

Untersuchungen zur phänotypischen und funktionellen Plastizität von T-Zellen im Kontext von Abstoßungsreaktion und Differenzierung

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dipl. Biol. Christian Welker

aus Nürtingen

Tübingen

2023

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:	07.12.2023
Dekan:	Prof. Dr. Thilo Stehle
1. Berichterstatter/-in:	Apl. Prof. Dr. Karin Schilbach
2. Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee
3. Berichterstatter/-in:	Prof. Dr. Ulrike Zentgraf

1. Inhalt

1. Inhalt.....	3
2. Zusammenfassung.....	5
3. Summary.....	7
4. Beschreibung des Eigenanteils	9
4.1 Isolation and Ex Vivo Culture of V δ 1 ⁺ CD4 ⁺ $\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ T-cell Progenitor	9
4.2 Human CD4 ⁺ V δ 1 ⁺ $\gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells.....	9
4.3 Selective, efficient modulation of activated CD4 ⁺ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR.....	9
4.4 Preemptive administration of human $\alpha\beta$ T cell receptor-targeting monoclonal antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR potentially abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo	10
5. Einleitung.....	11
5.1 Die Entwicklung des menschlichen Immunsystems	11
5.2 Die T-Zell-Reifung	11
5.3 T-Zellen in der Peripherie	15
5.3.1 $\alpha\beta$ -T-Zellen	15
5.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen.....	18
5.4 Die Rolle der T-Zellen in der Stammzelltransplantation: <i>Graft-vs-Host-Disease</i>	20
6. Zielsetzung	24
6.1 Transdifferenzierung von V δ 1-T-Zellen.....	24
6.2 Untersuchung eines $\alpha\beta$ TCR-Antikörpers auf sein Potential, Induktion und Verlauf der GvHD negativ zu modulieren.....	25
7. Ergebnisse und Diskussion	26
7.1 Isolation and Ex Vivo Culture of V δ 1+CD4+ $\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ T-cell Progenitor.....	26

7.2	Human CD4 ⁺ V δ 1 ⁺ $\gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells	30
7.3	Selective, efficient modulation of activated CD4 ⁺ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR.	42
7.4	Preemptive administration of human $\alpha\beta$ T cell receptor-targeting monoclonal antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR potentially abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo	46
8.	Danksagung	50
9.	Literaturverzeichnis	51

2. Zusammenfassung

Diese Dissertation befasst sich mit zwei Themengebieten, an denen der Doktorand gearbeitet hat und dabei naturwissenschaftlich studentische sowie ärztliche Mitarbeiter zusätzlich maßgeblich betreute. Aus diesen Arbeiten gingen vier Publikationen hervor.

Der erste Teil der Dissertationsarbeit thematisiert die Charakterisierung und Differenzierung einer bis dato unbekannt Form der extrathymischen T-Zellreifung, deren Vorläuferzellen, ein Subset der $V\delta 1^+$ -T-Zellen, auch gerade nach Involution des Thymus in erwachsenen Menschen in der Peripherie, vor allem in entzündetem Gewebe, nachzuweisen ist. Die vorgelegten Arbeiten zeigen erstmals, dass sich T-Zellen der angeborenen Immunität in adaptive T-Zellen umwandeln können, indem sie belegen, dass diese direkt aus Zellen der angeborenen Immunität über die gleichen Zwischenstadien wie sie im Thymus zu finden sind differenzieren. Sie belegen so, dass das bekannte Spektrum der Wirkungsweisen von $\gamma\delta$ -T-Zellen um eine bedeutende Funktion erweitert werden kann.

In der methodischen Publikation "*Isolation and Ex Vivo Culture of $V\delta 1^+CD4^+\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ T-cell Progenitor*", erschienen im *Journal of Visualized Experiments* (1), wird das Handwerkszeug für die Generierung der neu beschriebenen Progenitorpopulation geschnürt. Es wird gezeigt, wie humane $V\delta 1^+ CD4^+$ T-Zellen aus Zellen des Peripherbluts gesunder Erwachsener isoliert werden und nachfolgend Klone, die für die Forschung an der Plastizität dieser Zellpopulation unabdingbar sind, mittels *limiting dilution* Techniken gewonnen werden. Darüber hinaus werden die Kulturbedingungen, die eine Expansion der Vorläuferzellen *ex vivo* zulassen, beschrieben.

Weiterführende Experimente, anhand derer die Transdifferenzierung der $V\delta 1^+$ Zellen hin zu $\alpha\beta$ -T-Zellen aufgezeigt werden konnte, werden in „*Human $CD4^+ V\delta 1^+ \gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells*“, erschienen in *Frontiers Immunology* (2), beschrieben. Hierfür wurde zunächst die Vorläuferzelle eingehend auf die Expression verschiedener Stammzellmarker sowie Transkriptionsfaktoren hin charakterisiert und verschiedenen Kulturbedingungen ausgesetzt, die das augenscheinlich spontane Einsetzen der Transdifferenzierung begünstigen sollten. Der Prozess der Transdifferenzierung wurde wo fassbar molekularbiologisch untersucht, insbesondere hinsichtlich der

Expression der verschiedenen TCR-Ketten. Darüber hinaus wurden die resultierenden $\alpha\beta$ -T-Zellen auf ihre Funktionalität hin untersucht.

Im zweiten Teil dieser Dissertation wurde die Wirkungsweise des $\alpha\beta$ TCR-Antikörpers GZ- $\alpha\beta$ TCR hinsichtlich seiner möglichen Potenz eine *Graft-vs-Host-Diseases* (GvHD) nach Stammzelltransplantationen zu inhibieren, bzw. negativ zu modulieren untersucht. In der zu diesem Themenkreis gehörenden ersten Publikation „*Selective, efficient modulation of activated CD4+ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR*“, veröffentlicht in *Bone Marrow Transplantation* (3), wurde beschrieben wie der Antikörper überwiegend aktivierte $\alpha\beta$ -T-Zellen in die Apoptose treibt und ruhende $\alpha\beta$ -T-Zellen, sowie andere T-Zelltypen nicht beeinflusst werden. Dies wurde dort und im weiterführenden Paper „*Preemptive administration of human $\alpha\beta$ T cell receptor-targeting monoclonal antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR potently abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo*“, veröffentlicht in den *Annals of Hematology* (4), auch in einem GvHD-Mausmodell bestätigt. In letzterem Paper wurde außerdem gezeigt, dass eine Gabe von GZ- $\alpha\beta$ TCR vor der Stammzellgabe das Einsetzen einer GvHD komplett blockieren kann.

Die Publikationen, die in dieser Promotion erstellt wurden, zeigen eindrücklich die potente funktionelle und phänotypische Plastizität von T-Zellen sowohl in der adaptiven als auch angeborenen Immunität auf. Die überragende Variabilität der Spezifität von $\alpha\beta$ -T Zellen ist Grundpfeiler der adaptiven (T-)Zellimmunität, die für unser Überleben notwendig ist. Ihre Funktion ist jedoch nicht in jedem gesundheitsrelevanten Kontext förderlich. So wie sie lebenserhaltend effektiv Immunantworten gegen die Myriaden an Antigenen, denen wir ausgesetzt sind, starten, orchestrieren, beenden und ein immunologisches Gedächtnis bilden können, um bei Re-Exposition den Organismus noch schneller schützen zu können, so effektiv sie auch entartete Zellen eliminieren, so kann sich ihre Reaktion auch gegen das Individuum selber richten, eben dann, wenn autoimmune Erkrankungen oder die Transplantationssituation ein Milieu schaffen, das die Toleranz gegenüber selbst und fremd nicht mehr klar zeichnet. Schließlich zeigt die Arbeit zum thymusunabhängig reifenden $\alpha\beta$ -T-Zell-Progenitor aus dem $\gamma\delta$ -T-Zellkompartiment das hohe plastische Potential, das extrathymische T-Zellen in Funktion und Phänotyp besitzen.

3. Summary

This PhD thesis focuses on two areas of research which the candidate worked on and which he mentored several scientific or medical undergraduates at a significant level during his studies. Out of these, four peer-reviewed articles were published.

The first part of this thesis revolves around a hitherto unknown type of extrathymic generation of T-cells, whose progenitors that are a subset of V δ 1 T-cells are found in the periphery even after the involution of the thymus in adults has taken place. The papers summarized in this thesis describe a new bridge between the innate and adaptive immune system and broaden the functional spectrum of $\gamma\delta$ T-cells.

The methodic paper "*Isolation and Ex Vivo Culture of V δ 1+CD4+ $\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ T-cell Progenitor*", which was published in the *Journal of Visualized Experiments* demonstrates how the progenitor population of V δ 1+ CD4+ T-cells can be extracted from peripheral blood and how single cell clones that are indispensable for further research on the plasticity of those cells can be subsequently generated by limited dilution techniques. Furthermore, the paper shows the cell culture conditions that can be used for *ex vivo* expansion of the progenitor population.

Further experiments which show the transdifferentiation of these V δ 1 T-cells to $\alpha\beta$ -T-cells are described in "*Human CD4+ V δ 1+ $\gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells*", published in *Frontiers Immunology*. For this, the progenitor cell was characterized by its expression of various stem cell markers as well as transcription factors and was cultured under different conditions that influence the seemingly spontaneous onset of transdifferentiation of the cells. The process of transdifferentiation was examined on a molecular level, especially in light of the expression of the different TCR chain molecules. Moreover, the functionality of the resulting $\alpha\beta$ -T-cells was investigated.

In the second part of this thesis, the effect of the $\alpha\beta$ TCR-specific antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR on the potential inhibition or mitigation of GvHD after a stem cell transplantation was examined. The first publication on this topic, "*Selective, efficient modulation of activated CD4+ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR*", published in *Bone Marrow Transplantation*, describes how the antibody is able to induce apoptosis primarily in activated in contrast to dormant $\alpha\beta$ -T-cells or other T-cell types, which are not affected. This was verified by using a GvHD mouse model both in the first and the follow-up paper "*Preemptive administration of human $\alpha\beta$ T cell*

receptor-targeting monoclonal antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR potently abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo“, published in *Annals of Hematology*. Moreover, in this paper, it was shown that a preemptive dosage of GZ- $\alpha\beta$ TCR is able to inhibit the onset of a GvHD completely.

The publications that underlie this thesis show the functional and phenotypic plasticity of T cells, both in the innate and the adaptive immune system. The outstanding variability of the $\alpha\beta$ -T-cell specificity lays ground to the adaptive (T-cell) immunity that is essential for our survival. However, the efficacy of T-cells is not necessarily beneficial. As efficient and life-sustaining the cells are capable to start, to orchestrate and to end immune responses against the myriad of antigens that we are exposed to, as efficiently they can eliminate degenerated cells and create an immunologic memory to protect the organism even faster during re-exposition, their actions can also turn against the own body if autoimmune diseases or circumstances after a transplantation create an environment that fails to clearly define tolerance against self or foreign antigens. Finally, “*Human CD4⁺ V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells*” shows the highly variable potential of extrathymic T-cells in their functionalities and their phenotype.

4. Beschreibung des Eigenanteils

4.1 Isolation and Ex Vivo Culture of V δ 1⁺CD4⁺ $\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ T-cell Progenitor

Der Promovend optimierte zusammen mit PD Dr. Karin Schilbach die Techniken, die in dieser Publikation beschrieben wurden. Alle Experimente dieser Publikation wurden von ihm ausgeführt. Er vollführte diese Experimente zudem in dem Video, das Bestandteil der Publikation ist. Außerdem schrieb er das Manuskript zusammen mit PD Dr. Karin Schilbach und erstellte alle Grafiken.

4.2 Human CD4⁺ V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells

Der Promovend führte methodisch alle in dieser Dissertation beschriebenen Experimente zu Charakterisierung, Transdifferenzierung und *in vivo* Signifikanz selbstständig durch und interpretierte in Zusammenarbeit mit der Betreuerin deren Ergebnisse. Seine Ergebnisse bildeten einen Großteil der Daten, die als Grundlage für die Aussage des Manuskriptes herangezogen wurden. Er wendete diverse Isolations-, FACS- und molekularbiologische Techniken an, erstellte die finalen Versionen der Abbildungen für die Publikation und editierte das Manuskript im Hinblick auf die formalen Kriterien einer Publikation.

4.3 Selective, efficient modulation of activated CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR

Der Promovend führte FACS-Messungen der T-Zellen vor und nach Kultur, bzw. *ex vivo*, durch und interpretierte deren Ergebnisse. Er arbeitete den Erstautor in alle angewandten methodischen Techniken ein, vermittelte ihm dabei methodisch naturwissenschaftliches sowie zellbiologisches Grundlagenwissen und war Ansprechpartner in allen Fragestellungen hinsichtlich Zellkultur- und FACS-Techniken, sachgemäßer Bedienung von Analysegeräten, Versuchsplanung, Projektdurchführung, und Analyse von Daten. Außerdem präparierte er im *in vivo* Modell nach Erfüllung der Endpunktkriterien und Töten der Tiere die organständigen Lymphozyten aus den Organen und dem Blut der Tiere. Er erstellte sämtliche Grafiken der Publikation und editierte das von PD Dr. Karin Schilbach und Dr. med. Gregor Blank geschriebene Manuskript nach den formalen Kriterien des Journals zur Publikation.

4.4 Preemptive administration of human $\alpha\beta$ T cell receptor-targeting monoclonal antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR potently abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo

Die überwiegende Mehrheit der FACS-Messungen der T-Zellen aus diversen *ex vivo* Ansätzen, die entweder aus Isolationen durch Dr. med. Gregor Blank oder den Promovenden selber stammten, absolvierte der Promovend und interpretierte die Ergebnisse unter den gegebenen Fragestellungen. Er wirkte an der Ausarbeitung des Manuskriptes mit und erstellte alle Grafiken der Publikation. Er fertigte außerdem sämtliche Nacharbeiten an, die nach der ersten Runde des Review-Prozesses gefordert waren. Dies waren funktionelle *in vitro* und *ex vivo* Analysen der Immunzellen auf deren Zytokinexpression ohne und nach Behandlung aus den verschiedenen Versuchsansätzen, sowie Darstellungen zu Engraftment-Analysen mit Hilfe von FACS-Messungen.

5. Einleitung

5.1 Die Entwicklung des menschlichen Immunsystems

Das menschliche Immunsystem ist grundsätzlich aus zwei Ästen aufgebaut: dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Während das angeborene Immunsystem sich frühzeitig in der Evolution entwickelte und mit Hilfe spezifischer, aber unveränderlicher Rezeptoren auf bestimmte Pathogenstrukturen reagiert, ist das adaptive Immunsystem eine Errungenschaft der Wirbeltiere und vermag es, durch höchstvariable Rezeptoren spezifisch auf Krankheitserreger zu reagieren.

Den gemeinsamen Ursprung dieser in ihrer Erkennung von Pathogenen so verschiedenen Systeme erkennt man in der Ontogenese der jeweiligen Effektorzellen, die auf größtenteils identischen Vorläuferzellen beruht. Den gemeinsamen Vorläufer aller Immunzellen stellen hämatopoetische Stammzellen (HSC) dar, die im Menschen neben anderen Oberflächenmolekülen grundsätzlich durch die Expression von CD34 charakterisiert werden (5). Über die Zwischenstufe der *multipotential progenitors* (MPP) entwickeln sich daraus sowohl die myeloiden (*common myeloid progenitor*; CMP), wie auch die lymphatischen Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitor*; CLP) (6). CMPs sind im weiteren Verlauf für die Ausreifung nicht-immunologischer Blutbestandteile wie Erythro- und Thrombozyten, sowie von Granulozyten und Monozyten verantwortlich (7). Aus den CLPs reifen schlussendlich die Lymphozyten aus, die in B- und T-Zellen sowie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gruppiert werden (8; 9). Thema dieser Arbeit sind primär T-Zellen, deren Entwicklung im weiteren Verlauf näher beleuchtet werden soll.

5.2 Die T-Zell-Reifung

Für die Entwicklung von T-Zellen ist der Thymus von entscheidender Bedeutung. In dieses Organ wandern Vorläuferpopulationen wie die CLPs aus dem Knochenmark über das Blut ein, und werden durch besondere Eigenschaften des Thymusstromas zur Reifung stimuliert. Dies geschieht sowohl über direkte Zell-Zell-Interaktionen in molekular definierten Nischen, sowie durch die dort vorhandenen Zytokine und Chemokine. Die Ausreifung der Immunzellen im Thymus, auch Thymozyten genannt, unterliegt strengen Selektionsprozessen, die vor allem mit der Entwicklung des T-Zell-Rezeptors (TCR) zusammenhängen. Die TCRs von $\alpha\beta$ -T-Zellen bestehen aus einer α - und einer β -Kette, die beide zusammen die Erkennung spezifischer Pathogene

ermöglichen. Diese Erkennung pathogener Strukturen in Form von Peptiden aus pathogenabstammenden Proteinen geschieht nachdem diese Peptide den T-Zellen durch verschiedene Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle (*major histocompatibility complexes*, MHC) auf antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert wurden. Von den T-Zellen wird hierbei nicht das Peptid direkt, sondern das Peptid innerhalb des MHC-Moleküls (entweder MHC-I oder MHC-II) gebunden. Ein Genumlagerungsprozess in verschiedenen TCR-Loci während der Ausreifung der T-Zellen – die somatische Rekombination - ermöglicht die Generierung einzigartiger TCR-Ketten in jedem einzelnen T-Zell-Klon.

Hierfür werden Genabschnitte – sogenannte V- (*variable*), D (*diversity*) und J (*joining*) Segmente – zufällig rekombiniert und so die Exone der variablen Region der einzelnen TCR- α - und TCR- β -Ketten gebildet. Das Spektrum der α -Kette besteht hierbei aus 70-80 funktionalen V α - und 61 funktionalen J α -Segmente ohne eines D-Segments. Letztere spielen eine Rolle bei der Rekombination der β -Kette, deren funktionaler Pool aus 52 V β -, 13 J β und 2 D β -Segmenten besteht (10). Hauptakteur bei der Genumlagerung ist die V(D)J-Rekombinase, ein Enzymkomplex, der u.a. aus RAG1/2 (*recombination activating gene*) und TdT (*terminal deoxynucleotidyl transferase*). RAG1 startet den Prozess durch die Erkennung einer *Recombination Signal Sequence* (RSS), einer Nukleotidsequenz, die aus von einer Spacer-Region getrennten Heptamer- und Nonamer-Nukleotidfolge besteht (11). Alle VDJ-Segmente der TCR α - und β -Kette sind von einer solchen RSS flankiert und ermöglichen so die Erkennung durch RAG1 und die Generierung eines Einzelstrangbruches in der DNA. Damit zwei Segmente miteinander kombiniert werden können, geschieht dies simultan durch zwei RAG-Komplexe an zwei Gensegmenten. Die RAG-Komplexe binden hierbei aneinander und bringen die aufgebrochenen Enden des DNA-Strangs in räumliche Nähe. Dabei werden sogenannte *T-cell receptor excision circles* (TRECs) gebildet (12), DNA-Loops aus den Genabschnitten zwischen den beiden zu verbindenden Segmenten, die durch die Strangbrüche aus dem Locus herausgeschnitten werden und als Marker für frisch aus dem Thymus ausgewanderte T-Zellen dienen können (13).

Die Einzelstrangbrüche bewirken einen DNA-Doppelstrangbruch und die Bildung sogenannter *DNA hairpins* an den Enden der RSS. Diese werden durch den DNA-PK:Artemis-Enzymkomplex aufgebrochen (14). Da dies zufällig versetzt vom

originären Einzelstrangbruch geschehen kann, kann so die Keimbahnsequenz durch ursprünglich sich gegenüberliegende Nukleotide ergänzt werden. Diese die Segmente verlängernde Nukleotide werden P-Nukleotide genannt, da sie palindromischer Natur sind, und erhöhen die Variabilität der TCRs weiter (15; 16). In der Folge werden die so entstandenen Einzelstränge nun durch TdT (17) durch zufällig angehängte N-Nukleotide noch weiter verlängert und diversifiziert bevor weitere DNA-Reparaturenzyme die Einzelstränge zusammenführen, auffüllen und ligieren. Dieser Prozess findet sowohl an den V-J-Rekombinationen der TCR- α , als auch an den V-D und D-J-Rekombinationen der TCR- β -Kette statt (18). Hierdurch wird eine einzigartige Spezifität eines jeden so generierten, funktionalen TCRs, und die statistische und potentielle Generierung einer Bandbreite diverser TCRs in menschlichen Individuen von ungefähr 1×10^{19} TCR-Klonen ermöglicht (19). Dadurch kann nahezu jedes der Myriaden von Pathogenen erkannt werden, dem der menschliche Körper im Lauf des Lebens ausgesetzt ist.

Dieser Prozess muss allerdings aus zwei Gründen streng reguliert sein: Zum einen können nicht-funktionale Ketten entstehen, die sich zu keinem funktionellen TCR verbinden können. Zum anderen könnten TCRs über die MHCs auch körpereigene Strukturen erkennen und dagegen wirksam werden, was autoimmune Erkrankungen nach sich ziehen würde. Diese beiden Gefahren sollen während der Thymozytenreifung mit Hilfe eines strikten Selektionsprozesses, durch den solche Zellen erkannt und in die Apoptose getrieben werden, gebannt werden. Diese Prozesse sind die unten näher beschriebenen Positiv- und Negativselektion.

Ausreifende Thymozyten werden anhand ihrer Expression der Korezeptoren CD4 und CD8, die bei der Erkennung der MHC-Peptid-Komplexe eine Rolle spielen, eingeteilt. Im DN-Stadium (*double negative*, CD4⁻ CD8⁻), das wiederum in DN1 bis DN4 unterteilt wird, wird die β -Kette des TCRs generiert und mit Hilfe der invariablen pT α -Kette ein preTCR gebildet (20; 21). Nur wenn dies erfolgreich geschieht, wird der erste und gleichzeitig auch kritischste Selektionsschritt während der Thymozytenreifung erfolgreich durchlaufen und der Thymozyt vor Apoptose geschützt. Dieser wird auch β -Selektion genannt und findet vor allem im Cortex des Thymus, dem Randbereich des Organs, statt (22). Nach der β -Selektion expandieren die Thymozyten, die eine funktionelle β -Kette gebildet haben, stark, beginnen mit der Expression von CD4 und CD8 und gehen somit in das DP-Stadium (*double positive*) über (23). Daraufhin

wandern sie in das Innere des Thymus, der Medulla, ein und beginnen mit der Umlagerung der TCR α -Kette (24; 25). Dort durchlaufen die Zellen weitere Selektionsprozesse, anhand derer die Funktionalität ihres kompletten TCRs, bestehend aus umgelagerter β - und α -Kette, getestet wird. Entscheidend hierbei ist die Erkennung der MHC-Moleküle, die auf Epithelialzellen der thymischen Medulla mit Peptiden aus fast allen körpereigenen Proteinen beladen sind (26; 27). Werden die MHC-Peptid-Komplexe gar nicht oder zu wenig stark durch den TCR gebunden, sterben die Thymozyten, weil ihnen positive Überlebenssignale durch diese Bindung fehlen (Positivselektion) (28). Binden die Thymozyten jedoch so stark an die Komplexe, dass - geschähe es in der Peripherie - dort eine Immunantwort ausgelöst werden könnte, werden sie ebenfalls in die Apoptose getrieben, um autoimmune Reaktionen zu verhindern (Negativselektion) (29). Es überleben also gezielt nur die T-Zellen, die eine mittlere Affinität zu den im Thymus vorkommenden MHC-Peptid-Komplexen aufweisen. Dieser Vorgang wird zentrale Toleranz genannt (30). Je nach Bindungsstärke zu MHC-I oder MHC-II verlieren die Thymozyten einen ihrer Korezeptoren und werden zu SP-Zellen (*single positive*): Ist der TCR MHC-I-affin, bilden sich CD8⁺ T-Zellen, wohingegen durch MHC-II-affine TCR CD4⁺ T-Zellen ausreifen (31). Sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellen verlassen daraufhin den Thymus um in der Peripherie zu zirkulieren. Die drei Kontrollpunkte der β -, Positiv- und Negativselektion werden von einem Großteil der Zellen nicht passiert. Nur ca. 10% der Thymozyten entwickeln sich zu vollständigen $\alpha\beta$ -T-Zellen und verlassen den Thymus als naive T-Zellen (32).

Im Thymus entwickelt sich neben den soeben beschriebenen $\alpha\beta$ -T-Zellen auch eine weitere Subpopulation von T-Zellen: $\gamma\delta$ -T-Zellen, deren TCR aus einer γ - und einer δ -Kette gebildet wird. Auch diese Ketten werden durch Genumlagerung generiert, weisen aber keine so hohe Variabilität wie die Ketten des $\alpha\beta$ TCRs auf (33). Die Bildung von $\gamma\delta$ -T-Zellen koppelt sich von der Entwicklung der $\alpha\beta$ -T-Zellen im DN3-Stadium ab (23; 34; 35); zu dessen Zeitpunkt die Umlagerung der $\gamma\delta$ TCR-Loci abgeschlossen ist. Der genaue Entscheidungsprozess, ob ein DN3-Thymozyt die Entwicklung zu einer $\alpha\beta$ - oder einer $\gamma\delta$ -T-Zelle einschlägt, ist noch nicht abschließend geklärt. Das Modell der *signal strength* Theorie (23) besagt, dass am Ende des DN3-Stadiums sowohl ein funktioneller $\gamma\delta$ TCR als auch ein preTCR bestehend aus pT α und umgelagerter β -Kette auf der Oberfläche des Thymozyten vorhanden sein kann. Erfolgt eine Signalgebung über den preTCR, geht der Thymozyt in das DN4-Stadium über; erfolgt

hingegen ein Signal über den $\gamma\delta$ TCR, wird die somatische Rekombination abgeschlossen und der Thymozyt entwickelt sich weiter zu einer funktionalen $\gamma\delta$ -T-Zelle. Entscheidend hierbei ist auch die Signalstärke der unterschiedlichen TCRs. Das Signal eines funktionellen $\gamma\delta$ TCRs wird als stärker angesehen als jenes eines preTCRs.

Obwohl der Thymus als Hauptreifungsort der T-Zellen mit fortschreitendem Alter (36; 37) verkümmert und nur noch rudimentär Zellen generiert, ist der menschliche Körper auch noch im hohen Alter in der Lage dazu, das Repertoire seiner T-Zell aufgrund der Exposition mit bis dato unbekanntem Pathogenen mit entsprechenden TCRs zu erweitern. Für dieses scheinbare Paradoxon gibt es verschiedene Lösungsansätze. So wurden eine Ausreifung von Vorläuferzellen in anderen, sekundären lymphatischen Organen (38; 39; 40) oder schlicht die Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen als ausreichende Quelle neuer TCRs in Betracht gezogen (41; 42). Ein wichtiger Mechanismus hierfür ist die post-thymische TCR-Revision, die sowohl im murinen (43), als auch in humanen $\alpha\beta$ -T-Zellen (44) nachgewiesen wurde. Eine treibende Kraft hierfür könnten Superantigene sein, die die Expression des ursprünglichen TCRs auf der Oberfläche herunter reguliert. Durch das Fehlen aktivierender Signale über den TCR wird die Suppression der RAG-Genexpression gestört, wodurch es zu einer Re-Expression und nachfolgend neuer TCR-Rekombinationen kommt. Diese Form der post-thymischen T-Zell-Reifung ist in *germinal centers* in der Milz nachgewiesen (45); RAG⁺ T-Zellen wurden allerdings auch in sekundären lymphatischen Organen, wie Peyer-Plaques (46) und den Tonsillen (38), nachgewiesen.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Idee, dass sich reife T-Zellen durch bislang unbekannte Vorläuferzellen in der Peripherie, ohne Anwesenheit eines thymusartigen Organs, entwickeln könnten.

5.3 T-Zellen in der Peripherie

5.3.1 $\alpha\beta$ -T-Zellen

$\alpha\beta$ -T-Zellen sind die klassischen Effektorzellen des adaptiven Immunsystems. Sie sind über ihren TCR sehr spezifisch auf die Erkennung eines Antigenes ausgerichtet und können so entartete oder durch Viren befallene Zellen gezielt zerstören, und durch eine daraus folgende Zytokinsekretion andere Zellen des Immunsystems aktivieren.

Hierfür gibt es verschiedene Klassen an $\alpha\beta$ -T-Zellen, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen.

Alle $\alpha\beta$ -T-Zellen, die den Thymus verlassen, gelten als naiv, da sie noch nicht auf ihr entsprechendes Antigen getroffen sind. Naive T-Zellen zirkulieren durch die sekundären Lymphorgane und treffen dort auf spezialisierte APCs. Diese exprimieren hohe Mengen von MHC-Molekülen, deren Interaktion mit dem TCR und dessen Korezeptoren - unabhängig vom beladenen Peptid - wichtige Überlebenssignale übermittelt. Erkennen $\alpha\beta$ -T-Zellen jedoch auf einem MHC-Molekül das für sie spezifische Peptid, im Kontext eines zweiten, sogenannten kostimulatorischen Faktors, werden sie aktiviert, proliferieren und differenzieren weiter aus. Dabei werden $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen zu sogenannten Effektorzellen oder Gedächtniszellen (47). Sie sind damit noch nicht terminal differenziert, denn je nach umgebendem Milieu können sie als Effektorzelle auch in andere Subtypen differenzieren, da sie abhängig von der Dauer des umgebenden Milieus noch plastisches Potential besitzen (48; 49).

Naive $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen werden dann zu zytotoxischen Effektorzellen (CTLs) wenn sie an einer APC das für sie spezifische Antigen im Kontext eines sogenannten *second signals*, einer Kostimulation über CD28 durch die APC-assoziierten Liganden CD80 und CD86, erkennen. Nach dieser Konditionierung proliferieren die T-Zellen stark. Sollten sie in diesem Zustand das TCR-spezifische Antigen erkennen, zerstören sie die das Peptid präsentierende Zelle auch ohne Kostimulation (50). Solche Eptiope, die als fremd erkannt werden, bilden sich bei Entartung einer Zelle und der damit *de novo* gebildeten und produzierten Proteine, oder durch von Viren kodierten und durch die Wirtszelle hergestellten Proteine, die prozessiert und präsentiert werden. So können CTLs entartete Zellen erkennen und sie über eine Vielzahl von Mechanismen abtöten (51). Gemeinsam ist hierbei, dass der Zelltod der geschädigten Zelle gezielt über die Einleitung der Apoptose geschieht und so Nekrose vermieden wird. Hierdurch wird ein immunogener Zelltod, der durch die unkontrollierte Ausschüttung von *damage-associated molecular patterns* durch die sterbenden Zellen, bzw. ihrer Bestandteile, breite Immunreaktionen nach sich ziehen kann (52), verhindert.

Für $CD4^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen gibt es mehrere Subtypen von Effektorzellen, die unter dem Oberbegriff T-Helferzellen bekannt sind und sich vornehmlich in ihren sezernierten Zytokinen unterscheiden (53). Über diese können sie bestimmte Teile des Immunsystems weiter aktivieren. T_H1 -Zellen aktivieren über die Produktion von $IFN-\gamma$

und TNF- α vor allem Makrophagen und verstärken damit die zytotoxische Immunantwort (54; 55). Als Gegenpart hierfür dienen die T_H2-Zellen, die unter anderem IL-4 sezernieren. IL-4 ist das klassische Zytokin der humoralen Immunantwort und ermöglicht die Differenzierung von B-Zellen in antikörperbildende Plasmazellen (56). Antikörper sind entscheidend für die Abwehr extrazellulärer Pathogene wie Bakterien oder Helminthen. Über das Gleichgewicht an aktivierten T_H1- und T_H2-Zellen wird also die Art der Immunabwehr gesteuert. Darüber hinaus gibt es noch weitere Subpopulationen von T-Helferzellen, die spezifische Ausprägungen von Immunantworten begünstigen (57).

Unabhängig vom Typ ihres Korezeptors können alle $\alpha\beta$ -T-Zellen neben Effektorzellen auch Gedächtniszellen bilden. Diese auch Memory-T-Zellen genannten Immunzellen bilden zusammen mit ihrem B-Zell-Pendant das immunologische Gedächtnis, ein herausragendes Merkmal der adaptiven Immunabwehr. Dadurch wird bei einem schon dem Memory-System bekannten Erreger eine deutliche schnellere und wirksamere Immunantwort ermöglicht, die eine Infektion im Keim ersticken kann. Hierbei wird zwischen Effektor-Memory-T-Zellen (T_{EM}), die hin zu entzündetem Gewebe migrieren und dort den Erreger bekämpfen können, und zentralen Memory-T-Zellen (T_{CM}) unterschieden (58; 59). Letzere besitzen kaum Effektorfunktionen, sind aber in den sekundären lymphatischen Organen ansässig und können bei Stimulation über das für sie schon bekannte Antigen schnell und massiv proliferieren sowie T_{EM}-Zellen bilden (60).

Ein zu den bisher beschriebenen Effektorfunktionen als gegensätzlich erscheinender Mechanismus bildet neben Immunabwehr und immunologischem Gedächtnis ein dritter, wichtiger Aspekt der T-Zell-Immunologie: Die Regulation des Immunsystems über regulatorische T-Zellen. Sie bilden durch die Suppression der körpereigenen Abwehr nach abgeklungener Infektion einen wichtigen Schutzmechanismus, um Schäden an körpereigenen Zellen zu verhindern, die durch eine persistierende Immunantwort unvermeidbar wären. Auch hierfür gibt es unterschiedliche Zellpopulationen, die durch spezifische Wirkmechanismen bestimmte Zielzellen regulieren, aber grundsätzlich CD4⁺ sind (61).

5.3.2 $\gamma\delta$ -T-Zellen

Wie eingangs beschrieben, werden im Thymus neben den $\alpha\beta$ -T-Zellen auch Zellen mit einem $\gamma\delta$ TCR gebildet. Dies geschieht bevor die Zellen bezüglich der Erkennung von MHC-Molekülen selektiert werden, wodurch der $\gamma\delta$ TCR seine Liganden unabhängig von einer MHC-Präsentation erkennen kann (62). Dadurch sind auch die Korezeptoren CD4 und CD8, die bei der Bindung der MHC-Moleküle durch den $\alpha\beta$ TCR eine wichtige Rolle spielen, diesbezüglich nicht maßgebend und die überwiegende Mehrheit der $\gamma\delta$ -T-Zellen $CD4^-/CD8^-$ (63). So exprimieren nur ca. 20% der $\gamma\delta$ -T-Zellen CD8 (64). Außerdem zeichnen sie sich durch keine so hohe Vielfalt an möglichen TCR-Kombinationen aus, sondern vielmehr durch eine bevorzugte Kombination bestimmter γ - und δ -Ketten, die sich interessanterweise auch in der anatomischen Verteilung dieser Zellen niederschlägt. So sind $V\delta 2/V\gamma 9$ -T-Zellen die dominante Fraktion an $\gamma\delta$ -T-Zellen im Blutkreislauf (65), währenddessen $V\delta 1^+$ -T-Zellen mit variablen γ -Ketten vor allem in epitheliale Gewebe, wie Schleimhäuten oder der Haut, persistieren (64; 66).

Im Gegensatz zu den $\alpha\beta$ TCRs, die für jede T-Zelle einzigartig sind und über ihre Vielfalt ein komplexes Repertoire bereithält, erkennen $\gamma\delta$ TCRs bestimmte aber unterschiedliche Klassen an Zielstrukturen, bei denen es sich um Selbstantigene handelt (67).

Jede Kombination aus γ - und δ -Kette erkennt ein Spektrum von Liganden (68), die von den Körperzellen in unterschiedlichen Formen von Stress hochreguliert und exprimiert werden. Sie ähneln damit anderen Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, sogenannten *Pattern Recognition Receptors*. So binden $V\delta 2/V\gamma 9$ -TCRs Butyrophilin-Moleküle, im Speziellen BTN2A1 und BTN3A1 (CD277), deren Zusammenspiel eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von diesen T-Zellen darstellt. Es wurde gezeigt (69), dass BTN3A1 in einer Vielzahl von Tumoren überexprimiert wird und die Immunreaktion über die Aktivierung von $V\delta 1/V\gamma 9$ -T-Zellen beeinflussen kann. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei RhoB, das durch die Akkumulation der Phosphoantigene aus dem Zellkern in das Zytoplasma der Zelle transportiert wird und dort an die intrazelluläre Domäne von BTN3A1 bindet. Dies bewirkt eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne von BTN3A1 sowie eine erhöhte Zellmembranmobilität des Proteins, was eine Erkennung durch $V\delta 2/V\gamma 9$ -TCR ermöglicht (62). Da Phosphoantigene bei Dysregulation von körpereigenen Stoffwechselwegen in Zellen akkumulieren, ist dies vor allem bei entarteten im

Gegensatz zu gesunden Zellen von Bedeutung. Damit die $\gamma\delta$ -T-Zellen aber in diesem Kontext aktiviert werden können, ist auch die Expression von BTN2A1 essentiell, welches keimbahn-kodierte Regionen der V γ 9-Kette bindet (70).

V δ 1-TCRs hingegen erkennen u.a. MHC-verwandte, körpereigene MICA oder MICB-Moleküle, die durch Stress auf der Oberfläche von epithelialen Zellen induziert werden. Auch die Ligation von CD1-Molekülen, die eine Präsentation von bestimmten Lipiden und Lipoproteinen auf der Zelloberfläche ermöglicht, wurde bei V δ 1-Zellen nachgewiesen. Erst kürzlich wurde beschrieben (71), dass der *ephrin type-A receptor 2* (EphA2) ein Ligand für V δ 1/V γ 9-TCRs ist, der relativ zur Aktivität der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) in Tumorzellen exprimiert wird. Ist dessen Aktivität erhöht, kommt es zu einer vermehrten Infiltration solcher Tumore durch T-Zellen. Das Vorhandensein und die Aktivierung von $\gamma\delta$ -T-Zellen in entartetem Gewebe können sowohl antitumorale (72; 73; 74) als auch immunregulatorische Wirkungen haben (75; 76), denn $\gamma\delta$ -T-Zellen sind, obwohl in der Variabilität ihrer TCRs eingeschränkt, in ihrer Wirkungsweise äußerst effizient und plastisch.

Ihr großes Repertoire an Chemokin-Rezeptoren ermöglicht ihnen eine schnelle Migration in entzündetes Gewebe (77). Durch ihre MHC-unabhängigen TCRs können sie am Ort der Infektion dann auch rasch ihre Effektorfunktionen ausüben. Genau wie $\alpha\beta$ -T-Zellen weisen $\gamma\delta$ -T-Zellen hierbei zytotoxisches Potential auf und können Zytokine sezernieren, die hauptsächlich T_H1-Antworten begünstigen, beispielsweise IFN- γ und TNF- α (78; 79). Die rapide Wirkungsweise und die unspezifische Erkennung der Antigene lassen $\gamma\delta$ -T-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems wirken; der gemeinsame Ursprung und die simultan zu $\alpha\beta$ -T-Zellen stattfindende Generierung ihrer TCRs ermöglichen aber auch eine Klassifizierung als adaptive Immunzellen. Häufig werden $\gamma\delta$ -T-Zellen als archaische Variante der $\alpha\beta$ -T-Zellen gesehen und somit als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort.

Neben ihren lytischen Eigenschaften besitzen $\gamma\delta$ -T-Zellen auch Funktionen, die weitere Bereiche des Immunsystems beeinflussen. Das wird auch dadurch deutlich, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen sowohl in bakteriellen (80; 81; 82), als auch in viralen (83; 84) Infektionen expandieren. Dies zeigt ihre hohe plastische Funktionalität, da für diese verschiedenen Infektionstypen verschiedene Arme des adaptiven Immunsystems aktiviert werden müssen. Außerdem können sie, ähnlich wie $\alpha\beta$ -T-Zellen, auch regulatorische Phänotypen aufweisen und spielen so bei der Beendigung einer

Immunantwort eine Rolle, ebenso wie bei der Entscheidung ob und auch in welche Richtung eine T-Zellantwort erfolgt (85). Grundsätzlich üben $\gamma\delta$ -T-Zellen eine wichtige immunmodulierende Funktion aus, da Knockout-Modelle zeigen, dass Individuen, die keine $\gamma\delta$ -T-Zellen haben, nicht an Infektionen oder Tumoren versterben, sondern an autoimmunen Prozessen und überschießenden $\alpha\beta$ -T-Zellantworten (86). Neben diesen Funktionen, die sie mit $\alpha\beta$ -T-Zellen teilen, können $\gamma\delta$ -T-Zellen weitere Aufgaben übernehmen, welche sie von $\alpha\beta$ -T-Zellen unterscheiden. So wurde nachgewiesen, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen dazu in der Lage sind zu phagozytieren und als hochpotente antigenpräsentierende Zellen fungieren (87; 88) . Dies kann unter anderem die Proliferation und Differenzierung von naiven $CD4^+$ und $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen hin zu Effektorzellen befeuern.

Darüber hinaus übernehmen vor allem epithelständige $V\delta 1^+$ T-Zellen auch nach Abklingen einer Infektion wichtige Aufgaben. Durch die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, wie dem *keratinocyte growth factor* oder dem *fibroblast growth factor 9*, tragen sie maßgeblich zur Reparatur von geschädigtem Gewebe nach einer Entzündung bei (89).

$\gamma\delta$ -T-Zellen sind somit wichtiger Bestandteil in jeder Phase einer Immunantwort. Sie sind die erste Abwehrlinie, die in entzündetes Gewebe vordringt, dort Erreger bekämpft und weitere Immunprozesse induziert sowie deren Typus bestimmt, das Abklingen der Immunantwort definiert und die Beseitigung etwaiger Gewebeschäden begünstigt. Dies zeigt die außergewöhnliche Plastizität dieses T-Zelltyps, der in dieser Arbeit untersucht wurde und durch die neuartige Transdifferenzierung hin zu $\alpha\beta$ -T-Zellen auf eindruckliche Weise erweitert wird.

5.4 Die Rolle der T-Zellen in der Stammzelltransplantation: *Graft-vs-Host-Disease*

Wie eingangs erwähnt, wird die Hämatopoese über Prozesse, die eine Vielzahl von Vorläuferzellen und Entwicklungsstadien beinhalten, streng reguliert. Kommt es zu einer Entartung von Zellen, kann diese rigide Regulation außer Kraft gesetzt werden. In vielen Fällen kommt es zur unkontrollierten klonalen Expansion einzelner Zelltypen, die funktionale Zellen verdrängen und zu einem Ungleichgewicht innerhalb des gesamten hämatopoetischen Systems führen. Man spricht hierbei von leukämischen Erkrankungen, die nach der jeweils entarteten Zellpopulation und nach ihrem Verlauf

hin charakterisiert werden. So gibt es beispielsweise T-Zell akute lymphatische Leukämien (T-ALL), die mit einem sehr rapid verlaufenden Krankheitsbild einhergehen (90), oder auch chronische myeloische Leukämien (CML), die durch Granulozyten verursacht werden und deutlich langsamer in ihrem Verlauf sind (91). Ist den malignen Zellen mit konventioneller Chemo- und Bestrahlungstherapie nicht Herr zu werden, kann eine Stammzelltransplantation (HSCT), das heißt der Austausch des erkrankten hämatopoetischen Systems gegen ein gesundes, in vielen Fällen eine mögliche Therapie darstellen. Die HSCT ist die einzige Therapie, die kuratives Potential bei Rezidiven und therapieresistenten Leukämien hat.

Daneben kann auch aufgrund von genetischen Defekten eine nicht komplett oder gar nicht funktionierende Hämatopoese in Menschen existieren. So leiden z.B. Patienten mit Wiskott-Aldrich-Syndrom an einer insuffizienten Blutgerinnung, die unbehandelt unweigerlich zum Tod führt (92). Andere Mutationen, die unter *severe chronic immunologic disorders* (SCID) zusammengefasst werden, führen zu einem fehlenden adaptiven Immunsystem. In all diesen Fällen ist eine ursächliche Behandlung der Erkrankung nur durch eine Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantation möglich (93).

Eine Stammzelltransplantation wird auch dann notwendig, wenn Tumore, die nicht dem hämatopoetischen System angehören, chemo- und strahlenresistent und bereits disseminiert sind. Beim Einsatz von maximaler konventioneller Chemo- und Strahlentherapie wird das Knochenmark mit allen Progenitoren des hämatopoetischen Systems unweigerlich vernichtet. Dem Patienten werden daher vor dieser Maximaltherapie seine Stammzellen in Form von Knochenmark entnommen, und er erhält diese bzw. allogene, passende Stammzellen nachdem er ganzkörperbestrahlt und chemotherapiert wurde.

Mit Hilfe von maximal tolerierbarer Chemotherapie und Bestrahlung wird das kranke hämatopoetische System, bzw. ein disseminierter Tumor, zerstört. Die dabei komplett genommene Fähigkeit zur Bildung aller zellulären Blutbestandteile bezeichnet man als Aplasie nach myeloablativer Behandlung. Die Gabe von hämatopoetischen Stammzellen, meist die eines allogenen Spenders, führt hiernach in den meisten Fällen zu einem Anwachsen der (Spender-)Vorläuferzellen im Knochenmark und damit über die Zeit zur Generierung eines neuen, gesunden Immunsystems im Patienten. Aufgrund der Aplasie im Vorfeld der Stammzellgabe ist eine schnelle Rekonstitution

des Immunsystems durch Spenderzellen wichtig, da der Patient ohne Immunsystem ein signifikant höheres Risiko für ein Wiederauftreten der Grunderkrankung (Rezidiv) bzw. Infektionen ausgesetzt ist. Virale Infekte, seien sie endogen oder neuerworben, können dabei ebenso wie Mykosen oder bakterielle Infekte trotz medikamentöser Prophylaxe tödlich verlaufen. Hauptdarsteller im Kampf gegen Infektionen sind wie oben beschrieben die T-Zellen. T-Zellen stellen allerdings ein doppelschneidiges Schwert in einer Transplantationssituation dar.

Werden Zellen eines Fremdspenders zur Stammzelltransplantation genutzt, kann es auf der einen Seite durch im Transplantat enthaltene T-Zellen oder im Empfänger neu generierten Spender-T-Zellen zur Entwicklung einer GvHD kommen. Hierbei reagieren die Immunzellen, mediiert durch antigenpräsentierende Zellen des Empfängers, auf körpereigene Zellen und lösen so teils heftige gewebeschädigende Immunreaktionen aus. Diese können entweder akuter oder chronischer Art sein und betreffen vor allem epitheliales Gewebe, wie die Haut oder den Darm (94). Solche Reaktionen stellen eine lebensgefährliche Gefahr für den ohnehin geschwächten Patienten dar. Chronische Fälle einer Abstoßungsreaktion müssen mit lebenslanger Einnahme von Immunsuppressiva behandelt werden, inklusive einer daraus folgenden Minderung der Lebensqualität und Risiken, u.a. für Infekte und der Entstehung weiterer maligner Erkrankungen. Selbst wenn eine komplette Übereinstimmung der HLA-Genotypen zwischen Spender und Patient besteht, kommt es dennoch immer noch in über 50% aller Transplantationen zu einer GvHD (95). Dies lässt den Schluss zu, dass das MHC-Spektrum nicht die komplette Zellerkennung durch Immunzellen erklärt und darüber hinaus Minorantigene, die nicht in dem Ausmaß wie der HLA-Genotyp vor einer Transplantation abgeglichen werden, einen nicht zu vernachlässigenden Beitrag zur Entstehung von GvHD leisten (96). Auch in Hinblick dessen, dass haploidente Stammzellgaben immer relevanter werden, ist weitere Forschung zur Vermeidung von GvHD von entscheidender Bedeutung.

Auf der anderen Seite ist das schnelle Anwachsen eines neuen hämatopoetischen Systems von großer Wichtigkeit um das Überleben der Empfänger zu sichern. Durch den fehlenden eigenen, zellbasierten Schutz vor Pathogenen, auch opportunistischer Art, sind residuale T-Zellen innerhalb des Transplantats auch von Vorteil für den Patienten. Ein weiterer positiver Aspekt von T-Zellen des Spenders sind ihre zytolytischen Effekte auf noch verbliebene residuelle Tumorzellen, wenn eine maligne

Erkrankung Grund der Stammzelltransplantation war. Basierend auf demselben Prinzip, durch das es zu einer GvHD kommt, erkennen die Immunzellen des Spenders die allogenen Tumorzellen und sind sehr effektiv in deren Bekämpfung (*Graft-vs-tumor*; GvT-Effekt) (97). Dies kann unter anderem von Bedeutung sein, wenn der Zustand des Patienten keine myeloablative Therapie erlaubt und somit eine erhöhte Gefahr des Wiederaufflammens der Tumorerkrankung besteht.

Entsprechend werden auch Gaben von Spender-T-Zellen zur Stärkung des Immunsystems des Empfängers bei Notwendigkeit, wie (Wieder)Aufflammen von Infekten, bzw. zur Bekämpfung eines Rezidivs angewendet, auch wenn dies eine Verstärkung etwaiger GvHD-Reaktionen bedeuten kann. Die Abwägung zwischen erwünschtem GvT/GvL und unerwünschtem GvHD-Effekt ist ein Balanceakt für die behandelten Ärzte und von hoher Wichtigkeit für das Überleben des Patienten.

Unsere Arbeiten zum TCR $\alpha\beta$ -spezifischen Antikörper GZ- $\alpha\beta$ TCR, dessen Gabe während, bzw. vor einer Stammzellgabe das Aufflammen einer GvHD in einem humanisierten, murinen Modell abschwächen bzw. sogar gänzlich verhindern konnte, könnten eine Möglichkeit zur Kontrolle dieser lebensgefährlichen Komplikation nach einer Stammzellgabe darstellen.

6. Zielsetzung

Dieser Arbeit liegen vier Publikationen zugrunde, die in zwei Themengebiete unterteilt werden können: Die Analyse eines bis dato unbekanntes $V\delta 1^+$ -T-Zellprogenitors, der nach Durchlaufen eines Transdifferenzierungsprozesses zu diversen $\alpha\beta$ -T-Zellen differenzieren kann; sowie Untersuchungen des Einflusses eines Antikörpers, der durch Bindung an die konstante Region des $\alpha\beta$ TCRs apoptoseinduzierend auf aktivierte T-Zellen wirkt. Ob dessen Einsatz die Initiation bzw. den Verlauf der GvHD günstig im Sinne des Patienten modulieren kann, wurde präklinisch in einem humanisierten Mausmodell, also einer aggressiven Xeno-GVHD, evaluiert.

6.1 Transdifferenzierung von $V\delta 1$ -T-Zellen

Die Publikation "*Isolation and Ex Vivo Culture of $V\delta 1^+CD4^+\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ T-cell Progenitor*" (1) zeigt die methodische Strategie zur Isolation des im Blut nur im Promillebereich vorkommenden, neu beschriebenen Progenitors. Zusammengefasst stellt diese Veröffentlichung einen methodischen Artikel dar, der die Grundlagentechniken zur Kultivierung dieser seltenen Zellpopulation der Forschungsgemeinde veranschaulichen und so weitere Untersuchungen ermöglichen soll.

Im Artikel "*Human $CD4^+ V\delta 1^+ \gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells*" (2) werden Forschungen zu eben diesem Thema der Transdifferenzierung veröffentlicht. In dieser Publikation wurde erstmals die Transdifferenzierung von $V\delta 1^+ CD4^+ \gamma\delta$ -T-Zellen hin zu voll funktionsfähigen $\alpha\beta$ -T-Zellen beschrieben. Hier wird lückenlos aufgezeigt, welche Schritte diese Differenzierung umfasst, sowie dass die Transdifferenzierung analog zur thymischen Entwicklung verläuft, womit diese Publikation eine bis *dato* unbekannte Form der extrathymischen T-Zell-Reifung vorstellt. Sie unterstreicht die herausragende Bedeutung des angeborenen Immunsystems und zeigt die $V\delta 1$ -Population als Brücke zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Des Weiteren deutet sie an, dass dieser Vorgang weitreichende Implikationen für das Verständnis der Pathophysiologie einer Reihe autoimmuner Erkrankungen haben kann, ebenso wie für das Verständnis von Funktion und Potential des alternden Immunsystems.

6.2 Untersuchung eines $\alpha\beta$ TCR-Antikörpers auf sein Potential, Induktion und Verlauf der GvHD negativ zu modulieren

Die Wirkungsweise und Nutzen des $\alpha\beta$ -TCR-spezifischen Antikörpers GZ- $\alpha\beta$ TCR auf die Initiation und den Verlauf einer GvHD wurde in Arbeiten zu zwei Publikationen untersucht. In „*Selective, efficient modulation of activated CD4+ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR*“ (3) wurde die Wirkungsweise des Antikörpers auf Apoptoseinduktion in Subsets von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen hin diskriminiert. Außerdem sollte untersucht werden, ob durch Gabe des Antikörpers in einem aggressiven GvHD Xenograft-Mausmodell die GvHD gemildert oder gar verhindert werden kann.

Basierend auf den ermutigenden Ergebnissen der ersten Studie sollten in der Nachfolgestudie „*Preemptive administration of human $\alpha\beta$ T cell receptor-targeting monoclonal antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR potentially abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo*“ (4) *in vivo* differenzierende Therapieregime untersucht werden, um das therapeutische Potential des Antikörpers dahingehend zu untersuchen ob durch zeitlich optimale Gabe die Entstehung einer GvHD verhindert werden kann. Da durch den zuvor publizierten Versuchskomplex eine GvHD zwar hinausgezögert, aber nicht verhindert werden konnte, sollte nun untersucht werden, wie sich eine präemptive Gabe des Antikörpers, also die Gabe noch vor der Transplantation im Mausmodell auswirkt und ob dadurch im Idealfall eine Entstehung der GvHD verhindert werden kann.

7. Ergebnisse und Diskussion

7.1 Isolation and Ex Vivo Culture of V δ 1+CD4+ $\gamma\delta$ T Cells, an Extrathymic $\alpha\beta$ -cell Progenitor

Wie von uns an anderer Stelle beschrieben (siehe 7.2), können V δ 1⁺ CD4⁺ T-Zellen als periphere Vorläuferzellen für $\alpha\beta$ -T-Zellen fungieren. Sie kommen im peripheren Blut Erwachsener vor, in der Regel jedoch nur zu einem sehr geringen Prozentsatz, die der Frequenz von CD34⁺ Stammzellen entspricht (2). Wie der Anteil von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Peripherie ist auch der Anteil von V δ 1-T-Zellen interindividuell verschieden, unterliegt aber zudem Schwankungen je nach Gesundheitszustand eines Individuums. $\gamma\delta$ -T-Zellen sind überwiegend korezeptornegativ: etwa 20% exprimieren CD8, während CD4 von $\gamma\delta$ -T-Zellen von ursprünglich DN $\gamma\delta$ -T-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen exprimiert wird. Die geringe Anzahl erschwert Forschung zu dieser T-Zellentität, daher wurden sie nach Isolation kloniert. Da die Isolation einer so gering vorkommenden Zellpopulation herausfordernd ist, haben wir in der vorliegenden Publikation die Techniken, die eine solche Isolation möglich machen, gezeigt. Hierbei wurden mit Hilfe von FACS-Antikörpern über Dichtegradientenzentrifugation isolierte PBMCs sowohl auf Expression eines V δ 1-TCRs, als auch auf die der beiden Korezeptoren hin untersucht. Abbildung 1 zeigt das Ergebnis einer solchen Anfärbung und die angewendete Gating-Strategie. Der rot gefärbte Anteil der lymphozytären Fraktion entspricht einem Prozentsatz von 2,3%. Davon wiederum exprimierten 2,6% CD4, die im letzten Dot Blot blau angefärbt wurden. Dies entspricht einer Frequenz von etwa 0,06% der Lymphozyten im Peripherblut dieses Spenders.

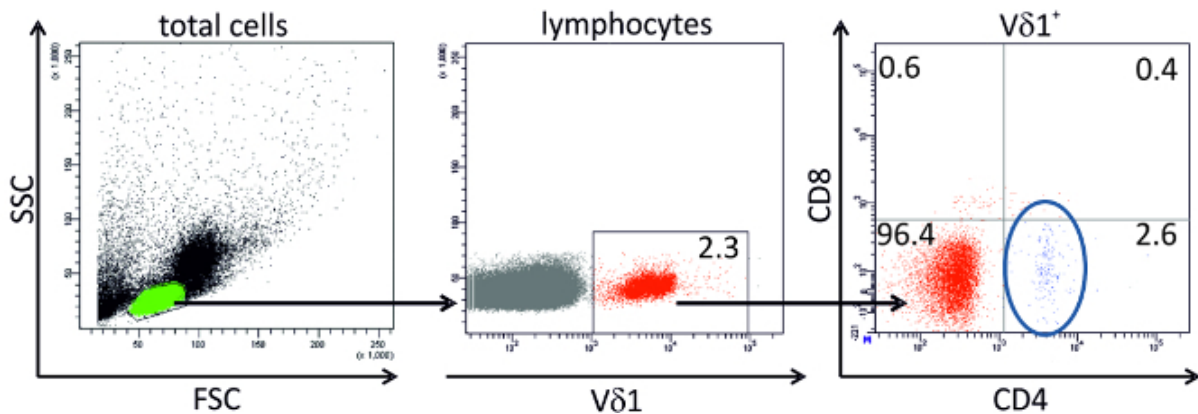


Abbildung 1 Gating-Strategie zur Veranschaulichung der Zielpopulation in einem adulten, menschlichen Probanden. Lymphozyten sind grün, $V\delta 1^+$ T-Zellen in rot und $V\delta 1^+CD4^+$ T-Zellen in blau und mit einem blauen Kreis markiert. Die Werte geben die Prozentzahlen bzgl. des Gates an.

Nach Depletion der $\alpha\beta$ -T-Zellen wurden mittels MACS-Isolation durch eine antikörperbasierte FITC-Markierung des $V\delta 1$ -Moleküls und nachfolgender Bindung von anti-FITC-Microbeads in einem ersten Schritt eine Anreicherung der $V\delta 1$ -T-Zellen von $>99\%$ innerhalb der $CD3^+$ -Population erreicht (s. Abbildung 2). Wichtig ist die konsequente Eliminierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen vor Isolation der Zielzellen, da sonst keine reine $CD4^+ V\delta 1$ Population gewonnen werden kann.

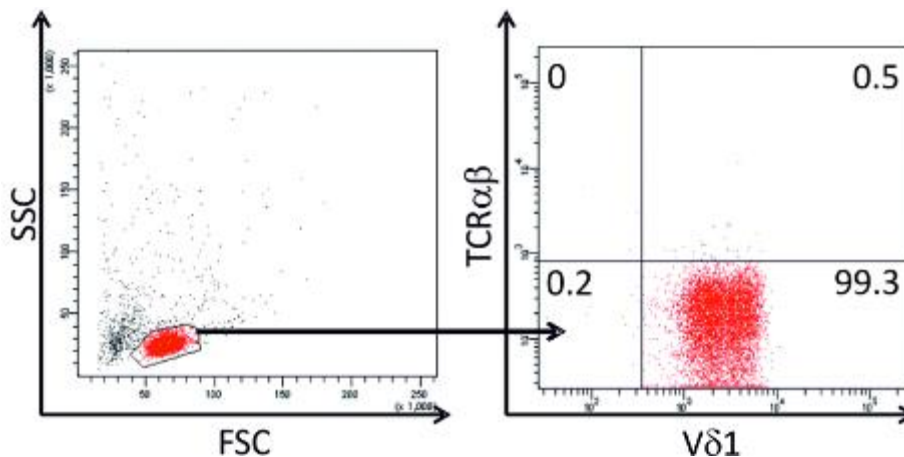


Abbildung 2 FACS-Analyse der $V\delta 1^+$ Fraktion nach erfolgreicher Isolation. Lymphozyten sind rot markiert. Die Zahlen geben die Prozentwerte der entsprechenden Gates an.

Mit Hilfe von $CD4$ -spezifischen Dynalbeads, die 20-fach größer als Microbeads sind, wurde die zuvor isolierte $V\delta 1^+$ -Population ebenfalls mittels einer Separation basierend auf magnetischen Beads in einem Magneten auf ihre $CD4$ -Expression hin sortiert. Durch ihre Größe benötigen Dynalbeads ein weniger starkes Magnetfeld um erfolgreich angereichert zu werden. Die noch auf der Zelloberfläche vorhandenen

MACS-Partikel werden somit vom zweiten Magnetfeld nicht angezogen. Erst diese neuartige Kombination von MACS- und Dynal-Technik ermöglichte die Anwendung zweier Positivselektionen zur Isolation dieser sehr seltenen Population aus dem Peripherblut menschlicher Probanden.

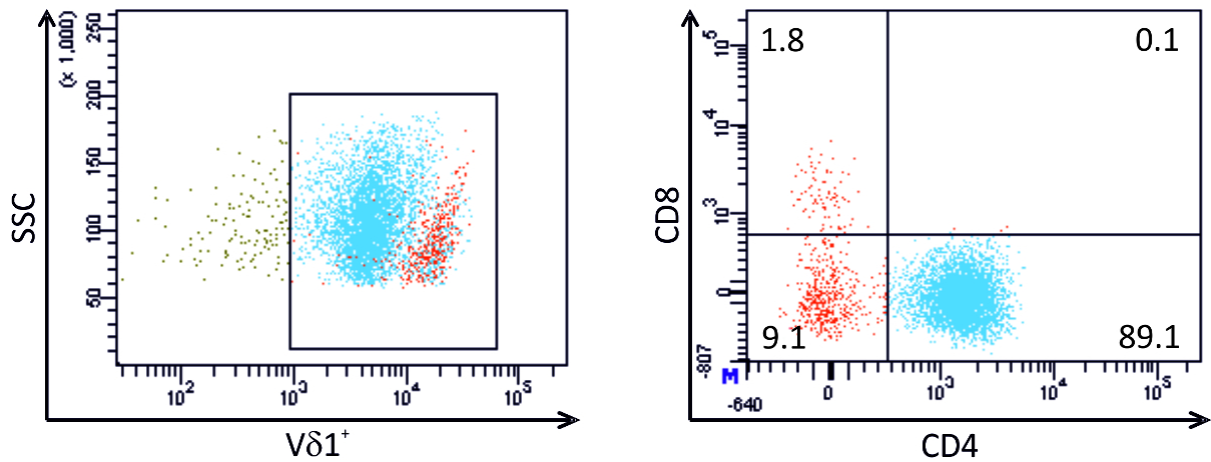


Abbildung 3 Beispielhafte FACS-Analyse der Positivfraktion von $V\delta 1^+$ T-Zellen nach Anreicherung nach CD4. $V\delta 1^+CD4^-$ Zellen sind rot, $V\delta 1^+CD4^+$ Zellen blau markiert. Die Prozentzahlen der Zellen innerhalb der Quadranten sind angegeben.

Das Ergebnis einer solchen zweiten Isolationsrunde ist in Abbildung 3 zu sehen. Hierbei handelt es sich nicht um eine vollständig reine $CD4^+$ -Fraktion, allerdings ist eine Anreicherung der Zellen um ca. das 30-fache auf über 90%, im Gegensatz zu den 2,6% Anteil im Peripherblut, erreicht worden. Die Effizienz der Isolation ist auch daran zu erkennen, dass in der $CD4^-$ -Fraktion praktisch keine residuellen $CD4^+$ Zellen verblieben sind. Die Anwesenheit residueller $CD8^+$ bzw. doppeltnegativer $V\delta 1$ -T-Zellen in der nach $CD4$ angereicherten Population war zu tolerieren, da im weiteren Verlauf aus der Population Einzelzellklone generiert wurden.

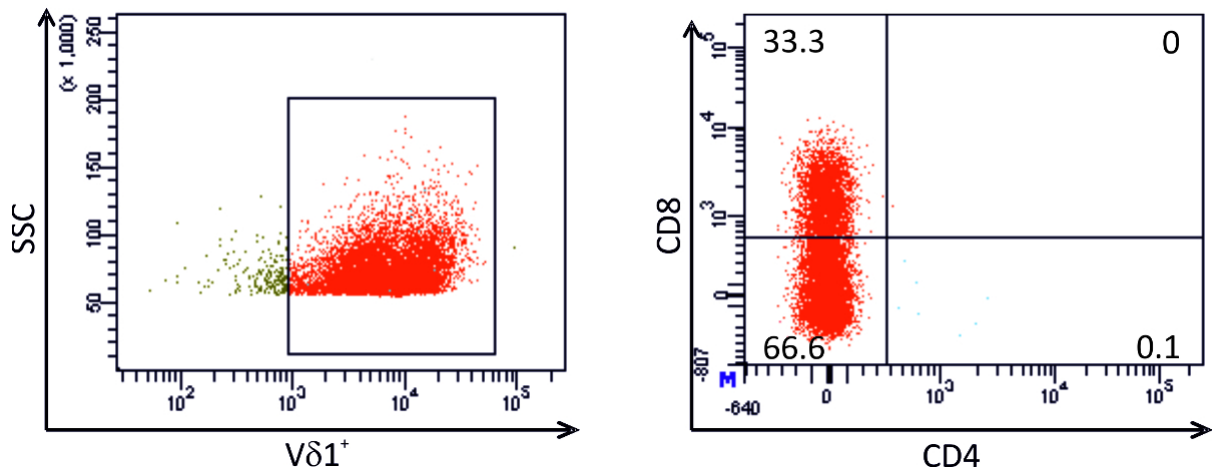


Abbildung 4: FACS-Analyse der Negativfraktion von Vδ1⁺ T-Zellen nach Anreicherung über CD4. Vδ1⁺ CD4⁻ Zellen sind rot markiert. Die Prozentzahlen der Zellen innerhalb der Gates sind als Werte angegeben.

Die so durch Isolation angereicherten Vδ1⁺CD4⁺ T-Zellen wurden nun kloniert und für weiterführende Experimente genutzt.

Diese Art der Publikation liefert neben einer Beschreibung der Techniken in Textform eine visuelle Begleitung, was die Durchführung und Klarheit der Aussage unterstützt und die Reproduzierbarkeit durch die Forschungsgemeinde sowie etwaige Folgearbeiten erleichtert.

7.2 Human CD4⁺ V δ 1⁺ $\gamma\delta$ T cells can develop into $\alpha\beta$ T cells

In dieser Publikation wurde durch unsere Arbeitsgruppe erstmals die Generierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen aus V δ 1⁺-T-Zellen gezeigt. Dieser Vorgang der Transdifferenzierung von V δ 1⁺-T-Zellen zu $\alpha\beta$ -T-Zellen wurde von uns umfassend untersucht. Wir haben dazu molekularbiologische Methoden zum Nachweis von RAG, TdT und der *de novo* Expression von $\alpha\beta$ -TCR-Genen in der Spectratype-Analyse angewandt, sowie die Epitopbinderegionen der neu rekombinierten TCR-Ketten analysiert. Pathophysiologisch haben wir mittels FACS-Techniken den Progenitor und seine Differenzierungsstadien in Exsudaten entzündeter Kniegelenke, Aszites und Tonsillen nachgewiesen. Den Prozess der Transdifferenzierung konnten wir anekdotisch in V δ 1-Klonkulturen und in V δ 1-Gesamtpopulationen aufzeigen.

Ein Schwerpunkt des Anteils des Promovenden an dieser Publikation lag in der Analyse der Oberflächenexpression der einzelnen TCR-Ketten während der Transdifferenzierung zu $\alpha\beta$ -T-Zellen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper sowohl gegenüber den variablen Bereichen des TCRs, als auch gegenüber den konstanten Regionen konnte so der Verlauf der TCR-Kettenexpression genau konstatiert werden.

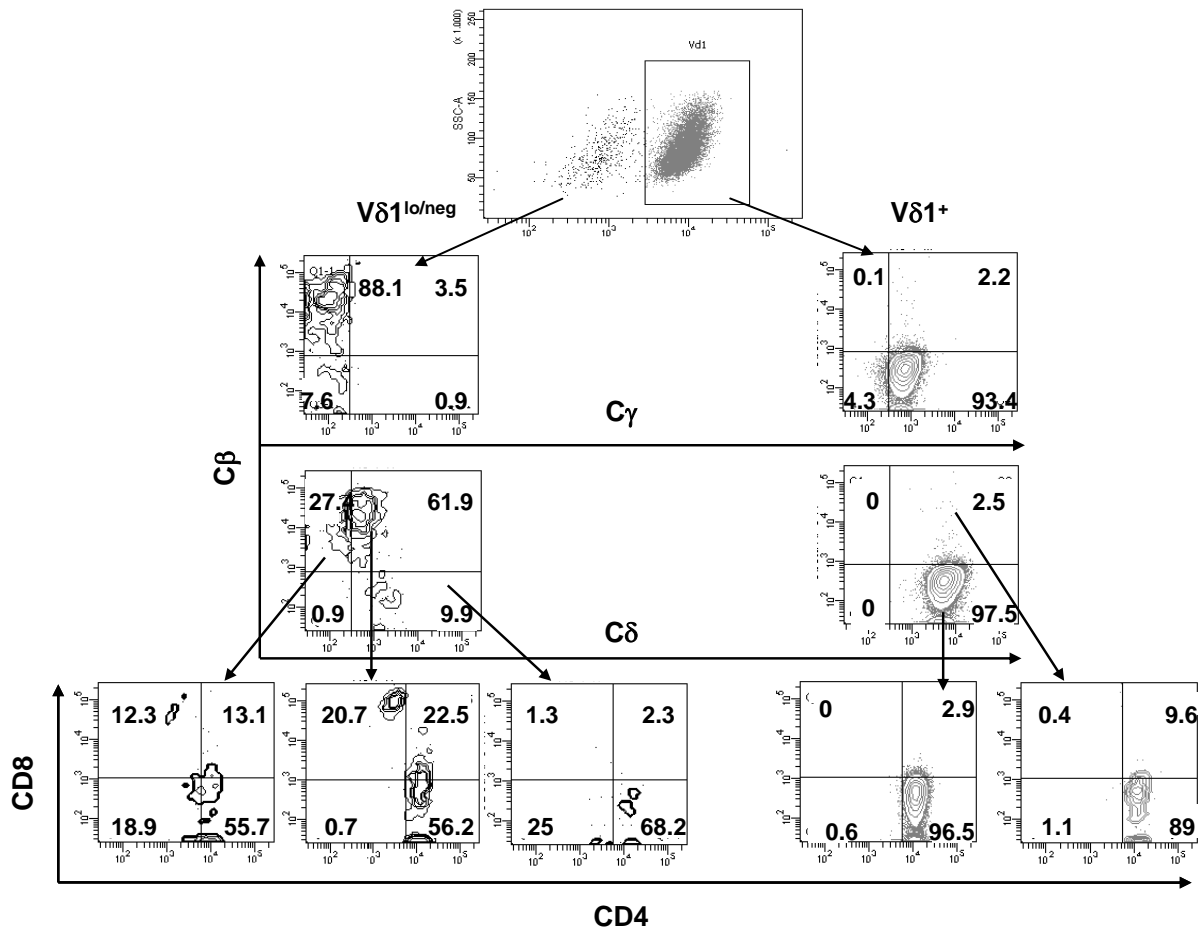


Abbildung 5: Beispiel der TCR-Ketten- und Korezeptorexpression eines sich in der Transdifferenzierung befindlichen Klon anhand von FACS Dot/Contour-Blots. Vδ1^{lo/neg} Zellen sind in der Transdifferenzierung schon fortgeschritten, Vδ1⁺ Zellen sind zum Großteil noch im originären Zustand. Cβ steht für die TCR-β-Kette, Cγ und Cδ respektive für die TCR-γ und TCR-δ-Kette. Werte innerhalb der Blots geben die Prozente der sich im Gate befindlichen Zellen an.

In Abbildung 5 ist beispielhaft ein sich in der Transdifferenzierung befindlicher Klon dargestellt. Die hier analysierten Vδ1⁺ T-Zellen sind klonalen Ursprungs, das heißt etabliert durch Einzelzellklonierung und nachfolgender Expansion. Sie haben zuvor über mehrere Wochen konstant einen Vδ1⁺ CD4⁺ Phänotyp gezeigt. Die Gating-Strategie differenziert anhand der Expressionsstärke zwischen Vδ1^{hi} und Vδ1^{lo} T-Zellen und solchen, die ihre Vδ1-Expression deutlich herunter reguliert haben (Vδ1^{neg}). Dieses Indiz einer beginnenden und abgeschlossenen Transdifferenzierung zu αβ-T-Zellen wird gespiegelt durch die komplette Herunterregulation der TCR-γ-Kette. Die gleichzeitige Färbung mit Antikörpern gegen die konstante Region der TCR-β-Kette (Cβ) und gegen jene der TCR-δ (Cδ) und der TCR-γ-Kette (Cγ) ermöglicht ein

differenziertes Bild des Ablaufs der Transdifferenzierung in Bezug auf die Expression der verschiedenen TCR-Ketten.

Man erkennt deutlich, dass zusammen mit der Herunterregulation der V δ 1-Kette ein kompletter Verlust der TCR- γ -Kette stattfindet. Stattdessen werden auf diesen Zellen deutlich TCR- β -Ketten exprimiert - bei einer Mehrheit der Zellen in Anwesenheit einer zwar deutlich verringerten, aber dennoch noch vorhandenen Expression von C δ . Dieses Zwischenstadium von C δ /C β doppelpositiven Zellen unterscheidet sich von einzelpositiven T-Zellen durch die Korezeptorexpression. C δ ⁺/C β ⁺ Zellen haben einen deutlichen Anteil von CD4/CD8 doppelpositiven Zellen, während C β ⁻ Zellen vor allem CD4 exprimieren, wie der Klon bislang auch. Zellen, die die C δ -Expression gänzlich runterregulierten, differenzieren sich dagegen zunehmend zu CD4 oder CD8 SP $\alpha\beta$ T-Zellen. Solche Zellen, die sich *nicht* in der Transdifferenzierung befanden, zeigten dagegen weiterhin einen stabilen C β -V δ 1⁺CD4⁺ Phänotyp. Die Expression des Korezeptors CD4 entspricht somit dem Entwicklungsstatus von ISP/DN4 Thymozyten, der im Menschen CD4⁺ ist.

Um das Bild der TCR-Kettenexpression durch die TCR- α -Kette zu vervollständigen, wurden die Zellen mit einem Antikörper gefärbt, der ein Framework-Epitop erkennt, eine Region, die sich nur bildet wenn V α - und V β -Segmente gepaart vorliegen.

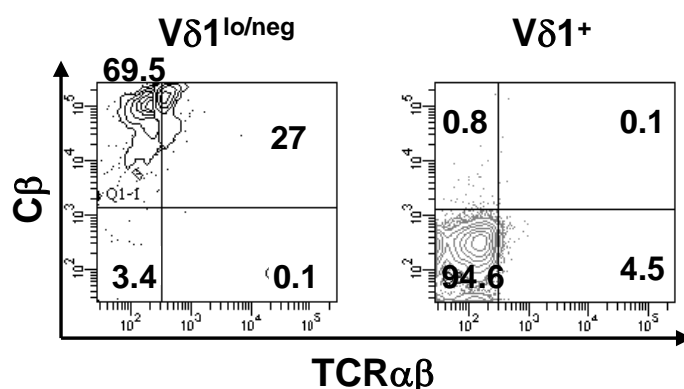


Abbildung 6 TCR- $\alpha\beta$ ⁺ Zellen in V δ 1^{lo/neg} und V δ 1⁺ Populationen eines V δ 1 CD4⁺ T-Zell Klon. Repräsentative Darstellung eines Klon von sieben analysierten. Zahlen geben die Prozente der entsprechenden Gates an.

Hierbei ist zu sehen, dass ein Großteil der V δ 1^{lo/neg} Zellen zwar eine TCR- β -Kette exprimieren, dies aber nicht in allen Fällen mit einer Expression einer TCR- α -Kette einhergeht. V δ 1⁺-Zellen exprimieren auch in diesem Ansatz keinerlei $\alpha\beta$ -TCR-Ketten.

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass der Prozess der extrathymischen T-Zell-Reifung aus V δ 1-Zellen bezüglich der TCR-Ketten-Expression ähnlich dem im Thymus von

Statten geht. Aufgrund der fehlenden TCR- γ -Kette kommt es hierbei zu einer Heterodimisierung der V δ 1- mit einer TCR- β -Kette, dessen Vorkommen bei der leukämischen Zelllinie DND41 beschrieben wurde (98). Da die V δ 1-Ketten des hier beschriebenen Progenitors wie wir zeigen konnten semiinvariant sind (V δ 1 D2/3 J1), kann das V δ 1/V β -Konstrukt als Äquivalent, bzw. Surrogat des thymischen preTCR angesehen werden, der ebenso wie die V δ 1^{lo/neg} Zellen eine verglichen zu reifen $\alpha\beta$ -T-Zellen stark verringerte Oberflächenexpression aufweist. Erst danach kommt es zur Rekombination einer TCR- α -Kette und bei Erfolg zur Expression eines $\alpha\beta$ -TCR.

Ein weiteres Augenmerk dieser Arbeit war die Beleuchtung dieses *in vitro* nachgewiesenen Vorgangs *in vivo*. Hierfür wurde das Vorkommen der V δ 1⁺CD4⁺-Progenitorpopulationen im Blut Gesunder und in entzündetem Gewebe adulter Menschen untersucht. Neben dem Blut von Probanden, die zum Zeitpunkt der Untersuchung mit viralen Infekten zu kämpfen hatten, wurden auch Flüssigkeiten entzündeter Gewebe, beispielsweise Synovialflüssigkeiten arthrosebelasteter Patienten, auf V δ 1-Populationen hin untersucht. Dies sollte die Bedeutung der Inflammation als mögliche treibende Kraft der Transdifferenzierung hervorheben, dessen Vorkommen wir schon *in vitro* in V δ 1-T-Zellen nachweisen konnten.

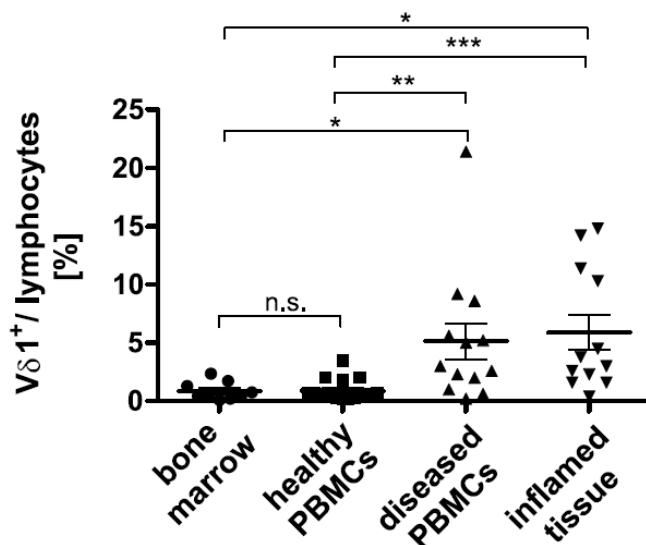


Abbildung 7: Prozentzahlen des Anteils von V δ 1⁺ T-Zellen an den Lymphozyten in Knochenmark (n=9), sowie Peripherblut gesunder (n=17) und erkrankter (n=13) Probanden, sowie entzündeter Gewebsflüssigkeiten (n=12). (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001)

In Abbildung 7 ist ein deutlicher und signifikanter Anstieg der V δ 1-Zellen in Populationen aus inflammatorisch geprägtem Milieu im Vergleich zu Knochenmark und zu PBMCs gesunder Probanden zu erkennen. Der Anteil der V δ 1-Zellen beläuft

sich hierbei bei PBMCs erkrankter Probanden im selben Bereich wie bei den entzündeten Gewebeflüssigkeiten.

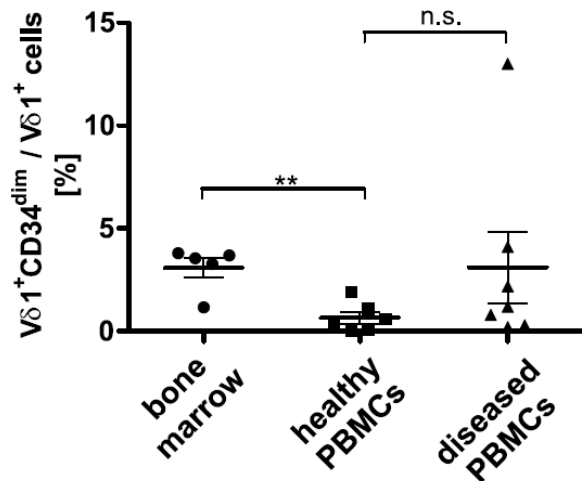


Abbildung 8 Prozentwerte von $V\delta 1^+$ $CD34^{dim}$ T-Zellen innerhalb der Gesamtheit der $V\delta 1^+$ Lymphozyten im Peripherblut gesunder (n=6) und erkrankter (n=7) Probanden, sowie gesundem Knochenmark (n=5). (**p<0,01)

An anderer Stelle der Publikation wurde gezeigt, dass die $V\delta 1$ -Progenitorpopulation $CD34$ schwach auf ihrer Oberfläche exprimiert. Daher wurde der Anteil der $V\delta 1$ -Zellen, die diesen Stammzellmarker aufweisen, ebenfalls *in vivo* im Vergleich von Knochenmark und PBMCs gesunder sowie erkrankter Probanden untersucht. Auch hier lässt sich ein Anstieg des Anteils in den PBMCs erkrankter Probanden erkennen, dieser war allerdings nicht signifikant. Bemerkenswert in diesem Zusammenhang ist auch, dass sich das prozentuale Niveau der $CD34$ -exprimierenden Zellen innerhalb der $V\delta 1$ -Population während einer Krankheit in der Peripherie jenem des Knochenmarks, dem Hort der hämatopoetischen Stammzellen, angleicht. Das spricht für eine Mobilisation solcher Zellen aus dem Mark in die Peripherie.

Diese *ex vivo* Erkenntnisse passen in das Bild, das vorangegangene *in vitro* Versuche bezüglich des Einflusses der Inflammation auf die Transdifferenzierung zeichnete. Hierbei wurde festgestellt, dass ein inflammatorisches Milieu die Vervielfachung von $V\delta 1^+$ -T-Zellen begünstigt, nicht jedoch deren Transdifferenzierung. Der deutliche Anstieg sowohl der Gesamtpopulation der $V\delta 1^+$ T-Zellen als auch der $CD34$ -exprimierenden Zellen innerhalb dieser bestätigt dies *in vivo*. Die Nivellierung des Anteils peripherer $CD34^+$ $V\delta 1^+$ T-Zellen auf das Niveau im Knochenmark während einer Krankheit lässt vermuten, dass es hierbei zu einer gezielten Ausschüttung der

Progenitorzellen aus dem Knochenmark kommt und unterstreicht den möglichen Einfluss einer Entzündung auf den Transdifferenzierungsprozess *in vivo*.

Da ein wichtiger Bestandteil der Transdifferenzierung der Verlust der TCR- γ -Kette darstellt, wurde deren Expression *in vivo* im Knochenmark, sowie im Blut gesunder und leicht erkrankter Probanden untersucht und mit der von $V\delta 2^+$ T-Zellen, die keine Transdifferenzierung durchlaufen, verglichen.

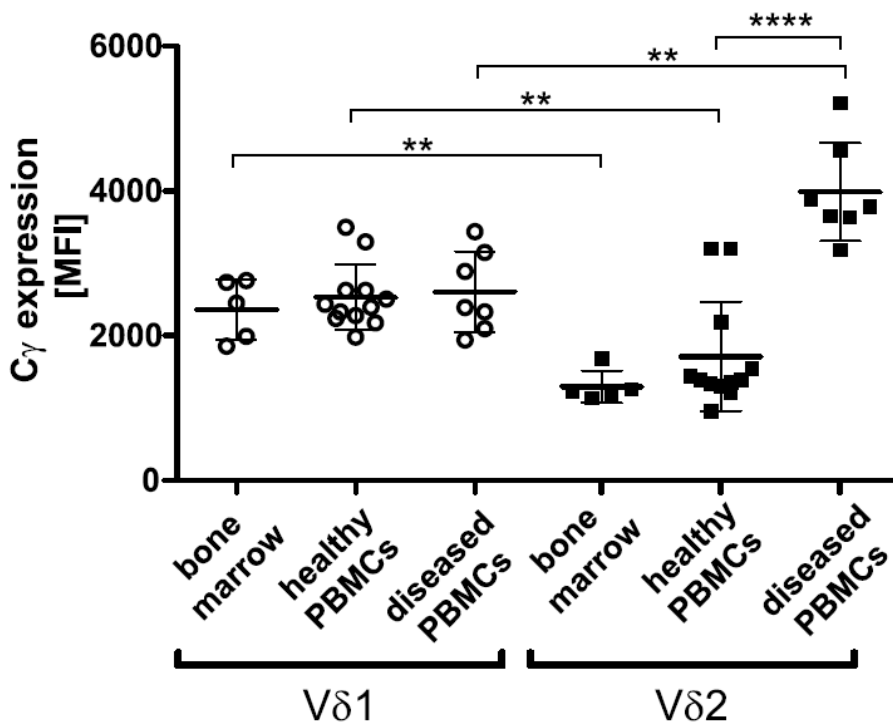


Abbildung 9 Expressionslevel (MFI) der TCR γ -Kette auf $V\delta 1^+$ und $V\delta 2^+$ Zellen in Knochenmark (n=5), sowie im Peripherblut gesunder (n=12) und erkrankter Probanden (n=5). (**p<0,01; ****p<0,0001).

Interessanterweise ist die Expression der TCR- γ -Kette im Knochenmark sowie unter nicht inflammatorischen Bedingungen in $V\delta 1^+$ T-Zellen signifikant höher als in $V\delta 2^+$ T-Zellen. Dieses Verhältnis kehrt sich allerdings im Laufe einer Infektion und einhergehender Entzündungsreaktion um. Dies wird durch eine massive Erhöhung der C γ -Expression in $V\delta 2$ -T-Zellen erreicht, während bei $V\delta 1$ -T-Zellen hingegen die Expressionshöhe ungeachtet der Gesundheitslage des Probanden auf demselben Niveau verbleibt.

Aufgrund des oben erwähnten Anstiegs der $V\delta 1$ -Gesamtpopulation sowohl in den PBMCs erkrankter Probanden, als auch in unmittelbar von einer Entzündung

betroffenen Geweben, ist eine Nicht-Beteiligung der V δ 1-T-Zellen in der Entzündungsreaktion als Grund für die konstante Expression der TCR- γ -Kette nicht plausibel. Vielmehr lässt die in Relation auffallend niedrige Expression der TCR- γ -Kette bei V δ 1⁺ T-Zellen den Schluss zu, dass ihre Aufgabe während der Immunreaktion weniger mit ihrem originären TCR, sondern eher mit der Transdifferenzierung zusammenhängt. Wie oben beschrieben wird zu Beginn des Transdifferenzierungsprozesses nämlich die Expression der TCR- γ -Kette weiter verringert, um die Paarung von V δ 1 mit der zeitgleich neu generierten TCR- β -Kette zu gewähren.

Falls diese Annahme stimmt, sollten die Zwischenprodukte der Transdifferenzierung auch *in vivo* nachgewiesen werden können. Tatsächlich ist es uns im Zuge unserer Arbeiten zu dieser Publikation gelungen, solche Intermediate in entzündetem Gewebe innerhalb der V δ 1-Population nachzuweisen und näher zu untersuchen.

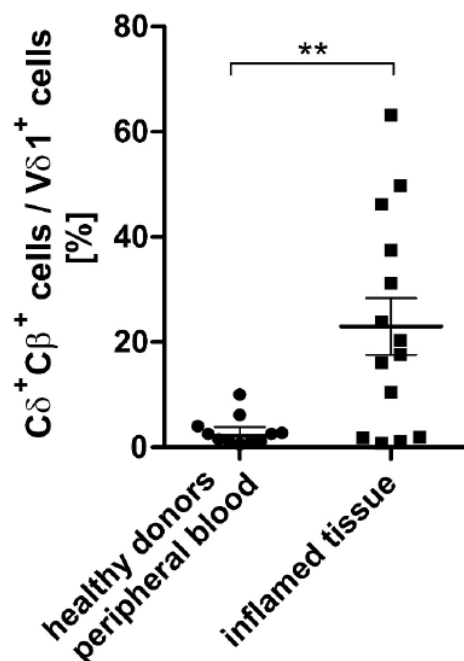


Abbildung 10 Prozentzahlen von C β ⁺C δ ⁺ Zellen in der Peripherie gesunder Spender (n=11) und Flüssigkeit entzündeter Gewebe (n=14). (**p<0,01)

Die analysierten Probenflüssigkeiten stellten Exsudate aus der Synovialflüssigkeit punktierter, von Arthrose betroffener Knie, tumorassoziertem Aszites sowie von Pleuraergüssen dar. In solch inflammatorischen Umgebungen sind hoch signifikant mehr C β C δ -TCR-Intermediate nachzuweisen als im Blut gesunder Probanden. Man sieht also, dass in einer Vielzahl von Erkrankungen und Milieus die Zwischenstufe von

V δ 1- hin zu $\alpha\beta$ -T-Zellen nachgewiesen werden kann und die Transdifferenzierung somit Teil der Immunreaktion *in vivo* in unterschiedlichen Geweben ist.

Durch die von uns postulierten Transdifferenzierungsprozesse sollten in der Peripherie während der Rekombination nicht nur C β C δ ⁺-TCR-Intermediate auf den Zellen nachzuweisen sein, sondern diese im Umkehrschluss sowohl keine TCR- γ Expression mehr aufweisen – diese wurde durch eine funktionale TCR- β -Kette ersetzt – als auch noch keinen kompletten TCR $\alpha\beta$ -TCR aufweisen können. Dies sollte der Fall sein, wenn es auch bei der extrathymischen Transdifferenzierung zu einer Rekombination der TCR- α -Kette nach der TCR- β -Kette kommt. In der Tat konnten wir durch simultanen Nachweis eines TCR $\alpha\beta$ -Framework-Epitops zusammen mit einem TCR- γ -bindenden Antikörper, genau solche für diese Oberflächenmoleküle doppeltnegative Zellen *ex vivo* verstärkt in der Peripherie erkrankter Probanden nachweisen. Die Annahme einer inflammationsgesteuerten Generierung von V δ 1⁺ CD4⁺ Zellen als Ausgangspopulation für eine kompensatorische Generierung von $\alpha\beta$ -T-Zellen nach konsumierenden Infektionen ist naheliegend und wahrscheinlich.

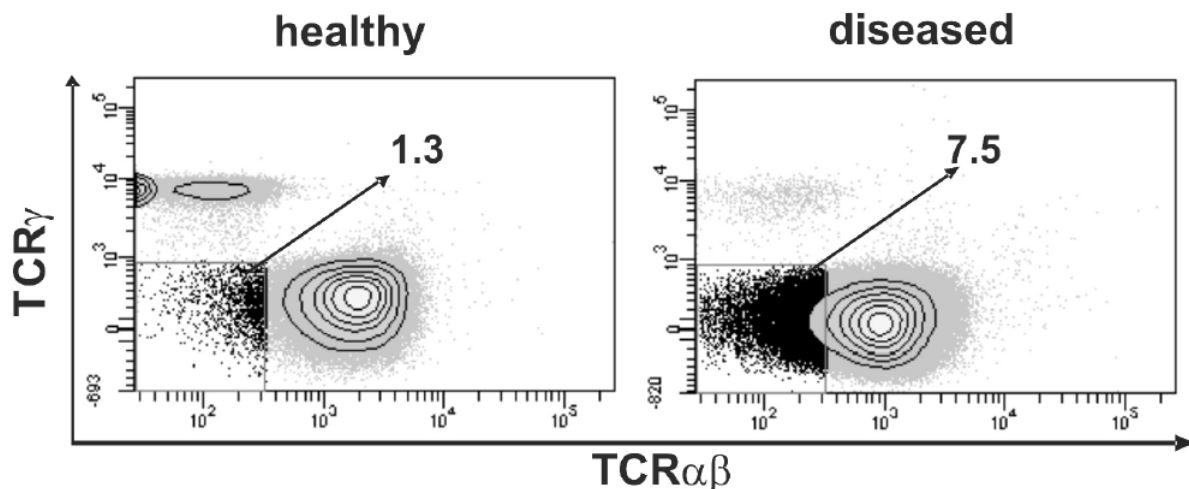


Abbildung 11 Färbung der TCR- γ -Kette und eines TCR $\alpha\beta$ von CD3⁺ Zellen in gesunden und erkrankten Probanden. Schwarz gefärbt sind die CD3⁺ TCR- γ ⁻ TCR $\alpha\beta$ ⁺ Zellen. Ein exemplarisches FACS Contour Blot wird gezeigt, dies ist repräsentativ für n=11 gesunde und n=4 erkrankte Probanden.

Die Prozesse, die eine Umlagerung der TCR- α -Kette und eine Transdifferenzierung von V δ 1⁺ CD4⁺ T-Zellen erlauben, sind jedoch nach wie vor unklar. Die molekularbiologische Analyse der neu generierten $\alpha\beta$ TCRs nach Abschluss der Transdifferenzierung kann nur das Ergebnis eines erfolgreichen Neuarrangements der Gene nachweisen, nicht jedoch was diese initiiert und letztlich zur erfolgreichen Bildung eines $\alpha\beta$ TCR führt. Was wichtig zu vermerken ist, ist, dass die Generierung der neuen TCRs nicht gerichtet, sondern zufällig erfolgt, sodass auch autoimmun-

reaktive TCRs gebildet werden können aufgrund fehlender zentraler Toleranzmechanismen im Zuge ihrer Entstehung.

Um die Bedeutung der Transdifferenzierung bei inflammatorischen Bedingungen weiter zu verdeutlichen, verglichen wir neben entzündeten Geweben auch die TCR- β -Expression zwischen Blut von gesunden und erkrankten Probanden. Hierbei lag das Augenmerk darauf, die TCR- β^+ V δ 1 $^+$ T-Zellen auf die Variabilität der exprimierten TCR- β -Ketten hin zu untersuchen, weswegen Antikörper gegenüber konstante Regionen verschiedener V-Segmente verwendet wurden.

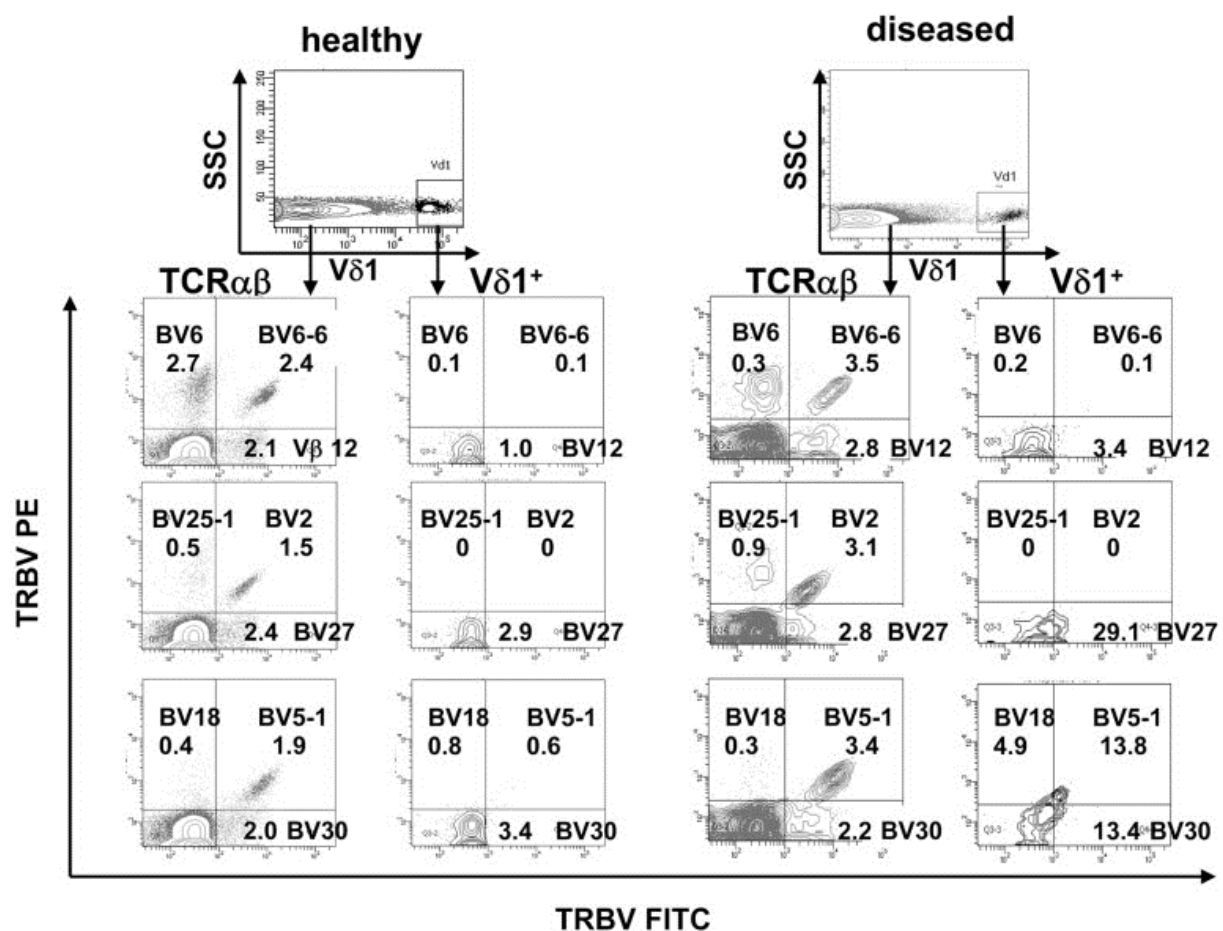


Abbildung 12: FACS Contour Blots der Färbung von V β -Ketten auf $\alpha\beta$ -T-Zellen und V δ 1-T-Zellen in PBMCs eines gesunden (links) und eines erkrankten (rechts) Probanden. Exemplarisch werden neun verschiedene V β -Familien gezeigt. Werte entsprechen der Prozentzahl der gateden Zellen.

In Abbildung 12 ist die Gating-Strategie für eine solche Expressionsanalyse beispielhaft für einige V β -Färbungen dargestellt. Zum Vergleich der Expressionshöhe wurden auch V δ 1 $^-$ PBMCs, die die Gesamtheit der peripheren $\alpha\beta$ -T-Zellen beinhalten, abgebildet. Man erkennt, dass bis auf eine vereinzelte niederprozentige und sehr schwache Expression, keine V β -Segmente auf der Oberfläche von V δ 1 $^+$ T-Zellen gesunder Probanden zu finden sind. Dies ändert sich, wenn man die PBMCs eines

kranken Individuums betrachtet. Hier erkennt man eine ähnliche Erhöhung des Anteils von $V\beta^+ V\delta 1^+$ Zellen wie im entzündeten Gewebe, ein weiterer Beweis für die Validität der Ergebnisse. Nimmt man alle untersuchten $V\beta$ -Ketten zusammen, ergibt sich eine signifikante Erhöhung der β -Ketten-Expression in den $V\delta 1$ -Populationen erkrankter Probanden (Abbildung 12).

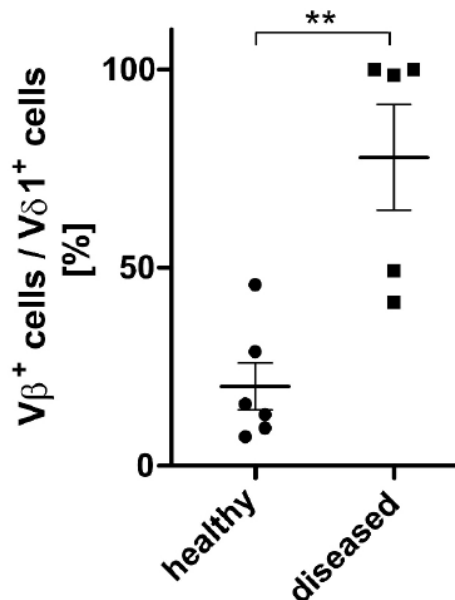


Abbildung 13 Prozente an $V\beta^+ V\delta 1^+$ T-Zellen im Blut im Vergleich zwischen gesunden (n=6) und erkrankten (n=5) Probanden (* p<0,05).

Auffallend ist die massive Expression einiger weniger TCR- β -Ketten, die in Abbildung 12 in der Nomenklatur ihrer Gensegmente aufgelistet sind. Gerade die stark erhöhte Expression von TRBV30 lässt Rückschlüsse auf den molekularbiologischen Prozess während der Transdifferenzierung zu. Es ist bekannt, dass TRBV30 das einzige Segment ist, welches außerhalb des Hauptbereiches der TRBV-Segmente im Genom liegt und eine den anderen Segmenten entgegengesetzte transkriptionelle Orientierung hat. Dies hat zur Folge, dass ein Rearrangement der TRBV30-Kette den Locus für die restlichen TRBV-Segmente öffnet, und zudem kein Herausschneiden der weiteren Segmente bedingt. Dadurch kann nach einem Rearrangement mit TRBV30 noch eine weitere β -Kette bestehend aus einem anderen TRBV-Segment generiert werden. Die Prävalenz der TRBV30-Kette auf der Oberfläche der transdifferenzierenden $V\delta 1$ -T-Zellen, deren Expression an anderer Stelle der Publikation auch molekularbiologisch in *in vitro* Versuchen beschrieben wurde, deutet auf eine Funktion von TRBV30 als Wegbereiter in der Öffnung der TCR-Ketten-Loci für weitere Rekombinationen hin – ähnlich zur thymischen Differenzierung der $\alpha\beta$ -T-Zellen. Gleichzeitig zeigen die Untersuchungen auch, dass die neu generierten $\alpha\beta$ -T-

Zellen eine Variabilität in den TCRs aufweisen, dies also kein gerichteter, sondern ein ergebnisoffener Prozess ist.

Zusammenfassend können die einzelnen, in dieser Arbeit nachgewiesenen Phasen der Transdifferenzierung folgendermaßen beschrieben werden: Der Beginn des Prozesses lässt sich anhand der Herunterregulation des originären $\gamma\delta$ -TCRs feststellen. Hierbei wird die Expression der TCR- γ -Kette komplett zu Gunsten einer neu generierten $V\beta$ -Kette aufgegeben, wobei anfänglich, allem Anschein nach zur Öffnung des Locus, das TRBV30-Segment dominiert und im weiteren Verlauf durch eine neu rekombinierte $V\beta$ -Kette bestehend aus einem anderem TRBV-Segment ersetzt wird. Dadurch bildet sich als Äquivalent des thymischen preTCRs ein $V\delta 1/V\beta$ -TCR aus und es kommt zur nachfolgenden Umlagerung der TCR- α -Kette und damit zur Generierung einer $\alpha\beta$ -T-Zelle mit einem komplett neu arrangierten TCR. Während dieses Prozesses ähnelt die Korezeptorexpression der Zellen bezüglich der DP- und SP-Stadien stark derer im Thymus und resultiert wie auch dort vornehmlich in SP $CD4^+$ oder $CD8^+$ $\alpha\beta$ -T-Zellen

Die Ergebnisse zeigen, dass eine extrathymische T-Zellreifung durch $V\delta 1^+$ Vorläuferzellen hin zu $\alpha\beta$ -T-Zellen *in vivo* in einem inflammatorischen Milieu stattfinden kann. Gerade in Erwachsenen ist dies aufgrund des Verkümmerns des Thymus nach der Pubertät von herausragender Bedeutung, da die Transdifferenzierung als Quelle von $\alpha\beta$ -T-Zellen mit gänzlich neuen TCR-Spezifitäten dienen kann, die für die Bekämpfung von bis dato unbekanntem Pathogenen benötigt werden. Das Vorhandensein der $V\delta 1V\gamma 9$ -Vorläuferzellen im peripheren Blut und deren Expression von Chemokinrezeptoren, die ein Homing in entzündetes Gewebe ermöglichen, wie an anderer Stelle in dieser Publikation gezeigt, begünstigt eine schnelle Aktivität der Zellen am Entzündungsherd. So können direkt an Ort und Stelle neue $\alpha\beta$ TCR-Kombinationen entstehen, selbst nachdem der Thymus verkümmert ist. Dies konnten wir *ex vivo* anhand der Intermediate der Transdifferenzierung zeigen und kann eventuell die offene Frage beantworten, wie Menschen auch im hohen Alter auf Krankheitserreger reagieren können, denen sie bisher noch nicht begegnet waren.

Allerdings könnte diese rapide Generation von neuen $\alpha\beta$ -T-Zellen auch eine Schattenseite haben. Wie eingangs beschrieben, erfüllt der Thymus enorm wichtige Selektionsaufgaben, die am Ort einer Infektion nicht anzutreffen sind. Dass dennoch Vorläuferzellen von T-Zellen in den Tonsillen, Knochenmark oder Nabelschnurblut zu

finden sind und Potential haben, zu $\alpha\beta$ -T-Zellen auszureifen, ist bekannt. Es ist denkbar, dass die un- oder nur wenig restringierte Bildung von $\alpha\beta$ -T-Zellen außerhalb des Thymus die Entstehung von autoreaktiven Immunzellen und damit das Aufflammen von Autoimmunerkrankungen begünstigt. Eine Korrelation zwischen solchen und chronischen Entzündungen im Vorfeld wurde schon publiziert (99) und könnte durch die Transdifferenzierung zumindest teilweise erklärt werden.

Darüber hinaus stellt die Erkenntnis, dass Zellen, die dem angeborenen Immunsystem zugerechnet werden, als Vorläufer für die höchst spezifische adaptive Immunantwort fungieren können, eine bis dato unbekannt Verknüpfung der beiden Systeme dar und könnte einen Paradigmenwechsel in der Forschung zu $\gamma\delta$ -T-Zellen wie auch zu Immunreaktionen im Allgemeinen einläuten. Eine Folgerung wäre auch, dass die Inflammation als „der Thymus des Erwachsenen“ fungieren könnte.

7.3 Selective, efficient modulation of activated CD4+ $\alpha\beta$ T cells by the novel humanized antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR targeting human $\alpha\beta$ TCR.

In dieser Publikation wurde der Effekt des Antikörpers GZ- $\alpha\beta$ TCR auf verschiedene T-Zell-Subtypen untersucht. GZ- $\alpha\beta$ TCR ist die humanisierte Form des schon etablierten Antikörpers BMA031 (100), der spezifisch die β -Kette des $\alpha\beta$ TCR an seiner konstanten C-Region bindet. Die Eigenschaften und mögliche Einsatzgebiete der humanisierten Variante galt es im Rahmen dieser und der in 7.4 beschriebenen Studie zu untersuchen.

Bei *in vitro* Versuchen in PBMC-Kulturen wurde festgestellt, dass der Antikörper eine apoptotische Wirkung vor allem auf solche $\alpha\beta$ -T-Zellen hat, die zum Beispiel durch eine CD3/CD28-Kostimulation aktiviert wurden. Ruhende T-Zellen hingegen wurden in einem signifikant geringeren Maße beeinträchtigt. Dies wurde anhand von FACS-Färbungen mit Annexin V gezeigt, einem Protein, das an Phosphatidylserin bindet. Phosphatidylserin wird bei apoptotischen Zellen auch an der Außenfläche der Zellen exprimiert und dient somit als extrazellulärer Marker für den induzierten Zelltod.

Die Wirkung des Antikörpers beschränkte sich hierbei ausschließlich auf die Induktion der Apoptose, einen Einfluss auf Proliferation oder proinflammatorische Zytokinproduktion konnte ebenfalls durch FACS-Färbungen ausgeschlossen werden.

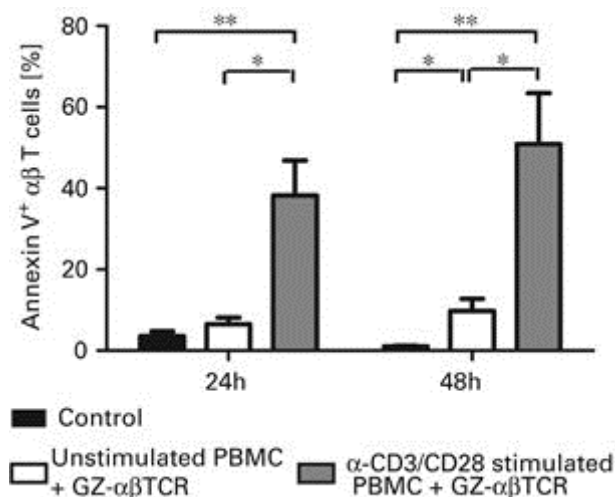


Abbildung 14 Prozentwerte der noch lebenden Annexin V⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen in PBMC-Kulturen (jeweils n=3). (*p<0,05; **p<0,01).

Nachdem wir klären konnten, wie GZ- $\alpha\beta$ TCR auf Zellen wirkt, war nun zu schauen, auf welche T-Zell-Populationen der Antikörper explizit Einfluss nimmt. In der Tat konnten wir bei der Analyse der einzelnen T-Zell-Memory-Populationen erkennen,

dass es zu einer sichtbaren Reduktion von naiven T-Zellen in Kulturen mit GZ- $\alpha\beta$ TCR kam, wenn es zu einer simultanen Aktivierung der Zellen kam. Wurden die Zellen dagegen nicht aktiviert, konnte keine Depletion des nativen Kompartiments festgestellt werden. Grundsätzlich wurden die Prozentzahlen der CD45RA⁻CD27⁺CD62L⁺ *central memory* (T_{CM}), CD45RA⁻CD27⁻CD62L⁺ *effector memory* (T_{EM}) und CD45RA⁺CD27⁻CD62L⁻ *effector memory RA* (T_{EMRA}) Kompartimente im Gegensatz zur naiven Fraktion durch GZ- $\alpha\beta$ TCR nicht verringert.

Auch $\gamma\delta$ -T-Zellen wurden durch GZ- $\alpha\beta$ TCR nicht in Mitleidenschaft gezogen; ihr Anteil an den PBMCs stieg in GZ- $\alpha\beta$ TCR-Kulturen an, was als kompensatorischer Effekt nach Apoptose der $\alpha\beta$ -T-Zellen zu erklären ist.

Da während einer GvHD naive $\alpha\beta$ -T-Zellen durch Empfänger-APCs mit Hilfe von körpereigenen Strukturen aktiviert werden, ist gerade die Depletion dieser aktivierten Zellen von Belang um eine GvHD einzudämmen. Die Spezifität von GZ- $\alpha\beta$ TCR auf solche Zellen, ohne dass ruhende oder bei einer GvHD nicht beteiligte Immunzellen ebenfalls depletiert werden, könnte einen entscheidenden Beitrag zu einer auf die Bedürfnisse von Patienten, die auf eine Stammzelltransplantation angewiesen sind, zugeschnittenen Behandlung leisten.

Um die Spezifität des Antikörpers tatsächlich in einer GvHD-Umgebung zu testen, wurde ein Mausmodell etabliert, bei dem humane PBMCs in NOD-*scidIL2ry^{null}* Mäuse injiziert wurden. Die humanen Zellen verursachen ohne Behandlung mit GvHD-limitierenden Agenzien in diesen Mäusen innerhalb von 10 Tagen eine schwere akute GvHD. Wir konnten zeigen, dass Tiere, die drei Wochen nach Transplantation mit humanen PBSCs eine einmalige Gabe von GZ- $\alpha\beta$ TCR erhielten, innerhalb von drei Tagen eine signifikante Reduktion von CD45⁺ Zellen im Peripherblut aufwiesen. Bei genauerer Betrachtung der Zellen zeigte sich eine signifikante Reduktion ausschließlich von CD4⁺ $\alpha\beta$ -T-Zellen, währenddessen der Anteil an $\gamma\delta$ -T-Zellen sowie CD8⁺ T-Zellen anstieg. Wie auch schon *in vitro* gezeigt, modifizierte der Antikörper vor allem die naive T-Zell-Population und ließ andere Gedächtnispopulationen unberührt. Dies lässt darauf schließen, dass naive T-Zellen, im Zuge der Aktivierung durch das Primen depletiert wurden und dadurch ein Einsetzen der GvHD unterbunden werden konnte.

Dieser Effekt war jedoch transienter Natur, der 6 Tage nach einmaliger Antikörpergabe nicht mehr festzustellen war. Daher wurde in einer separaten Kohorte eine wiederholte Injektion GZ- $\alpha\beta$ TCR drei Tage nach der ersten Injektion durchgeführt. Die Analysen des Peripherbluts, der Milz und des Knochenmarks an Tag 6 bestätigten, dass eine repetitive Gabe des Antikörpers seine depletierende Wirkung auf die alloreaktive Zellpopulation weiter anhalten lässt. Hierbei war sowohl die Reduktion der CD45⁺- und CD4⁺-, als auch die Erhöhung der $\gamma\delta$ -T-Zellpopulation an Tag 6 des Versuchs signifikant zur Kontrolle, während die CD8⁺-Population konstant blieb. Auffallend war hier, dass die CD45⁺-Gesamtpopulation, sowie die CD4⁺-Zellen innerhalb dieser, nur in der Peripherie depletiert wurden, nicht aber im Knochenmark der Mäuse.

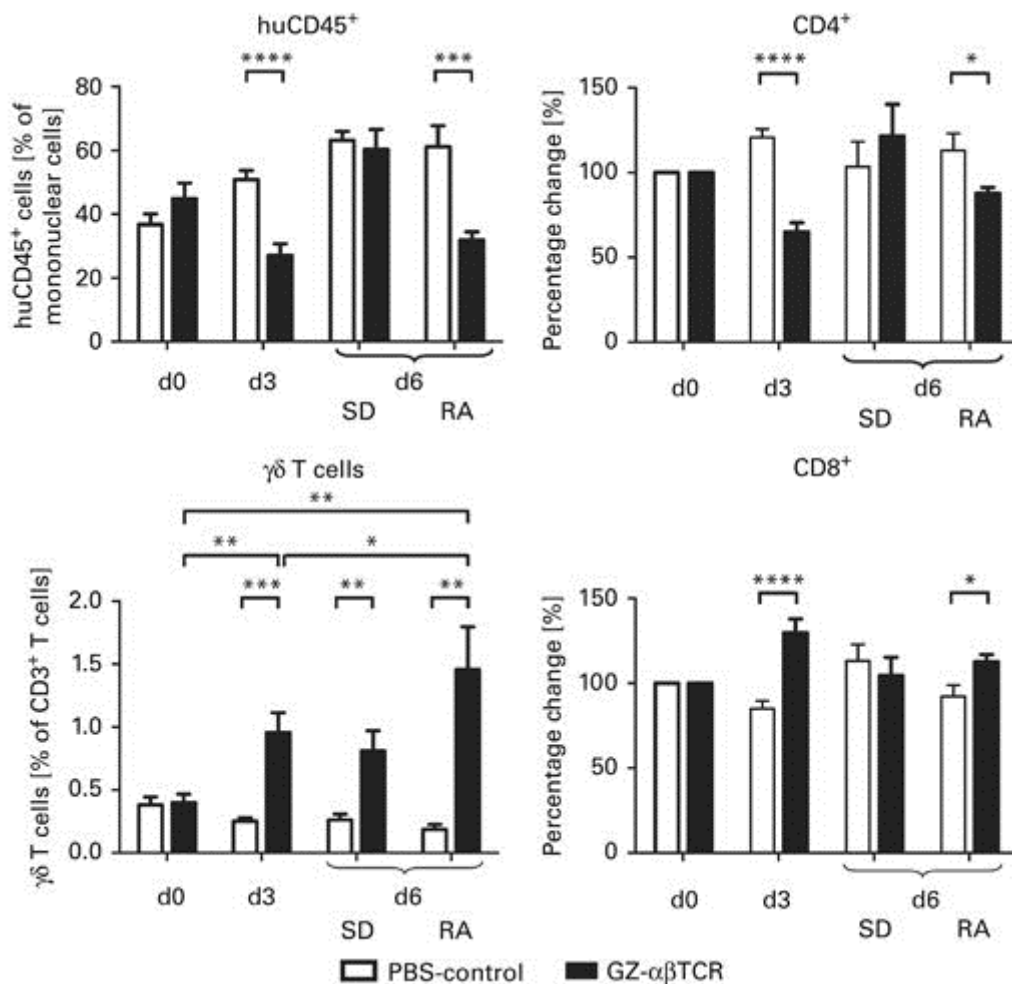


Abbildung 15 Analyse der Prozentsätze humaner CD45⁺CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ und $\gamma\delta$ -T-Zellen an Tag 0 (n=18), an Tag 3 (n=17) nach Behandlung mit GZ- $\alpha\beta$ TCR, sowie an Tag 6 nach Behandlung mit einer Einzeldosis GZ- $\alpha\beta$ TCR (single-dose, SD, n=9) oder wiederholter Gabe des Antikörpers (repetitive application, RA, n=9). Anteil an CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen an Tag 0 wurde als 100% definiert und die Änderungen diesbezüglich analysiert. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001)

Um mögliche xenogene Effekte der GvHD auszuschließen, die durch die Abwesenheit anderer hämatopoetischen Zelltypen in den Versuchstieren auftreten könnten, wurden

GZ- $\alpha\beta$ TCR ebenfalls in Tieren untersucht, denen zuvor humane CD34⁺ Stammzellen transplantiert wurden. Dadurch entwickelte sich ein komplett humanes hämatopoetisches System in den Mäusen. Auch hier wirkte GZ- $\alpha\beta$ TCR nach Etablierung einer humanen Hämatopoese in Abwesenheit eines Thymus wie schon im GvHD-Modell beobachtet mit einer Reduktion von CD4⁺ T-Zellen.

Diese Ergebnisse zeigen auf, dass GZ- $\alpha\beta$ TCR spezifisch in einer GvHD-induzierenden Umgebung aktivierte T-Zellen depletieren konnte, ohne dass breitbändig das Immunsystem, d.h. ruhende $\alpha\beta$ - und $\gamma\delta$ -T-Zellen in Mitleidenschaft gezogen wurden. Der Antikörper wurde von den Versuchstieren gut vertragen und es kam sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu keinem messbaren Zytokinsturm, was einen therapeutischen Einsatz des Antikörpers potentiell ermöglicht. Daher legten wir in einer zweiten Forschungsarbeit den Fokus auf die Optimierung der Therapie und einer möglichen Prophylaxe zur Nichtinitiation einer GvHD durch GZ- $\alpha\beta$ TCR.

7.4 Preemptive administration of human $\alpha\beta$ T cell receptor-targeting monoclonal antibody GZ- $\alpha\beta$ TCR potently abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo

In dieser Studie nutzten wir dasselbe Mausmodell, das in 7.3 beschrieben wurde. Im Gegensatz zur Vorstudie wurde das Augenmerk hier auf eine langfristige Therapie der GvHD gelegt. Dabei wurde zwischen einer Induktionstherapie, die eine dreimalige Gabe von GZ- $\alpha\beta$ TCR post Transplantation vorsah, sowie einer Erhaltungstherapie, die zusätzlich zur Induktionstherapie weitere Gaben alle 5 Tage bis zum Erreichen von vorher definierten Endkriterien einer GvHD beinhaltete (maximal 100 Tage), unterschieden. Zudem wurde zur Dosisoptimierung mit zwei unterschiedlichen Mengen (20 μ g oder 100 μ g) GZ- $\alpha\beta$ TCR therapiert

Beide Therapieformen erzielten eine signifikante Verbesserung des GvHD-Grades, der aus einer Kombination verschiedener Parameter, namentlich Gewichtsverlust, Zustand des Fells, Mobilität und der allgemeinen Verfassung der Versuchstiere ermittelt wurde. Außerdem überlebten die therapierten Mäuse signifikant länger (s. Abbildung 16), mussten aber schlussendlich nach Erreichen von Endpunktkriterien getötet werden.

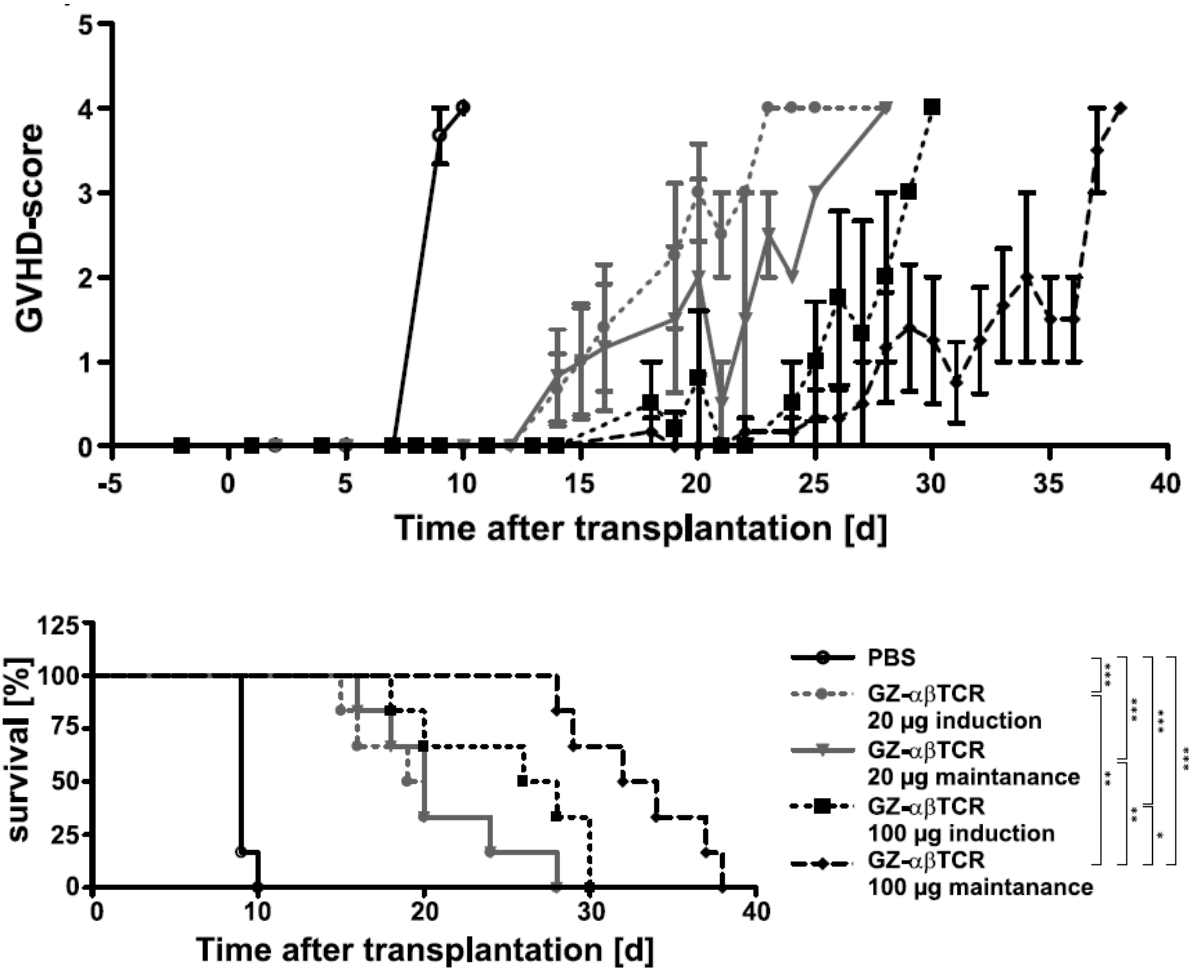


Abbildung 16 Oben: Darstellung des GvHD-Wertes über die Zeit bei den einzelnen Behandlungsschritten. Unten: Überlebenskurven der Mäuse nach Kaplan-Meier; n=6 Mäuse/Behandlung. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$)

Statistische Unterschiede in der Verfassung oder dem Überleben der Mäuse konnten zwischen den beiden Therapieformen nicht ausgemacht werden. Die Erhöhung der Antikörperdosis bewirkte zwar eine Protrahierung der GvHD, konnte eine GvHD an sich aber nicht verhindern.

Daher wurde eine der Transplantation vorangestellte Antikörpergabe untersucht, um eine Aktivierung der alloreaktiven, naiven $\alpha\beta$ -T-Zellen schon im Keim zu ersticken. Dies zeigte sich überaus effektiv, sodass die Versuchstiere entweder gar keine GvHD entwickelten, oder das Einsetzen dieser weiter verzögert wurde. Im Vergleich zum etablierten pan-T-Zell-depletierenden Thymoglobulin war das Überleben der Mäuse nicht signifikant unterschiedlich, auch wenn zwei der Versuchsmäuse zu einem späten Zeitpunkt eine GvHD entwickelten und noch vor vordefinierten Versuchsende von 100 Tagen getötet werden mussten.

Dies zeigt eindrücklich, dass GZ- $\alpha\beta$ TCR ein potentes Mittel zur Verhinderung einer GvHD sein kann, nämlich dann, wenn es präemptiv, also vor dem Primen naiver T-Zellen im Rezipienten, die Entwicklung der GvHD blockiert. Ist die GvHD einmal entstanden, kann sie zwar protrahiert aber nicht verhindert werden.

Auch in dieser Studie bestätigte sich der in der vorhergehenden Studie gezeigten Einfluss von GZ- $\alpha\beta$ TCR auf die T-Zellpopulationen, die sowohl im peripheren Blut als auch in der Milz in Mäusen nach deren Tötung untersucht wurden (s. Abbildung 17).

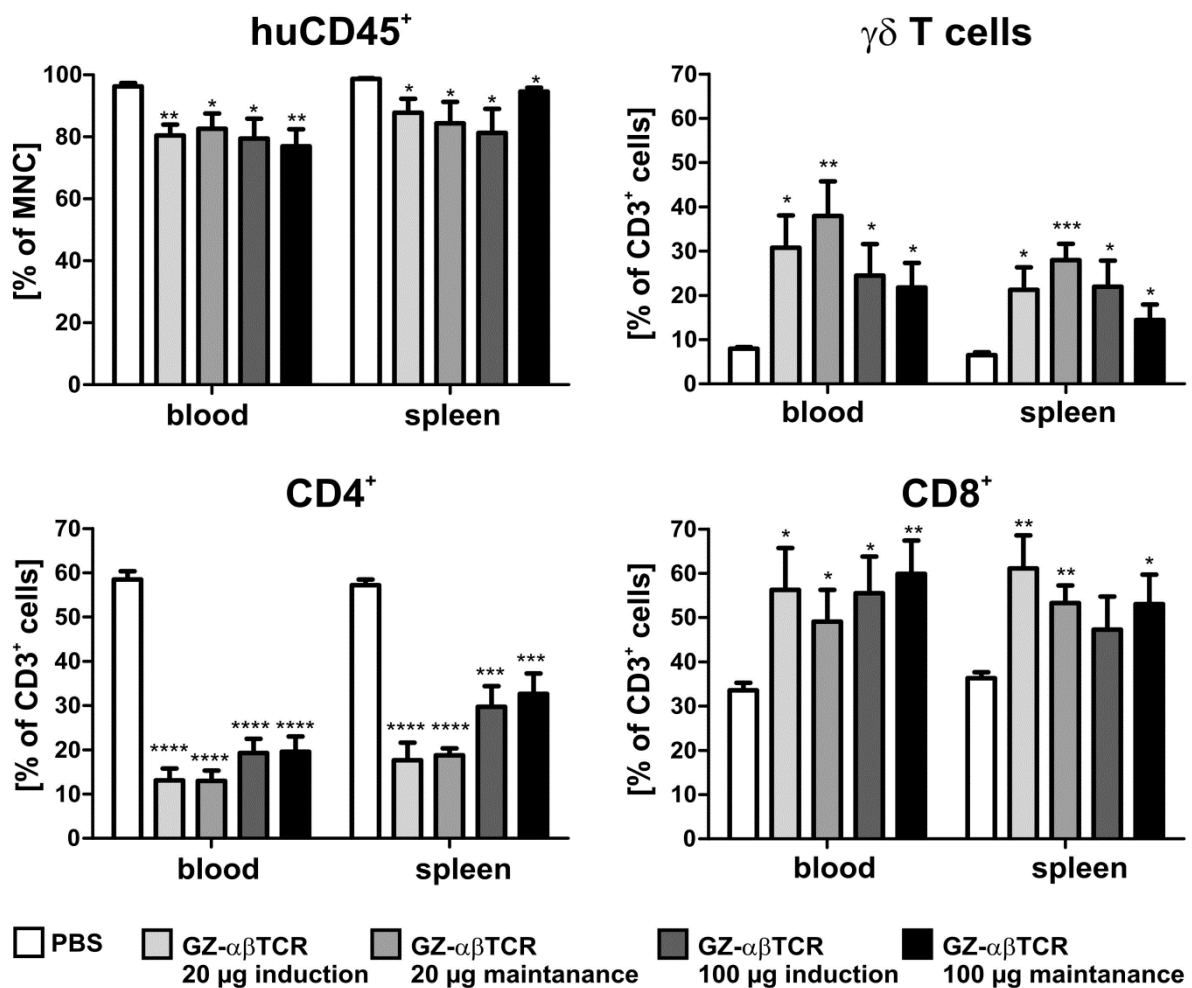


Abbildung 17 Prozentwerte humaner CD45⁺ Zellen in der mononukleären Fraktion von Blut und Milz der Versuchsmäuse nach Behandlung. Die Prozen-te der $\gamma\delta$ -, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sind im Bezug auf die humanen CD3⁺ Zellen angegeben. n=6 Mäuse pro Gruppe. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 im Vergleich zur PBS-Kontrolle.

Man erkennt, dass sich im Vergleich zur PBS-Kontrolle der Anteil an CD4⁺ T-Zellen deutlich verringert hat. Dafür erhöhte sich sowohl der Anteil an CD8⁺ T-Zellen als auch vor allem an $\gamma\delta$ -T-Zellen. Dies ist von besonderer Bedeutung, da andere, pan-T-Zell-depletierende Agenzien oft mit einer Erhöhung des Risikos für lebensbedrohliche Infektionen oder Rezidiven für den Patienten einhergingen. Durch Erhalt der $\gamma\delta$ -T-Zellen kann ein gewisses Maß an Immunabwehr im Patienten bewahrt werden, was das Risiko von endogen aufflammenden oder neu erworbenen Infekten sowie opportunistischen Keimen ebenso reduziert wie ein drohendes Rezidiv der Grunderkrankung während der Rekonstitutionsphase des Immunsystems.

Diese und die in 7.3 erörterten Publikationen runden somit das Bild von GZ- $\alpha\beta$ TCR ab, der ein vielversprechender Kandidat für eine neue Form der GvHD-Prävention und/oder Bekämpfung darstellt. Die Umstände, dass nicht das komplette T-Zellkompartiment durch diesen Antikörper depletiert wird, sowie seine gute Verträglichkeit, könnten eine dringend benötigte, gezieltere GvHD-Therapie ermöglichen.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank nachstehenden Personen entgegen bringen, deren Hilfe ich bei dieser Promotion in Anspruch nehmen durfte.

Zu allererst gilt es PD Dr. Karin Schilbach, zu danken, für die Betreuung dieser Promotion, nicht nur während der wissenschaftlichen Forschungsarbeit, sondern auch während der turbulenten Zeiten danach. Sie schaffte den Spagat zwischen professioneller Anleitung aufgrund Ihres enormen Fachwissens und einer herzlichen Umgangsform. Ohne ihre Unterstützung, ohne Ihren Glauben an mich, meinen Fertigkeiten und meinen Ergebnissen, wäre diese Arbeit niemals druckreif geworden. Danke für ein immer offenes Ohr, egal um was es ging.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee als mein fakultärer Betreuer, der immer ein großes Vorbild für meine Forschungstätigkeit war und diese Doktorarbeit trotz eines eher ungewöhnlichen Werdegangs nicht aufgab.

Auch meinen Laborkollegen, insbesondere Dr. Marco Sterk, Dr. Hendrik Ziegler, Dr. Jan-Oliver Haarer und Dr. Katja Sonntag, möchte ich für jede Hilfe und jedes Lachen danken, die die Arbeit im Labor erleichtert haben. Auch wenn nicht jedes Experiment glückte, es war stets eine Freude, diese mit diesen Kollegen durchzuführen.

Auch meiner Familie, namentlich meiner Mutter Inge Welker, sowie meinen Schwestern Dr. Cathrin Welker-Nieuwoudt und Nicole Lutz möchte ich von Herzen danken. Die bedingungslose Unterstützung während meines gesamten Studiums machte diese Arbeit erst möglich. Ich habe viel aus den verschiedenen Blickwinkeln, die sie mir mitgaben, ziehen können.

Auch Janina Jungbeck möchte ich an dieser Stelle erwähnen und ihr meinen Dank aussprechen. Die Motivationsspritze und der Antrieb, den sie mir gab, halfen sehr, diese Promotion zum Abschluss zu bringen.

Zu guter Letzt möchte ich auch meinem verstorbenen Vater danken, der zeitlebens immer für mich da war, überhaupt den Wunsch in mir weckte zu forschen und selbst im Tod mein Studium überhaupt ermöglichte. Ihm und meinem verstorbenen Neffen Felix Lutz ist diese Arbeit gewidmet. Für sie kam die Forschung zu spät, aber ich hoffe, dass die Ergebnisse dieser Promotion helfen, anderen ein allzu frühes Ableben zu ersparen.

9. Literaturverzeichnis

1. *Isolation and Ex Vivo Culture of V δ 1+CD4+ γ δ T Cells, an Extrathymic α β T-cell Progenitor.* **Welker, Christian, Handgretinger, Rupert und Schilbach, Karin.** 106, December 2015, Journal of visualized experiments : JoVE, S. e53482. ISSN: 1940-087X.
2. *Human Peripheral CD4(+) V δ 1(+) γ δ T Cells Can Develop into α β T Cells.* **Ziegler, Hendrik, et al.** 2014, Frontiers in immunology, Bd. 5, S. 645. ISSN: 1664-3224.
3. *Selective, efficient modulation of activated CD4+ α β T cells by the novel humanized antibody GZ- α β TCR targeting human α β TCR.* **Blank, G., et al.** 3, March 2015, Bone marrow transplantation, Bd. 50, S. 390–401. ISSN: 1476-5365.
4. *Preemptive administration of human α β T cell receptor-targeting monoclonal antibody GZ- α β TCR potently abrogates aggressive graft-versus-host disease in vivo.* **Blank, Gregor, et al.** 11, November 2015, Annals of hematology, Bd. 94, S. 1907–1919. ISSN: 1432-0584.
5. *Beyond Mere Markers: Functions for CD34 Family of Sialomucins in Hematopoiesis.* **Furness, Sebastian George Barton und McNagny, Kelly.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, 2006, Immunologic Research, Bd. 34, S. 13–32.
6. *Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors.* **Morrison, S. J., et al.** s.l. : The Company of Biologists, May 1997, Development, Bd. 124, S. 1929–1939.
7. *Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors.* **Manz, Markus G., et al.** s.l. : Proceedings of the National Academy of Sciences, August 2002, Proceedings of the National Academy of Sciences, Bd. 99, S. 11872–11877.
8. *Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from.* **Bhandoola, Avinash, et al.** s.l. : Elsevier BV, June 2007, Immunity, Bd. 26, S. 678–689.
9. *Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response.* **King, Katherine Y. und Goodell, Margaret A.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, September 2011, Nature Reviews Immunology, Bd. 11, S. 685–692.

10. *The taming of a transposon: V(D)J recombination and the immune system.* **Jones, Jessica M. und Gellert, Martin.** August 2004, Immunological reviews, Bd. 200, S. 233–248. ISSN: 0105-2896.
11. *V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation.* **Gellert, Martin.** 2002, Annual review of biochemistry, Bd. 71, S. 101–132. ISSN: 0066-4154.
12. *Identification of V(D)J recombination coding end intermediates in normal thymocytes.* **Livák, F. und Schatz, D. G.** 1, March 1997, Journal of molecular biology, Bd. 267, S. 1–9. ISSN: 0022-2836.
13. *T-cell receptor excision circles in primary immunodeficiencies and other T-cell immune disorders.* **Somech, Raz.** 6, December 2011, Current opinion in allergy and clinical immunology, Bd. 11, S. 517–524. ISSN: 1473-6322.
14. *ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2.* **Beucher, Andrea, et al.** 21, November 2009, The EMBO journal, Bd. 28, S. 3413–3427. ISSN: 1460-2075.
15. *Nucleotide deletion and P addition in V(D)J recombination: a determinant role of the coding-end sequence.* **Nadel, B. und Feeney, A. J.** 7, July 1997, Molecular and cellular biology, Bd. 17, S. 3768–3778. ISSN: 0270-7306.
16. *P nucleotides in V(D)J recombination: a fine-structure analysis.* **Meier, J. T. und Lewis, S. M.** 2, February 1993, Molecular and cellular biology, Bd. 13, S. 1078–1092. ISSN: 0270-7306.
17. *Ku80 is required for addition of N nucleotides to V(D)J recombination junctions by terminal deoxynucleotidyl transferase.* **Purugganan, M. M.** s.l. : Oxford University Press (OUP), April 2001, Nucleic Acids Research, Bd. 29, S. 1638–1646.
18. *Most alpha/beta T cell receptor diversity is due to terminal deoxynucleotidyl transferase.* **Cabaniols, J. P., et al.** 9, November 2001, The Journal of experimental medicine, Bd. 194, S. 1385–1390. ISSN: 0022-1007.
19. *Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire.* **Qi, Qian, et al.** 36, September 2014, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Bd. 111, S. 13139–13144. ISSN: 1091-6490.

20. *Characterization of TCR gene rearrangements during adult murine T cell development.* **Livák, F., et al.** 5, March 1999, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bd. 162, S. 2575–2580. ISSN: 0022-1767.
21. *A novel disulfide-linked heterodimer on preT cells consists of the T cell receptor beta chain and a 33 kd glycoprotein.* **Groettrup, Marcus, et al.** s.l. : Elsevier BV, October 1993, Cell, Bd. 75, S. 283–294.
22. *SELECTION OF THE T CELL REPERTOIRE.* **Sebzda, Eric, et al.** s.l. : Annual Reviews, April 1999, Annual Review of Immunology, Bd. 17, S. 829–874.
23. *Determining gammadelta versus alphabeta T cell development.* **Ciofani, Maria und Zúñiga-Pflücker, Juan Carlos.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, August 2010, Nature Reviews Immunology, Bd. 10, S. 657–663.
24. *Thymic selection revisited: how essential is it?* **Boehmer, Harald Von, et al.** s.l. : Wiley, February 2003, Immunological Reviews, Bd. 191, S. 62–78.
25. *Dynamic aspects of TCRalpha gene recombination: qualitative and quantitative assessments of the TCRalpha chain repertoire in man and mouse.* **Jouvin-Marche, Evelyne, Fuschiotti, Patrizia und Marche, Patrice Noël.** 2009, Advances in experimental medicine and biology, Bd. 650, S. 82–92. ISSN: 0065-2598.
26. *DEGRADATION OF CELL PROTEINS AND THE GENERATION OF MHC CLASS I-PRESENTED PEPTIDES.* **Rock, Kenneth L. und Goldberg, Alfred L.** s.l. : Annual Reviews, April 1999, Annual Review of Immunology, Bd. 17, S. 739–779.
27. *Projection of an Immunological Self Shadow Within the Thymus by the Aire Protein.* **Anderson, Mark S., et al.** s.l. : American Association for the Advancement of Science (AAAS), November 2002, Science, Bd. 298, S. 1395–1401.
28. *TCR Signal Strength and T Cell Development.* **Gascoigne, Nicholas R. J., et al.** October 2016, Annual review of cell and developmental biology, Bd. 32, S. 327–348. ISSN: 1530-8995.
29. *The Role of the Thymus in Tolerance.* **Griesemer, Adam D., Sorenson, Eric C. und Hardy, Mark A.** s.l. : Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), September 2010, Transplantation, Bd. 90, S. 465–474.

30. *Central tolerance: good but imperfect*. **Gallegos, Alena M. und Bevan, Michael J.** s.l. : Wiley, February 2006, Immunological Reviews, Bd. 209, S. 290–296.
31. *The thymus and central tolerance*. **Sprent, Jonathan und Kishimoto, Hidehiro.** [Hrsg.] P. J. Morris und K. J. Wood. s.l. : The Royal Society, May 2001, Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, Bd. 356, S. 609–616.
32. *Crossreactive $\alpha\beta$ T Cell Receptors Are the Predominant Targets of Thymocyte Negative Selection*. **McDonald, Benjamin D., et al.** 5, November 2015, Immunity, Bd. 43, S. 859–869. ISSN: 1097-4180.
33. *Specificity and function of T cells bearing gammadelta receptors*. **Janeway, Charles A., Jones, Barry und Hayday, Adrian.** s.l. : Elsevier BV, January 1988, Immunology Today, Bd. 9, S. 73–76.
34. *Thymic Origin of Intestinal α T Cells Revealed by Fate Mapping of ROR γ mat+ Cells*. **Eberl, Gerard und Littman, Dan R.** s.l. : American Association for the Advancement of Science (AAAS), July 2004, Science, Bd. 305, S. 248–251.
35. *The Developmental Fate of T Cells Is Critically Influenced by TCR γ Expression*. **Kang, Joonsoo, et al.** s.l. : Elsevier BV, April 1998, Immunity, Bd. 8, S. 427–438.
36. *Age-related changes in lymphocyte development and function*. **Linton, Phyllis Jean und Dorshkind, Kenneth.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, January 2004, Nature Immunology, Bd. 5, S. 133–139.
37. *Correlation between recent thymic emigrants and CD31+ (PECAM-1) CD4+ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children*. **Junge, Sonja, et al.** 11, November 2007, European journal of immunology, Bd. 37, S. 3270–3280. ISSN: 0014-2980.
38. *Evidence for a stepwise program of extrathymic T cell development within the human tonsil*. **McClory, Susan, et al.** s.l. : American Society for Clinical Investigation, April 2012, Journal of Clinical Investigation, Bd. 122, S. 1403–1415.

39. *Extrathymic maturation of alpha beta T cells from hemopoietic stem cells.* **Dejbakhsh-Jones, S., et al.** 7, October 1995, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bd. 155, S. 3338–3344. ISSN: 0022-1767.
40. *Stepwise Development of Committed Progenitors in the Bone Marrow That Generate Functional T Cells in the Absence of the Thymus.* **García-Ojeda, Marcos E., et al.** s.l. : The American Association of Immunologists, September 2005, The Journal of Immunology, Bd. 175, S. 4363–4373.
41. *Cutting Edge: Naive T Cells Masquerading as Memory Cells.* **Murali-Krishna, Kaja und Ahmed, Rafi.** s.l. : The American Association of Immunologists, August 2000, The Journal of Immunology, Bd. 165, S. 1733–1737.
42. *Interleukin-7 mediates the homeostasis of naïve and memory CD8 T cells in vivo.* **Schluns, Kimberly S., et al.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, November 2000, Nature Immunology, Bd. 1, S. 426–432.
43. *TCR Revision Generates Functional CD4+ T Cells.* **Hale, J. Scott, Wubeshet, Maramawit und Fink, Pamela J.** s.l. : The American Association of Immunologists, October 2010, The Journal of Immunology, Bd. 185, S. 6528–6534.
44. *Cutting Edge: Recombinase-Activating Gene Expression and V(D)J Recombination in CD4+CD3low Mature T Lymphocytes.* **Lantelme, Erica, et al.** s.l. : The American Association of Immunologists, April 2000, The Journal of Immunology, Bd. 164, S. 3455–3459.
45. *Receptor revision in CD4 T cells is influenced by follicular helper T cell formation and germinal-center interactions.* **Higdon, Lauren E., et al.** s.l. : Proceedings of the National Academy of Sciences, March 2014, Proceedings of the National Academy of Sciences, Bd. 111, S. 5652–5657.
46. *Expression of recombination-activating gene in mature peripheral T cells in Peyer's patch.* **Kondo, E.** s.l. : Oxford University Press (OUP), March 2003, International Immunology, Bd. 15, S. 393–402.
47. *Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development.* **Kaech, Susan M., Wherry, E. John und Ahmed, Raft.** 4, April 2002, Nature reviews. Immunology, Bd. 2, S. 251–262. ISSN: 1474-1733.

48. *Harnessing the plasticity of CD4(+) T cells to treat immune-mediated disease.* **DuPage, Michel und Bluestone, Jeffrey A.** 3, March 2016, Nature reviews. Immunology, Bd. 16, S. 149–163. ISSN: 1474-1741.
49. *Cross-Differentiation from the CD8 Lineage to CD4 T Cells in the Gut-Associated Microenvironment with a Nonessential Role of Microbiota.* **Lui, Jen Bon, et al.** s.l. : Elsevier BV, February 2015, Cell Reports, Bd. 10, S. 574–585.
50. *Epigenetic Regulation of T Cell Memory: Recalling Therapeutic Implications.* **Tough, David F., et al.** s.l. : Elsevier BV, January 2020, Trends in Immunology, Bd. 41, S. 29–45.
51. *The Expanding Arsenal of Cytotoxic T Cells.* **Cassoli, Chiara und Baldari, Cosima T.** 2022, Frontiers in immunology, Bd. 13, S. 883010. ISSN: 1664-3224.
52. *Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses.* **Seong, Seung-Yong und Matzinger, Polly.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, June 2004, Nature Reviews Immunology, Bd. 4, S. 469–478.
53. *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation.* **Seder, Robert A. und Ahmed, Rafi.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, September 2003, Nature Immunology, Bd. 4, S. 835–842.
54. *Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells.* **Nakamura, T., et al.** 3, February 1997, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bd. 158, S. 1085–1094. ISSN: 0022-1767.
55. *Inflammatory cytokines and change of Th1/Th2 balance as prognostic indicators for hepatocellular carcinoma in patients treated with transarterial chemoembolization.* **Lee, Hae Lim, et al.** 1, March 2019, Scientific reports, Bd. 9, S. 3260. ISSN: 2045-2322.
56. *Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells.* **Lundgren, Mats, et al.** s.l. : Wiley, July 1989, European Journal of Immunology, Bd. 19, S. 1311–1315.
57. *CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders.* **Zhu, Xiaoliang und Zhu, Jinfang.** s.l. : MDPI AG, October 2020, International Journal of Molecular Sciences, Bd. 21, S. 8011.

58. *Differential contributions of central and effector memory T cells to recall responses.* **Roberts, Alan D., Ely, Kenneth H. und Woodland, David L.** 1, July 2005, The Journal of experimental medicine, Bd. 202, S. 123–133. ISSN: 0022-1007.
59. *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions.* **Sallusto, Federica, et al.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, October 1999, Nature, Bd. 401, S. 708–712.
60. *Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells.* **Geginat, J., Sallusto, F. und Lanzavecchia, A.** 12, December 2001, The Journal of experimental medicine, Bd. 194, S. 1711–1719. ISSN: 0022-1007.
61. *Treg Heterogeneity, Function, and Homeostasis.* **Shevryev, Daniil und Tereshchenko, Valeriy.** s.l. : Frontiers Media SA, January 2020, Frontiers in Immunology, Bd. 10.
62. *A Structural Change in Butyrophilin upon Phosphoantigen Binding Underlies Phosphoantigen-Mediated Vgamma9Vdelta2 T Cell Activation.* **Yang, Yunyun, et al.** s.l. : Elsevier BV, April 2019, Immunity, Bd. 50, S. 1043–1053.e5.
63. *Functional double-negative T cells in the periphery express T cell receptor V beta gene products that cause deletion of single-positive T cells.* **Martínez, C., et al.** 1, January 1993, European journal of immunology, Bd. 23, S. 250–254. ISSN: 0014-2980.
64. *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity.* **Carding, Simon R. und Egan, Paul J.** 5, May 2002, Nature reviews. Immunology, Bd. 2, S. 336–345. ISSN: 1474-1733.
65. *Analysis of the TCR Vgamma repertoire in healthy donors and HIV-1-infected individuals.* **Wesch, D., Hinz, T. und Kabelitz, D.** 8, August 1998, International immunology, Bd. 10, S. 1067–1075. ISSN: 0953-8178.
66. *Understanding the complexity of $\gamma\delta$ T-cell subsets in mouse and human.* **Pang, Dick J., et al.** 3, July 2012, Immunology, Bd. 136, S. 283–290. ISSN: 1365-2567.
67. *Antigen recognition by gammadelta T cells.* **Chien, Yueh-hsiu und Konigshofer, Yves.** February 2007, Immunological reviews, Bd. 215, S. 46–58. ISSN: 0105-2896.

68. *Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology.* **Vantourout, Pierre und Hayday, Adrian.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, January 2013, Nature Reviews Immunology, Bd. 13, S. 88–100.
69. *BTN3A1 governs antitumor responses by coordinating alphabeta and gammadelta T cells.* **Payne, Kyle K., et al.** s.l. : American Association for the Advancement of Science (AAAS), August 2020, Science, Bd. 369, S. 942–949.
70. *Butyrophilin-2A1 Directly Binds Germline-Encoded Regions of the Vgamma9Vdelta2 TCR and Is Essential for Phosphoantigen Sensing.* **Karunakaran, Mohindar M., et al.** s.l. : Elsevier BV, March 2020, Immunity, Bd. 52, S. 487–498.e6.
71. *Human gammadelta T cell sensing of AMPK-dependent metabolic tumor reprogramming through TCR recognition of EphA2.* **Harly, Christelle, et al.** s.l. : American Association for the Advancement of Science (AAAS), July 2021, Science Immunology, Bd. 6.
72. *Selective lysis of the autologous tumor by delta TCS1+ gamma/delta+ tumor-infiltrating lymphocytes from human lung carcinomas.* **Zocchi, M. R., Ferrarini, M. und Rugarli, C.** 12, December 1990, European journal of immunology, Bd. 20, S. 2685–2689. ISSN: 0014-2980.
73. *Chemotherapy and zoledronate sensitize solid tumour cells to Vgamma9Vdelta2 T cell cytotoxicity.* **Mattarollo, Stephen R., et al.** 8, August 2007, Cancer immunology, immunotherapy : CII, Bd. 56, S. 1285–1297. ISSN: 0340-7004.
74. *Characterization of human $\gamma\delta$ T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas.* **Cordova, Adriana, et al.** 11, 2012, PloS one, Bd. 7, S. e49878. ISSN: 1932-6203.
75. *Tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer.* **Ma, Chunling, et al.** 10, November 2012, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bd. 189, S. 5029–5036. ISSN: 1550-6606.
76. *$\gamma\delta$ T17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer.* **Wu, Pin, et al.** 5, May 2014, Immunity, Bd. 40, S. 785–800. ISSN: 1097-4180.

77. *Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia.* **Boismenu, R., et al.** 3, August 1996, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bd. 157, S. 985–992. ISSN: 0022-1767.
78. *In the Absence of a TCR Signal IL-2/IL-12/18-Stimulated gammadelta T Cells Demonstrate Potent Anti-Tumoral Function Through Direct Killing and Senescence Induction in Cancer Cells.* **Schilbach, Karin, et al.** s.l. : MDPI AG, January 2020, Cancers, Bd. 12, S. 130.
79. *Unique and Common Features of Innate-Like Human Vdelta2 gammadelta T Cells and Mucosal-Associated Invariant T Cells.* **Provine, Nicholas M., et al.** s.l. : Frontiers Media SA, April 2018, Frontiers in Immunology, Bd. 9.
80. *Tracing innate immune defences along the path of Listeria monocytogenes infection.* **Regan, Tim, MacSharry, John und Brint, Elizabeth.** 7, August 2014, Immunology and cell biology, Bd. 92, S. 563–569. ISSN: 1440-1711.
81. *IL-17A-producing gammadeltaT cells promote CTL responses against Listeria monocytogenes infection by enhancing dendritic cell cross-presentation.* **Xu, Sheng, et al.** 10, November 2010, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bd. 185, S. 5879–5887. ISSN: 1550-6606.
82. *Protective immune responses of major Vγ2Vδ2 T-cell subset in M. tuberculosis infection.* **Chen, Zheng W.** October 2016, Current opinion in immunology, Bd. 42, S. 105–112. ISSN: 1879-0372.
83. *Vdelta1 T lymphocytes expressing a Th1 phenotype are the major gammadelta T cell subset infiltrating the liver of HCV-infected persons.* **Agrati, C., et al.** 1, January 2001, Molecular medicine (Cambridge, Mass.), Bd. 7, S. 11–19. ISSN: 1076-1551.
84. *The role of Vδ2-negative γδ T cells during cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic stem cell transplantation.* **Knight, Andrea, et al.** 12, September 2010, Blood, Bd. 116, S. 2164–2172. ISSN: 1528-0020.
85. *gammadelta T Cells: Unexpected Regulators of Cancer Development and Progression.* **Fleming, Christopher, et al.** s.l. : Elsevier BV, August 2017, Trends in Cancer, Bd. 3, S. 561–570.

86. *Propagation and regulation of systemic autoimmunity by gammadelta T cells.* **Peng, S. L., et al.** 12, December 1996, Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), Bd. 157, S. 5689–5698. ISSN: 0022-1767.
87. *Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells.* **Brandes, Marlène, Willimann, Katharina und Moser, Bernhard.** 5732, July 2005, Science (New York, N.Y.), Bd. 309, S. 264–268. ISSN: 1095-9203.
88. *$\gamma\delta$ T-APCs: a novel tool for immunotherapy?* **Moser, Bernhard und Eberl, Matthias.** 14, July 2011, Cellular and molecular life sciences : CMLS, Bd. 68, S. 2443–2452. ISSN: 1420-9071.
89. *The molecular mechanisms supporting the homeostasis and activation of dendritic epidermal T cell and its role in promoting wound healing.* **Chen, Cheng, et al.** s.l. : Oxford University Press (OUP), January 2021, Burns & Trauma, Bd. 9.
90. *T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies.* **Cordo, Valentina, et al.** s.l. : American Association for Cancer Research (AACR), January 2021, Blood Cancer Discovery, Bd. 2, S. 19–31.
91. *The Evolving Landscape of Frontline Therapy in Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia (CML).* **Wolfe, Heather R. und Rein, Lindsay A. M.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, October 2021, Current Hematologic Malignancy Reports, Bd. 16, S. 448–454.
92. *Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update of the IUIS Phenotypical Classification.* **Bousfiha, Aziz, et al.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, January 2020, Journal of Clinical Immunology, Bd. 40, S. 66–81.
93. *EBMT/ESID inborn errors working party guidelines for hematopoietic stem cell transplantation for inborn errors of immunity.* **Lankester, A. C., et al.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, July 2021, Bone Marrow Transplantation, Bd. 56, S. 2052–2062.
94. *Cutaneous Graft-Versus-Host Disease: Diagnosis and Treatment.* **Rodrigues, Karla Strong, et al.** s.l. : Springer Science and Business Media LLC, June 2017, American Journal of Clinical Dermatology, Bd. 19, S. 33–50.

95. *Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation.* **Jagasia, Madan, et al.** 1, January 2012, Blood, Bd. 119, S. 296–307. ISSN: 1528-0020.
96. *Minor Histocompatibility Antigen-Specific T Cells.* **Summers, Corinne, Sheth, Vipul S. und Bleakley, Marie.** s.l. : Frontiers Media SA, June 2020, Frontiers in Pediatrics, Bd. 8.
97. *Strategies for Enhancing and Preserving Anti-leukemia Effects Without Aggravating Graft-Versus-Host Disease.* **Chang, Ying-Jun, Zhao, Xiang-Yu und Huang, Xiao-Jun.** 2018, Frontiers in immunology, Bd. 9, S. 3041. ISSN: 1664-3224.
98. *T-cell receptor delta-chain can substitute for alpha to form a beta delta heterodimer.* **Hochstenbach, F. und Brenner, M. B.** 6234, August 1989, Nature, Bd. 340, S. 562–565. ISSN: 0028-0836.
99. *Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents.* **Wucherpfennig, K. W.** 8, October 2001, The Journal of clinical investigation, Bd. 108, S. 1097–1104. ISSN: 0021-9738.
100. *BMA031, a monoclonal antibody suited to identify the T-cell receptor alphabeta CD3 complex on viable human T lymphocytes in normal and disease states.* **Borst, Jannie, et al.** s.l. : Elsevier BV, November 1990, Human Immunology, Bd. 29, S. 175–188.
101. *Protective Role of gamma delta T Cells in Different Pathogen Infections and Its Potential Clinical Application.* **Zhao, Yueshui, et al.** s.l. : Hindawi Limited, July 2018, Journal of Immunology Research, Bd. 2018, S. 1–15.
102. *The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D.* **Kong, Yan, et al.** 2, July 2009, Blood, Bd. 114, S. 310–317. ISSN: 1528-0020.
103. *Patterns of Chemokine Receptor Expression on Peripheral Blood gammadelta T Lymphocytes: Strong Expression of CCR5 Is a Selective Feature of Vdelta2/Vgamma9 gammadelta T Cells.* **Glatzel, Andrea, et al.** s.l. : The American Association of Immunologists, May 2002, The Journal of Immunology, Bd. 168, S. 4920–4929.