bzw. CD3 positive Milzzellen (s. Abb. 3a, Tab. 5).

Zudem exprimierte etwa ein Drittel der TCR negativen Zellen der LEW- und der F344-Milz jeweils CD1d verstärkt gegenüber dem Hauptteil der TCR negativen Zellen, während in der BALB/c-Milz der Anteil CD3 negativer Zellen mit stark erhöhter CD1d-Expression sehr gering war.

Dagegen wies nur ein sehr kleiner Teil der TCR bzw. CD3 positiven Milzzellen der LEW-/F344-Ratte und der BALB/c-Maus eine erhöhte CD1d-Expression auf (s. Abb. 3b, Tab. 5). Somit ließen sich von der Gesamtheit der Milzzellen der BALB/c-Maus im Gegensatz zur LEW-/F344-Ratte nur kleine Populationen mit erhöhter CD1d-Expression abgrenzen.

Im Vergleich zu den Thymozyten der LEW-Ratte gab es in der LEW-/F344-Milz weniger TCR positive Milzzellen, die CD1d nur schwach oder gar nicht exprimierten. Dies zeigte sich erneut besonders in den TCR/CD1d-Dotplot-Diagrammen (s. Abb.

3a). Die CD4/CD8/CD1d-Färbung (s. Abb. 4b) deutete darauf hin, dass sich hierunter vor allem CD8⁺, aber auch CD4⁺ Zellen befanden.

Unter TCR negativen und DN Milzzellen der LEW-/F344-Ratte sowie unter Milzzellen der BALB/c-Maus waren noch weniger oder so gut wie keine Zellen, die CD1d schwächer exprimierten.

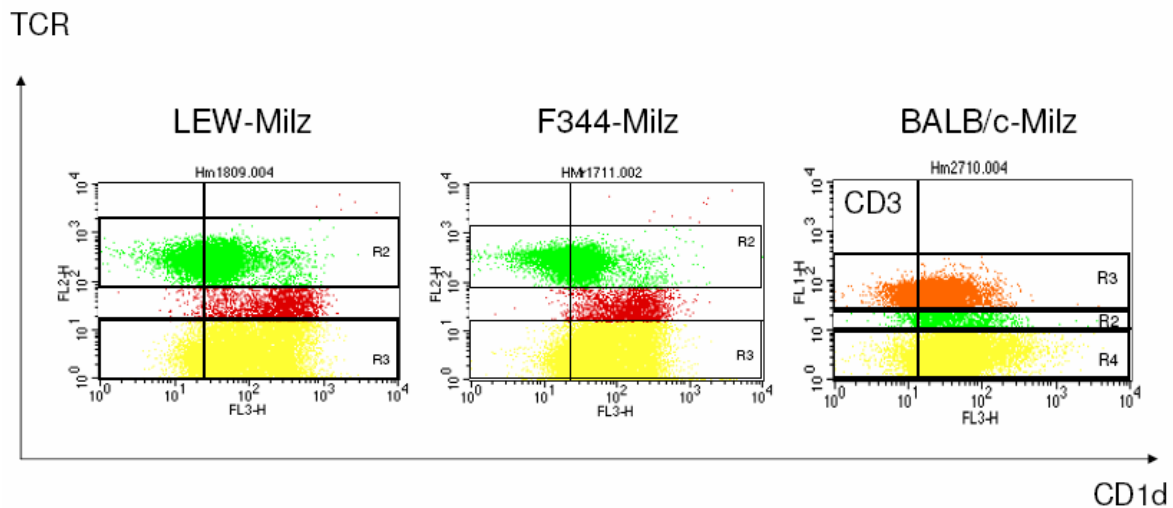


Abb. 3a. FACS-Analyse isolierter Zellen der Milz auf Expression von CD1d und TCR. Milzzellen der LEW-/F344-Ratte und der BALB/c-Maus wurden mit einem gegen $\alpha\beta$ -TCR (R73 unkonjugiert) gerichteten mAk bzw. dem FITC-markierten Anti-CD3-Antikörper und einem biotinylierten mAk gegen CD1d (232) gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Bei der Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die anhand der Parameter Größe und Granularität als Leukozyten eingestuft wurden. Zur Beurteilung der CD1d-Expression in Abhängigkeit der TCR-Expression wurden in den Dotplot-Diagrammen entsprechende Gates gesetzt.

Im Dotplot-Diagramm der TCR/CD1d-Färbung waren einige TCRschwach⁺ Zellen mit erhöhter CD1d-Expression zu erkennen (s. Abb. 3a). Einerseits könnte es sich hierbei um TCR negative Zellen handeln, die sich im oberen TCR negativen Bereich befanden. Andererseits stellten sich auch im Dotplot-Diagramm der TCR/mIgG2b-Färbung einige Ereignisse in diesen TCR-Bereichen dar, so dass unklar bleibt, ob sie

eine distinkte Milzzellpopulation repräsentieren oder, ob die gemessene TCR-Expression in Wirklichkeit auf eine unspezifische Bindung der TCR-spezifischen Antikörper zurückzuführen ist.

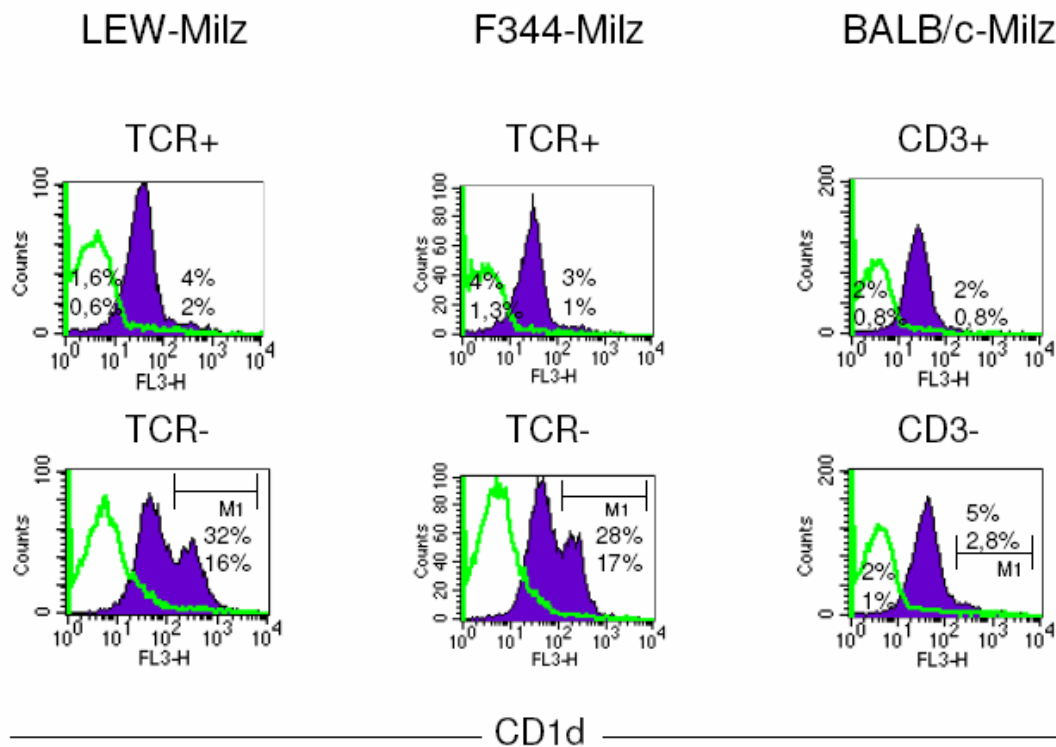


Abb. 3b. CD1d-Expression von LEW-/F344- und BALB/c-Milzzellen in Abhängigkeit der TCR- bzw. CD3-Expression. In den Histogrammen sind verschieden stark TCR (CD3) positive bzw. TCR (CD3) negative Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation mit verminderter oder erhöhter CD1d-Expression an der jeweiligen TCR (CD3) positiven bzw. negativen Population (obere Angabe) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (untere Angabe).

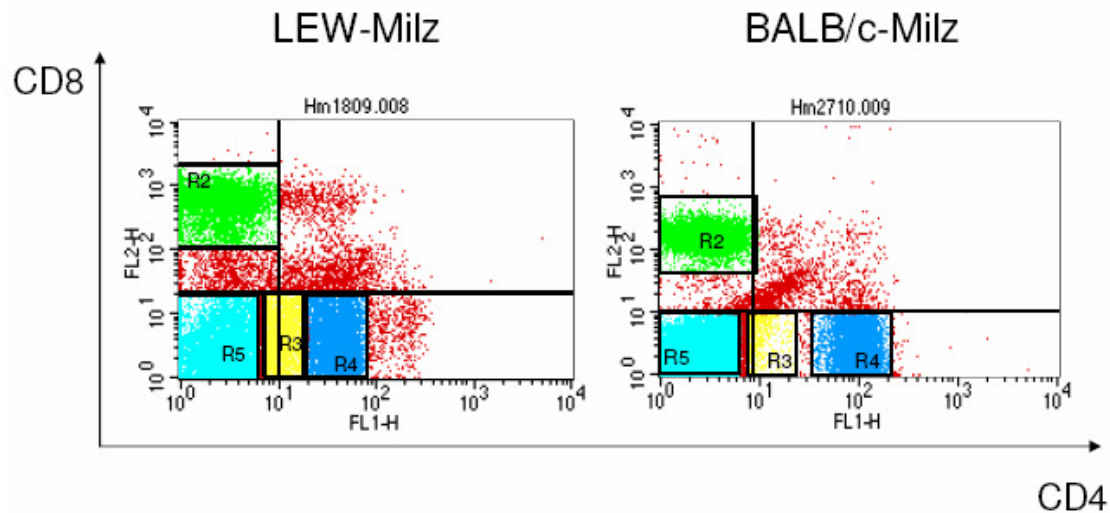


Abb. 4a. FACS-Analyse isolierter Zellen der LEW- und der BALB/c-Milz auf Expression von CD4 und CD8. Milzzellen der LEW-Ratte und der BALB/c-Maus wurden mit einem gegen CD8 (G28 unkonjugiert bzw. PE-konjugiert) gerichteten mAk und einem FITC-markierten mAk gegen CD4 gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Bei der Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die anhand der Parameter Größe und Granularität als Leukozyten eingestuft wurden. Zur Beurteilung der CD1d-Expression in Abhängigkeit der CD4- und CD8-Expression wurden in den Dotplot-Diagrammen entsprechende Gates gesetzt.

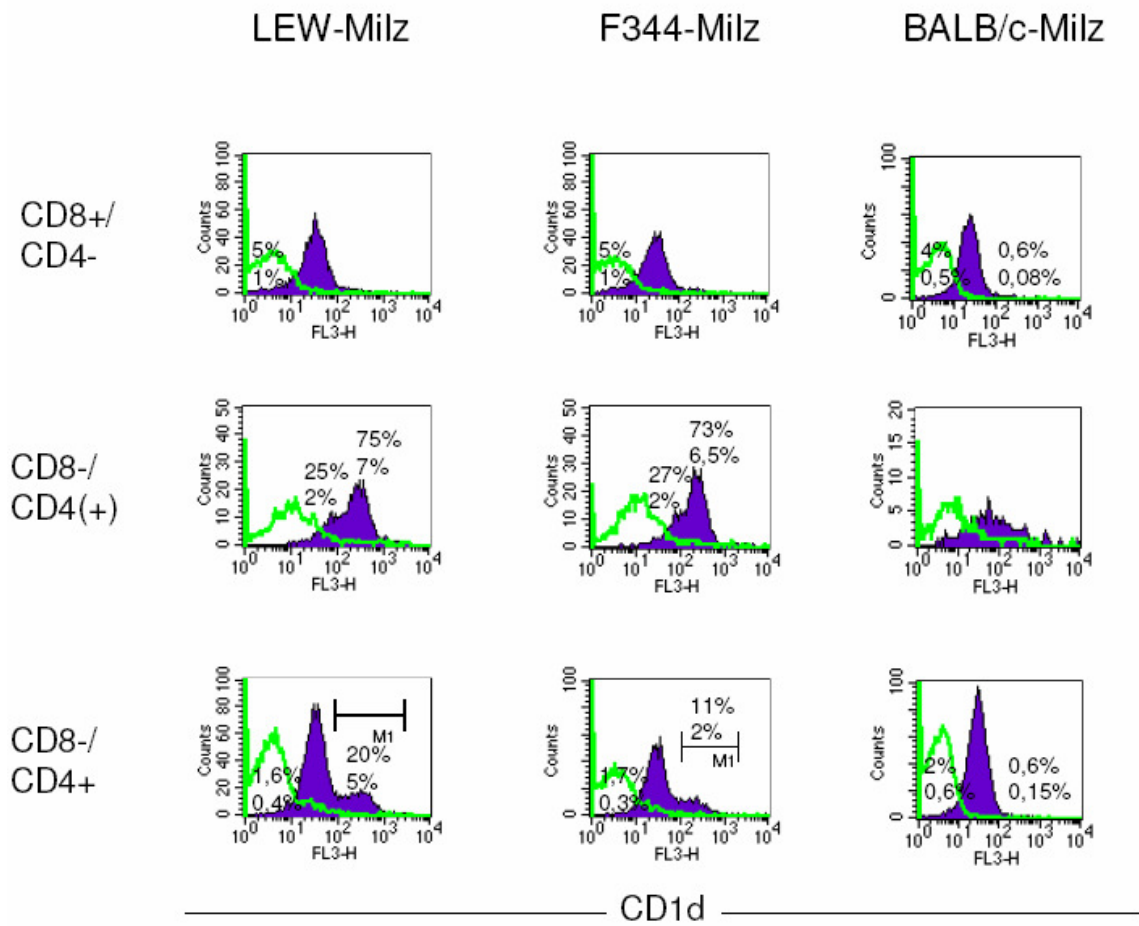


Abb. 4b. CD1d-Expression von LEW-/F344- und BALB/c-Milzzellen in Abhängigkeit der CD4- und CD8-Expression. In den Histogrammen sind CD4 oder CD8 positive Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation an der jeweiligen CD4 oder CD8 positiven Population (oberer Wert) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (unterer Wert).

Milz CD1d FL3	TCR-		TCR+		CD8+/ CD4-		CD4+/ CD8-		CD4(+)/ CD8-		CD4+/ TCR-	
	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
LEW												
+ bis ++	50	33	35	39	39	16	35	22	73	2		
+++	330	16					302	5	311	7	282	11
F344												
+ bis ++	49	44	31	28	33	15	33	17	73	2		
+++	251	17					261	2	261	6,5	219	12
BALB/c												
+ bis ++	41	50	26	40	25	14	30	25	88	2	50	0,6
+++	331	3					201	0,2				

Tab. 5. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl bestimmter Populationen der LEW-/F344- und der BALB/c-Milz. Abgebildet sind MFI-Werte (biotinylierter mAk gegen CD1d) von Populationen mit normaler oder leicht erhöhter CD1d-Expression bzw. von Populationen mit starker CD1d-Expression sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten TCR/CD1d-, CD4/CD8/CD1d- und CD4/TCR/CD1d-Färbungen.

3.1.3.2 CD4^{schwach}/CD8⁺/TCR⁺/OX42⁺ Zellen der LEW-/F344-Milz

exprimieren CD1d verstärkt

In der CD4/CD8/CD1d-Färbung der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz ließen sich eine CD4⁺- und eine CD8⁺-Hauptpopulation abgrenzen, deren CD1d-Expression im Bereich der von TCR⁺ Milzzellen lag (s. Abb. 4b, Tab. 5). Aufgrund ihrer normalen CD1d-Expression und ihrer Anzahl handelt es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um T-Zellen. Unter CD4⁺ Milzzellen gab es noch eine weitere Population, die aber CD1d stärker exprimierte. Besonders die Milzzellen mit schwacher CD4-Expression zeigten eine hohe CD1d-Expression. Innerhalb der beiden Rattenstämme gab es nur geringe Unterschiede in Bezug auf den prozentualen Anteil und die Intensität der CD1d-Expression dieser Population. In der BALB/c-Milz waren CD4⁺ Zellen mit erhöhter CD1d-Expression aber deutlich weniger häufig vertreten und von geringerer Intensität (s. Abb. 4b, Tab. 5).

Allerdings ist zu beachten, dass sich CD4schwach⁺ und CD4normal⁺ Milzzellen in der LEW-/F344-Ratte schlecht als eigenständige Populationen voneinander trennen ließen (s. Abb. 4a, 4b). Es ist aber eindeutig, dass in der LEW-/F344-Milz der Großteil der CD4schwach⁺/CD8⁻ Zellen CD1d stärker als der Großteil der CD4normal⁺/CD8⁻ Zellen exprimierten, jedoch ist die genaue Anzahl der CD1d stark positiven Population schwer zu bestimmen.

Deshalb können CD4 positive Milzzellen wohl besser hinsichtlich ihrer CD1d-Expression als bezüglich ihrer CD4-Expression abgegrenzt werden.

In der BALB/c-Milz waren die beiden CD4 positiven Populationen aufgrund der geringeren Anzahl von CD4schwach⁺ Zellen leichter auseinander zu halten.

Die CD4/TCR/CD1d-Färbung der LEW-/F344-Ratte bestätigte, dass die CD4 positive Population mit erhöhter CD1d-Expression TCR negativ ist (s. Abb. 5a, 5b, Tab. 5), so dass es sich also nicht um T-Zellen handeln kann. Wie bereits in der CD4/CD8/CD1d-Färbung zu erkennen war, stellte sich diese Population in CD4 schwach bis normal positiven Bereichen dar.

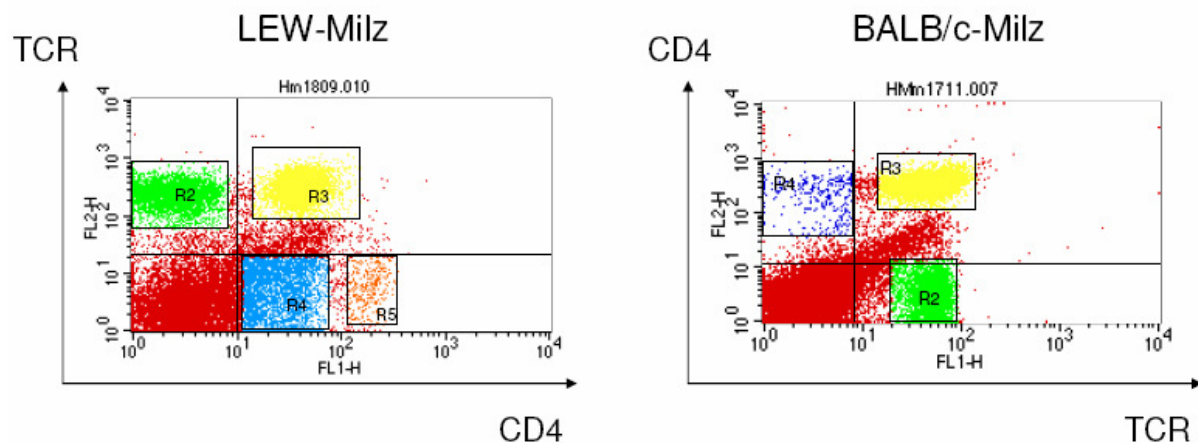


Abb. 5a. FACS-Analyse isolierter Zellen der LEW- und der BALB/c-Milz auf Expression von CD4 und TCR. Milzzellen der LEW-Ratte wurden mit einem gegen $\alpha\beta$ -TCR (R73 unkonjugiert) gerichteten mAk und einem FITC-markierten mAk gegen CD4 (OX35) gefärbt. Milzzellen der BALB/c-Maus wurden mit einem FITC-markierten mAk gegen $\alpha\beta$ -TCR und mit einem gegen CD4 (PE-konjugiert) gerichteten mAk gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Bei der Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die anhand der Parameter Größe und Granularität als Leukozyten eingestuft wurden. Zur Beurteilung der CD1d-Expression der verschiedenen Populationen wurden in den Dotplot-Diagrammen entsprechende Gates gesetzt.

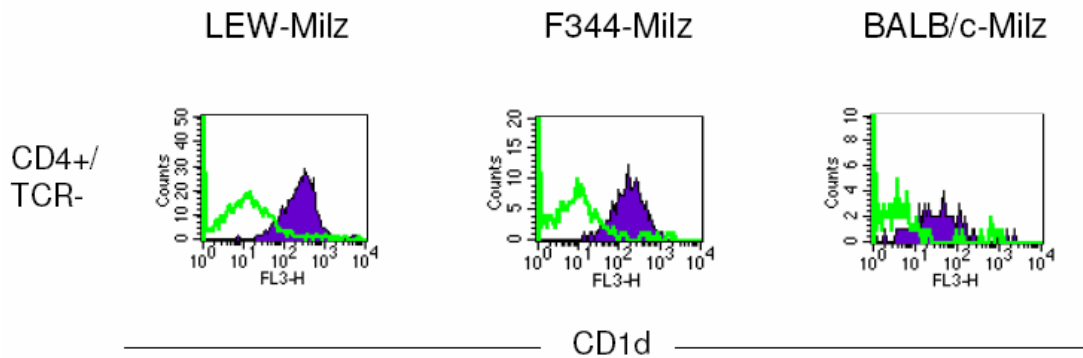


Abb. 5b. CD1d-Expression von LEW-/F344- und BALB/c-Milzzellen mit CD4- aber ohne TCR-Expression. In den Histogrammen sind CD4 positive Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt.

Um diese Populationen näher zu identifizieren, wurden die Milzzellen mit den Antikörpern OX42 und OX62 gefärbt, die zum Nachweis von Makrophagen und DC verwendet werden.

Der monoklonale Antikörper OX42 erkennt ein Epitop, das sich CD11b- und CD11c-Moleküle teilen. Beide Moleküle sind Varianten einer α -Kette, die jeweils mit CD18 als β -Kette verbunden sind und damit zur Familie der Leukozyten- β 2-Integrine gehören. Diese besteht aus LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1), CR3 (Komplement-Rezeptor Typ 3) und CR4 (Komplement-Rezeptor Typ 4). LFA-1 wird aus CD11a und CD18 gebildet und befindet sich auf allen Leukozyten. CR3 oder MAC-1 (Makrophagen-1-Antigen) besteht aus CD11b und CD18 und wird von Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, NK-Zellen, B1-B-Zellen, einigen aktivierten T-Zellen und bestimmten DC exprimiert. CR3 dient zur Adhäsion und transendothelialen Migration. Zudem kann es nach Aktivierung Phagozytose oder extrazelluläre Zytotoxizität vermitteln und bakterielle Antigene binden [161]. CR4 wird aus CD11c und CD18 gebildet und wird von den meisten CR3 positiven Zellen exprimiert und trägt ebenfalls zur Adhäsion bei.

Die Färbungen der LEW-Milz mit OX42 zeigten viele unspezifische Bindungen, die sich auch nach Präinkubation mit LEW-Serum oder F344-Serum kaum verringerten (Daten nicht gezeigt). So war die Abgrenzung eigenständiger OX42⁺ Populationen problematisch, was die Bestimmung prozentualer Anteile erschwerte. Zudem veränderte sich die Intensität der CD1d-Expression häufig nach geringer

Verschiebung der Gates innerhalb der OX42 positiven und CD4 positiven bzw. negativen Bereiche, so dass folgende Ergebnisse nur Tendenzen aufzeigen können.

Milz CD1d FL2	CD4+/ OX42+		CD4(+)/ OX42+		CD4-/ OX42+		CD4+/ OX42-		CD4++/ OX42(+)	
	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
LEW										
+ bis ++	23	2					13	22	45	0,5
+++	128	3,4	118	2	150	0,3				
F344										
+ bis ++	13	1,4					7	15	27	0,4
+++	85	1,6	70	5	80	1,8				

Tab. 6a. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl von LEW- und F344-Milzzellen in Abhängigkeit der CD4- und OX42-Expression. Abgebildet sind MFI-Werte (unkonjugierter mAk gegen CD1d) von Populationen mit normaler oder leicht erhöhter CD1d-Expression bzw. von Populationen mit starker CD1d-Expression sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der CD4/OX42/CD1d-Färbungen. Da der unkonjugierte 232-Ak schlechter färbt als der biotinylierte 232-Ak, sind die MFI-Werte in der FL2 generell niedriger als in FL3.

Sowohl unter OX42⁺/CD4^{schwach}⁺ und OX42⁺/CD4^{normal}⁺ als auch OX42⁺/CD4⁻ Milzzellen befanden sich CD1d stark positive Zellen, wobei es innerhalb der beiden Rattenstämme zahlenmäßige Unterschiede bezüglich Anzahl und CD1d-Intensität gab (s. Tab. 6a).

Einer der wenigen Effekte der Präinkubation mit Ratten-Serum war, dass im CD1d-Histogramm, aber kaum im OX42/CD4-Dotplot-Diagramm, Populationen im CD4 normal positiven Bereich besser abzugrenzen waren. Erst dann ließ sich ein Anteil von CD4^{normal}⁺/CD8⁻/TCR⁻/OX42⁺ Zellen mit ähnlich starker CD1d-Expression wie CD4^{schwach}⁺/CD8⁻/TCR⁻/OX42⁺ Zellen erkennen (s. Tab. 6a), so dass sich unter beiden Populationen wenigstens zu einem Teil ein- und dieselbe Population mit verschieden starker CD4-Expression zu befinden scheint. Dies hatte sich, allerdings in höherer Anzahl, auch schon in den CD1d-Histogrammen der CD4/CD8/CD1d-Färbung angedeutet (s. Abb. 4b).

Durch Verschieben der Gates wurde deutlich, dass weder zwischen der OX42- und der CD1d-Expression noch zwischen der CD4- und der CD1d-Expression im OX42/CD4 positiven Bereich eine lineare Korrelation bestand.

Im Übrigen veränderte sich auch unter CD4normal⁺ bzw. CD8⁺ Zellen der LEW-Milz die Intensität der CD1d-Expression im TCR⁺/CD4normal⁺ bzw. im CD8⁺/CD4⁻ Bereich. Denn mittelnormal CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen exprimierten CD1d schwächer als hochnormale und niedrignormale CD4⁺ bzw. CD8⁺ Zellen.

Demgegenüber befanden sich in der BALB/c-Milz weniger Zellen mit einem CD4schwach⁺, CD11b⁺ Phänotyp, die zudem CD1d deutlich schwächer exprimierten als in der LEW-/F344-Milz. Sie stellten sich wohl in der CD4/CD8/CD1d-Färbung mit einer höheren Anzahl und einer etwas stärkeren Intensität dar als in den CD4/TCR/CD1d- und CD4/CD11b/CD1d-Färbungen (s. Abb. 4b, 5a, 5b und Tab. 5, 6b).

Milz CD1d FL3	CD4+/ CD11b+		CD4(+)/ CD11b+		CD4-/ CD11b+		CD4+/ CD11b-		CD8+/ CD4-	
	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
BALB/c										
+ bis ++			67	0,5	26	0,8	31	24	25	13
+++	164	0,2			184	0,04	233	0,04	168	0,08

Tab. 6b. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl von BALB/c-Milzzellen in Abhängigkeit der CD4- und CD11b-Expression. Abgebildet sind MFI-Werte (biotinylierter mAk gegen CD1d) von Populationen mit normaler oder leicht erhöhter CD1d-Expression bzw. von Populationen mit starker CD1d-Expression sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten CD4/CD11b/CD1d-Färbungen.

Schon von Mausstämmen war bekannt, dass Makrophagen zu den Zelltypen mit einer erhöhten CD1d-Expression gehören können [81]. Zudem ist bekannt, dass in der Ratte Makrophagen bzw. Monozyten CD4 im Vergleich zu anderen CD4 positiven Zellen vermindert exprimieren. Da sie auch nicht den DC-spezifischen Marker OX62 exprimieren, weisen sie einen CD4schwach⁺, CD11b⁺, OX62⁻ Phänotyp auf [162]. Allerdings scheint es Unterschiede in der CD4-Expression

zwischen Makrophagen/Monozyten der Maus und denen der Menschen und der Ratte zu geben [163].

3.1.3.3 Klassische CD4⁺ DC sind die Zellen der LEW-Milz mit der höchsten CD1d-Expression

Färbungen mit dem Marker OX62 sollten DC identifizieren, denen in Mäusen eine erhöhte CD1d-Expression nachgewiesen wurde [81]. In der Ratte werden DC anhand früherer Studien (Sprague-Dawley-, Lewis-Ratte) in die CD4 positive und die CD4 negative Subpopulation der klassischen DC und in die pDC unterteilt [164].

Klassische DC sind durch einen OX62⁺, CD11a⁺/b⁺/c⁺ Phänotyp gekennzeichnet. OX62 ist ein monoklonaler Antikörper, der die α E2-Integrinkette der Ratte (CD103) erkennt [165]. CD4 negative DC bilden mit 80% den Hauptanteil der klassischen DC in der Milz, sind größer und exprimieren CD103 stärker als CD4 positive DC. Sie sind vermutlich an der Tumorabwehr und an der Toleranzerhaltung beteiligt [164].

Dagegen zeigen pDC der Ratte einen MHC II⁺, CD3⁻, CD4⁺, CD5⁺, CD11b⁻, CD11c⁻, CD45R⁺, CD45RC⁺ (OX22⁺), CD45RA⁻ (OX33⁻) Phänotyp, ohne dabei CD103 zu exprimieren. Mit ihrem Phänotyp und ihrer Funktion ähneln die pDC der Ratte mehr den pDC des Menschen als die der Maus. Sie sind in der Milz der Ratte stärker vertreten (1-1,5% der Milzzellen) als klassische DC [162].

Sowohl pDC als auch klassische CD4 positive DC zeigen eine höhere Intensität der CD4-Expression als T-Zellen [162].

Da bekannt ist, dass klassische DC die typische dendritische Morphologie mit Zellfortsätzen aufweisen und pDC morphologisch Plasmazellen ähneln, können diese Populationen nicht nur mit den Markern OX62 und CD4, sondern auch anhand der Granularität im FSC/SSC-Dotplot-Diagramm unterschieden werden.

Speziell bei DC ist problematisch, dass bestimmte Oberflächenmarker nicht nur auf die Expression der Zellen zurückzuführen sind, sondern dass auch Oberflächenmoleküle anderer Zellen in die Zellmembran integriert werden.

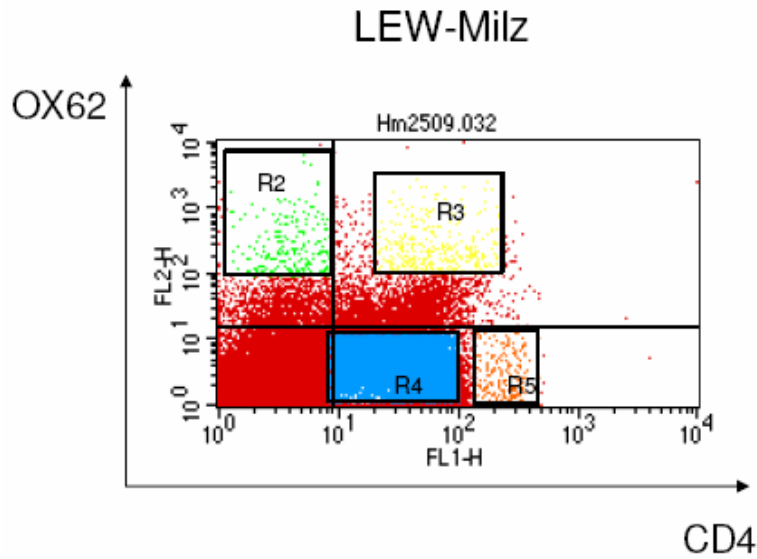


Abb. 6a. FACS-Analyse isolierter Zellen der LEW-Milz zur Identifizierung von Populationen mit einem DC-typischen Phänotyp. Milzzellen der LEW-Ratte wurden mit mAk gegen DC-typische Antigene gefärbt (OX62 unkonjugiert, CD4 FITC-markiert). Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Bei der Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die anhand der Parameter Größe und Granularität als Leukozyten eingestuft wurden. Zur Beurteilung der CD1d-Expression der verschiedenen Populationen wurden in den Dotplot-Diagrammen entsprechende Gates gesetzt.

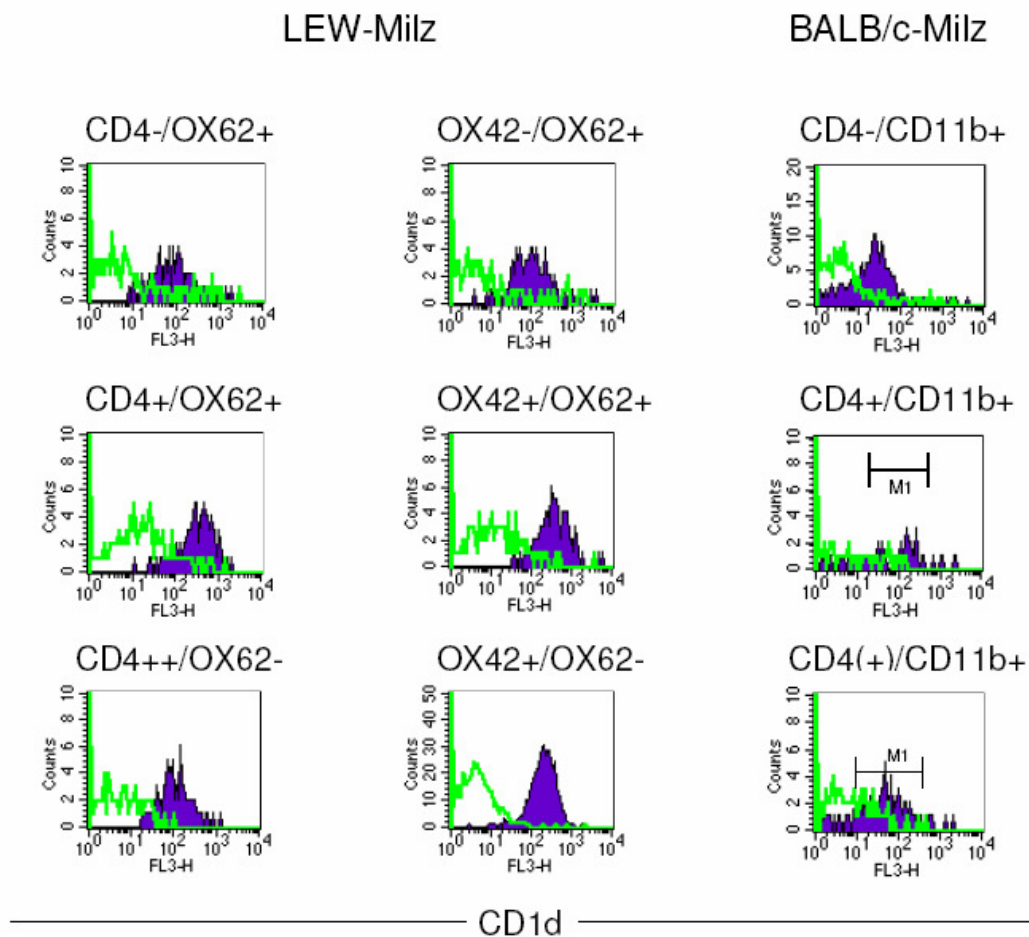


Abb. 6b. CD1d-Expression von LEW- und BALB/c-Milzzellen mit DC- bzw. Makrophagen-typischen Phänotyp. In den Histogrammen sind CD4 bzw. OX42 und/oder OX62 positive sowie CD11b und/oder CD4 positive Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt.

LEW	CD4+/ OX62+	CD4-/ OX62+	OX42+/ OX62+	OX42-/ OX62+	OX42+/ OX62-	CD4+/ OX62-
% aller Milzzellen	0,5	0,4	0,6	0,45	5	0,4
MFI CD1d FL3	360	166	395	154	180	125

Tab. 7. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl von LEW-Milzzellen mit DC- bzw. Makrophagen-typischen Phänotyp. Abgebildet sind MFI-Werte der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) der gefärbten Population sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten CD4/OX62/CD1d- und OX42/OX62/CD1d-Färbungen.

In der Tat zeigten in der LEW-Milz OX62⁺/CD4⁺ und OX62⁺/OX42⁺ Populationen zusammen mit Marginalzonen-B-Zellen die höchste CD1d-Expression im Vergleich zu den anderen Milzzellen (s. Abb. 6a, 6b, Tab. 7). Es konnten zwar keine 4-fach-Färbungen zur Bestätigung durchgeführt werden, jedoch ist es aufgrund der hohen Übereinstimmung dieser beiden Populationen in Anzahl und CD1d-Intensität sehr wahrscheinlich, dass sie klassische CD4 positive DC repräsentieren. Im FSC/SSC-Dotplot-Diagramm stellte sich eine große Bandbreite dieser Zellen dar.

OX62⁺/CD4⁻ Zellen der LEW-Milz waren an Anzahl und CD1d-Intensität vergleichbar mit OX62⁺/OX42⁻ Zellen (s. Abb. 6b, Tab. 7). In der CD4/OX42/OX62-Färbung wurden OX62⁺/CD4⁻ Milzzellen nicht durch OX42 markiert (Daten nicht gezeigt), so dass es sich bei diesen Zellen mit mittelstark erhöhter CD1d-Expression wohl um die gleiche Population, aber nicht um klassische CD4 negative DC handelt, die als OX62⁺/OX42⁺ Zellen definiert worden sind [164]. Außerdem waren OX62⁺/CD4⁻ bzw.

OX62⁺/OX42⁻ Milzzellen nicht häufiger vertreten und im FSC/SSC-Dotplot-Diagramm nicht größer als CD4 positive DC. Somit scheinen klassische CD4 negative DC in der LEW-Ratte nicht mit der OX62/CD4/CD1d-Färbung dargestellt werden zu können.

Auch die OX62⁻/CD4stark⁺ Population der LEW-Milz wies eine mittelstarke CD1d-Expression auf (s. Tab. 7). Aufgrund dieses Phänotyps repräsentieren diese Zellen höchstwahrscheinlich pDC [162]. Zudem stellten sich OX62⁻/CD4stark⁺ Milzzellen im FSC/SSC-Dotplot-Diagramm in kleineren FSC-/SSC-Bereichen dar als OX62⁺/OX42⁺/CD4⁺ Milzzellen mit mDC-typischer Morphologie. In der CD4/OX42/CD1d-Färbung zeigte der Großteil von CD4stark⁺ Milzzellen sogar nur eine gering erhöhte CD1d-Expression und eine fehlende bis schwache OX42-Markierung. Aus diesen Gründen könnte es sich bei den OX62⁻/OX42negativ bis schwach⁺/CD4stark⁺ Zellen der LEW-Milz um pDC handeln. Diese wären dann aber in der LEW-Milz nicht häufiger vertreten als klassische DC. In der F344-Milz waren sowohl die Anzahl als auch die CD1d-Expression dieser Zellen noch geringer (s. Tab. 6a).

Erneut veränderte sich durch Verschieben der Gates innerhalb des OX62⁺/OX42⁺ bzw. des OX62⁺/CD4⁺ Bereichs die CD1d-Expression. Hierbei nahm die CD1d-Expression mit zunehmender OX62-Markierung zu. Im Übrigen gab es keine OX62 positiven Milzzellen, die CD1d nicht oder vermindert exprimierten.

In weiteren Färbungen konnte festgestellt werden, dass die CD1d-Expression der Milzzellen auch mit zunehmender Markierung durch OX6 steigt (Daten nicht gezeigt). OX6 ist ein monoklonaler Antikörper gegen RT1B, ein MHC II-Isotyp der Ratte und Homolog des menschlichen HLA-DQ.

In der Maus werden DC der Milz in 3 Haupttypen unterteilt, die mit Hilfe der Marker CD4, CD8 und CD11b unterschieden werden können.

Die CD4 positive DC-Population mit einem CD4⁺, CD8⁻, CD11bstark⁺ Phänotyp waren in früheren Untersuchungen (C57BL/6-Maus) häufiger vertreten als die CD4 negativen DC-Populationen mit einem CD4⁻, CD8⁻, CD11bstark⁺ Phänotyp oder einem CD4⁻, CD8⁺, CD11bschwach⁺ Phänotyp [166].

In der BALB/c-Milz war die CD4normal⁺/CD11b⁺ Population sehr klein, aber wies eine verstärkte CD1d-Expression auf, die im CD11bstark⁺ Bereich noch deutlich zunahm (s. Abb. 6b, Tab. 6b). Hierbei könnte es sich um CD4⁺ DC handeln.

Dagegen zeigte nur ein geringer Teil der CD4⁻/CD11b⁺ Milzzellen eine erhöhte CD1d-Expression, während der Großteil dieser Zellen eine normale CD1d-Expression aufwies. In ihrer Gesamtheit war die CD4⁻/CD11b⁺ Population aber deutlich häufiger vertreten als die der mutmaßlichen CD4⁺ DC. Somit ist fraglich, ob sich CD4⁻/CD11b⁺ DC eher unter dem CD1d stark positiven, sehr kleinen, aber im richtigen Verhältnis stehenden Anteil befinden oder, ob sie in der BALB/c-Milz CD1d größtenteils nicht verstärkt exprimieren. Da laut einer Studie Makrophagen bzw. Monozyten der Maus CD4 nicht exprimieren [163], könnten die CD4⁻/CD11b⁺ Populationen z. T. auch diese Zelltypen repräsentieren.

Unter den CD8 positiven Milzzellen der BALB/c-Maus konnte nur ein sehr kleiner Teil mit verstärkter CD1d-Expression festgestellt werden (s. Abb. 4b, Tab. 6b). Ob diese Zellen CD4⁻/CD8⁺/CD11bschwach⁺ DC repräsentieren, wurde nicht weiter untersucht. Es könnte sich auch um CD8⁺ T-Zellen handeln, die sich im Sinne einer Normalverteilung in CD1d positiveren Bereichen befinden.

Zusätzlich scheinen in der Maus CD11c⁺/CD11b⁻/B220⁺ Zellen, die entweder CD4 oder CD8 exprimieren, das Äquivalent von pDC des Menschen zu sein. Diese unterscheiden sich durch ihre CD8- und/oder CD11c-Expression von den pDC des Menschen und der Ratte [167]. Dabei ist zu beachten, dass sich die Frequenz von pDC in den verschiedenen Geweben innerhalb der Mausstämmen deutlich unterscheidet. Demnach wurde bisher keine erhöhte CD4-Expression von pDC beschrieben wie es in der Ratte beobachtet wurde. Da auch in der BALB/c-Maus keine Milzzellen mit erhöhter CD4-Expression vorzufinden waren (s. Abb. 4a), könnten sich pDC sowohl unter CD4⁺/CD11b⁻ Zellen mit normaler als auch unter der sehr kleinen CD4⁺/CD11b⁻ Population mit erhöhter CD1d-Expression befinden (s. Tab. 6b).

3.1.3.4 Marginalzonen-B-Zellen bilden den Großteil der CD1d stark positiven Zellen der LEW-/F344-Milz und der BALB/c-Milz

Insgesamt konnte mit Hilfe der bisher aufgeführten Färbungen aber nur ein geringer Teil der CD1d stark positiven Populationen identifiziert werden. Der große Anteil TCR negativer Milzzellen mit erhöhter CD1d-Expression der LEW-/F344-Ratte ließ vermuten, dass auch B-Zellen CD1d verstärkt exprimieren könnten.

In der Maus stellen B-Zellen der Marginalzone der Milz den Zelltyp mit der stärksten CD1d-Expression dar [81]. Bisher war unbekannt, inwieweit dies auf die Ratte zutrifft. Die Marginalzonen (MZ)-B-Zellen sind möglicherweise an der T-Zell-unabhängigen Immunantwort gegen Lipidantigene bekapselter Bakterien, aber auch an T-Zell-abhängigen Immunreaktionen beteiligt [168]. Durch eine CD1d-abhängige Interaktion mit NKT-Zellen scheinen sie an der Tolerisierung der Augenvorderkammer mitzuwirken [169]. Etwa 80% der MZ-B-Zellen der Ratte (PVG-Ratte) und fast alle der Maus repräsentieren naive B-Zellen, wohingegen etwa 20% der MZ-B-Zellen der Ratte Kennzeichen von Gedächtnis-B-Zellen zeigen [170], [171]. Im Menschen ist die Aufteilung umgekehrt [172] und es wurden bisher keine CD1d stark⁺ B-Zellen der Milz identifiziert. Studien der Maus und der Ratte zeigen, dass sich MZ-B-Zellen unter anderem direkt aus rezirkulierender folliculärer (RF)-B-Zellen differenzieren können und den Großteil der Zellen der milzspezifischen Marginalzone bilden, die B-Zell-Lymphfollikel und periarterielle Lymphscheiden umgibt. Ihr Phänotyp deutet auf vorangegangene Aktivierung hin. Die MZ-B-Zellen der Maus sind durch einen CD21stark⁺, CD23schwach⁺, Oberflächen(s)-IgMstark⁺, sIgDschwach⁺ Phänotyp mit erhöhter basalen Expression von CD80 und von 86 gekennzeichnet. Dieser ist von dem CD21intermediär(int)⁺, CD23stark⁺, sIgMschwach⁺, sIgDstark⁺ Phänotyp RF-B-Zellen, die CD1d mit geringerer Intensität exprimieren, zu unterscheiden [171]. Die Entwicklung des MZ-B-Zell-spezifischen Markers HIS57 erleichtert ihre Identifizierung. Der monoklonale Antikörper HIS57 bindet ein bisher noch unbekanntes Oberflächenmolekül auf MZ-B-Zellen der Ratte, wobei 80% dieser Zellen stark und 20% intermediär markiert werden. HIS57int⁺ Zellen sind kleiner als die restlichen MZ-B-Zellen. Andere B-Zellen der Milz exprimieren das HIS57-Antigen nicht oder nur schwach (z. B. ein Teil der RF-B-Zellen) [173].

Sowohl in der LEW-Milz als auch in der F344-Milz wiesen der Großteil der OX33schwach⁺/TCR⁻ Zellen und jeweils ungefähr ein Drittel der OX33normal⁺/TCR⁻ Zellen eine stark erhöhte CD1d-Expression auf (s. Abb. 7a, 7b, Tab. 8). So zeigten in der LEW-Milz 32% und in der F344-Milz 34% der B-Zellen eine 6-8-fach höhere CD1d-Expression als die restlichen B-Zellen.

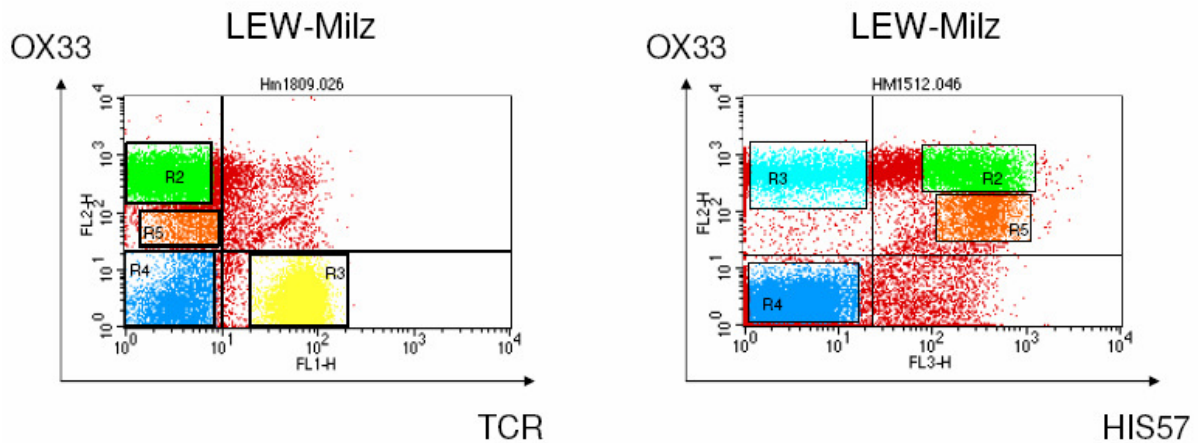


Abb. 7a. FACS-Analyse isolierter Zellen der LEW-Milz zur Identifizierung von MZ-B-Zellen. Milzzellen der LEW-Ratte wurden mit mAk gegen MZ-B-Zell-typische Antigene (OX33 PE-konjugiert, HIS57 biotinyliert) gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Bei der Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die anhand der Parameter Größe und Granularität als Lymphozyten eingestuft wurden. Zur Beurteilung der CD1d-Expression der verschiedenen Populationen wurden in den Dotplot-Diagrammen entsprechende Gates gesetzt.

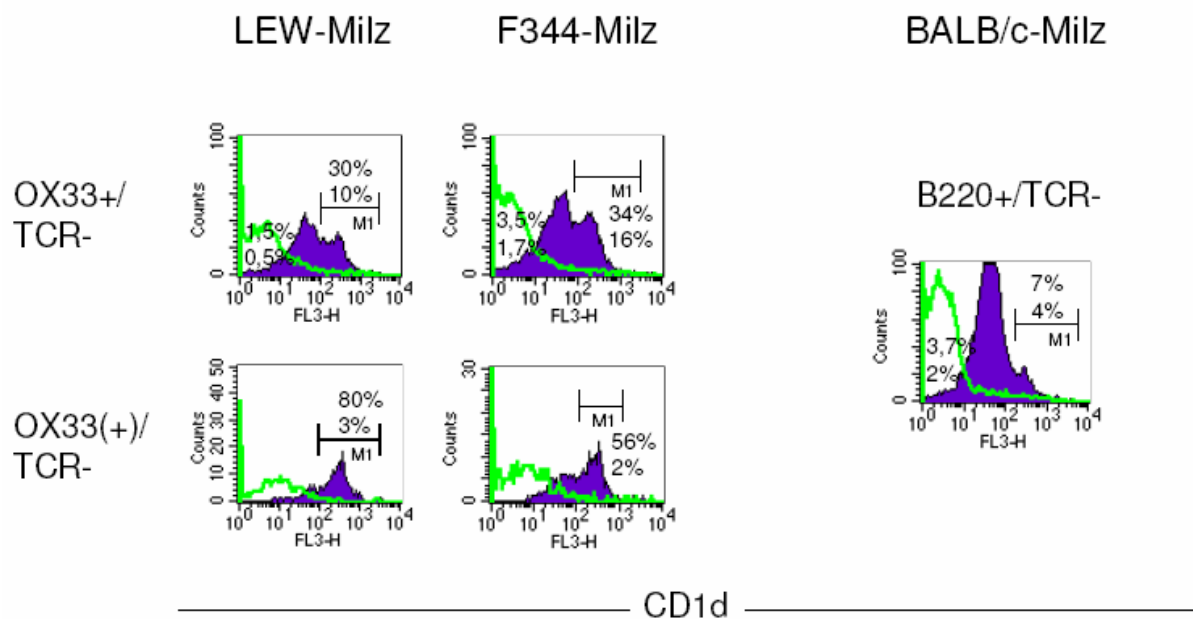


Abb. 7b. CD1d-Expression von B-Zellen der LEW-/F344- und BALB/c-Milz. In den Histogrammen sind OX33 bzw. B220 positive Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation an der jeweiligen Population (oberer Wert) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (unterer Wert).

Milz CD1d FL3	OX33+/TCR-		OX33(+)/TCR-	
	MFI	%	MFI	%
LEW				
+ bis ++	46	23	125	0,4
+++	300	10	298	3
F344				
+ bis ++	34	29	47	1,4
+++	218	16	254	2
BALB/c	B220+/TCR-		nicht untersucht	
+ bis ++	47	49		
+++	359	4		

Tab. 8. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl von B-Zellen der LEW-/F344- und der BALB/c- Milz. Abgebildet sind MFI-Werte (biotinylierter mAk gegen CD1d) von Populationen mit normaler oder leicht erhöhter CD1d-Expression bzw. von Populationen mit starker CD1d-Expression sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten OX33/TCR/CD1d- bzw. B220/TCR/CD1d-Färbungen.

Die OX33/HIS57/CD1d-Färbung bestärkte die Beobachtung, dass MZ-B-Zellen in der LEW-Ratte und besonders in der F344-Ratte häufiger zu finden waren als in den meisten untersuchten Mausstämmen, in denen sie 3-15% der B-Zellen entsprachen (s. Abb. 7a). Außerdem gab es demnach in der F344-Ratte im Vergleich zur LEW-Ratte nicht nur mehr OX33⁺ Milzzellen, sondern auch mehr MZ-B-Zellen.

Allerdings war es schwierig, HIS57 positive Zellen von HIS57 negativen Zellen abzugrenzen. Dies konnte auch durch Präinkubation der Zellen mit Rattenserum kaum erleichtert werden. Folglich sind erneut die Abgrenzung der Populationen und damit die korrekte Quantifizierung schwierig.

Mutmaßliche HIS57^{int}⁺ Milzzellen könnten möglicherweise anhand der OX33-Markierung von HIS57^{stark}⁺ Milzzellen unterschieden werden. Denn unter OX33^{schwach}⁺ Zellen waren größtenteils CD1d stark positive B-Zellen, die zwar den geringeren Anteil der Population bildeten, aber eine etwas höhere CD1d-Expression

als OX33normal⁺ Zellen und nur eine starke und keine intermediäre HIS57-Markierung zeigten. Dagegen wurden OX33normal⁺ Zellen entweder intermediär oder stark durch HIS57 markiert (s. Abb. 7a).

Von früheren Studien wurde berichtet, dass MZ-B-Zellen der Ratte im Gegensatz zu den anderen B-Zellen eine geringere CD45R(HIS24)-Expression aufweisen [174]. So kann vermutet werden, dass MZ-B-Zellen auch vermindert von OX33 markiert werden können.

Wie in der C57BL/6-Maus [171] waren MZ-B-Zellen der LEW- und F344-Ratte größer als der Hauptteil der B-Zellen. Die FSC-Werte stiegen dabei mit zunehmender HIS57-Markierung, so dass HIS57int⁺ Zellen, vergleichbar mit früheren Untersuchungen, kleiner (Mean 300-500) als HIS57stark⁺ Zellen (Mean 400-600) waren (Daten nicht gezeigt).

Durch Verschieben der Gates wurde deutlich, dass die CD1d-Expression in der LEW- und F344-Ratte mit zunehmender HIS57-Markierung stieg und in OX33schwach⁺ Bereichen höher war als in OX33normal⁺ Bereichen. Demnach wiesen HIS57stark⁺/OX33schwach⁺ Milzzellen die stärkste CD1d-Expression auf.

Die restlichen B-Zellen der Milz zeigten eine ähnliche CD1d-Expression wie der Großteil der TCR positiven Milzzellen.

MZ-B-Zellen ließen sich also auch in der LEW- und F344-Ratte gut durch die CD1d-Färbung von den restlichen B-Zellen der Milz abgrenzen.

Aufgrund ihrer großen Anzahl stellen MZ-B-Zellen den weitaus größten Teil CD1d stark positiver Milzzellen dar.

In der BALB/c-Maus war der Anteil CD1d stark positiver B-Zellen deutlich kleiner als in der LEW-/F344-Ratte.

Ungefähr 7% der B220 positiven Milzzellen der BALB/c-Milz zeigten eine starke CD1d-Expression (s. Abb. 7b, Tab. 8). Ihre Anzahl und die Intensität der CD1d-Expression, die 7-8-fach höher war als die des Großteils der B-Zellen, glichen früheren Studien der C57BL/6-Maus [81], [171]. So stellten auch in der BALB/c-Maus CD1dstark⁺ B-Zellen und nicht DC die Milzzellen mit der höchsten CD1d-Expression in der BALB/c-Maus dar.

Demnach ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um MZ-B-Zellen handelt, die anhand ihrer CD1d-Expression sehr gut identifiziert und von den anderen B-Zellen abgegrenzt werden können.

Das bedeutet, dass auch in der BALB/c-Milz die MZ-B-Zellen den mit Abstand größten Teil CD1d stark positiver Zellen bilden.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen über den Marker OX33 in der LEW-/F344-Milz, befanden sich in der BALB/c-Milz keine B220schwach⁺ Zellen mit starker CD1d-Expression. Dagegen zeigte ein kleiner Teil der B220 positiven Milzzellen gegenüber dem Großteil der B-Zellen eine verminderte oder gar keine CD1d-Expression. Entsprechende Ausschläge waren auch im CD1d-Histogramm der TCR/OX33/CD1d-Färbung in der LEW-/F344-Milz zu erkennen (s. Abb. 7b).

3.1.4 Färbungen der LEW-LK

Auch mit den isolierten Zellen der LEW-LK wurden mehrere Färbungen durchgeführt, um verschiedene Populationen zu identifizieren (s. Tab. 9) und deren CD1d-Expression zu bestimmen. Dadurch konnten Vergleiche mit den anderen untersuchten lymphatischen Organen erfolgen.

LK	TCR+	CD4+	CD8+	OX33+	OX6+	OX42+
LEW	63%	49%	16%	30%	15%	2-3%

Tab. 9. Verschiedene Populationen der LEW-LK. Zur Beurteilung prozentualer Anteile der Populationen an der Gesamtheit der untersuchten Zellen wurden entsprechende Gates in den Dotplot-Diagrammen der später beschriebenen Färbungen gesetzt.

3.1.4.1 CD1d-Expression der LEW-LK in Abhängigkeit der TCR-, CD4- und CD8-Expression

Der Anteil CD1d stark positiver Zellen war in den LEW-LK deutlich geringer als in der LEW-Milz. Denn nur ein kleiner Teil der TCR negativen LK-Zellen exprimierte CD1d vermehrt im Vergleich zum Großteil dieser Zellen (s. Abb. 8a, 8b, Tab. 10).

Erneut waren unter TCR positiven LK-Zellen auch Zellen mit schwacher CD1d-Expression vorzufinden (s. Abb. 8a). Diese Population, die wie in der LEW-/F344-Milz vor allem aus CD8⁺ LK-Zellen bestand (s. Abb. 8b), stellte sogar einen größeren Anteil dar als in den anderen lymphatischen Geweben.

Dagegen waren TCR negative LK-Zellen mit verminderter CD1d-Expression wie schon in der LEW-/F344-Milz kaum vorzufinden.

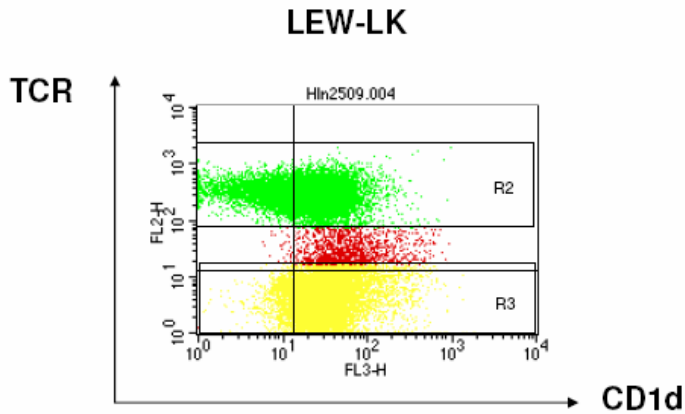


Abb. 8a. FACS-Analyse isolierter Zellen der LEW-Lymphknoten auf Expression von CD1d und TCR. Zellen der LEW-LK wurden mit einem gegen $\alpha\beta$ -TCR (R73 unkonjugiert) gerichteten mAk und einem biotinylierten mAk gegen CD1d (232) gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer. Bei der Auswertung wurden nur Zellen berücksichtigt, die anhand der Parameter Größe und Granularität als Leukozyten eingestuft wurden. Zur Beurteilung der CD1d-Expression in Abhängigkeit der TCR-Expression wurden in den Dotplot-Diagrammen entsprechende Gates gesetzt.

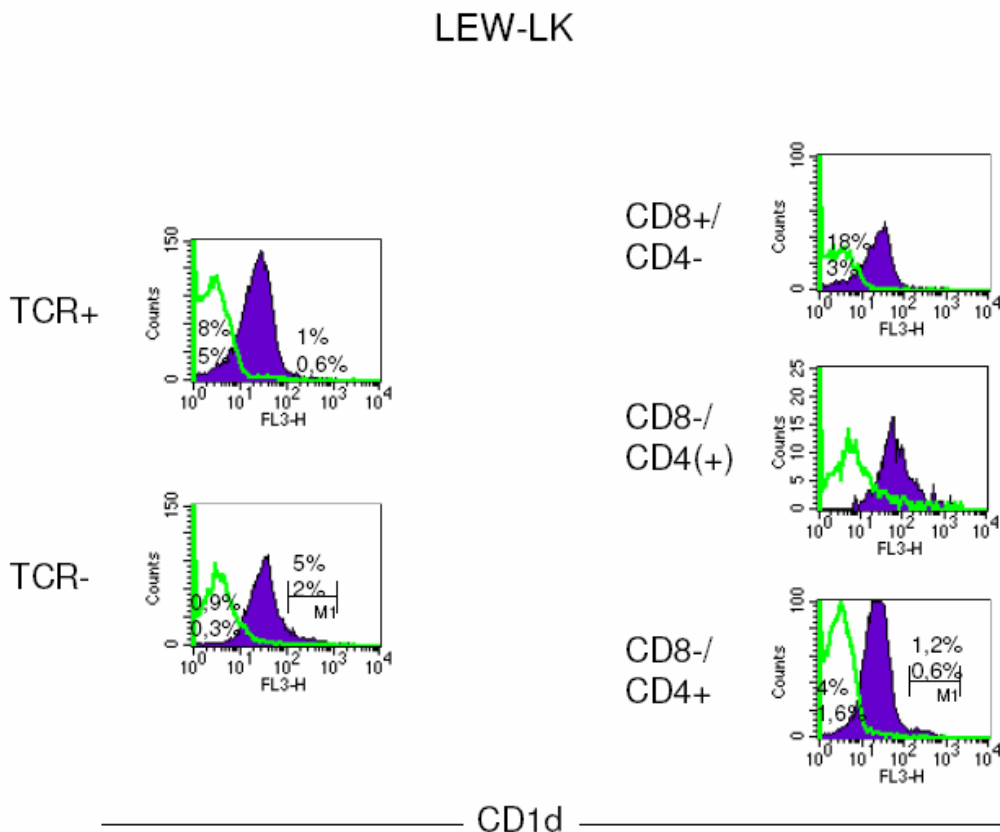


Abb. 8b. CD1d-Expression von Zellen der LEW-LK in Abhängigkeit der TCR- sowie der CD4- und CD8-Expression. In den Histogrammen sind TCR positive oder negative sowie CD4 oder CD8 positive Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation an der jeweiligen Population (oberer Wert) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (unterer Wert).

LK CD1d FL3	TCR-		TCR+		CD8+/ CD4-		CD4+/ CD8-		CD4(+)/ CD8-		CD4+/ TCR-	
	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
LEW												
+ bis ++	34	32	27	56	30	14	27	42	79	4		
+++	247	1,6					281	0,6			229	0,5

Tab. 10. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl bestimmter Populationen der LEW-LK. Abgebildet sind MFI-Werte (biotinylierter mAk gegen CD1d) von Populationen mit normaler oder leicht erhöhter CD1d-Expression bzw. von Populationen mit starker CD1d-Expression sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten TCR/CD1d-, CD4/CD8/CD1d- und CD4/TCR/CD1d-Färbungen.

3.1.4.2 Darstellung von Makrophagen und DC der LEW-LK

Anhand der CD4/CD8/CD1d-, CD4/TCR/CD1d- und CD4/OX42/CD1d-Färbungen ließ sich erkennen, dass CD4schwach⁺/CD8⁻/TCR⁻/OX42⁺ LK-Zellen im Vergleich zur LEW-Milz nur eine leicht erhöhte CD1d-Expression aufwiesen und geringer vertreten waren (s. Abb. 8b, Tab. 10, 11).

Die Ergebnisse der CD4/OX42/CD1d-Färbung waren erneut aufgrund unspezifischer Bindungen schwierig zu interpretieren. Zudem sei darauf hingewiesen, dass nur mit Hilfe von CD4- und OX42-Markern versucht wurde, DC-Populationen des LK zu identifizieren und dass der hierfür verwendete unkonjugierte Anti-CD1d-Antikörper schwächer färbte.

Laut früheren Untersuchungen sollte in Lymphknoten im Vergleich zur Milz unter der CD4schwach⁺ Population auch eine weitere DC-Population in der Ratte vertreten sein, die MHC II stark exprimiert und fast die Hälfte aller DC in Lymphknoten darstellt [175]. Da sich so gut wie keine CD4schwach⁺ LK-Zellen mit starker CD1d-Expression abgrenzen ließen (s. Tab. 11), würden diese DC in den LEW-LK nur eine gering

erhöhte CD1d-Expression zeigen. Aufgrund der schwachen CD4-Expression von Makrophagen in der Ratte [162], könnten CD4schwach⁺/CD8⁻/TCR⁻/OX42⁺ LK-Zellen auch Makrophagen repräsentieren, die CD1d aber geringer exprimieren würden als in der LEW-Milz. Allerdings stieg auch in den LEW-LK die CD1d-Expression mit zunehmender OX6-Markierung (Daten nicht gezeigt).

In der CD4/TCR/CD1d-Färbung waren CD4⁺/TCR⁻ LK-Zellen mit erhöhter CD1d-Expression besonders in CD4normal⁺ Bereichen vorzufinden und somit nicht in CD4schwach⁺ bis normal⁺ Bereichen wie es in der LEW-Milz beobachtet wurde. Deshalb handelt es sich bei den CD4normal⁺ Populationen mit starker CD1d-Expression aus den CD4/TCR/CD1d- und CD4/CD8/CD1d-Färbungen vermutlich um die gleiche (s. Tab. 10). CD4normal⁺/CD8⁻/TCR⁻/OX42⁺ LK-Zellen mit starker CD1d-Expression würden klassische CD4⁺ DC repräsentieren (s. Tab. 11). Jedoch wurden in der CD4/OX42/CD1d-Färbung kaum LK-Zellen dargestellt, die CD1d stark erhöht exprimieren. Da z. B. CD4⁺ T-Zellen in der FL2 einen sehr geringen MFI-Wert aufweisen, ist die CD1d-Expression des Hauptteils der CD4normal⁺/OX42⁺ Population doch deutlicher erhöht, so dass sich hierunter auch klassische CD4⁺ DC befinden könnten.

Klassische CD4⁻ DC könnten sich vor allem unter CD4⁻/OX42⁺ LK-Zellen befinden, die aber CD1d dann schwächer exprimieren würden und wohl geringer vertreten wären als klassische CD4⁺ DC (s. Tab. 11). Letzteres würde mit Studien übereinstimmen, wonach klassische CD4⁺ DC im Gegensatz zur Milz in Lymphknoten der Ratte stärker vertreten sind als klassische CD4⁻ DC [175].

Da in Lymphknoten der Ratte auch das Vorkommen von pDC beschrieben wurde [162], könnte es sich bei CD4stark⁺/OX42 negativ bis schwach⁺ LK-Zellen um pDC handeln (s. Tab. 11). Diese zeigen im Vergleich zur LEW-Milz eine geringere Anzahl, aber nur eine leicht erhöhte CD1d-Expression.

LK CD1d FL2	CD4+/ OX42+		CD4(+)/ OX42+		CD4-/ OX42+		CD4+/ OX42-		CD4++/ OX42(+)	
	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%	MFI	%
LEW										
+ bis ++	46	1,4	36	1,1	41	0,4	6	39	20	0,17
+++	263	0,04	185	0,02						

Tab. 11. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl von Zellen des LEW-LK in Abhängigkeit der CD4- und OX42-Expression. Abgebildet sind MFI-Werte (unkonjugierter mAk gegen CD1d) von Populationen mit normaler oder leicht erhöhter CD1d-Expression bzw. von Populationen mit starker CD1d-Expression sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der CD4/OX42/CD1d-Färbungen. Da der unkonjugierte 232-Ak schlechter färbt als der biotinylierte 232-Ak, sind die MFI-Werte in der FL2 generell niedriger als in FL3.

3.1.4.3 Darstellung von B-Zellen der LEW-LK mit starker CD1d-Expression

Frühere Untersuchungen der Maus zeigten, dass in Lymphknoten fast keine CD1d stark positiven B-Zellen nachgewiesen werden konnten [171].

Auch in den LEW-LK waren im Gegensatz zur LEW-Milz nur äußerst wenige OX33⁺ Zellen vorzufinden, die CD1d verstärkt exprimierten (s. Abb. 9, Tab. 12). Diese stellten etwa 4% der B-Zellen dar und zeigten eine 7-fach erhöhte CD1d-Expression gegenüber den restlichen B-Zellen. Unter OX33schwach⁺ LK-Zellen befanden sich im Gegensatz zur LEW-Milz vornehmlich CD1dnormal⁺ Zellen.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der LEW-/F344-Ratte und der BALB/c-Maus stellte sich auch in den LEW-LK ein kleiner Anteil der OX33⁺/TCR⁻ Zellen in CD1d negativere Bereiche dar (s. Abb. 9). Dieser Anteil war ähnlich groß wie der in CD1d positiveren Bereichen, so dass sich auch um Ausläufer der Normalverteilung handeln könnte.

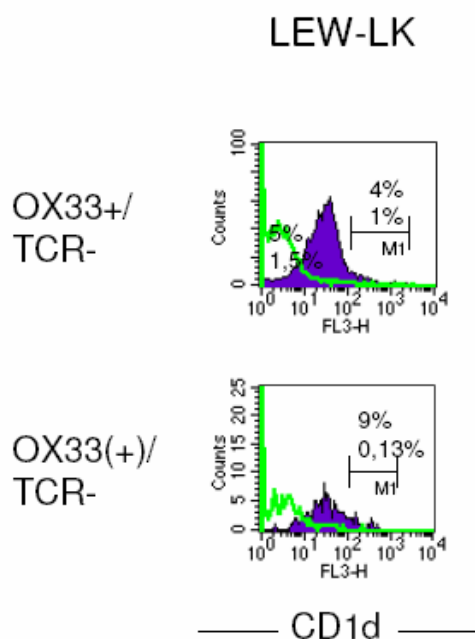


Abb. 9. CD1d-Expression von B-Zellen der LEW-LK. In den Histogrammen sind OX33 positive Populationen als gefüllte Fläche mit entsprechender Intensität der CD1d-Expression (biotinylierter mAk gegen CD1d) dargestellt. Mit isotypidentischen Kontrollantikörpern gefärbte Zellen sind als Kontur eingefügt. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der Subpopulation an der jeweiligen Population (oberer Wert) sowie auf den Anteil der Subpopulation an der Gesamtheit der untersuchten Zellen (unterer Wert).

LK CD1d FL3	OX33+/ TCR-		OX33(+)/ TCR-	
	MFI	%	MFI	%
LEW				
+	32	26	34	1,3
+++	249	1	224	0,13

Tab. 12. Vergleich der CD1d-Expression und der Anzahl von B-Zellen der LEW-LK. Abgebildet sind MFI-Werte (biotinylierter mAk gegen CD1d) von Populationen mit normaler CD1d-Expression bzw. von Populationen mit starker CD1d-Expression sowie der Anteil der Population an der Gesamtheit der untersuchten Zellen. Die Werte entstammen den Histogrammen der aufgeführten OX33/TCR/CD1d-Färbungen.

3.1.5 Vergleich der CD1d-Expression von LEW-/F344-Ratte und BALB/c-Maus

Die Färbungen ergaben, dass fast alle isolierten Zellen der untersuchten lymphatischen Gewebe CD1d positiv im Vergleich zur Isotypkontrolle waren. Die Intensität, mit der die Mehrheit der T- oder B-Zellen CD1d gegenüber kleineren Populationen mit erhöhter CD1d-Expression exprimierten, wurde als „normal“ deklariert. Diese konstitutive CD1d-Expression (einfach-positiv, +) stellte sich in den verschiedenen lymphatischen Organen unterschiedlich dar. In der LEW-Ratte war sie jeweils nur geringfügig höher als in der BALB/c-Maus, wobei die des Thymus jeweils oberhalb der der Milz und der Lymphknoten lag (s. Tab. 13).

Zusätzlich zur unterschiedlichen CD1d-Expression zeigten sich in den jeweiligen Vergleichs-Färbungen mit dem CD1d-Isotyp-Antikörper IgG2b verschiedene MFI-Werte, die in den Färbungen der Milz jeweils höher waren als in den LEW-Lymphknoten und im LEW- und BALB/c-Thymus. Die genauere Betrachtung

einzelner Populationen deckte auf, dass OX33⁺ Milzzellen stärker als die restlichen Zellen durch IgG2b markiert wurden (Daten nicht gezeigt).

MFI FL3	CD1d	Thymus	Milz	LK
LEW	Isotyp	6	16	5
	+	71	42	32
	+++		327	320
F344	Isotyp	nicht untersucht	14	nicht untersucht
	+		47	
	+++		269	
BALB/c	Isotyp	5	10	nicht untersucht
	+	61	35	
	+++		382	

Tab. 13. Vergleich der CD1d-Expression und der Intensität des isotypidentischen Kontrollantikörpers von Zellen lymphatischer Organe der LEW-/F344-Ratte und der BALB/c-Maus. Es wurden nur MFI-Werte der CD1d-Expression und der Intensität des isotypidentischen Kontrollantikörpers der gesamten Zellen des Organs bzw. des Hauptteils der Zellen gegenüber der kleineren Population mit erhöhter CD1d-Expression abgebildet. Die Werte entstammen Histogrammen aller untersuchten Zellen des Organs nach Färbung mit einem biotinylierten mAk gegen CD1d und dem biotinylierten isotypidentischen Kontrollantikörper und nachfolgender FACS-Analyse.

In der LEW-Milz lag die CD1d-Expression der Zellen mit konstitutiver CD1d-Expression etwas unterhalb und die von Zellen mit erhöhter CD1d-Expression (mehrfach positiv, +++) oberhalb der von der F344-Milz, so dass insgesamt der MFI-Wert aller Milzzellen der LEW-Ratte und der F344-Ratte beinahe identisch war (s. Tab. 13).

Es sei daran erinnert, dass die LEW-Ratte ein anderes CD1d-Allel besitzt als die F344-Ratte. So gab es einige Subpopulationen, die in der LEW-Ratte CD1d stärker exprimierten bzw. stärker durch 232 gefärbt wurden als in der F344-Ratte.

Wie schon in der SJL-Maus [127] und der C57BL/6-Maus [81] festgestellt wurde, exprimierten CD4⁺ T-Zellen der BALB/c-Maus CD1d stärker als CD8⁺ T-Zellen. Während im Thymus die Intensität der CD1d-Expression ebenfalls doppelt so hoch lag (s. Tab. 2), nahmen die konstitutiven CD1d-Expressionslevel der Hauptteile peripherer T-Zellen zwar auch in der BALB/c-Maus jeweils ab, jedoch erfolgte dies besonders bei CD4⁺ T-Zellen, so dass der Unterschied in der Milz nur noch gering war, also nicht doppelt so hoch wie in der C57BL/6-Maus (s. Tab. 5).

Dagegen waren in der LEW-Ratte die CD1d-Expressionslevel von CD8⁺ T-Zellen sowohl im Thymus als auch in der Milz und in den Lymphknoten höher als von CD4⁺ T-Zellen. Allerdings zeigten sich in der Peripherie nach jeweiliger Abnahme der CD1d-Expression kaum noch Unterschiede (s. Tab. 2, 5, 10).

Demgegenüber wick in der F344-Milz die CD1d-Expression der T-Zellpopulationen nicht voneinander ab und es stellte sich der geringste Unterschied zwischen B- und T-Zellen dar.

In der LEW- und F344-Ratte sowie in der BALB/c-Maus exprimierte der Großteil der B-Zellen der Milz CD1d stärker als der Großteil der T-Zellen (s. Tab. 5, 8).

3.2 Effekte von Anti-CD1d-Antikörpern auf rCD1d⁺ Transduktanten

Für die Analyse der Effekte von Antikörpern auf CD1d exprimierende Zellen wurde Ratten-CD1d (rCD1d) mittels retroviraler Transduktion in verschiedenen Tumorzelllinien exprimiert. Diese Zelllinien wurden dann auf antikörperinduzierte Effekte untersucht.

3.2.1 Effekte von Anti-CD1d-Antikörper auf rCD1d⁺ Raji-Zellen

Zu Beginn wurden verschiedene, erstmals generierte Anti-CD1d-Antikörper auf mögliche signal-induzierende Eigenschaften untersucht. Dies erfolgte zunächst nur an Raji-Zellen, die mit rCD1d transduziert wurden, und danach an anderen rCD1d⁺ Transduktanten. Raji-Zellen sind humane Tumor-B-Zellen des Burkitt-Lymphoms, die in Kultur zu geringer Aggregatbildung neigen.

3.2.1.1 Die Anti-CD1d-Antikörper zeigen Unterschiede in der Induktion von Aggregatbildung und Reduktion der Zellzahl

Als erstes wurden rCD1d⁺ Raji-Zellen mit verschiedenen Anti-CD1d-Antikörpern über Nacht inkubiert und die Ansätze am darauffolgenden Tag unter dem Mikroskop verglichen. Je nach Antikörper konnte eine noch stärkere Aggregatbildung bzw. zusätzlich eine Reduktion der Zellzahl beobachtet werden (s. Abb. 10).

Die alleinige Kultivierung von rCD1d⁺ Raji-Zellen in Medium führte zu einer hohen Kulturdichte mit Aggregaten und zu wenigen zellfreien Stellen. Die Inkubation mit dem Anti-CD1d-Antikörper 232 resultierte in einer etwas stärkeren Aggregatbildung mit konsekutiv vermehrt zellfreien Stellen bei immer noch hoher Kulturdichte.

Dagegen zeigte die Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit den Anti-CD1d-Antikörpern 58/4 und 244/1 in der gleichen Vergrößerung eine extreme Aggregatbildung mit deutlicher Zunahme der Aggregatgröße. Weite zellfreie Abschnitte und das Vorhandensein vieler kleiner dysmorpher Strukturen gaben Hinweise auf eine Reduktion lebender Zellen durch Zelltod.

Folglich scheinen 58/4 und 244/1, nicht aber 232, eine starke Aggregatbildung und Zelltod in rCD1d⁺ Raji-Zellen auszulösen.

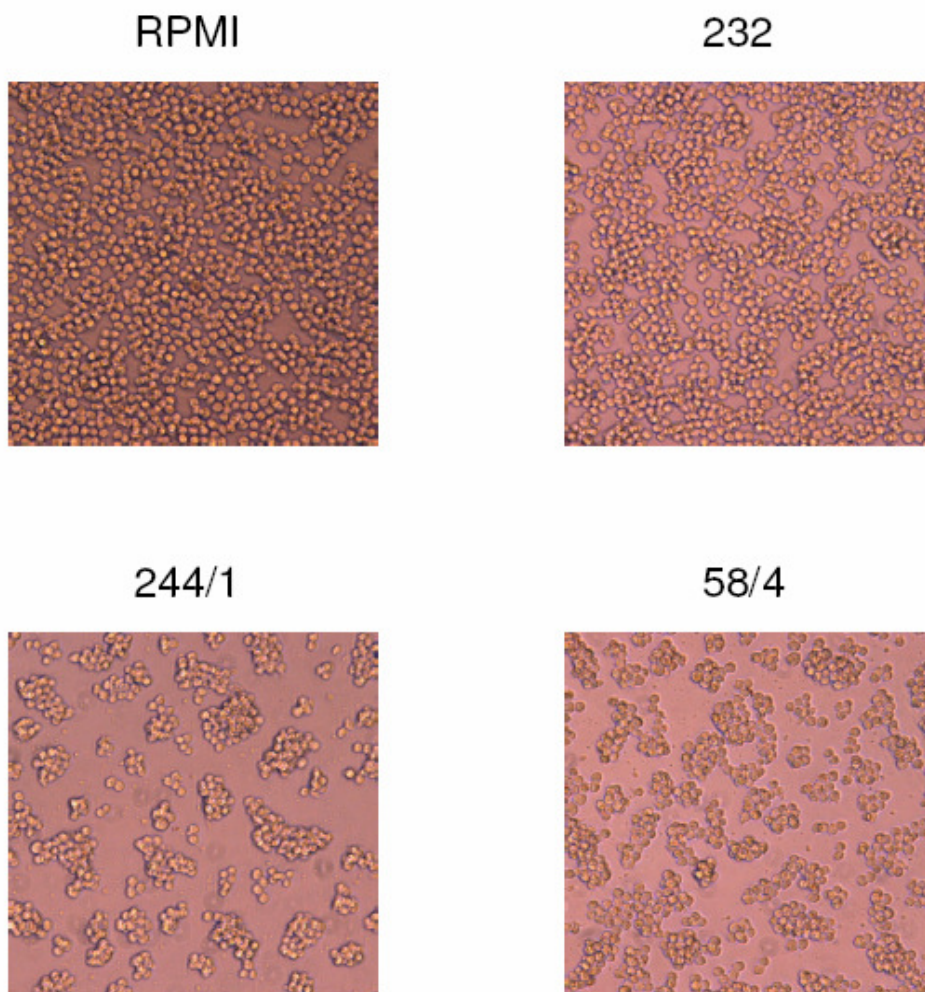


Abb. 10. Vergleich der Effekte verschiedener Anti-CD1d-Antikörper. rCD1d⁺ Raji-Zellen gleicher Anzahl wurden mit verschiedenen Anti-CD1d-Antikörpern der gleichen Konzentration über Nacht inkubiert und am darauffolgenden Tag unter dem Lichtmikroskop verglichen. Je nach Antikörper konnte eine noch stärkere Aggregatbildung bzw. zusätzlich eine Reduktion der Zellzahl gegenüber der alleinigen Kultivierung in Medium (RPMI) beobachtet werden.

3.2.1.2 Bestätigung der Effekte durch Zellzählung

Damit lebende und tote Zellen gezählt werden konnten, wurden die behandelten rCD1d⁺ Raji-Zellen mit Trypanblau (TB) gefärbt. TB wird bei Störung der Membranintegrität oder dem Verlust der Kapazität, Farbstoffe aktiv auszuschließen, von der Zelle aufgenommen. Solche Zellen werden als nicht lebensfähig und damit als sterbende oder tote Zellen betrachtet. So konnten sie als vollständig blau gefärbte, meist nicht runde Struktur von lebenden Zellen, die sich ungefärbt und rund darstellten, leicht unterschieden werden. Nach Inkubation mit 58/4 oder 244/1 wurde

eine konzentrationsabhängige Abnahme lebender Zellen bei gleichzeitiger Zunahme toter Zellen sowie eine starke Aggregatbildung beobachtet. Dagegen führte die Zugabe von 232 kaum zu Veränderungen gegenüber der alleinigen Kultivierung in Medium. Höhere Konzentrationen bewirkten sogar eine geringe Zunahme der Zellzahl und der Aggregatbildung.

Folglich könnte 232 auf rCD1d⁺ Raji-Zellen eine geringfügig aktivierende Wirkung haben, die zu einer etwas gesteigerten Aggregatbildung und eventuell besseren Lebensfähigkeit der Zellen führt. Dagegen ist wahrscheinlich, dass 244/1 und besonders 58/4 Zelltod in dieser Zelllinie auslösen, wobei überlebende Zellen mit einer sehr starken Aggregatbildung reagieren.

3.2.1.3 Quantifizierung toter Zellen mittels Propidiumiodid und FACS-Analyse

Eine objektivere Quantifizierung toter Zellen kann durch Färbung mit Propidiumiodid (PI) und anschließender FACS-Analyse erzielt werden. Denn PI formt fluoreszierende Komplexe mit der DNA toter Zellen [176], unabhängig davon, ob Apoptose oder CICD ausgelöst wurde. PI positive Ereignisse erscheinen in der FACS-Analyse gleichermaßen in der Fluoreszenz 2 und 3, so dass der Anteil toter Zellen in FL2-Histogrammen beurteilt wurde. Hiermit konnte der 58/4- bzw. 244/1-vermittelte Zelltod von rCD1d⁺ Raji-Zellen bestätigt und gemessen werden. Allerdings ergibt sich durch diese Art der Auswertung die Problematik, dass größere Ereignisse im FSC/SSC-Dotplot-Diagramm auch eine höhere PI-Markierung aufweisen, wodurch einige davon im FL2-Histogramm als tote Zellen interpretiert werden könnten. Da sowohl 58/4 als auch 244/1 eine starke Aggregatbildung induzierten, wurde eine andere Form der Auswertung gewählt. Diese veranschaulicht die Effekte von 58/4 auf rCD1d⁺ Raji-Zellen im FL2/FSC-Dotplot-Diagramm anhand von 4 verschiedenen Gates je nach Zellgröße und PI-Markierung. Es wurden die prozentualen Anteile von lebenden, nicht aggregatbildenden Zellen (Gate 1), von PI angefärbten und damit toten Zellen (Gate 2), von lebenden, aggregatbildenden Zellen (Gate 3) und von kleinen Zellresten (Gate 4) beurteilt (s. Abb. 11a).

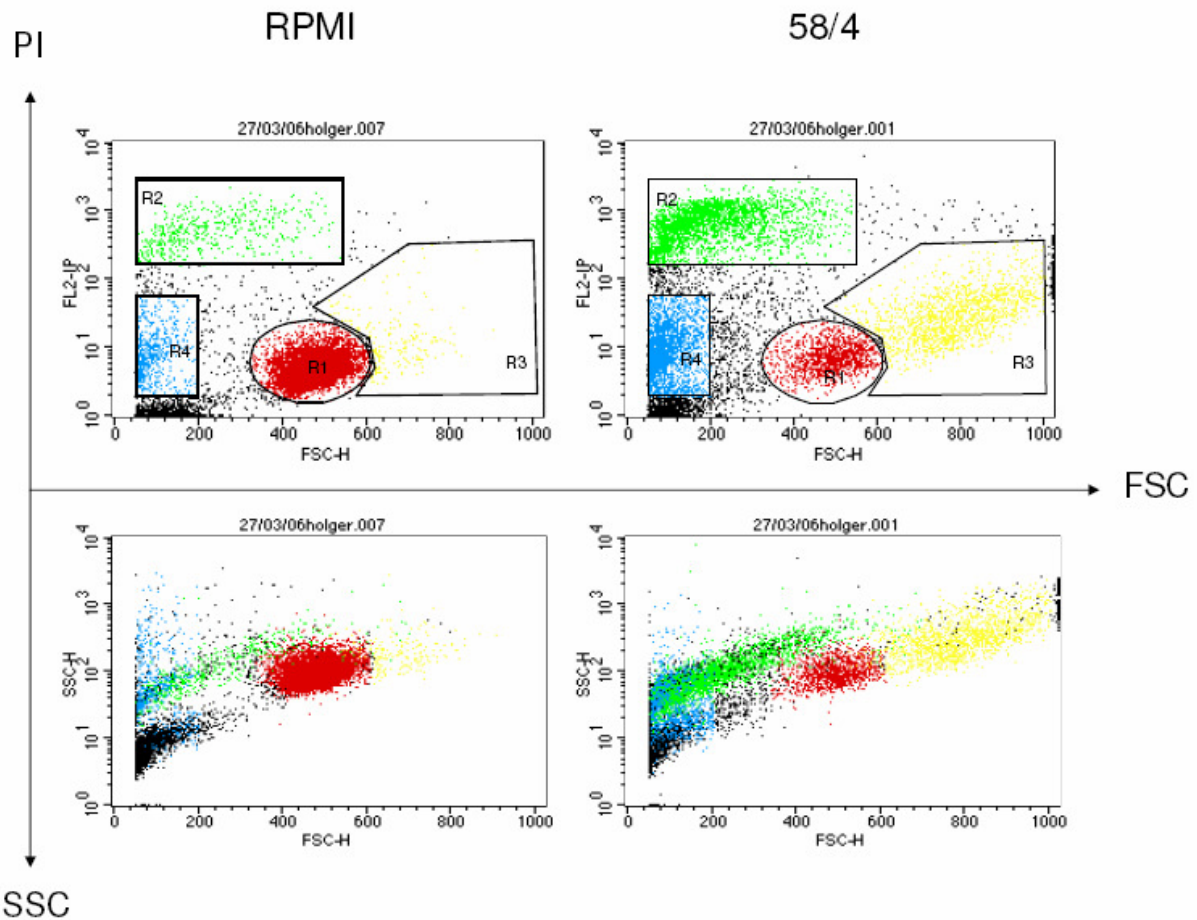


Abb. 11a. FACS-Analyse von rCD1d⁺ Raji-Zellen nach Kultivierung in Medium (RPMI) oder nach Inkubation mit 58/4. rCD1d⁺ Raji-Zellen wurden nach Kultivierung bzw. Inkubation mit 58/4 mit PI gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte anhand der Parameter PI-Markierung und Größe bzw. Granularität und Größe der Ereignisse. Zur Beurteilung der prozentualen Anteile von lebenden, nicht aggregatbildenden Zellen (R1), von PI angefärbten und damit toten Zellen (R2), von lebenden, aggregatbildenden Zellen (R3) und von kleinen Zellresten (R4) wurden in dem FSC/FL2-Dotplot-Diagramm entsprechende Gates gesetzt. Dadurch ließ sich erkennen, wo sich die Ereignisse der verschiedenen Gates im FSC/SSC-Dotplot-Diagramm befinden.

Auf diese Weise lassen sich größere Ereignisse mit stärkerer PI-Anfärbung als die restlichen lebenden Zellen besser von den kleineren, toten Ereignissen mit starker PI-Anfärbung abgrenzen.

Es zeigte sich eine Zunahme der Anteile von lebenden, aggregatbildenden Zellen, toten Zellen und kleinen Zellresten mit zunehmender Konzentration von 58/4, wohingegen der Anteil von lebenden, nicht aggregatbildenden Zellen sank. Nach Inkubation mit 244/1 konnten diese Veränderungen in ähnlicher Ausprägung beobachtet werden.

Dagegen führte die Zugabe von 232 nur zu einem minimalen Anstieg des Anteils toter Zellen, zu einer geringen Zunahme des Anteils lebender, aggregatbildender Zellen und vor allem zu nur geringen Veränderungen des Anteils lebender, nicht aggregatbildender Zellen (s. Abb. 11b). Da auch höhere Konzentrationen von 232 (20µl/ml) über Nacht zu keinem Anstieg des Anteils toter Zellen geführt hatten, kann dieser Anti-CD1d-Antikörper vermutlich generell keinen Zelltod in rCD1d⁺ Raji-Zellen auslösen.

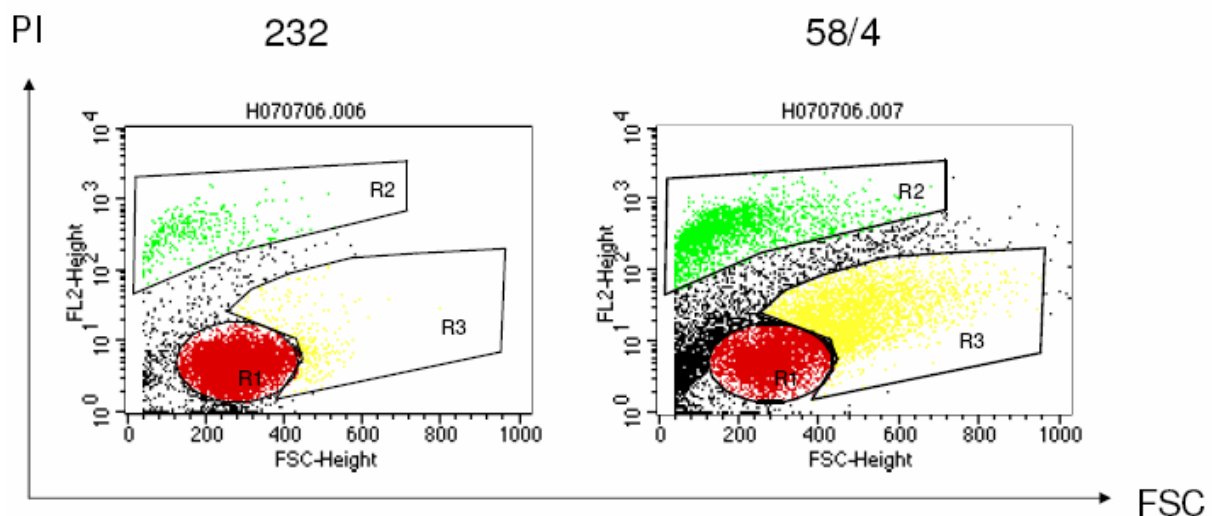


Abb. 11b. FACS-Analyse von rCD1d⁺ Raji-Zellen nach Inkubation mit 232 oder 58/4. rCD1d⁺ Raji-Zellen wurden nach Inkubation mit 232 oder 58/4 mit PI gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Auswertung erfolgte anhand der Parameter PI-Markierung und Größe der Ereignisse. Zur Beurteilung der prozentualen Anteile von lebenden, nicht aggregatbildenden Zellen (R1), von PI angefärbten und damit toten Zellen (R2), von lebenden, aggregatbildenden Zellen (R3) wurden in dem FSC/FL2-Dotplot-Diagramm entsprechende Gates gesetzt. So konnte ein Vergleich der Effekte von 232 und 58/4 erfolgen.

Bei der Interpretation dieser FACS-Auswertung muss beachtet werden, dass die Gates v. a. bei starker Zelltodinduktion ineinander übergehen und so schwer voneinander abgrenzbar sind. Deshalb wurde zwischen den Gates ein Abstand gelassen, wodurch die prozentualen Anteile in der Summe nicht 100% ergeben.

Zudem sind die Werte der Anteile immer in Relation zu der mit dem FACS aufgenommenen konstanten Anzahl von Ereignissen zu interpretieren. Denn bei höheren 58/4-Konzentrationen konnte der Anteil toter Zellen wie erwartet im Vergleich zu geringeren Konzentrationen ansteigen, jedoch der Anteil lebender, aggregatbildender Zellen relativ dazu abnehmen. Auch der umgekehrte Fall konnte

eintreten, so dass die Ergebnisse von 58/4 und 244/1 schwankten. In manchen Proben hatte 58/4 vermutlich derart stark Zelltod ausgelöst, dass sich viele Zellen nicht mehr mit PI anfärbten, sondern im Gate der Zellreste erschienen. Dieses Phänomen war allerdings unterschiedlich stark vorzufinden. Schon eine andere Studie hatte von desintegrierten Teilchen im Rahmen des MHC II-vermittelten Zelltodes berichtet [144].

Obwohl auch generell das Ausmaß der Effekte in den verschiedenen Versuchen variabel war, konnte eindeutig die beschriebene Tendenz festgestellt werden.

3.2.1.4 Titration von 58/4 und der Einfluss vermehrter Zellkontakte

Zur Titration von 58/4 und zur Untersuchung der Effekte in unterschiedlichen Kulturbedingungen wurden rCD1d⁺ Raji-Zellen in einer 24-well-Platte mit flachem Boden bzw. einer 96-well-Platte mit Rundboden mit ansteigenden Konzentrationen von 58/4 inkubiert (s. Abb. 12).

In beiden Ansätzen zeigte sich ab 0,062µl/ml 58/4 eine starke Aggregatbildung. Eine deutliche Zunahme des Anteils toter Zellen konnte in der 96-well-Platte mit Rundboden schon ab 0,185µl/ml 58/4 beobachtet werden, während dies in der 24-well-Platte mit flachem Boden erst ab 0,5µl/ml 58/4 zu erkennen war.

Somit ließ sich in beiden Platten eine ähnlich starke Aggregatbildung nachweisen, die jeweils schon bei geringerer Konzentration auftrat als die Zunahme des Anteils toter Zellen. In der 96-well-Platte mit Rundboden konnte im Vergleich zur 24-well-Platte ein schnellerer Anstieg und ein höherer maximaler Wert des Anteils toter Zellen festgestellt werden.

Diese Beobachtungen könnten darauf hinweisen, dass vermehrte Zellkontakte in der 96-well-Platte mit Rundboden für eine etwas stärkere Zelltodinduktion verantwortlich sind. Selbst in der Kontroll-Probe mit Medium konnten unter diesen Bedingungen mehr PI positive Zellen registriert werden.

In beiden Ansätzen stellte sich ab 1,66µl/ml 58/4 eine Sättigung der Zelltodinduktion ein. Außerdem nahm in der 96-well-Platte mit Rundboden der Anteil lebender, nicht aggregatbildender Zellen stetig ab, während der Anteil kleiner Zellreste fiel. Dagegen konnte in der 24-well-Platte mit flachem Boden solch eine kontinuierliche Veränderung nicht beobachtet werden.

Da in beiden Platten bei 0,5µl/ml 58/4 deutliche Veränderungen aller vier Anteile festzustellen waren, wurde in den weiteren Versuchen diese Konzentration für 1×10^5 rCD1d⁺ Zellen/100µl verwendet.

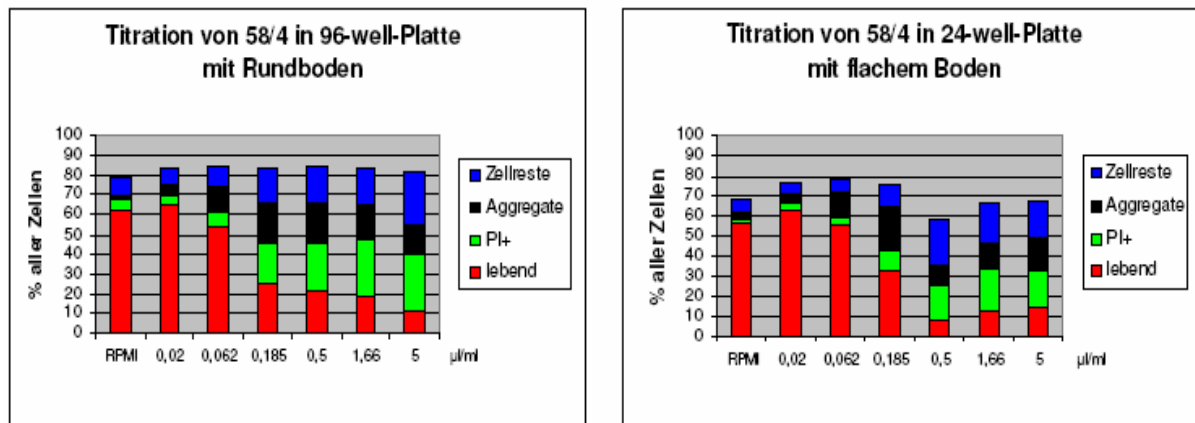


Abb. 12. Titration von 58/4 und Untersuchung der Effekte in unterschiedlichen Kulturbedingungen. 5×10^5 rCD1d⁺ Raji-Zellen/ml wurden in einer 96-well-Platte mit Rundboden (pro Ansatz 5 wells à 200µl) bzw. einer 24-well-Platte mit flachem Boden (pro Ansatz 1 well à 1ml) mit ansteigenden Konzentrationen von 58/4 jeweils 5 Stunden inkubiert. Nach PI-Färbung erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Prozentangaben der verschiedenen Anteile entstammen den entsprechenden Gates der FSC/FL2-Dotplot-Diagramme.

3.2.1.5 58/4 zeigt bei 37°C innerhalb weniger Minuten und bei 4°C nach wenigen Stunden erste Effekte

Die Untersuchung der Kinetik der Effekte von 0,5µl/ml 58/4 auf rCD1d⁺ Raji-Zellen ergab bereits nach 10-minütiger Inkubation im 37°C warmen Wasserbad eine Verdopplung des Anteils toter Zellen (s. Abb. 13).

Der Anteil lebender, aggregatbildender Zellen war schon nach 2 Minuten gestiegen. So erreichte der Anteil lebender, aggregatbildender Zellen nach 10 Minuten und der Anteil toter Zellen nach 30 Minuten seinen relativen Maximalwert, so dass der durch 58/4 ausgelöste Prozess deutlich schneller als klassische Apoptose ist.

Da die 30-minütige Inkubation zu fast identischen Ergebnissen wie die 60-minütige Inkubation führte, ist in diesem Zeitraum von einer Sättigung der Effekte auszugehen.

In den Proben mit längerer Inkubation waren wieder ein relativ größerer Anteil lebender, nicht aggregatbildender Zellen und eine Reduktion des Anteils toter Zellen zu erkennen.

Im Übrigen zeigten sich auch nach 3-stündiger alleiniger Kultivierung in Medium im Gegensatz zur 2-minütigen alleinigen Kultivierung eine Zunahme des Anteils lebender, nicht aggregatbildender Zellen, eine Abnahme des Anteils toter Zellen und eine Zunahme lebender, aggregatbildender Zellen um jeweils 2%-Punkte (Daten nicht gezeigt).

Die Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit 0,5µl/ml 58/4 im 4°C kalten Eisbad ergab erst nach 3 Stunden eine geringe Zunahme des Anteils toter Zellen, aber einen deutlichen Anstieg des Anteils lebender, aggregatbildender Zellen. Erst nach 5 Stunden war ein hoher Anteil toter Zellen zu erkennen.

Nach 1 Stunde hatte es noch fast keine Unterschiede zwischen der Inkubation mit 58/4 und der Kontrollprobe mit Medium gegeben. Der Anteil der Zellreste blieb in diesem Versuch unabhängig von der Inkubationszeit nahezu unverändert.

Folglich führte die Inkubation mit 58/4 bei 4°C nach einiger Zeit zu ähnlichen Effekten wie bei 37°C nach kürzester Zeit.

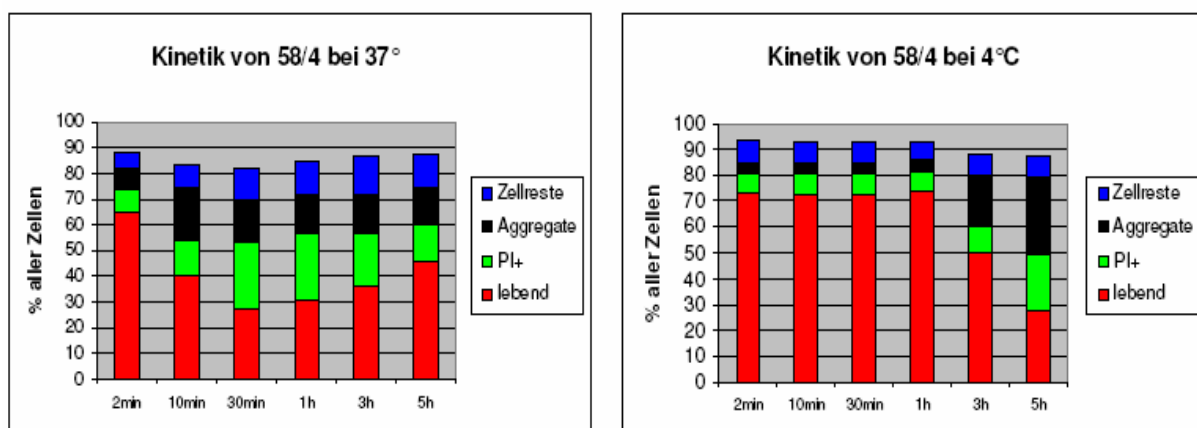


Abb.13. Kinetik der durch 58/4 induzierten Effekte. Zur Untersuchung der Kinetik der Effekte von 58/4 wurden rCD1d⁺ Raji-Zellen jeweils mit der gleichen Konzentration von 58/4 (0,5µl/ml) inkubiert, nach bestimmten Zeitabständen mit PI gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Prozentangaben der verschiedenen Anteile entstammen den entsprechenden Gates der FSC/FL2-Dotplot-Diagramme.

3.2.1.6 Die 58/4-induzierten Effekte ähneln denen von Anti-MHC II-

Antikörpern

Da es sich bei rCD1d⁺ Raji-Zellen um maligne humane B-Zellen handelt, konnten die CD1d-vermittelten Effekte mit MHC II-vermittelten Effekten verglichen werden. Hierfür wurden rCD1d⁺ Raji-Zellen mit 58/4 Kulturüberstand (KÜ) oder HB55 KÜ inkubiert (s. Abb. 14). HB55 ist ein Anti-HLA-DR-Antikörper, der MHC II-vermittelten Zelltod induzieren kann und dessen Wirkung vielfach untersucht wurde und allgemein anerkannt ist [144].

Die Inkubation mit HB55 KÜ ergab ähnliche Ergebnisse wie die mit 58/4 KÜ, so dass die gleiche Form der FACS-Auswertung verwendet werden konnte. Besonders bei der niedrigeren Konzentration zeigte sich nach Zugabe von 58/4 KÜ ein größerer Anteil an toten Zellen, wohingegen die Inkubation mit HB55 KÜ zu relativ höheren Anteilen an lebenden aggregatbildenden Zellen führte. Da die Proben mit 58/4 KÜ auch mehr kleine Zellreste aufwiesen, scheint 58/4 KÜ in rCD1d⁺ Raji-Zellen stärker Zelltod zu induzieren als HB55 KÜ.

Eine Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit HB55 KÜ oder 58/4 KÜ über Nacht, die jeweils größere Anteile toter Zellen ergab, bestätigte diese Beobachtung (Daten nicht gezeigt).

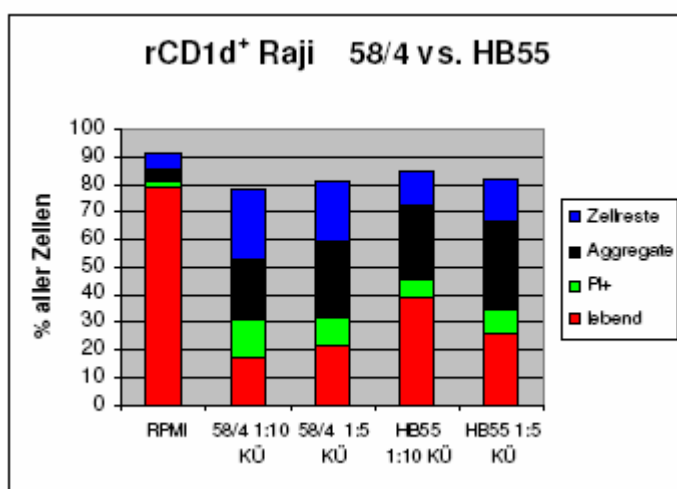


Abb. 14. Vergleich der Effekte von 58/4 und HB55. Zum Vergleich der 58/4- und HB55-vermittelten Effekte wurden rCD1d⁺ Raji-Zellen mit 58/4 oder HB55 in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. Nach PI-Färbung erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Prozentangaben der verschiedenen Anteile entstammen den entsprechenden Gates der FSC/FL2-Dotplot-Diagramme.

Demgegenüber führte die Inkubation von rCD1d⁺ P3/2-Zellen, die mit HLA-DR1 transduziert waren, weder mit 58/4 noch mit HB55 zu wesentlichen Veränderungen der Anteile toter Zellen und lebender aggregatbildender (Daten nicht gezeigt).

3.2.1.7 Die Wirkung von 58/4 auf rCD1d⁺ Raji-Zellen ist CD1d-spezifisch und unabhängig von HLA-DR-Molekülen

Eine Inkubation von rCD1d negativen Raji-Zellen mit HB55 führte ebenfalls zu einer Zunahme des Anteils toter Zellen und zu einer starken Aggregatbildung. Dagegen zeigte die Inkubation dieser Zellen mit 58/4 eine beinahe identische Verteilung der verschiedenen Anteile wie die Kontroll-Probe mit Medium, so dass 58/4 auf diese Raji-Zellen keine Effekte hatte (Daten nicht gezeigt).

Folglich sind CD1d negative Raji-Zellen für den HB55-, aber nicht für den 58/4-vermittelten Zelltod empfänglich, so dass die Wirkung von 58/4 CD1d-spezifisch ist und kein unspezifischer oder sogar toxischer Effekt vorliegt.

Zum Nachweis, dass der CD1d-abhängige Mechanismus von der HLA-DR-vermittelten Signaltransduktion ins Zellinnere unabhängig ist, wurden rCD1d⁺ RJ 2.2.5-Zellen, eine HLA-DR negative Variante der Raji-Zellen, mit 58/4 inkubiert (s. Abb. 15). Es konnte ein deutlicher Anstieg des Anteils toter Zellen und des Anteils lebender, aggregatbildender Zellen festgestellt werden, wohingegen die Inkubation mit HB55 KÜ beinahe identische Ergebnisse lieferte wie die alleinige Kultivierung dieser Zellen in Medium.

Somit benötigt der CD1d-vermittelte Mechanismus keine HLA-DR-Moleküle für die Induktion des Zelltodes, was aber die gemeinsame Nutzung intrazellulärer Mechanismen nicht ausschließt.

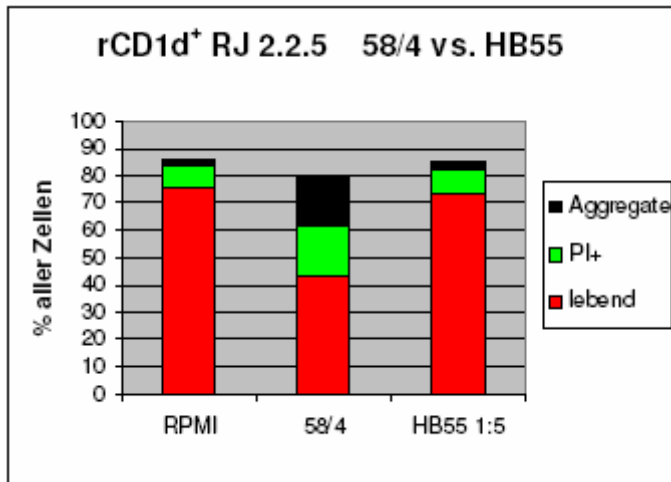


Abb. 15. Nachweis der Unabhängigkeit der 58/4-vermittelten Effekte von HLA-DR-Molekülen. Die Inkubation von rCD1d⁺ RJ 2.2.5-Zellen, einer HLA-DR negativen Variante der Raji-Zellen, führte nur bei 58/4, aber nicht bei HB55, zum Zelltod und zur Aggregatbildung. Nach PI-Färbung erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Prozentangaben der verschiedenen Anteile entstammen den entsprechenden Gates der FSC/FL2-Dotplot-Diagramme.

3.2.1.8 Veränderung der CD1d-/HLA-DR-Expression von Raji-Zellen durch Bindung verschiedener Antikörper

Studien zeigen, dass überlebende Zellen nach Inkubation mit Anti-MHC II-Antikörpern eine um 90% reduzierte Expression von MHC II-Molekülen aufwiesen [147]. Deshalb wurde die CD1d- und die HLA-DR-Expression vor und nach 5-stündiger Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit 232, 58/4 oder HB55 durch den entsprechenden unkonjugierten Antikörper gemessen. Nach der eigentlichen Inkubation wurde zwischen der erneuten Färbung mit dem jeweiligen Antikörper plus DaMIg-PE (jeweils 20 Minuten Inkubation) und der direkten Färbung nur mit DaMIg-PE unterschieden (s. Abb. 16).

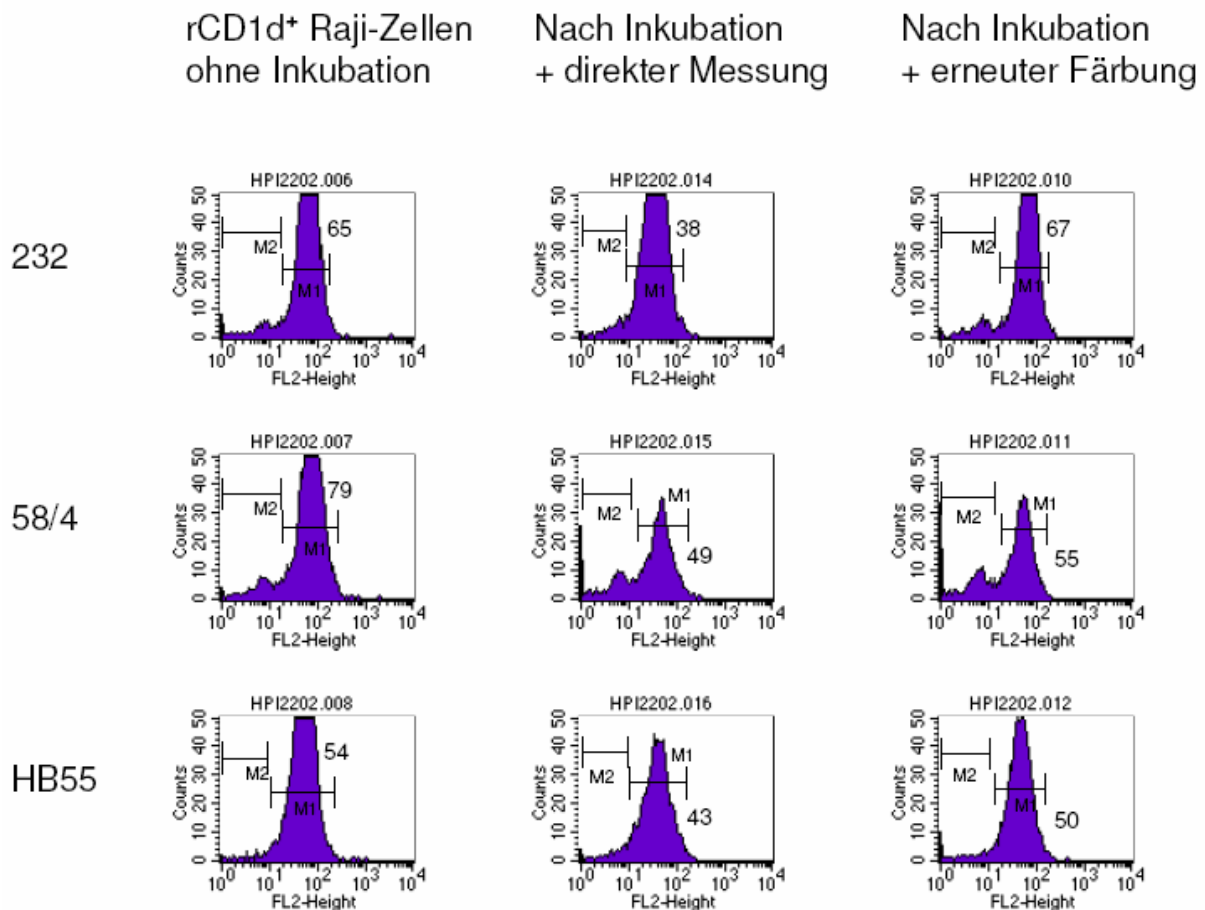


Abb. 16. Messung der CD1d- bzw. HLA-DR-Expression vor und nach Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit 232, 58/4 oder HB55. Die CD1d- bzw. HLA-DR-Expression wurde vor und nach der 5-stündigen Inkubation durch den entsprechenden unkonjugierten Antikörper gemessen. Nach der eigentlichen Inkubation wurde zwischen der direkten Färbung nur mit DaMlg-PE und der erneuten Färbung mit dem jeweiligen Antikörper plus DaMlg-PE unterschieden. Es wurden nur lebende, nicht aggregatbildende Zellen aus dem FSC/SSC-Dotplot-Diagramm betrachtet. Hiervon sind nur die MFI-Werte der Hauptpopulation der Zellen (M1) abgebildet.

Nach 5-stündiger Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit 232 zeigte die CD1d-Expression lebender, nicht aggregatbildender Zellen eine deutliche Reduktion nach direkter Messung. Dagegen war nach erneuter Färbung mit 232 eine leichte Zunahme gegenüber dem Ausgangswert festzustellen. Dieses Resultat legt nahe, dass CD1d-Moleküle nach Bindung von 232 internalisiert werden, woraufhin Raji-Zellen durch Recycling oder Neusynthese im Verlauf der 5-stündigen Inkubation die vorherige oder eine gering verstärkte CD1d-Expression erlangen.

Der Anteil von Aggregaten stieg durch die Inkubation mit 232 wie erwartet nur gering und die Veränderungen der CD1d-Expression der Aggregate stellten sich nach Inkubation mit 232 in einer ähnlichen Tendenz dar wie die der lebenden, nicht aggregatbildenden Zellen (Daten nicht gezeigt).

Die CD1d-Expression lebender, nicht aggregatbildender Zellen fiel durch die 5-stündige Inkubation mit 58/4 vergleichbar stark (um fast 40%) wie durch die Inkubation mit 232, jedoch konnte nach erneuter Färbung kaum eine Zunahme gegenüber dem Wert nach direkter Messung beobachtet werden. Demnach scheinen Raji-Zellen CD1d-Moleküle nach Bindung von 58/4 nicht stärker zu internalisieren als nach Bindung von 232, jedoch scheint hier die Abnahme der Zelloberflächenexpression nicht durch Expression von neu synthetisierten oder recycelnden Molekülen kompensiert zu werden.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließen sich nach Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit FITC-markierten Antikörpern sowohl bei 58/4 als auch bei 232 vereinzelt intrazelluläre Antigen-Antikörper-Komplexe nachweisen (s. Abb. 17). Zusätzlich zur Überlagerung der Fluoreszenz auf Zellmembranen aneinanderliegender Zellen waren an einigen Zellpolen stärker leuchtende Zonen, sogenannte caps, zu erkennen, die Vorzeichen der Internalisierung darstellen.

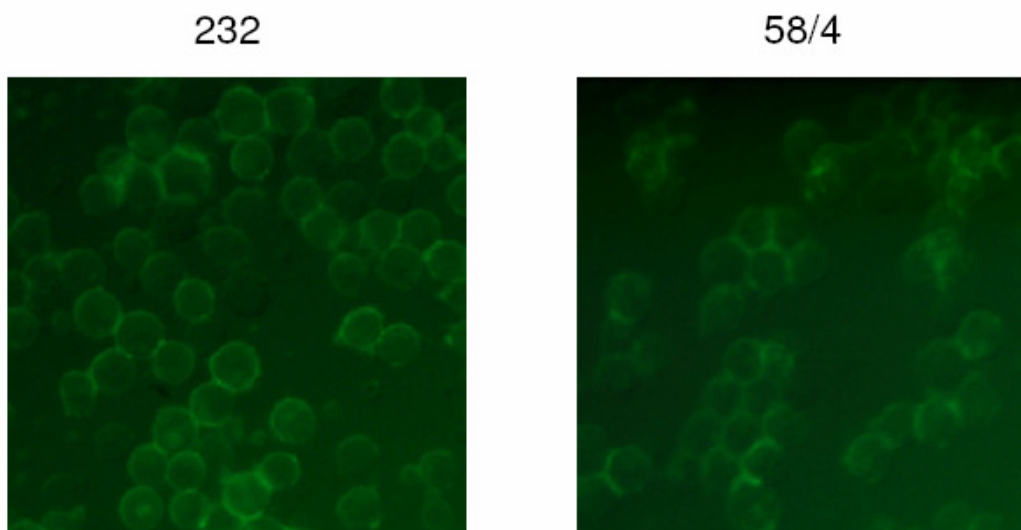


Abb. 17. Betrachtung der Antigen-Antikörper-Komplexe unter dem Fluoreszenzmikroskop. Nach Inkubation von rCD1d⁺ Raji-Zellen mit dem FITC-markierten Anti-CD1d-Antikörper 232 bzw. 58/4 ließen sich intrazelluläre Antigen-Antikörper-Komplexe und Vorzeichen der Internalisierung erkennen.

Auch nach Inkubation mit 58/4 konnte beobachtet werden, dass sich die CD1d-Expression von aggregatbildenden Zellen mit einer ähnlichen Tendenz änderte wie die von lebenden, nicht aggregatbildenden Zellen.

Durch die 5-stündige Inkubation mit HB55 war die HLA-DR-Expression lebender, nicht aggregatbildender Zellen nach direkter Messung nur etwas schwächer, während nach erneuter Färbung beinahe der Ausgangswert festgestellt wurde. Demnach reagierten in diesem Versuchsansatz Raji-Zellen nur mit einer geringen Abnahme (um 20%) der HLA-DR-Expression nach Bindung von HB55. Dies mag z. T. daran liegen, dass HB55-vermittelte Effekte (Zelltod, Aggregatbildung) generell langsamer auftraten, also erst im Verlauf der 5-stündigen Inkubation, so dass diese im Gegensatz zu den 58/4-induzierten Effekten noch nicht in der Färbung vor der 5-stündigen Inkubation beobachtet werden konnten.

Aggregate zeigten nach 5-stündiger Inkubation mit HB55 eine gering gesteigerte HLA-DR-Expression gegenüber dem Ausgangswert. Dies kann erneut darauf zurückgeführt werden, dass aufgrund der späteren Wirkung im Vergleich zu 58/4 erst nach der Inkubation eine deutliche Zunahme größerer Ereignisse mit stärkerer HLA-DR-Expression zu beobachten war.

3.2.1.9 Beeinflussung der Anfälligkeit für den 58/4- bzw. HB55-

vermittelten Zelltod durch anti-apoptotische Moleküle oder GFP

Zur Feststellung einer möglichen Abhängigkeit des 58/4-induzierten Zelltodes von Caspasen, wurden rCD1d⁺ Raji-Zellen mit anti-apoptotischen Vektoren transduziert. Der Vektor A1 kodiert das anti-apoptotische Molekül A1 der Bcl2-Familie und der Vektor dominant negative (dn) Caspase-9 ein Caspase-9 Molekül ohne funktionsfähiges katalytisches Zentrum. Beide enthalten zusätzlich eine Sequenz, die das „green fluorescence protein“ GFP kodiert, welches sich unter dem Fluoreszenzmikroskop grün darstellt und in der FACS-Analyse in der FL1 erscheint. Mit Hilfe der grünen Fluoreszenz kann der Erfolg der Transduktion leichter gemessen werden, so dass Vektor-positive Zellen von den negativen getrennt und kultiviert werden können. Nun sollte getestet werden, ob diese Transduktanten geringere Effekte auf eine Inkubation mit 58/4 oder HB55 zeigen.

Unerwarteterweise ergab die Inkubation von rCD1d⁺ Raji-A1-Zellen und rCD1d⁺ Raji-Caspase-9dn-Zellen mit 58/4 im Vergleich zu rCD1d⁺ Raji-Zellen eine jeweils stärkere Zunahme des Anteils toter Zellen (s. Abb. 18). Da auch mit GFP transduzierte rCD1d⁺ Raji-Zellen(+GFP) nach Zugabe von 58/4 einen ähnlich hohen

Anstieg des Anteils toter Zellen zeigten, könnte die Möglichkeit bestehen, dass die GFP exprimierenden Zellen für den 58/4-vermittelten Zelltod empfänglicher sind als die GFP negativen Zellen. Dies erschwert die Interpretation der folgenden Ergebnisse, da die rCD1d⁺ Raji-A1-Zellen eine fast doppelt so hohe GFP-Expression aufwiesen wie die beiden anderen GFP exprimierenden Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Falls eine höhere GFP-Expression eine stärkere Empfänglichkeit für 58/4 bedeuten würde, hätte A1 im Gegensatz zu Caspase-9dn einen hemmenden Effekt auf den 58/4-vermittelten Zelltod von rCD1d⁺ Raji-Zellen.

Auch der Anteil lebender, aggregatbildender Zellen war bei den drei grünen Transduktanten nach Inkubation mit 58/4 ähnlich groß und jeweils etwas höher als bei rCD1d⁺ Raji-Zellen (s. Abb. 18).

Dagegen ergab die Inkubation von rCD1d⁺ Raji-A1-Zellen mit HB55 einen geringeren Anstieg des Anteils toter Zellen als die der anderen beiden grünen Transduktanten, wobei diese eine beachtliche Übereinstimmung mit der von rCD1d⁺ Raji-Zellen zeigten. Folglich hatte die Expression von GFP keinen Einfluss auf den HB55-induzierten Zelltod. Der Anteil lebender, aggregatbildender Zellen war nach Zugabe von HB55 bei den grünen Transduktanten aber höher als bei rCD1d⁺ Raji-Zellen.

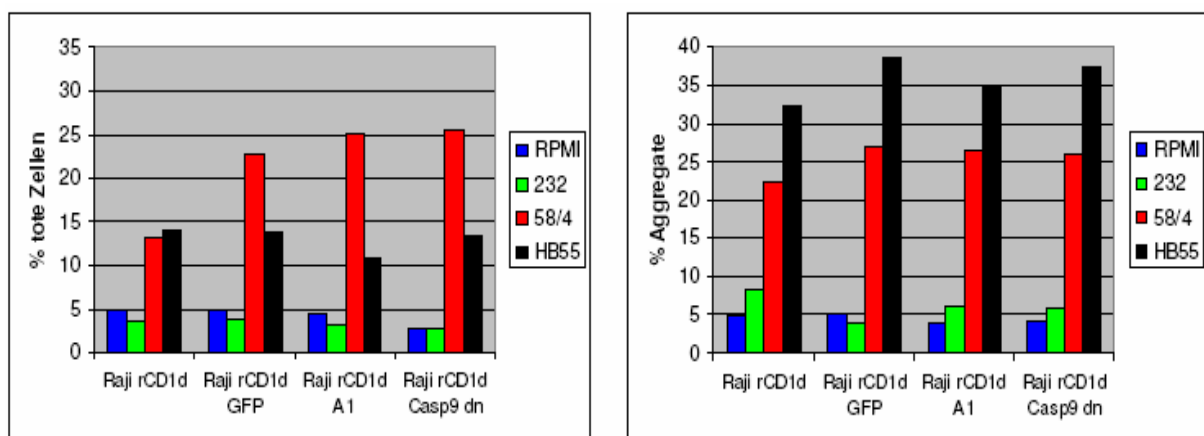


Abb. 18. Veränderung der Anfälligkeit für 232, 58/4 und HB55 in Abhängigkeit des Vektors. Zur Ermittlung des Einflusses von GFP oder anti-apoptotischen Molekülen auf die Empfänglichkeit wurden rCD1d⁺ Raji-Zellen mit verschiedenen Vektoren transduziert und mit unterschiedlichen Antikörpern inkubiert. Nach PI-Färbung erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Prozentangaben der PI positiven Anteile (links) und der lebenden, aggregatbildenden Zellen (rechts) entstammen den entsprechenden Gates der FSC/FL2-Dotplot-Diagramme.

Demnach scheint die zusätzliche Sequenz, die schon bestehende Anfälligkeit für den 58/4-vermittelten Zelltod, nicht aber für den HB55-vermittelten Zelltod zu

beeinflussen, so dass diese Sequenz Zellen nicht generell zusätzlich in ihrer Integrität stört. Da die untersuchten rCD1d⁺ Jurkat-Zellen, die wie später erwähnt keine Effekte auf die Inkubation mit 58/4 zeigten, ebenfalls GFP exprimierten, führt die GFP-Expression auch nicht zu einer grundsätzlichen Empfänglichkeit.

Zudem geben diese Ergebnisse Hinweise darauf, dass der HB55-vermittelte Zelltod etwas durch A1 gehemmt werden kann, während der 58/4-vermittelte Zelltod nur im Falle einer Korrelation zwischen der GFP-Expression und der Empfänglichkeit etwas durch A1 gehemmt wird. Sowohl der 58/4- als auch der HB55-induzierte Zelltod scheinen von Caspase-9 unabhängig zu sein.

3.2.2 58/4 induziert auch Effekte in malignen Maus-B-Zellen, jedoch nicht in malignen T-Zellen

Zur Überprüfung einer generellen Wirkung von 58/4 auf rCD1d positive Zellen, wurden auch andere Zelllinien mit rCD1d transduziert und auf antikörperinduzierte Effekte untersucht. Es stellte sich eine unterschiedliche Empfänglichkeit für den 58/4-vermittelten Zelltod heraus.

Die Inkubation von rCD1d⁺ A20-Zellen und besonders von rCD1d⁺ M12-Zellen mit 58/4 führte zu einem deutlichen Anstieg des Anteils toter Zellen und des Anteils lebender, aggregatbildender Zellen (s. Abb. 19a).

Da es sich bei beiden um Zelllinien eines Maus-B-Zell-Lymphoms handelt, ist folglich nicht nur die Kombination aus menschlichen Tumor-B-Zellen und Ratten-CD1d für 58/4-induzierte Effekte anfällig.

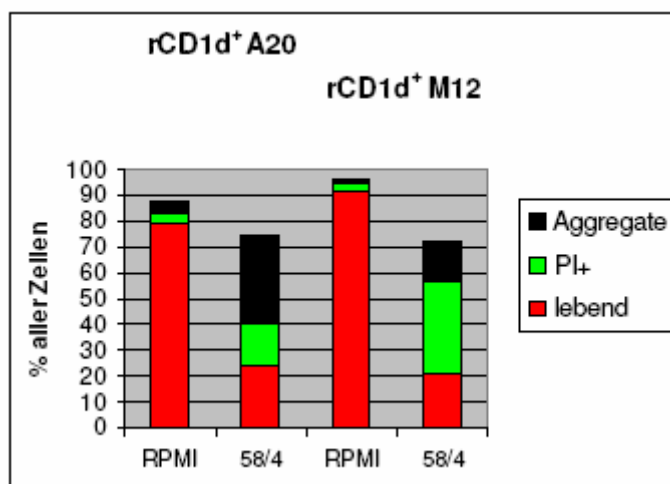


Abb. 19a. Überprüfung der Anfälligkeit von Tumor-B-Zellen der Maus für 58/4-induzierte Effekte. Die Inkubation sowohl von rCD1d⁺ A20-Zellen als auch von rCD1d⁺ M12-Zellen mit 58/4 führte zum Zelltod und zur Aggregatbildung. Nach PI-Färbung erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Prozentangaben der verschiedenen Anteile entstammen den entsprechenden Gates der FSC/FL2-Dotplot-Diagramme.

Dagegen bewirkte die Inkubation von rCD1d⁺ Wehi-Zellen mit 58/4 nur eine geringe Zu- bzw. Abnahme der Anteile. Bei rCD1d⁺ BW-Zellen und rCD1d⁺ Jurkat-Zellen waren nach Zugabe von 58/4 so gut wie gar keine Veränderungen der Anteile zu erkennen (s. Abb. 19b).

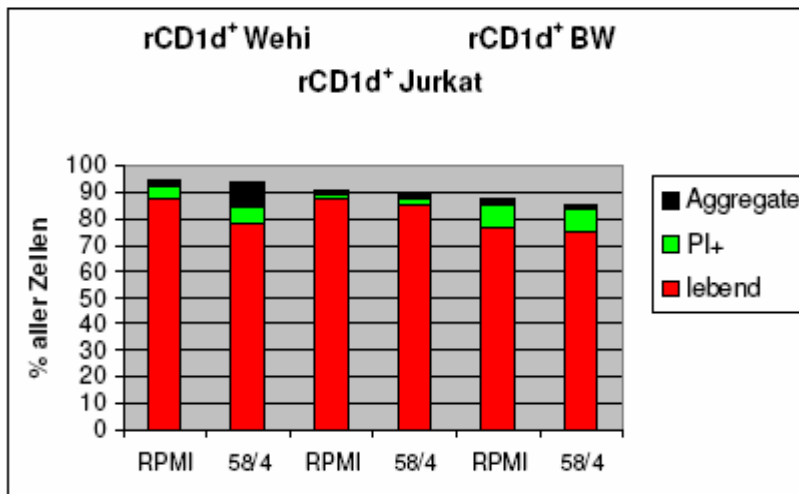


Abb. 19b. Überprüfung der Anfälligkeit einer B-Zell-Leukämie der Maus und von Tumor-T-Zellen der Maus bzw. des Menschen für 58/4-induzierte Effekte. Die Inkubation der verschiedenen Zelllinien mit 58/4 führte kaum bzw. nicht zu Veränderungen. Nach PI-Färbung erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Die Prozentangaben der verschiedenen Anteile entstammen den entsprechenden Gates der FSC/FL2-Dotplot-Diagramme.

Die verwendeten Wehi-Zellen haben den Phänotyp einer B-Zell-Leukämie einer Maus (Reifungsstadium entspricht dem von unreifen B-Zellen), während BW-Zellen einem Maus-T-Zell-Lymphom entstammen und es sich bei Jurkat-Zellen um Zellen einer humanen T-Zell-Leukämie handelt. Demnach scheint 58/4 vor allem auf reife B-Zell-Lymphome zu wirken.

Die Intensität der CD1d-Expression dieser Transduktanten war unterschiedlich. So zeigten rCD1d⁺ A20-Zellen und rCD1d⁺ BW-Zellen eine deutlich schwächere CD1d-Expression als rCD1d⁺ Raji-Zellen, rCD1d⁺ Wehi-Zellen, rCD1d⁺ Jurkat-Zellen (alle

etwa 3-fach höher) und besonders rCD1d⁺ M12-Zellen, die die höchste CD1d-Expression aufwiesen (Daten nicht gezeigt). Die CD1d-Expression korrelierte also nicht mit der Anfälligkeit für 58/4. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass eine bestehende Empfindlichkeit durch eine starke CD1d-Expression verstärkt wird.

4. DISKUSSION

Mit Hilfe des neu generierten gegen Ratten- und Maus-CD1d gerichteten Antikörpers 232 konnte erstmals die CD1d-Expression hämatopoetischer Zellen der Ratte und der Maus direkt verglichen werden.

Die Analyse ergab, dass alle Zellen der untersuchten lymphatischen Organe (Thymus, Milz und Lymphknoten) bis auf wenige Ausnahmen gering bis stark CD1d positiv waren. Es stellte sich eine unterschiedliche Intensität der konstitutiven CD1d-Expression in den verschiedenen lymphatischen Organen dar. Sie war in der LEW-Ratte jeweils geringfügig höher als in der BALB/c-Maus und war bei peripheren T-Lymphozyten geringer als bei Thymozyten (s. Tab. 13), wobei die Unterschiede keinesfalls so stark waren wie es zuvor für das humane System berichtet worden war, bei dem kortikale Thymozyten CD1d deutlich stärker als die reifen, medullären Thymozyten und die peripheren T-Zellen exprimieren [118]. Bei letzteren konnte eine erhöhte CD1d-Expression allerdings durch Aktivierung induziert werden.

Derzeit ist unklar, welche Funktion die konstitutive CD1d-Expression peripherer T- und B-Zellen in der Ratte bzw. in der Maus hat. Hierfür erscheinen mehrere Möglichkeiten realistisch, die z. T. vermutlich auch auf die nicht-lymphatischen CD1d-exprimierenden Zellen der verschiedensten Gewebe zutreffen. Analog den Antigen-präsentierenden MHC-Molekülen könnten CD1d-Moleküle stimulierende oder inhibierende Effekte induzieren, indem sie entweder mit T-Zellantigenrezeptoren, die Komplexe von CD1d und CD1d-Liganden erkennen, oder mit CD1d-spezifischen Rezeptoren reagieren. Die erste Möglichkeit ist offensichtlich und CD1d-restringierte T-Zellen bzw. CD1d-spezifische TCR sind relativ gut analysiert. Jedoch ist die physiologische Bedeutung des auf Lymphozyten exprimierten CD1d gegenüber dem von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (z. B. dendritische Zellen) exprimierten CD1d relativ unklar. Die zweite Möglichkeit wäre analog zur Bindung von MHC I-Molekülen an (inhibitorische) Rezeptoren auf NK-Zellen. Eine solche Bindung ist im Gegensatz zur CD1d-Bindung an TCR bisher biochemisch nicht nachgewiesen worden, doch wurde gezeigt, dass die Expression von CD1a-d des Menschen und von CD1d-Molekülen der Maus Zellen jeweils vor NK-Zell-vermittelter Zytolyse schützt [177]. Evidenzen, dass eine verminderte CD1d-Expression eine Strategie der Immunevasion ist, sind bisher indirekt, aber es gibt Beispiele, die dies nahelegen. So vermindert das Herpes-Simplex-Virus Typ 1 (HSV-1) die CD1d-

Expression durch Hemmung des Recyclings der CD1d-Moleküle von Lysosomen zur Plasmamembran. Möglicherweise ist das CD1d-Erkennungssystem auch durch NKT-Zell-vermittelte Zytolyse an der Immunabwehr dieses Virus beteiligt, von der sich das Virus durch eine verminderte CD1d-Expression schützen will [178]. Auch neoplastische B-Zellen zeigen eine Herunterregulierung der CD1d-Expression, was Teil einer Strategie der Umgehung der Immunosurveillance sein könnte [157].

Darüber hinaus könnte das CD1d-Molekül, vergleichbar mit vielen anderen Oberflächenmolekülen, Signale ins Zellinnere transduzieren, um immunologische Reaktionen oder auch nur den Zellstoffwechsel zu regulieren. Diese Möglichkeit wurde in dieser Arbeit mittels Anti-CD1d-Antikörper untersucht, worauf später noch eingegangen wird.

Über die Bedeutung der konstitutiven CD1d-Expression der T- und B-Zellen gibt es bisher aber noch wenige Informationen. Einige Untersuchungen berichten von einer α -GalCer-vermittelten Aktivierung von Typ I-NKT-Zellen, die ihrerseits zur Stimulierung der T-Zell- oder B-Zell-Antwort führte [42], [44]. Ob diese Antwort Konsequenz einer initialen CD1d-abhängigen Interaktion zwischen T- bzw. B-Zellen mit konstitutiver CD1d-Expression und CD1d-restringierten T-Zellen ist, ist jedoch fraglich. Verschiedene Studien zeigen eine Zunahme der CD1d-Expression von T-Zellen der Maus bei bestimmten Entzündungen des zentralen Nervensystems [127]. Ein physiologischer Induktor zur Steigerung der Expression, durch den das CD1d-Erkennungssystem aktiviert und z. B. regulatorisch eingreifen könnte, wurde allerdings noch nicht entdeckt.

Interessanterweise demonstriert die vorgelegte Arbeit, dass T-Zellen CD1d in Abhängigkeit der Intensität ihrer TCR-Expression unterschiedlich stark exprimierten. Denn in beiden Spezies konnten in allen lymphatischen Organen, besonders in LEW-Lymphknoten, kleine Populationen mit verminderter oder ohne nachweisbare CD1d-Expression festgestellt werden (s. Abb. 8a). Hierunter waren durchweg v. a. CD8⁺ Populationen vertreten. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist unklar. Ebenfalls noch ungewiss ist, warum im Thymus der LEW-Ratte, aber nicht im Thymus der BALB/c-Maus, DN Zellen ohne CD1d-Expression vorgefunden wurden (s. Abb. 1c). Allerdings besteht wie auf Seite 50 diskutiert die Möglichkeit, dass es sich bei diesem Befund um ein Artefakt handeln könnte. Im Übrigen wiesen CD1d⁺/DN Thymozyten beider Spezies eine etwas höhere CD1d-Expression auf als DP Thymozyten, von denen bekannt ist, dass sie mittels CD1d-abhängiger

Präsentation von endogenen Liganden für die Selektion von Typ I-NKT-Zellen verantwortlich sind [26].

Vergleichbar mit Studien in der Maus ist, dass auch in Ratten MZ-B-Zellen, DC und vermutlich Makrophagen die Milzzellen mit der höchsten CD1d-Expression sind und damit potentielle Interaktionspartner für CD1d-restringierte NKT-Zellen. Im Thymus befanden sich aufgrund der geringen Anzahl an APC kaum Zellen, die CD1d erhöht exprimieren. Die MZ-B-Zellen in der LEW- und F344-Ratte bilden den mit Abstand größten Teil an CD1d stark positiven Zellen (s. Abb. 7a, 7b). Sie waren häufiger als in den bisher untersuchten Mausstämmen, was vermutlich an der geringeren Größe der Marginalzonen in der Maus liegt. Jedoch repräsentierten MZ-B-Zellen auch in der BALB/c-Maus die große Mehrheit der CD1d stark positiven Zellen. Die Verfügbarkeit des MZ-B-Zell-spezifischen Markers HIS57 erleichterte ihre Identifizierung in der Ratte enorm. Allerdings war es schwierig, HIS57 positive Zellen von HIS57 negativen Zellen abzugrenzen, zumal es möglich ist, dass auch noch andere Zelltypen zumindest gering durch HIS57 markiert werden. Jedoch legt die OX33/CD1d-Färbung nahe, dass sich fast alle CD1d stark positiven Zellen unter B-Zellen befinden. Eine frühere Studie stellte fest, dass eine kleine Population der B-Zellen der Milzfollikel im Gegensatz zum Großteil dieser Zellen einen ähnlichen Phänotyp hat wie MZ-B-Zellen [173]. Folglich könnte es sich bei den OX33schwach⁺ Milzzellen der LEW- und F344-Ratte, die immer stark durch HIS57 markiert wurden und die die höchste CD1d-Expression der B-Zellen aufwiesen, um diese Population handeln. Vergleichbar mit früheren Untersuchungen der Maus konnten in LEW-Lymphknoten fast keine CD1d stark positiven B-Zellen nachgewiesen werden [171].

Die Funktion von MZ-B-Zellen ist noch nicht vollständig geklärt. Sie tragen jedoch sicherlich zur frühen, T-Zell-unabhängigen Immunantwort gegen Krankheitserreger des Blutes bei. Die hohe CD1d-Expression würde aber auch eine effiziente Interaktion mit CD1d-restringierten Zellen ermöglichen. Bisher wurde nur eine CD1d-abhängige Interaktion von CD1d positiven Zellen der Milz mit NKT-Zellen nachgewiesen, die zur immunologischen Toleranz in der Augenvorderkammer beitrug [169].

Interessanterweise gibt es wesentliche Unterschiede zwischen Marginalzonen bzw. MZ-B-Zellen von Nagern und Menschen. So wurden bisher im Menschen keine CD1dstark⁺ B-Zellen der Milz identifiziert. Dafür wurde von CD1dstark⁺ B-Zellen der Mantelzone von Lymphknoten berichtet [118]. Im Menschen bestehen die

Marginalzonen hauptsächlich aus Gedächtnis-Zellen und nicht aus naiven B-Zellen. Es wird vermutet, dass diese Zellen CD1c verstärkt exprimieren [179]. Zudem ist zu beachten, dass die anatomische Struktur der Marginalzone des Menschen von der von Maus und Ratte abweicht und der Mensch mehr und länger Antigenen ausgesetzt ist als die Tiere aus dem Labor [172]. Daher könnte sich die Bedeutung der MZ-B-Zellen in den Spezies unterscheiden, so dass weitere Studien notwendig sind, um die jeweilige CD1d-vermittelte Funktion von MZ-B-Zellen und deren CD1d-Liganden zu ermitteln. Aufgrund des Vorkommens von Marginalzonen- und Mantelzell-Lymphomen im Menschen wäre auch eine Untersuchung auf einen möglichen CD1d-vermittelten Zelltod sehr bedeutsam.

Da in der Ratte eine schwache CD4-Expression der Makrophagen beschrieben wurde [162], schienen CD4^{schwach}⁺/CD8⁻/TCR⁻/OX42⁺ Milzzellen mit erhöhter CD1d-Expression diese Population darzustellen. Jedoch war die CD4^{schwach}⁺/CD8⁻/CD1d^{stark}⁺ Population der CD4/CD8/CD1d-Färbung deutlich größer als die CD4^{schwach}⁺/OX42⁺/CD1d^{stark}⁺ Population der CD4/OX42/CD1d-Färbung (s. Tab. 5, 6a). In weiteren Versuchen wurde festgestellt, dass auch ein Teil der MZ-B-Zellen CD4 exprimieren (E. Monzon-Casanova, T. Herrmann; persönliche Mitteilung). Also könnten sich auch B-Zellen unter der CD4^{schwach}⁺/CD8⁻/CD1d^{stark}⁺ Population befinden. Allerdings waren unter CD4^{schwach}⁺/OX42⁻ Milzzellen nur sehr wenige mit erhöhter CD1d-Expression vorzufinden. Dies könnte bedeuten, dass einige dieser B-Zellen eventuell auch durch OX42 markiert werden oder dass sie sich schlecht mit dieser Färbung ohne B-Zell-Marker darstellen lassen. Da einige der CD4^{schwach}⁺/CD8⁻/TCR⁻/OX42⁺ Milzzellen in höheren SSC-Bereichen des FSC/SSC-Dotplot-Diagramms vorzufinden waren als es MZ-B-Zellen wären (Daten nicht gezeigt), spräche dies eher für eine Expression durch granuläre und nicht runde Zellen wie z. B. Makrophagen, dendritische Zellen oder Granulozyten. Letztere exprimieren CD1d im Menschen jedoch nur schwach oder überhaupt nicht [117], [156]. Demnach könnten sich unter dieser Population nicht nur CD4^{schwach}⁺ MZ-B-Zellen befinden. Auch wenn die Population von Makrophagen wohl kleiner ist als zuerst vermutet, so scheint sie doch zumindest in der LEW- und F344-Ratte CD1d erhöht zu exprimieren. Da aber Färbungen mit OX42 generell schwierig zu interpretieren waren, wären Färbungen mit zusätzlichen Markern nötig, um die genaue Anzahl der Makrophagen zu bestimmen und diese von anderen Populationen abzugrenzen. Das gleiche gilt für die BALB/c-Maus, deren Milzzellen

nur mit Antikörpern gegen CD4 und CD11b gefärbt wurden, um die Anzahl und die CD1d-Intensität verschiedener DC-Populationen und von Makrophagen grob zu bestimmen. Da es Unterschiede in der CD4-Expression zwischen Makrophagen/Monozyten der Maus und denen der Menschen und der Ratte zu geben scheint [163] und es vermutlich weniger Makrophagen in der Milz der BALB/c-Maus gibt als in der LEW-Ratte, fehlte uns die Möglichkeit, die Populationen der DC und Makrophagen anhand der CD4-Expression und der Anzahl zu unterscheiden. Eine endgültige Klärung des Zelltyps könnte durch Verwendung zusätzlicher Marker und von Experimenten mit Vierfarben-Fluoreszenz oder vorselektionierten Zellpopulationen erreicht werden. Möglicherweise können in Zukunft DC der Maus auch aufgrund einer höheren CD1d-Expression von Makrophagen abgegrenzt werden. Denn frühere Studien stellten eine erhöhte CD1d-Expression nur bei aktivierten Makrophagen fest [81].

Weitere Färbungen könnten auch klären, worum es sich bei der OX62⁺/CD4⁻/OX42⁻ Population der LEW-Milz mit mittelstarker CD1d-Expression handelt (s. Abb. 6a, 6b, Tab. 7). Es wurden bestimmte $\gamma\delta$ -T-Zellen besonders der Haut und des Darmtraktes identifiziert, die durch OX62, aber nicht durch OX42 markiert wurden. Jedoch wiesen sie eine dendritische Morphologie und damit größere FSC-/SSC-Werte auf als die OX62⁺/CD4⁻/OX42⁻ Population [180]. Zudem wurde gezeigt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen in LK der Sprague-Dawley-/Lewis-Ratte OX62 negativ sind [175]. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die OX62 positiven Zellen diese Population darstellen.

Demgegenüber scheint es aber ziemlich eindeutig zu sein, dass klassische CD4⁺ DC der LEW-Milz CD1d stark erhöht exprimieren, während pDC nur eine gering erhöhte bis mittelstarke CD1d-Expression aufwiesen (s. Tab. 7). Allerdings konnte das Häufigkeitsverhältnis der DC-Subpopulationen von früheren Studien [162], [164] nicht bestätigt werden.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass CD1d in den lymphatischen Organen der Ratte wohl nur von MZ-B-Zellen und APC verstärkt exprimiert werden. In der Maus scheint dies auch so zu sein, wodurch frühere Studien bestätigt werden. Es sollten weitere Färbungen folgen, um herauszufinden, ob sich das Expressionsverhalten des extralymphatischen Gewebes der Ratte von dem der Maus unterscheidet. Da im Menschen APC wohl nicht zu den Zellen mit erhöhter CD1d-Expression gehören [117], besteht hier ein gravierender Unterschied. Deshalb ist es von großer

Bedeutung herauszufinden, ob sich die CD1d-Moleküle der verschiedenen Spezies nicht nur in ihrer Expression, sondern auch in ihrer Funktion unterscheiden.

Bereits in früheren Studien mit humanen und Maus-Zellen wurde versucht, mit Hilfe von Anti-CD1d-Antikörpern die Interaktion zwischen NKT-Zellen und CD1d-Molekülen zu imitieren. Hierdurch sollten weitere mögliche Funktionen des CD1d-Erkennungssystems aufgedeckt werden. Unsere Antikörper ermöglichten die erstmalige Untersuchung signalinduzierender Effekte auf mit Ratten-CD1d transduzierten Zellen.

Dabei zeigte sich, dass der Antikörper 58/4 im Gegensatz zu 232 spezifisch über Ratten-CD1d Zelltod und Aggregatbildung in rCD1d⁺ Raji-Zellen induzieren konnte (s. Abb. 10, 11b). Wie bei Anti-MHC II-Antikörpern der Maus und des Menschen [146] gibt es auch unter Anti-CD1d-Antikörpern welche, die trotz ähnlicher Markierungs-Effizienz Zelltod auslösen und welche, die dies nicht tun. Da nach Inkubation mit 232 häufig weniger tote Zellen und eine gering erhöhte Aggregatbildung im Vergleich zu der Probe mit Medium festzustellen waren, ist es sogar möglich, dass dieser Antikörper die Zellen in irgendeiner Form aktiviert, was in einem verbesserten Überleben resultiert. Auch bei den überlebenden Zellen scheint es Unterschiede zwischen den Antikörpern bezüglich der CD1d-vermittelten Signale zu geben. Denn in beiden Fällen zeigten die Zellen zwar eine ähnlich ausgeprägte Herunterregulierung der CD1d-Expression, jedoch konnte nur bei 58/4 eine bleibende Verminderung beobachtet werden, während bei 232 im Verlauf der Inkubation wieder die vorherige Intensität erreicht wurde. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließen sich aber sowohl bei 58/4 als auch bei 232 vereinzelt intrazelluläre Antigen-Antikörper-Komplexe nachweisen, die auf eine Internalisierung der CD1d-Moleküle hindeuten (s. Abb. 16, 17). An einigen Zellpolen waren stärker leuchtende Zonen, sogenannte caps, zu erkennen, die Vorzeichen der Internalisierung darstellen.

Da es sich bei den für die Analysen verwendeten rCD1d⁺ Raji-Zellen um MHC-Klasse II-positive maligne humane B-Zellen handelt, konnten die CD1d-vermittelten Effekte mit MHC II-vermittelten Effekten verglichen werden. Diese Arbeit zeigte, dass 58/4 in rCD1d⁺ Raji-Zellen ähnliche, aber stärkere und schnellere Effekte auslöste als HB55. Die Wirkung dieses Anti-HLA-DR-Antikörper, der MHC II-vermittelten Zelltod induzieren kann, ist vielfach untersucht und allgemein anerkannt [144]. 58/4 führte

sowohl zur schnelleren Aggregatbildung und Zelltodinduktion als auch zur ausgeprägteren Herunterregulierung des Zielmoleküls und größeren Zunahme toter Zellen als der etablierte MHC II-spezifische Antikörper HB55. Folglich konnte in rCD1d⁺ Raji-Zellen über CD1d-Moleküle ein stärkeres Signal ausgelöst werden als über HLA-DR-Moleküle. Ob dies ein generelles Phänomen ist oder nur für die verwendeten Antikörper gilt, bleibt zu klären. In anderen Studien wurde jedoch von einer stärkeren Zelltodinduktion [144] und Abnahme der HLA-DR-Oberflächenexpression [147] durch HB55 berichtet, die wir so nicht feststellen konnten. Möglicherweise waren die von uns benutzten Antikörperkonzentrationen zu gering, um solche Effekte zu induzieren. Ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit für CD1d-spezifische Antikörper beschrieben, wurden auch bei Anti-HLA-DR-Antikörpern unterschiedliche Wirkungen beobachtet. Nur Antikörper, die eine bestimmte Domäne gebunden haben, lösten Zelltod und eine Abnahme der HLA-DR-Expression aus, während andere Antikörper keine Effekte zur Folge hatten [144]. Der Einsatz monovalenter F_{ab}-Fragmente von wirksamen Antikörpern führte hingegen nur zu einer Herunterregulierung der HLA-DR-Moleküle [147]. So könnte über die unterschiedliche Verwendung bi- bzw. monovalenter MHC II- bzw. CD1d-Liganden möglicherweise kontrolliert werden, ob in den Zielzellen die Zielmoleküle nur herunterreguliert werden oder Zelltod induziert wird, was eine Auswahl der erwünschten Effekte je nach therapeutischem Bedarf ermöglicht. Deshalb wäre es interessant, ähnliche Untersuchungen für die hier verwendeten Antikörper 58/4 und 232 durchzuführen.

Mit 14-4-4s, einem Anti-H-2A-Antikörper, der mit RTID, dem homologen MHC II-Isotyp der Ratte, und in schwächerem Maße mit HLA-DR-Molekülen kreuzreagiert, sollten weitere Versuche durchgeführt werden. Von ihm ist bekannt, dass er über einige MHC II-Allele Zelltod auslösen kann. Da die Inkubation von M12D β -Zellen, einer 14-4-4s⁺ Variante der Maus-Tumor-B-Zelllinie M12, mit 14-4-4s keine Effekte zeigte (Daten nicht aufgeführt), konnte leider kein Vergleich eines Maus- bzw. Ratten-MHC II-vermittelten Zelltodes mit dem HLA-DR-induzierten Zelltod oder mit dem Ratten-CD1d-abhängigen Zelltod erfolgen.

Die Versuche zum 58/4-induzierten Zelltod mit Zellen, die mit dem anti-apoptotischen A1 oder einer dominant negativen Caspase 9-Mutante transduziert waren, ergaben keine klaren Ergebnisse. Dies lag unter anderem daran, dass die Expression des als Reporters genutzten GFP die Anfälligkeit für den 58/4-induzierten Zelltod erhöhte.

Nur, wenn Zellen, die allein mit GFP transduziert wurden, als Referenzpunkt genommen wurden, ließ sich ein geringer anti-apoptotischer Effekt des A1 nachweisen. Die Expression einer dominant negativen Caspase 9-Mutante zeigte keine Effekte. Allerdings ist dieses negative Resultat nur bedingt aussagekräftig, da es sich um die Caspase der Maus und nicht des Menschen handelte.

Immerhin konnte für den HB55-vermittelten Zelltod, einem anerkannten CICD, ebenfalls eine geringe Beeinflussbarkeit durch A1 sowie eine Unabhängigkeit von Caspase-9 beobachtet werden (s. Abb. 18).

Zusammengefasst löst der Anti-CD1d-Antikörper 58/4 in rCD1d⁺ Raji-Zellen einen Prozess aus, der schneller als die Caspasen-abhängige Apoptose ist und möglicherweise von Caspase-9 unabhängig ist. 58/4 scheint demnach, vergleichbar mit HB55, CICD induzieren zu können.

Es stellte sich heraus, dass mit rCD1d transduzierte Tumor-B-Zellen des Menschen und der Maus, aber nicht Tumor-T-Zellen, für den 58/4-vermittelten Zelltod empfänglich waren (s. Abb. 19a, 19b). Da rCD1d⁺ C58-Zellen (Ratten-T-Zell-Lymphom) nicht anfällig waren (Daten nicht gezeigt), kann 58/4 wohl auch nicht in Tumor-T-Zellen der Ratte Zelltod induzieren. Im Gegensatz zum MHC II-vermittelten CICD, der in B- und T-Tumor-Zellen ausgelöst werden kann, scheint der 58/4-vermittelte Zelltod also nur in bestimmten Zellen induziert zu werden. Darüber hinaus führte die Inkubation von rCD1d transduzierten Jurkat-Zellen (humanes T-Zelllymphom) mit 58/4 weder zur Aggregatbildung noch zum Zelltod. Dem steht die Beobachtung gegenüber, dass Anti-CD1d-Antikörper über das humane CD1d-Molekül in Jurkat-Zellen Zelltod und eine starke Aggregatbildung induzieren [156]. Die Anfälligkeit für den CD1d-vermittelten Zelltod könnte also je nach Antikörper unterschiedliche Zelltypen betreffen oder davon abhängen, ob die Zelllinien transduzierte CD1d-Moleküle einer anderen Spezies oder endogene CD1d-Moleküle exprimieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit geben somit nur Hinweise darauf, dass der 58/4-vermittelte Zelltod nicht in Tumor-T-Zellen des Menschen, der Maus und der Ratte ausgelöst werden kann, die mit Ratten-CD1d transduziert worden waren.

Die Beobachtungen dieser Arbeit ähneln denen einer jüngst erschienenen Studie über die CD1d-abhängige Regulierung des Überlebens menschlicher Zellen des multiplen Myeloms [157]. In dieser Studie lösten gegen humanes CD1d gerichtete

Antikörper einen CICD in Myelomzellen des Menschen aus. Die Induktion dieses Zelltodes war mit einer Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials, der Verlagerung von Phosphatidylserin an die Oberfläche und einer Überexpression des pro-apoptotischen Moleküls Bax assoziiert. Die Empfänglichkeit der Myelomzellen war dosis- und zeitabhängig, korrelierte aber nicht mit der CD1d-Expression.

Aufgrund dieser Ähnlichkeiten wäre es bedeutsam herauszufinden, ob diese mitochondrialen Veränderungen und eine Zunahme von Bax auch im Verlauf des 58/4-vermittelten Zelltodes zu beobachten sind. Bezüglich des MHC II-vermittelten Zelltodes scheint eine neuere Studie zu bestätigen, dass der Anti-HLA-DR-Antikörper Apolizumab CICD über AIF auslöst [152].

Vergleichbar mit rCD1d⁺ Raji-Zellen führte auch die Inkubation von Myelomzellen mit Anti-CD1d-Antikörpern zur Aggregatbildung. Es konnte aber nicht geklärt werden, ob dies für den CICD der Myelomzellen erforderlich war [157]. Dagegen wurde über einen MHC I-vermittelten CICD berichtet, der von der Aggregatbildung der Lymphomzellen abhängig war [181]. Im Falle von Anti-MHC II-Antikörpern korrelierte der Grad an Zelladhäsion der DC mit der Effektivität des Zelltodes. Zytochalin D, das die für die Zelladhäsion notwendige Umlagerung des Zytoskeletts inhibiert, inhibiert auch den durch Anti-MHC II-Antikörper induzierten Zelltod [146]. Da verschiedene gegen Adhäsionsmoleküle gerichtete Antikörper keinen solchen Effekt zeigen, kann derzeit nicht gesagt werden, ob die Zelladhäsion als solche oder die Umlagerung des Zytoskeletts für den durch Anti-MHC II-Antikörper induzierten Zelltod notwendig sind. Jedenfalls gab es auch in unseren Versuchen eine Korrelation zwischen vermehrtem Zellkontakt und Zelltod.

Die Bedeutung des Aktin-Zytoskeletts konnte bereits für eine physiologische Form des MHC II-induzierten Zelltodes ermittelt werden. Denn auch der Zelltod, der in B-Zellen im Anschluss einer peptidspezifischen Interaktion mit T-Zellen ausgelöst wird, konnte durch Zytochalin D gehemmt werden. Deshalb erscheint eine dynamische Interaktion mit Bildung einer immunologischen Synapse an der Kontaktstelle und/oder eine Organisation des Zytoskeletts für die Signaltransduktion erforderlich. Da dieser Zelltod von Caspasen abhängig ist, unterscheidet sich dieser Prozess aber vom Anti-MHC II-Antikörper-vermittelten CICD [155]. Demnach scheinen die untersuchten Antikörper die Effekte der zellulären Interaktion nicht ganz kopieren zu können. Vermutlich muss auch bei CD1d-vermittelten Effekten zwischen Antikörper-induzierter und physiologischer Aktivierung unterschieden werden. So können gegen

CD1d gerichtete Antikörper wahrscheinlich Signale mit dem gleichen Endergebnis induzieren wie der NKT-Zellrezeptor und α -GalCer, jedoch laufen vermutlich unterschiedliche intrazelluläre Mechanismen ab. Zudem ist unklar, inwieweit die Antikörper physiologische Interaktionen imitieren. Diese Arbeit und die Beobachtungen des CD1d-abhängigen Zelltodes in humanen Myelomzellen zeigen, dass CD1d⁺ Tumorzellen nicht nur durch eine Liganden-abhängige, CD1d-induzierte Aktivierung von NKT-Zellen mit nachfolgender Stimulierung von NK-Zellen oder direkter Zytolyse durch Granzym oder Fas, sondern auch durch den Liganden-unabhängigen CD1d-vermittelten Zelltod beseitigt werden könnten. Neben der Interaktion mit dem iNKT-TCR könnten auch andere Komponenten des Immunsystems, z.B. NK-Zell-Rezeptoren [182], unabhängig vom iNKT-TCR mit CD1d interagieren. Außerdem stellt sich die Frage, in welchen Fällen welcher Mechanismus benutzt wird.

Aufgrund dieser weiteren Möglichkeit des CD1d-Erkennungssystems, Tumorzellen zu entfernen, ist es plausibel, dass humane Myelomzellen ihre CD1d-Expression herunterregulieren, um der NKT-Zell-vermittelten Immunantwort zu entgehen. Das bedeutet, dass die Therapie mit Anti-CD1d-Antikörpern zu Beginn erfolgen muss, um der Herunterregulierung zuvorzukommen und nicht therapieresistente Tumorzellen zu selektionieren. Außerdem wurde beobachtet, dass eine Kombination mit anderen Therapeutika eine Verstärkung der Effekte erzielt [157]. Allerdings wurde nicht untersucht, ob nach einer Behandlung überlebende humane Myelomzellen, die eventuell wie in unseren Untersuchungen mit einer Verminderung der CD1d-Expression reagieren, dadurch erst recht vor der CD1d-vermittelten Immunantwort geschützt sind. Da in Zellen der chronisch lymphatischen B-Zell-Leukämie eine Abnahme der mRNA-Transkripte von CD1d nachgewiesen wurde [183], ist es gut möglich, dass auch hier das CD1d-Erkennungssystem an der Immunantwort gegen diesen Tumor beteiligt ist, so dass Anti-CD1d-Antikörper ebenfalls nur in der frühen Phase der Erkrankung eine therapeutische Option darstellen könnten.

Eine weitere mögliche Funktion des CD1d-induzierten Zelltodes wäre die Regulierung bzw. Limitierung der Immunantwort durch Eliminierung der CD1d⁺ DC. Denn reife DC sind im Gegensatz zu unreifen kaum empfänglich für den Todes-Rezeptor-/CTL-/GranzymB-vermittelten Zelltod. So stellte der Anti-MHC II-Antikörper-vermittelte CICD lange die einzig bekannte Möglichkeit dar, die Population reifer DC

zu regulieren [146]. Neuere Studien berichteten von einer Typ I-NKT-Zell-abhängigen Zytolyse von mDC als Feedbackmechanismus [32]. In dieser Arbeit nicht gezeigte eigene Versuche ergaben jedoch keine Hinweise auf eine 58/4-vermittelte Zelltodinduktion von Milz-DC der Ratte (Daten nicht gezeigt). Daher wären weitere Untersuchungen von großem Interesse, um herauszufinden, ob 58/4 eventuell in anderen DC-Populationen oder unter bestimmten Bedingungen in DC Zelltod auslösen kann.

Derzeit gibt es noch keine eindeutigen Berichte über eine Anfälligkeit von primären, nicht malignen Zellen für den CD1d-induzierten Zelltod. Während humane CD1d⁺ Monozyten resistent waren [156], soll ein anderer gegen humanes CD1d gerichteter Antikörper Zelltod in humanen Monozyten ausgelöst haben. Daten hierzu wurden in der entsprechenden Publikation allerdings nicht gezeigt [157]. Deshalb wäre es interessant, ob 58/4 in anderen primären Zelllinien wie z. B. den CD1d stark positiven MZ-B-Zellen Zelltod induzieren kann.

Wie bereits erwähnt können CD1-Moleküle von der Zelloberfläche mit Hilfe einer Tyrosin-Zielsequenz im zytoplasmatischen Schwanz des Moleküls reinternalisiert und intrazellulär transportiert werden. Durch sie wird auch ein schnelles Recycling von CD1-Molekülen zwischen Zellmembran und Endosomen ermöglicht [104]. Mäuse mit CD1d-Molekülen ohne zytoplasmatische Schwanz (trunkierte CD1d-Moleküle) zeigten aufgrund einer defekten Oberflächeninternalisierung sogar eine 1,5-fach erhöhte CD1d-Expression und eine Störung der Antigenpräsentation, des intrazellulären Transports und der Typ I-NKT-Zellentwicklung [133]. Vergleichbar mit Beobachtungen von MHC-Molekülen scheint der zytoplasmatische Schwanz der CD1d-Moleküle an der Transduktion extrazellulärer Signale in intrazelluläre Reaktionen beteiligt zu sein. So gibt es eine Reihe von Beispielen, die zeigen, dass CD1d-Moleküle neben Zelltod und Aggregatbildung auch noch andere antikörperinduzierte Effekte vermitteln können, wie etwa die Freisetzung von IL-12 durch unreife DC und Monozyten [40]. Allerdings stellte sich heraus, dass die Tyrosinsequenz nicht an jeder Reaktion beteiligt ist. So wurde nachgewiesen, dass die Tyrosinsequenz nach Kreuzvernetzung von Anti-CD1d-Antikörpern mit sekundären Antikörpern in intestinalen Epithelzellen für die in-vitro Induktion von IL-10 entscheidend verantwortlich ist [134]. Demgegenüber erforderte die Zelltodinduktion und die Aggregatbildung von humanen Myelomzellen zwar den

zytoplasmatischen Schwanz, aber nicht dessen Tyrosinrest. Die Expression trunkierter humaner CD1d-Moleküle war ebenfalls leicht erhöht, während CD1d-Moleküle ohne Tyrosinrest normal exprimiert wurden [157]. Dies liegt vermutlich daran, dass sich im ER ein Komplex aus CD1d, dem MHC II-Molekül und der invarianten Kette bildet, der dafür verantwortlich ist, dass auch CD1d-Moleküle ohne Tyrosinsequenz im zytoplasmatischen Schwanz lysosomale Kompartimente in APC erreichen [109].

Um den Einfluss des zytoplasmatischen Schwanzes des Ratten-CD1d auf die Expression und die Ereignisse Zelltod und Aggregatbildung zu ermitteln, wurden Zelllinien, die trunkierte Ratten-CD1d-Moleküle exprimieren, hergestellt (Daten nicht gezeigt). So exprimierten RJ 2.2.5-Zellen, die mit trunkierten CD1d-Molekülen transduziert waren, sogar geringfügig weniger CD1d auf der Zelloberfläche als Zellen, die mit wildtypischem CD1d transduziert waren, während es sich, wie erwartet, bei transduzierten M12-Zellen und C58-Zellen umgekehrt verhielt. Die Untersuchung einer eventuell veränderten Anfälligkeit von Zellen mit trunkierten CD1d-Molekülen für den Zelltod durch 58/4 ergab keine eindeutigen Ergebnisse, so dass es unklar bleibt, ob der zytoplasmatische Schwanz an der Signaltransduktion dieses Prozesses beteiligt ist. Es schien sogar, dass RJ 2.2.5- und M12-Zellen mit trunkierten CD1d-Molekülen eher etwas anfälliger für Zelltod sind. Der Nachweis des Zelltodes in rCD1d⁺ RJ 2.2.5-Zellen – eine MHC Klasse II negative Variante von Raji-Zellen – zeigte aber auch, dass der CD1d-vermittelte Mechanismus keine HLA-DR-Moleküle für die Induktion des Zelltodes benötigt, was aber die Nutzung gemeinsamer intrazellulärer Mechanismen beim CD1d- und beim MHC II-vermittelten Zelltod nicht ausschließt. Die Aggregatbildung war bei RJ 2.2.5-Zellen mit trunkierten CD1d-Molekülen etwas geringer, während sie bei M12-Zellen mit trunkierten CD1d-Molekülen höher ausfiel. C58-Zellen, die wie bereits erwähnt nicht für den 58/4-vermittelten Zelltod anfällig sind, zeigten nach Inkubation mit 58/4 eine geringe Aggregatbildung, während bei C58-Zellen mit trunkierten CD1d-Molekülen keine Aggregatbildung festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dies könnte darauf hindeuten, dass der zytoplasmatische Schwanz der CD1d-Moleküle zwar nicht an der Signaltransduktion des CD1d-vermittelten Zelltodes, möglicherweise aber an der Aggregatbildung mancher Zelllinien beteiligt ist.

Interessant wäre es nun, diese Antikörperwirkungen mit Effekten nach Kreuzvernetzung der Antikörper mittels sekundärer Antikörper zu vergleichen. Auch

bietet es sich an, eine mögliche CD1d-induzierte Zytokinproduktion sowie eine mögliche Abhängigkeit der CD1d-Signale von der zytoplasmatischen Tyrosinsequenz zu untersuchen.

Zusammengefasst zeigen die Beobachtungen dieser Arbeit, dass CD1d-Moleküle nicht nur im Menschen, sondern auch in der Ratte, vergleichbar mit MHC II-Molekülen, neben der Antigenpräsentation auch signaltransduzierende Eigenschaften haben. Folglich gibt es auch Gemeinsamkeiten zwischen dem humanen CD1d und dem Ratten-CD1d, so dass in der Ratte beobachtete, CD1d-vermittelte Effekte möglicherweise auch auf den Menschen übertragbar sind.

5. ZUSAMMENFASSUNG

CD1d-Moleküle besitzen einige Ähnlichkeiten mit MHC-Molekülen, wie beispielsweise hinsichtlich Struktur und intrazellulären Transport. Wie MHC Klasse I- und II-Moleküle präsentieren CD1d-Moleküle dem TCR Antigene, allerdings Lipide und Glykolipide und nicht Proteinfragmente. Die Entdeckung der massiven T_H1 - und T_H2 -Zytokinproduktion von Typ I-NKT-Zellen nach CD1d-vermittelter Erkennung von α -Galactosylceramid, einem aus dem Meeresschwamm gewonnenen Glykosphingolipid, weckte großes Interesse an ihrem immunregulatorischen Potential und ihrem möglichen Nutzen für neue Immun- und Tumorthérapien.

Um die Funktion und die Bedeutung von CD1d besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit die Expressionslevel der lymphatischen Gewebe der Ratte und der Maus untersucht. Hierfür wurden die neu generierten monoklonalen Antikörper 232 und 58/4 verwendet, die die CD1d-Moleküle von Ratte und Maus binden und so den direkten Vergleich beider Spezies ermöglichen.

Sowohl die isolierten Zellen des Thymus und der Milz als auch des Lymphknotens waren in der LEW- und F344-Ratte sowie in der BALB/c-Maus schwach bis stark CD1d positiv. Es stellte sich eine unterschiedliche Intensität der konstitutiven CD1d-Expression in den verschiedenen lymphatischen Organen dar. Sie war in der LEW-Ratte jeweils geringfügig höher als in der BALB/c-Maus. In der LEW- und F344-Ratte sowie in der BALB/c-Maus exprimierten die meisten B-Zellen CD1d stärker als die T-Zellen. Während in der BALB/c-Maus $CD4^+$ T-Zellen des Thymus und der Milz CD1d stärker exprimierten als $CD8^+$ T-Zellen, war es in der LEW-Ratte umgekehrt. Besonders unter CD1d stark positiven Zellen gab es einige Subpopulationen, die in der LEW-Ratte stärker durch den Anti-CD1d-Antikörper 232 gefärbt wurden als in der F344-Ratte. In der F344-Ratte scheint es aber mehr CD1d stark positive B-Zellen zu geben.

In der LEW-Ratte und in der F344-Ratte wiesen jeweils ca. 18% der Milzzellen eine vergleichsweise erhöhte CD1d-Expression auf. Dabei handelte es sich in erster Linie um Marginalzonen-B-Zellen. Bestimmte Subpopulationen der Dendritischen Zellen und vermutlich Makrophagen stellten die restlichen CD1d stark positiven Populationen dar. Nur ca. 2% der isolierten Zellen der Lymphknoten der LEW-Ratte waren stark CD1d positiv, wohingegen der LEW-Thymus gemäß dem noch geringeren Anteil an APC kaum Zellen mit erhöhter CD1d-Expression enthielt. In der BALB/c-Maus war der Anteil CD1d stark positiver Milzzellen mit 4% deutlich geringer

als in der LEW- oder F344-Milz. Abgesehen von MZ-B-Zellen konnten in der Maus kaum Populationen mit starker CD1d-Expression in den verschiedenen Färbungen festgestellt werden. Demnach stellt CD1d sowohl in der Ratte als auch in der Maus einen guten Marker für MZ-B-Zellen dar.

Demgegenüber zeigten vereinzelt kleine Populationen der Milz, des Lymphknotens und des Thymus beider Spezies eine verminderte oder gar keine CD1d-Expression. T-Zellen exprimierten in Abhängigkeit der Intensität ihrer TCR-Expression CD1d unterschiedlich stark. Besonders in LEW-Lymphknoten, aber auch in den anderen lymphatischen Geweben, zeichneten sich CD1d negative bzw. schwach positive TCR⁺ Populationen ab, worunter v. a. CD8⁺ Zellen vertreten waren.

Zur Analyse möglicher signalinduzierender Eigenschaften der verschiedenen Anti-CD1d-Antikörper wurden ihre Effekte auf rCD1d⁺ Transduktanten und primäre Zellen untersucht. 58/4 konnte im Gegensatz zu 232 spezifisch über Bindung an Ratten-CD1d Zelltod und Aggregatbildung in Tumor-B-Zellen des Menschen und der Maus, aber nicht in Tumor-T-Zellen, induzieren. In rCD1d⁺ Raji-Zellen wurde ein sehr schneller Prozess ausgelöst, der bei 37°C bereits nach wenigen Minuten zu Aggregatbildung und nach 30 Minuten zum Zelltod führen konnte und bei dem es sich höchstwahrscheinlich nicht um eine Caspase-abhängige Apoptose handelt. Bei 4°C konnten nach einiger Zeit ähnliche Effekte beobachtet werden. Während vermehrte Zellkontakte vermutlich den Zelltod von rCD1d⁺ Raji-Zellen begünstigten, korrelierte die CD1d-Expression nicht mit der Anfälligkeit verschiedener Zelllinien für 58/4. Der zytoplasmatische Schwanz der CD1d-Moleküle scheint an der Aggregatbildung beteiligt zu sein.

Die Effekte ähnelten denen des MHC II-vermittelten Zelltodes, der mit Hilfe des Anti-HLA-DR-Antikörpers HB55 untersucht wurde. Allerdings waren HLA-DR-Moleküle nicht an der Induktion des CD1d-vermittelten Zelltodes beteiligt. Auch zeigte sich, dass der 58/4-induzierte Zelltod in rCD1d⁺ Raji-Zellen schneller eintrat als der HB55-induzierte Zelltod.

Die Bindung von 58/4 oder 232 führte in überlebenden rCD1d⁺ Raji-Zellen zu einer ähnlich starken Internalisierung der CD1d-Moleküle. Während nach 5-stündiger Inkubation mit 232 und erneuter CD1d-Färbung wieder die vorherige CD1d-Expression festgestellt wurde, konnte nach Inkubation mit 58/4 eine bleibende Herunterregulierung beobachtet werden. Folglich bewirkte 58/4 ein anderes bzw. stärkeres Signal in den Zellen als 232.

Diese Beobachtungen stützen die Signaltransduktion als mögliche weitere Funktion der CD1d-Moleküle neben der Antigenpräsentation und definieren die monoklonalen Antikörper 232 und 58/4 als nützliche Werkzeuge für weitere Studien zur Analyse der molekularen Mechanismen der CD1d-vermittelten Signaltransduktion. Das Verständnis solcher Mechanismen bildet wiederum die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapien z. B. zur Eliminierung CD1d exprimierender Tumore.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Male, D, *Immunology: An Illustrated Outline, fourth Edition*. Elsevier Science Limited, 2004.
2. Arden, B., et al., *Mouse T-cell receptor variable gene segment families*. Immunogenetics, 1995. **42**(6): p. 501-30.
3. Arden, B., et al., *Human T-cell receptor variable gene segment families*. Immunogenetics, 1995. **42**(6): p. 455-500.
4. Calabi, F. and C. Milstein, *A novel family of human major histocompatibility complex-related genes not mapping to chromosome 6*. Nature, 1986. **323**(6088): p. 540-3.
5. Shawar, S.M., et al., *Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules*. Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 839-80.
6. Pamer, E. and P. Cresswell, *Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 323-58.
7. Hava, D.L., et al., *CD1 assembly and the formation of CD1-antigen complexes*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(1): p. 88-94.
8. Cresswell, P., *Invariant chain structure and MHC class II function*. Cell, 1996. **84**(4): p. 505-7.
9. Ghosh, P., et al., *The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3*. Nature, 1995. **378**(6556): p. 457-62.
10. Bendelac, A., et al., *CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes*. Science, 1995. **268**(5212): p. 863-5.
11. Spada, F.M., Y. Koezuka, and S.A. Porcelli, *CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1529-34.
12. Lantz, O. and A. Bendelac, *An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8-T cells in mice and humans*. J Exp Med, 1994. **180**(3): p. 1097-106.
13. Kawano, T., et al., *CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides*. Science, 1997. **278**(5343): p. 1626-9.
14. Yu, K.O., et al., *Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by using N-acyl variants of alpha-galactosylceramides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(9): p. 3383-8.
15. Schmiege, J., et al., *Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand alpha-Galactosylceramide*. J Exp Med, 2003. **198**(11): p. 1631-41.
16. Chang, D.H., et al., *Sustained expansion of NKT cells and antigen-specific T cells after injection of alpha-galactosyl-ceramide loaded mature dendritic cells in cancer patients*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1503-17.
17. Chen, Y.H., et al., *Impaired NK1+ T cell development and early IL-4 production in CD1-deficient mice*. Immunity, 1997. **6**(4): p. 459-67.
18. Kronenberg, M. and L. Gapin, *The unconventional lifestyle of NKT cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(8): p. 557-68.
19. Lee, P.T., et al., *Testing the NKT cell hypothesis of human IDDM pathogenesis*. J Clin Invest, 2002. **110**(6): p. 793-800.
20. Slifka, M.K., R.R. Pagarigan, and J.L. Whitton, *NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8+ and CD4+ T cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 2009-15.
21. McMahan, C.W. and D.H. Raulet, *Expression and function of NK cell receptors in CD8+ T cells*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(4): p. 465-70.

22. Benlagha, K., et al., *In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers*. J Exp Med, 2000. **191**(11): p. 1895-903.
23. Brossay, L., et al., *CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution*. J Exp Med, 1998. **188**(8): p. 1521-8.
24. Schumann, J., et al., *Cutting edge: influence of the TCR V beta domain on the avidity of CD1d:alpha-galactosylceramide binding by invariant V alpha 14 NKT cells*. J Immunol, 2003. **170**(12): p. 5815-9.
25. Pyz, E., et al., *The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7447-55.
26. Wei, D.G., et al., *Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 239-48.
27. Benlagha, K., et al., *A thymic precursor to the NK T cell lineage*. Science, 2002. **296**(5567): p. 553-5.
28. Bendelac, A., M. Bonneville, and J.F. Kearney, *Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes*. Nat Rev Immunol, 2001. **1**(3): p. 177-86.
29. Benlagha, K. and A. Bendelac, *CD1d-restricted mouse V alpha 14 and human V alpha 24 T cells: lymphocytes of innate immunity*. Semin Immunol, 2000. **12**(6): p. 537-42.
30. Kaneko, Y., et al., *Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis*. J Exp Med, 2000. **191**(1): p. 105-14.
31. Metelitsa, L.S., et al., *Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3114-22.
32. Yang, O.O., et al., *CD1d on myeloid dendritic cells stimulates cytokine secretion from and cytolytic activity of V alpha 24J alpha Q T cells: a feedback mechanism for immune regulation*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 3756-62.
33. Mallevaey, T., et al., *Invariant and noninvariant natural killer T cells exert opposite regulatory functions on the immune response during murine schistosomiasis*. Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2171-80.
34. Duthie, M.S., et al., *Critical proinflammatory and anti-inflammatory functions of different subsets of CD1d-restricted natural killer T cells during Trypanosoma cruzi infection*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 181-92.
35. Lee, P.T., et al., *Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 637-41.
36. Schmieg, J., et al., *Glycolipid presentation to natural killer T cells differs in an organ-dependent fashion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(4): p. 1127-32.
37. Yang, Y., et al., *Control of NKT cell differentiation by tissue-specific microenvironments*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5913-20.
38. Zajonc, D.M., et al., *Structure and function of a potent agonist for the semi-invariant natural killer T cell receptor*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 810-8.
39. Gumperz, J.E., et al., *Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 625-36.
40. Yue, S.C., et al., *CD1d ligation on human monocytes directly signals rapid NF-kappaB activation and production of bioactive IL-12*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(33): p. 11811-6.
41. Kita, H., et al., *Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human CD1d tetramer*. Gastroenterology, 2002. **123**(4): p. 1031-43.

42. Fujii, S., et al., *Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein.* J Exp Med, 2003. **198**(2): p. 267-79.
43. Eberl, G. and H.R. MacDonald, *Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells.* Eur J Immunol, 2000. **30**(4): p. 985-92.
44. Galli, G., et al., *Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 3984-9.
45. Kawakami, K., et al., *Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against Streptococcus pneumoniae infection.* Eur J Immunol, 2003. **33**(12): p. 3322-30.
46. Gonzalez-Aseguinolaza, G., et al., *alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8461-6.
47. Kawakami, K., et al., *Activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with Cryptococcus neoformans.* Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 213-20.
48. Nieuwenhuis, E.E., et al., *CD1d-dependent macrophage-mediated clearance of Pseudomonas aeruginosa from lung.* Nat Med, 2002. **8**(6): p. 588-93.
49. Exley, M.A., et al., *CD1d-reactive T-cell activation leads to amelioration of disease caused by diabetogenic encephalomyocarditis virus.* J Leukoc Biol, 2001. **69**(5): p. 713-8.
50. Kakimi, K., et al., *Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo.* J Exp Med, 2000. **192**(7): p. 921-30.
51. van Dommelen, S.L., et al., *Activation of natural killer (NK) T cells during murine cytomegalovirus infection enhances the antiviral response mediated by NK cells.* J Virol, 2003. **77**(3): p. 1877-84.
52. Gansert, J.L., et al., *Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity.* J Immunol, 2003. **170**(6): p. 3154-61.
53. Crowe, N.Y., M.J. Smyth, and D.I. Godfrey, *A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas.* J Exp Med, 2002. **196**(1): p. 119-27.
54. Halder, R.C., et al., *Type II NKT cell-mediated anergy induction in type I NKT cells prevents inflammatory liver disease.* J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2302-12.
55. Naumov, Y.N., et al., *Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13838-43.
56. Zeissig, S., et al., *Role of NKT cells in the digestive system. III. Role of NKT cells in intestinal immunity.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007. **293**(6): p. G1101-5.
57. Hammond, K.J. and D.I. Godfrey, *NKT cells: potential targets for autoimmune disease therapy?* Tissue Antigens, 2002. **59**(5): p. 353-63.
58. Giaccone, G., et al., *A phase I study of the natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide (KRN7000) in patients with solid tumors.* Clin Cancer Res, 2002. **8**(12): p. 3702-9.
59. Ishikawa, A., et al., *A phase I study of alpha-galactosylceramide (KRN7000)-pulsed dendritic cells in patients with advanced and recurrent non-small cell lung cancer.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(5): p. 1910-7.
60. Crowe, N.Y., et al., *Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo.* J Exp Med, 2005. **202**(9): p. 1279-88.

61. Akbari, O., et al., *Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 582-8.
62. Akbari, O., et al., *CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma*. N Engl J Med, 2006. **354**(11): p. 1117-29.
63. Griseri, T., et al., *Invariant NKT cells exacerbate type 1 diabetes induced by CD8 T cells*. J Immunol, 2005. **175**(4): p. 2091-101.
64. Bendelac, A., P.B. Savage, and L. Teyton, *The biology of NKT cells*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 297-336.
65. van der Vliet, H.J., et al., *Circulating V(alpha24+) Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage*. Clin Immunol, 2001. **100**(2): p. 144-8.
66. Beaudoin, L., et al., *NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells*. Immunity, 2002. **17**(6): p. 725-36.
67. Sharif, S., et al., *Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes*. Nat Med, 2001. **7**(9): p. 1057-62.
68. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: what's in a name?* Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 231-7.
69. Terabe, M., et al., *A nonclassical non-Valpha14Jalpha18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance*. J Exp Med, 2005. **202**(12): p. 1627-33.
70. Behar, S.M., et al., *Diverse TCRs recognize murine CD1*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 161-7.
71. Park, S.H., et al., *The mouse CD1d-restricted repertoire is dominated by a few autoreactive T cell receptor families*. J Exp Med, 2001. **193**(8): p. 893-904.
72. Chiu, Y.H., et al., *Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments*. J Exp Med, 1999. **189**(1): p. 103-10.
73. Cardell, S., et al., *CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice*. J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 993-1004.
74. Jahng, A., et al., *Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide*. J Exp Med, 2004. **199**(7): p. 947-57.
75. Ambrosino, E., et al., *Cross-regulation between type I and type II NKT cells in regulating tumor immunity: a new immunoregulatory axis*. J Immunol, 2007. **179**(8): p. 5126-36.
76. Porcelli, S.A. and R.L. Modlin, *The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 297-329.
77. Martin, L.H., F. Calabi, and C. Milstein, *Isolation of CD1 genes: a family of major histocompatibility complex-related differentiation antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(23): p. 9154-8.
78. Ichimiya, S., K. Kikuchi, and A. Matsuura, *Structural analysis of the rat homologue of CD1. Evidence for evolutionary conservation of the CD1D class and widespread transcription by rat cells*. J Immunol, 1994. **153**(3): p. 1112-23.
79. Angenieux, C., et al., *Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37757-64.
80. Blumberg, R.S., et al., *Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins*. Immunol Rev, 1995. **147**: p. 5-29.
81. Roark, J.H., et al., *CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3121-7.

82. Van Rhijn, I., et al., *The bovine CD1 family contains group 1 CD1 proteins, but no functional CD1d*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4888-93.
83. Koch, M., et al., *The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide*. Nat Immunol, 2005. **6**(8): p. 819-26.
84. Beckman, E.M., et al., *Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta+ T cells*. Nature, 1994. **372**(6507): p. 691-4.
85. Rosat, J.P., et al., *CD1-restricted microbial lipid antigen-specific recognition found in the CD8+ alpha beta T cell pool*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 366-71.
86. Shamshiev, A., et al., *Presentation of the same glycolipid by different CD1 molecules*. J Exp Med, 2002. **195**(8): p. 1013-21.
87. Joyce, S., et al., *Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol*. Science, 1998. **279**(5356): p. 1541-4.
88. Park, J.J., et al., *Lipid-protein interactions: biosynthetic assembly of CD1 with lipids in the endoplasmic reticulum is evolutionarily conserved*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(4): p. 1022-6.
89. Giabbai, B., et al., *Crystal structure of mouse CD1d bound to the self ligand phosphatidylcholine: a molecular basis for NKT cell activation*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 977-84.
90. Gumperz, J.E., et al., *Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 211-21.
91. Kinjo, Y., et al., *Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 520-5.
92. Wu, D., et al., *Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1351-6.
93. Agea, E., et al., *Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens*. J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 295-308.
94. Mattner, J., et al., *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*. Nature, 2005. **434**(7032): p. 525-9.
95. Mallevaey, T., et al., *Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite schistosoma mansoni*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2476-85.
96. Brigl, M., et al., *Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection*. Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1230-7.
97. Moody, D.B., *TLR gateways to CD1 function*. Nat Immunol, 2006. **7**(8): p. 811-7.
98. Vincent, M.S., et al., *CD1-dependent dendritic cell instruction*. Nat Immunol, 2002. **3**(12): p. 1163-8.
99. Stanic, A.K., et al., *Defective presentation of the CD1d1-restricted natural Va14Ja18 NKT lymphocyte antigen caused by beta-D-glucosylceramide synthase deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1849-54.
100. Mattner, J., et al., *Liver autoimmunity triggered by microbial activation of natural killer T cells*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(5): p. 304-15.
101. De Silva, A.D., et al., *Lipid protein interactions: the assembly of CD1d1 with cellular phospholipids occurs in the endoplasmic reticulum*. J Immunol, 2002. **168**(2): p. 723-33.
102. Brozovic, S., et al., *CD1d function is regulated by microsomal triglyceride transfer protein*. Nat Med, 2004. **10**(5): p. 535-9.
103. Kim, H.S., et al., *Biochemical characterization of CD1d expression in the absence of beta2-microglobulin*. J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9289-95.
104. Jayawardena-Wolf, J., et al., *CD1d endosomal trafficking is independently regulated by an intrinsic CD1d-encoded tyrosine motif and by the invariant chain*. Immunity, 2001. **15**(6): p. 897-908.

105. Zhou, D., et al., *Editing of CD1d-bound lipid antigens by endosomal lipid transfer proteins*. Science, 2004. **303**(5657): p. 523-7.
106. Kang, S.J. and P. Cresswell, *Saposins facilitate CD1d-restricted presentation of an exogenous lipid antigen to T cells*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 175-81.
107. Prigozy, T.I., et al., *Glycolipid antigen processing for presentation by CD1d molecules*. Science, 2001. **291**(5504): p. 664-7.
108. Zhong, G., P. Romagnoli, and R.N. Germain, *Related leucine-based cytoplasmic targeting signals in invariant chain and major histocompatibility complex class II molecules control endocytic presentation of distinct determinants in a single protein*. J Exp Med, 1997. **185**(3): p. 429-38.
109. Kang, S.J. and P. Cresswell, *Regulation of intracellular trafficking of human CD1d by association with MHC class II molecules*. EMBO J, 2002. **21**(7): p. 1650-60.
110. Chen, X., et al., *Distinct endosomal trafficking requirements for presentation of autoantigens and exogenous lipids by human CD1d molecules*. J Immunol, 2007. **178**(10): p. 6181-90.
111. Yuan, W., et al., *Saposin B is the dominant saposin that facilitates lipid binding to human CD1d molecules*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(13): p. 5551-6.
112. Meunier, L., A. Gonzalez-Ramos, and K.D. Cooper, *Heterogeneous populations of class II MHC+ cells in human dermal cell suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen-presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells*. J Immunol, 1993. **151**(8): p. 4067-80.
113. Delia, D., et al., *CD1c but neither CD1a nor CD1b molecules are expressed on normal, activated, and malignant human B cells: identification of a new B-cell subset*. Blood, 1988. **72**(1): p. 241-7.
114. Kasinrerker, W., et al., *CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 1993. **150**(2): p. 579-84.
115. Grant, E.P., et al., *Molecular recognition of lipid antigens by T cell receptors*. J Exp Med, 1999. **189**(1): p. 195-205.
116. Vincent, M.S., J.E. Gumperz, and M.B. Brenner, *Understanding the function of CD1-restricted T cells*. Nat Immunol, 2003. **4**(6): p. 517-23.
117. Spada, F.M., et al., *Low expression level but potent antigen presenting function of CD1d on monocyte lineage cells*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3468-77.
118. Exley, M., et al., *CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes*. Immunology, 2000. **100**(1): p. 37-47.
119. Chen, Y.H., et al., *Expression of CD1d2 on thymocytes is not sufficient for the development of NK T cells in CD1d1-deficient mice*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4560-6.
120. Brossay, L., et al., *Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1216-24.
121. Canchis, P.W., et al., *Tissue distribution of the non-polymorphic major histocompatibility complex class I-like molecule, CD1d*. Immunology, 1993. **80**(4): p. 561-5.
122. Balk, S.P., et al., *Beta 2-microglobulin-independent MHC class Ib molecule expressed by human intestinal epithelium*. Science, 1994. **265**(5169): p. 259-62.
123. Bonish, B., et al., *Overexpression of CD1d by keratinocytes in psoriasis and CD1d-dependent IFN-gamma production by NK-T cells*. J Immunol, 2000. **165**(7): p. 4076-85.
124. Im, J.S., et al., *Expression of CD1d molecules by human schwann cells and potential interactions with immunoregulatory invariant NK T cells*. J Immunol, 2006. **177**(8): p. 5226-35.

125. Kawana, K., et al., *Expression of CD1d and ligand-induced cytokine production are tissue specific in mucosal epithelia of the human lower reproductive tract*. Infect Immun, 2008. **76**(7): p. 3011-8.
126. Matsumoto, J., et al., *Expression of surface CD1d in the extravillous trophoblast cells of early gestational placenta is downregulated in a manner dependent on trophoblast differentiation*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **371**(2): p. 236-41.
127. Busshoff, U., et al., *CD1 expression is differentially regulated by microglia, macrophages and T cells in the central nervous system upon inflammation and demyelination*. J Neuroimmunol, 2001. **113**(2): p. 220-30.
128. Bleicher, P.A., et al., *Expression of murine CD1 on gastrointestinal epithelium*. Science, 1990. **250**(4981): p. 679-82.
129. de Lalla, C., et al., *Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis*. J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1417-25.
130. Emoto, M., Y. Emoto, and S.H. Kaufmann, *IL-4 producing CD4+ TCR alpha beta int liver lymphocytes: influence of thymus, beta 2-microglobulin and NK1.1 expression*. Int Immunol, 1995. **7**(11): p. 1729-39.
131. Ohteki, T. and H.R. MacDonald, *Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice*. J Exp Med, 1994. **180**(2): p. 699-704.
132. Amano, M., et al., *CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the spleen: beta 2-microglobulin-dependent and independent forms*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1710-7.
133. Chiu, Y.H., et al., *Multiple defects in antigen presentation and T cell development by mice expressing cytoplasmic tail-truncated CD1d*. Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 55-60.
134. Colgan, S.P., et al., *Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(24): p. 13938-43.
135. Kasai, K., et al., *Localization of rat CD1 transcripts and protein in rat tissues--an analysis of rat CD1 expression by in situ hybridization and immunohistochemistry*. Clin Exp Immunol, 1997. **109**(2): p. 317-22.
136. Matsuura, A., et al., *NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK T cells expressing distinct V alpha 14 chains*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 3140-8.
137. Badovinac, V., et al., *Rat NKR-P1+ CD3+ T cells: selective proliferation in interleukin-2, diverse T-cell-receptor-Vbeta repertoire and polarized interferon-gamma expression*. Immunology, 1998. **95**(1): p. 117-25.
138. Bains, S.K., et al., *Mitochondria control of cell death induced by anti-HLA-DR antibodies*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1357-65.
139. Chipuk, J.E. and D.R. Green, *Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death?* Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(3): p. 268-75.
140. Nagy, Z.A. and N.A. Mooney, *A novel, alternative pathway of apoptosis triggered through class II major histocompatibility complex molecules*. J Mol Med, 2003. **81**(12): p. 757-65.
141. Truman, J.P., et al., *HLA class II-mediated death is induced via Fas/Fas ligand interactions in human splenic B lymphocytes*. Blood, 1997. **89**(6): p. 1996-2007.
142. Pardo, J., et al., *A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis*. J Immunol, 2001. **167**(3): p. 1222-9.
143. Drenou, B., et al., *A caspase-independent pathway of MHC class II antigen-mediated apoptosis of human B lymphocytes*. J Immunol, 1999. **163**(8): p. 4115-24.

144. Nagy, Z.A., et al., *Fully human, HLA-DR-specific monoclonal antibodies efficiently induce programmed death of malignant lymphoid cells*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 801-7.
145. McLellan, A., et al., *MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival*. Eur J Immunol, 2000. **30**(9): p. 2612-9.
146. Leverkus, M., et al., *MHC class II-mediated apoptosis in dendritic cells: a role for membrane-associated and mitochondrial signaling pathways*. Int Immunol, 2003. **15**(8): p. 993-1006.
147. Vidovic, D., et al., *Down-regulation of class II major histocompatibility complex molecules on antigen-presenting cells by antibody fragments*. Eur J Immunol, 1995. **25**(12): p. 3349-55.
148. Kansas, G.S., J.C. Cambier, and T.F. Tedder, *CD4 binding to major histocompatibility complex class II antigens induces LFA-1-dependent and -independent homotypic adhesion of B lymphocytes*. Eur J Immunol, 1992. **22**(1): p. 147-52.
149. Bertho, N., et al., *HLA-DR-mediated apoptosis susceptibility discriminates differentiation stages of dendritic/monocytic APC*. J Immunol, 2000. **164**(5): p. 2379-85.
150. Schattner, E.J., et al., *CD40 ligation induces Apo-1/Fas expression on human B lymphocytes and facilitates apoptosis through the Apo-1/Fas pathway*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1557-65.
151. Vidovic, D. and J.I. Toral, *Selective apoptosis of neoplastic cells by the HLA-DR-specific monoclonal antibody*. Cancer Lett, 1998. **128**(2): p. 127-35.
152. Castillo, J., E. Winer, and P. Quesenberry, *Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies*. Exp Hematol, 2008. **36**(7): p. 755-68.
153. Fan, X., et al., *The effect of class II major histocompatibility complex expression on adherence of Helicobacter pylori and induction of apoptosis in gastric epithelial cells: a mechanism for T helper cell type 1-mediated damage*. J Exp Med, 1998. **187**(10): p. 1659-69.
154. Vidovic, D., et al., *Down-regulation of class II major histocompatibility complex molecules on antigen presenting cells after interaction with helper T cells*. Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1326-31.
155. Setterblad, N., et al., *Cognate MHC-TCR interaction leads to apoptosis of antigen-presenting cells*. J Leukoc Biol, 2004. **75**(6): p. 1036-44.
156. Ozeki, M. and J.E. Shively, *Differential cell fates induced by all-trans retinoic acid-treated HL-60 human leukemia cells*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(3): p. 769-79.
157. Spanoudakis, E., et al., *Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d*. Blood, 2009. **113**(11): p. 2498-507.
158. Lindemann, D., et al., *Efficient pseudotyping of murine leukemia virus particles with chimeric human foamy virus envelope proteins*. J Virol, 1997. **71**(6): p. 4815-20.
159. Soneoka, Y., et al., *A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors*. Nucleic Acids Res, 1995. **23**(4): p. 628-33.
160. Law, D.A., et al., *Subsets of thymopoietic rat thymocytes defined by expression of the CD2 antigen and the MRC OX-22 determinant of the leukocyte-common antigen CD45*. Eur J Immunol, 1989. **19**(12): p. 2289-95.
161. Ross, G.D. and V. Vetvicka, *CR3 (CD11b, CD18): a phagocyte and NK cell membrane receptor with multiple ligand specificities and functions*. Clin Exp Immunol, 1993. **92**(2): p. 181-4.
162. Hubert, F.X., et al., *Rat plasmacytoid dendritic cells are an abundant subset of MHC class II+ CD4+CD11b-OX62- and type I IFN-producing cells that exhibit selective expression of Toll-like receptors 7 and 9 and strong responsiveness to CpG*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7485-94.

163. Crocker, P.R. and S. Gordon, *Mouse macrophage hemagglutinin (sheep erythrocyte receptor) with specificity for sialylated glycoconjugates characterized by a monoclonal antibody*. J Exp Med, 1989. **169**(4): p. 1333-46.
164. Voisine, C., et al., *Two phenotypically distinct subsets of spleen dendritic cells in rats exhibit different cytokine production and T cell stimulatory activity*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2284-91.
165. Brennan, M. and M. Puklavec, *The MRC OX-62 antigen: a useful marker in the purification of rat veiled cells with the biochemical properties of an integrin*. J Exp Med, 1992. **175**(6): p. 1457-65.
166. Vremec, D., et al., *CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2978-86.
167. Nakano, H., M. Yanagita, and M.D. Gunn, *CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1171-8.
168. Spencer, J., M.E. Perry, and D.K. Dunn-Walters, *Human marginal-zone B cells*. Immunol Today, 1998. **19**(9): p. 421-6.
169. Sonoda, K.H. and J. Stein-Streilein, *CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance*. Eur J Immunol, 2002. **32**(3): p. 848-57.
170. Dammers, P.M., et al., *Most marginal zone B cells in rat express germline encoded Ig VH genes and are ligand selected*. J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6156-69.
171. Makowska, A., et al., *CD1high B cells: a population of mixed origin*. Eur J Immunol, 1999. **29**(10): p. 3285-94.
172. Dunn-Walters, D.K., P.G. Isaacson, and J. Spencer, *Analysis of mutations in immunoglobulin heavy chain variable region genes of microdissected marginal zone (MGZ) B cells suggests that the MGZ of human spleen is a reservoir of memory B cells*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 559-66.
173. Dammers, P.M. and F.G. Kroese, *Recruitment and selection of marginal zone B cells is independent of exogenous antigens*. Eur J Immunol, 2005. **35**(7): p. 2089-99.
174. Dammers, P.M., et al., *The origin of marginal zone B cells in the rat*. Eur J Immunol, 1999. **29**(5): p. 1522-31.
175. Trinite, B., et al., *A subset of cytolytic dendritic cells in rat*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4202-8.
176. Altman, S.A., L. Randers, and G. Rao, *Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations*. Biotechnol Prog, 1993. **9**(6): p. 671-4.
177. Campos-Martin, Y., et al., *Expression of human CD1d molecules protects target cells from NK cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 2004. **172**(12): p. 7297-305.
178. Yuan, W., A. Dasgupta, and P. Cresswell, *Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling*. Nat Immunol, 2006. **7**(8): p. 835-42.
179. Weller, S., et al., *Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire*. Blood, 2004. **104**(12): p. 3647-54.
180. Brennan, M. and D.J. Rees, *Sequence analysis of rat integrin alpha E1 and alpha E2 subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in lymph*. Eur J Immunol, 1997. **27**(11): p. 3070-9.
181. Kimura, N., et al., *2D7 diabody bound to the alpha2 domain of HLA class I efficiently induces caspase-independent cell death against malignant and activated lymphoid cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **325**(4): p. 1201-9.

182. Huang, M.M., et al., *CD1d1 displayed on cell size beads identifies and enriches an NK cell population negatively regulated by CD1d1*. *J Immunol*, 2004. **172**(9): p. 5304-12.
183. Zheng, Z., et al., *Expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia suggests deficient CD1-mediated immunity, polarized cytokine response, altered adhesion and increased intracellular protein transport and processing of leukemic cells*. *Leukemia*, 2002. **16**(12): p. 2429-37.

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Herrmann für die Betreuung dieser Arbeit bedanken. Außerdem danke ich dem Team aus Labor 313 für das tolle Betriebsklima und besonders Elisa Monzon-Casanova für die gute Einarbeitung sowie allen, die mir mit Rat zur Seite standen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Holger Daniel Clemen
Geburtsdatum: 22.10.1980
Geburtsort: Stuttgart Bad Cannstatt
Anschrift: Wildberger Str. 18
71034 Böblingen
E-Mail: hclemen@web.de

Schulbildung:

09/1987 – 07/1991 Grundschule in Böblingen
09/1991 – 07/2000 Gymnasium in Böblingen
Abschluss: Abitur, Note 1,7

Zivildienst:

09/2000 – 07/2001 Kreiskrankenhaus Böblingen

Studium:

10/2001 – 12/2001 Bioinformatik an der Universität Tübingen
10/2002 – 06/2009 Humanmedizin an der Universität Würzburg
09/2004: Ärztliche Vorprüfung, Note 2,0
06/2009: Ärztliche Prüfung, Note 1,5

Promotionsarbeit:

Ab 2006 Experimentelle Doktorarbeit bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Herrmann in der Immunologie an der Universität Würzburg: „Analyse der Expression und möglicher signalinduzierender Eigenschaften des CD1d-Moleküls der Ratte“

Beruf:

Ab 2010 Assistenzarzt in der Kinderklinik des Universitätsklinikums Heidelberg

Heidelberg, März 2011