

**Untersuchungen zur Rolle von CD8  
bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte**

Dissertation  
zur Erlangung des  
naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen  
Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

vorgelegt von

Frank Straube

aus Fulda

Würzburg 2000

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Bisher habe ich keine akademischen Grad erworben oder zu erwerben versucht.

Eimeldingen, den 12.12.2000

**Meiner kleinen Prinzessin**

Danksagung:

Geschafft! Eine große Aufgabe geht zu ende. PD (bald Prof.) Dr. Thomas Herrmann bin ich allezeit zu Dank verpflichtet dafür, daß er mir diese Arbeit ermöglicht hat. Seine Hilfe in allen Phasen der Arbeit, die Gespräche und sein Rat waren unverzichtbar.

Bei Prof. Dr. Jürgen Kreft möchte ich mich für die Betreuung der Arbeit als Zweitkorrektor bedanken.

Herr Hünig war als Chef des ganzen für die hervorragenden Rahmenbedingungen verantwortlich und hat diese Arbeit mit guten Ideen bereichert. Die Gespräche mit Frau Prof. Schimpl waren (und sind) eine wertvolle Hilfe.

Und natürlich gab noch es eine Menge Menschen, die mir sehr geholfen haben, und zwar nicht nur mit allerlei Methodenwissen, Reagenzien und Ideen. Unschätzbar wichtig war und ist eure Freundschaft. Zunächst mal gab es die Leute im Labor 313, wo ich sehr gerne mit Kathrin Hofmann, Matthias Kreis, Nicole Matzner, Juan-Carlos Sepúlveda Arias, Anne Asmuß, und Elwira Pyz zusammengearbeitet habe. Ich vermisse Euch.

Hier kann ich nicht alle erwähnen, aber ein paar Leute aus der Viro und dem Graduiertenkolleg möchte ich namentlich nennen, weil es ohne euch einfach nicht so gut gewesen wäre: Astrid Bischof, Andreas Kerstan, Kevin Dennehy, Chia-Huey Lin, Nora Torres-Nagel, Bea Mehling, Silke Hauf, Marta Rodrigues-Palmero Seuma, Sabine Wagner, Matthias Knödel, Brigitte Santner-Nanan, Klaus Drews, Volker Thiel (ohne den es kein Spektratyping gäbe), Sonja Rotzoll, Astrid Heiter, Judith Gerlach, Cathy Toben, ...

## Inhaltsverzeichnis

1	<b>Einleitung</b> .....	4
1.1	Natürliches und adaptives Immunsystem.....	4
1.2	Aufgaben von T Zellen .....	6
1.3	Thymische Reifung.....	10
1.4	Die Antigene der T Zellen .....	13
1.4.1	<i>MHC-restringierte Antigenerkennung von <math>\alpha/\beta</math> T Zellen</i> .....	14
1.4.2	<i>Nicht klassisch MHC-restringierte Antigenerkennung von <math>\alpha/\beta</math> T Zellen</i>	15
1.4.3	<i>Die Antigenerkennung der <math>\gamma/\delta</math> T Zellen</i> .....	16
1.5	T Zellaktivierung .....	19
1.6	CD4 und CD8 .....	21
1.7	Die Rolle von CD8 bei der Aktivierung von $\gamma/\delta$ T Zellen der Ratte .....	24
2	<b>Material und Methoden</b> .....	27
2.1	Material .....	27
2.1.1	<i>Verbrauchsmaterial</i> .....	27
2.1.2	<i>Chemikalien, Reagenzien</i> .....	27
2.1.3	<i>Puffer und Lösungen</i> .....	27
2.1.4	<i>Kits</i> .....	29
2.1.5	<i>Geräte</i> .....	29
2.1.6	<i>Serologische Reagenzien und Zytokine</i> .....	29
2.1.7	<i>Oligonukleotide</i> .....	31
2.1.8	<i>Enzyme</i> .....	33
2.1.9	<i>Versuchstiere und Zelllinien</i> .....	33
2.2	Methoden.....	34
2.2.1	<i>Zelluläre Techniken</i> .....	34
2.2.1.1	Gewinnung von Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und Thymus.....	34
2.2.1.2	Erythrozytenlyse mit Ammoniumchlorid.....	34
2.2.1.3	T Zellreinigung durch Nylonwollpassage .....	34
2.2.1.4	Reinigung und Aktivierung von T Zellen durch Panning .....	35
2.2.1.5	Aktivierung von T Zellen mit PMA und Ionomycin.....	36
2.2.1.6	Reinigung von CD8 $\alpha\beta$ und CD8 $\alpha\alpha$ positiven und CD8 negativen T Zellen .....	37
2.2.1.7	Lebendzellzahlbestimmung über Trypanblau-Ausschluß .....	37
2.2.1.8	Zellanalyse im Durchflußzytometer .....	38
2.2.1.9	Intrazelluläre Färbung.....	38

2.2.1.10	Bestimmung der Zytotoxizität.....	39
2.2.2	<i>Molekulare Techniken</i> .....	40
2.2.2.1	Gewinnung von RNA und gDNA.....	40
2.2.2.2	Reverse Transkription von RNA.....	40
2.2.2.3	PCR.....	40
2.2.2.3.1	Kompetitive PCR.....	41
2.2.2.3.2	Semiquantitative PCR.....	42
2.2.2.4	Nomenklatur der DV-Segmente:.....	42
2.2.2.5	Klonierung von PCR-Produkt.....	42
2.2.2.6	Sequenzierung.....	43
2.2.2.7	Spektratyp-Analysen.....	43
2.2.2.8	Immunpräzipitation.....	44
2.2.2.9	Immunblot.....	45
2.2.2.10	Detektion von Kinase-Aktivität.....	46
3	<b>Ergebnisse</b> .....	47
3.1	Korezeptor-Expression auf $\alpha/\beta$ und $\gamma/\delta$ T Zellen der Milz.....	47
3.2	CD8-vermittelte Signale bei $\gamma/\delta$ T Zellen.....	49
3.2.1	<i>CD8-assoziierte p56<sup>lck</sup>-Kinaseaktivität</i> .....	50
3.2.2	<i>CD8-vermittelte Signale bei intakten <math>\gamma/\delta</math> T Zellen</i> .....	52
3.3	Analyse der CDR3-Längen der TCR $\delta$ -Ketten als Kriterium für klassische MHC-Restriktion.....	54
3.3.1	<i>DV105 und ADV7-Gensegmente in der Rattenmilz</i> .....	54
3.3.1.1	Identifizierung und Sequenzanalyse von einem DV105- und fünf ADV7-Gensegmenten der Ratte.....	54
3.3.1.2	Analyse der DV-Proteinsequenzen auf ein Motiv für die Wechselwirkung von CD8 und TCR.....	60
3.3.1.3	Expression der (A)DV-Gensegmente in CD8-Subpopulationen von $\gamma/\delta$ T Zellen.....	61
3.3.2	<i>CDR3-Längenverteilung bei TCR<math>\beta</math> und TCR<math>\delta</math></i> .....	62
3.3.3	<i>CDR3<math>\delta</math>-Längen von CD8<math>\alpha\alpha</math> und CD8<math>\alpha\beta</math> positiven sowie CD8 negativen <math>\gamma/\delta</math> T Zellen</i> .....	65
3.3.4	<i>CDR3<math>\delta</math>-Längenverteilung bei <math>\gamma/\delta</math> T Zellen von Ratte und Maus</i> .....	67
3.3.5	<i>CDR3-Längenverteilung von unselektierten <math>\gamma/\delta</math> T Zellen</i> .....	67
3.3.6	<i>Häufigkeit von ADV7 und DV105 in der Rattenmilz</i> .....	71
3.4	Modulation von CD8 $\beta$ nach Aktivierung <i>in vitro</i> .....	72
3.4.1	<i>Modulation von CD8<math>\beta</math> auf gereinigten, CD8<math>\alpha\beta</math> positiven T Zellen</i> .....	72
3.4.2	<i>Beeinflussung der CD8<math>\beta</math> mRNA durch die Modulation</i> .....	74
3.4.3	<i>CD8<math>\beta</math>-Modulation nach verschiedenen Aktivierungsprotokollen</i> .....	75

3.4.4	<i>Einfluß der Stärke des Aktivierungssignals auf die Modulation .....</i>	78
3.5	Funktionelle Charakterisierung der CD8-Subpopulationen .....	80
3.5.1	<i>IFN-<math>\gamma</math>-Produktion .....</i>	80
3.5.2	<i>Zytolytische Fähigkeiten.....</i>	81
3.5.3	<i>Expression der Membranrezeptoren CD2, NKR-P1A und des IL-15-Rezeptors.....</i>	82
4	<b>Diskussion .....</b>	87
4.1	Vergleich von CD8 auf $\alpha/\beta$ und $\gamma/\delta$ T Zellen.....	87
4.2	TCR-Stukturdaten sprechen gegen eine klassische MHC I-Restriktion.. .....	91
4.3	Modulation der CD8 $\beta$ -Kettenexpression .....	94
4.4	Die mögliche Rolle von CD8 bei der Aktivierung von $\gamma/\delta$ T Zellen der Ratte .....	98
5.1	<b>Zusammenfassung.....</b>	106
5.2	<b>Abstract.....</b>	108
6	<b>Literatur .....</b>	110
7	<b>Abkürzungen.....</b>	123
8	<b>Lebenslauf.....</b>	125
9	<b>Publikationsliste.....</b>	127

## 1 Einleitung

### 1.1 Natürliches und adaptives Immunsystem

Vor Gefahren, die von Pathogenen oder von transformierten eigenen Zellen ausgehen, schützen sich vielzellige Organismen mit dem Immunsystem. Die zum Teil sehr langlebigen Vertebraten haben ein besonders ausgeklügeltes System hervorgebracht, das sich auf ein Geflecht verschiedener Abwehrmechanismen stützt. Neben physikalischen Barrieren wie der Haut sind unspezifische Faktoren wie bestimmte pH-Werte oder lösliche Faktoren wie das Komplementsystem von grundlegender Bedeutung. An der angeborenen Immunität sind im Prinzip alle Körperzellen beteiligt; wenn sie von Erregern befallen sind, können Zellen dies den Nachbarn und dem Immunsystem mitteilen. Sie selbst reagieren z.B. mit Apoptose, d.h. sie leiten den Zelltod ein. Zu dem sogenannten unspezifischen, angeborenen Immunsystem gehören darüberhinaus auch spezialisierte Zellpopulationen. So gibt es verschiedene phagozytierende Zellen: Makrophagen, Monozyten, Dendritische Zellen, Granulozyten, in manchen Fällen auch Fibroblasten. Andere wichtige Effektorfunktionen werden von Natürlichen Killer-Zellen (NK Zellen) übernommen. Alle genannten Zellen exprimieren verschiedene Membranrezeptoren, die eindeutige Merkmale bestimmter Erreger detektieren können. Diese Rezeptoren erkennen typische, immer mit gewissen Pathogenen assoziierte Muster. Als Beispiel seien die Rezeptoren für Lipopolysaccharid genannt, die eine allen gram-negativen Bakterien gemeinsame Struktur erkennen. Da alle Pathogene charakteristische Strukturen besitzen, spezifische Reaktionen bei infizierten Zellen hervorrufen oder z.B. durch Komplement als fremd gekennzeichnet werden können, reicht das natürliche Immunsystem in vielen Fällen zur Verteidigung des Organismus aus; nur die Vertebraten verfügen zusätzlich über das adaptive Immunsystem.

Das adaptive Immunsystem wird durch B- und T Lymphozyten gebildet. Diese Zellen besitzen Rezeptoren, die so variabel gestaltet werden können, daß sie praktisch alle pathogenen Strukturen erkennen können. Jeder Lymphozyt exprimiert



einen Antigenrezeptor mit einer bestimmten Spezifität, wegen der großen Vielfalt möglicher Rezeptoren gibt es vor dem Kontakt mit einem Pathogen nur wenige Lymphozyten mit passendem Rezeptor. Bei der primären Immunantwort proliferieren diese Zellen, wobei sie teilweise in Effektorzellen, teilweise in Gedächtniszellen ausdifferenzieren. Während die Effektorzellen gegen das Pathogen antworten (z.B. indem sie virusinfizierte Zellen lysieren) und dann sterben, sorgen die langlebigen Gedächtniszellen dafür, daß bei einem zweiten Kontakt mit demselben Pathogen sofort eine starke spezifische Immunantwort vorhanden ist. Das adaptive unterstützt, ergänzt und steuert die Funktionen des angeborenen Immunsystems, kann sich theoretisch auf alle strukturellen Veränderungen eines Pathogens einstellen und bietet darüber hinaus mit dem immunologischen Gedächtnis einen evolutionär wichtigen Vorteil für die langlebigen Vertebraten.

Die Antigenrezeptoren der Lymphozyten sind Heterodimere aus einer sogenannten „schweren“ und einer „leichten“ Kette. Die Gene beider Proteinketten werden bei der Reifung der Lymphozyten aus einer großen Zahl von Gensegmenten zufällig zusammengesetzt. Für die „schweren“ Ketten wird eines von vielen V-Segmenten mit einem von mehreren D-Segment verknüpft, das zuvor mit einem ebenfalls zufällig gewählten J-Segment rekombinierte; durch Splicing des Transkripts wird dieses Konstrukt mit einem konstanten Gensegment verbunden. Die „leichten“ Ketten werden ebenso generiert, aber sie enthalten keine D-Segmente. Zusätzliche Vielfalt wird durch absichtlich ungenaue Verknüpfung der Gensegmente erzeugt: Nukleotide können durch Exonukleasen entfernt werden. Durch Haarnadelstrukturen an freien DNA-Enden kann es zu P-Nukleotidinsertionen kommen; durch die Aktivität der Terminalen Desoxyribonukleotid-Transferase werden sogenannte N-Nukleotide eingefügt. Mit dem Antigen interagieren drei Proteinschleifen jeder Proteinkette des Rezeptors, die CDR (complementarity determining regions) genannt werden. CDR1 und CDR2 sind im V-Segment kodiert, CDR3 dagegen von der Verknüpfungsregion der V-, (D-) und J-Segmente, deshalb ist CDR3 besonders variabel.

Da die Spezifität der Antigenrezeptoren von Lymphozyten zufällig erzeugt wird, sind viele mögliche Rezeptoren gegen körpereigene Strukturen gerichtet. Das

adaptive Immunsystem benötigt deshalb verschiedene Mechanismen, um die Toleranz gegen körpereigene Strukturen aufrecht zu erhalten.

Auf verschiedenen Wegen ist das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem verknüpft. Einerseits ist das adaptive Immunsystem auf die Antigenpräsentation und auf Aktivierungssignale durch Zellen des angeborenen Immunsystems angewiesen, wird also erst nach dem angeborenen aktiv; andererseits können Lymphozyten die Aktivität von angeborenen Effektorzellen steuern. Die Kommunikation zwischen Zellen wird beim direkten Kontakt der Zellen durch Rezeptor-Liganden-Paare vermittelt, zusätzlich können Zellen Lymphokine, bzw. Zytokine produzieren, die auch über eine gewisse Entfernung Signale vermitteln.

Im adaptiven Immunsystem vermitteln B Zellen die humorale Immunität, indem sie Antikörper produzieren, die an ein Pathogen binden und es so neutralisieren oder für andere Zellen des Immunsystems als fremd markieren. Die B Zellrezeptoren (BCR) und ihre sekretierten Formen, die Antikörper, binden dreidimensionale Strukturen der unterschiedlichsten Molekülklassen, z.B. Strukturen von Proteinen, Kohlenhydraten, Nukleinsäuren, aber auch von rein synthetischen Chemikalien.

### 1.2 Aufgaben von T Zellen

T Zellen sind die Träger der adaptiven zellulären Immunität, sie erkennen Antigene, die von anderen Zellen präsentiert werden. Aktivierte T Zellen können Lymphokine produzieren, die z.B. Reaktionen des Immunsystems steuern oder Gewebezellen in einen Pathogen-resistenten Zustand versetzen; bestimmte T Zellen können krankhaft veränderte oder infizierte Zellen zerstören.

Anhand der Expression des T Zellrezeptors (TCR) als Heterodimer aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette oder aus  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette unterscheidet man zwei T Zellklassen, die folglich  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen genannt werden. Sie zeigen viele gemeinsame Charakteristika: Die beiden TCR-Heterodimere sind mit dem signaltransduzierenden CD3-Komplex assoziiert. Beide T Zellklassen können im Prinzip dieselben Zytokine produzieren

und zytotoxische Aktivität besitzen. Abgesehen vom TCR exprimieren sie dieselben Membranrezeptoren; nur für Rinder ist mit WC-1 ein Rezeptor beschrieben, dessen Expression anscheinend auf eine Subpopulation von  $\gamma/\delta$  T Zellen beschränkt ist (Machugh et al. 1997). Unterschiede zwischen  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen liegen vor allem in ihrer Häufigkeit in verschiedenen Organen, in der Antigenerkennung und in den Aufgaben im Immunsystem.

Obwohl in peripheren lymphatischen Organen der Paarhufer der Anteil von  $\gamma/\delta$  T Zellen mehr als 50% aller T Zellen beträgt, besitzen andere Gruppen wie Primaten und Nagetiere dort nur sehr wenige. Ratte, Maus und Mensch gehören also zu Arten mit wenigen peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen; nur 2-3% der T Zellen in Lymphknoten und Milz sind  $\gamma/\delta$  T Zellen. In Epithelien findet man dagegen besonders viele  $\gamma/\delta$  T Zellen. Die in der Haut der Maus lokalisierten  $\gamma/\delta$  T Zellen weisen allerdings praktisch keine Variabilität des TCR auf; und in der Haut der Ratte wird ein fast identischer TCR gefunden (Kühnlein et al. 1996). Man spricht von einem kanonischen TCR, weil er durch die exakte Verknüpfung jeweils eines bestimmten V-, D- und J-Gensegments gebildet wird (GV1-GJ1 / DV101-DD2-DJ2). Auch in den Epithelien von Zunge und Reproduktionsorganen besitzt die Maus einen  $\gamma/\delta$  TCR mit charakteristischer Zusammensetzung, der durch das Auftreten von N-Nukleotiden bei der Rekombination der TCR-Gensegmente eine geringe Diversität erhält. Beim Menschen findet man diese beiden  $\gamma/\delta$  T Zellpopulation nicht, auch keine vergleichbare Zellpopulation. Es ist unklar, welche Funktionen von den  $\gamma/\delta$  T Zellen mit kanonischen Rezeptoren erfüllt werden und wie ihre Abwesenheit beim Menschen kompensiert wird.

Im Epithel des Intestinums befinden sich neben  $\alpha/\beta$  in allen untersuchten Spezies relativ viele  $\gamma/\delta$  T Zellen. Sowohl die  $\alpha/\beta$  wie die  $\gamma/\delta$  T Zellen besitzen dort ein oligoklonales TCR-Repertoire, sind durch eine besondere Expression von Oberflächenmarkern charakterisiert und haben wohl auch spezielle Funktionen (Kyes et al. 1989; zusammengefaßt bei Mowat et al. 1997). Das Hauptinteresse der vorliegenden Arbeit gilt aber nicht den epithelialen  $\gamma/\delta$  T Zellen mit ihren funktionellen Besonderheiten, sondern den  $\gamma/\delta$  T Zellen der peripheren

lymphatischen Organe, wo der Anteil der  $\gamma/\delta$  T Zellen zwar gering ist, diese aber ebenso wie die  $\alpha/\beta$  T Zellen ein hoch variables TCR-Repertoire aufweisen.

Die Antigenerkennung der  $\gamma/\delta$  T Zellen soll nur kurz angesprochen werden, da ihr ein eigenes Kapitel gewidmet ist (Abschnitt 1.4). Antigene der  $\alpha/\beta$  T Zellen in lymphatischen Organen sind Peptide, die gebunden an spezielle Proteine auf der Membran präsentiert werden. (Weil die präsentierenden Proteine von Klasse I- und II-Genen des MHC-Komplex kodiert sind, werden sie im folgenden als MHC I und MHC II bezeichnet.) Für die  $\gamma/\delta$  T Zellen sucht man dagegen noch nach generellen Prinzipien der Antigenerkennung. Trotz dieser Wissenslücke konnte man bereits einiges über ihre Rolle im Immunsystem lernen (zusammengefaßt in Hayday 2000).

Eine klassische T Zellfunktion ist die Hilfe bei der Antikörperproduktion von B Zellen; vor allem für den Klassenwechsel von Antikörpern ist Hilfe von T Zellen nötig. Aber auch zytotoxische Zellen benötigen für effiziente Immunantworten normalerweise die Unterstützung von Zytokin-produzierenden Zellen. Sie geht normalerweise von CD4 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen aus, den sogenannten T Helfer-Zellen. Auch Immunantworten gegen Zellen mit fremdem MHC werden durch  $\alpha/\beta$  T Zellen vermittelt (Schlipkötter et al. 1990). Allerdings gibt es anscheinend eine gewisse Redundanz im Immunsystem, denn  $\gamma/\delta$  T Zellen können in  $\alpha/\beta$  T Zell-defizienten Mäusen manche Funktionen übernehmen: Sie können in gewissem Rahmen T Zellhilfe für die Antikörperproduktion und den Klassenwechsel oder für andere T Zellen vermitteln (Häcker et al. 1995; Dianda et al. 1996; Wen et al. 1996; Kaufmann et al. 1993). Auch eine Transplantatabstoßung, die über nicht-klassische MHC-Moleküle vermittelt wird, kann von  $\gamma/\delta$  T Zellen ausgehen (Chandler et al. 1995).

Wichtige Aufgaben für T Zellen liegen auch in der Abwehr von Infektionen und in der Zerstörung von transformierten Zellen. Beide Aufgaben werden hauptsächlich durch  $\alpha/\beta$  T Zellen übernommen, aber anscheinend haben  $\gamma/\delta$  T Zellen spezielle Funktionen. Bestimmte  $\gamma/\delta$  T Zellen gehen gegen spontane Leukämien (Penninger et al. 1995) und solide Tumoren vor (Ericsson et al. 1991). Besser untersucht ist die Rolle der  $\gamma/\delta$  T Zellen bei der Abwehr von Infektionen: Zwar gehen die wichtigsten

schützenden Antworten von den  $\alpha/\beta$  T Zellen aus, aber eine Expansion von  $\gamma/\delta$  T Zellen wurde bei Infektionen mit einer großen Zahl von Erregern beobachtet (zusammengefaßt bei Matsuzaki et al. 1999), und eine protektive Rolle von  $\gamma/\delta$  T Zellen konnte bei der Antwort gegen *L. monocytogenes* (Hiromatsu et al. 1993; Mombaerts et al. 1993), *M. tuberculosis* (Ladel et al. 1995), *E. coli* (Takano et al. 1998), *N. asteroides* (King et al. 1999), *L. major* (Rosat et al. 1993) und *T. gondii* (Hisaeda et al. 1995) nachgewiesen werden. Die  $\gamma/\delta$  T Zellen sind in einigen dieser Infektionsmodelle die ersten Zellen des adaptiven Immunsystems, die auf die Infektion reagieren; deshalb sieht man die  $\gamma/\delta$  T Zellen als erste Verteidigungslinie des Immunsystems („*first line of defence*“). Zwar wird das immunologische Gedächtnis bei sekundären Immunantworten hauptsächlich von  $\alpha/\beta$  T Zellen getragen, aber in  $\alpha/\beta$  T Zell-defizienten Mäusen findet man auch ein  $\gamma/\delta$  T Zellgedächtnis (Mombaerts et al. 1993).

Schließlich gehört die Regulation von Immunantworten zu den Aufgaben von T Zellen. Sie ist meistens die Aufgabe von CD4 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen, daneben haben  $\gamma/\delta$  T Zellen nicht-redundante Aufgaben. Sie können Immunreaktionen durch die Lyse von aktivierten  $\alpha/\beta$  T Helfer-Zellen oder Makrophagen steuern (Correale et al. 1997; Egan et al. 2000) oder durch die Produktion von Zytokinen wie IL-10 (Hsieh et al. 1996; Gorczynski et al. 1996). IL-10 gehört wie IL-4, IL-5 und IL-13 zum sogenannte Th2-Zytokinmuster, das Antikörper-vermittelte Immunreaktionen betont. Th1-Antworten sind dagegen durch die Produktion von IFN- $\gamma$  charakterisiert und aktivieren vor allem zelluläre Immunreaktionen, z.B. Makrophagen. Th1- und Th2-Antworten supprimieren sich gegenseitig, durch die Produktion von TGF- $\beta$  können beide Antworten blockiert werden (zusammengefaßt bei Abbas et al. 1996). Wie die  $\alpha/\beta$  T Zellen können auch  $\gamma/\delta$  T Zellen Zytokine vom Th1- oder Th2-Typ produzieren (Ferrick et al. 1995; Duhindan et al. 1997; Wen et al. 1998).

Anscheinend ist für die Immunregulation eine Subpopulation von  $\gamma/\delta$  T Zellen verantwortlich, denn auf noch nicht geklärte Weise können CD8 positive  $\gamma/\delta$  T Zellen von Maus und Ratte in einem Allergiemodell Immunantworten vom Th2-Typ in Th1-Antworten umlenken (McMenamin et al. 1994; McMenamin et al. 1995). Umgekehrt können CD8 exprimierende  $\gamma/\delta$  T Zellen Th1-Antworten, die zu

autoimmuner Diabetes führen, in Th2-Antworten umwandeln (Harrison et al. 1996). Es gibt weitere Beispiele für die Modulation von Immunantworten durch CD8 positive  $\gamma/\delta$  T Zellen des Menschen (Correale et al. 1997) und der Maus (Rosat et al. 1993).

Die zwei wichtigsten Aufgaben der  $\gamma/\delta$  T Zellen könnten also zum einen die frühe Antwort gegen Pathogene und Verletzungen (King et al. 1999) und zum anderen die Regulation von Immunantworten sein. Beide Funktionen sind im Modell der Listeriose der Maus nachgewiesen. Einerseits findet man eine protektive, frühe Antwort von  $\gamma/\delta$  T Zellen nach der Infektion mit Listerien (Hiromatsu et al. 1993; Mombaerts et al. 1993). Andererseits verhindern bestimmte  $\gamma/\delta$  T Zellen später im Verlauf der Infektion die Bildung von Nekrosen durch eine übermäßig starke Entzündungsreaktion (Mombaerts et al. 1993); dies wird durch die Lyse von aktivierten Makrophagen vermittelt (Egan et al. 2000). Möglicherweise gehen die frühen und die späten Effekte von unterschiedlichen  $\gamma/\delta$  T Zell-Subpopulationen aus. Um die Rolle der  $\gamma/\delta$  T Zellen bei Immunantworten komplett aufklären zu können, muß man vor allem mehr über ihre Antigenerkennung und Aktivierung lernen.

### 1.3 Thymische Reifung

Die Abkürzung „T Zelle“ leitet sich von Thymus ab, denn dort vollzieht sich die Reifung der meisten T Zellen. Die aus dem Knochenmark eingewanderten Vorläufer der T Zellen sind doppelt negativ für CD4 und CD8; sie können sich noch zu  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma/\delta$  T Zellen entwickeln (Livak et al. 1995). Die Entwicklungsstadien im Thymus sind aber bisher nur für die  $\alpha/\beta$  T Zellen und nur bei der Maus geklärt und soll hier kurz zusammengefaßt werden: Im Stadium I der Entwicklung sind die T Zellvorläufer CD44 stark positiv und CD25 negativ; sie entwickeln sich über das CD44 stark positive, CD25 positive Stadium II weiter zum Stadium III, in dem sie CD44 schwach positiv, CD25 positiv sind. Im Stadium II beginnen die Zellen gleichzeitig TCR $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten umzulagern, am Ende von Stadium III sind diese

Rekombinationen abgeschlossen. Wird dann eine funktionelle TCR $\beta$ -Kette exprimiert, erreicht diese im Komplex mit einer prä-T $\alpha$ -Kette die Membran. Durch Signale des prä-TCR wird das Rearrangement der anderen  $\beta$ -Kette gestoppt, die Zelle teilt sich und tritt in Stadium IV ein, d.h. sie ist CD44 niedrig positiv und CD25 negativ (zusammengefaßt bei Hayday et al. 1999). Trotz der produktiven Umlagerung einer TCR $\beta$ -Kette kann ein Thymozyt sich aber noch zu einer  $\gamma\delta$  T Zelle entwickeln (Dudley et al. 1994). Ist sie aber auf dem Weg zur  $\alpha\beta$  T Zelle, exprimiert sie CD4 und CD8 $\alpha\beta$  und beginnt die TCR $\alpha$ -Ketten umzulagern. Auf dem Weg zu  $\alpha\beta$  T Zellen werden in diesem Stadium die meisten TCR $\delta$ -Gene durch TCR $\alpha$ -Umlagerungen deletiert (Chien et al. 1987; Malissen et al. 1992), und die Transkription der TCR $\gamma$ -Kette wird supprimiert (Wilson et al. 1994; Wilson et al. 1996). Wenn ein funktioneller  $\alpha\beta$  TCR exprimiert wird, teilt sich die Zelle mehrfach und wird auf die Erkennung des exprimierten MHC-Haplotyps positiv selektiert. Wird der MHC zu hoch affin gebunden, ist die Zelle also autoreaktiv, wird sie negativ selektiert. Schließlich wird sichergestellt, daß MHC I restringierte  $\alpha\beta$  T Zellen nur noch CD8 exprimieren, MHC II restringierte dagegen alleine CD4.

Wann die  $\gamma\delta$  T Zelllinie von diesem Weg abzweigt, ist noch nicht abschließend geklärt; vermutlich gibt es mindestens zwei verschiedene Entwicklungswege für die  $\gamma\delta$  T Zellen. Der erste zweigt vor dem CD4 und CD8 doppelt positiven Stadium ab, die entstehenden  $\gamma\delta$  T Zellen bleiben dann doppelt negativ. Ein zweiter Weg der  $\gamma\delta$  T Zellreifung führt dagegen über das CD4 und CD8 doppelt positive Stadium, dieser Entwicklungsweg ist in der Maus aber anscheinend eher die Ausnahme (Passoni et al. 1997; Washburn et al. 1997). Wie die wenigen in der Peripherie CD4 oder CD8 einzeln positiven  $\gamma\delta$  T Zellen reifen, ist unbekannt. Es wäre denkbar, daß ihr Entwicklungsweg über eine TCR $\beta$ -Expression und das doppelt positive Thymozytenstadium führt. Da in 15 bis 20% der peripheren  $\gamma\delta$  T Zellen Umlagerungen der TCR $\beta$ -Kette im richtigen Leserahmen gefunden werden (Wilson et al. 1998), sollte man überprüfen, ob die entsprechenden  $\gamma\delta$  T Zellen CD8 oder CD4 exprimieren.

Über die thymische Entwicklung bei der Ratte weiß man relativ wenig; es gibt aber einige Untersuchungen, die prinzipielle Übereinstimmungen mit der Maus zeigen (Bischof et al., zur Veröffentlichung eingereicht); aber es wurden auch Unterschiede zwischen Maus und Ratte gefunden. So entwickeln sich CD4 und CD8 doppelt positive Thymozyten der Maus nach Stimulation *in vitro* zu CD4 positiven T Zellen, während in gleicher Weise stimulierte doppelt positive Thymozyten der Ratte in CD8 einzeln positive T Zellen ausreifen. Der „*default pathway*“, also der Standard-Entwicklungsweg führt in der Ratte anscheinend zu CD8 positiven Zellen, in der Maus dagegen zu CD4 positiven (Mitnacht et al. 1998).

Auch in der Ratte exprimieren 10 bis 15% der peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen intrazellulär die TCR $\beta$ -Kette, und auch sie entwickeln sich im Thymus anscheinend nicht über ein doppelt positives Stadium (Bischof et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Es bleibt deshalb unklar, in welchem Stadium ihrer Ontogenie  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte CD8 exprimieren. Analog zu den  $\alpha/\beta$  Thymozyten der Ratte führt möglicherweise auch bei  $\gamma/\delta$  T Zellen der Standard-Entwicklungsweg zur CD8-Expression. Das nötige TCR-Signal könnte bei den  $\gamma/\delta$  T Zellen mit einer positiven Selektion im Zusammenhang stehen.

Auch die Expression des für die zelluläre Differenzierung bedeutsamen Rezeptors Notch könnte sich zwischen Maus und Ratte unterscheiden; so führt auch in der Maus die Expression von konstitutiv aktivem Notch zur Expression von CD8 $\alpha\beta$  auf einem großen Teil der  $\gamma/\delta$  Thymozyten (Washburn et al. 1997).

Es ist noch immer strittig, ob die  $\gamma/\delta$  T Zellen bei der Reifung analog zu den  $\alpha/\beta$  T Zellen eine positive Selektion durchlaufen, d.h. ob sie eine niedrig affine Erkennung bestimmter Restriktionselemente aufweisen müssen (Schweighofer et al. 1996; Wilbert et al. 1997). Eine größere Zahl von zum Teil besser kontrollierten Experimenten spricht aber für die Notwendigkeit einer positiven Selektion (Wells et al. 1991, Pereira et al. 1992, Tsujimura et al. 1996). Einige wenige experimentelle Systeme zeigen eine negative Selektion von autoreaktiven  $\gamma/\delta$  T Zellen (Bonneville et al. 1990; Dent et al. 1990). Diese Zellen werden anscheinend zu einem großen Teil anergisiert und nicht vollständig im Thymus deletiert. Fast alle Experimente zur positiven wie zur negativen Selektion von  $\gamma/\delta$  T Zellen stützen sich auf die zwei



transgenen T Zellrezeptoren KN6 und G8, die für das nur von wenigen  $\gamma/\delta$  T Zellen erkannte nicht-klassische MHC-Molekül T22 spezifisch sind (Crowley et al. 2000); möglicherweise stellt diese Art der Antigenerkennung eine Ausnahme dar.

Zwar reifen die meisten T Zellen im Thymus, aber z.B. viele intestinale intraepitheliale T Zellen entstehen in der Lamina Propria des Intestinums (Saito et al. 1998). Als grober Anhaltspunkt für den Ort der Reifung CD8 positiver T Zellen gilt die Expression der CD8 $\beta$ -Kette (Torres-Nagel et al. 1992). Für die Entwicklung CD8 positiver T Zellen im Thymus ist diese notwendig, während sie zumindest bei der Maus auf extrathymisch gereiften Zellen in der Regel nicht gefunden wird. Die  $\gamma/\delta$  T Zellen der Milz, die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen, gehören zur thymisch gereiften Population.

### 1.4 Die Antigene der T Zellen

T Zellen erkennen Antigene, die von anderen Zellen präsentiert werden. Seitens der Antigen präsentierenden Zellen ist eine Reihe verschiedener präsentierender Moleküle bekannt. Da von den entsprechenden T Zellen zusammen mit dem präsentierten Fremdantigen immer auch das präsentierende Molekül erkannt wird, nennt man die präsentierenden Proteine die Restriktionselemente und spricht davon, daß T Zellen eine bestimmte Antigenrestriktion besitzen. Man unterscheidet eine Reihe von T Zellschubklassen, die für ihre Antigenerkennung verschiedene Restriktionselemente nutzen.

### 1.4.1 MHC-restringierte Antigenerkennung von $\alpha/\beta$ T Zellen

Die meisten thymisch gereiften  $\alpha/\beta$  T Zellen der peripheren lymphatischen Organe erkennen Peptide, die ihnen durch andere Zellen über MHC I oder MHC II präsentiert werden. Während fast alle Körperzellen MHC I exprimieren, wird MHC II im allgemeinen nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen wie Dendritischen Zellen oder aktivierten Makrophagen und B Zellen gefunden. Wenn  $\alpha/\beta$  T Zellen den Korezeptor CD4 exprimieren, erkennen sie Peptide im Zusammenhang mit klassischen MHC II-Molekülen; CD8 exprimierende  $\alpha/\beta$  T Zellen erkennen Peptid auf klassischen MHC I-Molekülen. CD4 und CD8 nennt man Korezeptoren, weil sie einerseits die Stabilität der TCR-Bindung mit dem Antigen erhöhen, andererseits die TCR-Signale verstärken.

MHC I besteht aus einer kleinen Kette, dem sogenannten  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ) und einer  $\alpha$ -Kette mit drei Domänen, von denen die ersten beiden von der Membran abstehen und mit zwei  $\alpha$ -Helices über einer  $\beta$ -Faltblattstruktur eine Peptidbindungsgrube bilden. Die dritte Domäne und  $\beta_2m$  liegen membranproximal und bestehen aus je einer Immunglobulin-Domäne. Dagegen besteht MHC II aus einem Dimer mit ungefähr gleich großer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette; beide Ketten bestehen aus einer membranproximalen Immunglobulin-Domäne, während die beiden distalen Domänen wieder eine Peptidbindungsgrube bilden, die der von MHC I ähnelt. Die Gene für MHC I und MHC II liegen nebeneinander im selben Genkomplex. Weil die Anpassung eines Pathogens an die Möglichkeiten der Peptidpräsentation eines bestimmten MHC-Haplotyps für dessen homozygoten Träger schwere Nachteile zur Folge hätte, sind die klassischen MHC-Gene zwischen Individuen einer Population extrem variabel.

Über MHC I werden den CD8 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen 8 bis 11 Aminosäuren lange Peptide präsentiert, die in der Regel Abbauprodukte von zytoplasmatischen Proteinen sind. Die mit MHC II assoziierten 12 bis 25 Aminosäuren langen Peptide hingegen, die von CD4 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen erkannt werden, stammen von phagozytierten Proteinen, also von außerhalb der präsentierenden Zelle. Für die

Beladung der beiden MHC-Moleküle gibt es zwei getrennte Wege der Antigenprozessierung. MHC I wird gleich nach der Synthese im Endoplasmatischen Retikulum (ER) mit Peptiden beladen, die von Proteasomen im Zytoplasma erzeugt und vom TAP-Transporter ins ER gebracht wurden. Dagegen wird MHC II im ER durch die invariante Proteinkette blockiert und in Endosomen transportiert. Erst nach dem Abbau der invarianten Kette im Endolysosom wird MHC II mit der Hilfe von H2-M mit Peptid beladen.

### 1.4.2 Nicht klassisch MHC-restringierte Antigenerkennung von $\alpha/\beta$ T Zellen

Einige  $\alpha/\beta$  T Zellen besitzen eine Spezifität für Antigene, die im Zusammenhang mit nicht-klassischen MHC-Molekülen präsentiert werden. Bestimmte CD8 positive  $\alpha/\beta$  T Zellen der Maus erkennen von Qa-1 präsentierte Antigene, andere sind H-2M3 restringiert (Review: Beckman et al. 1995; Braud et al. 1999). Das nicht-klassische MHC I-Molekül Qa-1, zu dem mit RT-BM1 ein Homolog der Ratte bekannt ist (Parker et al. 1991), kann Peptide aus der Leadersequenz von Proteinen präsentieren und ist deshalb unabhängig vom TAP-Transporter. H-2M-Moleküle, zu denen in der Ratte ebenfalls homologe Gene bekannt sind (Wang et al. 1995), präsentieren N-formylierte Peptide von Mitochondrien oder Bakterien. Andere nicht-klassische MHC I-Moleküle wie T3 oder T22 der Maus binden anscheinend keine Antigene, sondern werden aktivierungsabhängig oder als Anzeichen für Streß exprimiert. Kürzlich wurden T3-restringierte und folglich TAP-unabhängige  $\alpha/\beta$  T Zellen beschrieben (Tsujimura et al. 2000). Bei einigen nicht-klassischen MHC-Genen kennt man weder Expressionsmuster noch Funktion. Für einige dieser Gene und ähnlicher Pseudogene nimmt man an, daß ihr Hauptnutzen darin liegt, daß sie durch mögliche Rekombinationen mit klassischen MHC-Molekülen deren Variabilität erhöhen können.

Eine Population von  $\alpha/\beta$  T Zellen mit nicht klassisch MHC-restringierter Antigenerkennung befindet sich im intestinalen Epithel. Bei der Maus erkennen

diese Zellen anscheinend Antigene im Zusammenhang mit nicht-klassischen MHC I-Molekülen (Das et al. 1999). Sie unterscheiden sich in Bezug auf ihre Aktivierung und Funktion von klassisch MHC-restringierten  $\alpha/\beta$  T Zellen (zusammengefaßt bei Mowat et al. 1997).

Es gibt mit den sogenannten NK T-Zellen auch  $\alpha/\beta$  T Zellen, die nicht MHC-restringiert sind. In der Maus exprimieren die NK T Zellen den aktivierenden NK Zellrezeptor NK1.1 und entweder keine Korezeptoren oder CD4. Ihre T Zellrezeptoren zeigen nur eine stark eingeschränkte Variabilität: Sie benutzen AV14- und AJ281-Gensegmente in Kombination mit BV8 oder BV7 und erkennen Glycolipide, die von CD1-Molekülen präsentiert werden (Gumperz et al. 2000), und CD4 hat bei der Antigenerkennung vermutlich keine Rolle, denn die MHC I-ähnlichen CD1-Moleküle interagieren nicht mit CD4. Eine ähnliche, NKR-P1A positive Zellpopulation des Menschen benutzt CD4 nicht als Korezeptor der Antigenerkennung, denn Antikörper gegen CD4 beeinflussen ihre Aktivierung nicht (Sieling et al. 2000). Ob die NKR-P1A und CD8 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen der Ratte die zu den NK T Zellen homologe Population darstellen, ist noch Gegenstand von Untersuchungen.

### 1.4.3 Die Antigenerkennung der $\gamma/\delta$ T Zellen

Die Antigenerkennung der  $\gamma/\delta$  T Zellen ist im Gegensatz zu den gleichzeitig entdeckten  $\alpha/\beta$  T Zellen noch nicht verstanden. Sie beginnt nur langsam anhand vieler einzelner Beispiele klarer zu werden (Review: Davis et al. 1995; Chien 1996). Beim Menschen erkennen z.B. einige intestinale intraepitheliale  $\gamma/\delta$  T Lymphozyten das nicht-klassische MHC I-Molekül MICA, das durch Streß induziert wird, keine Peptide präsentiert und interessanterweise nicht mit  $\beta 2m$  assoziiert ist (Bauer et al. 1999). Auch die Antigenerkennung der intestinalen intraepithelialen  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus hat anscheinend etwas mit Genen des MHC zu tun (Pereira et al. 1997) und ist

unabhängig von einer  $\beta 2m$ -Expression ist (Fujiura et al. 1996), aber bei Maus und Ratte wurden bisher keine zu MICA homologen Gene gefunden.

Man kennt noch immer nicht die Antigene der kanonischen Rezeptoren der  $\gamma/\delta$  T Zellen in der Haut und im Epithel der Reproduktionsorgane. Diese Zellen weisen gemeinsam mit den intestinalen intraepithelialen  $\gamma/\delta$  T Lymphozyten ( $\gamma/\delta$  iIEL) einige Besonderheiten auf, z.B. ist ihre CD3 $\zeta$ -Kette zumindest teilweise durch die gemeinsame  $\gamma$ -Kette der Fc-Rezeptoren ersetzt (siehe Abschnitt 1.5). Als einzige T Zellen können DETC und  $\gamma/\delta$  iIEL Fibroblastenwachstumsfaktor VII (= Keratinozytenwachstumsfaktor, KGF) produzieren (Boismenu et al. 1994). Diese  $\gamma/\delta$  T Zellen stehen also funktionell abseits von den peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen mit hoher TCR-Diversität.

Für die letztgenannten  $\gamma/\delta$  T Zellen wurde eine Reihe von Antigenen beschrieben. Strenggenommen weiß man allerdings nicht einmal, ob die Antigenerkennung der  $\gamma/\delta$  T Zellen verschiedener Spezies generellen Regeln folgt; beispielsweise erkennen die  $\gamma/\delta$  T Zellen des Menschen anscheinend oft kleine Nichtpeptid-Antigene, während dies bei der Maus nicht gefunden wurde. Für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus wurde dagegen häufig die Erkennung von streßinduzierten und Hitzeschock-Proteinen beschrieben (Kim et al. 1995; Kaufmann 1996). Für einzelne  $\gamma/\delta$  T Zellen bei Maus und Mensch wurde die Erkennung von klassischen und nicht-klassischen MHC-Molekülen publiziert (zusammengefaßt bei Haas 1993), doch anscheinend sind die  $\gamma/\delta$  T Zellen in der Regel nicht MHC-restringiert, da ihre Zahl und Lokalisierung durch die Defizienz von  $\beta 2m$ , TAP, MHC II oder H2-M nicht beeinflußt wird (Zijlstra et al. 1990; Koller et al. 1990; Grusby et al. 1993; de la Salle et al. 1994; Schild et al. 1994). Bei Maus und Mensch sind die peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen dementsprechend zum größten Teil CD4 und CD8 negativ. Wo man eine MHC-Erkennung fand und charakterisierte, erkennen  $\gamma/\delta$  T Zellen die MHC-Moleküle unabhängig von gebundenen Peptiden und unabhängig von Antigenprozessierung (Schild et al. 1994; Weintraub et al. 1994). Etwa 0,5% der  $\gamma/\delta$  T Zellen in der Milz der Maus erkennen das nicht-klassische MHC-Molekül T22 (Crowley et al. 2000), das – wie in Abschnitt 1.4.2 beschrieben – höchstwahrscheinlich keine Antigen bindet und aktivierungsabhängig oder als Anzeichen für Streß exprimiert wird (Wingren et al. 2000). Anscheinend ist

die Antigenerkennung von  $\gamma/\delta$  T Zellen in Maus und Mensch allgemein eher mit der des BCR vergleichbar als mit der Antigenerkennung der  $\alpha/\beta$  T Zellen. Für diese Möglichkeit sprechen die vielen beschriebenen Fälle für die Erkennung von intakten, nicht prozessierten Proteinen (Schild et al. 1994; Sciammas et al. 1994), von Kohlenhydratstrukturen (Speir et al. 1999), synthetischen Aminosäurepolymeren (Vidovic et al. 1989) und kleinen Nichtpeptidantigenen (Tanaka et al. 1995; Bukowski et al. 1999).

Auch indirekt über die Proteinstruktur hat man die Antigenerkennung des  $\gamma/\delta$  TCR untersucht. Im Gegensatz zu BCR und  $\alpha/\beta$  TCR sind für den  $\gamma/\delta$  TCR aber keine Kristallstrukturen mit gebundenem Antigen bekannt, lediglich die Struktur der variablen Domäne einer menschlichen TCR $\delta$ -Kette wurde bisher bestimmt. Sie zeigt zum Teil nähere strukturelle Verwandtschaft mit der TCR $\alpha$ -Kette, zum Teil mit der schweren Kette des BCR. Während Lage und Orientierung des CDR2 $\delta$  eher der des CDR2 in der schweren BCR-Kette entspricht, ähnelt die Orientierung von CDR1 $\delta$  und CDR3 $\delta$  der von AV (Li et al. 1998).

Aus den Kristallstrukturen von BCR und TCR mit ihrem jeweiligen Antigen weiß man, daß vor allem CDR3 eine zentrale Rolle bei der Antigenerkennung besitzt: Zwar kann der BCR sein Antigen in unterschiedlicher Orientierung binden, in jedem Fall sind aber Antigenkontakte der CDR3-Schleifen beteiligt (Davies et al. 1990). Beim  $\alpha/\beta$  TCR bindet vor allem CDR3 an das antigene Peptid (Garboczi et al. 1996; Ding et al. 1998; Garcia et al. 1998; Reinherz et al. 1999). Die zwischen dem BCR und dem MHC-restringierten  $\alpha/\beta$  TCR bestehenden Unterschiede der Antigenerkennung spiegeln sich in unterschiedlichen Längen der CDR3-Schleifen wider: Während nämlich CDR3 der schweren (d.h. ein D-Segment enthaltenden) Kette des BCR im Durchschnitt deutlich länger ist als CDR3 der leichten BCR-Kette, weist die TCR $\beta$ -Kette trotz D-Segment nur die gleiche CDR3-Länge auf wie die „leichte“ TCR $\alpha$ -Kette. Zusätzlich können die CDR3-Längen schwerer BCR-Ketten stark variieren, während sie bei TCR $\beta$  auf einen kleinen Bereich beschränkt sind (Rock et al. 1994). Man kann das eingeschränkte Längenspektrum der TCR $\beta$ -Kette auf strukturelle Anforderungen der MHC-Restriktion zurückführen, denn CDR1, CDR2 und CDR3 der TCR $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette müssen gleichzeitig mit den beiden  $\alpha$ -Helices des MHC interagieren, während

CDR3 und zum Teil auch CDR1 mit dem eingeschlossenen Peptid in Kontakt stehen (Garboczi et al. 1996; Ding et al. 1998; Garcia et al. 1998; Reinherz et al. 1999). Auch für CD1-restringierter  $\alpha/\beta$  TCR gelten anscheinend sehr ähnliche Regeln (Melián et al. 2000). Die MHC-Restriktion und auch die CD1-Restriktion von  $\alpha/\beta$  T Zellen bedingen also eine mehr oder weniger ebene Kontaktfläche mit dem MHC-Peptid-Komplex, wodurch nur ganz bestimmte CDR3-Längen erlaubt sind. Dabei spielt die Erkennung von MHC I oder II für die CDR3-Länge fast keine Rolle (Candéias et al. 1991; Rock et al. 1994).

Bei Maus und Mensch ist die Antigenerkennung  $\gamma/\delta$  T Zellen anscheinend nicht MHC-restringiert, und dementsprechend ähnelt das Spektrum von CDR3-Längen der oft sogar mehr als ein D-Segment enthaltenden TCR $\delta$ -Ketten dem Spektrum der schweren BCR-Kette. Die Länge der CDR3 $\delta$ -Schleifen ist sehr variabel, im Durchschnitt ist CDR3 $\delta$  aber deutlich länger als CDR3 $\gamma$  (Rock et al. 1994). Bis jetzt wurden allerdings nur CDR3-Längenspektren für die meist CD4 und CD8 negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen dieser beiden Spezies bestimmt, sowie für die  $\gamma/\delta$  T Zellen des Schafs, wo ähnliche CDR3-Längen gefunden wurden (Hein et al. 1993). Für die  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte oder speziell für CD8 positive  $\gamma/\delta$  T Zellen gibt es bisher keine Daten zur CDR3-Länge, und für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte sind auch keine Antigene bekannt.

### 1.5 T Zellaktivierung

Würde CD8 als Korezeptor des  $\gamma/\delta$  TCR fungieren, käme ihm eine wichtige Rolle bei der antigenspezifischen T Zellaktivierung zu. Diese Aktivierung lässt sich in verschiedene Phasen einteilen, sie beginnt mit dem Kontakt des TCR mit dem spezifischen Antigen. Daraufhin wird eine Reihe verschiedener Signalwege angeschaltet, die letztlich zur Proliferation und zum Erwerb verschiedener Effektorfunktionen führen.

Der TCR selbst hat nur winzige zytoplasmatische Domänen und ist mit dem CD3-Komplex assoziiert, der die TCR-Signale vermittelt. CD3 besteht aus einem CD3 $\zeta$ -Dimer, einem CD3 $\epsilon\delta$ - und einem CD3 $\epsilon\gamma$ -Dimer. Allerdings ist in einigen T Zellklassen CD3 $\zeta$  durch die gemeinsame  $\gamma$ -Kette der Fc-Rezeptoren ersetzt. Die intraepithelialen intestinalen T Zellen (Guy-Grand et al. 1994), die NK T Zellen (Arase et al. 1997), die DETCs und die  $\gamma/\delta$  T Zellen der Reproduktionsorgane (Park et al. 1995) benutzen diese Fc-Rezeptorkette. Bei thymisch gereiften  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen mit hoher TCR-Diversität enthält CD3 dagegen die  $\zeta$ -Kette (Ohno et al. 1994). Die Aktivierung dieser Zellen soll hier kurz zusammengefaßt werden.

Das gängige Modell der T Zellaktivierung geht davon aus, daß durch die Antigenerkennung Kinasen der src-Familie in die Nähe des TCR, bzw. der CD3-Ketten gebracht werden. Vor allem die Proteintyrosinkinase p56<sup>lck</sup> (mit dem Korezeptor assoziiert) und p59<sup>fyn</sup> phosphorylieren dann die sogenannten ITAM-Motive (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) des CD3-Multimers. An die Tyrosin-phosphorylierten ITAMs bindet ZAP-70, eine Proteintyrosinkinase der syk-Familie, die daraufhin durch p56<sup>lck</sup> oder p59<sup>fyn</sup> phosphoryliert wird (Weiss et al. 1994). ZAP-70 ist daraufhin in der Lage, viele Substrate zu phosphorylieren. Dazu gehören kleine G-Proteine, Lipidkinasen, Mitglieder der MAP-Kinasen-Familie und auch das Adapterprotein LAT, das am Korezeptor gebunden ist (Zhang et al. 1998; Bosselut et al. 1999). LAT assoziiert mit weiteren Komponenten der Signalkaskade wie Grb2, PLC $\gamma$ 1 und einer Untereinheit der PI3-Kinase; die LAT-Rekrutierung ist notwendig für die Einbeziehung des PLC $\gamma$ /Calcineurin/NF-AT-Weges und des ras/ERK-Weges (Finco et al. 1998). Andere Signale münden von ZAP-70 aus in die JNK und p38-MAP-Kinase-Wege. Als Endergebnis führen die verschiedenen, mehrfach miteinander verknüpften Signalwege zu komplexen Veränderungen der Genexpression.

Ob die Aktivierung der peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen auf dieselbe Weise funktioniert wie die der  $\alpha/\beta$  T Zellen, wurde bisher nicht untersucht. Für die beiden T Zellklassen sind keine Unterschiede in der Expression von Komponenten der Signalkaskaden bekannt. Auch wenn anscheinend die  $\gamma/\delta$  T Zellen p56<sup>lck</sup>- und p59<sup>fyn</sup>-Defizienz etwas



besser durch syk kompensieren können als  $\alpha/\beta$  T Zellen (van Oers et al. 1996), sollte sich die Signaltransduktion nicht grundlegend unterscheiden.

Um eine T Zelle zu aktivieren, müssen gleichzeitig zum TCR-Signal noch weitere, sogenannte kostimulatorische Signale gegeben werden. Diese können durch kostimulatorische Moleküle wie CD28 oder CD2 vermittelt werden, aber auch durch Zytokine wie IL-2 oder IL-4. Am wichtigsten, vor allem für die Aktivierung naiver T Zellen, ist das kostimulatorische Molekül CD28, dessen Liganden CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) nur von professionellen antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Zwar sind die  $\gamma/\delta$  T Zellen auch in dieser Hinsicht kaum untersucht worden, aber sie haben anscheinend ähnliche Erfordernisse bezüglich der Kostimulation wie  $\alpha/\beta$  T Zellen (Sperling et al. 1993; Wesch et al. 1997; Hanrahan et al. 1997).

### 1.6 CD4 und CD8

CD8 und CD4 dienen MHC-restringierten  $\alpha/\beta$  T Zellen als Korezeptoren bei der Antigenerkennung. Sie sind aber nicht unverzichtbar für die T Zellaktivierung: Viele  $\gamma/\delta$  T Zellen exprimieren keinen der beiden Korezeptoren, und auch  $\alpha/\beta$  T Zellen können in Abwesenheit eines Korezeptors normale TCR-Signale erhalten (Bosselut et al. 1999). Bei  $\alpha/\beta$  T Zellen stabilisieren CD4, bzw. CD8 aber einerseits die Antigenbindung (zumindest durch CD8 wird die Avidität der Bindung erhöht) und potenzieren andererseits die Signale des TCR (zusammengefaßt bei Janeway et al. 1992). Auf manchen Zellen haben CD4 oder CD8 aber auch andere, oft noch nicht völlig verstandenen Aufgaben. Nachfolgend werden CD4 und CD8 und ihre Funktionen vorgestellt.

CD4 wird von einer einzelnen Polypeptidkette gebildet. Neben den thymisch gereiften, MHC II-restringierten  $\alpha/\beta$  T Zellen wird CD4 auch von einigen  $\gamma/\delta$  T Zellen exprimiert. Bisher ist nicht untersucht worden, ob CD4 auch der Korezeptor des  $\gamma/\delta$  TCR sein kann. Wenn  $\gamma/\delta$  T Zellen CD4 exprimieren, sind sie (analog zu CD4 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen) nicht zytotoxisch, sondern produzieren Zytokine (Spits et al.

1991; Wen et al. 1998). Es gibt Zellen, die CD4 nicht als Korezeptor des TCR exprimieren, z.B. die schon erwähnten NK T Zellen des Menschen. Aber auch Subpopulationen von Monozyten der Rattenmilz oder Dendritischen Zellen im Lymphknoten der Ratte exprimieren CD4 (Liu et al. 1998).

CD8 wird als Dimer exprimiert, entweder als CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer oder als CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer. Zwar binden p56<sup>lck</sup> und LAT an sich überlappenden Motiven der zytoplasmatischen Domäne von CD8 $\alpha$ , aber durch die CD8 $\beta$ -Kette wird die Bindung dieser Moleküle und die Effizienz der CD8-Korezeptor-Signale deutlich verbessert (Irie et al. 1995; Bosselut et al. 1999; Bosselut et al. 2000). Im Gegensatz zu CD4 sind für CD8 in verschiedenen Spezies und in verschiedenen Organen unterschiedliche Isoformen beschrieben, die nachfolgend vorgestellt werden:

Thymisch gereifte, periphere, MHC I-restringierte  $\alpha/\beta$  T Zellen exprimieren das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer. Zwar besitzen CD8 $\alpha\alpha$  und CD8 $\alpha\beta$  anscheinend ähnliche Affinitäten zu MHC I (Garcia et al. 1996), aber die Anwesenheit der CD8 $\beta$ -Kette verstärkt die Assoziation von CD8 mit p56<sup>lck</sup> und LAT, so daß CD8 $\alpha\beta$  effizientere Kosignale vermittelt (Bosselut et al. 2000). In CD8 $\beta$ -defizienten Mäusen ist die thymische Entwicklung CD8 positiver  $\alpha/\beta$  T Zellen fast völlig blockiert (Nakayama et al. 1994). Über  $\gamma/\delta$  T Zellen ist in diesen Mäusen leider nichts veröffentlicht.

Menschliche T Zellen können durch alternatives Splicing der beiden fast identischen CD8 $\beta$ -Gene eine ganze Reihe unterschiedlicher Formen von CD8 $\beta$  erzeugen, die sich meist in der zytoplasmatischen Domäne unterscheiden, die zum Teil als Dimer mit der entsprechenden Spliceform von CD8 $\alpha$  sogar sekretiert werden können (DiSanto et al. 1993). In Maus und Ratte gibt es nur ein CD8 $\beta$ -Gen (Dissen et al. 1996), und alternatives Splicing ist nicht beschrieben.

Thymozyten der Maus, nicht jedoch der Ratte exprimieren eine CD8 $\alpha'$  genannte Spliceform von CD8 $\alpha$ , die praktisch keine zytoplasmatische Domäne besitzt (Zamoyska et al. 1985; Mitnacht et al. 1998). Diese Form von CD8 $\alpha$  verstärkt TCR-Signale nicht.

Die wohl größtenteils außerhalb des Thymus gereiften (Rocha et al. 1994) intraepithelialen intestinalen  $\alpha/\beta$  und auch  $\gamma/\delta$  T Zellen ( $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  iIEL) sind in der

Maus und im Menschen CD8 $\alpha\alpha$  positiv; in der Ratte exprimieren sie meistens CD8 $\alpha\beta$  (Helgeland et al. 1997). Auch bei der Antigenerkennung von  $\alpha/\beta$  iIEL dient CD8 anscheinend als Korezeptor: Zumindest einige menschliche  $\alpha/\beta$  iIEL sind CD1d-restringiert, und ihre Aktivierung wird durch mAk gegen CD8 blockiert. Zwar kann CD8 nicht an CD1 binden, aber CD8 bindet an ein gp180 genanntes Oberflächenprotein, das wiederum mit CD1d assoziiert ist (Campbell et al. 1999). Bei der Maus wurde noch kein Homolog für gp180 beschrieben; anscheinend binden  $\alpha/\beta$  iIEL der Maus auch nicht CD1, sondern ein nicht-klassisches,  $\beta$ 2m-assoziiertes, TAP-abhängiges MHC I-Molekül (Das et al. 1999).

Aktivierte CD4 positive  $\alpha/\beta$  T Zellen der Ratte und des Menschen können nach ihrer Aktivierung CD8 $\alpha\alpha$  exprimieren (Ramirez et al. 1992; Paliard et al. 1988), wobei unklar ist, ob diese Isoform funktionell ist, z.B. ob sie mit p56<sup>lck</sup> assoziiert ist.

Neben den T Zellen exprimieren die meisten NK Zellen der Ratte und viele NK Zellen des Menschen das CD8 $\alpha\alpha$  Homodimer. Auch an diese Form von CD8 ist p56<sup>lck</sup>-gebunden (Beyers et al. 1992), aber die Bedeutung für die NK Zell-Aktivierung ist unklar.

CD8 wird aber auch von nicht lymphoiden Zellen exprimiert: CD8 $\alpha\alpha$  wird z.B. auf einer Subpopulation von Dendritischen Zellen der Maus gefunden (Winkel et al. 1997). Für der Ratte ist vor einigen Jahren eine Form von CD8 $\alpha\beta$  beschrieben worden, die auf peritonealen und alveolaren Makrophagen und auf alveolaren Mastzellen exprimiert wird. Diese CD8-Form unterscheiden sich von der Isoform der T Zellen bezüglich der Glykosylierung der V-artigen Domäne von CD8 $\alpha$  (Hirji et al. 1997; Lin et al. 1998). Durch Kreuzvernetzen mit mAk gegen CD8 $\alpha$  oder CD8 $\beta$  löst man in Makrophagen und Mastzellen die Produktion von NO und von Zytokinen (z.B. TNF- $\alpha$ ) aus. Auch hier werden die CD8-Signale durch eine Src-Kinase vermittelt, aber da Mastzellen und Makrophagen weder die Proteintyrosinkinase p56<sup>lck</sup>, noch Zap-70 exprimieren, müssen andere Signalwege als auf T Zellen benutzt werden (Hiji et al. 1999). CD8 könnte mit einem anderen Mitglied der Src-Familie assoziiert sein, wobei p53/59<sup>lyn</sup>, p58<sup>hck</sup>, p59<sup>fgr</sup> und p59<sup>fyn</sup> in Frage kämen.

Es gibt also eine große Zahl von CD8-Isoformen, von denen CD8 $\alpha\beta$  auf  $\alpha/\beta$  T Zellen die Funktion des Korezeptors besitzt, CD8 $\alpha\beta$  von Mastzellen und Makrophagen aber eindeutig andere Funktionen hat. Welche Rolle spielt CD8 für die  $\gamma/\delta$  T Zellen der peripheren lymphoiden Organe? Diese Frage läßt sich am einfachsten in der Ratte beantworten, denn die  $\gamma/\delta$  T Zellen von Mensch, Maus und Ratte, die in den peripheren lymphoiden Organen der drei Spezies etwa gleich häufig sind, unterscheiden sich bezüglich der CD8-Expression: Die peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen des Menschen exprimieren nur zu etwa 10% CD8 und dann ausschließlich CD8 $\alpha\alpha$  (Moebius et al. 1991). Auch die  $\gamma/\delta$  T Zellen in Lymphknoten und Milz der Maus sind nur zu etwa 10% CD8 positiv, sie exprimieren aber zum überwiegenden Teil CD8 $\alpha\beta$  (Sabine Wagner, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg, zur Veröffentlichung vorbereitet). In den peripheren lymphoiden Organen der Ratte sind etwa 90% der  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8 positiv (Lawetzki et al. 1990), von denen die meisten CD8 $\alpha\beta$  exprimieren (Torres-Nagel et al. 1992). Die Ratte bietet also durch die große Zahl der CD8 positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen die besten Voraussetzungen zur Untersuchung von CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen. Beim Übertragen der Daten auf andere Spezies ist aber Vorsicht angeraten, da eventuell Unterschiede in der Antigenerkennung der  $\gamma/\delta$  T Zellen verschiedener Spezies bestehen (zusammengefaßt in Hayday 2000).

### 1.7 Die Rolle von CD8 bei der Aktivierung von $\gamma/\delta$ T Zellen der Ratte

Noch immer ist die Bedeutung von  $\gamma/\delta$  T Zellen im Immunsystem nicht verstanden. Dies liegt vor allem daran, daß man die Prinzipien der Antigenerkennung von  $\gamma/\delta$  T Zellen noch nicht verstanden hat, weder für die kanonischen Rezeptoren der epithelialen, noch für die variablen Rezeptoren der  $\gamma/\delta$  T Zellen in peripheren lymphatischen Organen. Bisher kennt man einige Beispiele für  $\gamma/\delta$  T Zell-Antigene in Maus und Mensch, die unabhängig von MHC und Antigenprozessierung erkannt werden (Abschnitt 1.4), dementsprechend sind die meisten  $\gamma/\delta$  T Zellen dieser Spezies CD4 und CD8 doppelt negativ. Einige  $\gamma/\delta$  T Zellen exprimieren aber CD4

oder CD8; wenn diese Proteine als Korezeptor des TCR benutzt würden, könnten die Korezeptoren die Schlüssel zum Verständnis der Antigenerkennung von  $\gamma/\delta$  T Zellen werden.

Etwa ein Prozent der  $\gamma/\delta$  T Zellen exprimiert CD4 und ähnelt funktionell den CD4 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen (Abschnitt 1.6). Ob diese  $\gamma/\delta$  T Zellen eine spezielle Antigenrestriktion besitzen, vielleicht eine MHC II-Restriktion, wurde noch nicht untersucht, wohl auch deshalb, weil diese Zellen extrem selten sind.

In allen Spezies gibt es auch CD8 positive  $\gamma/\delta$  T Zellen. Da CD8 auf  $\alpha/\beta$  T Zellen im Zusammenhang mit einer MHC I-Restriktion exprimiert wird, könnten auch die CD8 positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen diese Antigenrestriktion aufweisen. Möglicherweise deutet CD8 nicht nur auf eine Antigenrestriktion hin, sondern auch auf eine funktionelle Spezialisierung. Es gibt nämlich einige experimentelle Systeme, in denen den CD8 positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben wurden (McMenamin et al. 1994; McMenamin et al. 1995; Harrison et al. 1996).

Zur Bedeutung von CD8 für die Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen gibt es bisher kaum Veröffentlichungen. Tsujimura und Kollegen berichten von CD8 $\alpha\beta$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus, Catálfamo und Kollegen von CD8 $\alpha\alpha$  positiven menschlichen  $\gamma/\delta$  T Zellen, deren TCR-vermittelte Zytotoxizität in beiden Fällen durch Antikörper gegen CD8 blockiert werden konnte (Tsujimura et al. 1996; Catálfamo et al. 1996). Es stellt sich die Frage, ob CD8 auch auf  $\gamma/\delta$  T Zellen der Korezeptor des TCR ist und ob die CD8 positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen eine MHC I-restringierte Antigenerkennung aufweisen. Da die peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte zu fast 90% CD8 exprimieren, bietet es sich an, diesbezügliche Untersuchungen in der Ratte durchzuführen. Gegen eine klassische MHC-Restriktion von  $\gamma/\delta$  T Zellen spricht zwar, daß auch in der Ratte die Alloreaktivität auf  $\alpha/\beta$  T Zellen beschränkt ist (Schlipköter et al. 1990). Doch gerade auch nicht-polymorphe nicht-klassische MHC I-Moleküle werden als Restriktionselemente für  $\gamma/\delta$  T Zellen diskutiert (Abschnitt 1.4).

Man muß nicht befürchten, daß  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte völlig andere Eigenschaften besitzen als die der Maus, da sich die  $\gamma/\delta$  T Zellen der beiden nahe verwandten Arten in fast allen bisher untersuchten Eigenschaften stark ähneln: Die GV- und die DV-

Gensegmente, sowie die D- und J-Segmente sind zwischen beiden Spezies sehr konserviert (Kinebuchi et al. 1994 ; Watson et al. 2000; diese Arbeit); der kanonische Rezeptor der dendritischen epidermalen  $\gamma/\delta$  T Zellen ist zwischen Maus und Ratte zu über 92% identisch (Kühnlein et al. 1996). Auch  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte produzieren Zytokine, vor allem vom Th1-, aber auch vom Th2-Typ (Hoffmeyer 1994), vermitteln zytotoxische Aktivität gegen Tumoren (Ericsson et al. 1991) und expandieren bei einer Reihe von Infektionen, z.B. mit *Toxoplasma gondii* (Kempf et al. 1999) oder *Listeria monocytogenes* (Kimura et al. 1996). Auch im Rattensystem gibt es CD8 positive regulatorische  $\gamma/\delta$  T Zellen (McMenamin et al. 1995). In der Milz der Ratte (Torres-Nagel et al. 1992) wie der Maus (Sabine Wagner, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg, zur Veröffentlichung vorbereitet) exprimieren die  $\gamma/\delta$  T Zellen, wenn sie CD8 positiv sind, meist das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer. Es bleibt aber zu prüfen, ob die für die Ratte gewonnenen Daten auch auf die Maus übertragen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rattensystem benutzt, zuerst wurden die CD8-Signale charakterisiert. Die Möglichkeit einer klassisch MHC-restringierten Antigenerkennung wurde indirekt über die Struktur der Antigen-bindenden CDR3-Proteinschleife untersucht. Schließlich wurde die Regulation der CD8 $\beta$ -Genexpression und die Funktion von CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  exprimierenden  $\gamma/\delta$  T Zellen analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterial

Nylonwolle	NEN LifeScience, Zaventem, Belgien
Petrischalen (nicht beschichtet für Zellkultur)	Greiner, Nürtingen
Wizard Minisäule	Promega, Heidelberg

#### 2.1.2 Chemikalien, Reagenzien

Aprotinin	Roth, Karlsruhe
Brefeldin A	Sigma, Deisenhofen
FCS	Gibco BRL, Eggenstein
Formamid	Sigma, Deisenhofen
Ionomycin	Sigma, Deisenhofen
Leupeptin	Roche, Mannheim
Pefabloc	Roche, Mannheim
PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat)	Sigma, Deisenhofen
Protein A Sepharose „Fast flow“	Pharmacia Biotech, Freiburg
Protein G Sepharose „Fast flow“	Pharmacia Biotech, Freiburg
Proteingrößenstandard „low molecular weight“	BIO-RAD, München
Radioaktives Natriumchromat ( $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$ )	Amersham Buchler, Braunschweig
Radioaktives $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP	Amersham Buchler, Braunschweig
RNAsin (Rnase-Inhibitor)	Promega, Heidelberg
RPMI1640	Gibco BRL, Eggenstein

#### 2.1.3 Puffer und Lösungen

Assaypuffer	0,1% Brij96; 25mM Hepes pH7,4
-------------	-------------------------------

## Material und Methoden

Beschichtungspuffer	250µg/ml ShaMIg in 50mM NaCarbonat-Puffer, pH9,5
1% Brij-Lysepuffer	1% Brij96; 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 20mM NaF; 1mM Pefabloc; 2µg/ml Leupeptin; 2µg/ml Aprotinin
Diatomeenerde-Lösung	10g Diatomeenerde in 50ml aqua dest.; 1% 16,2M HCl
FACS-Puffer:	PBS/0,1% BSA/0,02% NaN <sub>3</sub>
Lösung 1	50ml Tris/HCl pH7,5; 10mM EDTA pH8,0; 100µg/ml RNase A
Lösung 2	1% SDS; 0,2N NaOH
Lösung 3	3M K-Acetat pH5,5
Lösung 4	40mM Tris/HCl pH6,4; 17,5mM EDTA; 4M Guadiniumthiocyanat; 1% Triton X100
Lösung 5	100mM NaCl; 10mM Tris/HCl pH7,5; 2,5mM EDTA; 50% abs. Ethanol
10x PCR-Puffer	KCl: 500mM; MgCl <sub>2</sub> : 15mM; Triton X100: 1%; Tris/HCl: 100mM, pH9,0
Permeabilisierungspuffer	FACS-Puffer mit 0,5% Saponin (gefiltert)
Radioaktiv-Assaypuffer	pro Ansatz: 27µl Assaypuffer + 3µl 10mM NaVanadat + 0,3µl 1M MnCl <sub>2</sub> + 1µl <sup>γ</sup> 32P-ATP (10µCi, bzw. 370kBq)
RPMI	RPMI mit 50ml SC-Lösung
SC-Lösung	500ml FCS (hitzeinaktiviert), 100ml NaPyruvat, 100ml nicht-essentielle Aminosäuren, 100ml Penicillin-Streptomycin-Lösung, 5ml 2-Mercaptoethanol, 2,92g Glutamin
10x SDS-Laufpuffer	100ml 10% SDS-Lösung, 144,13g Glycin, 30,3g Tris, mit aqua dest. ad 1l, pH nicht einstellen
2x SDS-Probenpuffer (nicht reduzierend):	350mM Tris pH 6,8; 20% Glycerin; 6% SDS; 0,05% Bromphenolblau; 10mM EDTA
2x SDS-Probenpuffer (reduzierend):	nicht reduzierender Puffer + 1/10 Volumen 10% 2-Mercaptoethanol
TAC (Tris / Ammoniumchlorid)	20mM Tris, 0,83% NH <sub>4</sub> Cl, pH7,2
10x Transferpuffer Western Blot	116g Tris, 580g Glycin, mit aqua dest. Ad 4l



### 2.1.4 Kits

Big Dye Sequenzierungs-Kit	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA
ECL-System	Amersham Pharmacia, Freiburg
HTP TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
QIAquick-spin PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Quiagen, Hilden
Trizol-Reagenz	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.1.5 Geräte

Automatischer Sequenzierer „ABI Prism 310“	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut, USA
FACScan II	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Zellsorter FACS Vantage	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Magnet „Vario-MACS“	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Gamma-Counter	Wallac Oy, Turku, Finnland

### 2.1.6 Serologische Reagenzien und Zytokine

Folgende polyklonale Antikörper wurden benutzt:

Kaninchen-Serum anti Maus IgG	hergestellt im Institut für Virologie und Immunbiologie
Kaninchen-Serum anti p56 <sup>lck</sup>	Geschenk von Jannie Borst, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Holland
Kaninchen-Serum anti p59 <sup>fyn</sup>	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
MACS Partikel mit Ziegen-Serum anti Maus IgG	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Maus IgG	Sigma, Deisenhofen
Schaf-Serum anti Maus IgG	Boehringer Mannheim
Streptavidin-CyChrome	Pharmingen, San Diego, CA, USA

Folgende Zytokine wurden benutzt:

Rekombinantes humanes IL-2	Chiron, Emeryville, CA, USA
Rekombinantes Maus IL-15	Geschenk von Immunex, Seattle, Washington, USA
IL-15-Fusionsprotein: humanes IL-15, fusioniert mit der Maus-IgG2b-Fc-Domäne und biotinyliert:	Geschenk von Silvia Bulfone-Paus, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin
IL-2-Fusionsprotein: humanes IL-2, fusioniert mit der menschlichen IgG1-Fc-Domäne und biotinyliert:	Geschenk von Silvia Bulfone-Paus, Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Berlin

Folgende monoklonalen Antikörper (mAk) wurden benutzt:

Klon:	Spezifität:	Hersteller; Referenz:
10/78	NKR-P1A	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Kraus et al. 1996
3.4.1	CD8 $\beta$	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Torres-Nagel et al. 1992
3A5	p56 <sup>lck</sup>	Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY, USA; Omri et al. 1996
DB-1	IFN- $\gamma$	Pharmingen, San Diego, CA, USA; van der Meide et al. 1990
G28	CD8 $\alpha$	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Torres-Nagel et al. 1992
JJ319	CD28	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Tacke et al. 1995
OX8	CD8 $\alpha$	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Brideau et al. 1980
OX19	CD5	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Dallmann et al. 1984
OX33	CD45RA (nur B Zellen)	Serotec, Oxford, England; Woolett et al. 1985

OX34	CD2	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Williams et al. 1987
OX35	CD4	Kulturüberstand, eigene Herstellung; Jefferies et al. 1985
OX38	CD4	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Jefferies et al. 1985
OX81	IL-4	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Ramírez et al. 1996
R73	$\alpha/\beta$ TCR	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Hünig et al. 1989
Rib6/1	CD8 $\beta$	BMA Biomedicals, Augst, Schweiz; Mitteilung M. Lehmann, Universität Rostock
V65	$\gamma/\delta$ TCR	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Kühnlein et al. 1994
W3/13	CD43	Serotec, Oxford, England; Williams et al. 1977
W3/25	CD4	Pharmingen, San Diego, CA, USA; Webb et al. 1979
L180	Negativkontrolle	Insitut für Virologie und Immunbiologie; Hünig 1985

### 2.1.7 Oligonukleotide

Die Annealing-Temperaturen der PCR-Primer wurden nach der 2+4-Regel berechnet, d.h. für jedes Thymin oder Adenin wurden 2°C, für Guanin und Cytosin 4°C berechnet. Sie wurden von MWG Biotech, Ebersberg, bezogen.

Für Klonierung und Sequenzierung von DV-Segmenten:

Sense:

ADV7<sub>lang</sub>: 5'- ACT GTT CAT ATG AGA CAA G -3'

DV105<sub>lang</sub>: 5'- CAA ACC CAG ATT TAT TTT GGT -3'

### Antisense:

DC<sub>lang</sub>: 5'- AAC TTA ACA GTC AAG AGA AAA TT -3'

DC<sub>kurz</sub>: 5'- ATG AAG ACA GAT GGT TTG GC -3'

15mer Oligo dT-Primer für reverse Transkription      Promega, Heidelberg

### Für Spekatratyp-Analysen:

Genescan350-Längenmarker (TAMRA-markiert)      Perkin Elmer, Norwalk, Conneticut, USA

### Sense:

ADV7<sub>kurz</sub>:      5'- TCT GTA RTC TTC CAG AAA TC -3'

DV105<sub>kurz</sub>:      5'- AGT GAG GCT TGA AGA CAG -3'

BV8S2: 5'- AGA TGT CCC CGA TGG GTA CAA AGT CTC CAG ACC CA -3'

BV13:      5'- AGT CCC CCA GAT ATG CAA TC -3'

BV16 (Geschenk von Lutz Walter, Abteilung Immungenetik, Universität Göttingen):

5'- TTA GTT GAT AGG CAA CAC GGT -3'

BV10 (Geschenk von Lutz Walter, Abteilung Immungenetik, Universität Göttingen):

5'- ATC AAG TCT GTA GAG CCG GGT GA -3'

### Antisense:

DJ1 (5'-FAM markiert):

5'- CAG TCA CTT GGG TTC CT -3'

BC2 (5'-FAM markiert; Geschenk von Lutz Walter, Abteilung Immungenetik, Universität Göttingen):

5'- CTT GGG TGG AGT CAC CGT TTT C -3'

### Für quantitative und semiquantitative PCR:

pKF-Kontrollplasmid:      siehe Siegling et al. 1994

Primerpaare für  $\beta$ -Aktin, IL-4 und IFN- $\gamma$ :      siehe Siegling et al. 1994

CD8 $\alpha$       sense (*hinge*-Domäne):

5'- TCA GTG GAG GGA ATG GGA TTG G -3'

antisense (C2-Exon cytoplasmatische Domäne):

5'- TGA AGG TCT GGG CTT GAC AAG G -3'

CD8 $\beta$  sense (V-artige Domäne):

5'- AGC ACT TTG AGT TCC TGG CGT C -3'

antisense (membranproximale Domäne):

5'- GGG GTT GGA CAT TGT TTC TTC TTC -3'

### 2.1.8 Enzyme

Hot star Taq-Polymerase	Quiagen, Hilden
MuLV Reverse Transkriptase	MBI Fermentas, St Leon-Roth
RNase A	Promega, Heidelberg
Taq-Polymerase	MBI Fermentas, St Leon-Roth

### 2.1.9 Versuchstiere und Zelllinien

LEW-Ratten und C57BL/6-Mäuse wurden im Institut für Virologie und Immunbiologie gezüchtet. Die Zuchtpaare stammen ursprünglich von Charles River, Sulzfeld, Deutschland, oder von IFFA Credo; L' Arbresle, Frankreich. Für die gezeigten Experimente wurden 7 bis 15 Wochen alte Ratten, bzw. 8 Wochen alte Mäuse verwendet.

Die B Zellhybridome V65 (Kühnlein et al. 1994) und R73 (Hünig et al. 1989) stammen aus Fusionen von Maus-Milzzellen mit der X63-Ag8.653-Zelllinie. Sie produzieren Antikörper gegen den  $\gamma/\delta$  TCR (V65) und den  $\alpha/\beta$  TCR (R73) der Ratte.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zelluläre Techniken

##### 2.2.1.1 Gewinnung von Lymphozyten aus Milz, Lymphknoten und Thymus

LEW-Ratten wurden durch Begasung mit CO<sub>2</sub> und anschließendem Genickbruch getötet. Milz, inguinale, cervicale und mesenteriale Lymphknoten oder der Thymus wurden entnommen und in eiskaltem BSS durch feinmaschige Metallsiebe gerieben. Um Gewebereste absetzen zu lassen, wurden die Zellsuspensionen 10 Minuten auf Eis stehen gelassen; der Überstand wurde mit BSS/BSA gewaschen (5 Minuten bei 1600 Upm zentrifugiert).

##### 2.2.1.2 Erythrozytenlyse mit Ammoniumchlorid

Milzzellen wurden einer Erythrozytenlyse unterworfen, die auf der verminderten Fähigkeit von Erythrozyten zur Osmoregulation beruht. Dazu wurde ein Zellpellet in 1ml TAC-Lösung pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert, für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann mit BSS/BSA gewaschen.

##### 2.2.1.3 T Zellreinigung durch Nylonwollpassage

Zur Depletion von B-Zellen und Makrophagen kann man deren Adhärenz an Nylonfasern nutzen; T Zellen können also durch eine Nylonwollpassage angereichert werden (Mishell et al. 1980). Da die Adhärenz ein aktiver Vorgang ist, wurde die Reinigung bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Pro 5x10<sup>8</sup>

Zellen wurde eine autoklavierte 50ml Einmalspritze mit 3g locker gezupfter und dann leicht zusammengepreßter Nylonwolle benutzt. Die Spritze mit Silikonschlauch und Quetschhahn wurde luftblasenfrei mit dem dreifachen Säulenvolumen BSS gewaschen, dann wurden mit BSS/5% FCS für 45 Minuten bei 37°C unspezifische Proteinbindungsstellen abgesättigt. Die Zellen wurden in 2 bis 3ml warmem BSS/5% FCS aufgenommen, in die Säule einlaufen gelassen, mit 5ml BSS/5% FCS überschichtet und 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden daraufhin mit einem Säulenvolumen BSS/5% FCS (1ml pro Minute) eluiert, dann mit BSS/BSA gewaschen.

### 2.2.1.4 Reinigung und Aktivierung von T Zellen durch Panning

Die Panning genannte Methode beruht auf der Bindung von Zellen an eine Oberfläche mit immobilisiertem Antikörper gegen Membranproteine. Zellen können entweder depletiert (negatives Panning) oder angereichert werden (positives Panning; beide in Anlehnung an Wysocki et al. 1980).

Für einige Experimente wurden CD4 positive Zellen aus Zellpopulationen depletiert. Dazu wurden Bakterienpetrischalen (Durchmesser 145mm) bei 4°C über Nacht mit 200µg/ml Schaf anti Maus IgG-Antiserum (ShaMIg) in Beschichtungspuffer inkubiert, danach mit BSS dreimal gewaschen und eine Stunde bei 4°C mit sättigender Konzentration Maus anti CD4 mAk (OX35) beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit BSS wurden in 20ml BSS/BSA so viele Zellen auf die Platten gegeben, daß ca.  $5 \times 10^7$  CD4 positive Zellen enthalten waren. Nach 15 Minuten bei 4°C wurde die Platte etwas bewegt, nach weiteren 15 Minuten wurden die nicht adhärenen Zellen abgenommen.

Zur Aufreinigung von  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden Zellen zuerst 30 Minuten bei 4°C auf mit ShaMIg-beschichteten Petrischalen inkubiert, um unspezifisch adhärierende Zellen zu entfernen. Die nicht adhärenen Zellen wurden auf Petrischalen gegeben, die mit mAk anti  $\alpha/\beta$ , bzw.  $\gamma/\delta$  TCR beschichtet worden waren (wie für mAk gegen

CD4 beschrieben). Die Zellkonzentration wurde dazu so eingestellt, daß in 20ml BSS/BSA 2 bis  $5 \times 10^6$  der entsprechenden T Zellen enthalten waren. Nach 45 Minuten bei 4°C wurden nicht adhärenente Zellen vorsichtig mit kaltem BSS gewaschen, bis im Invertmikroskop nur noch adhärenente Zellen zu sehen waren.

Die Zellen wurden in 40ml RPMI kultiviert. Sie erhielten durch den immobilisierten mAk anti TCR Aktivierungssignale, und dem Medium wurden entweder 100U/ml IL-2 oder unterschiedliche Konzentrationen von mAk anti CD28 als Kostimulus zugegeben. In einigen Experimenten wurden stattdessen Antikörper gegen CD8 oder Isotypkontrollen und kein weiterer Kostimulus benutzt. Nach 20 oder 40 Stunden wurden die Zellen mit einem Zellschaber geerntet, gezählt, gewaschen und in RPMI mit 100U/ml IL-2 für 40 (manchmal 64) Stunden weiterkultiviert.

### 2.2.1.5 Aktivierung von T Zellen mit PMA und Ionomycin

Der Phorbolester PMA aktiviert eine große Zahl von zellulären Kinasen; gemeinsam mit dem Kalziumionophor Ionomycin kann PMA in bestimmten Konzentrationsbereichen zur Aktivierung von Zellen verwendet werden. Vor der Aktivierung von T Zellen mit PMA und Ionomycin wurden die CD4 positiven Zellen depletiert wie in 2.2.1.4 beschrieben. Die übrigen Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen/ml in RPMI kultiviert, das 5ng/ml PMA und 400ng/ml Ionomycin enthielt. Nach 20 Stunden wurden die Zellen gewaschen, gezählt und in RPMI mit 100U/ml IL-2 für 40 Stunden kultiviert.



### 2.2.1.6 Reinigung von CD8 $\alpha\beta$ und CD8 $\alpha\alpha$ positiven und CD8 negativen T Zellen

Um ruhende CD8 $\alpha\beta$  positive T Zellen zu aktivieren, wurden Milzzellen einer Erythrozytenlyse und der Nylonwollpassage unterzogen und CD4 positive Zellen durch Panning depletiert. Die übrigen Zellen wurden mit biotinyliertem mAk gegen CD8 $\beta$  gefärbt und die CD8 $\alpha\beta$  positive Population durch positive Anreicherung mit magnetisch aktivierter Zell-Sortierung (MACS) über magnetische Ziege-anti-Maus-IgG-Partikel gewonnen (dem Protokoll des Herstellers folgend). Die Reinheit der Population wurde nach Färbung mit Streptavidin-CyChrome und mAk gegen  $\alpha\beta$  oder  $\gamma\delta$  TCR im Durchflußzytometer überprüft und erreichte jeweils mindestens 95%. Diese Zellen wurden durch TCR-spezifisches positives Panning weiter gereinigt und aktiviert.

Für Spekatratyp-Analysen, RT-PCR und Zytotoxizitätstests wurden aktivierte CD8 negative, CD8 $\alpha\alpha$  oder CD8 $\alpha\beta$  positive  $\gamma\delta$  T Zellen gewonnen. Dazu wurden durch Panning aktivierte, danach in IL-2-Medium kultivierte Zellen mit mAk gegen CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$  gefärbt und durchflußzytometrisch in CD8 negative und CD8 positive oder in CD8 $\alpha\alpha$  und CD8 $\alpha\beta$  positive Zellen getrennt. Die Reinheit wurde durchflußzytometrisch überprüft und betrug mehr als 90% (bzw. 86% bei den CD8 negativen Zellen).

### 2.2.1.7 Lebendzellzahlbestimmung über Trypanblau-Ausschluß

Trypanblau kann intakte Zellmembranen nicht penetrieren; ist jedoch die Membran zerstört, färbt es das Zytoplasma der entsprechenden Zelle an. Lebendzellzahlen wurden in der Neubauer-Zählkammer anhand des Ausschlusses von Trypanblau bestimmt.

### 2.2.1.8 Zellanalyse im Durchflußzytometer

Für Analysen im Durchflußzytometer (FACS) wurden 0,5 bis  $2 \times 10^5$  Zellen bei 4°C in 100µl FACS-Puffer aufgenommen und unspezifische Antikörperbindungsstellen durch 10 Minuten Inkubation mit 10µg/ml Maus IgG abgesättigt. Daraufhin wurde ein direkt PE-konjugierter mAk in sättigender Konzentration zugegeben, nach 15 Minuten gewaschen, ein biotinylierter mAk zugegeben und wieder 15 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Waschen wurden ein FITC-konjugierter mAk und CyChrome konjugiertes Streptavidin zugegeben, 15 Minuten inkubiert, gewaschen und im Durchflußzytometer gemessen. Parallel wurden Färbungen mit Isotyp-Kontrollantikörpern durchgeführt und anhand der unspezifischen Färbung die jeweils tatsächlich positiven Prozentsätze berechnet. Lebendzellen wurden über Größe und Granularität definiert. Die Analyse erfolgte mit CellQuest Software.

### 2.2.1.9 Intrazelluläre Färbung

Für intrazelluläre Zytokinfärbungen wurden gereinigte, aktivierte  $\gamma\delta$  T Zellen vier Stunden mit PMA (5ng/ml) und Ionomycin (400ng/ml) restimuliert und für die letzten beiden Stunden 10µg/ml Brefeldin A zugegeben. Zunächst wurden die Zellen mit einem biotin-konjugiertem mAk und einem direkt farbstoffgekoppelten mAk 15 Minuten auf der Zelloberfläche gefärbt, wie unter 2.2.1.8 beschrieben. Nach Inkubation mit einem Steptavidin-CyChrome-Konjugat wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 2% Formaldehyd-Lösung für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen zum Waschen 10 Minuten mit maximal 1200 Upm zentrifugiert. Zunächst wurden sie einmal mit FACS-Puffer gewaschen und in 1ml Permeabilisierungspuffer aufgenommen. Nach 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen abzentrifugiert, mit 10µg/ml Maus IgG in Permeabilisierungspuffer für 20 Minuten inkubiert, danach wurde direkt farbstoffkonjugierter Zytokin-spezifischer mAk oder eine Isotypkontrolle für 30 Minuten zugegeben, dann mit Permeabilisierungspuffer gewaschen. Als

Spezifitätskontrolle wurde die Färbung von Fluorochrom-konjugiertem Zytokinspezifischem mAk geblockt, indem vorher anstatt des Maus IgG 10µg/ml des nicht farbstoffkonjugierten zytokinspezifischen mAk zugegeben wurde. Als weitere Kontrolle wurden nicht permeabilisierte Zellen gefärbt, um sicherzugehen, daß nicht Zytokine auf der Zelloberfläche gefärbt wurden. Nach der intrazellulären Zytokinfärbung wurden die Zellen einmal mit Permeabilisierungspuffer und einmal mit FACS-Puffer gewaschen und dann im Durchflußzytometer analysiert.

### 2.2.1.10 Bestimmung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität von gereinigten, aktivierten  $\gamma/\delta$  T Zellen wurde über die Freisetzung von radioaktivem  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  aus lysierten Zielzellen bestimmt. Als Zielzellen dienten die Hybridomzellen V65, die Antikörper gegen den  $\gamma/\delta$  TCR produzieren („*redirected lysis*“), und R73 als Negativkontrolle. FACS-Analysen

zeigten in keinem Experiment eine Kontamination mit  $\alpha/\beta$  T Zellen.

Je  $10^6$  Zielzellen wurden für eine Stunde bei 37°C mit 100µCi  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  in RPMI mit 20mM Hepes-Puffer (pH7,4) inkubiert und dreimal mit BSS/BSA gewaschen. Je 5000 Zielzellen wurden als Triplikate in 96-Napf-V-Boden-Platten in 200µl RPMI mit 20U/ml IL-2 in verschiedenen Verhältnissen mit Effektorzellen gemischt. Nach 4 Stunden wurden 100µl Kulturüberstand abgenommen und die Radioaktivität im  $\gamma$ -Zähler gemessen. Nöpfe mit Zielzellen in Medium ohne Effektoren und Zielzellen in 1% Triton X100 dienten zur Bestimmung der spontanen, bzw. der maximalen Freisetzung. Aus diesen Werten wurde nach folgender Formel die spezifische Lyse berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse} = \frac{\text{Meßwert [cpm]} - \text{Spontanwert [cpm]}}{\text{Maximalwert [cpm]} - \text{Spontanwert [cpm]}} \times 100$$

### 2.2.2 Molekulare Techniken

#### 2.2.2.1 Gewinnung von RNA und gDNA

Zur Gewinnung von RNA wurden meist RNeasy-Säulen laut Protokoll des Herstellers benutzt. Wurde aus denselben Zellen sowohl RNA, als auch gDNA isoliert, mußte Trizol-Reagenz nach den Angaben des Herstellers benutzt werden.

#### 2.2.2.2 Reverse Transkription von RNA

Zur Synthese von cDNA wurde 1µg RNA in einem 40µl-Ansatz von MuLV Reverser Transkriptase in Puffer des Herstellers mit 2,5µM DTT, 40U RNAsin und 0,2ng 15mer Oligo dT-Primer revers transkribiert: Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion für eine Stunde bei 37°C durchgeführt, dann durch fünfminütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt.

#### 2.2.2.3 PCR

Die Reaktionen der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden in Ansätzen von 25µl durchgeführt. Dem PCR-Puffer waren jeweils 100µM dNTPs, je 0,4µM von sense und antisense Primern und Taq-Polymerase nach Angabe des Herstellers beigefügt; die Ansätze wurden mit 30µl Paraffinöl überschichtet. Zur Denaturierung wurden die Ansätze vier Minuten bei 94°C (für HotStar Taq-Polymerase: 15 Minuten 95°C) inkubiert. Die nachfolgende Amplifikation bestand aus drei Schritten: Die Denaturierung für eine Minute (gDNA: eine Minute 30 Sekunden) bei 94°C, die Hybridisierung für eine Minute bei einer Primer-spezifischen Temperatur und die DNA-Verlängerung für eine Minute bei 72°C. Diese Abfolge wurde 20 bis 35 mal

wiederholt. Am Ende wurde mit einer Inkubation für 10 Minuten bei 72°C sichergestellt, daß alle DNA-Stränge zu Ende synthetisiert wurden.

PCR-Produkt wurde mit 1/5 Volumen Gelladepuffer gemischt, auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Etidiumbromid sichtbar gemacht; 2% Agarose wurde gewählt, wenn das PCR-Produkt kürzer als 200bp war, ansonsten 1%.

### 2.2.2.3.1 Kompetitive PCR

Die synthetisierte cDNA wurde mit quantitativer PCR auf dieselbe cDNA-Konzentration für  $\beta$ -Aktin eingestellt; dazu wurden Primer und das Plasmid pKF benutzt, die von Siegling et al. 1994 beschrieben sind. pKF besitzt Bindungsstellen für Primerkombinationen, die für  $\beta$ -Aktin und einige Zytokine der Ratte spezifisch sind; die Länge des PCR-Produkt der Plasmid-DNA unterscheidet sich um 50 bis 100bp vom PCR-Produkt aus cDNA. Zur Quantifizierung der  $\beta$ -Aktin-Transkripte wurden gleiche Volumina cDNA-Lösung zusammen mit jeweils 2 $\mu$ l aus einer 1:10-Verdünnungsreihe (schließlich aus einer 1:2-Verdünnungsreihe) des Plasmids in PCR-Ansätzen mit  $\beta$ -Aktin spezifischen Primern amplifiziert. Die Konzentration der cDNA wurde mit der Plasmidkonzentration gleichgesetzt, bei der im selben Ansatz die im Agarose-Gel entstandenen Banden für cDNA und Plasmid gleich stark waren.

In einigen der so auf die gleiche  $\beta$ -Aktin-Konzentration eingestellten cDNA-Ansätze wurde in analoger Weise mit IFN- $\gamma$ - und IL-4-spezifischen Primern die Konzentration der cDNA für diese Zytokine bestimmt.

### 2.2.2.3.2 Semiquantitative PCR

Weil für ADV7, DV105, CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$  keine kompetitive PCR durchgeführt werden konnte, wurde die cDNA-Konzentration dieser Proteine durch semiquantitative PCR mit verschiedenen Zyklenzahlen bestimmt. Dazu wurden die zu vergleichenden cDNAs wie oben beschrieben auf dieselbe  $\beta$ -Aktin-Konzentration eingestellt, dann wurden parallel Ansätze mit 20, 25, 30 und 35, bzw. mit 20, 23, 26, 29 und 32 Zyklen amplifiziert. Mit je weniger Zyklen eine Bande im nachfolgenden Agarosegel sichtbar wurde, desto höher war die Konzentration der entsprechenden cDNA.

### 2.2.2.4 Nomenklatur der DV-Segmente:

Für die V-Segmente der TCR $\delta$ -Kette sind unterschiedliche Nomenklaturen gebräuchlich. In dieser Arbeit wird die von Arden et al. 1995 für die Maus eingeführte Nomenklatur benutzt und auf die Ratte übertragen. ADV7 und DV105 nach Arden wurden früher V $\delta$ 6 und V $\delta$ 5 genannt.

### 2.2.2.5 Klonierung von PCR-Produkt

Mit ADV7- und DV105-spezifischen Primern im Bereich des CDR1 des jeweiligen DV-Segments und einem Gegenprimer nahe dem 3'-Ende von DC wurden rearrangierte TCR $\delta$ -Ketten durch PCR amplifiziert und direkt kloniert. Für die PCR wurde cDNA von aktivierten  $\gamma/\delta$  T Zellpopulationen verwendet; das PCR-Produkt wurde mit dem HTP TOPO TA Cloning Kit nach den Angaben des Herstellers kloniert.

### 2.2.2.6 Sequenzierung

Bakterienklone wurden in 1,5ml Kulturen über Nacht wachsen gelassen, pelletiert (2 Minuten 13000 Upm) und Plasmide folgendermaßen isoliert: Das Pellet wurde in 150µl Lösung 1 aufgenommen, nacheinander je 150µl Lösung 2 und Lösung 3 damit gemischt. Nach zehnmütiger Zentrifugation (13000Upm) wurde der Überstand mit 900µl Lösung 4 und 50µl Diatomeenerde-Lösung gemischt, 5 Minuten inkubiert und auf eine an Vakuum angeschlossene Wizard Minisäule gegeben. Die Silikatpartikel der Diatomeenerde wurden mit 3ml Lösung 5 gewaschen und durch kurze Zentrifugation von Ethanolresten befreit; danach wurde die Plasmid DNA mit 50µl aqua dest. eluiert. In den Sequenzierungsreaktionen wurde jeweils Plasmidlösung mit 500ng DNA eingesetzt. Zur Sequenzierung wurde das Big Dye Kit und die M13-Primer des TOPO TA Cloning Kit oder selbst entworfene Primer im 5'-Bereich von DC (DC<sub>kurz</sub>) verwendet. Zur Sequenzierung von PCR-Produkt wurden PCR-Ansätze mit 100µl eingesetzt, freie Nukleotide nach der PCR mit Hilfe des QIAquick-spin Kit entfernt, bevor die Sequenzreaktion mit einem der PCR-Primer und dem Big Dye Kit durchgeführt wurde.

Ungebundene Farbstoffmoleküle wurden durch eine Natriumazetatfällung entfernt (10µl Sequenzierungsansatz + 90µl H<sub>2</sub>O, mischen, + 10µl 3M Natriumazetat pH5,2, mischen, + 250µl Ethanol, mischen, 20 Minuten bei 14000 Upm zentrifugieren, Überstand verwerfen und Ethanol abtrocknen lassen). Das Präzipitat wurde in 15µl TSR aufgenommen und im automatischen Sequenzierer analysiert.

### 2.2.2.7 Spektratyp-Analysen

Die CDR3 $\delta$ -Längenspektren polyklonaler  $\gamma/\delta$  T Zellpopulationen wurden durch Spektratyp-Analysen von cDNA oder gDNA ermittelt. Diese Analysen beruhen auf PCR mit fluoreszenzmarkierten Oligonukleotiden (Pannetier et al. 1993); das

Spektrum unterschiedlich langer PCR-Produkte wurde mit einem automatischen Sequenzierer analysiert.

Nahe am 3'-Ende des jeweiligen DV-Segments und für die Gegenrichtung im DJ1-Segment (Jd1) wurden Primer für die PCR gewählt. Das DJ1-Oligonukleotid war am 5'-Ende mit Carboxyfluorescein (FAM) konjugiert. In den DV-Segmenten wurden die Primer so ausgesucht, daß das entstehende PCR-Produkt nicht kürzer als 80 und nicht viel länger als 150bp würde. Für die CDR3 $\beta$ -Längen wurden für verschiedene BV-Segmente spezifische Oligonukleotide und ein FAM-markierter BC2-Primer benutzt.

Nach einer PCR mit 35 Zyklen wurde 1 $\mu$ l des Produkts im 2%igen Agarosegel aufgetrennt, um anhand der Stärke der Bande über das für die Spekatyp-Analyse benutzte Volumen zu entscheiden. Für die Analyse wurden x  $\mu$ l PCR-Produkt zusammen mit 0,5 $\mu$ l Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA)-markiertem Genescan350-Längenmarker und (10-x) $\mu$ l aqua dest. in 20 $\mu$ l Formamid gegeben, 10 Minuten bei 96°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und im automatischen Sequenzierer analysiert. Mit Genescan 2.1-Software wurden verschiedene Spektren anhand des Genescan350-Markers übereinandergelegt. Durch Spekatyp-Analysen von sequenzierten (A)DV-Klonen wurden die exakten CDR3 $\delta$ -Längen bestimmt; für die BV8S2-Längen wurde dazu cDNA des Hybridoms 35/1 analysiert, dessen Sequenz bekannt ist (Asmuß 1999). Die CDR3-Länge in Aminosäuren wurde wie bei Rock et al. 1994 berechnet: Sie ist vier Aminosäuren kürzer als der Abstand zwischen dem Glycin-X-Glycin-Motiv im J-Segment (X kann jede Aminosäure sein) und dem nächsten im V-Segment gelegenen Cystein.

### 2.2.2.8 Immunpräzipitation

Um Membranproteine zu präzipitieren, wurden 1 bis 5x10<sup>6</sup> T Zellblasten für 30 Minuten auf Eis mit mAk gegen das Protein in BSS/BSA inkubiert, gewaschen und das Pellet in 1ml 1% Brij-Lysepuffer lysiert. Nach 30 Minuten auf Eis wurden die



Proben mit 15000g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände rotierten zur Präzipitation bei 4°C in 1,5ml Reaktionsgefäßen entweder zusammen mit 150µl 10% (v/v) Protein A-Sepharose-Kügelchen, die für mehr als eine Stunde bei 4°C in PBS mit Kaninchen anti Maus IgG-Serum inkubiert worden waren, oder zusammen mit 100µl 10% (v/v) Protein G-Sepharose-Kügelchen. Für die Präzipitation von p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> wurden Protein A-Sepharose-Kügelchen benutzt, die mit Kaninchenserum anti p56<sup>lck</sup>, bzw. anti p59<sup>fyn</sup> beladen worden waren. Nach 2 Stunden (oder einer Nacht) Präzipitation wurden die Sepharose-Kügelchen abzentrifugiert (nicht schneller als 5000Upm) und gewaschen.

### 2.2.2.9 Immunblot

Für Immunblots wurden die Präzipitate dreimal mit 1% Brij-Lysepuffer gewaschen, in 100µl reduzierendem oder nicht-reduzierendem 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und für fünf Minuten auf 95°C erhitzt. Je 20µl wurden neben einem Proteingrößenstandard auf reduzierenden oder nicht reduzierenden 10% Acrylamid SDS-PAGE-Minigelen getrennt. Die Proteine wurden elektropheretisch auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, die Banden des Proteingrößenstandards mit einer Ponceau S Rot-Färbung sichtbar gemacht und die Membran mit 5% Milchpuver in PBS/0,2% Tween 20 abgeblockt. Nach einer Stunde Inkubation mit Primärantikörper gegen CD8α (OX8) wurde mehrmals gewaschen und mit an Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Ziegenerum gegen Maus-Immunglobulin eine weitere Stunde inkubiert. Die CD8-Banden wurden mit Hilfe des ECL-Systems sichtbar gemacht.

Als Beladungskontrolle wurde nach Behandlung mit 1% NaN<sub>3</sub> in PBS/0,2% Tween 20 mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Mausserum gegen Kaninchen-Immunglobuline die Menge des präzipitierenden Antiserums gegen p56<sup>lck</sup> mit dem ECL-System bestimmt.

### 2.2.2.10 Detektion von Kinase-Aktivität

Für die Detektion von Kinase-Aktivität („*in vitro kinase assay*“) wurden Immunpräzipitate einmal mit 1% Brij-Lysepuffer und zweimal mit Assaypuffer gewaschen. Die Sepharosekügelchen wurden mit einer Hamilton-Spritze getrocknet, danach in 30µl Radioaktiv-Assaypuffer suspendiert. Nach 20 Minuten bei 30°C wurden 30µl 2x SDS-Probenpuffer zugegeben, gemischt und für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Wie für den Immunblot beschrieben, wurden 20µl der Proben mit reduzierenden 10% Acrylamid SDS-PAGE-Minigelen aufgetrennt, um dann getrocknet und autoradiographisch ausgewertet zu werden.

### 3 Ergebnisse

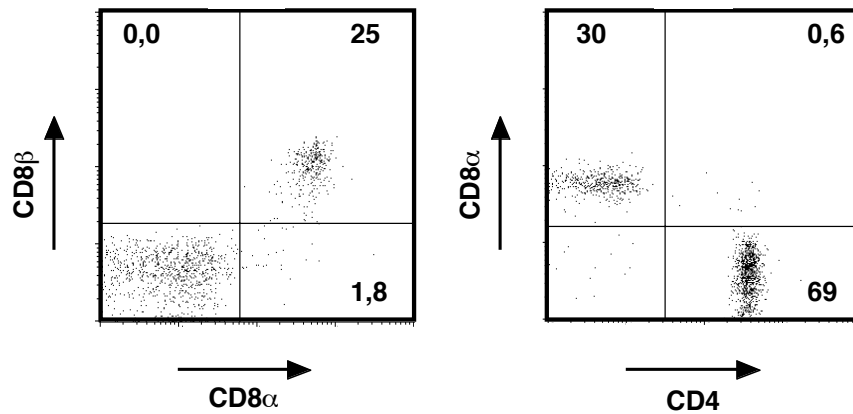
Die meisten peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte exprimieren das CD8 $\alpha\beta$  Heterodimer (Abschnitt 3.1), das bei  $\alpha/\beta$  T Zellen als Korezeptor der MHC I restringierten Antigenerkennung dient. Zur Beantwortung der Frage, ob auch CD8 $\alpha\beta$  positive  $\gamma/\delta$  T Zellen eine analoge MHC I Restriktion aufweisen, wurde die CD8-Signaltransduktion (Abschnitt 3.2) und die Antigenerkennung (Abschnitt 3.3) CD8 $\alpha\beta$  positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen analysiert. Besonderheiten bei der Regulation der CD8 $\beta$ -Expression wurden beleuchtet (Abschnitt 3.4) und die CD8 $\alpha\alpha$  und CD8 $\alpha\beta$  positiven Subpopulationen funktionell charakterisiert (Abschnitt 3.5).

#### 3.1 Korezeptor-Expression auf $\alpha/\beta$ und $\gamma/\delta$ T Zellen der Milz

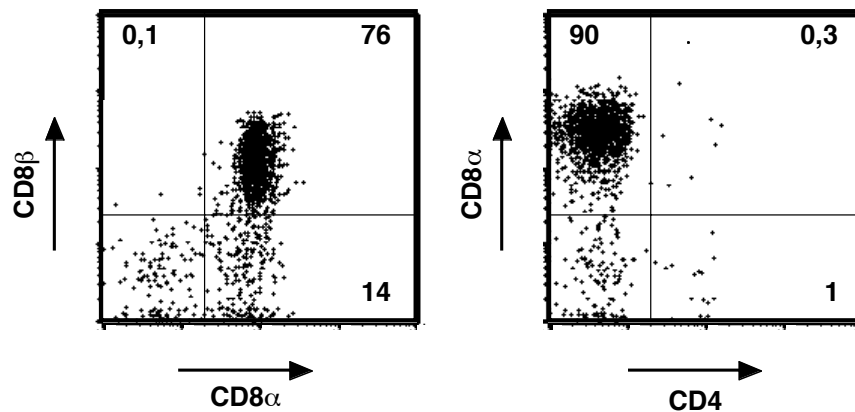
Die  $\alpha/\beta$  T Zellen in der Milz der Ratte zeigen die gleiche Expression von Korezeptoren, wie sie bei der Maus und beim Menschen bekannt ist. Sie exprimieren entweder das CD8 $\alpha\beta$  Heterodimer oder sind CD4 positiv (Abb. 1a). Neben den  $\alpha/\beta$  T Zellen findet man in der Rattenmilz wie bei der Maus und beim Menschen ein bis drei Prozent  $\gamma/\delta$  T Zellen. Während dort bei Maus und Mensch nur bis zu 10% der  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8 exprimieren, tun dies die meisten  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte (Abb. 1b); CD4 ist in allen drei Spezies nur auf extrem wenigen  $\gamma/\delta$  T Zellen exprimiert.

Um zu bestimmen, wie viele Zellen den jeweiligen Korezeptor tragen, wurden frisch isolierte Milzzellen von erwachsenen LEW-Ratten mit Dreifachfärbungen analysiert. In jeder Färbung wurde sowohl mAk anti  $\alpha/\beta$  TCR, als auch anti  $\gamma/\delta$  TCR eingesetzt, um die  $\gamma/\delta$  T Zellen von unspezifischer Färbung abgrenzen zu können. Gegen die Korezeptoren wurde in der übrigbleibenden Fluoreszenz gefärbt, die Größe der Subpopulationen schließlich berechnet. Die  $\alpha/\beta$  T Zellen waren zu  $29,0 \pm 2,3\%$  CD8 $\alpha\beta$  positiv, nur  $1,0 \pm 0,8\%$  exprimierte allein CD8 $\alpha\alpha$ ; auf  $68,6 \pm 3,3\%$  fand sich CD4, während es fast keine CD4 und CD8 doppelt negativen Zellen gab (Tabelle 1). Die  $\gamma/\delta$  T Zellen dagegen exprimierten zu  $76,5 \pm 4,0\%$  CD8 $\alpha\beta$  und zu  $12,5 \pm 3,3\%$  CD8 $\alpha\alpha$ .  $9,9 \pm 1,9\%$  waren doppelt negativ und nur  $1,1 \pm 0,4\%$  CD4 positiv (Tabelle 1). In diesen

## a $\alpha/\beta$ T Zellen



## b $\gamma/\delta$ T Zellen



**Abbildung 1: Korezeptorexpression von  $\alpha/\beta$  (a) und  $\gamma/\delta$  T Zellen (b) der Rattenmilz.** Milz-T Zellen wurden durch TAC-Lyse von Erythrozyten und Nylonwollpassage gereinigt und mit Dreifarbenanalysen im Durchflußzytometer charakterisiert. Die Färbungen wurden mit mAk gegen (a) den  $\alpha/\beta$  TCR (R73) oder (b) den  $\gamma/\delta$  TCR (V65) und gegen CD8 $\alpha$  (OX8), CD8 $\beta$  (3.4.1) oder CD4 (W3/25) durchgeführt. Gezeigt sind jeweils nur Zellen, die den entsprechenden TCR exprimieren. Zahlen geben den Prozentsatz der Zellen mit dem jeweiligen Membranrezeptor an.

und weiteren FACS Färbungen von 3 bis 29 Wochen alten Ratten fiel mit zunehmendem Alter keine Veränderung der Korezeptor-Expression auf (Daten nicht gezeigt).

Experiment Nr.	Prozent der $\alpha/\beta$ T Zellen				Prozent der $\gamma/\delta$ T Zellen			
	CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>-</sup> / CD4 <sup>-</sup>	CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>-</sup> / CD4 <sup>-</sup>
V170	33	0	66	1	74	16	1	9
V178	28	0	73	0	76	11	2	11
V184	27	1	72	0	82	8	1	9
V207	31	1	68	0	77	10	1	12
V231	30	2	68	0	76	12	1	11
V234	26	1	63	0	70	18	1	11
V241	28	1	71	0	82	11	1	6
V251	29	2	68	0	75	14	1	10
Mittelwert $\pm$ Standard- abweichung	29,0 $\pm$ 2,3	1,0 $\pm$ 0,8	68,6 $\pm$ 3,3	0,1 $\pm$ 0,4	76,5 $\pm$ 4,0	12,5 $\pm$ 3,3	1,1 $\pm$ 0,4	9,9 $\pm$ 1,9

**Tabelle 1: Korezeptor-Expression auf T Zellen der Rattenmilz.** Frisch isolierte LEW Ratten-Milzzellen wurden mit mAb gegen den  $\alpha/\beta$  TCR (R73-Biotin / CyChrome), den  $\gamma/\delta$  TCR (V65-PE) und ein weiteres Antigen (OX8- / 3.4.1- / W3/25-FITC) gefärbt und zusammen mit Isotyp-Kontrollfärbungen im Durchflußzytometer analysiert. Der prozentuale Anteil an der jeweiligen T Zellpopulation wurde so für die CD4 positive Subpopulation direkt bestimmt; die Anteile der CD8 $\alpha\alpha$  und CD8 $\alpha\beta$  positiven und der CD4/CD8 doppelt negativen Populationen wurden anhand zweier Färbungen berechnet. Für die Analyse wurden Zellen berücksichtigt, die mit nur einem der beiden TCR-spezifischen Antikörper angefärbt waren. In der letzten Zeile sind die Mittelwerte und Stichproben-Standardabweichungen angegeben.

### 3.2 CD8-vermittelte Signale bei $\gamma/\delta$ T Zellen

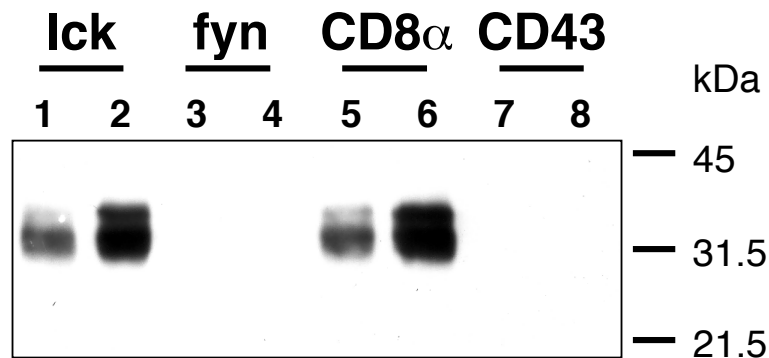
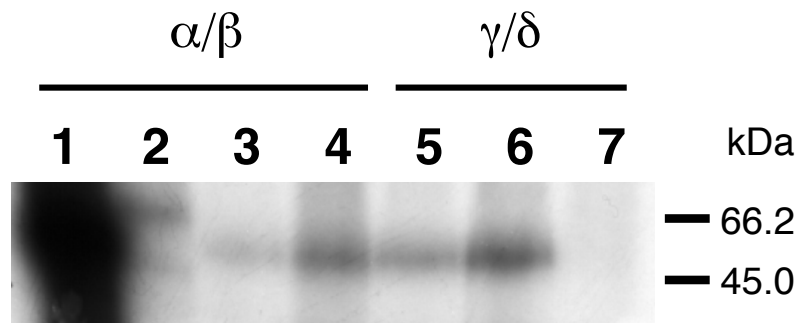
Um zu verstehen, ob CD8 als Korezeptor des  $\gamma/\delta$  TCR fungieren kann, wurde zunächst untersucht, ob CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen Signale vermitteln kann und ob hierbei grundlegende Unterschiede zu  $\alpha/\beta$  T Zellen bestehen. Zuerst wurde die Assoziation von CD8 mit der Protein-Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> geprüft (Abschnitt 3.2.1).

Desweiteren wurden CD8-vermittelte Signale für das Überleben von intakten  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen verglichen (Abschnitt 3.2.2).

### 3.2.1 CD8-assoziierte p56<sup>lck</sup>-Kinaseaktivität

Da bei  $\alpha/\beta$  T Zellen CD8 Signale durch die mit der CD8 $\alpha$ -Kette assoziierte Protein-Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> vermittelt werden, wurde untersucht, ob auch bei  $\gamma/\delta$  T Zellen die Aktivität dieser Kinase mit CD8 assoziiert ist. Dazu wurden  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen durch Adhäsion an Kulturschalen mit immobilisiertem mAk anti den jeweiligen TCR gereinigt, für einen Tag in Gegenwart von IL-2 aktiviert und für weitere zwei Tage mit IL-2 kultiviert. Die zu jeweils über 98% reinen T Zellblasten wurden mit Brij 96-Puffer lysiert und die Kinasen p56<sup>lck</sup> und p59<sup>fyn</sup> präzipitiert, außerdem CD8 $\alpha$  als Positiv- und CD43 als Negativkontrolle. Die Präzipitate wurden mit 10% Acrylamid SDS PAGE Gelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen transferiert und CD8 $\alpha$  wurde im Immunblot nachgewiesen. Abbildung 2a zeigt ein für zwei Experimente repräsentatives Ergebnis: Zusammen mit p56<sup>lck</sup> wurde bei den  $\gamma/\delta$  genau wie bei den  $\alpha/\beta$  T Zellen CD8 $\alpha$  präzipitiert. Mit p56<sup>lck</sup> spezifischem Antikörper wurde fast so viel CD8 $\alpha$  präzipitiert wie mit CD8 $\alpha$ -spezifischem. Dagegen wurde mit p59<sup>fyn</sup>- und mit CD43-spezifischem Antikörper kein assoziiertes CD8 $\alpha$  gefunden.

Um die Aktivität der mit CD8 $\alpha$  assoziierten Kinase p56<sup>lck</sup> nachzuweisen, wurden auf die gerade beschriebene Weise T Zellblasten erzeugt und lysiert. Aus den Lysaten wurde entweder direkt p56<sup>lck</sup> oder CD8 $\alpha$  präzipitiert und mit dem Präzipitat ein *in vitro* Kinase-Assay durchgeführt. Im reduzierenden 10% Acrylamid SDS PAGE Gel zeigten radioaktive Banden phosphorylierte Proteine. Wie man in Abbildung 2b sieht, wurde sowohl bei  $\alpha/\beta$ -, als auch bei  $\gamma/\delta$  Blasten mit mAk anti CD8 $\alpha$  Kinaseaktivität präzipitiert, und ein phosphoryliertes Protein komigrierte bei beiden T Zellpopulationen mit autophosphoryliertem p56<sup>lck</sup>. Mit einer Isotypkontrolle und mit CD43-spezifischem Antikörper wurde dagegen keine entsprechende Bande gefunden (Abbildung 2b).

**a****b**

**Abbildung 2a: Ko-Immünpräzipitation von CD8 mit p56<sup>lck</sup>.** Präzipitate von  $\alpha/\beta$  T Zellen (Spuren 1, 3, 5, 7) und  $\gamma/\delta$  T Zellen (Spuren 2, 4, 6, 8) mit Antikörpern gegen p56<sup>lck</sup> (Spuren 1, 2), gegen p59<sup>fyn</sup> (Spuren 2, 3), gegen CD8 $\alpha$  als Positivkontrolle (G28; Spuren 4, 5) und gegen CD43 als Negativkontrolle (W3/13; Spuren 7, 8) wurden mit reduzierenden SDS-PAGE-Gelen elektrophoretisch getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Auf der Membran wurde CD8 $\alpha$  mit einem Immunblot (OX8) detektiert.

**2b: *In vitro* Detektion von CD8-assoziiierter Kinase-Aktivität.** Präzipitate von  $\alpha/\beta$  (Spuren 1 bis 4) und  $\gamma/\delta$  T Zellen (Spuren 5 bis 7) wurden einer *In vitro*-Kinase-Detektion unterzogen. Autoradiographisch geschwärzte Banden zeigen Autophosphorylierung von p56<sup>lck</sup>. Spur 1 enthält als Positivkontrolle ein Präzipitat mit p56<sup>lck</sup>-spezifischem Antiserum auf Protein A-Partikeln, Spur 2 zeigt die Negativkontrolle mit Maus-IgG auf Protein A-Partikeln. Die übrigen Präzipitate stammen von mAk anti CD8 $\alpha$  (G28; Spuren 2 bis 6) oder mAk anti CD43 (W3/13; Spuren 7, 8), beide auf Protein G-Partikeln. In den Spuren 3 und 5 wurden Lysate von  $2 \times 10^6$  Zellen verwendet, in allen übrigen Spuren von  $1 \times 10^7$ . Rechts sind die Banden des parallel verwendeten Protein-Molekulargewichtsstandards dargestellt.

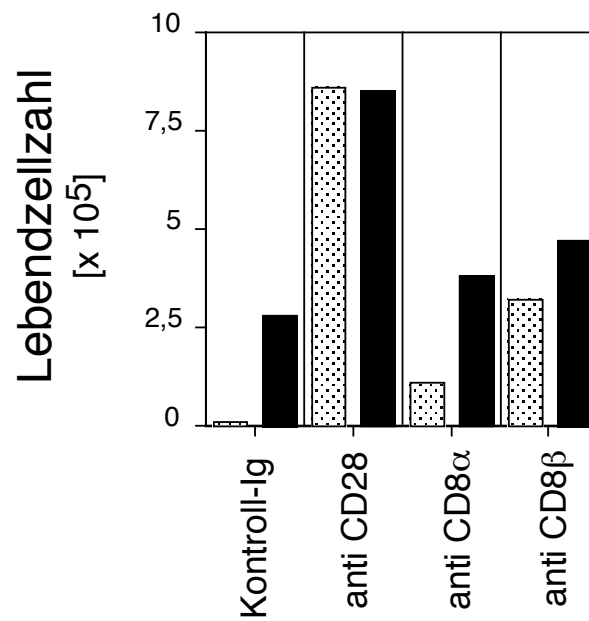
Folglich ist CD8 auf  $\alpha/\beta$  wie auf  $\gamma/\delta$  T Zellen mit funktioneller Protein-Tyrosinkinase p56<sup>lck</sup> assoziiert.

### 3.2.2 CD8-vermittelte Signale bei intakten $\gamma/\delta$ T Zellen

Schon die Assoziation von CD8 mit funktioneller Kinase p56<sup>lck</sup> weist auf die Fähigkeit von CD8 hin, kostimulatorische Signale zu vermitteln; diese Fähigkeit wurde durch zusätzliche Experimente mit lebenden Zellen bestätigt. Die dazu durchgeführten Experimente nutzen aus, daß die Stimulation von ruhenden T Zellen alleine über den TCR normalerweise Apoptose auslöst, ein extrem starkes TCR-Signal aber auch ohne kostimulatorisches Signal zu Aktivierung und Proliferation führen kann. Frisch isolierte T Zellen wurden auf Kulturschalen mit immobilisiertem mAk anti  $\alpha/\beta$  oder anti  $\gamma/\delta$  TCR gegeben, so daß gleich viele Zellen jeder Subpopulation an den jeweiligen Schalen adhärirten. Nicht gebundene Zellen wurden weggespült und die T Zellen in Gegenwart von löslichem mAk anti CD8 $\alpha$ , anti CD8 $\beta$  mAk, kostimulatorischem anti CD28 oder irrelevantem Kontrollantikörper kultiviert. Nach 40 Stunden wurde die Lebendzellzahl über Trypanblau-Ausschluß bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren in Gegenwart des irrelevanten Antikörpers fast alle  $\gamma/\delta$  und die meisten  $\alpha/\beta$  T Zellen gestorben, in Gegenwart des mAk anti CD28 dagegen hatten die Zellen überlebt (Abbildung 3) und begannen zu proliferieren (nicht gezeigt). In Gegenwart von anti CD8 $\alpha$  oder anti CD8 $\beta$  mAk überlebten sowohl bei den  $\alpha/\beta$ , als auch bei den  $\gamma/\delta$  T Zellen deutlich mehr Zellen als in Gegenwart des Isotyp-Kontrollantikörpers (Abbildung 3). Im Lauf der nächsten Tage starben aber auch diese Zellen (nicht gezeigt).

Bei den  $\alpha/\beta$  wie bei den  $\gamma/\delta$  T Zellen haben die Antikörper gegen CD8 also zu Signalen geführt, die zwar das kostimulatorische Signal nicht ersetzen, aber doch das Überleben der Zellen verlängern konnten.





**Abbildung 3: Die Gegenwart von CD8 spezifischem mAk erhöht die Zahl überlebender Zellen nach 40 Stunden anti TCR Stimulation.** Milzzellen wurden durch TAC-Lyse und Nylonwollpassage gereinigt und  $\alpha/\beta$  (schwarze Säulen), bzw.  $\gamma/\delta$  (helle Säulen) T Zellen durch Bindung an immobilisierten mAk gegen den jeweiligen TCR gereinigt. Die Zellen wurden für 40 Stunden in Medium stimuliert, dem Isotyp-Kontrollantikörper (OX33) oder mAk anti CD28 (JJ319) als Positivkontrolle zugesetzt wurde. Daneben wurden Stimulationen mit mAk anti CD8 $\alpha$  (OX8) und anti CD8 $\beta$  (3.4.1) durchgeführt. Nach 40 Stunden wurden die überlebenden Zellen gezählt.

### 3.3 Analyse der CDR3-Längen der TCR $\delta$ -Ketten als Kriterium für klassische MHC-Restriktion

Da CD8 auch auf  $\gamma/\delta$  T Zellen mit funktioneller Kinase p56<sup>lck</sup> assoziiert ist und wie bei  $\alpha/\beta$  T Zellen Kosignale für die T Zellaktivierung liefern könnte, stellt sich mit Nachdruck die Frage, ob CD8 positive  $\gamma/\delta$  T Zellen Antigen MHC I-restringiert erkennen. Mangels bekannter Antigene wurde mit der Bestimmung des CDR3-Längenspektrums der TCR $\delta$ -Ketten ein indirekter Weg gewählt, um die Frage der MHC-Restriktion von  $\gamma/\delta$  T Zellen zu klären. Zunächst wurden die zuvor unbekannt Sequenzen von DV-Segmenten der Rattenmilz bestimmt, auf ein Motiv hin analysiert, daß möglicherweise für die Korezeptorinteraktion wichtig ist, und ihre Häufigkeit in verschiedenen CD8-Subpopulationen ermittelt (Abschnitt 3.3.1). Daraufhin wurden die CDR3-Längen für die TCR $\beta$  und TCR $\delta$ -Ketten verglichen (Abschnitt 3.3.2) und die CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven sowie die CD8 negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen getrennt analysiert (Abschnitt 3.3.3). Zur Validierung der eingesetzten Methode wurden die CDR3 $\delta$ -Längen der Maus bestimmt und mit der Ratte verglichen (Abschnitt 3.3.4). Auch das Längenspektrum unselektierter thymischer  $\gamma/\delta$  T Zellen (Abschnitt 3.3.5) und die Expressionshäufigkeit von ADV7- und DV105-Segmenten in der Rattenmilz (Abschnitt 3.3.6) wurde bestimmt.

#### 3.3.1 DV105 und ADV7-Gensegmente in der Rattenmilz

##### 3.3.1.1 Identifizierung und Sequenzanalyse von einem DV105- und fünf ADV7-Gensegmenten der Ratte

Bei Beginn dieser Arbeit waren für die Ratte lediglich die Sequenzen von DV101 (Kühnlein et al. 1996) und von zwei GV-Segmenten (Kinebuchi et al. 1994) bekannt. Als Basis für die Spektratyp-Analysen mußten deshalb die Sequenzen von typischen, in der Milz exprimierten DV-Segmenten bestimmt werden. Da die schon bekannten

Sequenzen große Homologie zu den entsprechenden Mausequenzen zeigten, wurden auf Grundlage der Mausequenzen die ADV7<sub>lang</sub>- und DV105<sub>lang</sub>-PCR-Primer entworfen, die von 5' in die CDR1-Sequenz von ADV7 reichen, bzw. 3' im CDR1 von DV105 beginnen. Alle Maus-ADV7-Sequenzen waren in der ausgewählten Sequenz identisch. Im DC Gensegment wurde der DC<sub>lang</sub>-Primer innerhalb der letzten 35 Nukleotide des Gensegments in einer Region gewählt, die identisch zu DC-Sequenzen verschiedener anderer Spezies ist. Die Spezifität der Primer wurde durch direkte Sequenzierung von PCR Produkt aus cDNA von gereinigten, aktivierten  $\gamma\delta$  T Zellen bestätigt. Beide DV-Familien lieferten eine eindeutige Sequenz, die der Mausequenz sehr ähnlich war; bei ADV7 gab es einige unklare Nukleotide. Anhand dieser Sequenzen wurden die Primer DV105<sub>kurz</sub>, ADV7<sub>kurz</sub> und DC<sub>kurz</sub> entworfen, deren Spezifität wieder durch Sequenzierung von PCR-Produkt gezeigt wurde.

PCR-Produkt der DV<sub>lang</sub>- und DC<sub>lang</sub>-Primer wurde kloniert; drei DV105 enthaltende, sowie 38 ADV7 enthaltende Klone wurden sequenziert, und alle Klone unterschieden sich in der Sequenz der V-D-J-Verknüpfung. Für DC wurde dieselbe Sequenz erhalten, die von Arden und Kollegen (Arden et al. 2000) veröffentlicht ist (Genbank: AJ249228, nicht gezeigt). Alle drei DV105-Klone und 36 von 37 ADV7-Klonen mit aufgeklärter DJ-Sequenz enthielten das DJ1-Segment; nur ein ADV7-Klon enthielt DJ2, und alle Sequenzen blieben nach der CDR3-egion im richtigen Proteinleseraster. Die DJ1-Sequenz entsprach der von Arden et al. veröffentlichten (Arden et al. 2000), DJ2 war identisch mit der Sequenz in Kühnlein et al. 1996.

Die DV105-Klone besaßen alle drei dieselbe Sequenz, die auch durch Sequenzierung des PCR-Produkts erhalten wurde (Abbildung 4a). Klon 170 wurde mit der Zugangsnummer AF259789 in der Genbank veröffentlicht. Im klonierten Bereich war die DNA-Sequenz von DV105 der Ratte zu 89,9% identisch mit der homologen Mausequenz; sie war außerdem identisch mit der später veröffentlichten, sogenannten DV105S2-Sequenz von einem cDNA-Klon aus dem Rattenthymus (Watson et al. 2000; Genbank AF196226). In derselben Veröffentlichung wurde ein zweites DV105-Familienmitglied für die Ratte beschrieben, das allerdings nur 5' von der hier beschriebenen Sequenz und am 3'-Ende des DV105-Segments Unterschiede

zeigt. Da aber in der Maus nur ein DV105-Gensegment veröffentlicht ist (Arden et al. 1995) und sich die DV105S1-Sequenz von Watson et al. nur auf einen Klon stützt, sollte mit weiteren Experimenten geprüft werden, ob die DV105S1-Sequenz existiert.

Die ADV7-Klone enthielten mehrere Sequenzen. Fünf Klone zeigten sogar eine Deletion von Aminosäureposition 29 bis 69 (IMGT-Nomenklatur), während die restlichen Klone mit den ADV7-Sequenzen der Maus vergleichbar waren. Analog zur Maus waren vier bis sechs verschiedene ADV7-Mitglieder erwartet worden, denn die Zahl der ADV7-Gensegmente variiert anscheinend in verschiedenen Mausstämmen (Pereira et al. 2000); allerdings wurden in den Klonen 13 verschiedene Sequenzen gefunden (nicht gezeigt).

Die große Zahl von 13 teilweise nur an einzelnen Nukleotiden verschiedenen ADV7-Sequenzen kann zum Teil auf Fehler bei der reversen Transkription oder der für die PCR benutzten taq Polymerase zurückgeführt werden (Roman-Roman et al. 1991), deren Fehlerrate in den DC Sequenzen ein Nukleotid pro 1200 betrug. Einzelne Sequenzen, die in bestimmten Bereichen einem, in anderen Bereichen anderen Klonen aus Abbildung 4 entsprachen, lassen sich aber besser mit anderen Mechanismen erklären, die zur Bildung von Chimären zwischen verschiedenen Familienmitgliedern führen könnten: Zum einen sind die ADV7-Sequenzen so ähnlich, daß bei einem PCR-Zyklus entstehende, nicht bis zu Ende synthetisierte DNA-Stränge im nächsten Zyklus an anderen Familienmitgliedern als Primer binden könnten. Andererseits könnten am Ende der PCR zwei von unterschiedlichen Familienmitgliedern stammende Einzelstränge paaren; nach der Klonierung würden von Reparaturenzymen im Bakterium die wenigen nicht passenden Nukleotide an jeder Position zufällig mit dem einen oder dem anderen Strang als Vorbild repariert. Folglich wurden nur Sequenzen als echt angesehen, die mindestens in zwei Klonen identisch erhalten wurden, bzw. für die eine Genbanksuche identische Sequenzen ergab. Nach diesen Kriterien bleiben fünf verschiedene ADV7-Mitglieder, für die jeweils ein repräsentativer Klon in Abbildung 4b gezeigt wird.

Sechs weitere Klone ohne Deletion haben dieselbe ADV7-Sequenz wie Klon 299, die auch Genbanksequenzen (AF196248 und andere) entspricht. Diese Sequenz wurde am häufigsten gefunden, und auch die Sequenzierung des PCR-Produkts von  $\gamma/\delta$  T

Zell-cDNA aus der Milz ergab außer einigen unklaren Nukleotiden diese Sequenz (nicht gezeigt). Weitere drei zu Klon 308 und zur Genbanksequenz AF196242 identische Sequenzen wurden gefunden. Klon 175 ist identisch mit der Genbanksequenz AF196245. Zur Sequenz von Klon 278 waren weitere 2 Klone identisch, und die Genbanksequenz L37956 unterscheidet sich davon nur in einem Nukleotid, bzw. einer Aminosäure. Schließlich gibt es einen weiteren mit Klon 173 identischen Klon, zu dem es in der Genbank bisher kein Gegenstück gibt. Die fünf ADV7-Mitglieder der Ratte sind im klonierten Bereich mit dem jeweils ähnlichsten Mitglied der Maus auf Nukleotidebene zu 83,6 bis 88,8% identisch, untereinander zu 83,9 bis 94,0%. Die in Abbildung 4b im Bereich des ADV7-Gensegments gezeigten Klone wurden unter den Zugangsnummern AF258317 und AF 259785 bis AF259788 in der Genbank veröffentlicht. Wenn man die hier erhaltenen Daten mit denen der Publikation von Watson und Kollegen ergänzt (Watson et al. 2000), sind jetzt also sechs ADV7-Familienmitglieder der LEW-Ratte bekannt: Zwischen DV7S1 und DV7S4 konnte in der vorliegenden Arbeit nicht differenziert werden, da sie sich außerhalb des klonierten Bereichs unterscheiden; für beide steht die Sequenz von Klon 299. Klon 308 entspricht DV7S2, Klon 175 DV7S3 (Watson et al. 2000). Der Liste angefügt werden müssen noch Klon 278 als ADV7S5 (als AV beschrieben bei Shirwan et al. 1995) und Klon 173, dessen Sequenz hier erstmals beschrieben wurde, als DV7S6.

Wie oben erwähnt, wurden auch Klone mit einer großen Deletion von Aminosäureposition 29 bis 69 (IMGT-Nomenklatur) in der V-Sequenz erhalten. Für die Maus ist eine vergleichbare Deletion nicht bekannt. Von den in dieser Arbeit gefundenen Klonen mit Deletion würden vier von fünf das korrekte Leseraster für die Translation behalten. Da die Deletion sowohl die CDR1-, als auch die CDR2-Region zerstören würde, könnte aber keine funktionelle TCR $\delta$ -Kette gebildet werden. Weil die deletierte Sequenz direkt nach der Sequenz des benutzten PCR-Primers beginnt, müßte man ein Artefakt vermuten, wenn nicht in der Genbank ADV7-Sequenzen mit sehr ähnlichen Deletionen beschrieben wären. Zwei Klone mit Deletionen (nicht gezeigt) waren ansonsten nur identisch zu Klon 308, weitere 3 ansonsten identisch zu Klon 175. Die Genbanksequenz AJ196247 (und 4 andere) ist

**a**

Nukleotide:

```

CDR1 - IMGT          <----- FR 2 - I M G T ----->          CDR2 - IMGT
... .. TTA TTT TGG TAT CGC AAA AGG CCA GAC GGG TCC TTC CAG TTC ATC CTT TAT AGG GAT AAC TAC AGG ...
Klon 170
PCR
M23382 Maus DV105
... .. TTA TTT TGG TA----- A-A----- --C G-- ACT --T ...

          <----- FR 3 - I M G T ----->
... .. TCC CAT GAT GCA GAT TTT GTT CAA GGT CGA TTT TCT GTG AAG CAC AGC AAG GCT GAC GGA ACC
Klon 170
PCR
M23382 Maus DV105
... .. ----- --C A-- A--

----->          CDR3 - IMGT
Klon 170          TTC CAC CTG GTG ATT GCT CCA GTG AGG CTT GAA GAC AGC GCT ACG TAT TAC TGT GCC TTA GGG TC
PCR
M23382 Maus DV105 --- --T --- --C T-- --C --- --T --- --CC --- --AT

Aminosäuren:
Klon 170          NED...LFWYKRKRPDGSFQFILYRDNYR...SHDADFVQGRFSVKHSHKADGTFHLVIAFVRLEDSATYYCALG
M23382 Maus DV105 ENED...LFWY-----R-----DTS-----NR-----S--S-----S-
          CDR1          CDR2          Δ          CDR3
          CDR2 (Arden)

```

**b**

Nukleotide:

```

FR 1 - I M G T --->          CDR1 - IMGT          <----- FR 2 -
Klon 299          AC TGT TCA TAT GAG ACA AGT TAT GGC ACA TAT TAT ... CTT TTT TGG TAC AAG CAG CTT CTT
Klon 278          AC TGT TCA TAT GAG ACA AG- C-G AA- -T- C-- ... --C G-- --CAG CTT CTT
Klon 173          AC TGT TCA TAT GAG ACA AG- C-G AA- -T- --C -- --C -- --AA
Klon 308          AC TGT TCA TAT GAG ACA AG- --T- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 175          AC TGT TCA TAT GAG ACA AG- --T- GT- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
X07878 Maus ADV7 GAC TGT TCA TAT GAG ACA AG- C-G -T- TT- --C -- --C -- --C -- --C -- --C --

I M G T ----->          CDR2 - IMGT          <-----
Klon 299          AGT GGA GAG ATG GTT TTC CTT ATT CTC CAA CCT TCT TTT ... GAT TCT CAG AAC CAG AGG
Klon 278          -- -- -- -- --A A-- -- -- -- --G-- --A-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 173          -- -- -- -- --A R-- -- -- -- --C A-- --G-- --C-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 308          -- -- -- -- --A -- -- -- -- --A-- -- -- -- --C-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 175          -- -- -- -- --A -- -- -- -- --A-- -- -- -- --TC- --A-- --GCA G-A A-- --
X07878 Maus ADV7 -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --GA- --ATG -- --C-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

          <----- FR 3 - I M G T ----->
Klon 299          AGC ... GGC CGC TAT TCT GTA ATC TTC CAG CAA TCA CTC AAG TCC ATC AGC CTT GTC ATT TCA GCC TCT CAG CCA
Klon 278          --T ... -- -- -- -- --G-- -- -- -- --A-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 173          --T ... A-- -- -- -- -- --T-- --A-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 308          --T ... -- -- -- -- --G-- -- -- -- --A A-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 175          --T ... -- -- -- -- --G-- -- -- -- --A-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
X07878 Maus ADV7 --T ... -- -- -- -- --G-- -- -- -- --A-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --

----->          CDR3 - IMGT
Klon 299          GAG GAT TCG GGG AAG TAT TTC TGT GCT CTC TGG GAA ACT
Klon 278          -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 173          --A -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 308          -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --
Klon 175          -- -- -- -- --P-- -- -- -- -- -- -- -- -- -- --A-T --
X07878 Maus ADV7 --C -- -- -- --A -- -- -- -- -- -- -- -- -- --G CTC

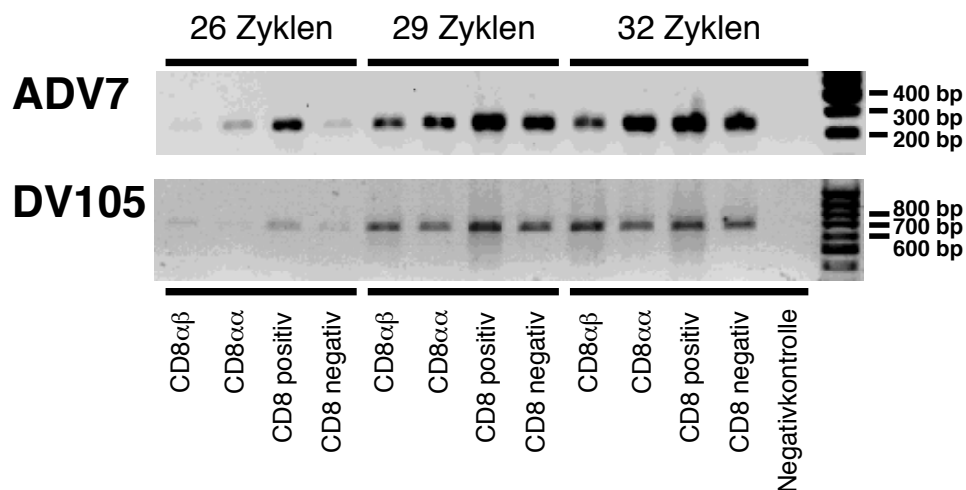
Aminosäuren:
Klon 299          CSYVETS YGTYY...LFWYKQLLSGEMVFLILQPSF...DSQNQRS.GRYSVIFQQSLKLSISLVISASQPEDSGRYFCALNET
Klon 278          CSYVETS QNI-H...-----DII--R-T-...-----V--K-----
Klon 173          CSYVETS QNL-...-----Q--DII--H-A-S-...-----S-----K-----
Klon 308          CSYVETS -V-...-----R-----H-I-S-...-----STA EK--...-----V--K-----
Klon 175          CSYVETS -VV-...-----H-I-...-----STA EK--...-----V--K-----L-----S
X07878 Maus ADV7 DC SYVETS QVL-H...-----H-----R-M-S-...-----STA EK--...-----V--K-----L--D-----L
          CDR1          CDR2          Δ          CDR3
          CDR2 (Arden)

```

**Abbildung 4: Nukleotidsequenzen und daraus abgeleitete Aminosäuresequenzen von DV105 (a) und ADV7 (b) der Ratte.** Die Numerierung der Aminosäurepositionen folgt dem IMGT-System (Lefranc et al. 1999; IMGT = ImMunoGeneTics database, <http://imgt.cines.fr>), ebenso die Lage der CDR-Regionen. Für CDR2 ist zusätzlich der von Arden definierte Bereich; das Dreieck (Δ) unter der Aminosäuresequenz gibt die Position 56 nach (weiter: nächste Seite)

(zu Abbildung 4)

Ardens Nomenklatur an (siehe Text). Die Nukleotidsequenz der PCR-Primer und die zugehörigen Aminosäuresequenzen sind unterstrichen. Bindestriche geben identische Nukleotide, bzw. Aminosäuren an, Punkte stehen für Lücken, die durch den Vergleich im IMGT-System verursacht sind. Für DV105 wird die Sequenz eines repräsentativen Klon mit der durch direkte Sequenzierung von PCR-Produkt erhaltenen Sequenz und mit einer in der Genbank veröffentlichten Maus-DV105-Sequenz verglichen (a). Für ADV7 werden einer Maus-ADV7-Sequenz aus der Genbank die klonierten Ratten-DV Sequenzen gegenübergestellt (b). Die Sequenzen sind in der Genbank veröffentlicht: Klon 170: AF259789; Klon 299: AF258317; Klon 278: AF259785; Klon 173: AF259786; Klon 308: AF259787; Klon 175: AF259788.



**Abbildung 5: Quantifizierung der mRNA für ADV7 und DV105 in Subpopulationen von  $\gamma/\delta$  T Zellen.** Die DV105 und ADV7 mRNA-Menge wurde in CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven, sowie in CD8 insgesamt positiven und in CD8 negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen durch semiquantitative RT-PCR mit unterschiedlichen Zyklenzahlen verglichen. Die Zellen waren für zwei Tage mit immobilisiertem mAk anti TCR in Gegenwart von IL-2 (CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$ ) oder von mAk gegen CD28 (CD8 positiv und negativ) aktiviert, zwei weitere Tage kultiviert, dann mit mAk gegen CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$ , bzw. nur mit mAk gegen CD8 $\alpha$  gefärbt und durchflußzytometrisch getrennt worden, um RNA zu isolieren. Die Reinheit der Populationen betrug 99% (CD8 $\alpha\beta$ ), 97% (CD8 $\alpha\alpha$ ), 97% (CD8 positiv) und mindestens 86% (CD8 negativ, weniger als 2% waren CD8 $\beta$  positiv). Die RNA wurde revers transkribiert und die cDNA mit einer kompetitiven PCR auf dieselbe  $\beta$ -Aktin-Konzentration eingestellt. Danach wurden PCR-Reaktionen mit den angegebenen Zyklenzahlen mit C $\delta_{kurz}$  und V $\delta 6_{lang}$  (ADV7) oder C $\delta_{lang}$  und V $\delta 5_{lang}$ -Primern (DV105) durchgeführt und die PCR-Produkte im Agarose-Gel getrennt.

eine deletierte Sequenz von Klon 299, Sequenz AF196232 ist eine deletierte Sequenz von Klon 175, Sequenz AF196243 ist ein deletierter Klon 308. Die Deletion ist also wahrscheinlich kein methodisches Artefakt, und sie tritt anscheinend in allen ADV7-Familienmitgliedern auf.

Ähnlich zur Situation bei der Maus, wo ein DV105-Mitglied (Arden et al. 1995) und beim DBA/2-Stamm sechs (Azuara et al. 1998), bei C57BL/6 vier (Pereira et al. 2000) ADV7-Mitglieder gibt, konnten für die Ratte jetzt also insgesamt sechs V-Segmente der ADV7-Familie gefunden werden. Ob es in der Ratte ein oder zwei DV105-Familienmitglieder gibt (Watson et al. 2000), läßt sich aufgrund der erhobenen Daten nicht beantworten.

### 3.3.1.2 Analyse der DV-Proteinsequenzen auf ein Motiv für die Wechselwirkung von CD8 und TCR

Um als Korezeptor bei der Antigenerkennung von  $\gamma/\delta$  T Zellen zu wirken, müßte CD8 mit dem  $\gamma/\delta$  TCR während der Antigenerkennung interagieren. Kürzlich wurde von Arden (Arden 1998) vorgeschlagen, daß für eine Interaktion von TCR AV und CD8 die Aufeinanderfolge von Lysin, Glutaminsäure und Lysin, bzw. zumindest die positiv geladene Aminosäure Lysin an Position 56 (seiner Nomenklatur) in der Sequenz von AV-Gensegmenten vorhanden sein muß (nach der IMGT-Nomenklatur Position 70 für DV105 und Position 69 für ADV7). Es wäre möglich, daß sich dieses Motiv auch in DV-Gensegmenten findet, wenn diese  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8 als der Korezeptor bei der Antigenerkennung benutzen. An der entsprechenden Position findet sich aber weder für DV105, noch für ADV7 der Ratte dieses Motiv (Abbildung 4), obwohl eine Genbank-Suche ergab, daß drei von sechs ADV7-Familienmitgliedern der Maus ein Lysin (K) an der entsprechenden Position exprimieren (als Beispiel siehe Abbildung 4).



### 3.3.1.3 Expression der (A)DV-Gensegmente in CD8-Subpopulationen von $\gamma/\delta$ T Zellen

Bisher sind für die Ratte oder die Maus keine Untersuchungen dazu publiziert worden, ob die Expression eines Korezeptors auf  $\gamma/\delta$  T Zellen mit der bevorzugten Benutzung bestimmter DV-Segmente korreliert. Einerseits könnte ein Zusammenhang zwischen der Art der Antigenerkennung und der DV-Segmentbenutzung bestehen, andererseits ist es gerade auch für die unten folgenden, Analysen der CDR3 $\delta$ -Länge ist es wichtig zu wissen, ob DV105 und ADV7 in CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven, sowie in CD8 negativen  $\gamma/\delta$  T Zellsubpopulationen ungefähr gleich häufig exprimiert werden. Die auf PCR basierenden Spektratyp-Analysen könnten sonst durch die unvermeidbare Kontamination mit Zellen anderer Subpopulationen verfälscht werden.

Aktivierte  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden mit dem Durchflußzytometer in CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positive, sowie in CD8 negative und CD8 positive Subpopulationen getrennt. Die cDNA von CD8 $\alpha\alpha$  und CD8 $\alpha\beta$  positiven Zellen stammte aus demselben Experiment, und vor der Aktivierung waren alle Zellen CD8 $\alpha\beta$  positiv gewesen, d.h. die CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen hatten die CD8 $\beta$ -Expression moduliert (siehe Abschnitt 3.4). Die Reinheit der CD8 $\alpha\beta$  positiven Zellpopulation hatte über 99% betragen, die der CD8 $\alpha\alpha$  positiven 97%. In einer weiteren Reinigung wurden CD8 negative  $\gamma/\delta$  T Zellen, die zu mindestens 85% sauber waren (CD8 $\alpha\beta$  positive Zellen weniger als 2%), von CD8 positiven Zellen getrennt, die wiederum zu 12% CD8 $\alpha\beta$  und zu 85% CD8 $\alpha\alpha$  exprimierten. Durch quantitative kompetitive RT-PCR wurden alle cDNAs auf dieselbe Konzentration von  $\beta$ -Aktin cDNA eingestellt, und mit den so abgeglichenen cDNAs wurden semiquantitative RT-PCR-Analysen durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Zyklenzahlen in Dreierschritten von 23 auf 32 erhöht. Die PCR auf DV105 ergab in allen vier Subpopulationen ungefähr gleich starke Banden (Abbildung 5 unten), d.h. dieses Gensegment war gleich stark exprimiert. Dagegen tauchte bei der RT-PCR mit ADV7-spezifischen Primern die Bande für die CD8 positiven Zellen früher auf als bei den CD8 negativen; CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positive Zellen unterscheiden sich nicht (Abbildung 5 oben). Folglich war DV105 in allen Subpopulationen gleich häufig exprimiert, während weitere Experimente klären

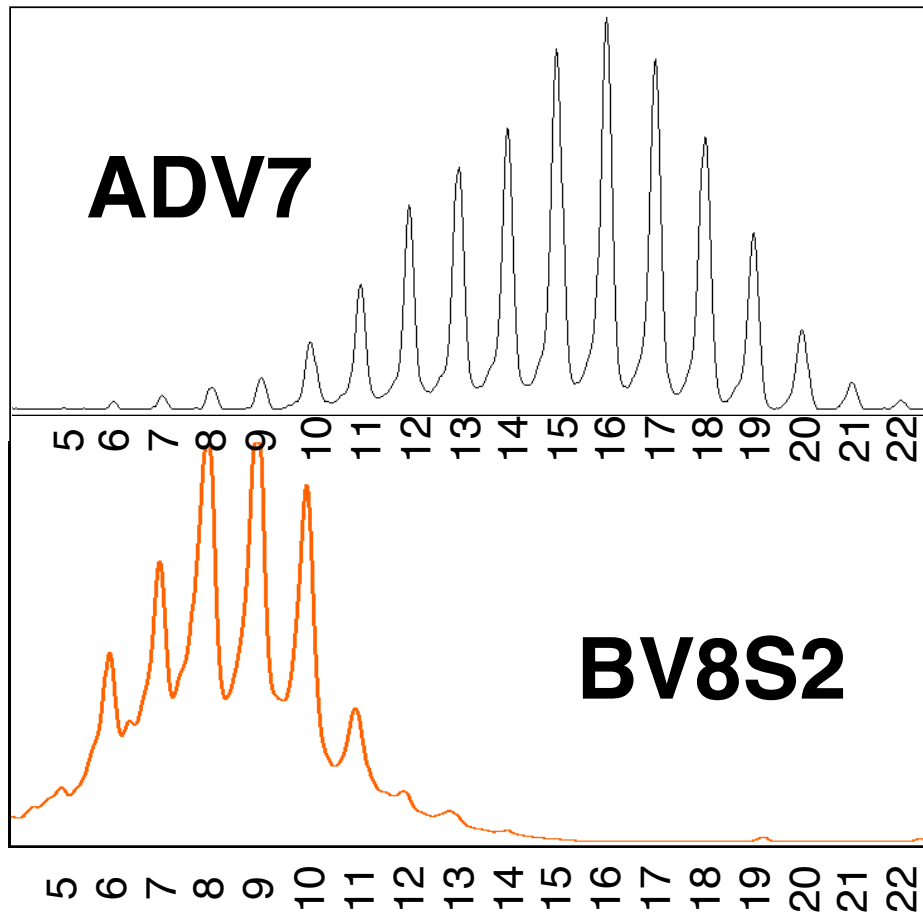
müßten, ob die Gensegmente der ADV7-Familie seltener in CD8 negativen als CD8 positiven  $\gamma\delta$  T Zellen zu finden sind.

### 3.3.2 CDR3-Längenverteilung bei TCR $\beta$ und TCR $\delta$

Als Indiz für eine mögliche MHC I-Restriktion wurde geprüft, ob CD8 positive  $\gamma\delta$  T Zellen ein CDR3d Längenspektrum aufweisen, das dem CDR3 Längenspektrum für die TCR $\beta$ -Kette entspricht. Dazu wurde meist cDNA von gereinigten  $\alpha/\beta$  und  $\gamma\delta$  T Zellblasten für Spekatyp-Analysen verwendet; mit Material von ruhenden Milzzellen wurden aber dieselben Ergebnisse erzielt (vergleiche z.B. Abbildungen 6 und 8).

Die Spekatyp-Analysen wurden durch PCR mit jeweils einem fluorochrom-markierten Primer durchgeführt. Für  $\gamma\delta$  T Zellen wurden die unter 3.3.1.1 beschriebenen DV105<sub>kurz</sub>- und ADV7<sub>kurz</sub>-Primer, bzw. für die Gegenrichtung ein FAM-markierter DJ1 spezifischer Primer benutzt, damit auch genomische DNA analysiert werden konnte. Die Analysen mit DJ1-spezifischem Primer erfaßten den größten Teil der  $\gamma\delta$  T Zellen der Milz, denn: i) Es gibt anscheinend in der Ratte wie in der Maus nur zwei DJ-Segmente, die sich von den Maus-Segmenten nur in wenigen Nukleotiden unterscheiden (Klone in Abschnitt 3.3.1.1; Kühnlein et al. 1996; Arden et al. 2000). ii) DJ2 ist in der Milz vernachlässigbar selten, da es trotz bekannter Sequenz mit verschiedenen PCR-Primern nicht detektiert wurde und da es nur in einem von 36 Klonen gefunden wurde, die mit DV- und DC-spezifischen Primern erzeugt worden waren (Abschnitt 3.3.1.1). In der Milz der Maus ist DJ2 ebenfalls selten (Szymanska et al. 1999).

Leider stellte sich nach der Analyse der ADV7-Sequenzen (Abschnitt 3.3.1.1) heraus, daß der für die Spekatyp-Analysen verwendete ADV7<sub>kurz</sub>-Primer bei vier der fünf gefundenen Familienmitglieder an jeweils einem der Nukleotide nicht komplementär ist. Trotzdem kann man davon ausgehen, daß auch diese Familienmitglieder mit hoher Effizienz amplifiziert wurden, da das unpassende



### CDR3-Länge (Aminosäuren)

**Abbildung 6: Vergleich der CDR3-Längenspektren von ADV7 (oben) und BV8S2 (unten) enthaltenden TCR.** cDNA von aktivierten 97% reinen  $\gamma/\delta$ , bzw. 99% reinen  $\alpha/\beta$  T Zellen wurde mit ADV7, bzw. BV8S2-spezifischem Primer und FAM-markiertem DJ1 (J $\delta$ 1), bzw. BC2 (C $\beta$ 2)-Primer mit PCR amplifiziert. Die Spektroatyp-Analysen wurden mithilfe eines automatischen Sequenzierers und Genescan 2.1-Software durchgeführt.

Nukleotid mindestens vier Nukleotide von 3'-Ende des Primers entfernt ist und die wegen des DJ-Primers gewählte Annealing-Temperatur von 48°C deutlich unter der Schmelztemperatur des ADV7<sub>kurz</sub>-Primers von 56°C lag.

Für  $\alpha/\beta$  T Zellen wurden BV8S2-, BV10-, BV13- und BV16-spezifische sense Primer und ein FAM-markierter BC2-spezifischer antisense Primer benutzt. Das TCR $\delta$ - oder TCR $\alpha$ -Ketten spezifische PCR-Produkt wurde zusammen mit einem DNA-Längenmarker in einem automatischen Sequenzierer analysiert. Für beide TCR-Ketten zeigten die Längenspektren Verteilungen von einzelnen Kuppen, deren Kurvenmaxima genau drei Nukleotide voneinander entfernt lagen, wenn die amplifizierten DNA-Stränge keine Proteinleserahmen-Verschiebung aufwiesen. Also erscheint alle drei Nukleotide, bzw. umgerechnet jede Aminosäure, eine Spitze, an der die Transkripte der TCR-Rekombinationen im Proteinleseraster liegen, und über die Verteilung dieser einzelnen Spitzen kann man näherungsweise eine Gauß-Verteilung legen. Als Längenstandards wurden einige der unter 3.3.1.1 beschriebenen DV105- und ADV7-Klone benutzt, da ihre CDR3-Länge durch Sequenzierung bekannt war. Für BV8S2 diente cDNA der Zelllinie 35/1 als Längenstandard, da ihre TCR-Ketten sequenziert sind (Asmuß 1999). Die CDR3-Länge wurde wie bei Rock et al. berechnet (Rock et al. 1994): Die CDR3-Länge beträgt vier Aminosäuren weniger als der Abstand zwischen dem letzten im V-Segment codierten Cystein und dem im J-Segment codierten Glycin-X-Glycin-Triplett (X kann jede Aminosäure sein).

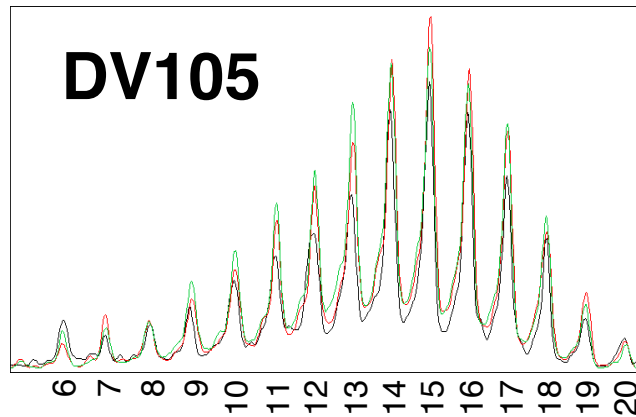
Das CDR3-Längenspektrum der TCR $\beta$ -Ketten war für alle untersuchten BV-Segmente ähnlich. Die Längenverteilung war stark eingeschränkt; z.B. maßen CDR3 von BV8S2 enthaltenden TCR am häufigsten 9 Aminosäuren, wobei auch Längen von fünf bis 13 Aminosäuren vorkamen (Abbildung 6 unten). Dagegen waren die CDR3 $\delta$ -Proteinschleifen deutlich länger und die Spektren breiter: ADV7 enthaltende TCR hatten eine mittlere CDR3-Länge von 16 Aminosäuren mit einer Verteilung von sechs bis 22 Aminosäuren (Abbildung 6 oben). Für TCR $\delta$  mit DV105 war die mittlere CDR3-Länge 15 Aminosäuren, die Verteilung so breit wie für ADV7 (Abbildung 7 oben). Dieselben Spektren wurden auch mit genomischer DNA erhalten (nicht

gezeigt). ADV7 positive TCR $\delta$ -Ketten besaßen also etwas längere CDR als DV105 positive.

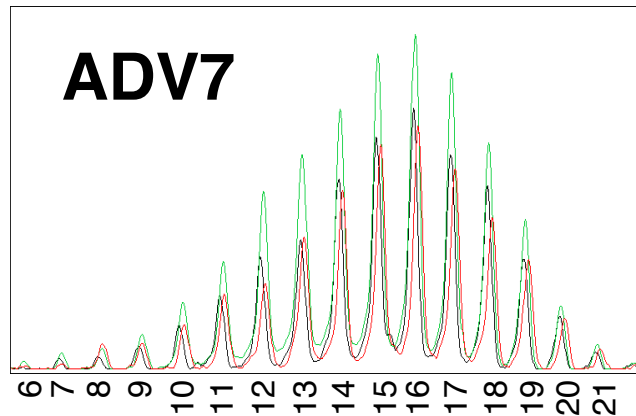
Allgemein waren CDR3d zum einen deutlich länger als CDR3b, zum anderen waren CDR3d Längenspektren wesentlich breiter als die Verteilung der CDR3 $\beta$ -Längen. Die CDR3-Länge der TCR $\delta$ -Ketten unterscheiden sich demnach deutlich von der Länge MHC-restringierter TCR-Ketten.

### 3.3.3 CDR3 $\delta$ -Längen von CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta$ positiven sowie CD8 negativen $\gamma\delta$ T Zellen

Obwohl auch in der Ratte trotz der CD8-Expression die TCR $\delta$ -Längenspektren nicht dem eingeschränkten Spektrum der MHC-restringierten TCR $\beta$ -Kette entsprechen, wurden Spektratyp-Analysen mit cDNA durchgeführt, die von FACS-sortierten CD8-Subpopulationen stammte, um nach Unterschieden zwischen den CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven, bzw. CD8 negativen  $\gamma\delta$  T Zellsubpopulationen zu suchen. Die CD8 $\alpha\beta$  positiven Ausgangszellen waren zu 99% rein. Die beiden anderen cDNA waren dieselben wie die in Abschnitt 3.3.1.3 beschriebenen, d.h. sie wurden aus Zellen gewonnen, die zu 97% (CD8 $\alpha\alpha$ ) und mindestens 86% (CD8 negativ) rein waren. Spektren der jeweils getrennt durchgeführten Spektratyp-Analysen wurden in Abbildung 7 übereinandergelegt. Die verwendete cDNA jeder CD8-Subpopulation stammte aus einem anderen Experiment; jedes Spektrum stammt also von Ausgangszellen aus anderen Ratten. Obwohl folglich Unterschiede der Spektren zu erwarten wären, sind alle Spektren gleich. Sowohl für DV105, als auch für ADV7 sind die Spektren aller drei CD8-Subpopulationen praktisch ununterscheidbar. Die CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma\delta$  T Zellen aus Abbildung 7 waren übrigens vor der Aktivierung alle CD8 $\alpha\beta$  positiv gewesen, haben also die CD8 $\beta$ -Kette moduliert (siehe Abschnitt 3.4), aber auch ein CD8 $\alpha\alpha$ -Spektrum von nicht vorsortierten Blasten ist mit den Spektren identisch (nicht gezeigt). Die CD8 negative und die beiden CD8 positiven Subpopulationen haben also dasselbe CDR3-Längenspektrum.



- CD8 $\alpha\beta$
- CD8 $\alpha\alpha$
- CD8 negativ



**CDR3-Länge (Aminosäuren)**

**Abbildung 7: Vergleich der CDR3-Längenspektren von CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven, sowie CD8 negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen.** Die Abbildungen zeigen übereinandergelegt die CDR3-Längenspektren von DV105 (oben) und ADV7 (unten) enthaltenden TCR $\delta$ -Ketten. Die cDNA für die Spektroatyp-Analysen stammte von zwei plus zwei Tage aktivierten  $\gamma/\delta$  T Zellen. CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positive Zellen wurden in Gegenwart von IL-2 aktiviert, die CD8 negativen Zellen in Gegenwart von mAk anti CD28. Die Blasten wurden mit mAk anti CD8 $\alpha$  (OX8) und CD8 $\beta$  (3.4.1) gefärbt und durchflußzytometrisch getrennt, bevor RNA isoliert wurde. Die CD8 $\alpha\beta$  positiven Zellen (grün) waren zu 99% rein, die CD8 $\alpha\alpha$  positiven (rot) zu 97%, die CD8 negativen (schwarz) zu mindestens 86% (Verunreinigung durch CD8 $\alpha\beta$  positive weniger als 2%). Die CD8 $\alpha\alpha$  positiven Zellen stammten von Zellen, die vor der Aktivierung nach MACS-Sortierung zu 97% CD8 $\beta$  positiv waren, haben also die CD8 $\beta$ -Kettenexpression nach Aktivierung moduliert (siehe Abschnitt 3.4.1).

### 3.3.4 CDR3 $\delta$ -Längenverteilung bei $\gamma/\delta$ T Zellen von Ratte und Maus

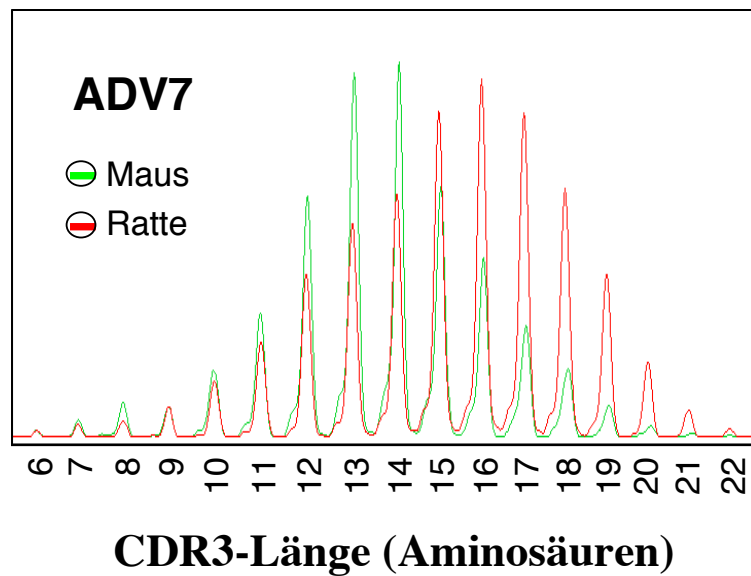
Die DV-spezifischen PCR-Primer wurden so gewählt, daß sie sowohl für die Ratte, als auch die Maus benutzt werden können. Um die verwendete Methode der Spektratyp-Analyse zu überprüfen, wurden deshalb Spektratyp-Analysen auch mit cDNA von Maus-Milzzellen durchgeführt und mit publizierten Daten verglichen.

Abbildung 8 zeigt die Überlagerung von Spektratyp-Analysen für ADV7 in Ratte und Maus. CDR3d war bei der Maus mit dem Maximum bei 14 Aminosäuren zwei Aminosäuren kürzer als bei der Ratte. Für DV105 lag das Maximum für die Maus bei 13 Aminosäuren, also wieder zwei Aminosäuren kürzer (nicht gezeigt).

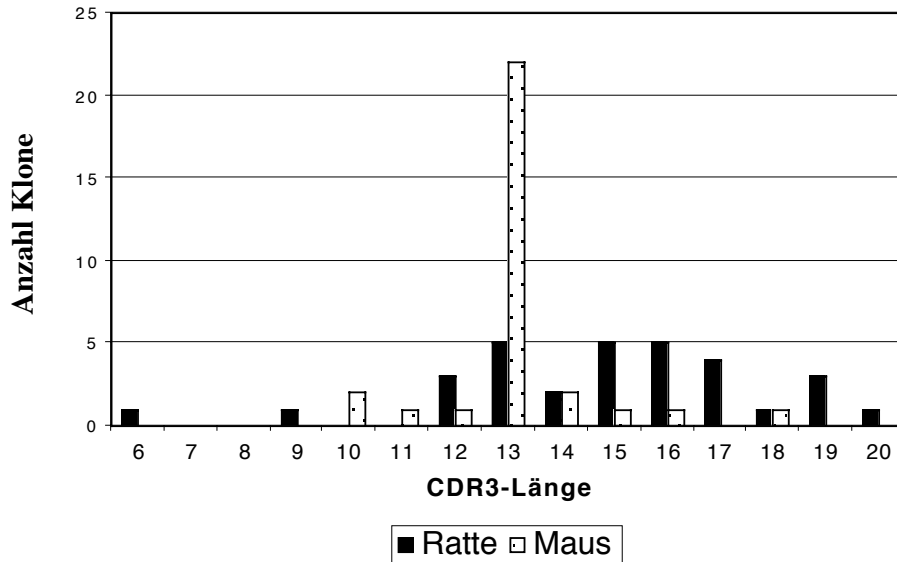
Die CDR3 $\delta$ -Längenspektren der Maus korrelierten gut mit einem aus 171 klonierten TCR $\delta$ -Ketten zusammengesetzten Spektrum (Rock et al. 1994). Auch aus den CDR3 $\delta$ -Längen der in Abschnitt 3.3.1.1 beschriebenen Klone ließ sich ein Spektrum zusammenstellen. In Abbildung 9 ist das Spektrum von 31 ADV7 enthaltenden Klonen einem Spektrum von ADV7-Klonen aus der Milz der Maus gegenübergestellt. Die CDR3 $\delta$ -Sequenzen von 33 mit cDNA aus der Milz der Maus generierten Klonen wurden kürzlich von Szymanska (Szymanska et al. 1999) veröffentlicht. In Abbildung 9 sind als direkter Vergleich zur Spektratyp-Analyse nur die 32 Klone mit ADV7 zu DJ1-Verknüpfung dargestellt. Auch diese Daten bestätigen die Ergebnisse der Spektratyp-Analysen. CDR3 $\delta$ -Längen der Ratte sind auch hier im Schnitt etwas länger als bei der Maus.

### 3.3.5 CDR3-Längenverteilung von unselektierten $\gamma/\delta$ T Zellen

Spektratyp-Analysen von Thymozyten unterschieden sich von Analysen mit Milzzellen (Abbildung 10). Im Thymus wurden viele Transkripte sichtbar, die nicht im richtigen Proteinleserahmen rearrangiert sind und die kaum von den im Rahmen



**Abbildung 8: Vergleich der CDR3-Spektren von ADV7 enthaltendem TCR von Ratte und Maus.** Spektratyp-Analysen wurden mit cDNA von ruhenden Milzzellen einer 11 Wochen alten LEW-Ratte (rot) oder einer 9 Wochen alten C57BL/6-Maus (grün) durchgeführt.



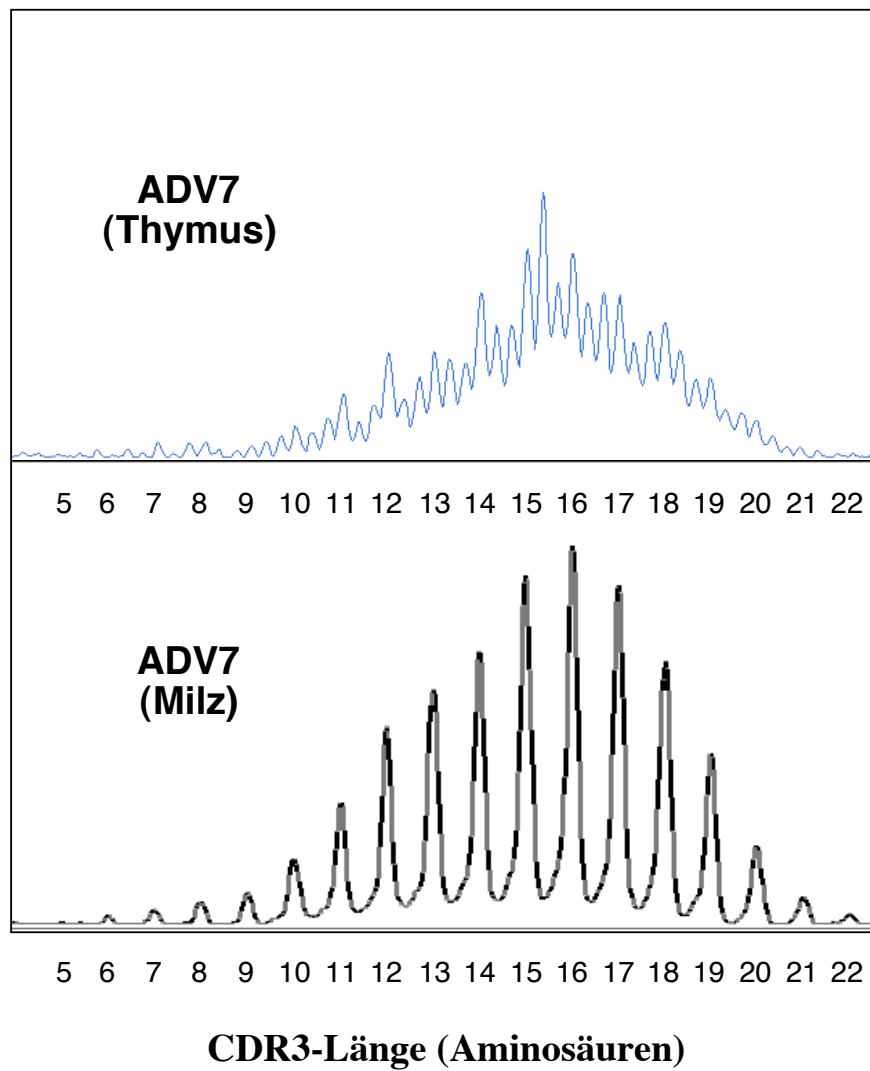
**Abbildung 9: CDR3-Längenspektren von ADV7-Klonen aus Ratte (schwarze Säulen) und Maus (helle Säulen).** Es werden nur CDR3-Längen von ADV7 zu DJ1-Verknüpfungen gezeigt. Die Daten für die Maus sind der Veröffentlichung von Szymanska et al. entnommen (LITERATUR). In beiden Spezies wurde PCR-Produkt von cDNA aus Milzzellen kloniert und sequenziert.



liegenden Signalen überragt werden. Die falsch rearrangierten TCR-Ketten können gerade stattfindende Rearrangements widerspiegeln oder auch von  $\gamma/\delta$  T Zellen stammen, die ein anderes DV-Segment korrekt und ADV7 auf dem anderen Chromosom falsch rearrangiert haben. In jedem Fall waren die Rearrangements noch keiner Selektion unterworfen; und interessanterweise ist die Verteilung der CDR3-Längen im Thymus und in der Milz gleich. Folglich wurde schon bei der Umlagerung der Gensegmente im Thymus das CDR3 $\delta$ -Längenspektrum der Peripherie erzeugt.

Auch bei der Verknüpfung der Segmente für die TCR $\beta$ -Kette der Maus wird das in der Peripherie gefundene CDR3-Längenspektrum schon durch die Rekombination erzeugt und muß nicht durch Antigenerkennung selektiert werden (Candéias et al. 1991). Um die durchschnittliche CDR3-Länge der TCR $\beta$ -Kette zu erhalten, müssen im Durchschnitt von den genomischen Gensegmenten einige Nukleotide entfernt werden (Pannetier et al. 1993). Bei der Verknüpfung der TCR $\delta$ -Kette müssen dagegen eher Nukleotide eingefügt werden, damit die durchschnittliche CDR3 $\delta$ -Länge erreicht wird: Die Verknüpfung der unveränderten genomischen Segmente von ADV7, DD2 und DJ1 ergibt eine CDR3-Länge von 13 Aminosäuren. Das DD1-Segment, das modifiziert werden muß, um nicht zu einer Leserahmenverschiebung zu führen, trägt maximal drei Aminosäuren zur CDR3-Länge bei.

Im Durchschnitt beträgt die CDR3 $\delta$ -Länge bei der Maus 15, bei der Ratte 16 Aminosäuren (Abschnitt 3.3.4). Da bei der Analyse der TCR $\delta$ -Klone (Abschnitt 3.3.1.1) keine Hinweise gefunden wurden, daß die DV- oder DJ-Segmente in der Ratte länger als in der Maus wären, könnten die im Schnitt etwas längeren CDR3-Schleifen der Ratte durch unterschiedliche Aktivität der an der Gensegment-rekombination beteiligten Enzyme erzeugt worden sein.



**Abbildung 10: Vergleich der CDR3-Längenspektren von Thymus und Milz.** Spekatratyp-Analysen wurden für ADV7 enthaltende TCR mit cDNA aus frisch isolierten Thymozyten (oben) oder zwei plus zwei Tage aktivierten  $\gamma/\delta$  T Zellen aus der Milz durchgeführt.

### 3.3.6 Häufigkeit von ADV7 und DV105 in der Rattenmilz

In peripheren lymphoiden Organen der Maus werden DV105- und ADV7-Gensegmente sehr häufig exprimiert (Haas et al. 1992; Pereira et al. 2000). Um ihre Expressionshäufigkeit in der Rattenmilz zu bestimmen, wären Analysen mit DV-Segment-spezifischen Antikörpern am besten geeignet. Da aber für die Ratte keine solchen Antikörper zur Verfügung stehen, wurden indirekte Hinweise aus den Spektratyp-Analysen abgelesen. Signale, die von nicht im Leserahmen rearrangierten Umlagerungen stammen, weisen nämlich auf die Häufigkeit der Benutzung des entsprechenden Segments hin: Eine T Zelle mit funktioneller TCR-Umlagerung transkribiert auch eine eventuell auf dem zweiten Chromosom falsch rearrangierte TCR-Kette (Abbildung 8; Azuara et al. 1998; Ferradini et al. 1991). Für die TCR $\beta$ -Kette wurde mit allen BV-spezifischen Primern jeweils ein relativ hoher nicht im richtigen Leserahmen liegender Hintergrund gefunden (Abbildung 6 und nicht gezeigt), den man darauf zurückführen kann, daß in der Milz über 20 BV-Segmente exprimiert werden, die meisten  $\alpha/\beta$  T Zellen das für die Spektratyp-Analyse benutzte BV-Segment also nicht exprimieren. Trotzdem können die dieses Gensegment mit einer Leserahmenverschiebung auf dem zweiten Chromosom rearrangiert haben. Je seltener ein Gensegment exprimiert wird, desto höher ist der Hintergrund im Vergleich zum im richtigen Leserahmen liegenden Signal.

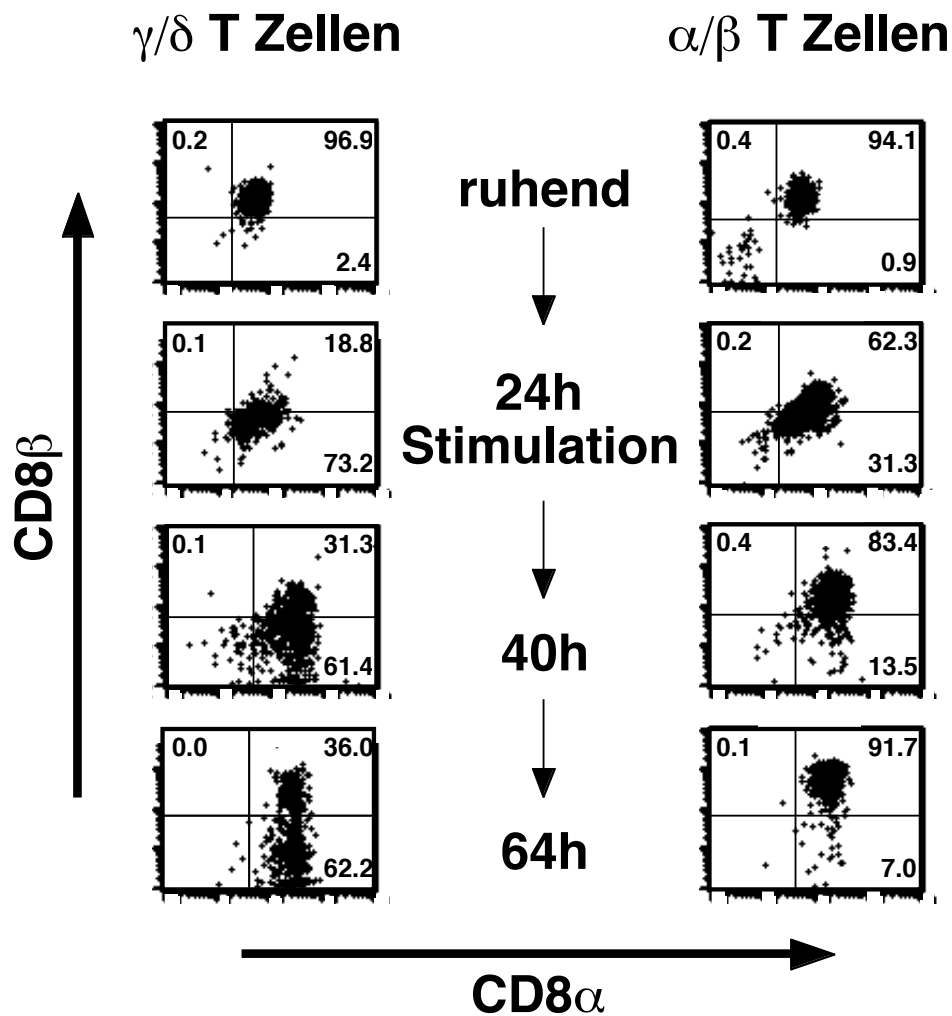
Da bei den Spektratyp-Analysen für TCR $\delta$ -Ketten fast kein Signal von falsch rearrangierten ADV7- und DV105-Ketten gefunden wurde (Abbildung 7), kann man auf eine häufige Benutzung der Segmente in funktionellem TCR der Rattenmilz schließen.

### 3.4 Modulation von CD8 $\beta$ nach Aktivierung *in vitro*

Das CD8 $\alpha\beta$  Heterodimer wird als Korezeptor auf MHC I-restringierten  $\alpha/\beta$  T Zellen stabil exprimiert, und auch die meisten peripheren Ratten  $\gamma/\delta$  T Zellen tragen diesen Rezeptor. Nach der Aktivierung von T Zellen *in vitro* konnte selektiv auf  $\gamma/\delta$  T Zellen eine Modulation der CD8 $\beta$ -Kettenexpression nachgewiesen werden (Abschnitt 3.4.1). Darüber hinaus wurde geprüft, ob die Modulation auf Ebene der mRNA stattfand (Abschnitt 3.4.2), welchen Einfluß verschiedene Aktivierungsprotokolle (Abschnitt 3.4.3) und die Stärke des Aktivierungssignals auf die Modulation hatten (Abschnitt 3.4.4).

#### 3.4.1 Modulation von CD8 $\beta$ auf gereinigten, CD8 $\alpha\beta$ positiven T Zellen

Nach der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen *in vitro* wurde schon von Hoffmeyer (Hoffmeyer 1994) eine drastische Abnahme des Anteils CD8 $\alpha\beta$  positiver und eine Zunahme CD8 $\alpha\alpha$  exprimierender Zellen festgestellt. Um unterscheiden zu können, ob unterschiedlich starkes Wachstum der Subpopulationen oder ein Verlust, d.h. eine Modulation der CD8 $\beta$ -Kettenexpression für den Effekt verantwortlich ist, wurden CD8 $\alpha\beta$  positive T Zellen aus der Milz durch positive MACS-Sortierung gereinigt. Parallel zueinander wurden die  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen auf Kulturschalen mit immobilisiertem Antikörper gegen den jeweiligen TCR gereinigt und in Gegenwart von CD28-spezifischem mAk für 24 Stunden aktiviert. Danach wurden die Zellen geerntet und für weitere zwei Tage in Medium mit IL-2 weiterkultiviert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten gezählt und mit Dreifachfärbungen gegen CD8 $\alpha$ , CD8 $\beta$  und den jeweiligen TCR im FACS analysiert (Abbildung 11) Sowohl auf  $\alpha/\beta$ , als auch auf  $\gamma/\delta$  T Zellen wurde nach 24 Stunden eine aktivierungsbedingte Modulation von CD8 beobachtet. Nach Umsetzen und 16 Stunden Kultur der Zellen in IL-2-Medium erreichte die Expression der Oberflächenrezeptoren fast wieder die normale Höhe. Nach 64 Stunden, d.h. 40 Stunden nach dem Umsetzen, sahen die  $\alpha/\beta$



**Abbildung 11: Modulation der CD8 $\beta$ -Kettenexpression nach Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen *in vitro*.** Milzzellen wurden durch TAC-Lyse und Nylonwollpassage gereinigt und durch Inkubation auf Platten mit mAk anti CD4 gereinigt. Nicht adhärierende Zellen wurden einer MACS-Sortierung mit anti Maus-Ig-Partikeln unterzogen, dann mit mAk anti CD8 $\beta$  gefärbt. Die CD8 $\beta$  positiven Zellen wurden durch MACS-Sortierung mit anti Maus-Ig-Partikeln gereinigt. Sowohl  $\gamma/\delta$ , als auch  $\alpha/\beta$  T Zellen wurden mit immobilisiertem mAk gegen den jeweiligen TCR gereinigt und in Medium mit mAk anti CD28 aktiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und in IL-2-Medium weiterkultiviert. Zu den oben genannten Zeitpunkten wurden die Zellen mit mAk anti CD8 $\beta$  (3.4.1-Biotin / Streptavidin-CyChrome), anti CD8 $\alpha$  (OX8-FITC) und anti TCR (V65-PE oder R73-PE) mit Dreifarbenfluoreszenzanalysen im Durchflußzytometer charakterisiert. Zahlen geben den Prozentsatz der im jeweiligen Quadranten liegenden Zellpopulation an.

T Zellen so aus wie vor der Aktivierung, nämlich fast alle waren CD8 $\alpha\beta$  positiv (Abbildung 11). Von den sieben Prozent CD8 $\alpha\alpha$  exprimierenden Zellen war ein Viertel (0,5% aller Zellen) zusätzlich CD4 positiv. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ursprünglich allein CD4 positive Zellen, bei denen aktivierungsbedingt eine CD8 $\alpha$ -Kettenexpression induziert werden kann (Ramírez et al. 1992).

Im Gegensatz zu den  $\alpha\beta$  T Zellen waren die  $\gamma\delta$  T Zellen zum größten Teil CD8 $\beta$  negativ geworden. Nur etwa ein Drittel der  $\gamma\delta$  T Zellen behielt die Expression des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers bei, der Rest der Zellen trug das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer auf der Oberfläche (Abbildung 11). Schnelleres Wachstum der CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma\delta$  T Zellsubpopulationen könnte die große Anzahl CD8 $\beta$  negativer Zellen nicht erklären, denn mit maximal  $2 \times 10^5$  CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma\delta$  T Zellen vor der Aktivierung konnte die Gesamtzellzahl von  $1,4 \times 10^7$  CD8 $\alpha\alpha$  exprimierenden Zellen nach 64 Stunden nur erreicht werden, wenn Zellen der Ausgangspopulation die CD8 $\beta$ -Kette moduliert hatten. Die Modulation ist anscheinend nicht reversibel, denn eine Reexpression von CD8 $\beta$  konnte auch nach einer Woche in keinem Experiment beobachtet werden; statt dessen sank der Anteil CD8 $\beta$  exprimierender Zellen stetig (nicht gezeigt).

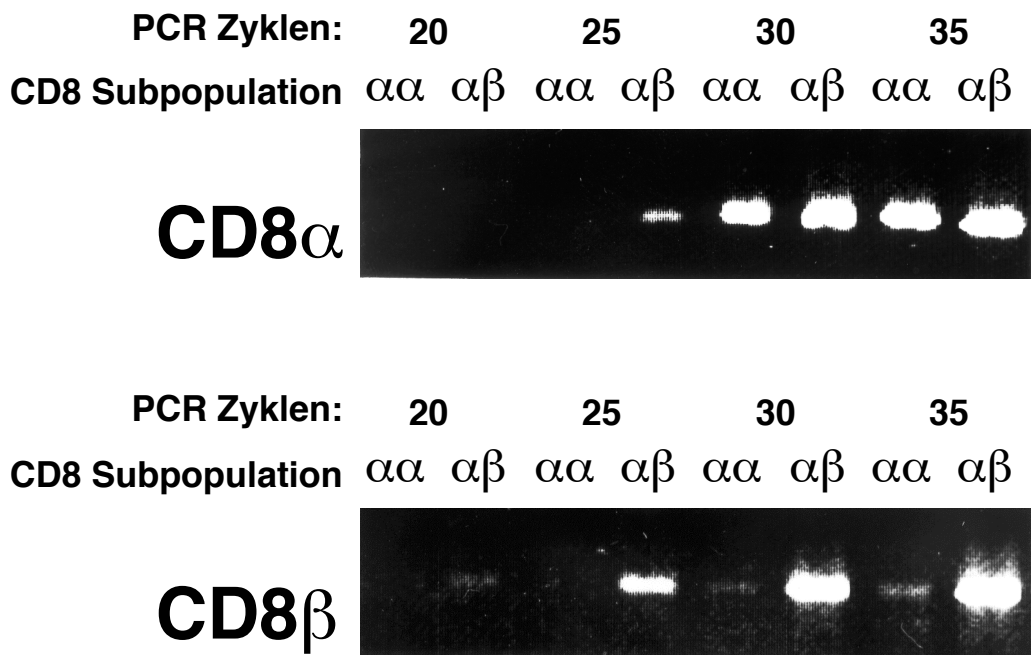
### 3.4.2 Beeinflussung der CD8 $\beta$ mRNA durch die Modulation

Die beschriebene Modulation der CD8 $\beta$ -Expression könnte prä- oder posttranslational reguliert sein. Um dies zu untersuchen, wurde durch semiquantitative RT-PCR die Menge der CD8 $\beta$  mRNA in  $\gamma\delta$  T Zellen vor und nach Modulation verglichen. Dazu wurden CD8 $\alpha\beta$  positive  $\gamma\delta$  T Zellen durch MACS gereinigt, 24 Stunden über immobilisierten mAk anti TCR mit anti CD28 als Kostimulus aktiviert und weitere 40 Stunden in Medium mit IL-2 kultiviert (Abbildung 11). Zellen, die danach CD8 $\beta$  positiv geblieben waren, wurden mittels durchflußzytometrischer Sortierung von denen getrennt, die CD8 $\beta$  moduliert hatten; aus beiden Populationen wurde RNA isoliert, um cDNA zu gewinnen. Die cDNA

der CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven Zellen wurde durch kompetitive PCR auf dieselbe Konzentration von  $\beta$ -Aktin cDNA eingestellt (nicht gezeigt). Schließlich wurde sowohl die Menge der CD8 $\beta$ , als auch der CD8 $\alpha$  mRNA durch PCR quantifiziert, indem die Zyklen in Fünferschritten von 20 auf 35 erhöht wurden (Abbildung 12). Für CD8 $\alpha$  tauchte bei beiden Subpopulationen eine Bande nach gleich vielen Zyklen auf; bei CD8 $\beta$  dagegen erschien die Bande für die an der Oberfläche CD8 $\alpha\beta$  tragenden Zellen wesentlich früher. Mit der cDNA der CD8 $\alpha\alpha$ -Population gab es erst nach 35 Zyklen eine sehr schwache Bande, die mit den ca. 2% verunreinigenden CD8 $\alpha\beta$  positiven Zellen erklärt werden kann. Die Menge der CD8 $\alpha$  mRNA war also in beiden Subpopulationen gleich, während CD8 $\beta$  mRNA nur in Zellen nachweisbar war, die den Rezeptor auch auf der Oberfläche trugen. Die CD8 $\beta$ -Modulation fand folglich prätranslational statt.

### 3.4.3 CD8 $\beta$ -Modulation nach verschiedenen Aktivierungsprotokollen

Wie in Abschnitt 3.4.1 gezeigt, wurde CD8 $\beta$  moduliert, wenn man mit immobilisiertem mAk anti TCR und löslichem mAk anti CD28 stimulierte. Die Modulation wurde aber auch nach anderen *in vitro* Aktivierungsprotokollen beobachtet. Tabelle 2 faßt die Daten für verschiedene Aktivierungsprotokolle zusammen: Wurden  $\gamma\delta$  T Zellen aus der Rattenmilz durch immobilisierten mAk anti TCR und Kosignal für 24 Stunden stimuliert, beobachtete man nach weiteren 40 Stunden Kultur eine Reduktion des Anteils CD8 $\beta$  positiver Zellen. Vor der Aktivierung waren  $76,5 \pm 4,0\%$  CD8 $\alpha\beta$  positiv. Wenn das Kosignal durch mAk anti CD28 vermittelt wurde, erhielt man mit nur noch  $44,1 \pm 12,1\%$  eine weit stärkere Reduktion CD8 $\beta$  positiver Zellen als mit IL-2 auf  $69,1 \pm 10,3\%$ . Auch eine Stimulation der Zellen durch PMA und Ionomycin führte zur Abnahme CD8 $\beta$  exprimierender



**Abbildung 12: Quantifizierung von CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$  mRNA in Zellen, die CD8 $\beta$  moduliert oder nicht moduliert haben.** Aktivierte  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden gewonnen wie für Abbildung 11 beschrieben. Die ein plus zwei Tage aktivierten Zellen wurden mit mAk anti TCR (V65), anti CD8 $\alpha$  (OX8) und anti CD8 $\beta$  (3.4.1) gefärbt (Abbildung 11, Bild unten links) und im Durchflußzytometer in die CD8 $\alpha\beta$  und die CD8 $\alpha\alpha$  exprimierenden Subpopulationen getrennt. RNA wurde gewonnen, revers transkribiert und die Konzentration der cDNA mit einer kompetitiven PCR auf dieselbe Konzentration von  $\beta$ -Aktin eingestellt. Durch PCR mit den angegebenen Zyklenzahlen wurde die mRNA für CD8 $\alpha$  (oben) und CD8 $\beta$  (unten) in beiden Subpopulationen quantifiziert.



Zellen auf  $58,0 \pm 2,8\%$ . Die  $\gamma/\delta$  T Zellen reagierten in allen drei unterschiedlichen *in vitro* Aktivierungen mit der Modulation von CD8 $\beta$ .

Stimulation durch	Korezeptor-Expression			
	CD8 $\alpha\beta$	CD8 $\alpha\alpha$	CD8 negativ	CD4 positiv
<b>anti TCR + anti CD28</b> [0,1 $\mu$ g/ml] (9 Experimente)	44,1 $\pm$ 12,1%	51,4 $\pm$ 10,4%	5,2 $\pm$ 2,4%	0,4 $\pm$ 0,4%
<b>anti TCR + IL-2</b> [100U/ml] (8 Experimente)	69,1 $\pm$ 10,3%	25,6 $\pm$ 10,1%	4,3 $\pm$ 1,8%	0,1 $\pm$ 0,3%
<b>PMA + Ionomycin</b> (2 Experimente)	58,0 $\pm$ 2,8%	38,0 $\pm$ 2,8%	4,5 $\pm$ 0,7%	*)
<b>Frisch isoliert aus der Milz</b> (8 Experimente)	76,5 $\pm$ 4,0%	12,5 $\pm$ 3,3%	9,9 $\pm$ 1,9%	1,1 $\pm$ 0,4%

**Tabelle 2: Korezeptorexpression nach unterschiedlichen *in vitro* Aktivierungsprotokollen.** Für alle Protokolle wurden T Zellen aus frisch isolierten Milzzellen durch TAC-Lyse und Nylonwollpassage gereinigt und einen Tag aktiviert. Nach der Aktivierung wurden die Zellen gewaschen, weitere zwei Tage in Medium mit 100U/ml IL-2 kultiviert und dann im Durchflußzytometer charakterisiert. Entweder wurden die Zellen über immobilisierten mAb gegen den  $\gamma/\delta$  TCR gereinigt und in Gegenwart von 0,1 $\mu$ g/ml mAb anti CD28 oder von 100U/ml IL-2 aktiviert, oder die Zellen wurden durch 20 Minuten Inkubation auf einer Schale mit immobilisiertem mAb anti CD4 (OX35) von CD4 positiven Zellen depletiert, und die CD8 positiven T Zellen mit den enthaltenen  $\gamma/\delta$  T Zellen durch Kultur in Medium mit 5ng/ml PMA und 400ng/ml Ionomycin aktiviert. Nach der Aktivierung wurden die prozentualen Anteile der Subpopulationen mit Dreifarbenfluoreszenzanalysen gegen den  $\gamma/\delta$  TCR (V65), CD8 $\alpha$  (OX8), CD8 $\beta$  (3.4.1) und CD4 (W3/25) bestimmt. Die Prozentzahlen entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  der Stichprobenstandardabweichung aus der angegebenen Anzahl von Experimenten.

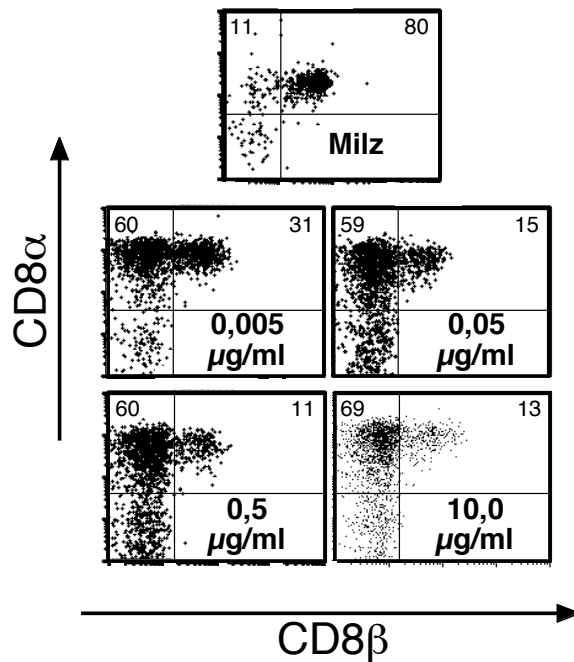
\*) Vor der Aktivierung wurde eine Depletion von CD4 positiven Zellen durchgeführt.

#### 3.4.4 Einfluß der Stärke des Aktivierungssignals auf die Modulation

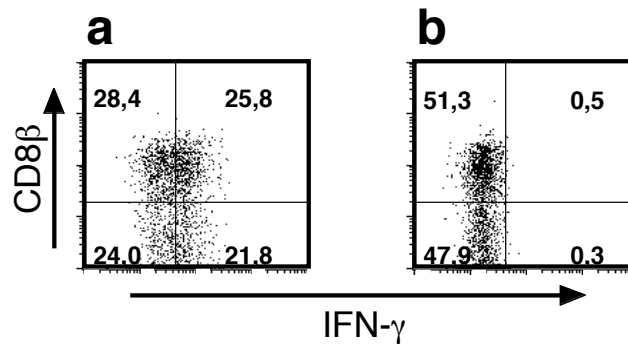
Nachdem, wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, qualitativ verschiedene Aktivierungsprotokolle zu unterschiedlich starker Modulation der CD8 $\beta$ -Expression führten, wurde getestet, ob die CD8 $\beta$ -Modulation durch quantitative Veränderungen des Aktivierungssignals beeinflusst werden kann. Die  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden hierzu über immobilisierten mAk gegen den TCR gereinigt und aktiviert. Damit die Zellen aufgereinigt werden konnten, war eine Reduktion der Menge dieses mAk kaum möglich, aber die Stärke des kostimulatorischen Signals konnte moduliert werden, indem die Konzentration des löslichen mAk gegen CD28 titriert wurde.

Tatsächlich war das Ausmaß der CD8 $\beta$ -Modulation bis zu einem Sättigungswert proportional zur Konzentration des mAk gegen CD28. Abbildung 13 zeigt ein für drei Experimente repräsentatives Ergebnis:  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden für 40 Stunden mit immobilisiertem mAk anti TCR in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von mAk anti CD28 aktiviert, dann für weitere 72 Stunden in Medium mit IL-2 kultiviert und im Durchflußzytometer analysiert. Der Anteil CD8 $\beta$  exprimierender Blasten sank von 31 auf 11%, wenn die Konzentration des mAk anti CD28 von 0,005 auf 0,5 $\mu$ g/ml erhöht wurde. Mit einer höheren Konzentration von mAk anti CD28 konnte die CD8 $\beta$ -Expression jedoch nicht weiter reduziert werden. Die Ergebnisse legen nahe, daß mit der Stärke des Kosignals der Anteil CD8 $\beta$  modulierender Zellen zunimmt.

Parallel zur Zunahme der CD8 $\beta$ -Modulation wurden auch Veränderungen in der Expression weiterer Oberflächenrezeptoren festgestellt: Mit von 0,005 über 0,05 und 0,5 auf 10 $\mu$ g/ml steigender Konzentration des mAk anti CD28 stieg der Anteil CD2 niedrig exprimierender aktivierter  $\gamma/\delta$  T Zellen von 8% über 18 und 24% auf 29% (Tabelle 3; vergleiche Abbildung16). Parallel entwickelte sich auch der Anteil der CD5 niedrig exprimierenden Zellen von 10% über 15 auf 22% (Tabelle 3). Das Ausmaß der Modulation aller drei Oberflächenrezeptoren zeigte Sättigungskurven, die exakt parallel zur entsprechenden Kurve für die Proliferation der Zellen verlaufen. Wie Tabelle 3 zeigt, stieg auch die Lebendzellzahl bei der Erhöhung der



**Abbildung 13: Einfluß der Konzentration von kostimulatorischem mAk anti CD28 auf das Ausmaß der Modulation von CD8 $\beta$ .** Frisch isolierte Milzzellen (oben) und dieselben Zellen nach Aktivierung für zwei Tage in Gegenwart der angegebenen Konzentration des mAk gegen CD28 (JJ319) und drei weiteren Tagen in IL-2-Medium wurden mit Dreifabenfluoreszenzanalysen im Durchflußzytometer charakterisiert. Die Zellen wurden mit mAk anti  $\gamma/\delta$  TCR (V65), anti CD8 $\alpha$  (OX8) und anti CD8 $\beta$  (3.4.1) gefärbt; für die frisch isolierten Milzzellen sind nur die  $\gamma/\delta$  TCR positiven gezeigt, die aktivierten Zellen waren zu über 98% rein.



**Abbildung 14: CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positive  $\gamma/\delta$  T Zellen produzieren gleich viel IFN- $\gamma$ .** Für zwei plus zwei Tage mit IL-2 als Kostimulus aktivierte  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden mit mAk gegen CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$  auf der Membran und intrazellulär gegen IFN- $\gamma$  gefärbt (a). Etwa 98% der Zellen waren CD8 $\alpha$  positiv. Die Spezifität der Färbung wurde, außer durch die Isotyp-Kontrollfärbung, durch Blockierung der Färbung mit nicht Fluoreszenzfarbstoff-konjugiertem mAk anti IFN- $\gamma$  gezeigt (b).

Konzentration des mAk gegen CD28 nur bis zu einem Sättigungswert, der bei 0,5µg/ml mAk gegen CD28 erreicht war. Die Stärke des Kosignals beeinflusste also die Proliferation und die Modulation von CD8β, CD2 und CD5 in gleicher Weise.

### 3.5 Funktionelle Charakterisierung der CD8-Subpopulationen

Da  $\gamma/\delta$  T Zellen die Expression der CD8β-Kette modulierten, stellte sich die Frage, ob mit der CD8β-Expression auch funktionelle Eigenschaften der Zellen verändert wurden. Als Effektorfunktionen aktivierter T Zellen wurden die Zytokinproduktion (Abschnitt 3.5.1) und die zytotoxischen Fähigkeiten (Abschnitt 3.5.2) von CD8αβ und CD8αα exprimierenden  $\gamma/\delta$  T Zellen verglichen. Schließlich wurde nach Unterschieden in der Expression der Membranrezeptoren CD2, NKR-P1A und des IL-15 Rezeptors gesucht (Abschnitt 3.5.3).

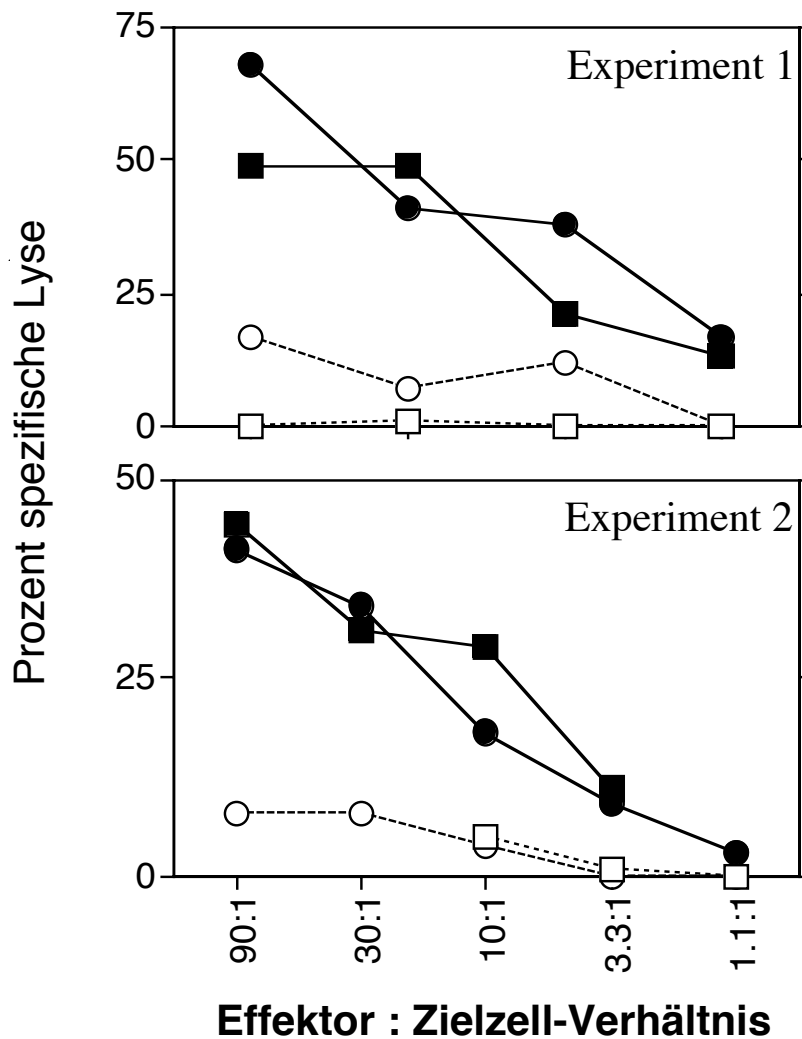
#### 3.5.1 IFN-γ-Produktion

Schon vor dieser Arbeit war bekannt, daß aktivierte  $\gamma/\delta$  T Zellen der Rattenmilz IFN-γ produzieren (Hoffmeyer 1994; McMenamin et al. 1995). Deshalb wurden  $\gamma/\delta$  T Zellen über immobilisierten mAk anti TCR in Gegenwart von IL-2 für zwei Tage aktiviert und weitere zwei Tage in Kultur gehalten. Danach wurden sie für vier Stunden mit PMA und Ionomycin restimuliert, gegen CD8α und CD8β auf der Zelloberfläche, sowie intrazellulär gegen IFN-γ gefärbt wie in Methoden beschrieben. Die Zellen waren zu diesem Zeitpunkt zu 99% positiv für eine der beiden CD8-Formen (nicht gezeigt). Unabhängig, ob sie CD8αβ oder CD8αα exprimierten, produzierten die restimulierten  $\gamma/\delta$  T Zellen IFN-γ, und aus beiden Populationen produzierten gleich viele Zellen das Zytokin, und zwar in derselben Höhe (Abbildung 14). Auch durch eine kompetitive RT-PCR mit cDNA aus durchflußzytometrisch getrennten CD8-Subpopulationen konnte kein Unterschied in der IFN-γ-Produktion festgestellt

werden (nicht gezeigt). Das Potential zur Produktion von IFN- $\gamma$  ist also nicht mit der Expression von CD8 $\alpha\beta$  oder CD8 $\alpha\alpha$  verknüpft.

### 3.5.2 Zytolytische Fähigkeiten

Die zweite wichtige Effektorfunktion von  $\gamma/\delta$  T Zellen ist die zytotoxische Aktivität. Deshalb wurden die zytotoxischen Fähigkeiten von CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  exprimierenden  $\gamma/\delta$  T Zellblasten verglichen. Die  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden über immobilisierten mAk anti TCR gereinigt, zwei Tage in Gegenwart von IL-2 aktiviert und für zwei oder drei Tage in Medium weiterkultiviert. Dann wurden die zu über 99% reinen  $\gamma/\delta$  T Zellblasten mit mAk gegen CD8 $\alpha$  und CD8 $\beta$  gefärbt, um durchflußzytometrisch CD8 $\alpha\alpha$  und CD8 $\alpha\beta$  positive Zellen zu gewinnen, deren Reinheit jeweils über 90% betrug. Die lytische Aktivität dieser Zellen, sowie von gefärbten, nicht sortierten und von ungefärbten Zellen wurde gegen Zielzellen gemessen, die mAk gegen den  $\gamma/\delta$  TCR oder irrelevanten mAk produzierten. Die durch den mAk anti  $\gamma/\delta$  TCR vermittelte lytische Aktivität von CD8 $\alpha\alpha$  und CD8 $\alpha\beta$  exprimierenden Zellen war gleich gut (Abbildung 16). Auch die ungetrennten und die ungefärbten Blasten zeigten etwa dieselbe Aktivität (nicht gezeigt); die Lyse von Kontrollzellen war gering (Abbildung 16). Im verwendeten System zeigten also beide CD8-Subpopulationen dieselben zytotoxischen Fähigkeiten.



**Abbildung 15: Zytotoxische Aktivität von CD8 $\alpha\beta$  positiven (Quadrate) und CD8 $\alpha\alpha$  positiven (Kreise)  $\gamma/\delta$  T Zellen.** Für zwei Tage mit immobilisiertem mAk anti TCR und IL-2-Kostimulus aktivierte und weitere zwei (Experiment 2) oder drei Tage (Experiment 1) mit IL-2 kultivierte  $\gamma/\delta$  T Zellen (>99% rein) wurden mit mAk gegen CD8 $\alpha$  und gegen CD8 $\beta$  gefärbt und im Durchflußzytometer in die beiden CD8-Subpopulationen getrennt. Die Verunreinigung durch die andere Subpopulation betrug unter 10%. Die Zellen wurden als Effektorzellen in den angegebenen Verhältnissen mit B-Zellhybridomen als Zielzellen gemischt, die entweder mAk gegen den  $\gamma/\delta$  TCR (V65; schwarz ausgefüllte Symbole) oder gegen den  $\alpha/\beta$  TCR (R73; offene Symbole) produzierten.

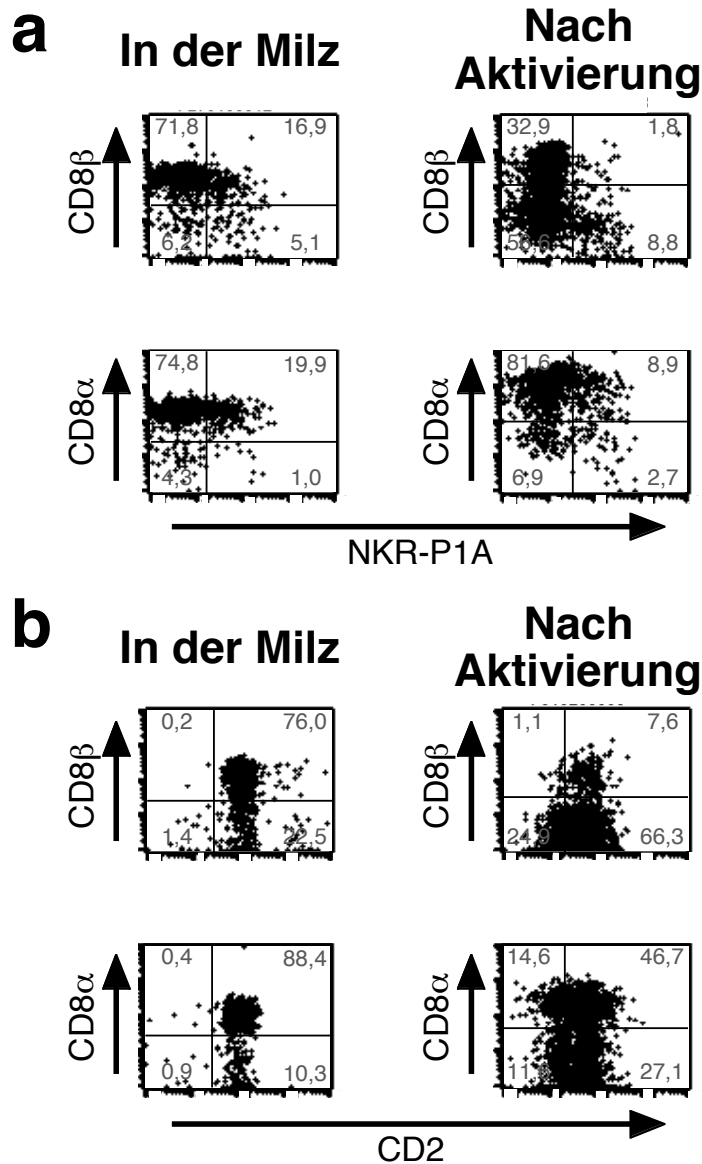
### 3.5.3 Expression der Membranrezeptoren CD2, NKR-P1A und des IL-15-Rezeptors

Nachdem sich in den vorhergehenden Abschnitten gezeigt hatte, daß CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  exprimierende  $\gamma/\delta$  T Zellen dieselben funktionellen Fähigkeiten besitzen, stellte sich die Frage, ob ihre Aktivierung unterschiedlich reguliert wird. Viele Membranrezeptoren beeinflussen die Aktivierung von Zellen; exemplarisch wurde die Expression von CD2, NKR-P1A und der IL-15-Rezeptors auf CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen verglichen.

CD2 kann wichtige kostimulatorische Signale liefern (Bachmann et al. 1999) und wurde von praktisch allen  $\gamma/\delta$  T Zellen in der Rattenmilz exprimiert (Abbildung 16b, links). Nach der Aktivierung *in vitro* und weiteren zwei oder drei Tagen in Medium mit IL-2 zeigte bis zu einem Drittel der  $\gamma/\delta$  T Zellblasten eine reduzierte CD2-Expression; von den CD8 $\alpha\beta$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen waren relativ weniger Zellen von der Modulation betroffen als von den übrigen Zellen. Relativ die meisten CD2 schwach positiven Zellen waren in der CD8 negativen  $\gamma/\delta$  T Zellpopulation zu finden (Abbildung 16b, rechts).

Auch NKR-P1A wirkt kostimulatorisch, durch seine Kreuzvernetzung kann man die Produktion von Zytokinen auslösen. Die Expression seiner Homologe in Maus und Mensch kann durch T Zellaktivierung moduliert (Chen et al. 1997; Ishihara et al. 2000) oder induziert (Azzoni et al. 1998; Poggi et al. 1999) werden, die Bedeutung dieser Änderungen ist aber noch unklar. In der Milz der LEW-Ratten waren mehr als 20% der  $\gamma/\delta$  T Zellen NKR-P1A positiv, CD8 $\alpha\beta$  zu unter 20% und CD8 $\alpha\alpha$  positive Zellen in höherem Ausmaß (Abbildung 16a, links). Nach der Aktivierung mit mAk anti CD28 (oder auch mit IL-2) als Kostimulus und zwei weiteren Tagen exprimierten insgesamt weniger  $\gamma/\delta$  T Zellen den NK-Rezeptor, wobei die NKR-P1A-Expression in beiden CD8-Subpopulationen stark abnahm (Abbildung 16a, rechts).

Über die Expression des IL-15-Rezeptors auf  $\gamma/\delta$  T Zellen ist bisher wenig bekannt. Dieser Rezeptor setzt sich aus der konstitutiv exprimierten gemeinsamen  $\gamma$ -Kette, der mit dem IL-2-Rezeptor geteilten  $\beta$ -Kette, die von den meisten  $\gamma/\delta$  T Zellen der Rattenmilz exprimiert wird (Park et al. 1996), und einer IL-15-spezifischen  $\alpha$ -Kette



**Abbildung 16: Die Expression von NKR-P1A (a) und CD2 (b) auf frisch aus der Milz isolierten  $\gamma/\delta$  T Zellen (links) und nach zwei plus zwei Tagen Aktivierung (rechts).** Milz-T Zellen wurden durch TAC-Lyse und Nylonwollpassage gereinigt und mit Dreifachfärbungen im Durchflußzytometer charakterisiert (links). Oder die T Zellen wurden mit immobilisiertem mAk anti  $\gamma/\delta$  TCR gereinigt und für zwei Tage in Gegenwart von mAk anti CD28 aktiviert, danach für weitere zwei (a) oder drei (b) Tage kultiviert, um dann ebenfalls im Durchflußzytometer charakterisiert zu werden (rechts). Die Färbungen wurden wie in Methoden beschrieben mit mAk gegen den  $\gamma/\delta$  TCR (V65), CD8 $\alpha$  (OX8) oder CD8 $\beta$  (3.4.1) und NKR-P1A (10/78), bzw. CD2 (OX34) durchgeführt. Bei den Milzzellen sind nur  $\gamma/\delta$  TCR-positive Zellen dargestellt; die aktivierten  $\gamma/\delta$  T Zellen waren zu über 99% rein. Zahlen geben den Prozentsatz der im jeweiligen Quadranten liegenden Zellen an.

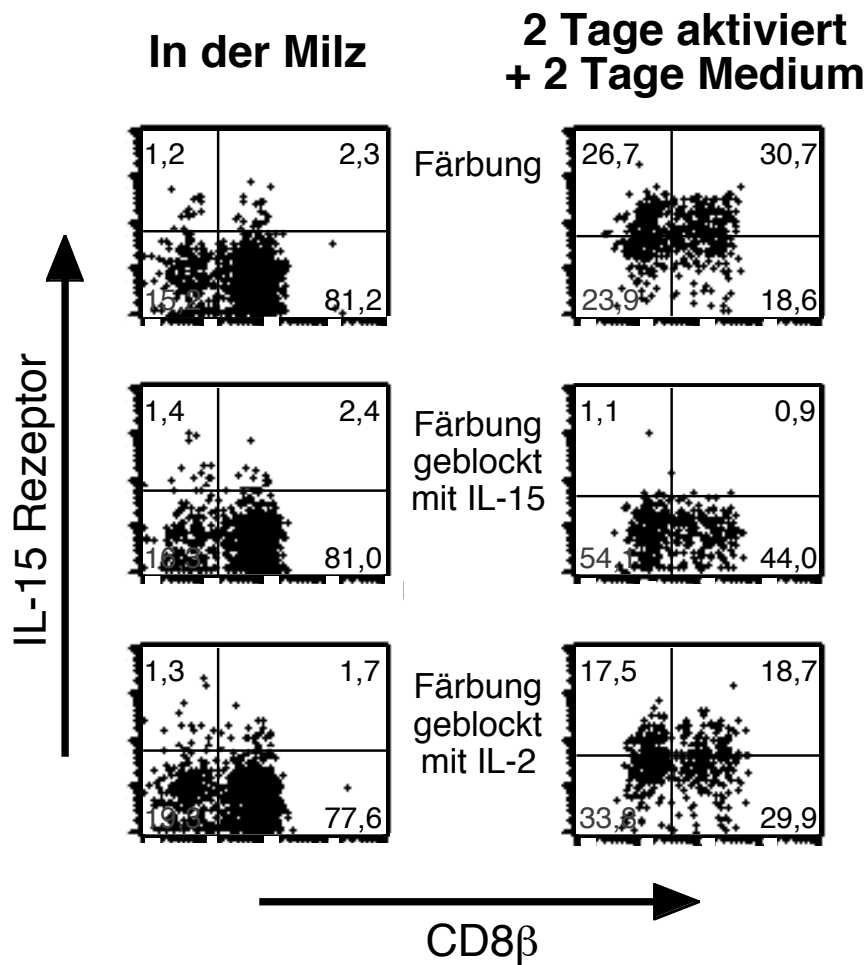


zusammen (Zusammenfassung bei Waldmann 1996). Um die Expression des Rezeptors zu studieren, wurden ruhende und aktivierte  $\gamma/\delta$  T Zellen mit fluorochrommarkiertem IL-15 gefärbt. Auf ruhenden  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden keine IL-15R positiven Zellen gefunden (Abbildung 17, links). Dagegen exprimierten fast alle  $\gamma/\delta$  T Zellen den IL-15-Rezeptor nach zwei Tagen Aktivierung in Gegenwart von IL-2 und zwei Tagen Kultur in IL-2-haltigem Medium, durch IL-2 ließ sich die Färbung des IL-15-Rezeptors nicht blockieren. Zwischen CD8 $\alpha\beta$  positiven und anderen  $\gamma/\delta$  T Zellen bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 17, rechts).

Die CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  exprimierenden  $\gamma/\delta$  T Zellen unterschieden sich also nicht in der Expression der IL-15-Rezeptors. Dagegen wurde eine stärkere Modulation von NKR-P1A sowie eine schwächere Modulation von CD2 auf aktivierten CD8 $\alpha\beta$  exprimierenden Zellen festgestellt als auf CD8 $\alpha\alpha$  positiven.

Konzentration des mAk anti CD28	Anteil niedrig CD2 exprimierend	Anteil niedrig CD5 exprimierend	Zellzahl nach 2 Tagen [x 10 <sup>6</sup> ]	Zellzahl nach 2+3 Tagen [x 10 <sup>6</sup> ]
0,005 $\mu$ g/ml	8%	10%	1,0	5,7
0,05 $\mu$ g/ml	18%	15%	1,7	8,3
0,5 $\mu$ g/ml	24%	22%	1,5	19,8
10 $\mu$ g/ml	29%	22%	1,6	21,3

**Tabelle 3: Einfluß der Korezeptorsignale auf den Anteil niedrig CD2 und CD5 exprimierender  $\gamma/\delta$  T Zellen und auf die Proliferation.** Mit immobilisiertem mAk anti  $\gamma/\delta$  TCR wurden  $\gamma/\delta$  T Zellen gereinigt und stimuliert. Als Kostimulus wurde jeweils die angegebene Konzentration von mAk anti CD28 ins Medium gegeben. Nach zwei Tagen wurden die Zellen geerntet, gezählt und für weitere drei Tage in Medium mit IL-2 kultiviert, danach wieder gezählt und im Durchflußzytometer auf die Expression von CD2 und CD5 analysiert. Die Zellen stammen aus demselben Experiment, das auch Abbildung 13 zeigt. Die CD2 negative Population ist beispielsweise in Abbildung 16 gut zu erkennen.



**Abbildung 17: Expression des IL-15-Rezeptors auf aktivierten, nicht auf ruhenden  $\gamma/\delta$  T Zellen.**

Milz-T Zellen wurden durch TAC-Lyse und Nylonwollpassage gereinigt und mit Dreifachfärbungen im Durchflußzytometer charakterisiert (linke Seite). Außerdem wurden  $\gamma/\delta$  T Zellen mit immobilisiertem mAk anti TCR gereinigt und für zwei Tage in Gegenwart von IL-2 aktiviert, danach für weitere zwei Tage in Medium mit IL-2 kultiviert. Auch die resultierenden Blasten wurden im Durchflußzytometer charakterisiert (rechts). Dazu wurden die zu 96% reinen  $\gamma/\delta$  T Zellblasten, bzw. die ruhenden Milz-T Zellen für 30 Minuten mit 1:10 verdünntem hitzeinaktiviertem humanem Serum inkubiert, bei Kontrollfärbungen waren gleichzeitig 2000U/ml IL-2 oder 200ng/ml IL-15 anwesend. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 30 Minuten gleichzeitig mit mAk gegen den  $\gamma/\delta$  TCR (V65-PE), mAk gegen CD8 $\beta$  (3.4.1-FITC) und biotinyliertem IL-15-Fusionsprotein inkubiert. Nach Waschen und Färbung mit red<sup>670</sup>-konjugiertem Streptavidin wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert. In den Abbildungen sind nur die  $\gamma/\delta$  T Zellen dargestellt. Zahlen geben den Prozentsatz der im jeweiligen Quadranten liegenden Zellen an.

### 4 Diskussion

Bei  $\alpha/\beta$  T Zellen ist die Expression von  $CD8\alpha\beta$  ein Erkennungszeichen thymisch gereifter MHC I restringierter Zellen. Da in den peripheren lymphoiden Organen der Ratte die meisten  $\gamma/\delta$  T Zellen ebenfalls diesen Rezeptor exprimieren (Abschnitt 3.1), stellt sich die Frage, ob auch die  $CD8\alpha\beta$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen Antigen MHC I restringiert erkennen. So könnte die  $CD8$ -Expression einen Ansatzpunkt für das Verständnis der immer noch unklaren Antigenerkennung von  $\gamma/\delta$  T Zellen bieten. In dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, welche Rolle  $CD8$  bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen spielt. Zwar kann  $CD8$  auf  $\gamma/\delta$  T Zellen dieselben Signale vermitteln wie auf  $\alpha/\beta$  T Zellen (Abschnitt 4.1), aber Untersuchungen zur TCR-Struktur sprechen gegen eine klassische MHC-Restriktion  $CD8$  positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen (Abschnitt 4.2). Im Unterschied zu  $\alpha/\beta$  T Zellen zeigen  $\gamma/\delta$  T Zellen mit der Modulation der  $CD8\beta$ -Kette eine bisher nicht beschriebene Eigenschaft (Abschnitt 4.3).

Schließlich werden die mögliche Rolle von  $CD8$  für die Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen und die Unterschiede in der  $CD8$ -Expression von Maus und Ratte diskutiert (Abschnitt 4.4).

#### 4.1 Vergleich von $CD8$ auf $\alpha/\beta$ und $\gamma/\delta$ T Zellen

Auf MHC I restringierten  $\alpha/\beta$  T Zellen fungiert  $CD8\alpha\beta$  als Korezeptor bei der Antigenerkennung. Wenn  $CD8$  auf  $\gamma/\delta$  T Zellen dieselbe Funktion hat, sollten sowohl die exprimierte  $CD8$ -Isoform als auch die von  $CD8$  vermittelten Signale gleich sein. Wie auf  $\alpha/\beta$  T Zellen würde  $CD8$  bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen mit dem TCR und dem erkannten Antigen interagieren.

In der Ratte kann  $CD8$  von verschiedenen Zellen in unterschiedlichen Isoformen exprimiert werden. Da die zu 90%  $CD8$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen der Rattenmilz zum allergrößten Teil das  $CD8\alpha\beta$  Heterodimer exprimieren (Abschnitt 3.1), wäre es

denkbar, daß CD8 $\alpha\beta$  auf  $\gamma\delta$  T Zellen einzigartige Eigenschaften besitzt. Tatsächlich ist in der Ratte neben der CD8 $\alpha\beta$ -Isoform der  $\alpha\beta$  T Zellen eine anscheinend anders glycosylierte Isoform bekannt, die auf peritonealen und alveolaren Makrophagen sowie auf alveolaren Mastzellen zu finden ist; dort löst das Kreuzvernetzen von CD8 die Produktion von Zytokinen und NO aus (Hirji et al. 1999).

Auf  $\gamma\delta$  T Zellen entsprach CD8 in allen untersuchten Eigenschaften der Isoform der  $\alpha\beta$  T Zellen: Zum einen bindet ein mAk gegen die V-artige Domäne von CD8 $\alpha$  (G28) gleichermaßen an  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T Zellen (nicht gezeigt), während er wohl wegen einer anderen Glykosylierung CD8 $\alpha$  auf Makrophagen und Mastzellen nicht erkennt (Lin et al. 1998). Keine Unterschiede zwischen der CD8-Isoform der  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T Zellen wurden auch mit dem mAk OX8, dessen Epitop auf der „*hinge*“-Domäne von CD8 $\alpha$  liegt (Classon et al. 1992), sowie mit 3.4.1 und Rib6/1 gefunden, die beide ein überlappendes Epitop des CD8 $\alpha\beta$  Heterodimer erkennen (FACS Färbungen nicht gezeigt). Im Immunblot gegen CD8 $\alpha$  sind die Banden von  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T Zellysaten gleich.

Intrazellulär ist CD8 auf  $\alpha\beta$  T Zellen, aber nicht bei Makrophagen und Mastzellen mit LAT und p56<sup>lck</sup> assoziiert (Bosselut et al. 1999; Hirji et al. 1999). Eine molekulare Analyse mittels Immunblots und *in vitro* Kinase-Detektionen zeigte, daß sich CD8 von  $\gamma\delta$  und  $\alpha\beta$  T Zellen auch in Bezug auf die p56<sup>lck</sup>-Bindung nicht unterscheidet (Abschnitt 3.1.2). Bei beiden T Zelllinien konnte CD8 $\alpha$  mit p56<sup>lck</sup> kopräzipitiert, und Kinaseaktivität nachgewiesen werden. Dementsprechend wurde auch bei den  $\gamma\delta$  T Zellen keine Assoziation von CD8 mit p59<sup>fyn</sup> festgestellt, ebenfalls einer src-Kinase, die bei der Thymusentwicklung von T Zellen die Funktion von p56<sup>lck</sup> teilweise übernehmen kann (van Oers et al. 1996) und die mit der CD8-Form von Makrophagen und Mastzellen assoziiert sein könnte.

Auf der nächsthöheren Komplexitätsebene wurde geprüft, ob CD8 auf intakten  $\alpha\beta$  und  $\gamma\delta$  T Zellen die gleichen Signale vermittelt. Sowohl bei  $\alpha\beta$  T wie bei  $\gamma\delta$  T Zellen konnten Antikörper gegen CD8 positive Signale für das Überleben von Zellen liefern, die nach einem Signal über den TCR alleine sonst relativ schnell gestorben wären (Abschnitt 3.2.2). Folglich spielen CD8-Signale eine Rolle im Zusammenhang mit  $\gamma\delta$  TCR-vermittelten Signalen.

CD8 ist auf  $\gamma/\delta$  T Zellen also sowohl serologisch als auch, soweit untersucht, in der Signalübertragung mit der Form der  $\alpha/\beta$  T Zellen identisch. Aber die Daten lassen keine Schlüsse zu, ob  $\gamma/\delta$  T Zellen das Protein als Korezeptor bei der TCR vermittelten Aktivierung exprimieren oder als einen kostimulatorischen Rezeptor. Sollte CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen analog zu den  $\alpha/\beta$  T Zellen der Korezeptor sein, würde bei der antigenabhängigen Aktivierung eine Kolokalisation von CD8 mit dem  $\gamma/\delta$  TCR stattfinden, um die assoziierten signalübertragenden Proteine direkt in die Nähe des TCR zu bringen. Ohne die Kenntnis von Antigenen für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte mußte diese Assoziation indirekt nachgeprüft werden.

Ein erster experimenteller Ansatz orientierte sich an publizierten Experimenten mit  $\alpha/\beta$  T Zellen der Maus. Wird auf diesen Zellen mit mAk entweder der TCR oder CD8 kreuzvernetzt, entsteht ein sogenanntes Cap auf der Zellmembran. Nach TCR-Kreuzvernetzung wird auch CD8 im Cap gefunden, und im mit mAk anti CD8 erzeugten Cap ist der  $\alpha/\beta$  TCR kolokalisiert (Kwan Lim et al. 1998). Aus nicht näher bekannten experimentellen Gründen war es aber auch bei  $\alpha/\beta$  T Zellen der Ratte nicht möglich, eine Kolokalisation von CD8 und TCR nachzuweisen.

Als zweites wurde die Proteinstruktur der TCR $\delta$ -Kette untersucht, um Aussagen über die Interaktion von CD8 und TCR zu ermöglichen. B. Arden hat durch Analyse der bekannten Aminosäuresequenzen von TCR und BCR V-Segmenten der Maus ein Aminosäuremotiv gefunden, von dem er vorschlägt, daß es eine direkte Interaktion zwischen TCR und CD8 ermögliche. Das sogenannte KEK-Motiv (Aufeinanderfolge von Lysin (K), Glutaminsäure (E) und Lysin), dessen minimale Ausprägung das Lysin an der Aminosäureposition 56 (nach Ardens Nomenklatur) am Rand des CDR2 der TCR $\alpha$ , bzw. TCR $\delta$ -Kette sei, führe zu einer Interaktion zwischen der nach außen gerichteten positiven Ladung des Lysin mit negativen Resten der CD8-Glykosylierung (Arden 1998). Leider wird diese These bisher durch keine experimentellen Daten gestützt. Wenn Ardens Hypothese zutrifft und sich Maus und Ratte in dieser Eigenschaft nicht unterscheiden, sollte man in DV-Segmenten der Ratte häufiger Lysin 56 finden als bei der Maus, wenn CD8 als Korezeptor mit dem  $\gamma/\delta$  TCR interagiert. Im DBA/2-Mausstamm tragen drei von sechs ADV7-Segmenten, aber nicht DV105 das entsprechende Lysin. Jedoch wurde es weder in

den fünf klonierten ADV7, noch im DV105-Gensegment der Ratte gefunden (Abschnitt 3.3.1.2). Da es keine experimentellen Daten gibt, die Ardens Theorie stützen, kann man aber aus dem Fehlen von Lysin 56 nichts über die Möglichkeit einer Assoziation von CD8 mit dem  $\gamma/\delta$  TCR schlußfolgern.

Es gibt nämlich einige experimentell besser belegte Hypothesen zur Interaktion von CD8 und  $\alpha/\beta$  TCR, die nicht in Einklang mit Arden sind. So haben Janeway und Kollegen in AV-Segmenten der Maus zwei andere Motive gefunden, die eine extrazelluläre Interaktion der TCR $\alpha$ -Kette mit CD4, bzw. CD8 ermöglichen könnten. Diese Motive sind nicht direkt in der Aminosäuresequenz erkennbar, sondern ergeben ein konformationales Epitop. Zumindest einige der TCR $\alpha$ -Ketten mit nur einem der beiden Motive assoziieren bevorzugt mit dem Korezeptor, der zum verbliebenen Motiv paßt (Janeway et al. 1996). Für menschliches CD8 gibt es keine meßbare Bindung der extrazellulären Bereiche von TCR und CD8 (persönliche Mitteilung Alexandre Arcaro, Ludwig-Institut für Krebsforschung, Epalinges, Schweiz). Dagegen ist eine intrazelluläre Interaktion über eine Bindung des CD8-assoziierten p56<sup>lck</sup> an TCR-assoziiertes Zap-70 beschrieben (Thome et al. 1996). Davon unabhängig gibt es vermutlich eine Interaktion zwischen der intrazellulären Domäne von CD8 $\beta$  und dem  $\alpha/\beta$  TCR (persönliche Mitteilung Alexandre Arcaro, Ludwig-Institut für Krebsforschung, Epalinges, Schweiz).

Zur Bedeutung von CD8 als möglichem Korezeptor von  $\gamma/\delta$  T Zellen sind also in dieser Arbeit einige Fragen geklärt worden, andere sind noch unbeantwortet. CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen ist serologisch nicht unterscheidbar von der Isoform der  $\alpha/\beta$  T Zellen, ist mit aktivem p56<sup>lck</sup> assoziiert und vermittelt auf  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen ähnliche, vielleicht dieselben Signale. Es wäre aber noch zu klären, ob bei der Antigenerkennung CD8 mit dem  $\gamma/\delta$  TCR assoziiert und so die frühen TCR-Aktivierungssignale verstärkt werden; man könnte z.B. die LAT-Rekrutierung zum TCR oder die ZAP-70-Phosphorylierung messen. Schließlich ist noch die Frage offen, ob die CD8 positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen MHC I-retringiert sind.

### 4.2 TCR-Strukturdaten sprechen gegen eine klassische MHC I-Restriktion

CD8 besaß in allen untersuchten Punkten auf  $\gamma/\delta$  T Zellen die gleichen Eigenschaften wie auf  $\alpha/\beta$  T Zellen und könnte deshalb auch der Korezeptor des  $\gamma/\delta$  TCR sein. Weil CD8 als Korezeptor des  $\alpha/\beta$  TCR gemeinsam mit dem TCR an MHC I bindet, stellt sich die Frage, ob auch CD8 positive  $\gamma/\delta$  T Zellen eine MHC I-restringierte Antigenerkennung aufweisen.

Mangels bekannter Antigene für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte wurde die Antigenerkennung indirekt über die Struktur der Antigen bindenden CDRs (englisch: *complementarity determining regions*) untersucht. Da CDR3 der jeweiligen schweren Kette der Immunrezeptoren von der Verknüpfungsregion der V, D und J-Gensegmente kodiert wird, sind theoretisch sehr verschiedene CDR3-Längen möglich. Die TCR $\beta$ -Kette weist aber wegen der MHC-Restriktion nur ein eingeschränktes Spektrum mit kurzem CDR3 auf (Rock et al. 1994). Zwar sind alloreaktive  $\alpha/\beta$  TCR beschrieben, die mitunter CDR3-Längen von 13 oder auch 16 Aminosäuren aufweisen können; diese CDR3-Proteinschleifen sind aber zu lang, um noch mit dem antigenen Peptid interagieren zu können, und binden allein an den fremden MHC (persönliche Mitteilung Bernard Malissen, Centre d'Immunologie INSERM-CNRS, Marseille-Luminy). Wenn CD8 $\alpha/\beta$  positive  $\gamma/\delta$  T Zellen in klassischer Weise MHC-restringiert Antigen erkennen, sollten die CDR3 $\delta$ -Schleifen ähnlich kurz sein wie üblicherweise bei der TCR $\beta$ -Kette.

Um CDR3-Längen zu messen, wurden Spektrotyp-Analysen durchgeführt, die einen Überblick über die CDR3-Längen ganzer Zellpopulationen bieten. Da sie auf PCR mit Primern links und rechts vom CDR3 basieren, muß man die Sequenz der (A)DV-Segmente kennen. Bei  $\gamma/\delta$  T Zellen können außerdem nicht willkürliche DV-Gensegmente für die Spektrotypanalysen verwendet werden, weil auch in den peripheren lymphoiden Organen einige Gensegmente bevorzugt exprimiert sind, während man andere kaum nachweisen kann. Da keine Untersuchungen zur DV-Segmentbenutzung in der Rattenmilz vorlagen, aber bekannt ist, daß in peripheren lymphoiden Organen der Maus bevorzugt ADV7, DV104 und DV105 exprimiert

werden (Haas et al. 1992; Pereira et al. 2000), wurde auch in der Ratte von der Präferenz dieser Gensegmente ausgegangen. DV105 und ADV7-Gensegmente wurden partiell kloniert und sequenziert, und es wurden starke Sequenzhomologien zwischen den entsprechenden Gensegmenten von Maus und Ratte festgestellt (Abschnitt 3.3.1.1; aus Gründen der Übersichtlichkeit werden diese Sequenzen nicht hier, sondern im Ergebnisteil besprochen). Zusätzlich fanden sich im Lauf der Analysen starke Indizien, daß DV105 und Segmente aus der ADV7-Familie auch in der Rattenmilz sehr häufig sind (Abschnitt 3.3.6), die Analysen der ADV7 und DV105 enthaltenden CDR3-Längen sind folglich repräsentativ für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Rattenmilz.

Spektratyp-Analysen für vier verschiedene BV-Segmente zeigten jeweils das eingeschränkte Spektrum mit kurzem CDR3 (im Durchschnitt 9 Aminosäuren), das schon von Maus und Mensch bekannt ist (Candéias et al. 1991; Pannetier et al. 1993; Rock et al. 1994). Trotz der CD8-Expression der  $\gamma/\delta$  T Zellen war CDR3 $\delta$  der Ratte wesentlich länger (im Durchschnitt 15 bis 16 Aminosäuren) als CDR3 $\beta$  und das Längenspektrum für CDR3 $\delta$  breiter als bei CDR3 $\beta$  (Abschnitt 3.3.2). Die Analyse von aufgereinigten CD8 $\alpha\beta$  und CD8 $\alpha\alpha$  positiven sowie CD8 negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen zeigte dasselbe Längenspektrum in allen drei Subpopulationen (Abschnitt 3.3.3). Da die Spektratyp-Analysen auf der gegen kleine Verunreinigungen sehr empfindlichen PCR basieren, war der Befund wichtig, daß innerhalb der Subpopulationen sowohl der Anteil DV105, als auch ADV7 exprimierender Zellen jeweils etwa gleich groß war (Abschnitt 3.3.1.3). Also haben  $\gamma/\delta$  T Zellen unabhängig von der CD8-Expression absolut dieselbe CDR3-Länge und wahrscheinlich auch dieselbe Art der Antigenerkennung.

Ein direkter Vergleich der CDR3 $\delta$ -Längen von Maus und Ratte (Abschnitt 3.3.4) zeigte die Zuverlässigkeit der Spektratyp-Analysen, da für die Maus das identische ADV7 CDR3-Längenspektrum erhalten wurde wie bei Gerber et al. 1999 beschrieben (Längenangaben persönliche Mitteilung Pablo Pereira, Institut Pasteur, Paris). In beiden Spezies war das DV105-Spektrum im Durchschnitt eine Aminosäure kürzer als das ADV7-Spektrum. Eine Korrelation von DV-Segment und CDR3-Länge ist für die Maus schon von Weber-Arden et al. beschrieben worden (Weber-Arden et al.



2000), und auch für BV-Segmente der Maus ist eine Korrelation der CDR3-Länge mit bestimmten V-Segmenten bekannt (Pannetier et al. 1993).

Betrachtet man die CDR3-Längenspektren von Maus und Ratte im Detail, werden kleine Unterschiede deutlich: Sowohl für DV105, als auch für ADV7-TCR ist das Längenspektrum bei der Maus nicht ganz so breit gefächert wie bei der Ratte; vor allem die Längeren CDR3 fehlen. Deshalb sind die CDR3 $\delta$ -Längen der Ratte im Schnitt ein bis zwei Aminosäuren länger als bei der Maus und ähneln mehr denen des Menschen (Rock et al. 1994). Obwohl sie CD8 exprimieren, haben also die  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte etwa das gleiche CDR3 $\delta$ -Längenspektrum wie die meist CD4 und CD8 doppelt negativen, nicht klassisch MHC I restringierten (Zusammenfassung in Davis et al. 1995; Chien et al. 1996)  $\gamma/\delta$  T Zellen von Maus und Mensch (Rock et al. 1994) und wie  $\gamma/\delta$  T Zellen des Schafs (Hein et al. 1993). So wie die MHC-Restriktion in allen Spezies kurze CDR3 $\beta$ -Längen bewirkt, folgt wohl auch die Antigenerkennung der  $\gamma/\delta$  T Zellen speziesübergreifend denselben Prinzipien.

Die Spektratyp-Analyse von Thymozyten zeigte darüber hinaus, daß das CDR3 $\delta$ -Längenspektrum der Milz nicht durch eine Selektion geformt wurde, denn auch unselektierte CDR3 $\delta$ -Spektren besaßen dieselbe Verteilung (Abschnitt 3.3.3.5). Daraus kann man folgern, daß die CDR3 $\delta$ -Längenunterschiede zwischen Maus und Ratte schon bei der Gensegmentrekombination entstehen. Die Sequenzen der ADV7- und DV105-Klone erbrachten keine Hinweise auf längere genomische DV- oder DJ-Sequenzen der Ratte, aber erst ein Vergleich der genomischen Sequenzen kann dies abschließend klären. Möglicherweise gibt es bei der Rekombination der Gensegmente, also im Gleichgewicht zwischen der Aktivität von Exonukleasen und der Terminalen Desoxyribonukleotid-Transferase Unterschiede zwischen Ratte und Maus. Wie bei der Maus (Weber-Arden et al. 2000) entstehen wohl auch bei der Ratte ADV7 und DV105 exprimierende  $\gamma/\delta$  T Zellen spät in der Ontogenie, wenn maximale CDR3-Längen möglich sind.

Obwohl  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte CD8 $\alpha\beta$  exprimieren, besitzen sie dieselben CDR3 $\delta$ -Längen, dieselbe Antigen bindende Struktur wie die  $\gamma/\delta$  T Zellen anderer Spezies. Zumindest für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus konnte eine mit den Antikörpern vergleichbare Erkennung von dreidimensionalen Strukturen gezeigt werden (Schild et al. 1994),

und die CDR3 $\delta$ -Längen legen diese Art der Antigenerkennung auch für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte nahe.

Obwohl keine klassische MHC I-Erkennung wie bei CD8 positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen gefunden wurde, spielen möglicherweise MHC I-artige Proteine eine wichtige Rolle bei der Antigenerkennung CD8 positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen. Diese MHC-Moleküle müßten nicht unbedingt Antigene präsentieren, sondern sie selbst könnten das Antigen darstellen; für einige nicht-klassische MHC I-Moleküle konnte sogar eine Interaktion mit CD8 gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.4). Obwohl CD8 $\alpha\beta$  positive  $\gamma/\delta$  T Zellen keine klassische MHC I-Restriktion besitzen, könnte CD8 also trotzdem die Rolle eines Korezeptors bei der Antigenerkennung spielen.

### 4.3 Modulation der CD8 $\beta$ -Kettenexpression

Da weiter offen bleiben muß, ob CD8 auch auf  $\gamma/\delta$  T Zellen ein Korezeptor des TCR ist, bleibt auch die Bedeutung einer besonderen Eigenschaft der  $\gamma/\delta$  T Zellen unklar: Nach Aktivierung können  $\gamma/\delta$  T Zellen die Expression der CD8 $\beta$ -Kette modulieren, so daß sie nur noch CD8 $\alpha\alpha$  exprimieren. Schon Hoffmeyer hatte Hinweise auf die CD8 $\beta$ -Modulation der  $\gamma/\delta$  T Zellen gefunden (Hoffmeyer 1994), in der vorliegenden Arbeit wurde sie im Detail untersucht.

Zunächst wurden die Signale charakterisiert, die zur CD8 $\beta$ -Modulation führen. Durch Stimulation mit Phorbol ester und Ionophor wurde gezeigt, daß die Modulation nicht eine besondere Eigenschaft des zur Stimulation benutzten mAk gegen den  $\gamma/\delta$  TCR (V65) ist (Abschnitt 3.4.3). Mit gereinigten CD8 $\alpha\beta$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen konnte dann der Nachweis geführt werden, daß tatsächlich die CD8 $\beta$ -Expression moduliert wird und das Verschwinden von CD8 $\beta$  nicht etwa mit besserer Vermehrung der CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen erklärbar ist (Abschnitt 3.4.1). Durch semiquantitative RT-PCR wurde nachgewiesen, daß Zellen, die CD8 $\beta$  von der Oberfläche moduliert hatten, auch keine CD8 $\beta$  mRNA mehr enthielten (Abschnitt

3.4.2). Die Modulation von CD8 $\beta$  fand also auf Ebene der mRNA statt, und sie war nicht reversibel, zumindest wurden keine Kulturbedingungen gefunden, mit denen man den Anteil CD8 $\beta$  positiver Zellen wieder erhöhen konnte.

Umgekehrt hängt die Effektivität der CD8 $\beta$ -Modulation zumindest teilweise von der Stärke des Aktivierungssignals ab, denn parallel zur Titration des kostimulatorischen mAk gegen CD28 nahm die CD8 $\beta$ -Modulation bis zu einem Sättigungswert zu. Verschiedene Stimulationsprotokolle unterschieden sich in diesem Sättigungswert, d.h. im Ausmaß der induzierten CD8 $\beta$ -Modulation. Bei Aktivierung durch immobilisierten mAk gegen den  $\gamma/\delta$  TCR bewirkte Kostimulation in Form von IL-4 eine etwa so effektive Abnahme von CD8 $\beta$  wie Kosignale durch mAk gegen CD28 (nicht gezeigt). IL-2 als Kostimulus induzierte auf weniger Zellen eine CD8 $\beta$ -Modulation (Abschnitt 3.4.3); allerdings muß berücksichtigt werden, daß rekombinantes humanes IL-2 benutzt wurde und nicht IL-2 der Ratte, das vielleicht effektivere Kosignale vermitteln könnte. Interessanterweise verschwanden die CD8 $\beta$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen nie völlig, und z.B. die gleichzeitige Gabe von IL-4 und mAk gegen CD28 konnte keine weitere Reduktion bewirken (nicht gezeigt).

Bisher gibt es zwar keine Beobachtung der CD8 $\beta$ -Modulation *in vivo*; weil sie aber *in vitro* mit verschiedenen Aktivierungsprotokollen gefunden wird, ist dieser Effekt möglicherweise auch bei einer antigenvermittelten Aktivierung *in vivo* relevant. Die CD8 $\alpha\alpha$  positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen, die man zu unterschiedlichen Anteilen in den peripheren lymphoiden Organen der Ratte findet, könnten von aktivierten, ehemals CD8 $\alpha\beta$  positiven Zellen stammen. Jedenfalls kann man aus der CD8 $\alpha\alpha$ -Expression bei  $\gamma/\delta$  T Zellen keine Rückschlüsse auf eine mögliche extrathymische Reifung ziehen. Weitergehende Untersuchungen zur Modulation von CD8 $\beta$  *in vivo* würden durch die Entdeckung von Antigenen für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte erleichtert.

Nach der Charakterisierung der Signale, die zur CD8 $\beta$ -Modulation führen, stellt sich die Frage nach einem möglichen Sinn der Modulation. Wenn CD8 der Korezeptor des  $\gamma/\delta$  TCR oder ein kostimulatorischer Rezeptor wäre, hätte der Verlust der CD8 $\beta$ -Kette eine Abschwächung der CD8-Kosignale zur Folge. CD8 $\alpha\alpha$  bindet nämlich MHC I mit kaum schwächerer Affinität (Garcia et al. 1996), aber CD8 $\alpha\beta$  kann

effektiver Kosignale vermitteln (Irie et al. 1995; Bosselut et al. 1999; Bosselut et al. 2000). Die CD8 $\alpha\alpha$ -Expression könnte also eine Erhöhung des Schwellenwerts für die Aktivierung der  $\gamma\delta$  T Zellen bedeuten.

Andererseits könnte die CD8 $\beta$ -Modulation mit einer veränderten Funktion der Zellen in Zusammenhang stehen. Für CD8 $\alpha\beta$  positive  $\alpha\beta$  T Zellen sind nämlich *in vitro* Aktivierungsprotokolle beschrieben, die zum Verlust der CD8-Expression und gleichzeitig zu erheblichen funktionellen Veränderungen führen (Erard et al. 1993; Mehal et al. 1998). Außerdem geht die periphere Inaktivierung von CD8 positiven  $\alpha\beta$  T Zellen in bestimmten Fällen mit dem Verlust der CD8-Expression einher (Davignon et al. 1985; Arnold 1991; Schönrich et al. 1992; Pestano et al. 1999; Mixer et al. 1999).

Um mögliche Auswirkungen der CD8 $\beta$ -Modulation auf die Funktion der  $\gamma\delta$  T Zellen zu bestimmen, wurden mit der Produktion von IFN- $\gamma$  und der zytotoxischen Aktivität typische Effektorfunktionen gemessen. Doch weder die Fähigkeit zur Produktion von Zytokinen (Abschnitt 3.5.1), noch das zytotoxische Potential der Zellen (Abschnitt 3.5.2) wurden durch die CD8 $\beta$ -Modulation verändert. Demnach sind  $\gamma\delta$  T Zellen nach der CD8 $\beta$ -Modulation nicht inaktiviert, sondern besitzen noch dieselben funktionellen Fähigkeiten wie die CD8 $\beta$  positiven Ausgangszellen. Diese Ergebnisse schließen auch aus, daß die Fähigkeit zur CD8 $\beta$ -Modulation die Eigenschaft einer funktionellen Subpopulation der  $\gamma\delta$  T Zellen ist. Dazu paßt auch, daß die ADV7- und DV105-Gensegmente in den CD8 $\beta$  modulierenden und nicht modulierenden  $\gamma\delta$  T Zellen gleich häufig benutzt wurden (Abschnitt 3.3.1.3). Da die Antigenerkennung für die Aktivierung im verwendeten *in vitro* System keine Rolle spielte, waren die CDR3-Längenspektren nach der Modulation nicht verändert (Abschnitt 3.3.3). *In vivo* würden Antigene, die mit hoher Affinität erkannt werden, eher zum Verlust von CD8 $\beta$  führen als mit geringer Affinität gebundene, so daß in den CD8-Subpopulationen unterschiedliche CDR3-Längenspektren entstehen könnten.

Vorausgesetzt, daß CD8 überhaupt eine Bedeutung für  $\gamma\delta$  T Zellen hat, welche Auswirkungen könnte die CD8 $\beta$ -Modulation haben? Es besteht die Möglichkeit, daß mit dem Verlust von CD8 $\beta$  der Schwellenwert für eine zweite Aktivierung erhöht

wird. Dies würde indirekt auch die Funktion der betroffenen Zellen verändern, denn man muß beachten, daß alle Funktionstests dieser Arbeit nach einem starken polyklonalen Aktivierungssignal durchgeführt wurden. Im Fall einer antigenvermittelten T Zellaktivierung könnte die Modulation der CD8 $\beta$ -Kettenexpression durch eine Abschwächung von Kosignalen kleine funktionelle Veränderungen vermitteln. Zum Beispiel kann ein  $\alpha/\beta$  T Zellklon, der normalerweise Zielzellen über Fas und Perforin tötet, bei schwächeren Aktivierungssignalen nur eine Fas-abhängige Lyse bewirken (Kessler et al. 1998).

Sollte CD8 auch bei  $\gamma/\delta$  T Zellen ein Korezeptor bei der Antigenerkennung sein, wären diese nach der CD8 $\beta$ -Modulation wohl vor allem schwerer aktivierbar. In der Literatur finden sich Hinweise für eine entsprechende Abnahme der Aktivierbarkeit von menschlichen  $\gamma/\delta$  T Zellen, die allerdings weder CD4 noch CD8 $\alpha\beta$  exprimieren. Bürk und Kollegen beobachteten bei diesen  $\gamma/\delta$ , aber nicht bei  $\alpha/\beta$  T Zellen nach Aktivierung *in vitro* einen gestiegenen Schwellenwert für eine zweite Aktivierung. Sie vermuten sogar, daß die  $\gamma/\delta$  T Zellen die Expression eines unbekanntes Korezeptors modulieren könnten (Bürk et al. 1997), aber auch eine verstärkte Expression inhibitorischer Rezeptoren wäre denkbar.

In der vorliegenden Arbeit wurden tatsächlich neben der CD8 $\beta$ -Modulation weitere Hinweise darauf gefunden, daß  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte nach ihrer Aktivierung kostimulatorische Rezeptoren modulieren können. So exprimieren fast alle  $\gamma/\delta$  T Zellen in der Rattenmilz CD2, die meisten auch CD5. Nach der Aktivierung *in vitro* stieg der Anteil CD5 nur noch niedrig exprimierender  $\gamma/\delta$  T Zellen (Straube 1996), und es bildete sich eine Population CD2 niedrig exprimierender Zellen (Abschnitt 3.5.3); die Expression beider Marker blieb dauerhaft reduziert. Während die Bedeutung von CD2 als kostimulatorischer Rezeptor gut belegt ist (Bachmann et al. 1999), bleibt strittig, ob CD5 bei der T Zellaktivierung eher inhibitorische (Peña-Rossi et al. 1999) oder stimulatorische Signale (Simarro et al. 1997) vermittelt.

Interessanterweise nahm auch das Ausmaß der Modulation von CD2 und CD5 mit der Stärke des Aktivierungssignals zu, und hierbei folgte die Modulation von CD2, CD5 jeweils derselben Sättigungskurve wie die CD8 $\beta$ -Modulation. Überdies modulierten meist dieselben Zellen die Expression aller drei Proteine: Zellen, die

nach der Aktivierung noch CD8 $\beta$  positiv waren, exprimierten fast immer auch CD2 und CD5 stark (Abschnitt 3.5.3, für CD5 nicht gezeigt).

Man könnte also spekulieren, daß die verminderte Expression von CD2, CD5 und CD8 $\beta$  jeweils die Aktivierbarkeit der betroffenen Zellen senkt. Möglicherweise besitzen die  $\gamma/\delta$  T Zellen mit der Modulation kostimulatorischer Moleküle einen besonderen Mechanismus, um ihre Aktivierung zu regulieren. Angesichts der verbreiteten Erkennung körpereigener Strukturen durch  $\gamma/\delta$  T Zellen (zusammengefaßt bei Hayday et al. 1997) könnte ein solcher Mechanismus nötig sein, um Autoimmunität zu vermeiden. CD8 könnte in diesem Fall entweder der Korezeptor des TCR oder auch ein kostimulatorischer Rezeptor sein. Die Modulation der CD8 $\beta$ -Kette wäre dann eine von mehreren Möglichkeiten, um die Effektorfunktionen aktivierter  $\gamma/\delta$  T Zellen zu kontrollieren.

#### 4.4 Die mögliche Rolle von CD8 bei der Aktivierung von $\gamma/\delta$ T Zellen der Ratte

Abschließend sollen aus den vorgestellten Daten Schlußfolgerungen für eine mögliche Rolle von CD8 für die Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen abgeleitet werden. Obwohl sich CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen sowohl serologisch als auch in der Signaltransduktion in allen untersuchten Eigenschaften als identisch mit der CD8-Isoform der  $\alpha/\beta$  T Zellen erwies, kann CD8 positiven  $\gamma/\delta$  T Zellen keine klassische MHC I-Restriktion zugeschrieben werden. Die CDR3-Längen der TCR $\delta$ -Ketten legen eher nahe, daß CD8 $\alpha\beta$  positive  $\gamma/\delta$  T Zellen dieselbe Art der Antigenerkennung besitzen wie die übrigen  $\gamma/\delta$  T Zellen der Rattenmilz. Auch die CDR3-Längenspektren der meist CD4 und CD8 doppelt negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen von Maus und Mensch ähneln denen der Ratte, und deshalb sind wohl auch die Prinzipien der Antigenerkennung verwandt.

Im Maussystem wurden einige für das Verständnis der CD8-Expression von  $\gamma/\delta$  T Zellen wichtige Beobachtungen veröffentlicht, und wegen der starken

Sequenzhomologie der  $\gamma/\delta$  TCR-Ketten einerseits und der funktionellen Ähnlichkeiten andererseits hat möglicherweise auch CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen von Maus und Ratte die gleiche Funktion. Unklar bleibt allerdings, warum sich die Häufigkeit der CD8-Expression so stark unterscheidet: In der Rattenmilz exprimieren 90% der  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8, bei der Maus nur etwa 10%. Mögliche Gründe dafür werden später angesprochen. Allerdings sind die Unterschiede zwischen  $\gamma/\delta$  T Zellen von Maus und Ratte geringer als bisher angenommen. Man ging zwar bisher fälschlicherweise meist davon aus, daß die  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus nur das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer exprimieren, tatsächlich sind sie aber zumindest in der Milz von C57BL/6-Mäusen zum größten Teil CD8 $\alpha\beta$  positiv (Sabine Wagner, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg, zur Veröffentlichung vorbereitet). Diese Diskrepanz kann vielleicht damit erklärt werden, daß  $\gamma/\delta$  T Zellen eine kleine Zellpopulation darstellen, die einer Untersuchung nur schwer zugänglich ist. Frühe, eingehende Analysen des Phänotyps von  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden deshalb erst nach einer Anreicherung und Aktivierung von mehreren Tagen durchgeführt (Cron et al. 1989; MacDonald et al. 1990). Sollten auch  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus nach Aktivierung die CD8 $\beta$ -Expression modulieren, konnten diese Analysen leicht zu falschen Ergebnissen kommen.

Man muß nicht notwendigerweise davon ausgehen, daß die CD8-Expression auf  $\gamma/\delta$  T Zellen mit einer Funktion verbunden ist. Die CD4-Expression der CD1-restringierten NK T Zellen zeigt nämlich einige Analogien zur CD8-Expression der  $\gamma/\delta$  T Zellen: In der Maus exprimiert ein beträchtlicher Teil der NK T Zellen CD4, obwohl diese Zellen keine MHC II-Restriktion aufweisen, und NK T Zellen können nach Aktivierung *in vitro* die CD4-Expression modulieren (Chen et al. 1997). Möglicherweise spielt CD4 bei der Aktivierung der CD1-restringierten NK T Zellen keine Rolle, denn die Aktivierung menschlicher CD4 positiver NK T Zellen kann durch blockierenden mAk gegen CD4 nicht beeinflußt werden (Sieling et al. 2000).

Dagegen existieren Hinweise darauf, daß CD8 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen spielt, denn auf  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus wie der Ratte kann CD8 Signale vermitteln. Da in der Ratte keine Antigene für  $\gamma/\delta$  T Zellen bekannt sind, konnten in der vorliegenden Arbeit nur Indizien für einen Einfluß von CD8 auf Aktivierungssignale des  $\gamma/\delta$  TCR gesammelt werden (Abschnitt 3.2.2). Aber für  $\gamma/\delta$  T

Zellen der Maus wurde belegt, daß CD8-Signale zur antigenvermittelten T Zellaktivierung beitragen können, denn die Aktivierung CD8 $\alpha\beta$  positiver  $\gamma/\delta$  T Zellklone kann durch einen mAk gegen CD8 blockiert werden (Tsujimura et al. 1996). Deshalb besitzt CD8 $\alpha\beta$  sehr wahrscheinlich eine Funktion bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen. Anscheinend werden auf  $\gamma/\delta$  T Zellen dieselben CD8-Signalwege benutzt wie auf  $\alpha/\beta$  T Zellen (Abschnitt 3.2.1). Deswegen ist kaum vorstellbar, daß die CD8-Kreuzvernetzung auf  $\gamma/\delta$  T Zellen eigene, vom TCR unabhängige Signale auslöst. Hinweise auf die Erfüllung anderer Aufgaben durch CD8, wie für bestimmte Makrophagen und Mastzellen der Ratte nachgewiesen (Hirji et al. 1999), haben sich bei  $\gamma/\delta$  T Zellen bisher nicht ergeben.

Auch wenn CD8 anscheinend Signale zur TCR-vermittelten Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen beisteuert, kann seine Funktion für  $\gamma/\delta$  T Zellen noch nicht eindeutig benannt werden. Nachfolgend werden drei Möglichkeiten diskutiert: Einerseits könnte CD8 die Rolle eines Korezeptors des TCR besitzen (A), andererseits ist eine Funktion als kostimulatorisches Molekül vorstellbar (B). Schließlich wird eine weitere, neue Rolle von CD8 bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen vorgeschlagen (C).

A) Es liegt nahe zu vermuten, daß CD8 - analog zu  $\alpha/\beta$  T Zellen - die Funktion eines Korezeptors des  $\gamma/\delta$  TCR besitzt. Da die Struktur des  $\gamma/\delta$  TCR aus sterischen Gründen nicht zu einer klassischen MHC I-Restriktion paßt (Abschnitt 3.3), kämen nicht-klassische MHC I-Moleküle als Restriktionselemente in Frage, die tatsächlich schon lange als Antigene der  $\gamma/\delta$  T Zellen diskutiert werden (Haas et al. 1993; Chien et al. 1996; Steele et al. 2000). Für einige  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus wurde die Erkennung von H2-T-Molekülen im Detail beschrieben (Schild et al. 1994; Tsujimura et al. 1996; Crowley et al. 2000) und auch in der Ratte sind zu H2-T homologe Gene bekannt (Kirisits et al. 1992; Kirisits et al. 1994). Beim Menschen fand man das nicht-klassische MHC I-Molekül MICA als  $\gamma/\delta$  T Zell-Antigen (Bauer et al. 1999); für dieses unabhängig von  $\beta 2m$  exprimierte nicht-klassische MHC-Molekül ist aber bisher in Maus und Ratte kein Analog gefunden worden. Die Expression von H2-T-Molekülen und MICA ist abhängig vom zellulären Aktivierungszustand oder von Streß, so daß z.B. für immunregulatorische  $\gamma/\delta$  T Zellen die Erkennung dieser Antigene sinnvoll wäre. Interessanterweise können H2-T-Moleküle mit CD8 interagieren (Teitell et al.



1991; Wingren et al. 2000), und die Aktivierung CD8 $\alpha\beta$  positiver, T3-spezifischer  $\gamma\delta$  T Zellen kann durch mAk anti CD8 blockiert werden (Tsujimura et al. 1996). Ob auch MICA mit CD8 interagieren kann, ist unbekannt. Eventuell wäre eine direkte Assoziation gar nicht notwendig, denn beim Menschen wurde das Glycoprotein gp180 beschrieben, das anscheinend eine indirekte Assoziation zwischen CD8 auf intestinalen  $\alpha\beta$  T Zellen und dem MHC-ähnlichen Molekül CD1 auf intestinalen Epithelzellen vermitteln kann (Campbell et al. 1999). Auf diese Weise könnten auch andere denkbare Restriktionselemente, z.B. Hitzeschockproteine, CD8 indirekt binden.

Obwohl folglich CD8 auf  $\gamma\delta$  T Zellen durchaus als Korezeptor bei der Erkennung nicht-klassischer MHC-Moleküle dienen könnte, gibt einige Indizien, die gegen diese Möglichkeit sprechen. Erstens exprimieren H2-T restringierte  $\gamma\delta$  T Zellen nicht häufiger CD8 als der Durchschnitt der  $\gamma\delta$  T Zellen (Crowley et al. 2000), sie benötigen also CD8 nicht als Korezeptor. Zum anderen findet man auf TCR-transgenen  $\gamma\delta$  T Zellen mit H2-T-Spezifität ebenso häufig CD8 wie auf  $\gamma\delta$  T Zellen von wildtypischen Mäusen (Wells et al. 1991; Pereira et al. 1992); folglich unterscheiden sich CD8 positive und negative  $\gamma\delta$  T Zellen nicht in der Affinität der Antigenbindung. Schließlich gibt es Gründe anzunehmen, daß  $\gamma\delta$  T Zellen im allgemeinen nicht H2-T-restringiert sind: Hinweise auf die Notwendigkeit einer positiven Selektion von  $\gamma\delta$  T Zellen wurden nämlich mit Mäusen gewonnen, die transgen für T22-spezifische  $\gamma\delta$  TCR sind. Während TCR-transgene,  $\beta 2m$ -defiziente (also auch H2-T-defiziente) Mäuse keine  $\gamma\delta$  T Zellen in der Peripherie aufweisen, findet man normale Zahlen von  $\gamma\delta$  T Zellen in allen untersuchten Organen  $\beta 2m$ -defizienter Mäuse ohne transgenen TCR (Wells et al. 1991; Pereira et al. 1992; Correa et al. 1992). Auch der Anteil CD8 positiver  $\gamma\delta$  T Zellen wird durch die  $\beta 2m$ -Defizienz nicht verändert (Sabine Wagner, Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg, zur Veröffentlichung vorbereitet).

**B)** Zwar ist nicht auszuschließen, daß CD8 trotzdem als Korezeptor des  $\gamma\delta$  TCR dienen kann. In der Maus richtet sich aber die CD8-Expression anscheinend nicht nach dem erkannten Antigen. Dazu würde eher eine Rolle von CD8 als kostimulatorisches Molekül passen. Auch so ließe sich der beschriebene Block der  $\gamma\delta$

T Zellaktivierung durch mAb anti CD8 erklären (Tsujimura et al. 1996), denn auch durch die Blockierung kostimulatorischer Signale kann die T Zellaktivierung verhindert werden. Trotzdem gibt es für eine Rolle von CD8 als kostimulatorisches Molekül bisher keine konkreten Hinweise.

C) Schließlich besteht die Möglichkeit, daß CD8-Signale bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen beteiligt sind, ohne daß CD8 im klassischen Sinn als Korezeptor oder kostimulatorisches Molekül dient. Um die TCR-Signale zu unterstützen, muß CD8 nicht notwendigerweise zusammen mit dem  $\gamma/\delta$  TCR an das Antigen binden. *In vitro* kann nämlich die Kreuzvernetzung des  $\alpha/\beta$  TCR durch Antikörper eine sogenannte Cap-Bildung auslösen, und auf  $\alpha/\beta$  T Zellen findet man CD8 mit dem TCR im selben Cap kolokalisiert (Kwan Lim et al. 1998). Analog dazu könnte bei der Antigenerkennung der  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8 passiv, ohne selbst an einen Liganden auf der Antigen präsentierenden Zellen zu binden, durch TCR-Kreuzvernetzung in die Nähe des TCR gebracht werden. Im Komplex mit dem TCR würden die mit CD8 assoziierten Proteine p56<sup>lck</sup> und LAT dann Kosignale vermitteln. Darüber hinaus wurde beschrieben, daß bestimmte  $\alpha/\beta$  T Zellrezeptoren auch auf naiven, ruhenden Zellen relativ stark mit CD8 assoziiert sind (Anel et al. 1997). Man könnte sich vorstellen, daß bestimmte  $\gamma/\delta$  T Zellrezeptoren CD8 entweder permanent gebunden haben oder nach der Antigenerkennung sehr effizient rekrutieren. CD8 wäre dann weder klassischer Korezeptor, noch kostimulatorisches Molekül, sondern eher als weiteres Proteinketten-Dimer des TCR/CD3-Komplex zu betrachten. Auch diese Rolle von CD8 würde erklären, warum man die Aktivierung CD8 positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen durch einen mAk gegen CD8 verhindern kann (Tsujimura et al. 1996): Blockierte man die Assoziation von CD8 und TCR, hemmte man die T Zellaktivierung. Es bliebe zu prüfen, welche CD8-Epitope von Antikörpern gebunden werden müssen, um die  $\gamma/\delta$  T Zellaktivierung zu blockieren.

Die Rolle von CD8 für die Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen ist noch nicht eindeutig geklärt, und folglich können auch die Auswirkungen der CD8 $\beta$ -Modulation durch  $\gamma/\delta$  T Zellen nur geschätzt werden. Nach der Aktivierung modulieren  $\gamma/\delta$  T Zellen die Expression der CD8 $\beta$ -Kette und exprimieren nur noch das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer; in dieser Eigenschaft unterscheiden sie sich von den peripheren  $\alpha/\beta$  T Zellen (Abschnitt

3.4). Mit zunehmender Signalstärke nimmt der Anteil noch CD8 $\beta$  positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen ab, aber es gibt anscheinend einen Sättigungswert, denn einige  $\gamma/\delta$  T Zellen modulieren die CD8 $\beta$ -Genexpression auch bei maximalem Aktivierungssignal nicht. Obwohl die funktionellen Fähigkeiten der  $\gamma/\delta$  T Zellen nicht verändert werden (Abschnitt 3.5), könnte die Modulation die Aktivierbarkeit von  $\gamma/\delta$  T Zellen beeinflussen. Da nämlich durch die CD8 $\beta$ -Kette die funktionelle Assoziation von CD8 $\alpha$  mit p56<sup>lck</sup> und LAT verbessert wird (Irie et al. 1995; Bosselut et al. 1999; Bosselut et al. 2000), sollten die CD8-Signale durch die Modulation abgeschwächt werden.

Wenn zutrifft, daß CD8 auch auf  $\gamma/\delta$  T Zellen als Korezeptor des TCR dient, würde die Modulation vermutlich die Effizienz der TCR-Signalvermittlung erniedrigen und so den Schwellenwert für eine zweite Aktivierung erhöhen. Dieses Szenario erinnert an Beobachtungen bei der Reifung CD8 positiver  $\alpha/\beta$  T Zellen im Thymus von Maus und Ratte. Diese Thymozyten können die Expression der CD8 $\beta$ -Kette modulieren, um einer negativen Selektion durch ein zu starkes TCR-Signal zu entgehen. Bei noch stärkerem TCR-Signal verlieren sie auch die Expression der CD8 $\alpha$ -Kette, schließlich werden sie durch negative Selektion entfernt (Chidgey et al. 1998; Mitnacht et al. 1998). Bei peripheren  $\gamma/\delta$  T Zellen könnte die CD8 $\beta$ -Modulation dazu dienen, bereits aktivierte  $\gamma/\delta$  T Zellen weniger reaktiv zu machen, z.B. um so die  $\gamma/\delta$  T Zellantwort zu terminieren.

Möglicherweise dient CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen nicht als Korezeptor, sondern als kostimulatorisches Molekül. Auch in diesem Fall würde sich das Verschwinden der CD8 $\beta$ -Kette wahrscheinlich durch schwächere CD8-Signale auswirken. Andererseits könnte die Avidität von CD8 $\alpha\alpha$  zu den signalübertragenden Proteinen p56<sup>lck</sup> und LAT so weit reduziert sein, daß sie an andere Membranrezeptoren binden könnten. Die entsprechenden Rezeptoren könnten jetzt ihrerseits kostimulatorische Signale vermitteln. Dann würde durch die CD8 $\beta$ -Modulation eher die Qualität als die Stärke der Kosignale verändert.

Schließlich gibt es die Möglichkeit, daß CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen weder als Korezeptor, noch als kostimulatorisches Molekül dient, sondern wie ein zusätzliches Dimer des TCR/CD3-Komplex an der Signalübertragung beteiligt ist. Da dann CD8 dieselben

Signale wie als Korezeptor vermitteln würde, sollte die CD8 $\beta$ -Modulation auch in diesem Fall die TCR-vermittelten Signale abschwächen und so den Schwellenwert für eine eventuell folgende zweite Aktivierung erhöhen.

Unabhängig davon, welche Funktion CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen letztlich zukommt, stellt sich die Frage, warum  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8 exprimieren. Da nämlich die CD4 und CD8 doppelt negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen für ihre Aktivierung nicht auf CD8 angewiesen sind, besteht anscheinend keine Notwendigkeit für CD8-Signale bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen. Aber es ist gut möglich, daß manche  $\gamma/\delta$  T Zellen bei der thymischen Reifung CD8 exprimieren. Da CD8 dann die für die T Zellaktivierung unentbehrlichen Proteine p56<sup>lck</sup> und LAT bindet, wären die Zellen für eine Aktivierung auf CD8-Signale angewiesen. Leider ist die thymische Reifung von  $\gamma/\delta$  T Zellen erst zum Teil verstanden, und man weiß nicht, wann sie CD8 exprimieren. Vielleicht gehen CD8 positive  $\gamma/\delta$  T Zellen aus CD4 und CD8 doppelt positiven  $\gamma/\delta$  Thymozyten hervor, doch anscheinend ist dieser Entwicklungsweg sowohl für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus (Passoni et al. 1997; Washburn et al. 1997) wie auch der Ratte (Bischof et al., zur Veröffentlichung eingereicht) eine Ausnahme. Möglicherweise exprimieren einige  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8 erst nach einer positiven Selektion, also zu einem Zeitpunkt, an dem die zuvor doppelt positiven  $\alpha/\beta$  T Zellen die Entscheidung für die Expression von CD4 oder CD8 treffen. Man könnte die benutzten CD8-Enhancer-Elemente untersuchen und so eventuell den Zeitpunkt der ersten CD8-Expression eingrenzen. Periphere  $\alpha/\beta$  T Zellen benutzen nämlich andere Enhancer für die Expression der Korezeptoren als die CD4 und CD8 doppelt positiven Thymozyten (zusammengefaßt in Ellmeier et al. 1999). Dieser späte Zeitpunkt für eine Entscheidung über die CD8-Expression könnte auch die unterschiedliche Häufigkeit von CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen von Maus und Ratte erklären, denn *in vitro* gereifte doppelt positive  $\alpha/\beta$  Thymozyten der Maus reifen nach einem Aktivierungssignal spontan in CD4 einzeln positive  $\alpha/\beta$  T Zellen aus, während Zellen der Ratte unter denselben Bedingungen in CD8 positiven Zellen ausdifferenzieren (Mitnacht et al. 1998). Eventuell führt diese spontane Neigung der Ratten T Zellen zur CD8-Expression dazu, daß in der Ratte viel mehr periphere  $\gamma/\delta$  T Zellen CD8

exprimieren als in der Maus. Klarheit kann aber erst der Vergleich des thymischen Reifungsweges CD8 positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen in den beiden Spezies bringen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die Rolle von CD8 bei der Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T Zellen noch nicht völlig verstanden ist. Die Interpretation der in dieser Arbeit gewonnenen Daten wird dadurch erschwert, daß die allgemeinen Prinzipien der Antigenerkennung von  $\gamma/\delta$  T Zellen noch nicht aufgeklärt sind und daß man ihre Entwicklung im Thymus noch zu wenig versteht. Trotzdem gibt es starke Hinweise, daß CD8-Signale an der Aktivierung CD8 positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen beteiligt sind, denn einerseits wurde in der vorliegenden Arbeit eine weitgehende Ähnlichkeit der CD8-vermittelten Signale auf  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen gefunden, und andererseits kann man die antigenvermittelte Aktivierung CD8 positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen der Maus mit Antikörpern gegen CD8 blockieren. Erst weitere Analysen können zeigen, ob CD8 auf  $\gamma/\delta$  T Zellen als Korezeptor des TCR oder als kostimulatorisches Molekül fungiert oder ob CD8 eher als zusätzliches Peptidkettendimer des TCR/CD3-Komplexes angesehen werden muß.

### 5.1 Zusammenfassung

CD8 wird von thymisch gereiften  $\alpha/\beta$  T Zellen als CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer exprimiert und dient als Korezeptor bei der MHC Klasse I (MHC I) restringierten Antigenerkennung. In dieser Funktion stabilisiert CD8 die Bindung des T Zellrezeptors (TCR) an seinen Liganden (MHC I mit antigenem Peptid) und vermittelt darüber hinaus kostimulatorische Signale an die T Zelle. Die Antigene der  $\gamma/\delta$  T Zellen sind bis auf einige Ausnahmen unbekannt, aber  $\gamma/\delta$  T Zellen von Maus und Mensch weisen im allgemeinen höchstwahrscheinlich keine MHC-restringierte Antigenerkennung auf. Dementsprechend findet man auf den meisten  $\gamma/\delta$  T Zellen dieser Spezies keinen der MHC-spezifischen Korezeptoren CD4 oder CD8. In auffälligem Gegensatz dazu exprimieren in der Milz der Ratte bis zu 80% der  $\gamma/\delta$  T Zellen das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer.

Um die mögliche Funktion von CD8 $\alpha\beta$  auf  $\gamma/\delta$  T Zellen besser zu verstehen, wurden zunächst die CD8-vermittelten Signale untersucht. Eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der TCR-Signalkaskade kommt der mit CD8 $\alpha$  assoziierten Proteintyrosinkinase p56<sup>lck</sup> zu. Diese ist, wie durch Kopräzipitationsexperimente gezeigt wurde, bei  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen gleichermaßen mit CD8 assoziiert und zeigt dieselbe Kinaseaktivität. Weiterhin konnte *in vitro* ein kostimulatorisches Potential von CD8-spezifischen Antikörpern für  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen gezeigt werden. Demnach besitzt CD8 auf  $\alpha/\beta$  und  $\gamma/\delta$  T Zellen prinzipiell eine vergleichbare Fähigkeit zur Übertragung kostimulatorischer Signale.

Es war folglich naheliegend, einen Zusammenhang zwischen der CD8 $\alpha\beta$ -Expression der  $\gamma/\delta$  T Zellen mit einer möglichen MHC I restringierten Antigenerkennung zu prüfen. Da bisher keine Antigene für  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte bekannt sind, wurden die Antigen bindenden Regionen des  $\gamma/\delta$  TCR analysiert. Bei Antigenrezeptoren von Mensch und Maus bestehen nämlich charakteristische Längenunterschiede zwischen den mit dem Antigen interagierenden CDR3-Proteinschleifen (englisch: *complementarity determining regions*), die in der Verknüpfungsregion der V-, D- und J-Gensegmente codiert sind. Bei Maus und Mensch sind die CDR3-Längen der TCR $\delta$ -Kette ähnlich variabel und etwa so lang wie bei der schweren Kette des B

Zellrezeptors. Dagegen sind die CDR3-Regionen der TCR $\beta$ -Kette sehr kurz, was wahrscheinlich durch die notwendige Interaktion des MHC-Peptid-Komplexes mit allen drei CDR-Schleifen bedingt wird. Daraus wurde geschlossen, daß die Bestimmung der CDR3 $\delta$ -Längen Aussagen über eine mögliche MHC-Restriktion von  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte erlauben sollte. Zur Durchführung der CDR3 $\delta$ -Längenanalysen wurde die Methode des Spektratyping etabliert. Hierfür wurden in der Milz häufig vorkommende TCR $\delta$  V-Gensegmente (DV105 und fünf Mitglieder der ADV7-Familie) partiell kloniert und sequenziert. In CD8 positiven und negativen  $\gamma/\delta$  T Zellen wurden sowohl DV105 als auch Mitglieder der ADV7-Familie jeweils etwa gleich häufig exprimiert. Spektratyp-Analysen ergaben in  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte für beide V-Genfamilien etwas längere CDR3 $\delta$ -Schleifen als bei der Maus; CD8 $\alpha\beta$  positive, CD8 $\alpha\alpha$  positive und CD8 negative  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte besaßen identische Längenspektren. Demnach kann man die CD8 $\alpha\beta$ -Expression von  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte nicht als Hinweis auf eine der klassischen MHC-Restriktion ähnliche Antigenerkennung werten.

Als spezifische Eigenschaft von  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte wurde eine Modulation der CD8 $\beta$ -Genexpression nachgewiesen, die mit der Stärke des Aktivierungssignals zunahm. Nach Aktivierung *in vitro* exprimierte ein großer Teil zuvor CD8 $\alpha\beta$  positiver  $\gamma/\delta$  T Zellen nur noch das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer, das auf MHC I restringierten  $\alpha/\beta$  T Zellen deutlich schlechtere Korezeptoreigenschaften aufweist als das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer. Die Modulation war irreversibel, fand prätranslational statt und zeigte keine Einflüsse auf Effektorfunktionen der  $\gamma/\delta$  T Zellen wie Interferon- $\gamma$ -Produktion oder zytotoxische Fähigkeiten. Über die physiologische Bedeutung dieser Modulation kann nur spekuliert werden, doch könnte sie ein Mechanismus sein, um den Schwellenwert für Signale einer erneuten T Zellaktivierung zu erhöhen. Darüber hinaus limitiert sie den Nutzen der CD8 $\alpha\beta$ -Expression als Marker für die thymisch gereifte Linie von  $\gamma/\delta$  T Zellen.

### 5.2 Abstract

CD8 is expressed on thymus derived  $\alpha/\beta$  T cells and serves as the co-receptor for MHC class I (MHC I) restricted antigen recognition. In this role CD8 stabilises the binding of the T cell receptor (TCR) to its ligand (MHC with antigenic peptide) and moreover transduces co-stimulatory signals to the T cell. Aside from few examples the antigens of  $\gamma/\delta$  T cells are unknown, but mouse and human  $\gamma/\delta$  T cells most probably do not possess a MHC restricted way of antigen recognition. Correspondingly most  $\gamma/\delta$  T cells of these species do not express one of the MHC specific co-receptors CD4 or CD8. In striking contrast up to 80% of splenic rat  $\gamma/\delta$  T cells express the CD8 $\alpha\beta$  heterodimer.

To understand the putative function of CD8 $\alpha\beta$  expressed by rat  $\gamma/\delta$  T cells, CD8 signalling was investigated first. The protein tyrosine kinase p56<sup>lck</sup> plays a key role at the initiation of the TCR signalling cascade. This kinase is equally associated with CD8 on  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T cells as found by co-precipitations, and it shows the same kinase activity there. Furthermore, *in vitro* a co-stimulatory potential of CD8 specific antibodies could be demonstrated for  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T cells likewise. Therefore in principle, CD8 possesses similar co-stimulatory properties on rat  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T cells.

Consequently a correlation between CD8 $\alpha\beta$  expression and a possible MHC I restriction of rat  $\gamma/\delta$  T cells was tested. Because no antigens have been found for rat  $\gamma/\delta$  T cells so far, the antigen binding regions of the  $\gamma/\delta$  TCR were investigated. It is known that the complementarity determining region 3 (CDR3) protein loops, which are encoded by the region of V, D, and J gene segment joining, show characteristic length differences: CDR3 lengths of mouse and human TCR $\delta$  chains show the same variability and are as long as CDR3 of the B cell receptor heavy chain. In contrast, the CDR3 regions of TCR $\beta$  chains are very short, what probably results from the necessity of interaction between MHC and all three CDR loops. In consequence, determining the CDR3 $\delta$  lengths should allow predictions about a possible MHC restriction of rat  $\gamma/\delta$  T cells. For CDR3 $\delta$  length analysis a method called spectratyping was established. First of all, common TCR $\delta$  V segments from rat spleen (DV105 and five members of the ADV7 gene family) were cloned and sequenced partially. Both



gene families were expressed in about the same frequency by CD8 negative and CD8 positive  $\gamma/\delta$  T cells, respectively. For both V segment families the spectratyping analyses revealed somewhat longer CDR3 $\delta$  loops in rat than in mouse  $\gamma/\delta$  T cells. CD8 $\alpha\beta$  or CD8 $\alpha\alpha$  positive and CD8 negative  $\gamma/\delta$  T cells showed exactly the same CDR3 $\delta$  length spectra. Therefore the CD8 $\alpha\beta$  expression of rat  $\gamma/\delta$  T cells is no indication for a MHC restricted antigen recognition.

As a specific property of rat  $\gamma/\delta$  T cells an activation dependent down modulation of the CD8 $\beta$  chain could be demonstrated, that increased with the strength of the activating signal. Following activation *in vitro*, a major percentage of  $\gamma/\delta$  T cells which previously expressed CD8 $\alpha\beta$ , solely expressed the CD8 $\alpha\alpha$  homodimer. On MHC I restricted  $\alpha/\beta$  T cells CD8 $\alpha\alpha$  is known to show poor co-stimulatory potential compared to CD8 $\alpha\beta$ . The modulation was irreversible, occurred on a pre-translational level and did not influence  $\gamma/\delta$  T cell effector functions like interferon- $\gamma$  production or cytotoxicity. A physiological role of the modulation is speculative so far, but the CD8 $\beta$  modulation might be a mechanism to increase the signalling threshold for a following T cell activation. Moreover, the modulation limits the use of CD8 $\alpha\beta$  expression as a marker for the thymically derived  $\gamma/\delta$  T cell lineage.

## 6 Literatur

- Abbas A. K., Murphy K. M. and Sher A. (1996) Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* **383**, 787-793.
- Anel A., Martinez-Lorenzo M. J., Schmitt-Verhulst A. M. and Boyer C. (1997) Influence on CD8 of TCR/CD3-generated signals in CTL clones and CTL precursor cells. *J Immunol* **158**, 19-28.
- Arase N., Arase H., Park S. Y., Ohno H., Ra C. and Saito T. (1997) Association with FcRgamma is essential for activation signal through NKR-P1 (CD161) in natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells. *J Exp Med* **186**, 1957-1963.
- Arden B., Clark S. P., Kabelitz D. and Mak T. W. (1995) Mouse T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* **42**, 501-530.
- Arden B. (1998) Conserved motifs in T-cell receptor CDR1 and CDR2: implications for ligand and CD8 co-receptor binding. *Curr Opin Immunol* **10**, 74-81.
- Arden B., Thureau S. R. and Wildner G. (2000) Complementary DNA sequences encoding rat T-cell receptor delta-chain D1-, D2-, J1-, and C-region proteins. *Immunogenetics* **51**, 500-502.
- Arnold B. (1991) Downregulation of T cell receptors on self-reactive T cells as a novel mechanism for extrathymic tolerance induction. *Cell* **65**, 293-.
- Asmuß A. (1999) Genetische und funktionelle Analyse der Superantigen-Reaktivität polymorpher V-Segmente der T-Zellrezeptor beta-Kette in der Ratte. Diplomarbeit an der Universität Würzburg, Biologische Fakultät.
- Azuara V., Lembezat M. P. and Pereira P. (1998) The homogeneity of the TCRdelta repertoire expressed by the Thy-1dull gammadelta T cell population is due to cellular selection. *Eur J Immunol* **28**, 3456-3467.
- Azzoni L., Zatssepina O., Abebe B., Bennett I. M., Kanakaraj P. and Perussia B. (1998) Differential transcriptional regulation of CD161 and a novel gene, 197/15a, by IL-2, IL-15, and IL-12 in NK and T cells. *J Immunol* **161**, 3493-3500.
- Bachmann M. F., Barner M. and Kopf M. (1999) CD2 sets quantitative thresholds in T cell activation. *J Exp Med* **190**, 1383-1392.
- Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J. H., Lanier L. L. and Spies T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* **285**, 727-729.
- Beckman E. M. and Brenner M. B. (1995) MHC class I-like, class II-like and CD1 molecules: distinct roles in immunity. *Immunol. Today* **16**, 349-352.
- Beyers A. D., Spruyt L. L. and Williams A. F. (1992) Molecular associations between the T-lymphocyte antigen receptor complex and the surface antigens CD2, CD4, or CD8 and CD5. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 2945-2949.
- Bluestone J. A., Cron R. Q., Barrett T. A., Houlden B., Sperling A. I., Dent A., Hedrick S., Rellahan B. and Matis L. A. (1991) Repertoire development and ligand specificity of murine TCR gamma delta cells. *Immunol Rev* **120**, 5-33.
- Boismenu R. and Havran W. (1994) Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gammadelta T cells. *Science* **266**, 1263-1255.

- Bonneville M., Ishida I., Itohara S., Verbeek S., Berns A., Kanagawa O., Haas W. and Tonegawa S. (1990) Self-tolerance to transgenic gamma delta T cells by intrathymic inactivation. *Nature* **344**, 163-165.
- Bosselut R., Zhang W., Ashe J. M., Kopacz J. L., Samelson L. E. and Singer A. (1999) Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction [published erratum appears in *J Exp Med* 2000 Feb 7;191(3):585]. *J Exp Med* **190**, 1517-1526.
- Bosselut R., Kubo S., Guinter T., Kopacz J. L., Altman J. D., Feigenbaum L. and Singer A. (2000) Role of CD8 $\beta$  domains in CD8 coreceptor function: importance for MHC I binding, signaling, and positive selection of CD8<sup>+</sup> T cells in the thymus. *Immunity* **12**, 409-418.
- Braud V. M., Allan D. S. and McMichael A. J. (1999) Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Curr.Opin.Immunol.* **11**, 100-108.
- Brideau R. J., Carter P. B., McMaster W. R., Mason D. W. and Williams A. F. (1980) Two subsets of rat T lymphocytes defined with monoclonal antibodies. *Eur.J.Immunol.* **10**, 609-615.4
- Bukowski J. F., Morita C. T. and Brenner M. B. (1999) Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* **11**, 57-65.
- Burk M. R., Carena I., Donda A., Mariani F., Mori L. and De Libero G. (1997) Functional inactivation in the whole population of human V gamma 9/V delta 2 T lymphocytes induced by a nonpeptidic antagonist. *J Exp Med* **185**, 91-97.
- Campbell N. A., Kim H. S., Blumberg R. S. and Mayer L. (1999) The nonclassical class I molecule CD1d associates with the novel CD8 ligand gp180 on intestinal epithelial cells. *J.Biol.Chem.* **274**, 26259-26265.
- Candeias S., Waltzinger C., Benoist C. and Mathis D. (1991) The V beta 17<sup>+</sup> T cell repertoire: skewed J beta usage after thymic selection; dissimilar CDR3s in CD4<sup>+</sup> versus CD8<sup>+</sup> cells. *J Exp Med* **174**, 989-1000.
- Catalfamo M., Roura-Mir C., Sospedra M., Aparicio P., Costagliola S., Ludgate M., Pujol-Borrell R. and Jaraquemada D. (1996) Self-reactive cytotoxic gamma delta T lymphocytes in Graves' disease specifically recognize thyroid epithelial cells. *J Immunol* **156**, 804-811.
- Chandler P., Frater A. J., Douek D. C., Viney J. L., Kay G., Owen M. J., Hayday A. C., Simpson E. and Altmann D. M. (1995) Immune responsiveness in mutant mice lacking T-cell receptor alpha beta<sup>+</sup> cells. *Immunology* **85**, 531-537.
- Chen H., Huang H. and Paul W. E. (1997) NK1.1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells lose NK1.1 expression upon *in vitro* activation. *J Immunol* **158**, 5112-5119.
- Chidgey A. P. and Boyd R. L. (1998) Positive selection of low responsive, potentially autoreactive T cells induced by high avidity, non-deleting interactions. *Int Immunol* **10**, 999-1008.
- Chien Y. H., Iwashima M., Kaplan K. B., Elliot J. F. and Davis M. M. (1987) A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* **327**, 677-682.
- Chien Y. H., Jores R. and Crowley M. P. (1996) Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol* **14**, 511-532.
- Classon B. J., Brown M. H., Garnett D., Somoza C., Barclay A. N., Willis A. C. and Williams A. F. (1992) The hinge region of the CD8 alpha chain: structure, antigenicity, and utility in expression of immunoglobulin superfamily domains. *Int.Immunol.* **4**, 215-225.

- Correa I., Bix M., Liao N.-S., Zijlstra M., Jaenisch R. and Raulet D. (1992) Most gammadelta T cells develop normally in beta2-microglobulin-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 653-657.
- Correale J., Rojany M. and Weiner L. P. (1997) Human CD8+ TCR-alpha beta(+) and TCR-gamma delta(+) cells modulate autologous autoreactive neuroantigen-specific CD4+ T-cells by different mechanisms. *J Neuroimmunol* **80**, 47-64.
- Cron R. Q., Ezquerra A., Coligan J. E., Houlden B. A., Bluestone J. A. and Maloy W. L. (1989) Identification of distinct T cell receptor (TCR)-gamma delta heterodimers using an anti-TCR-gamma variable region serum. *J Immunol* **143**, 3769-3775.
- Crowley M. P., Fahrner A. M., Baumgarth N., Hampl J., Gutgemann I., Teyton L. and Chien Y. (2000) A population of murine gammadelta T cells that recognize an inducible MHC class Ib molecule. *Science* **287**, 314-316.
- Dallman M. J., Thomas M. L. and Green J. R. (1984) MRC OX-19: a monoclonal antibody that labels rat T lymphocytes and augments *in vitro* proliferative responses. *Eur.J.Immunol.* **14**, 260-267.
- Das G. and Janeway C. A., Jr. (1999) Development of CD8 $\alpha$ /alpha and CD8 $\alpha$ /beta T cells in major histocompatibility complex class I-deficient mice. *J Exp Med* **190**, 881-884.
- Davignon J. L., Budd R. C., Ceredig R., Piguet P. F., MacDonald H. R., Cerottini J. C., Vassalli P. and Izui S. (1985) Functional analysis of T cell subsets from mice bearing the *lpr* gene. *J Immunol* **135**, 2423-2428.
- Davies D. R., Padlan E. A. and Sheriff S. (1990) Antibody-antigen complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 439-.
- Davis M. M. and Chien Y. (1995) Issues concerning the nature of antigen recognition by alpha beta and gamma delta T-cell receptors. *Immunol Today* **16**, 316-318.
- de la Salle H., Hanau D., Fricker D., Urlacher A., Kelly A., Salamero J., Powis S. H., Donato L., Bausinger H., Laforet M. et al. (1994) Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency [published erratum appears in *Science* 1994 Dec 2;266(5190):1464]. *Science* **265**, 237-241.
- Dent A. L., Matis L. A., Hooshmand F., Widacki S. M., Bluestone J. A. and Hedrick S. M. (1990) Self-reactive gamma delta T cells are eliminated in the thymus. *Nature* **343**, 714-719.
- Dianda L., Gulbranson-Judge A., Pao W., Hayday A. C., MacLennan I. C. and Owen M. J. (1996) Germinal center formation in mice lacking alpha beta T cells. *Eur J Immunol* **26**, 1603-1607.
- Ding Y. H., Smith K. J., Garboczi D. N., Utz U., Biddison W. E. and Wiley D. C. (1998) Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity* **8**, 403-411.
- DiSanto J. P., Smith D., de Bruin D., Lacy E. and Flomenberg N. (1993) Transcriptional diversity at the duplicated human CD8 beta loci. *Eur J Immunol* **23**, 320-326.
- Dissen E. and Fossum S. (1996) Chromosomal localization of the genes encoding rat CD4, CD8 $\alpha$ , and CD8 $\beta$ . *Immunogenetics* **44**, 312-314.
- Dudley E. C., Petrie H. T., Shah L. M., Owen M. J. and Hayday A. C. (1994) T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity.* **1**, 83-93.
- Duhindan N., Farley A. J., Humphreys S., Parker C., Rossiter B. and Brooks C. G. (1997) Patterns of lymphokine secretion amongst mouse gamma delta T cell clones. *Eur J Immunol* **27**, 1704-1712.

- Egan P.J. and Carding S. R. (2000) Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J.Exp.Med.* **191**, 2145-2158.
- Erard F., Wild M. T., Garcia-Sanz J. A. and Le Gros G. (1993) Switch of CD8 T cells to noncytolytic CD8-CD4- cells that make TH2 cytokines and help B cells. *Science* **260**, 1802-1805.
- Ericsson P. O., Hansson J., Widegren B., Dohlsten M., Sjogren H. O. and Hedlund G. (1991) *In vivo* induction of gamma/delta T cells with highly potent and selective anti-tumor cytotoxicity. *Eur J Immunol* **21**, 2797-2802.
- Ferradini L., Roman-Roman S., Azocar J., Michalaki H., Triebel F. and Hercend T. (1991) Studies on the human T cell receptor alpha/beta variable region genes. II. Identification of four additional V beta subfamilies. *Eur J Immunol* **21**, 935-942.
- Ferrick D. A., Schrenzel M. D., Mulvania T., Hsieh B., Ferlin W. G. and Lepper H. (1995) Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells *in vivo*. *Nature* **373**, 255-257.
- Finco T. S., Kadlecsek T., Zhang W., Samelson L. E. and Weiss A. (1998) LAT is required for TCR-mediated activation of PLCgamma1 and the Ras pathway. *Immunity* **9**, 617-626.
- Fujiura Y., Kawaguchi M., Kondo Y., Obana S., Yamamoto H., Nanno M. and Ishikawa H. (1996) Development of CD8 alpha alpha+ intestinal intraepithelial T cells in beta 2-microglobulin- and/or TAP1-deficient mice. *J Immunol* **156**, 2710-2715.
- Garboczi D. N., Ghosh P., Utz U., Fan Q. R., Biddison W. E. and Wiley D. C. (1996) Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature* **384**, 134-141.
- Garcia K.C., Scott C. A., Brunmark A., Carbone F. R., Peterson P. A., Wilson I A. and Teyton L. (1996) CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* **387**, 630-634.
- Garcia K. C., Degano M., Pease L. R., Huang M., Peterson P. A., Teyton L. and Wilson I. A. (1998) Structural basis of plasticity in T cell receptor recognition of a self peptide-MHC antigen. *Science* **279**, 1166-1172.
- Gerber D. J., Azuara V., Levraud J. P., Huang S. Y., Lembezat M. P. and Pereira P. (1999) IL-4-producing gamma delta T cells that express a very restricted TCR repertoire are preferentially localized in liver and spleen. *J Immunol* **163**, 3076-3082.
- Gorczyński R. M., Cohen Z., Leung Y. and Chen Z. (1996) Gamma delta TCR+ hybridomas derived from mice preimmunized via the portal vein adoptively transfer increased skin allograft survival *in vivo*. *J Immunol* **157**, 574-581.
- Grusby M. J., Auchincloss H., Jr., Lee R., Johnson R. S., Spencer J. P., Zijlstra M., Jaenisch R., Papaioannou V. E. and Glimcher L. H. (1993) Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**, 3913-3917.
- Gumperz J. E., Roy C., Makowska A., Lum D., Sugita M., Podrebarac T., Koezuka Y., Porcelli S. A., Cardell S., Brenner M. B. and Behar S. M. (2000) Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity* **12**, 211-221.
- Guy-Grand D., Rocha B., Mintz P., Malassis-Seris M., Selz F., Malissen B. and Vassalli P. (1994) Different use of T cell receptor transducing modules in two populations of gut intraepithelial lymphocytes are related to distinct pathways of T cell differentiation. *J Exp Med* **180**, 673-679.
- Haas W. and Tonegawa S. (1992) Development and selection of gamma delta T cells. *Curr Opin*

*Immunol* **4**, 147-155.

Haas W., Pereira P. and Tonegawa S. (1993) Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* **11**, 637-685.

Hacker G., Adam S. and Wagner H. (1995) Interaction between gamma delta T cells and B cells regulating IgG production. *Immunology* **84**, 105-110.

Hanrahan C. F., Kimpton W. G., Howard C. J., Parsons K. R., Brandon M. R., Andrews A. E. and Nash A. D. (1997) Cellular requirements for the activation and proliferation of ruminant gammadelta T cells. *J Immunol* **159**, 4287-4294.

Harrison L. C., Dempsey-Collier M., Kramer D. R. and Takahashi K. (1996) Aerosol insulin induces regulatory CD8 gamma delta T cells that prevent murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* **184**, 2167-2174.

Hayday A. C., Geng L. (1997) gammadelta cells regulate autoimmunity. *Curr Opin Immunol* **9**, 884-889

Hayday A. C., Barber D. F., Douglas N. and Hoffman E. S. (1999) Signals involved in gamma/delta T cell versus alpha/beta T cell lineage commitment. *Semin Immunol* **11**, 239-249.

Hayday A. C. (2000) [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu.Rev.Immunol.* **18**, 975-1026.

Hein W. R. and Dudler L. (1993) Divergent evolution of T cell repertoires: extensive diversity and developmentally regulated expression of the sheep gamma delta T cell receptor. *Embo J* **12**, 715-724.

Helgeland L., Brandtzaeg P., Rolstad B. and Vaage J. T. (1997) Sequential development of intraepithelial gamma delta and alpha beta T lymphocytes expressing CD8 alpha beta in neonatal rat intestine: requirement for the thymus. *Immunology* **92**, 447-456.

Hirji N., Lin T. J. and Befus A. D. (1997) A novel CD8 molecule expressed by alveolar and peritoneal macrophages stimulates nitric oxide production. *J Immunol* **158**, 1833-1840.

Hirji N. S., Lin T. J., Gilchrist M., Nault G., Nohara O., Grill B. J., Belosevic M., Stenton G. R., Schreiber A. D. and Befus A. D. (1999) Novel CD8 molecule on macrophages and mast cells: expression, function and signaling. *Int Arch Allergy Immunol* **118**, 180-182.

Hisaeda H., Nagasawa H., Maeda K., Maekawa Y., Ishikawa H., Ito Y., Good R. A. and Himeno K. (1995) Gamma delta T cells play an important role in hsp65 expression and in acquiring protective immune responses against infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* **155**, 244-251.

Hoffmeyer, A. (1994) Untersuchungen zur Zytokin-Expression von gamma/delta T Zellen der Ratte. Diplomarbeit an der Universität Würzburg, Biologische Fakultät.

Hsieh B., Schrenzel M. D., Mulvania T., Lepper H. D., DiMolfetto-Landon L. and Ferrick D. A. (1996) *In vivo* cytokine production in murine listeriosis. Evidence for immunoregulation by gamma delta+ T cells. *J Immunol* **156**, 232-237.

Hunig T. (1985) The cell surface molecule recognized by the erythrocyte receptor of T lymphocytes. Identification and partial characterization using a monoclonal antibody. *J.Exp.Med.* **162**, 890-901.

Hunig T., Wallny H. J., Hartley J. K., Lawetzky A. and Tiefenthaler G. (1989) A monoclonal antibody to a constant determinant of the rat T cell antigen receptor that induces T cell activation. Differential reactivity with subsets of immature and mature T lymphocytes. *J.Exp.Med.* **169**, 73-86.

Irie H. Y., Ravichandran K. S. and Burakoff S. J. (1995) CD8 beta chain influences CD8 alpha chain-associated Lck kinase activity. *J Exp Med* **181**, 1267-1273.

- Ishihara S., Nieda M., Yabe T., Nakayama H., Osada T., Kitayama J., Nagawa H. and Juji T. (2000) NKR-P1A+ T cells in human liver: their distinct phenotype and function. *Mod Asp Immunobiol* **1**, 48-51.
- Janeway C. A., Jr. (1992) The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu Rev Immunol* **10**, 645-674.
- Janeway C. A., Jr. and Bottomly K. (1996) Responses of T cells to ligands for the T-cell receptor. *Semin Immunol* **8**, 108-115.
- Jarjour W., Mizzen L. A., Welch W. J., Denning S., Shaw M., Mimura T., Haynes B. F. and Winfield J. B. (1990) Constitutive expression of a groEL-related protein on the surface of human gamma/delta cells. *J Exp Med* **172**, 1857-1860.
- Jefferies W. A., Green J. R. and Williams A. F. (1985) Authentic T helper CD4 (W3/25) antigen on rat peritoneal macrophages. *J.Exp.Med.* **162**, 117-127.
- Kang J.; Coles M., Cado D. and Raulet D. H. (1998) The developmental fate of T cells is critically influenced by TCR gammadelta expression. *Immunity* **8**, 427-438.
- Kaufmann S. H., Blum C. and Yamamoto S. (1993) Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells *in vivo*: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9620-9624.
- Kaufmann S. H. (1996) gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2272-2279.
- Kempf M. C., Cesbron-Delauw M. F., Deslee D., Gross U., Herrmann T. and Sutton P. (1999) Different manifestations of *Toxoplasma gondii* infection in F344 and LEW rats. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **187**, 137-142.
- Kessler B., Hudrisier D., Schroeter M., Tschopp J., Cerottini J. C. and Luescher I. F. (1998) Peptide modification or blocking of CD8, resulting in weak TCR signaling, can activate CTL for Fas- but not perforin-dependent cytotoxicity or cytokine production. *J Immunol* **161**, 6939-6946.
- Kim H. T., Nelson E. L., Clayberger C., Sanjanwala M., Sklar J. and Krensky A. M. (1995) Gamma delta T cell recognition of tumor Ig peptide. *J Immunol* **154**, 1614-1623.
- Kimura Y., Tomida S., Matsumoto Y., Hiromatsu K. and Yoshikai Y. (1996) Evidence for the early recruitment of T-cell receptor gamma delta+ T cells during rat listeriosis. *Immunology* **87**, 21-28.
- Kinebuchi M., Kikuchi K. and Matsuura A. (1994) Rat T-cell receptor gamma chain sequences: identification of conserved gene segments and a unique chimeric constant region gene, C4L. *Immunogenetics* **40**, 449-455.
- King D. P., Hyde D. M., Jackson K. A., Novosad D. M., Ellis T. N., Putney L., Stovall M. Y., Van Winkle L. S., Beaman B. L. and Ferrick D. A. (1999) Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* **162**, 5033-5036.
- Kirisits M. J., Kunz H. W., Hassett A. L. and Gill T. J. d. (1992) Genomic DNA sequence and organization of a TL-like gene in the grc-G/C region of the rat. *Immunogenetics* **35**, 365-377.
- Kirisits M. J., Sawai H., Kunz H. W. and Gill T. J., 3rd. (1994) Multiple TL-like loci in the grc-G/C region of the rat. *Immunogenetics* **39**, 301-315.
- Koller B. H., Marrack P., Kappler J. W. and Smithies O. (1990) Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* **248**, 1227-1230.

- Kraus E., Lambracht D., Wonigeit K. and Hunig T. (1996) Negative regulation of rat natural killer cell activity by major histocompatibility complex class I recognition. *Eur.J.Immunol.* **26**, 2582-2586.
- Kuhnlein P., Park J. H., Herrmann T., Elbe A. and Hunig T. (1994) Identification and characterization of rat gamma/delta T lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the gamma/delta T cell receptor. *J.Immunol.* **153**, 979-986.
- Kuhnlein P., Mitnacht R., Torres-Nagel N. E., Herrmann T., Elbe A. and Hunig T. (1996) The canonical T cell receptor of dendritic epidermal gamma delta T cells is highly conserved between rats and mice. *Eur J Immunol* **26**, 3092-3097.
- Kwan Lim G. E., McNeill L., Whitley K., Becker D. L. and Zamoyska R. (1998) Co-capping studies reveal CD8/TCR interactions after capping CD8 beta polypeptides and intracellular associations of CD8 with p56(lck). *Eur J Immunol* **28**, 745-754.
- Kyes S., Carew E., Carding S. R., Janeway C. A., Jr. and Hayday A. (1989) Diversity in T-cell receptor gamma gene usage in intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5527-5531.
- Ladel C. H., Hess J., Daugelat S., Mombaerts P., Tonegawa S. and Kaufmann S. H. (1995) Contribution of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to immunity against Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin: studies with T cell receptor-deficient mutant mice. *Eur J Immunol* **25**, 838-846.
- Lauritsen J. P., Christensen M. D., Dietrich J., Kastrup J., Odum N. and Geisler C. (1998) Two distinct pathways exist for down-regulation of the TCR. *J Immunol* **161**, 260-267.
- Lawetzky A., Tiefenthaler G., Kubo R. and Hunig T. (1990) Identification and characterization of rat T cell subpopulations expressing T cell receptors alpha/beta and gamma/delta. *Eur J Immunol* **20**, 343-349.
- Lefranc M. P., Giudicelli V., Ginestoux C., Bodmer J., Muller W., Bontrop R., Lemaître M., Malik A., Barbie V. and Chaume D. (1999) IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res.* **27**, 209-212.
- Levelt C. N., de Jong Y. P., Mizoguchi E., O'Farrelly C., Bhan A. K., Tonegawa S., Terhorst C. and Simpson S. J. (1999) High- and low-affinity single-peptide/MHC ligands have distinct effects on the development of mucosal CD8 $\alpha$ alpha and CD8 $\alpha$ phbeta T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5628-5633.
- Li H., Lebedeva M., Llera A. S., Fields B. A., Brenner M. B. and Mariuzza R. A. (1998) Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* **391**, 502-506.
- Lin T. J., Hirji N., Nohara O., Stenton G. R., Gilchrist M. and Befus A. D. (1998) Mast cells express novel CD8 molecules that selectively modulate mediator secretion. *J Immunol* **161**, 6265-6272.
- Liu L., Zhang M., Jenkins C. and MacPherson G. G. (1998) Dendritic cell heterogeneity *in vivo*: two functionally different dendritic cell populations in rat intestinal lymph can be distinguished by CD4 expression. *J Immunol* **161**, 1146-1155.
- Livak F., Petrie H. T., Crispe I. N. and Schatz D. G. (1995) In-frame TCR delta gene rearrangements play a critical role in the alpha beta/gamma delta T cell lineage decision. *Immunity* **2**, 617-627.
- MacDonald H. R., Schreyer M., Howe R. C. and Bron C. (1990) Selective expression of CD8 alpha (Ly-2) subunit on activated thymic gamma/delta cells. *Eur J Immunol* **20**, 927-930.
- Machugh N. D., Mburu J. K., Carol M. J., Wyatt C. R., Orden J. A. and Davis W. C. (1997) Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue



distribution. *Immunology* **92**, 340-345.

Malissen M., Trucy J., Jouvin Marche E., Cazenave P. A., Scollay R. and Malissen B. (1992) Regulation of TCR alpha and beta gene allelic exclusion during T-cell development. *Immunol.Today* **13**, 315-322.

Manara G. C., Sansoni P., Badiali-De Giorgi L., Gallinella G., Ferrari C., Brianti V., Fagnoni F. F., Ruegg C. L., De Panfilis G. and Pasquinelli G. (1993) New insights suggesting a possible role of a heat shock protein 70-kD family-related protein in antigen processing/presentation phenomenon in humans. *Blood* **82**, 2865-2871.

Matsuzaki G., Hiromatsu K., Yoshikai Y., Muramori K. and Nomoto K. (1993) Characterization of T-cell receptor gamma delta T cells appearing at the early phase of murine *Listeria monocytogenes* infection. *Immunology* **78**, 22-27.

Matsuzaki G., Takada H. and Nomoto K. (1999) *Escherichia coli* infection induces only fetal thymus-derived gamma delta T cells at the infected site. *Eur J Immunol* **29**, 3877-3886.

McMenamin C., Pimm C., McKersey M. and Holt P. G. (1994) Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen-specific gamma delta T cells. *Science* **265**, 1869-1871.

McMenamin C., McKersey M., Kuhnlein P., Hunig T. and Holt P. G. (1995) Gamma delta T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J Immunol* **154**, 4390-4394.

Mehal W. Z. and Crispe I. N. (1998) TCR ligation on CD8+ T cells creates double-negative cells *in vivo*. *J Immunol* **161**, 1686-1693.

Melian A., Watts G. F. M., Shamshev A., DeLibero G., Clatworthy A., Vincent M., Brenner M. B., Behar S., Niazi K., Modlin R. L., Almo S., Ostrov D., Nathenson S. G. and Porcelli S. A. (2000) Molecular recognition of human CD1b antigen complexes: Evidence for a common pattern of interaction with alphabeta TCRs. *J Immunol* **165**, 4494-4504.

Mishell B. B. and Shiigi S. M. (1980) Selected methods in cellular immunology. Freeman and Company, San Francisco

Mitnacht R., Bischof A., Torres-Nagel N. and Hunig T. (1998) Opposite CD4/CD8 lineage decisions of CD4+8+ mouse and rat thymocytes to equivalent triggering signals: correlation with thymic expression of a truncated CD8 alpha chain in mice but not rats. *J Immunol* **160**, 700-707.

Mixter P. F., Russell J. Q., Morrissette G. J., Charland C., Aleman-Hoey D. and Budd R. C. (1999) A model for the origin of TCR-alphabeta+ CD4-CD8- B220+ cells based on high affinity TCR signals. *J Immunol* **162**, 5747-5756.

Moebius U., Kober G., Griscelli A. L., Hercend T. and Meuer S. C. (1991) Expression of different CD8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol* **21**, 1793-1800.

Mombaerts P., Arnoldi J., Russ F., Tonegawa S. and Kaufmann S. H. (1993) Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* **365**, 53-56.

Mowat A. M. and Viney J. L. (1997) The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev* **156**, 145-166.

Nakayama K., Negishi I., Kuida K., Louie M. C., Kanagawa O., Nakauchi H. and Loh D. Y. (1994) Requirement for CD8 beta chain in positive selection of CD8-lineage T cells. *Science* **263**, 1131-1133.

Ohno H., Ono S., Hirayama N., Shimada S. and Saito T. (1994) Preferential usage of the Fc receptor gamma chain in the T cell antigen receptor complex by gamma/delta T cells localized in epithelia. *J*

*Exp Med* **179**, 365-369.

Omri B., Crisanti P., Marty M. C., Alliot F., Fagard R., Molina T. and Pessac B. (1996) The Lck tyrosine kinase is expressed in brain neurons. *J.Neurochem.* **67**, 1360-1364.

Paliard X., Malefijt R. W., de Vries J. E. and Spits H. (1988) Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones. *Nature* **335**, 642-644.

Pannetier C., Cochet M., Darche S., Casrouge A., Zoller M. and Kourilsky P. (1993) The sizes of the CDR3 hypervariable regions of the murine T-cell receptor beta chains vary as a function of the recombined germ-line segments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4319-4323.

Park J. H., Mitnacht R., Torres-Nagel N. and Hunig T. (1993) T cell receptor ligation induces interleukin (IL) 2R beta chain expression in rat CD4,8 double positive thymocytes, initiating an IL-2-dependent differentiation pathway of CD8 alpha+/beta- T cells. *J Exp Med* **177**, 541-546.

Park S. Y., Arase H., Wakizaka K., Hirayama N., Masaki S., Sato S., Ravetch J. V. and Saito T. (1995) Differential contribution of the FcR gamma chain to the surface expression of the T cell receptor among T cells localized in epithelia: analysis of FcR gamma-deficient mice. *Eur J Immunol* **25**, 2107-2110.

Park J. H., Hanke T. and Hunig T. (1996) Identification and cellular distribution of the rat interleukin-2 receptor beta chain: induction of the IL-2R alpha- beta+ phenotype by major histocompatibility complex class I recognition during T cell development *in vivo* and by T cell receptor stimulation of CD4+8+ immature thymocytes *in vitro*. *Eur J Immunol* **26**, 2371-2375.

Parker K. E., Carter C. A., Murphy G. and Fabre J. W. (1991) The rat RT.BM1 MHC class I cDNA shows a high level of sequence similarity to the mouse H-2T23d gene. *Immunogenetics* **34**, 211-213.

Passoni L., Hoffman E. S., Kim S., Crompton T., Pao W., Dong M. Q., Owen M. J. and Hayday A. C. (1997) Intrathymic delta selection events in gammadelta cell development. *Immunity* **7**, 83-95.

Pena-Rossi C., Zuckerman L. A., Strong J., Kwan J., Ferris W., Chan S., Tarakhovsky A., Beyers A. D. and Killeen N. (1999) Negative regulation of CD4 lineage development and responses by CD5. *J Immunol* **163**, 6494-6501.

Penninger J. M., Wen T., Timms E., Potter J., Wallace V. A., Matsuyama T., Ferrick D., Sydora B., Kronenberg M. and Mak T. W. (1995) Spontaneous resistance to acute T-cell leukaemias in TCRV gamma 1.1J gamma 4C gamma 4 transgenic mice. *Nature* **375**, 241-244.

Pereira P., Zijlstra M., McMaster J., Loring J. M., Jaenisch R. and Tonegawa S. (1992) Blockade of transgenic gamma delta T cell development in beta 2-microglobulin deficient mice. *Embo J* **11**, 25-31.

Pereira P., Lafaille J. J., Gerber D. and Tonegawa S. (1997) The T cell receptor repertoire of intestinal intraepithelial gammadelta T lymphocytes is influenced by genes linked to the major histocompatibility complex and to the T cell receptor loci. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5761-5766.

Pereira P., Hermitte V., Lembezat M. P., Boucontet L., Azuara V. and Grigoriadou K. (2000) Developmentally regulated and lineage-specific rearrangement of T cell receptor Valpha/delta gene segments [In Process Citation]. *Eur.J.Immunol.* **30**, 1988-1997.

Pestano G. A., Zhou Y., Trimble L. A., Daley J., Weber G. F. and Cantor H. (1999) Inactivation of misselected CD8 T cells by CD8 gene methylation and cell death. *Science* **284**, 1187-1191.

Poggi A., Zocchi M. R., Costa P., Ferrero E., Borsellino G., Placido R., Galgani S., Salvetti M., Gasperini C., Ristori G., Brosnan C. F. and Battistini L. (1999) IL-12-mediated NKR1A up-regulation and consequent enhancement of endothelial transmigration of V delta 2+ TCR gamma delta+ T

- lymphocytes from healthy donors and multiple sclerosis patients. *J Immunol* **162**, 4349-4354.
- Ramirez F., McKnight A. J., Silva A. and Mason D. (1992) Glucocorticoids induce the expression of CD8 alpha chains on concanavalin A-activated rat CD4+ T cells: induction is inhibited by rat recombinant interleukin 4. *J Exp Med* **176**, 1551-1559.
- Ramirez F., Fowell D. J., Puklavec M., Simmonds S. and Mason D. (1996) Glucocorticoids promote a TH2 cytokine response by CD4+ T cells *in vitro*. *J.Immunol.* **156**, 2406-2412.
- Reinherz E. L., Tan K., Tang L., Kern P., Liu J., Xiong Y., Hussey R. E., Smolyar A., Hare B., Zhang R., Joachimiak A., Chang H. C., Wagner G. and Wang J. (1999) The crystal structure of a T cell receptor in complex with peptide and MHC class II. *Science* **286**, 1913-1921.
- Rocha B., Vassalli P. and Guy-Grand D. (1994) Thymic and extrathymic origins of gut intraepithelial lymphocyte populations in mice. *J Exp Med* **180**, 681-686.
- Rock E. P., Sibbald P. R., Davis M. M. and Chien Y. H. (1994) CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J Exp Med* **179**, 323-328.
- Roman-Roman S., Ferradini L., Azocar J., Genevee C., Hercend T. and Triebel F. (1991) Studies on the human T cell receptor alpha/beta variable region genes. I. Identification of 7 additional V alpha subfamilies and 14 J alpha gene segments. *Eur J Immunol* **21**, 927-933.
- Rosat J. P., MacDonald H. R. and Louis J. A. (1993) A role for gamma delta + T cells during experimental infection of mice with *Leishmania major*. *J Immunol* **150**, 550-555.
- Saito H., Kanamori Y., Takemori T., Nariuchi H., Kubota E., Takahashi-Iwanaga H., Iwanaga T. and Ishikawa H. (1998) Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches . *Science* **280**, 275-278.
- Schild H., Mavaddat N., Litzenberger C., Ehrich E. W., Davis M. M., Bluestone J. A., Matis L., Draper R. K. and Chien Y. H. (1994) The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* **76**, 29-37.
- Schlipkoter E. and Hunig T. (1990) The neonatally T cell receptor 2-suppressed rat: lymphocyte subset composition and immune reactivity. *Eur J Immunol* **20**, 2621-2627.
- Schonrich G., Momburg F., Malissen M., Schmitt-Verhulst A. M., Malissen B., Hammerling G. J. and Arnold B. (1992) Distinct mechanisms of extrathymic T cell tolerance due to differential expression of self antigen. *Int Immunol* **4**, 581-590.
- Schweighoffer E. and Fowlkes B. J. (1996) Positive selection is not required for thymic maturation of transgenic gamma delta T cells. *J Exp Med* **183**, 2033-2041.
- Sciammas R., Johnson R. M., Sperling A. I., Brady W., Linsley P. S., Spear P. G., Fitch F. W. and Bluestone J. A. (1994) Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. *J Immunol* **152**, 5392-5397.
- Shirwan H., Cajulis E., Makowka L. and Cramer D. V. (1995) Differential usage of the T cell receptor repertoire for allorecognition of heart, liver, and kidney grafts. *Transplantation* **59**, 1709-1714.
- Shirwan H., Barwari L., Fuss I., Makowka L. and Cramer D. V. (1995) Structure and repertoire usage of rat TCR alpha-chain genes in T cells infiltrating heart allografts. *J Immunol* **154**, 1964-1972.
- Siegling A., Lehmann M., Platzer C., Emmrich F. and Volk H. D. (1994) A novel multispecific competitor fragment for quantitative PCR analysis of cytokine gene expression in rats. *J.Immunol.Methods* **177**, 23-28.

- Sieling P. A., Ochoa M.-T., Jullien D., Leslie D. S., Sabet S., Rosat J.-P., Burdick A. E., Rea T. H., Brenner M. B., Porcelli S. T. and Modlin R. L. (2000) Evidence for human CD4+ T cells in the CD1-restricted repertoire: Derivation of mycobacteria-reactive T cells from leprosy lesions. *J Immunol* **164**, 4790-4796.
- Simarro M., Pelassy C., Calvo J., Places L., Aussel C. and Lozano F. (1997) The cytoplasmic domain of CD5 mediates both TCR/CD3-dependent and -independent diacylglycerol production. *J Immunol* **159**, 4307-4315.
- Speir J. A., Abdel-Motal U. M., Jondal M. and Wilson I. A. (1999) Crystal structure of an MHC class I presented glycopeptide that generates carbohydrate-specific CTL. *Immunity* **10**, 51-61.
- Sperling A. I., Linsley P. S., Barrett T. A. and Bluestone J. A. (1993) CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor-gamma delta+ T lymphocytes. *J Immunol* **151**, 6043-6050.
- Spits H., Paliard X., Vandekerckhove Y., van Vlasselaer P. and de Vries J. E. (1991) Functional and phenotypic differences between CD4+ and CD4- T cell receptor-gamma delta clones from peripheral blood. *J Immunol* **147**, 1180-1188.
- Steele C. R., Oppenheim D. E. and Hayday A. C. (2000) gammadelta T cells: Non-classical ligands for non-classical cells. *Curr Biology* **10**, R282-R285.
- Straube F. (1996) Untersuchungen zur Antigen-spezifität und Aktivierung von gamma/delta T Zellen der Ratte. Diplomarbeit an der Universität Würzburg, Biologische Fakultät.
- Szymanska B., Rajan A. J., Gao Y. L., Tronczynska E., Brosnan C. F. and Selmaj K. (1999) Evidence for gammadelta T cells with a restricted Vgamma6 junctional region in the normal mouse central nervous system. *J Neuroimmunol* **100**, 260-265.
- Tacke M., Clark G. J., Dallman M. J. and Hunig T. (1995) Cellular distribution and costimulatory function of rat CD28. Regulated expression during thymocyte maturation and induction of cyclosporin A sensitivity of costimulated T cell responses by phorbol ester. *J Immunol* **154**, 5121-5127.
- Takano M., Nishimura H., Kimura Y., Mokuno Y., Washizu J., Itohara S., Nimura Y. and Yoshikai Y. (1998) Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in Escherichia coli infection in mice. *Infect Immun* **66**, 3270-3278.
- Tamura Y., Tsuboi N., Sato N. and Kikuchi K. (1993) 70 kDa heat shock cognate protein is a transformation-associated antigen and a possible target for the host's anti-tumor immunity. *J Immunol* **151**, 5516-5524.
- Tanaka Y., Morita C. T., Nieves E., Brenner M. B. and Bloom B. R. (1995) Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. *Nature* **375**, 155-158.
- Teitell M., Mescher M. F., Olson C. A., Littman D. R. and Kronenberg M. (1991) The thymus leukemia antigen binds human and mouse CD8. *J Exp Med* **174**, 1131-1138.
- Terry L. A., DiSanto J. P., Small T. N. and Flomenberg N. (1990) Differential expression and regulation of the human CD8 alpha and CD8 beta chains. *Tissue Antigens* **35**, 82-91.
- Thome M., Germain V., DiSanto J. P. and Acuto O. (1996) The p56lck SH2 domain mediates recruitment of CD8/p56lck to the activated T cell receptor/CD3/zeta complex. *Eur J Immunol* **26**, 2093-2100.
- Torres-Nagel N., Kraus E., Brown M. H., Tiefenthaler G., Mitnacht R., Williams A. F. and Hunig T. (1992) Differential thymus dependence of rat CD8 isoform expression. *Eur J Immunol* **22**, 2841-2848.
- Torres-Nagel N. E., Herrmann T. and Hünig T. (1998) The rat T cell receptor. In: Pastoret P. P., Griebel P., Bazin H. and Govaerts A eds., Handbook of vertebrate immunology. Chapter V: Immunology of

the rat. F:G:M: Kroese (ed), Academic Press, New York, 162-168.

Tsujimura K., Takahashi T., Morita A., Hasegawa-Nishiwaki H., Iwase S. and Obata Y. (1996) Positive selection of gamma delta CTL by TL antigen expressed in the thymus. *J Exp Med* **184**, 2175-2184.

Tsujimura K., Obata Y., Iwase S., Matsudaira Y., Ozeki S. and Takahashi T. (2000) The epitope detected by cytotoxic T lymphocytes against thymus leukemia (TL) antigen is TAP independent. *Int Immunol* **12**, 1217-1225.

Valitutti S., Muller S., Cella M., Padovan E. and Lanzavecchia A. (1995) Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* **375**, 148-151.

van der Meide P. H., Borman T. H., de Labie M. C., Wubben J. A., Botman C. A., Vijverberg K. and Schellekens H. (1990) A sensitive two-site enzyme immunoassay for the detection of rat interferon-gamma in biological fluids. *J Interferon Res.* **10**, 183-189.

van Oers N. S., Lowin-Kropf B., Finlay D., Connolly K. and Weiss A. (1996) alpha beta T cell development is abolished in mice lacking both Lck and Fyn protein tyrosine kinases. *Immunity* **5**, 429-436.

Vidovic D., Roglic M., McKune K., Guerder S., MacKay C. and Dembic Z. (1989) Qa-1 restricted recognition of foreign antigen by a gamma delta T-cell hybridoma. *Nature* **340**, 646-650.

Viola A., Salio M., Tuosto L., Linkert S., Acuto O. and Lanzavecchia A. (1997) Quantitative contribution of CD4 and CD8 to T cell antigen receptor serial triggering. *J Exp Med* **186**, 1775-1779.

Waldmann T. A. (1996) The promiscuous IL-2/IL-15 receptor: a target for immunotherapy of HTLV-I-associated disorders. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol*, **13 Suppl 1**, S179-85

Wang C. R., Lambracht D., Wonigeit K., Howard J. C. and Lindahl K. F. (1995) Rat RT1 orthologs of mouse H2-M class Ib genes. *Immunogenetics* **42**, 63-67.

Warren H. S., Kinnear B. F., Kastelein R. L. and Lanier L. L. (1996) Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells. *J Immunol.* **156**, 3254-3259.

Washburn T., Schweighoffer E., Gridley T., Chang D., Fowlkes B. J., Cado D. and Robey E. (1997) Notch activity influences the alphabeta versus gammadelta T cell lineage decision. *Cell* **88**, 833-843.

Watson D., Ando T. and Knight J. F. (2000) Sequence and diversity of the rat delta T-cell receptor. *Immunogenetics* **51**, 714-722.

Webb M., Mason D. W. and Williams A. F. (1979). Inhibition of mixed lymphocyte responses by monoclonal antibody specific for a rat T lymphocyte subset. *Nature* **282**: 841-

Weber-Arden J., Wilbert O. M., Kabelitz D. and Arden B. (2000) V delta repertoire during thymic ontogeny suggests three novel waves of gamma delta TCR expression. *J Immunol* **164**, 1002-1012.

Weintraub B. C., Jackson M. R. and Hedrick S. M. (1994) Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. *J Immunol* **153**, 3051-3058.

Weiss A. and Littman D. R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**, 263-274.

Wells F. B., Gahm S. J., Hedrick S. M., Bluestone J. A., Dent A. and Matis L. A. (1991) Requirement for positive selection of gamma delta receptor-bearing T cells. *Science* **253**, 903-905.

Wen L., Pao W., Wong F. S., Peng Q., Craft J., Zheng B., Kelsoe G., Dianda L., Owen M. J. and Hayday

- A. C. (1996) Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells. *J Exp Med* **183**, 2271-2282.
- Wen L., Barber D. F., Pao W., Wong F. S., Owen M. J. and Hayday A. (1998) Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. *J Immunol* **160**, 1965-1974.
- Wesch D., Marx S. and Kabelitz D. (1997) Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol* **27**, 952-956.
- Wiest D. L., Ashe J. M., Abe R., Bolen J. B. and Singer A. (1996) TCR activation of ZAP70 is impaired in CD4+CD8+ thymocytes as a consequence of intrathymic interactions that diminish available p56lck. *Immunity* **4**, 495-504.
- Wilbert O. M., Weber-Arden J., Kabelitz D. and Arden B. (1997) TCR-delta gene rearrangement and selection during fetal thymocyte development. *J Immunol* **159**, 3338-3346.
- Williams A. F., Galfre G. and Milstein C. (1977) Analysis of cell surfaces by xenogeneic myeloma-hybrid antibodies: differentiation antigens of rat lymphocytes. *Cell* **12**, 663-673.
- Williams A. F., Barclay A. N., Clark S. J., Paterson D. J. and Willis A. C. (1987) Similarities in sequences and cellular expression between rat CD2 and CD4 antigens. *J.Exp.Med.* **165**, 368-380.
- Wilson A., Held W. and MacDonald H. R. (1994) Two waves of recombinase gene expression in developing thymocytes. *J.Exp.Med.* **179**, 1355-1360.
- Wilson A., de Villartay J. P. and MacDonald H. R. (1996) T cell receptor delta gene rearrangement and T early alpha (TEA) expression in immature alpha beta lineage thymocytes: Implications for alpha beta/gamma delta lineage commitment. *Immunity* **4**, 37-45.
- Wilson A. and MacDonald H. R. (1998) A limited role for beta-selection during gammadelta T cell development. *J Immunol* **161**, 5851-5854.
- Wingren C., Crowley M. P., Degano M., Chien Y. and Wilson I. A. (2000) Crystal structure of a gammadelta T cell receptor ligand T22: a truncated MHC-like fold. *Science* **287**, 310-314.
- Winkel K. D., Kronin V., Krummel M. F. and Shortman K. (1997) The nature of the signals regulating CD8 T cell proliferative responses to CD8alpha+ or CD8alpha- dendritic cells. *Eur J Immunol* **27**, 3350-3359.
- Woollett G. R., Barclay A. N., Puklavec M. and Williams A. F. (1985) Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* **15**, 168-173.
- Wysocki L. J. and Sato V. L. (1978) Panning for lymphocytes: A method for cell selection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75**: 2844-
- Zamoyska R., Vollmer A. C., Sizer K. C., Liaw C. W. and Parnes J. R. (1985) Two Lyt-2 polypeptides arise from a single gene by alternative splicing patterns of mRNA. *Cell* **43**, 153-163.
- Zhang W., Sloan-Lancaster J., Kitchen J., Tribble R. P. and Samelson L. E. (1998) LAT: the ZAP-70 tyrosine kinase substrate that links T cell receptor to cellular activation. *Cell* **92**, 83-92.
- Zijlstra M., Bix M., Simister N. E., Loring J. M., Raulet D. H. and Jaenisch R. (1990) Beta 2-microglobulin deficient mice lack CD4-8+ cytolytic T cells. *Nature* **344**, 742-746.

## 7 Abkürzungen

BCR	B Zellrezeptor
BSS	<i>balanced salt solution</i>
cDNA	(zu mRNA) komplementäre DNA
CDR	Kompatibilitätsdeterminierende Region ( <i>complementarity determining region</i> )
DETC	Dendritische Epidermale $\gamma/\delta$ T Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FACS	fluoreszenzaktivierter Zellschanner, bzw. -sorter
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
gDNA	genomische DNA
$\gamma/\delta$ iIEL	intestinale intraepitheliale $\gamma/\delta$ T Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
mAk	monoklonaler Antikörper
MACS	magnetaktivierter Zellsorter
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
mRNA	messenger („Boten“) RNA
TCR	T Zellrezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure

RT

reverse Transkription

SDS PAGE

SDS Polyacrylamidgelelektrophese

Upm

Umdrehungen pro Minute



## 8 Lebenslauf

### **Persönliche Daten:**

Name Frank Straube  
Adresse Dorfstraße 32  
79591 Eimeldingen  
Tel.: 07621 / 686324  
Fax: 0180 / 505254714149  
E mail: FrankStraube@web.de  
Geboren am 6.11.1970 in Fulda  
Familienstand ledig

### **Ausbildung:**

Grundschule 1976 – 1980 in Niederseelbach und Rommerz  
Gymnasium 1980 – 1989 Freiherr-vom-Stein-Schule Fulda

Wehrdienst Juni 1989 – August 1990

### **Hochschule:**

Studium 1990 – 1996 Biologie an der Universität Würzburg  
Schwerpunktfächer: Biotechnologie, Pflanzenphysiologie, Virologie und Immunbiologie  
Diplomarbeit 1995 – 1996 am Institut für Virologie und Immunologie, Würzburg  
*„Untersuchungen zur Antigenpezifität und Aktivierung von  $\gamma\delta$  T Zellen der Ratte“*  
bei Prof. Thomas Hünig in der Arbeitsgruppe Dr. Thomas Herrmann  
Dissertation ab Juli 1996 am Institut für Virologie und Immunologie, Würzburg, im Rahmen des

Graduiertenkollegs „Infektiologie“ (bis 1999) und  
des Interdisziplinären Zentrums für klinische  
Forschung (IZKF) Würzburg

*„Untersuchungen zur Rolle von CD8 bei der Aktivierung  
von  $\gamma/\delta$  T Zellen der Ratte“*

bei PD Dr. Thomas Herrmann

**Aktuelle Tätigkeit:**

Forschungstätigkeit

ab August 2000 in der Genetischen und  
Experimentellen Toxikologie, PCS, Novartis Pharma  
in Basel, Schweiz; gefördert von der „Stiftung 3R“  
(*refinement, reduction, and replacement of animal  
experiments*)

Charakterisierung der Vorgänge bei der Aktivierung  
Dendritischer Zellen durch Kontaktallergene

bei Dr. Peter Ulrich

Eimeldingen, den

## 9 Publikationsliste

### Originalarbeiten:

Straube F. und Herrmann T. (2000) Expression of functional CD8 $\alpha\beta$  heterodimer on rat  $\gamma\delta$  T cells does not correlate with the CDR3 length of the TCR $\delta$  chain predicted for MHC class I-restricted antigen recognition. *Eur J Immunol* **30**, 3562-3568.

### Abstracts:

Straube F. und Herrmann T. (1998) Activation induced downmodulation of the CD8 $\beta$  chain on rat  $\gamma\delta$  but not  $\alpha\beta$  T cells. *Immunobiology* **199**, 504.

Straube F. und Herrmann T. (1999) CD8 $\alpha\beta$  on rat  $\gamma\delta$  T cells is not a marker for MHC restricted antigen recognition but may have costimulatory properties. *Immunobiology* **200**, 450.

Wagner S., Straube F., Schimpl A. und Herrmann T. (2000) Expression of the CD8 $\alpha\beta$  heterodimer on  $\gamma\delta$  T cells is neither a marker for MHC class I restricted antigen recognition nor for MHC class I driven positive selection. *Immunobiology* **203**, 40.