



Fakultät für Medizin

Die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immunität gegen das Epstein-Barr-Virus

Sandra Felicitas Brancato

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Uta Behrends
2. Prof. Dr. Stefan Burdach

Die Dissertation wurde am 12.12.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 10.10.2018 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis.....	1
2	Einleitung	3
2.1	$\gamma\delta$-T-Zellen.....	3
2.2	Der $\gamma\delta$-T-Zell-Rezeptor	3
2.2.1	$\gamma\delta$ -T-Zell-Antigene	4
2.2.2	Immunobiologische Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen	6
2.2.3	Oberflächenmoleküle auf $\gamma\delta$ -T-Zellen	7
2.2.4	Therapeutische Bedeutung der $\gamma\delta$ -T-Zellen	8
2.3	Das Epstein-Barr-Virus.....	10
2.3.1	EBV-kodierte Proteine.....	10
2.3.2	Die lymphoblastoide Zelllinie als Latenz-Modell	12
2.3.3	EBV-assoziierte Krankheiten.....	12
2.4	$\gamma\delta$-T-Zellen und EBV.....	13
3	Problemstellung.....	14
4	Material und Methodik.....	15
4.1	Material	15
4.1.1	Geräte.....	15
4.1.2	Chemikalien und kommerzielle Reagenzien.....	16
4.1.3	Stammlösungen und Puffer.....	17
4.1.4	Antikörper	17
4.1.5	Enzyme	18
4.1.6	Zytokine.....	18
4.1.7	Kommerzielle Kits.....	18
4.1.8	Primer	19
4.1.9	Zelllinien	19
4.1.10	Blutspender und HLA-Typen.....	20
4.1.11	Software und Datenbanken	21
4.2	Methoden	21
4.2.1	Kultivierung und Analyse von Zellen	21
4.2.2	Molekularbiologische Methoden	26

5	Ergebnisse	28
5.1	Herstellung und Charakterisierung von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen	28
5.2	Herstellung von B-Zelllinien	33
5.3	Funktionelle Analyse der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone	35
5.3.1	Spender A	35
5.3.2	Spender B	42
5.3.3	Spender C	48
5.3.4	Spender D und E	52
5.3.5	$\gamma\delta$ -TCR-Sequenzierung.....	57
6	Diskussion.....	60
6.1	Klonierung und Kultivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	61
6.2	Funktionelle Analyse von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen.....	63
6.3	$\gamma\delta$ -TCR-Analyse.....	66
7	Zusammenfassung	68
8	Literaturverzeichnis	69

1 Abkürzungsverzeichnis

allo	allogen
AP	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
auto	autolog
BARF	<i>BamH1A rightward reading frame</i> Transkripte
BBL	B-Blasten
BCR	B-Zell-Rezeptor
CAEBV	chronisch-aktive EBV-Infektion
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDR	<i>complementary determining region</i>
CMV	Cytomegalievirus
Cy7	Cyanin7
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBER	<i>Epstein-Barr virus encoded mRNA</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr virus nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPCR	endotheliale Protein-C-Rezeptor
FACS	Durchflusszytometrie, engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FBS	fötales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GvHD	Graft-versus-Host-Krankheit
Gy	Gray
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HMB-PP	Hydroxymethylbutenylpyrophosphat
IL	Interleukin
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KIR	Killerzellen-Immunglobulin-ähnlicher-Rezeptor
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie, engl. <i>lymphoblastoid cell line</i>

LMP	Latentes Membranprotein
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIC	<i>MHC class I polypeptide-related sequence</i>
miRNA	microRNA
n.b.	nicht bestimmt
NCAM	Neurales Zelladhäsionsprotein
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKG	<i>natural killer group</i>
NKR	NK-Zell-Rezeptor
NPC	Nasopharynx-Karzinom
PAL	Pyothorax-assoziiertes Lymphom
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Bluts
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PTLD	Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung
RAG	<i>recombination-activating gene</i>
s	„Schmiereffekt“
Sp.	Spender
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor, engl. <i>T cell receptor</i>
ULBP	<i>UL-16-binding protein</i>
ZT	Zytotoxizität untersucht

2 Einleitung

T-Zellen zählen zu den Hauptakteuren der zellulären Immunantwort. Die Mehrheit dieser im Thymus heranreifenden Lymphozyten exprimiert einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor (TCR), der eng mit dem CD3-Komplex zusammenwirkt. Anhand der Expression einer der TCR-Korezeptoren CD8 oder CD4 lassen sich $\alpha\beta$ -T-Zellen in zwei funktionelle Gruppen unterteilen. CD8-tragende T-Zellen verfügen über zytotoxische Funktionen, wohingegen T-Zellen, die den Corezeptor CD4 exprimieren, T-Helferzellen genannt werden. Beiden T-Zellklassen ist ein TCR gemeinsam, der als Antigen einen Komplex aus einem MHC-Molekül und einem Peptid erkennt. Bei CD8-T-Zellen geschieht dies über MHC-Moleküle der Klasse I, CD4-T-Zellen werden Antigene auf MHC-Moleküle der Klasse II präsentiert.

Seit Mitte der 80er Jahre ist bekannt, dass bei allen Kieftieren neben $\alpha\beta$ -T-Lymphozyten auch T-Zellen existieren, die einen alternativen TCR – bestehend aus einem $\gamma\delta$ -Heterodimer – exprimieren (Saito et al. 1984, Bank et al. 1986). Wie auch die meisten $\alpha\beta$ -T-Zellen gehören sie zu den CD3⁺-Lymphozyten. Zu ihren Effektorfunktionen gehören Zytotoxizität und die Fähigkeit, Zytokine zu sezernieren. Dennoch weiß man heute, dass sich ihre Aufgaben und Funktionsweisen von denen konventioneller T-Zellen unterscheiden.

2.1 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Seit ihrer Entdeckung wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen intensiv erforscht. Zwar ist ihre Funktion noch nicht vollständig geklärt, fest steht jedoch, dass sie einen ausschlaggebenden Beitrag zur Immunfunktion leisten. Sie spielen eine Rolle bei der Tumorbekämpfung, der Abwehr von Infektionen durch intra- und extrazelluläre Erreger und der Homöostase der Immunantwort (Bonneville et al. 2010, Chien et al. 2014). Im peripheren Blut eines Erwachsenen bilden $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einem Anteil von 1-10 % nur einen kleinen Anteil der Lymphozyten, während ihr Anteil in epitheliale Gewebe weit höher ist (Deusch et al. 1991). Von den im Blut zirkulierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert bei den meisten Menschen der Großteil V γ 9V δ 2⁺-TCRs (Borst et al. 1989, Casorati et al. 1989). Dagegen findet man in epithelialen Gewebe, wie dem Gastrointestinaltrakt, hauptsächlich V δ 1⁺-Zellen (Deusch et al. 1991).

2.2 Der $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptor

Wie $\alpha\beta$ -T-Zellen und B-Zellen sind auch $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Lage mittels V(D)J-Rearrangement einen variablen Rezeptor zu generieren. Bei menschlichen $\gamma\delta$ -T-Zellen liegt

der γ -Locus (TCRG) auf Chromosom 7 (Bensmana et al. 1991) und beinhaltet verschiedene V-, C- und J-Gensegmente, allerdings kein D-Segment. Beim Menschen unterscheidet man sechs funktionelle $V\gamma$ -Gensegmente. Der TCR- δ -Genlocus liegt auf Chromosom 14 und ist mit dem TCR- α -Lokus verschränkt. Dennoch werden in der Entwicklung im Thymus zuerst TCR- δ -Ketten vor den TCR- α -Ketten gebildet (Chien et al. 1987, Takihara et al. 1988). Bei der Rekombination von TCR- δ -Ketten können drei als $V\delta 1-3$ bezeichnete Gensegmente genutzt werden (die nur in TCR- δ -Ketten vorkommen) und zusätzlich fünf V-Gensegmente, die sowohl in TCR- δ -Ketten als auch TCR- α -Ketten vorkommen, sodass insgesamt acht mögliche $V\delta$ -Segmente zu Verfügung stehen. Die Anzahl der V-Gen-Segmente für die γ - und δ -Kette ist somit wesentlich geringer als für $\alpha\beta$ -TCRs oder Immunglobuline (Murphy et al. 2009). Dennoch verfügen $\gamma\delta$ -T-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen über eine potenziell höhere Diversität ihres TCRs (ungefähr 10^{18} Kombinationsmöglichkeiten) (Chien et al. 2007). Dies wird durch die Insertion von N-Nukleotiden zwischen die Joining-Segmente (N-Regionen-Diversifikation) und die Nutzung dreier offener Leseraster pro $D\delta$ -Gensegment ermöglicht (Rock et al. 1994, Born et al. 2013). Ähnlich wie beim Aufbau von Immunglobulinen ist die CDR3-Regionen der TCR- δ -Kette lang und variabel, wohingegen sie bei der γ -Kette kurz ist (Rock et al. 1994, Chien et al. 2014).

2.2.1 $\gamma\delta$ -T-Zell-Antigene

Für bestimmte $\gamma\delta$ -Subtypen wurden mittlerweile verschiedene Formen der Antigenerkennung beschrieben, die sich grundlegend von derjenigen konventioneller T-Zellen unterscheiden. $\gamma\delta$ -T-Zellen sind polyspezifisch, ihr Antigenrepertoire ist strukturell mannigfaltig. Es reicht von MHC-ähnlichen und Nicht-MHC-Oberflächenmolekülen über lösliche Proteine variabler Größe bis hin zu Phosphoantigenen. Im Folgenden werden zur Übersicht beispielhaft einige Antigene dargestellt.

2.2.1.1 MHC-ähnliche Moleküle

Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen konnte für $\gamma\delta$ -T-Zellen bisher nicht gezeigt werden, dass sie Antigene über die Präsentation auf MHC-Molekülen erkennen. Allerdings steht mittlerweile fest, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen in Interaktion mit MHC-ähnlichen Molekülen stehen. Bei zellulärem Stress, wie im Falle von Tumortransformation oder Infektion werden beispielsweise die MHC-I-verwandten Oberflächenmoleküle MIC (engl. *MHC Class I polypeptide-related*

sequence) A, MICB oder UL-16 bindendes Protein (ULBP) hochreguliert (Murphy et al. 2009). MICA und MICB werden von $\gamma\delta$ -T-Zellen, genauer von $V\delta 1^+$ -T-Zellen, der intestinalen Schleimhaut unabhängig von einer Antigenprozessierung erkannt (Groh et al. 1998). Wie genau die Interaktion zwischen Antigen und $\gamma\delta$ -T-Zelle von statten geht, ist nicht vollständig geklärt. Diese Moleküle sind bekannte Liganden des Rezeptors NKG2D (engl. *natural killer group 2, member D*), der unter natürlichen Killer(NK-)zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und CD8-Zellen weit verbreitet ist (Ribot et al. 2011). Allerdings wird auch eine direkte Bindung durch den $\gamma\delta$ -TCR vermutet (Wu et al. 2002, Kong et al. 2009). Die Liganden können mit unterschiedlicher Bindungskinetik sowohl von NKG2D als auch vom $\gamma\delta$ -TCR gebunden und erkannt werden, beispielsweise wurde die Struktur eines solchen Komplexes zwischen MICA und dem $\gamma\delta$ -TCR bereits röntgenkristallographisch aufgeklärt (Xu et al. 2011). Der Zusammenhang und die Hierarchie von $\gamma\delta$ -TCR und NKG2D wird kontrovers diskutiert, da unklar ist, ob deren Aktivierung einzeln oder simultan im Sinne einer Kostimulation abläuft (Correia et al. 2013).

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind ferner in der Lage, mikrobielle Lipide zu erkennen, die auf CD1-Molekülen präsentiert werden. CD1-Moleküle sind ebenfalls enge Verwandte der MHC-Moleküle. Es konnte gezeigt werden, dass rekombinante $V\delta 1^+$ -TCRs direkt an CD1d-Moleküle binden und $\delta 1^+$ -T-Zellen mit Interferon- γ - und Granulysin-Ausschüttung auf den Kontakt mit CD1c-Molekülen reagieren (Spada et al. 2000, Sugita et al. 2000, Bai et al. 2012).

Ein weiteres MHC-ähnliches Antigen könnte der endotheliale Protein-C-Rezeptor (EPCR) darstellen. Beim Menschen wird er von Endothelzellen exprimiert und hat dort eine protektive Funktion bei Entzündung oder Hypoxie. EPCR wird durch zelluläre Transformation und Infektion hochreguliert und bindet, ähnlich wie das Molekül CD1, an Lipide. Es konnte ein $V\gamma 4V\delta 5$ -TCR identifiziert werden, der EPCR unabhängig von dem Lipid band, mit dem es beladen wurde. (Willcox et al. 2012)

2.2.1.2 Phosphoantigene

Einen Durchbruch im Verständnis der Funktionsweise humaner $\gamma\delta$ -T-Zellen brachte die Identifizierung sogenannter Phosphoantigene als potente Aktivatoren von $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR-exprimierenden Lymphozyten (Tanaka et al. 1994). Phosphoantigene sind nicht-peptidische Prenylpyrophosphate. Sie entstehen als Zwischenmetabolite während des Isoprenoid-Biosynthesewegs, dessen Produkte essentiell für das Überleben sowohl mikrobieller als

auch eukaryotischer Zellen sind. Mikrobielle Phosphoantigene wie Hydroxymethylbutenylpyrophosphat (HMB-PP) entstehen bei der mevalonatunabhängigen Isoprenoid-Biosynthese in Bakterien (Nedellec et al. 2010). Sie können bereits in nanomolaren Konzentrationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt werden und diese aktivieren (Belmant et al. 2000). Ein in eukaryotischen Zellen ubiquitäres Phosphoantigen aus der Mevalonatsynthese ist Isopentenylpyrophosphat (IPP). $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen erkennen dieses Phosphoantigen erst in mikromolaren Konzentrationen, die durch zelluläre Transformation, jedoch nicht in gesundem Gewebe zustande kommen und somit als physiologisches Warnsignal dienen (Gober et al. 2003). Bereits früh wurde gezeigt, dass bei der Erkennung von Phosphoantigenen eine TCR-Abhängigkeit, allerdings keine MHC-Restriktion vorliegt (Lang et al. 1995). Eine T-Zell-Aktivierung durch Moleküle von solch geringer Größe erfordert Antigenpräsentation durch bestimmte Nachbarzellen (Lang et al. 1995, Morita et al. 1995, Allison et al. 2001). Zunächst wurde die Hypothese verfolgt, dass die F_1 ATPase, eine Form der mitochondrialen ATP-Synthase, die auf Tumorzellen ektop an der Zelloberfläche exprimiert wird, bei der Interaktion von $\gamma\delta$ -TCR und Phosphoantigenen womöglich als Verbindungsglied fungiert (Scotet et al. 2005, Mookerjee-Basu et al. 2010). Neuere Studien deuten darauf hin, dass das Molekül CD277 (BTN3A1), ein Mitglied der Butyrophilin-Familie, Phosphoantigene gegenüber $\gamma 9\delta 2$ -T-Zellen präsentiert. Intrazelluläre Akkumulation von Phosphoantigenen in gestressten Zellen bewirkt eine Konformationsänderung von membranständigem CD277, die von $V\gamma 9V\delta 2$ -T-Zellen erkannt wird (Harly et al. 2012). Butyrophilin 3A1 bindet Phosphoantigene und der modifizierte Komplex interagiert direkt mit dem $V\gamma 9V\delta 2$ -TCR (Vavassori et al. 2013).

2.2.2 Immunobiologische Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Ein aktuelles Konzept um das komplexe Verhalten von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu beschreiben, beinhaltet ihre Zuordnung in den Randbereich zwischen adaptivem und angeborenem Immunsystem (Kabelitz 2011). Die Herkunft und Entstehung ihres TCRs legt nahe, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen zum adaptiven Immunsystem zu zählen sind. $\gamma\delta$ -T-Zellen lagern, wie auch $\alpha\beta$ -T-Zellen, mittels RAG-1 und RAG-2 Rekombinasen ihre TCR-Rezeptorgene um, woraus eine große Rezeptorvielfalt resultiert. Die nahe Verwandtschaft zwischen beiden Arten von T-Lymphozyten zeigt sich auch darin, dass sich der Genort für den δ -TCR inmitten des TCRA-Lokus befindet (Vantourout et al. 2013). Eine antigenspezifische Gedächtnisfunktion von $\gamma\delta$ -

T-Zellen ist noch umstritten. Typische Gedächtniszellmarker, wie CD45RO, kommen auf $\gamma\delta$ -T-Zellen vor und folgen einem Expressionsmuster, wie es auch für $\alpha\beta^+$ -Gedächtnis-T-Zellen typisch ist (Eberl et al. 2002, Gioia et al. 2002, Dieli et al. 2003). Ob diese Marker bei $\gamma\delta$ -T-Zellen die gleiche Bedeutung besitzen wie bei $\alpha\beta$ -T-Zellen, ist noch nicht klar.

Trotz dieser Parallelen zum adaptiven Immunsystem haben Forschungen der letzten Jahre ihre Rolle in der angeborenen Immunantwort enthüllt. Bereits die anatomische Verteilung lässt auf eine „innate-ähnliche“ Funktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen schließen. Ähnlich wie Zellen des angeborenen Immunsystems befindet sich der Großteil der $\gamma\delta$ -T-Zellen an vorderster Front in den epithelialen Geweben des Körpers (Bonneville et al. 2010). Dort exprimieren sie trotz ihres hohen Diversitätspotenzials meist klonale oder oligoklonale TCRs, die jeweils spezifisch für das Gewebe sind, in dem sie sich befinden (Itohara et al. 1990). Dadurch kann eine zeitraubende Amplifikation von Lymphozyten umgangen werden, indem viele $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten ohne eine notwendige klonale Expansion gleichzeitig und schnell durch ein Antigen aktiviert werden. Die Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen erfordert keine Antigenprozessierung, sondern wird vielmehr durch konservierte stressinduzierte Moleküle vermittelt, die, wie beispielsweise die zuvor erwähnten Phosphoantigene, keine pathogenspezifischen Antigene sein müssen (Murphy et al. 2009). Auch die Fähigkeit von $\gamma\delta$ -T-Zellen nach einer Infektion schnell pro-inflammatorische Zytokine wie Interferon- γ oder Tumornekrosefaktor zu produzieren, zeigt, dass sie in der frühen Phase der Immunantwort agieren (Morita et al. 1991, O'Brien et al. 2009).

2.2.3 Oberflächenmoleküle auf $\gamma\delta$ -T-Zellen

Neben dem $\gamma\delta$ -TCR und dem CD3-Komplex sind auch andere Oberflächenmoleküle bekannt, die von $\gamma\delta$ -T-Zellen exprimiert werden. Im Gegensatz zu $\alpha\beta$ -T-Zellen tragen $\gamma\delta$ -T-Zellen nur selten den MHC-II-Korezeptor CD4 und die Expression des MHC-I-Korezeptors CD8 ist uneinheitlich (Groh et al. 1989). Zudem werden auf $\gamma\delta$ -T-Zellen oft Oberflächenmoleküle detektiert, die ansonsten typisch für NK-Zellen sind.

Bei den NK-Zell-Rezeptoren (NKR) lassen sich zwei funktionelle Gruppen unterscheiden: aktivierende und hemmende Rezeptoren. Zu den wichtigen Vertretern der aktivierenden Rezeptoren zählt NKG2D aus der Gruppe der C-Typ-Lektine. Wie bereits erwähnt, wird er

durch konservierte MHC-ähnliche Liganden (wie MICA und B) aktiviert, die bei zellulärem oder metabolischem Stress hochreguliert werden.

Der zweite Rezeptortyp hemmt die Aktivierung der Effektorzelle. Dazu gehören das C-Typ-Lektin NKG2A und Vertreter der Killerzellen-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR) wie KIR-2DL1, -2DL2/3 und -3DL1. Über inhibitorische KIRs wird bei Interaktion mit entsprechenden MHC-Klasse-I-Molekülen die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gehemmt (Moretta et al. 1997). Im Falle einer Infektion oder malignen Transformation der Zielzelle werden oftmals MHC-I-Moleküle herunterreguliert, sodass die Hemmung der NK-Zelle ausbleibt. Dies führt zur Aktivierung ihrer lytischen Funktionen gegen die kranke Zielzelle (Ljunggren et al. 1990). Es überleben hierdurch Zellen, die eine normale MHC-Expression aufweisen. Auch auf $\gamma\delta$ -T-Zellen sind KIRs verbreitet, allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, welche Funktion sie hier übernehmen (Battistini et al. 1997, Halary et al. 1997). Man geht davon aus, dass sie regulatorisch wirken und eine Rolle in der Erkennung von Tumoren spielen (De Libero 1999, Moris et al. 1999).

Ein weiteres Oberflächenmolekül, das als prototypischer NK-Zell-Marker dient ist CD56. Dieses Molekül ist auch als neurales Zelladhäsionsmolekül (NCAM) bekannt und auch im Nervensystem weithin exprimiert. Seine Expressionshöhe korreliert mit funktionellen Eigenschaften von NK-Zellen (Murphy et al. 2009). Niedrige CD56-Expression ist mit zytotoxischen Eigenschaften vergesellschaftet, während Zytokin-produzierende NK-Zellen CD56 stark exprimieren (Cooper et al. 2001). Auch auf $\gamma\delta$ -T-Zellen kommt das Molekül CD56 vor, allerdings ist die Funktion hier noch nicht geklärt.

2.2.4 Therapeutische Bedeutung der $\gamma\delta$ -T-Zellen

Ihre Fähigkeit Antigene verschiedener Klassen MHC-unabhängig zu erkennen, proinflammatorische Zytokine zu bilden und potente zytotoxische Aktivität auszuüben, macht $\gamma\delta$ -T-Zellen zu Hoffnungsträgern der zielgerichteten Tumormimmuntherapie (Gomes et al. 2010). Sie sind in der Lage, *in vitro* eine Vielzahl solider und hämatologischer Tumoren und Tumorzelllinien zu erkennen (Fisch et al. 1990, Di Fabrizio et al. 1991, Wrobel et al. 2007, Todaro et al. 2009, Bonneville et al. 2010, Hannani et al. 2012). Um dieses therapeutische Potenzial auszunutzen, können $\gamma\delta$ -T-Zellen für den adoptiven Zelltransfer *in vitro* expandiert oder aber durch die Gabe von Phosphoantigenen oder Aminobisphosphonaten mit IL-2 *in-vivo* stimuliert werden (Gogoi et al. 2013). Aminobisphosphonate inhibieren Enzyme der Mevalonatsynthese, was zu einer Akkumulierung von IPP in der Zelle führt,

wodurch dies durch $\gamma\delta$ -T-Zellen erkannt werden kann. In klinischen Studien der Phase I konnte beispielsweise bei Patienten mit hormonrefraktärem Prostatakarzinom, Nierenzellkarzinom, Non-Hodgkin-Lymphom oder multiplem Myelom eine partielle Tumorremission erzielt werden (Wilhelm et al. 2003, Dieli et al. 2007, Bennouna et al. 2008). $\gamma\delta$ -T-Zellen sind mittlerweile auch Gegenstand klinischer Forschung im Zusammenhang mit allogener Stammzelltransplantation. Innovativen Protokollen zufolge werden $\alpha\beta$ -T-Zellen und CD19⁺-Lymphozyten aus peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) im Transplantat mittels negativer Selektion gezielt depletiert, während NK-Zellen, Monozyten und $\gamma\delta$ -T-Zellen erhalten bleiben (Handgretinger 2012). Dadurch soll ein erleichtertes Ansiedeln der Spenderzellen, ein protektiver Effekt gegen Leukämierезidive und gegen Reaktivierung von Cytomegalieviren (CMV) erzielt werden und das Risiko einer Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) reduziert werden (Drobyski et al. 1999, Otto et al. 2005, Godder et al. 2007, Saitoh et al. 2008, Daniele et al. 2012, Locatelli et al. 2013). Hinweise auf protektive Effekte von $\gamma\delta$ -T-Zellzahlen nach HLA-Mismatch-Stammzelltransplantationen zeigten sich erstmals, als in einer klinischen Studie bei den krankheitsfrei überlebenden Patienten nach Transplantation erhöhte $\gamma\delta$ -T-Zellzahlen beobachtet wurden (Lamb et al. 1996).

Ein weiterer möglicher therapeutischer Einsatzbereich ist die zelluläre Immuntherapie mit gentechnisch veränderten $\gamma\delta$ -T-Zellen. In Mausmodellen wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen durch ein retrovirales Einbringen antigenspezifischer $\alpha\beta$ -TCRs mit Reaktivität gegen bestimmte Targets ausgestattet (van der Veken et al. 2009). Diese gentechnisch veränderten $\gamma\delta$ -T-Zellen sollen die Bildung gemischter TCR-Dimere aus endogenen und hinzugeführten TCR-Ketten und somit unvorhersehbarer Reaktivität verhindern (van der Veken et al. 2006).

2.3 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist weltweit verbreitet und gehört zur Familie der Herpesviren. Zielzellen dieses DNA-tragenden Virus, sind abgesehen von Epithelzellen des Naso- und Oropharynx vor allem B-Lymphozyten. Bei letzteren bindet das Virus an den Komplementrezeptor 21 (CD21). Nach der klinisch meist inapparenten Primärinfektion kommt es zur latenten Erregerpersistenz im B-Zell-Pool. Durch eine ständige immunologische Kontrolle mittels zytotoxischen T-Lymphozyten und Serumantikörpern gegen EBV-Proteine wird die Anzahl der infizierten Zellen konstant auf etwa 1-50 von 10^6 zirkulierenden B-Zellen gehalten (Yao et al. 1985, Miyashita et al. 1995, Tan et al. 1999).

Während die Infektion im Kleinkindesalter meist asymptomatisch verläuft, kann im späteren Lebensalter als typische akute Manifestation eine infektiöse Mononukleose (auch Pfeiffersches Drüsenfieber genannt) auftreten. Diese benigne lymphoproliferative Krankheit geht mit fieberhafter Angina tonsillaris, Lymphadenopathie und charakteristischen atypischen Lymphozyten im Blutbild einher und verläuft selbstlimitierend.

In Westeuropa liegt die Durchseuchungsrate bei über 95 % der Bevölkerung der über 30-Jährigen, in Zentralafrika sind die meisten Kinder unter drei Jahren bereits infiziert (Herold 2006).

2.3.1 EBV-kodierte Proteine

Das EBV-Genom kodiert über 70 Proteine, von denen die meisten der Virusreplikation dienen. Zur Viruskapsidproduktion werden im lytischen Stadium nahezu alle viralen Proteine exprimiert. Im latenten Stadium überlebt das Virus intrazellulär, ohne dass es sich repliziert, indem es nur eine Auswahl sogenannter latenter Proteine exprimiert. Als latente Proteine bezeichnet man sechs Epstein-Barr-Zellkernantigene (*Epstein-Barr nuclear antigens*, EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, -LP), und drei latente Membranproteine (LMP1, 2A, 2B). Je nach Expressionsmuster dieser Proteine unterscheidet man drei verschiedene Latenzformen, die in Tabelle 2.1 dargestellt sind. Im Gegensatz zur Latenz III, wo alle Latenzproteine exprimiert werden, weisen die Stadien 0, I und II eine noch eingeschränktere Proteinexpression auf. Das Latenzstadium III ist durch Transformation infizierter B-Lymphozyten zu aktivierten und stark proliferierenden lymphoblastoiden Zellen gekennzeichnet. Im Zuge dieses auch als Wachstumsstadium bezeichneten Vorgangs wird beim Wirt eine humorale und zelluläre Immunantwort induziert, wodurch die

proliferierenden Zellen fortlaufend eliminiert werden. Durch eine weiter reduzierte Expression der Latenzproteine ist es dem Virus jedoch möglich, der Erkennung durch den Wirt gänzlich zu entkommen. So wird im sogenannten Standardlatenzstadium („*default*“, Latenz I/II) ausschließlich EBNA1 mit oder ohne verschiedene LMP-Proteine exprimiert, während Viren, die ruhende B-Gedächtniszellen befallen, sich im sogenannten „echten“ Latenzstadium (Latenz 0) befinden, wo kein Latenzprotein, sondern nur virale nicht-codierende RNA nachgewiesen werden kann (Babcock et al. 2000). Im Folgenden werden beispielhaft einige dieser Latenzproteine näher erläutert, für die bereits eine Funktion beschrieben worden ist.

EBNA1 dient der Erhaltung des Virusgenoms und der Sicherstellung von dessen Replikation, indem es dieses an das zelluläre Chromosom bindet (Yates et al. 1985). Es interagiert außerdem mit dem Proteasom der Wirtszelle und verhindert seine eigene Spaltung in antigenische Peptide (Murphy et al. 2009). EBNA2 wurde als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Steuerung der Expression weiterer latenter EBV-Proteine beschrieben (Ling et al. 1994). LMP1 ist der Haupteffektor der virus-induzierten zellulären Transformation, indem es zum Überleben und Wachstum der infizierten B-Zelle beiträgt. Als funktionelles Homolog zu CD40 ist es in der Lage, Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Signalwege zu induzieren und so Überlebenssignale zu liefern (Kilger et al. 1998). Kürzlich wurde gezeigt, dass LMP2A neben einem Beitrag zum B-Zell-Überleben außerdem auch eine Rolle bei der Immunevasion des Virus spielt (Miller et al. 1995, Caldwell et al. 1998, Rancan et al. 2015).

Tabelle 2.1 Virale Phänotypen der verschiedenen EBV-Latenzstadien. BARF: *BamH1 A rightward reading frame* Transkripte; EBER: EBV-kodierende mRNA; NPC: Nasopharynx-Karzinom; CAEBV: chronisch-aktive EBV-Infektion; PTLD: Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung, LCL: Lymphoblastoide Zelllinie, PAL: Pyothorax-assoziiertes Lymphom. (Ohga et al. 2002)

Latenz	Stadium I	Stadium II	Stadium III
virale Expression	EBNA1	EBNA1	EBNA1
	BARFO	BARFO	BARFO
	EBERs	EBERs	EBERs
		LMP1/2	LMP1/2
			EBNA2, 3A, 3B, 3C, LP
Vorkommen	Burkitt-Lymphom	Hodgkin-Lymphom	PTLD
		NPC	PAL
		CAEBV	LCL (in vitro)
		Magenkarzinom	

2.3.2 Die lymphoblastoide Zelllinie als Latenz-Modell

EBV besitzt die einzigartige Eigenschaft, ruhende B-Zellen, die in Abwesenheit von T-Zellen *in vitro* kultiviert werden, latent zu infizieren und in permanente Zelllinien zu transformieren (Miller et al. 1973). Diese lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) dienen als ein *in-vitro*-Modell sowohl für die Infektion im Latenzstadium III als auch für das lymphomogene Potenzial des Virus. LCLs exprimieren neben B-Zell-Aktivierungsmarkern (wie CD23, CD30) und Adhäsionsmolekülen (wie CD54/ICAM1) in gesteigertem Ausmaß auch das Proteinprogramm der Latenz III und besitzen daher eine hohe proliferative Kapazität (Young et al. 2004, Rancan et al. 2015).

2.3.3 EBV-assoziierte Krankheiten

Man geht davon aus, dass EBV eine Rolle in der Pathogenese von einer Vielzahl an Krankheiten spielt. So konnten bereits in Zellen verschiedenster Malignome Genprodukte und DNA des Virus nachgewiesen werden. Hierzu zählen B-Zell-Lymphome wie das Burkitt- und das Hodgkin-Lymphom, die Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung (PTLD) und die chronisch-aktive Mononukleose (CAEBV). Wie in Tabelle 2.1 dargestellt, werden bei den verschiedenen EBV-assoziierten Krankheiten jeweils Viren in

unterschiedlichen Latenzstadien gefunden. Vor allem Patienten mit geschwächter T-Zell-Funktion sind gefährdet, EBV-assoziierte Krankheiten zu entwickeln. Dies hebt deutlich hervor, welches ein empfindliches Gleichgewicht zwischen dem onkogenen Virus und dem menschlichen Immunsystem herrscht.

2.4 $\gamma\delta$ -T-Zellen und EBV

$\gamma\delta$ -T-Zellen spielen unter anderem eine Rolle beim Schutz des Körpers gegen Mikroorganismen, die latente Infektionen hervorrufen (Fujishima et al. 2007). Wie genau die Aufgabe der $\gamma\delta$ -T-Zellen bei der Kontrolle einer EBV-Infektion aussieht, ist noch nicht vollständig geklärt, allerdings konnte in verschiedenen Experimenten ihre Beteiligung gezeigt werden. Bei Patienten, die an infektiöser Mononukleose (frische EBV-Infektion) litten, wurde beispielsweise ein Anstieg der $\gamma\delta$ -T-Zellzahl beobachtet (De Paoli et al. 1990). Ferner konnte eine Proliferation oder zytotoxische Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen *in vitro* durch den Kontakt mit LCLs und anderen EBV-positiven B-Zelllinien stimuliert werden (Lam et al. 1990, Hacker et al. 1992, Orsini et al. 1993, Bhaduri-McIntosh et al. 2008). Welche $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulation die bedeutendere Rolle im Zusammenhang mit EBV spielt, wird in der Literatur nach wie vor kontrovers diskutiert (De Paoli et al. 1990, Qvigstad et al. 1990, Hacker et al. 1992, Orsini et al. 1993, Fujishima et al. 2007, Kong et al. 2009). Die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immunität gegen EBV ist bisher noch nicht aufgeklärt und verlangt weiterführende Studien.

3 Problemstellung

Obwohl $\gamma\delta$ -T-Zellen bereits vor über 30 Jahren entdeckt wurden, wirft ihre Funktion beim Schutz vor infektiösen Krankheiten und der Entwicklung von Tumoren nach wie vor eine Vielzahl von Fragen auf. Im Vergleich zu „klassischen“ T-Zellen scheinen sie bezüglich ihrer Antikörpererkennung, ihrer Verteilung im Gewebe und ihrem Verhalten faszinierenderweise anderen Gesetzen zu folgen. Hierdurch wird dieser Zelltyp zu einem komplexen und herausfordernden Objekt der Forschung.

Im Zusammenhang mit viralen Infektionen wird $\gamma\delta$ -T-Zellen, speziell der $V\delta 1^+$ -TCR tragenden Untergruppe, mittlerweile eine wesentliche Beteiligung zugesprochen, allerdings existiert hierzu ein nur oberflächliches Verständnis. Detailliertes Wissen fehlt hierbei auch im Zusammenhang mit Infektionen durch EBV. In der Literatur wird kontrovers diskutiert, welche Untergruppe von $\gamma\delta$ -T-Zellen die antivirale Antwort vermittelt und wie genau das Virus oder die virusinfizierte Zelle erkannt werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, aus humanen Spendern $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone unterschiedlicher Typen herzustellen und diese phänotypisch und funktionell zu charakterisieren. Insbesondere sollte dabei deren potentielle EBV-spezifische Reaktivität näher untersucht werden. Um den Weg zum Verständnis zu ebnen, welche Rolle $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immunität gegen EBV einnehmen, sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- (1) Lassen sich unterschiedliche Reaktivitätsmuster – insbesondere EBV-spezifische Reaktivität – von $\gamma\delta$ -T-Zellen herausarbeiten?
- (2) Bestehen Korrelationen zwischen den immunologischen Phänotypen, dem funktionellen Verhalten und oder der TCR-Sequenz von menschlichen $\gamma\delta$ -T-Zellen?
- (3) Wie groß sind die Unterschiede der Repertoires von $\gamma\delta$ -T-Zellen verschiedener Spender in Bezug auf Phänotyp und Reaktivität?

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tabelle 4.1 Übersicht über verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Bestrahlungsanlage Gammacell 40 Cäsium-137 (γ -Strahler)	AECL, Ontario, Kanada
Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus Holding, Hanau
Durchflusszytometer LSR-Fortessa	BD Bioscience, Heidelberg
Fluorometer Wallac Victor ²	Perkin Elmer, Waltham, USA
Fluorometer Infinite 200 PRO	TECAN, Männedorf, Schweiz
Geldokumentationssystem Quantum	Vilber Lourmat, Eberhardzell
MACS Separationseinheit	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Nanophotometer NanoDrop	PeqLab, Erlangen
Sicherheitswerkbank der Stufe II	BDK, Sonnenbühl
Thermocycler T Gradient	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge PICO 21	Thermo Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Rotanta 46 RSC	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich, Tuttlingen

4.1.2 Chemikalien und kommerzielle Reagenzien

Tabelle 4.2 Übersicht über verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller
1kb DNA-Leiter	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Calceinacetoxymethylester	Invitrogen, Karlsruhe
Cyclosporin A	Novartis, Wien, Österreich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
DNA Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf
DNA Loading Dye, 6-fach	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTPs, 10mM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FACS-Lösungen (Flow, Clean, Rinse)	BD Biosciences, Heidelberg
Fötales Rinderserum (FBS)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
GeneRuler 100bp DNA-Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm, Ulm
Natriumselenit	Sigma, St. Louis, USA
Pancoll	PAN Biotech, Aidenbach
PCR Puffer	New England Biolabs, Frankfurt
Penicillin-Streptomycin	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat Buffer Saline (PBS)	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
Tris-Acetat-EDTA (TAE-Puffer)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

4.1.3 Stammlösungen und Puffer

Sofern nicht näher bezeichnet, setzen sich die verwendeten Lösungen und Puffer gemäß Tabelle 4.3 zusammen.

Tabelle 4.3 Zusammensetzung von Lösungen und Puffern

Bezeichnung	Zusammensetzung
Einfriermedium	50% FBS, 40% Stammmedium, 10% DMSO
FACS-Fixierlösung	PBS, 1% Paraformaldehyd
FACS-Puffer	PBS, 2% FCS
Stammmedium	RPMI 1640 mit 10% FBS, 10 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100nM Natriumselenit

4.1.4 Antikörper

Bei den in den Experimenten verwendeten Antikörpern handelte es sich um monoklonale, gegen humane Antigene gerichtete Antikörper der Maus. Ihre Spezifitäten und weitere Eigenschaften sind in Tabelle 4.4 aufgelistet.

Tabelle 4.4 Verwendete Antikörper

Spezifität	Klon	Isotyp	Hersteller	Konjugat
CD19	H1B19	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	PE
CD3	HIT3a	IgG2a	BioLegend, San Diego, USA	PE-Cy5
CD56	HCD56	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	Brilliant Violet 412
KIR2DL1 (CD158a)	HP-3E4	IgM	BD Bioscience, Heidelberg	FITC
KIR2DL2/3 (CD158b)	CHL	IgG2b	BioLegend, San Diego, USA	PE
KIR3DL1 (CD158e1)	DX9	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	FITC
NKG2A (CD159a)	Z199	IgG2b	Beckmann Coulter, Krefeld	AP
NKG2D (CD314)	1D11	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	PE-Cy7
TCR V γ 9	B3	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	PE

Spezifität	Klon	Isotyp	Hersteller	Konjugat
TCR V δ 1	TS8.2	IgG1	Thermo Scientific, Schwerte	FITC
TCR V δ 2	B6	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	PerCP
TCR α/β	IP26	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	AP
TCR γ/δ	B1	IgG1	BioLegend, San Diego, USA	PE

4.1.5 Enzyme

Tabelle 4.5 Verwendete Enzyme

Substanz	Hersteller
Pfu-DNA-Polymerase	Thermo Scientific, Schwerte
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Ipswich, USA

4.1.6 Zytokine

Tabelle 4.6 zeigt die Zytokine, die bei der Zellkultivierung eingesetzt wurden.

Tabelle 4.6 Liste der verwendeten Zytokine

Substanz	Hersteller
Proleukin (Rekombinantes humanes Interleukin-2)	Novartis, Nürnberg
Rekombinantes humanes Interleukin-4	R&D Systems, Minneapolis, USA

4.1.7 Kommerzielle Kits

Für diverse Experimente wurden kommerzielle Kits verwendet, die in Tabelle 4.7 aufgelistet sind.

Tabelle 4.7 Liste der eingesetzten kommerziellen Kits

Bezeichnung	Hersteller
MACS Human B Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS TCR γ/δ^+ T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Bezeichnung	Hersteller
Nucleo Spin Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren
QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect Reverse-Transcription Kit	Qiagen, Hilden
RNAEasy Mini Kit	Qiagen, Hilden

4.1.8 Primer

Alle in Tabelle 4.8 aufgeführten Primer wurden von der Firma Metabion (München) synthetisiert.

Tabelle 4.8 Verwendete Primer

Zielgen	Primername	Sequenz (5'→3')	Produktlänge (bp)
gp85	gp85c	TGG TCA GCA GCA GAT AGT GAA CG	450
	gp85d	TGT GGA TGG GTT TCT TGG GC	
Vδ1	Vδ1F2	GAA CAG AAT GCA AAA AGT GGT C	variiert
	CδR3	CAC TTCA AAG TCA GTG GAG TGC	
Vδ2	Vδ2F1	CCG AGA AAA GGA CAT CTA TG	variiert
	CδR3	CAC TTC AAA GTC AGT GGA GT GC	
Vδ3	Vδ3F3	GGC GAG TGG CAG TGA GG	variiert
	CδR3	CAC TTC AAA GTC AGT GGA GTG C	

4.1.9 Zelllinien

Die in Tabelle 3.9 beschriebenen Zelllinien kamen in den Experimenten zum Einsatz.

Tabelle 4.9 Liste der eingesetzten Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
B-Blasten	mittels CD40-Stimulation konditional immortalisierte B-Zellen	(Wiesner et al. 2008)
Daudi	humane Burkitt-Lymphom-B-Zelllinie, subkloniert für EBV-Verlust, HLA-defizient	(Klein et al. 1968)
K562	humane chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie, NK-Zell-Target, HLA-defizient	(Lozzio et al. 1975)

Zelllinie	Beschreibung	Quelle
LCL	mit EBV transformierte, lymphoblastoide Zelllinie; in dieser Arbeit verwendet wurde EBV 2089, ein Derivat von B95.8	(Miller et al. 1973, Delecluse et al. 1998)
LL8	CD40-Liganden exprimierende murine Fibroblastenzelllinie L929, als Stimulatorzellen zur Herstellung von B-Blasten	(Rancan et al. 2015)
Raji	humane EBV-positive Burkitt-Lymphom-B-Zelllinie	(Pulvertaft 1964)

4.1.10 Blutspender und HLA-Typen

Leukozytenkonzentrate (*Buffy Coats*) unbekannter erwachsener Spender wurden vom Institut für klinische Transfusionsmedizin und Immungenetik in Ulm bezogen. Deren Verwendung zu Forschungszwecken wurde von der Ethikkommission des Klinikums der Ludwig-Maximilians-Universität München in Großhadern als unbedenklich bescheinigt. Daneben wurden Zellen direkt aus dem Vollblut gesunder erwachsener Spender gewonnen. Die HLA-A/B/C-Typen aller Spender werden in Tabelle 4.10 unter verschlüsseltem Namen dargestellt. Niedrigauflösende HLA-A/B-Typisierungen wurden zum Teil vom Lieferanten der *Buffy Coats* zur Verfügung gestellt. Hochauflösende Typisierungen wurden im Zentrum für Humangenetik und Laboratoriumsdiagnostik (MVZ) Dr. Klein, Dr. Rost und Kollegen in Martinsried kommerziell durchgeführt.

Tabelle 4.10 Eigenschaften der Blutspender

Spender	EBV-Status	CMV-Status	HLA-A	HLA-B	HLA-C
A	+ (VCA+, EBNA-)	-	A*0101, A*0201	B*3906, B*4402	C*0702, C*0704
B	+	+	A*0101, A*2402	B*0801, B*1402	C*0701, C*0802
C	+	+	A*0201, A*2902	B*4402, B*4501	C*0602
D	+	+	A*2601, A*6802	B*3801, B*5301	C*0401, C*1203
E	+	-	A*1101, A*2301	B*1402, B*4403	C*0401, C*0802
F	+	+	A*0201	B*4002, B*0702	C*0702, C*0202

G	+	+	A*0201, A*6801	B*4402, B*1501	C*0102, C*0501
H	+	-	A*6801, A*0301	B*3501, B*0702	C*0702, C*0401

4.1.11 Software und Datenbanken

Folgende Computerprogramme wurden zur Datenauswertung und -darstellung verwendet:

Tabelle 4.11 Verwendete Software

Programm	Hersteller
Microsoft Excel 2011	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Word 2011	Microsoft, Redmond, USA
Prism 6.0c	GraphPad, San Diego, USA
MacVector 12.7.5	MacVector Inc., Cary, USA
FlowJo 9.4.11	TreeStar Inc., Ashland, USA
Endnote X7.1	Thomson Reuters, New York City, USA

Die Identifizierung der CDR3-Region von sequenzierten V δ -Ketten der $\gamma\delta$ -TCRs erfolgte mithilfe des online verfügbaren Programms IMGT/V-Quest (<http://www.imgt.org>) (Brochet 2008).

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung und Analyse von Zellen

4.2.1.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Die verwendeten Zelllinien und $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone wurden in einem Inkubator bei 37 °C unter 5%-iger Kohlendioxid-Atmosphäre in Standardmedium (im Folgenden als Medium bezeichnet) mit entsprechenden Zusätzen, falls angegeben mit weiteren Zusätzen, kultiviert. Zellkulturarbeiten erfolgten mit sterilen Geräten in einer Klasse-II-Sicherheitswerkbank.

4.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mithilfe einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurde eine repräsentative Einzelzellsuspension zur Hälfte mit Trypanblau verdünnt, wodurch eine Unterscheidung von toten und lebenden Zellen ermöglicht wurde. Anschließend wurde die Kammer mit 10 µl verdünnter Lösung befüllt, die Zellzahl visuell ermittelt und die Zellzahl der Ausgangslösung nach Gleichung 1 berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = 2 \cdot \frac{(\text{Summe der Zellen pro Großquadrat})}{4} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \frac{10^4}{\text{ml}} \quad (1)$$

4.2.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden in gekühltem Einfriermedium resuspendiert (1-1,5 ml je Aliquot), in ein 1.8 ml-Kryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Wiederverwendung wurden die Zellen zügig in vorgewärmtem Medium aufgetaut (mindestens 20 ml pro Aliquot), einmal abzentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert, um sie entsprechend weiter zu kultivieren.

4.2.1.4 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut

Die Isolierung von PBMCs erfolgte mittels Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation. Hierfür wurde entweder peripher-venöses Vollblut von gesunden Spendern frisch entnommen und heparinisiert oder Leukozytenkonzentrate verwendet. Blut bzw. Zellsuspension wurden mit PBS verdünnt, je 30 ml in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig mit 13 ml Ficolllösung (Dichte 1.077 g/ml) unterschichtet. Durch 25-minütiges Zentrifugieren bei Raumtemperatur und 2000 Umdrehungen pro Minute (mit langsamer Beschleunigung und Abbremsung) wurde eine Trennung der Blutbestandteile in mehrere Schichten erzielt. Erythrozyten und Granulozyten sammelten sich aufgrund höherer Dichte am Boden des Gefäßes, während PBMCs sich als dünne Schicht über der Ficolllösung auflagerten. Diese

Schicht wurde jeweils vorsichtig abgesaugt und in je ein frisches 50 ml-Falcongefäß überführt. Die Suspension wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, abzentrifugiert und die pelletierten Zellen noch weitere zwei- bis dreimal mit PBS gewaschen.

4.2.1.5 B-Zell-Isolierung

Unmarkierte B-Zellen wurden mithilfe des *B cell Isolation Kit II* von Miltenyi Biotec aus den frisch gewonnenen PBMCs gesunder, HLA-typisierter Spender isoliert. Gemäß dem Herstellerprotokoll wurden Nicht-B-Zellen mit (1) einem Cocktail von Biotin-gekoppelten spezifischen Antikörpern und (2) mit Anti-Biotin-Microbeads markiert. Bei der Passage durch eine paramagnetische MACS-Isolationssäule im entsprechenden Separator (Magneten) wurden der Suspension die Nicht-B-Zellen entzogen und die B-Zellen im Durchfluss aufgefangen. Die Resultate der Separation wurden mittels Durchflusszytometrie überprüft. Im Normalfall konnte eine Reinheit der B-Zellen von über 95% erzielt werden.

4.2.1.6 Generierung von CD40-aktivierten B-Blasten

Für die Herstellung CD40-aktivierter B-Blasten (BBL) wurden isolierte B-Zellen (s.o.) und CD40-Ligand-exprimierende Mausfibroblasten (LL8) verwendet (Rancan et al. 2015). Nach Bestrahlung mit 180 Gy wurden 1×10^6 der Fibroblasten pro 12-, 24- oder 96-well-Flachbodenplatte ausplattiert (Stimulatorplatten). Beginnend mit der Kokultivierung mit 100.000 vorher isolierten B-Zellen pro well einer 96-well-Platte wurden im Laufe mehrerer Wochen unter wöchentlicher Restimulation mit LL8-Zellen schließlich CD40-aktivierte B-Blasten generiert (Wiesner et al. 2008). Dem Kulturmedium wurde stets IL-4 (2 ng/ml) und für die ersten vier Wochen zusätzlich Cyclosporin A (1 µg/ml) zugesetzt. Eine mögliche EBV-Infektion der BBL-Kulturen wurde mittels PCR (s.u.) regelmäßig ermittelt und positive Kulturen von den Experimenten ausgeschlossen. EBV-freie BBL wurden wöchentlich auf frische Stimulatorplatten überführt und dabei je nach vorheriger Proliferation zwei- bis dreifach expandiert.

4.2.1.7 Etablierung von LCLs

Um LCLs zu etablieren, wurden isolierte B-Zellen mit EBV infiziert. Hierfür wurde rekombinantes EBV 2089 (Delecluse et al. 1998), ein vom EBV Wildtyp B95.8 (Miller et al. 1973) abgeleiteter Virusstamm, verwendet. Das Virus wurde mit Hilfe der Zelllinie TR-2/293

hergestellt (Delecluse et al. 1998) und freundlicherweise von Frau Leah Schirrmann zur Verfügung gestellt. Die Zahl infektiöser EBV-Einheiten wurde ermittelt wie beschrieben (Iskra et al. 2010).

An Tag 0 wurden frisch isolierte B-Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen pro *well* auf 24-well-LL8-Stimulatorplatten überführt und mit 0,1 Viruseinheiten pro Zelle infiziert. Um die Aktivität eventuell verbliebener T-Zellen zu hemmen, wurde dem Medium während der nächsten vier bis fünf Wochen Cyclosporin A (1 mg/ml) zugesetzt. An Tag 1 wurde die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt, um den zelltoxischen Effekt des Virusüberstands zu verringern. Die Kulturen wurden nach ein bis zwei Wochen auf frische Platten überführt und fortan ohne LL8 kultiviert. Etwa 1,5-4 Monate nach Beginn der Kultivierung konnten die LCLs für Experimente mit $\gamma\delta$ -T-Zellen eingesetzt werden.

4.2.1.8 $\gamma\delta$ -T-Zell Isolierung

Zur Gewinnung von $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden PBMCs aus dem Blut HLA-typisierter Spender frisch isoliert. Mit dem *MACS TCR γ/δ T Cell Isolation Kit human* wurden unmarkierte $\gamma\delta$ -T-Zellen durch Abtrennung sonstiger Zellen über indirektes magnetisches Labelling unter Zuhilfenahme einer MACS-Separationssäule sowie des Separators von allen anderen Zellen (Nicht- $\gamma\delta$ -Zellen) getrennt und aufgereinigt. Es wurden hierfür die Herstelleranweisungen des Protokolls befolgt. Anschließend erfolgte eine Erfolgskontrolle der Zelltrennung mittels Durchflusszytometer. Im Normalfall konnte mit dieser Methode eine Reinheit von ungefähr 95% $\gamma\delta$ -T-Zellen erzielt werden.

4.2.1.9 Etablierung von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen

Zur Herstellung monoklonaler Zellkulturen wurden die gewonnenen $\gamma\delta$ -T-Zellen (s.o.) einer Kultivierung unter Bedingungen der limitierenden Verdünnung unterzogen. Hierfür wurden diese in Kloniermix (siehe unten) auf eine mittlere Konzentration von 0,5 Zellen pro *well* verdünnt und auf 96 Well-Platten mit U-Boden verteilt. Der Kloniermix bestand aus bestrahlten (50 Gy) PBMCs, gemischt von drei verschiedenen Spendern (zusammen 1×10^6 /ml), bestrahlten LCL-Zellen ($0,2 \times 10^6$ /ml) sowie Interleukin-2 (IL-2) in einer Endkonzentration von 500 U/ml in Standardmedium. Alle drei Wochen wurden die T-Zell-Klone geerntet und mit frischem Kloniermix stimuliert. Bei Bedarf wurden die Zellen auch zwischen den Restimulationen maximal einmal expandiert, indem sie unter Zugabe von

Standardmedium mit IL-2 (500 U/ml) resuspendiert und auf mehrere Wells verteilt wurden. Eine durchflusszytometrische Analyse (siehe unten) wurde durchgeführt, um auszuschließen, dass bei diesem Verfahren Mischkulturen von T-Zellen mit unterschiedlichen Typen von TCRs entstanden waren.

4.2.1.10 Calceinassay

Die Messung der zytotoxischen Aktivität von $\gamma\delta$ -T-Zellen (Effektorzellen) gegenüber verschiedenen Zielzellen erfolgte über einen Calcein-Freisetzungstest. Hierfür wurden verschiedene Zielzellen mit Calceinacetoxymethylester inkubiert. In lebenden Zellen wird diese nicht-fluoreszierende Substanz enzymatisch zu Calcein hydrolysiert, das durch starke Negativladung schlecht membrangängig ist. Bei Lyse der Zielzelle wird Calcein in den Überstand freigesetzt. Die Calcein-Freisetzung wurde im Fluorimeter detektiert (Anregung/Emission 285 nm/535 nm).

Als Zielzellen dienten B-Blasten, LCLs, Raji-, Daudi- und K562-Zellen. Davon wurden jeweils $2 \cdot 10^6$ Zellen bei 37 °C für 30 min in 1 ml Calceinlösung (5 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Nach vier Waschschritten wurden pro 200 μl Replikat 5000 markierte Zielzellen auf eine 96-well Spitzbodenplatte überführt und drei Stunden mit unterschiedlichen Effektorzellen koinkubiert. Das Verhältnis von Zielzelle zu Effektor wurde für verschiedene Versuchsansätze unterschiedlich hoch angesetzt (zwischen 1:4 und 1:20). Für die Bestimmung der maximalen Lyse wurden Zielzellen mit 0,5%-iger Triton X-100-Lösung versetzt, während für die minimale Lyse Zielzellen in Medium kultiviert wurden.

Für die Messung am Fluorimeter wurden 150 μl des Überstands auf eine 96-well Flachbodenplatte überführt. Die prozentuale Lyse wurde mittels Gleichung 2 bestimmt (x steht für den gemessenen Wert, min für den Wert der minimalen Lyse, max für den Wert der maximalen Lyse):

$$Lyse (\%) = \frac{x - min}{max - min} \cdot 100 \quad (2)$$

4.2.1.11 Durchflusszytometrische Analysen

Zur phänotypischen Analyse von Zellen wurden verschiedene Oberflächenmoleküle mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern markiert. Hierfür wurden zwischen 100.000 und 200.000 Zellen in 96-well Platten oder 1,5 ml-Reaktionsgefäßen für 20 min auf Eis mit den Antikörpern in FACS-Puffer (PBS/2% FCS, Endvolumen 20 µl) inkubiert. Die Konzentration der Antikörper wurde in Vorexperimenten ermittelt oder entsprechend den Herstellerangaben ausgewählt. Nach dem Färbeschritt folgten zwei Waschschrte mit FACS-Puffer. Für die unmittelbare Analyse am Durchflusszytometer wurden die markierten Zellen in 150 µl FACS-Puffer resuspendiert. Für eine zeitlich verzögerte Untersuchung (spätestens jedoch innerhalb einer Woche) wurden die Zellen nach dem Färben direkt mit einer FACS-Fixierlösung (PBS/1 % Formaldehyd) konserviert und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

4.2.2 **Molekularbiologische Methoden**

4.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in dieser Arbeit unter anderem eingesetzt, um das Vorhandensein endogener EBV-DNA in CD40L-stimulierten B-Blasten zu überprüfen, um EBV-infizierte Kulturen von weiterer Verwendung auszuschließen. Die hierfür benötigte DNA aus B-Blasten wurde mithilfe des QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Kit extrahiert. Für die PCR wurde anschließend eine Standardmischung, bestehend aus 0,2 µl Taq-Polymerase, 2,5 µl des zugehörigen 10x TaqPuffer, 0,5 µl Nucleotidbausteine (dNTPs, 10mM), jeweils 10 pmol der Primer und 100-150 ng DNA, verwendet und zu einem Gesamtvolumen von 25 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Das Protokoll bestand aus einer initialen Denaturierung bei 95 °C à 45 s, gefolgt von 40 Zyklen Denaturierung bei 95 °C für 45 s, Primeranlagerung für 45 s bei Primer-spezifischer Temperatur und Elongation bei 68 °C (Dauer je nach erwarteter Produktlänge, Taq-Polymerase arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 1000 bp/min). Nachdem die PCR-Zyklen abgeschlossen waren, folgte der letzte Schritt bei 68 °C für 5 min, um ein vollständiges Beenden der Reaktion zu ermöglichen. Anschließend wurde mittels Gelelektrophorese die Amplifikation der Wunsch-DNA nachgewiesen.

Ferner kam PCR zur Amplifikation von TCR-cDNA zum Zweck der anschließenden Sequenzierung von $\gamma\delta$ -TCRs zum Einsatz, wie es im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

4.2.2.2 Sequenzierung von $\gamma\delta$ -T-Zell-Rezeptoren

Zur Sequenzierung des T-Zell-Rezeptors wurde mithilfe des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) die RNA aus verschiedenen $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen isoliert. Anschließend wurde unter Zuhilfenahme des QuantiTect® Reverse Transcription Kit (Qiagen) und 1 μg RNA die cDNA synthetisiert. Anschließend wurden durch PCR mit spezifischen Primern (Tabelle 4.8) die δ -Ketten des TCR spezifisch amplifiziert. Das Reaktionsgemisch hierfür setzte sich zusammen aus 1 μl der cDNA, 4 μl des 10-fachen Pfu-Puffers, jeweils 10 pmol der Primer, 0.5 μl dNTPs (10 mM) und 0.8 μl der Pfu-Polymerase, einer thermostabilen Polymerase mit einer Korrekturlesefunktion für eine besonders niedrige Fehlerquote. Um ein Gesamtvolumen von 40 μl zu erreichen, wurde mit sterilem Wasser aufgefüllt. Das PCR-Programm hierfür startete mit dem initialen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 2 min. Es folgten 40 Zyklen von Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Primeranlagerung für 30 s bei Primer-spezifischer Temperatur und Elongation des Genprodukts bei 72 °C je nach erwarteter Produktlänge (Pfu-Polymerase arbeitet mit einer Geschwindigkeit von 500 bp/min). Nachdem die PCR-Zyklen abgeschlossen waren, folgte der letzte Schritt bei 72 °C für 10 min. Vom Produkt wurden 10 μl zur Erfolgskontrolle mittels Gelelektrophorese benötigt. Die restlichen 30 μl wurden mit dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit aufgereinigt und der Firma GATC zugesandt, wo die Sequenzierung nach der Sanger-Methode erfolgte.

4.2.2.3 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Für die Gelmatrix wurde eine 1%-ige Agaroselösung mit Ethidiumbromid (0,1 $\mu\text{l}/\text{ml}$) versetzt. Als Laufpuffer wurde 1-facher Tris-Acetat-EDTA-(TAE)-Elektrophoresepuffer verwendet. Bevor die Beladung des Gels mit den Nukleinsäuren erfolgte, wurden diese mit 6-fachem Ladepuffer (New England Biolabs) gemischt. Für die Bestimmung der Größe des DNA-Fragments wurde der Leiterstandard GeneRuler™ (MBI Fermentas) verwendet. Die Visualisierung und Dokumentation der Banden erfolgte unter Bestrahlung von ultraviolettem (UV-)Licht durch ein Geldokumentationssystem (Quantum, Vilber Lourmat).

5 Ergebnisse

Die Funktion und das biologische Verhalten von $\gamma\delta$ -T-Zellen ist noch unvollständig entschlüsselt. Um Erkenntnisse über die in humanem peripheren Blut vorkommenden Zellen dieses Typs zu erlangen, wurden in einer breit angelegten Analyse die immunologischen Phänotypen und die zytotoxischen Effekte gegen verschiedene Zielzellen bestimmt sowie zum Teil auch deren $\gamma\delta$ -TCRs analysiert. Besonderes Augenmerk wurde hierbei auf die Funktion der $\gamma\delta$ -T-Zellen, speziell $V\delta 1^+$ -Untergruppen, im Zusammenhang mit EBV-Infektion gelegt.

5.1 Herstellung und Charakterisierung von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen

Um monoklonale $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone zu etablieren, wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen aus frisch isolierten PBMCs fünf gesunder humaner Spender gewonnen. Dies konnte für jeden der Spender erfolgreich durchgeführt und jeweils eine Anreicherung von 90-95 % $\gamma\delta$ -T-Zellen erreicht werden. Abbildung 5.1 zeigt am Beispiel eines Spenders das Ergebnis der Isolierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen aus PBMCs, welches durchflusszytometrisch verifiziert wurde. Anschließend wurden mittels Endpunktverdünnung Einzelzell-Klone generiert. Die Herstellung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone erfolgte mit einem modifizierten Protokoll, das für $\alpha\beta$ -T-Zell-Klone bereits gut etabliert ist ([Ameres et al. 2013](#)) und anderen Protokollen zur $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonierung ähnelt ([Casorati et al. 1989](#)). Dabei wurden die T-Zellen mit bestrahlten allogenen PBMCs und allogenen LCLs von jeweils drei gesunden Spendern in Gegenwart hoher Dosen von IL-2 (500 U/ml) stimuliert. Obwohl die entsprechende Methode der Klonierung auch für eine effiziente Klonierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen verwendet wird ([Ameres et al. 2013](#)), wuchsen bemerkenswerterweise keine $\alpha\beta$ -T-Zell-Klone aus. Dies liegt, daran, dass diese beim Separationsvorgang sehr effizient depletiert wurden.

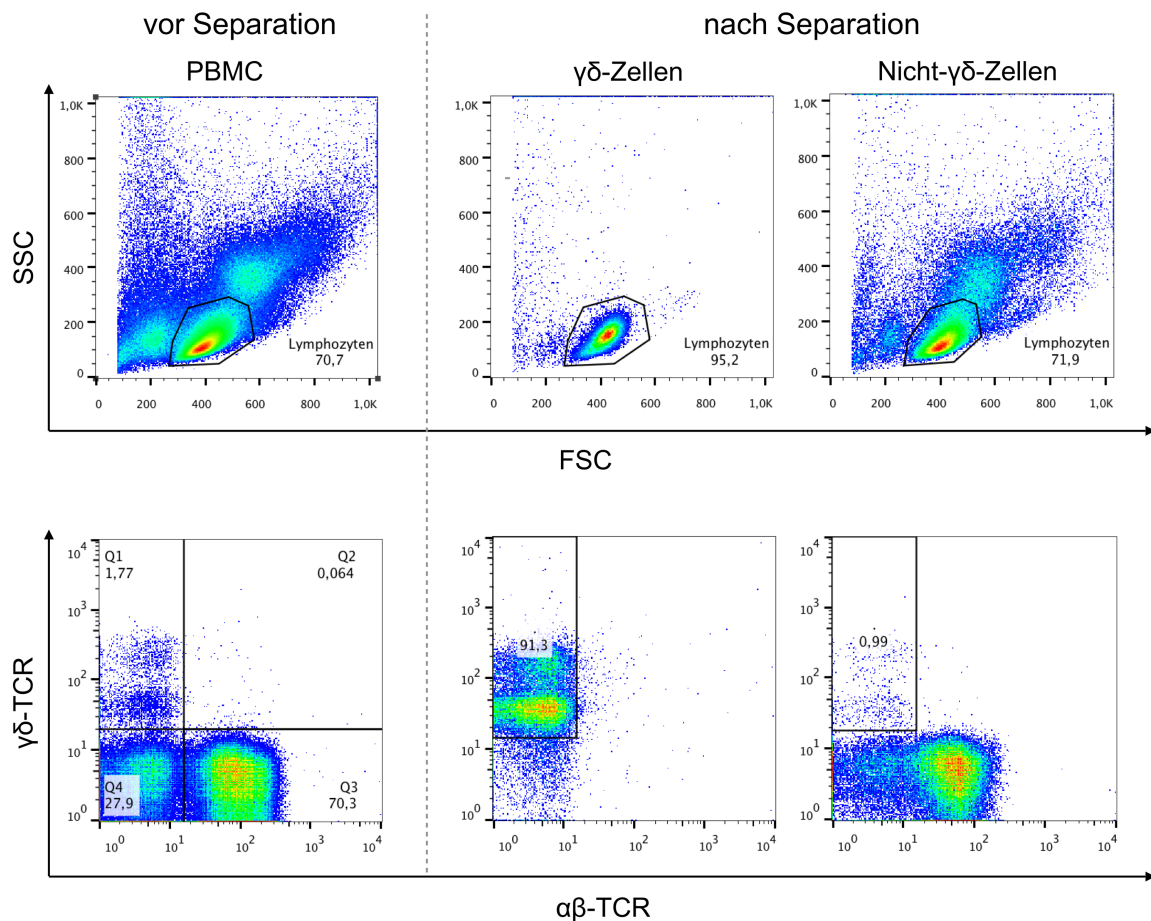


Abbildung 5.1 Gewinnung von $\gamma\delta$ -T-Zellen aus dem peripheren Blut. Die durchflusszytometrischen Graphen zeigen die Effizienz der Separierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen aus PBMCs am Beispiel von Spender D.

Die Etablierung von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen gelang bei allen fünf Spendern. Bei jedem Spender wuchsen zwischen 40 und 160 Klone aus. Von diesen konnten pro Spender zwischen 25 und 120 Klone soweit vermehrt werden, dass sie zur näheren Charakterisierung einer durchflusszytometrischen Untersuchung unterzogen werden konnten, wo die Expression diverser Oberflächenmoleküle getestet wurde. Diese Untersuchung zeigte, dass alle Klone den $\gamma\delta$ -TCR exprimierten. Wie in Tabelle 5.1 (linker Teil) zusammenfassend dargestellt, wurden insgesamt 331 Klone analysiert. Dabei konnten unterschiedliche Typen von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen gefunden werden, nämlich $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$ und $V\delta 1^-/V\delta 2^-$ -T-Zellen. Bei jedem der fünf Spender konnten $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone jeder dieser drei Kategorien etabliert werden. Es handelte sich insgesamt um etwa 32 % $V\delta 1^+$ und 46 % $V\delta 2^+$. Bei der Mehrzahl der Spender (A, C, D, E) bildeten $V\delta 2^+$ -T-Zell-Klone die Mehrheit, bei Spender B dagegen $V\delta 1^+$ Klone. Bei den Spendern D und E wurde eine weiterführende TCR-Charakterisierung ausgewählter

Klone mittels Durchflusszytometrie durchgeführt, wie im rechten Teil von Tabelle 5.1 gezeigt wird. Dabei fiel besonders auf, dass Spender D auch T-Zellen des selteneren $V\gamma 9^+V\delta 1^+$ -Typs aufwies. Entgegen der Erwartung koexprimierte nur eine Minderheit der $V\delta 2^+$ -Klone dieses Spenders die $V\gamma 9^+$ -Kette.

Tabelle 5.1 Zusammenfassung der T-Zell-Rezeptor-Phänotypen von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen fünf verschiedener Spender. Tests auf Expression verschiedener $\gamma\delta$ -TCR-Ketten wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Expression von $V\gamma 9$ wurde nicht bei allen Klonen geprüft, die Anzahl der getesteten Klone wird in der Tabelle jeweils nach dem Schrägstrich aufgeführt. 17 Klone von Spender D und 6 Klone von Spender F wurden auf $V\gamma 9$ getestet. (n.b.: nicht bestimmt)

Spender	Klone	TCR Phänotyp					
		$V\delta 1^+$	$V\delta 2^+$	$V\delta 1^+/V\delta 2^+$	$V\gamma 9^+ V\delta 1^+$	$V\gamma 9^+ V\delta 2^+$	$V\gamma 9^+ V\delta 1^+/V\delta 2^+$
A	106	14 (13%)	54 (51%)	38 (36%)	n.b.	n.b.	n.b.
B	80	44 (55%)	18 (22,5%)	18 (22,5%)	n.b.	n.b.	n.b.
C	77	28 (36%)	36 (47%)	13 (17%)	n.b.	n.b.	n.b.
D	45	15 (33%)	28 (62%)	2 (5%)	5/17	6/17	1/17
E	23	4 (17%)	17 (74%)	2 (9%)	0/6	0/6	2/6
Gesamt	331	105	153	73	5/23	6/23	3/23

Für alle Klone wurden die für $\gamma\delta$, $\delta 1$ und $\delta 2$ gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) in gemeinsamen Graphen aufgetragen (siehe Abbildung 5.2). Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die $\delta 2^+/\delta 1^+$ -T-Zell-Klone aller Spender in einer gemeinsamen Population befanden. Es existierten in Bezug auf diese Marker also offenbar weder spenderspezifische noch spenderübergreifende Subpopulationen. Im Gegensatz dazu war das Färbemuster bei den $\delta 1^+$ -T-Zellen vielfältiger und auch teilweise stark durch den jeweiligen Spender geprägt. Bei den $\delta 1$ -exprimierenden T-Zellen variierte die Färbeintensität mit dem anti- $\gamma\delta$ -TCR-Antikörper um das bis zu 40-fache (zwischen 897 und 34123 MFI-Einheiten) und mit dem $\delta 1$ -spezifischen Antikörper um das rund 11-fache (zwischen 629 bis 7085 MFI-Einheiten). Dabei war der MFI mit diesen beiden Antikörpern nicht notwendigerweise proportional. Dies deutet darauf hin, dass die Färbeintensität mit diesen Antikörpern nicht nur von der TCR-Expressionshöhe, sondern auch von weiteren

TCR-Eigenschaften, mutmaßlich auch der TCR-Sequenz, abhängt. Im Folgenden werden diese Beobachtungen verwendet, um die unterschiedlichen $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone zu subklassifizieren. Dabei werden nach optisch plausiblen Einteilungen die Kategorien „ $\gamma\delta$ –“ (negativ, MFI <500), „ $\gamma\delta$ +“ (schwach positiv, MFI 500-5000), „ $\gamma\delta$ ++“ (positiv, MFI 5001-10.000), „ $\gamma\delta$ +++“ (stark positiv, MFI >10.000) unterschieden. Die Expression von $V\delta 1$ wurde ebenfalls in die Kategorien „–“ (MFI <500), „+“ (MFI 500-2000) und „++“ (MFI >2000) eingeteilt. Die Anfärbung mit $V\delta 2$ -spezifischen Antikörpern wurde ab einem MFI >10.000 als „++“ festgelegt.

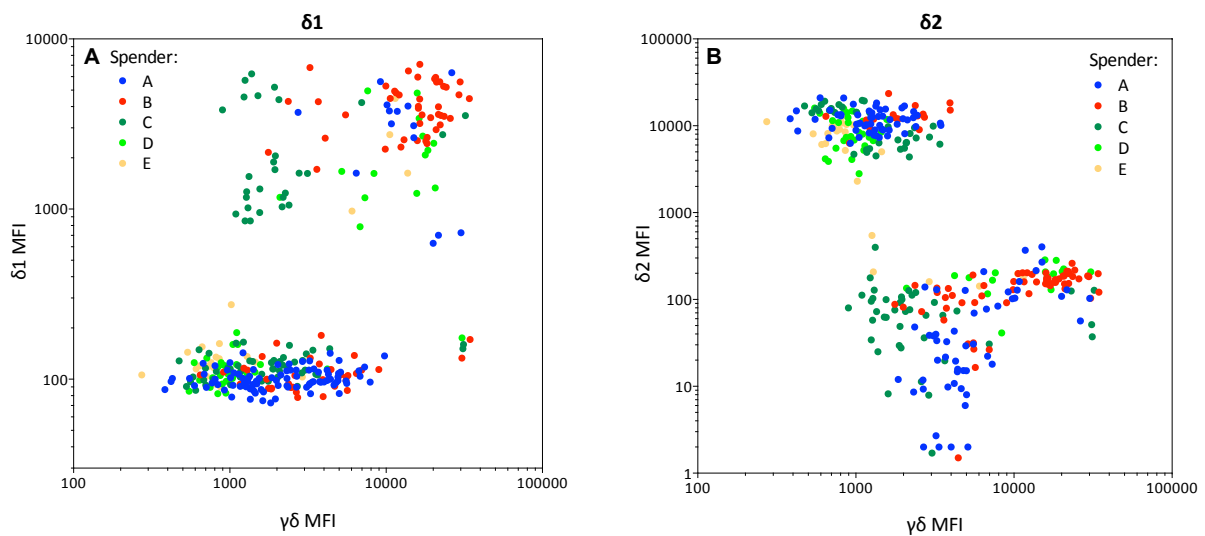


Abbildung 5.2 Überblick über TCR-Phänotypen aller $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone. Es ist die mittlere Fluoreszenzintensität des $\gamma\delta$ -TCRs gegen $\delta 1$ (A) beziehungsweise gegen $\delta 2$ (B) dargestellt, die mittels fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch ermittelt wurde. Die Messung der anti- $\delta 2$ -Fluoreszenz wurde so eingestellt, dass $\delta 2$ -negative Zellen bei MFI=0 lagen. Um die Darstellung dieses Parameters in einem logarithmischen Maßstab zu ermöglichen, wurden zu allen $\delta 2$ -MFI-Werten 100 Einheiten addiert.

Außer den TCRs wurde auch die Expression weiterer Oberflächenmoleküle untersucht. Abbildung 5.3 zeigt repräsentative Beispiele dafür. Es wurde beobachtet, dass ein Großteil der kultivierten $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone $CD56^+$ waren oder eine breite („verschmierte“) Verteilung der Expression dieses Markers von negativ bis positiv aufwiesen (z.B. Klon A.58 in Abbildung 5.3).

Für ausgewählte Klone der Spender D und E wurde auch die Expression von inhibitorischen Rezeptoren des KIR-Typs (KIR2DL1, KIR2DL2/3, KIR3DL1) und von den Lektin-artigen Rezeptoren NKG2A und NKG2D untersucht (Abb. 5.3). Die Ergebnisse dieser Analysen werden nachfolgend diskutiert.

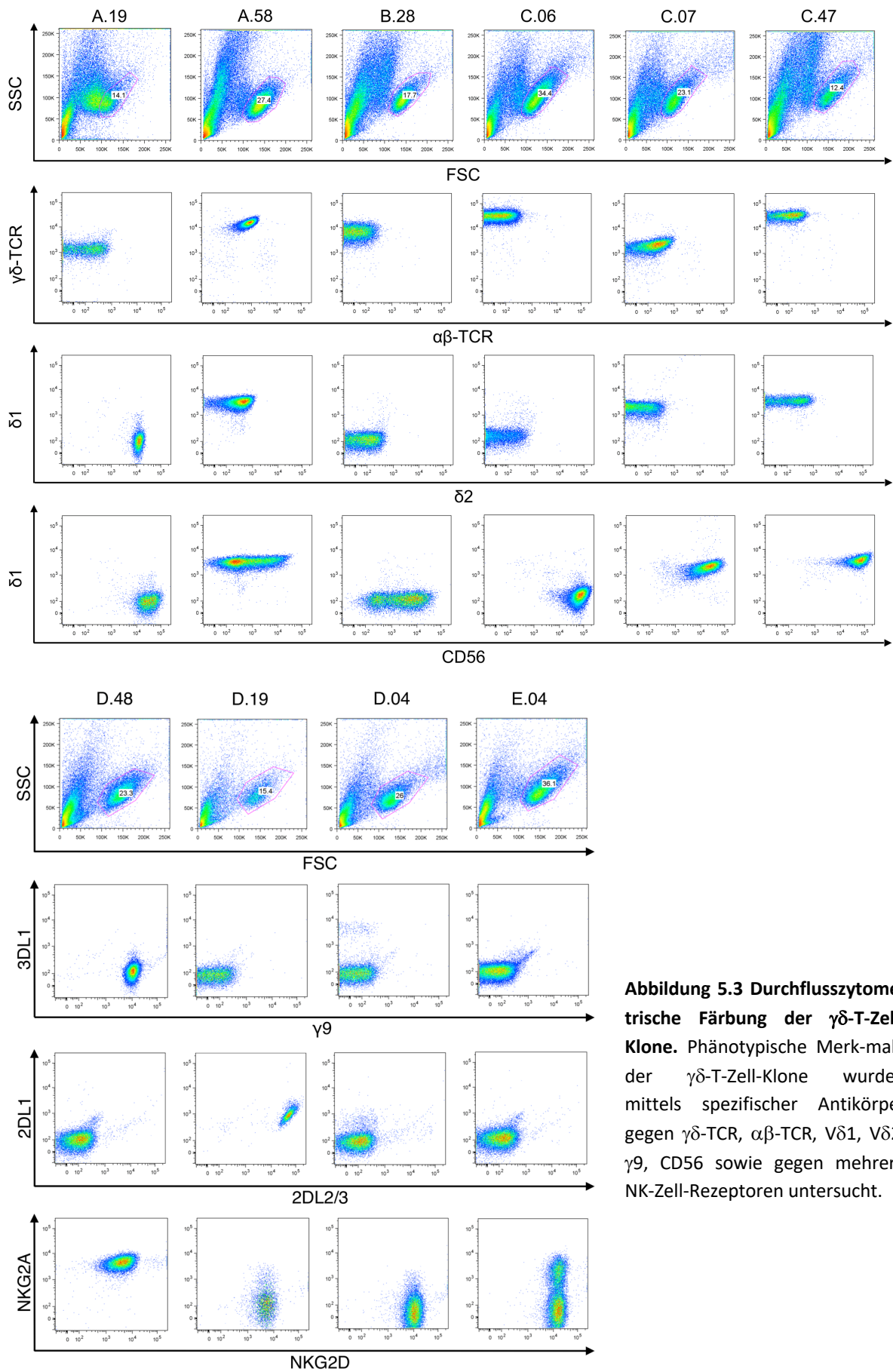


Abbildung 5.3 Durchflusszytometrische Färbung der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone. Phänotypische Merkmale der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone wurden mittels spezifischer Antikörper gegen $\gamma\delta$ -TCR, $\alpha\beta$ -TCR, $\delta 1$, $\delta 2$, $\gamma 9$, CD56 sowie gegen mehrere NK-Zell-Rezeptoren untersucht.

Um zu ermitteln, ob die verwendete Kloniermethode die Generierung bestimmter Typen von T-Zell-Klonen begünstigt, wurde die relative Kloniereffizienz der beiden wichtigsten Subklassen von $\gamma\delta$ -T-Zellen, $V\delta 1^+$ - und $V\delta 2^+$ -T-Lymphozyten, bei vier Spendern ermittelt (Tabelle 5.2). Hierbei zeigten sich sowohl beim Ausgangsverhältnis von $V\delta 1^+$ - zu $V\delta 2^+$ -T-Lymphozyten in PBMCs als auch bei der Effizienz mit der Klone etabliert werden konnten, deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern. Bei zwei der vier Spender konnten $V\delta 1^+$ -T-Zellen deutlich effizienter kloniert werden als $V\delta 2^+$ -T-Zellen, bei einem Spender deutlich schlechter. Jedenfalls war das Klonierprotokoll zur Generierung von verschiedenen Typen von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen gut geeignet und gestattete auch die Herstellung von $V\delta 1^+$ -T-Zell-Klonen bei sehr niedrigen Anteilen im peripheren Blut, so wie sie bei Spender E vorlagen.

Tabelle 5.2 Relative Kloniereffizienz. Es wird das Verhältnis der Kloniereffizienz von $V\delta 1^+$ - zu $V\delta 2^+$ -T-Zellen dargestellt. Die Daten der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Anteile von $V\delta 1^+$ - und $V\delta 2^+$ -T-Zellen in frischen PBMCs wurden freundlicherweise von Frau Dr. Chiara Rancan zur Verfügung gestellt. Die relative Kloniereffizienz ($eff\delta 1/eff\delta 2$) wurde als Quotient der ($V\delta 1^+/V\delta 2^+$)-Quotienten der Klone und der PBMCs berechnet.

Spender	PBMCs		Klone		Effizienz $eff\delta 1/ eff\delta 2$
	$V\delta 1^+$ (%)	$V\delta 2^+$ (%)	$V\delta 1^+$ (Anzahl)	$V\delta 2^+$ (Anzahl)	
A	0,7	3,3	14	54	1,2
C	1,9	0,45	28	36	0,18
D	0,11	1,75	15	28	8,5
E	0,02	0,5	4	17	5,9

5.2 Herstellung von B-Zelllinien

Um die Funktion der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone im Zusammenhang mit EBV-Infektionen *in-vitro* zu untersuchen, wurden verschiedene B-Zelllinien der gleichen und weiterer Spender benötigt und hergestellt, LCLs und BBL. Als Ausgangsmaterial wurden jeweils B-Zellen mittels MACS-Technologie isoliert (vergleiche Abbildung 5.5). Wie in Abbildung 5.6 für Spender E beispielhaft dargestellt, konnte eine endogene EBV-Infektion der BBL mittels PCR mit Primern für das Gen des viralen Proteins gp85 ausgeschlossen werden. Ferner kamen

weitere B-Zelllinien, wie Raji, Daudi und K562 als Targets in Zytotoxizitäts-Assays zum Einsatz.

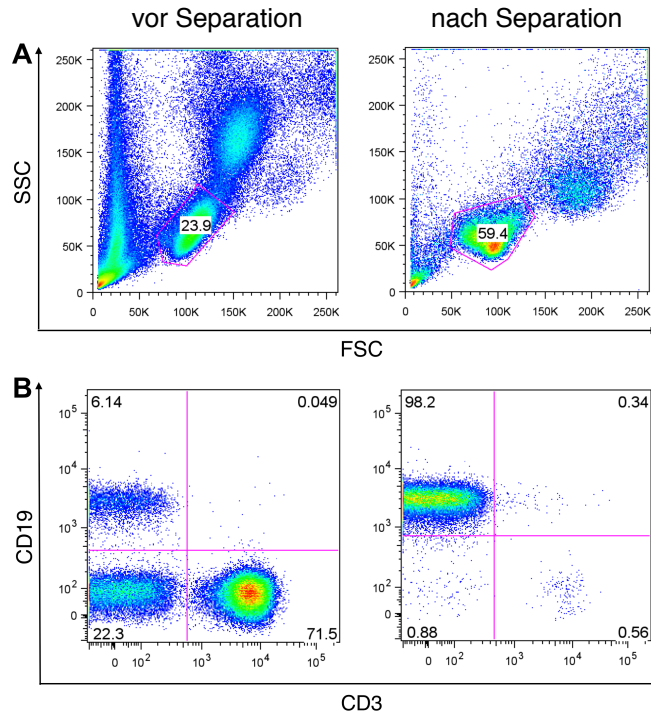


Abbildung 5.4 Separation von B-Zellen aus PBMCs. Die Diagramme zeigen beispielhaft das Ergebnis der B-Zell-Separierung aus PBMCs des Spenders C. Die immunomagnetische Depletion von Nicht-B-Zellen erfolgte mithilfe des *B cell Isolation Kit II* von Miltenyi Biotec. Auf der linken Seite sind die PBMCs (vor Separation) dargestellt. Das Resultat der Separation ist auf der rechten Seite im Bild gezeigt. **A** Im Größen- und Granularitätskriterium (SSC steht für engl. *side scatter* und FSC für *forward scatter*) wurden die mononukleären Zellen aufgesucht und eingegrenzt (siehe Gate = rotes Polygon). **B** Der Anteil der so eingegrenzten Lymphozyten wurde ermittelt. Gezeigt ist eine Färbung mit CD19 als B-Zell-Marker und CD3 als T-Zell-Marker. Die B-Zell-Fraktion (CD19⁺/CD3⁻) machte hier nach der Separation einen Anteil von über 98% aus.

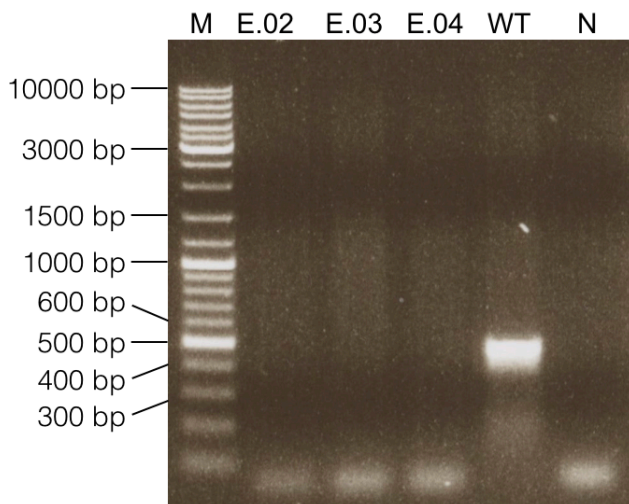


Abbildung 5.5 Ausschluss einer endogenen EBV-Infektion in BBL. Wie anhand dieser Gel-elektrophorese beispielhaft für drei BBL des Spenders E (E.02-04) dargestellt, konnte mittels PCR eine EBV-Infektion ausgeschlossen werden. „WT“: EBV-Wildtyp als Positivprobe, „N“: Negativprobe, M: Größenmarker.

5.3 Funktionelle Analyse der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone

Im nächsten Schritt wurden die phänotypisierten T-Zell-Klone auf ihre zytotoxische Aktivität gegenüber verschiedenen Zielzellen hin untersucht. Ziel war es insbesondere, Klone zu identifizieren, die möglicherweise EBV-spezifisch reagieren und diese Klone möglichst genau zu beschreiben, um sie in Zukunft bei weiteren Spendern gezielt aufsuchen zu können. Hierbei wurde ein besonderes Augenmerk auf $V\delta 1^+$ -T-Zellen gelegt, da bereits vermutet wird, dass diese eine Rolle in der Erkennung und Bekämpfung von viralen Infektionen spielen. Als Testsystem für die Analyse einer EBV-Spezifität wurde der Vergleich zwischen der Erkennung von autologen LCLs und von EBV-negativen BBL verwendet. Um zusätzliche Informationen über die Art des erkannten Antigens zu gewinnen, wurden zudem auch allogene LCLs und BBL verschiedener Spender getestet. Das Ergebnis dieser funktionellen Analyse soll im Folgenden nach Spendern aufgeteilt detailliert dargestellt werden.

5.3.1 Spender A

Mit insgesamt 106 Klonen, die sich aus der Klonierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen ergaben, war die Ausbeute bei Spender A am besten. Davon exprimierten 104 Klone einen $\gamma\delta$ -TCR und die Mehrzahl davon einen TCR mit $V\delta 2$. Tabelle 5.3 zeigt eine Liste aller Klone und deren identifizierte Merkmale. Bemerkenswerterweise traten bei diesem Spender vier Klone auf, die sowohl stark $\gamma\delta$ -TCR⁺ waren als auch schwach vom $\alpha\beta$ -TCR-spezifischen Antikörper angefärbt wurden. Sie exprimierten alle die $V\delta 1$ -Kette (siehe Tabelle 5.3 und Abbildung 5.3, Klone A.58, A.62, A.94, A.119). Außerdem wurden zwei Zell-Klone gefunden, die weder einen $\gamma\delta$ - noch einen $\alpha\beta$ -TCR exprimierten (Klone A.06 und A.79). Wegen ihres lymphoiden Phänotyps in der Vorwärts- und Seitwärtsstreuung, der Abwesenheit eines TCRs und ihrer Expression von CD56 wurden diese als NK-Zellen klassifiziert.

Tabelle 5.3 Phänotypisierung der Klone des Spenders A. Zur Generierung von Einzellzell-Klonen wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen aus PBMCs isoliert, mittels Grenzpunktverdünnung vereinzelt und mit bestrahlten allogenen PBMCs und allogenen LCLs koinkubiert. Es sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen dargestellt. Durch Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die T-Zell-Klone näher charakterisiert und kategorisiert (siehe Kapitel 5.1). (n.b.: nicht bestimmt; s: Schmiereffekt; +): nicht sicher positiv/evtl. Kreuzreaktivität der Antikörper; „X“ in Spalte „Ztx“: die zytotoxische Funktion des Klons wurde in mindestens einem Experiment geprüft; „X“ in Spalte „Sequ.“: die CDR3-Region der δ -Kette wurde sequenziert.) Die experimentellen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Chiara Rancan durchgeführt.

Klon	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx.	Sequ.
A.01	+	3419	-	-	96	++	10626	+	n.b.	n.b.
A.02	+	1387	-	-	90	++	12697	+	n.b.	n.b.
A.03	++	6691	-	-	112	-	-22	+	X	n.b.
A.05	+	2028	-	-	122	++	16818	+	n.b.	n.b.
A.06	-	62	-	-	99	-	-39	s	X	n.b.
A.07	+	2037	-	-	91	+	8000	+	n.b.	n.b.
A.08	+++	19983	-	+	629	-	8	+	X	X
A.09	+	675	-	-	124	+	7153	+	n.b.	n.b.
A.10	+	1425	-	-	85	++	15192	+	n.b.	n.b.
A.11	++	9770	-	-	137	-	2	+	n.b.	n.b.
A.12	+	1623	-	-	74	+	8809	s	n.b.	n.b.
A.13	+	707	-	-	89	+	9254	+	n.b.	n.b.
A.14	+	1643	-	-	84	++	11698	+	n.b.	n.b.
A.15	+	1215	-	-	143	++	14665	+	n.b.	n.b.
A.16	+	1263	-	-	95	++	14019	s	n.b.	n.b.
A.17	+	2322	-	-	91	++	14486	s	X	n.b.
A.18	+	1337	-	-	104	++	16755	+	n.b.	n.b.
A.19	+	1270	-	-	90	++	12467	+	n.b.	n.b.
A.20	+	594	-	-	91	++	20863	s	n.b.	n.b.
A.21	+++	21610	-	+	702	-	29	+	X	X
A.22	+	552	-	-	101	++	11786	+	n.b.	n.b.
A.23	+	2734	-	++	3700	-	38	s	X	n.b.
A.24	+	429	-	-	101	+	8590	+	n.b.	n.b.
A.25	+	1010	-	-	102	++	10436	+	n.b.	n.b.
A.26	+	1302	-	-	96	+	7687	+	n.b.	n.b.
A.27	+	1486	-	-	93	+	8837	s	n.b.	n.b.
A.28	+	2398	-	-	123	+	9675	+	n.b.	n.b.
A.29	+	1214	-	-	101	+	8172	s	n.b.	n.b.

Klon	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx.	Sequ.
A.30	+	1415	-	-	114	++	10004	s	n.b.	n.b.
A.31	+	2118	-	-	106	++	11585	+	n.b.	n.b.
A.32	+++	30141	-	+	726	-	2	+	X	n.b.
A.33	+	2445	-	-	113	++	13085	+	n.b.	n.b.
A.34	++	9189	-	++	5607	-	22	s	X	n.b.
A.35	+	1319	-	-	102	+	8849	+	n.b.	n.b.
A.36	+	1137	-	-	107	+	9869	+	n.b.	n.b.
A.37	+	1002	-	-	125	+	8789	+	n.b.	n.b.
A.38	+	964	-	-	113	++	17613	s	n.b.	n.b.
A.39	+	803	-	-	120	++	12899	+	n.b.	n.b.
A.40	+	770	-	-	95	++	13232	s	X	n.b.
A.41	+	1407	-	-	93	+	7225	s	n.b.	n.b.
A.42	+	1061	-	-	109	++	10604	+	n.b.	n.b.
A.43	+	2312	-	-	112	++	12300	+	n.b.	n.b.
A.44	+	3454	-	-	115	++	10009	+	n.b.	n.b.
A.45	+	1349	-	-	87	+	7577	+	n.b.	n.b.
A.46	+	4920	-	-	103	-	27	s	X	n.b.
A.47	+++	10804	-	++	3172	-	60	s	X	n.b.
A.48	+	922	-	-	86	+	6173	+	n.b.	n.b.
A.49	+	421	-	-	96	++	14764	+	n.b.	n.b.
A.50	+	1244	-	-	94	++	12332	+	n.b.	n.b.
A.51	+	685	-	-	107	++	15043	+	n.b.	n.b.
A.52	+	1048	-	-	92	+	7242	+	X	n.b.
A.53	+	1164	-	-	90	++	10161	+	n.b.	n.b.
A.54	+	1243	-	-	95	++	10426	+	n.b.	n.b.
A.55	+	1986	-	-	98	++	11978	s	X	n.b.
A.56	+++	13798	-	++	4031	-	115	s	X	n.b.
A.57	+	402	-	-	86	++	10983	+	n.b.	n.b.
A.58	+++	15020	(+)	++	3088	-	303	s	X	n.b.
A.59	+	837	-	-	93	++	20796	+	n.b.	n.b.
A.60	+	1027	-	-	78	++	13276	+	n.b.	n.b.
A.61	+	1351	-	-	76	++	18222	+	n.b.	n.b.
A.62	+++	11791	(+)	++	3750	-	269	s	X	n.b.
A.63	++	5602	-	-	94	-	-30	+	n.b.	n.b.

Klon	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx.	Sequ.
A.64	++	7905	-	-	96	-	-16	s	n.b.	n.b.
A.65	+	1538	-	-	101	++	15467	+	n.b.	n.b.
A.66	+	1955	-	-	76	++	15989	+	n.b.	n.b.
A.67	+	1455	-	-	82	+	9067	+	n.b.	n.b.
A.68	+	1588	-	-	86	+	7556	+	n.b.	n.b.
A.69	+	1478	-	-	97	++	12804	+	n.b.	n.b.
A.70	+	805	-	-	100	++	13355	+	n.b.	n.b.
A.71	+	1826	-	-	72	++	10309	s	n.b.	n.b.
A.72	+	4640	-	-	92	-	-90	+	n.b.	n.b.
A.73	++	7289	-	-	118	-	-82	+	n.b.	n.b.
A.75	++	6818	-	-	104	-	-77	+	n.b.	n.b.
A.76	++	5539	-	-	97	-	-69	+	n.b.	n.b.
A.79	-	112	-	-	119	-	-94	+	n.b.	n.b.
A.80	+	4002	-	-	96	-	-102	+	n.b.	n.b.
A.81	+	3285	-	-	82	-	-80	+	n.b.	n.b.
A.82	+	4956	-	-	108	-	-70	+	n.b.	n.b.
A.83	+++	10489	-	++	3778	-	27	s	n.b.	n.b.
A.84	++	5111	-	-	110	-	-103	+	n.b.	n.b.
A.85	+	4401	-	-	100	-	-84	+	n.b.	n.b.
A.86	+	3354	-	-	96	-	-103	+	n.b.	n.b.
A.91	+	1853	-	-	102	-	-88	+	n.b.	n.b.
A.92	+	3207	-	-	113	-	-60	0	n.b.	n.b.
A.93	++	5002	-	-	129	-	-84	+	n.b.	n.b.
A.94	+++	15050	(+)	++	2625	-	169	s	X	X
A.95	+++	26338	-	++	6337	-	-43	+	X	n.b.
A.96	+	4189	-	-	98	-	-89	+	n.b.	n.b.
A.97	+	2320	-	-	101	-	-91	+	n.b.	n.b.
A.99	+	2682	-	-	104	-	-103	+	n.b.	n.b.
A.100	+	4191	-	-	113	-	-56	+	n.b.	n.b.
A.102	+	4383	-	-	142	-	-85	+	n.b.	n.b.
A.104	+	4912	-	-	98	-	-94	+	n.b.	n.b.
A.105	+++	10125	-	++	4095	-	3	+	n.b.	n.b.
A.106	+	3214	-	-	92	-	-97	+	n.b.	n.b.
A.107	+	2659	-	-	113	-	-88	+	n.b.	n.b.

Klon	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx.	Sequ.
A.108	+	4277	-	-	107	-	-80	+	n.b.	n.b.
A.109	++	5013	-	-	82	-	-92	+	n.b.	n.b.
A.110	+	4795	-	-	95	-	-84	+	n.b.	n.b.
A.112	+	3819	-	-	96	-	-90	+	n.b.	n.b.
A.113	+	2353	-	-	89	-	-51	+	n.b.	n.b.
A.115	+	2671	-	-	89	-	-90	+	n.b.	n.b.
A.116	+	3095	-	-	89	-	-61	+	n.b.	n.b.
A.117	+	3758	-	-	96	-	-67	+	n.b.	n.b.
A.118	+	3244	-	-	128	-	29	0	n.b.	n.b.
A.119	++	6437	(+)	+	1625	-	109	s	X	n.b.
A.120	+	2915	-	-	127	-	-61	+	n.b.	n.b.
A.122	+	3248	-	-	94	-	-66	+	n.b.	n.b.
A.123	+	3694	-	-	110	-	-78	+	n.b.	n.b.

Um $\gamma\delta$ -T-Zellen zu identifizieren, die EBV erkennen, wurde deren zytotoxisches Verhalten gegen autologe LCLs mit dem gegen autologe BBL verglichen (siehe Abbildung 5.7). Tatsächlich zeigten sich hier einige T-Zell-Klone selektiv reaktiv gegenüber EBV-infizierten Zellen, während sie gegenüber BBL keine oder geringe Reaktivität aufwiesen. Klone, die autologe LCL stärker lysierten als autologe BBL, werden im Folgenden operationell als „EBV-spezifisch“ definiert. Vier Klone waren ausgeprägt EBV-spezifisch, drei weitere reagierten nur schwach auf LCLs und die restlichen fünf gar nicht. Unter den deutlich EBV-spezifischen konnten zwei phänotypische Muster der TCR-Expression beobachtet werden. Beide hatten ein erhöhtes geometrisches Mittel der $\gamma\delta$ -TCR-Expression gemeinsam ($\gamma\delta$ TCR+++). Phänotyp 1 exprimierte die δ 1-Kette im TCR mittelstark (δ 1++) und wurde außerdem leicht, vermutlich kreuzreaktiv, durch den $\alpha\beta$ -TCR-spezifischen Antikörper angefärbt (siehe Tabelle 5.3 Klone A.94 und A.58). Der EBV-reaktive Phänotyp 2 exprimierte die δ 1-Kette auf nur schwach positivem (δ 1+) Niveau und kreuzreagierte nicht mit anti- $\alpha\beta$ -TCR (siehe Tabelle 5.3 Klone A.21 und A.32). Diese beiden Phänotypen wurden auch bei den schwach EBV-spezifischen Klonen, jedoch nicht bei den areaktiven gefunden. Ferner wurde in zwei weiteren Experimenten die Fähigkeit der Erkennung und Lyse von allogenen LCLs überprüft. In verschiedenen Versuchen (siehe Abbildung 5.6 B und C) konnte gezeigt werden, dass die $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone des Spenders A mehrere unterscheidbare

Erkennungsmuster gegenüber allogenen LCLs zeigten. Zwei der Klone erkannten allogene LCLs deutlich stärker als autologe (z.B. A.62 und A.08), drei weitere Klone erkannten allogene LCLs ähnlich stark oder schwächer als autologe (A.21, A.94, A.32), während der Klon A.43 auf keine der beiden Zielzellen reagierte. Weiterhin fiel auf, dass die $\delta 2^+$ -T-Zell-Klone eine deutlich geringere zytotoxische Aktivität gegen allogene LCLs aufwiesen (Abb. 5.3 B, C). Warum manche Klone zwischen allogenen LCLs verschiedener Spender unterschieden, ließ sich nicht immer schlüssig auf die An- oder Abwesenheit bestimmter HLA-Klasse-I-Allotypen zurückführen, weder im Sinne einer HLA-Restriktion noch einer spezifischen Inhibition von KIRs durch HLA. Beispielsweise reagierte Klon A.94 deutlich gegenüber LCLs der Spender A, G, F jedoch nicht der Spender B und C. Allerdings gab es kein HLA-Klasse-I-Allel, das nur in den drei erkannten Spendern vorlag. Im Falle des Klons A.119 dagegen könnte die ausschließliche Reaktivität mit LCLs des Spenders G auf eine Alloreaktivität gegen HLA-Klasse-I-Allotypen zurückgehen, die nur bei diesem Spender, aber nicht bei Spender F, B oder C, vorliegen. Hier kämen A*6801, B*1501, C*0102 oder C*0501 in Frage. Der alternativen Möglichkeit einer Restriktion durch HLA-Klasse-II ([Flament et al. 1994](#)) konnte leider nicht nachgegangen werden, weil die nötigen HLA-Klasse-II-Typisierungen nicht erfolgt waren.

Auffallend bei allen Versuchen war, dass hauptsächlich Klone mit hohem $\gamma\delta$ -TCR-Expressionsniveau (TCR+++)⁺ reaktiv gegen LCLs waren.

Wie in Abbildung 5.6 D gezeigt, wurden Klone in einem weiteren Experiment gegen die Zielzellen Daudi, Raji und K562 getestet. K562-Zellen exprimieren keine MHC-Klasse-I-Moleküle und gelten als klassisches NK-Zell-Target, da sie von den meisten NK-Zell-Klassen sehr gut erkannt und effizient lysiert werden ([Anfossi et al. 2006](#)). Sie wurden daher in diesem Experiment als Indikator für NK-zellartige Reaktivität eingesetzt. Die Erkennung dieser HLA-defizienten Tumorzelllinie fiel bei $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen verschiedenster Phänotypen ($\delta 1^+$, $\delta 2^+$ und $\delta 1^-/\delta 2^-$) nur schwach aus. Im Gegensatz dazu konnte bei einem NK-Zell-Klon (A.06), der aus der gleichen $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonierung hervorging, eine hohe Lyse beobachtet werden, was die Voraussage bestätigte.

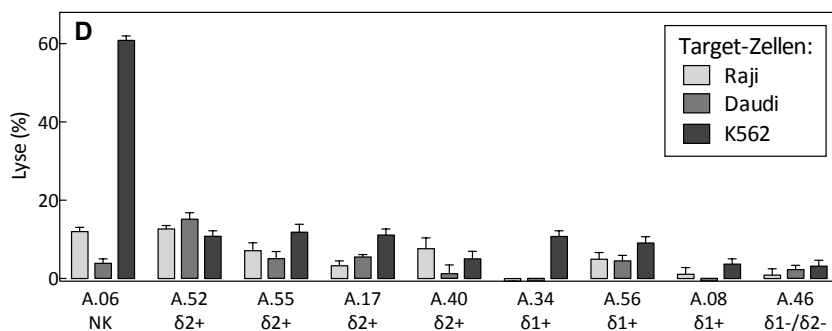
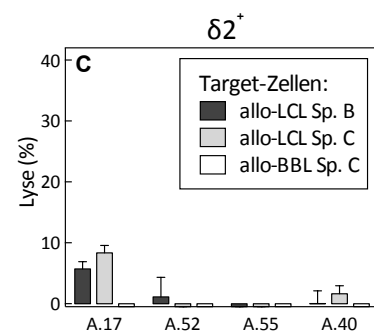
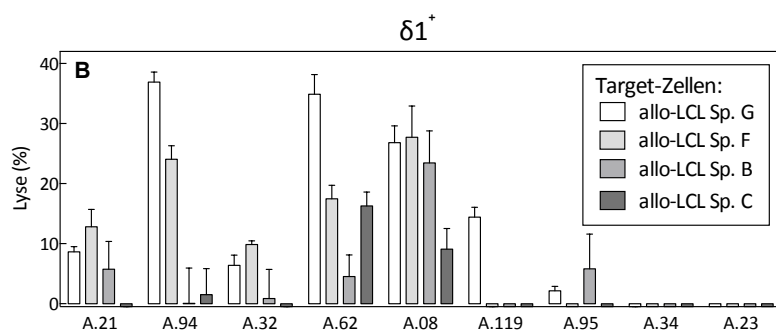
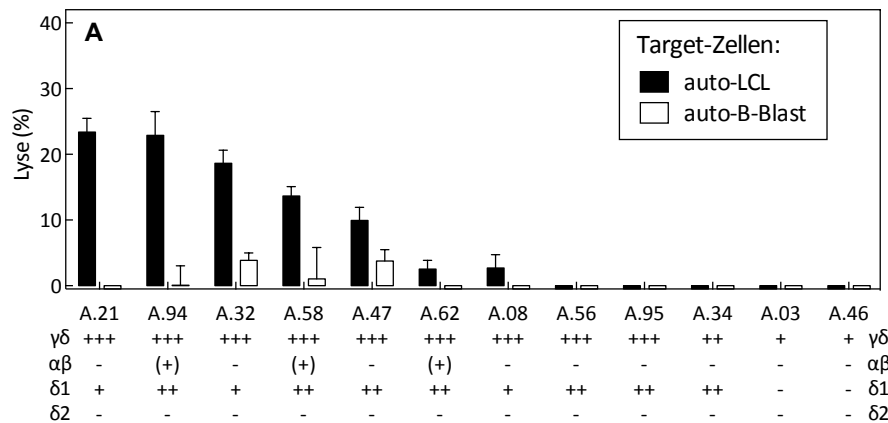


Abbildung 5.6 Erkennung von Zielzellen durch $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone von Spender A. Eine Auswahl an Klone des Spenders A wurde auf ihre zytotoxische Aktivität gegen unterschiedliche Zielzellen untersucht. Hierfür erfolgte eine Inkubation in einem Effektor- zu Zielzell-Verhältnis von 10:1. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils vier Replikaten angegeben. Sp. bedeutet Spender. **A** $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone gegen autologe LCLs und BBL. **B** $\delta 1$ -T-Zell-Klone gegen allogene LCLs. **C** $\delta 2$ -T-Zell-Klone gegen allogene LCLs und BBL. **D** $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone und der NK-Zell-Klon A.06 gegen typische NK-Zell-Targets (K562, Raji, Daudi).

Die Tumorzelllinie Daudi wurde in der Literatur schon früh als Target für $\delta 2^+$ -T-Zellen beschrieben, das von den meisten $\delta 2^+$ -T-Zellen erkannt wird (Fisch et al. 1990, Gober et al. 2003). Allerdings konnte in oben gezeigtem Experiment bei keinem der getesteten Klone eine starke Reaktivität gegen Daudi-Zellen beobachtet werden. Die Gründe dafür bleiben unklar. Für die Zelllinie Raji wurde ein uneinheitliches Muster der Erkennung durch $\gamma\delta$ -T-

Zell-Klone, jedoch eine gute Erkennung durch NK-Zellen beschrieben (Fisch et al. 1990). Die Erkennung von Raji-Zellen sowohl durch $\gamma\delta$ -T-Zellen als auch durch die getestete NK-Zelle fiel im Falle des Spenders A jedoch nur schwach aus. Es wurde bereits früher beobachtet, dass eine Minderheit von $\delta 2^+$ -T-Zellen nicht zur Erkennung von Daudi-Zellen in der Lage ist (Davodeau et al. 1993) und dass damit auch eine schwache Erkennung von mykobakteriellem Antigen (vermutlich Phosphoantigen) korreliert. Möglicherweise weist Spender A (aus unbekanntem Grund) eine erhöhte Zahl solcher $\delta 2^+$ -T-Zellen auf.

5.3.2 Spender B

Von Spender B konnten insgesamt 80 Einzelzell-Klone etabliert werden. Die Mehrzahl trug eine V $\delta 1$ -Kette im TCR. Auch hier traten zwei $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone auf, die schwach durch den anti- $\alpha\beta$ -TCR-Antikörper angefärbt wurden. Außerdem wurde ein NK-Zell-Klon etabliert. Die Tabelle 5.4 zeigt die Ergebnisse aller durchflusszytometrischen Untersuchungen dieses Spenders.

Tabelle 5.4 Phänotypisierung der Klone des Spenders B. Zur Generierung von Einzelzell-Klonen wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen aus PBMCs isoliert, mittels Grenzpunktverdünnung vereinzelt und mit bestrahlten allogenen PBMCs und allogenen LCLs kokubiert. Es sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen dargestellt. Durch Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die T-Zell-Klone näher charakterisiert und kategorisiert (siehe Kapitel 5.1). (n.b.: nicht bestimmt; s: Schmiereffekt; (+): nicht sicher positiv/evtl. Kreuzreaktivität der Antikörper; „X“ in Spalte „Ztx“: die zytotoxische Funktion des Klons wurde in mindestens einem Experiment geprüft; „X“ in Spalte „Sequ.“: die CDR3-Region der δ -Kette wurde sequenziert.) Die experimentellen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Chiara Rancan durchgeführt.

Klon	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V $\delta 1$	MFI $\delta 1$	V $\delta 2$	MFI $\delta 2$	CD56	Ztx.	Sequ.
B.01	+++	34481	-	-	171	-	21	+	X	X
B.02	+	2661	-	-	83	++	13548	+	X	n.b.
B.03	+++	16445	-	++	7085	-	56	s	X	n.b.
B.04	+++	22052	-	++	5595	-	110	s	X	X
B.05	+++	17955	-	++	2509	-	58	s	X	n.b.
B.06	+	3682	-	++	4281	-	5	s	X	n.b.
B.07	+++	13006	-	++	2554	-	94	s	n.b.	n.b.
B.08	+	1767	-	-	88	++	12255	+	n.b.	n.b.
B.09	+++	22445	-	++	3549	-	98	s	X	n.b.
B.10	+++	19293	-	++	3443	-	72	s	X	n.b.
B.11	+	1610	-	-	136	++	23453	+	n.b.	n.b.

Klon	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx.	Sequ.
B.12	+	4074	-	++	2610	-	11	s	X	n.b.
B.13	+++	15944	-	++	5967	-	102	s	X	n.b.
B.14	+++	20768	-	++	5945	-	85	+	n.b.	n.b.
B.15	+	1853	-	-	88	++	11851	+	n.b.	n.b.
B.16	+++	21617	-	++	3603	-	100	s	X	n.b.
B.17	+	1839	-	-	87	++	11869	s	n.b.	n.b.
B.18	+	2378	-	-	93	++	16997	+	n.b.	n.b.
B.19	+	2458	-	-	89	++	12920	s	n.b.	n.b.
B.20	+++	29739	-	++	5593	-	83	s	X	X
B.21	+++	21616	-	++	3991	-	112	s	X	n.b.
B.22	+++	13886	-	++	6480	-	59	s	n.b.	n.b.
B.23	+++	23529	-	++	3509	-	83	s	n.b.	n.b.
B.25	++	1723	-	-	100	++	13291	+	n.b.	n.b.
B.26	++	3602	-	+	1711	-	-42	+	X	n.b.
B.27	+++	24251	-	++	5202	-	118	s	X	n.b.
B.28	++	6450	-	-	108	-	44	s	n.b.	n.b.
B.29	+	3258	-	++	6787	-	35	s	X	X
B.30	+	1296	-	-	113	++	11839	s	n.b.	n.b.
B.31	+++	29225	-	++	4691	-	87	s	X	n.b.
B.32	+++	21043	-	++	5575	-	32	+	X	n.b.
B.33	++	5642	-	-	85	-	-7	s	X	n.b.
B.34	+++	16418	-	++	3183	-	75	s	X	n.b.
B.35	+	1230	-	-	116	+	9073	+	n.b.	n.b.
B.36	+	1763	-	++	2153	-	-12	s	X	X
B.37	+	3267	-	-	133	-	20	s	X	n.b.
B.39	+	3941	-	-	99	++	18279	+	n.b.	n.b.
B.40	+++	23333	-	++	5262	-	161	s	X	n.b.
B.42	+	2367	(+)	++	4298	-	45	+	X	n.b.
B.43	+	912	-	-	110	+	6213	+	n.b.	n.b.
B.44	+++	10618	-	++	4467	-	99	s	X	n.b.
B.45	++	5496	(+)	++	3581	-	91	s	n.b.	n.b.
B.46	+++	11346	-	++	4936	-	103	s	X	n.b.
B.47	+++	12127	-	++	4690	-	103	s	X	n.b.
B.48	+++	11573	-	++	4819	-	59	s	X	n.b.

Klon	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx.	Sequ.
B.49	+++	9866	-	++	2250	-	29	s	X	n.b.
B.50	+++	16397	-	++	4434	-	50	s	X	n.b.
B.51	+++	20437	-	++	5830	-	87	s	X	n.b.
B.52	+	647	-	-	106	++	12744	+	n.b.	n.b.
B.53	+	1165	-	-	93	++	11525	+	n.b.	n.b.
B.54	+++	18260	-	++	2426	-	69	s	X	n.b.
B.55	++	5538	-	-	98	-	-68	+	n.b.	n.b.
B.56	+++	22164	-	++	3125	-	52	s	X	n.b.
B.57	++	5576	-	-	103	-	-73	+	n.b.	n.b.
B.58	++	6256	-	-	138	-	9	+	n.b.	n.b.
B.59	+	2606	-	-	105	-	-27	+	n.b.	n.b.
B.60	+	4691	-	-	90	-	-8	s	n.b.	n.b.
B.61	++	5697	-	-	105	-	-83	+	n.b.	n.b.
B.62	+++	15830	-	++	2524	-	51	s	X	n.b.
B.63	+++	16965	-	++	3580	-	43	s	X	n.b.
B.64	++	5121	-	-	106	-	-69	+	n.b.	n.b.
B.65	+	1995	-	-	163	-	-18	+	n.b.	n.b.
B.66	+	2516	-	-	89	+	8903	+	X	n.b.
B.67	++	6969	-	-	113	-	-73	+	n.b.	n.b.
B.68	+	4440	-	-	114	-	-98	+	n.b.	n.b.
B.69	+	3738	-	-	123	-	-20	+	n.b.	n.b.
B.70	+	3951	-	-	79	++	15059	s	n.b.	n.b.
B.71	++	9951	-	++	5289	-	60	s	X	n.b.
B.73	+++	16080	-	++	4015	-	75	s	X	n.b.
B.74	-	91	-	-	118	-	-2	s	n.b.	n.b.
B.75	+++	12437	-	+	2315	-	16	s	X	n.b.
B.76	+++	34123	-	++	4456	-	97	s	X	n.b.
B.77	+++	18296	-	++	2637	-	57	s	X	n.b.
B.78	+	3844	-	-	181	-	33	+	n.b.	n.b.
B.80	+++	16089	-	++	3912	-	66	s	n.b.	n.b.
B.89	+++	25730	-	++	3415	-	73	s	X	n.b.
B.92	+	2714	-	-	78	++	12462	s	n.b.	n.b.
B.95	++	8982	-	-	114	-	-8	s	X	n.b.
B.96	+++	30541	-	-	133	-	3,07	s	X	n.b.

Auch bei Spender B wurde zur Identifizierung von EBV-spezifischen $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen die Reaktivität gegen autologe LCLs und BBLs getestet. Es wurden hierfür ausschließlich $\delta 2$ -negative T-Zell-Klone herangezogen. Abbildung 5.6 zeigt das Ergebnis des zytotoxischen Screenings, wobei sich drei funktionelle Populationen abzeichnen. Klone der einen Gruppe schienen ein EBV-spezifisches Reaktionsmuster aufzuweisen, eine zweite Population erkannte keines der beiden Targets und die Klone der dritten Gruppe lysierten interessanterweise bevorzugt autologe BBL.

Bei den fünf Klonen, die am deutlichsten EBV-spezifisch waren (Lyse von LCLs >10%; Klon B.01, B.26, B.04, B.29, B.36), traten unterschiedliche Phänotypen in der TCR-spezifischen Antikörperfärbung auf.

Trägt man übersichtshalber die Lyse der BBLs gegen die der LCLs auf (Abbildung 5.9), so wird noch deutlicher, dass die Mehrzahl der getesteten reaktiven T-Zell-Klone jeweils eines der beiden Targets favorisierte. Die meisten dieser Klone hatten den Phänotyp $\delta 1+$ oder $\delta 1++$, ein Klon war $\delta 1-/\delta 2-$.

Eine weitere Versuchsreihe diente der Untersuchung einer möglichen Alloreaktivität der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone dieses Spenders. Wie in Abbildung 5.7 B dargestellt, wurde hierfür die Erkennung drei unterschiedlicher allogener LCLs mit der einer autologen LCL verglichen. Die drei allogenen LCLs (der Spender C, F, und G) waren gegenüber dem autologen Spender B im HLA-Klasse-I-Typ jeweils vollständig divergent. Vier der fünf Klone, die im vorangehenden Experiment als EBV-spezifisch identifiziert wurden (Klone B.01, B.26, B.29, B.36), wurden auch in diesem Experiment getestet. Sie erkannten allogene LCLs in einem nahezu gleichen Ausmaß wie die autologe LCL. Die EBV-Spezifität dieser Klone war also offenbar nicht HLA-Klasse-I-restringiert.

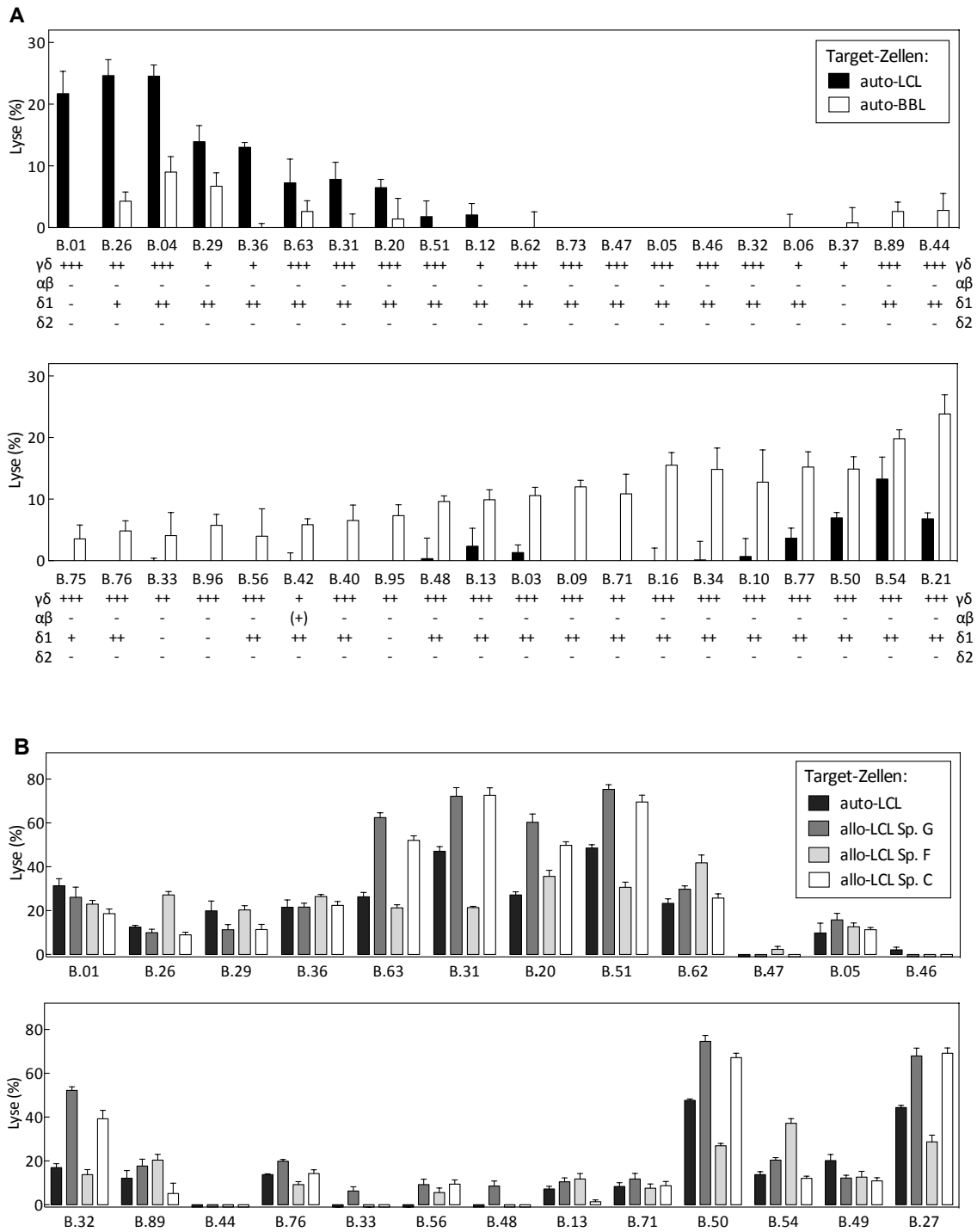


Abbildung 5.7 Erkennung von LCLs und BBLs durch $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone von Spender B. **A** Lyse von autologen LCLs und BBL. Es sind die Mittelwerte von jeweils vier Replikaten dargestellt. **B** Lyse von autologen und allogenen LCLs. Beide Experimente wurden in einem Effektor-zu-Zielzellen-Verhältnis von 10:1 durchgeführt. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils vier Replikaten dargestellt.

Eine zweite Gruppe von Klonen wies in diesem Versuch eine ausgeprägte Alloreaktivität auf, insbesondere die Klone B.63, B.31, B.20, B.51, B.32, B.50 und B.27. Das Reaktionsmuster dieser sieben Klone war auffallend ähnlich: Allogene LCLs der Spender G und C wurden stark erkannt, die Reaktivität gegen LCLs des Spenders F war weitaus geringer. Das vermutete Antigen – wahrscheinlich ein allogenes Merkmal – ist also offenbar nur bei den Spendern G und C vorhanden. Ein Blick auf die HLA-Typen der Spender (Tabelle 4.10) zeigt, dass die Spender G und C das Allel HLA-B*44:02 aufweisen, Spender B und F jedoch nicht. HLA-B*4402 ist auch bereits als Alloantigen beschrieben, das von $\alpha\beta$ -T-Zellen erkannt werden kann (Burrows et al. 1994).

Alle genannten alloreaktiven $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone wiesen in der Antikörperfärbung den gleichen TCR-Phänotyp ($\gamma\delta$ TCR+++/ $V\delta 1$ ++) auf, allerdings zeigte die Mehrzahl der sonstigen Klone dieses Spenders ebenfalls diesen Phänotyp. Eine Identifizierung von alloreaktiven Klonen allein anhand dieses TCR-Expressionsusters war also nicht möglich.

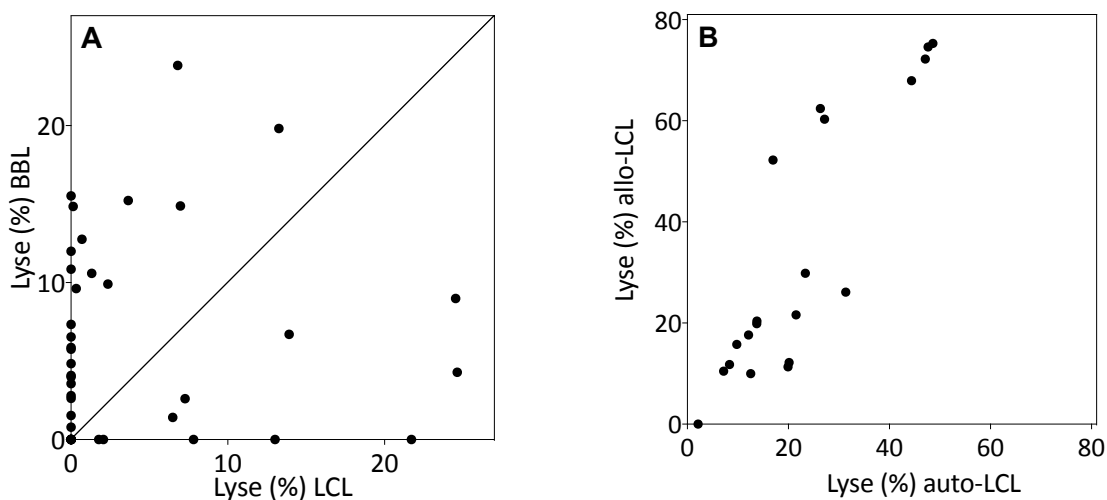


Abbildung 5.8 Reaktivität von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen des Spenders B. **A** Korrelation der Lyse von LCLs und BBL. Die Diagonale markiert ein Lyse-Verhältnis von 1:1. **B** Korrelation der Lyse von autologen und allogenen LCLs.

In der zweidimensionalen Darstellung der Lyse autologer und allogener LCLs (hier exemplarisch von Spender G) ließen sich stark alloreaktive von gering alloreaktiven Klonen recht deutlich abgrenzen (Abbildung 5.7 B).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass bei Spender B vier unterschiedliche funktionelle Klassen von $V\delta 1^+$ -T-Zell-Klonen unterschieden werden konnten, nämlich EBV-

spezifische, alloreaktive, areaktive und autoreaktive T-Zellen. Während die meisten EBV-spezifischen T-Zell-Klone vom V δ 1⁺-Typ waren, wurde auch ein EBV-spezifischer V δ 1⁻/V δ 2⁻-Zell-Klon identifiziert. Es fanden sich keine Hinweise auf eine HLA-restringierte EBV-Spezifität.

5.3.3 Spender C

Von Spender C konnten insgesamt 77 Klone etabliert werden. Die häufigsten Phänotypen waren, in dieser Reihenfolge, V δ 2⁺, V δ 1⁺ und V δ 1⁻V δ 2⁻. Ferner konnten zwei NK-Zell-Klone (C.10, C.91), sowie ein $\gamma\delta$ -T-Zell-Klon (C.36) etabliert werden, der sowohl stark $\gamma\delta$ -TCR⁺ war als auch schwach vom $\alpha\beta$ -TCR-spezifischen Antikörper angefärbt wurde. Tabelle 5.5 zeigt alle generierten Klone dieses Spenders mit den getesteten phänotypischen Merkmalen.

Tabelle 5.5 Phänotypisierung der Klone des Spenders C. Zur Generierung von Einzellzell-Klonen wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen aus PBMCs isoliert, mittels Grenzpunktverdünnung vereinzelt und mit bestrahlten allogenen PBMCs und allogenen LCLs koinkubiert. Es sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen dargestellt. Durch Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die T-Zell-Klone näher charakterisiert und kategorisiert (siehe Kapitel 5.1). (n.b.: nicht bestimmt; s: Schmiereffekt; (+): nicht sicher positiv/evtl. Kreuzreaktivität der Antikörper; „X“ in Spalte „Ztx“: die zytotoxische Funktion des Klons wurde in mindestens einem Experiment geprüft; „X“ in Spalte „Sequ.“: die CDR3-Region der δ -Kette wurde sequenziert.) Die experimentellen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Chiara Rancan durchgeführt.

Klon C	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx..	Sequ.
C.01	+	2055	-	++	2056	-	-8	+	X	n.b.
C.02	+	605	-	-	86	++	17473	+	X	n.b.
C.03	+	1006	-	-	115	++	14254	+	n.b.	n.b.
C.04	+	528	-	-	90	++	13991	+	n.b.	n.b.
C.06	+++	31279	-	-	160	-	-62	+	X	X
C.07	+	1906	-	+	1892	-	-8	+	X	n.b.
C.08	+	2077	-	-	112	+	6225	+	n.b.	n.b.
C.09	+++	30988	-	-	151	-	-48	+	X	X
C.10	-	62	-	-	95	-	-84	+	n.b.	n.b.
C.11	+	781	-	-	99	++	17447	+	n.b.	n.b.
C.12	+	1512	-	++	4638	-	-37	+	X	n.b.
C.13	+	1602	-	-	97	+	9674	+	n.b.	n.b.
C.14	+	1280	-	+	1265	-	2	s	X	X
C.15	+	1166	-	-	103	+	5182	+	n.b.	n.b.

Klon C	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx..	Sequ.
C.16	+	2204	-	-	134	+	8031	+	n.b.	n.b.
C.17	+	2093	-	-	127	+	6329	+	n.b.	n.b.
C.18	+	2193	-	+	1172	-	-23	s	X	n.b.
C.19	+	1172	-	-	111	+	4836	+	n.b.	n.b.
C.20	+	698	-	-	116	++	15731	+	n.b.	n.b.
C.21	+	972	-	-	117	+	4595	+	n.b.	n.b.
C.22	+	1352	-	+	852	-	-27	s	X	X
C.23	+	1844	-	-	125	+	6789	+	n.b.	n.b.
C.24	+	1915	-	-	129	+	5263	+	n.b.	n.b.
C.25	+	505	-	-	128	++	16812	+	n.b.	n.b.
C.26	+	1341	-	-	128	+	4392	+	n.b.	n.b.
C.27	+	735	-	-	142	++	14121	s	n.b.	n.b.
C.28	+	1399	-	-	127	+	6259	+	n.b.	n.b.
C.29	+	581	-	-	103	++	14800	+	n.b.	n.b.
C.30	+	1307	-	+	1017	-	28	+	X	n.b.
C.32	+	635	-	-	149	++	19107	+	n.b.	n.b.
C.33	+	2264	-	+	1241	-	12	+	X	n.b.
C.34	+	3402	-	-	148	+	6037	+	n.b.	n.b.
C.35	+	1131	-	-	120	++	19231	+	n.b.	n.b.
C.36	+	1232	(+)	++	4553		77	s	n.b.	n.b.
C.37	+	2777	-	+	1626	-	-34	+	X	n.b.
C.38	+	701	-	-	92	++	14886	+	n.b.	n.b.
C.39	++	6976	-	++	4223	-	-69	+	X	n.b.
C.40	+	2392	-	+	1056	-	20	+	n.b.	n.b.
C.41	+	3083	-	-	141	+	9805	+	n.b.	n.b.
C.42	+	2179	-	-	121	+	4273	+	n.b.	n.b.
C.43	+	1096	-	-	163	++	19521	+	n.b.	n.b.
C.44	+	820	-	-	111	++	16324	+	n.b.	n.b.
C.45	+	1223	-	-	165	+	5348	+	n.b.	n.b.
C.46	+	3137	-	+	1620	-	-7	+	X	n.b.
C.47	+++	32190	-	++	3541	-	27	+	X	n.b.
C.48	+	2408	-	-	158	+	7133	+	n.b.	n.b.
C.49	+	2351	-	-	116	+	9380	+	n.b.	n.b.
C.51	+	681	-	-	98	++	14950	+	n.b.	n.b.

Klon C	$\gamma\delta$ TCR	MFI $\gamma\delta$	$\alpha\beta$ TCR	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	Ztx..	Sequ.
C.52	+	1943	-	+	1706	-	6	+	X	n.b.
C.54	+	3648	-	-	106	-	-80	+	n.b.	n.b.
C.55	+	1555	-	+	1313	-	-37	+	X	n.b.
C.56	+	2890	-	-	109	-	-92	+	n.b.	n.b.
C.57	+	1881	-	-	115	-	-70	+	n.b.	n.b.
C.58	+	1275	-	+	1173	-	-42	+	X	n.b.
C.59	+	2598	-	-	126	-	-88	+	n.b.	n.b.
C.61	+	1379	-	++	6231	-	-75	+	X	n.b.
C.62	+	3032	-	-	113	-	-98	+	n.b.	n.b.
C.69	++	5001	-	-	151	-	-26	+	n.b.	n.b.
C.70	+	1933	-	++	5203	-	-72	+	n.b.	n.b.
C.71	+	1251	-	++	5713	-	-65	+	n.b.	n.b.
C.76	+	2062	-	++	4398	-	-27	+	n.b.	n.b.
C.78	+	1250	-	+	852	-	-4	+	X	n.b.
C.79	+	1553	-	+	954	-	-2	+	X	n.b.
C.81	+	2920	-	-	129	+	7296	+	n.b.	n.b.
C.82	+	1011	-	-	92	++	14102	+	n.b.	n.b.
C.83	+	897	-	++	3827	-	-20	+	n.b.	n.b.
C.84	+	1765	-	-	97	-	-24	+	n.b.	n.b.
C.85	+	1602	-	-	107	-	-91	+	n.b.	n.b.
C.86	+	1092	-	+	936	-	12	+	X	n.b.
C.87	+	2162	-	+	1030	-	26,7	+	n.b.	n.b.
C.88	+	561	-	-	96	++	15570	+	n.b.	n.b.
C.89	+	1325	-	+	1554	-	299	+	X	n.b.
C.90	-	85	-	-	105	-	-46	+	n.b.	n.b.
C.91	+	3551	-	-	107	-	-34	+	n.b.	n.b.
C.92	+++	23017	-	++	2739	-	24	+	X	n.b.
C.93	+	2028	-	-	103	+	5411	+	n.b.	n.b.
C.94	+	1225	-	-	92	++	13995	+	n.b.	n.b.
C.95	+	2705	-	-	90	-	-63	+	n.b.	n.b.
C.96	+	1901	-	-	115	-	-51	+	n.b.	n.b.

Auch bei Spender C wurden ausgewählte, hinreichend in Kultur proliferierende Zell-Klone auf ihr zytotoxisches Verhalten gegenüber verschiedenen Zielzellen untersucht. Abbildung 5.9 A zeigt, dass die Untersuchung hinsichtlich EBV-spezifischer $V\delta 1^+$ -T-Zellen nur vereinzelte reaktive Zellen ergab, die zudem nur schwach reagierende (C.92, C.14) und einen grenzwertig reaktiven Klon (C.22) identifizierten. Klon C.92 gehörte zum hochexprimierenden ($TCR\gamma\delta^{+++}/\delta 1^{++}$), Klon C.14 zum niedrig exprimierenden Phänotyp ($TCR\gamma\delta^{+}/\delta 1^{+}$). Alle vier autoreaktiven Klone, die gegen autologe BBL, jedoch nicht autologe LCL reagierten, exprimierten ihren TCR auf hohem Niveau (Phänotyp $TCR\gamma\delta^{+++}$ oder $++$).

Im nächsten Experiment (siehe Abbildung 5.9 B) fiel besonders auf, dass drei $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone (C.06, C.09, C.39) eine starke Alloreaktivität aufwiesen. Alle drei Klone hatten beim vorherigen Experiment bereits Reaktivität gegen autologe BBL, jedoch nicht autologe LCL aufgewiesen. Als Ziel einer möglichen HLA-spezifischen Alloreaktivität käme das Merkmal HLA C*07 in Frage, da dies das einzige HLA-Klasse-I-Merkmal ist, das Spender F und B gemeinsam hatten, aber nicht bei Spender C und G vorkam. Möglich wäre auch eine HLA-Klasse-II-restringierte Alloreaktivität (Flament et al. 1994), aber dieser Möglichkeit konnte mangels vollständiger HLA-Klasse-II-Typisierungsdaten für die betreffenden Spender nicht weiter nachgegangen werden. Weil gerade die drei alloreaktiven Klone auch die K562-Zellen, ein typisches NK-Zell-Target, äußerst stark erkannten (siehe Abb. 5.9 C), wurde auch der Hypothese nachgegangen, ob diese $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone möglicherweise NK-Zell-artig reagieren, nämlich durch HLAs via KIR inhibiert werden, wie bereits früher bei $V\delta 2^+$ -T-Zellen beobachtet wurde (Rothenfusser et al. 2002). Es wurde daher überprüft, ob den Spendern B und F ein KIR-Ligand fehlt, den Zellen der Spender C und G exprimieren (siehe Tabelle 4.10). Dabei zeigte sich, dass Spender C und G jeweils sowohl einen Ligand für KIR3DL1 (also ein HLA-Bw4-Molekül) als auch einen Ligand für KIR2DL1 (ein HLA-C-Molekül der Gruppe 2) haben. Spender B besitzt nur ein Bw4 (HLA-A*2402) aber kein HLA-C-Gruppe-2-Molekül. Bei Spender F ist es umgekehrt, dieser besitzt ein HLA-C der Gruppe 2 (C*0202), aber kein Bw4-Allel. Diesen beiden letzteren Spendern fehlt also je ein inhibitorischer KIR-Ligand. Die Abwesenheit solcher KIR-Liganden könnte die Reaktivität von T-Zell-Klonen induzieren, die die entsprechenden KIRs exprimieren. Leider konnte diese Hypothese nicht genauer überprüft werden, da der KIR-Expressionsphänotyp für die T-Zell-Klone mangels hinreichender Zellzahlen nicht ermittelt werden konnte.

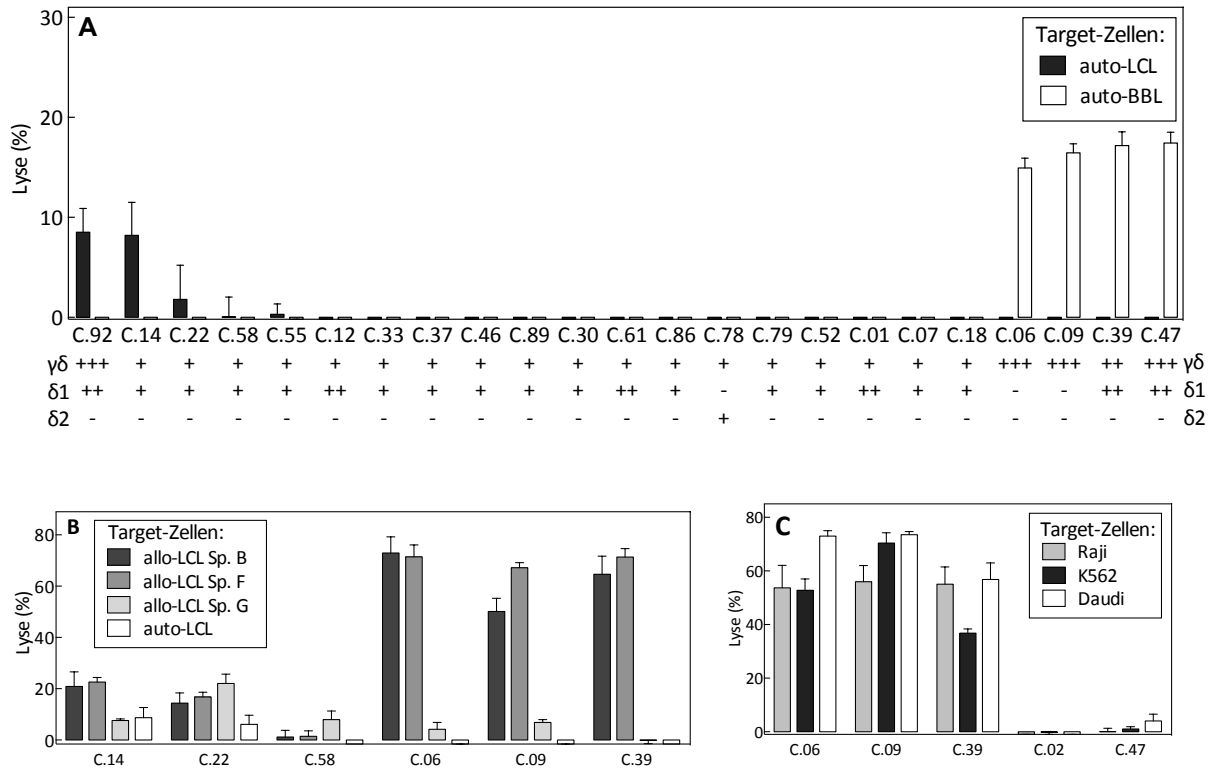


Abbildung 5.9 Erkennung von LCLs und BBLs durch $\gamma\delta$ T-Zell-Klone des Spenders C. Die zytotoxische Aktivität ausgewählter $\gamma\delta$ -T-Zellen wurde gegenüber folgenden Zielzellen getestet: **A** autologe LCLs und BBLs; **B** autologe und allogene LCLs; **C** Daudi-, Raji- und K562-Zellen. Das Verhältnis von Effektor- zu Zielzelle mit betrug jeweils 10:1. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler von jeweils vier Replikaten angegeben.

Darüber hinaus wurden die Klone auf Reaktivität gegenüber weiteren B-Zelllinien getestet. Hier kamen EBV-positive Tumorzelllinien wie Raji und Daudi sowie das NK-Zell-Target K562 als Zielzellen zum Einsatz. Diese wurden allesamt von den Klonen C.06, C.09, und C.39 stark lysiert, während sie von den restlichen Klonen dieses Versuchs nicht erkannt wurden. Insgesamt ergaben sich bei diesem Spender also nur geringe Hinweise auf EBV-spezifische T-Zellen, jedoch deutliche Hinweise auf die Anwesenheit einer funktionellen Subgruppe alloreaktiver $\gamma\delta$ -T-Zellen mit einer NK-Zell-ähnlichen Regulation.

5.3.4 Spender D und E

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse für Spender D und E gemeinsam dargestellt. Von Spender D konnten 45 Klone, von Spender E 23 Klone etabliert werden. Davon war die Mehrzahl jeweils $V\delta 2^+$. Wie in den Tabellen 5.6 und 5.7 dargestellt, wurden bei der phänotypischen Analyse an einer Auswahl von Klonen auch die Expression zusätzlicher

Oberflächenmoleküle wie V γ 9 und verschiedene NK-Zell-Marker untersucht. Bei Spender D konnten vier Klone mit dem ansonsten seltenen TCR-Heterodimer V γ 9V δ 1 identifiziert werden (D.09, D.25, D.35, D.36). Alle Klone bis auf eine Ausnahme (Klon E.22) exprimierten NKG2D. Die Mehrzahl der Klone exprimierte keine KIRs, vier V δ 1⁺ Klone von Spender D exprimierten jedoch einen oder zwei KIRs.

Außerdem wurde von keinem der Klone mehr als zwei unterschiedliche KIRs exprimiert.

Tabelle 5.6 Phänotypen der Klone des Spenders D. Zur Generierung von Einzellzell-Klonen wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen aus PBMCs isoliert, mittels Grenzpunktverdünnung vereinzelt und mit bestrahlten allogenen PBMCs und allogenen LCLs kokubiert. Es sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen dargestellt. Durch Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die T-Zell-Klone näher charakterisiert und kategorisiert (siehe Kapitel 5.1). (n.b.: nicht bestimmt; s: Schmiereffekt; (+): nicht sicher positiv/evtl. Kreuzreaktivität der Antikörper; „X“ in Spalte „Ztx“: die zytotoxische Funktion des Klons wurde in mindestens einem Experiment geprüft; „X“ in Spalte „Sequ.“: die CDR3-Region der δ -Kette wurde sequenziert.)

Klon	$\gamma\delta$ -TCR	MFI $\gamma\delta$	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	V γ 9	NKG2D	NKG2A	2DL1	2DL2/3	3DL1	Ztx.	Sequ.
D.01	+	929	-	120	+	7414	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.02	+	1049	-	104	+	2707	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	X
D.03	+++	18521	++	2216	-	182	s	-	+	s	-	-	-	X	X
D.04	+++	15691	+	1238	-	185	s	-	+	-	-	-	-	X	n.b.
D.05	+	1215	-	91,6	+	7277	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.07	+	712	-	133	++	11357	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.08	++	8357	+	1621	-	-59	+	-	+	-	-	+	-	n.b.	n.b.
D.09	+++	17803	+	1997	-	97	s	+	+	-	-	-	+	n.b.	n.b.
D.10	+++	30626	-	175	-	108	s	-	+	-	-	-	-	X	n.b.
D.11	+	891	-	122	++	12347	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.12	+	4210	-	115	-	88	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.13	+	943	-	83	+	3991	+	+	+	s	-	-	-	X	n.b.
D.14	+	1287	-	101	+	6654	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
D.16	+	1280	-	109	+	7917	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
D.17	+	1040	-	101	++	10471	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	X
D.18	+++	16258	++	3411	-	84	s	-	+	-	-	-	-	X	n.b.
D.19	++	6805	+	787	-	16	+	-	+	-	+	+	-	X	n.b.
D.20	+	670	-	100	+	3798	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
D.21	+	749	-	90	+	5416	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	X
D.22	+	977	-	107	+	6760	s	+	+	+	-	-	-	X	X
D.23	+	641	-	99	+	4057	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.24	+++	15819	++	4807	-	108	s	-	+	s	-	-	-	X	n.b.
D.25	+++	20638	+	1331	-	125	s	+	+	-	-	-	-	X	X
D.26	+	868	-	105	+	7238	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.27	+	777	-	102	++	10802	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.

Klon	$\gamma\delta$ -TCR	MFI $\gamma\delta$	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	V γ 9	NKG2D	NKG2A	2DL1	2DL2/3	3DL1	Ztx.	Sequ.
D.28	+	1141	-	107	+	5779	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
D.29	+	592	-	125	++	13848	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.30	+	949	-	97,2	++	14668	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
D.31	+	837	-	82	++	15659	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.33	+	1104	-	122	+	7921	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.35	+++	20191	++	2435	-	110	s	+	+	-	-	-	-	X	n.b.
D.36	+++	17154	++	2683	-	29,4	+	+	+	-	-	-	-	X	n.b.
D.37	+	1047	-	160	+	8317	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.38	+	881	-	125	++	14088	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.39	+	1449	-	110	+	8375	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.40	+	896	-	94	++	10786	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.41	++	5204	+	1666	-	78	+	-	n.b.	n.b.	-	-	-	n.b.	n.b.
D.43	+	549	-	85	++	15930	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.44	+	1106	-	188	++	11182	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.45	++	7615	++	4950	-	103	s	-	n.b.	n.b.	-	-	-	n.b.	n.b.
D.46	+	839	-	118	+	6650	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.47	++	7310	+	1165	-	67	+	-	+	s	+	+	-	n.b.	n.b.
D.48	+	1568	-	122	++	11704	+	+	+	+	-	-	-	n.b.	n.b.
D.50	+	1123	-	160	+	5124	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
D.51	+	2093	+	1173	-	35	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X

Tabelle 5.7 Phänotypen der Klone des Spenders E

Klon	$\gamma\delta$ -TCR	MFI $\gamma\delta$	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	γ 9	NKG2D	NKG2A	2DL1	2DL2/3	3DL1	Ztx.	Sequ.
E.01	+++	11429	++	4465	-	77	s	-	+	-	-	-	-	X	n.b.
E.02	+	758	-	125	+	8616	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	X
E.03	+	644	-	120	+	6126	+	-	s	-	-	-	-	X	X
E.04	+	2911	-	103	-	60	s	-	+	s	-	-	-	X	n.b.
E.05	+	709	-	104	+	9849	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
E.06	+	608	-	115	+	6000	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.07	+	665	-	155	+	8035	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.08	+	1455	-	126	+	4923	-	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.10	+	1022	-	274	+	2199	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.11	+	273	-	106	++	11046	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.12	+	537	-	144	+	7964	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.13	+	856	-	132	+	8389	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.14	+	788	-	117	+	8995	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
E.15	+	872	-	90	++	10263	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	X
E.16	+	734	-	119	+	9120	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	n.b.
E.17	+	820	-	93,1	++	12642	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	X
E.18	+	967	-	109	++	10135	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	X	X

Klon	$\gamma\delta$ -TCR	MFI $\gamma\delta$	V δ 1	MFI δ 1	V δ 2	MFI δ 2	CD56	γ 9	NKG2D	NKG2A	2DL1	2DL2/3	3DL1	Ztx.	Sequ.
E.01	+++	11429	++	4465	-	77	s	-	+	-	-	-	-	X	n.b.
E.19	++	6054	+	973	-	42,6	s	n.b.	n.b.	n.b.	-	-	-	X	n.b.
E.20	+++	10558	++	2740	-	98,4	s	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.21	+++	13727	+	1625	-	111	s	n.b.	n.b.	n.b.	-	-	-	X	n.b.
E.22	+	1291	-	136	-	108	-	+	-	-	-	-	-	X	n.b.
E.23	+	816	-	135	++	10650	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
E.24	+	857	-	162	+	5094	+	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Auch bei diesen beiden Spendern wurde eine größere Auswahl an Klonen Experimenten unterzogen, die der Identifizierung einer möglichen EBV-Spezifität dienen sollten. Es handelte sich hierbei um eine Voranalyse ohne Replikate zur Auswahl möglicherweise interessanter Klone, die dann in detaillierteren Experimenten weiter untersucht werden sollten. Wie in Abbildung 5.10 A dargestellt, reagierten die Klone D.25, D.35 und D.10 schwach gegen autologe LCLs und nicht gegen BBL. Weil die autologen BBL zum Zeitpunkt des Experiments leider noch nicht verfügbar war, konnte bei Spender D zunächst nur gegen eine allogene BBL des Spenders E getestet werden. Bei diesen drei Klonen wurde aufgrund der Reaktivität gegen LCL und der fehlenden Reaktivität mit der allogenen BBL vorläufig eine EBV-Spezifität vermutet. Elf V δ 2-positive Klone zeigten, wie bereits bei anderen Spendern beobachtet, keinen zytotoxischen Effekt gegenüber LCL oder BBL. Das gleiche galt für die übrigen V δ 1-positiven Klone.

Bei Spender E hingegen wurde die Reaktivität gegen die autologe BBL und autologe LCLs getestet. Die Klone E.21 und E.03 zeigten ein EBV-spezifisches Muster, allerdings ebenso nur einen schwachen lytischen Effekt. Auch in diesem Versuch waren V δ 2-positive Klone areaktiv gegenüber BBL und LCL.

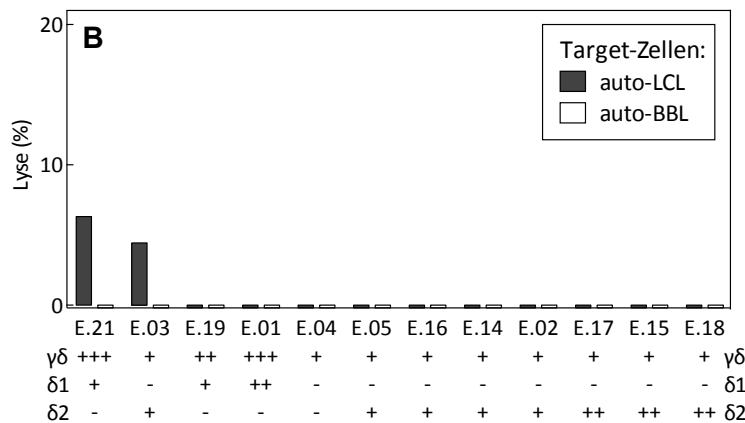
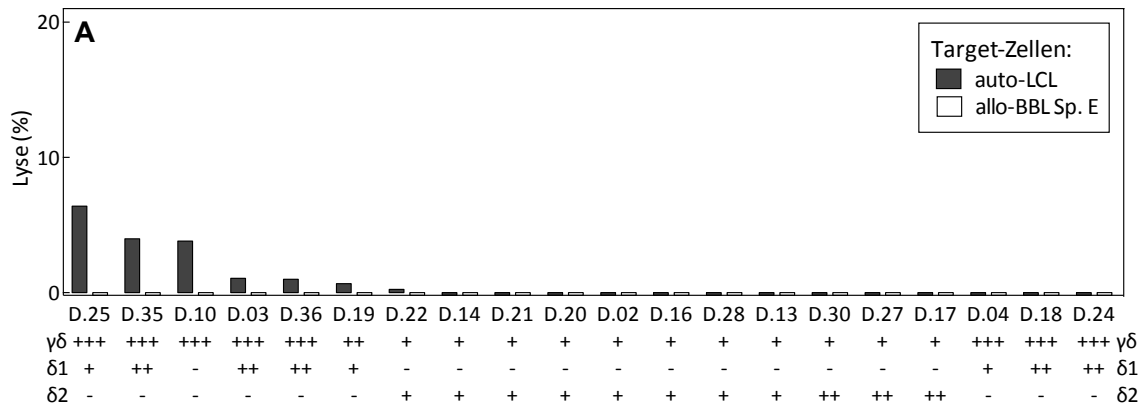


Abbildung 5.10 Erkennung von LCLs und BBL durch $\gamma\delta$ T-Zell-Klone. **A** Klone des Spenders D gegen autologe LCLs und allogene BBL. **B** Klone des Spenders E gegen autologe LCLs und BBL. Es wurde der Inhalt eines *wells* gut proliferierender Effektorzellen mit einer Targetzelle koinkubiert. Es wurden keine Replikate verwendet.

In einem zweiten Versuchsdurchlauf wurde eine Auswahl der oben gezeigten Effektorzellen mit vermehrter Zellzahl erneut getestet. Hier zeigte sich nun bei einigen Klonen eine deutlichere Reaktivität. Das vermutete EBV-spezifische Reaktivitätsmuster von Klon D.19 wurde betätigt. Für die Kandidaten des Spenders E ergab sich jedoch keine solche Bestätigung.

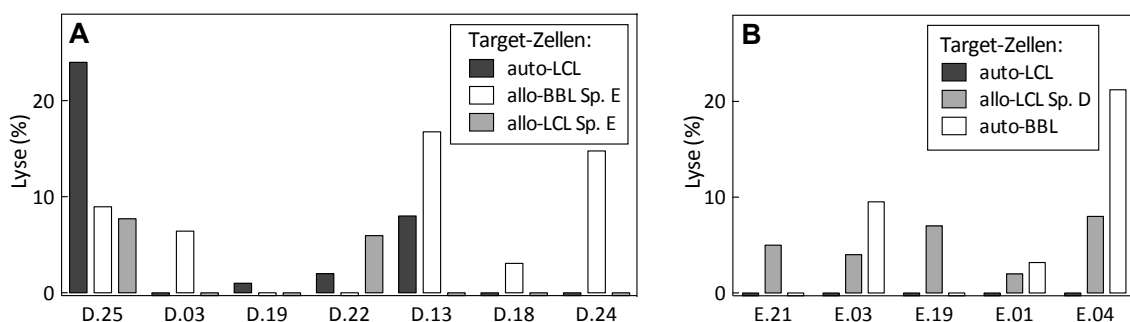


Abbildung 5.11 Erkennung von LCLs und BBL. **A** Klone der Spender D gegen autologe und allogene LCLs und allogene BBL **B** Klone des Spenders E gegen autologe LCLs und BBLs sowie allogene LCLs. Es wurde der Inhalt von 1,5 *wells* gut proliferierender Effektorzellen mit **einer** Targetzelle koinkubiert und keine Replikate verwendet.

Die dritte zytotoxische Versuchsreihe beinhaltete neben den oben verwendeten Zielzellen (LCLs und BBLs) auch die Targets K562 und Daudi (siehe Abbildung 5.12). Weder die Erkennung von Daudi noch von K562 schien von der Expression von NKG2A/D oder den KIRs abzuhängen. $V\delta 2^+$ -Klone (D.22, D.02, D.13, E.05, E.17, E.18) erkannten Daudi-Zellen besonders stark und reagierten schwach bis gar nicht auf LCLs. Die EBV-Spezifität des Klons D.25 bestätigte sich in diesem Experiment nicht.

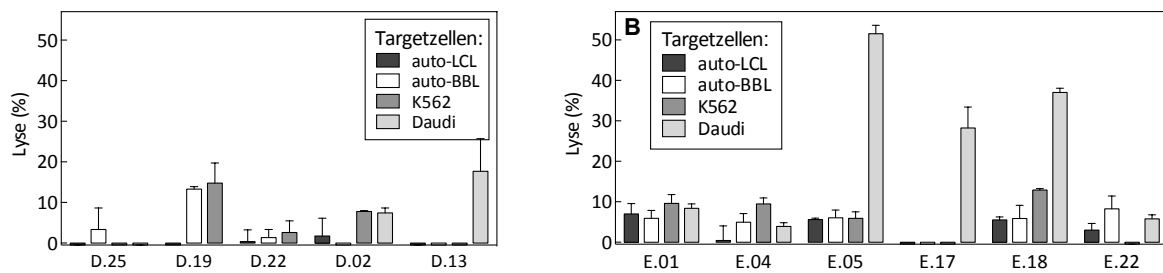


Abbildung 5.12 Klone der Spender D (Bild A) und E (Bild B) wurden auf ihre Reaktivität gegen autologe LCLs und BBLs sowie Tumorzelllinien K562 und Daudi getestet. Die Koinkubation erfolgte in einem Effektor- zu Target-Verhältnis von 8:1. Es sind die Mittelwerte mit Standardfehler von drei Replikaten dargestellt. Die Klone D.22 und D.19 wurden nicht gegen Daudi-Zellen getestet.

5.3.5 $\gamma\delta$ -TCR-Sequenzierung

Neben der phänotypischen und funktionellen Analyse der $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone wurden zur weiteren Charakterisierung die TCR-Sequenzen herangezogen. Da entsprechend der obigen Ergebnisse davon ausgegangen wurde, dass vor allem das Vorhandensein einer $\delta 1$ -Kette für die EBV-Spezifität eine Rolle spielt, erfolgte eine indirekte Sequenzierung der mRNA, die für die CDR3 δ -Region des TCRs kodiert. Zum Vergleich wurden neben $\delta 1^+$ - auch $\delta 2^+$ - und $\delta 1^-/\delta 2^-$ -TCRs sequenziert. Tabelle 5.8 gibt eine Übersicht über alle erfolgten Sequenzierungen.

Von allen fünf Spendern konnten CDR3 δ -Regionen verschiedener Klone sequenziert werden. Hierbei konnte bei allen $\delta 1$ -positiven und $\delta 2$ -positiven Klonen bestätigt werden, dass die aufgrund der durchflusszytometrischen TCR-Phänotypisierung erwartete TCR- δ -Kette tatsächlich exprimiert war. Ferner wurden drei Klone, deren δ -Kette in Ermangelung eines spezifischen Antikörpers nicht näher klassifiziert werden konnte (Phänotyp $\delta 1^-/\delta 2^-$), nun als $V\delta 3^+$ -T-Zell-Klone (siehe Klone C.06, C.09, B.01) identifiziert. Bei drei Spendern

wurden Klone detektiert, deren CDR3 δ -Sequenz jeweils identisch mit der eines weiteren Klons desselben Spenders ist.

Tabelle 5.8 Sequenzen der V δ -Kette des TCRs verschiedener Klone. Anhand extrahierter mRNA aus $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen wurde die cDNA der CD3-Region der δ -Kette synthetisiert. Die kodierende DNA-Sequenz der unterstrichenen Aminosäuren entspricht einem D-Segment. Bei den $\delta 2^+$ -Sequenzen ist die (hydrophobe) Aminosäure 97 durch Fettdruck markiert. In einigen Fällen konnte das Allel des V-Gensegments nicht sicher identifiziert werden, da die analysierte Nukleotidsequenz mit allen drei Allelen übereinstimmt (*01/02/03). AS steht für Aminosäure-Sequenz. Die experimentellen Arbeiten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Chiara Rancan durchgeführt.

Klon	V-Gensegment	V-Region AS	<u>NDN</u> AS	J-Region AS	J-Gensegment
A.08	TRDV1*01	CALGE	<u>RTSLIYWGFNV</u>	TAQLFF	TRDJ2*01
A.21	TRDV1*01	CALGE	<u>RTSLIYWGFNV</u>	TAQLFF	TRDJ2*01
A.94	TRDV1*01	CALGE	<u>FRAYLGGYVRLK</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
B.04	TRDV1*01	CALGE	<u>AFARLRRGDTRL</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
B.20	TRDV1*01	CALGEL	<u>LSTGG</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
B.29	TRDV1*01	CALGE	<u>PVGδSWIPDNAD</u>	TDKLIF	TRDJ1*01
B.36	TRDV1*01	CALGEL	<u>NSPTGNTGGYFVGSN</u>	TDKLIF	TRDJ1*01
C.14	TRDV1*01	CALGE	<u>SAFPTTGGST</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
C.22	TRDV1*01	CALGE	<u>SAFPTTGGST</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
D.02	TRDV2*01/02/03	CACD	<u>LLGLRRKA</u>	TDKLIF	TRDJ1*01
D.17	TRDV2*01	CACDT	<u>ITGGYP</u>	DTDKLIF	TRDJ1*01
D.21	TRDV2*01/02/03	CA	<u>FSFLLGDTEA</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
D.22	TRDV2*01/02/03	CACDT	<u>VLTPVGDSSR</u>	DKLIF	TRDJ1*01
E.02	TRDV2*01/02/03	CACD	<u>RLPSLGDδP</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
E.03	TRDV2*01/02/03	CACDT	<u>VSTYAGGIQ</u>	TDKLIF	TRDJ1*01
E.15	TRDV2*01/02/03	CACDT	<u>VFPGLGD</u>	KGKLIF	TRDJ1*01
E.17	TRDV2*01/02/03	CACD	<u>PLSSTGGY</u>	PDKLIF	TRDJ1*01
E.18	TRDV2*01/02/03	CACDT	<u>IRPSYERSVIGG</u>	TDKLIF	TRDJ1*01
B.01	TRDV3*01	CAF	<u>REIHVLG</u>	TDKLIF	TRDJ1*01
C.06	TRDV3*01	CAF	<u>SALQ</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01
C.09	TRDV3*01	CAF	<u>SALQ</u>	YTDKLIF	TRDJ1*01

Bei Spender A hatten zwei der drei sequenzierten $\delta 1^+$ -positiven Klone (A.8, A.21) trotz unterschiedlicher Reaktivitäten in den funktionellen Tests (Abb. 5.6 A,B) dieselbe CDR3-Sequenz in ihrer $\delta 1$ -Kette. Davon unterschied sich deutlich die Sequenz des Klons A.94, der

in funktionellen Experimenten eine robuste LCL-Erkennung aufwies und daher weitere Analyse hinsichtlich seiner EBV-Spezifität verdienen dürfte. Die fünf potentiell EBV-spezifischen $\delta 1^+$ - und $\delta 3^+$ -positiven Klone des Spenders B (Abb. 5.7) hatten allesamt unterschiedliche CDR3-Sequenzen. Bei den vier sequenzierten Klonen des Spenders C wurde eine Korrelation von Reaktivität und Sequenz deutlich bestätigt: Klone C.14 und C.22, mit identischer CDR3, waren beide moderat EBV-spezifisch und nicht autoreaktiv, während die Klone C.06 und C.09 beide stark auto- und alloreaktiv waren (Abb. 5.9). Dieses Ergebnis zeigt, dass sich eine TCR-V δ -Sequenzierung im Prinzip für eine Identifikation von $\gamma\delta$ -T-Zellen unterschiedlicher Reaktivitätsklassen eignet.

6 Diskussion

Es gibt Hinweise darauf, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen an der Bekämpfung verschiedener Infektionen beteiligt sind. Eine Proliferation von $\gamma\delta$ -T-Zellen in Kontakt mit CMV, *Plasmodium falciparum* (einer der Erreger der Malaria) oder *Mycobacterium tuberculosis*, um Beispiele aufzuführen, wurde schon früh in der Literatur beschrieben (Ho et al. 1990, Kabelitz et al. 1990, Dechanet et al. 1999). Auch im Zusammenhang mit EBV-Infektionen existieren diverse Studien, die eine Rolle von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immunität dieses weit verbreiteten Virus implizieren.

Jedoch bestehen hier noch viele Unklarheiten. Zum Teil gibt es widersprüchliche Informationen dazu, welche Typen von $\gamma\delta$ -T-Zellen EBV-infizierte Zellen erkennen können, wie diese Erkennung zustande kommt und wie spezifisch sie ist. Zum Beispiel wurde ein Zusammenhang zwischen $\gamma\delta$ 2-T-Zellen und EBV dadurch nahegelegt, dass bei Patienten mit akuter infektiöser Mononukleose nur δ 1-negative T-Zellen (also vermutlich δ 2-T-Zellen) expandiert sind (De Paoli et al. 1990). Auch spätere Daten deuten auf eine Rolle von $\gamma\delta$ 2-T-Zellen bei der Erkennung von EBV-infizierten Zellen hin (Kong et al. 2009). Kürzlich wurde sogar ein humanisiertes Mausmodell entwickelt, bei dem das Wachstum von aus LCLs hervorgehenden Lymphomen durch Transfusion von *ex vivo* Pamidronat-expandierten $\gamma\delta$ 2-T-Zellen oder durch Behandlung der Mäuse mit Pamidronat unterbunden werden konnte (Xiang et al. 2014, Dharnidharka et al. 2015). Auf der anderen Seite zeigten einige Studien, dass nur δ 1-positive, nicht aber δ 2-positive T-Zellen, in der Lage sind, LCLs in Kultur zu erkennen (Qvigstad et al. 1990, Hacker et al. 1992, Orsini et al. 1993). Weitere Untersuchungen mit größeren Spenderzahlen zur LCL-getriebenen Vermehrung verschiedener T-Zelltypen, auch im klinischen Kontext einer T-Zelltherapie, unterschieden leider nicht zwischen δ 1-positiven und δ 2-positiven T-Zellen (Bhaduri-McIntosh et al. 2008). Um zu einer Klärung der offenen Fragen beizutragen, stand im Mittelpunkt dieser Arbeit die experimentelle Untersuchung der Interaktion von $\gamma\delta$ -T-Zellen mit EBV-infizierten Zellen. Es sollten verschiedene $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen voneinander abgegrenzt und wenn möglich, EBV-spezifische $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone detektiert und näher beschrieben werden. Hierfür wurden in einer groß angelegten Versuchsreihe 331 $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone durchflusszytometrisch phänotypisiert. Ausgewählte Klone wurden im Anschluss funktionellen und molekularbiologischen Analysen unterzogen.

6.1 Klonierung und Kultivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen

Aus den PBMC fünf unabhängiger gesunder humaner Spender wurden $\gamma\delta$ -T-Zellen gewonnen. Anschließend erfolgten eine Etablierung der Klone mittels Einzelzellverdünnung und deren Stimulation durch bestrahlte PBMCs, verschiedene allogene LCLs und IL-2. Dieses Klonierprotokoll gestattete bei allen fünf Spendern die gleichzeitige Etablierung von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen der Typen $V\delta 1^+$, $V\delta 2^+$ und $V\delta 1^-V\delta 2^-$. Auffallend war, dass bei zwei Spendern eine deutlich höhere Kloniereffizienz von $V\delta 1^+$ -T-Zellen gegenüber $V\delta 2^+$ -T-Zellen vorlag. Möglicherweise wird durch den Einsatz von verschiedenen LCLs im Klonierungsansatz das Wachstum von bestimmten $\gamma\delta$ -T-Zell-Subpopulationen beeinflusst. Insbesondere ist beschrieben worden, dass durch Stimulation mit allogenen LCLs alloreaktive $V\delta 1^+$ -Zellen angereichert werden können (Ciccione et al. 1989, Qvigstad et al. 1990, Flament et al. 1994). Möglicherweise trug dies dazu bei, dass in der vorliegenden Arbeit relativ häufig eine Alloreaktivität von $V\delta 1^+$ -Zell-Klonen festgestellt wurde (siehe folgende Abschnitte).

Zu erwähnen ist ferner, dass seltene $\gamma\delta$ -TCR-Typen, wie beispielsweise $V\gamma 9^+V\delta 1^+$ oder $V\delta 1^-/V\delta 2^-$, detektiert wurden. Letztere exprimieren wahrscheinlich vorwiegend die im peripheren Blut am dritthäufigsten exprimierte $V\gamma\delta$ -Kette, nämlich $V\delta 3$ (Peyrat et al. 1995). Bemerkenswerterweise traten bei den Spendern A, B und C vereinzelte Klone auf, die sowohl stark $\gamma\delta$ -TCR⁺ waren, als auch schwach vom $\alpha\beta$ -TCR-spezifischen Antikörper angefärbt wurden (siehe Abbildung 5.3). Sie alle exprimierten die $V\delta 1$ -Kette in ihrem TCR. Als Ursache dafür sollte neben einer möglichen Kreuzreaktivität der Antikörper auch die Zusammensetzung des TCRs selbst in Erwägung gezogen werden. Sogenannte $\delta/\alpha\beta$ -Hybrid-TCRs, bestehend aus einer variablen Region des TCR δ sowie der Joining-Region und der konstanten Region des TCR α , gepaart mit einer TCR β -Kette, wurden bereits beschrieben (Pellicci et al. 2014). Mittels TCR-Sequenzierung wurde auch ein Klon charakterisiert, der eine solche schwache $\alpha\beta$ -TCR-Antikörperfärbung aufwies (Tab. 5.3 und Tab. 5.8, Klon A.94). Dieser Klon war in seinem übrigen Färbemuster ein typischer Vertreter dieser Kategorie ($\gamma\delta$ -TCR⁺⁺⁺, $\delta 1^{++}$, $\delta 2^-$) und wies eine klassische $V\delta 1$ -J $\delta 1$ -Kette auf, was zeigt, dass die schwache $\alpha\beta$ -TCR-Anfärbung nicht notwendigerweise ein Hinweis auf ein $\delta/\alpha\beta$ -Hybrid-TCRs ist. TCR-Sequenzanalysen weiterer Klone wären hilfreich, um diesen Befund noch weiter zu erhärten.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben bei $V\delta 1^+$ -T-Zell-Klonen außerdem eine morphologisch höhere Diversität als bei Färbungen der $V\delta 2^+$ -T-Zell-Klone. Dies steht im Einklang mit bisherigen Beobachtungen, dass $V\delta 2^+$ -T-Zellen in ihrer TCR-Diversität eingeschränkt sind und damit in aller Regel auch eine einheitliche Spezifität aufweisen (Phosphoantigene als hauptsächliches Antigen). Durch die unterschiedlich hohen Intensitäten, mit denen sowohl $\gamma\delta$ -TCR, als auch $V\delta 1$ und $V\delta 2$ angefärbt wurden, gelang es $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone zu subklassifizieren, was den Weg für ein besseres Verständnis unterschiedlicher Verhaltensweisen und Spezifitäten der $\gamma\delta$ -T-Zellen ebnen könnte. Die Variationen in der Höhe der Färbeintensität könnten auf eine unterschiedliche TCR-Expressionshöhe oder eine unterschiedliche Affinität der verwendeten Antikörper zu strukturell unterschiedlichen $\gamma\delta$ -TCRs zurückzuführen sein. Es wäre auch denkbar, dass ein unterschiedlicher funktioneller Status der $\gamma\delta$ -T-Zelle abgebildet wird. Aktivierte T-Zellen reduzieren vorübergehend ihre TCR-Expression, und dieser Zustand könnte bei kultivierten T-Zell-Klonen unterschiedlich lange anhalten.

Auf vielen $\gamma\delta$ -T-Zellen werden typische NK-Zell-Marker exprimiert, was zur Hypothese führte, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen und NK-Zellen funktionell eng verwandt sind. Es wurde daher auf einigen $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen das Vorhandensein verschiedener typischer NKRs getestet. In der Literatur werden NKRs hauptsächlich mit $V\gamma 9V\delta 2^+$ -T-Lymphozyten in Verbindung gebracht, jedoch nur selten auf $V\delta 1^+$ -T-Zellen gefunden (Halary et al. 1997). Anders als bislang beschrieben, wurden in dieser Arbeit bei Spender D auf der Mehrzahl der getesteten $V\delta 1^+$ -T-Zell-Klonen NKRs wie KIR2DL2/3 oder 3DL1 detektiert.

Ein weiteres Oberflächenmolekül, das auf vielen NK-Zellen exprimiert wird und auch auf bestimmten CD8-T-Zellen gefunden wird, ist CD56 (NCAM). Im peripheren Blut ist CD56 auf $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Regel gering exprimiert, kann jedoch durch Kultivierung mit Zytokinen hochreguliert werden. Dabei korreliert die Expression von CD56 mit der zytotoxischen Aktivität der Zellen (Saito et al. 1984, Qin et al. 2012). Daher wurde CD56 in diesem Rahmen mitgetestet und interessanterweise auf nahezu allen getesteten $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen nachgewiesen. Dies spricht dafür, dass die hier verwendete Kultivierungsmethode zur Etablierung von potentiell zytotoxischen $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen geeignet sein sollte. Die Expression von CD56 trat in zwei unterscheidbaren Formen auf: entweder als homogen positive Population (in den Tabellen mit "+" markiert) oder als breite, homogene Verteilung

von schwach bis stark positiv ("Schmiereffekt", mit "s" bezeichnet). Ein systematischer Unterschied in der zytotoxischen Aktivität dieser beiden Typen von CD56-exprimierenden $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen wurde jedoch nicht beobachtet.

6.2 Funktionelle Analyse von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen

Der zweite Teil dieser Arbeit beinhaltete eine funktionelle Untersuchung von $\gamma\delta$ -T-Zellen. Diese umfasste zytotoxische Experimente mit verschiedenen B-Zelllinien als Targets, die Aufschluss über die Reaktivität von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen gegenüber EBV-infizierten Zellen geben sollten. Der Fokus dieser funktionellen Analyse wurde dabei auf $V\delta 1^+$ -T-Zell-Klone gelegt, da diese Population in der Literatur bereits mehrfach im Zusammenhang mit viralen Erregern beschrieben wurde. Während $V\gamma 9\delta 2^+$ -T-Zellen hauptsächlich mit der Bekämpfung von Tumorzellen, Parasiten (wie *Plasmodium falciparum*) oder Mykobakterien assoziiert werden (Pfeffer et al. 1990, Goerlich et al. 1991, Kabelitz et al. 1991), zeigten verschiedene Studien eine Proliferation von $V\delta 1^+$ -T-Zellen bei Kontakt mit unterschiedlichen Viren, darunter CMV und humanem Immundefizienzvirus (HIV) (De Paoli et al. 1991, De Maria et al. 1992, Dechanet et al. 1999, Knight et al. 2010). Ähnliches Verhalten zeigten $V\delta 1^+$ -T-Zellen auch im Zusammenhang mit EBV. Durch Stimulation mit LCLs oder EBV-positiven Burkitt-Lymphomzelllinien konnte eine Proliferation dieser $\gamma\delta$ -T-Zell-Population erzielt oder sogar zytotoxische Effekte beobachtet werden (Qvigstad et al. 1990, Hacker et al. 1992, Orsini et al. 1993, Fujishima et al. 2007). Demgegenüber wurde in anderen Untersuchungen eine Rolle von $V\delta 2^+$ -T-Zellen bei der Erkennung von EBV-infizierten Zellen und der Kontrolle von EBV-positiven Tumoren im Mausmodell postuliert, wie zuvor näher dargestellt wurde (De Paoli et al. 1990, Kong et al. 2009). Demnach ist die Rolle verschiedener Typen von $\gamma\delta$ -T-Zell-Populationen im Zusammenhang der EBV-Infektion noch nicht geklärt. Sowohl die aufgeführten Studien als auch arbeitsgruppeninternen Beobachtungen (Rancan 2014) dienten als Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente. Es wurden die zytotoxischen Effekte einer Vielzahl von $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen – hauptsächlich $V\delta 1^+$ – gegen autologe und allogene LCLs, BBL, Daudi-, Raji- und K562-Zellen untersucht. Besonderes Augenmerk wurde dabei darauf gelegt, EBV-spezifische Klone zu identifizieren, also solche, die stärker auf EBV-positive B-Zellen (LCLs) als auf BBL reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass bei allen fünf Spendern $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone vorkamen, die reaktiv gegen B-Zelllinien waren. Innerhalb der untersuchten Klone existierten unterschiedliche Spezifitäten, die mit

Hilfe der verschiedenen Arten von B-Zelllinien charakterisiert werden konnten. Dabei hing die Reaktivität oftmals vom EBV-Infektionsstatus ab. Zusammenfassend zeichneten sich vier funktionelle Gruppen ab, die folgendermaßen betitelt wurden: EBV-spezifisch, alloreaktiv, autoreaktiv und areaktiv.

Als EBV-spezifisch wurden diejenigen Klone definiert, die reaktiv gegenüber autologen LCLs waren und die autologen BBL nicht oder nur kaum lysierten. EBV-spezifisches Verhalten konnte sowohl bei $V\delta 1^+$ - als auch bei $V\delta 1^-/V\delta 2^-$ -T-Zell-Klonen beobachtet werden, jedoch nicht bei $V\delta 2^+$ -Klonen. Im Einklang mit der beschriebenen Literatur deuteten die Experimente auf eine Rolle der $V\delta 1^+$ -T-Zellen in der Immunität gegen EBV hin. Die Natur des erkannten Antigens allerdings ist weiterhin unklar. Möglich wäre eine Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen durch EBV-eigene Peptide, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Eine zweite Möglichkeit wäre eine durch EBV, aber nicht durch CD40-Stimulation auf B-Zellen bewirkte Präsentation von zellulären Antigenen in Form von Selbst-Peptiden auf MHC oder von Lipiden auf CD1-Molekülen. Es wurde bereits beschrieben, dass manche $V\delta 1^+$ -T-Zellen Lipide erkennen können, die von CD1c oder CD1d präsentiert werden ([Spada et al. 2000](#), [Uldrich et al. 2013](#)). Es ist aber nicht bekannt, ob die Aktivierung durch EBV tatsächlich andere Lipide oder Selbst-Peptide auf B-Zellen zur Präsentation bringt als die Aktivierung durch CD40L und IL-4. Auch HLA-restringierte $V\delta 1^+$ -T-Zellen wurden bereits beschrieben. In der Regel handelte es sich hier jedoch nur um Reaktivitäten gegen allogene MHC-Moleküle und nicht um eine nachweisliche Erkennung von Peptiden im Kontext eines autologen MHC-Moleküls ([Matis et al. 1987](#), [Flament et al. 1994](#)). In einem Einzelfall wurden allerdings nachweislich, peptidspezifische HLA-restringierte $\gamma\delta$ -T-Zellen bei einem Tumorkranken nach Peptidvakzinierung beschrieben ([Knutson et al. 2002](#)). Als erster Schritt bei der Klärung der Frage, welcher Mechanismus im Falle der eigenen Klone relevant war, wäre zu testen, ob die Erkennung der EBV-infizierten Zellen durch die $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone tatsächlich mit blockierenden Antikörpern gegen CD1c, CD1d oder MHC-Moleküle inhibiert werden kann. Überraschenderweise wurden bei mehreren Spendern ebenso $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone beobachtet, die die autologen BBL gegenüber LCL bevorzugt lysierten. Dieses Verhaltensmuster – hier als autoreaktiv bezeichnet – könnte die Hypothese unterstützen, dass in EBV-infizierten B-Zellen womöglich Signalwege unterdrückt werden, die in EBV-freien, aktivierten B-Zellen zu einer T-Zell-Erkennung führen. Es ist bekannt, dass bestimmte EBV-Proteine die T-Zell-Erkennung im Sinne einer Immunevasion unterdrücken können. Die zugrundeliegenden

Mechanismen sind vielfältig (Ressing et al. 2015). Beispielsweise verringert das EBV-Protein LMP2A die Expression von NKG2D-Liganden und hemmt so die Erkennung von LCLs durch CD8⁺-T-Lymphozyten (Rancan et al. 2015). Auch EBV-codierte microRNAs (miRNAs) reduzieren die Erkennung von infizierten Zellen durch CD4- und CD8-T-Zellen mittels verschiedener Mechanismen, die eventuell auch für eine Erkennung durch $\gamma\delta$ -T-Zellen relevant sein könnten (Zuo et al. 2017). Dazu gehört besonders die Verringerung der Expression von MHCI, des Peptidtransporters TAP und von lysosomalen Proteasen, die für die Prozessierung von MHCII-präsentierten Peptiden wichtig sind (Albanese et al. 2016, Tagawa et al. 2016).

Ferner wurden in dieser Arbeit V δ 1⁺-T-Zell-Klone gefunden, die autologe B-Zellen nicht erkannten, jedoch stark auf allogene B-Zell-Targets ansprachen. Dieses als alloreaktiv bezeichnete Verhalten konnte bei Klonen mehrerer Spender beobachtet werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass mehrere Klone auf ein bestimmtes allogenes, vom Spender der Targetzelle abhängiges Merkmal reagierten. Diese Reaktivität konnte zum Teil mit den HLA-Typen der Spenderzellen erklärt werden. Beispielsweise wurde, wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben, bei Spender B eine Gruppe von Klonen detektiert, die ein untereinander ähnliches Verhaltensmuster gegenüber allogenen LCLs aufwiesen. Sie reagierten besonders stark auf LCLs des Spenders G und C, die beide das Allel HLA-B*44:02 trugen, das bei den Spender der anderen verwendeten LCLs nicht vorhanden ist. Eine Alloreaktivität gegen dieses HLA-Merkmal wäre also vorstellbar. HLA-B*44 ist als Zielantigen einer Alloreaktivität von EBV-spezifischen $\alpha\beta$ -T-Zellen bekannt (Burrows et al. 1994). Alternativ wäre, wie in der Literatur beschrieben, eine HLA-Klasse-II-restringierte Alloreaktivität möglich (Matis et al. 1989). Dieser Fragestellung konnte jedoch nicht genauer untersucht werden, da eine vollständige HLA-Typisierung der Zellen der verschiedenen Spender nicht verfügbar war.

Zusammengefasst wurde der Hypothese von HLA-restringierten $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Literatur mehrfach nachgegangen, allerdings wurden dabei bisher kontroverse Resultate erzielt. Eine klassische MHC-Restriktion in Form der Erkennung von Peptiden im Kontext von Selbst-MHC-Molekülen konnte von einer Vielzahl von Autoren nicht nachgewiesen werden (Borst et al. 1987, Lam et al. 1990, Maccario et al. 1993). Wohingegen eine MHC-abhängige Alloreaktivität bei murinen und humanen $\gamma\delta$ -T-Zellen beschrieben wurde. (Matis et al. 1987, Ciccone et al. 1989, Flament et al. 1994).

Als klar wurde, dass die Antigenerkennung durch $\gamma\delta$ -T-Zellen anderen Gesetzen unterliegt als die der $\alpha\beta$ -T-Zellen, rückte die Hypothese der klassischen HLA-Restriktion mehr und mehr in den Hintergrund. Erst die Identifizierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen als mögliches therapeutisches Mittel bei der Bekämpfung von neoplastischen Krankheiten entfachte erneutes Interesse an einer möglichen HLA-abhängigen Reaktivität, die mindestens in einem Einzelfall bei einem Tumorpatienten nach Peptidvakzinierung bei zwei $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen beobachtet wurde (Knutson et al. 2002).

Der sichere therapeutische Einsatz von $\gamma\delta$ -T-Zellen verlangt exaktes Wissen über deren Verhalten in Anwesenheit allogener Zellen. Beispielsweise werden bei bestimmten aktuellen Protokollen der haploidentischen Stammzelltransplantation gezielt $\alpha\beta$ -T-Zellen aus dem Transplantat depletiert, $\gamma\delta$ -T-Zellen jedoch im Graft belassen (Handgretinger 2012, Locatelli et al. 2013). Dies soll dazu beitragen, das Risiko eines Tumorrezidivs nach Transplantation zu senken, da eine antitumorale Wirkung der $\gamma\delta$ -T-Zellen erhofft wird (Otto et al. 2005, Godder et al. 2007, Saitoh et al. 2008) und davon ausgegangen wird, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen keine *Graft-versus-Host-Krankheit* (GvHD) verursachen (Locatelli et al. 2013). In bisherigen Studien an Transplantationspatienten wurde jedoch eine mögliche Korrelation von GvHD und der Rekonstitution von $\gamma\delta$ -T-Zell-Subtypen noch nicht eingehend genug untersucht wurde, um die Möglichkeit eines Beitrags von $\gamma\delta$ -T-Zellen zu einer GvHD ausschließen zu können. Das experimentelle Setting der eigenen Arbeit schließt nur die Alloreaktivität gegen B-Zellen und hauptsächlich die im Blut seltene $V\delta 1^+$ -T-Zellpopulation ein und lässt damit noch keine Rückschlüsse über das Verhalten von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext einer allogenen Stammzelltransplantation zu. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass durchaus $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone existieren, die eine starke Alloreaktivität aufweisen, welche sich z.T. durchaus plausibel mittels der spezifischen HLA-Diversität der erkannten Zielzellen erklären ließ. In Anbetracht dessen ist es möglich, dass zur Erhöhung der Sicherheit klinische Vorgehensweisen angepasst werden müssen, beispielsweise indem präziser differenziert wird, welche Untergruppe von $\gamma\delta$ -T-Zellen ungefährlich für den Spender ist.

6.3 $\gamma\delta$ -TCR-Analyse

Die molekulare Untersuchung des TCRs wurde im dritten Abschnitt dieser Arbeit ergänzend zu den funktionellen Analysen durchgeführt. Es wurden die Sequenzen der δ CDR3-Regionen von einer Auswahl an Klonen aller Spender sowohl von $\delta 1^+$ -, $\delta 2^+$ -, als auch von $\delta 1^-$

δ^2 -Klonen aus den jeweils unterschiedlichen beobachteten Reaktionsgruppen (EBV-spezifisch, autoreaktiv, alloreaktiv, areaktiv) analysiert. Unter anderem wurden die TCRs EBV-spezifischer Klone sequenziert, auch in der Absicht, mögliche EBV-spezifische *public TCRs* oder konservierte TCR-Sequenzmotive zu identifizieren. Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen der Sequenz und der Reaktivität entdeckt werden. Alle TCR-Sequenzen der verschiedenen Klassen von $\gamma\delta$ -T-Zellen waren bei den verschiedenen Spendern stark divergent. Um eine Aussage über Korrelationen zwischen der TCR-Sequenz und dem funktionellen Verhalten von $\gamma\delta$ -T-Zellen treffen zu können, muss diese Analyse in Zukunft deutlich erweitert werden.

Jedoch lässt sich bei diesem Untersuchungsumfang bereits eine deutliche Variation in der Länge der CDR3-Region erkennen, wie sie auch in der Literatur beschrieben wird (zwischen 12 und 21 Aminosäuren in der V-Region (Rock et al. 1994)). Möglicherweise spiegelt sich in der Varianz der Länge und der Aminosäuresequenz die Tatsache wider, dass die untersuchten $\gamma\delta$ -T-Zell-Klone in ihrem Reaktionsmuster äußerst mannigfaltig zu sein scheinen. Interessanterweise zeigten auch die untersuchten δ^2 -TCRs eine gewisse Varianz der CDR3-Länge, was im Widerspruch zur Literatur steht, da δ^2 -T-Zellen dafür bekannt sind, nur eine bestimmte Art von Antigen (Phosphoantigene) zu erkennen (Lang et al. 1995, Harly et al. 2012).

Auffallend war außerdem, dass identische δ CDR3-Sequenzen – wie sie beispielsweise bei den Klonen A.08 und A.21, C.14 und C.22 auftraten – sowohl in einem ähnlichen durchflusszytometrischen Färbemuster als auch in einem ähnlichen funktionellen Reaktionsmuster widerspiegeln. Um genaue Aussagen in diesem Gebiet treffen zu können, sind weiterführende Forschungen notwendig, allerdings könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass Klone mit solchen TCRs möglicherweise gehäuft auftreten und sogar eine relevante Funktion beim Schutz gegen EBV übernehmen.

7 Zusammenfassung

Bei gesunden Menschen machen $\gamma\delta$ -T-Zellen etwa 1-10 % der im peripheren Blut zirkulierenden T-Lymphozyten aus. Ihnen wird eine bedeutende Rolle in der Modulation der Immunantwort sowie bei der Bekämpfung von pathogenen Keimen und entarteten Zellen zugeschrieben. Im Zusammenhang mit Infektionen durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) ist deren Funktion allerdings bisher nur oberflächlich erforscht. Es wird nach wie vor kontrovers diskutiert, durch welche Gruppe von $\gamma\delta$ -T-Zellen ein Beitrag zur Kontrolle des Virus erfolgen könnte und welche molekularbiologischen Mechanismen zugrunde liegen. Die Ergebnisse dieser Arbeit beantworten die Fragen keinesfalls vollständig, allerdings konnte deutlich gezeigt werden, dass zwischen $\gamma\delta$ -T-Zellen und EBV-infizierten Zellen zielgerichtete Interaktionen stattfinden, die zu einer Eliminierung der befallenen Zellen führen. Dies untermauert die Hypothese einer Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Immunität gegen EBV und stellt eine Grundlage für weiterführende Forschungen auf diesem Gebiet dar.

Ausgedehnte Analysen einer großen Auswahl an monoklonalen humanen $\gamma\delta$ -T-Zell-Klonen fünf verschiedener Spender waren Voraussetzung für eine breite Phänotypisierung und ferner für eine Abgrenzung der Reaktivitätsmuster verschiedener $\gamma\delta$ -T-Zell-Untergruppen. Das beschriebene Kultivierungsprotokoll, das eine Stimulation durch bestrahlte EBV-positive lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) enthält, ermöglichte eine erfolgreiche Anzucht mehrerer hundert T-Zell-Klone und zeigte zudem, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen *in-vitro* durch EBV-infizierte Zellen stimuliert werden können. In Anbetracht ihrer im Vergleich zu $V\delta 2$ -T-Zellen geringeren Häufigkeit in den PBMCs, aus denen sie gewonnen wurden, zeigte sich, dass $V\delta 1$ -T-Zell-Klone mit hoher Effektivität etabliert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass hauptsächlich $V\delta 1$ -T-Zellen in die Bekämpfung von EBV-Infektionen involviert sind. Bestätigt wurde diese Annahme durch zytotoxische Analysen, in denen insbesondere $V\delta 1$ -T-Zell-Klone in der Lage waren, EBV-infizierte Zellen spezifisch und effizient zu erkennen und abzutöten. Die funktionellen Untersuchungen ergaben neben der Identifizierung von EBV-spezifischen Klonen auch solche, die sich hauptsächlich gegen allogene Zielzellen richteten. Dies erscheint aus klinischer Sicht hochinteressant, da die speziellen Funktionen von $\gamma\delta$ -T-Zellen im Kontext jüngerer Protokolle der allogenen Stammzelltransplantation an Wichtigkeit gewinnen.

8 Literaturverzeichnis

Albanese, M., T. Tagawa, M. Bouvet, L. Maliqi, D. Lutter, J. Hoser, M. Hastreiter, M. Hayes, B. Sugden, L. Martin, A. Moosmann and W. Hammerschmidt (2016). Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(42): E6467-E6475.

Allison, T. J., C. C. Winter, J. J. Fournie, M. Bonneville and D. N. Garboczi (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 411(6839): 820-824.

Ameres, S., J. Mautner, F. Schlott, M. Neuenhahn, D. H. Busch, B. Plachter and A. Moosmann (2013). Presentation of an immunodominant immediate-early CD8+ T cell epitope resists human cytomegalovirus immunoevasion. *PLoS pathogens* 9(5): e1003383.

Anfossi, N., P. Andre, S. Guia, C. S. Falk, S. Roetynck, C. A. Stewart, V. Bresco, C. Frassati, D. Reviron, D. Middleton, F. Romagne, S. Ugolini and E. Vivier (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity* 25(2): 331-342.

Babcock, G. J., D. Hochberg and A. D. Thorley-Lawson (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13(4): 497-506.

Bai, L., D. Picard, B. Anderson, V. Chaudhary, A. Luoma, B. Jabri, E. J. Adams, P. B. Savage and A. Bendelac (2012). The majority of CD1d-sulfatide-specific T cells in human blood use a semiinvariant Vdelta1 TCR. *Eur J Immunol* 42(9): 2505-2510.

Bank, I., R. A. DePinho, M. B. Brenner, J. Cassimeris, F. W. Alt and L. Chess (1986). A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. *Nature* 322(6075): 179-181.

Battistini, L., G. Borsellino, G. Sawicki, F. Poccia, M. Salvetti, G. Ristori and C. F. Brosnan (1997). Phenotypic and cytokine analysis of human peripheral blood gamma delta T cells expressing NK cell receptors. *Journal of immunology* 159(8): 3723-3730.

Belmant, C., E. Espinosa, F. Halary, Y. Tang, M. A. Peyrat, H. Sicard, A. Kozikowski, R. Buelow, R. Poupot, M. Bonneville and J. J. Fournie (2000). A chemical basis for selective recognition of nonpeptide antigens by human delta T cells. *FASEB J* 14(12): 1669-1670.

Bennouna, J., E. Bompas, E. M. Neidhardt, F. Rolland, I. Philip, C. Galea, S. Salot, S. Saiagh, M. Audrain, M. Rimbart, S. Lafaye-de Micheaux, J. Tiollier and S. Negrier (2008). Phase-I study of Innacell gammadelta, an autologous cell-therapy product highly enriched in gamma9delta2 T lymphocytes, in combination with IL-2, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 57(11): 1599-1609.

Bensmana, M., M. G. Mattei and M. P. Lefranc (1991). Localization of the human T-cell receptor gamma locus (TCRG) to 7p14---p15 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 56(1): 31-32.

Bhaduri-McIntosh, S., M. J. Rotenberg, B. Gardner, M. Robert and G. Miller (2008). Repertoire and frequency of immune cells reactive to Epstein-Barr virus-derived autologous lymphoblastoid cell lines. *Blood* 111(3): 1334-1343.

Bonneville, M., R. L. O'Brien and W. K. Born (2010). gamma delta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nat. Rev. Immunol.* 10(7): 467-478.

Born, W. K., M. Kemal Aydintug and R. L. O'Brien (2013). Diversity of gammadelta T-cell antigens. *Cellular & molecular immunology* 10(1): 13-20.

Borst, J., R. J. van de Griend, J. W. van Oostveen, S. L. Ang, C. J. Melief, J. G. Seidman and R. L. Bolhuis (1987). A T-cell receptor gamma/CD3 complex found on cloned functional lymphocytes. *Nature* 325(6106): 683-688.

Borst, J., A. Wicherink, J. J. Van Dongen, E. De Vries, W. M. Comans-Bitter, F. Wassenaar and P. Van Den Elsen (1989). Non-random expression of T cell receptor gamma and delta variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Eur J Immunol* 19(9): 1559-1568.

Brochet, X., Lefranc, M.-P. and Giudicelli, V. (2008). IMGT/V-QUEST: the highly customized and integrated system for IG and TR standardized V-J and V-D-J sequence analysis *Nucl. Acids Res.*

Burrows, S. R., R. Khanna, J. M. Burrows and D. J. Moss (1994). An alloresponse in humans is dominated by cytotoxic T lymphocytes (CTL) cross-reactive with a single Epstein-Barr virus CTL epitope: implications for graft-versus-host disease. *The Journal of experimental medicine* 179(4): 1155-1161.

Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson and R. Longnecker (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9(3): 405-411.

Casorati, G., G. De Libero, A. Lanzavecchia and N. Migone (1989). Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood. *The Journal of experimental medicine* 170(5): 1521-1535.

Chien, Y. H., M. Iwashima, K. B. Kaplan, J. F. Elliott and M. M. Davis (1987). A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 327(6124): 677-682.

Chien, Y. H. and Y. Konigshofer (2007). Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev* 215: 46-58.

Chien, Y. H., C. Meyer and M. Bonneville (2014). gammadelta T cells: first line of defense and beyond. *Annual review of immunology* 32: 121-155.

Ciccione, E., O. Viale, D. Pende, M. Malnati, G. Battista Ferrara, S. Barocci, A. Moretta and L. Moretta (1989). Specificity of human T lymphocytes expressing a gamma/delta T cell antigen receptor. Recognition of a polymorphic determinant of HLA class I molecules by a gamma/delta clone. *Eur J Immunol* 19(7): 1267-1271.

Cooper, M. A., T. A. Fehniger, S. C. Turner, K. S. Chen, B. A. Ghaheri, T. Ghayur, W. E. Carson and M. A. Caligiuri (2001). Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97(10): 3146-3151.

Correia, D. V., A. Lopes and B. Silva-Santos (2013). Tumor cell recognition by gammadelta T lymphocytes: T-cell receptor vs. NK-cell receptors. *Oncoimmunology* 2(1): e22892.

Daniele, N., M. C. Scerpa, M. Caniglia, M. E. Bernardo, C. Rossi, C. Ciammetti, G. Palumbo, F. Locatelli, G. Isacchi and F. Zinno (2012). Transplantation in the onco-hematology field: focus on the manipulation of alphabeta and gammadelta T cells. *Pathol Res Pract* 208(2): 67-73.

Davodeau, F., M. A. Peyrat, M. M. Hallet, J. Gaschet, I. Houde, R. Vivien, H. Vie and M. Bonneville (1993). Close correlation between Daudi and mycobacterial antigen recognition by human gamma delta T cells and expression of V9JPC1 gamma/V2DJC delta-encoded T cell receptors. *Journal of immunology* 151(3): 1214-1223.

De Libero, G. (1999). Control of gammadelta T cells by NK receptors. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1(3): 263-267.

De Maria, A., A. Ferrazin, S. Ferrini, E. Ciccone, A. Terragna and L. Moretta (1992). Selective increase of a subset of T cell receptor gamma delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients with human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of infectious diseases* 165(5): 917-919.

De Paoli, P., D. Gennari, P. Martelli, G. Basaglia, M. Crovatto, S. Battistin and G. Santini (1991). A subset of gamma delta lymphocytes is increased during HIV-1 infection. *Clinical and experimental immunology* 83(2): 187-191.

De Paoli, P., D. Gennari, P. Martelli, V. Cavarzerani, R. Comoretto and G. Santini (1990). $\gamma\delta$ T Cell Receptor-Bearing Lymphocytes during Epstein-Barr Virus Infection. *Journal of Infectious Diseases* 161(5): 1013-1016.

Dechanet, J., P. Merville, A. Lim, C. Retiere, V. Pitard, X. Lafarge, S. Michelson, C. MERIC, M. M. Hallet, P. Kourilsky, L. Potaux, M. Bonneville and J. F. Moreau (1999). Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *The Journal of clinical investigation* 103(10): 1437-1449.

Delecluse, H. J., T. Hilsendegen, D. Pich, R. Zeidler and W. Hammerschmidt (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(14): 8245-8250.

Deusch, K., F. Luling, K. Reich, M. Classen, H. Wagner and K. Pfeffer (1991). A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur J Immunol* 21(4): 1053-1059.

Dharnidharka, V. R. and T. Mohanakumar (2015). New approaches to treating B-cell cancers induced by Epstein-Barr virus. *The New England journal of medicine* 372(6): 569-571.

Di Fabrizio, L., Y. Kimura, R. Ware, L. Rogozinski and L. Chess (1991). Specific triggering of gamma, delta T cells by K562 activates the gamma, delta T cell receptor and may regulate natural killer-like function. *Journal of immunology* 146(8): 2495-2503.

Dieli, F., F. Poccia, M. Lipp, G. Sireci, N. Caccamo, C. Di Sano and A. Salerno (2003). Differentiation of effector/memory Vdelta2 T cells and migratory routes in lymph nodes or inflammatory sites. *The Journal of experimental medicine* 198(3): 391-397.

Dieli, F., D. Vermijlen, F. Fulfarò, N. Caccamo, S. Meraviglia, G. Cicero, A. Roberts, S. Buccheri, M. D'Asaro, N. Gebbia, A. Salerno, M. Eberl and A. C. Hayday (2007). Targeting human {gamma}delta T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. *Cancer research* 67(15): 7450-7457.

Drobyski, W. R., D. Majewski and G. Hanson (1999). Graft-facilitating doses of ex vivo activated gammadelta T cells do not cause lethal murine graft-vs.-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation* 5(4): 222-230.

Eberl, M., R. Engel, E. Beck and H. Jomaa (2002). Differentiation of human gamma-delta T cells towards distinct memory phenotypes. *Cell Immunol* 218(1-2): 1-6.

Fisch, P., M. Malkovsky, E. Braakman, E. Sturm, R. L. Bolhuis, A. Prieve, J. A. Sosman, V. A. Lam and P. M. Sondel (1990). Gamma/delta T cell clones and natural killer cell clones mediate distinct patterns of non-major histocompatibility complex-restricted cytotoxicity. *The Journal of experimental medicine* 171(5): 1567-1579.

Fisch, P., M. Malkovsky, S. Kovats, E. Sturm, E. Braakman, B. S. Klein, S. D. Voss, L. W. Morrissey, R. DeMars, W. J. Welch and et al. (1990). Recognition by human V gamma 9/V delta 2 T cells of a GroEL homolog on Daudi Burkitt's lymphoma cells. *Science* 250(4985): 1269-1273.

Flament, C., A. Benmerah, M. Bonneville, F. Triebel and F. Mami-Chouaib (1994). Human TCR-gamma/delta alloreactive response to HLA-DR molecules. Comparison with response of TCR-alpha/beta. *Journal of immunology* 153(7): 2890-2904.

Fujishima, N., M. Hirokawa, M. Fujishima, J. Yamashita, H. Saitoh, Y. Ichikawa, T. Horiuchi, Y. Kawabata and K. I. Sawada (2007). Skewed T cell receptor repertoire of Vdelta1(+) gammadelta T lymphocytes after human allogeneic haematopoietic stem cell transplantation and the potential role for Epstein-Barr virus-infected B cells in clonal restriction. *Clinical and experimental immunology* 149(1): 70-79.

Gioia, C., C. Agrati, R. Casetti, C. Cairo, G. Borsellino, L. Battistini, G. Mancino, D. Goletti, V. Colizzi, L. P. Pucillo and F. Poccia (2002). Lack of CD27-CD45RA-V gamma 9V delta 2+ T cell effectors in immunocompromised hosts and during active pulmonary tuberculosis. *Journal of immunology* 168(3): 1484-1489.

Gober, H. J., M. Kistowska, L. Angman, P. Jenö, L. Mori and G. De Libero (2003). Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells. *The Journal of experimental medicine* 197(2): 163-168.

Godder, K. T., P. J. Henslee-Downey, J. Mehta, B. S. Park, K. Y. Chiang, S. Abhyankar and L. S. Lamb (2007). Long term disease-free survival in acute leukemia patients recovering with increased gammadelta T cells after partially mismatched related donor bone marrow transplantation. *Bone marrow transplantation* 39(12): 751-757.

Goerlich, R., G. Hacker, K. Pfeffer, K. Heeg and H. Wagner (1991). Plasmodium falciparum merozoites primarily stimulate the V gamma 9 subset of human gamma/delta T cells. *Eur J Immunol* 21(10): 2613-2616.

Gogoi, D. and S. V. Chiplunkar (2013). Targeting gamma delta T cells for cancer immunotherapy: bench to bedside. *Indian J Med Res* 138(5): 755-761.

Gomes, A. Q., D. S. Martins and B. Silva-Santos (2010). Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application. *Cancer research* 70(24): 10024-10027.

Groh, V., S. Porcelli, M. Fabbi, L. L. Lanier, L. J. Picker, T. Anderson, R. A. Warnke, A. K. Bhan, J. L. Strominger and M. B. Brenner (1989). Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *The Journal of experimental medicine* 169(4): 1277-1294.

Groh, V., A. Steinle, S. Bauer and T. Spies (1998). Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279(5357): 1737-1740.

Hacker, G., S. Kromer, M. Falk, K. Heeg, H. Wagner and K. Pfeffer (1992). V delta 1+ subset of human gamma delta T cells responds to ligands expressed by EBV-infected Burkitt lymphoma cells and transformed B lymphocytes. *Journal of immunology* 149(12): 3984-3989.

Halary, F., M. A. Peyrat, E. Champagne, M. Lopez-Botet, A. Moretta, L. Moretta, H. Vie, J. J. Fournie and M. Bonneville (1997). Control of self-reactive cytotoxic T lymphocytes expressing gamma delta T cell receptors by natural killer inhibitory receptors. *Eur J Immunol* 27(11): 2812-2821.

Handgretinger, R. (2012). New approaches to graft engineering for haploidentical bone marrow transplantation. *Semin Oncol* 39(6): 664-673.

Hannani, D., Y. Ma, T. Yamazaki, J. Dechanet-Merville, G. Kroemer and L. Zitvogel (2012). Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol* 33(5): 199-206.

Harly, C., Y. Guillaume, S. Nedellec, C. M. Peigne, H. Monkkonen, J. Monkkonen, J. Li, J. Kuball, E. J. Adams, S. Netzer, J. Dechanet-Merville, A. Leger, T. Herrmann, R. Breathnach, D. Olive, M. Bonneville and E. Scotet (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human gammadelta T-cell subset. *Blood* 120(11): 2269-2279.

Herold, G. (2006). Innere Medizin, Eigenverl.

Ho, M., H. K. Webster, P. Tongtawe, K. Pattanapanyasat and W. P. Weidanz (1990). Increased gamma delta T cells in acute Plasmodium falciparum malaria. Immunol Lett 25(1-3): 139-141.

Iskra, S., M. Kalla, H. J. Delecluse, W. Hammerschmidt and A. Moosmann (2010). Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by Epstein-Barr virus. Journal of virology 84(7): 3612-3623.

Itohara, S., A. G. Farr, J. J. Lafaille, M. Bonneville, Y. Takagaki, W. Haas and S. Tonegawa (1990). Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. Nature 343(6260): 754-757.

Kabelitz, D. (2011). gammadelta T-cells: cross-talk between innate and adaptive immunity. Cellular and molecular life sciences : CMLS 68(14): 2331-2333.

Kabelitz, D., A. Bender, T. Prospero, S. Wesselborg, O. Janssen and K. Pechhold (1991). The primary response of human gamma/delta + T cells to Mycobacterium tuberculosis is restricted to V gamma 9-bearing cells. The Journal of experimental medicine 173(6): 1331-1338.

Kabelitz, D., A. Bender, S. Schondelmaier, B. Schoel and S. H. Kaufmann (1990). A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein. The Journal of experimental medicine 171(3): 667-679.

Kilger, E., A. Kieser, M. Baumann and W. Hammerschmidt (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. EMBO J 17(6): 1700-1709.

Klein, E., G. Klein, J. S. Nadkarni, J. J. Nadkarni, H. Wigzell and P. Clifford (1968). Surface IgM-kappa specificity on a Burkitt lymphoma cell in vivo and in derived culture lines. Cancer research 28(7): 1300-1310.

Knight, A., A. J. Madrigal, S. Grace, J. Sivakumaran, P. Kottaridis, S. Mackinnon, P. J. Travers and M. W. Lowdell (2010). The role of Vdelta2-negative gammadelta T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation. Blood 116(12): 2164-2172.

Knutson, K. L. and M. L. Disis (2002). Clonal diversity of the T-cell population responding to a dominant HLA-A2 epitope of HER-2/neu after active immunization in an ovarian cancer patient. Hum Immunol 63(7): 547-557.

Kong, Y., W. Cao, X. Xi, C. Ma, L. Cui and W. He (2009). The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D. Blood 114(2): 310-317.

Lam, V., R. DeMars, B. P. Chen, J. A. Hank, S. Kovats, P. Fisch and P. M. Sondel (1990). Human T cell receptor-gamma delta-expressing T-cell lines recognize MHC-controlled elements on autologous EBV-LCL that are not HLA-A, -B, -C, -DR, -DQ, or -DP. Journal of immunology 145(1): 36-45.

Lamb, L. S., Jr., P. J. Henslee-Downey, R. S. Parrish, K. Godder, J. Thompson, C. Lee and A. P. Gee (1996). Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. *J Hematother* 5(5): 503-509.

Lang, F., M. A. Peyrat, P. Constant, F. Davodeau, J. David-Ameline, Y. Poquet, H. Vie, J. J. Fournie and M. Bonneville (1995). Early activation of human V gamma 9V delta 2 T cell broad cytotoxicity and TNF production by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Journal of immunology* 154(11): 5986-5994.

Ling, P. D., J. J. Hsieh, I. K. Ruf, D. R. Rawlins and S. D. Hayward (1994). EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *Journal of virology* 68(9): 5375-5383.

Ljunggren, H. G. and K. Karre (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11(7): 237-244.

Locatelli, F., A. Bauquet, G. Palumbo, F. Moretta and A. Bertaina (2013). Negative depletion of alpha/beta+ T cells and of CD19+ B lymphocytes: a novel frontier to optimize the effect of innate immunity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Immunol Lett* 155(1-2): 21-23.

Lozzio, C. B. and B. B. Lozzio (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45(3): 321-334.

Maccario, R., M. G. Revello, P. Comoli, D. Montagna, F. Locatelli and G. Gerna (1993). HLA-unrestricted killing of HSV-1-infected mononuclear cells. Involvement of either gamma/delta+ or alpha/beta+ human cytotoxic T lymphocytes. *Journal of immunology* 150(4): 1437-1445.

Matis, L. A., R. Cron and J. A. Bluestone (1987). Major histocompatibility complex-linked specificity of gamma delta receptor-bearing T lymphocytes. *Nature* 330(6145): 262-264.

Matis, L. A., A. M. Fry, R. Q. Cron, M. M. Cotterman, R. F. Dick and J. A. Bluestone (1989). Structure and specificity of a class II MHC alloreactive gamma delta T cell receptor heterodimer. *Science* 245(4919): 746-749.

Miller, C. L., A. L. Burkhardt, J. H. Lee, B. Stealey, R. Longnecker, J. B. Bolen and E. Kieff (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* 2(2): 155-166.

Miller, G. and M. Lipman (1973). Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70(1): 190-194.

Miyashita, E. M., B. Yang, K. M. Lam, D. H. Crawford and D. A. Thorley-Lawson (1995). A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* 80(4): 593-601.

Mookerjee-Basu, J., P. Vantourout, L. O. Martinez, B. Perret, X. Collet, C. Perigaud, S. Peyrottes and E. Champagne (2010). F1-adenosine triphosphatase displays properties

characteristic of an antigen presentation molecule for Vgamma9Vdelta2 T cells. *Journal of immunology* 184(12): 6920-6928.

Moretta, A. and L. Moretta (1997). HLA class I specific inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 9(5): 694-701.

Moris, A., S. Rothenfusser, E. Meuer, R. Hangretinger and P. Fisch (1999). Role of gammadelta T cells in tumor immunity and their control by NK receptors. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1(3): 227-234.

Morita, C. T., E. M. Beckman, J. F. Bukowski, Y. Tanaka, H. Band, B. R. Bloom, D. E. Golan and M. B. Brenner (1995). Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Immunity* 3(4): 495-507.

Morita, C. T., S. Verma, P. Aparicio, C. Martinez, H. Spits and M. B. Brenner (1991). Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells. *Eur J Immunol* 21(12): 2999-3007.

Murphy, K. M., K. Mahlke, L. Seidler, P. Travers, I. Haußer-Siller and M. Walport (2009). *Janeway Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag.

Nedellec, S., M. Bonneville and E. Scotet (2010). Human Vgamma9Vdelta2 T cells: from signals to functions. *Semin Immunol* 22(4): 199-206.

O'Brien, R. L., C. L. Roark and W. K. Born (2009). IL-17-producing gammadelta T cells. *Eur J Immunol* 39(3): 662-666.

Ohga, S., A. Nomura, H. Takada and T. Hara (2002). Immunological aspects of Epstein-Barr virus infection. *Crit Rev Oncol Hematol* 44(3): 203-215.

Orsini, D. L., P. C. Res, J. M. Van Laar, L. M. Muller, A. E. Soprano, Y. M. Kooy, P. P. Tak and F. Koning (1993). A subset of V delta 1+ T cells proliferates in response to Epstein-Barr virus-transformed B cell lines in vitro. *Scandinavian journal of immunology* 38(4): 335-340.

Otto, M., R. C. Barfield, R. Iyengar, J. Gatewood, I. Muller, M. S. Holladay, J. Houston, W. Leung and R. Handgretinger (2005). Human gammadelta T cells from G-CSF-mobilized donors retain strong tumoricidal activity and produce immunomodulatory cytokines after clinical-scale isolation. *J Immunother* 28(1): 73-78.

Pellicci, D. G., A. P. Uldrich, J. Le Nours, F. Ross, E. Chabrol, S. B. Eckle, R. de Boer, R. T. Lim, K. McPherson, G. Besra, A. R. Howell, L. Moretta, J. McCluskey, M. H. Heemskerk, S. Gras, J. Rossjohn and D. I. Godfrey (2014). The molecular bases of delta/alphabeta T cell-mediated antigen recognition. *The Journal of experimental medicine* 211(13): 2599-2615.

Peyrat, M. A., F. Davodeau, I. Houde, F. Romagne, A. Necker, C. Leget, J. P. Cervoni, N. Cerf-Bensussan, H. Vie, M. Bonneville and et al. (1995). Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V delta 3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor (TCR) delta-chain expressors and alpha beta T cells expressing V delta 3J alpha C alpha-encoded TCR chains. *Journal of immunology* 155(6): 3060-3067.

Pfeffer, K., B. Schoel, H. Gulle, S. H. Kaufmann and H. Wagner (1990). Primary responses of human T cells to mycobacteria: a frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur J Immunol* 20(5): 1175-1179.

Pulvertaft, J. V. (1964). Cytology of Burkitt's Tumour (African Lymphoma). *Lancet* 1(7327): 238-240.

Qin, G., Y. Liu, J. Zheng, Z. Xiang, I. H. Ng, J. S. Malik Peiris, Y. L. Lau and W. Tu (2012). Phenotypic and functional characterization of human gammadelta T-cell subsets in response to influenza A viruses. *The Journal of infectious diseases* 205(11): 1646-1653.

Qvigstad, E., V. Bosnes, K. E. Lundin and E. Thorsby (1990). Specificity of two subsets of cytotoxic human gamma delta T-cell clones. *Scandinavian journal of immunology* 32(2): 129-135.

Rancan, C. (2014). Modulation of immunity by Epstein-Barr virus. Dr. rer. nat. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Rancan, C., L. Schirrmann, C. Huls, R. Zeidler and A. Moosmann (2015). Latent Membrane Protein LMP2A Impairs Recognition of EBV-Infected Cells by CD8+ T Cells. *PLoS pathogens* 11(6): e1004906.

Ressing, M. E., M. van Gent, A. M. Gram, M. J. Hooykaas, S. J. Piersma and E. J. Wiertz (2015). Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 391: 355-381.

Ribot, J. C., A. debarros and B. Silva-Santos (2011). Searching for "signal 2": costimulation requirements of gammadelta T cells. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68(14): 2345-2355.

Rock, E. P., P. R. Sibbald, M. M. Davis and Y. H. Chien (1994). CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *The Journal of experimental medicine* 179(1): 323-328.

Rothenfusser, S., A. Buchwald, S. Kock, S. Ferrone and P. Fisch (2002). Missing HLA class I expression on Daudi cells unveils cytotoxic and proliferative responses of human gammadelta T lymphocytes. *Cell Immunol* 215(1): 32-44.

Saito, H., D. M. Kranz, Y. Takagaki, A. C. Hayday, H. N. Eisen and S. Tonegawa (1984). Complete primary structure of a heterodimeric T-cell receptor deduced from cDNA sequences. *Nature* 309(5971): 757-762.

Saitoh, A., M. Narita, N. Watanabe, N. Tochiki, N. Satoh, J. Takizawa, T. Furukawa, K. Toba, Y. Aizawa, S. Shinada and M. Takahashi (2008). Anti-tumor cytotoxicity of gammadelta T cells expanded from peripheral blood cells of patients with myeloma and lymphoma. *Med Oncol* 25(2): 137-147.

Scotet, E., L. O. Martinez, E. Grant, R. Barbaras, P. Jenou, M. Guiraud, B. Monsarrat, X. Saulquin, S. Maillat, J. P. Esteve, F. Lopez, B. Perret, X. Collet, M. Bonneville and E. Champagne (2005). Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor

interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity* 22(1): 71-80.

Spada, F. M., E. P. Grant, P. J. Peters, M. Sugita, A. Melian, D. S. Leslie, H. K. Lee, E. van Donselaar, D. A. Hanson, A. M. Krensky, O. Majdic, S. A. Porcelli, C. T. Morita and M. B. Brenner (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *The Journal of experimental medicine* 191(6): 937-948.

Sugita, M. and M. B. Brenner (2000). T lymphocyte recognition of human group 1 CD1 molecules: implications for innate and acquired immunity. *Semin Immunol* 12(6): 511-516.

Tagawa, T., M. Albanese, M. Bouvet, A. Moosmann, J. Mautner, V. Heissmeyer, C. Zielinski, D. Lutter, J. Hoser, M. Hastreiter, M. Hayes, B. Sugden and W. Hammerschmidt (2016). Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *The Journal of experimental medicine* 213(10): 2065-2080.

Takahara, Y., E. Champagne, H. Griesser, N. Kimura, D. Tkachuk, J. Reimann, A. Okada, F. W. Alt, L. Chess, M. Minden and et al. (1988). Sequence and organization of the human T cell delta chain gene. *Eur J Immunol* 18(2): 283-287.

Tan, L. C., N. Gudgeon, N. E. Annels, P. Hansasuta, C. A. O'Callaghan, S. Rowland-Jones, A. J. McMichael, A. B. Rickinson and M. F. Callan (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *Journal of immunology* 162(3): 1827-1835.

Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R. L. Modlin, M. B. Brenner, B. R. Bloom and C. T. Morita (1994). Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(17): 8175-8179.

Todaro, M., M. D'Asaro, N. Caccamo, F. Iovino, M. G. Francipane, S. Meraviglia, V. Orlando, C. La Mendola, G. Gulotta, A. Salerno, F. Dieli and G. Stassi (2009). Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes. *Journal of immunology* 182(11): 7287-7296.

Uldrich, A. P., J. Le Nours, D. G. Pellicci, N. A. Gherardin, K. G. McPherson, R. T. Lim, O. Patel, T. Beddoe, S. Gras, J. Rossjohn and D. I. Godfrey (2013). CD1d-lipid antigen recognition by the gammadelta TCR. *Nat Immunol* 14(11): 1137-1145.

van der Veken, L. T., M. Coccoris, E. Swart, J. H. Falkenburg, T. N. Schumacher and M. H. Heemskerk (2009). Alpha beta T cell receptor transfer to gamma delta T cells generates functional effector cells without mixed TCR dimers in vivo. *Journal of immunology* 182(1): 164-170.

van der Veken, L. T., R. S. Hagedoorn, M. M. van Loenen, R. Willemze, J. H. Falkenburg and M. H. Heemskerk (2006). Alphabeta T-cell receptor engineered gammadelta T cells mediate effective antileukemic reactivity. *Cancer research* 66(6): 3331-3337.

Vantourout, P. and A. Hayday (2013). Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology* 13(2): 88-100.

Vavassori, S., A. Kumar, G. S. Wan, G. S. Ramanjaneyulu, M. Cavallari, S. El Daker, T. Beddoe, A. Theodossis, N. K. Williams, E. Gostick, D. A. Price, D. U. Soudamini, K. K. Voon, M. Olivo, J. Rossjohn, L. Mori and G. De Libero (2013). Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells. *Nat Immunol* 14(9): 908-916.

Wiesner, M., C. Zentz, C. Mayr, R. Wimmer, W. Hammerschmidt, R. Zeidler and A. Moosmann (2008). Conditional immortalization of human B cells by CD40 ligation. *PloS one* 3(1): e1464.

Wilhelm, M., V. Kunzmann, S. Eckstein, P. Reimer, F. Weissinger, T. Ruediger and H. P. Tony (2003). Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* 102(1): 200-206.

Willcox, C. R., V. Pitard, S. Netzer, L. Couzi, M. Salim, T. Silberzahn, J. F. Moreau, A. C. Hayday, B. E. Willcox and J. Dechanet-Merville (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat Immunol* 13(9): 872-879.

Wrobel, P., H. Shojaei, B. Schitteck, F. Gieseler, B. Wollenberg, H. Kalthoff, D. Kabelitz and D. Wesch (2007). Lysis of a broad range of epithelial tumour cells by human gamma delta T cells: involvement of NKG2D ligands and T-cell receptor- versus NKG2D-dependent recognition. *Scandinavian journal of immunology* 66(2-3): 320-328.

Wu, J., V. Groh and T. Spies (2002). T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class I-related chains by human epithelial gamma delta T cells. *Journal of immunology* 169(3): 1236-1240.

Xiang, Z., Y. Liu, J. Zheng, M. Liu, A. Lv, Y. Gao, H. Hu, K. T. Lam, G. C. Chan, Y. Yang, H. Chen, G. S. Tsao, M. Bonneville, Y. L. Lau and W. Tu (2014). Targeted activation of human Vgamma9Vdelta2-T cells controls epstein-barr virus-induced B cell lymphoproliferative disease. *Cancer Cell* 26(4): 565-576.

Xu, B., J. C. Pizarro, M. A. Holmes, C. McBeth, V. Groh, T. Spies and R. K. Strong (2011). Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(6): 2414-2419.

Yao, Q. Y., A. B. Rickinson and M. A. Epstein (1985). A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int J Cancer* 35(1): 35-42.

Yates, J. L., N. Warren and B. Sugden (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313(6005): 812-815.

Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4(10): 757-768.

Zuo, L., W. Yue, S. Du, S. Xin, J. Zhang, L. Liu, G. Li and J. Lu (2017). An update: Epstein-Barr virus and immune evasion via microRNA regulation. *Virol Sin* 32(3): 175-187.