

Aus der Klinik für Kinder–Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. U. Göbel

**In vitro Untersuchungen zur Stimulation von humanen TZR  $\alpha/\beta$ +  
CD4- CD8- doppeltnegativen T-Lymphozyten**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von

Dirk Eichelbauer

2004

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H. M. Raab

Dekan

Referent: Priv. Doz. Dr. Tim Niehues

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Colin R. MacKenzie

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------|----|
| Abkürzungen                                                              | 04 |
| 1. Einleitung                                                            | 05 |
| 1.1. Definition doppeltnegativer T-Zellen                                | 05 |
| 1.2. Ontogenese doppeltnegativer T-Zellen                                | 05 |
| 1.3. Antigenerkennung und Funktion von doppeltnegativen T-Zellen         | 06 |
| 1.4. Rolle von doppeltnegativen T-Zellen bei Erkrankungen                | 07 |
| 1.5. Rolle von doppeltnegativen T-Zellen bei der Immunität gegenüber TBC | 07 |
| 1.6. Ziele dieser Arbeit                                                 | 08 |
| 2. Material                                                              | 09 |
| 2.1. Zellmaterial                                                        | 09 |
| 2.2. Medien                                                              | 09 |
| 2.3. Stimulanzien                                                        | 10 |
| 2.4. Monoklonale Antikörper                                              | 10 |
| 2.4.1. Bezugsquellen                                                     | 10 |
| 2.4.1.1. Antikörper                                                      | 10 |
| 2.4.2. Kontrollen                                                        | 13 |
| 2.4.2.1. Positivkontrollen                                               | 13 |
| 2.4.2.2. Negativkontrollen                                               | 13 |
| 2.4.3. Zweitantikörper                                                   | 13 |
| 2.4.4. Magnetkonjugierte Antikörper                                      | 13 |
| 2.5. Immunoassays                                                        | 13 |
| 2.6. Chemikalien                                                         | 13 |
| 2.7. Materialien                                                         | 14 |
| 2.8. Geräte                                                              | 14 |
| 3. Methoden                                                              | 15 |
| 3.1. Isolierung mononukleärer Zellen                                     | 15 |
| 3.1.1. Isolierung von doppeltnegativen und einfach positiven T-Zellen    | 15 |
| 3.1.2. Einfrieren von mononukleären Zellen                               | 16 |
| 3.1.3. Auftauen von mononukleären Zellen                                 | 16 |

|          |                                                                                            |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.     | Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie                                              | 18 |
| 3.2.1.   | Phänotypisierung isolierter mononukleärer Zellen                                           | 18 |
| 3.3.     | Proliferationsassay                                                                        | 18 |
| 3.4.     | Kurzzeitkultur                                                                             | 19 |
| 3.5.     | ELISA                                                                                      | 19 |
| 3.6.     | Induktion von CD1 auf antigenpräsentierenden Zellen                                        | 20 |
| 3.7.     | Aufbereitung von Mykolsäuren                                                               | 20 |
| 4.       | Ergebnisse                                                                                 | 21 |
| 4.1.     | Überprüfung der Reinheit frisch isolierter T-Zellen                                        | 21 |
| 4.1.1.   | Doppeltnegative Zellen                                                                     | 21 |
| 4.1.2.   | CD4 Zellen                                                                                 | 21 |
| 4.1.3.   | CD8 Zellen                                                                                 | 21 |
| 4.2.     | Stimulation von doppeltnegativen Zellen mit konventionellen Antigenen                      | 25 |
| 4.2.1.   | Polyklonale Aktivierung mit PHA                                                            | 25 |
| 4.2.2.   | Aktivierung durch Superantigene (SEB)                                                      | 27 |
| 4.2.2.1. | Proliferation in Abhängigkeit der SEB-Konzentration                                        | 27 |
| 4.2.2.2. | Stimulation mit SEB in An- und Abwesenheit von<br>antigenpräsentierenden Zellen            | 27 |
| 4.2.3.   | Aktivierung durch Recall-Antigene (Tetanus Toxoid)                                         | 29 |
| 4.2.3.1. | Proliferation in Abhängigkeit der Tetanus Toxoid Konzentration                             | 29 |
| 4.2.3.2. | Stimulation mit Tetanus Toxoid in An- und Abwesenheit von<br>antigenpräsentierenden Zellen | 29 |
| 4.3.     | Stimulation von doppeltnegativen Zellen mit unkonventionellem Antigen<br>(Mykolsäure)      | 31 |
| 4.3.1.   | Induktion von CD1 auf antigenpräsentierenden Zellen                                        | 31 |
| 4.3.2.   | Stimulation mit Mykolsäure                                                                 | 31 |
| 4.3.2.1. | Stimulation mit verschiedenen Mykolsäurekonzentrationen                                    | 31 |
| 4.3.2.2. | Abhängigkeit der Stimulationsfähigkeit vom Typ der<br>antigenpräsentierenden Zellen        | 31 |
| 4.4.     | Eigenschaften stimulierter doppeltnegativer Zellen                                         | 34 |
| 4.4.1.   | Phänotypische Veränderungen                                                                | 34 |
| 4.4.1.1. | Aktivierungsmarker; CD25 und HLA-DR Expression                                             | 34 |

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.4.1.2. Expression der Marker für Apoptosebereitschaft (CD95/CD28) und des Kostimulationsliganden CD86           | 36 |
| 4.5. Zytokinprofil                                                                                                | 37 |
| 5. Diskussion                                                                                                     | 38 |
| 5.1. Isolierung von doppeltnegativen Zellen                                                                       | 38 |
| 5.2. Antigenerkennung durch doppeltnegative Zellen und Eigenschaften von doppeltnegativen Zellen bei Aktivierung. | 38 |
| 5.3. Stimulation von doppeltnegativen Zellen durch Mykolsäuren                                                    | 40 |
| 5.4. Ausblick und mögliche klinische Bedeutung von doppeltnegativen Zellen                                        | 41 |
| 6. Literaturverzeichnis                                                                                           | 43 |
| 7. Danksagungen                                                                                                   | 48 |
| 8. Curriculum vitae                                                                                               | 49 |
| 9. Zusammenfassung                                                                                                | 50 |

## Abkürzungen

|                  |                                                                                                                       |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ag</b>        | <b>Antigen</b>                                                                                                        |
| <b>Ak</b>        | <b>Antikörper</b>                                                                                                     |
| <b>APZ</b>       | <b>Antigen Präsentierende Zellen</b>                                                                                  |
| <b>BSA</b>       | <b>Bovines Serum Albumin</b>                                                                                          |
| <b>CD</b>        | <b>Cluster of Differentiation</b>                                                                                     |
| <b>DMSO</b>      | <b>Dimethylsulfoxid</b>                                                                                               |
| <b>DN Zellen</b> | <b>Doppelt Negative T-Zellen (TZR <math>\alpha/\beta</math> positive, CD4 und CD8 negative Zellen)</b>                |
| <b>ELISA</b>     | <b>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</b>                                                                            |
| <b>FACS</b>      | <b>Fluorescence Activated Cell Sorter</b>                                                                             |
| <b>FCS</b>       | <b>Fötales Kälberserum (foetal calf serum)</b>                                                                        |
| <b>FITC</b>      | <b>Fluorescein Isothiocyanat</b>                                                                                      |
| <b>Ig</b>        | <b>Immunglobulin</b>                                                                                                  |
| <b>IL</b>        | <b>Interleukin</b>                                                                                                    |
| <b>kD</b>        | <b>Kilodalton</b>                                                                                                     |
| <b>LPS</b>       | <b>Lipopolysaccharid</b>                                                                                              |
| <b>MG</b>        | <b>Molekulargewicht</b>                                                                                               |
| <b>MHC</b>       | <b>Major Histocompatibility Complex</b>                                                                               |
| <b>NK-Zellen</b> | <b>Natürliche Killerzellen</b>                                                                                        |
| <b>NRS</b>       | <b>Normal Rabbit Serum</b>                                                                                            |
| <b>PB</b>        | <b>Peripheres Blut</b>                                                                                                |
| <b>MNZ</b>       | <b>Mononukleäre Zellen</b>                                                                                            |
| <b>PBS</b>       | <b>Phosphate Buffered Saline</b>                                                                                      |
| <b>PE</b>        | <b>Phycoerythrin</b>                                                                                                  |
| <b>PerCP</b>     | <b>Peridinin Chlorophyll Protein</b>                                                                                  |
| <b>PHA</b>       | <b>Phytohämagglutinin</b>                                                                                             |
| <b>PI</b>        | <b>Propidium Iodid</b>                                                                                                |
| <b>PMA</b>       | <b>Phorol Myristat Acetat</b>                                                                                         |
| <b>SEB</b>       | <b>Staphylokokken Enterotoxin B</b>                                                                                   |
| <b>SP Zellen</b> | <b>Single Positive Cells ( einfach positive Zellen; CD3 und CD4 positive Zellen oder CD3 und CD8 positive Zellen)</b> |
| <b>TZR</b>       | <b>T-Zell-Rezeptor</b>                                                                                                |

# 1. Einleitung

## 1.1. Definition doppeltnegativer T-Zellen

T-Zellen stellen einen wichtigen Teil des menschlichen Immunsystems dar. Sie bilden einen Teil der zellulären Immunabwehr. Über ihren Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor (TZR), erkennen sie von Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) aufgearbeitete Antigene, die entweder über HLA-Klasse-I oder HLA-Klasse-II Moleküle präsentiert werden. Diese T-Zellen besitzen den  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor. Die Wichtigkeit von T-Zellen für das Immunsystem wird an den Folgen von Erkrankungen deutlich, bei denen T-Zellen fehlen oder defekt sind. Hierzu gehören die HIV Infektion und primäre Immundefekte, wie z.B. SCID (schwerer kombinierter Immundefekt), oder das Syndrom der "nackten" Lymphozyten (Bare Lymphocyte Syndrome), die unbehandelt zum Tode durch opportunistische Infektionen führen. Um mit den APZ interagieren zu können, braucht die T-Zelle zusätzliche Hilfsrezeptoren. Die wichtigsten dieser sogenannten Korezeptoren der T-Zellen sind entweder der CD4-Rezeptor, welcher mit dem HLA-Klasse-II-Molekül reagiert, oder der CD8-Rezeptor, welcher an das HLA-Klasse-I-Molekül der APZ bindet. Im peripheren Blut des Menschen findet sich eine Zellpopulation, die 0,5-2% der T-Zellen ausmacht. Die Besonderheit ist, dass sie zwar den  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor besitzt, aber weder den Hilfsrezeptor CD4 noch CD8 trägt. Im Folgenden werden diese Zellen als „doppelt negative“ T-Zellen (DN) bezeichnet.

## 1.2. Ontogenese doppeltnegativer T-Zellen

Die T-Zelle, welche sich wie alle anderen Blutzellen aus einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark entwickelt, erfährt ihre Prägung im Thymus. Dabei unterliegt sie einer speziellen positiven sowie auch einer negativen Selektion. Die positive Selektion stellt sicher, dass alle reifen T-Zellen auf Fremdanigene reagieren können, die von Antigenpräsentierenden Zellen über den MHC-Komplex dargeboten werden. Bei der negativen Selektion werden Zellen, die autoreaktiv sind, eliminiert. Bei diesem Prozess unterliegt die T-Zelle einem phänotypischen Wandel von  $CD3^- CD4^- CD8^-$  über  $CD3^+ CD4^+ CD8^+$  zu entweder  $CD3^+ CD4^+$  oder  $CD3^+ CD8^+$ . Bei DN Zellen ist der Selektionsmechanismus noch nicht geklärt. Einerseits sprechen Versuche mit thymektomierten Mäusen für eine

thymusunabhängige Selektionierung, da diese eine normale Anzahl an DN Zellen entwickeln (Bendelac, 1995; MacDonald, 1995), andererseits wurde durch den Transfer unreifer T-Zellen in den Thymus bestrahlter Mäuse gezeigt, dass der Thymus zur Heranreifung benötigt wird (MacDonald, 1995). Alternativ besteht die Hypothese, dass es durch Aktivierung von reifen, bereits selektionierten T-Zellen zu einer Herunterregulierung der Korezeptoren CD4 und CD8 kommt. In vitro besteht z.B. die Möglichkeit, aus CD8 Zellen durch Stimulation mit Ionomycin und PMA DN Zellen zu entwickeln, da die Produktion der CD8 $\alpha$  Kette unterdrückt wird (Erard, 1993).

### **1.3. Antigenerkennung und Funktion von doppeltnegativen T-Zellen**

Das Vorkommen von DN Zellen in verschiedenen Spezies deutet darauf hin, dass diese Population in der Evolution konserviert worden ist. Daher wird vermutet, dass DN Zellen eine wichtige Rolle in der Immunabwehr zukommt. Die Funktion ist allerdings noch nicht exakt charakterisiert. Vergleiche von Phänotyp und TZR-Repertoire mit einfach positiven Zellen [single positive (SP)] (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> oder CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) lassen vermuten, dass DN Zellen einem anderen Selektionsmechanismus unterliegen und auch die Antigenerkennung nicht derjenigen von SP Zellen entspricht (Brooks, 1993; Dellabona, 1994; Niehues, 1994; Porcelli, 1993). Die klassische Antigenerkennung benötigt entweder den CD4 oder den CD8 Hilfsrezeptor, um mit dem peptidpräsentierenden HLA-Klasse-I- respektive HLA-Klasse-II-Molekül interagieren zu können. In humanen DN Klonen konnte gezeigt werden, dass diese Nicht-Peptid-Antigene (Lipide, Glykolipide) erkennen (Beckman, 1994; Sieling, 1995). Eine Untergruppe von humanen DN Zellen ist CD1 restringiert (Bendelac, 1995; Porcelli, 1992). CD1 ist in der Lage, Antigene zu präsentieren. Im Gegensatz zu MHC Molekülen ist CD1 nicht polymorph, aber beinhaltet verschiedene Isotypen (CD1a - CD1e) (Bendelac, 1995[2]). Diese CD1 restringierten Zellen zeigen bevorzugt den Gebrauch von V $\beta$ 11 und V $\alpha$ 24 TZR (Brooks, 1993; Dellabona, 1994; Niehues, 1994) analog zu V $\beta$ 8 und V $\alpha$ 14 TZR in Maus NK1.1-Zellen (Vicari, 1996). Diese NK1.1-Zellen der Maus produzieren große Mengen an IL-4 innerhalb nur einer Stunde nach Aktivierung (Bendelac, 1995). Im Maussystem konnte gezeigt werden, dass einen Tag nach Verbrennung (10-15% der Körperoberfläche der Mäuse wurden neun Sekunden lang einer Gasflamme ausgesetzt) DN Zellen in der Milz vorkommen, die sowohl Typ 1 als auch Typ 2 Zytokine produzieren. Diese Zellen wurden hier als verbrennungsassoziierte



Suppressorzellen mit unspezifischer inhibitorischer Aktivität für Lymphozytenproliferation bezeichnet (Matsu, 1997).

#### **1.4. Rolle von doppeltnegativen T-Zellen bei Erkrankungen**

Bei verschiedenen Krankheiten wurde eine Erhöhung der DN Zellen im peripheren Blut festgestellt. So ergab sich eine deutliche Erhöhung dieser Zellen bei einigen Patienten mit Autoimmunerkrankungen wie SLE oder Myasthenia gravis (Yuriko Nagane, 1996).

Charakteristisch ist ein starker Anstieg von DN-Zellen bei Patienten mit dem Autoimmunen "Lymphoproliferative" Syndrom (ALPS) (Sneller, 1997), dessen molekulare Grundlage in Form von Fas-Mutationen (CD95) identifiziert werden konnte. Es wird vermutet, dass eine extreme Aktivierung der T-Zellen bei ALPS aufgrund der fehlenden "Ausschaltung" durch Fas vermittelte Apoptose zur Herunterregulierung von CD4 und CD8 und damit zu einer Anreicherung von DN Zellen führt. In neueren Arbeiten wird den DN Zellen bei ALPS eine immunregulatorische Rolle zugeordnet (Hamad, 2001).

#### **1.5. Rolle von doppeltnegativen T-Zellen bei der Immunität gegenüber TBC**

An Tuberkulose versterben jährlich ca. 2-3 Millionen Menschen. Die TBC-Impfung mit BCG hat nur einen etwa 50%igen Schutzeffekt (Colditz, 1994). Lymphozyten spielen in der TBC-Immunität eine zentrale Rolle. Interessanterweise sind es gerade die DN Zellen, die Hauptbestandteile der mykobakteriellen Zellmembran in Verbindung mit CD1-Präsentation spezifisch erkennen. Mykobakterien, wie Mykobakterium tuberculosis, Mykobakterium africanum oder Mykobakterium bovis, haben eine lipidreiche Zellwand, die gesättigte Fettsäuren enthält, welche als Ester in Phospholipiden, Glykolipiden und Lipoproteinen vorliegen. Diese sind wesentlich für die Struktur und Funktion der zytoplasmatischen Membran und der Zellhülle (Takayama, 1984). Die langkettigen Fettsäuren von Mykobakterien enthalten unter anderem Mykolsäure (Goren, 1979; Minnikin, 1982). Für die Struktur der Mykolsäuren wird auf andere Arbeiten verwiesen (Goodrum, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass Mykolsäuren, die über das CD1 Molekül präsentiert werden, fähig sind, DN Zellen zu stimulieren (Beckmann, 1994). Daher könnten DN Zellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tuberkulose spielen

## **1.6. Ziele dieser Arbeit**

Humane DN Zellen werden frisch ohne Langzeitkultur isoliert. An diesen Zellen werden in dieser Arbeit folgende Fragen untersucht:

- A: Welchen Phänotyp besitzen frisch isolierte DN Zellen?
- B: Welche Eigenschaften besitzen frisch isolierte DN Zellen nach Aktivierung mit Mitogenen und konventionellen Antigenen (Peptid-Ag), und wie ändert sich deren Phänotyp?
- C: Welche Eigenschaften zeigen frisch isolierte DN Zellen bei Aktivierung mit unkonventionellen Nicht-Peptid-Antigenen (Lipidantigene in Form von Mykolsäuren)?

Zur internen Kontrolle werden in allen Experimenten die Ergebnisse für DN Zellen mit denen für einfach positive CD4 und CD8 Zellen verglichen.

## 2. Material

### 2.1. Zellmaterial:

#### Zellen für Proliferationsassays:

Zellen für Proliferationsassays werden aus Buffy-Coats von freiwilligen Blutspendern des Instituts für Blutgerinnungswesen und Transfusionsmedizin der Heinrich Heine Universität Düsseldorf isoliert.

### 2.2. Medien

#### Kulturmedium

*5% humanes AB-Serum:*      5% (v/v) AB  
                                         1% (v/v) L-Glutamin  
                                         0.25% (v/v) Refobacin (1 ml = 40 mg Gentamicin)  
                                         in RPMI-1640

Das humane AB Serum wird von männlichen Blutspendern der Blutgruppe AB isoliert und vor Gebrauch 30 min bei 56°C inaktiviert.

#### Auftaumedium:

*10% FCS:*              10% (v/v) FCS in RPMI-1640

#### Einfriermedium:

*50% FCS:*              50% (v/v) FCS in RPMI-1640

*22% DMSO:*          22% (v/v) DMSO in RPMI-1640

#### Arbeitsmedium:

*1% FCS:*              1% (v/v) FCS in RPMI-1640

#### Facspuffer:

*5% FCS:*              5% (v/v) FCS in PBS

*BSA-Puffer:*          0,5% (v/v) BSA  
                                 0,1% (w/v) Natriumazid

Das FCS wird vor Gebrauch 30 min bei 56°C inaktiviert.

## **2.3. Stimulanzen**

*Phytohämagglutinin (PHA)* der Firma Gibco

*Staphylokokken Enterotoxin B* Eine freundliche Spende von Dr. B. Fleischer, Bernhard Nocht Institut, Hamburg, Deutschland

*PMA* der Firma Sigma, München, Deutschland

*Ionomycin* der Firma Calbiochem, Bad Soden, Deutschland

*Tetanus Toxoid* eine freundliche Spende der Behringwerke AG, Marburg, Deutschland

*PPD* (gereinigte Tuberkuline)

*Mykolsäure* eine freundliche Spende von Prof. Dr. Jan Verschoor, Department of Biochemistry Pretoria, Südafrika

## **2.4. Monoklonale Antikörper**

### **2.4.1. Bezugsquellen:**

|                |                                                                  |
|----------------|------------------------------------------------------------------|
| Leu-Antikörper | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland                   |
| Tü-Antikörper  | Immunologisches Labor, Medizinische Klinik Tübingen, Deutschland |
| WT 31          | Dr. W. Tax, Nijmegen, Niederlande                                |

#### **2.4.1.1. Antikörper**

In der folgenden Tabelle (Tab.1) werden die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper aufgeführt.

Tab.1: Tabellarische Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper.

| CD           | Antikörper | Konjugation         | MG (kD)                          | zelluläre Expression                                                    | Funktion des Ag                                                                                                           |
|--------------|------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CD 1b</b> |            | FITC                | 45                               | kortikale Thymozyten, Langerhans-Zellen, dendritische Zellen            | MHC-I-ähnliches Molekül, assoziiert mit $\beta$ 2-Mikroglobulin, hat eine besondere Bedeutung bei der Antigenpräsentation |
| <b>CD 1b</b> | SG 157     | Ø                   | 45                               | s.o.                                                                    | s.o.                                                                                                                      |
| <b>CD 1b</b> | WM-25      | Ø                   | 45                               | s.o.                                                                    | s.o.                                                                                                                      |
| <b>CD 3</b>  |            | FITC                | 5 Ketten mit Gewichten von 16-28 | Thymozyten T-Zellen                                                     | assoziiert mit dem TZR, notwendig für die Oberflächenexpression des TZR und die Signalvermittlung über diesen Rezeptor    |
| <b>CD 4</b>  | Leu 3a     | FITC<br>PE<br>PerCP | 55                               | Thymozyten<br>T-Helferzellen<br>Monozyten<br>Makrophagen                | bindet an HLA-Kl.-II-Molekül der APZ und stabilisiert die Zell-Zell-Interaktion                                           |
| <b>CD 8</b>  | Leu 2a     | FITC                | 32-34                            | Thymozyten<br>Suppressor T-Zellen<br>Zytotoxische T-Zellen<br>NK-Zellen | bindet an HLA-Kl.-I-Molekül der APZ und stabilisiert die Zell-Zell-Interaktion                                            |
| <b>CD 14</b> | Leu M3     | PE                  | 53-55                            | Myelomonozytäre Zellen                                                  | Rezeptor für den Komplex aus LPS und LBP                                                                                  |
| <b>CD 19</b> | Leu 12     | FITC                | 95                               | B-Zellen                                                                | Korezeptor für B-Zellen                                                                                                   |
| <b>CD25</b>  | Il-2-R     | FITC                | 55                               | Aktivierte Lymphozyten, induzierbar auf Monozyten                       | IL-2 Rezeptor $\alpha$ -Kette niedrig affiner IL-2-R                                                                      |
| <b>CD 28</b> |            | FITC                | 44                               | Untergruppe von T-Zellen<br>aktivierte B-Zellen                         | Rezeptor für Kostimulation bindet B7.1 und B7.2                                                                           |
| <b>CD34</b>  | BIRMA-K3   | FITC                | 105-120                          | hämatopoetische Vorläuferzellen; vaskuläres Endothel                    | Ligand für CD 62L                                                                                                         |

| CD           | Antikörper | Konjugation | MG (kD) | zelluläre Expression                 | Funktion des Ag                                                                                                 |
|--------------|------------|-------------|---------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CD 45</b> |            | FITC<br>PE  | 180-240 | Leukozyten                           | Tyrosinphosphatase;<br>verstärkt die<br>Signalvermittlung<br>über den<br>Antigenrezeptor<br>von B- und T-Zellen |
| <b>CD 80</b> | B7.1.      | FITC        | 60      | aktivierte B-Zellen und<br>Monozyten | Ligand für CD28 und<br>CTLA4                                                                                    |
| <b>CD 86</b> | B7.2.      | FITC        | 75      | aktivierte B-Zellen und<br>Monozyten | Ligand für CD28 und<br>CTLA4                                                                                    |
| <b>CD 95</b> | Fas        | FITC        | 48      | Vielzahl von Zellen                  | vermittelt<br>Apoptoseinduktion                                                                                 |
|              | β2m        | Ø           | 11      | alle kernhaltigen Zellen             |                                                                                                                 |
|              | Tü 35      | Ø           |         |                                      | blockierender AK für<br>HLA-Klasse-II-<br>Moleküle                                                              |
|              | wt 31      | Ø           | 37-44   | TZR α/β positive T-<br>Zellen        | erkennt α/β-Kette des<br>TZR                                                                                    |
|              | TZR α/β    | FITC        | 37-44   | TZR α/β positive T-<br>Zellen        | erkennt α/β-Kette des<br>TZR                                                                                    |
|              | TZR δ      | FITC        |         | Subpopulation von T-<br>Zellen       | Antigenerkennung                                                                                                |
|              | HLA-DR     | FITC        | 27-36   | einer Vielzahl von<br>Zellen         | Antigenpräsentation                                                                                             |
|              | HLA-DR     | PE          | 27-36   | einer Vielzahl von<br>Zellen         | Antigenpräsentation                                                                                             |

## **2.4.2. Kontrollen**

### **2.4.2.1. Positivkontrollen**

*β2-Microglobulin*, ICN, Lisle, Israel

*CD45/CD14*, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

### **2.4.2.2. Negativkontrolle**

*Control γ<sub>1</sub>/γ<sub>2</sub>*, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

## **2.4.3. Zweitantikörper**

*Fluorescein konjugiertes F(ab')<sub>2</sub> Fragment Ziege-anti-Maus IgG*, Cappel, West Chester, USA

*RPE konjugiertes F F(ab')<sub>2</sub> Fragment Ziege-anti-Maus IgG*, Southern Biotechnology Association, Birmingham, USA

## **2.4.4. Magnetkonjugierte Antikörper**

*Dynabeads M450 T CD8*, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland

*Dynabeads M450 T CD4*, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland

*Dynabeads M450 α-IgG*, Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland

## **2.5. Immunoassays**

*IL-4 ELISA*, Genzyme, Cambridge, MA, USA

*IL-10 ELISA*, Genzyme, Cambridge, MA, USA

## **2.6. Chemikalien**

*<sup>3</sup>H-Thymidin*, Amersham, Braunschweig, Deutschland

*BSA*, Organon Technika, Niederlande

*DMSO*, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

*FCS*, Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

*Ficoll*, Seromed, Berlin, Deutschland

*L-Glutamin*, Flow Laboratories, Irvine, Schottland

*Lysing-Solution*, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

*Natriumazid*, Merck, Darmstadt, Deutschland

*NRS*, Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland

*PBS*, Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

*Quintizit 501*, Zinsser Analytic GmbH, Frankfurt, Deutschland

*RPMI-1640*, Gibco, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland

## **2.7. Materialien**

|                                   |                                                |
|-----------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>24 well Clusterplatten,</i>    | Costar, Cambridge, USA                         |
| <i>96 well Mikrotiterplatten,</i> | Greiner, Solingen, Deutschland                 |
| <i>FACS Röhrchen,</i>             | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| <i>Hamiltonspritzen,</i>          | Hamilton, Darmstadt, Deutschland               |
| <i>Kulturflaschen ventiliert,</i> | Costar, Cambridge, USA                         |

## **2.8. Geräte**

|                                  |                                                |
|----------------------------------|------------------------------------------------|
| <i>Beta-Counter,</i>             | Berthold, Wildbad, Deutschland                 |
| <i>ELISA-Reader 2001,</i>        | Anthos, Köln, Deutschland                      |
| <i>Facscan,</i>                  | Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland |
| <i>Harvester,</i>                | Skatron, Kopenhagen, Norwegen                  |
| <i>Inkubator,</i>                | Hereaus, Osterode, Deutschland                 |
| <i>Sampe-Mixer,</i>              | Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland      |
| <i>Sterilbank,</i>               | Hereaus, Osterode, Deutschland                 |
| <i>Zentrifuge,</i>               | Hettich, Tuttlingen, Deutschland               |
| <i>M. Particle Concentrator,</i> | Deutsche Dynal GmbH, Hamburg, Deutschland      |



### **3.Methoden**

#### **3.1. Isolierung mononukleärer Zellen**

Für die Gewinnung von DN Zellen, SP Zellen sowie APZ werden als Ausgangszellmaterial mononukleäre Zellen (MNZ) benötigt. Diese werden aus peripherem Blut (PB) und Buffy-Coats mittels Ficoll-Dichtezentrifugation isoliert. Peripheres Blut wird hierzu 1:2 mit PBS bzw. Buffy-Coat-Material 1:4 mit PBS verdünnt. Das verdünnte Material wird auf Ficoll ( $1,077\text{g/cm}^3$ ) aufgeschichtet und mit  $839\text{g}$  20 min bei Raumtemperatur im Ausschwingrotor zentrifugiert. Die aus MNZ bestehende Interphase wird abgehoben und die Zellen zweimal mit PBS bei  $225\text{g}$  und 10 min gewaschen.

##### **3.1.1. Isolierung von doppelt negativen und einfach positiven T-Zellen**

Nachdem die MNZ gewonnen sind, werden diese 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  in Dunkelheit mit Normal Rabbit Serum (NRS) präinkubiert, um eine spätere unspezifische Bindung über den  $F_C$ -Rezeptor zu verhindern. Anschließend werden die Zellen zweimal mit 1% FCS bei  $4^\circ\text{C}$  mit  $225\text{g}$  gewaschen und auf  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml mit 1% FCS eingestellt. Danach werden vom vorher ausgetesteten Antikörper wt31 (TCR  $\alpha/\beta$ )  $10\mu\text{l}$  pro  $1 \times 10^6$  Zielzellen zugeführt (ca. 60 % der MNZ) und wie vorher inkubiert. Jetzt wird die Suspension dreimal gewaschen und wieder auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^7$  Zellen pro ml eingestellt. Pro  $1 \times 10^6$  Zielzellen werden  $7,5\mu\text{l}$  an Magnetbeads gekoppelte anti-Maus-IgG-Antikörper zugegeben, welche an den wt31-Antikörper binden. Dieses Gemisch inkubiert 30 min in Dunkelheit bei  $4^\circ\text{C}$  unter ständiger Bewegung (Dyna Sample Mixer). Nach Beendigung der Inkubation werden die Zellen, welche den Antikörper gebunden haben, mit Hilfe eines Magneten isoliert und für 24 h in Kultur genommen (10% AB Medium,  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), um zu depletieren. Die verbleibenden TCR  $\alpha/\beta$  negativen Zellen werden eingefroren, um später als APZ (Antigenpräsentierende Zellen) zur Verfügung zu stehen. Nach 24 h werden die Zellen mittels Magneten von den Magnet-Beads getrennt. Dann werden  $20\mu\text{l}$  Dynabeads M450 T CD4 pro  $1 \times 10^6$  Zielzellen zugegeben, welche an den CD4-Rezeptor der T-Zellen binden, und die obige Prozedur wird wiederholt. Den verbleibenden Zellen werden  $20\mu\text{l}$  Dynabeads M450 T CD8 pro  $1 \times 10^6$  Zielzellen zugesetzt, welche an den CD8-Rezeptor der T-Zellen

binden. Auch hier wird gleich verfahren. Die verbleibenden Zellen sind TCR  $\alpha/\beta$  positiv und sowohl CD4 als auch CD8 negativ, daher Doppelt Negative T-Zellen. Diese werden über 24 h in einer 24-well Costar Platte in Kultur genommen, um sie zusammen mit den CD4 und CD8 Zellen, welche noch depletieren müssen, für Experimente zur Verfügung zu haben. Die CD4 und CD8 Zellen, welche nach der 24-stündiger Depletion vom magnetgekoppelten Antikörper gewonnen werden, werden zusammen mit den DN Zellen phänotypisiert und für Stimulationsversuche benutzt.

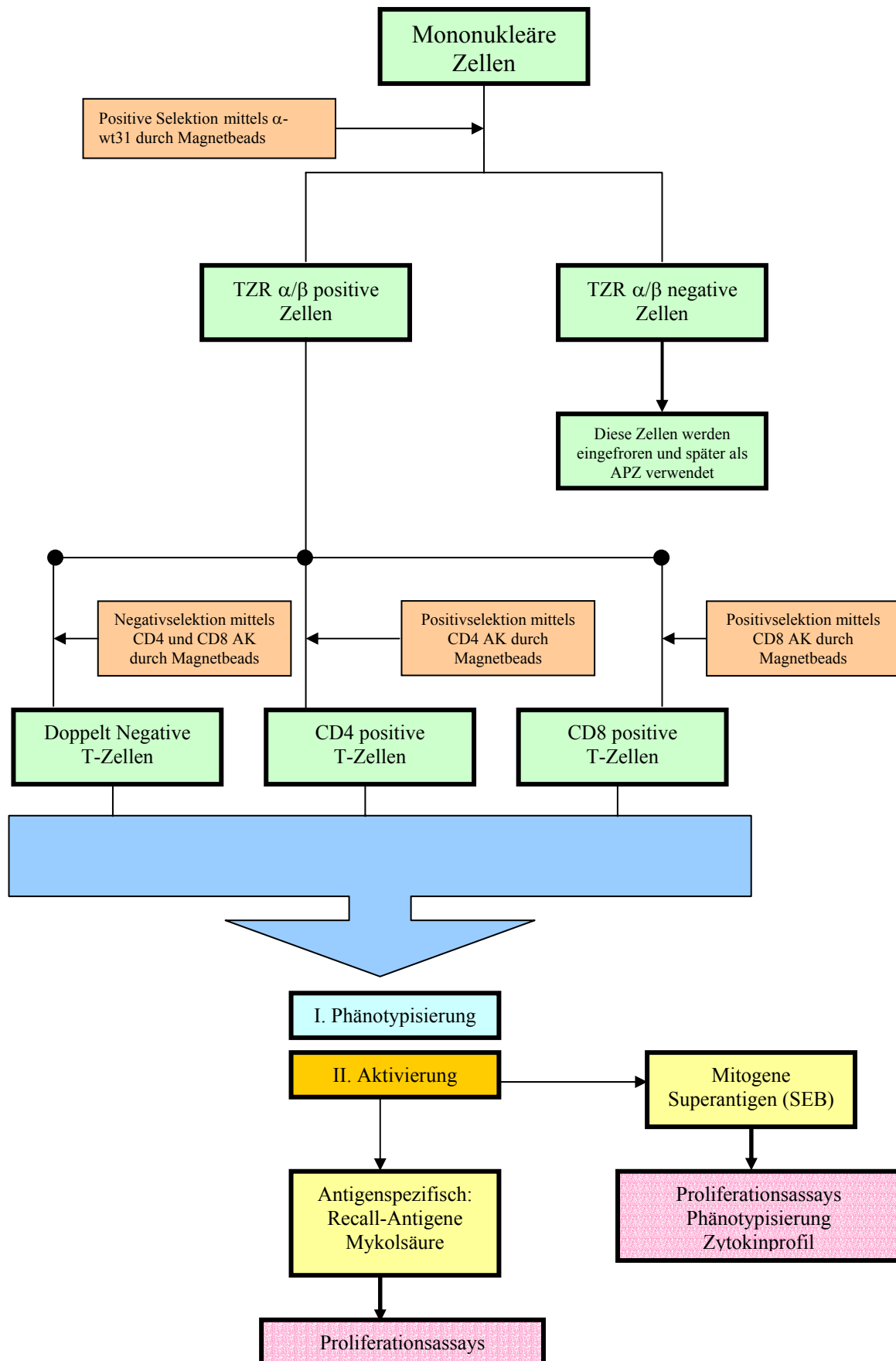
### **3.1.2. Einfrieren von mononukleären Zellen**

Um APZ (TZR  $\alpha/\beta$  negative Zellen), die während der Isolation von DN Zellen und SP Zellen gewonnen wurden, auch für später durchgeführte Versuche zur Verfügung zu haben, bei denen sie der Antigenpräsentation dienen, werden sie eingefroren und in flüssigen Stickstoff gelagert. Die Zellen werden in 50% FCS aufgenommen und im Verhältnis 1:2 unter ständiger Bewegung mit 22% DMSO gemischt. Sie werden in sterilen Einfrierampullen à 1-2 ml aliquotiert, wobei die Zellkonzentration höchstens  $6 \times 10^6$  Zellen/ml beträgt. Die Zellen werden bei  $-80^\circ\text{C}$  für maximal sieben Tage gelagert. Langzeitlagerung der Ampullen erfolgt in flüssigem Stickstoff.

### **3.1.3. Auftauen von mononukleären Zellen**

Um die APZ für die verschiedenen Versuche verwenden zu können, müssen die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wieder aufgetaut werden. Die Ampullen werden in einem Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und mit dem gleichen Volumen 15% FCS in RPMI aufgefüllt. Nach ca. 3 Minuten wird noch einmal die doppelte Menge 15% FCS zugegeben und das Gemisch 7 min mit 225g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Zellpellet kann nun im entsprechenden Medium aufgenommen und weiterverarbeitet werden.

Abb. 1. Untersuchungsschema zur Isolierung, Aktivierung und Funktion von DN Zellen



### **3.2. Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie**

Die Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie wird durchgeführt, um die Reinheit der isolierten CD4, CD8 und DN Zellen darzustellen. Ferner wird sie benötigt um die Veränderung der Expression von Oberflächenmolekülen, z.B. nach Aktivierung mit Mitogenen, zeigen zu können.

#### **3.2.1. Phänotypisierung isolierter mononukleären Zellen**

Die zu typisierenden Zellen werden 30 min bei 4°C in Dunkelheit mit NRS präinkubiert. Anschließend werden sie zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (PBS/BSA/Azid) (3min, 150g). Nach Beendigung des Waschvorgangs werden die Zellen in FACS-Puffer auf  $2-4 \times 10^6$  Zellen eingestellt. Von dieser Suspension werden 50µl pro Ansatz in jeweils ein FACS-Röhrchen gegeben. Nun werden 20µl des gewünschten Antikörpers zugegeben und die Zellen für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Zellen wieder dreimal gewaschen. Handelt es sich bei den Antikörpern um direktmarkierte, so können die Zellen nun mit dem FACScan gemessen werden. Bei nichtmarkierten AK werden 20µl des jeweiligen Zweitantikörpers zugegeben und die Ansätze für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach anschließendem dreimaligem Waschen können sie mit dem FACScan gemessen werden. Alle Arbeitsschritte finden auf Eis statt, die Inkubationen in Dunkelheit.

### **3.3. Proliferationsassay**

Um die Stimulierbarkeit von DN Zellen im Vergleich zu CD4 und CD8 Zellen zu untersuchen, werden Proliferationsassays durchgeführt. Der Proliferationsassay wird in 96-well Rundbodenkulturplatten inkubiert. Dazu werden die Responderzellen (CD4, CD8, DN) in Kulturmedium aufgenommen und auf  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml eingestellt. 50µl dieser Zellsuspension werden dann auf die einzelnen Wells verteilt, in die schon 50µl Medium vorgelegt sind. Im nächsten Schritt werden die APZ, die zuvor mit 30Gy bestrahlt werden, um deren Fähigkeit zur Proliferation zu verhindern, in Kulturmedium aufgenommen und auf  $8 \times 10^5$  Zellen eingestellt. Auch von dieser Suspension werden 50µl pro Well verteilt. Anschließend werden die jeweiligen Stimulanzen zugegeben und die Kulturplatten für 72h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die letzten 16h werden pro Well 0.5µCi <sup>3</sup>H-Thymidin zugegeben. Nach Abschluss der Inkubation werden die einzelnen Wells mit Hilfe eines Titertek

Cell Harvesters auf Nitrozellulosefilter geerntet. Das Filterpapier mit den geernteten Zellkernen wird getrocknet und mit Scintillationsflüssigkeit versetzt. Dann kann die Aktivität im  $\beta$ -Counter gezählt werden und hieraus eine entsprechende Proliferation berechnet werden. Es wurden 3er Bestimmungen erstellt und der Mittelwert benutzt.

### **3.4. Kurzzeitzellkultur**

Zellkulturen werden benutzt, um die Expression von bestimmten Oberflächenantigenen, mit und ohne Stimulation, über einen bestimmten Zeitraum zu beobachten. Die maximale Kultivierungsdauer beträgt 72 Stunden. MNZ werden in einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen pro ml alternativ in 24-well Flachbodenkulturplatten oder T25 Kulturflaschen mit Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Es werden verschiedene Stimulanzen zugesetzt, um die Zellen dann zu unterschiedlichen Zeitpunkten phänotypisch zu charakterisieren.

### **3.5 ELISA**

Um die Zytokinsynthese von DN Zellen und SP Zellen zu untersuchen, werden ELISA eingesetzt. Für die verwendeten ELISA werden jeweils 50  $\mu$ l Überstand pro Well aus den Proliferationsassays von DN, CD4 und CD8 Zellen vor Zugabe des <sup>3</sup>H-Thymidins abgenommen und die Triplets gepooled. Die Überstände werden dann direkt oder verdünnt im ELISA eingesetzt. Die verwendeten ELISA arbeiten nach der Sandwichtechnik. Dazu werden die Proben auf eine mit spezifischem, gegen das zu bestimmende Interleukin gerichteten, monoklonalen AK beschichtete 96-well-Platte pipettiert. Nach einigen Inkubier- und Waschvorgängen unter Zugabe von Zweitantikörper und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wird durch die Aktivität der Meerettich-Peroxidase das Substrat zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Die Reaktion wird anschließend mit H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt und man erhält einen gelben Farbumschlag. Mit Hilfe eines Photometers kann anhand der optischen Dichte die Interleukinkonzentration der Proben errechnet werden.

### **3.6 Induktion von CD1 auf antigenpräsentierenden Zellen**

Die Induktion von CD1 wird erreicht, indem man APZ mit 200 U/ml IL-4 sowie 100 U/ml GM-CSF stimuliert. Dazu werden isolierte mononukleäre Zellen mit Kulturmedium (5% FCS in RPMI), dem die entsprechenden Mengen IL-4 und GM-CSF zugesetzt sind, für maximal 48h in T75 ventilierten Kulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0h, 24h und 48h) werden Zellen entnommen und per Durchflusszytometrie analysiert.

### **3.7 Aufbereitung von Mykolsäuren**

Die aufgereinigten Mykolsäuren werden uns von Prof. Dr. Jan Verschooren zur Verfügung gestellt. Diese werden in Azeton aufbewahrt. Um die Mykolsäuren einsetzen zu können müssen sie zuerst einem Wiederverseifungsprozeß unterzogen werden (Goodrum, 2001). Anschließend wird die gewünschte Menge an Mykolsäuren in 100µl Chloroform gelöst und zu 5ml humanem AB-Serum zugesetzt. Um dieses Gemisch in Lösung zu bringen, wird es bei Raumtemperatur mit einem Ultraschallgerät für 5 Minuten bei maximaler Leistung beschallt.

Anschließend wird Stickstoff durch die Lösung geleitet, bis kein Chloroform mehr detektiert werden kann. Die so entstandene Stammlösung kann nun mit 10% AB-Medium soweit verdünnt werden, bis sie in den benötigten Konzentrationen vorliegt.

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Überprüfung der Reinheit frisch isolierter T-Zellen**

In den folgenden Abbildungen (Abb.2a –2c) wird exemplarisch für einen Probanden die Analyse der Oberflächenantigene von frisch isolierten DN Zellen, CD4 Zellen und CD8 Zellen nach magnetischen Selektions- und Depletionsschritten gezeigt. Bei der durchflusszytometrischen Auswertung wurden keine Gates gesetzt. Die Analyse wurde durchgeführt um die Reinheit der DN Zellen und SP Zellen zu dokumentieren. Der grüne Graph stellt die Negativkontrolle dar, die rote Fläche entspricht dem Histogramm für den jeweilig unten aufgeführten Antikörper. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch aufgetragen. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Ereignisse pro Kanal abzulesen.

#### **4.1.1. Doppelnegative Zellen**

Die isolierten DN-Zellen zeigen einen  $CD45^+ TZR\alpha/\beta^+$  Phänotyp. Es liegt kein Hinweis auf B-Zellen (CD19) vor. Ebenso findet man keine Kontamination mit Stammzellen (CD34) oder Monozyten (CD14). Es liegt keine Verunreinigung mit CD8-Zellen vor und nur eine geringe mit CD4-Zellen ( $< 10\%$ ) (Abb. 2a)

#### **4.1.2. CD4 Zellen**

Dirkekt nach Isolierung zeigen die CD4 Zellen einen hohen Reinheitsgrad mit über 98%  $TZR\alpha/\beta^+$  und  $CD45^+$  Zellen (Abb. 2b). In Folge der positiven magnetischen Selektion kommt es zu einem Capping des CD4 Moleküls und daher ist die Fluoreszenzintensität von CD4 noch vermindert. Die Anzahl der CD14 bzw. CD8 positiven Zellen beträgt weniger als 5%.

#### **4.1.3. CD8 Zellen**

Die CD8 Zellen zeigen einen hohen Reinheitsgrad mit über 98%  $TZR\alpha/\beta^+$  und  $CD45^+$  Zellen (Abb.: 2c). Ähnlich wie bei den CD 4 Zellen ist in Folge der positiven magnetischen Selektion die Fluoreszenzintensität von CD8 noch vermindert. Die Anzahl der CD14 bzw. CD4 positiven Zellen beträgt weniger als 5%.

Abb. 2a: Oberflächenanalyse von DN Zellen bei einem Probanden. Der grüne Graph stellt die Negativkontrolle dar, die rote Fläche das Histogramm für den jeweiligen Antikörper. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch aufgetragen. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Ereignisse pro Kanal abzulesen. Als Fitc markierte Antikörper wurden TCR  $\alpha/\beta$ , CD45, CD19 und CD34 verwendet. PE markierte Antikörper sind CD14 und CD4. CD8 ist PerCP markiert.

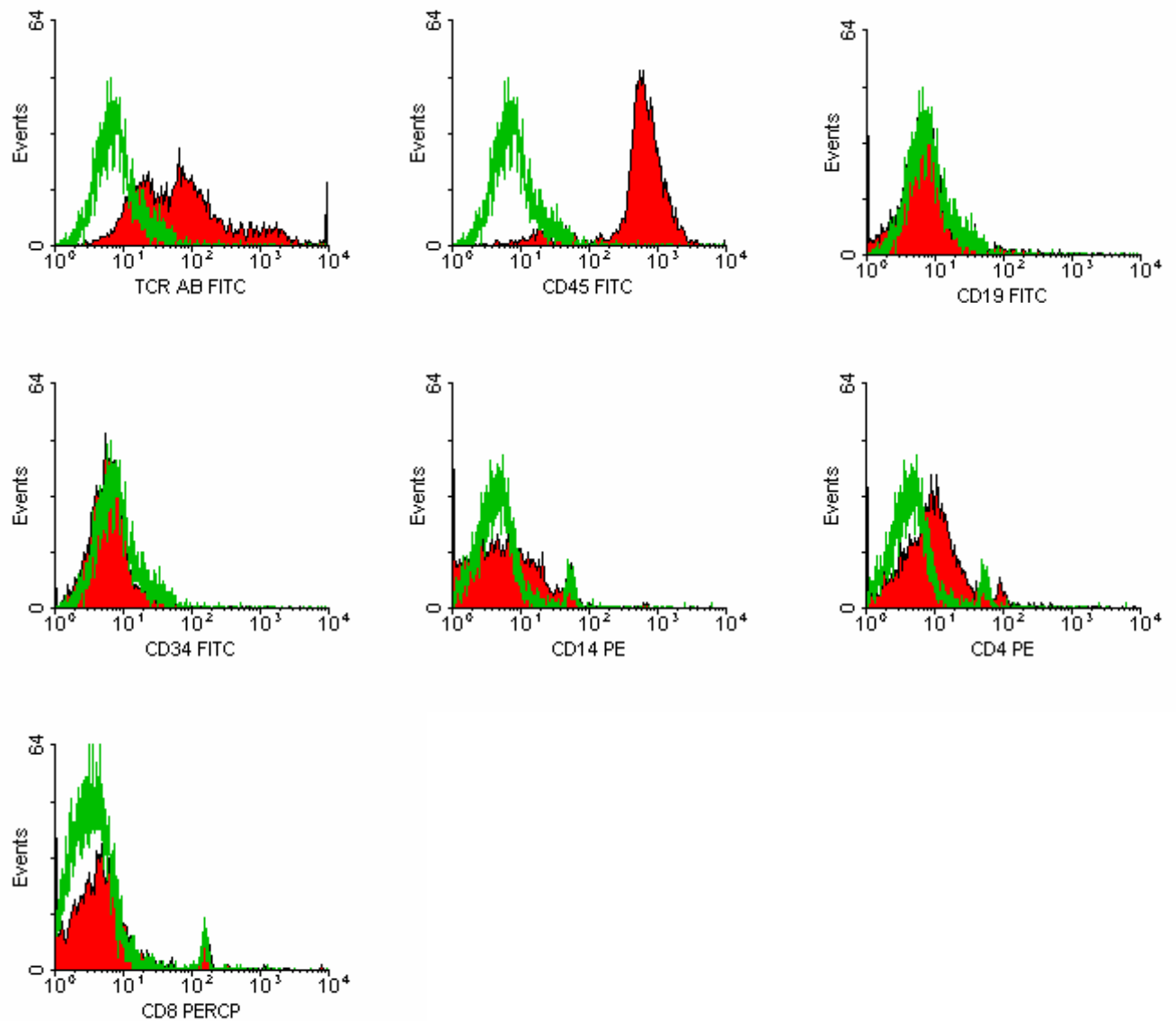




Abb. 2b: Oberflächenanalyse von CD4 Zellen bei einem Probanden. Der grüne Graph stellt die Negativkontrolle dar, die rote Fläche das Histogramm für den jeweiligen Antikörper. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch aufgetragen. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Ereignisse pro Kanal abzulesen. Fitc markierte Antikörper sind CD45 und TZR $\alpha$ / $\beta$ . PE markiert sind CD14 und CD4. CD8 ist PerCP markiert.

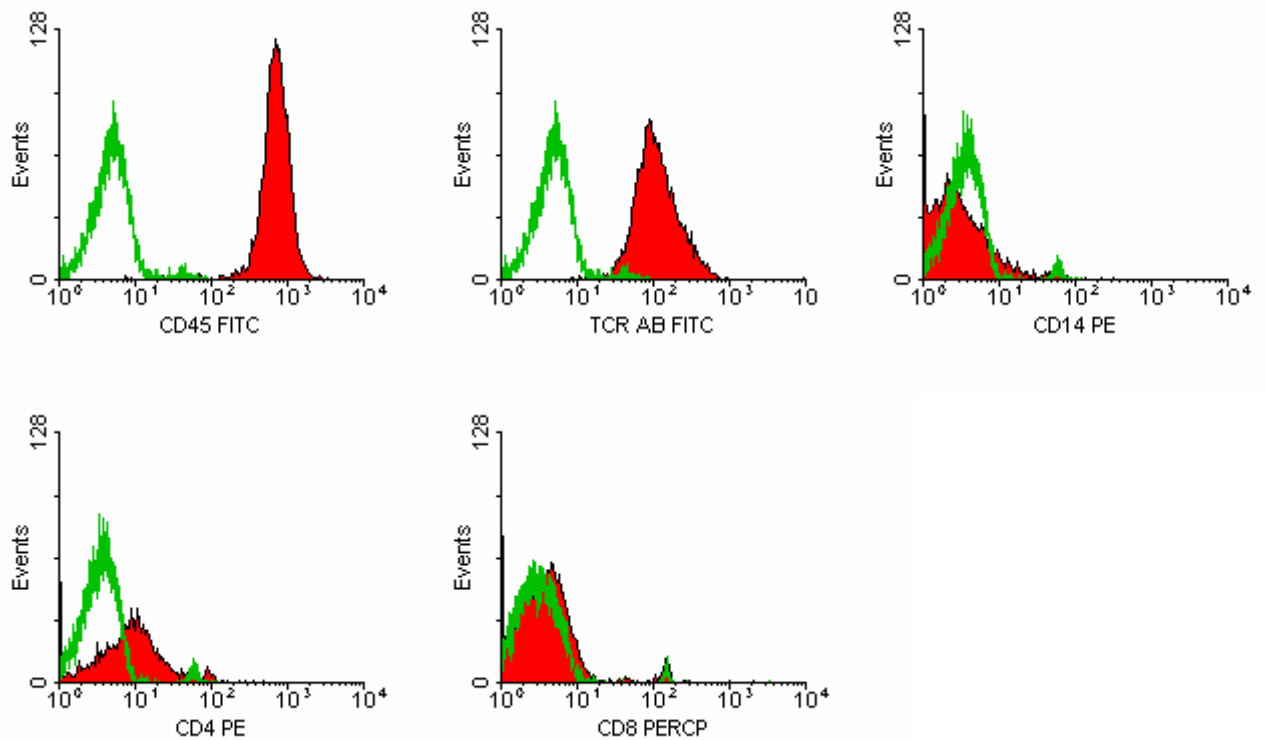
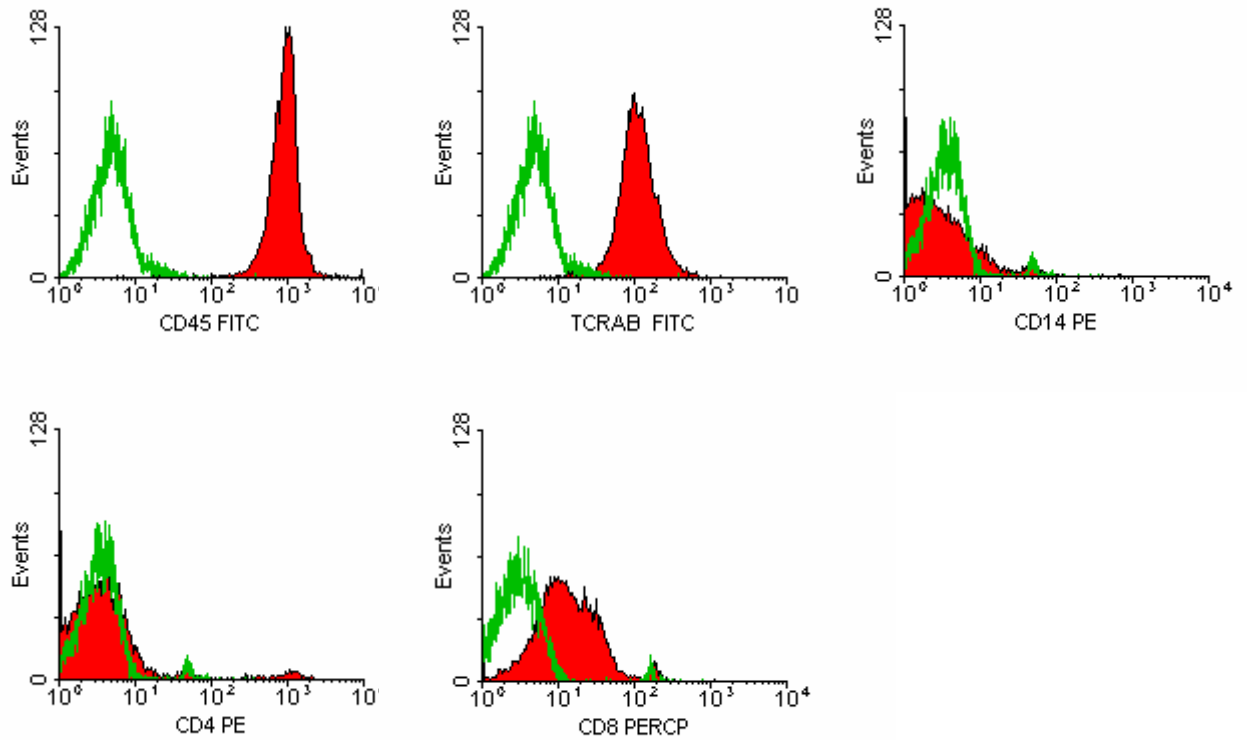


Abb. 2c: Oberflächenanalyse von CD8 Zellen bei einem Probanden. Der grüne Graph stellt die Negativkontrolle dar, die rote Fläche das Histogramm für den jeweiligen Antikörper. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität logarithmisch aufgetragen. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Ereignisse pro Kanal abzulesen. Fitc markierte Antikörper sind CD45 und TCR $\alpha/\beta$ . PE markiert sind CD14 und CD4. CD8 ist PerCP markiert.



## **4.2. Stimulation von doppeltnegative Zellen mit konventionellen Antigenen**

### **4.2.1. Polyklonale Aktivierung mit PHA**

Die Werte der Proliferationstests sind als Stimulationsindizes angegeben. Hierbei wird das arithmetische Mittel der Counts (cpm) von stimulierten Kulturen durch das arithmetische Mittel der Kontrollen dividiert (Coling). Die Konzentration von PHA beträgt in allen Proliferationsassays 3,3µg/ml. In Anwesenheit von APZ finden sich etwas geringere Stimulationsindizes bei DN Zellen im Vergleich zu CD4 und CD8 Zellen (Abb. 3a). Bei Individuum 1 zeigen die CD4 Zellen im Vergleich zu CD8 und DN Zellen eine verminderte Stimulierbarkeit. Bei Individuum 3 zeigt sich eine verstärkte Stimulierbarkeit der CD8 Zellen im Vergleich zu CD4 und DN Zellen. Interessanterweise zeigt sich eine signifikante Proliferation von DN Zellen bei Stimulation mit PHA trotz Abwesenheit von klassischen APZ (Abb. 3b). Bei SP Zellen konnte keine vergleichbare Proliferation in Abwesenheit von klassischen APZ gezeigt werden. Sowohl für die Stimulation in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von APZ finden sich deutliche interindividuelle Unterschiede in der Stimulierbarkeit von DN Zellen.

Abb.3a: Stimulation von CD4 ,CD8 und DN Zellen mit PHA in Anwesenheit von APZ bei 6 Probanden (Ind.1-6). Auf der Ordinate ist der Stimulationsindex aufgetragen.

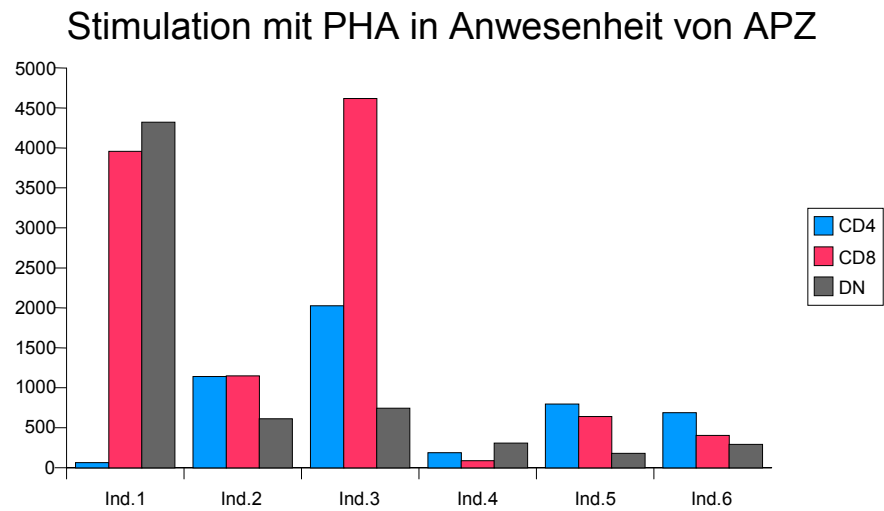
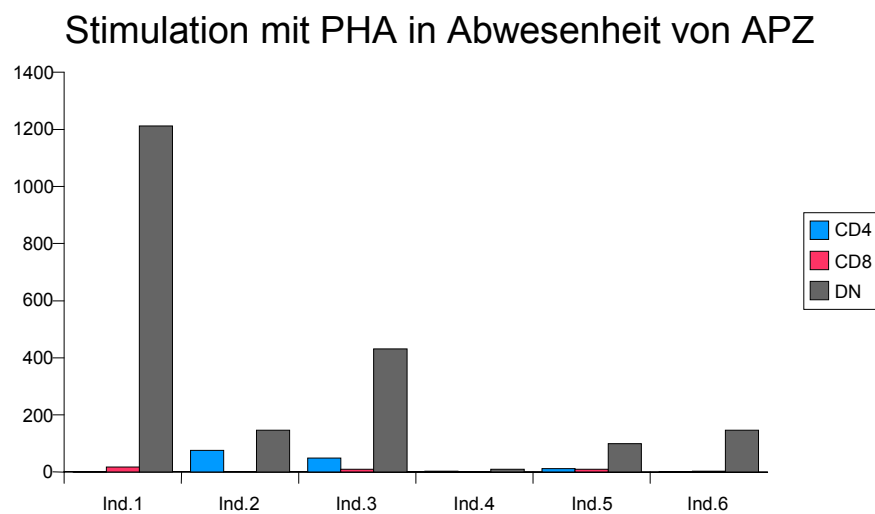


Abb.3b: Stimulation von CD4 ,CD8 und DN Zellen mit PHA in Abwesenheit von APZ bei 6 Probanden (Ind.1-6). Auf der Ordinate ist der Stimulationsindex aufgetragen.



## **4.2.2. Aktivierung durch Superantigene (SEB)**

### **4.2.2.1. Proliferation in Abhängigkeit der SEB-Konzentration**

Bei der Stimulation mit SEB ist das Verhalten von SP und DN Zellen ähnlich. Verschiedene Konzentrationen von SEB werden ausgetestet, um die optimale Konzentration für die Stimulation von DN-Zellen in Anwesenheit von APZ zu ermitteln. Bei allen Zellpopulationen ist eine konzentrationsabhängige Proliferation zu beobachten (Abb.4a). Bei einer Konzentration von 1.3µg/ml SEB zeigt sich bereits eine beinahe maximale Stimulation, so dass in den folgenden Experimenten mit dieser SEB-Konzentration gearbeitet wird (Abb.4a).

### **4.2.2.2. Stimulation mit SEB in An- und Abwesenheit von antigen-präsentierenden Zellen**

Es besteht sowohl bei DN Zellen als auch bei SP Zellen eine Proliferation in Anwesenheit von APZ und eine kaum nachweisbare in deren Abwesenheit (Abb.4b). Eine APZ unabhängige Stimulierbarkeit wie bei der Stimulation mit PHA lässt sich nicht nachweisen.

Abb.4a: Proliferation von CD4, CD8 und DN Zellen in Abhängigkeit verschiedener SEB-Konzentrationen exemplarisch für einen Probanden. Auf der Abszisse sind die verschiedenen SEB-Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate gibt das Proliferationsverhalten als Stimulationsindex wieder.

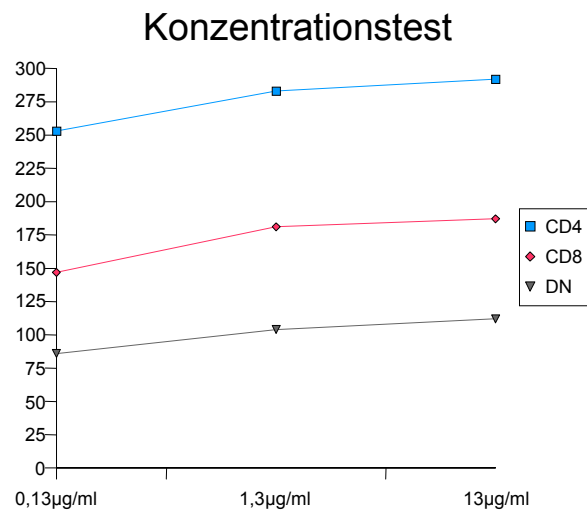
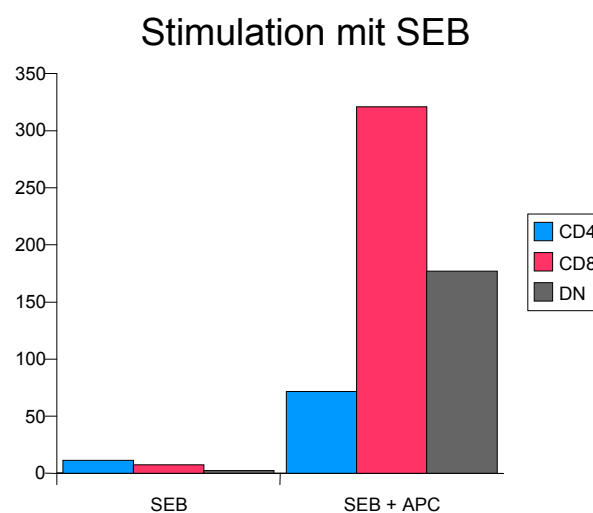


Abb.4b: Stimulation von CD4, CD8 und DN Zellen mit SEB bei einer Konzentrationen von 1,3 µg/ml exemplarisch für einen Probanden in An- und Abwesenheit von APZ. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Zellen mit und ohne APZ aufgetragen, die Ordinate gibt das Proliferationsverhalten als Stimulationsindex wieder.



### **4.2.3. Aktivierung durch Recall-Antigene (Tetanus Toxoid)**

#### **4.2.3.1. Proliferation in Abhängigkeit der Tetanus Toxoid Konzentration**

Um die optimale Konzentration zur Stimulation von DN und SP Zellen mit Tetanus Toxoid zu finden, wird ein Konzentrationstest durchgeführt (Abb.5a). Es werden folgende Konzentrationen gewählt: 0,57 µg/ml, 5,7 µg/ml und 57 µg/ml. Für SP-Zellen zeigt sich ein proportionales Verhalten von Tetanus Toxoid Konzentration zur Stimulierbarkeit. Bei DN-Zellen läßt sich keine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit nachweisen (Abb.5a). Als optimale Konzentration werden 5,7 µg/ml Tetanus Toxoid gewählt.

#### **4.2.3.2. Stimulation mit Tetanus Toxoid in An- und Abwesenheit von antigen-präsentierenden Zellen**

Die Stimulierbarkeit von T-Zellen bei einer Konzentration von 5,7µg Tetanus Toxoid pro ml ist exemplarisch bei einem Probanden dargestellt (Abb.5b). Bei der Stimulation mit Tetanus Toxoid sind DN Zellen in Anwesenheit von APZ stärker stimulierbar als in deren Abwesenheit. Die Proliferation ist der von SP Zellen ähnlich. Bei Stimulation mit dem Recall-Ag Tetanus Toxoid fanden sich interindividuell stark unterschiedliche Proliferationsraten (Daten nicht dargestellt).

Abb.5a: Proliferation von CD4, CD8 und DN Zellen in Abhängigkeit verschiedener Tetanus Toxoid Konzentrationen exemplarisch für einen Probanden. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate gibt das Proliferationsverhalten als Stimulationsindex wieder.

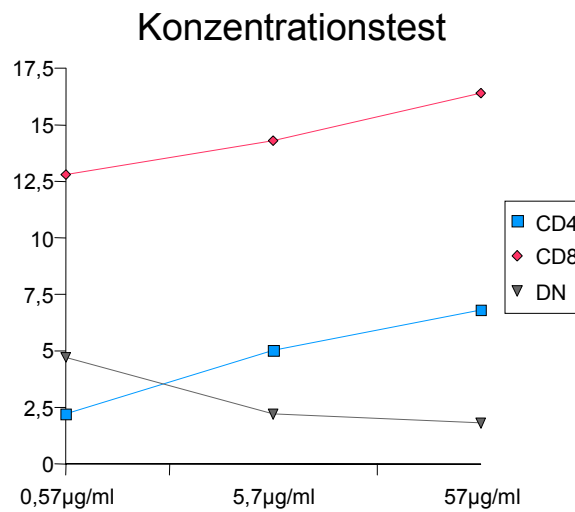
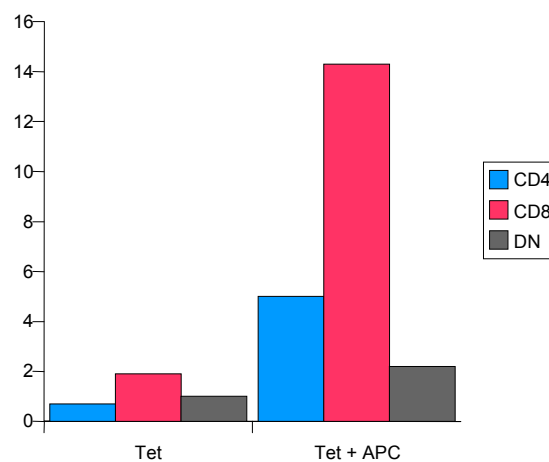


Abb.5b: Stimulation von CD4, CD8 und DN Zellen mit Tetanus Toxoid bei einer Konzentrationen von 5,7 µg/ml exemplarisch für einen Probanden in An- und Abwesenheit von APZ. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Zellen mit und ohne APZ aufgetragen, die Ordinate gibt das Proliferationsverhalten als Stimulationsindex wieder.

### Stimulation mit Tetanus Toxoid





### **4.3. Stimulation von doppeltnegativen Zellen mit unkonventionellen Antigenen (Mykolsäuren)**

#### **4.3.1. Induktion von CD1 auf antigenpräsentierenden Zellen**

Wie bei DN-Zell-Linien festgestellt wurde, erfordert die Präsentation von Lipid-Antigenen durch beispielsweise Monozyten die Expression von CD1b auf antigenpräsentierenden-Zellen. Um DN Zellen mit Mykolsäure stimulieren zu können wird daher CD1 auf APZ induziert. Bei der Auswertung wird ein Gate auf die Monozyten (CD14) gesetzt. Bereits nach 24h findet sich eine deutliche Expression von CD1b (Abb. 6a – 6c).

#### **4.3.2. Stimulation mit Mykolsäure**

##### **4.3.2.1. Stimulation mit verschiedenen Mykolsäurekonzentrationen**

Um festzustellen, bei welcher Mykolsäurekonzentration eine optimale Stimulation von DN und SP Zellen erfolgt, werden verschiedene Konzentrationen ausgetestet (5µg/ml, 25µg/ml und 50µg/ml) (Abb. 7a). Die Zellen werden mit CD1b positiven APZ für 72 Stunden inkubiert. Es zeigt sich eine deutliche konzentrationsabhängige Proliferation. Für die folgenden Experimente wählten wir eine Mykolsäurekonzentration von 50µg/ml.

##### **4.3.2.2. Abhängigkeit der Stimulationsfähigkeit vom Typ der antigenpräsentierenden Zelle**

CD4, CD8 und DN Zellen inkubieren mit Mykolsäure bei einer Konzentration von 50µg/ml. Es gibt drei verschiedene Ansätze: Ohne APZ, mit APZ, bei denen kein CD1b induziert wird und mit APZ, welche CD1b exprimieren (Abb. 7b). Bei dem Proliferationsassay ohne APZ ergibt sich keine Stimulierbarkeit von CD4, CD8 oder DN Zellen. Das gleiche gilt für den Assay mit APZ, welche kein CD1b exprimieren. Werden jedoch APZ verwendet, die CD1b exprimieren, so zeigt sich eine deutliche Proliferation von CD4 und DN Zellen. CD8 Zellen lassen sich nur geringfügig stimulieren. Dies macht deutlich, dass die Anwesenheit von APZ und CD1b notwendig ist, um eine Proliferation von CD4 und DN Zellen durch Mykolsäure zu induzieren.

Abb.6a: Expression von CD14 und CD1b auf nicht stimulierten Monozyten in der Durchflusszytometrie. Die Abszisse markiert die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Antikörpers. Die Ordinate die Ereignisse pro Kanal. Der grüne Graph stellt die Negativkontrolle dar, die rote Fläche den zu bestimmenden Antikörper.

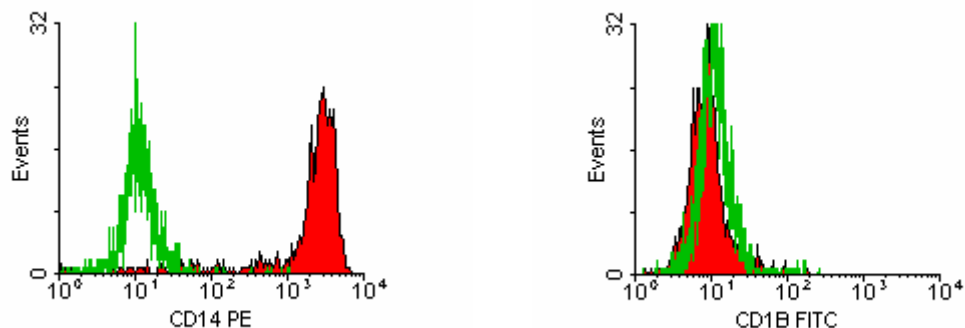


Abb.6b: Expression von CD14 und CD1b, nach 24-stündiger Stimulation mit IL-4 und GM-CSF, auf Monozyten in der Durchflusszytometrie. Die Abszisse markiert die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Antikörpers. Die Ordinate die Ereignisse pro Kanal. Der grüne Graph stellt die Negativkontrolle dar, die rote Fläche den zu bestimmenden Antikörper.

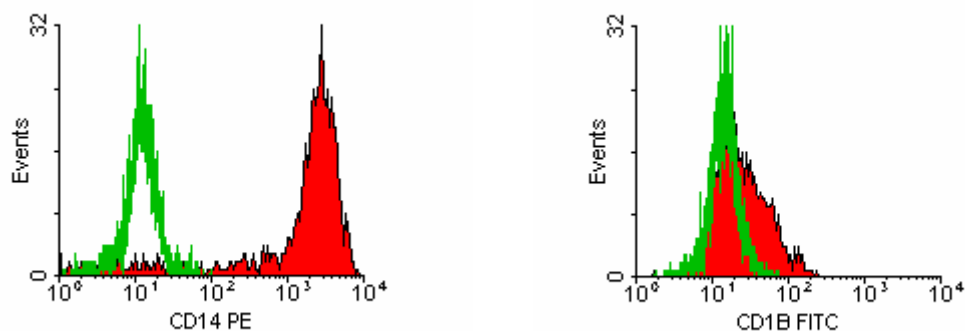


Abb.6c: Expression von CD14 und CD1b, nach 48-stündiger Stimulation mit IL-4 und GM-CSF, auf Monozyten in der Durchflusszytometrie. Die Abszisse markiert die Fluoreszenzintensität des jeweiligen Antikörpers. Die Ordinate die Ereignisse pro Kanal. Der grüne Graph stellt die Negativkontrolle dar, die rote Fläche den zu bestimmenden Antikörper.

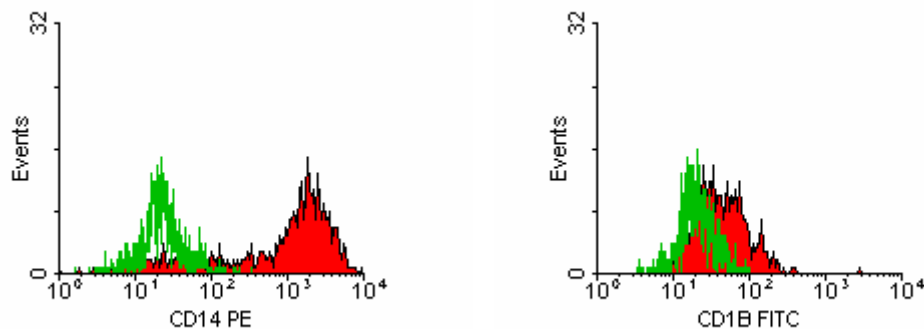


Abb.7a: Proliferation von CD4, CD8 und DN Zellen in Abhängigkeit verschiedener Mykolsäure – Konzentrationen in Anwesenheit von CD1b positiven APZ exemplarisch für einen Probanden. Die Stimulation fand für 72 h statt. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, die Ordinate gibt das Proliferationsverhalten als Stimulationsindex wieder.

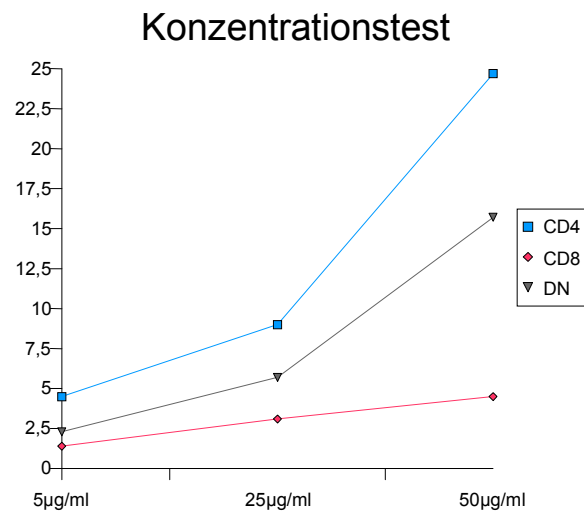
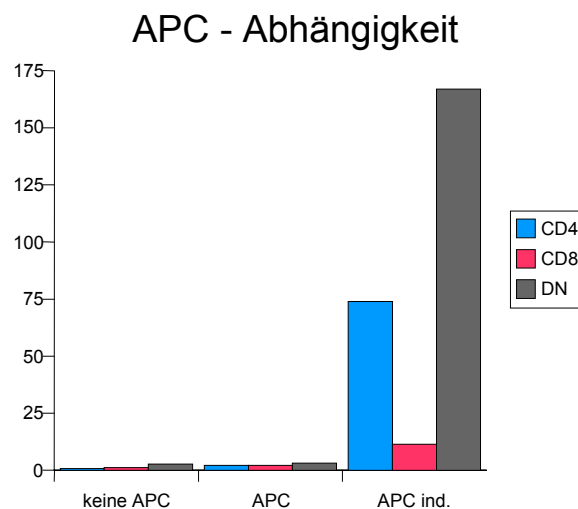


Abb.7b: Stimulation von CD4, CD8 und DN Zellen mit Mykolsäure bei einer Konzentrationen von 50µg/ml exemplarisch für einen Probanden in An- und Abwesenheit von APZ, sowie in Anwesenheit von APZ bei denen CD1b induziert ist. Auf der Abszisse sind die verschiedenen Zellen mit und ohne APZ aufgetragen, die Ordinate gibt das Proliferationsverhalten als Stimulationsindex wieder.



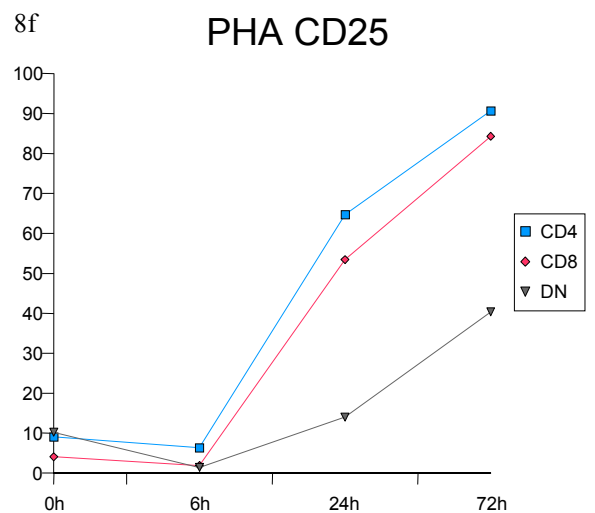
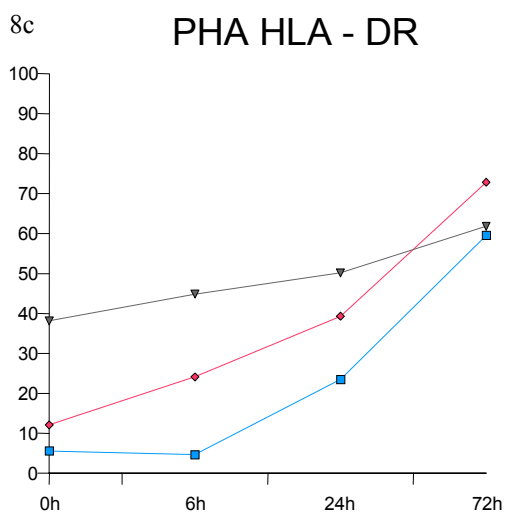
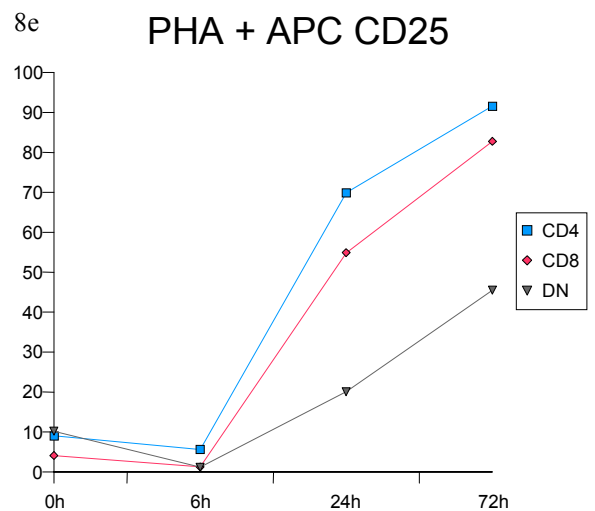
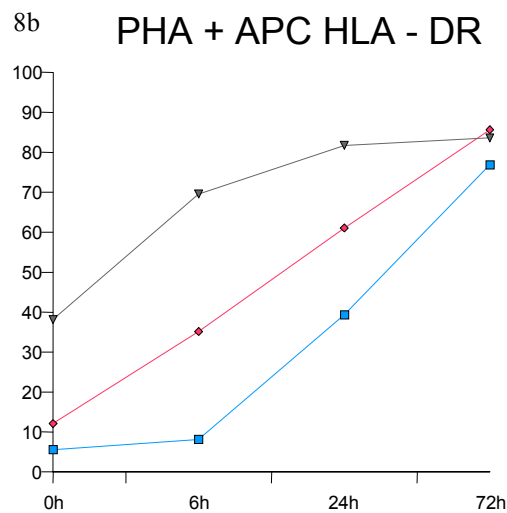
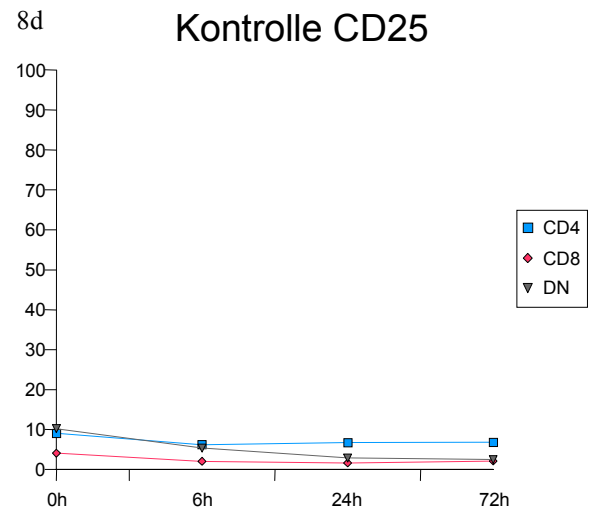
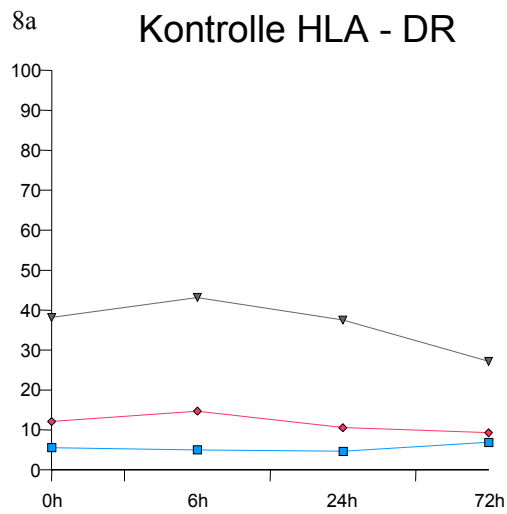
## **4.4. Eigenschaften stimulierter doppeltnegativen Zellen**

### **4.4.1. Phänotypische Veränderungen**

#### **4.4.1.1. Aktivierungsmarker; CD25 und HLA-DR Expression.**

Über einen Zeitraum von 72 Stunden wird untersucht, welche phänotypischen Veränderungen auf DN Zellen durch Aktivierung mit Mitogen induziert werden und ob sich das Expressionsmuster von Aktivierungsmarkern (CD25 / HLA-DR) auf DN Zellen von dem Expressionsmuster auf CD4 / CD8 Zellen unterscheidet. Insbesondere ist von Interesse, ob bei Stimulation ohne APZ besondere phänotypische Veränderungen auftreten. Hier interessierte, ob DN Zellen vermehrt Liganden zur Kostimulation (CD86) exprimieren können, die eine Stimulation von T-Zellen ohne APZ (in Form einer T-Zell—T-Zell Interaktion) vermitteln könnten. In den Abb. 8a-8f wird der Verlauf der HLA-DR und CD25 Expression unter Stimulation mit PHA über 72 Stunden dargestellt. Es gibt eine Kontrolle ohne Stimulanzien, einen Ansatz mit APZ und PHA als Stimulator, sowie einen Ansatz ohne APZ und mit PHA als Stimulator. DN Zellen zeigen gegenüber SP Zellen eine höhere Expression von HLA-DR. Die maximale Expression von HLA-DR erreichen DN Zellen nach Stimulation mit PHA in Anwesenheit von APZ nach 24 Stunden. Bei SP Zellen ist das Maximum nach 72 Stunden noch nicht erreicht. DN Zellen exprimieren nach Stimulation niedrigere Level von CD25 im Vergleich zu SP Zellen.

Abb.8a-8f: Kinetik der HLA-DR und CD25 Expression über 72 Stunden auf CD4, CD8, und DN Zellen ohne Stimulation als Kontrolle, mit PHA als Stimulans in An- und Abwesenheit von APZ. Auf der Abszisse ist die Zeitachse aufgetragen, die Ordinate gibt die Anzahl der in der Durchflußzytometrie gemessenen positiven Zellen in Prozent wieder.



#### 4.4.1.2. Expression der Marker für Apoptosebereitschaft (CD95 und CD28) und des Kostimulationsliganden CD86.

Es wird untersucht, ob nach Aktivierung bei DN Zellen eine von den SP Zellen unterschiedliche Bereitschaft zur Apoptose vorliegt. Hierzu wird die Expression von CD95 und CD28 untersucht. Für CD28 wird beschrieben, dass es die Fähigkeit hat Zellen vor Apoptose zu schützen, während CD95 bei der Apoptoseinduktion eine Rolle spielt. Ebenso wird ein Molekül untersucht, das für eine T-Zell—T-Zell Interaktion eine Rolle spielen kann: CD86. In der folgenden Tabelle wird die Expression der Oberflächenantigene CD86, CD95 und CD28 von vier Individuen (falls nicht anders gekennzeichnet) dargestellt. Die Daten wurden von frisch isolierten Zellen, Zellen nach 24h Kultur ohne Stimulation und von Zellen nach 24h Kultur mit PHA gewonnen. Für die Untersuchungen werden die Zellen mit TZR $\alpha/\beta$ -PE, CD4PerCP, CD8PerCP und dem jeweiligen zu bestimmenden Antigen als Fitc markierten Antikörper inkubiert. So kann bei der Datengewinnung ein direktes Gate auf die Region der DN Zellen gelegt werden, so dass diese in ausreichender Menge akquiriert werden können.

Die CD95 und CD28 Expression in DN und SP Zellen variiert bei den verschiedenen Individuen. Die durchschnittliche CD95 Expression auf DN und SP Zellen ist in PHA stimulierten oder unstimulierten Proben ähnlich (Tab.2). Ähnlich verhält es sich für die CD28 Expression. Die Empfänglichkeit zur Apoptose scheint anhand des Phänotyps für DN und SP Zellen ähnlich zu sein. Erwartungsgemäß ist die CD86 Expression auf konventionellen SP Zellen kaum nachweisbar, auch nicht nach Stimulation. Auch für DN Zellen läßt sich nach Stimulation keine signifikante CD86 Expression nachweisen.

Tab.2: Drei Farben durchflußzytometrische Analyse von frisch isolierten, unstimulierten und PHA stimulierten DN Zellen. Die Zahlen geben den Mittelwert in Prozent  $\pm$  SD von positiven DN Zellen an. Die in Klammern gestellten Werte beziehen sich auf SP Zellen. Untersucht wurden die Marker CD95, CD28 und CD86. Es handelt sich um Mittelwerte von vier Individuen außer bei anderer Kennzeichnung. <sup>a)</sup> entspricht 3 Individuen ; <sup>b)</sup> entspricht 2 Individuen..

| Marker | Frisch isolierte Zellen                                      | Unstimuliert nach 24 h                                       | PHA stimuliert nach 24 h                                     |
|--------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| CD95   | 51 $\pm$ 13<br>(51.2 $\pm$ 12)                               | 38.2 $\pm$ 14<br>(45.6 $\pm$ 12) <sup>b)</sup>               | 58.0 $\pm$ 30<br>(67.0 $\pm$ 33)                             |
| CD28   | 62.7 $\pm$ 20<br>(63.2 $\pm$ 6)                              | 9.5 <sup>b)</sup><br>(15) <sup>b)</sup>                      | 6.0 $\pm$ 2 <sup>a)</sup><br>(20.0 $\pm$ 10) <sup>b)</sup>   |
| CD86   | 1.0 $\pm$ 0.4 <sup>a)</sup><br>(1.6 $\pm$ 0.6) <sup>a)</sup> | 5.0 $\pm$ 4.4 <sup>a)</sup><br>(1.7 $\pm$ 0.8) <sup>a)</sup> | 2.5 $\pm$ 1.9 <sup>a)</sup><br>(4.4 $\pm$ 1.5) <sup>a)</sup> |

#### 4.5. Zytokinprofil

Verglichen wird die Produktion von IL-4 respektive IL-10 bei CD4, CD8 und DN Zellen. Die Messungen erfolgt aus Überständen von unstimulierten Zellen sowie Zellen, die mit PHA in Abwesenheit von APZ stimuliert wurden und Zellen, die mit PHA in Anwesenheit von APZ stimuliert wurden. Sowohl die IL-4 als auch die IL-10 Menge wird in pg/ml angegeben.

Überstände von nichtstimulierten CD4, CD8 und DN Zellen zeigen keine IL-4 Produktion (Tab.3). Nach PHA Aktivierung wird in Anwesenheit von APZ IL-4 von DN Zellen sezerniert. Das gleiche gilt für CD8 Zellen. Die IL-4 Werte für DN und CD8 Zellen lagen über dem linearen Meßbereich und mußten deshalb verdünnt werden.

Während die IL-10 Werte bei nicht stimulierten Zellen unter dem Detektionslevel lagen, zeigte sich eine signifikante IL-10 Produktion in Überständen von CD8 und DN Zellen nach Stimulierung mit PHA in Anwesenheit von APZ.

Tab.3: Zytokindetektion in Überständen von frisch isolierten und PHA stimulierten DN und SP Zellen mittels ELISA. Der lineare Bereich der Sensitivität beträgt für IL-4 100–1500 pg/ml für IL-10 8-500 pg/ml. Die mit b) versehenen Proben wurden 1:2 verdünnt.

| IL-4 (pg/ml) | unstimuliert | PHA stimuliert<br>ohne APZ | PHA stimuliert mit<br>APZ |
|--------------|--------------|----------------------------|---------------------------|
| CD4 Zellen   | <100         | <100                       | <100                      |
| CD8 Zellen   | <100         | <100                       | 775 <sup>b)</sup>         |
| DN Zellen    | <100         | <100                       | 1385 <sup>b)</sup>        |

| IL-10 (pg/ml) | unstimuliert | PHA stimuliert<br>ohne APZ | PHA stimuliert mit<br>APZ |
|---------------|--------------|----------------------------|---------------------------|
| CD4 Zellen    | <8           | <8                         | <8                        |
| CD8 Zellen    | <8           | 38                         | 34                        |
| DN Zellen     | <8           | <8                         | 44                        |

## **5. Diskussion**

### **5.1. Isolierung von doppeltnegativen Zellen**

Die Isolierung von DN Zellen mittels Magnet-Beads liefert T-Zellen mit einem stabilen Phänotyp und einer Reinheit von über 90%. Veröffentlichte Daten zeigen, dass DN Zellen, die mittels FACSSorting gewonnen werden und solche, die durch Magnet-Beads isoliert werden, einen nahezu identischen Phänotyp zeigen (Brooks, 1993; Niehues., 1994; Boise, 1995). Bei immunomagnetischer Isolation von DN Zellen besteht die Möglichkeit einer Kontamination dieser Zellen mit professionellen APZ (Monozyten, B-Zellen, dendritische Zellen), da der Antikörper wt31 während des ersten Isolationsschrittes über sein Fc-Fragment an den Fc-Rezeptor am Monozyten binden könnte. Um dies zu verhindern, werden die frisch isolierten MNZ mit NRS präinkubiert, damit die FC-Rezeptoren blockiert werden. Bei der FACS Analyse von gereinigten DN Zellen ergibt sich kein Hinweis auf eine wesentliche Verunreinigung mit B-Zellen und monozytären Zellen (Abb.2a-2c). Darüber hinaus können wir zeigen, dass es sich bei den frisch isolierten DN Zellen um aufgereinigte funktionelle Zellen handelt, die konzentrationsabhängig stimulierbar sind (Abb. 4a, 5a, 7a) und in deren Überständen die Produktion von Zytokinen nachgewiesen werden kann (Tab. 3a-3b).

### **5.2. Antigenerkennung durch doppeltnegativen Zellen und Eigenschaften von doppeltnegativen Zellen bei Aktivierung.**

DN Zellen zeigen besondere Eigenschaften bei der Antigenerkennung. Bei der Stimulation mit dem Recall-Antigen Tetanus Toxoid zeigt sich keine wesentliche Proliferation weder in An- noch in Abwesenheit von APZ. Die stärkste Proliferation fand hier bei den CD8 Zellen statt (Abb. 5b). Da es sich bei Tetanus Toxoid um ein Recall-Antigen handelt sind die interindividuellen Proliferationen (Daten nicht dargestellt) sehr unterschiedlich.

Superantigene binden an MHC-Klasse-II-Moleküle und  $V_{\beta}$ -Domänen von T-Zell-Rezeptoren. Sie aktivieren eine Untergruppe der T-Zellen außerordentlich stark, die bestimmte  $V_{\beta}$ -Gensegmente exprimieren. Bei der Stimulation mit dem Superantigen SEB gab es eine signifikante Proliferation von DN Zellen (Abb. 4a). SEB reagiert mit der menschlichen TZR  $V_{\beta}3$  und  $V_{\beta}17$  Kette spezifisch, ohne dass ein



Korezeptor benötigt wird (Acha-Orbea, 1993). Die beobachtete Proliferation von DN Zellen nach Stimulation mit SEB spricht für funktionelle TZR V $\beta$ 3 und V $\beta$ 17 Ketten auf isolierten DN Zellen.

Bei der Stimulation mit PHA zeigt sich überraschenderweise eine APZ unabhängige Proliferation von DN Zellen (Abb. 3b), die etwa in der Größenordnung von 50% des Stimulationsindex in Anwesenheit von APZ (Abb. 3a) liegt. Der Mechanismus der APZ unabhängigen Proliferation von DN Zellen auf PHA Stimulation ist noch unklar. Zwei Erklärungen scheinen möglich: Zum einen könnte additiv zur TZR Stimulation durch PHA eine Kostimulation mit einem Liganden erfolgen, der zwar auf DN Zellen, nicht aber auf SP Zellen exprimiert wird und eine andere Signalweiterleitung auslöst. Ein möglicher Kandidat für das kohlenwasserstoffreiche PHA als Ligand könnten zum Beispiel die NK-Rezeptoren der C-Type-Lectin Superfamilie sein, welche auf DN-Klonen exprimiert werden und von denen gezeigt wurde, dass sie Kohlenwasserstoffe binden. Eine CD80/CD28 unabhängige Kostimulation wird für die CD28 positive Subpopulation von DN Zellen beschrieben (Behar, 1995). Zum anderen könnte PHA eine extrem hohe Affinität für den TZR von DN Zellen haben. DN Zellen würden somit aktiviert, ohne ein weiteres Signal zu benötigen. In diesem Zusammenhang könnte PHA vielleicht eine Verbindung vom HLA-DR einer DN Zelle zum TZR einer anderen DN Zelle im Sinne eine superantigenähnlichen Verbindung herstellen. Eine superantigenähnliche Verbindung zwischen APZ und T-Zellen wurde für UDA (*Urtica dioica* agglutinin), einem anderen pflanzlichen Lectin, und dem murinen TZR V $\beta$ 8.3 beschrieben (Galelli, 1993).

Die Ursache für die insgesamt im Vergleich zur Stimulation in Anwesenheit von APZ etwas verminderte Stimulierbarkeit ist unklar. Es könnte sein, dass das Aktivierungssignal für DN Zellen in Abwesenheit von APZ weniger stark ist als in Anwesenheit von APZ. Eine andere Möglichkeit wäre die Existenz verschiedener DN-Subpopulationen, die entweder bei APZ-Abwesenheit proliferieren, oder wie CD4 und CD8 Zellen keine Proliferation zeigen. Eine funktionelle Heterogenität von DN Zellen konnte bei Mäusen nachgewiesen werden (Nishizawa, 1997). Für die Hypothese, dass verschiedene DN Subpopulationen existieren sprechen folgende Befunde: Bei der Stimulation mit PHA in Anwesenheit von APZ kann IL-4 und IL-10 in den Überständen der DN Zellen nachgewiesen werden, jedoch nicht bei der Stimulation mit PHA in Abwesenheit von APZ (Abb. 3a-3b). Es ist jedoch

schwierig, funktionelle Untergruppierungen bei frisch isolierten humanen DN Zellen zu analysieren, da sie numerisch nur gering im peripheren Blut vorkommen. Neben den unterschiedlichen Aktivierungseigenschaften von DN Zellen finden sich nach deren Aktivierung Unterschiede zu regulären T-Zellen sowohl im Phänotyp als auch bei der Zytokinproduktion.

Auffällig ist die im Vergleich zu SP Zellen hohe HLA-DR Expression auf DN Zellen (Abb. 8a). Nach Aktivierung kommt es zu einer wesentlich schnelleren Hochregulation dieses Moleküls auf DN Zellen im Vergleich zu SP Zellen (Abb. 8b, 8c). Die Bedeutung der HLA-DR-Expression auf DN Zellen ist unklar, möglicherweise könnte HLA-DR mit CD4 auf anderen T-Zellen interagieren und damit auf eine T-Zell—T-Zell-Interaktion hindeuten. Im Gegensatz zu HLA-DR ist der klassische T-Zell-Aktivierungsmarker CD25 (IL-2-Rezeptor) auf DN Zellen geringer exprimiert als auf SP Zellen (Abb. 8d, 8e, 8f). Dies spricht dafür, dass DN Zellen weniger empfänglich für die Stimulation mit IL-2 als SP Zellen sind. Die hohen Mengen von IL-4, die in Überständen von menschlichen DN Zellen nach Aktivierung gefunden werden, könnten darauf hindeuten, dass DN Zellen eher T-Zellen in die Richtung Th2 ausdifferenzieren lassen, als selber Th2-Zellen zu sein. Analog hierzu werden im Maussystem Zellen beschrieben, die IL-4 und IFN- $\gamma$  produzieren. Diese DN Zellen, die das NK1.1 Molekül tragen, welches analog zum menschlichen CD56 ist (humane DN Zellen exprimieren zum Teil CD56 (Niehues, 1994)), unterscheiden sich von Th1 oder Th2 Zellen und werden als T-Regulator-Zellen bezeichnet (Vicari, 1996).

### **5.3. Stimulation von doppeltnegativen Zellen durch Mykolsäuren.**

Um T-Zellen mit Mykolsäuren zu stimulieren, müssen die verwendeten APZ CD1b exprimieren. Die Induktion von CD1b wird auf den APZ durch Inkubation mit GM-CSF und IL-4 erreicht (Abb. 6a-6c). Es findet keine Proliferation statt, wenn keine APZ anwesend sind oder diese kein CD1b exprimieren (Abb. 7b).

T-Zelllinien und T-Zellklone weisen Veränderungen im Phänotyp und Proliferationsverhalten auf. Wir untersuchten daher, ob auch frisch isolierte T-Zellen mit Mykolsäure stimuliert werden können. In unseren Experimenten mit CD1 positiven APZ konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulation von DN als auch von SP Zellen konzentrationsabhängig ist (Abb. 7a). Diese in vitro Daten könnten

darauf hindeuten, dass DN Zellen eine Rolle in der Immunantwort bei Infektionen mit Mykobakterien spielen. Weitere Untersuchungen zur Funktion von DN Zellen bei Patienten mit mykobakteriellen Infektionen erscheinen sinnvoll, um die Rolle der DN Zellen bei mykobakteriellen Erkrankungen auch in vivo näher zu charakterisieren. Ob den DN Zellen bei der Präsentation der mykobakteriellen Ag durch CD1 dabei eine protektive oder eine pathophysiologische Rolle bei der Erkennung von Mykobakterien zukommt, ist nicht bekannt.

#### **5.4. Ausblick und mögliche klinische Bedeutung von doppeltnegativen Zellen**

Eine weitere in vivo Charakterisierung von DN Zellen wäre durchaus wünschenswert. Die Organverteilung von DN Zellen beim Menschen ist unbekannt. So ist es vorstellbar, dass z.B. in Lymphknoten oder Leber ein wesentlich höherer Anteil an T-Zellen den DN Phänotyp trägt. Bei Mäusen finden sich zum Teil bis zu 50% DN Zellen in der Leber (Vicari, 1996).

Den DN Zellen könnte eine bisher unbekannte Rolle bei Infektionskrankheiten zukommen, da das Erkennen von Lipidantigenen der bakteriellen Zellmembran durch DN Zellen möglich ist. Immunregulatorische Eigenschaften der DN Zellen als "T-Regulator-Zellen" nach Aktivierung mit DN zellspezifischen Ag könnten darüber hinaus für das Verständnis der Impfstoffwirkung und die Entwicklung von azellulären Impfstoffen ausgenutzt werden. Zur Zeit gibt es noch keine systematischen Untersuchungen über die Rolle von humanen DN Zellen in vivo.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es sich bei DN Zellen nur um einen prozentual kleinen Teil der T-Zell-Population im PB handelt. Die hier durchgeführten Untersuchungen an frisch isolierten, humanen DN Zellen zeigen, dass diese sich von konventionellen SP Zellen wesentlich unterscheiden. Eine weitergehende Charakterisierung der funktionellen Eigenschaften von DN Zellen in vitro und in vivo ist notwendig, um zu klären welche physiologische Rolle die DN Zellen haben und bei welchen pathophysiologischen Vorgängen diese Zellpopulation eine Rolle spielen könnte. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass DN Zellen die Funktion von CD8 positiven Zellen, die den selben T-Zell-Rezeptor tragen, inhibieren können bzw. Apoptose aktivieren und damit in der Lage sind die Abstoßung von Hauttransplantaten zu verhindern (Zhang, 2001). DN Zellen töten hierbei über FAS/FAS L syngene T Zellen im Sinne einer T-T-Zell Interaktion. Sie „erwerben“

Antigen vom MHC von APZ und präsentieren dieses dann in Verbindung mit FAS L. Diese Eigenschaft könnte zukünftig interessante Aspekte für die Transplantationsmedizin bieten.

Auch scheinen DN Zellen bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen. Bei Patienten mit Sklerodermie zeigt sich eine Erhöhung der DN Zellen mit limitierter TCR- $\beta$  Heterogenität (Sumida, 1995), aber ohne Expression der invarianten NKT Zell assoziierten V $\alpha$ 24J $\alpha$ Q TZR  $\alpha$ -Kette. Möglicherweise besteht bei Sklerodermie ein Zusammenhang zwischen dem Fehlen von NKT Zellen und der oligoklonalen Expansion von anderen DN V $\alpha$ 24+ T Zellen.

Bei Patienten mit Systemischen Lupus Erythematosus findet man dagegen eine drei- bis zehnfach erhöhte Anzahl von DN Zellen im PB (Shivakumar, 1989; Funauchi, 1999). Diese Zellen können nach polyklonaler Stimulation zum großen Teil IL-4 produzieren und sind in vitro fähig, die Produktion von anti-DNA Antikörpern durch syngene B Zellen zu unterstützen. Sie könnten das Gegenstück zu den Sklerodermie assoziierten pathogenen DN Zellen sein.

Bei Typ 1 Diabetes konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass bei NOD Mäusen ein numerisches und funktionelles Defizit von NKT Zellen im Thymus und in der Peripherie besteht (Gombert, 1996; Godfrey, 1997). Durch Injektion von Thymus  $\alpha/\beta$  DN Zellen in NOD Mäuse konnte der Ausbruch von Diabetes verhindert werden (Hammond, 1998). Dieser Schutz wird wahrscheinlich durch einen IL-4 und/oder IL-10 Mechanismus vermittelt.

## 6. Literaturverzeichnis

Acha-Orbea, H. 1993. Bacterial and viral: roles in autoimmunity?. *Ann. Rheum. Dis.* **52**: 6

Beckman, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlon, S.T., and Brenner, M.B. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha/beta+ T cells. *Natur* **372**: 691-694.

Beckmann, E.M., Porcelli, S.A., Morita, C.T., Behar, S.M., Furlong, S.T. and Brenner, M.B. 1994. Recognition of a lipid antigen by CD1 restricted T-Cells. *Nature*. **372**: 691-694.

Behar, S.M., Porcelli, S.A., Beckmann, E.M., and Brenner M.B. 1995. A pathway of costimulation that prevents anergy in CD28- T cells: B7-independent costimulation of CD1- restricted T cells. *J. Exp. Med.* **182**: 2007-2019.

Bendelac, A. 1995. CD1: Presenting Unusual Antigens to Unusual T Lymphocytes. *Science* **269** 185-186.

Bendelac, A. 1995. Mouse NK1+ T cells. *Current opinion in immunology* **7**: 367-374.

Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M.E., Yewdell, J.W., Bennink, R., and Brutkiewicz, R.R. 1995. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* **268**: 863-865.

Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thombsen, C.B. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* **3**: 87-98.

Brooks, E.G., Balk, S.P., Aupiex, K., Colonna, M., Strominger, J.L., and Groh-Spies, V. 1993. Human T-cell receptor (TCR) alpha/beta+CD4-CD8- T cells express oligoclonal TCRs, share junctional motifs across TCR V-gene families, and phenotypically resemble memory T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **90**: 11787-11791.

Colditz, G.A., Brewer, T.F., Berkey, C.S. et al. 1994. Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis: meta-analysis of the published literature. JAMA. **271**: 698-702

Coling, J.E. (Hrsg.), Current Protocols in Immunology.-New York [u.a.]: Wiley ISBN: 0-471-52276-7, Proliferation Assay for T-Cell-Function, 3.12.4

Dellabona, P., Padovan, E., Casarati, G., Brockhaus, M., and Lanzavecchia, A. 1994. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-CD8- T cells. J. Exp. Med. **180**: 1171-1176.

Editorial. 1991. Double-Negative (CD4- CD8-) TCR alpha/beta-expressing, peripheral T cells. Scand. J. Immunol. **34** : 679-688.

Erard, F., Wild, M.-T., Garcia-Sanz, J.A., and Le Gros, G. 1993. Switch of CD8 T cells to nonlytic CD8- CD4- cells that make Th2 cytokines and help B cells. Science **260**: 1802-1805.

Exley, M., Garcia, J., Balk, S.P., and Porcelli, S. 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant V alpha 24+ CD4-CD8- T cells. J. Exp. Med. **186**: 109-120.

Funauchi, M. et al. 1999. Increased interleukin 4 production by NKT cells in systemic lupus erythematosus. Clin. Immunol. **92**: 197-202.

Galelli, A., and Truffa-Bachi, P. 1993. *Urtica dioica* agglutinin. A superantigenic lectin from stinging nettle rhizome. J. Immunol. **151**: 1821-1831.

Godfrey, D.I. et al. 1997. Flow cytometric study of T cell development in NOD mice reveals a deficiency in  $\alpha\beta$ TCR+CD4-CD8- thymocytes. *J. Autoimmunity* **10**: 279-285.

Gombert, J.M. et al. 1996. Early quantitative and functional deficiency of NK1+ -like thymocytes in the NOD mouse. *Eur. J. Immunol.* **26**: 2989-2998.

Goodrum, M.A., Siko, D.G.R., Niehues, T., Eichelbauer, D., Verschoor, J.A. 2001. Mycolic acids from *Mycobacterium tuberculosis*: purification by countercurrent distribution and T-Cell stimulation. *Microbios.* **106**: 55-67

Goren, M.B. and Brennan, P.J. 1979. Tuberculosis. pp 63-193. Edited by G.P. Youmans. W.B. Saunders, Philadelphia, U.S.A.

Hamad, A.R., Srikrishnan, A., Mirmonsef, P., Broeren, C.P., June, C.H., Pardoll, D., Schneck J.P. 2001. Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative  $\alpha/\beta$  T cells: implications for autoimmunity. *J. Exp. Med.* **193**(10): 1113-1121.

Hammond, K.L. et al. 1998.  $\alpha\beta$ -T cell receptor (TCR)+ CD4-CD8- (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD/Lt) mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* **187**: 1047-1056

MacDonald, R.H. 1995. NK1.1+ T cell receptor  $\alpha/\beta$ + cells: New clues to their origin, specificity, and function. *J. Exp. Med.* **182**: 633-638.

Matsuo, R., Herndon, D.N., Kobayashi, M., Pollard, R.B., and Suzuki, F. 1997. CD4-CD8  $\alpha/\beta$  TCR+ suppressor T cells demonstrated in mice 1 day after thermal injury. *The journal of trauma* **42**: 635-640.

Minnikin, D. E. 1982. The biology of the mycobacteria. Physiology, identification and classification. Vol. 1 pp 95-184. Edited by C. Ratledge and J. Stanford. Academic Press, London.

Nagane, Y., Utsugisawa, K., Matsubara, R., Yamagata, M., and Tohgi, H. .1996. TCR $\alpha\beta^+$  CD4 $^-$  CD8 $^-$  T Cells Among the Peripheral Blood Mononuclear Cells of Myasthenia Gravis Patients. *Brain and Nerve*. **48**: 644-647.

Niehues, T., Eichelbauer, D., Schneider, M. 1999. Functional characteristics of human peripheral blood alpha/beta TCR+, CD4- and CD8- double-negative (DN) T cells. *Microbiol. Immunol.* **43**: 153-159.

Niehues, T., Gulwani-Akolkar, B., Akolkar, P., Tax, W., and Silver, J. 1994. Unique phenotype and distinct T-cell-receptor (TCR) V beta repertoire in human peripheral blood alpha/beta positiv, CD4 and CD8 double negative (DN) T cells. *J. Immunol.* **173**: 1072-1081.

Nishizawa, K., and Koyasu, S.1997. IL-2 and IL-7 differentially induce CD4-CD8 alpha beta TCR+ NK1.1+ large granular lymphocytes and IL-4-producing cells from CD4-CD8 alpha beta TCR+ NK1.1-cells: implications for the regulation of Th1- and Th2-type responses. *Int. Immunol.* **9**: 1123-1129.

Porcelli, S.A., Morita, C.T., and Brenner, M.B. 1992. CD1b restricts the respons of human CD4- CD8- lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* **360**: 593-597.

Porcelli, S.A., Yockey, C.E., Brenner, M.B., and Balk, S.P. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4- CD8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several VB genes and an invariant TCR alpha-chain. *J. Exp. Med.* **178**: 1-16.

Shivakumar, S. et al. 1989. T cell receptor  $\alpha\beta$  expressing double-negative (CD4-/CD8-) and CD4+ T helper cells in humans augment the produktion of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis. *J. Immunol.* **143**:103-112.

Sieling, P.A., Chatterjee, D., Porcelli, S.A., Prigozy, T.I., Mazzaccaro, R.J., Soriano, T., Bloom, B.R., Kronenberg, M., Brennan, M.R., and Modlin, R.L. 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* **269**: 227-230.



Sneller, M.C., Wang, J., Dale, J.K., Strober, W., Middleton L.A., Choi, Y., Fleisher, T.A., Lim, M.S., Jaffee, E.S., Puck, J.M., Leonardo, M.J., and Straus, S.E. 1997. Clinical, immunologic, and genetic features of an autoimmune lymphoproliferative syndrome associated with abnormal lymphocyte apoptosis. *Blood* **89**: 1341-1348.

Sumida, T. et al. 1995. Selective reduction of T cells bearing invariant V- $\alpha$ -24J- $\alpha$ -Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J. Exp. Med.* **182**: 1163-1168.

Takayama, K. and Qureshi, N. 1984. Structure and synthesis of lipids. *The Mycobacteria, A sourcebook (in two parts), Part B*, (Kubica G.P. and Wayne L.G. eds) From: Microbiology Series, 5, (Laskin, A.I., Mateles, R.I. eds), Marcel Dekker Inc., New York, p315-320, ISBN 0-8247-7009-9.

Vicari, A.P., and Zlotnik, A. 1996. Mouse NK1.1+ T cells: a new family of T cells. *Immunol. Today* **17**: 71-76.

Zhang, Z.X., Young, K., Zhang, L.. 2001. CD3+CD4-CD8-  $\alpha\beta$ + T cell as immune regulatory cell. *J. Mol. Med.* **79**: 419-427.

## **7. Danksagung**

Herzlich danken möchte ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. U. Göbel für die Möglichkeit an seiner Klinik promovieren zu dürfen. Mein Besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Tim Niehues für seine intensive Betreuung und freundliche Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung der Arbeit.

Desweiteren möchte ich Herrn Universitätsprofessor Dr. med. R.E. Scharf für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. E.M. Schneider für Ihre stetige Anleitung und unermüdliche Diskussionsbereitschaft ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Den Mitarbeitern des Immunologischen Labors danke ich für das angenehme Arbeitsklima, besonders Frau Dr. Ingrid Lorenz und Frau Dr. Britt Schirra für ihre Unterstützung und Hilfe.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Schwester und Freunden, die durch ihr Verständnis und stetes Interesse sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

# CURRICULUM VITAE

**Dirk Eichelbauer**

## PERSÖNLICHE ANGABEN

---

|                      |                 |
|----------------------|-----------------|
| Familienstand:       | ledig           |
| Staatsangehörigkeit: | deutsch         |
| Geburtsdatum:        | 26. Januar 1969 |
| Geburtsort:          | Düsseldorf      |

## SCHULBILDUNG

---

|                         |                                                        |
|-------------------------|--------------------------------------------------------|
| 01.08.1975 – 13.06.1979 | Theodor–Heuss–Grundschule Düsseldorf                   |
| 06.08.1979 – 07.06.1985 | Städtische–Realschule–Siegburgerstraße 149, Düsseldorf |
| 01.02.1988 – 10.12.1990 | Wilhelm–Heinrich–Riehl–Kolleg, Düsseldorf              |
| Dezember 1990           | Abitur                                                 |

## AUSBILDUNG

---

|                         |                                                                                 |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| 01.09.1985 – 31.08.1987 | Ausbildung zum Elektroanlageninstallateur bei der Firma Henkel KGaA, Düsseldorf |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|

## ZIVILDIENTST

---

|                         |                                                                           |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 02.01.1991 – 31.03.1992 | Zivildienst in den Medizinischen Einrichtungen der Universität Düsseldorf |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------|

## AKADEMISCHE AUSBILDUNG

---

|                         |                                                                                                               |
|-------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 01.04.1992              | Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf                                      |
| 29.08.1994              | Ärztliche Vorprüfung                                                                                          |
| 21.03.1996              | Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung                                                                       |
| 23.03.1998              | Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung                                                                      |
| 20.04.1998 – 19.03.1999 | Praktisches Jahr im Klinikum Krefeld, Wahlfach Augenheilkunde                                                 |
| 15.06.1999              | Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung                                                                      |
| 15.10.1999 – 14.04.2001 | AiP im Klinikum Krefeld im Fachbereich Augenheilkunde unter Prof. Dr. med. Friedburg und Prof. Dr. med. Knorr |
| seit 15.04.2001         | Assistenzarzt in der Abteilung für Augenheilkunde des Klinikum Krefeld unter Prof. Dr. med. Knorr             |

---

## 9. Zusammenfassung

TCR  $\alpha/\beta$  CD4- CD8- T Zellen, DN Zellen, stellen eine Zellpopulation dar, die 0,5 – 2% der humanen T Zellen im PB ausmachen. Die Bedeutung dieser Zellen für das Immunsystem ist noch weitgehend ungeklärt. In dieser Arbeit wird die Funktion von frisch isolierten humanen DN Zellen untersucht und mit denen von SP Zellen verglichen. Die Isolation findet mit Hilfe von Immunomagnetbeads statt. So können Experimente zur Oberflächenanalyse (FACS), Stimulations- und Proliferationsverhalten (Proliferationsassays) sowie Zytokinproduktion (ELISA) durchgeführt werden. Wir stellten uns die Frage, welchen Phänotyp und welche Eigenschaften frisch isolierte DN Zellen vor und nach Aktivierung mit konventionellen und unkonventionellen Antigenen haben.

Es kann gezeigt werden, dass eine weitgehend APZ unabhängige Stimulation von DN Zellen durch PHA möglich ist. Nach Stimulation mit PHA produzieren DN Zellen in Anwesenheit von APZ signifikante Mengen von IL-4 und IL-10. Der Aktivierungsmarker HLA-DR wird auf DN Zellen stärker exprimiert als auf SP Zellen und nach Aktivierung mit PHA in Anwesenheit von APZ erreicht er seine maximale Expression nach 24h, wobei bei SP Zellen das Maximum nach 72h noch nicht erreicht ist. DN Zellen exprimieren nach Stimulation niedrigere Level von CD25 im Vergleich zu SP Zellen. Bei der Expression von CD28, CD95 und CD86 ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zu DN und SP Zellen vor und nach Aktivierung. DN Zellen sowie CD4 Zellen lassen sich durch Mykolsäuren stimulieren, sofern die APZ CD1b exprimieren.

Die Ergebnisse sprechen dafür, dass für DN und SP Zellen unterschiedliche Aktivierungsmechanismen vorliegen. So könnte die im Vergleich zu SP Zellen erhöhte HLA-DR Expression auf DN Zellen auf eine T-Zell-T-Zell Interaktion hindeuten. Das gleiche gilt für die APZ unabhängige Aktivierung durch PHA. Die hohen Mengen von IL-4 die in Überständen von menschlichen DN Zellen nach Aktivierung gefunden werden, deuten darauf hin, dass DN Zellen die Fähigkeit besitzen T-Zellen in Richtung Th2 ausdifferenzieren zu lassen. Die Stimulierbarkeit von DN Zellen mittels Mykolsäure spricht dafür, dass DN Zellen eine Rolle in der Immunantwort bei Infektionen mit Mykobakterien spielen.

Düsseldorf den 11.3.2003

 (ID Dr. T. NIEHUES)