

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

-

Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

- Direktor: Univ-Prof. Dr. med. Claudia Rössig -

Antigenpräsentierende Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Interaktion mit

regulatorischen T-Zellen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Zöller, Silke Sabine

aus Münster

2016

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. .Dr. med. Helmut Wittkowski

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2016

Aus dem Universitätsklinikum Münster

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin - Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig
- Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia Rössig
- Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Helmut Wittkowski

ZUSAMMENFASSUNG

Antigenpräsentierende Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Interaktion mit
regulatorischen T-Zellen

Zöller, Silke Sabine

Eine aussichtsreiche adoptive Immuntherapie bösartiger Tumorerkrankungen bedarf einer einfachen, praktikablen Gewinnung der eingesetzten Immunzellen. Zudem muss ihre Kultivierung kosteneffektiv und auch unter den erschwerten Bedingungen der Abwehrschwäche der Tumorpatienten durchführbar sein. Die fortbestehende Funktionalität der Immunzellen ist dabei essenzielle Voraussetzung für eine wirksame Therapie.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen den sehr schwer kultivierbaren und funktionell heterogenen dendritischen Zellen (DC) in Aspekten der Präsentation tumorassoziierter viraler Antigene gleichwertig sind. Gegenüber DC sind sie einfach und kostengünstig auch aus geringen Blutmengen zu isolieren, stellen geringe Ansprüche an die Kulturbedingungen und zeigen eine stabile in vitro Expansion. Ihre Funktionalität bei der effektiven Präsentation tumorassoziierter Antigene wurde durch die stabile Induktion antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen durch Präsentation des Epstein-Barr-Virus-Peptids RAK bestätigt. In diesen Koinkubationen zeigte sich weder durch peptidbeladene noch durch nichtbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen eine signifikante Induktion regulatorischer T-Zellen. Dies ist insofern hervorzuheben, als dass regulatorische T-Zellen tumorprotektiv sein können, indem sie tumorreaktive T-Zellen in ihrer Funktion behindern. $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen somit eine Alternative für die Stimulation und Expansion von tumorantigenspezifischen T-Zellen für die zelluläre Immuntherapie dar.

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2016

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Antigenpräsentierende Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen und ihre Interaktion mit
regulatorischen T-Zellen

in der

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin - Pädiatrische Hämatologie und Onkologie

unter der Anleitung von Frau Univ.-Prof. Dr. med. C. Rössig

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte Hilfe in Anspruch genommen,
4. Sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 18.05.2016

Silke Sabine Zöller

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	3
1.1	Das Immunsystem	3
1.1.1	Das angeborene Immunsystem	3
1.1.2	Das erworbene Immunsystem.....	3
1.2	Zelluläre Immuntherapie maligner Tumore.....	4
1.3	Dendritische Zellen.....	5
1.3.1	Antigenpräsentierende Funktionen dendritischer Zellen	8
1.3.2	Immuntoleranzinduktion durch DC	8
1.3.3	In vitro Generierung und Ausreifung von DC	9
1.4	$\gamma\delta$ -T-Zellen	10
1.4.1	Antigenerkennung und Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen	11
1.4.2	Aktivierung und Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen zur Forschung in vitro	12
1.4.3	Funktionelle Eigenschaften aktivierter $\gamma\delta$ -T-Zellen	12
1.4.4	Antigenpräsentation durch $\gamma\delta$ -T-Zellen	13
1.5	Regulatorische T-Zellen	13
1.5.1	Suppressive Kapazität regulatorischer T-Zellen.....	15
1.6	Zielsetzung.....	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.2	Apparate und Software	17
2.1.3	Reagenzien.....	18
2.1.4	Medium, Lösungen und Puffer	19
2.1.5	Zytokine und Peptide	19
2.1.6	MACS-Isolationskits.....	19
2.1.7	Färbungen	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Spender	20
2.2.2	Zellzählung	20
2.2.3	Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC).....	20
2.2.4	Gewinnung und Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	21
2.2.5	Gewinnung und Ausreifung der DC	21
2.2.6	Isolation der CD3 ⁺ -Responderzellen	22

2.2.7 Magnetische Zell Separation (MACS).....	22
2.2.8 RAK-Peptidbeladung.....	24
2.2.9 Färbungen	24
2.2.10 Pentamerfärbung.....	25
2.2.11 FOXP3-Färbung.....	25
2.2.11 Koinkubation der Antigen präsentierenden Zellen mit und ohne RAK-Peptidbeladung mit CD3 ⁺ -Zellen	26
2.6.12 Statistischer Analyse	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1 In vitro Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	28
3.2 Kultivierung dendritischer Zellen in vitro	34
3.3 Gewinnung der CD3 ⁺ -Responderzellen.....	38
3.4 Induktion antigenspezifischer CTL durch peptidbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen	39
3.5 Weder RAK-peptidbeladene noch unbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren regulatorische T-Zellen.....	47
4. Diskussion.....	55
4.1 Vereinfachte Kultur von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu DC.....	55
4.2 Funktionelle Defizite der DC von Tumorpatienten erschweren die Immuntherapie	57
4.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen sind DC hinsichtlich ihrer APC-Funktion beim RAK-Peptid ebenbürtig	57
4.4 $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren keine regulatorischen T-Zellen und tragen damit nicht zu tumorprotektiver Immuntoleranz bei	59
5. Literaturverzeichnis	64
6. Abkürzungsverzeichnis	84
Lebenslauf.....	87

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Eine Vielzahl an Pathogenen ist in der Lage unseren Organismus in seiner Funktion zu kompromittieren und schwere Erkrankungen hervorzurufen. Geschützt wird unser Körper durch das Immunsystem, wobei durch verschiedene Regulationsmechanismen gleichzeitig eine Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen gewährleistet wird. Grob betrachtet unterscheidet man das angeborene (unspezifische) sowie das erworbene (antigenspezifische) Immunsystem.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Kennzeichnend für die angeborene Immunität ist, dass sie nicht spezifisch erfolgt, sondern sich gegen Merkmale richtet, die von verschiedenen Pathogenen geteilt werden wie zum Beispiel das Lipopolysaccharid oder Karbohydrate der Zellwand verschiedenster Bakterien sowie die doppelsträngige RNA einiger Viren (11). Das angeborene Immunsystem wird vor allem durch Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Effektorzellen repräsentiert, die keine $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptoren tragen wie z.B. natürliche Killerzellen (172). Auch $\gamma\delta$ -T-Zellen weisen Eigenschaften des angeborenen Immunsystems auf (23). $\gamma\delta$ -T-Zellen stellen eine eigene Subpopulation von T-Zellen dar, welche MHC-unabhängig Protein- und Nichtproteinantigene erkennt und verschiedene Funktionen ausübt (s. Kapitel $\gamma\delta$ -T-Zellen) (128,133,166,203).

1.1.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem zeichnet sich durch seine (erworbene) Antigenpezifität und somit gezielte Immunantwort aus. Zellen des erworbenen Immunsystems weisen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für ein spezifisches Antigen auf. T-Zellen bilden die zelluläre Komponente des erworbenen Immunsystems, während die humorale, antigenspezifische Immunantwort am besten durch die von den B-Zellen synthetisierten Antikörper gekennzeichnet ist. Durch die Fähigkeit der B- und T-Zellen zum Re-Arrangement der Gene der Immunglobulinfamilie entsteht eine große Vielfalt und ausreichende Anzahl an

spezifischen Zellen und Antikörpern. (93,197,198) B- und T-Zellen durchlaufen in Knochenmark bzw. dem Thymus Reifungsprozesse der klonalen Deletion bzw. der positiven und negativen Selektion, bei welchen die vorher naiven Zellen zu antigenspezifischen Zellen ausreifen und gegen körpereigene Antigene gerichtete Zellen frühzeitig eliminiert werden (60,96,137,198). T-Zellen werden durch Präsentation des für ihre individuellen T-Zell-Rezeptoren spezifischen Antigens durch antigenpräsentierende Zellen (APC) sowie kostimulatorische Signale aktiviert (172). Nach Aktivierung kommt es zur klonalen Expansion der Zellen sowie zur weiteren Differenzierung. Während B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen reifen, differenzieren $CD8^+$ -Zellen zu aktivierten zytotoxischen T-Zellen und $CD4^+$ -Zellen zu inflammatorischen Typ1- Zellen (T_{H1}) oder zu der zur B-Zell-Aktivierung erforderlichen Typ2-Helferzelle (T_{H2}) (172). Spezifische T- und B-Zellen weisen zum Teil eine lange Lebensdauer auf und schaffen so ein Immungedächtnis, welches bei erneuter Antigenexposition schnell und effektiv expandieren und agieren kann (54,60,194).

1.2 Zelluläre Immuntherapie maligner Tumore

Die gezielte Nutzung von Effektorzellen des Immunsystems zur Bekämpfung von Krebs ist die Grundlage der antigenspezifischen zellulären Immuntherapie. Unterschieden wird dabei die aktive Immunisierung gegen Tumorantigene, die sogenannte Vakzinierungsstrategie, und die adoptive Immuntherapie mit in vitro generierten Effektor-T-Zellen.

Für die **Vakzinierungsstrategie** macht man sich zunutze, dass auch Tumorantigene in Form von Peptiden über APC präsentiert werden und so zu einer tumor-gerichteten T-Zellantwort führen können (16,75,136). Mit abgetöteten, allogenen Melanomzelllinien beladene dendritische Zellen (DC) führen bei einigen Patienten mit metastasiertem, malignen Melanom durch Induktion tumorantigenspezifischer T-Zellen zu einer Regression des Tumors (16,146). Bei anderen Tumorerkrankungen als dem außergewöhnlich immunogenen Melanom blieb der Erfolg dieser in vivo Stimulation und Expansion des erworbenen Immunsystems durch Injektion von Antigenen oder antigenbeladenen APC bislang hinter den Erwartungen zurück (125). Dies ist zum Teil bedingt durch die fortgeschrittenen Tumorstadien der in die Studien einbezogenen Patienten sowie ihre radio- und chemotherapiebedingte Immunsuppression (178). Aber auch die z.T. fehlende Migration der

injizierten Zellen zur Tumorlokalisierung, die Induktion bzw. Aktivierung immunsuppressiver regulatorischer T-Zellen sowie ein immunsuppressives Tumormikromilieu stellen Hindernisse der Vakzinierungsstrategie dar (147,178,193).

Die **adoptive zelluläre Immuntherapie** beruht auf der ex-vivo Modifikation und Expansion (tumor-)antigenspezifischer Effektorzellen sowie ihrer anschließenden Reinfusion. Effektorzellen sind in der Regel tumorreaktive, zytotoxische T-Zellen. Alternativen sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, z.B. natürliche Killerzellen oder $\gamma\delta$ -T-Zellen (7,47,75). $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen eine immanente Antitumoraktivität (114). Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Nierenzellkarzinom ist eine erhöhte Anzahl von $\gamma\delta$ -T-Zell-Zahlen im peripheren Blut mit einer günstigen Prognose assoziiert (98). Die Zytotoxizität von in vitro stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen gegen diverse Tumorzellen wurde beschrieben, hierunter das Nierenzellkarzinom, das Neuroblastom, die chronisch myeloische Leukämie, das Kolonkarzinom, sowie das Ovarialkarzinom (40,46,99,107,188).

Neben ihren zytotoxischen Effektorfunktionen gibt es Hinweise, dass aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen antigene Epitope präsentieren und so tumorantigenspezifische T-Zell-Antworten induzieren können (28). Durch die Kombination beider Funktionen bieten $\gamma\delta$ -T-Zellen konzeptionelle Vorzüge gegenüber DC für die Präsentation von Antigen. Zwar wurden zytotoxische Eigenschaften von DC gegenüber Zellen des Basalzellkarzinoms beschrieben, jedoch scheint eine Effektorfunktion bei DC eine untergeordnete Rolle zu spielen (175).

Ziel dieses Projektes ist die Erarbeitung von Vorarbeiten für eine $\gamma\delta$ -T-Zell-basierte Immuntherapie unter der Vorstellung, diese Synergieeffekte durch die antigenpräsentierenden als auch die zytotoxischen Eigenschaften dieser Zellen simultan in der Immuntherapie von Tumorerkrankungen nutzen zu können.

1.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind die sogenannten „professionellen“ antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems mit maximaler Kapazität zur Antigenstimulation von T-Zellen (10,178). Für immuntherapeutische Fragestellungen wurden sie bislang vorrangig erforscht. Bei DC handelt es sich um einen morphologisch sehr heterogenen Zelltyp (179). Alle DC sind zur Präsentation zuvor aufgenommener und prozessierter Antigene an naive T-Zellen in der Lage. Unterschiede zwischen Subpopulationen bestehen in Lokalisation

und Migrationsverhalten ebenso wie in ihrer speziellen Funktion und den zur Aktivierung und Heranreifung notwendigen Stimuli (106,171,176).

DC entwickeln sich unter Stimulation diverser Zytokine aus einer multipotenten hämatopoetischen myeloischen Vorläuferzelle des Knochenmarks (10,37,120,171).

Humane DC lassen sich in zwei größere Untergruppen unterteilen: Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) sowie konventionelle, auch myeloide dendritische Zellen (cDC) genannt (48,72). Plasmazytoide DC nehmen vor allem Aufgaben der angeborenen Immunabwehr wahr (48,181). Nach Ausreifung im Knochenmark gehen sie in den Blutstrom über und finden sich im Steady State vor allem im Thymus und in den sekundären lymphatischen Organen (9,195). Im Gegensatz zu den cDC führen aktivierte pDC ihre immunmodulatorischen Aufgaben vor allem am Infektionsort aus und scheinen keinen nennenswerten Stellenwert in der Antigenpräsentation in Lymphknoten zu haben (195).

Konventionelle (myeloide) DC hingegen sind in der Regel migratorische DC und verkörpern die klassische APC, die nach Antigenaufnahme in der Peripherie im Verlauf in die regionalen Lymphknoten migriert und hier die in der Peripherie aufgenommenen und prozessierten Antigene den T-Zellen präsentiert (85,198). Typischerweise durchlaufen sie während der Migration Reifungsprozesse und zeigen bei Eintreffen in den Lymphknoten einen reifen Phänotyp (171). Die in dieser Arbeit verwendete Bezeichnung einer dendritische Zelle (DC) bezieht sich auf diese Gruppe von konventionellen dendritischen Zellen.

Klassische DC lassen sich anhand ihrer Oberflächenmerkmale in weitere Untergruppen untergliedern. Das Ursprungsgewebe der cDC ist dabei ausschlaggebend für die Expression der Subgruppenmerkmale sowie die Funktion der DC (48,125,170). Es wird jedoch diskutiert, ob die verschiedenen Oberflächenmarker distinkte Zellreihen von DC darstellen oder nur unterschiedliche Entwicklungswege und Entwicklungsstufen nach Antigenaktivierung (170). Jede Untergruppe dendritischer Zellen besitzt ein unterschiedliches Rezeptorprofil. (94). Dies ist insofern hervorzuheben, als die unterschiedlichen Rezeptoren entsprechend differierende Aufnahmewege und Verarbeitungen der Antigene nach sich ziehen können. Die hieraus resultierenden, unterschiedlichen Reifungssignale an die DC sowie die Bandbreite an möglichen Zytokinausschüttungen ergeben eine Vielzahl an möglichen Immunantworten von der bevorzugten Stimulation eher zytotoxischer oder

Helfer-T-Zellen bis hin zur Immunsuppression durch Stimulation von regulatorischen T-Zellen oder Ausschüttung von immunsuppressiven Mediatoren. (48,87,88,94,117,119,168)

Grundlegend entscheidend für die Eigenschaften der DC ist neben ihrer Unterart und dem Profil an Oberflächenrezeptoren zudem ihr Reifungsstatus.

Unreife DC finden sich in vielen peripheren Geweben (178). Unreife DC weisen Chemo-kinrezeptoren auf, welche initial ihre Migration zur Stelle der Inflammation und während der Ausreifung ihre Migration in das Lymphsystem begünstigen (11,50,147).

Hier erfüllen sie eine Art Wächterfunktion und nehmen endogene und exogene Antigene und Partikel auf (10,73,162,192). Die Proteine werden in den Endosomen abgebaut und anschließend mit Hilfe von MHC-Klasse-II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. In unstimuliertem Zustand weisen diese MHC-II-Peptid-Komplexe jedoch nur eine kurze Lebensdauer auf, da sie regelmäßig durch Ligasen und Lysosomen wieder internalisiert und abgebaut werden. (192) Zudem besitzen unreife DC nur wenige kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche und sind daher nur eingeschränkt zur Interaktion mit T-Zellen fähig (147,170). Hauptaufgabe der unreifen DC ist daher die Antigenaufnahme.

Die Ausreifung dendritischer Zellen wird von einer Reihe von Faktoren beeinflusst. Neben Bakterien, mikrobiellen Bestandteilen wie dem LPS der Zellwand sind hier auch stimulatorische Zytokine wie IL-1, GM-CSF und TNF- α zu nennen (10,34,162,200). Auch natürliche Produkte des Zellabbaus, wie z.B. Harnsäure und Hitzeschockproteine, welche bei Tumorerkrankungen oder Apoptosevorgängen vermehrt produziert werden, können eine Aktivierung dendritischer Zellen zur Folge haben (125).

Die zur Aktivierung und Differenzierung der DC notwendigen Stimuli können einen synergistischen Effekt entwickeln. Ihre Kombination bestimmt das Oberflächenrezeptorprofil der sich entwickelnden DC sowie ihre Funktion (147,178). Aktivierte, heranreifende DC verlassen ihren Ursprungsort und migrieren in lymphatische Organe wie die Milz sowie Lymphknoten, um dort antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren (10). Reife DC sind durch eine hohe Expression von MHC-II-Molekülen an ihrer Oberfläche sowie durch die Expression von T-Zell kostimulierenden Molekülen wie z.B. CD80, CD86 und CD40 charakterisiert (147,192,200).

1.3.1 Antigenpräsentierende Funktionen dendritischer Zellen

Exogene Antigene werden von DC unspezifisch durch Phagozytose oder Makropinozytose jedoch auch rezeptorvermittelt aufgenommen (10,53,162,178). Die noch unreifen DC weisen spezielle MHC-II reiche Kompartimente auf, in welche die Antigene überführt, prozessiert und an MHC-II-Moleküle gekoppelt werden, bevor sie als MHC-II-Antigen-Komplexe zurück an die Zelloberfläche gelangen (10,139). Veränderungen des MHC-II-Stoffwechsels sowie eine gesteigerte Proteaseaktivität lassen heranreifende DC deutlich effektiver in ihrer Antigenpräsentation werden (38,73,122). Auch wenn vorwiegend exogene Peptide mittels MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche dendritischer Zellen präsentiert werden, können auch Peptide, welche sich im Cytosol befinden mittels Autophagie oder spezieller Transporter in die Endosomen und somit den MHC-II-Präsentationsweg gelangen (167,195,206).

Zelleigene oder über die zelleigene Proteinsynthese produzierte virale Proteine oder Tumorantigene werden in DC durch Proteasomen abgebaut und im endoplasmatischen Retikulum an MHC-I-Moleküle gekoppelt (10,73). Im Verlauf werden diese Protein-MHC-I-Komplexe an der Zelloberfläche CD8⁺-T-Zellen präsentiert. Einige Antigene exogenen Ursprungs gelangen ebenfalls via Phagozytose, Makropinozytose oder rezeptorvermittelt in die Zelle und werden mittels MHC-I an CD8⁺-T-Zellen kreuzpräsentiert (5,73,142). Diese Kreuzpräsentation führt zur Stimulation zytotoxischer T-Zellen auch gegen Tumorzellen (5,10,143,170).

1.3.2 Immuntoleranzinduktion durch DC

Neben ihrer T-Zell-aktivierenden Eigenschaft spielen DC auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von Immuntoleranz: DC sind an der negativen Selektion von potentiell autoreaktiven T-Zellen im Thymus beteiligt (170). In der Abwesenheit von zur Reifung führenden Stimuli sind DC zudem in der Lage, eine Toleranz gegenüber den von ihnen aufgenommenen Eigen- und Fremdanitigenen aufzubauen. Hawinger et al. konnten zeigen, dass unter diesen Bedingungen zwar eine antigenspezifische T-Zell-Antwort durch antigenpräsentierende DC erzielt werden kann, diese jedoch im Verlauf nicht aufrechterhalten wird. Die Zahl der induzierten T-Zellen sinkt nach sieben Tagen durch Deletion

deutlich ab. Zudem zeigen die spezifischen T-Zellen im Verlauf keine Reaktion mehr auf ihr spezifisches Antigen, werden also anerg. (76,177)

Insbesondere trägt die Induktion regulatorischer T-Zellen durch DC zur Erhaltung einer Antigentoleranz bei (12,52). Auf diesen T-Zell-Subtyp und die Interaktion mit DC wird im Folgenden noch detailliert eingegangen.

Wurden bislang spezielle Subgruppen dendritischer Zellen für die Aufrechterhaltung von Toleranzmechanismen verantwortlich gemacht, geht man aktuell eher davon aus, dass der Entwicklungsstatus der DC für ihre immunogene oder tolerogene Funktion entscheidend ist (109,125,170).

Während die immunogenen Eigenschaften dendritischer Zellen in der Immuntherapie geschätzt werden, stellt ihr tolerogenes Potential eine Hürde dar. Anstelle einer Aktivierung tumorantigenspezifischer T-Zellen können diese Eigenschaften zu einer Unterdrückung natürlicher oder durch Tumorzellen induzierter Immunreaktionen gegen Tumorzellen führen.

1.3.3 In vitro Generierung und Ausreifung von DC

Ein weiterer Nachteil von DC bei ihrer Anwendung in der Tumorimmuntherapie ist die Heterogenität dieses Zelltyps sowie ihre komplexen Ansprüche an die in vitro Kultur.

Prinzipiell stehen verschiedene Verfahren zur Gewinnung dendritischer Zellen für die Tumorimmuntherapie zur Auswahl. DC werden z.B. durch in vitro Differenzierung aus Monozyten oder CD34⁺-Vorläuferzellen des Knochenmarks bzw. Nabelschnurblutes durch Zugabe von GM-CSF und IL-4 bzw. TNF α gewonnen (22,84,89,156,182). Für die optimale Präsentation von Antigenen werden reife DC benötigt. Es müssen also vielgestaltige Entwicklungswege und Reifungsprozesse in vitro nachempfunden werden. Als gängigstes Verfahren hat sich dabei die Ausreifung von aus Monozytenkulturen gewonnenen DC mittels eines Zytokincocktails aus IL-1 β , IL-6, TNF- α sowie Prostaglandin E2 etabliert (48,89,110).

1.4 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Auf der Suche nach alternativen Zellen für die Immuntherapie richtete sich die Aufmerksamkeit der Forscher in den letzten Jahren unter anderem auf $\gamma\delta$ -T-Zellen. Bei $\gamma\delta$ -T-Zellen handelt es sich um T-Zellen, welche anstatt α - und β -Untereinheiten des T-Zell-Rezeptors $\gamma\delta$ -Heterodimere aufweisen (29,74). $\alpha\beta$ -T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen entstehen aus einer gemeinsamen $CD4^+CD8^-$ -Vorläuferzelle des Thymus (51,190,203). $\gamma\delta$ -T-Zellen finden sich beim Menschen vorwiegend in den lymphatischen Organen, im Blut sowie im Intestinum. Ihr Anteil an den Lymphozyten in den jeweiligen Regionen ist variabel (Blut 0,5-16%, Milz 2-30%, Lymphknoten 5%, Intestinum 10%). (33,67,74)

$\gamma\delta$ -T-Zellen weisen einige der gleichen Oberflächenmoleküle wie $\alpha\beta$ -T-Zellen auf. Hierzu zählen unter anderem CD2, CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD11b, CD16, CD25, CD28 und CD45, wobei CD2, CD7 und CD5 bei allen $\gamma\delta$ -T-Zellen aufzufinden sind und die anderen variabel exprimiert werden (67,74). Vereinzelt exprimieren $\gamma\delta$ -Zellen ebenfalls CD4 oder CD8 an ihrer Oberfläche (74).

Es existieren verschiedene Subgruppen von $\gamma\delta$ -T-Zellen. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres zeitlichen Auftretens während der Entwicklung, aber auch in Bezug auf ihre Lokalisation und T-Zell-Rezeptor-Beschaffenheit (74). $\gamma\delta$ -T-Zellen schützen somit bereits neonatal einen Fötus, dessen $\alpha\beta$ -Zellen noch nicht entwickelt und dessen DC noch unreif sind (74,102,123,124,190). Humane pränatal entstehende $\gamma\delta$ -T-Zellen gehören vorwiegend der $V\delta 1$ -Fraktion an, während postnatal zunehmend $V\delta 2$ -Zellen produziert werden (36,74,149).

Der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten unterscheidet sich zudem in den unterschiedlichen Distributionsorten. Hier zeigt sich darüber hinaus ein subgruppenspezifisches Verteilungsmuster. Während sich im peripheren Blut zu über 80% $\gamma\delta$ -T-Zellen finden, welche den $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zell-Rezeptor exprimieren, finden sich im Thymus und in Schleimhäuten vorwiegend $V\delta 1^+$ -Zellen. (28,74,149,203) Das Verteilungsmuster ist bei den verschiedenen Spezies sehr unterschiedlich: So scheinen z.B. im Gegensatz zu Mäusen beim Menschen $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Haut keine wesentliche Rolle zu spielen und auch Anzahl und Subgruppenverhältnisse von $\gamma\delta$ -T-Zellen variieren unter den verschiedenen Spezies beträchtlich (32,33,67,74,77,86,118,173). Die vorliegende

Arbeit berichtet über Erkenntnisse aus der Erforschung von humanen, aus peripherem Blut gewonnenen V γ 9V δ 2-T-Zellen, so dass der Terminus $\gamma\delta$ -T-Zelle im Folgenden synonym für diese verwendet wird.

1.4.1 Antigenerkennung und Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen

$\gamma\delta$ -T-Zellen unterscheiden sich grundlegend von $\alpha\beta$ -T-Zellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Antigenerkennung. Während $\alpha\beta$ -T-Zellen nur über MHC-Moleküle präsentierte Peptide erkennen, erfolgt die Antigenerkennung und Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen vorwiegend MHC-unabhängig, erfordert jedoch ebenfalls eine Stimulation über den T-Zell-Rezeptor (128,133,166,203). $\gamma\delta$ -T-Zellen sind in der Lage, verschiedene Liganden wie Phosphoantigene, Alkylamine, Oberflächenmoleküle oder lösliche Proteine zu erkennen (203).

$\gamma\delta$ -T-Zellen können über Metabolite der Steroidsynthese aktiviert werden. Membrankomponenten wie Cholesterol und Steroide erfordern für ihre Synthese Isoprenoide, die entweder über den Mevalonatweg oder den Methylerythritolphosphatweg (MEP) synthetisiert werden. (15,80,133) Die in diesem Zusammenhang auftretenden Prenyl-Pyrophosphat-Antigene (Phosphoantigene) werden von V γ 9V δ 2-T-Zellen über ihren T-Zell-Rezeptor erkannt, wobei hierfür weder Antigenpräsentation über die klassischen MHC-I, MHC-II oder CD1a/b/c Moleküle noch Antigenaufnahme und Antigenprozessierung notwendig sind (132). Isopentyl-Pyrophosphat (IPP) als Zwischenprodukt des Mevalonatweges führt bei unphysiologisch hohen Serumkonzentration, wie z.B. bei der gesteigerten Membransynthese aufgrund des hohen Zellumsatzes bei Tumorerkrankungen, zu einer Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen (65,80). Ein weiteres, sehr potentes Stimulans von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist HMB-PP ((*E*)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphat), das beim Menschen nicht vorkommt, aber im Rahmen mikrobieller Infektionen von Bakterien produziert wird (15,80). Auch einige Alkylamine, welche in verschiedenen Sekreten und Nahrungsmitteln vorkommen, wirken ebenfalls als Antigene für V γ 9V δ 2-T-Zellen (35,80).

Die vor allem in Geweben vorkommenden V δ 1⁺-Zellen werden durch CD1c, einem CD1-Molekül auf der Oberfläche von B-Zellen und DC, aktiviert (174). V δ 1⁺-Zellen können auch über ihren NKG2D-Rezeptor durch stressinduzierte Antigene wie MICA und

MICB aktiviert werden (14,68-70,80,190). Auch eine $\gamma\delta$ -T-Zellaktivierung durch lösliche Proteine z.B. das Staphylococcal enterotoxin A (SEA) oder durch Hitzeschockproteine wurde beschrieben (39,133,158,203).

Wie bei den $\alpha\beta$ -T-Zellen werden auch bei den $\gamma\delta$ -Zellen für ihre optimale Aktivierung neben der Antigenbindung an den entsprechenden T-Zell-Rezeptor ein oder mehrere weitere kostimulatorische Signale benötigt (74). Die zur Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen benötigten kostimulatorischen Signale werden vor allem über Rezeptoren der Immunglobulin-Superfamilie oder Tumornekrose-Superfamilie vermittelt (155).

1.4.2 Aktivierung und Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen zur Forschung in vitro

$\gamma\delta$ -T-Zellen können in vitro aktiviert und in großen Mengen expandiert werden. Dabei macht man sich zunutze, dass Medikamente der Osteoporosetherapie, Aminobisphosphonate, als Pyrophosphatanaloga Ähnlichkeit zu Phosphoantigenen aufweisen (45) und eine stabile Expansion funktioneller $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren können (103,104). Während die Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen sich zytokinunabhängig zeigte, ist zur Proliferation eine exogene Gabe des Zytokins IL-2 notwendig (104). Die $\gamma\delta$ -T-Zell-Aktivierung über Aminobisphosphonate ist abhängig vom V γ 9V δ 2-T-Zell-Rezeptor, so dass initial aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Phosphoantigenen eine direkte Aktivierung ähnlich zu IPP und HMB-PP diskutiert wurde. Aktuell geht man eher von einer Aktivierung der $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Akkumulation von IPP und seinen Vorstufen durch Hemmung der Farnesyl-Disphosphonat-Synthetase des Mevalonatweges aus. (45,80,185)

1.4.3 Funktionelle Eigenschaften aktivierter $\gamma\delta$ -T-Zellen

Nach Stimulation über den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor und kostimulatorische Moleküle, sind $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Lage, verschiedene Funktionen auszuüben.

So sind aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Lage eine große Bandbreite an pro- aber auch anti-inflammatorischen Chemokinen und Zytokinen wie IL-2, IL-4, IL-5, TNF α sowie INF γ freizusetzen. Das Repertoire sowie die quantitative Zusammenstellung der sezernierten Botenstoffe sind hierbei abhängig von der Untergruppe der $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie dem Stimulationsreiz. (74,108,131,203)

Weiterhin besitzen $\gamma\delta$ -T-Zellen zytotoxische Eigenschaften. Diese werden zum einen über eine Apoptose über die Fas/Fas-Ligand vermittelte Caspasenaktivierung erzielt (44,196,203). Zum anderen können $\gamma\delta$ -T-Zellen über Perforin direkt zytolytisch wirken (101,135,174).

1.4.4 Antigenpräsentation durch $\gamma\delta$ -T-Zellen

Während die zytotoxischen Effektor-Eigenschaften von $\gamma\delta$ -T-Zellen gut beschrieben sind, ist erst seit kurzem bekannt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen auch Antigene präsentieren können. Nach Aktivierung über den T-Zell-Rezeptor zeigt sich bei den nun proliferierenden $V\delta 2^+$ Zellen eine verstärkte Expression des Lymphknoten-Homing-Rezeptors CCR7 (27). Die somit zur Migration in Lymphknoten begünstigten $V\delta 2^+$ -T-Zellen weisen zudem eine vermehrte Expression von MHC-II-Molekülen, CD40 sowie kostimulatorischen (CD80, CD86) und Adhäsionsmolekülen (u.a. CD54) auf ihrer Oberfläche auf (28,203). Diese Oberflächenmerkmale ähneln denen einer professionellen APC. Brandes et al. konnten zeigen, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen auch entsprechende Aufgaben wahrnehmen können: Aktivierte $V\delta 2^+$ -T-Zellen können eine Proliferation und Differenzierung antigenspezifischer $\alpha\beta$ -T-Zellen induzieren (28).

Analog gelang es, durch Antigenpräsentation auf $V\delta 2^+$ -T-Zellen eine Proliferation antigenspezifischer zytotoxischer $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen (CTLs) zu induzieren (28,108).

$\gamma\delta$ -T-Zellen weisen demnach nicht nur Effektorzeleigenschaften, sondern auch antigenpräsentierende Eigenschaften auf und besitzen daher ein großes Potenzial für den Einsatz in der Immuntherapie.

1.5 Regulatorische T-Zellen

Als wesentliches Hindernis der Tumorimmuntherapie hat sich die Hemmung tumorantigenspezifischer T-Zellen durch regulatorische T-Zellen, die immunsuppressive Wirkungen aufweisen, gezeigt (111,134,160).

Nach ersten Hinweisen für Immuntoleranz unterstützende T-Zellen in den 70er Jahren haben Sakaguchi et al. in den 90er Jahren $CD4^+CD25^+$ -T-Zellen eine entscheidende Rolle

bei der Kontrolle autoreaktiver T-Zellen nachgewiesen (62,159). Die Gruppe konnte zeigen, dass das Fehlen von $CD4^+CD25^+$ -Zellen bei Mäusen zu Autoimmunerkrankungen wie Thyreoiditis, Gastritis, Insulinitis, Oophoritis, Glomerulonephritis und anderen führte, die Zellen jedoch auch eine Rolle in der Toleranz von nichteigenen Antigenen spielen (159). Aufgrund dieser Fähigkeit zur Steuerung der Immunantwort wurden diese T-Zellen zunächst als suppressive T-Zellen, später dann als regulatorische Zellen bezeichnet.

Regulatorische T-Zellen entwickeln sich aus einer $CD4^+$ -Vorläuferzelle (19). Natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen entstehen während der frühen fetalen und neonatalen T-Zell-Entwicklung im Thymus und werden von hier in die Peripherie ausgeschwemmt (160). Ihre Selektion scheint eine TCR-Rezeptoraffinität für die von thymalen Stromazellen präsentierten Selbstantigene zu erfordern (91). Trotz dieser Spezifität für Selbstantigene entgehen sie im Gegensatz zu normalen T-Zellen aus bisher nicht eindeutig geklärten Gründen der negativen Selektion und differenzieren stattdessen zu regulatorischen T-Zellen (19).

Regulatorische T-Zellen können auch in der Peripherie durch entsprechende Antigen- und Zytokinstimulation aus reifen $CD4^+$ -T-Zell-Populationen entstehen (18,43). Dies kann in einem inflammatorischen oder nichtinflammatorischen Kontext geschehen und diese adaptiven regulatorischen T-Zellen finden sich gehäuft im Kontext einer Infektion oder nach Transplantation aber auch durch gehäufte Exposition mit anderen Fremdantigenen z.B. durch Allergene oder Nahrung (18,92).

Neben $CD4$ weisen die Zellen den $IL-2$ -Rezeptor $CD25$ an ihrer Oberfläche auf (159).

Als wichtiger Marker regulatorischer T-Zellen wurde in den vergangenen Jahren der Forkhead Transkriptionsfaktor FOXP3 identifiziert. In aktivierten T-Zellen bewirkt FOXP3 eine Hemmung der Transkription von Zytokinen wie $IL-2$, $IL-4$ oder $IFN-\gamma$ (17,56,169). Gleichzeitig wird FOXP3 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen zugeschrieben: Durch retroviralen Gentransfer von FOXP3 gelang es, $CD25^-CD45RO^-CD4^+$ -Zellen in einen Phänotyp ähnlich regulatori-

scher CD25⁺CD4⁺-Zellen zu verwandeln, während Foxp3 defiziente Mäuse keine regulatorischen T-Zellen aufweisen und als Folge schwere lymphoproliferative Autoimmunerkrankungen erleiden (55,56,204).

Im Rahmen der Erforschung regulatorischer T-Zellen wurden unterschiedliche Oberflächencluster zur Definition einer regulatorischen T-Zelle verwendet, da keiner dieser Marker spezifisch für eine regulatorische T-Zelle ist. Konsens ist jedoch, dass CD4⁺CD25⁺FOXP3^{high}-Zellen die höchsten suppressiven Eigenschaften aufweisen, so dass sich diese Definition in den letzten Jahren durchgesetzt hat und für die vorliegende Arbeit zugrunde gelegt wurde.

1.5.1 Suppressiv Kapazität regulatorischer Zellen

Regulatorische T-Zellen sind in der Lage, ihre immunmodulatorische Funktion durch Beeinflussung einer Vielzahl von Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems zu entfalten. Hierbei ist zu erwähnen, dass regulatorische T-Zellen zur Entfaltung ihrer immunsuppressiven Eigenschaften zwar einer Antigenstimulation über ihren TCR bedürfen, die folgende Immunsuppression jedoch antigenunspezifisch abläuft (129,187).

Regulatorische T-Zellen können die Aktivierung, Proliferation, Funktion und Zytokinproduktion von CD4⁺ sowie CD8⁺-T-Zellen über immunsuppressive Proteine und Zytokine wie IL-10, IL-35, IL-9, TGF- β und Galectin supprimieren (24,25,41,61,92,100,161,180,183,186). Durch die hohe Dichte des IL-2-Rezeptors CD25 an der Oberfläche von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen wird zudem die den übrigen Effektorzellen zur Verfügung stehende Menge an IL-2 reduziert und so eine Apoptose der CD4⁺-Zellen durch Zytokindeprivation induziert. (92,148)

Antigenpräsentierende DC werden durch regulatorische T-Zellen sowohl in ihrem Reifungsprozess, als auch in Ihrer Funktion beeinträchtigt (112,127,144,154,199).

Antigenspezifische CTL sowie natürliche Killerzellen werden durch regulatorische T-Zellen in Ihrer Proliferation, zytotoxischen Funktion und Produktion von IFN- γ eingeschränkt (63,64). Auch eine direkte Zytotoxizität gegenüber CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen, B-Zellen, CD14⁺-Monozyten sowie unreifen und reifen DC über Perforine und Granzyme (A/B) konnte nachgewiesen werden (71,205).

1.6 Zielsetzung

In dieser Arbeit haben wir das Potenzial von $\gamma\delta$ -T-Zellen untersucht, als APC für tumor-assoziierte Antigene zu dienen. Dies soll der Stimulation und Expansion von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen für die zelluläre Immuntherapie dienen. Der Goldstandard der Antigenpräsentation sind zur Zeit DC; ihre Verwendung für die Immuntherapie ist jedoch durch die Heterogenität dieses Zelltyps und die Schwierigkeiten ihrer Expansion und in vitro Kultur limitiert. Hier haben wir die Hypothese untersucht, dass in vitro aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen wesentliche Funktionen von Antigenpräsentation besitzen und T-Zellen antigenspezifisch stimulieren können.

Um die Eignung von $\gamma\delta$ -T-Zellen als APCs für die Immuntherapie zu untersuchen, wurden folgende Gesichtspunkte betrachtet: Die technisch einfache, ressourcenschonende Isolation sowie in vitro Kultivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist für ihren Einsatz in der Immuntherapie entscheidend. Der zentrale Aspekt war die Untersuchung der Kapazität dieser Zellen zur Antigenpräsentation. Ziel dieser Arbeit war es weiterhin darzustellen, ob $\gamma\delta$ -T-Zellen auch regulatorische T-Zellen stimulieren, die ein potenziell negatives Feedback für die von ihnen induzierte Immunantwort liefern könnten.

Um diesen Fragestellungen näher nachzugehen wurde in der vorliegenden Arbeit die Effektivität und Praktikabilität einer in vitro Aktivierung und Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen überprüft. Zur näheren Evaluation der antigenpräsentierenden Eigenschaften sowie der möglichen Stimulation regulatorischer T-Zellen wurden Koinkubationsversuche von antigenpräsentierenden Zellen und CD3⁺-Responderzellen durchgeführt. Das Epitop RAK des Epstein-Barr-Virus (EBV)-Proteins BZLF1, das zum lytischen Zyklus des Virus gehört, wurde aufgrund seiner starken Immunogenität als Antigen gewählt (153). Entsprechend der HLA-Restriktion dieses Peptids (20) wurden entsprechende, HLA-B08 positive Spender gewählt. Im direkten Vergleich mit DC als APC haben wir untersucht, ob durch Präsentation auf $\gamma\delta$ -T-Zellen funktionell gleichwertige, peptidspezifische T-Zellen generiert werden können. Längerfristig planen wir die Weiterentwicklung dieser Strategie im Hinblick auf eine klinische Anwendung bei der Tumorimmuntherapie.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien:

Falcon 15ml, 50ml	Greiner Labortechnik
T75-Gewebekulturflaschen	Greiner Labortechnik
24-Well-Platten	Nunc
Kolbenhubpipetten 1-10, 10-100, 100-1000µl	Eppendorf
Pipettenspitzen 10-1000µl (steril)	Sarstedt
Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Corning
Transferpipetten 3,5ml	Sarstedt
Eppendorf Tubes 1,5ml	Eppendorf
0,45µm Filter	Corning
FACS-Röhrchen	BD-Falcon

2.1.2 Apparate und Software

Neubauer-Zählkammer	Merck
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss
Magnetblock MidiMACS Separator	Miltenyi
MACS-Midi-Säulen	Miltenyi
MACS Magnet	Miltenyi
MACS Multistand	Miltenyi
Laminar Flow hood	Zapf Instruments

Inkubator	Heraeus Instruments
Vortex	Heidolph
Megafuge	Heraeus Instruments
Eppendorf Zentrifuge 5417R	Eppendorf
Pipettierhilfe pipetus® akku	Hirschmann Laborgeräte
Autoklav 2540EL Tuttnauer	Systemc Laborsysteme

Durchflusszytometrie/FACS (fluorescence activated cell sorting): Für jede Analyse wurden 10^4 - 10^5 Zellen mittels dem FACS Calibur™ A4C gemessen und die Daten mit Hilfe der BD Cell Quest Software (Becton Dickinson) oder mit Hilfe der Flowing Software 2.5.1 (<http://www.flowingsoftware.com/>) von Perttu Terho, Cell Imaging Core, Turku Centre for Biotechnology analysiert.

2.1.3 Reagenzien

RPMI 1640	Invitrogen/GIBCO/Hyclone
Trypanblau	GIBCO
Ficoll Lymphoprep™	Axis Shieds
PBS (phosphate buffered saline)	GIBCO
BSA (Bovines Serum Albumin)	Promega
PFA (Paraformaldehyd)	Serva
L-Glutamin	GIBCO
Zoledronsäure (Zometa®)	Novartis
Tris-HCl	Sigma Aldrich
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma Aldrich
NaCl	Sigma Aldrich

2.1.4 Medium, Lösungen und Puffer

Autologes Medium: RPMI 1640, 8% autologes Serum , 1% L-Glutamin

Cell dissociation solution: 0,04M Tris-HCl, 1mM EDTA, 0,15M NaCl, pH 7,4

MACS Puffer: 500ml PBS, 0,5% BSA, 2mM EDTA, pH 7,2

FACS-Puffer: PBS, 0,5% BSA

Waschpuffer Pentamerfärbung: PBS, 0,1% BSA, 0,1% Azid

Die für die FOXP3 Färbung benötigte Fixations/Permeabilisationslösung sowie der Permeabilisations-Puffer wurden mit den Reagentien und gemäß den Herstellerangaben des FOXP3 staining set von eBioscience gefertigt.

2.1.5 Zytokine und Peptide

GMCSF, rhIL-2, rhIL-4, rhIL-6, TNF- α : ImmunoTools

IL-1 β : R&D

Prostaglandin E2: Sigma-Aldrich

RAK: HLA-B08 bindendes Epitop RAKFKQLL des EBV-Proteins BZLF1, welches zum lytischen Zyklus des Virus gehört, ProImmune

2.1.6 MACS-Isolationskits

Für die MACS-Verfahren wurden die entsprechenden, kommerziell verfügbaren Isolationskits (Pan T Cell Isolation Kit II, Anti-TCR γ/δ MicroBead kit human, CD14 Microbeads) von Miltenyi Biotec verwendet.

2.1.7 Färbungen

Oberflächenmarker: Die für die Färbungen verwendeten fluorescein-konjugierten monoklonalen Antikörper Anti-CD3 PerCp, Anti-CD3 PE, Anti-CD4 PerCp, Anti-CD8 Fite, Anti-CD14 Fite, Anti-CD25 Fite stammten von Becton Dickinson Pharmingen.

RAK-Pentamerfärbung: Das für die RAK-Pentamerfärbung notwendigen RAK-Pentamer sowie das PE-konjugierte Fluortag wurde von ProImmune bezogen.

FOXP3-Färbung: Die für die FOXP3-Färbung benötigten Permeabilisationspuffer, Rattenserum und Antikörper gegen FOXP3 entstammen dem FOXP3 staining set von e-Bioscience.

2.2 Methoden

2.2.1 Spender

Für die Koinkubationsexperimente von $\gamma\delta$ -T-Zellen und DC wurde das Blut von drei freiwilligen, gesunden Spendern verwendet, welche bekanntermaßen das Histokompatibilitätsantigen HLA-B08 aufwiesen.

2.2.2 Zellzählung

Die Zellzählung erfolgte manuell mit Hilfe der Neubauer Zählplatte. Hierfür wurde eine Probe der zuvor im enthaltenden Medium suspendierten Zellen in einem je nach Experiment variablen Verdünnungsverhältnis mit Trypanblau versetzt und anschließend auf die Zählplatte aufgebracht. Nach Auszählen aller vier Quadranten unter dem Mikroskop wurde die Zellzahl der Suspension nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Summe der Zellen der 4 Quadranten})/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

2.2.3 Isolierung der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC)

Zur Isolation der PBMC wurde heparinisiertes Blut gesunder Spender 1:1 mit RPMI vermischt. Anschließend wurde dieses Gemisch vorsichtig über die Hälfte der Menge an Ficoll-Lösung (Lymphoprep®) in 50ml-Tubes geschichtet, ohne es mit dieser zu vermischen. Es erfolgte die Zentrifugation über 20-30 Minuten bei 800g und Auslaufen der Zentrifuge ohne Bremse. Hierdurch trennten sich die Blutbestandteile gemäß ihres Dichtegradienten auf. Der sich an der Interphase zwischen Ficoll-Paque und Plasma bildende Lymphozytenring konnte mit einer Transferpipette abgenommen werden, während die Erythrozyten und Granulozyten sich aufgrund ihrer geringen Dichte am Boden der 50ml-

Tubes anreicherten (26). Nach zweimaligem Waschen (Resuspendieren, Abzentrifugieren und Verwerfen des Überstandes) der PBMC mit reinem RPMI wurden die gewonnenen Lymphozyten in autologem Medium aufgenommen und mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt.

2.2.4 Gewinnung und Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen

Für die Gewinnung von $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden je $20 \cdot 10^6$ der isolierten PBMC mit $1 \mu\text{g/ml}$ Zoledronsäure stimuliert und zu $2 \cdot 10^6$ Zellen/well auf einer 24 well-Platte ausplattiert. Bei dem hierbei verwendeten Medium handelte es sich um RPMI, welchem 8% autologes Serum und 2mM L-Glutamin sowie rhIL-2 in einer Konzentration von 100U/ml zugesetzt wurden. Zur Inkubation wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 bebrütet. Eine 1:2 Splittung und Fütterung mit dem rhIL-2 haltigem, autologen Medium wurde an Tag 4-5 durchgeführt, bevor die Zellen an Tag 8 bzw. an Tag 9 geerntet und gezählt wurden. Aus jeweils $20 \cdot 10^6$ der geernteten Zellen wurden mit Hilfe von TCR- $\gamma\delta$ spezifischen Beads in einem magnetischen Separationsverfahren (s. Punkt 2.2.7) die $\gamma\delta$ -T-Zellen positiv selektiert, diese anschließend gezählt und für die weitere Koinkubation mit den $\text{CD}3^+$ -Zellen verwendet. Zur Kontrolle der Reinheit dieser für die Kokulturen verwendeten $\gamma\delta$ -T-Zellen erfolgte die Färbung einer Probe der Zellfraktionen vor der Separation sowie der positiv und der negativ selektierten Zellfraktionen mittels monoklonaler Antikörper gegen CD3 und anschließender FACS-Analyse. Eine Färbung des $\gamma\delta$ -TCR erfolgte bereits durch die Fitc-konjugierten Beads (1).

2.2.5 Gewinnung und Ausreifung der DC

$\text{CD}14^+$ -Zellen wurden mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (s. Punkt 2.2.7) aus jeweils $30 \cdot 10^6$ frisch isolierten PBMC positiv selektiert und anschließend gezählt. Zur Überprüfung der Reinheit der weiter zu verwendenden $\text{CD}14^+$ -Zellen erfolgte die Färbung einer Probe der Zellfraktionen vor der Separation sowie der positiv und der negativ selektierten Zellfraktionen mittels monoklonaler Antikörper gegen CD3 und CD14 und anschließender FACS-Analyse.

Die so isolierten $\text{CD}14^+$ -Zellen wurden mit einer Dichte von $1-2 \cdot 10^6$ /well auf einer 24-well Platte ausplattiert. Als Medium diente RPMI, welchem 8% autologes Serum sowie

2mM L-Glutamin, 800U/ml GM-CSF und 1000U/ml IL-4 zugefügt wurden. Die Inkubation wurde bei 37°C und 5% CO₂ durchgeführt. Am 3. Tag erfolgte ein Wechsel des GM-CSF und IL-4 haltigen, autologen Mediums. Zur Ausreifung der DC wurden die Zellen an Tag 6 mit Hilfe von Cell dissociation solution geerntet, mit RPMI gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Ausplattierung aller gewonnenen Zellen in RPMI mit 8% autologem Serum, 2mM L-Glutamin sowie den Ausreifungszytokinen IL-6 (100ng/ml), IL-1 β (10ng/ml), Prostaglandin E₂ (1 μ g/ml) sowie TNF- α (10ng/ml) auf einer 24-well Platte in einer Dichte von 300.000 bis 1,4 Millionen CD14⁺-Zellen pro well. Nach 24h wurden die ausgereiften DC abermals mit Hilfe von Cell dissociation solution geerntet, gewaschen und für die weitere Koinkubation mit den CD3⁺-Zellen verwendet.

2.2.6 Isolation der CD3⁺ Responderzellen

Die für die Kokulturen als Responderzellen benötigten CD3⁺-Zellen wurden aus jeweils 30*10⁶ frischen PBMC mit Hilfe der magnetischen Zellseparation gewonnen (s. Punkt 2.2.7). Dabei handelte es sich bei den eingesetzten CD3⁺-Zellen um die negativ selektionierte Zellfraktion. Der Gesamtmenge an PBMC wurden durch das Verfahren die CD3⁻-Zellen entzogen. Die CD3⁺-Zellen blieben unberührt und somit unstimuliert (2).

Zur Kontrolle der Reinheit dieser für die Kokulturen verwendeten CD3⁺-T-Zellen erfolgte die Färbung einer Probe der Zellfraktionen vor der Separation sowie der positiv und der negativ selektierten Zellfraktionen mittels monoklonaler Antikörper gegen CD3 und anschließender FACS-Analyse.

2.2.7 Magnetische Zell Separation (MACS)

Die magnetische Zellseparation (MACS) bedient sich der Oberflächenmerkmale von Zellen zum gezielten Separieren von Zellgemischen. Hierbei werden je nach der zu isolierenden Zellfraktion monoklonale Antikörper gegen die spezifische Oberflächenstrukturen verwendet, welche wiederum mit sogenannten MicroBeads konjugiert sind. Bei diesen handelt es sich um magnetische Mikropartikel eines Durchmessers von bis zu 100nm. Durch die magnetischen Eigenschaften der MicroBeads können die mit ihnen verbundenen Zellen im nächsten Schritt isoliert werden. Die mit MicroBeads versetzte Zellsuspension wird über eine Säule mit plastikbeschichteter Stahlwolle gegeben, welche in einem starken magnetischen Feld aufgehängt ist. Während die unmarkierten Zellen die Säule

und das Magnetfeld passieren bleiben die mit MicroBeads markierten Zellen durch die magnetischen Kräfte an der Stahlwolle in der Säule haften. Das anschließende Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld führt zur Entmagnetisierung der Stahlwolle, so dass die in ihr verbliebenen, markierten Zellen anschließend ausgewaschen werden können (126).

Die sogenannte Negativfraktion der unmarkierten Zellen in der Ausschlussfraktion als auch die sogenannte Positivfraktion der markierten Zellen können im Anschluss für weitere Experimente genutzt werden.

Für das genaue Procedere zur Gewinnung der einzelnen Zellfraktionen wird auf die Herstellerangaben von Miltenyi zu den CD14MicroBeads human, Anti-TCR γ/δ MicroBead kit human sowie des Pan T Cell Isolation Kit II verwiesen.

Besonderheiten bzw. Unterschiede der einzelnen Verfahren:

CD14 Microbeads: Dieser Kit von Miltenyi dient zur Gewinnung von CD14⁺-Zellen aus PBMC. Hierbei wurden, analog zu dem oben beschriebenen MACS-Prinzip, an MicroBeads gebundene, monoklonale anti-humane CD14-Antikörper verwendet. Bei den für die Zellkulturen eingesetzten CD14⁺-Zellen handelte es sich also um die Positivfraktion. (3)

Anti-TCR γ/δ MicroBead kit human: Dieser Kit wurde zur Gewinnung der $\gamma\delta$ -T-Zellen aus den zuvor mit Zoledronsäure stimulierten PBMC eingesetzt. Im Unterschied zu dem oben geschilderten Verfahren ist bei diesem MACS zunächst die Bindung eines Hapten-konjugierten Anti-TCR- γ/δ -Antikörpers an die Zielzellen erforderlich. In einem zweiten Schritt wurden dann FITC-konjugierte Anti-Hapten MicroBeads an die gebundenen Hapten-konjugierten Anti-TCR- γ/δ -Antikörper gebunden. Das Auftrennungsprinzip bleibt unter der Berücksichtigung dieser zweifachen Bindung analog zu dem oben geschilderten. Bei den isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen handelte es sich somit um die Positivfraktion aus dem MACS. Diese Zellen waren aufgrund der FITC-Konjugation der Micro-Beads bereits für die Analyse im FACS geeignet, die Färbung weiterer Oberflächenmarker wurde abgeschlossen. (1)

Pan T Cell Isolation Kit II: Dieses Kit dient zur Gewinnung von CD3⁺-Zellen aus PBMC. Bei diesem Verfahren wurden die PBMC mit einem Cocktail aus Biotin-konjugierten

Antikörpern gegen CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 sowie CD235a (Glycopherin A) versetzt. Nach den nötigen Inkubations- und Waschschritten wurde auch hier eine zweite Bindung mit Anti-Biotin-MicroBeads angeschlossen, bevor die an die Beads gebundenen Zellen mit Hilfe der magnetischen Separation aus der Gesamtzellmenge herausortiert wurden. Bei den in den Experimenten verwendeten CD3⁺-Zellen handelte es sich somit um die unberührte und somit unstimulierte Negativfraktion. (2)

2.2.8 RAK-Peptidbeladung

Für die Peptidbeladung der in der Kokultur mit CD3⁺-Zellen verwendeten $\gamma\delta$ -T-Zellen und DC wurde das an das human leukocyte antigen (HLA)-B08 bindende Epitop RAKFKQLL des EBV-Proteins des lytischen Zyklus BZLF1, im folgenden RAK genannt, verwendet (20,153). Bis zu einer Million der $\gamma\delta$ -T-Zellen bzw. der DC wurden hierzu geerntet, abzentrifugiert und dann mit jeweils 1 μ l (10 μ g/ml) des in 1,5ml autologem Medium und 0,5ml PBS gelösten RAK-Peptides für eine Stunde bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Hierauf folgten drei Waschschriffe mit RPMI oder autologem Medium, bevor die peptidbeladenen Zellen für die Kokultur mit den CD3⁺-Zellen weiterverwendet wurden. Aufgrund der mehrfachen Zentrifugationsvorgänge wurde ein Verlust von 10% der Ausgangszellen eingerechnet.

2.2.9 Färbungen

Die in den Experimenten verwendeten Zellen wurden vor und nach den Kokulturen hinsichtlich ihrer Oberflächenmerkmale mittels der Durchflußzytometrie analysiert. Hierzu wurden die Zellen geerntet, mit PBS mit 0,5% BSA gewaschen, der Überstand verworfen und anschließend das verbleibende Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert. Die Zellen wurden mit verschiedenen Kombinationen von FITC-, PE-, oder PerCp konjugierten monoklonalen Antikörpern für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert, anschließend abermals mit PBS mit 0,5% BSA gewaschen, in 200-300 μ l 1% PFA fixiert und bis zur Durchflußzytometrie bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.2.10 Pentamerfärbung

Für die RAK-Pentamerfärbungen wurden die Zellen der Koinkubationen resuspendiert, ca. 500µl geerntet und mit Waschpuffer, bestehend aus 0,1% BSA- und 0,1% Azid-haltigem PBS, gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100µl Waschpuffer resuspendiert. Je die Hälfte, 50µl, der Zellsuspension wurden für die Pentamer- bzw. Isotypenfärbung verwendet. Für die Pentamerfärbung wurden 10µl des verdünnten RAK-Pentamers (1,5µl Pentamer/20µl Waschpuffer) hinzugegeben und die Zellen für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift unter Zugabe von 2ml Waschpuffer, die folgende Abzentrifugation, das Verwerfen des Überstandes und die anschließende Resuspension der Zellen in der Restflüssigkeit. Zwischenzeitlich wurde das PE-konjugiertem Fluorotag bei 14.000rpm 2 Minuten lang abzentrifugiert. Sowohl zur Isotypenkontrolle als auch zu den pentamergefärbten Zellen wurden anschließend je 3µl der PerCp- bzw. Fitc-konjugierten monoklonalen Antikörper gegen CD3 bzw. gegen CD8 sowie 4µl des Fluortag-PE zugegeben. Nach 20-30 Minuten Inkubation im Dunkeln folgte ein erneutes zweimaliges Waschen bevor die Zellen in 100-200µl 1% PFA fixiert und bis zur Durchflußzytometrie bei 4°C im Dunkeln gelagert wurden.

2.2.11 FOXP3-Färbung

Für die intrazelluläre FOXP3-Färbung wurden Puffer, Rattenserum und Antikörper des Foxp3 staining sets von eBioscience verwendet. Zunächst wurde mit der Färbung mittels monoklonaler Antikörper gegen die Oberflächenmarker CD4, CD25 und CD3 begonnen. Nach abgelaufener Inkubation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, der Überstand verworfen und anschließend in der Restflüssigkeit resuspendiert. 1ml der vorher nach den Herstellerangaben gefertigten Fixations/Permeabilisationslösung wurde hinzugefügt, die Mischung gevortext und dann für 30 Minuten bei 4° im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation erfolgten zwei Waschschriffe mit dem ebenfalls nach Herstellerangaben gefertigten und 0,45µm filtriertem Permeabilisationspuffer. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in der Restflüssigkeit resuspendiert und 2µl Rattenserum zur Blockierung hinzugefügt. Nach erneuter 15-minütiger Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden 20µl des fluorochrom-konjugierte anti-human FOXP3 Antikörper hinzugegeben, und die Zellen abermals für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem

Waschen mit dem Permeabilisationspuffer wurde der Überstand verworfen, das Pellet in PBS mit 0,5% BSA resuspendiert und unverzüglich mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert.

Bei allen Färbungen wurden die entsprechenden Isokontrollen mitgeführt.

2.1.12 Koinkubation der Antigen präsentierenden Zellen mit und ohne RAK-Peptidbeladung mit CD3⁺-Zellen

Zur Evaluation der APC-Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie der durch sie hervorgerufenen Induktion regulatorischer T-Zellen wurden verschiedene Zellkulturen angelegt. MACS-isolierte CD3⁺-Zellen dienten hierbei als Responderzellen und wurden mit $\gamma\delta$ -T-Zellen bzw. DC als Vergleich koinkubiert. Eine Mediumkontrolle bestehend aus reinen CD3⁺-Responderzellen ohne Zusatz von APC wurde ebenfalls angelegt. Vor dem CD3-MACS wurde zur Bestimmung des Ausgangswertes an regulatorischen T-Zellen eine Probe der frisch isolierten PBMC FOXP3, CD4, CD25 und CD3 gefärbt und im FACS analysiert.

Die mit Zoledronsäure stimulierten und durch den $\gamma\delta$ -MACS isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden zum Teil mit dem RAK-Peptid beladen. Ebenso wurde auch ein Teil der zytokingereiften DC mit diesem Peptid beladen. Anschließend wurden die gewonnenen peptidbeladenen und nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen und DC im Verhältnis 1:10 mit den CD3⁺-Responderzellen in RPMI mit 8% autologem Serum, 2mM L-Glutamin und 100 U/ml IL-2 auf einer 24-well-Platte ausplattiert:

2*10 ⁶ CD3 ⁺ -Zellen (Mediumkontrolle)	2*10 ⁶ CD3 ⁺ -Zellen + 200.000 $\gamma\delta$ -T-Zellen (ohne RAK)	2*10 ⁶ CD3 ⁺ -Zellen + 200.000 $\gamma\delta$ -T-Zellen (mit RAK)	2*10 ⁶ CD3 ⁺ -Zellen + 200.000 DC (ohne RAK)	2*10 ⁶ CD3 ⁺ -Zellen + 200.000 DC (mit RAK)
---	--	---	--	---

Während der einwöchigen Koinkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ erfolgte der einmalige Wechsel des autologen, IL-2-haltigen Mediums.

Zur Bestimmung des Anteils induzierter regulatorischer T-Zellen in den Kulturen wurden diese an Tag 7 abgenommen, gewaschen und FOXP3, CD4, CD25 und CD3 gefärbt. Parallel erfolgte eine gesonderte CD3, CD8 und RAK-Pentamerfärbung aller Kulturen zur Bestimmung des Anteils antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen. Sowohl der Anteil regulatorischer T-Zellen als auch der antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen wurde anschließend gesondert voneinander mittels Durchflusszytometrie erfasst.

2.2.13 Statistische Analyse

Die in dieser Arbeit abgebildeten Grafiken und Tabellen beruhen auf den mehrfach durchgeführten Experimenten. Der zweiseitige Student T-Test Typ 2 wurde zur Testung der Signifikanz der Resultate angewandt. Eine gleiche Varianz wurde hierbei zugrunde gelegt.

3 Ergebnisse

3.1 In vitro Expansion von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Für den therapeutischen Einsatz von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist es notwendig, die Zellen in einer großen und ausreichenden Zellzahl in vitro zu expandieren. Dies ist möglich durch eine gezielte Stimulation der $\gamma\delta$ -T-Zellen unter den PBMC mit dem Aminobisphosphonat Zoledronsäure. Um das Potenzial von $\gamma\delta$ -T-Zellen für den Einsatz in der Immuntherapie zu evaluieren, wurde daher zunächst ihre Fähigkeit zur Proliferation sowie die Ausbeute der zur Verfügung stehenden $\gamma\delta$ -T-Zellen überprüft. Wie in Abbildung 1 schematisch dargestellt wurden hierfür die Lymphozyten aus dem Spenderblut mittels Ficollgradientenzentrifugation isoliert und an Tag 0 mittels Zugabe von IL-2 und Zoledronsäure stimuliert. An Tag 5 erfolgten ein Mediumwechsel und eine erneute Zugabe von IL-2. Die hierunter expandierten $\gamma\delta$ -T Zellen wurden an Tag 9 geerntet und gezählt. Für spätere Koinkubationsexperimente wurde anschließend mit Hilfe der magnetischen Zellseparation die Fraktion der $\gamma\delta$ -T-Zellen aufgereinigt. Der Anteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen vor und nach MACS wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfasst.

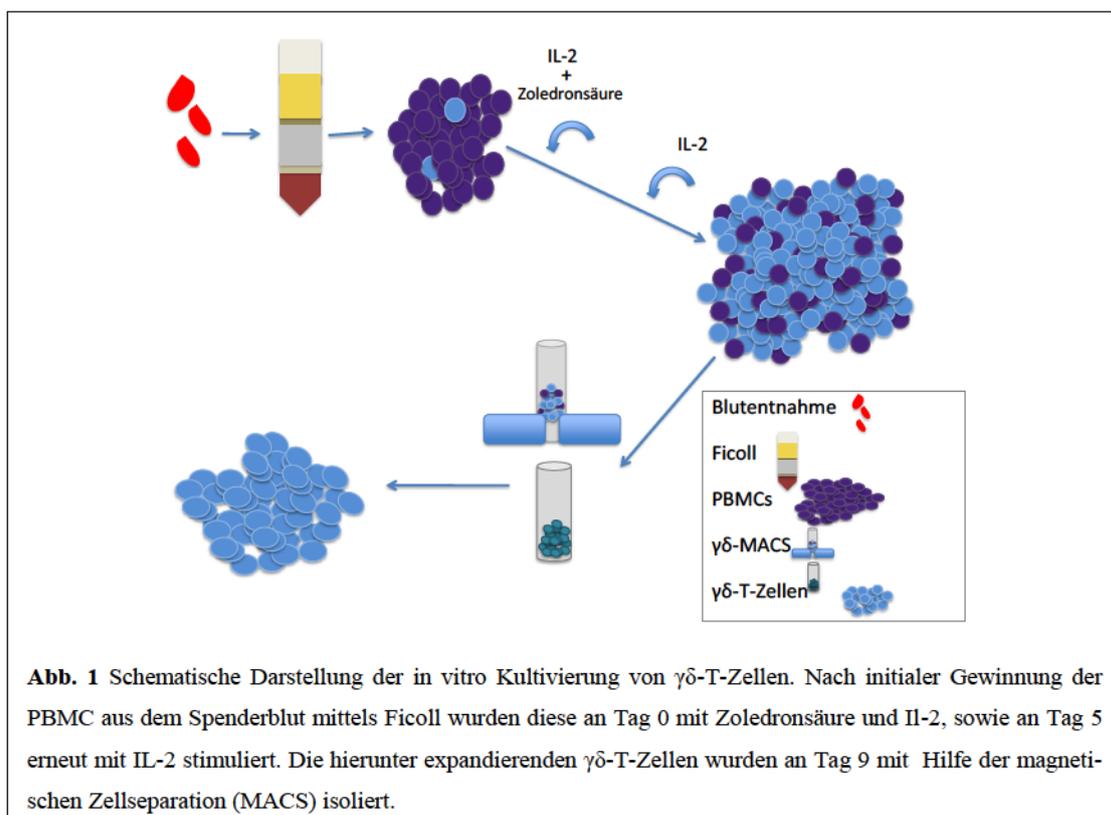
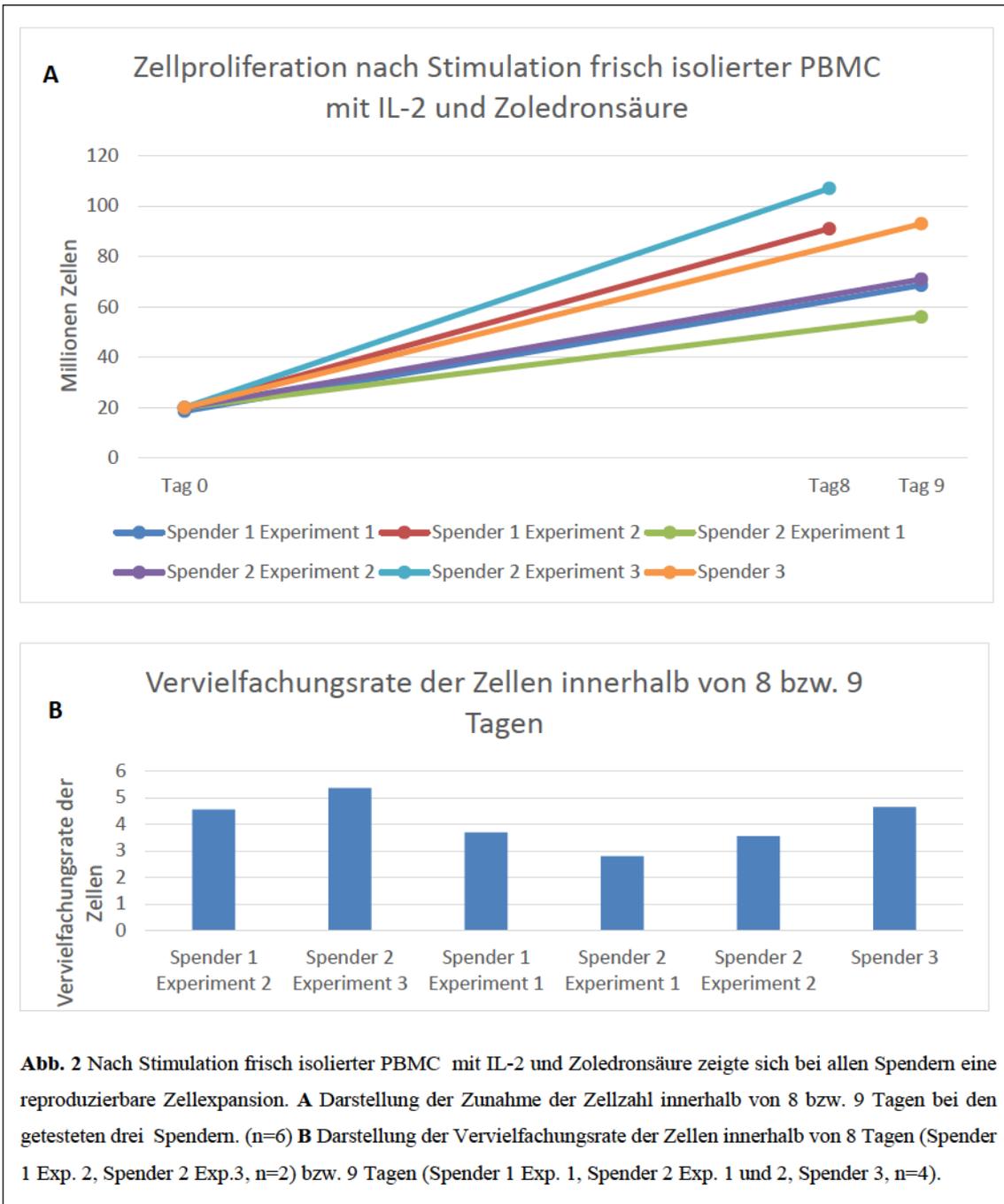


Abb. 1 Schematische Darstellung der in vitro Kultivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen. Nach initialer Gewinnung der PBMC aus dem Spenderblut mittels Ficoll wurden diese an Tag 0 mit Zoledronsäure und IL-2, sowie an Tag 5 erneut mit IL-2 stimuliert. Die hierunter expandierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden an Tag 9 mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS) isoliert.

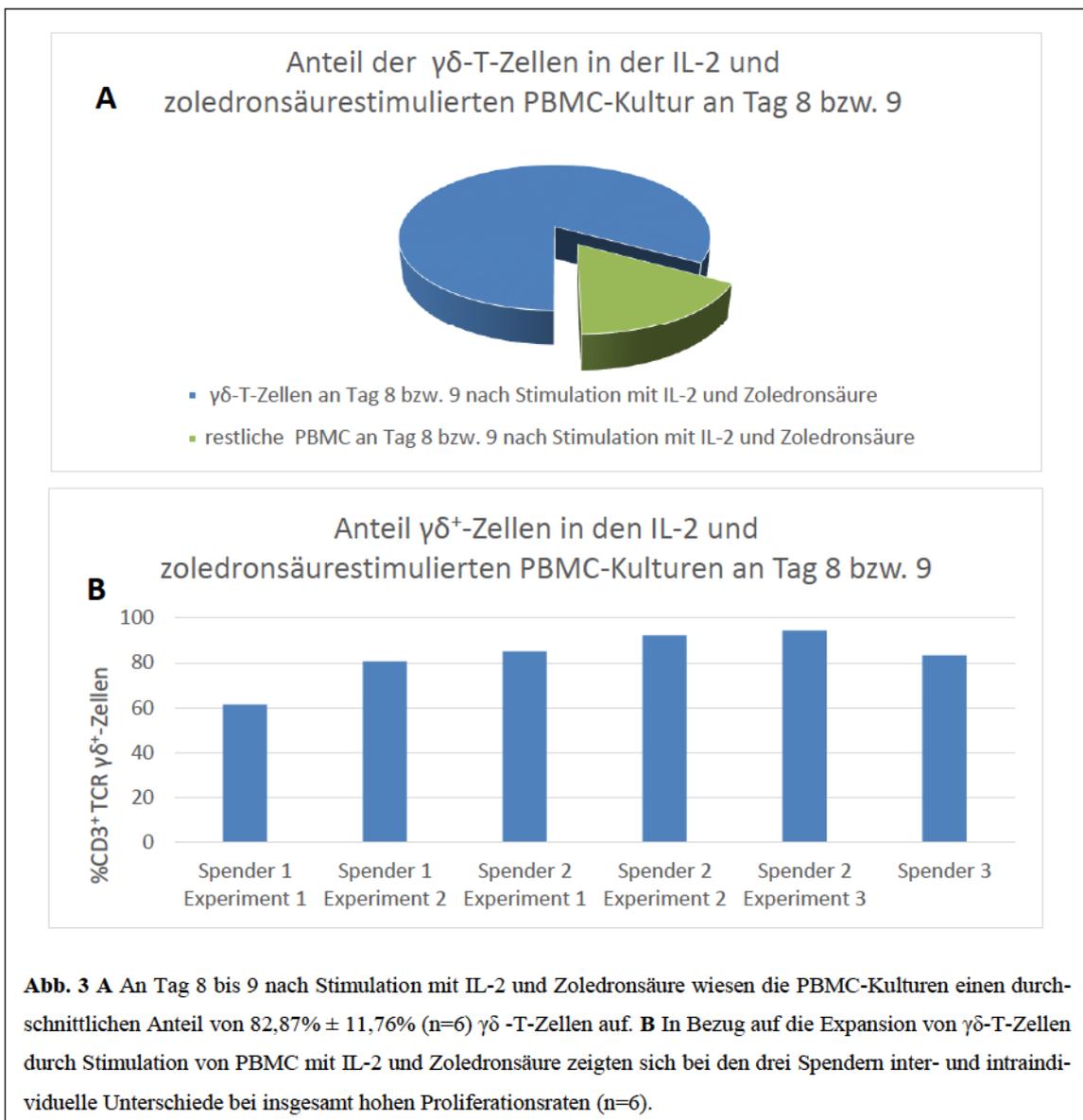
Durch die einmalige Stimulation mit Zoledronsäure und unter Zugabe von IL-2 konnte bei 3 Spendern in 4 Versuchen eine Expansion der 20 Millionen eingesetzten PBMC auf eine durchschnittliche Zellzahl von $73,44 \pm 15,20$ Millionen Zellen nach 9 Tagen erzielt werden. Dies entspricht einer durchschnittlich $3,67 \pm 0,76$ -fachen Expansionsrate innerhalb von 9 Tagen ($n=4$) (s. Abb. 2). Bei zwei weiteren Spendern wurden 20 Millionen der gewonnenen PBMC gleichermaßen stimuliert und an Tag 8 gezählt. Hier zeigten sich durchschnittlich $99 \pm 11,31$ Millionen Zellen, entsprechend einer Vervielfachung um den Faktor $4,95 \pm 0,57$ ($n=2$). Es waren interindividuelle sowie intraindividuelle Schwankungen zu verzeichnen. So ergaben sich für den Spender 2 an Tag 9 in zwei separat durchgeführten Experimenten dieser Versuchsreihe Vervielfältigungen der PBMC um den Faktor 2,8 bzw. 3,55; an Tag 8 zeigte der gleiche Spender eine Vervielfachungsrate von 5,36. Die minimale Vervielfachung bei den drei getesteten Spendern lag an Tag 8 bzw. 9 beim Faktor 2,8, die höchste gemessene Vervielfachungsrate bei 5,36 (s. Abb. 2).



Es ließ sich also durch Stimulation mit Zoledronsäure unter Zugabe von IL-2 eine reproduzierbare Expansion erzielen.

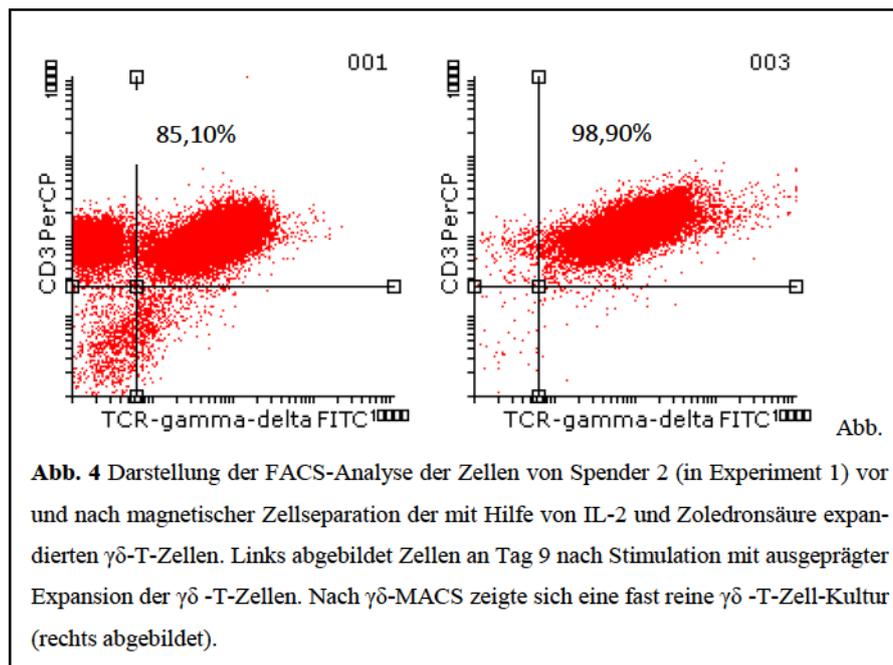
Die Proliferation der PBMC ist vor allem auf eine Expansion der $\gamma\delta$ -T-Zellen zurückzuführen. Bei den getesteten drei Spendern exprimierten an Tag 8 bzw. 9 $82,87\% \pm 11,76\%$ (n=6) der in Kultur befindlichen Zellen neben CD3 auch den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor (s. Abb.

3A). Auch hier zeigten sich neben interindividuellen vor allem intraindividuelle Unterschiede (s. Abb. 3B), so dass eine Abhängigkeit des Proliferationserfolges der $\gamma\delta$ -T-Zellen von den situativen Gegebenheiten im Spenderorganismus zum Zeitpunkt der Blutentnahme angenommen werden kann. Bei den zwei wiederholt getesteten Spendern ergaben sich Spannbreiten von 61,4% bis 80,7% (Spender 1) bzw. 85,1% bis 94,4% (Spender 2) an $\gamma\delta$ -T-Zellen innerhalb der expandierten PBMC. Der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen an den Lymphozyten im peripheren Blut vor Stimulation wurde in den hier dargestellten Experimenten nicht getestet, in vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ergaben sich hierfür intra- und interindividuell variable Anteile von 1,5%-5,5% (191). Dies entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (103).

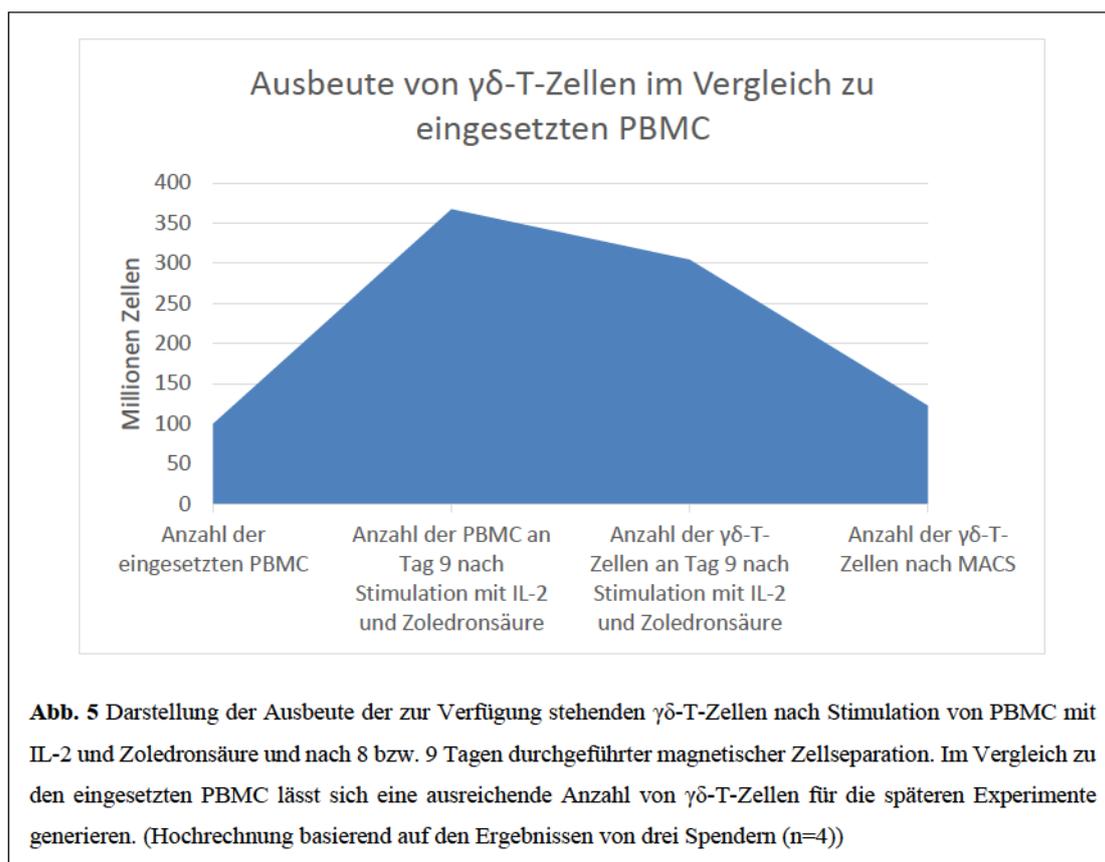


Um möglichst reine $\gamma\delta$ -T-Zell-Kulturen für die späteren Experimente zu gewinnen und einen Einfluss verbleibender antigenpräsentierender Zellen, wie B-Zellen innerhalb der PBMC, zu minimieren, wurden die Zellen mittels Positivselektion mit $\gamma\delta$ -TCR-spezifischen Antikörpern und magnetischer Zellseparation ($\gamma\delta$ -MACS) weiter aufgereinigt.

Durch den $\gamma\delta$ -MACS konnte die Reinheit der für die Experimente verwendeten $\gamma\delta$ -T-Zellen der drei Spender (n=6) auf $99,06\% \pm 0,70\%$ hinsichtlich des Anteils der CD3 und den $\gamma\delta$ -TCR koexprimierenden Zellen gesteigert werden (s. Abb. 4).



Die vorausgehenden Ausführungen verdeutlichen, dass sich bei der Gewinnung von $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie deren Proliferation in vitro mit relativ geringem Aufwand eine ausreichende Zellzahl für mögliche Forschungs- und Therapieansätze generieren lässt. Bei einem Einsatz von 100 Millionen PBMC lägen die zu erwartenden $\gamma\delta$ -T-Zellen trotz Verlusten im Rahmen der magnetischen Zellseparation nach Stimulation und Isolation bei 123 Millionen (s. Abb. 5).



3.2 Kultivierung dendritischer Zellen in vitro

Um das Potenzial von $\gamma\delta$ -T-Zellen als APC für die Immuntherapie zu analysieren, wurde als Vergleichspartner die DC als Goldstandard einer antigenpräsentierenden Zelle gewählt. DC stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar, welche weitaus schwieriger als $\gamma\delta$ -T-Zellen zu isolieren und in Kultur zu halten ist. Dementsprechend gestaltet sich die Gewinnung ausreichender Mengen an DC für die Immuntherapie im klinischen Kontext kompliziert. Eine Möglichkeit für die in vitro Kultivierung von DC ist die Ausreifung von $CD14^+$ -Monozyten zu DC. Wie in Abbildung 6 schematisch dargestellt wurde zur Gewinnung der DC drei HLA-B08 positiven Spendern Blut abgenommen und mittels Ficollgradientenzentrifugation die Lymphozytenpopulation isoliert. Danach wurden per magnetischer Zellseparation $CD14^+$ -Zellen isoliert. Zur Überprüfung der Reinheit der gewonnenen Kulturen wurden entsprechende Proben vor und nach dem Verfahren mit Antikörpern gegen $CD14$ und $CD3$ gefärbt und anschließend mittels FACS analysiert. Die $CD14^+$ -Zellen wurden an Tag 0 sowie Tag 3 mit GM-CSF sowie IL-4 stimuliert und an Tag 6 durch Zugabe von IL-6, IL-1 β , PGE-2 und TNF- α zur Ausreifung gebracht. Am Folgetag wurden die nun reifen DC für die folgenden Koinkubationsversuche mit autologen $CD3^+$ -T-Zellen eingesetzt.

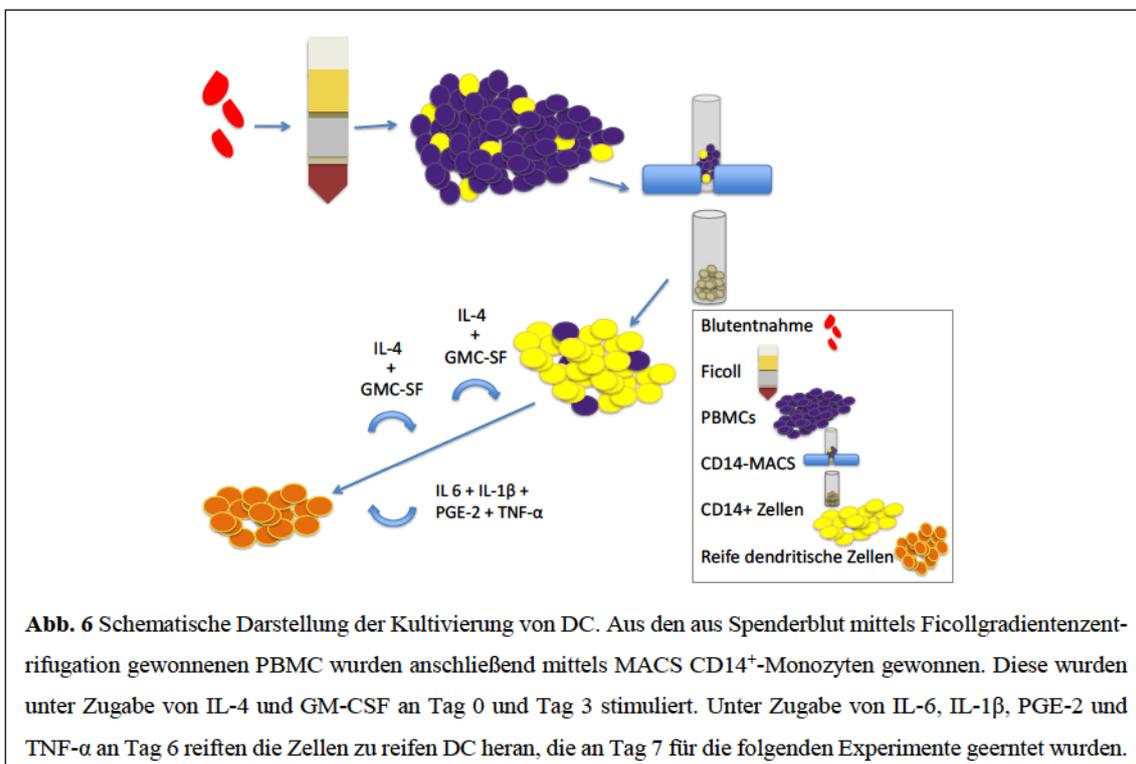
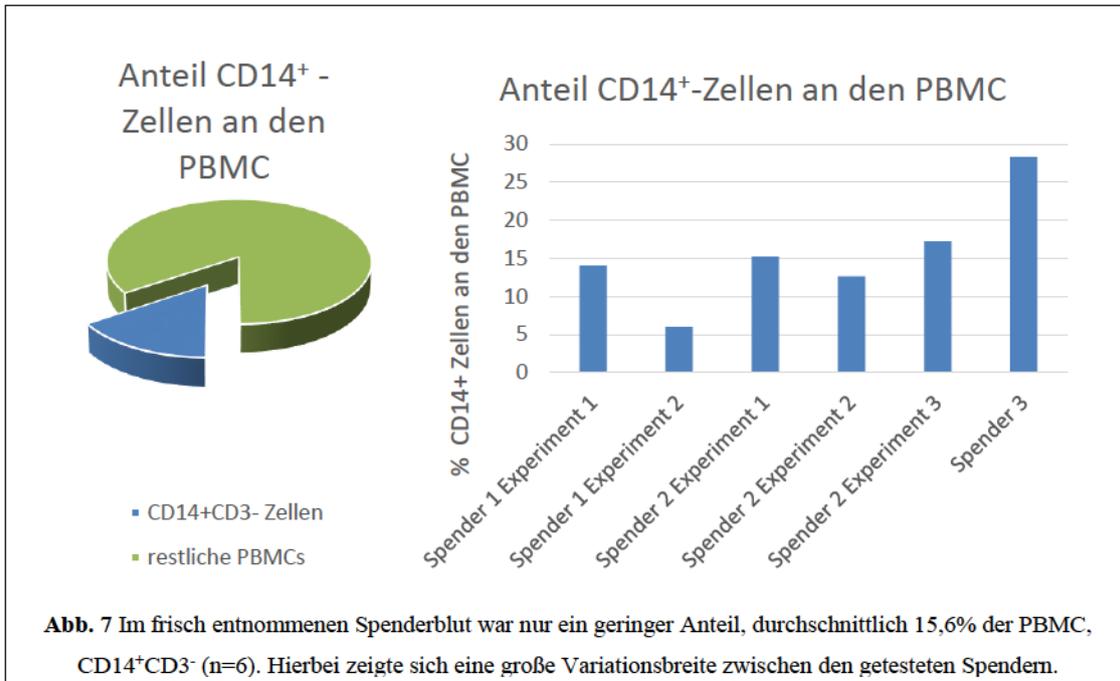
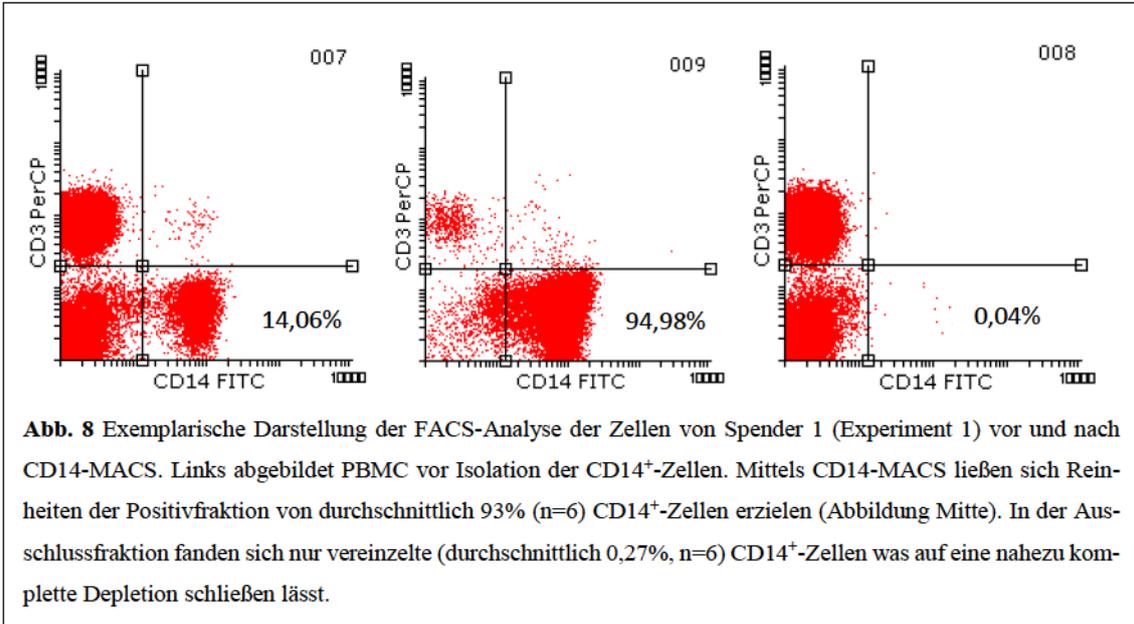


Abb. 6 Schematische Darstellung der Kultivierung von DC. Aus den aus Spenderblut mittels Ficollgradientenzentrifugation gewonnenen PBMC wurden anschließend mittels MACS $CD14^+$ -Monozyten gewonnen. Diese wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF an Tag 0 und Tag 3 stimuliert. Unter Zugabe von IL-6, IL-1 β , PGE-2 und TNF- α an Tag 6 reiften die Zellen zu reifen DC heran, die an Tag 7 für die folgenden Experimente geerntet wurden.

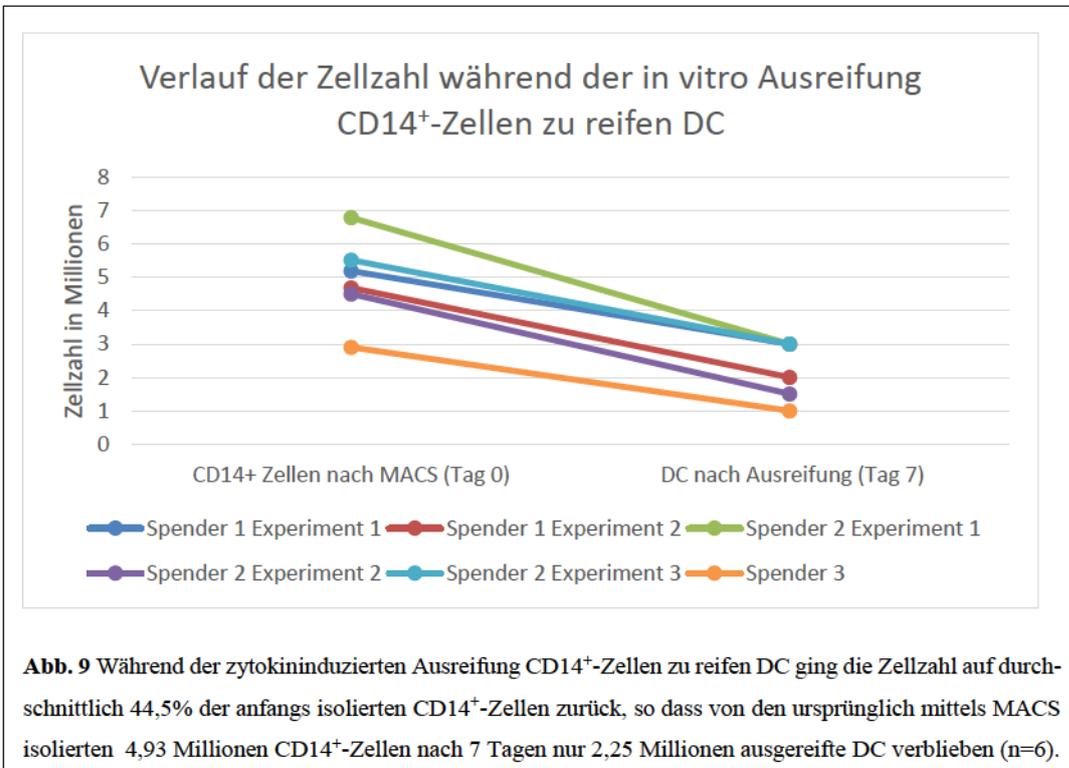
Im Blut der getesteten drei gesunden Spender (n=6) fanden sich stark unterschiedliche Anteile an CD14⁺-Zellen. Im Mittel fanden sich 15,57% ± 7,31% CD14⁺CD3⁻-Zellen innerhalb der isolierten PBMC bei einer Bandbreite der einzelnen Werte von 6,00% bis 28,29% (s. Abb. 7).



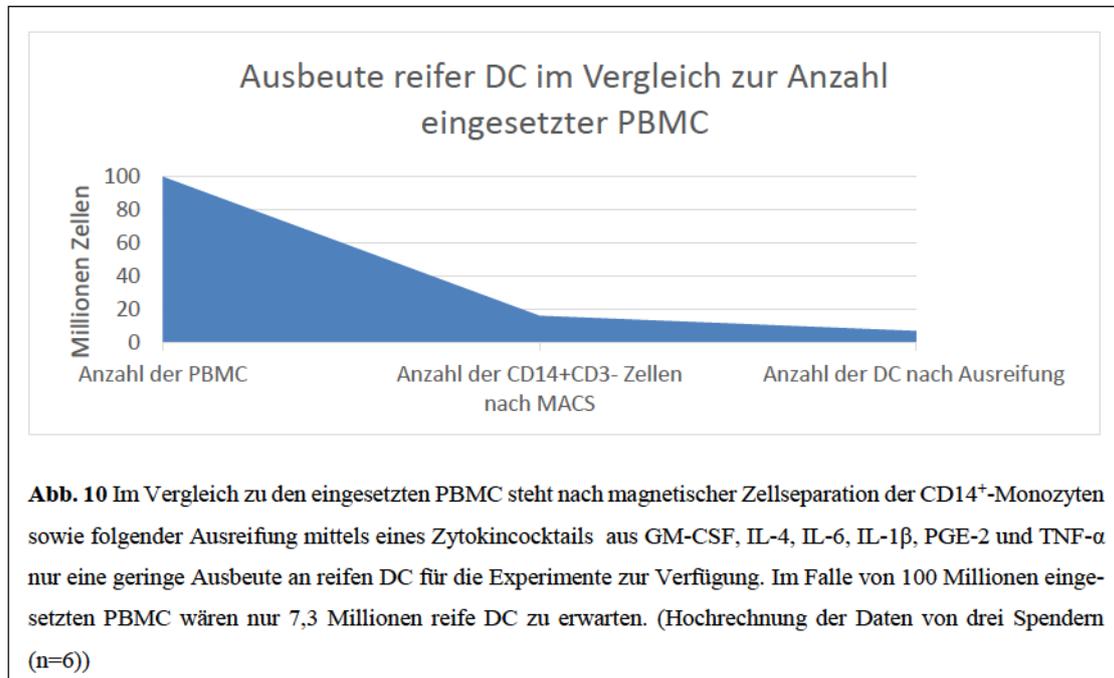
Um diese Zellen für die weiteren Experimente aus der PBMC-Menge zu isolieren wurde auch hier die magnetische Zellseparation angewandt. Dadurch konnten durchschnittlich aus $30 \cdot 10^6$ PBMC $4,93 \cdot 10^6 \pm 1,28 \cdot 10^6$ CD14⁺-Zellen gewonnen werden. Diese durch den Positiv-MACS gewonnene Zellfraktion wies eine durchschnittliche Reinheit von $93,34\% \pm 3,61\%$ hinsichtlich der CD14⁺-Zellen auf. Die Ausschussfraktion hingegen zeigte eine nahezu komplette Depletion der CD14⁺-Zellen; nur $0,29\% \pm 0,27\%$ der Zellen waren CD14⁺ und CD3⁻ (s. Abb. 8).



Während der Stimulations- und Ausreifungsphase der DC kam es zu einem Rückgang der Zellzahl der Kulturen, so dass an Tag 7 durchschnittlich nur noch 44,5% ±10,0%, also 2,25 ± 0,88 Millionen der ursprünglichen 4,93 ± 1,28 Millionen isolierter CD14⁺CD3⁻-Zellen für die folgenden Experimente zur Verfügung standen (n=6) (s. Abb. 9).



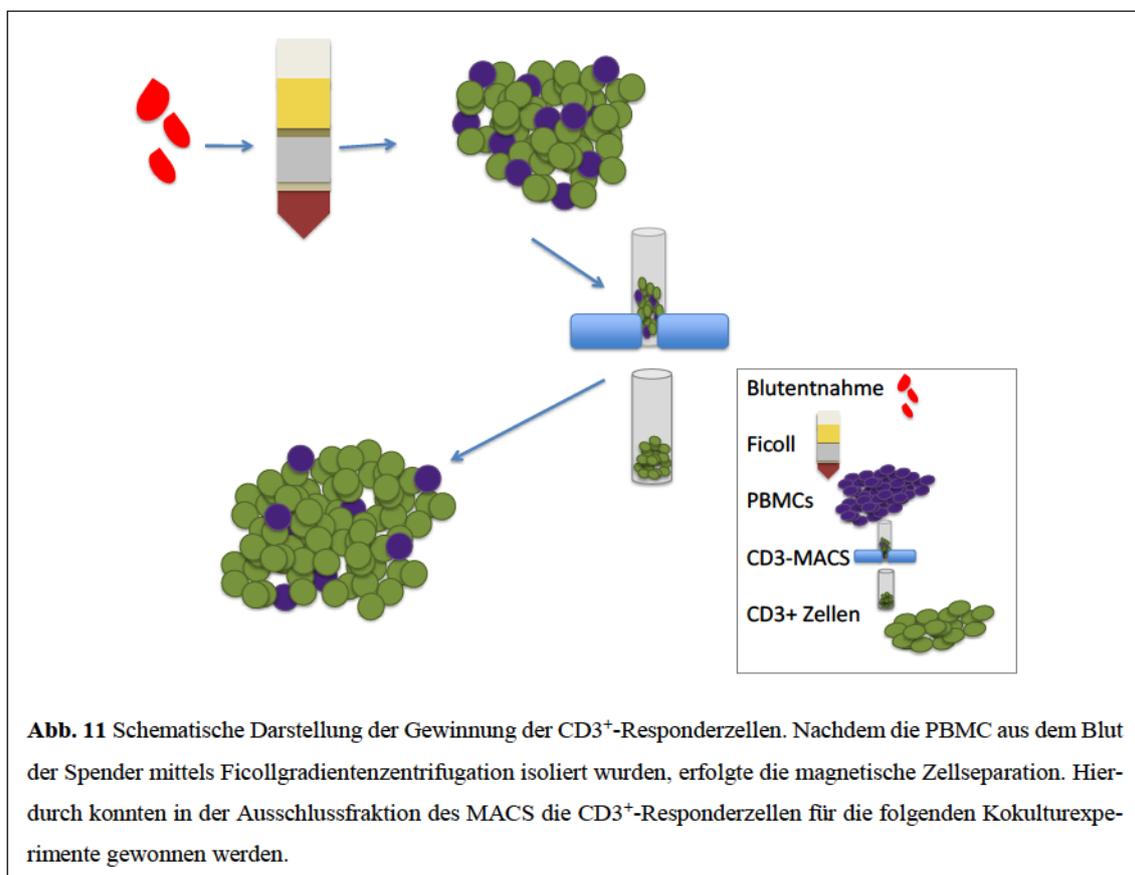
Zusammenfassend ergab sich, verglichen mit der Zahl der initial eingesetzten PBMC, nur eine geringe Ausbeute an reifen DC. Bei einem Einsatz von 100 Millionen PBMC läge die zu erwartende Zahl reifer DC bei ca. 7,3 Millionen Zellen (s. Abb 10).



Im Gegensatz zu $\gamma\delta$ -T-Zellen ist die Generierung einer ausreichenden Anzahl von einsetzbaren DC für Forschung und Therapieansätze somit wesentlich aufwendiger und ineffektiver.

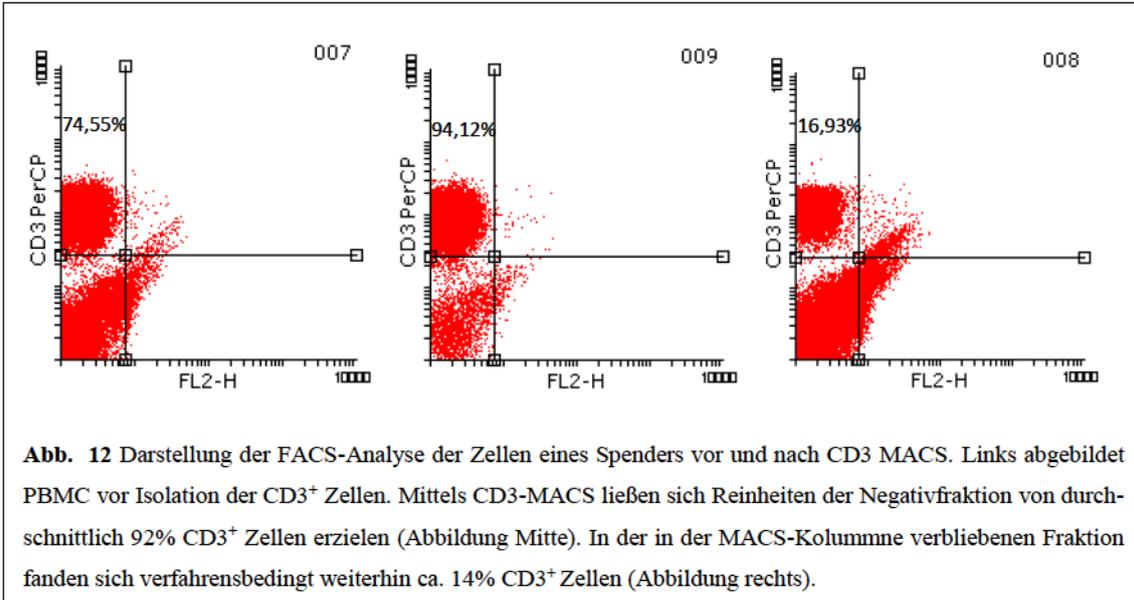
3.3 Gewinnung der CD3⁺-Responderzellen

Zur Evaluation der APC-Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie der Induktion regulatorischer T-Zellen durch $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden Koinkubationsexperimente von in vitro aktivierten $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie DC mit CD3⁺-Responderzellen durchgeführt. Um den Einfluss anderer antigenpräsentierender Zellen auszuschließen wurden die Responderzellen vor Beginn der Kokulturen aufgereinigt. Nach tagesgleicher Entnahme des Spenderblutes und Isolation der Lymphozyten mittels Ficollgradientenzentrifugation erfolgte hierzu eine magnetische Zellseparation zur Gewinnung der CD3⁺-Responderzellfraktion (s. Abb 11).



Innerhalb der von den drei Spendern (n=6) isolierten PBMC fanden sich durchschnittlich 72,46% \pm 7,02% CD3⁺-Zellen, wobei die einzelnen Werte zwischen 60,4% und 79,7% lagen.

Mittels des CD3-MACS konnte bei den drei Spendern in vier Versuchen eine Reinheit der CD3-Fraktion von durchschnittlich 91,92% \pm 3,86% erzielt werden (s. Abb. 12).



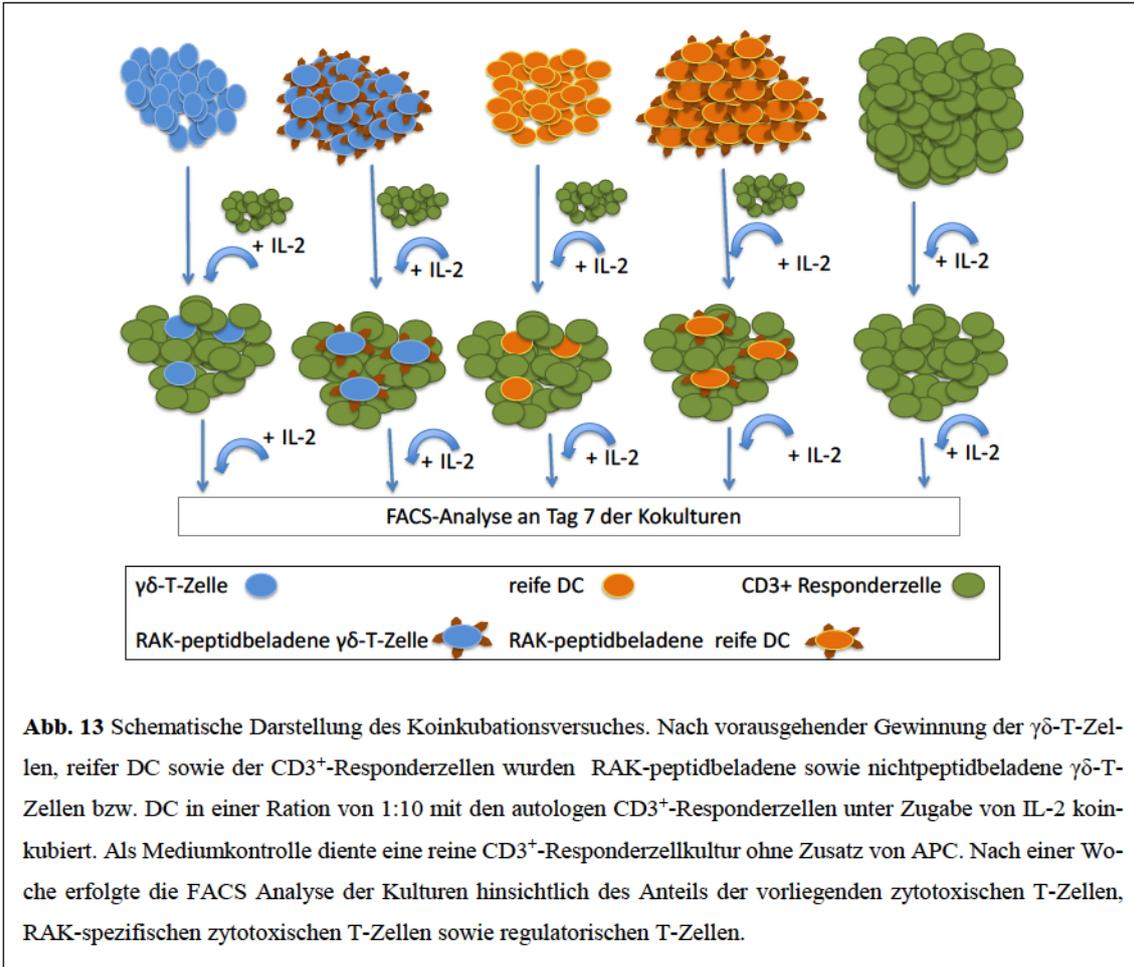
Da bei dieser Negativ-Separation die CD3⁺-Zellen die Ausschlussfraktion bilden und die anderen Zellen mit Hilfe eines Cocktails von CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 sowie Glycopherin A-Beads herausgefiltert wurden, blieben die CD3⁺-Zellen unberührt und somit unstimuliert (2). Sie eigneten sich somit als Responderzellen für die Koinkubationsversuche mit DC und $\gamma\delta$ -T-Zellen.

3.4 Induktion antigenspezifischer CTL durch peptidbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen

Ein therapeutischer Ansatz der Immuntherapie besteht in der *in vitro* Expansion zytotoxischer T-Zellen mit Spezifität für Tumor-assoziierte Antigene unter Zuhilfenahme kompetenter antigenpräsentierender Zellen. Aufgabe der APC ist dabei, die defizitären Fähigkeiten von Tumorzellen, T-Zellen antigenspezifisch zu stimulieren, zu umgehen. Entscheidend für den Erfolg eines solchen Therapieansatzes ist die Effektivität, mit welcher die APC antigenspezifische zytotoxische T-Zellen induzieren kann. DC haben dahingehend optimale Eigenschaften, jedoch wird aufgrund der beschriebenen technischen Schwierigkeiten ihrer *in vitro* Expansion nach Alternativen gesucht. Zur näheren Erforschung einer möglichen Funktion *in vitro* aktivierter $\gamma\delta$ -T-Zellen als APC haben wir zunächst in einem Virusmodell ihre Fähigkeiten zur Induktion peptidspezifischer zytotoxischer T-Zellen geprüft. Dazu wurden *in vitro* aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem Peptid RAK des BZLF1-Proteins, einem Peptid des lytischen Zyklus von EBV, beladen und mit einer

autologen CD3⁺T-Zell-Responderzellkultur koinkubiert. Aufgrund der HLA-Restriktivität der Peptidpräsentation wurden nur Spender mit dem zur Präsentation des EBV-Peptids RAK erforderlichen HLA-B08 Oberflächenmerkmal eingesetzt (20,153). Als Vergleichspopulation dienten DC. Zur Minimierung anderer Einflussfaktoren wurde für Effektor- sowie Responderzellen sowie die zugesetzten Medien ein autologer Kontext gewählt. Die Experimente wurden für drei Spender durchgeführt, wobei einer der Spender zweimalig getestet wurde (n=4).

Die zuvor mittels Zoledronsäure und IL-2 stimulierten und nach 9 Tagen per magnetischer Zellseparation isolierten $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden hierfür mit dem RAK-Peptid beladen und dann in einer Ratio von 1:10 mit den autologen CD3⁺-Responderzellen koinkubiert. Als Vergleichsgruppe dienten DC des jeweils selben Spenders, welche mittels Zugabe von GM-CSF und IL-4 zu CD14⁺-Monozyten an Tag 0 und Tag 3 generiert und mittels der Ausreifungszytokine IL6, IL-1 β , PGE-2 und TNF- α an Tag 6 in vitro ausgereift wurden. Die an Tag 7 geernteten, reifen DC wurden ebenfalls mit dem RAK-Peptid beladen und dann in einer Ratio von 1:10 mit autologen CD3⁺-Responderzellen koinkubiert. Eine Mediumkontrolle, bestehend aus einer reinen CD3⁺-Responderzellkultur ohne den Zusatz von APC, wurde ebenfalls angelegt (schematische Darstellung des Versuchsaufbaus in Abbildung 13). Die Kulturen wurden an Tag 0 in autologem, IL-2 haltigem Medium inkubiert, welches an Tag 3 einmalig gewechselt wurde. An Tag 7 wurden die Koinkubationen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD3, CD8 sowie einer für das RAK-Peptid spezifischen Pentamerfärbung gefärbt und mittels FACS-Analyse hinsichtlich ihres Anteils an zytotoxischen T-Zellen bzw. RAK-spezifischen zytotoxischen T-Zellen untersucht. Parallel erfolgte eine FACS basierte Bestimmung der in der gleichen Kultur befindlichen regulatorischen T-Zellen.

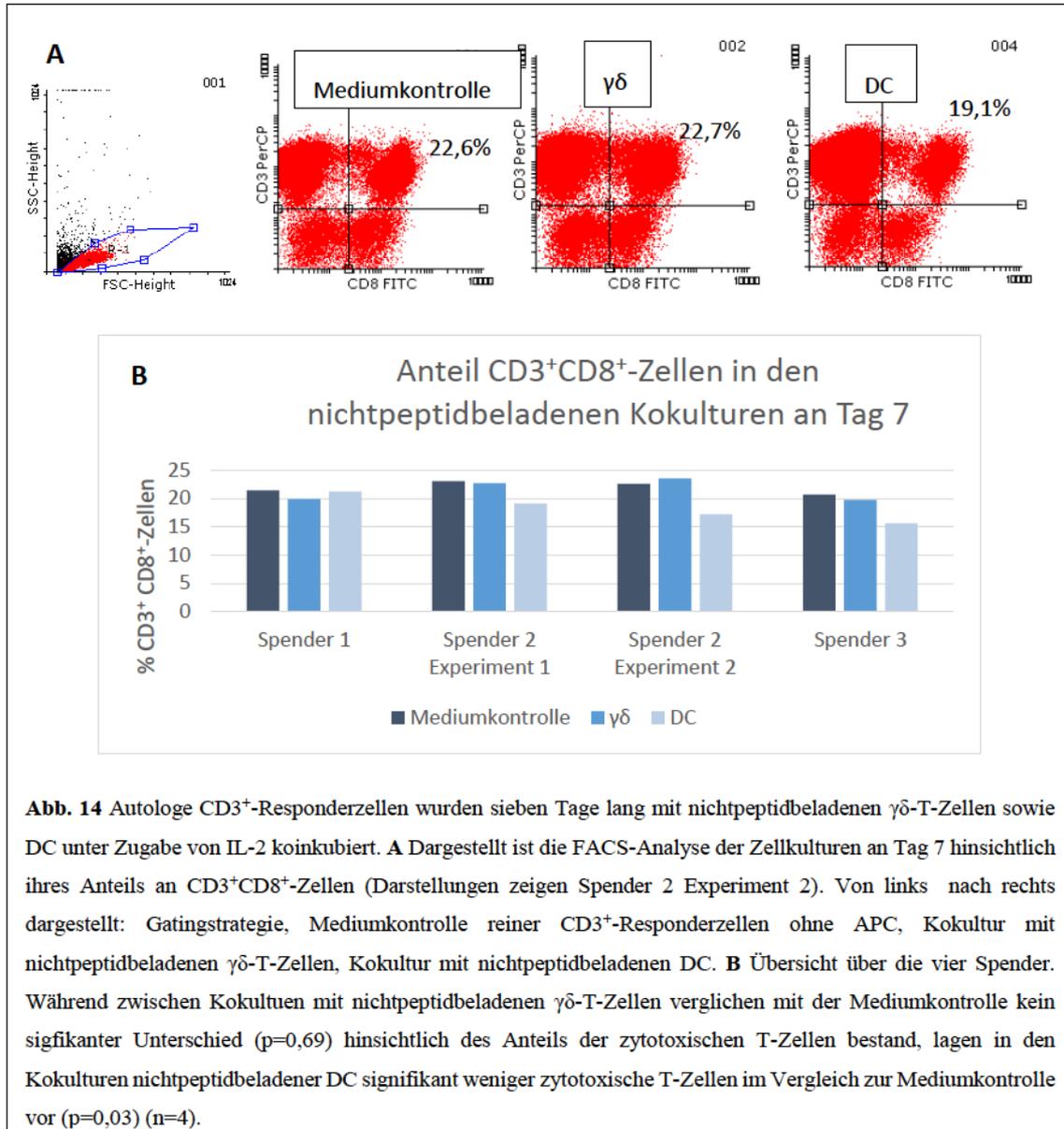


Durch die RAK-Peptidbeladung der $\gamma\delta$ -T-Zellen bzw. DC wurden in den Kokulturen RAK-spezifische $CD8^+$ -Killerzellen spezifisch aktiviert. Durch peptidspezifische Expansion kam es zu einem Anstieg der RAK-spezifischen $CD8^+$ -Zellen.

In der reinen $CD3^+$ -Kultur als Mediumkontrolle lag der durchschnittliche Anteil der $CD3^+$ $CD8^+$ -Zellen an den lebenden Zellen an Tag 7 der Koinkubation bei den drei Spendern bei $21,94\% \pm 1,09\%$. Auch bei Koinkubation mit $\gamma\delta$ -T-Zellen ($21,47\% \pm 1,93\%$) und DC ($18,28\% \pm 2,43\%$) fanden sich ohne Peptidbeladung etwa gleiche Anteile $CD3^+$ $CD8^+$ -Zellen, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Kokulturen der $\gamma\delta$ -T-Zellen und der Mediumkontrolle ($p=0,69$) sowie zwischen den Kokulturen der $\gamma\delta$ -T-Zellen und den Kokulturen der DC ($p=0,09$) finden ließ.

Im Gegensatz dazu wiesen die Kokulturen mit DC im Vergleich zur Mediumkontrolle der reinen $CD3^+$ -Responderzellkulturen im Durchschnitt signifikant weniger zytotoxi-

sche T-Zellen auf ($p=0,03$). Ein Erklärungsansatz ist der höhere Gehalt an regulatorischen T-Zellen in diesen Kulturen und deren immunsuppressive Wirkung auf $CD8^+$ -T-Zellen (s. Abb 14 und 16).



Nach RAK-Peptidbeladung stieg der Anteil der zytotoxischen $CD3^+CD8^+$ -Zellen an. In Kokulturen mit RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen wiesen sie durchschnittlich einen Anteil von $60,26\% \pm 11,53\%$ auf und unterschieden sich somit signifikant ($p<0,01$) von der Mediumkontrolle der reinen $CD3^+$ -Responderzellen ($n=4$). Auch in den Kokulturen der RAK-peptidbeladenen DC zeigte sich im Vergleich zur Mediumkontrolle ein signifikanter Anstieg der $CD3^+CD8^+$ -Zellen ($p<0,01$) auf $67,70\% \pm 8,19\%$ ($n=4$). Vergleicht man

den Anteil der CD3⁺CD8⁺-Zellen in den beiden peptidbeladenen Kokulturen von $\gamma\delta$ -T-Zellen bzw. DC hingegen, ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p=0,33$, $n=4$) (s. Abb. 15 und 16).

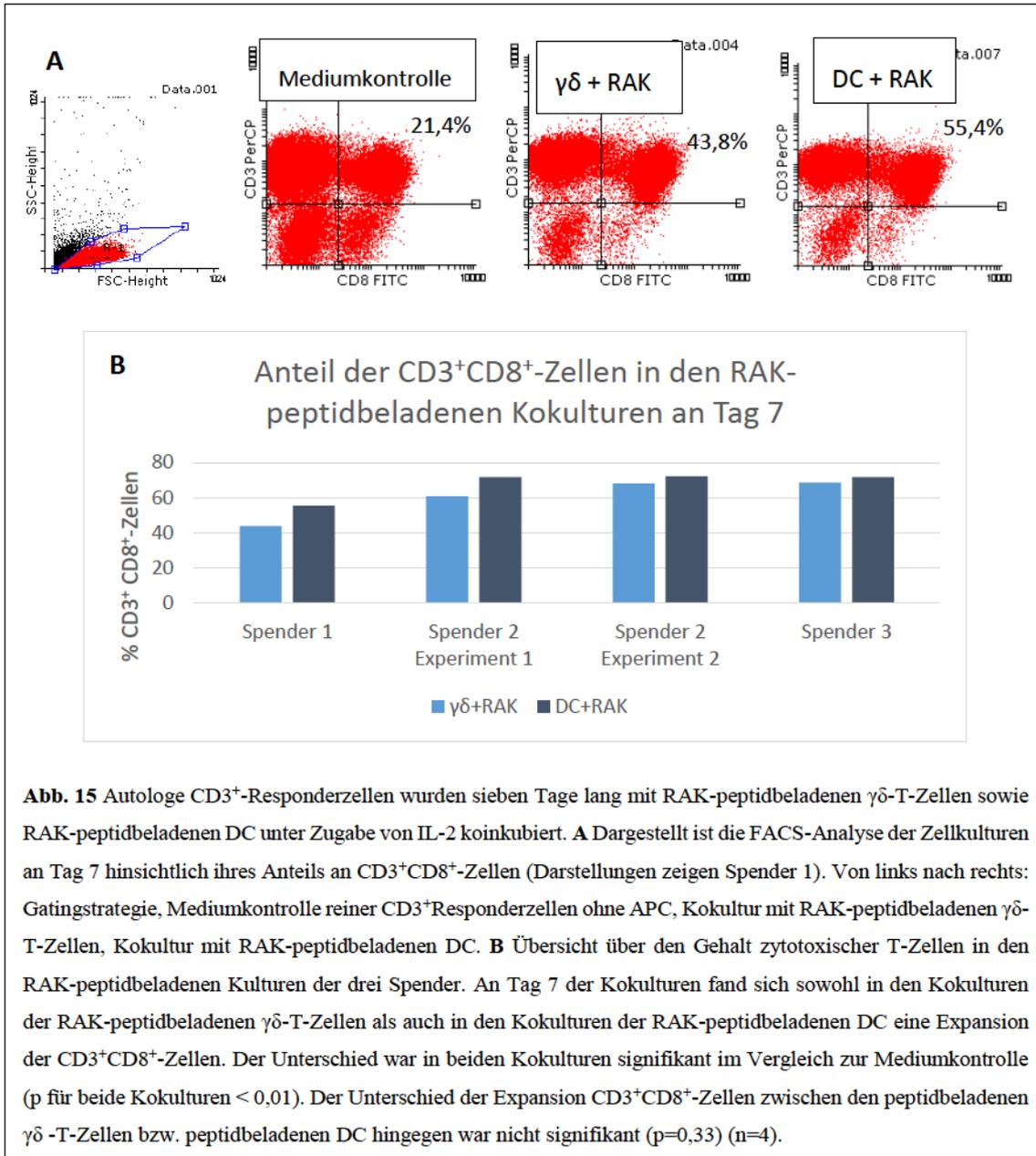


Abb. 15 Autologe CD3⁺-Responderzellen wurden sieben Tage lang mit RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie RAK-peptidbeladenen DC unter Zugabe von IL-2 koinkubiert. **A** Dargestellt ist die FACS-Analyse der Zellkulturen an Tag 7 hinsichtlich ihres Anteils an CD3⁺CD8⁺-Zellen (Darstellungen zeigen Spender 1). Von links nach rechts: Gatingstrategie, Mediumkontrolle reiner CD3⁺Responderzellen ohne APC, Kokultur mit RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen, Kokultur mit RAK-peptidbeladenen DC. **B** Übersicht über den Gehalt zytotoxischer T-Zellen in den RAK-peptidbeladenen Kulturen der drei Spender. An Tag 7 der Kokulturen fand sich sowohl in den Kokulturen der RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch in den Kokulturen der RAK-peptidbeladenen DC eine Expansion der CD3⁺CD8⁺-Zellen. Der Unterschied war in beiden Kokulturen signifikant im Vergleich zur Mediumkontrolle (p für beide Kokulturen $< 0,01$). Der Unterschied der Expansion CD3⁺CD8⁺-Zellen zwischen den peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen bzw. peptidbeladenen DC hingegen war nicht signifikant ($p=0,33$) ($n=4$).

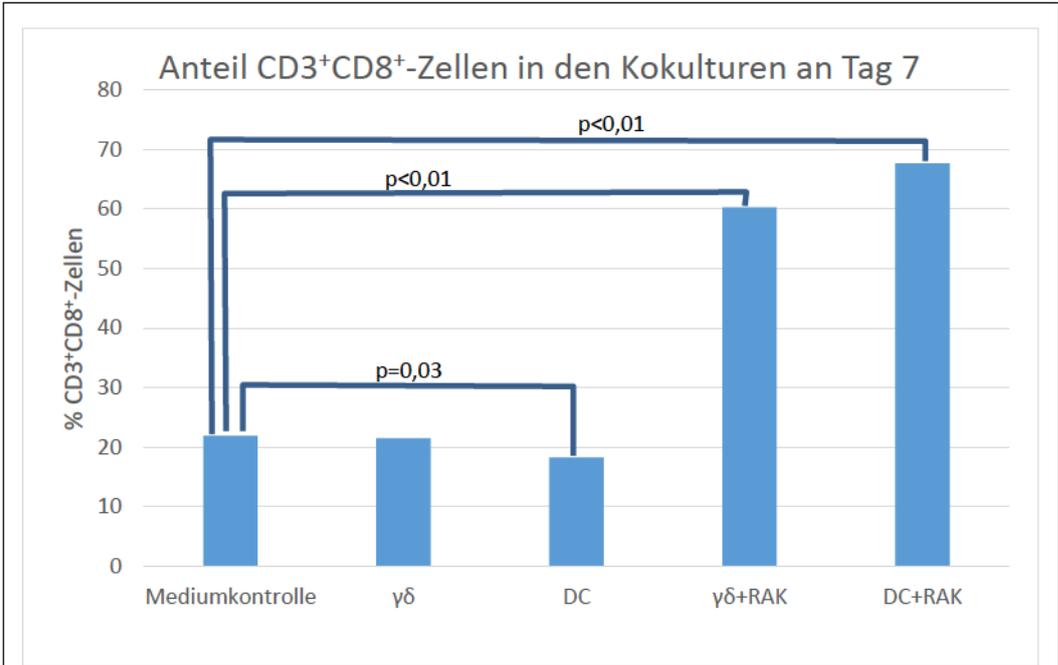


Abb. 16 Autologe CD3⁺-Responderzellen wurden sieben Tage lang mit RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen DC unter Zugabe von IL-2 koinkubiert. An Tag 7 der Koinkubation zeigte sich eine signifikante Expansion der zytotoxischen T-Zellen in den RAK-peptidbeladenen Kokulturen im Vergleich zur Mediumkontrolle ($p < 0,01$ für $\gamma\delta$ +RAK sowie DC+RAK). Dahingegen zeigte sich ein signifikanter Rückgang der CD3⁺CD8⁺-Zellen in der Kokultur der nichtpeptidbeladenen DC im Vergleich zur Mediumkontrolle ($p=0,03$).

Eine ergänzend durchgeführte Pentamerfärbung erlaubt eine weitere Differenzierung durch die selektive Detektion der T-Zellen, welche einen peptidspezifischen T-Zell-Rezeptor exprimieren. Bei der hier durchgeführten RAK-Pentamerfärbung verdeutlichte sich, dass die Expansion der CD3⁺CD8⁺-Zellen vor allem auf die der RAK-spezifischen CD8⁺-T-Zellen zurückzuführen war: Der Anteil der mittels Pentamerfärbung erfassten CD8⁺-RAK-spezifischen T-Zellen lag in den RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zell-Kokulturen bei den drei Spendern durchschnittlich bei $43,64\% \pm 13,07\%$ ($n=4$); bei Kokulturen mit RAK-beladenen DC respektive bei $52,87\% \pm 13,22\%$ ($n=4$). Ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Induktion RAK-spezifischer CD8⁺-Zellen bestand zwischen diesen beiden Gruppen nicht ($p=0,36$) (s. Abb. 17 und 18).

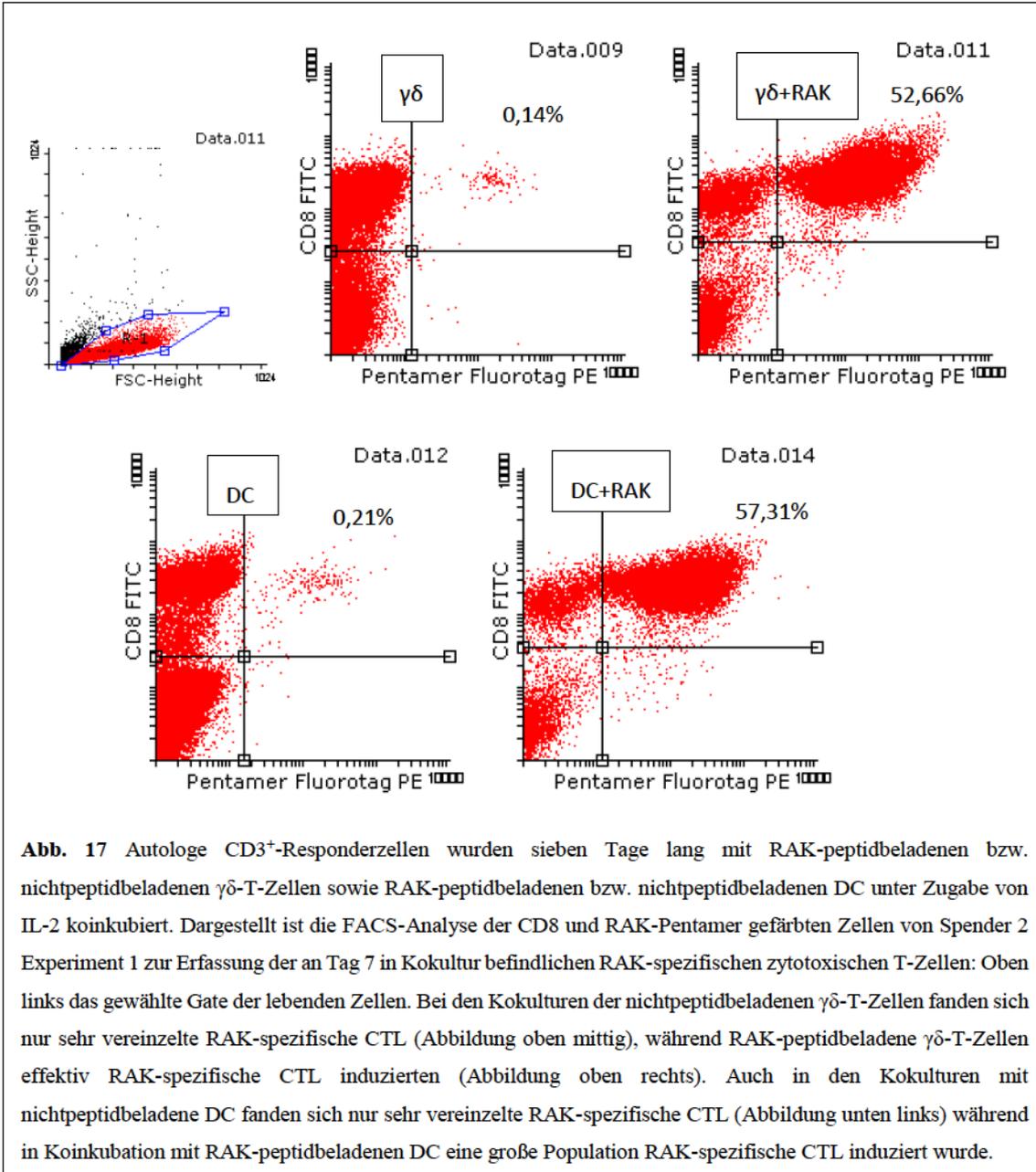
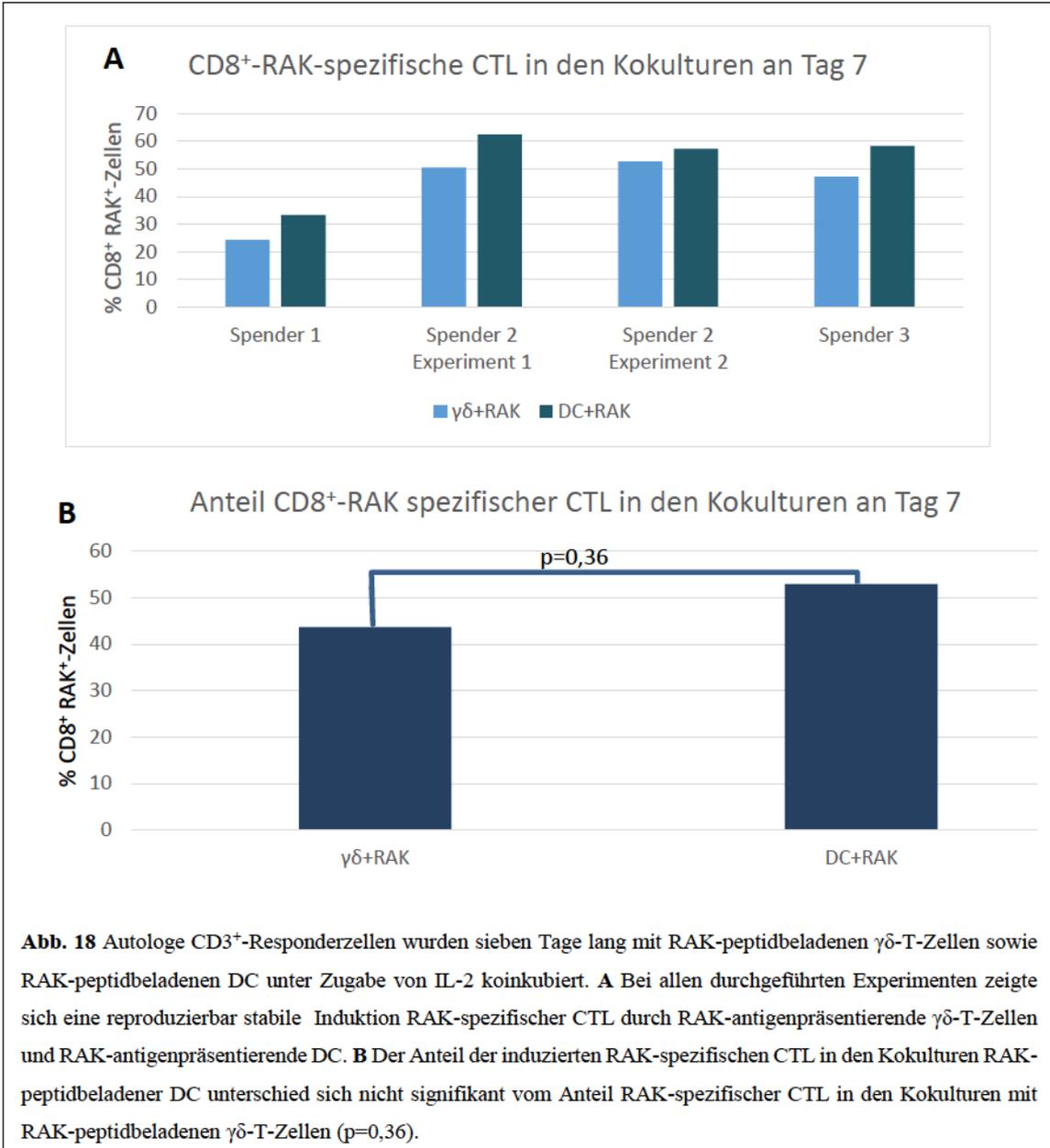


Abb. 17 Autologe CD3⁺-Responderzellen wurden sieben Tage lang mit RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen DC unter Zugabe von IL-2 koinkubiert. Dargestellt ist die FACS-Analyse der CD8 und RAK-Pentamer gefärbten Zellen von Spender 2 Experiment 1 zur Erfassung der an Tag 7 in Kokultur befindlichen RAK-spezifischen zytotoxischen T-Zellen: Oben links das gewählte Gate der lebenden Zellen. Bei den Kokulturen der nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen fanden sich nur sehr vereinzelte RAK-spezifische CTL (Abbildung oben mittig), während RAK-peptidbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen effektiv RAK-spezifische CTL induzierten (Abbildung oben rechts). Auch in den Kokulturen mit nichtpeptidbeladene DC fanden sich nur sehr vereinzelte RAK-spezifische CTL (Abbildung unten links) während in Koinkubation mit RAK-peptidbeladenen DC eine große Population RAK-spezifische CTL induziert wurde.



Ohne RAK-Peptidbeladung hingegen fanden sich bei den drei Spendern nach sieben Tagen in den reinen CD3⁺-Responderzellkulturen erwartungsgemäß keine nennenswerten Anteile CD8⁺ RAK-spezifischer Zellen. Durchschnittlich nur 0,45% ± 0,63% der Zellen waren CD8⁺- und RAK-spezifisch. Auch in den Kokulturen mit γδ-T-Zelle (0,42% ± 0,54%) bzw. DC (0,43% ± 0,37%) fand keine Induktion RAK-spezifischer CTLs statt.

Eine Peptidbeladung der APC führte also sowohl bei γδ-T-Zellen als auch bei DC zur Expansion zytotoxischer T-Zellen, wobei vorwiegend antigenspezifische zytotoxische T-

Zellen stimuliert wurden. Betrachtet man den Anteil antigenspezifischer T-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der in Kokultur befindlichen zytotoxischen T-Zellen ergibt sich folgendes Bild: Durchschnittlich $70,87\% \pm 11,94\%$ der durch RAK-beladene $\gamma\delta$ -T-Zellen stimulierten $CD8^+$ -Zellen zeigten sich in der Pentamerfärbung spezifisch für dieses Antigen. Nur wenig effektiver waren diesbezüglich RAK-beladene DC in deren Kulturen $76,75\% \pm 11,50\%$ der $CD8^+$ -Zellen eine Spezifität für das RAK-Antigen zeigten. Statistisch ist dieser Unterschied nicht signifikant ($p=0,50$).

Sowohl peptidbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch DC stellen in diesem Modell somit effektive APC dar, welche in der Lage sind, eine Proliferation RAK-spezifischer $CD8^+$ -T-Zellen zu induzieren.

3.5 Weder RAK-peptidbeladene noch unbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen sind in der Lage, die Immunantwort des Körpers durch ihre suppressiven Eigenschaften zu dämpfen. Von Natur aus als negativer Rückkoppelungsmechanismus zur Prävention einer überschießenden Immunantwort angelegt, würde eine Stimulation von regulatorischen T-Zellen im Rahmen der Immuntherapie von Krebs- oder Infektionskrankheiten daher gleichzeitig einen Verlust der Therapieeffektivität durch die daraus resultierende Immunsuppression bedeuten.

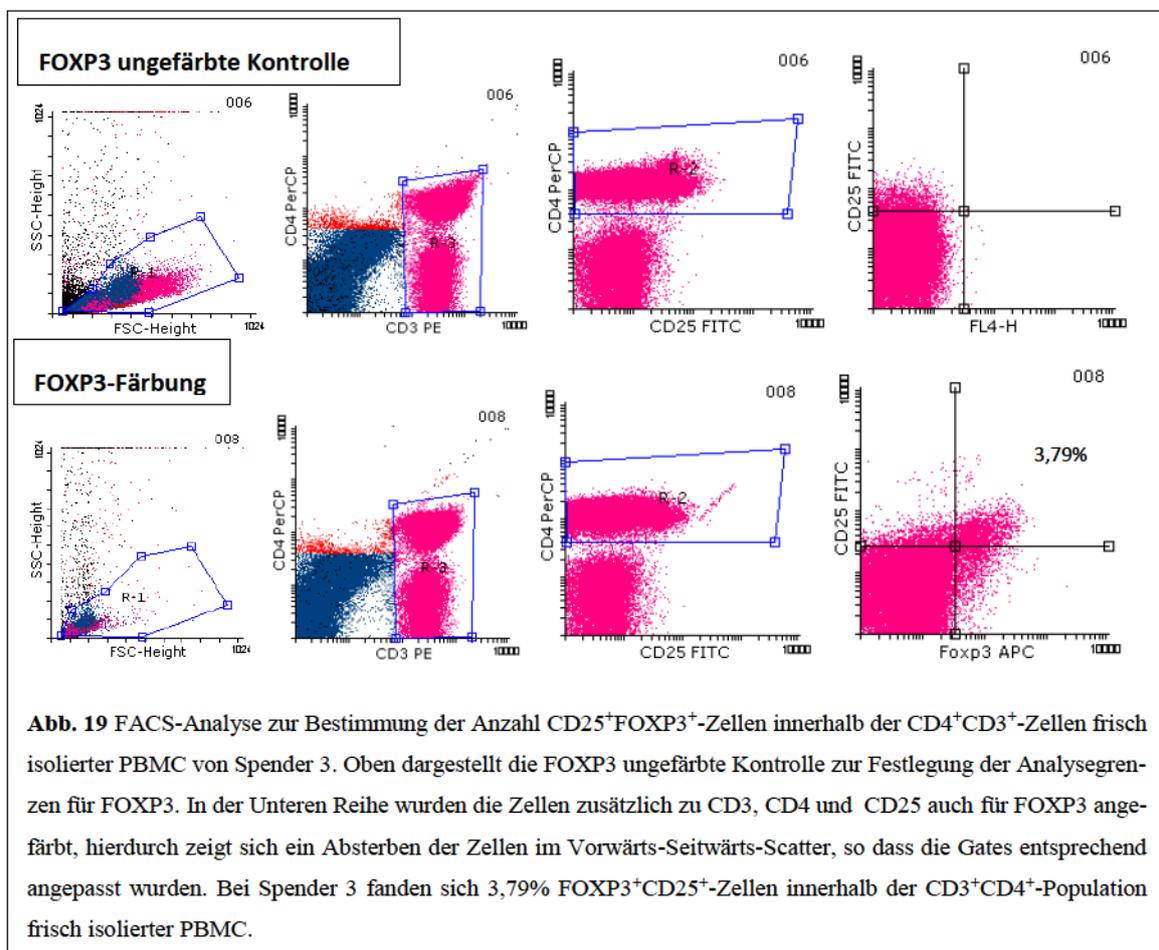
Zur Evaluierung der Beeinflussung regulatorischer T-Zellen im Rahmen einer Antigenpräsentation wurden die beschriebenen Koinkubationsversuche autologer $CD3^+$ -Responderzellen mit antigenpräsentierenden Zellen daher auch bezüglich der Induktion regulatorischer T-Zellen durch RAK-peptidbeladene und unbeladene aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen bzw. reife DC getestet.

Zur Bestimmung des Grundgehaltes an $FOXP3^+$ -Zellen erfolgte eine entsprechende Färbung und Analyse aus den PBMC vor Durchführung des CD3-MACS.

An Tag 7 wurden die Zellen der Koinkubationen mit monoklonalen Antikörpern gegen $CD3$, $CD4$, $CD25$ sowie den intrazellulären Transkriptionsfaktor $FOXP3$ gefärbt und mit-

tels FACS-Analyse der Anteil $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ regulatorischer T-Zellen quantifiziert. Parallel erfolgte die FACS-basierte Quantifizierung der in der gleichen Kultur befindlichen RAK-spezifischen zytotoxischen T-Zellen.

Zur Bestimmung des Gehaltes an regulatorischen T-Zellen wurde bei der FACS-Analyse der Gehalt der $CD25^+FOXP3^+$ -Zellen innerhalb der Population der $CD4^+$ -Zellen erfasst. Zur Festlegung der Gates dienten mitgeführte FOXP3 ungefärbte Kontrollen der einzelnen Kulturen. Aufgrund der intrazellulären FOXP3-Färbung mit Permeabilisationspuffer zeigte sich eine Verschiebung der Zellen im Vorwärts-Seitwärts-Scatter, so dass die Gates für die jeweilige Population sowie zwischen FOXP3 ungefärbter Kontrolle und FOXP3-Färbung angepasst wurden (s. Abb. 19).



Direkt nach Isolierung der PBMC aus dem Blut der drei HLA-B08 positiven Spender zeigte sich bei diesen durchschnittlich ein Gehalt von $2,38\% \pm 1,10$ $CD25^+FOXP3^+$ -Zel-

len innerhalb der Fraktion CD4⁺- und CD3⁺-Zellen. Schwankungen waren sowohl interindividuell mit Werten von 1,28% bis 3,79% der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺-Population als auch intraindividuell von 1,28% bis 2,65% der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD3⁺CD4⁺-Population bei der zweifachen Testung eines Spenders (s. Tabelle 1 und Abbildung 20).

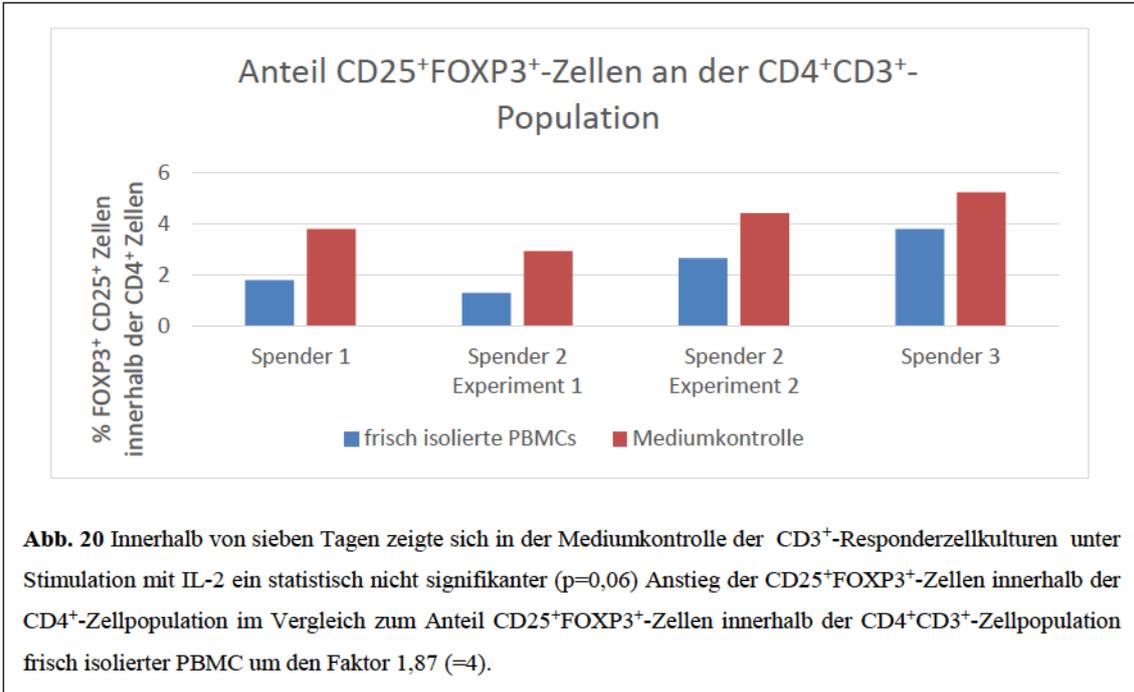
Nach einwöchiger Inkubationszeit der Kokulturen zeigte sich in der Mediumkontrolle reiner CD3⁺-Responderzellen bei den drei Spendern in vier Versuchen ein durchschnittlicher Anteil von 4,09% ± 0,97% der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an den CD4⁺-Zellen (s. Tabelle 1 und Abbildung 20).

Tabelle 1: Anteil CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺CD3⁺-Population von PBMC

	Spender 1	Spender 2 Experiment 1	Spender 2 Experiment 2	Spender 3	μ	σ
Anteil CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an den CD4⁺CD3⁺-Zellen frisch isolierter PBMC an Tag 0	1,78%	1,28%	2,65%	3,79%	2,38%	1,10%
Anteil CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an den CD4⁺-Zellen der Mediumkontrolle der CD3⁺-Responderzellkultur nach 7 d	3,79%	2,93%	4,42%	5,23%	4,09%	0,97%

Der Anteil CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺CD3⁺-Population von frisch isolierten PBMC dreier HLA-B08 positiver Spender sowie nach einwöchiger Inkubationszeit innerhalb der CD4⁺-Zellen der Mediumkontrolle reiner CD3⁺-Responderzellen. Es zeigten sich intra- sowie interindividuelle Schwankungen. Die Expansionsrate der regulatorischen T-Zellen innerhalb der 7 Tage ist statistisch nicht signifikant (p=0,06, n=4).

μ= Mittelwert, σ= Standardabweichung



Verglichen mit dem Anteil CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an den CD4⁺CD3⁺-Zellen frisch isolierter PBMC ergab sich somit innerhalb der sieben Tage unter der Stimulation mit IL-2 eine statistisch jedoch nicht signifikante (p=0,06) Zunahme dieser Zellen in der Mediumkontrolle der CD3⁺-Responderzellen (s. Abb. 20). Durchschnittlich steigerte sich der Gehalt CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an den CD4⁺-Zellen in diesem Zeitraum bei den drei Spendern um den Faktor $1,87 \pm 0,42$.

In den Kokulturen von CD3⁺-Responderzellen mit nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen lag der Gehalt der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation nach sieben Tagen bei den drei Spendern bei durchschnittlich $5,30\% \pm 1,65\%$. Es zeigten sich interindividuelle Unterschiede mit Werten von 3,05% bis 6,79% sowie leichte intraindividuelle Unterschiede bei dem doppelt getesteten Spender mit Werten von 5,11% und 6,79% (s. Tabelle 2 und Abb. 21+22). Ein signifikanter Unterschied des Anteils der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺-Zellpopulation der Kokulturen von CD3⁺-Responderzellen mit nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle der CD3⁺-Responderzellkultur fand sich nicht. (p=0,26) (s. Tabelle 3 und Abb. 21+22).

In den Kokulturen von CD3⁺-Responderzellen mit RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen lag der Gehalt der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation nach sieben Tagen bei den drei Spendern bei durchschnittlich $4,62\% \pm 1,49\%$ (2,81% bis 6,36%), bei

leichten intraindividuellen Unterschieden bei dem doppelt getesteten Spender mit Werten von 5,07% und 6,36% (s. Tabelle 2 und Abb. 21+22). Auch hier fand sich kein signifikanter Unterschied der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation der Kokulturen mit RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle der CD3⁺-Responderzellkultur ($p=0,57$) (s. Tabelle 3 und Abb. 21+22).

Demgegenüber fand sich in den Kokulturen von CD3⁺-Responderzellen mit nichtpeptidbeladenen DC ein Anteil von durchschnittlich $13,31\% \pm 6,04\%$ an CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation der drei Spender nach sieben Tagen. Die Induktion regulatorischer T-Zellen wies hierbei eine deutliche interindividuelle Variationsbreite auf. Zwar zeigte sich eine stabile Induktion regulatorischer T-Zellen in allen Kokulturen, es ergab sich jedoch zwischen den Spendern eine Bandbreite der Werte von 9,49% bis 22,3%. Diese spiegelte sich nicht nur inter- sondern auch intraindividuell wider, so zeigte sich bei dem doppelt getesteten Spender ein Anteil der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺-Zellpopulation von 11,32% und 22,30% (s. Tabelle 2 und Abb. 21+22). Die Induktion von CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation der Kokulturen von CD3⁺-Responderzellen mit nichtpeptidbeladenen DC zeigte sich statistisch signifikant im Vergleich zur Mediumkontrolle der CD3⁺-Responderzellkultur. ($p=0,02$) (s. Tabelle 3 und Abb. 21+22).

Nach Peptidbeladung der DC zeigte sich hingegen keine signifikante Induktion CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation verglichen zur Mediumkontrolle der CD3⁺-Responderzellen ($p=0,69$) (s. Tabelle 3 und Abb. 21+22). In den Kokulturen von CD3⁺-Responderzellen mit RAK-peptidbeladenen DC lag der Gehalt der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺-Zellpopulation nach sieben Tagen bei den drei Spendern bei durchschnittlich $3,82\% \pm 0,82\%$. Interindividuelle Unterschiede mit Werten von 3,22% bis 5,04% waren ebenso zu verzeichnen wie intraindividuelle Unterschiede bei dem doppelt getesteten Spender mit Werten von 3,53% und 5,04% (s. Tabelle 2 und Abb. 21+22).

Vergleicht man die Induktion der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der Population der CD4⁺-Zellen in den Koinkubationen mit den nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen mit denen in den Koinkubationen mit den nichtpeptidbeladenen DC, so findet sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied ($p=0,04$). Auch gegenüber den anderen Koinkubationen ergaben

sich signifikante Unterschiede im Vergleich mit nichtpeptidbeladenen DC (s. Tabelle 3). Kein signifikanter Unterschied bestand hingegen bezüglich der Induktion der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der Population der CD4⁺-Zellen für die Koinkubationen der RAK-peptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen mit denen der RAK-peptidbeladenen DC ($p=0,38$) (s. Tabelle 3 und Abb. 21+22)

Tabelle 2: Anteil CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺-Population in den verschiedenen Kokulturen

	Spender 1	Spender 2 Experiment 1	Spender 2 Experiment 2	Spender 3	μ	σ
Mediumkontrolle	3,79%	2,93%	4,42%	5,23%	4,09%	0,97%
$\gamma\delta$	3,05%	5,11%	6,23%	6,79%	5,30%	1,65%
$\gamma\delta$+RAK	2,81%	5,07%	6,36%	4,25%	4,62%	1,49%
DC	9,49%	11,32%	22,3%	10,13%	13,31%	6,04%
DC+RAK	3,22%	3,53%	5,04%	3,50%	3,82%	0,82%

Autologe CD3⁺-Responderzellen wurden sieben Tage lang mit RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen DC unter Zugabe von IL-2 koinkubiert. Die Tabelle gibt den nach dieser Koinkubationszeit gemessenen Anteil der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺-Zellpopulation der Koinkubationen wieder. Lediglich nichtpeptidbeladene DC zeigen eine signifikante Induktion regulatorischer T-Zellen ($p=0,02$) im Vergleich zur Mediumkontrolle reiner CD3⁺-Responderzellen. μ =Mittelwert, σ = Standardabweichung, (n=4)

Tabelle 3: Signifikanz der Induktion CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺-Zellen in den Kokulturen

	Mediumkontrolle	$\gamma\delta$	$\gamma\delta$ +RAK	DC	DC+RAK
Mediumkontrolle	x	$p=0,26$	$p=0,57$	$p=0,02$	$p=0,69$
$\gamma\delta$	$p=0,26$	x	$p=0,57$	$p=0,04$	$p=0,16$
$\gamma\delta$ +RAK	$p=0,57$	$p=0,57$	x	$p=0,03$	$p=0,38$
DC	$p=0,02$	$p=0,04$	$p=0,03$	x	$p=0,02$
DC+RAK	$p=0,69$	$p=0,16$	$p=0,38$	$p=0,02$	x

Autologe CD3⁺-Responderzellen wurden sieben Tage lang mit RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen DC unter Zugabe von IL-2 koinkubiert. Die Tabelle bietet eine Übersicht über die Signifikanz vergleicht man die verschiedenen Kokulturen untereinander bezüglich der Induktion von CD25⁺FOXP3⁺-Zellen innerhalb der Population der CD4⁺-Zellen. Ein signifikanter Unterschied fand sich in den Kokulturen mit nichtpeptidbeladenen DC im Vergleich mit allen übrigen. (n=4)

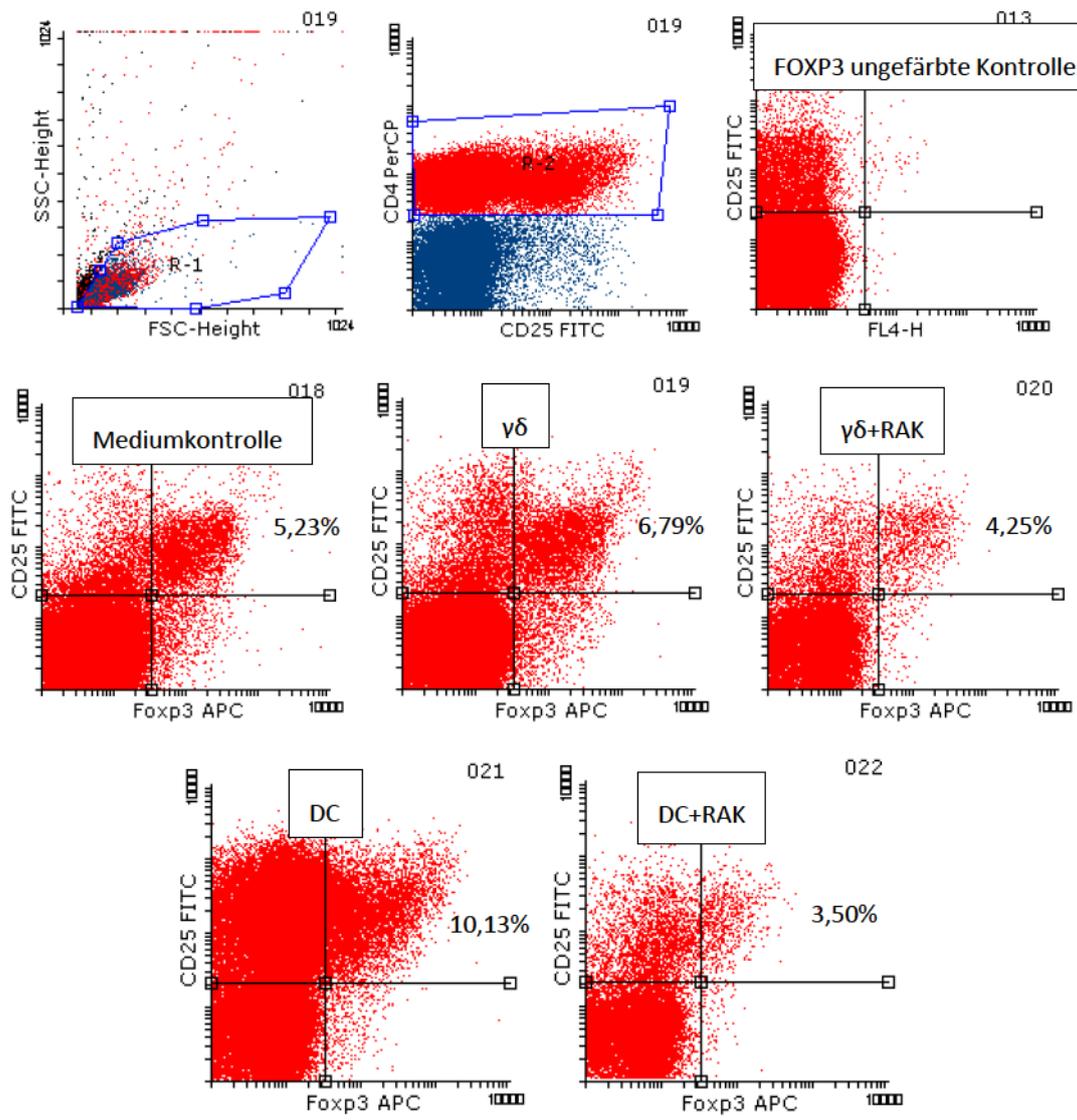
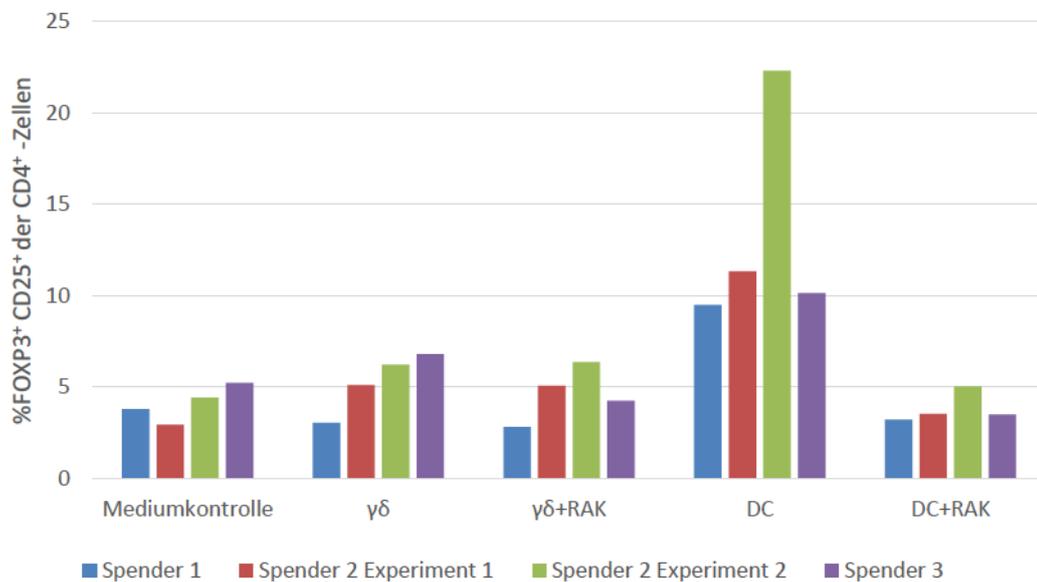


Abb. 21 Autologe CD3⁺-Responderzellen wurden sieben Tage lang mit RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen DC unter Zugabe von IL-2 koinkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde nach anschließender FOXP3-Färbung der Anteil der FOXP3⁺CD25⁺-Zellen innerhalb des Gates der CD4⁺-Zellen der Kokulturen bestimmt. Abgebildet sind die FACS-Analysen des Spenders 3. Oben links: Darstellung des Gate R1 nach erfolgter FOXP3-Färbung. Oben mittig: Gate der CD4⁺-Zellen (R2). Oben rechts: Darstellung der FOXP3-ungefärbten Kontrolle zur Festlegung der Grenzen für FOXP3. Darstellung der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an den CD4⁺-Zellen (Gate R1+R2) in der Mediumkontrolle der CD3⁺-Responderzellen (Mitte links), in den Kokulturen mit nichtpeptidbeladenen (Mitte mittig) sowie RAK-peptidbeladenen (Mitte rechts) $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie in den Kokulturen mit nichtpeptidbeladenen (unten links) und RAK-peptidbeladenen (unten rechts) DC. Eine signifikante Induktion regulatorischer T-Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle findet sich nur in den Kokulturen mit nichtpeptidbeladenen DC ($p=0,02$).

A Anteil CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺-Population



B Mittelwert der Anteile CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺-Population

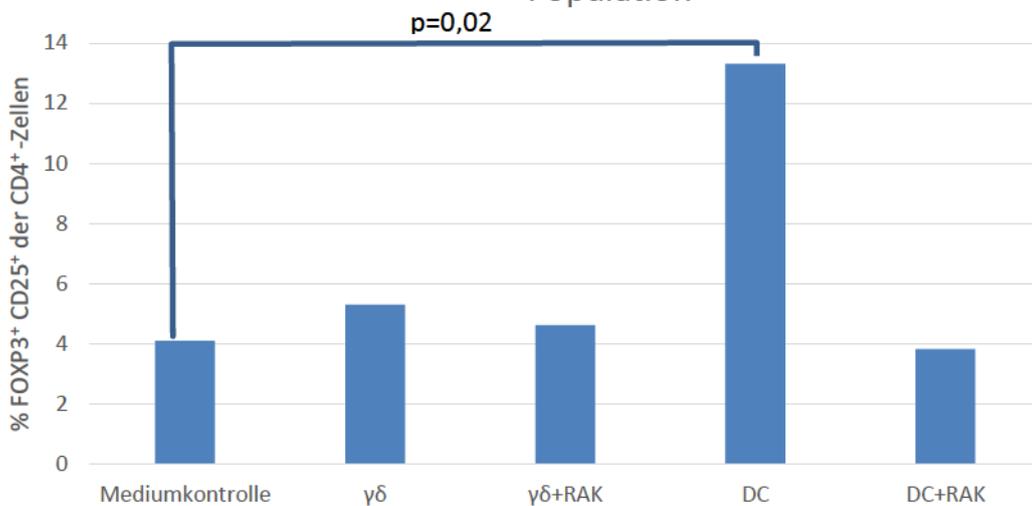


Abb. 22 Autologe CD3⁺-Responderzellen wurden sieben Tage lang mit RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie RAK-peptidbeladenen bzw. nichtpeptidbeladenen DC unter Zugabe von IL-2 koinkubiert. Die Abbildungen stellen den Anteil der CD25⁺FOXP3⁺-Zellen an der CD4⁺-Zellpopulation für die verschiedenen Koinkubationen der einzelnen Spender (A) und als Mittelwerte (B) dar. Es fand sich ein signifikanter Unterschied der Anteile regulatorischer T-Zellen in den Koinkubationen mit den nichtpeptidbeladenen DC verglichen mit den übrigen Koinkubationskulturen. (zur Signifikanz s. auch Tabelle 3).

4 Diskussion

Übergeordnetes Ziel des Projekts ist die Untersuchung des Potenzials von $\gamma\delta$ -T-Zellen für die zelluläre Immuntherapie maligner Erkrankungen. Die Rationale eines solchen Therapieansatzes basiert auf der praktikablen und effizienten ex vivo Stimulationsmöglichkeit von $\gamma\delta$ -T-Zellen, die stabile antigenspezifische T-Zell-Antworten induzieren können. Die Attraktivität der Effektorzellpopulation wäre noch erhöht, sollte sich zeigen, dass sie in geringerem Maße als alternative APC regulatorische T-Zellen induzieren, die aufgrund ihrer immunsuppressiven Eigenschaften als Hindernis der Immuntherapie betrachtet werden (111,134,160).

Seit Dekaden gelten DC aufgrund ihrer herausragenden antigenpräsentierenden Eigenschaften als Goldstandard der zellbasierten Immuntherapie. Doch ihre Heterogenität sowie ihre aufwendige Kultivierung behindern oft einen effektiven Therapieansatz. In vorausgegangenen Arbeiten hat unsere Forschungsgruppe untersucht, inwieweit $\gamma\delta$ -T-Zellen DC hinsichtlich der Praktikabilität der Gewinnung für in vitro Studien, ihrer Proliferationskapazität sowie ihrer Fähigkeit zur Antigenpräsentation ebenbürtig oder sogar überlegen sind. In der hier vorliegenden Arbeit wurde der Aspekt untersucht, ob $\gamma\delta$ -T-Zellen und DC neben antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen auch regulatorische T-Zellen induzieren und somit ein potentiell negatives Feedback für die von ihnen induzierte (Antitumor-) Immunantwort liefern.

4.1 Vereinfachte Kultur von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu DC

Unsere Arbeiten haben vorausgehende Beschreibungen bestätigt, dass sich $\gamma\delta$ -T-Zellen im Gegensatz zu DC mit wenigen einfachen Arbeitsschritten aus PBMC generieren und durch Bisphosphonate zur Proliferation stimulieren lassen (103). Die im peripheren Blut zu 1-5% der T-Zellen vorkommenden $\gamma\delta$ -T-Zellen erreichen so innerhalb von 8-9 Tagen ein Vielfaches ihrer ursprünglichen Anzahl (103). Im Zuge dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass nach Einsatz von 100 Millionen PBMC unter Zusatz von IL-2 und Zoledronsäure nach 9 Tagen im Mittel Ausbeuten von 123 Millionen $\gamma\delta$ -T-Zellen zu erwarten sind. Zudem zeigte sich die Zahl der $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 9 vor MACS mit etwa 300

Millionen noch deutlich größer. Eine weitere Steigerung der Ausbeute durch Minimierung der im Rahmen der magnetischen Zellseparation auftretenden Verluste durch Optimierung oder Wechsel des Isolationsverfahrens wäre dementsprechend möglich. Abel et al konnten zeigen, dass die wiederholte Infusion von Zoledronsäure und IL-2 stimulierten $\gamma\delta$ -T-Zellen bei Patienten mit Multiplem Myelom keine schwerwiegenden Nebenwirkungen hervorruft (4). Auch die in vivo Stimulation von $\gamma\delta$ -T-Zellen mittels IL-2 und Zometa erwies sich als nichttoxisch (49), so dass eine Aufrechterhaltung der Immunantwort durch Reaktivierung infundierter $\gamma\delta$ -T-Zellen möglich erscheint.

DC hingegen sind schwieriger aus peripherem Blut zu isolieren und zeigen sich deutlich heterogener hinsichtlich ihrer Zelleigenschaften. Die durch Ausreifung aus Monozytenkulturen gewonnenen DC ähneln eher Makrophagen als den übrigen Subgruppen dendritischer Zellen hinsichtlich ihrer proteolytischen Fähigkeiten, so dass Forschungsergebnisse mit diesen Zellen nur unter Vorbehalt auf DC im Allgemeinen übertragbar sind (122). Die in unseren Experimenten mit 6,00% bis 28,29% der PBMC geringe und stark schwankende Anzahl DC im peripheren Blut erschwert zusätzlich eine Beurteilung bzw. Vorhersage bezüglich der erforderlichen Blutmenge. Die ohnehin oft anämischen Tumorpatienten müssten sich also ggf. rezidivierenden bzw. exzessiven Blutentnahmen unterziehen, damit eine ausreichende Anzahl dendritischer Zellen für die Immuntherapie gewonnen werden kann. Eine Steigerung der Ausbeute durch Optimierung des Isolationsverfahrens ist gemäß unseren Daten nicht zu erwarten, da in Anbetracht der geringen Anzahl (0,29% \pm 0,27%) der CD14⁺-Zellen in der Ausschlussfraktion des MACS von einer kompletten Depletion auszugehen ist. Des Weiteren erfordert die Ausreifung dendritischer Zellen eine aufwendige Stimulation durch teure Zytokincocktails, bevor sie für die Forschung oder Therapie eingesetzt werden können. Zu guter Letzt zeigen DC in vitro keine Expansion; vielmehr ging die Zellzahl im Rahmen der erforderlichen Reifungsschritte deutlich auf 44,5% der anfangs isolierten CD14⁺-Zellen zurück.

4.2 Funktionelle Defizite der DC von Tumorpatienten erschweren die Immuntherapie

Reife DC eignen sich aufgrund ihrer hohen Kapazität zur Antigenpräsentation sehr gut für die Induktion zytotoxischer T-Zellen mit Spezifität für in der Regel schwach immunogene, tumorassoziierte Antigene in der Immuntherapie. Trotz der herausragenden antigenpräsentierenden Eigenschaften stehen ihre Heterogenität sowie ihre erschwerten Kulturbedingungen einer breiten Anwendung entgegen. Der Einsatz von DC in der Krebstherapie ist weiteren Hindernissen unterworfen: DC bei Krebspatienten weisen funktionelle Defekte auf. Bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich zeigten DC eine verminderte Fähigkeit zur Bildung von Zellclustern (184). Gabrilovich et al. konnten zudem zeigen, dass die Antigenpräsentation von DC bei Mäusen mit Tumoren herabgesetzt ist und sie eine verminderte Fähigkeit zur Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen aufweisen (58). Auch für Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs konnte eine defiziente antigenpräsentierende Funktion reifer DC nachgewiesen werden (59). Des Weiteren liegen reife DC bei Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom, Brustkrebs oder Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Halsbereiches in einer deutlich reduzierten Anzahl vor, was den Einsatz autologer Zellen in der Immuntherapie weiter erschwert (6,57,201). Im Gegensatz hierzu zeigten $\gamma\delta$ -T-Zellen von Patienten mit Hodgkin-Lymphom oder Nierenzellkarzinom nach Stimulation mit Bisphosphonaten eine effiziente Proliferation bei fortbestehender Funktionalität (99,108).

4.3 $\gamma\delta$ -T-Zellen sind DC hinsichtlich ihrer APC-Funktion beim RAK-Peptid ebenbürtig

DC werden insbesondere aufgrund ihrer ausgeprägten antigenpräsentierenden Eigenschaften in der Immuntherapie geschätzt. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch auch durch $\gamma\delta$ -T-Zellen eine stabile Induktion RAK-antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen nachgewiesen werden, welche sich von der durch DC hervorgerufenen Induktion statistisch nicht signifikant unterschied. Brandes und unsere Arbeitsgruppe konnten in vorherigen Arbeiten zeigen, dass die durch $\gamma\delta$ -T-Zellen induzierten, peptidspezifischen CD8⁺-Zellen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Eigenschaften vollfunktionell sind (28,108). Einschränkend muss erwähnt werden, dass das EBV-Peptid RAK auf ein stark

immunogenes Antigen zurückzuführen ist, das die Eigenschaften von Tumorantigenen nur bedingt widerspiegelt. Jedoch haben Vorarbeiten gezeigt, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen das Potenzial besitzen durch die Präsentation auch schwächer immunogener Antigene wie LMP2a eine stabile Expansion peptidspezifischer $CD8^+$ -T-Zellen zu induzieren (108). LMP2a ist ein in der latenten Phase des EBV-Virus vorkommendes Membranprotein, welches aufgrund seines Vorkommens bei EBV-assoziierten Tumoren wie dem Hodgkin Lymphom oder nasopharyngealen Tumoren ein tumorassoziertes Antigen darstellt (31,116,138). Der Einsatz EBV-spezifischer, zytotoxischer T-Zellen, welche mittels LMP2-transduzierten APC (DC und B-Lymphoblasten) expandiert wurden, zeigte in klinischen Studien mit EBV-assoziierten Lymphomen erste Erfolge (21).

Auch nach retroviraler Transduktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit dem Tumorantigen LMP2a zeigte sich eine Expansion antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen (108). Die Antigenpräsentation von $\gamma\delta$ -T-Zellen könnte somit durch genetischen Transfer von gezielt ausgewählten Tumorantigenen in die Zelle für die Immuntherapie nutzbar gemacht werden. Dabei muss jedoch in Erwägung gezogen werden, dass Tumorantigene in der Regel schwächer immunogen sind als virale Antigene. Ein Beispiel ist das tumorassozierte Selbstantigen PRAME, das sich nicht zur Induktion tumorspezifischer $CD8^+$ -T-Zellen eignet (8). PRAME („preferentially expressed antigen in melanoma“), ist ein Antigen, welches sich vor allem auf Melanomzellen, beim Plattenepithelkarzinom der Lunge sowie bei vielen Sarkomen und akuten Leukämien findet, jedoch in geringer Anzahl auch auf gesunden Zellen vorkommt (83). Einige Studien zeigten zudem, dass sowohl durch $\gamma\delta$ -T-Zellen, aber auch durch DC expandierte $CD8^+$ -Zellen mit Spezifität für PRAME und andere tumorassozierte Selbstantigene in der Lyse der dieses Antigen endogen exprimierenden Zielzellen versagen (8,130). Die Therapie mit spezifischen T-Zellen gegen nicht-virale Tumorantigene ist demzufolge deutlich erschwert (157). Die wesentliche Ursache ist, dass schützende Toleranzmechanismen gegenüber diesen auch auf gesunden Zellen exprimierten Antigenen eine effektive Immunantwort verhindern (157). Dies schränkt die Effektivität einer gegen Tumorselbstantigene gerichteten, zellulären Immuntherapie deutlich ein, so dass weitere Forschungen auf diesem Gebiet notwendig sind.

4.4 $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren keine regulatorischen T-Zellen und tragen damit nicht zu tumorprotektiver Immuntoleranz bei

Ein weiteres Hindernis der adoptiven Immuntherapie sind Tumordinfiltrationen mit regulatorischen T-Zellen. Regulatorische T-Zellen besitzen ausgeprägte immunsuppressive Eigenschaften. Zum Erhalt eines gesunden Organismus ist ein Gleichgewicht aus immunsuppressiven und immunsupportiven Impulsen erforderlich. Ohne den Einfluss regulatorischer T-Zellen resultieren Autoimmunerkrankungen, Allergien, überschießende Inflammation und Transplantatabstoßung (160). Wie aber ist ihre Rolle im Kontext einer Tumorerkrankung zu bewerten?

Eine Vielzahl an Tumoren exprimieren tumorassoziierte Selbstantigene, die zwar eine Angriffsfläche für das Immunsystem bieten, sich diesem jedoch entziehen. Dazu tragen regulatorische T-Zellen bei. So konnten in einigen Tumorgeweben, z.B. von Lunge, Ovar, Leber, Pankreas, Brust und anderen, eine gehäufte Anzahl regulatorischer T-Zellen nachgewiesen werden (42,78,82,115,140,145,163,165,202). Zudem korrelierten hohe Level regulatorischer T-Zellen mit fortgeschrittenen, metastasierten Tumorstadien unter anderem beim Ewing-Sarkom, Ovarial- und Mammakarzinom (13,30,42). Vor allem ein vermindertes Verhältnis von zytotoxischen T-Zellen zu FOXP3⁺CD4⁺CD25⁺-Zellen scheint bei einigen Tumoren mit einer schlechten Prognose einherzugehen, weshalb von einem tumorprotektiven Effekt der regulatorischen T-Zellen durch Suppression tumorspezifischer CD8⁺-T-Zellen und ggf. anderer Immunzellen ausgegangen wird (78,95,140,152,164). Nicht bei allen Tumorerkrankungen ist jedoch Progress mit dem Vorliegen regulatorischer T-Zellen assoziiert. Leon et al. postulierten, basierend auf einem mathematischen Modell, das Vorliegen zweier unterschiedlicher Arten des Tumourprogresses. Der Arbeitsgruppe zufolge ist der Progress von schnellwachsenden Tumoren mit geringer Immunogenität und relativer Resistenz gegenüber tumorspezifischen Effektor-T-Zellen darauf zurückzuführen, dass trotz der vorwiegenden Induktion von Effektor-T-Zellen diese nicht ausreichen, das Tumorstadium zu kontrollieren. Der Tumor wächst somit dem Immunsystem, ohne dass der Progress durch regulatorische T-Zellen gefördert wird. Bei Tumoren mit einer geringen Wachstumsrate, mittlerer bis hoher Immunogenität, sowie hoher Sensitivität gegenüber tumorspezifischen Effektor-T-Zellen

hingegen könne ein Progress maßgeblich vom Vorliegen regulatorischer T-Zellen abhängen, welche durch Suppression der Effektor-T-Zellen die Immunantwort hindern und somit einen Tumorprogress erst ermöglichen (111).

Hinsichtlich des Mechanismus der Häufung regulatorischer T-Zellen in Tumoren wurden verschiedene Thesen diskutiert, wie z.B. eine chemokinvermittelte Migration regulatorischer T-Zellen in den Tumor, die durch Produktion von Chemokinen durch Tumoren und Makrophagen über ihre Chemokinrezeptoren, z.B. CCR4, vermittelt wird (90). Postuliert wird aber auch eine Induktion von regulatorischen T-Zelle aus nicht-regulatorischen T-Zellen durch Sekretion von TGF- β durch DC und Tumorzellen (63,113,140). Zudem besteht aufgrund der hohen Proliferationsrate sowie des gesteigerten Zellzerfalls in Tumoren ein erhöhtes Angebot an Selbstantigenen, was zur Rekrutierung regulatorischer T-Zellen beiträgt (140).

Aufgrund der suppressiven Wirkung regulatorischer T-Zellen auf tumorspezifische T-Zellen wurden in den letzten Jahren diverse therapeutische Ansätze entwickelt, dies zu unterbinden:

Depletierende Verfahren mittels gegen CD25 oder den Chemokinrezeptor CCR4 gerichteter monoklonaler Antikörper werden mittlerweile in klinischen Studien getestet (79,140). Eine Inhibition der durch regulatorische T-Zellen vermittelten Suppression mittels Einsatz agonistischer monoklonaler Antikörper gegen die Oberflächenproteine OX40 und GITR zeigte in vitro ebenfalls vielversprechende Resultate und geht nun in die klinische Studienphase über (97,140,141,151). In jüngerer Zeit werden Antikörper gegen die Oberflächenmoleküle PD-1 und CTLA-4 aufgrund ihrer Bedeutung für die suppressive Funktion regulatorischer T-Zellen intensiv erforscht und klinisch geprüft (140,141,189).

Aufgrund der hohen Bedeutung regulatorischer T-Zellen für die Unterdrückung von Immunantworten gegen Tumore sollte eine effektive zelluläre Immuntherapie nicht oder nur möglichst geringfügig von einer weiteren Steigerung der Zahl regulatorischer T-Zellen begleitet sein. Unsere Ergebnisse bestätigen, dass reife DC zu einer Induktion regulatorischer T-Zellen führen können. Die Zahl der induzierten regulatorischen T-Zellen durch nichtpeptidbeladene reife DC im Vergleich zur Mediumkontrolle reiner CD3⁺-Respon-

derzellen sowie im Vergleich zu peptid- und nichtpeptidbeladenen $\gamma\delta$ -T-Zellen war signifikant erhöht. Dies ist kongruent mit den Ergebnissen von Banerjee et al., welche zuvor eine zellkontaktabhängige, IL-2 und CD80/CD86-vermittelte, signifikante Induktion regulatorischer T-Zellen durch DC in einer CD3⁺-Kokultur nachweisen konnten. Laut dieser Arbeitsgruppe scheinen gerade die in der Forschung vielfältig eingesetzten, aus Monozytenkulturen gewonnenen und zytokinstimulierten DC diesbezüglich besonders potent zu sein. (12) Auffälliger Weise konnte in den Experimenten der vorliegenden Arbeit eine signifikante Reduktion zytotoxischer T-Zellen in den Kulturen der nichtpeptidbeladenen DC im Vergleich zur Mediumkontrolle gezeigt werden. Diese Feststellung unterstützt die Annahme, dass der in diesen Kulturen vorhandene, höhere Gehalt regulatorischer Zellen zu einer Kompromittierung der zellulären Immunantwort führt.

Die Analyse der Experimente zeigt jedoch auch, dass im Falle einer RAK-antigenvermittelten Immunantwort durch DC keine signifikante Induktion von regulatorischen T-Zellen in den Kokulturen aufzufinden ist. Dies legt den Schluss nahe, dass die Immunantwort auf das starke virale Antigen weniger hemmenden Regulationsmechanismen unterworfen ist. Im Falle schwächerer Antigene wie dem tumorassoziierten Antigene PRAME oder dem bei Karzinomen von Prostata, Blase, Kolon, Ovar und beim Ewing-Sarkom hochregulierten STEAP1 („six transmembrane epithelial antigen of the prostate“) (81), zeigte sich in weiteren Arbeiten unserer Gruppe jedoch eine Induktion regulatorischer T-Zellen durch DC (8). Analog der hier berichteten Ergebnisse mit unbeladenen DC werden durch PRAME und STEAP1 beladene $\gamma\delta$ -APC bei denselben Spendern gegenüber DC weniger regulatorische T-Zellen induziert (8).

Die Induktion regulatorischer T-Zellen und damit teilweise reziproke Hemmung der induzierten Immunantwort durch DC zeigt sich demnach abhängig vom gewählten Antigen. Gerade in der Immuntherapie von Tumoren macht man sich jedoch vorwiegend die auch bei Gesunden vorkommenden tumorassoziierten Antigene zunutze, so dass die Effekte bei schwach immunogenen Antigenen besonders relevant erscheinen.

Auch wenn diese Arbeit darauf hindeutet, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen keine nennenswerte hemmende Immunantwort durch Induktion regulatorischer T-Zellen hervorrufen, muss dies durch weitere Studien bestätigt werden. Aufgrund der HLA-Restriktivität der Antigenpräsentation konnte hier nur eine geringe Spenderdiversität von drei unterschiedlichen

HLA-B08 positiven, gesunden Spendern getestet (n=3) werden, so dass interindividuelle Schwankungen möglich sind. In Kongruenz mit unseren Ergebnissen zeigte sich jedoch auch in den Experimenten von Mao et al. mit durch Tumorlysat, IL-2 und IL-15 aktivierten $\gamma\delta$ -T-Zellen von drei Patienten mit Magenkarzinom keine Induktion $CD4^+CD25^+$ regulatorischer T-Zellen in einer $CD4^+CD25^-$ -Responderzellkultur (121).

Zudem gibt es weitere Hinweise, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen regulatorische T-Zellen nicht nur zahlenmäßig nicht induzieren, sondern auch ihre immunsuppressive Funktion beeinträchtigen können:

Petermann et al. konnten zeigen, dass IL-23 aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext der Autoimmunen Encephalomyelitis in der Lage sind, die Konversion konventioneller T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen zu hemmen. Zudem produzierten diese $\gamma\delta$ -T-Zellen ein Zytokinmilieu, welches die von regulatorischen T-Zellen hervorgerufene Suppression von $\alpha\beta$ -T-Zellen aufhob und so proinflammatorisch wirkte (150). Auch bei Patienten mit Magenkarzinom konnte nachgewiesen werden, dass durch Tumorlysat, IL-2 und IL-15 aktivierte $\gamma\delta$ -T-Zellen zell-zellkontaktabhängig die von $CD4^+CD25^+$ regulatorischen T-Zellen hervorgerufene Suppression von $CD4^+CD25^-$ -Zellen aufheben und diesen die Proliferation ermöglichen (121). Sowohl die tumoraktivierten $\gamma\delta$ -T-Zellen selbst, als auch durch sie induzierten $CD8^+$ -Zellen wiesen hierbei eine Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen auf (121).

Aktuell nicht eindeutig geklärt ist zudem die Frage, wie und in wieweit die immunsuppressive Funktion regulatorischer T-Zellen auch die Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen selbst betrifft.

Kunzmann et al. haben gezeigt, dass regulatorische T-Zellen eine starke, zellkontaktunabhängige Hemmung der Proliferation von phosphoantigeninduzierten $\gamma\delta$ -T-Zellen hervorrufen, deren Effektorfunktion wie Zytotoxizität oder Zytokinproduktion jedoch nicht beeinträchtigen (105). In einer anderen Studie wurde jedoch bei Mäusen neben einer zellkontaktabhängigen proliferationshemmenden Wirkung regulatorischer T-Zellen auf $\gamma\delta$ -T-Zellen auch eine Hemmung ihrer zytotoxischen Effektorfunktion sowie verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IFN- γ und IL-17 beschrieben (66). Diese teils konkurrierenden Resultate sind womöglich auf eine unterschiedliche Subpopulation

regulatorischer T-Zellen mit differierenden Oberflächenmarkern und/oder auf Speziesunterschiede zurückzuführen.

Zusammenfassend bleibt festzustellen, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu DC deutlich einfacher und kostengünstiger sowie in ausreichenden Mengen zu generieren sind. Sie weisen effiziente antigenpräsentierende Eigenschaften und zudem inherente Effektorfunktionen auf und erweisen sich dadurch im Gegensatz zu DC als multifunktionell. $\gamma\delta$ -T-Zellen induzieren zudem weder RAK-peptidbeladen noch ohne Peptidbeladung eine signifikante Anzahl von immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen. Somit bieten $\gamma\delta$ -T-Zellen vielversprechende Eigenschaften für ihren Einsatz in der zellulären Immuntherapie. Konkret könnten RAK-peptidbeladene $\gamma\delta$ -T-Zellen für die Induktion RAK-spezifischer zytotoxischer T-Zellen bei Patienten mit EBV-assoziierten Lymphomen, wie z.B. dem Hodgkin-Lymphom, und dem entsprechendem HLA-Kontext verwendet werden. Denkbar wären dabei entweder eine direkte Applikation als Tumorstoffimpfung oder aber die Verwendung für die *in vitro* Generierung peptidspezifischer T-Zellen und deren anschließender adoptiver Transfer in den Patienten.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Miltenyi Biotec (o. J.) Data sheet magnetic cell sorting, Anti-TCR γ/δ MicroBead Kit human, Order No. 130-050-701. Online im Internet: URL: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001200/IM0001255.ashx> [Abrufdatum: 29.01.2015]
- (2) Miltenyi Biotec (o. J.) Data sheet magnetic cell sorting, Pan T cell Isolation Kit II human, Order no. 130-091-156. Online im Internet: URL: <http://www.miltenyibiotec.com/~media/Images/Products/Import/0001100/IM0001137.ashx> [Abrufdatum: 29.01.2015]
- (3) Miltenyi Biotec (o. J.) Data sheet magnetic cell sorting, CD14 MicroBeads human, Order no. 130-050-201. Online im Internet: URL: <http://www.miltenyibiotec.com/en/products-and-services/macscell-separation/cell-separation-reagents/monocytes-and-macrophages/cd14-microbeads-human.aspx> [Abrufdatum: 29.01.2015]
- (4) Abe Y, Muto M, Nieda M, Nakagawa Y, Nicol A, Kaneko T, et al. (2009) Clinical and immunological evaluation of zoledronate-activated V γ 9V δ 2 T-cell-based immunotherapy for patients with multiple myeloma. *Exp.Hematol.* 37 (8): 956-968. Online im Internet: DOI: 10.1016/j.exphem.2009.04.008 [doi]
- (5) Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392 (6671): 86-89. Online im Internet: DOI: 10.1038/32183 [doi]
- (6) Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, et al. (2000) Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin.Cancer Res.* 6 (5): 1755-1766. Online im Internet:
- (7) Altvater B, Landmeier S, Pscherer S, Temme J, Schweer K, Kailayangiri S, et al. (2009) 2B4 (CD244) signaling by recombinant antigen-specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells. *Clin.Cancer Res.* 15 (15): 4857-4866. Online im Internet: DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2810 [doi]
- (8) Altvater B, Pscherer S, Landmeier S, Kailayangiri S, Savoldo B, Juergens H, et al. (2012) Activated human $\gamma\delta$ T cells induce peptide-specific CD8⁺ T-cell responses to tumor-associated self-antigens. *Cancer Immunol.Immunother.* 61 (3): 385-396. Online im Internet: DOI: 10.1007/s00262-011-1111-6 [doi]
- (9) Asselin-Paturel C, Brizard G, Pin JJ, Briere F, Trinchieri G (2003) Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody. *J.Immunol.* 171 (12): 6466-6477. Online im Internet:
- (10) Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392 (6673): 245-252. Online im Internet: DOI: 10.1038/32588

- (11) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, et al. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 18: 767-811. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev.immunol.18.1.767
- (12) Banerjee DK, Dhodapkar MV, Matayeva E, Steinman RM, Dhodapkar KM (2006) Expansion of FOXP3^{high} regulatory T cells by human dendritic cells (DCs) in vitro and after injection of cytokine-matured DCs in myeloma patients. *Blood* 108 (8): 2655-2661. Online im Internet: DOI: blood-2006-03-011353 [pii]
- (13) Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL, et al. (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J.Clin.Oncol.* 24 (34): 5373-5380. Online im Internet: DOI: 24/34/5373 [pii]
- (14) Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285 (5428): 727-729. Online im Internet: DOI: 7717 [pii]
- (15) Begley M, Gahan CG, Kollas AK, Hintz M, Hill C, Jomaa H, et al. (2004) The interplay between classical and alternative isoprenoid biosynthesis controls gammadelta T cell bioactivity of *Listeria monocytogenes*. *FEBS Lett.* 561 (1-3): 99-104. Online im Internet: DOI: 10.1016/S0014-5793(04)00131-0 [doi]
- (16) Berard F, Blanco P, Davoust J, Neidhart-Berard EM, Nouri-Shirazi M, Taquet N, et al. (2000) Cross-priming of naive CD8 T cells against melanoma antigens using dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells. *J.Exp.Med.* 192 (11): 1535-1544. Online im Internet:
- (17) Bettelli E, Dastrange M, Oukka M (2005) Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102 (14): 5138-5143. Online im Internet: DOI: 0501675102 [pii]
- (18) Bilate AM, Lafaille JJ (2012) Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in immune tolerance. *Annu.Rev.Immunol.* 30: 733-758. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075043 [doi]
- (19) Bluestone JA, Abbas AK (2003) Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat.Rev.Immunol.* 3 (3): 253-257. Online im Internet: DOI: 10.1038/nri1032 [doi]
- (20) Bogedain C, Wolf H, Modrow S, Stuber G, Jilg W (1995) Specific cytotoxic T lymphocytes recognize the immediate-early transactivator Zta of Epstein-Barr virus. *J.Virol.* 69 (8): 4872-4879. Online im Internet:
- (21) Bollard CM, Gottschalk S, Torrano V, Diouf O, Ku S, Hazrat Y, et al. (2014) Sustained complete responses in patients with lymphoma receiving autologous cytotoxic T lymphocytes targeting Epstein-Barr virus latent membrane proteins. *J.Clin.Oncol.* 32 (8): 798-808. Online im Internet: DOI: 10.1200/JCO.2013.51.5304 [doi]

- (22) Bonaccorsi I, Pezzino G, Morandi B, Ferlazzo G (2013) Novel perspectives on dendritic cell-based immunotherapy of cancer. *Immunol.Lett.* 155 (1–2): 6-10. Online im Internet: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.09.021> URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165247813001442>
- (23) Bonneville M, O'Brien RL, Born WK (2010) Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat.Rev.Immunol.* 10 (7): 467-478. Online im Internet: DOI: 10.1038/nri2781 [doi]
- (24) Bopp T, Becker C, Klein M, Klein-Hessling S, Palmetshofer A, Serfling E, et al. (2007) Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J.Exp.Med.* 204 (6): 1303-1310. Online im Internet: DOI: jem.20062129 [pii]
- (25) Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, et al. (2007) Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110 (4): 1225-1232. Online im Internet: DOI: blood-2006-12-064527 [pii]
- (26) Boyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.* 97: 77-89. Online im Internet:
- (27) Brandes M, Willmann K, Lang AB, Nam KH, Jin C, Brenner MB, et al. (2003) Flexible migration program regulates gamma delta T-cell involvement in humoral immunity. *Blood* 102 (10): 3693-3701. Online im Internet: DOI: 10.1182/blood-2003-04-1016 [doi]
- (28) Brandes M, Willmann K, Moser B (2005) Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* 309 (5732): 264-268. Online im Internet: DOI: 1110267 [pii]
- (29) Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, et al. (1986) Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* 322 (6075): 145-149. Online im Internet: DOI: 10.1038/322145a0 [doi]
- (30) Brinkrolf P, Landmeier S, Altvater B, Chen C, Pscherer S, Rosemann A, et al. (2009) A high proportion of bone marrow T cells with regulatory phenotype (CD4+CD25hiFoxP3+) in Ewing sarcoma patients is associated with metastatic disease. *Int.J.Cancer* 125 (4): 879-886. Online im Internet: DOI: 10.1002/ijc.24461 [doi]
- (31) Brooks L, Yao QY, Rickinson AB, Young LS (1992) Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts. *J.Virol.* 66 (5): 2689-2697. Online im Internet:

- (32) Bucy RP, Chen CL, Cihak J, Losch U, Cooper MD (1988) Avian T cells expressing gamma delta receptors localize in the splenic sinusoids and the intestinal epithelium. *J.Immunol.* 141 (7): 2200-2205. Online im Internet:
- (33) Bucy RP, Chen CL, Cooper MD (1989) Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of T gamma delta cells in humans. *J.Immunol.* 142 (9): 3045-3049. Online im Internet:
- (34) Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F (1997) Human dendritic cell responses to lipopolysaccharide and CD40 ligation are differentially regulated by interleukin-10. *Eur.J.Immunol.* 27 (8): 1848-1852. Online im Internet: DOI: 10.1002/eji.1830270805 [doi]
- (35) Bukowski JF, Morita CT, Brenner MB (1999) Human gamma delta T cells recognize alkylamines derived from microbes, edible plants, and tea: implications for innate immunity. *Immunity* 11 (1): 57-65. Online im Internet: DOI: S1074-7613(00)80081-3 [pii]
- (36) Casorati G, De Libero G, Lanzavecchia A, Migone N (1989) Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood. *J.Exp.Med.* 170 (5): 1521-1535. Online im Internet:
- (37) Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Azuma M, Okumura K, Lanier LL, et al. (1994) B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *J.Exp.Med.* 180 (5): 1841-1847. Online im Internet:
- (38) Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388 (6644): 782-787. Online im Internet: DOI: 10.1038/42030 [doi]
- (39) Champagne E (2011) gammadelta T cell receptor ligands and modes of antigen recognition. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz)* 59 (2): 117-137. Online im Internet: DOI: 10.1007/s00005-011-0118-1 [doi]
- (40) Chargui J, Combaret V, Scaglione V, Iacono I, Peri V, Valteau-Couanet D, et al. (2010) Bromohydrin pyrophosphate-stimulated Vgamma9delta2 T cells expanded ex vivo from patients with poor-prognosis neuroblastoma lyse autologous primary tumor cells. *J.Immunother.* 33 (6): 591-598. Online im Internet: DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181dda207 [doi]
- (41) Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. (2007) The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 450 (7169): 566-569. Online im Internet: DOI: nature06306 [pii]
- (42) Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat.Med.* 10 (9): 942-949. Online im Internet: DOI: 10.1038/nm1093 [doi]

- (43) Curotto de Lafaille MA, Lino AC, Kutchukhidze N, Lafaille JJ (2004) CD25- T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion. *J.Immunol.* 173 (12): 7259-7268. Online im Internet: DOI: 173/12/7259 [pii]
- (44) Dalton JE, Howell G, Pearson J, Scott P, Carding SR (2004) Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J.Immunol.* 173 (6): 3660-3667. Online im Internet: DOI: 173/6/3660 [pii]
- (45) Das H, Wang L, Kamath A, Bukowski JF (2001) Vgamma2Vdelta2 T-cell receptor-mediated recognition of aminobisphosphonates. *Blood* 98 (5): 1616-1618. Online im Internet:
- (46) D'Asaro M, La Mendola C, Di Liberto D, Orlando V, Todaro M, Spina M, et al. (2010) V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *J.Immunol.* 184 (6): 3260-3268. Online im Internet: DOI: 10.4049/jimmunol.0903454 [doi]
- (47) Dechanet-Merville J (2014) Promising Cell-Based Immunotherapy Using Gamma-Delta T Cells: Together Is Better. *Clin.Cancer Res.* Online im Internet: DOI: clincan-res.1371.2014 [pii]
- (48) Delamarre L, Mellman I (2011) Harnessing dendritic cells for immunotherapy. *Semin.Immunol.* 23 (1): 2-11. Online im Internet: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2011.02.001> URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532311000182>
- (49) Dieli F, Vermijlen D, Fulfaro F, Caccamo N, Meraviglia S, Cicero G, et al. (2007) Targeting human {gamma}delta} T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 67 (15): 7450-7457. Online im Internet: DOI: 67/15/7450 [pii]
- (50) Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, et al. (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J.Exp.Med.* 188 (2): 373-386. Online im Internet:
- (51) Dudley EC, Girardi M, Owen MJ, Hayday AC (1995) Alpha beta and gamma delta T cells can share a late common precursor. *Curr.Biol.* 5 (6): 659-669. Online im Internet: DOI: S0960-9822(95)00131-X [pii]
- (52) Fallarino F, Grohmann U (2011) Using an ancient tool for igniting and propagating immune tolerance: IDO as an inducer and amplifier of regulatory T cell functions. *Curr.Med.Chem.* 18 (15): 2215-2221. Online im Internet: DOI: 0929-8673/11 \$58.00+.00 [doi]

- (53) Fanger NA, Wardwell K, Shen L, Tedder TF, Guyre PM (1996) Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J.Immunol.* 157 (2): 541-548. Online im Internet:
- (54) Farber DL, Yudanin NA, Restifo NP (2014) Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. *Nat.Rev.Immunol.* 14 (1): 24-35. Online im Internet: DOI: 10.1038/nri3567 [doi]
- (55) Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat.Immunol.* 4 (4): 330-336. Online im Internet: DOI: 10.1038/ni904 [doi]
- (56) Fontenot JD, Rudensky AY (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat.Immunol.* 6 (4): 331-337. Online im Internet: DOI: ni1179 [pii]
- (57) Gabrilovich D (2004) Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat.Rev.Immunol.* 4 (12): 941-952. Online im Internet: DOI: nri1498 [pii]
- (58) Gabrilovich DI, Ciernik IF, Carbone DP (1996) Dendritic cells in antitumor immune responses. I. Defective antigen presentation in tumor-bearing hosts. *Cell.Immunol.* 170 (1): 101-110. Online im Internet: DOI: S0008-8749(96)90139-2 [pii]
- (59) Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP (1997) Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin.Cancer Res.* 3 (3): 483-490. Online im Internet:
- (60) Gaehtgens P, Pries AR, Walzog B (1999 (Erstaufgabe 1992)) Blut, Abwehr und Immunität. In: Deetjen P, Speckmann E (Hrsg) *Physiologie*. Urban & Fischer Verlag, München, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm, 3., völlig neu bearbeitete Auflage, S. 273-286
- (61) Garin MI, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollon E, Wait R, Lechler RI (2007) Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood* 109 (5): 2058-2065. Online im Internet: DOI: blood-2006-04-016451 [pii]
- (62) Gershon RK, Kondo K (1970) Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology* 18 (5): 723-737. Online im Internet:
- (63) Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, et al. (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J.Exp.Med.* 202 (8): 1075-1085. Online im Internet: DOI: jem.20051511 [pii]
- (64) Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, Zitvogel L (2006) The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol.Rev.* 214: 229-238. Online im Internet: DOI: IMR445 [pii]

- (65) Gober HJ, Kistowska M, Angman L, Jenó P, Mori L, De Libero G (2003) Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *J.Exp.Med.* 197 (2): 163-168. Online im Internet:
- (66) Goncalves-Sousa N, Ribot JC, deBarros A, Correia DV, Caramalho I, Silva-Santos B (2010) Inhibition of murine gammadelta lymphocyte expansion and effector function by regulatory alphabeta T cells is cell-contact-dependent and sensitive to GITR modulation. *Eur.J.Immunol.* 40 (1): 61-70. Online im Internet: DOI: 10.1002/eji.200939715 [doi]
- (67) Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Anderson T, et al. (1989) Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J.Exp.Med.* 169 (4): 1277-1294. Online im Internet:
- (68) Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93 (22): 12445-12450. Online im Internet:
- (69) Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279 (5357): 1737-1740. Online im Internet:
- (70) Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T (1999) Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 (12): 6879-6884. Online im Internet:
- (71) Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ (2004) Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 21 (4): 589-601. Online im Internet: DOI: S1074761304002729 [pii]
- (72) Grouard G, Risoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J.Exp.Med.* 185 (6): 1101-1111. Online im Internet:
- (73) Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 20: 621-667. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.100301.064828
- (74) Haas W, Pereira P, Tonegawa S (1993) Gamma/delta cells. *Annu.Rev.Immunol.* 11: 637-685. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev.iy.11.040193.003225 [doi]
- (75) Hailemichael Y, Overwijk WW (2014) Cancer vaccines: Trafficking of tumor-specific T cells to tumor after therapeutic vaccination. *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 53: 46-50. Online im Internet: DOI: 10.1016/j.biocel.2014.04.019 [doi]

- (76) Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, et al. (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J.Exp.Med.* 194 (6): 769-779. Online im Internet:
- (77) Hein WR, Mackay CR (1991) Prominence of gamma delta T cells in the ruminant immune system. *Immunol.Today* 12 (1): 30-34. Online im Internet:
- (78) Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S (2006) Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin.Cancer Res.* 12 (18): 5423-5434. Online im Internet: DOI: 12/18/5423 [pii]
- (79) Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden MV, Haluska FG, Kruse A, et al. (2008) Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105 (8): 3005-3010. Online im Internet: DOI: 10.1073/pnas.0712237105 [doi]
- (80) Holtmeier W, Kabelitz D (2005) gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. *Chem.Immunol.Allergy* 86: 151-183. Online im Internet: DOI: 86659 [pii]
- (81) Hubert RS, Vivanco I, Chen E, Rastegar S, Leong K, Mitchell SC, et al. (1999) STEAP: a prostate-specific cell-surface antigen highly expressed in human prostate tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96 (25): 14523-14528. Online im Internet:
- (82) Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin.Cancer Res.* 9 (12): 4404-4408. Online im Internet:
- (83) Ikeda H, Lethe B, Lehmann F, van Baren N, Baurain JF, de Smet C, et al. (1997) Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6 (2): 199-208. Online im Internet: DOI: S1074-7613(00)80426-4 [pii]
- (84) Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, et al. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 176 (6): 1693-1702. Online im Internet:
- (85) Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, et al. (1998) Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J.Exp.Med.* 188 (11): 2163-2173. Online im Internet:

- (86) Itohara S, Farr AG, Lafaille JJ, Bonneville M, Takagaki Y, Haas W, et al. (1990) Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 343 (6260): 754-757. Online im Internet: DOI: 10.1038/343754a0 [doi]
- (87) Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A (2001) Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 31 (11): 3388-3393. Online im Internet: DOI: 10.1002/1521-4141(200111)31:11<3388::AID-IMMU3388>3.0.CO;2-Q [pii]
- (88) Jiang A, Bloom O, Ono S, Cui W, Unternaehrer J, Jiang S, et al. (2007) Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27 (4): 610-624. Online im Internet: DOI: S1074-7613(07)00446-3 [pii]
- (89) Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, et al. (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur.J.Immunol.* 27 (12): 3135-3142. Online im Internet: DOI: 10.1002/eji.1830271209 URL: <http://dx.doi.org/10.1002/eji.1830271209>
- (90) Jordan JT, Sun W, Hussain SF, DeAngulo G, Prabhu SS, Heimberger AB (2008) Preferential migration of regulatory T cells mediated by glioma-secreted chemokines can be blocked with chemotherapy. *Cancer Immunol.Immunother.* 57 (1): 123-131. Online im Internet: DOI: 10.1007/s00262-007-0336-x [doi]
- (91) Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, et al. (2001) Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat.Immunol.* 2 (4): 301-306. Online im Internet: DOI: 10.1038/86302 [doi]
- (92) Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY (2012) Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu.Rev.Immunol.* 30: 531-564. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141623 [doi]
- (93) Jung D, Alt FW (2004) Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation. *Cell* 116 (2): 299-311. Online im Internet: DOI: S009286740400039X [pii]
- (94) Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J.Exp.Med.* 194 (6): 863-869. Online im Internet:
- (95) Kim S, Lee A, Lim W, Park S, Cho MS, Koo H, et al. (2014) Zonal difference and prognostic significance of foxp3 regulatory T cell infiltration in breast cancer. *J.Breast Cancer.* 17 (1): 8-17. Online im Internet: DOI: 10.4048/jbc.2014.17.1.8 [doi]

- (96) Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA (2014) Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat.Rev.Immunol.* 14 (6): 377-391. Online im Internet: DOI: 10.1038/nri3667 [doi]
- (97) Ko K, Yamazaki S, Nakamura K, Nishioka T, Hirota K, Yamaguchi T, et al. (2005) Treatment of advanced tumors with agonistic anti-GITR mAb and its effects on tumor-infiltrating Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *J.Exp.Med.* 202 (7): 885-891. Online im Internet: DOI: jem.20050940 [pii]
- (98) Kobayashi H, Tanaka Y, Nakazawa H, Yagi J, Minato N, Tanabe K (2011) A new indicator of favorable prognosis in locally advanced renal cell carcinomas: gamma delta T-cells in peripheral blood. *Anticancer Res.* 31 (3): 1027-1031. Online im Internet: DOI: 31/3/1027 [pii]
- (99) Kobayashi H, Tanaka Y, Yagi J, Minato N, Tanabe K (2011) Phase I/II study of adoptive transfer of gammadelta T cells in combination with zoledronic acid and IL-2 to patients with advanced renal cell carcinoma. *Cancer Immunol.Immunother.* 60 (8): 1075-1084. Online im Internet: DOI: 10.1007/s00262-011-1021-7 [doi]
- (100) Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR (2006) T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J.Immunol.* 177 (10): 6780-6786. Online im Internet: DOI: 177/10/6780 [pii]
- (101) Koizumi H, Liu CC, Zheng LM, Joag SV, Bayne NK, Holoshitz J, et al. (1991) Expression of perforin and serine esterases by human gamma/delta T cells. *J.Exp.Med.* 173 (2): 499-502. Online im Internet:
- (102) Krangel MS, Yssel H, Brocklehurst C, Spits H (1990) A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *J.Exp.Med.* 172 (3): 847-859. Online im Internet:
- (103) Kunzmann V, Bauer E, Wilhelm M (1999) Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. *N.Engl.J.Med.* 340 (9): 737-738. Online im Internet: DOI: 10.1056/NEJM199903043400914 [doi]
- (104) Kunzmann V, Bauer E, Feurle J, Weissinger F, Tony HP, Wilhelm M (2000) Stimulation of gammadelta T cells by aminobisphosphonates and induction of antiplasma cell activity in multiple myeloma. *Blood* 96 (2): 384-392. Online im Internet:
- (105) Kunzmann V, Kimmel B, Herrmann T, Einsele H, Wilhelm M (2009) Inhibition of phosphoantigen-mediated gammadelta T-cell proliferation by CD4+ CD25+ FoxP3+ regulatory T cells. *Immunology* 126 (2): 256-267. Online im Internet: DOI: 10.1111/j.1365-2567.2008.02894.x [doi]

- (106) Kupiec-Weglinski JW, Austyn JM, Morris PJ (1988) Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Traffic from the blood, and T cell-dependent and -independent entry to lymphoid tissues. *J.Exp.Med.* 167 (2): 632-645. Online im Internet:
- (107) Lai D, Wang F, Chen Y, Wang C, Liu S, Lu B, et al. (2012) Human ovarian cancer stem-like cells can be efficiently killed by gammadelta T lymphocytes. *Cancer Immunol.Immunother.* 61 (7): 979-989. Online im Internet: DOI: 10.1007/s00262-011-1166-4 [doi]
- (108) Landmeier S, Altvater B, Pscherer S, Juergens H, Varnholt L, Hansmeier A, et al. (2009) Activated human gammadelta T cells as stimulators of specific CD8+ T-cell responses to subdominant Epstein Barr virus epitopes: potential for immunotherapy of cancer. *J.Immunother.* 32 (3): 310-321. Online im Internet: DOI: 10.1097/CJI.0b013e31819b7c30 [doi]
- (109) Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat.Immunol.* 1 (4): 311-316. Online im Internet: DOI: 10.1038/79758 [doi]
- (110) Lee AW, Truong T, Bickham K, Fonteneau J, Larsson M, Da Silva I, et al. (2002) A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20, Supplement 4 (0): A8-A22. Online im Internet: DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00382-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00382-1) URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X02003821>
- (111) Leon K, Garcia K, Carneiro J, Lage A (2007) How regulatory CD25(+)CD4(+) T cells impinge on tumor immunobiology? On the existence of two alternative dynamical classes of tumors. *J.Theor.Biol.* 247 (1): 122-137. Online im Internet: DOI: S0022-5193(07)00059-8 [pii]
- (112) Liang B, Workman C, Lee J, Chew C, Dale BM, Colonna L, et al. (2008) Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J.Immunol.* 180 (9): 5916-5926. Online im Internet: DOI: 180/9/5916 [pii]
- (113) Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, et al. (2007) Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J.Immunol.* 178 (5): 2883-2892. Online im Internet: DOI: 178/5/2883 [pii]
- (114) Liu Z, Guo BL, Gehrs BC, Nan L, Lopez RD (2005) Ex vivo expanded human Vgamma9Vdelta2+ gammadelta-T cells mediate innate antitumor activity against human prostate cancer cells in vitro. *J.Urol.* 173 (5): 1552-1556. Online im Internet: DOI: 00005392-200505000-00032 [pii]

- (115) Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J.Immunol.* 169 (5): 2756-2761. Online im Internet:
- (116) Longnecker R, Kieff E (1990) A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J.Virol.* 64 (5): 2319-2326. Online im Internet:
- (117) Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F (2007) Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol.* 28 (5): 227-233. Online im Internet: DOI: S1471-4906(07)00079-8 [pii]
- (118) Mackay CR, Hein WR (1989) A large proportion of bovine T cells express the gamma delta T cell receptor and show a distinct tissue distribution and surface phenotype. *Int.Immunol.* 1 (5): 540-545. Online im Internet:
- (119) Manicassamy S, Reizis B, Ravindran R, Nakaya H, Salazar-Gonzalez RM, Wang YC, et al. (2010) Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* 329 (5993): 849-853. Online im Internet: DOI: 10.1126/science.1188510 [doi]
- (120) Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K (2001) Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. *Blood* 97 (11): 3333-3341. Online im Internet:
- (121) Mao C, Mou X, Zhou Y, Yuan G, Xu C, Liu H, et al. (2014) Tumor-activated TCRgammadelta(+) T cells from gastric cancer patients induce the antitumor immune response of TCRAlphabeta(+) T cells via their antigen-presenting cell-like effects. *J.Immunol.Res.* 2014: 593562. Online im Internet: DOI: 10.1155/2014/593562 [doi]
- (122) McCurley N, Mellman I (2010) Monocyte-derived dendritic cells exhibit increased levels of lysosomal proteolysis as compared to other human dendritic cell populations. *PLoS One* 5 (8): e11949. Online im Internet: DOI: 10.1371/journal.pone.0011949 [doi]
- (123) McVay LD, Carding SR, Bottomly K, Hayday AC (1991) Regulated expression and structure of T cell receptor gamma/delta transcripts in human thymic ontogeny. *EMBO J.* 10 (1): 83-91. Online im Internet:
- (124) McVay LD, Jaswal SS, Kennedy C, Hayday A, Carding SR (1998) The generation of human gammadelta T cell repertoires during fetal development. *J.Immunol.* 160 (12): 5851-5860. Online im Internet:
- (125) Melief CJM (2008) Cancer Immunotherapy by Dendritic Cells. *Immunity* 29 (3): 372-383. Online im Internet: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.08.004>
URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761308003750>

- (126) Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A (1990) High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11 (2): 231-238. Online im Internet: DOI: 10.1002/cyto.990110203 [doi]
- (127) Misra N, Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Kazatchkine MD, Kaveri SV (2004) Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J.Immunol.* 172 (8): 4676-4680. Online im Internet:
- (128) Miyagawa F, Tanaka Y, Yamashita S, Minato N (2001) Essential requirement of antigen presentation by monocyte lineage cells for the activation of primary human gamma delta T cells by aminobisphosphonate antigen. *J.Immunol.* 166 (9): 5508-5514. Online im Internet:
- (129) Miyara M, Sakaguchi S (2007) Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol.Med.* 13 (3): 108-116. Online im Internet: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2007.01.003> URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491407000044>
- (130) Molldrem JJ, Lee PP, Kant S, Wieder E, Jiang W, Lu S, et al. (2003) Chronic myelogenous leukemia shapes host immunity by selective deletion of high-avidity leukemia-specific T cells. *J.Clin.Invest.* 111 (5): 639-647. Online im Internet: DOI: 10.1172/JCI16398 [doi]
- (131) Morita CT, Verma S, Aparicio P, Martinez C, Spits H, Brenner MB (1991) Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells. *Eur.J.Immunol.* 21 (12): 2999-3007. Online im Internet: DOI: 10.1002/eji.1830211215 [doi]
- (132) Morita CT, Beckman EM, Bukowski JF, Tanaka Y, Band H, Bloom BR, et al. (1995) Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* 3 (4): 495-507. Online im Internet: DOI: 1074-7613(95)90178-7 [pii]
- (133) Morita CT, Mariuzza RA, Brenner MB (2000) Antigen recognition by human gamma delta T cells: pattern recognition by the adaptive immune system. *Springer Semin.Immunopathol.* 22 (3): 191-217. Online im Internet:
- (134) Nair RE, Kilinc MO, Jones SA, Egilmez NK (2006) Chronic immune therapy induces a progressive increase in intratumoral T suppressor activity and a concurrent loss of tumor-specific CD8+ T effectors in her-2/neu transgenic mice bearing advanced spontaneous tumors. *J.Immunol.* 176 (12): 7325-7334. Online im Internet: DOI: 176/12/7325 [pii]
- (135) Nakata M, Smyth MJ, Norihisa Y, Kawasaki A, Shinkai Y, Okumura K, et al. (1990) Constitutive expression of pore-forming protein in peripheral blood gamma/delta T cells: implication for their cytotoxic role in vivo. *J.Exp.Med.* 172 (6): 1877-1880. Online im Internet:

- (136) Neidhardt-Berard EM, Berard F, Banchereau J, Palucka AK (2004) Dendritic cells loaded with killed breast cancer cells induce differentiation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Breast Cancer Res.* 6 (4): R322-8. Online im Internet: DOI: 10.1186/bcr794 [doi]
- (137) Nemazee D (2006) Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat.Rev.Immunol.* 6 (10): 728-740. Online im Internet: DOI: nri1939 [pii]
- (138) Niedobitek G, Kremmer E, Herbst H, Whitehead L, Dawson CW, Niedobitek E, et al. (1997) Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood* 90 (4): 1664-1672. Online im Internet:
- (139) Nijman HW, Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Oorschot VM, Vierboom MP, van de Keur M, et al. (1995) Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J.Exp.Med.* 182 (1): 163-174. Online im Internet:
- (140) Nishikawa H, Sakaguchi S (2010) Regulatory T cells in tumor immunity. *Int.J.Cancer* 127 (4): 759-767. Online im Internet: DOI: 10.1002/ijc.25429 [doi]
- (141) Nishikawa H, Sakaguchi S (2014) Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr.Opin.Immunol.* 27 (0): 1-7. Online im Internet: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2013.12.005> URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0952791513002239>
- (142) Norbury CC, Chambers BJ, Prescott AR, Ljunggren HG, Watts C (1997) Constitutive macropinocytosis allows TAP-dependent major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble antigen by bone marrow-derived dendritic cells. *Eur.J.Immunol.* 27 (1): 280-288. Online im Internet: DOI: 10.1002/eji.1830270141 [doi]
- (143) Nouri-Shirazi M, Banchereau J, Bell D, Burkeholder S, Kraus ET, Davoust J, et al. (2000) Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses. *J.Immunol.* 165 (7): 3797-3803. Online im Internet:
- (144) Onishi Y, Fehervari Z, Yamaguchi T, Sakaguchi S (2008) Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 105 (29): 10113-10118. Online im Internet: DOI: 10.1073/pnas.0711106105 [doi]
- (145) Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2005) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 65 (6): 2457-2464. Online im Internet: DOI: 65/6/2457 [pii]

- (146) Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck JP, Johnston DA, et al. (2006) Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *J.Immunother.* 29 (5): 545-557. Online im Internet: DOI: 10.1097/01.cji.0000211309.90621.8b [doi]
- (147) Palucka K, Banchereau J (2012) Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat.Rev.Cancer.* 12 (4): 265-277. Online im Internet: DOI: 10.1038/nrc3258; 10.1038/nrc3258
- (148) Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ (2007) CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat.Immunol.* 8 (12): 1353-1362. Online im Internet: DOI: ni1536 [pii]
- (149) Parker CM, Groh V, Band H, Porcelli SA, Morita C, Fabbi M, et al. (1990) Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J.Exp.Med.* 171 (5): 1597-1612. Online im Internet:
- (150) Petermann F, Rothhammer V, Claussen MC, Haas JD, Blanco LR, Heink S, et al. (2010) gammadelta T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism. *Immunity* 33 (3): 351-363. Online im Internet: DOI: 10.1016/j.immuni.2010.08.013 [doi]
- (151) Piconese S, Valzasina B, Colombo MP (2008) OX40 triggering blocks suppression by regulatory T cells and facilitates tumor rejection. *J.Exp.Med.* 205 (4): 825-839. Online im Internet: DOI: 10.1084/jem.20071341 [doi]
- (152) Preston CC, Maurer MJ, Oberg AL, Visscher DW, Kalli KR, Hartmann LC, et al. (2013) The ratios of CD8+ T cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T cells correlate with poor clinical outcome in human serous ovarian cancer. *PLoS One* 8 (11): e80063. Online im Internet: DOI: 10.1371/journal.pone.0080063 [doi]
- (153) Pudney VA, Leese AM, Rickinson AB, Hislop AD (2005) CD8+ immunodominance among Epstein-Barr virus lytic cycle antigens directly reflects the efficiency of antigen presentation in lytically infected cells. *J.Exp.Med.* 201 (3): 349-360. Online im Internet: DOI: jem.20041542 [pii]
- (154) Qureshi OS, Zheng Y, Nakamura K, Attridge K, Manzotti C, Schmidt EM, et al. (2011) Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* 332 (6029): 600-603. Online im Internet: DOI: 10.1126/science.1202947 [doi]
- (155) Ribot JC, debarros A, Silva-Santos B (2011) Searching for "signal 2": costimulation requirements of gammadelta T cells. *Cell Mol.Life Sci.* 68 (14): 2345-2355. Online im Internet: DOI: 10.1007/s00018-011-0698-2 [doi]

(156) Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, et al. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J.Exp.Med.* 180 (1): 83-93. Online im Internet:

(157) Rossig C (2014) Zellulare Immuntherapien als Kombinationspartner für die Immun-Checkpoint-Blockade. *Oncol.Res.Treat.* 37 Suppl 4: 14-15. Online im Internet: DOI: 000366434 [pii]

(158) Rust CJ, Verreck F, Vietor H, Koning F (1990) Specific recognition of staphylococcal enterotoxin A by human T cells bearing receptors with the V gamma 9 region. *Nature* 346 (6284): 572-574. Online im Internet: DOI: 10.1038/346572a0 [doi]

(159) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J.Immunol.* 155 (3): 1151-1164. Online im Internet:

(160) Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. (2001) Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol.Rev.* 182: 18-32. Online im Internet: DOI: 1820102 [pii]

(161) Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T (2009) Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int.Immunol.* 21 (10): 1105-1111. Online im Internet: DOI: 10.1093/intimm/dxp095 [doi]

(162) Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182 (2): 389-400. Online im Internet:

(163) Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer* 98 (5): 1089-1099. Online im Internet: DOI: 10.1002/cncr.11618 [doi]

(164) Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. (2005) Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 102 (51): 18538-18543. Online im Internet: DOI: 0509182102 [pii]

(165) Schaefer C, Kim GG, Albers A, Hoermann K, Myers EN, Whiteside TL (2005) Characteristics of CD4+CD25+ regulatory T cells in the peripheral circulation of patients with head and neck cancer. *Br.J.Cancer* 92 (5): 913-920. Online im Internet: DOI: 6602407 [pii]

- (166) Schild H, Mavaddat N, Litzenberger C, Ehrlich EW, Davis MM, Bluestone JA, et al. (1994) The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 76 (1): 29-37. Online im Internet: DOI: 0092-8674(94)90170-8 [pii]
- (167) Schmid D, Pypaert M, Munz C (2007) Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26 (1): 79-92. Online im Internet: DOI: S1074-7613(06)00525-5 [pii]
- (168) Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat.Immunol.* 2 (10): 947-950. Online im Internet: DOI: 10.1038/ni712 [doi]
- (169) Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF (2001) Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J.Biol.Chem.* 276 (40): 37672-37679. Online im Internet: DOI: 10.1074/jbc.M104521200 [doi]
- (170) Shortman K, Liu YJ (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat.Rev.Immunol.* 2 (3): 151-161. Online im Internet: DOI: 10.1038/nri746
- (171) Shortman K, Naik SH (2007) Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat.Rev.Immunol.* 7 (1): 19-30. Online im Internet: DOI: 10.1038/nri1996
- (172) Silbernagel S, Despopoulos A (2007 (Erstaufgabe 1979)) Immunabwehr. In: Immunabwehr. Taschenatlas Physiologie. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, Germany, 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage, S. 94-99
- (173) Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD (1988) A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J.Exp.Med.* 167 (2): 315-322. Online im Internet:
- (174) Spada FM, Grant EP, Peters PJ, Sugita M, Melian A, Leslie DS, et al. (2000) Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J.Exp.Med.* 191 (6): 937-948. Online im Internet:
- (175) Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G (2007) Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J.Exp.Med.* 204 (6): 1441-1451. Online im Internet: DOI: jem.20070021 [pii]
- (176) Steinman RM (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu.Rev.Immunol.* 9: 271-296. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415 [doi]
- (177) Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 21: 685-711. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040

- (178) Steinman RM, Banchereau J (2007) Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 449 (7161): 419-426. Online im Internet: DOI: 10.1038/nature06175
- (179) Steinman RM, Cohn ZA (2007) Pillars Article: Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice. I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *J. Exp. Med.* 197. 137: 1142–1162. *The Journal of Immunology* 178 (1): 5-25. Online im Internet: URL: <http://www.jimmunol.org/content/178/1/5.short>
- (180) Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT (2003) CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J.Exp.Med.* 198 (6): 889-901. Online im Internet: DOI: 10.1084/jem.20030171 [doi]
- (181) Swiecki M, Colonna M (2010) Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunol.Rev.* 234 (1): 142-162. Online im Internet: DOI: 10.1111/j.0105-2896.2009.00881.x [doi]
- (182) Szabolcs P, Moore MA, Young JW (1995) Expansion of immunostimulatory dendritic cells among the myeloid progeny of human CD34+ bone marrow precursors cultured with c-kit ligand, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and TNF-alpha. *J.Immunol.* 154 (11): 5851-5861. Online im Internet:
- (183) Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int.Immunol.* 10 (12): 1969-1980. Online im Internet:
- (184) Tas MP, Simons PJ, Balm FJ, Drexhage HA (1993) Depressed monocyte polarization and clustering of dendritic cells in patients with head and neck cancer: in vitro restoration of this immunosuppression by thymic hormones. *Cancer Immunol.Immunother.* 36 (2): 108-114. Online im Internet:
- (185) Thompson K, Rogers MJ (2004) Statins prevent bisphosphonate-induced gamma,delta-T-cell proliferation and activation in vitro. *J.Bone Miner.Res.* 19 (2): 278-288. Online im Internet: DOI: 10.1359/JBMR.0301230 [doi]
- (186) Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J.Exp.Med.* 188 (2): 287-296. Online im Internet:
- (187) Thornton AM, Shevach EM (2000) Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J.Immunol.* 164 (1): 183-190. Online im Internet: DOI: [ji_v164n1p183](https://doi.org/10.1002/ji.v164n1p183) [pii]
- (188) Todaro M, D'Asaro M, Caccamo N, Iovino F, Francipane MG, Meraviglia S, et al. (2009) Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *J.Immunol.* 182 (11): 7287-7296. Online im Internet: DOI: 10.4049/jimmunol.0804288 [doi]

- (189) Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. (2012) Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N.Engl.J.Med.* 366 (26): 2443-2454. Online im Internet: DOI: 10.1056/NEJMoa1200690 [doi]
- (190) Vantourout P, Hayday A (2013) Six-of-the-best: unique contributions of gamma-delta T cells to immunology. *Nat.Rev.Immunol.* 13 (2): 88-100. Online im Internet: DOI: 10.1038/nri3384 [doi]
- (191) Varnholt L (2011) Eine neue Generation Antigen-präsentierender Zellen für die adoptive Immuntherapie. Inaugural Dissertation, Medizinische Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster: 29-29
- (192) Vega-Ramos J, Villadangos JA (2013) Consequences of direct and indirect activation of dendritic cells on antigen presentation: Functional implications and clinical considerations. *Mol.Immunol.* 55 (2): 175-178. Online im Internet: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molimm.2012.10.034> URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0161589012004488>
- (193) Verdijk P, Aarntzen EH, Lesterhuis WJ, Boullart AC, Kok E, van Rossum MM, et al. (2009) Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin.Cancer Res.* 15 (7): 2531-2540. Online im Internet: DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2729 [doi]
- (194) Victora GD, Nussenzweig MC (2012) Germinal centers. *Annu.Rev.Immunol.* 30: 429-457. Online im Internet: DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032 [doi]
- (195) Villadangos JA, Young L (2008) Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity* 29 (3): 352-361. Online im Internet: DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.002> URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1074761308003816>
- (196) Waring P, Mullbacher A (1999) Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol.Cell Biol.* 77 (4): 312-317. Online im Internet: DOI: icb837 [pii]
- (197) Welsch U (2003) Blutzellen. In: Welsch U (Hrsg) *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 1. Auflage, S. 195-200
- (198) Welsch U (2003) Immunsystem (lymphatisches System). In: Welsch U (Hrsg) *Lehrbuch Histologie*. Urban & Fischer Verlag, München, Jena, 1. Auflage, S. 233-242
- (199) Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. (2008) CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 322 (5899): 271-275. Online im Internet: DOI: 10.1126/science.1160062 [doi]

- (200) Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, et al. (1997) Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J.Exp.Med.* 185 (2): 317-328. Online im Internet:
- (201) Wojas K, Tabarkiewicz J, Jankiewicz M, Rolinski J (2004) Dendritic cells in peripheral blood of patients with breast and lung cancer--a pilot study. *Folia Histochem.Cytobiol.* 42 (1): 45-48. Online im Internet:
- (202) Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstien B (2003) Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. *Clin.Cancer Res.* 9 (2): 606-612. Online im Internet:
- (203) Wu YL, Ding YP, Tanaka Y, Shen LW, Wei CH, Minato N, et al. (2014) gamma-delta T cells and their potential for immunotherapy. *Int.J.Biol.Sci.* 10 (2): 119-135. Online im Internet: DOI: 10.7150/ijbs.7823 [doi]
- (204) Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. (2004) Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int.Immunol.* 16 (11): 1643-1656. Online im Internet: DOI: dxh165 [pii]
- (205) Zhao DM, Thornton AM, DiPaolo RJ, Shevach EM (2006) Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood* 107 (10): 3925-3932. Online im Internet: DOI: 2005-11-4502 [pii]
- (206) Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, et al. (2005) Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22 (5): 571-581. Online im Internet: DOI: S1074-7613(05)00104-4 [pii]

6 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
APC	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
BZLF	Bam H1 Z fragment leftward open reading frame
CCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte, Zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated Protein 4
DC	Dendritische Zelle
DC+RAK	RAK-peptidbeladene dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiaminteraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FACS	fluorescens activated cell sorting, Durchflusszytometrie fluoreszenz-markierter Zellen
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiozyanit
FOXP3	Forkhead box P3
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (bei Angaben zur Zentrifuge)
GITR	Glucocorticoid induced tumor necrosis factor receptor family related gene
Glu	Glutamin
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

HLA	Human leukocyte antigen
HMB-PP	(<i>E</i>)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl Pyrophosphat
IDO	Indolamine 2,3-dioxygenase
IFN-γ	Interferon gamma
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IPP	Isopentyl-Pyrophosphat
KGF	Keratinocyte growth factor
l	Liter
LMP	Latent membrane proteine
LPS	Lipolpolysaccharid
M	Mol
m	Milli
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MEP	Methylerythritolphosphatweg
MHC	Major Histocompatibility Complex
MICA	MHC-Class I Chain-Related Protein A
MICB	MHC-Class I Chain-Related Protein B
n	Number (Anzahl der Experimente/Spender)
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NKG2D	Natural-killer group 2, membrane D, Rezeptor auf der Oberfläche von NK- und CD8 ⁺ -Zellen
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OX40	Oberflächenmarker einiger T-Zellen, Mitglied der TNF-Rezeptor-Superfamilie
p	probability, Signifikanzwert
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell, mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline
PD-1	programmed cell death protein 1

pDC	Plasmozytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCp	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Complex
PFA	Paraformaldehyd
PRAME	preferentially expressed antigen in melanoma
RAK	RAKFKQLL
rh	rekombinantes humanes
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
SEA	Staphylococcal enterotoxin A
STEAP 1	six transmembrane epithelial antigen of the prostate
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Tumor growth factor
T_{H1}, T_{H2}, T_{H0}, T_{H17}	Untergruppen von T-Helferzellen
TNF-α	Tumornekrosefaktor alpha
Treg	Regulatorische T-Zelle
U	Unit
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Vδ1⁺-T-Zelle, Vγ9Vδ2⁺-T- Zelle	Untergruppen von $\gamma\delta$ -T-Zellen
$\alpha\beta$-T-Zelle	T-Zelle, welche den $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor exprimiert
$\gamma\delta$+RAK	RAK-peptidbeladene $\gamma\delta$ -T-Zelle
$\gamma\delta$-T-Zelle	T-Zelle, welche den $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor exprimiert
μ	Mittelwert (bei Statistik)
μ	Mikro
σ	Standardabweichung

Lebenslauf

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei ...

... Herrn Universitäts-Professor Dr. Jürgens und Frau Universitäts-Professorin Dr. Rössig für die Möglichkeit in der Klinik für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie zu promovieren. Ein besonderer Dank gilt hierbei Frau Prof. Dr. Rössig, ohne deren Engagement, Begeisterungsfähigkeit, Zuversicht und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

... der Arbeitsgruppe Rössig, insbesondere Silke Jamitzky und Bianca Altvater, für die unermüdliche Hilfsbereitschaft, Unterstützung und die Angenehme Zusammenarbeit; für die stetigen Tipps und Tricks während der Forschungsarbeiten sowie das stets offene Ohr darüber hinaus.

... meinen Eltern und meinem Bruder, die mir stets die Zuversicht gaben, dass auch ein gewundener Weg zum Ziel führt und die Reise lohnt.

... meinen Freunden und übrigen Verwandten, die neben unermüdlichem Zuspruch auch für die nötige Ablenkung da waren.