

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt  
&  
dem Institut für Molekulare Immunologie  
GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Direktorin: Prof. Dr. PhD D.J. Schendel

Vergleichende Untersuchung der Funktion  
fetaler Natürlicher Killer T-Zellen mit  
Natürlichen Killer T-Zellen aus peripherem Blut Erwachsener



Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

**Anke Katharina RUNGE**

aus

Villingen-Schwenningen

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. D. Reinhardt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Wank  
Prof. Dr. H.J. Kolb

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. S. Krauss-Etschmann

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2008

Meinen Eltern

---

## Kurzübersicht

<b>1</b>	<b>Das Immunsystem</b> .....	<b>1</b>
1.1	Das angeborene Immunsystem .....	1
1.2	Das adaptive Immunsystem .....	1
1.3	Mediatoren der Zellkommunikation: Chemokine und Chemokinrezeptoren .....	4
<b>2</b>	<b>NKT-Zellen</b> .....	<b>10</b>
2.1	Definition .....	10
2.2	Einteilung .....	13
2.3	Oberflächenmarker von NKT-Zellen .....	13
2.4	CD1d-abhängige Antigenerkennung .....	14
2.5	Liganden .....	15
2.6	Funktionen .....	17
<b>3</b>	<b>Vergleich adulter mit fetalen NKT-Zellen</b> .....	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
5.1	Materialien .....	22
5.2	Methoden .....	26
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>40</b>
6.1	Gruppen .....	40
6.2	Vergleich der Prozentsätze CKR <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen von Erwachsenen und Neugeborenen .....	43
6.3	Zytokinproduzierende NKT-Zellen .....	72
<b>7</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>94</b>
7.1	Probanden .....	94
7.2	Methodik .....	95
7.3	Phänotypische Charakterisierung fetaler und adulter NKT-Zellen anhand der CKR-Prozentsätze .....	97
7.4	Funktionelle Charakterisierung fetaler und adulter CKR <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	98
<b>8</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>102</b>

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Das Immunsystem .....</b>	<b>1</b>
1.1	Das angeborene Immunsystem .....	1
1.2	Das adaptive Immunsystem .....	1
1.2.1	B-Lymphozyten .....	2
1.2.2	T-Lymphozyten.....	2
1.2.2.1	Das Th1/Th2-Modell .....	2
1.2.2.2	Th1-Zellen.....	3
1.2.2.3	Th2-Zellen.....	4
1.3	Mediatoren der Zellkommunikation: Chemokine und Chemokinrezeptoren .....	4
1.3.1	Chemokinrezeptoren .....	6
<b>2</b>	<b>NKT-Zellen .....</b>	<b>10</b>
2.1	Definition .....	10
2.1.1	Rearrangement der TCR-Gene .....	10
2.2	Einteilung.....	13
2.3	Oberflächenmarker von NKT-Zellen.....	13
2.4	CD1d-abhängige Antigenerkennung .....	14
2.5	Liganden .....	15
2.6	Funktionen .....	17
<b>3</b>	<b>Vergleich adulter mit fetalen NKT-Zellen.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
5.1	Materialien .....	22
5.1.1	Glas- und Plastikmaterial .....	22
5.1.2	Chemikalien und Puffer .....	23
5.1.3	Antikörper .....	24
5.1.4	Geräte .....	25
5.2	Methoden .....	26
5.2.1	Probanden .....	26
5.2.2	Probengewinnung .....	26

5.2.3	Routineblutbild .....	27
5.2.4	Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation .....	27
5.2.5	Zelluläre Stimulation .....	27
5.2.6	Färben der NKT-Zellen.....	29
5.2.7	Analyse der NKT-Zellen mittels Durchflußzytometrie (FACS) .....	33
5.2.7.1	Prinzip der Durchflußzytometrie .....	33
5.2.7.2	Messung .....	34
5.2.7.3	Auswertung .....	34
5.2.7.3.1	Statistik.....	37
5.2.7.4	Einschlußkriterien zur Auswertung der Proben.....	39
<b>6</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
6.1	Gruppen.....	40
6.1.1	Erwachsene .....	40
6.1.2	Neugeborene .....	41
6.1.3	Vergleich von Erwachsenen mit Neugeborenen.....	41
6.1.3.1	Vergleich von fetalem mit adultem Blut.....	42
6.1.3.2	Vergleich der NKT-Subpopulationen innerhalb der Neugeborenen- und Erwachsenenengruppe .....	43
6.2	Vergleich der Prozentsätze CKR <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen von Erwachsenen und Neugeborenen .....	43
6.2.1	Prozentsatz CCR2 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	44
6.2.2	Prozentsatz CCR3 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	46
6.2.3	Prozentsatz CCR4 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	49
6.2.4	Prozentsatz CCR5 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	51
6.2.5	Prozentsatz CCR6 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	54
6.2.6	Prozentsatz CCR7 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	56
6.2.7	Prozentsatz CCR8 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	59
6.2.8	Prozentsatz CCR9 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	62
6.2.9	Prozentsatz CXCR3 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	65
6.2.10	Prozentsatz CXCR4 <sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen .....	67
6.2.11	Zusammenfassung.....	70
6.3	Zytokinproduzierende NKT-Zellen .....	72

6.3.1	IFN $\gamma$ und IL-4 produzierende NKT-Zellen.....	72
6.3.2	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen.....	74
6.3.2.1	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR2 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	74
6.3.2.2	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR3 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	76
6.3.2.3	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR4 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	77
6.3.2.4	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR5 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	78
6.3.2.5	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR6 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	79
6.3.2.6	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR7 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	80
6.3.2.7	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR8 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	81
6.3.2.8	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR9 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	82
6.3.2.9	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CXCR3 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen.....	83
6.3.2.10	IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CXCR4 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen.....	84
6.3.3	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender NKT-Zellen .....	85
6.3.3.1	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR2 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	85
6.3.3.2	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR3 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	85
6.3.3.3	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR4 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	86
6.3.3.4	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR5 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	87
6.3.3.5	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR6 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	87
6.3.3.6	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR7 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	88
6.3.3.7	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR8 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	89
6.3.3.8	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR9 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	89
6.3.3.9	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CXCR3 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	90
6.3.3.10	Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CXCR4 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	90
6.3.3.11	Vergleich des IFN $\gamma$ /IL-4-Verhältnisses von DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen innerhalb einer Gruppe .....	91
6.3.3.12	Zusammenfassung.....	91

<b>7 Diskussion .....</b>	<b>94</b>
7.1 Probanden .....	94
7.2 Methodik .....	95
7.3 Phänotypische Charakterisierung fetaler und adulter NKT-Zellen .....	97
7.4 Funktionelle Charakterisierung fetaler und adulter CKR <sup>+</sup> NKT-Zellen.....	98
<b>8 Zusammenfassung.....</b>	<b>102</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>104</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>107</b>
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>119</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>120</b>



---

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC-Cy7	Allophycocyanin- cyanine dye Cy7
BD	Becton & Dickinson
BFA	Brefeldin A
CD	Cluster of differentiation
CKR	Chemokinrezeptor
evtl	eventuell
EW	Erwachsenenblut
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetal Calf Serum, Rinderserumalbumin
FITC	Fluoreszeinisothiocyant
FSC	Forward Angle Light Scatter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Colony-Stimulating Factor
i.e.S.	im engeren Sinne
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
iGb3	Isoglobotrihexosylceramid
IL	Interleukin
IL-4	Interleukin-4
LAF	Laminar Air Flow
LPS	Lipopolysaccharid
LT	Lymphotaktin
MACS	Magnetic Cell Separation
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger RNA
NK	Natürliche Killerzellen
NS	Nabelschnurblut
PE-Cy7	Phycoerythrin -cyanine dyeCy7
PerCP-Cy5.5	Peridinin Chlorophyllprotein -cyanine dye Cy5.5
PMA	Phorbol12-myristate13-acetate
RPM	Rounds per minute/ Umdrehungen pro Minute
SSC	Side Angle Light Scatter
TCR	T-cell-Receptor
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor alpha
u.a.	unter anderem
$\alpha$ GalCer	Alpha-Galactosylceramid

# 1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem dient primär dem Schutz des Organismus vor eindringenden Erregern. Es wird unterteilt in einen phylogenetisch älteren Teil der Abwehr, das angeborene Immunsystem, und einen jüngeren Abwehrmechanismus, das adaptive Immunsystem.

## 1.1 Das angeborene Immunsystem

Der Mensch ist durch physikalische Barrieren wie Haut, Magen und Darm vor dem Eindringen krankheitsverursachender Mikroorganismen geschützt. Durchdringen jedoch Erreger wie Bakterien, Viren, Würmer, Parasiten oder Pilze diese Schutzwälle und gelangen in den menschlichen Organismus, so wird eine Abwehrkaskade gegen sie in Gang gesetzt. Dabei bilden neutrophile Granulozyten, Natürliche Killerzellen (NK), und Makrophagen die erste Front der Abwehr. Diese Zelltypen gehören dem angeborenen Immunsystem an und zeichnen sich dadurch aus, dass sie mit einer limitierten Anzahl an Rezeptoren relativ unspezifisch fremde Molekülmuster erkennen und die drohende Infektionsausbreitung durch Phagozytose und direktes Abtöten der Erreger zu verhindern versuchen. Weiter sind sie an der Einleitung der adaptiven Immunantwort beteiligt, die nach 4-7 Tagen beginnt und Mikroben spezifisch eliminiert.

## 1.2 Das adaptive Immunsystem

Bei der Immunantwort des Körpers auf Eindringlinge greifen angeborene und erworbene Abwehrmechanismen ineinander, wobei die adaptive Antwort später einsetzt. Zu dem erworbenen Immunsystem zählen B- und T-Lymphozyten. Ihre Aufgabe besteht darin, krankheitsverursachende Mikroorganismen gezielt mit Hilfe hochspezifischer Antikörper bzw. T-Zellrezeptoren (TCR) auszuschalten. B- und T-Lymphozyten stammen von gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark ab. Ihre weitere Differenzierung erfolgt entweder im Knochenmark (B-Zellen) oder im Thymus (T-Zellen). Sie zirkulieren vom Blut in lymphatische Gewebe und gelangen schließlich über die Milz wieder zurück in den

Blutkreislauf. Werden ihnen in den lymphatischen Geweben von antigenpräsentierenden Zellen spezifische Antigene via MHC Molekülen präsentiert, so differenzieren sie zu Effektorzellen.

### **1.2.1 B-Lymphozyten**

Durch die Fähigkeit der B-Lymphozyten spezifische Antikörper gegen Antigene zu bilden, zählen sie zu den effektivsten Mechanismen der Immunabwehr. Ihr genetisch bedingtes Rezeptorrepertoire ist nahezu unerschöpflich. Trifft ein B-Lymphozyt mit seinem B-Zell-Rezeptor auf sein spezifisches Antigen, kommt es zur B-Zellproliferation mit enormer Antikörperausschüttung und der Entstehung von Effektorzellen. Ein Teil der B-Zellen reift zu Gedächtniszellen, die bei wiederholtem Antigenkontakt schnell reagieren können.

### **1.2.2 T-Lymphozyten**

T-Lymphozyten werden in zwei Gruppen unterteilt: zytotoxische T-Zellen, welche CD8 an ihrer Zelloberfläche exprimieren (CD8<sup>+</sup> T-Zellen) und virusinfizierte Zellen erkennen und lysieren und T-Helferzellen, die Makrophagen und B-Lymphozyten aktivieren und somit indirekt an der Erregerabtötung beteiligt sind. T-Helferzellen tragen den Marker CD4 an ihrer Oberfläche und werden daher auch als CD4-positive Zellen (CD4<sup>+</sup> Zellen) bezeichnet. Anhand ihres Zytokinmusters teilt man sie weiter in Th1- und Th2-Zellen ein<sup>1,2</sup>. T-Zellen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) das für sie spezifische Antigen, welches ihnen von APCs in Verbindung mit MHC-Molekülen präsentiert wird.

#### **1.2.2.1 Das Th1/Th2-Modell**

Ob sich eine naive CD4<sup>+</sup>-T-Zelle nach ihrer Aktivierung zu einer Th1- oder Th2-Zelle entwickelt, ist von dem Antigen, das den T-Lymphozyten in der T-Zellzone des Lymphknotens von den APC präsentiert wird, von kostimulatorischen Molekülen sowie der Anwesenheit von bestimmten Zytokinen abhängig<sup>3</sup>. 1985 konnte von Kim et al. gezeigt werden, dass sich CD4<sup>+</sup>-T-Zellen hinsichtlich ihrer Zytokinproduktion erheblich unterscheiden<sup>4</sup>. Dies wirkt sich auch

auf funktioneller Ebene aus. 1986 entwickelten Mosmann et al. das Modell der Th1/Th2-Immunantwort anhand des dominierenden Zytokinmusters von murinen aktivierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen<sup>3</sup>. Dieses Modell ist auch auf den Menschen übertragbar. Hier differenzieren CD4<sup>+</sup>-T-Zellen jedoch zuerst in Vorläuferzellen, sogenannte Th0-Zellen, die sich dann sowohl in Th1- als auch in Th2-Richtung weiterentwickeln können<sup>5</sup>. Th0-Zellen sind in der Lage, ein weites Zytokinspektrum zu sekretieren, das weniger eingeschränkt ist als bei Th1- oder Th2-Zellen<sup>6</sup>. So produzieren Th0-Zellen das für sie kennzeichnende IL-2<sup>7</sup>, jedoch auch IFN $\gamma$ , Lymphotoxin, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, GM-CSF und TNF- $\alpha$ <sup>1,8</sup>. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt wird angenommen, dass eine Vielzahl regulatorischer Zellen die Balance zwischen einer Th1- und Th2-Immunantwort steuert<sup>9</sup>.

### 1.2.2.2 Th1-Zellen

Die Differenzierung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen wird neben weiteren Faktoren wie Antigenstruktur und Eintrittspforte des Erregers durch das Zytokin IL-12 beeinflusst, das von Zellen des angeborenen Immunsystems stammt, nachdem diese Kontakt zu bestimmten Antigenen wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) hatten. Des Weiteren unterdrückt das von den Th1-Zellen selbst produzierte IFN $\gamma$  die Bildung von Th2-Zellen und fördert die weitere Ausdifferenzierung von Th0-Zellen in Richtung Th1. Neben IFN $\gamma$  sezernieren Th1-Zellen auch IL-2, LT, IL-3, GM-CSF und TNF- $\alpha$ . Charakteristisch für die Th1-Immunantwort sind die Stimulation und Proliferation von Makrophagen und dadurch die Verstärkung der zellvermittelten Immunantwort. Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose (MS), Diabetes mellitus und Lupus erythematodes (SLE) sind mit einem relativen Überwiegen der Th1-Zellen assoziiert<sup>10</sup>.

### 1.2.2.3 Th2-Zellen

Im Gegensatz zu Th1-Zellen aktivieren Th2-Zellen B-Lymphozyten, welche ihrerseits dann weiter zu Antikörper-produzierenden Zellen differenzieren <sup>11</sup>. Entscheidend für die Entwicklung von Th0-Zellen zu Th2-Zellen ist die Anwesenheit von IL-4 sowie IL-10, welche eine Differenzierung in Th1-Zellen unterbinden. Kennzeichnend für Th2-Zellen ist die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 <sup>12,13</sup>. Da IL-4 und IL-13 gemeinsam mit weiteren kostimulatorischen Signalen in B-Lymphozyten den Isotypklassenwechsel zu IgE induzieren, kommt ihnen bei atopischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale, allergische Rhinitis und atopischer Dermatitis eine entscheidende Rolle zu <sup>1,3</sup>.

## 1.3 Mediatoren der Zellkommunikation: Chemokine und Chemokinrezeptoren

Beim Zusammenspiel angeborener und adaptiver Immunantworten spielen Chemokine und ihre Rezeptoren eine wesentliche Rolle, da sie gemeinsam mit Adhäsionsmolekülen die Wanderung einzelner Zellpopulationen in bestimmte Gewebe steuern <sup>14-16</sup>. Bei Chemokinen handelt es sich um chemotaktische Zytokine (daher der Name) mit einer unterschiedlichen Länge von 60-70 Aminosäuren, die über Disulfidbrücken stabilisiert werden <sup>17</sup>.

Chemokine werden anhand der ersten vier konservierten Cysteine in vier Gruppen eingeteilt (Abbildung 1-4).

### CC Chemokine

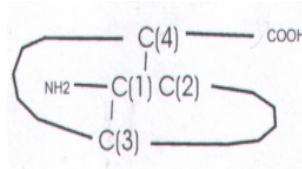


Abbildung 1: Schematische Darstellung der CC Chemokine

### CXC Chemokine

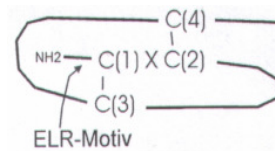


Abbildung 2: Schematische Darstellung der CXC Chemokine

### CX Chemokine

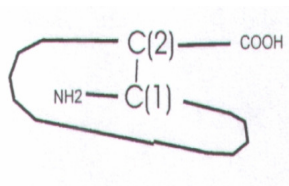


Abbildung 3: Schematische Darstellung der CX Chemokine

### CXXXC Chemokine

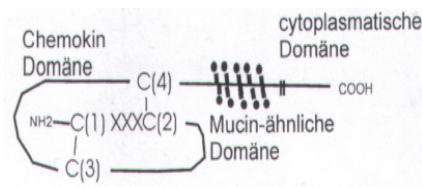


Abbildung 4: Schematische Darstellung der CXXXC Chemokine

Bei CC-Chemokinen liegen die ersten beiden Cysteine direkt benachbart, während bei CXC-Chemokinen noch eine variable Aminosäure dazwischen liegt. XC-Chemokinen fehlt ein Cystein, wohingegen sich bei CXXXC-Chemokinen zwischen den Cysteinen 3 variable Aminosäuren finden. Bislang sind 50 Chemokine identifiziert worden. Nach einer anderen Unterteilung werden Chemokine in  $\alpha$  (CXC)-,  $\beta$  (CC)-,  $\gamma$  (C)- und  $\delta$  (CX3C)- Chemokine unterteilt. Dabei wirken  $\alpha$ -Chemokine überwiegend auf Granulozyten, während  $\beta$ -Chemokine vor allem Monozyten und Lymphozyten beeinflussen<sup>18</sup>.

### 1.3.1 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren (CKR) sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die mit sieben Transmembran- $\alpha$ -Helices die Zellmembran durchspannen und zur Rhodopsin-Superfamilie gehören<sup>19-21</sup>. Analog zu den Chemokinen werden CC- und CXC-Rezeptoren unterscheiden. Sie besitzen 3 extrazelluläre Domänen und 3 intrazelluläre Schlaufen, einen außerhalb der Zelle gelegenen N-Terminus und einen sich im Zytoplasma befindenden C-Terminus, der Serin- und Threoninphosphorylierungsstellen enthält (Abbildung 5).

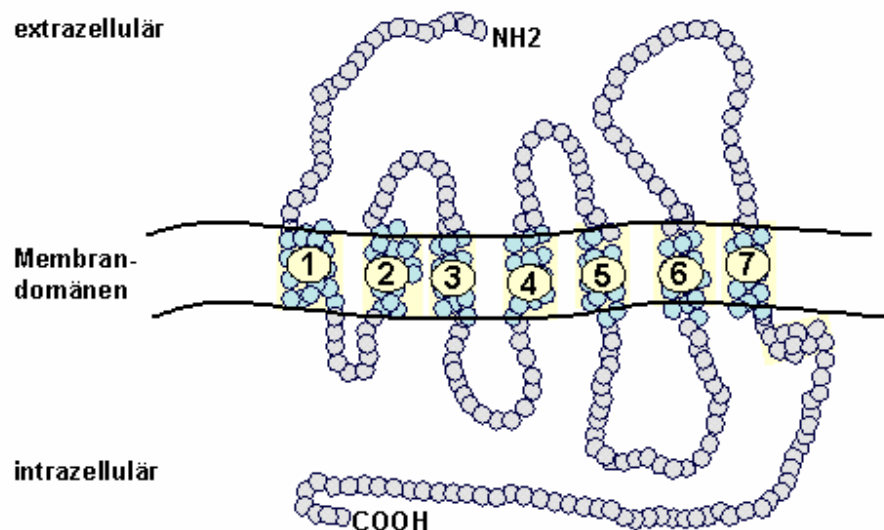


Abbildung 5: G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen

Nach Bindung des Chemokins an seinen Rezeptor internalisiert der Rezeptor innerhalb kürzester Zeit<sup>22,23</sup>. Dabei können die Rezeptoren meist mehr als ein bestimmtes Chemokin

binden und verschiedene Chemokine binden an unterschiedliche Rezeptoren, wodurch ein komplexes, stark ineinander verflochtenes Chemokin-CKR-Netzwerk entsteht.

Spezifische Kinasen phosphorylieren die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors, wodurch dieser unempfindlich gegen eine weitere Aktivierung wird <sup>22,24</sup>. Durch die Expression verschiedener Chemokinrezeptoren auf Lymphozyten wird die Zellwanderung entlang eines chemotaktischen Gradienten von einem Gewebe in ein anderes ermöglicht <sup>25</sup>. Die Chemokinrezeptoren können funktionell in zwei Gruppen unterteilt werden <sup>19,26</sup>:

- inflammatorische induzierbare Rezeptoren, zu denen CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CXCR3, CXCR6 und CX<sub>3</sub>CR zählen und
- homöostatische Rezeptoren, denen CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4 und CXCR5 angehören. Diese steuern physiologische Wanderungsprozesse, wie etwa das Homing von T-Zellen in T-Zellareale des Lymphknotens.

Die Chemokine und ihre dazugehörigen Rezeptoren bilden ein komplexes Netzwerk der Zellkommunikation wie aus der folgenden Abbildung 6 ersichtlich wird.



	Rezeptoren	Chemokine	Funktion
<b>inflammatorisch</b>	CCR1	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-2, MCP-3	Effektor T-Zelle
	CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4	Effektor T-Zelle
	CCR3	Eotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MEC	Effektor T-Zelle
	CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , MCP-2	Effektor T-Zelle
	CCR8	I309	Effektor T-Zelle
	CXCR3	I-TAC, MIG, IP10	Effektor T-Zelle
	CXCR6	CXCL16	Effektor T-Zelle
	CX3CR1	Fractalkine	Effektor T-Zelle
	CCR4	MDC, TARC	Effektor T-Zelle (Th1, Th2) memory T-Zelle (CLA) transitionale Thymozyten
	CCR6	LARC	Effektor T-Zelle, B-Zellen memory T-Zellen (CLA, $\alpha$ 4 $\beta$ 7)
<b>homöostatisch</b>	CCR7	SLC, ELC	Naive, central memory T-Zellen (TCM) B-Zellen reife medulläre Thymozyten
	CCR9	TECK	memory T-Zellen (CLA, $\alpha$ 4 $\beta$ 7) B-Zellen unreife Thymozyten
	CCR10	CTACK, MEC	memory T-Zelle (CLA)
	CXCR4	SDF-1	Naive, central memory T-Zellen (TCM) B-Zellen reife medulläre Thymozyten
	CXCR5	BCA-1	follikuläre B-Helfer T-Zellen (TFH) B-Zellen
	Unbekannt	DC-CK1	Naive T-Zellen

Abbildung 6: Funktionale Klassifikation der humanen Chemokine und ihrer Rezeptoren nach inflammatorischer (hellblau dargestellt) und homöostatischer (dunkelblau) Funktion. Weiß dargestellte CKR lassen sich keiner der beiden Gruppen funktionell exakt zuordnen (modifiziert nach Moser und Loetscher<sup>19</sup>).

Die dargestellten Chemokine sind nach ihren geläufigen Namen benannt. Die neue systematische Chemokin-Nomenklatur ist in Klammern wiedergegeben. I-Tac, interferon-inducible T-cell  $\alpha$ -chemoattractant (CXCL12); MIG, monokine-induced by  $\gamma$ -interferon (CXCL9); IP10, interferon-inducible protein 10 (CXCL10); RANTES, regulated on activation

*normal T cell expressed and secreted (CCL5); MIP-1 $\alpha$ , macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  (CCL3); MCP-1, monocyte chemoattractant protein1 (CCL2); MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7); MCP-4 (CCL13); Eotaxin-1 (CCL11); Eotaxin-2 (CCL24); Eotaxin-3 (CCL26); MEC, mucosae-associated epithelial chemokine (CCL28); MIP1 $\beta$  (CCL4); I309 (CCL1); Fractalkine (CX<sub>3</sub>CL1); MDC, macrophage-derived chemokine (CCL22); TARC, thymus-and activation-regulated chemokine (CCL17); LARC, liver- and activation-regulated chemokine (CCL20); CTACK, cutaneous T cell-attracting chemokine (CCL27); SDF-1, stromal cell-derived factor-chemokine (CCL21); BCA-1, B cell-activating chemokine 1 (CXCL13); SLC, secondary lymphoid tissue chemokine (CCL21); ELC, Epstein Barr virus-induced receptor ligand chemokine (CCL19); TECK, thymus-expressed chemokine (CCL25); DC-CK1, dendritic cell chemokine 1 (CCL18); BRAK, breast and kidney chemokine (CXCL14). CLA, cutaneous lymphocyte antigen for skin homing;  $\alpha_4\beta_7$ , integrin for gut homing. Die systematische Nomenklatur kann unter <http://cytoline.medic.kumamoto-u.ac.jp/> abgerufen werden. Die Bezeichnung „memory T-Zelle“ bezeichnet Gedächtnis-T-Zellen<sup>19</sup>.*

## 2 NKT-Zellen

NKT-Zellen nehmen eine Zwischenstellung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem ein, da sie einerseits einen T-Zellrezeptor (TCR) tragen, andererseits aber Marker von Natürlichen Killerzellen (NK) exprimieren.

### 2.1 Definition

Natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) sind eine Subpopulation von T-Zellen, die zu weniger als 1 % der Lymphozyten im peripheren Blut vorkommen und phänotypische sowie funktionelle Charakteristika sowohl von Natürlichen Killerzellen (NK) als auch von herkömmlichen T-Lymphozyten aufweisen<sup>27-29</sup>. Sie sind in Knochenmark, Milz, Leber, Lymphknoten, Thymus und in der Lunge zu finden<sup>28,30</sup>. In infizierten Geweben wurde ein gehäuftes Auftreten von NKT-Zellen beobachtet<sup>31</sup>. NKT-Zellen wurden ursprünglich in Mäusen als NK1.1<sup>+</sup> Zellen mit einer monoklonalen T-Zell-Rezeptor  $\alpha$ -Kette definiert, die in den meisten Fällen mit V $\beta$ 8 gepaart ist und durch  $\alpha$ -Galaktosylceramid in Verbindung mit CD1d aktiviert werden<sup>28</sup>. Humane NKT-Zellen lassen sich über ihren TCR, dessen V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18-Kette vorwiegend mit einer V $\beta$ 11-Kette gepaart ist<sup>32,33</sup> sowie über ihre Reaktivität gegenüber  $\alpha$ -Galaktosylceramid in Verbindung mit CD1d-Molekülen identifizieren<sup>34,35</sup>. Als weiteres eindeutiges Charakteristikum fehlt NKT-Zellen die N-Region, die bei herkömmlichen T-Zellen beim Rearrangement des TCR zwischen den V- und J-Segmenten eingebaut wird<sup>36</sup> (siehe 2.1.1).

#### 2.1.1 Rearrangement der TCR-Gene

Die Gene für die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten, die aus unterschiedlichen Segmenten bestehen, werden während der Entwicklung durch somatische Rekombination verknüpft. Für die  $\alpha$ -Kette gibt es etwa x V $\alpha$ -Segmente und y J $\alpha$ -Segmente. Es werden jeweils ein V $\alpha$ - und ein J $\alpha$ -Segment zufällig zusammengelagert, so dass ein funktionelles Exon für die variable Region entsteht.

Anschließende Transkription und Spleißen des  $VJ_{\alpha}$ -Exons an das  $C_{\alpha}$ -Exon ergeben eine reife mRNA, die zum  $\alpha$ -Kettenprotein des TCR translatiert wird (Abbildung 7). Für die  $\beta$ -Kette werden 3 Gensegmente,  $V_{\beta}$ ,  $J_{\beta}$  und  $D_{\beta}$  zu einem funktionellen Exon zusammengelagert, das transkribiert und an  $C_{\beta}$  gespleißt wird. Die auf diese Weise entstandene mRNA wird dann zum  $\beta$ -Kettenprotein des TCR translatiert<sup>37</sup> (Abbildung 7). An dieser somatischen Rekombination der TCR-Gene, die in ähnlicher Form bei den Immunglobulin-Genen abläuft, ist eine komplexe Maschinerie von Enzymen beteiligt, von denen die bekanntesten RAG1 und RAG2 sind<sup>37</sup>. Der Rekombinationsvorgang erlaubt die Verknüpfung von V-, D- und J- Gensegmenten, wobei der Zufall eine große Rolle bei der Auswahl der Segmente spielt. Ein wichtiger Beitrag zum Zustandekommen des großen Repertoires an TCR ist das Auftreten zusätzlicher Nucleotide an den Verbindungsstellen der V/D-, V/J- und D/J-Segmente, die nicht in der Keimbahn kodiert werden. Diese Nucleotide, die man auch als N-Nucleotide bezeichnet, werden durch die Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) eingefügt<sup>38-40</sup>. Bei der Rekombination der jeweiligen Gensegmente entstehen unter Vermittlung des RAG-Proteinkomplexes zunächst einzelsträngige Enden an der codierenden DNA, sogenannte P-Nucleotide. Alle nicht gepaarten Basen werden durch Reparaturenzyme abgeschnitten, verbliebene einzelsträngige DNA wird mit komplementären Nucleotiden aufgefüllt und die DNA schließlich mit den P-Nucleotiden ligiert<sup>11,38</sup>. Bei konventionellen T-Zellen treten P- und N-Nucleotide zwischen den V- und J-Segmenten *aller* umgeordneten  $TCR\alpha$ -Gene auf<sup>41</sup>. Zusammen mit den Möglichkeiten der unpräzisen Verknüpfung der Segmente, der Einfügung eines D-Segments, sowie der Möglichkeit verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten zu kombinieren, erklärt dies die enorme Vielfalt der T-Zell-Rezeptoren<sup>42</sup>. Der hier im Mittelpunkt stehende T-Zell-Subpopulation, nämlich die der NKT-Zellen, enthält nur in äußerst seltenen Fällen eine N-Region in der  $\alpha$ -Kette<sup>33,43,44</sup>. Die  $\alpha$ -Kette von NKT-Zellen ist somit monoklonal.

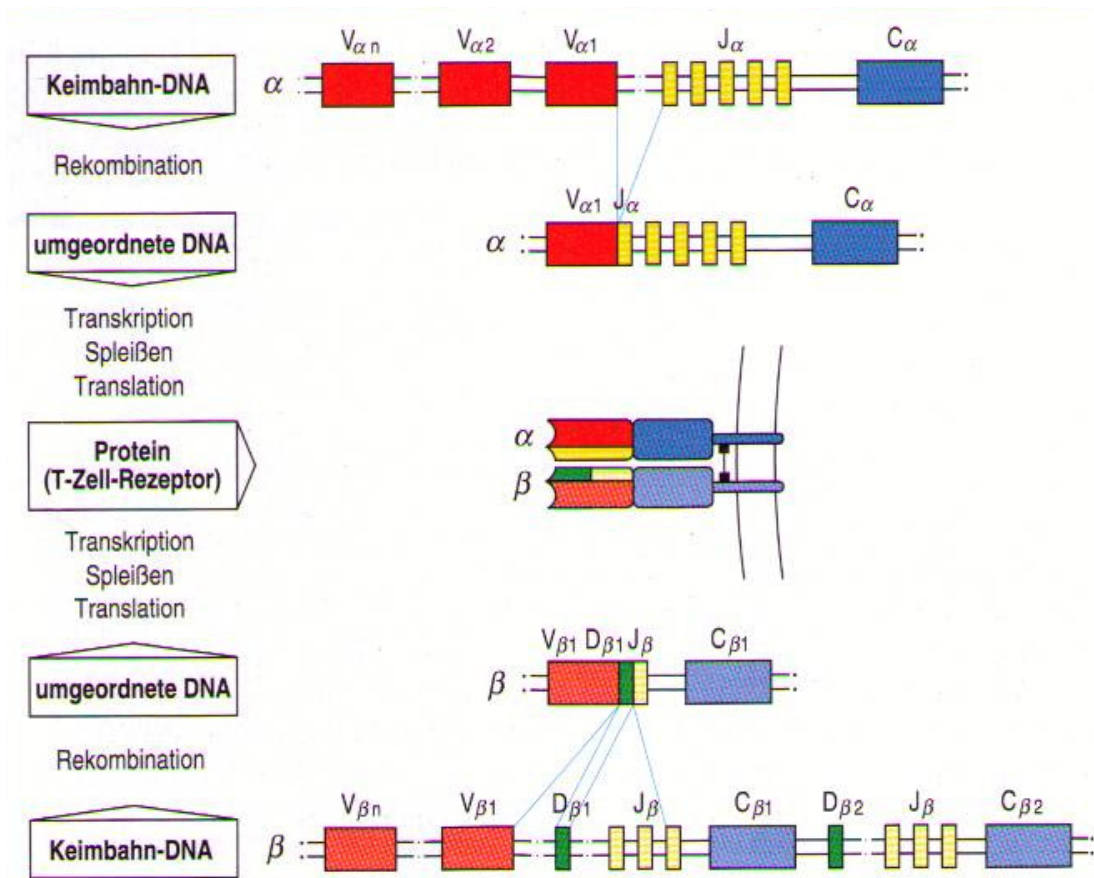


Abbildung 7: Rearrangement der TCR-Gene <sup>41</sup>

Keimbahn-DNA für  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des TCR. Zur Bildung der  $\alpha$ -Kette werden durch somatische Rekombination aus etwa 80  $V_{\alpha}$ -Segmenten und ca. 60  $J_{\alpha}$ -Segmenten jeweils ein  $V_{\alpha}$ -Segment mit einem  $J_{\alpha}$ -Segment zusammengelagert. Zusammen bilden sie ein funktionelles Exon. Durch Umschreiben (Transkription) und Zuschneiden (Splicing) des  $VJ_{\alpha}$  Exons an das  $C_{\alpha}$ -Segment entsteht die mRNA, die daraufhin zum  $\alpha$ -Kettenprotein übersetzt wird (Translation). Für die Bildung der  $\beta$ -Kette werden 3 Gensegmente,  $V_{\beta}$ ,  $J_{\beta}$  und  $D_{\beta}$  zu einem funktionellen Exon zusammengelagert und danach zum  $\beta$ -Kettenprotein translatiert.  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette bilden zusammen das Heterodimer des  $\alpha\beta$  T-Zell-Rezeptors <sup>11</sup>.

## 2.2 Einteilung

Humane NKT-Zellen werden in 3 Subpopulationen unterteilt:

1. CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen.
2. CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen, die nur in Menschen und Primaten zu finden sind. Mäuse scheinen diesen Subtyp nicht zu besitzen. CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen bilden den geringsten prozentualen Anteil der NKT-Zellen im Menschen <sup>45</sup>.
3. CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> NKT-Zellen, die auch doppelt negative oder DN NKT-Zellen benannt werden. Sie steuern den größten Anteil an NKT-Zellen im peripheren Blut bei.

Bei Erwachsenen weisen NKT-Zellen einen aktivierten Phänotyp (CD45RO<sup>+</sup> CD45RA<sup>-</sup> CD62L<sup>-</sup>) auf und sind in der Lage nach Stimulation Zytokine sehr schnell und in großen Mengen zu sezernieren <sup>45,46</sup>. Dies deutet neben ihren phänotypischen Eigenschaften auf eine Zuordnung zum angeborenen Immunsystem hin <sup>46</sup>.

## 2.3 Oberflächenmarker von NKT-Zellen

NKT-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche sowohl einen T-Zell-Rezeptor (TCR) als auch NK-Zell-Marker wie  $\alpha$ 2-Integrin, CD122 oder CD161 (analog zu NK1.1 bei Mäusen). CD161 gehört zur Familie der C-Typ-Lektine und ist hauptsächlich an der Oberfläche von Natürlichen Killerzellen vorzufinden <sup>28</sup>. Die ursprüngliche Annahme, dass alle NKT-Zellen CD161 positiv sind, ist heute widerlegt <sup>47</sup>. Da auch bei konventionellen T-Lymphozyten und virusspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung eine CD161-Expression induziert werden kann, scheidet dieser Marker als eindeutiges Charakteristikum für NKT-Zellen aus <sup>29,48</sup>. Dagegen ist der TCR von NKT-Zellen hochspezifisch. Im humanen System besteht der TCR wie oben dargestellt (2.1.1) aus einer invarianten V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18-Kette, die mit einer V $\beta$ 11-Kette gepaart ist <sup>49</sup>. Mit diesem TCR erkennen NKT-Zellen ihre Antigene, die über das Molekül Klasse I-ähnliche CD1d präsentiert werden. Dabei weisen sie vor allem eine Reaktivität gegenüber Lipidmolekülen wie  $\alpha$ -Galaktosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) auf <sup>50,51</sup>. Mausmodelle, denen CD1d oder

die  $\alpha$ -Kette des TCR fehlen, besitzen keine NKT-Zellen<sup>27</sup>. Somit sind NKT-Zellen eindeutig über ihre TCR  $\alpha$ -Kette und ihre Reaktivität gegenüber CD1d identifizierbar<sup>51,52</sup>.

NKT-Zellen exprimieren abhängig von ihrer Gewebelokalisation verschiedene Chemokinrezeptoren (CKR). So sind beim Erwachsenen die meisten NKT-Zellen, die sich in Geweben außerhalb von Lymphknoten befinden CCR1<sup>+</sup>, CCR2<sup>+</sup>, CCR5<sup>+</sup>, CXCR3<sup>+</sup> und CXCR6<sup>+</sup>. Darüber hinaus ist CXCR4 auf einem großen Teil der NKT-Zellen zu finden<sup>53,54</sup>. CCR7, der für das Wanderungsverhalten der NKT-Zellen in lymphatische Gewebe verantwortlich ist, kann nur auf 20 % der adulten NKT-Zellen nachgewiesen werden, hingegen auf allen naiven T-Zellen und vielen Gedächtnis-Zellen<sup>55,56</sup>. Einige der Chemokinrezeptoren werden von verschiedenen NKT-Subpopulationen unterschiedlich stark exprimiert. So ist CCR4 überwiegend auf CD4<sup>+</sup>NKT-Zellen vorhanden, während CD8<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen einen CCR1-, CCR6- und CXCR6-positiven Phänotyp aufweisen<sup>54,57</sup>. Aufgrund des unterschiedlichen Phänotyps der NKT-Zellen ist in Analogie zu klassischen T-Zellen eine differenzierte Effektorfunktion verschiedener NKT-Subpopulationen bei der Immunregulation zu vermuten. So konnte bei CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>- T-Lymphozyten gezeigt werden, dass die CKR-Expression unmittelbar mit der Zytokinproduktion assoziiert ist<sup>58</sup>. Dabei korrelierte auf CD4<sup>+</sup>- T-Zellen die IL-4-Produktion mit einer CCR4-Expression, wohingegen eine IFN $\gamma$ -Ausschüttung mit der Expression von CXCR3 in Verbindung gebracht wurde. Auch CCR2, CCR5 und CXCR6 werden überwiegend von IFN $\gamma$  produzierenden T-Zellen exprimiert<sup>59</sup>. Auch für NKT-Zellen wurde ein deutlich unterschiedliches Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren festgestellt<sup>54,59-61</sup>.

## **2.4 CD1d-abhängige Antigenerkennung**

CD1d Moleküle wurden erstmals in Zusammenhang mit der Präsentation von bakteriellen Lipidantigenen in den achtziger Jahren beschrieben. Sie ähneln vom Aufbau her MHC-I Molekülen, jedoch liegen ihre Gene außerhalb der MHC-Region. Es existieren bislang 5 bekannte CD1 Moleküle (a-e) beim Menschen. CD1a, b und c sind mittlerweile gut charakterisiert und präsentieren einige autologe Antigene wie Gangloside und Phospholipide<sup>62,63</sup>. CD1d ist ein den MHC Klasse-I Molekülen ähnliches Molekül, das in einer tiefen,

hydrophoben Tasche Antigene bindet und diese bestimmten T-Zell-Subpopulationen wie  $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen präsentiert (Abbildung 8) <sup>34</sup>. Die präsentierten Antigene sind vorwiegend Lipide und Glycolipide. Nach einer CD1d abhängigen Aktivierung von NKT-Zellen kommt es innerhalb von 1-2 Stunden zu einer massiven Zytokinproduktion <sup>11,64</sup>. CD1d wird bei Mäusen auf B- und T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen exprimiert <sup>65</sup>.

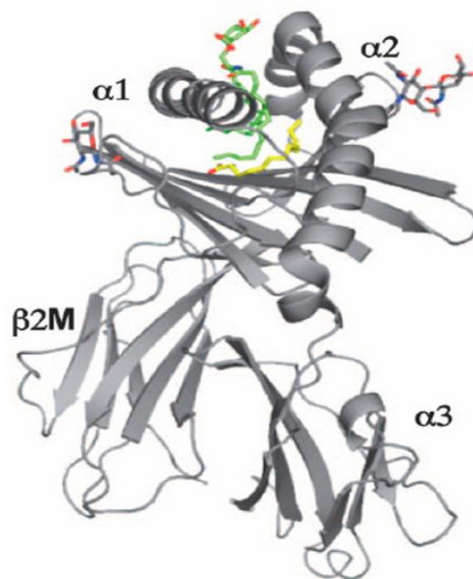


Abbildung 8: Vorderansicht des CD1d-Molekül (nach D. Wu et al., 2006) <sup>66</sup>. Es besteht wie die MHC-I-Moleküle aus einer schweren Kette mit 3 Domänen ( $\alpha 1$ -  $\alpha 3$ ) und einem  $\beta 2$ -Mikroglobulin.

## 2.5 Liganden

Der erste bekannte, später synthetisch hergestellte Ligand der NKT-Zellen war  $\alpha$ -Galaktosylceramid (Abbildung 9), welches ursprünglich aus dem marinen Schwamm *Agelas mauritanus* gewonnen wurde <sup>50,67,68</sup>.

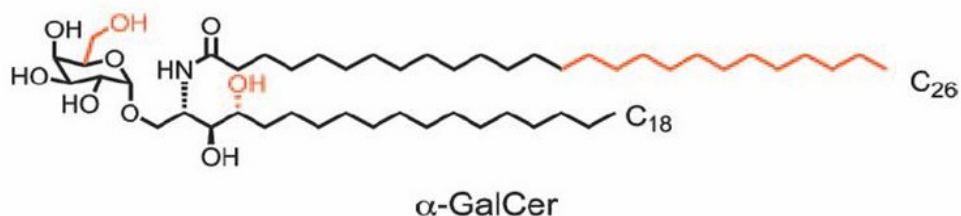


Abbildung 9:  $\alpha$ -Galaktosylceramid (nach D. Wu et al., 2006) <sup>66</sup>



2004 wurde Isoglobotrihexosylceramid (iGb3) als erster lysosomaler endogener Ligand identifiziert, der für die Entwicklung der NKT-Zellen im Thymus entscheidend zu sein scheint, jedoch nicht in der Lage ist, NKT-Zellen im gleichen Maße wie  $\alpha$ -GalCer zu aktivieren<sup>69,70</sup>. 2005 gelang es Mattner et al. eine Aktivierung von NKT-Zellen durch bakterielle Glykosylceramide aufzuzeigen<sup>71</sup>. Es gibt Hinweise darauf, dass iGb3 als endogener Ligand bei Infektionen durch gramnegative Bakterien involviert ist, indem es mit CD1d einen Komplex bildet<sup>71,72</sup>. Doch gibt es auch Anhaltspunkte dafür, dass eine Aktivierung durch LPS-negative Bakterien wie *Sphingomonas* oder *Ehrlichia spp.* möglich ist<sup>73-75</sup>, sofern wie in den genannten Bakterienstämmen Glykosylceramide vorhanden sind, die von Dendritischen Zellen (DC) über CD1d präsentiert werden können.

## 2.6 Funktionen

NKT-Zellen unterscheiden sich von anderen T-Lymphozyten dadurch, dass sie nicht mit von MHC-Molekülen präsentierten Peptidantigenen interagieren, sondern Glykolipide erkennen, die von CD1d präsentiert werden. Gemeinsam ist ihnen die identische Entwicklung im Thymus bis zum CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>- Stadium <sup>76</sup>.

Aktiviert NKT-Zellen haben sowohl Perforin-abhängige als auch FasL-abhängige zytotoxische Funktionen, welche über die Erkennung von spezifischen Antigenen durch ihren TCR induziert werden <sup>77</sup>. Wesentlich ist ihre immunregulatorische Funktion, die u.a. durch die schnelle Zytokin-Ausschüttung ausgeübt wird <sup>27,64</sup>. Dabei schütten NKT-Zellen sowohl Th1-Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als auch Th2-Zytokine wie IL-4 und IL-13 aus <sup>78-80</sup>. Dies erscheint paradox, da normalerweise eine Th1-Antwort eine Th2-Aktivierung unterdrückt und umgekehrt <sup>3</sup>. Durch diese einzigartige Eigenschaft der NKT-Zellen, beide Immunantworten zu stimulieren, können sie vermutlich sowohl Th1- als auch Th2-Immunantworten regulieren. <sup>54,81-85</sup>. Stetson und Matsuda konnten 2003 am Mausmodell aufzeigen, dass zumindest geringe Mengen IL-4 und IFN $\gamma$  bereits in einer Art Ruhezustand in Form von mRNA noch vor TCR-Aktivierung vorliegen, so dass sie nach Aktivierung des TCR in kürzester Zeit ausgeschüttet werden können <sup>86,80</sup>. Nach Aktivierung regulieren murine NKT-Zellen ihre TCR schnell herab und gehen innerhalb von 3-4 Tagen in Apoptose <sup>87-89</sup>. Die auslösenden Faktoren für die Polarisierung der Zytokinproduktion von NKT-Zellen sind bislang unbekannt und stellen aufgrund des zu erwartenden hohen therapeutischen Nutzens durch ein entsprechendes mögliches Eingreifen in diese Regulation weiterhin eine große Herausforderung an die Forschung dar <sup>90</sup>.

Es gibt Hinweise darauf, dass NKT-Zellen an Autoimmunerkrankungen wie Diabetes Typ I, Multipler Sklerose (MS) oder Lupus beteiligt sind <sup>91</sup>. Beim Typ I Diabetes in NOD-Mäusen konnte eine verringerte Anzahl von NKT-Zellen nachgewiesen <sup>92-94</sup> und die protektive Auswirkung einer durch NKT-Zellen hervorgerufenen Th2-Antwort gezeigt werden <sup>95,96</sup>. Durch wiederholte Gabe von  $\alpha$ -GalCer erfolgte eine Inhibition der IFN $\gamma$ -Produktion, jedoch kein vermehrtes Agieren der NKT-Zellen durch IL-4 <sup>97</sup>. Die protektive Th2-Ausrichtung zeigte sich auch bei Patienten mit MS in Remission <sup>98</sup>.

Weiterhin konnte aufgezeigt werden, dass NKT-Zellen bedeutend für die Suppression einiger Tumoren sind <sup>99,100</sup>. So wurde beispielsweise beim fortgeschrittenen Prostatakarzinom ein Zusammenhang bezüglich des Krankheitsstadiums und einer stark verringerten IFN $\gamma$ -Produktion von NKT-Zellen demonstriert <sup>101</sup>.

Auch gibt es Indizien, dass NKT-Zellen an der Abwehr von Bakterien, Viren und Parasiten partizipieren, jedoch werden einige dieser Beobachtungen zum gegenwärtigen Zeitpunkt kontrovers diskutiert <sup>27,102-107</sup>. Eine Beteiligung der NKT-Zellen wird auch im Zusammenhang mit Asthma und Allergien vermutet <sup>108,109</sup>.

### 3 Vergleich adulter mit fetalen NKT-Zellen

Das Immunsystem eines Neugeborenen befindet sich zum Zeitpunkt der Geburt bezüglich der spezifischen sowie der unspezifischen Immunität in einem unreifen Zustand. Erst nach circa sechs Lebensmonaten reift die Immunantwort des Säuglings aus. Da die T-Lymphozyten *in utero* nur geringen Antigenkontakt haben, liegen sie zu Beginn überwiegend naiv vor. Von Geburt an reifen schließlich immer mehr T-Zellen durch Antigenexposition zu Effektor- und Gedächtniszellen, so dass im Erwachsenenalter nur noch circa 5 % naive T-Zellen im peripheren Blut vorkommen. Delespesse et al. führen den Immunstatus des Neugeborenen auch auf eine verminderte Reifung neonataler APCs und eine Reduktion hinsichtlich der Freisetzung von Th1-Zytokinen zurück wohingegen die intrauterine Exposition gegenüber Progesteron und IL-4, die durch die Plazenta in großen Mengen produziert werden, das Th1/Th2-Gleichgewicht in Richtung Th2 verschiebt<sup>110-112</sup>.

Im Gegensatz zu herkömmlichen T-Lymphozyten gibt es Hinweise darauf, dass NKT-Zellen bereits *in utero* aktiviert werden und sich somit zum Zeitpunkt der Geburt bereits in einem aktivierten Zustand befinden<sup>46,113</sup>. Als Grund wird vermutet, dass sie bereits vor Geburt mit einem endogenen Liganden in Kontakt gekommen sind. Sie exprimieren CD25 (IL-2R  $\alpha$ -Kette), das nach Aktivierung der Zellen an der Oberfläche erscheint, jedoch bei adulten NKT-Zellen nicht nachzuweisen ist. Weiterhin exprimieren neonatale NKT-Zellen nicht das Adhäsionsmolekül CD62L (L-Selektin), welches charakteristisch für naive Zellen ist<sup>55,113</sup>.

D`Andrea et al. versuchten im Jahr 2000 die Unterschiede von neonatalen NKT-Zellen im Vergleich zu adulten NKT-Zellen herauszuarbeiten. Dabei kamen sie zu folgenden Schlussfolgerungen <sup>46</sup>:

- fetale Zellen exprimieren im Gegensatz zu adulten NKT-Zellen CD25, was auf eine Aktivierung *in utero* hinweist
- fetale NKT-Zellen sind bezüglich der  $\beta$ -Kette des TCR polyklonal und nicht wie adulte NKT-Zellen diesbezüglich limitiert
- neonatale NKT-Zellen produzieren keine Zytokine nach erstmaliger Stimulation, bei erneuter Stimulation jedoch schon.

D`Andrea schlussfolgerte daraus, dass fetale NKT-Zellen zwar einen aktivierten Phänotyp (CD45RO<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD62L<sup>-</sup>) aufweisen, jedoch zum Zeitpunkt der Geburt noch nicht voll entwickelt sind und erst nach erneutem Antigenkontakt ihren endgültigen Immunstatus erreichen <sup>46</sup>.

## 4 Zielsetzung der Arbeit

NKT-Zellen sind nach dem heutigen Wissensstand zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem anzusiedeln. Es gibt Hinweise darauf, dass NKT-Zellen bereits *in utero* aktiviert werden. Dies deutet darauf hin, dass sie bereits vor der Geburt immunregulatorisch wirken. Über die Funktion fetaler NKT-Zellen ist jedoch wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, fetale und adulte NKT-Zellen phänotypisch und funktionell vergleichend zu untersuchen.

Es ergaben sich im Einzelnen folgende Fragestellungen:

1. Unterscheiden sich die Prozentsätze fetaler und adulter NKT-Zellen innerhalb der Lymphozyten?
2. Unterscheiden sich die Prozentsätze fetaler CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und DN NKT-Zellen gegenüber adulten NKT-Zellen?
3. Welches Chemokinrezeptorexpressionsmuster weisen fetale NKT-Zellen auf?
4. Finden sich alle auf adulten NKT-Zellen vorhandenen Chemokinrezeptoren (CKR) auch auf fetalen NKT-Zellen bzw. umgekehrt?
5. Sind die relativen Häufigkeiten fetaler CKR<sup>+</sup>NKT-Subpopulationen ähnlich wie bei adulten CKR<sup>+</sup>NKT-Subpopulationen?
6. Welche Zytokine werden von fetalen CKR<sup>+</sup>NKT-Subpopulationen sezerniert?
7. Sind die Zytokinsynthesemuster fetaler und adulter CKR<sup>+</sup>NKT-Subpopulationen vergleichbar?

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Glas- und Plastikmaterial

- Reaktionsgefäße Eppendorf
- Plastikspitzen für Mikropipetten Schubert/Pharmacia
- Plastikröhrchen (15 ml/ 50 ml) Falcon BD
- 24-Well-Platten Falcon Falcon BD
- Pipetten (5 ml,10 ml, 25 ml) Sarstedt
- FACS-Röhrchen Falcon Becton & Dickinson
- Einmalplastikpipetten Roth
- Zellkulturflaschen Nunclon Surface 200 ml Nunc
- 10 ml/20 ml Spritzen Discardit II Becton & Dickinson
- 50 ml Spritze Perfusion Becton & Dickinson
- 15 ml/ 50 ml Tubes Greiner Laborbedarf

### 5.1.2 Chemikalien und Puffer

- BicolI Separating Solution (Ficoll) Biochrom AG
- PBS pH 7,2 Gibco Invitrogen
- VLE RPMI 1640 Medium Biochrom AG
- Cellfix Becton & Dickinson
- Saponin DAB Carl Roth GmbH
- Rinderserumalbumin Gibco Invitrogen
- Phorbol12-myristate13-acetate (PMA) Sigma
- Ionomycin Sigma
- Brefeldin A Sigma
- FACS Lysing Solution Becton & Dickinson
- Heparin-Natrium 25 000 I.E./5 ml Braun
- Ethanol Merck
- NaCl 0,9 % Braun
- Aqua bidest. H. Kerndl GmbH



### 5.1.3 Antikörper

In Tabelle 1 sind die verwendeten Antikörper dargestellt.

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Isotyp	Firma
Anti-human CCR2	APC	48607	IgG2B	R&D
Anti-human CCR3	APC	61828	IgG2A	R&D
Anti-human CCR4	APC	205410	IgG2B	R&D
Anti-human CCR5	APC	CTC5	IgG1	R&D
Anti-human CCR6	APC	53103	IgG2B	R&D
Anti-human CCR7	APC	150503	IgG2A	R&D
Anti-human CCR8	APC	191704	IgG2B	R&D
Anti-human CCR9	APC	112509	IgG2A	R&D
Anti-human CXCR3	APC	49801	IgG1	R&D
Anti-human CXCR4	APC	1265	IgG2A	R&D
Mouse IgG2B	APC	133303	IgG2B	R&D
Mouse IgG2A	APC	20102	IgG2A	R&D
Mouse IgG1	APC	11711	IgG1	R&D
Vβ11	Biotin	C21	IgG2a	Beckman-Coulter
Rat IgG2B	APC	141945	IgG2B	R&D
CD8	PerCP-Cy5.5	SK1	IgG1	BD
IL-4	PE	8D4-8	Mouse IgG1	BD
INFy	PE	B27	Mouse IgG1	BD
CD4	APC-Cy7	RPA-T4	IgG1	BD
Va24	FITC	C15	IgG1	Beckman-Coulter
IgG1	FITC	679.1Mc7	IgG1	BD
IgG1	PerCP-Cy5.5	MOPC-21	IgG1	BD
IgG1	PE	MOPC-21	IgG1	BD
IgG1	APC-Cy7	MOPC-21	IgG1	BD
Streptavidin	PE-Cy7			BD

Tabelle 1: verwendete Antikörper

#### 5.1.4 Geräte

- Zentrifuge Rotanta 460 R Hettich
- Waage 1265 MP Sartorius
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorf
- Kühlschrank + 4°C Bosch
- Gefrierschrank -20°C Bosch
- Mischgerät: Vortex-Genie 2 Scientific Industries
- Pipettierhilfe Easypet Eppendorf
- Mikropipetten (0-10µl; 10-100µl; 20-1000µl) Eppendorf
- Durchflußzytometer FACS Canto Becton & Dickinson
- FACS Auswertesoftware Diva Becton & Dickinson
- Brutschrank Typ BB6220 Heraeus Instruments
- Laminair HBB2472 Heraeus Instruments
- XT-1800i (Blutbild) Sysmex
- SPSS 12.0 für Windows SPSS Inc.
- Prism 4,0 GraphPad Software San Diego,  
California
- PC Fujitsu Siemens
- Windows XP Microsoft

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Probanden**

Als Probenmaterial wurde Nabelschnurblut von Neugeborenen und peripheres Blut gesunder erwachsener Spender verwendet. Das Nabelschnurblut wurde freundlicherweise in der Geburtsklinik des 3. Ordens in München von dem dortigen Hebammenteam abgenommen. Ein Ethikvotum zur Arbeit mit Nabelschnurblut lag vor. Einschlusskriterien für die Bearbeitung des Nabelschnurblutes waren:

- keine anderen Entbindungsmodi als vaginale Entbindung
- keine Hinweise auf perinatale Asphyxie (1. APGAR-Wert  $\leq 7$ , NSpH  $< 7,2$ )
- normalgewichtige Kinder
- keine Infektionszeichen bei Mutter oder Kind
- keine erkennbaren Fehlbildungen des Neugeborenen

Die freiwilligen Blutspenden der Erwachsenen stammen von Personen, die im Forschungsgebäude Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals arbeiten. Die Spender waren gesunde, nicht rauchende Erwachsene ohne chronische Erkrankungen oder Allergien.

### **5.2.2 Probengewinnung**

Erwachsenen Spendern wurde jeweils 100 ml Blut in zwei mit Heparin-Natrium benetzten 50 ml Spritzen abgenommen. 50 ml Nabelschnurblut wurde von Hebammen direkt nach der Geburt der Kinder aus der plazentaren Vena umbilicalis in ebenfalls mit Heparin-Natrium benetzten Spritzen abgenommen.

### 5.2.3 Routineblutbild

Mit einem Sysmex XT-1800i wurde ein maschinelles Blutbild von 1 ml der Vollblut-Proben erstellt, anhand dessen die Lymphozytenzahl berechnet und so die Menge der einzusetzenden Antikörper errechnet wurde. Die Nabelschnurblutproben waren zum Zweck der Messung 1:2 mit NaCl 0,9 % verdünnt.

### 5.2.4 Isolierung mononukleärer Zellen aus Vollblut mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Alle Arbeitsschritte wurden steril unter dem Laminar Air Flow (LAF) durchgeführt. Heparinisiertes Erwachsenen-Vollblut wurde mit PBS im Verhältnis 1:2 (v/v), heparinisiertes Nabelschnurblut im Verhältnis 1:5 (v/v) verdünnt. In 50 ml Falcon-Tubes wurde 20 ml Bicoll Separating Solution (Ficoll) vorgelegt. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, dessen Dichte so eingestellt ist, dass Erythrozyten und tote Zellen diese Schicht passieren können und folglich eine Abtrennung dieser Blutbestandteile möglich wird. Dann wurde das Ficoll vorsichtig mit bis zu 30 ml verdünntem Vollblut überschichtet, da ein Vermischen an der Grenzschicht die Auftrennung stört. Zur Ausbildung eines Gradienten wurden die Tubes 20 Minuten bei 2600 RPM ohne Bremse zentrifugiert. Danach ist zwischen der Zuckerlösung und dem PBS ein weißlicher Ring erkennbar, die sogenannte Interphase. Hierbei handelt es sich um die mononukleären Zellen. Oberhalb des Rings befinden sich im PBS überwiegend Thrombozyten, während sich die Erythrozyten aufgrund ihrer Dichte unten im Falcon-Tube befinden. Die Interphase wurde behutsam mit einer 10 ml Pipette abgesaugt und in neue 50 ml Falcon-Tube überführt. Diese wurden dann mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1300 RPM mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde abgekippt und die Lymphozyten-Pellets in insgesamt 2,6 ml RPMI/FCS 10 % aufgenommen.

### 5.2.5 Zelluläre Stimulation

Die T-Zellaktivierung erfolgte über den  $\text{Ca}^{2+}$ /Calcineurin (CaN)- und Proteinkinase C (PKC)-Signalweg. Nach T-Zellrezeptor-Aktivierung erhöht sich die zytosolische Calciumionenkonzentration und es kommt zu einer Aktivierung der  $\text{Ca}^{2+}$ /Calcineurin-

abhängigen Phosphatase CaN. Diese dephosphoryliert das zytosolische Protein NFAT (nuclear factor of activated T-cells), welches daraufhin in den Zellkern wandert und mit weiteren Proteinen u.a. Fos und Jun, die durch die Proteinkinase C induziert werden, die Transkription von Genen reguliert, die für die Immunantwort entscheidend sind. Phorbol12-myristate13-acetate (PMA) ist ein starker Stimulator der PKC, wohingegen Ionomycin den Calciumeinstrom in die Zelle induziert und somit Calcineurin aktiviert.

Praktisch wurde bei der Stimulation so vorgegangen, dass zwei 24-Well-Platten unter dem LAF bereitgelegt wurden und in 44 Wells 923 µl RPMI/FCS 10 % pipettiert wurden. Aufgrund der hohen Zellzahlen in den Nabelschnurblutproben wurden diese in 24-Well-Platten stimuliert. Um eine Vergleichbarkeit zwischen Nabelschnurblut und adultem peripheren Blut zu gewährleisten, wurden die adulten Proben ebenfalls in 24-Well-Platten der Stimulation unterzogen. Die Stimulantien-Vedünnungen wurden immer frisch hergestellt und nach folgendem Protokoll zugegeben:

### Phorbol12-myristate13-acetate (PMA):

PMA lag als Pulver (5 mg) vor und wurde für die Stammlösung in 50 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurde die Stocklösung im bei -20°C gelagert. Zur Stimulation wurde es 1:100 mit RPMI/FCS 10 % verdünnt. Pro Well benötigte man 10 µl, was einer Endkonzentration von 10 ng/ml entsprach.

### Ionomycin:

Ionomycin lag als Pulver (1 mg) vor und wurde für die Stammlösung in 1 ml Ethanol gelöst. Anschließend wurde die Stocklösung im bei 4°C gelagert. Zur Stimulation wurde es 1:10 mit RPMI/FCS 10 % verdünnt. Pro Well wurden 7,5 µl verwendet, was einer Endkonzentration von 0,75 µg/ml entsprach.

Brefeldin A:

Brefeldin A lag als Pulver (5 mg) vor und wurde für die Stammlösung in 1 ml Ethanol gelöst. In einem zweiten Verdünnungsschritt wurden aus der Stammlösung 50 µl entnommen und mit 950 µl Aqua dest. verdünnt. Aus dieser Lösung wurden für die Stimulation 100 µl entnommen und mit 400 µl RPMI/FCS 10 % verdünnt. In jedes Well wurden 10 µl gegeben, was einer Endkonzentration von 10 µg/ml entsprach. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert. Brefeldin A ist ein Proteininhibitor und verhindert die Freisetzung der gebildeten Zytokine aus dem Golgi-Apparat, so dass die Zytokinmenge später intrazellulär bestimmt werden kann.

In zwei zusätzliche Wells wurden nur 950 µl RPMI/FCS 10 % und keine Stimulantien pipettiert, da diese als Negativkontrolle dienten. Anschließend wurden in jedes Well 50 µl der vorbereiteten Lymphozyten-Lösung zupipettiert und die Platten für 3,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

**5.2.6 Färben der NKT-Zellen**

Der Inhalt aller stimulierten Wells wurde in ein 50 ml Falcontube und die beiden unstimulierten Negativkontrollen in je ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden 10 Minuten bei 1300 RPM abzentrifugiert, die Wells nochmals mit je 1 ml PBS/FCS 5 % ausgespült und erneut zentrifugiert. Das Pellet im 50 ml Falcontube wurde in 4400 µl aufgenommen wohingegen die Pellets der beiden Negativkontrollen in jeweils 200 µl resuspendiert wurden.

Während der Zentrifugationszeit wurden 26 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße bereitgestellt, beschriftet und folgende Antikörper, die in Vorversuchen austitriert wurden, zupipettiert (Tabelle 2). Die Menge der zugegeben Antikörper richtete sich nach der Lymphozyten-Zellzahl, die nach Erhalt der Proben mittels eines Blutbilds bestimmt wurde.

<b>Tube No.</b>	<b>FITC 5 µl/10<sup>6</sup> Zellen</b>	<b>PerCP-Cy5.5 5 µl/10<sup>6</sup> Zellen</b>	<b>APC 5 µl/10<sup>6</sup> Zellen</b>	<b>Biotin 4 µl/10<sup>6</sup> Zellen</b>
1	Vα24	CD8	CCR2	Vβ11
2	Vα24	CD8	CCR2	Vβ11
3	Vα24	CD8	CCR3	Vβ11
4	Vα24	CD8	CCR3	Vβ11
5	Vα24	CD8	CCR4	Vβ11
6	Vα24	CD8	CCR4	Vβ11
7	Vα24	CD8	CCR5	Vβ11
8	Vα24	CD8	CCR5	Vβ11
9	Vα24	CD8	CCR6	Vβ11
10	Vα24	CD8	CCR6	Vβ11
11	Vα24	CD8	CCR7	Vβ11
12	Vα24	CD8	CCR7	Vβ11
13	Vα24	CD8	CCR8	Vβ11
14	Vα24	CD8	CCR8	Vβ11
15	Vα24	CD8	CCR9	Vβ11
16	Vα24	CD8	CCR9	Vβ11
17	Vα24	CD8	CXCR3	Vβ11
18	Vα24	CD8	CXCR3	Vβ11
19	Vα24	CD8	CXCR4	Vβ11
20	Vα24	CD8	CXCR4	Vβ11
<b>Isotypkontrolle</b>	IgG1	IgG1	Ms IgG1	
<b>Isotypkontrolle</b>			Ms IgG2A	
<b>Isotypkontrolle</b>			Ms IgG2B	
<b>Isotypkontrolle</b>			Rat IgG2B	
<b>Negativkontrolle 1</b>	Vα24	CD8	CCR oder CXCR	Vβ11
<b>Negativkontrolle 2</b>	Vα24	CD8	CCR oder CXCR	Vβ11

Tabelle 2: Antikörperkombinationen der einzelnen Tubes

## Färbeprotokoll

### Oberflächenfärbung

- Jeweils 200 µl der stimulierten Zellsuspension wurden in Tube No. 1-20 und je 100 µl in die Isotypkontrollen gegeben. Die unstimulierten Zellsuspensionen wurden in die Negativ-Tubes pipettiert. Danach wurden alle Eppendorf-Reaktionsgefäße gevortext und 25 Minuten bei 4°C inkubiert.
- Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml PBS/FCS 5 % (5 Minuten, 3500 x g).
- Die Zellpellets wurden in 150 µl resuspendiert und mit Streptavidin-PE-Cy7 (5µl/ 10<sup>6</sup> Zellen) erneut für 20 Minuten bei 4°C gefärbt. Dabei bindet je ein Fluorochrom PE-Cy7 versehenes Streptavidin-Molekül mit hoher Affinität an 4 Moleküle des Vitamins Biotin, welches seinerseits an Vβ11 gebunden ist. Es handelt sich hierbei um eine sogenannte indirekte Färbemethode. Alle anderen verwendeten Antikörper sind der direkten Färbemethode zuzuordnen.
- Es folgte ein Waschschrift mit 1 ml PBS/FCS 5 % (5 Minuten, 3500 x g).

### Intrazelluläre Färbung

Das Prinzip der intrazellulären Färbung beruht darauf, dass fluoreszenzmarkierte Antikörper die Zellmembran durchdringen und in der Zelle ihre entsprechenden Antigene binden. Hierfür müssen die zu untersuchenden Zellen permeabel für die entsprechenden Antikörper gemacht werden. Dies setzt jedoch eine Fixierung der Zelloberflächen voraus, da das Detergenz zur Permeabilisierung (Saponinlösung) ansonsten die Zellen sowie die bereits gebundenen Oberflächenantikörper zerstören würde. Durch die Fixierung mit para-Formaldehyd (Cellfix, BD) kommt es zu einer Denaturierung und Vernetzung von Proteinen und deren Seitenketten, wodurch die Zellen stabilisiert werden.

Weiterhin wurde das Oberflächenmolekül CD4 ebenfalls erst nach dem Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt gefärbt, da sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass das Tandemfluorochrom APC-Cy7 dieser Prozedur nicht standhält und die Verbindung bricht.



- Zu den Zellen wurde jeweils 500 µl Cellfix gegeben, vorsichtig gemischt und die Zellen exakt 10 Minuten bei Raumtemperatur fixiert.
- Anschließend erfolgte erneut ein Waschschrift mit 1 ml PBS/FCS 5 % (5 Minuten, 3500 x g).
- Durch Zugabe von je 150 µl einer frisch hergestellten 0,5 % igen Saponinlösung (50 mg Saponin DAB mit PBS/FCS 5 % ad 10,0 g) für 10 Minuten bei 4°C wurden die Zellwände der Lymphozyten für die Antikörper zur intrazellulären Färbung permeabel gemacht.
- Folgende direkt markierten Antikörper wurden zupipettiert (Tabelle 3):

<b>Tube No.</b>	<b>APC-Cy7 5 µl/10<sup>6</sup> Zellen</b>	<b>PE 10 µl/10<sup>6</sup> Zellen</b>
1	CD4	IFN $\gamma$
2	CD4	IL-4
3	CD4	IFN $\gamma$
4	CD4	IL-4
5	CD4	IFN $\gamma$
6	CD4	IL-4
7	CD4	IFN $\gamma$
8	CD4	IL-4
9	CD4	IFN $\gamma$
10	CD4	IL-4
11	CD4	IFN $\gamma$
12	CD4	IL-4
13	CD4	IFN $\gamma$
14	CD4	IL-4
15	CD4	IFN $\gamma$
16	CD4	IL-4
17	CD4	IFN $\gamma$
18	CD4	IL-4
19	CD4	IFN $\gamma$
20	CD4	IL-4
<b>Negativ 1</b>	CD4	IFN $\gamma$
<b>Negativ 2</b>	CD4	IL-4

*Tabelle 3: Pipettierschema zur intrazellulären Färbung*

- Schließlich folgte ein Waschschrift mit 1 ml PBS/FCS 5 % (5 Minuten, 3500 x g), eine Resuspendierung der Zellen in 400 µl PBS/FCS 5 % und ein Überführen der Zellsuspensionen in vorbereitete FACS-Tubes. Bei den Nabelschnurproben wurde statt PBS/FCS 5 % 500 µl Erythrozyten-Lysepuffer verwendet, da nicht alle Erythrozyten durch die Dichtegradienten-Zentrifugation entfernt werden konnten.

## **5.2.7 Analyse der NKT-Zellen mittels Durchflußzytometrie (FACS)**

### **5.2.7.1 Prinzip der Durchflußzytometrie**

Die Zellen der Probenflüssigkeit werden von einer Stahlkapillare aufgesaugt und mit Druck auf eine sich verengende Küvette zugeführt. Dort werden sie von einer zellfreien Trägerflüssigkeit umhüllt und beschleunigt, so dass sie wie an einer Perlenkette hintereinander aufgereiht einzeln an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeführt werden. Man nennt diesen Vorgang hydrodynamische Fokussierung. Dabei trifft der Laser auf jede einzelne Zelle. Anhand der Messung des Vorwärtsstreulichts (FSC), des Seitwärtsstreulichts (SSC) und der Fluoreszenz, die für jedes Fluorochrom spezifisch ist und über spezielle Detektoren detektiert wird, ist eine genaue Charakterisierung der einzelnen Zellen möglich. Die Ablenkung des Lichtstrahls ist abhängig von physikalischen Größen wie Größe (FSC), Granularität, Membranstruktur und Refraktionsindex (SSC) der Zelle. Durch exakte Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes mittels des Laserpulses werden diese auf ein höheres Energieniveau katapultiert, von welchem sie kurz danach unter Abgabe von Energie in Form von Photonen wieder auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen. Die freiwerdenden Photonen werden über ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern geleitet, durch Photomultiplier (PMT) elektronisch verstärkt und schließlich von spezifischen Detektoren, sog. Photodioden aufgenommen und in elektrische Signale umgewandelt, welche dann von einer entsprechenden Software ausgewertet und graphisch dargestellt werden können.

### 5.2.7.2 Messung

Der in dieser Arbeit verwendete Durchflußzytometer FACS Canto (BD, Heidelberg) verfügt über sowohl einen Argon-Ionen-Laser (488 nm; blauer Laser), der die Fluoreszenzfarbstoffe FITC, PE, PE-Cy7 und PerCP-Cy5.5 zur Emission von Licht bestimmter Wellenlänge anregt als auch über einen Helium-Neon-Laser (633nm; roter Laser), der die Fluorochrome APC und APC-Cy7 anregt.

<b>Fluorochrom</b>	<b>Max. Anregung</b>	<b>Emission</b>	<b>Farbe</b>
FITC	488 nm	520 nm	Grün
PE-Cy7	488 nm/ 532nm	785 nm	Violett
APC	595 nm/ 633 nm	660 nm	Rot
APC-Cy7	595 nm/ 633 nm	785 nm	Violett
PE	488 nm	575 nm	Gelb
PerCP-Cy5.5	488 nm	695 nm	Dunkelrot

*Tabelle 4: Verwendete Fluorochrome und ihre Charakteristika*

### 5.2.7.3 Auswertung

Für die Auswertung der Messungen wurde das Programm FACS Diva Software der Firma BD verwendet.

#### Auswertungsbeispiel

Als erstes erfolgte die Abgrenzung der Lymphozyten-Population von anderen Zellpopulationen mittels der korrelierten Zweiparameterdarstellung (DotPlot). Dabei wird jede gemessene Zelle als Punkt in einem x, y-Achsen-Diagramm nach Größe und Granularität dargestellt (Abbildung 10).

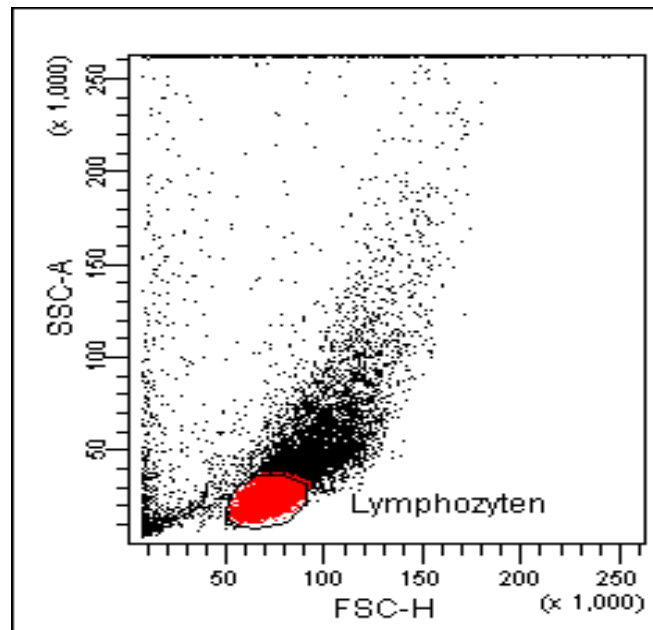


Abbildung 10: Lymphozyteneingrenzung in ficolliertem Blut

Mit Hilfe des BD Diva-Programms wurden in einem neuen elektronischen Fenster nur noch die Lymphozyten angezeigt. Dabei wurden die Achsenparameter Va24-FITC und Vβ11-Biotin-Streptavidin-PE-Cy7 zugrunde gelegt, die die NKT-Zellen charakterisieren und erneut ein Abgrenzungsfenster auf Va24 Vβ11 doppelpositive Zellen (NKT) gesetzt (Abbildung 11).

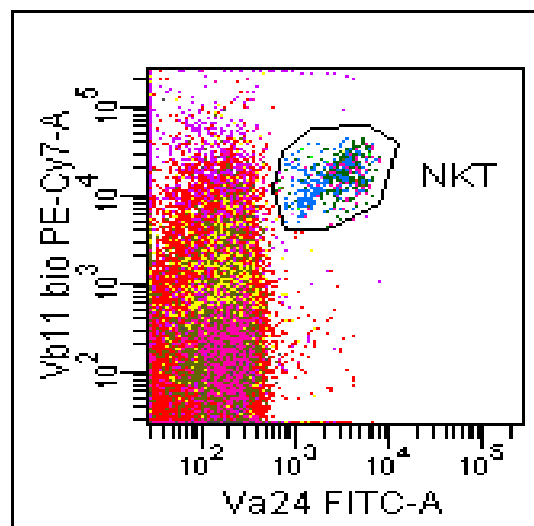


Abbildung 11: Eingrenzung der NKT-Zellen innerhalb der aufgenommenen Lymphozyten

Der nächste Schritt bestand darin, NKT-Zellsubpopulationen anhand der CD4-APC-Cy7 und CD8-PerCP-Cy5.5 Oberflächenproteine zu differenzieren, so dass folgende Subpopulationen abzugrenzen waren: CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen, CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> NKT-Zellen (doppelt negative NKT-Zellen, DN NKT-Zellen). Da NKT-Zellen im Blut nur sehr wenig vorhanden sind und sich eine Abgrenzung dieser Zellpopulation daher schwierig gestaltet, erfolgte zunächst die Abgrenzung in der Lymphozytenpopulation und schließlich eine Übertragung der Grenzwerte in ein neues elektronisches Fenster, das nur noch die NKT-Zellen anzeigte (Abbildung 12).

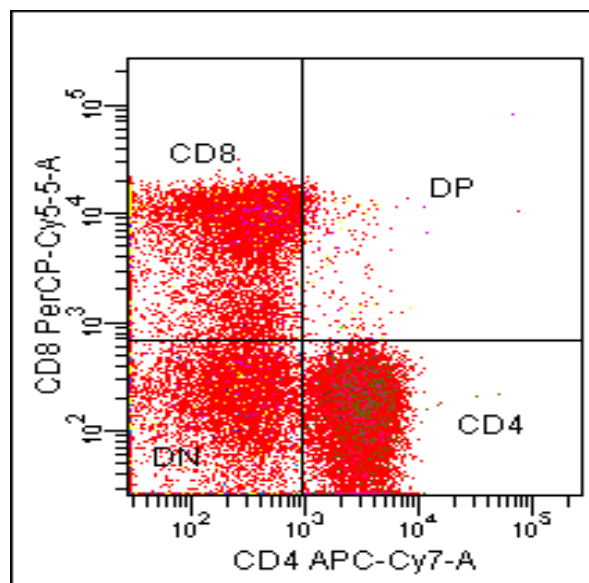


Abbildung 12: Darstellung der CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (DP)- und CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (DN) -Lymphozyten

Die folgenden Auswertungen wurden nur für die CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zell-Population vorgenommen, da diese Subpopulationen den größten prozentualen Anteil der NKT-Zellen ausmachten. Die Frequenz CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen war zu niedrig für weitere Funktionsanalysen. Es wurden die Chemokinrezeptoren-APC, gegen IFN $\gamma$ -PE bzw. gegen IL-4-PE aufgetragen (Abbildung 13). Zur Abgrenzung unspezifischer Bindungen wurden die Isotypkontrollen herangezogen.

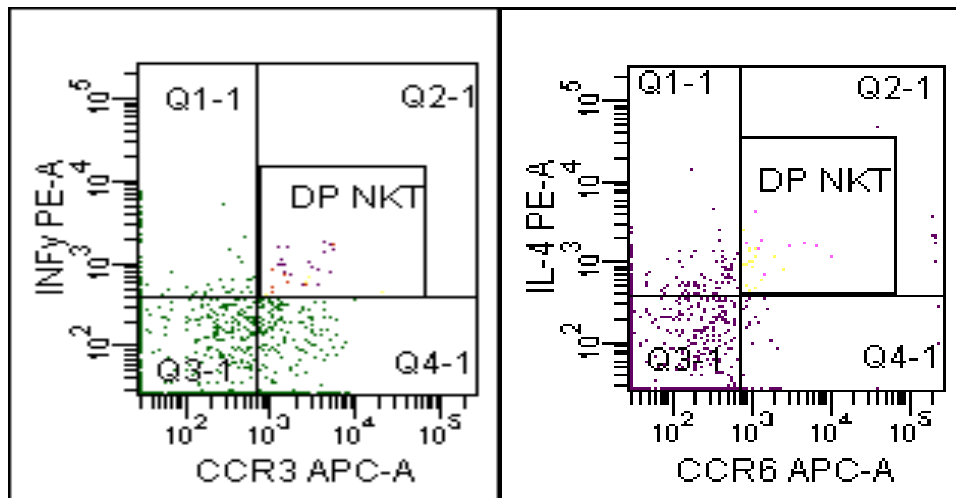


Abbildung 13: beispielhafte Darstellung der  $CCR^+IFN\gamma^+$ - und  $CCR^+IL-4^+$  NKT-Zellen (DP NKT)

### 5.2.7.3.1 Statistik

Die statistische Auswertung wurde mit der Statistiksoftware SPSS 12.0 vorgenommen. Dabei wurde die prozentuale Auswertung des FACS Diva-Programms zugrunde gelegt (Beispiel siehe Abbildung 14).

Population	Parent Name	#Events	%Parent	%Total
P1	All Events	1,946,641	96.0351	96.0351
NKT	P1	1,157	0.0594	0.0571
Q1	NKT	62	5.3587	0.0031
Q2	NKT	9	0.7779	0.0004
DN NKT	NKT	710	61.3656	0.0350
CD4+ NKT	NKT	376	32.4978	0.0185
Q1-1	NKT	265	22.9041	0.0131
Q2-1	NKT	60	5.1858	0.0030
Q3-1	NKT	793	68.5393	0.0391
Q4-1	NKT	39	3.3708	0.0019
DP NKT	NKT	54	4.6672	0.0027
DN NKT AND DP NKT	NKT	17	1.4693	0.0008
CD4+ NKT AND DP NKT	NKT	9	0.7779	0.0004
CD8	P1	184,854	9.4960	9.1195
DP	P1	12,032	0.6181	0.5936
DN	P1	1,286,679	66.0974	63.4767
CD4	P1	463,076	23.7885	22.8453
Cyto+/CCR+	P1	27,114	1.3929	1.3376
alle Cyto+	P1	295,615	15.1859	14.5838
alle CCR+	P1	77,794	3.9963	3.8379
NKT AND CD4	P1	377	0.0194	0.0186
NKT AND DN	P1	721	0.0370	0.0356
NKT AND CD4 AND Cyto+/CCR+	P1	9	0.0005	0.0004
NKT AND DN AND Cyto+/CCR+	P1	22	0.0011	0.0011
CD4 AND alle CCR+	P1	27,981	1.4374	1.3804
CD4 AND alle Cyto+	P1	21,325	1.0955	1.0520
CD4 AND Cyto+/CCR+	P1	5,027	0.2582	0.2480

Abbildung 14: FACS Diva statistische Auswertung

Da bei den untersuchten Patientengruppen keine Normalverteilung zu erwarten war, wurde mit Medianwerten gerechnet. Für Vergleiche innerhalb einer Gruppe wurde der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben herangezogen. Unterschiede zwischen Nabelschnurblut und peripherem Blut Erwachsener wurden mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Proben berechnet. Wenn bei mehr als 5 CKR<sup>+</sup> NKT-Zellen ein Zytokin nachweisbar war und das andere nicht, wurde bei der Berechnung der IFN $\gamma$ /IL-4 Ratio der Wert 0=1 gesetzt. Das Signifikanzniveau wurde mit p<0,05 festgelegt. Die graphische Darstellung erfolgte mit der GraphPad Prism 4,0 Software.

#### 5.2.7.4 Einschlusskriterien zur Auswertung der Proben

Die für die Berechnungen verwendeten Proben mussten nachfolgend dargestellten Anforderungen genügen (Abbildung 15):

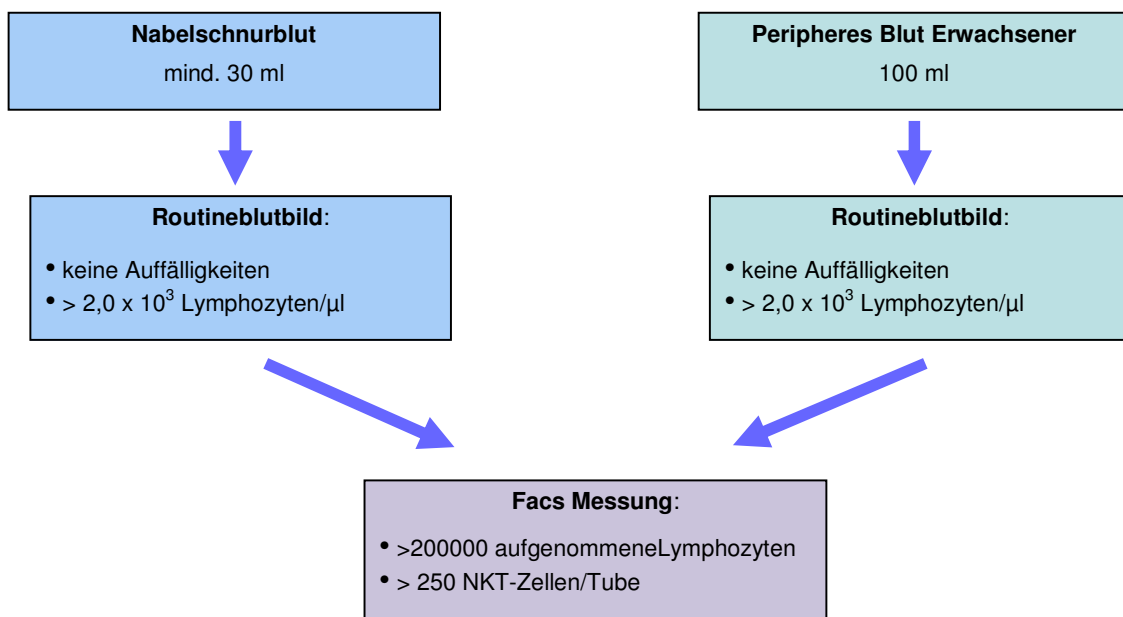


Abbildung 15: Einschlusskriterien zur Auswertung der Proben



## 6 Ergebnisse

### 6.1 Gruppen

#### 6.1.1 Erwachsene

In die Erwachsenenengruppe wurden 12 gesunde Probanden eingeschlossen, welche die oben genannten Selektionskriterien erfüllten. Der Altersmedian betrug 27 Jahre, das Geschlechterverhältnis war ausgewogen. Das Routineblutbild zeigte keine Auffälligkeiten wie eine Leuko- oder Lymphozytose. Eine akute Infektion sowie Allergien wurden anhand der Anamnese ausgeschlossen.

Folgende Parameter wurden erhoben (Tabelle 5):

Alter (in Jahren)	Geschlecht (m/w)	gemessene Anzahl	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	Ratio CD4/CD8	NKT-Zellen (% Lymphozyten)
		Lymphozyten (absolut)	Lymphozyten (% Lymphozyten)	Lymphozyten (% Lymphozyten)		
27 (23-45)	7/5	880439 (208718-2137150)	39,7 (30,7-51,9)	25,8 (20,3-32,6)	1,47 (1,10-2,55)	0,18 (0,03-0,50)

*Tabelle 5: Charakterisierung von Erwachsenen*

*(die angegebenen Werte sind Mediane mit Minimum- und Maximumwerten in Klammern)*

### 6.1.2 Neugeborene

Die Gruppe der Neugeborenen bestand aus 14 gesunden, vaginal entbundenen Kindern. Das Geschlechterverhältnis war ausgeglichen (Tabelle 6).

Geschlecht (m/w)	Gestationsalter (in Jahren)	Gewicht (in g)	Größe (in cm)	APGAR (5 Min)	pH im Blut
7/7	34 (24-42)	3760 (2450-4390)	52 (47-55)	10	7,25 (7,16-7,4)

*Tabelle 6: Charakterisierung der Neugeborenen*

*(die angegebenen Werte sind Mediane mit Minimum- und Maximumwerten in Klammern)*

Die Routineblutbilder wiesen keine Auffälligkeiten auf. Es wurden ebenso wie bei der Erwachsenengruppe die in Tabelle 7 dargestellten Parameter untersucht.

gemessene Anzahl Lymphozyten (absolut)	CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten (% Lymphozyten)	CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten (% Lymphozyten)	Ratio CD4/CD8	NKT-Zellen (% Lymphozyten)
1588350 (504088-2435950)	36,6 (20,2-50,1)	19,7 (8,5-26,1)	1,76 (1,10-3,78)	0,06 (0,04-0,11)

*Tabelle 7: Blutparameter der Neugeborenen*

*(die angegebenen Werte sind Mediane mit Minimum- und Maximumwerten in Klammern)*

### 6.1.3 Vergleich von Erwachsenen mit Neugeborenen

In einem ersten Schritt wurde die Frequenz von Lymphozyten- und NKT-Subpopulationen bestimmt. Dabei beziehen sich die angegebenen Prozentsätze auf die Gesamtzahl gemessener Lymphozyten.

### 6.1.3.1 Vergleich von fetalem mit adultem Blut

Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich mit dem Mann-Whitney-U- Test für die CD8<sup>+</sup>-Lymphozytenpopulation (p=0,003) und für die prozentuale Anzahl an NKT-Zellen bezogen auf die Gesamtlymphozytenzahl (p=0,031). Somit hatten Erwachsene signifikant mehr NKT-Zellen im peripheren Blut als Neugeborene.

Weiterhin wurde ein Vergleich der prozentualen Verteilung der DN- und CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen innerhalb der NKT-Populationen durchgeführt. Hier zeigten sich keine Unterschiede (Tabelle 8).

	CD4 <sup>+</sup> Lymphozyten (% Lymph.)	CD8 <sup>+</sup> Lymphozyten (% Lymph.)	Ratio CD4/CD8	NKT-Zellen (% Lymph.)	DN NKT-Zellen (% NKT-Zellen)	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen (% NKT-Zellen)
<b>EW*</b>	39,7 (30,7-51,9)	25,9 (20,3-32,6)	1,47 (1,10-2,55)	0,18 (0,03-0,48)	58,75 (42,16-85,94)	18,96 (7,55-50,27)
<b>NS*</b>	36,6 (20,2-50,1)	19,7 (8,5-26,1)	1,76 (1,10-3,78)	0,06 (0,02-0,11)	53,94 (24,05-92,09)	32,14 (17,21-63,20)
<b>p-Wert**</b>	p=0,355	<b>p=0,003</b>	p=0,136	<b>p=0,031</b>	p=0,417	p=0,136

Tabelle 8: Vergleich von fetalen und adulten Lymphozyten- und NKT-Subpopulationen.

Die Prozentsätze beziehen sich auf die Gesamtzahl gemessener Lymphozyten. (EW=Erwachsenenblut, NS=Nabelschnurblut; \*die angegebenen Werte sind Mediane mit Minimum- und Maximumwerten in Klammern; \*\*p-Wert: Wilcoxon-Test)

### 6.1.3.2 Vergleich der NKT-Subpopulationen innerhalb der Neugeborenen- und Erwachsenenengruppe

Es wurde ein Intragruppenvergleich der NKT-Subpopulationen bei peripherem Blut Erwachsener und Nabelschnurblut angestellt, um Unterschiede der prozentualen Verteilung von NKT-Subpopulationen zu ermitteln. Dabei waren sowohl die adulten als auch die fetalen DN NKT-Zellen zu einem signifikant höheren Prozentsatz im Blut vorhanden als die CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen (siehe Tabelle 9). Da die Anzahl CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen äußerst niedrig war, war eine sinnvolle Auswertung dieser Zellpopulation nicht möglich.

	Erwachsene	Neugeborene
	58,75	53,94
<b>DN NKT*</b>	(42,16-85,94)	(24,05-92,09)
	18,96	32,14
<b>CD4<sup>+</sup> NKT*</b>	(7,55-50,27)	(17,21-63,20)
<b>p=Wert**</b>	<b>p= 0,006</b>	<b>p= 0,019</b>

Tabelle 9: Prozentsatz an DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen innerhalb aller Lymphozyten bei Neugeborenen und Erwachsenen

(\*die angegebenen Werte sind Mediane mit Minimum- und Maximumwerten in Klammern; \*\*p-Wert: Wilcoxon-Test)

## 6.2 Vergleich der Prozentsätze CKR<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen von Erwachsenen und Neugeborenen

Es wurde eine Überprüfung der Frequenz Chemokinrezeptor exprimierender Lymphozytenpopulationen von Erwachsenen und Neugeborenen durchgeführt, um diesbezüglich auftretende Differenzen zu untersuchen. Dabei wurde neben der Frequenz CKR<sup>+</sup> Lymphozyten weiter die Häufigkeit CKR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten und NKT-Zellen untersucht. Zusätzlich erfolgte eine Differenzierung der NKT-Zellen in DN- und CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen.

### 6.2.1 Prozentsatz CCR2<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung der Frequenz CCR2<sup>+</sup> Zellen ergab weder bei den Lymphozyten noch bei CD4<sup>+</sup>-Zellen und NKT-Zellen signifikante Unterschiede. Auch ließen sich innerhalb der NKT-Subpopulationen keine Differenzen aufzeigen (Tabelle 10 und Abbildung 16).

CCR2	Lymphozyten %	CD4 %	NKT %
EW*	2,68 (1,03-6,25)	1,65 (0,47-4,12)	6,69 (2,19-59,65)
NS*	3,72 (0,73-13,22)	1,77 (0,36-9,07)	6,60 (2,57-38,96)
p-Wert**	0,626	0,807	0,504

Tabelle 10: Prozentsätze CCR2<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen

(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

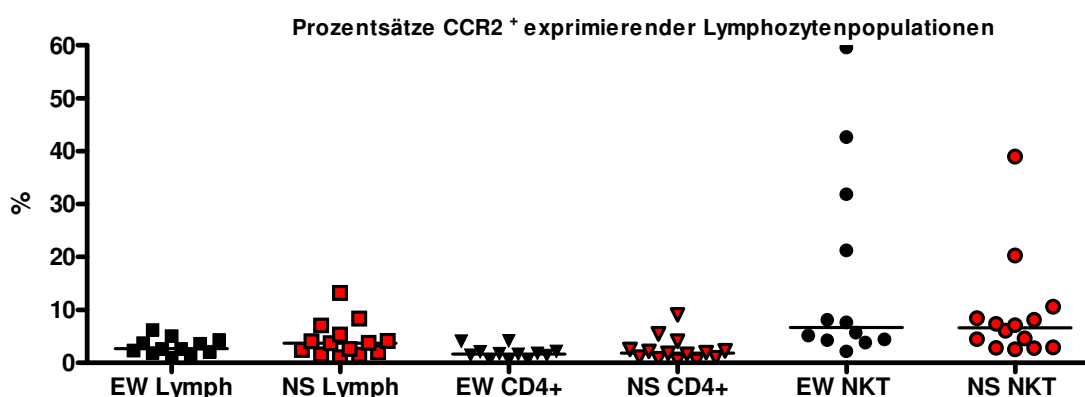


Abbildung 16: Prozentsätze CCR2<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen

(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

Tabelle 11 und Abbildung 17 zeigen die Prozentsätze CCR2<sup>+</sup> exprimierender NKT-Zellsubpopulationen:

CCR2	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
EW*	3,40 (0,86-43,24)	2,67 (0,47-15,21)
NS*	2,61 (1,64-16,47)	1,76 (0,12-16,00)
p-Wert**	0,504	0,090

Tabelle 11: Prozentsätze CCR2<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen

(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### CCR2-Frequenz auf NKT-Subpopulationen

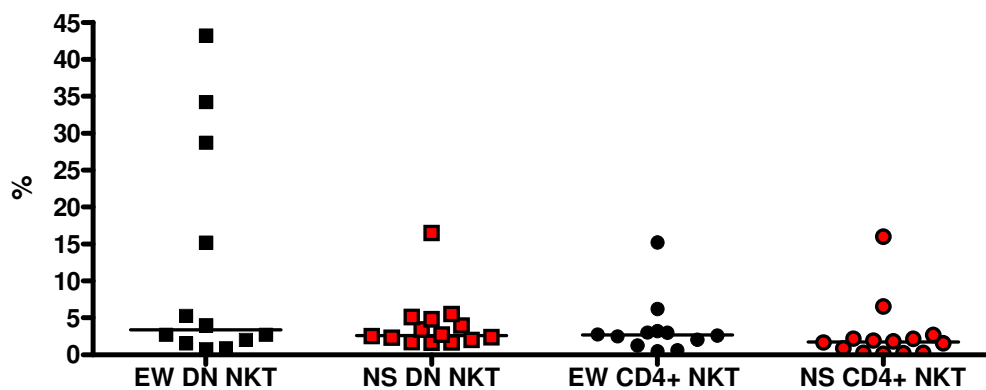


Abbildung 17: Frequenz CCR2<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Populationen

(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.2 Prozentsatz CCR3<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung der CCR3<sup>+</sup> exprimierenden Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

Es konnten keine signifikanten Unterschiede weder bei der Lymphozyten-Subpopulation noch bei der differenzierten Betrachtung der NKT-Fraktionen nachgewiesen werden (Tabelle 12 und Abbildung 18).

<b>CCR3</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	2,96 (0,80-7,31)	1,67 (0,29-4,36)	7,38 (3,64-28,16)
<b>NS*</b>	3,97 (0,64-8,19)	1,76 (0,18-5,30)	6,72 (1,92-30,54)
<b>p-Wert**</b>	0,561	0,961	0,877

Tabelle 12: Prozentsätze CCR3<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

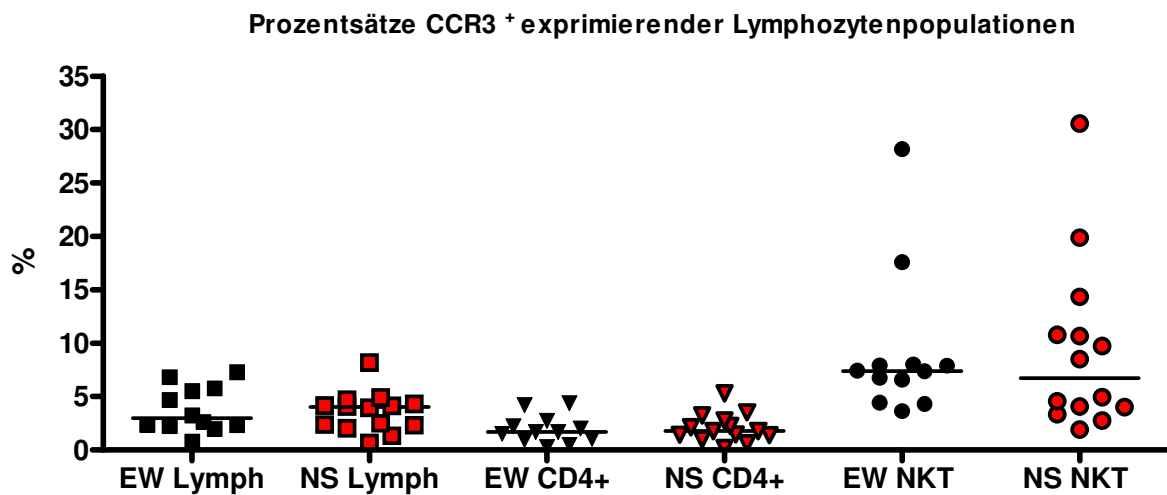


Abbildung 18: Prozentsätze CCR3<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;  
NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

Tabelle 13 und Abbildung 19 zeigen die Prozentsätze innerhalb fetaler und adulter CCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Subpopulationen:

CCR3	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
EW*	2,32 (0,26-12,72)	3,77 (1,28-13,51)
NS*	1,61 (0,14-8,74)	3,73 (0,75-14,90)
<b>p-Wert**</b>	0,959	0,150

Tabelle 13: Prozentsätze CCR3<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)



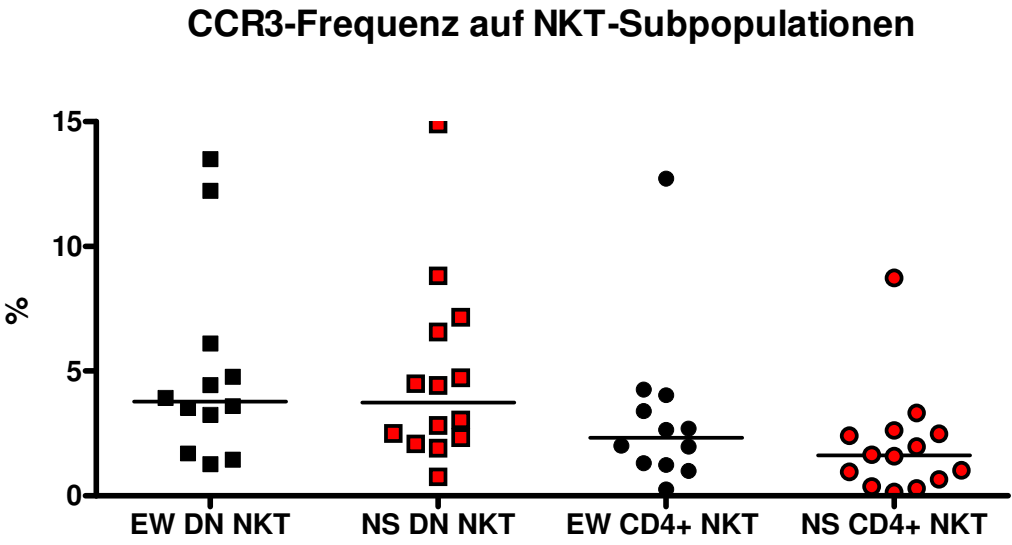


Abbildung 19: Frequenz CCR3<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen (in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.3 Prozentsatz CCR4<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung der Prozentsätze CCR4<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

Der Prozentsatz adulter CCR4<sup>+</sup> Lymphozyten war bezogen auf die Gesamtlymphozytenzahl signifikant höher als bei Nabelschnurblut-Lymphozyten. Umgekehrt waren CCR4<sup>+</sup>NKT-Zellen in fetalem Blut deutlich häufiger als in adultem peripherem Blut (Tabelle 14 und Abbildung 20). Die CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten zeigten keine Unterscheide. Innerhalb der NKT-Subpopulationen waren fetale CCR4<sup>+</sup>DN- und CD4<sup>+</sup>NKT-Zellen deutlich häufiger als adulte CCR4<sup>+</sup>DN- und CD4<sup>+</sup>NKT-Zellen (Tabelle 15 und Abbildung 21).

<b>CCR4</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	5,45 (2,29-11,33)	2,98 (1,32-7,97)	7,73 (2,55-16,62)
<b>NS*</b>	3,97 (1,12-9,25)	1,53 (0,54-5,76)	15,16 (5,87-42,32)
<b>p-Wert**</b>	<b>0,010</b>	0,250	<b>0,006</b>

Tabelle 14: Prozentsätze CCR4<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

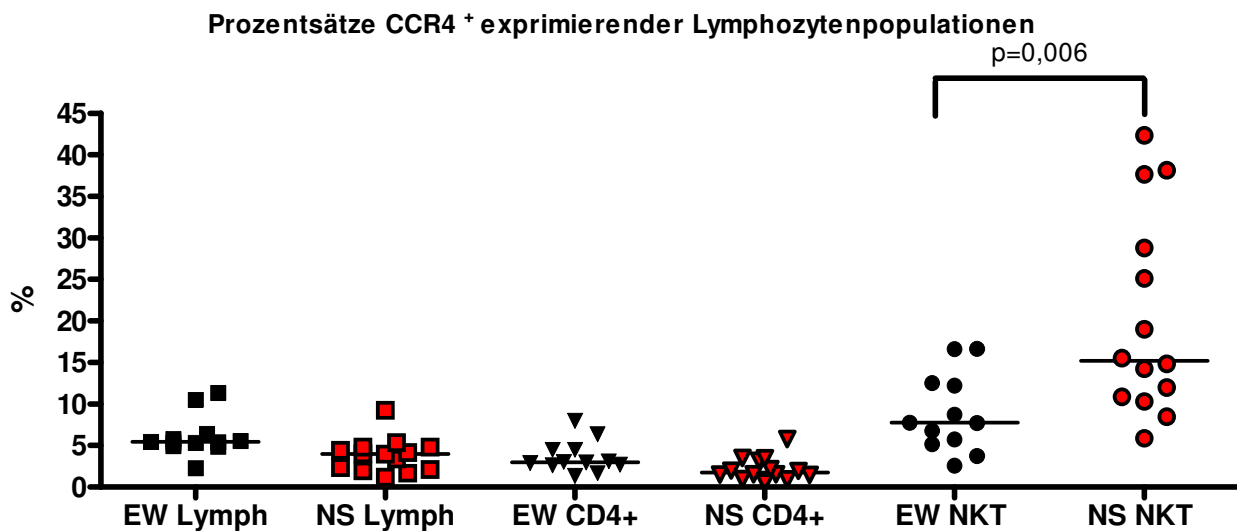


Abbildung 20: Prozentsätze CCR4<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

CCR4	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
<b>EW*</b>	1,92 (0,47-6,29)	4,82 (1,36-13,22)
<b>NS*</b>	3,90 (0,52-18,26)	9,43 (3,96-27,90)
<b>p-Wert**</b>	<b>0,009</b>	<b>0,021</b>

Tabelle 15: Prozentsätze CCR4<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen

(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

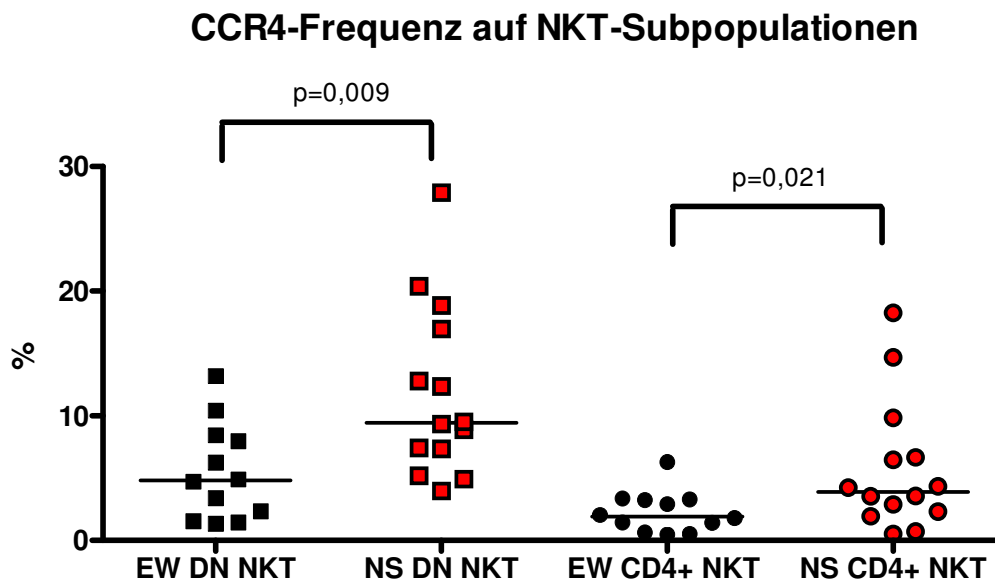


Abbildung 21: Frequenz CCR4<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

#### 6.2.4 Prozentsatz CCR5<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung des Prozentsatzes CCR5<sup>+</sup> Lymphozyten- und NKT-Populationen ergab folgende Ergebnisse:

Es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des CCR5-Prozentsatzes weder bei den Lymphozyten-Subpopulationen (Tabelle 16 und Abbildung 23) noch bei der differenzierten Betrachtung der NKT-Fraktionen beobachtet werden (Tabelle 17 und Abbildung 24).

<b>CCR5</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	2,84 (0,64-6,10)	1,37 (0,23-3,53)	6,13 (1,80-13,23)
<b>NS*</b>	2,75 (0,60-7,83)	1,42 (0,19-5,65)	6,04 (2,90-27,96)
<b>p-Wert**</b>	0,661	0,884	0,918

Tabelle 16: Prozentsätze CCR5<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl; NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl; \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

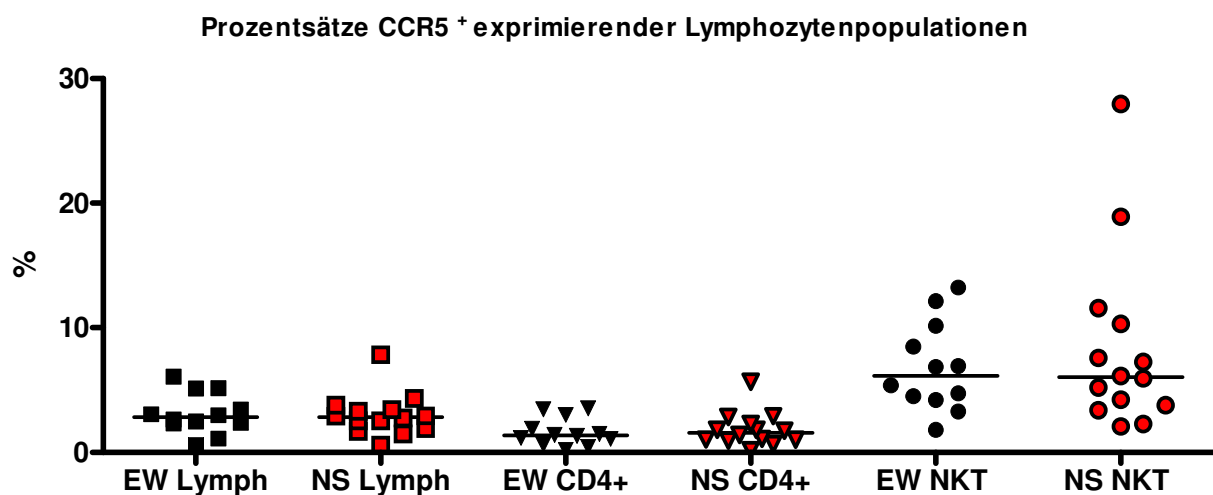


Abbildung 22: Prozentsätze CCR5<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl; NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl; \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

Tabelle 17 und Abbildung 23 zeigen die Frequenz des CCR5 auf den untersuchten NKT-Zellsubpopulationen:

CCR5	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
EW*	2,09 (0,11-5,16)	3,30 (1,04-7,50)
NS*	1,32 (0,22-10,44)	3,37 (0,94-12,88)
p-Wert**	0,681	0,165

Tabelle 17: Prozentsätze CCR5<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

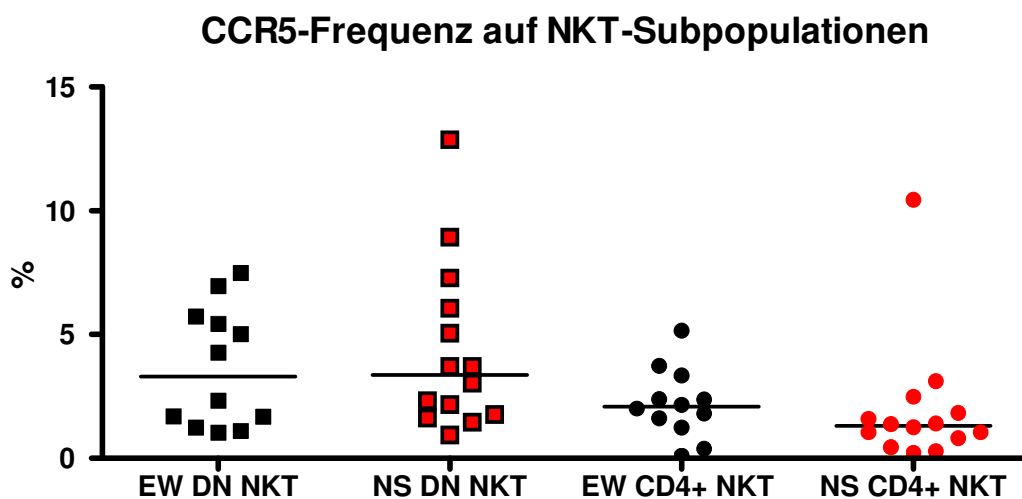


Abbildung 23: Frequenz CCR5<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.5 Prozentsatz CCR6<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung des Prozentsatzes CCR6 exprimierender Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

Die Frequenz von CCR6 positiven CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten war in adultem peripheren Blut signifikant höher als in der Neugeborenen-Vergleichsgruppe, während im Hinblick auf die gemessene Gesamt-Lymphozytenzahl und auf die NKT-Zellen keine Unterschiede bezüglich des Prozentsatzes nachzuweisen waren (Tabelle 18 und Abbildung 24). In den DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Prozentsatzes CCR6 exprimierender NKT-Zellen festgestellt werden (Tabelle 19 und Abbildung 25).

<b>CCR6</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	14,55 (7,48-19,76)	5,84 (2,20-7,74)	15,07 (5,79-53,16)
<b>NS*</b>	12,39 (4,08-24,08)	1,82 (0,87-4,44)	12,73 (5,75-35,99)
<b>p-Wert**</b>	0,440	<b>0,000</b>	0,703

*Tabelle 18: Prozentsätze CCR6<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtl lymphozytenzahl; NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;*

*\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)*

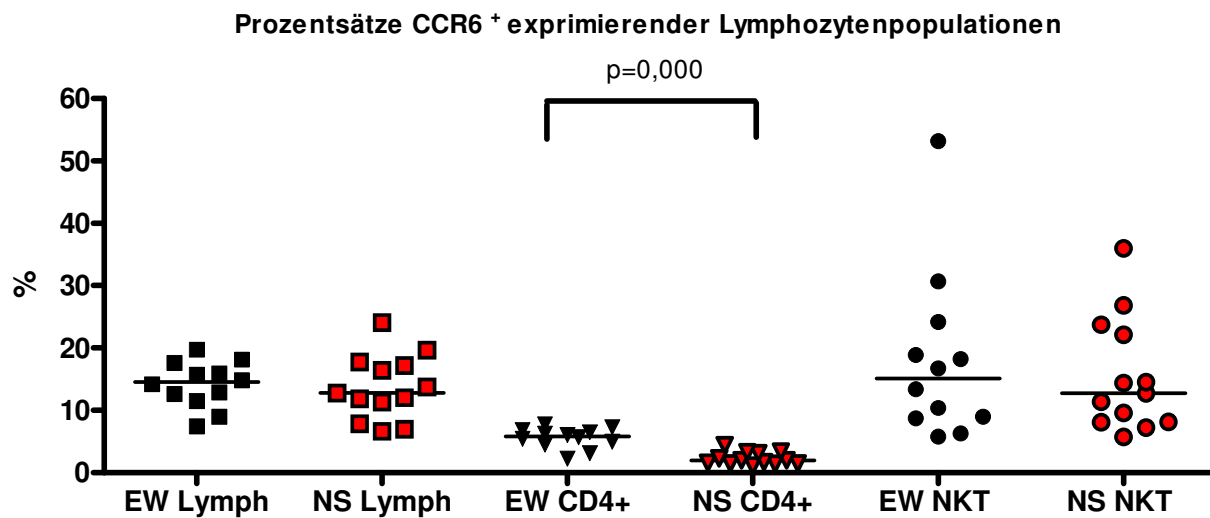


Abbildung 24: Prozentsätze CCR6<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
 (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;  
 NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
 \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

Tabelle 19 und Abbildung 25 zeigen die Frequenz CCR6<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulationen:

CCR6	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
EW*	2,94 (1,04-19,14)	9,52 (3,72-32,14)
NS*	2,40 (0,33-5,72)	8,44 (4,02-25,04)
<b>p-Wert**</b>	0,703	0,480

Tabelle 19: Prozentsätze CCR6<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
 (in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
 \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)



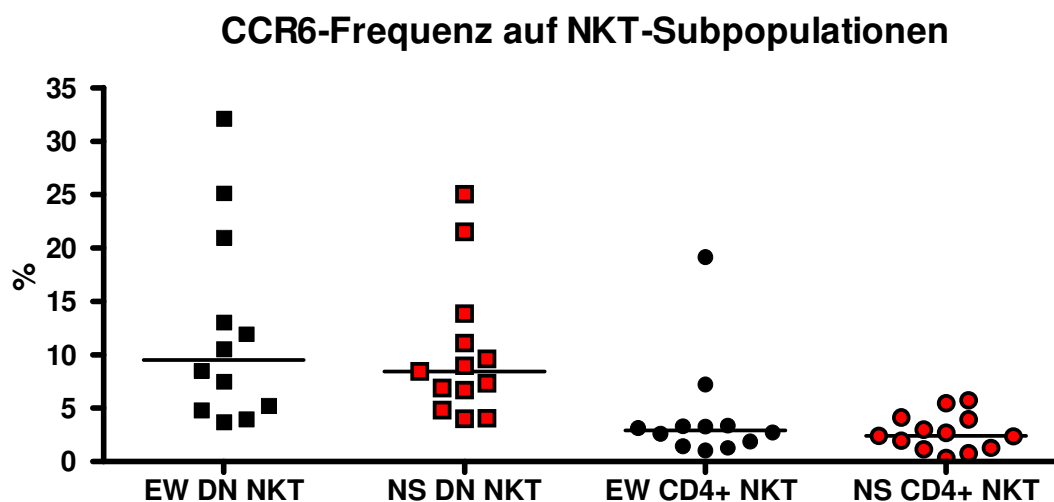


Abbildung 25: Frequenz  $CCR6^+$  Zellen innerhalb fetaler und adulter  $CD4^+$ - und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.6 Prozentsatz $CCR7^+$ exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung des Prozentsatzes  $CCR7^+$  exprimierender Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

$CCR7^+$  NKT-Zellen waren in Nabelschnurblut zu einem signifikant höheren Prozentsatz vertreten als auf adulten NKT-Zellen. Betrachtet man die NKT-Subpopulationen, so zeigte nur die DN NKT-Zellfraktion eine ein ebensolches signifikantes Frequenzmuster (Tabelle 21 und Abbildung 26). Auch hier war ein signifikant höherer Prozentsatz seitens der NKT-Zellen im Nabelschnurblut zu verzeichnen.

Keine Unterschiede waren bei den Lymphozyten und den  $CD4^+$ -Zellen zu sehen (Tabelle 20 und Abbildung 25).

CCR7	Lymphozyten %	CD4 %	NKT %
EW*	2,18 (0,47-4,80)	1,05 (0,23-3,95)	2,43 (0,71-5,87)
NS*	3,27 (0,14-7,77)	1,81 (0,06-5,62)	5,95 (0,98-18,61)
<b>p-Wert**</b>	0,205	0,380	<b>0,007</b>

Tabelle 20: Prozentsätze CCR7<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl; NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl; \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

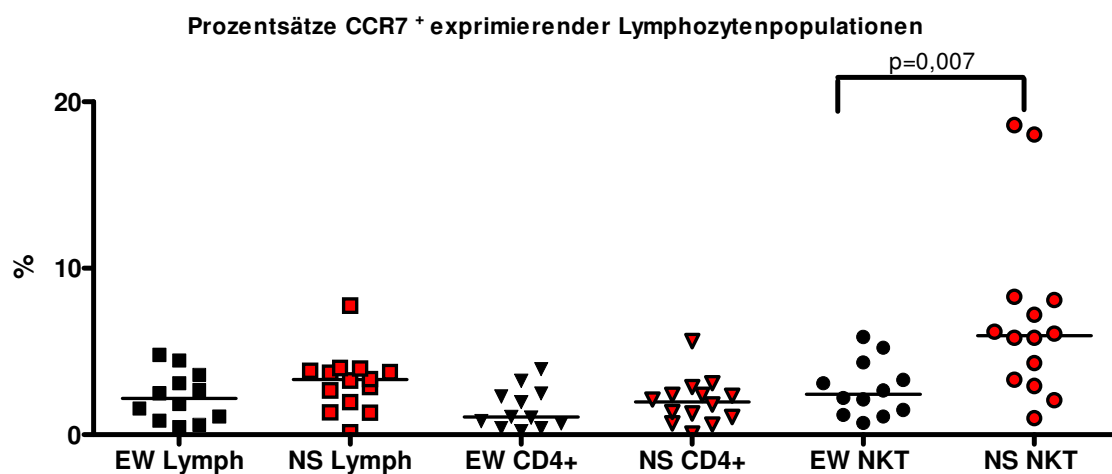


Abbildung 26: Prozentsätze CCR7<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl; NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl; \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

CCR7	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
EW*	0,76 (0,12-4,01)	0,96 (0,09-2,64)
NS*	1,21 (0,21-6,37)	2,88 (0,00-7,68)
p-Wert**	<b>0,001</b>	0,411

Tabelle 21: Prozentsätze CCR7<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### CCR7-Frequenz auf NKT-Subpopulationen

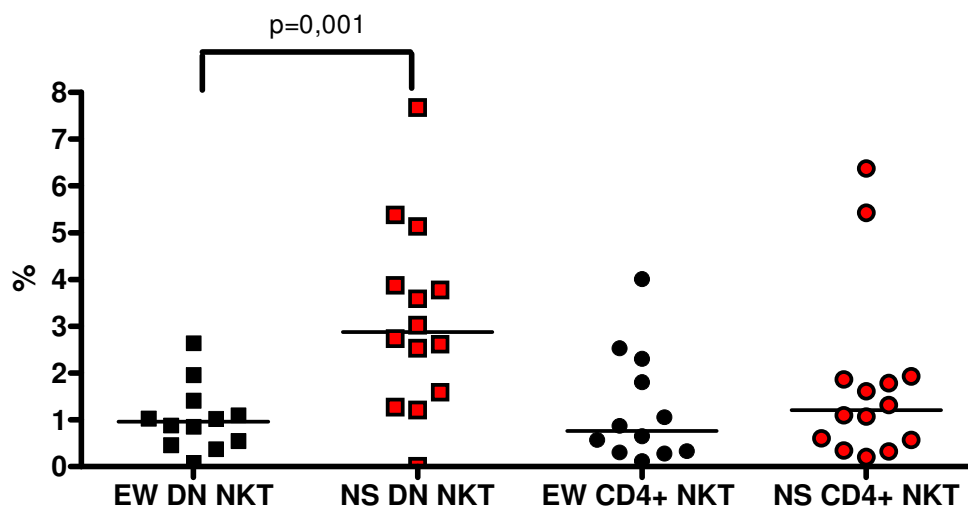


Abbildung 27: Frequenz CCR7<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.7 Prozentsatz CCR8<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung des Prozentsatzes CCR8<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

Es konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des CCR8<sup>+</sup> Prozentsatzes weder bei der Lymphozyten-Subpopulation (Tabelle 22 und Abbildung 27) noch bei der differenzierten Betrachtung der NKT-Fraktionen nachgewiesen werden.

Tabelle 23 und Abbildung 28 zeigen die Frequenz der CCR8<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulationen. Im Gegensatz zu der CD4<sup>+</sup>-NKT Subpopulation, die keinen Unterschied zwischen adultem und fetalem Blut zeigte, ließ sich ein signifikant höherer Prozentsatz CCR8<sup>+</sup> DN NKT-Zellen im Erwachsenenblut verglichen mit Nabelschnurblut aufzeigen.

<b>CCR8</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	2,11 (0,89-5,51)	0,91 (0,22-3,23)	4,22 (2,12-9,43)
<b>NS*</b>	2,97 (1,14-5,42)	1,36 (0,17-2,96)	5,99 (1,83-23,19)
<b>p-Wert**</b>	0,262	0,558	0,111

Tabelle 22: Prozentsätze CCR8<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen

(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

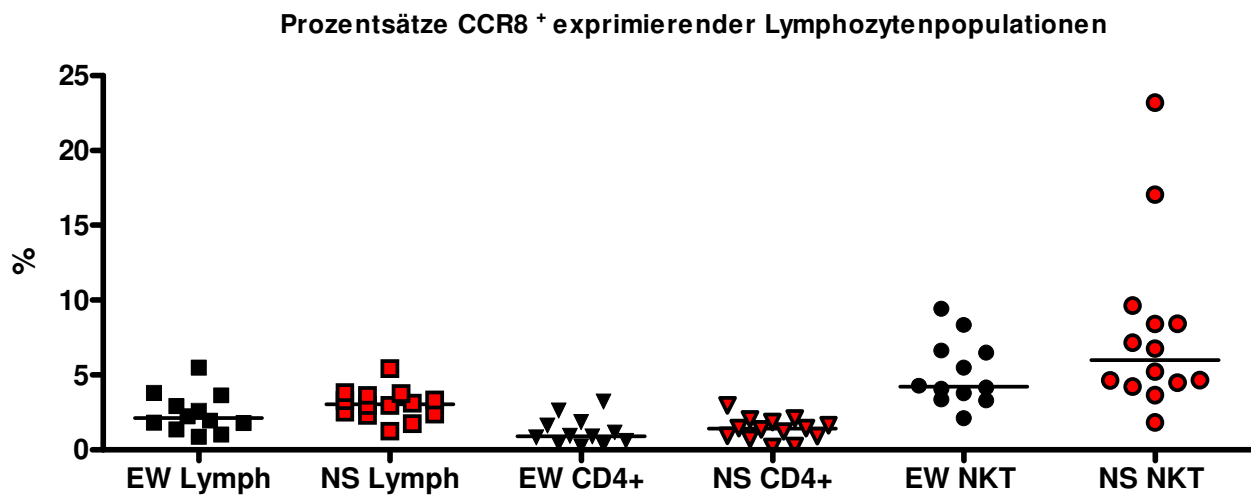


Abbildung 28: Prozentsätze CCR8<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl; NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl; \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

CCR8	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
EW*	1,37 (0,22-3,64)	2,07 (0,78-4,52)
NS*	0,95 (0,12-4,76)	3,40 (1,49-13,80)
<b>p-Wert**</b>	<b>0,018</b>	0,258

Tabelle 23: Prozentsätze CCR8<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen (in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl; \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

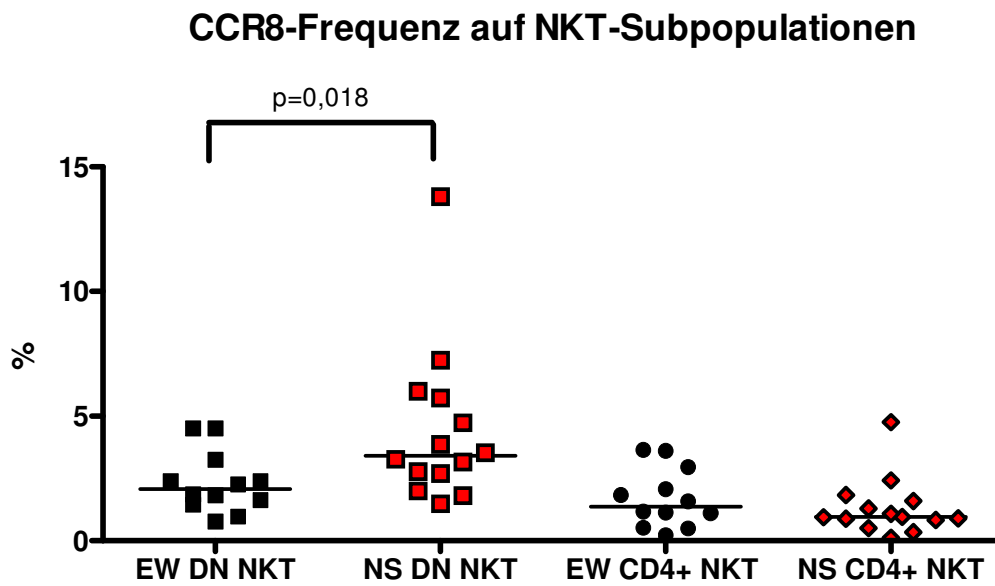


Abbildung 29: Frequenz CCR8<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.8 Prozentsatz CCR9<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung des Prozentsatzes CCR9<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

In adultem peripherem Blut war ein signifikant höherer Prozentsatz CCR9<sup>+</sup> exprimierender Lymphozyten zu beobachten als in der Neugeborenen-Vergleichsgruppe, wohingegen alle weiteren gemessenen Parameter keine signifikanten Unterschiede aufwiesen (Tabelle 24 und Abbildung 29).

Tabelle 25 und Abbildung 30 zeigen die Frequenz der CCR9<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulationen:

<b>CCR9</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	4,45 (0,76-8,06)	1,98 (0,23-3,68)	8,56 (4,22-34,92)
<b>NS*</b>	2,30 (1,29-5,88)	1,03 (0,29-3,35)	8,50 (3,55-32,71)
<b>p-Wert**</b>	<b>0,025</b>	0,097	0,537

Tabelle 24: Prozentsätze CCR9<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

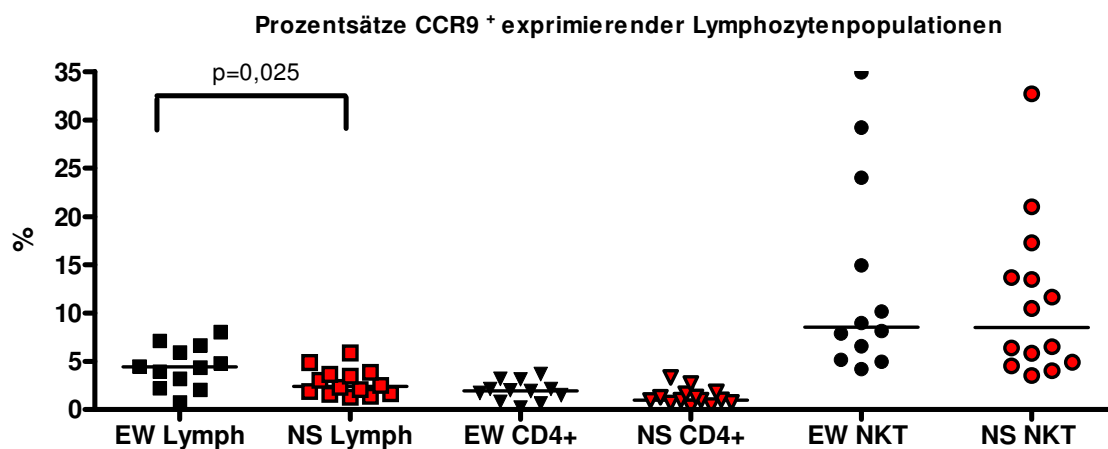


Abbildung 30: Prozentsätze CCR9<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
(Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;  
NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

CCR9	DN NKT-Zellen %	CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen %
EW*	2,21 (0,13-9,25)	6,03 (2,02-25,69)
NS*	1,01 (0,22-4,68)	6,29 (2,19-22,60)
<b>p-Wert**</b>	0,797	0,090

Tabelle 25: Prozentsätze CCR9<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)



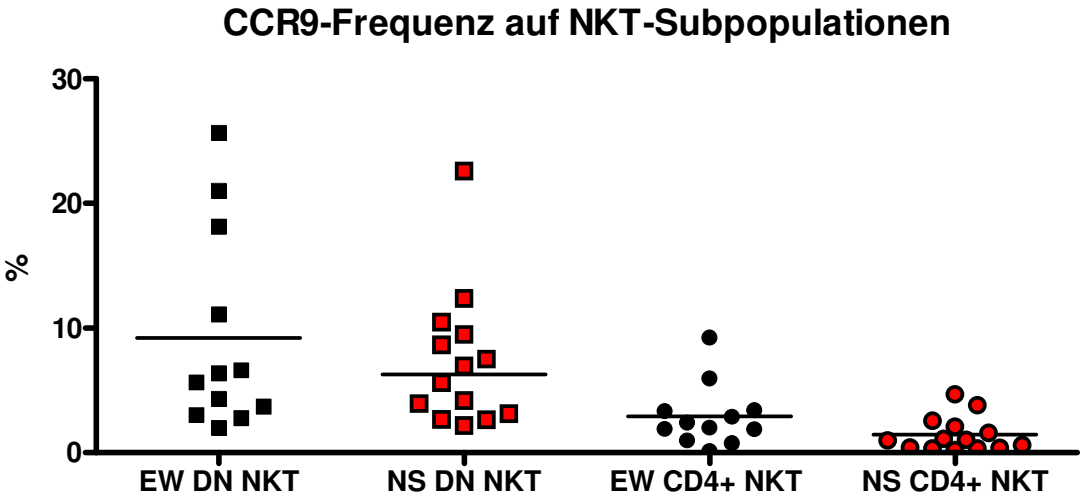


Abbildung 31: Frequenz CCR9<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen (in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.9 Prozentsatz CXCR3<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung des CXCR3-Prozentsatzes innerhalb der Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

Hinsichtlich der CXCR3-Frequenz ergaben sich weder auf den verschiedenen Lymphozytenpopulationen noch auf den NKT-Zellsubpopulationen signifikante Unterschiede (Tabelle 26 und Abbildung 31).

Tabelle 27 und Abbildung 32 zeigen die Frequenz CXCR3<sup>+</sup> exprimierender fetaler und adulter NKT-Zellsubpopulationen:

<b>CXCR3</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	3,60 (0,77-14,76)	1,73 (0,34-8,80)	7,25 (1,29-15,53)
<b>NS*</b>	2,81 (0,75-6,04)	1,05 (0,22-3,28)	7,08 (1,46-28,76)
<b>p-Wert**</b>	0,243	0,186	0,797

*Tabelle 26: Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl; NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl; \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)*

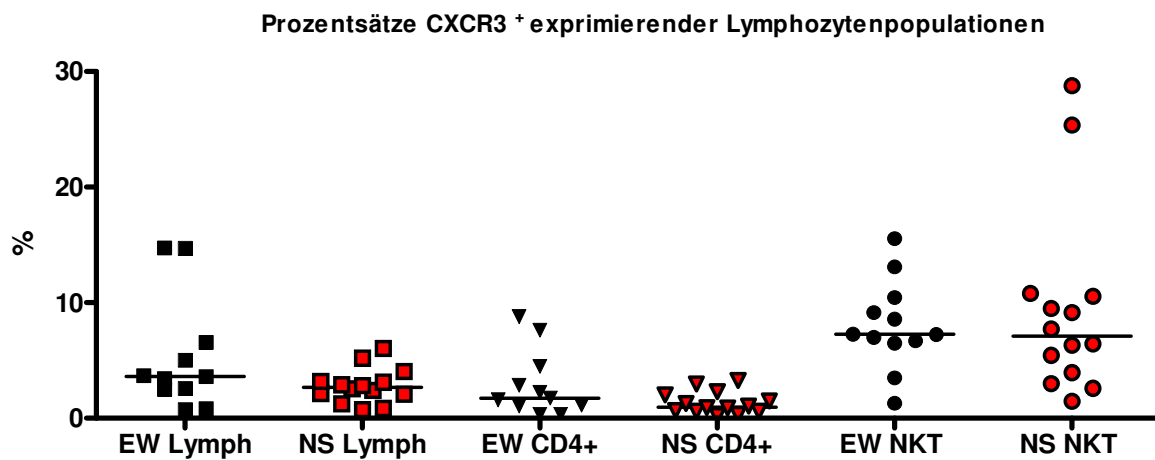


Abbildung 32: Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen  
 (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;  
 NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
 \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

<b>CXCR3</b>	<b>DN NKT-Zellen %</b>	<b>CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen %</b>
<b>EW*</b>	2,30 (0,43-8,47)	8,47 (0,62-6,95)
<b>NS*</b>	1,15 (0,13-5,00)	4,28 (0,67-19,17)
<b>p-Wert**</b>	0,643	0,510

Tabelle 27: Prozentsätze CXCR3<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
 (in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;  
 \*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

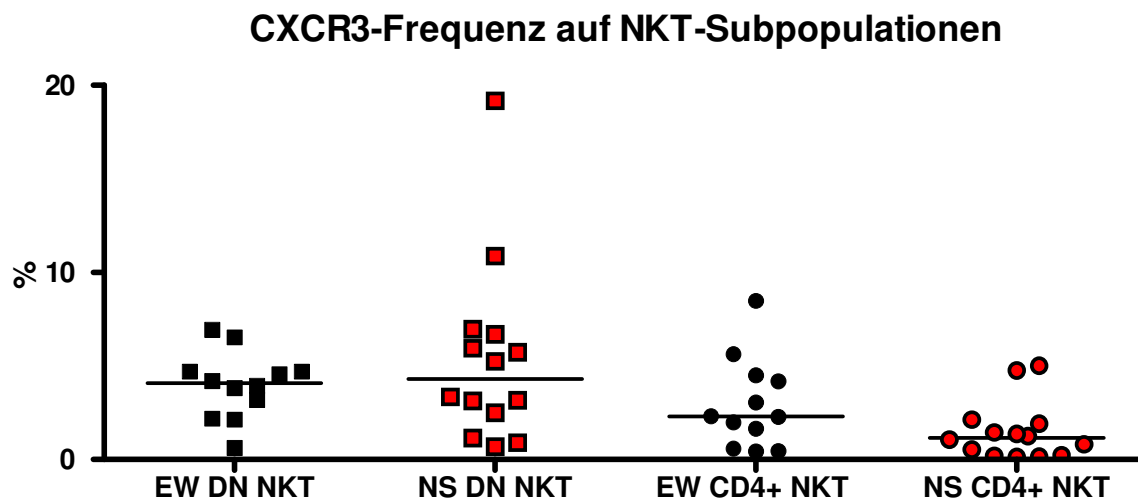


Abbildung 33: Frequenz CXCR3<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.10 Prozentsatz CXCR4<sup>+</sup> exprimierender Lymphozytenpopulationen

Die Untersuchung des Prozentsatzes CXCR4<sup>+</sup> Lymphozytenpopulationen ergab folgende Ergebnisse:

Weder die Lymphozyten noch die CD4<sup>+</sup>Lymphozyten zeigten ein differenziertes CXCR4-Frequenzmuster im Vergleich Nabelschnurblut- zu Erwachsenenblutzellen (Tabelle 28 und Abbildung 33). Betrachtet man jedoch die NKT-Zellpopulation, so lässt sich ein signifikant höherer CXCR4-Prozentsatz auf fetalen NKT-Zellen versus adulten NKT-Zellen feststellen. Zu demselben Ergebnis gelangte man in der DN NKT-Subpopulation. CXCR4<sup>+</sup> DN NKT-Zellen von Neugeborenen waren zu einem signifikant höheren Prozentsatz als die Erwachsenen-Kontrollgruppe nachweisbar (Tabelle 29 und Abbildung 34).

Tabelle 29 und Abbildung 34 zeigen die Prozentsätze der CXCR4<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulationen:

<b>CXCR4</b>	<b>Lymphozyten %</b>	<b>CD4 %</b>	<b>NKT %</b>
<b>EW*</b>	4,04 (0,86-8,33)	1,30 (0,31-5,43)	5,70 (2,07-22,15)
<b>NS*</b>	4,99 (1,62-28,36)	1,27 (0,20-7,72)	12,64 (3,14-39,39)
<b>p-Wert**</b>	0,306	0,922	<b>0,018</b>

Tabelle 28: Prozentsätze CXCR4<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

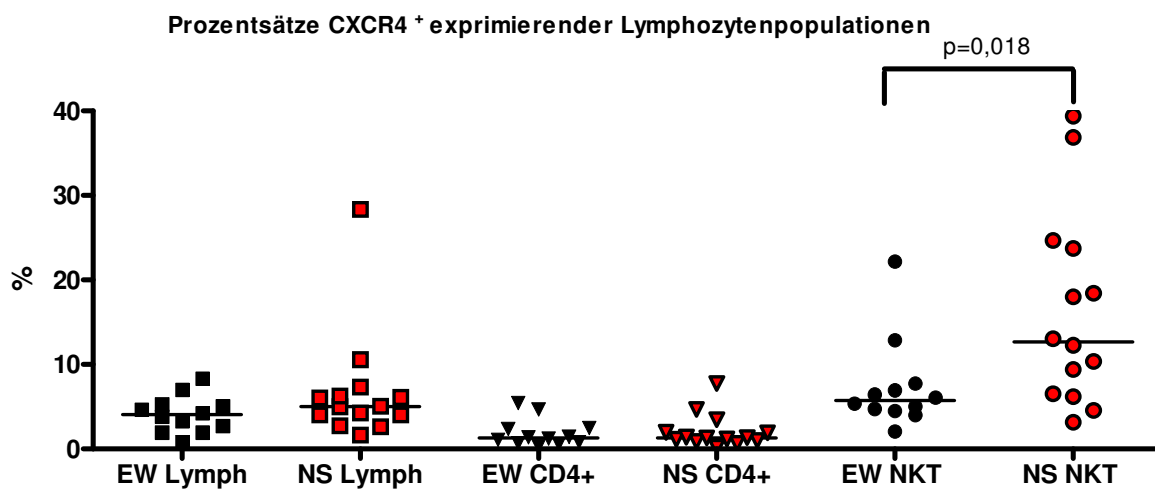


Abbildung 34: Prozentsätze CXCR4<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4<sup>+</sup>- und NKT-Zellen (Lymphozyten und CD4 in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamtlymphozytenzahl;

NKT in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

<b>CXCR4</b>	<b>DN NKT-Zellen %</b>	<b>CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen %</b>
<b>EW*</b>	3,06 (0,88-15,44)	1,42 (0,78-2,71)
<b>NS*</b>	9,37 (2,14-28,89)	1,21 (0,00-5,64)
<b>p-Wert**</b>	<b>0,005</b>	0,504

Tabelle 29: Prozentsätze CXCR4<sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen

(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl;

\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

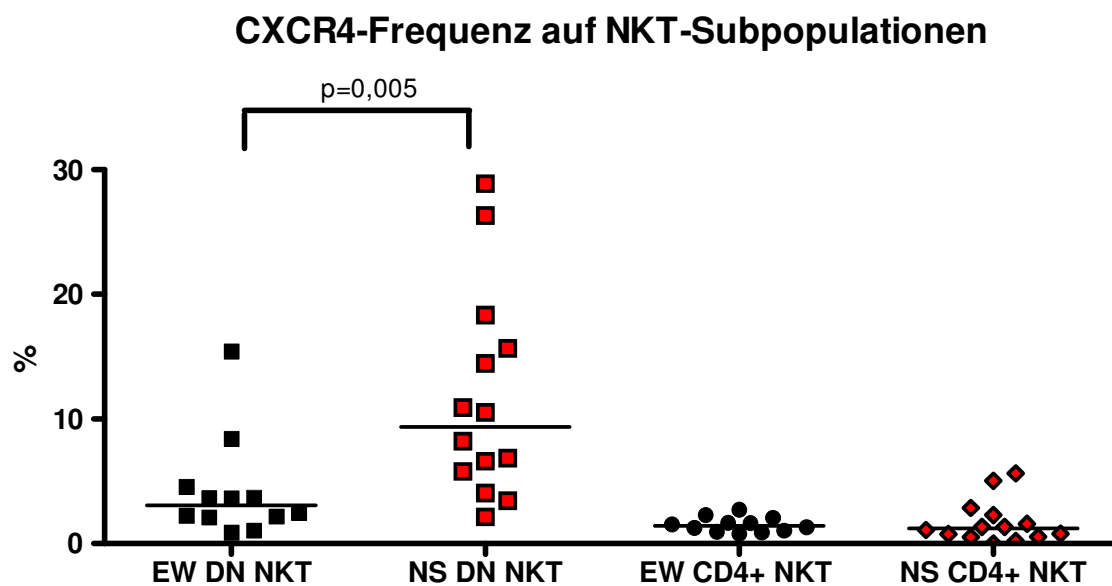


Abbildung 35: Frequenz CXCR4<sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen

(in Prozent bezogen auf die gemessene Gesamt NKT-Zahl)

### 6.2.11 Zusammenfassung

Die Prozentsätze  $CCR4^+$ ,  $CCR7^+$  und  $CXCR4^+$  exprimierender NKT-Zellen waren innerhalb der fetalen NKT-Zellpopulation signifikant zu einem höheren Prozentsatz vertreten als in der Erwachsenenpopulation (Abbildung 36).

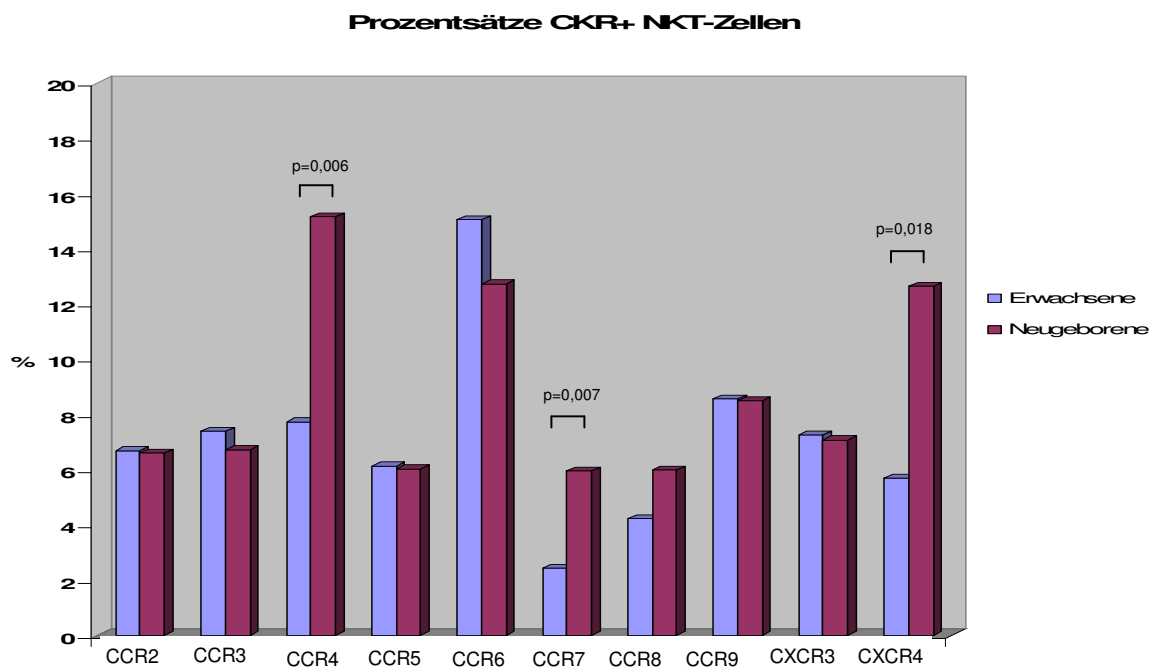


Abbildung 36: Prozentsätze  $CCR^+$  adulter und fetaler NKT-Zellen

Die Prozentsätze  $CCR4^+$ ,  $CCR7^+$ ,  $CCR8^+$  und  $CXCR4^+$  fetaler DN NKT-Zellen waren signifikant höher als die der adulten Vergleichspopulation (Abbildung 37).

### Prozentsätze CKR+ DN NKT-Zellen

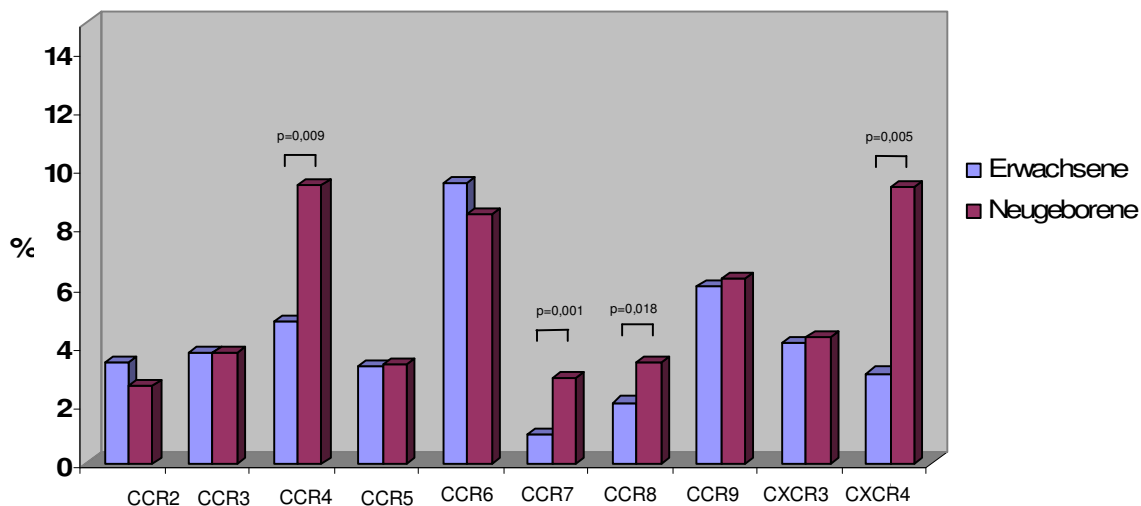


Abbildung 37: Prozentsätze CKR<sup>+</sup> adulter und fetaler DN NKT-Zellen

Die Frequenz CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen innerhalb aller NKT-Zellen war im Nabelschnurblut signifikant höher als in peripherem Blut Erwachsener. Für alle weiteren untersuchten Chemokinrezeptoren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 38).

### Prozentsätze CKR+ CD4+ NKT-Zellen

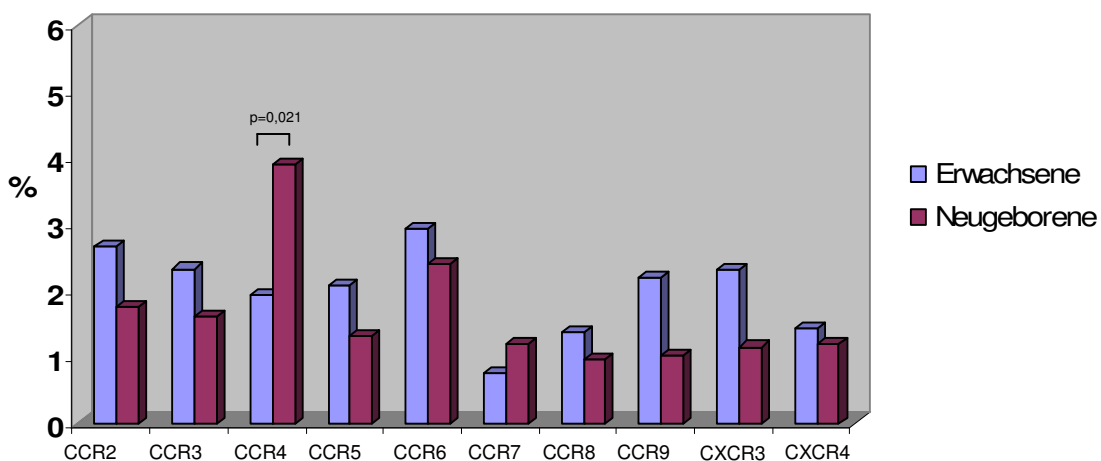


Abbildung 38: Prozentsätze CKR<sup>+</sup> adulter und fetaler CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen



### 6.3 Zytokinproduzierende NKT-Zellen

Im folgenden Ergebnisteil wurden fetale und adulte NKT-Zellen mit ihren DN- und CD4<sup>+</sup>-Subpopulationen hinsichtlich der Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ )- und Interleukin-4-Produktion untersucht.

#### 6.3.1 IFN $\gamma$ und IL-4 produzierende NKT-Zellen

Die IFN $\gamma$ -Produktion von Gesamt-NKT-Zellen und der DN NKT-Subpopulation wies zwischen Erwachsenen und Neugeborenen keine signifikanten Unterschiede auf. Im Gegensatz dazu produzierten die adulten CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen signifikant häufiger IFN $\gamma$  als die fetale Vergleichsgruppe (siehe Tabelle 30).

	% NKT IFN $\gamma$	% NKT IL-4	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	27,61 (4,23-75,17)	15,79 (3,97-38,74)	13,90 (1,21-50,08)	8,06 (1,53-39,54)	4,65 (1,50-22,24)	3,85 (0,51-20,16)
<b>NS*</b>	27,07 (12,53-56,38)	26,79 (9,75-59,94)	19,72 (9,69-28,42)	3,67 (0,44-17,49)	20,21 (6,94-30,81)	4,07 (1,49-11,97)
<b>p-Wert**</b>	p=0,719	<b>p=0,035</b>	p=0,411	<b>p=0,045</b>	<b>p=0,005</b>	p=0,572

Tabelle 30: Prozentsätze zytokinproduzierender NKT-Zellen und deren CD4<sup>+</sup>- und DN- Subpopulationen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

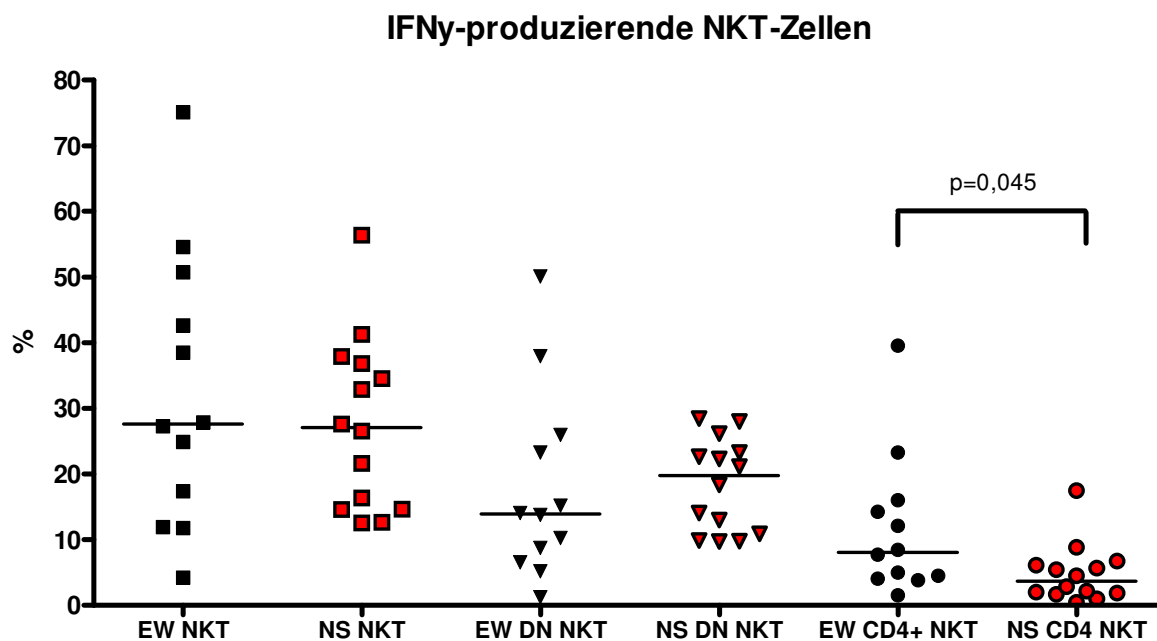


Abbildung 39: Prozentsätze IFN $\gamma$ -produzierende NKT-Zellen und NKT-Subpopulationen

Hinsichtlich der IL-4 Sekretion ergaben sich sowohl für die Gesamtpopulation fetaler NKT-Zellen als auch für die fetale DN NKT-Subpopulation signifikant höhere Werte im Vergleich zu den entsprechenden adulten Vergleichsgruppen (Abbildung 40)

## IL-4-produzierende NKT-Zellen

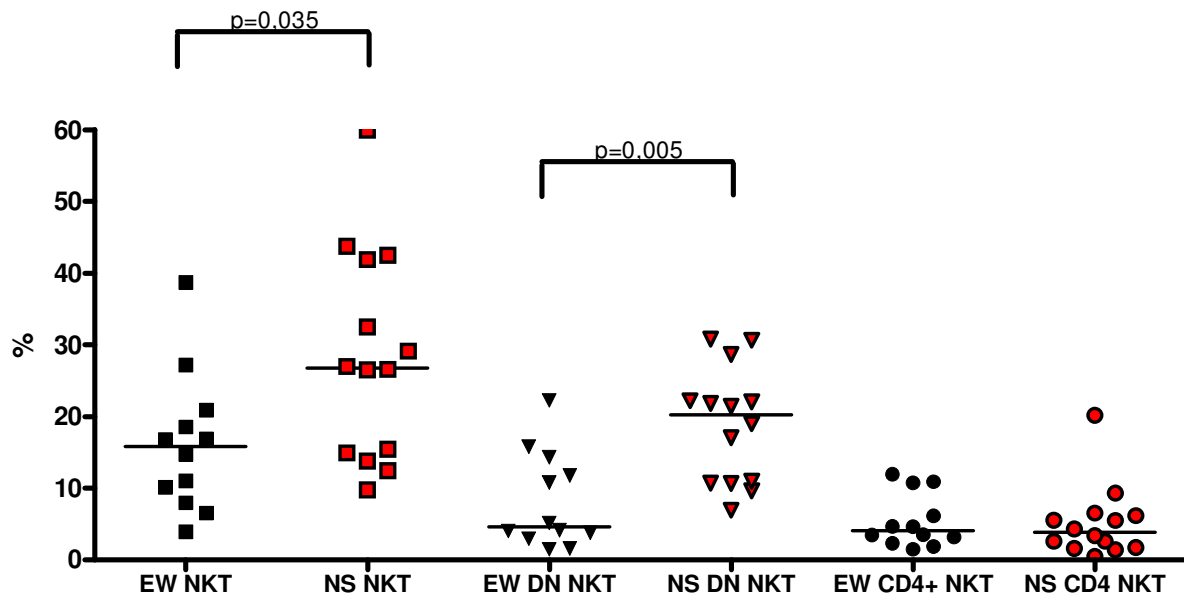


Abbildung 40: Procentsätze IL-4-produzierende NKT-Zellen und NKT-Subpopulationen

### 6.3.2 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

Im Folgenden wurde die Procentsätze IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierender NKT-Zellen jeweils innerhalb CKR<sup>+</sup> exprimierender Subpopulationen bestimmt.

#### 6.3.2.1 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR2<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Tabelle 31 und Abbildung 41 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der zytokinproduzierenden CCR2<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen. Fetale CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen produzierten signifikant häufiger IL-4 als die adulte Vergleichsgruppe. Hinsichtlich der weiteren untersuchten Populationen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	0,33 (0,18-4,10)	0,55 (0,10-1,61)	0,33 (0,16-3,35)	0,21 (0,10-0,60)
<b>NS*</b>	1,13 (0,08-4,17)	0,55 (0,40-2,34)	1,44 (0,23-5,83)	0,68 (0,17-1,73)
<b>p-Wert**</b>	p=0,239	p=0,298	p=0,102	<b>p=0,011</b>

Tabelle 31: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR2<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

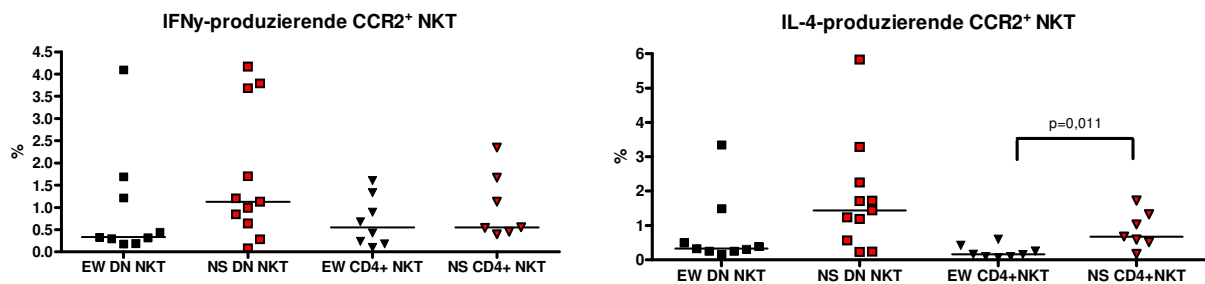


Abbildung 41: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR2<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.2 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR3<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Innerhalb der CCR3<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulationen produzierten fetale DN NKT-Zellen signifikant mehr IL-4 als adulte DN NKT-Zellen. Die Häufigkeit IL-4-produzierender CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen unterschied sich nicht (Abbildung 42).

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
EW*	0,49 (0,15-1,02)	0,54 (0,09-3,34)	0,18 (0,08-1,53)	0,25 (0,14-0,73)
NS*	1,47 (0,10-4,58)	0,51 (0,11-1,54)	1,38 (0,12-6,81)	0,39 (0,11-0,78)
<b>P- Wert**</b>	p=0,192	p=0,757	<b>p=0,008</b>	p=0,691

Tabelle 32: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

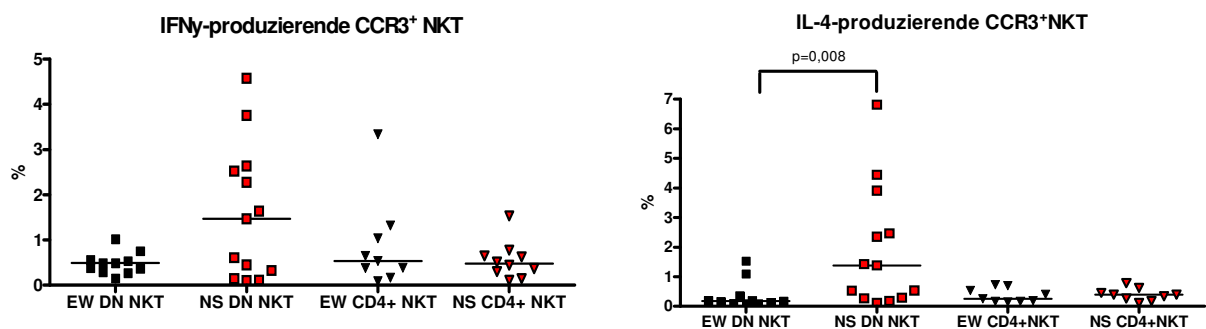


Abbildung 42: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR3<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.3 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR4<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Die CCR4<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> NKT-Subpopulation unterschied sich bei Erwachsenen und Neugeborenen weder hinsichtlich der IFN $\gamma$  noch der IL-4-Synthese. Jedoch ließen sich für die CCR4<sup>+</sup> DN NKT-Population in Neugeborenenblut sowohl hinsichtlich der IFN $\gamma$ - Produktion als auch hinsichtlich der IL-4-Produktion signifikant höhere Werte beobachten (Abbildung 43, Tabelle 33).

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	0,49 (0,22-2,34)	0,52 (0,211-1,65)	0,29 (0,12-1,55)	0,44 (0,06-1,00)
<b>NS*</b>	2,47 (0,31-6,47)	0,62 (0,21-2,10)	2,24 (0,50-12,56)	0,54 (0,15-11,07)
<b>p-Wert**</b>	<b>p=0,029</b>	p=0,217	<b>p=0,008</b>	p=0,151

Tabelle 33: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

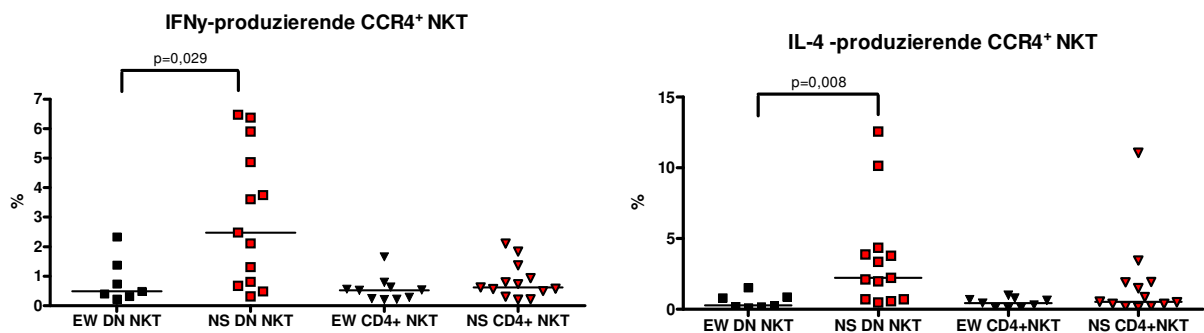


Abbildung 43: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR4<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.4 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR5<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Tabelle 34 und Abbildung 44 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der Zytokinproduktion von CCR5<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen. DN NKT-Zellen von Neugeborenen sezernierten signifikant mehr IL-4 als DN NKT-Zellen Erwachsener. Bei den übrigen untersuchten Populationen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	0,283 (0,23-1,21)	0,74 (0,12-1,83)	0,22 (0,00-1,75)	0,40 (0,06-0,77)
<b>NS*</b>	0,65 (0,05-3,72)	0,30 (0,16-1,13)	0,89 (0,20-4,66)	0,36 (0,11-1,99)
<b>p- Wert**</b>	p=0,661	p=0,462	<b>p=0,007</b>	p=0,683

Tabelle 34: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

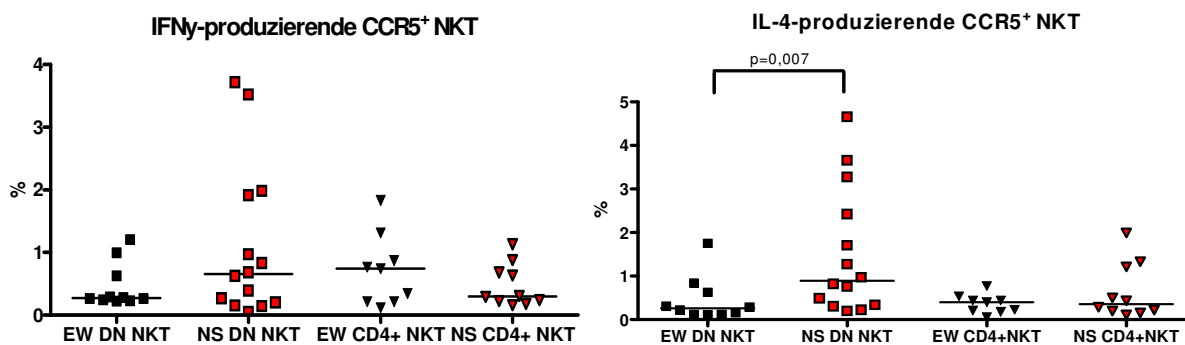


Abbildung 44: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR5<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.5 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR6<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Innerhalb der CCR6<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulationen produzierten fetale DN NKT-Zellen signifikant mehr IL-4 als adulte DN NKT-Zellen. Die Häufigkeit IL-4 -produzierender CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen unterschied sich nicht (Abbildung 45).

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
EW*	0,91 (0,45-4,06)	0,45 (0,17-2,46)	0,52 (0,13-3,65)	0,48 (0,12-1,46)
NS*	1,83 (0,10-8,59)	0,34 (0,11-2,14)	2,16 (0,43-14,12)	0,62 (0,11-2,82)
<b>p- Wert**</b>	p=0,073	p=0,279	<b>p=0,004</b>	p=0,412

Tabelle 35: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR6<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

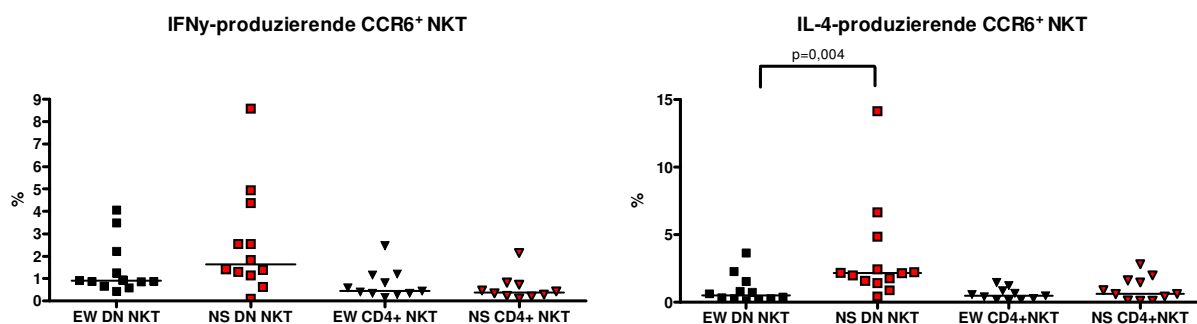


Abbildung 45: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR6<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen



### 6.3.2.6 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR7<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Hinsichtlich der Zytokinproduktion von CCR7<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen konnten in keiner der untersuchten NKT-Subpopulationen signifikante Unterschiede festgestellt werden.

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	0,29 (0,06-0,65)	0,24 (0,14-1,42)	0,28 (0,02-1,45)	0,36 (0,05-0,72)
<b>NS*</b>	0,34 (0,10-2,56)	0,16 (0,08-3,00)	0,48 (0,05-2,69)	0,34 (0,15-0,66)
<b>p- Wert**</b>	p=0,293	p=0,315	p=0,096	p=0,688

Tabelle 36: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR7<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

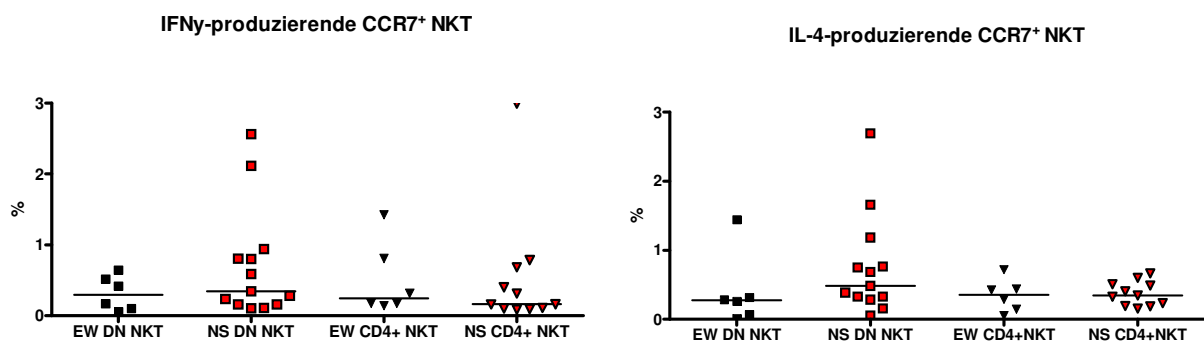


Abbildung 46: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR7<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.7 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR8<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Tabelle 37 und Abbildung 47 zeigen die Ergebnisse der Untersuchung der Zytokinproduktion von CCR8<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen. DN NKT-Zellen von Neugeborenen produzierten signifikant mehr IL-4 als DN NKT-Zellen Erwachsener. Bei den weiteren untersuchten Populationen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
EW*	0,59 (0,10-3,17)	0,30 (0,10-1,18)	0,43 (0,09-1,82)	0,25 (0,01-0,60)
NS*	0,87 (0,14-2,8)	0,18 (0,10-1,07)	0,94 (0,40-5,29)	0,32 (0,11-2,07)
p-Wert**	p=0,292	p=0,355	<b>p=0,010</b>	p=0,418

Tabelle 37: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR8<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen

(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

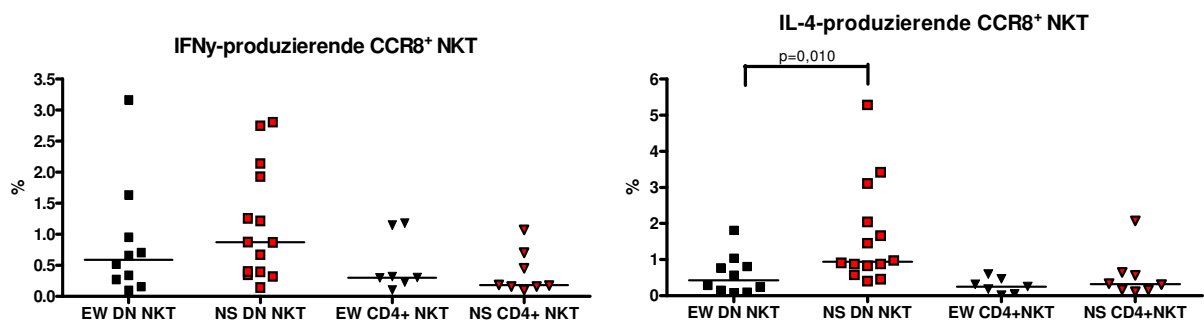


Abbildung 47: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR8<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.8 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CCR9<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Bei den untersuchten CCR9<sup>+</sup> NKT-Zellen konnte in keiner der Subpopulationen ein signifikanter Unterschied bezüglich der IFN $\gamma$ - oder IL-4-Produktion nachgewiesen werden (Abbildung 48, Tabelle 38).

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	0,88 (0,37-5,25)	0,44 (0,19-3,00)	0,92 (0,19-6,27)	0,47 (0,15-1,65)
<b>NS*</b>	1,79 (0,38-9,15)	0,32 (0,05-1,02)	1,71 (0,14-9,85)	0,38 (0,10-3,58)
<b>P- Wert**</b>	p=0,115	p=0,514	p=0,174	p=0,369

Tabelle 38: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR9<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

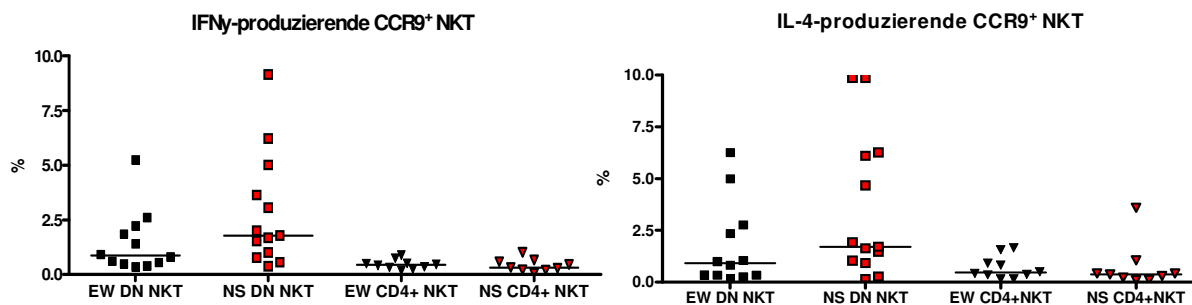


Abbildung 48: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR9<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.9 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CXCR3<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Die Analyse der CXCR3<sup>+</sup> NKT-Zellen hinsichtlich ihrer IFN $\gamma$ - und IL-4 -Produktion ergab, dass weder für die CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen noch für die DN NKT-Population signifikante Unterschiede zwischen Erwachsenen und Neugeborenen bestanden (Tabelle 39).

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	0,54 (0,23-1,54)	0,62 (0,06-2,11)	0,55 (0,11-1,86)	0,53 (0,16-1,17)
<b>NS*</b>	1,54 (0,08-6,54)	0,37 (0,11-1,53)	1,16 (0,27-6,13)	0,45 (0,20-3,64)
<b>p-Wert**</b>	p=0,107	p=0,380	p=0,055	p=0,845

Tabelle 39: Prozentsätze zytokinproduzierender CXCR3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

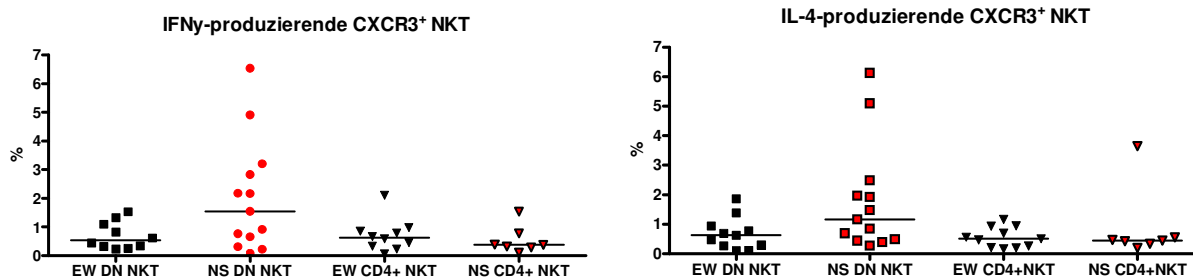


Abbildung 49: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CXCR3<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.2.10 IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CXCR4<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Die CXCR4<sup>+</sup>DN NKT-Zellen von Neugeborenen produzierten sowohl signifikant mehr IFN $\gamma$  als auch IL-4 als adulte CXCR4<sup>+</sup>DN NKT-Zellen, während bei den CD4<sup>+</sup> NKT- Populationen keine Unterschiede bestanden (Abbildung 50, Tabelle 40).

	% DN NKT IFN $\gamma$	% CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$	% DN NKT IL-4	% CD4 <sup>+</sup> NKT IL-4
<b>EW*</b>	1,09 (0,24-6,46)	0,28 (0,09-1,29)	0,90 (0,09-7,72)	0,20 (0,06-1,65)
<b>NS*</b>	2,33 (0,67-13,82)	0,39 (0,08-2,52)	3,29 (1,06-15,15)	0,41 (0,06-2,86)
<b>P- Wert**</b>	<b>p=0,021</b>	p=1,0000	<b>p=0,004</b>	p=0,253

Tabelle 40: Prozentsätze zytokinproduzierender CXCR4<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>- und DN NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

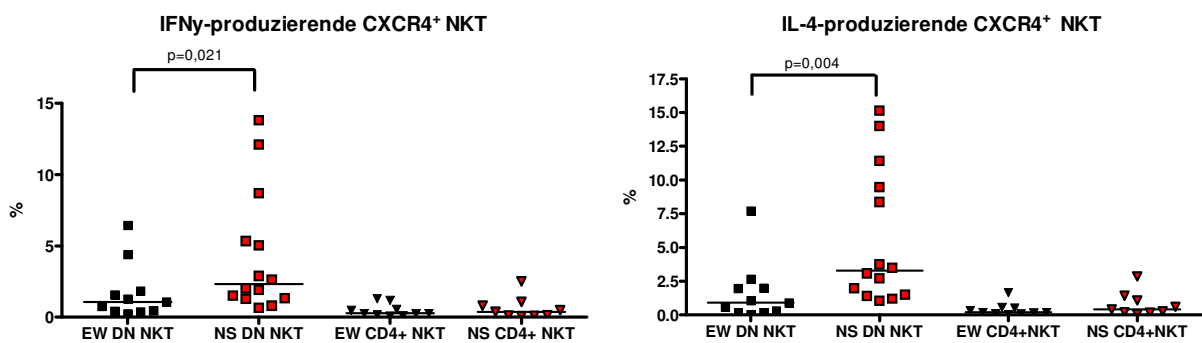


Abbildung 50: IFN $\gamma$ - und IL-4-produzierende CXCR4<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen

### 6.3.3 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender NKT-Zellen

Der folgende Abschnitt stellt das Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sowohl für die DN- als auch für die CD4<sup>+</sup> NKT-Subpopulation dar. Des Weiteren wurde hierbei eine Differenzierung in die einzelnen CKR<sup>+</sup>- Untergruppen vorgenommen.

#### 6.3.3.1 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR2<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Es bestand kein signifikanter Unterschied innerhalb der Subpopulationen zwischen Neugeborenen und Erwachsenen (Tabelle 41).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
<b>EW*</b>	1,22 (0,48-6,56)	2,22 (0,54-6,43)
<b>NS*</b>	1,00 (0,35-2,13)	1,36 (0,41-2,34)
<b>p-Wert**</b>	p=0,382	p=0,223

Tabelle 41: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR2<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

#### 6.3.3.2 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR3<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Bei den beiden untersuchten CCR3<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen waren die Werte der DN NKT-Zellen der Erwachsenen den Neugeborenen bezüglich des Verhältnisses IFN $\gamma$ /IL-4 signifikant höher, wohingegen die CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen keinen signifikanten Unterschied aufwiesen (Tabelle 42).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
<b>EW*</b>	2,60 (0,17-5,63)	0,96 (0,40-20,29)
<b>NS*</b>	0,85 (0,28-2,15)	1,06 (0,37-4,51)
<b>p-Wert**</b>	<b>p=0,008</b>	p=0,806

Tabelle 42: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR3<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### 6.3.3.3 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR4<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Die CCR4<sup>+</sup>DN NKT-Zellen von Erwachsenen zeigten einen signifikant höheren Wert des Verhältnisses IFN $\gamma$ /IL-4 als die Neugeborenen-Vergleichsgruppe, wohingegen die CD4<sup>+</sup> NKT-Population keinen signifikanten Unterschied aufwies (Tabelle 43).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
<b>EW*</b>	1,62 (0,823-2,81)	2,07 (0,28-5,19)
<b>NS*</b>	0,97 (0,52-1,52)	0,75 (0,19-4,23)
<b>p-Wert**</b>	<b>p=0,036</b>	p=0,171

Tabelle 43: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR4<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### 6.3.3.4 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR5<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Das IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnis war bei adulten CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> NKT-Zellen höher als bei fetalen. Für die DN NKT-Zellen war keine Differenz festzustellen (Tabelle 44).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
<b>EW*</b>	1,03 (0,35-6,28)	1,99 (0,53-4,19)
<b>NS*</b>	0,70 (0,20-1,88)	0,88 (0,34-2,27)
<b>p-Wert**</b>	p=0,053	<b>p=0,019</b>

Tabelle 44: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR5<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### 6.3.3.5 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR6<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Bei der Untersuchung der CCR6<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen wurde ein signifikant höherer Wert für die DN NKT-Zellfraktion der Erwachsenen gegenüber den Neugeborenen beobachtet, wohingegen sich für die CD4<sup>+</sup>-Zellfraktion kein Unterschied feststellen ließ (Tabelle 45).



	<b>DN NKT IFN<math>\gamma</math>/IL-4</b>	<b>CD4<sup>+</sup> NKT IFN<math>\gamma</math>/IL-4</b>
<b>EW*</b>	2,2471 (0,7378-7,1540)	1,49 (0,42-2,56)
<b>NS*</b>	0,91 (0,24-1,29)	0,79 (0,12-3,17)
<b>p-Wert**</b>	<b>p=0,000</b>	p=0,074

*Tabelle 45: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR6<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)*

### 6.3.3.6 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR7<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Hinsichtlich des IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnisses bei CCR7<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Erwachsenen- und Neugeborenenblut nachgewiesen werden (Tabelle 46).

	<b>DN NKT IFN<math>\gamma</math>/IL-4</b>	<b>CD4<sup>+</sup> NKT IFN<math>\gamma</math>/IL-4</b>
<b>EW*</b>	1,78 (0,36-3,38)	1,35 (0,40-5,62)
<b>NS*</b>	0,61 (0,13-3,76)	0,53 (0,24-5,88)
<b>p-Wert**</b>	p=0,599	p=0,269

*Tabelle 46: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR7<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)*

### 6.3.3.7 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR8<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Die CCR8<sup>+</sup> DN NKT-Zellen von Erwachsenen zeigten einen signifikant höheren Wert für das IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnis als die Neugeborenen-Vergleichsgruppe, während die CD4<sup>+</sup> NKT-Population keinen signifikanten Unterschied aufwies (Tabelle 47).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
<b>EW*</b>	1,16 (0,55-7,68)	2,56 (0,32-27,43)
<b>NS*</b>	0,7134 (0,2198-1,5197)	0,75 (0,18-4,21)
<b>p-Wert**</b>	<b>p=0,010</b>	p=0,105

Tabelle 47: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR8<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### 6.3.3.8 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CCR9<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Die Untersuchung des IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnisses von adulten und fetalen CCR9<sup>+</sup> NKT-Zellen ergab weder für die DN- noch für die CD4<sup>+</sup>-Subpopulation einen signifikanten Unterschied (Tabelle 48).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
<b>EW*</b>	1,05 (0,21-3,60)	0,98 (0,32-3,37)
<b>NS*</b>	0,94 (0,58-3,97)	0,76 (0,16-6,57)
<b>p-Wert**</b>	p=0,270	p=0,909

Tabelle 48: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### 6.3.3.9 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CXCR3<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Beim Vergleich von CXCR3<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen von Erwachsenen und Neugeborenen war hinsichtlich des Verhältnisses IFN $\gamma$ /IL-4 kein signifikanter Unterschied festzustellen (Tabelle 49).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
<b>EW*</b>	1,90 (0,14-7,12)	1,16 (0,36-2,54)
<b>NS*</b>	1,08 (0,30-1,86)	0,69 (0,32-1,90)
<b>p-Wert**</b>	p=0,068	p=0,172

Tabelle 49: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### 6.3.3.10 Verhältnis IFN $\gamma$ - zu IL-4- synthetisierender CXCR4<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen

Die untersuchten fetalen und adulten CXCR4<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen unterschieden sich nicht signifikant bezüglich des Verhältnisses IFN $\gamma$ /IL-4 (Tabelle 50).

	DN NKT IFN $\gamma$ /IL-4	CD4 <sup>+</sup> NKT IFN $\gamma$ /IL-4
EW*	1,28 (0,45-6,40)	0,96 (0,42-7,68)
NS*	0,75 (0,44-1,46)	0,82 (0,47-2,02)
p-Wert**	p=0,280	p=0,239

Tabelle 50: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(\*Medianwerte (Spannweite); \*\*p-Wert: MWU-Test)

### 6.3.3.11 Vergleich des IFN $\gamma$ /IL-4-Verhältnisses von DN- und CD4<sup>+</sup>NKT-Zellen innerhalb einer Gruppe

Innerhalb der Neugeborenenengruppe konnte für die CCR3<sup>+</sup> NKT-Zellen ein signifikanter Unterschied bezüglich des Verhältnisses IFN $\gamma$  zu IL-4 zwischen der DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Subpopulation festgestellt werden. Es war für die fetalen DN CCR3<sup>+</sup> NKT-Zellen ein signifikantes Überwiegen von IL-4 nachweisbar (Ratio <1, p=0,028), wohingegen bei fetalen CD4<sup>+</sup> CCR3<sup>+</sup> NKT-Zellen die IFN $\gamma$ - Produktion gegenüber IL-4 überwog. Für alle übrigen untersuchten fetalen und adulten CCR<sup>+</sup>NKT- Populationen bestanden keine signifikanten Differenzen.

### 6.3.3.12 Zusammenfassung

Die Untersuchung des Verhältnisses der IFN $\gamma$  zu IL-4 Synthese als Ausdruck der Balance zwischen Th1 und Th2-Immunantwort, ergab eine Tendenz der fetalen NKT-Zellen hin zu einer Th2-Antwort. Signifikante Unterschiede bestanden dabei in der DN NKT-Zellsubpopulation für CCR3<sup>+</sup>-, CCR4<sup>+</sup>-, CCR6<sup>+</sup>- und CCR8<sup>+</sup> NKT-Zellen und in der CD4<sup>+</sup> NKT-Fraktion für CCR5<sup>+</sup>NKT-Zellen. Wie in Abbildung 51 veranschaulicht wird, war das IFN $\gamma$ /IL-4-Verhältnisse nahezu aller NKT-Zellen von Neugeborenen <1. Ausnahmen bildeten

dabei in der DN NKT-Subpopulation CXCR3<sup>+</sup> NKT-Zellen (Ratio 1,0762) und in der CD4<sup>+</sup> NKT- Population die CCR2<sup>+</sup> und CCR3<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulation (Ratio 1,3564 und 1,0552). Hervorzuheben ist, dass sowohl in der DN NKT-Subpopulation als auch in der CD4<sup>+</sup> NKT-Subpopulation die Werte des Erwachsenenblutes stets die des Nabelschnurblutes überstiegen. Einzig für CCR3<sup>+</sup> in der CD4<sup>+</sup> NKT-Fraktion lag der Wert für das Verhältnis IFN $\gamma$  zu IL-4 für die fetalen Zellen über dem der adulten NKT-Zellen (Abbildung 52 und 53).

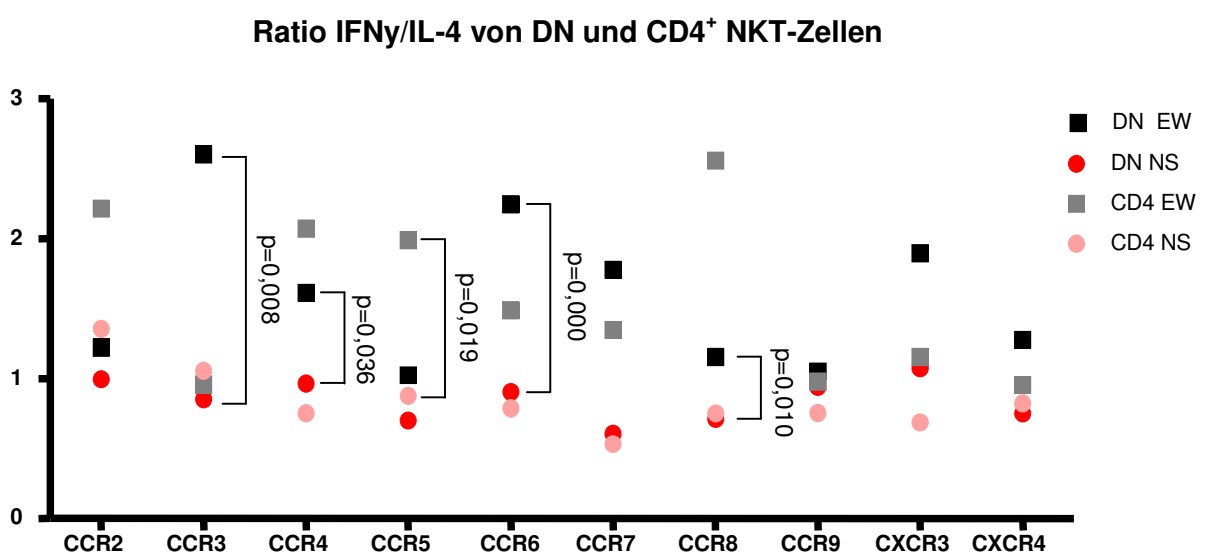


Abbildung 51: IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnis von CCR<sup>+</sup> DN- und CD4<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen (Darstellung der Medianwerte)

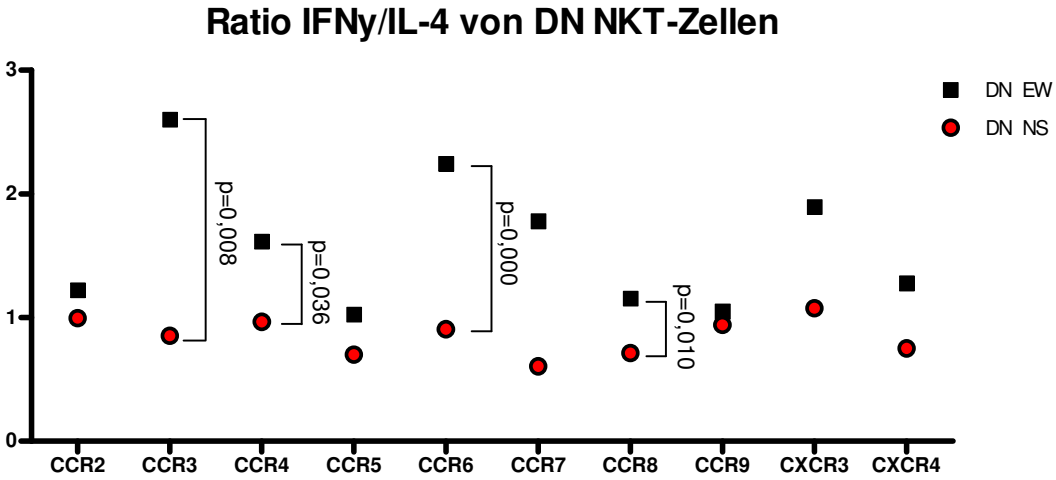


Abbildung 52: IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnis von CCR<sup>+</sup> DN NKT-Zellen  
(Darstellung der Medianwerte; Erläuterung dazu oben im Text)

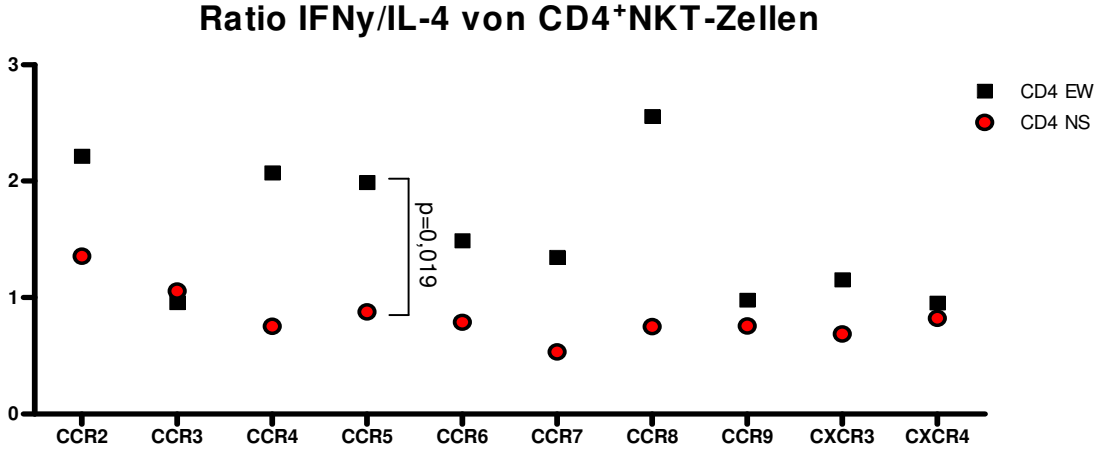


Abbildung 53: IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnis von CCR<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen  
(Darstellung der Medianwerte; Erläuterung dazu oben im Text)

## **7 Diskussion**

Die Charakterisierung fetaler NKT-Zellen und ihrer Subpopulationen hinsichtlich ihres Phänotyps sowie ihrer immunregulatorischen Funktionen ist für das Verständnis dieser Lymphozyten-Subpopulation wichtig. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, fetale und adulte NKT-Zellen phänotypisch und funktionell vergleichend zu untersuchen. Chemokinrezeptoren und ihren Liganden kommt bei der Zellwanderung in der Immunabwehr eine bedeutende Rolle zu. Deshalb wurde in der vorliegenden Dissertation ermittelt, ob das Chemokinrezeptorexpressionsmuster fetaler NKT-Zellen im Vergleich zu adulten NKT-Zellen Unterschiede aufweist. In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob Unterschiede in der Zytokinsynthese zwischen den einzelnen fetalen und adulten  $CKR^+$  NKT-Subpopulationen bestehen. Weiter wurde überprüft, wie sich die Zytokinsynthesemuster fetaler NKT-Zellen und adulter NKT-Zellen unterscheiden.

### **7.1 Probanden**

Aufgrund vorher festgelegter Auswahlkriterien wurden in der Erwachsenengruppe 12 von 20 Spendern eingeschlossen. Der häufigste Grund für einen Ausschluß war eine zu geringe Zahl an NKT-Zellen, die auf eine zu geringe Anzahl Lymphozyten in der Probe zurückzuführen war. Akute oder chronische Infektionen, Rauchen oder Allergien waren weitere Ausschlußkriterien. Dadurch wurde einer Verzerrung der Ergebnisse innerhalb der Zytokinsynthese- und Chemokinrezeptormuster vorgebeugt. Bei den Neugeborenen erfüllten 14 von 15 Kindern die zuvor festgelegten Anforderungen. Eine Probe musste aufgrund einer zu geringer Anzahl an NKT-Zellen ausgeschlossen werden. Da im Nabelschnurblut 2-3 mal so viele Zellen wie in peripherem Blut Erwachsener vorhanden sind, war eine Blutmenge von 50 ml ausreichend, um ausreichend Lymphozyten und damit auch NKT-Zellen zu analysieren, obgleich der prozentuale Anteil an NKT-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation in fetalem Blut im Vergleich zu adultem Blut signifikant geringer war. Dies entspricht den Ergebnissen von Kadowaki et al, 2001<sup>114</sup>. Als möglicher Grund hierfür wird postuliert, dass NKT-Zellen nach der Geburt durch sich selbst oder durch CD1d vermittelten Antigenkontakt

chronisch zur Proliferation stimuliert werden<sup>114</sup>. In Analogie zum Verhalten humaner NKT-Zellen steigt im Mausmodell die NKT-Zahl ebenfalls nach der Geburt an<sup>28</sup>.

## **7.2 Methodik**

NKT-Zellen sind in der Lage, nach Stimulation sehr schnell großen Mengen an IFN $\gamma$  und IL-4 zu synthetisieren<sup>79,115</sup>. Die hier verwendete Stimulantien PMA und Ionomycin stimulieren in starkem Ausmaß unspezifisch alle Lymphozyten. Sie wurden gewählt, da in Vorversuchen mit LPS und  $\alpha$ -Galactosylceramid für 6 Stunden keine sicher meßbare Zytokinsynthese nachweisbar war. Eine länger andauernde Stimulation konnte aufgrund der Herabregulation der Chemokinrezeptoren mit zunehmender Stimulationszeit nicht durchgeführt werden. Die Analyse erfolgte mittels der 6-Farben Durchflußzytometrie. Bei dieser Methode werden extra- und intrazelluläre Antigene mittels spezifischer Antikörper analysiert. Limitierend für die Analyse der NKT-Zellen war die Anzahl der maximal durchflußzytometrisch analysierbaren Lymphozyten, die benötigt wurde, um ausreichend NKT-Zellen zu sehen und die durch den zur Verfügung stehenden Datenspeicher begrenzt war. Dies kann umgangen werden, indem man NKT-Zellen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS) anreichert und somit anstatt aller Lymphozyten nur noch die NKT-Zellpopulation weiter analysiert. Hierfür war die zu große Menge an Nabelschnurblut, die pro Versuch für eine Anreicherung nötig gewesen wäre, limitierend. Um eine eindeutige Auswertung der Messungen gewährleisten zu können, mussten die einzelnen Kompensationsparameter am Durchflußzytometer derart eingestellt werden, dass positive Signale deutlich von negativen getrennt werden konnten, so dass eine sichere Abgrenzung der einzelnen Populationen möglich war. Der für NKT-Zellen charakteristische CD161-Antikörper konnte in Kombination mit PE-Cy7 als Fluorochrom nicht verwendet werden, da keine ausreichende Trennung der positiven von den negativen Zellen erreichbar war. In Vorversuchen stellte sich weiterhin heraus, dass das APC-Cy7 Fluorochrom durch para-Formaldehyd während der Fixierung vom Antikörper getrennt wurde. Folglich wurde die Färbung der CD4-Moleküle mit APC-Cy7-Antikörpern erst nach Fixierung der Zellen vorgenommen. Die Übereinstimmung der extrazellulären und intrazellulären CD4-Expression wurde überprüft, indem eine Kontrollfärbung dergleichen Zellen ohne den Fixierungsschritt vergleichend erfolgte. Bei der Analyse der Chemokinrezeptor-Prozentsätze auf den verschiedenen Lymphozytensubpopulationen musste beachtet werden, dass die



Chemokinrezeptoren unter den verwendeten Stimulantien herabreguliert werden und somit diesbezüglich nicht mit unstimulierten Zellen verglichen werden können. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt existieren keinerlei Vergleichsdaten zum Verhalten fetaler Chemokinrezeptoren auf NKT-Zellen nach PMA/ Ionomycin-Stimulation.

Die Herabregulation der Rezeptoren kann auf mindestens zwei Arten geschehen: Einerseits wird postuliert, dass das G-Protein nach Aktivierung vom Rezeptor abgetrennt wird, so dass eine weitere Stimulation des Rezeptors verhindert wird <sup>116</sup>, andererseits wird eine Internalisation des gesamten Rezeptors diskutiert, wobei der Rezeptor entweder im Lysosom abgebaut wird oder wiederaufbereitet an die Zelloberfläche zurückkehrt <sup>117</sup>. Welcher Mechanismus bei den NKT-Zellen zugrunde liegt ist nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise liegen beide Mechanismen parallel vor.

### 7.3 Phänotypische Charakterisierung fetaler und adulter NKT-Zellen anhand der CKR-Prozentsätze

Im Nabelschnurblut war im Vergleich zu adultem peripherem Blut ein geringerer Prozentsatz an CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten festzustellen. Innerhalb der Gesamt NKT-Zellen war der prozentuale Anteil an DN NKT-Zellen sowohl in der Erwachsenen- als auch in der Neugeborenenengruppe größer als der Anteil CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen. Die CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen waren in adultem Blut zu einem deutlich geringeren Prozentsatz gegenüber fetalen CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen vertreten. Damit stellte die DN NKT-Population den größten Anteil an NKT-Zellen in Nabelschnurblut und bei den Erwachsenen dar. Da die Anzahl CD8<sup>+</sup> NKT-Zellen äußerst niedrig war, konnte diese Subpopulation aufgrund der zu geringen Zellzahlen nicht in die Auswertungen miteinbezogen werden.

Es konnte aufgezeigt werden, dass alle bei Erwachsenen untersuchten CKR<sup>+</sup> NKT-Zellsubpopulationen auch in Nabelschnurblut nachweisbar waren. Während Thomas et al. 2003 innerhalb adulter unstimulierter NKT-Zellen eine Häufigkeit von jeweils > 50 % CCR5<sup>+</sup>, CCR6<sup>+</sup> und CXCR3<sup>+</sup> exprimierender NKT-Zellen nachwies<sup>118</sup>, wurden in der vorliegenden Arbeit diese Chemokinrezeptoren nur noch auf < 20 % aller NKT-Zellen exprimiert. Auch Kim et al. kamen 2002 zu dem Ergebnis, dass adulte NKT-Zellen CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 und CXCR4 zu mehr als 70 % exprimieren<sup>54</sup>. Auch hier wurden unstimulierte Zellen für die Untersuchungen herangezogen. Der Unterschied in den Prozentsätzen CKR<sup>+</sup> NKT-Zellen kann daher möglicherweise auf die PMA/Ionomycin-Stimulation zurückgeführt werden. Beim Vergleich der Prozentsätze adulter versus fetaler NKT-Zellsubpopulationen fanden sich signifikant höhere Prozentsätze fetaler CCR4<sup>+</sup>, CCR7<sup>+</sup> und CXCR4<sup>+</sup> NKT-Zellen. Es gibt gegenwärtig keine Hinweise darauf, dass CKR auf adulten und fetalen NKT-Zellen unterschiedlich schnell herabreguliert werden, so dass die unterschiedlichen Häufigkeiten fetaler und adulter NKT-Zellen vermutlich real sind. Dennoch kann eine unterschiedliche Modulation der Chemokinrezeptoren auf fetalen und adulten NKT-Zellen unter den gewählten Stimulationsbedingungen nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden. Insgesamt gestaltet sich die Beurteilung der Ergebnisse schwierig, da in der Literatur bislang kaum Vergleichsdaten vorliegen. Dies betrifft insbesondere Untersuchungen der CKR-Expression auf fetalen NKT-Zellen.

Somit kann als ein Ergebnis festgehalten werden, dass die Prozentsätze einzelner  $CKR^+$  NKT-Zellen in der Nabelschnurblut höher sind, obwohl der Prozentsatz aller fetalen NKT-Zellen niedriger als bei Erwachsenen ist. Das bedeutet, dass die Verteilung der einzelnen  $CKR^+$ -Subpopulationen zwischen Erwachsenen und Feten nicht spiegelbildlich ist. Dies betrifft vor allem Marker, die mit naiven Zellen assoziiert sind bzw. zu den homöostatischen Rezeptoren gehören (CXCR4, CCR7), aber auch Th2-assoziierte Marker (CCR4, CCR8)<sup>57</sup>. Da Neugeborene mehr naive T-Zellen besitzen als Erwachsene<sup>110</sup> werden diese Rezeptoren erwartungsgemäß bei einem signifikant höheren Prozentsatz fetaler NKT-Zellen im Vergleich zu NKT-Zellen aus peripherem Blut Erwachsener gefunden. Die Beobachtung, dass der hier festgestellte Prozentsatz fetaler  $CCR7^+$  NKT-Zellen dennoch sehr gering ist kann evtl. darauf zurückgeführt werden, dass NKT-Zellen von Neugeborenen bereits bei einmaliger Stimulation aktiviert werden und somit ihren naiven Phänotyp verlieren. Dies widerspricht allerdings der Hypothese von D'Andrea et al, die besagt, dass fetale NKT-Zellen erst nach wiederholter Stimulation in der Lage sind, eine Immunantwort zu induzieren, wobei in dieser Publikation keine nähere Untersuchung hinsichtlich der  $CKR$ -Expression erfolgte und die Probandenzahl von 3 Neugeborenen möglicherweise nicht aussagekräftig genug ist<sup>46</sup>. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Stimulationszeiten möglichst kurz gewählt wurden, so dass dennoch eine meßbare Zytokinproduktion gewährleistet werden konnte, war eine Herabregulation der  $CKR$  unvermeidbar. Es ergaben sich in der DN NKT-Population für CCR4, CCR7, CCR8 und CXCR4 signifikant höhere Prozentsätze auf Zellen aus der Nabelschnur als auf Zellen des Erwachsenenblutes.

#### **7.4 Funktionelle Charakterisierung fetaler und adulter $CKR^+$ NKT-Zellen**

Die Untersuchung der Zytokinproduktion von DN- und  $CD4^+$  NKT-Zellen von Erwachsenen und Neugeborenen innerhalb der jeweiligen Chemokinrezeptor-exprimierenden Subpopulationen diente dazu, Zusammenhänge zwischen  $CKR^+$  NKT-Zellsubpopulationen und immunregulatorischen Funktionen herzustellen. Für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft ist eine Th2-Immunantwort sowohl bei der Mutter als auch beim Feten wesentlich, da es sonst zur Abstoßung des fetalen Semiallografts kommt. Vergleichbar mit herkömmlichen fetalen T-Zellen zeigten fetale NKT-Zellen beider untersuchten Subpopulationen eine deutliche Tendenz hin zu einer Th2-Immunantwort<sup>110,114,119,120</sup>.

Der Prozentsatz  $\text{IFN}\gamma$ -synthetisierender NKT-Zellen war bei den Erwachsenen und Neugeborenen vergleichbar. Die Frequenz IL-4-produzierender fetaler NKT-Zellen war nahezu vergleichbar hoch wie die der  $\text{IFN}\gamma$ -synthetisierenden NKT-Zellen, wohingegen in der adulten NKT-Population ein signifikant geringeren Prozentsatz IL-4 synthetisierender NKT-Zellen zu beobachten war. Dies entspricht dem Ergebnis von Kadowaki et al., der eine Th2 Polarisation für stimulierte fetale NKT-Zellen aufzeigte<sup>114</sup>. Dabei untersuchte er jedoch nicht, ob sich DN- und  $\text{CD4}^+$  NKT-Subpopulationen diesbezüglich unterscheiden. Ob das Überwiegen einer Th2-Immunantwort fetaler NKT-Zellen darauf zurückgeführt werden kann, dass adulte NKT-Zellen weniger flexibel sind, beide Immunantworten zu provozieren und eher eine Th1-Immunantwort eingehen, ist noch nicht abschließend geklärt. Bei Betrachtung der DN und  $\text{CD4}^+$  NKT-Subpopulationen zeigte sich, dass in der DN NKT-Fraktion signifikant häufiger IL-4 von den Neugeborenenzellen als von adulten Vergleichszellen gebildet wurde. Nicht ganz so ausgeprägt war der Unterschied bei den  $\text{CD4}^+$   $\text{IFN}\gamma$  produzierenden NKT-Zellen. In der  $\text{CD4}^+$  NKT-Subpopulation war hinsichtlich der IL-4-Produktion kein Unterschied zwischen Erwachsenen- und Nabelschnurblutzellen festzustellen. Bezüglich der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion ließ sich ein signifikant höherer Prozentsatz bei den adulten  $\text{CD4}^+$  NKT-Zellen nachweisen.

Um die funktionellen Unterschiede zwischen adulten versus fetalen  $\text{CKR}^+$  NKT-Zellsubpopulationen zu untersuchen, wurden für jede  $\text{CKR}^+$  DN und  $\text{CD4}^+$  NKT-Population das Verhältnis  $\text{IFN}\gamma$  zu IL-4 synthetisierender NKT-Zellen berechnet. Da NKT-Zellen beide Zytokine in hohem Ausmaße produzieren, kann anhand des Quotienten  $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$  die Tendenz der untersuchten NKT-Subpopulation hinsichtlich einer Th1-dominierten oder einer Th2-dominierten Immunantwort abgelesen werden. Als Resultat dieser Untersuchung konnte aufgezeigt werden, dass bis auf  $\text{CCR3}^+$   $\text{CD4}^+$  NKT-Zellen das  $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$  Verhältnis der DN und  $\text{CD4}^+$  NKT-Populationen aus Erwachsenenblut stets größer waren als die der entsprechenden fetalen Populationen. Der Befund, dass mit Ausnahme der  $\text{CCR3}^+$   $\text{CD4}^+$  NKT-Zellen alle untersuchten fetalen NKT-Zellpopulationen mehr IL-4 produzierten als ihre adulte Vergleichsgruppe, zeigt, dass in Analogie zu herkömmlichen T-Zellen bei fetalen NKT-Zellen eine Th2-Immunantwort überwiegt. Des Weiteren zeigte sich, dass die unterschiedliche Ausprägung der Zytokinproduktion in den verschiedenen NKT-Populationen nicht unwesentlich von den vorhandenen Chemokinrezeptoren abhängt. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass NKT-Zellen von Neugeborenen andere immunregulatorische Funktionen

während der Immunantwort übernehmen, als die gleichen Zellen dies im Erwachsenenalter tun. Wann der Übergang von einer Th2-Antwort hin zu einer Th1-Immunantwort vollzogen wird bleibt weiter Bestandteil der immunologischen Forschung. Ebenso, zu welchem Zeitpunkt NKT-Zellen im fetalen Leben ihre Funktion erlangen.

Bei der Betrachtung fetaler NKT-Zellen, die inflammatorische CKR tragen (CCR2, CCR3, CCR5, CCR8, CXCR3) stellte sich auf Zytokinebene durchgängig ein relatives Th2-Übergewicht dar. Dieser Befund gilt auch für CCR5, welcher ansonsten typischerweise mit Th1-Immunantworten bzw. Erkrankungen assoziiert ist<sup>53,121-125</sup>. Da für fetale NKT-Zellen ein nahezu ausschließlicher Th2-Phänotyp postuliert wird<sup>119</sup>, waren CCR5<sup>+</sup> NKT-Zellen erwartungsgemäß im Nabelschnurblut seltener nachweisbar, obwohl im Vergleich zu der Häufigkeit adulter CCR5<sup>+</sup> NKT-Zellen kein signifikanter Unterschied festzustellen war. Der Befund der Th2-Gewichtung fetaler NKT-Zellen mit inflammatorischen Markern spiegelte sich auch in den IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnissen wider. Einzig für CCR2 war in der fetalen CD4<sup>+</sup> NKT-Population ein signifikant höherer Prozentsatz an IL-4 synthetisierender NKT-Zellen nachzuweisen (Th2), wohingegen das IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnis jedoch eine Th1-bias aufzeigte. Allerdings betreffen diese Beobachtungen zur fetalen Th2-bias fast nur DN NKT-Zellen, evtl. weil die Frequenz CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen für den entsprechenden Nachweis zu niedrig war (Ausnahme CCR2). Von NKT-Zellen, die homöostatische CKR trugen (CCR7, CCR9, CXCR4), wiesen nur CXCR4<sup>+</sup> NKT-Zellen eine höhere IL-4-Synthese auf. Diesen Befund spiegelten die IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnisse jedoch nicht wider. Zwar zeigte sich prozentual eine Th2-Tendenz (signifikant mehr IL-4 synthetisierende fetale DN NKT-Zellen), die aber nicht durch ein erniedrigtes IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnis widergespiegelt wurde.

Basierend auf diesen Beobachtungen leiten wir folgende Hypothese ab: „Effektor NKT“ (i.e.S. NKT-Zellen welche inflammatorische CKR exprimieren) sind an der Aufrechterhaltung des fetalen relativen Th2-Übergewichts beteiligt, das für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft wichtig ist<sup>120,126,127</sup>. Homöostatische NKT-Zellen sind hingegen nicht an einer Th2-Immunantwort beteiligt, wobei für CXCR4<sup>+</sup> NKT widersprüchliche Ergebnisse erzielt wurden. Die Tatsache, dass das Verhältnis IFN $\gamma$  und IL-4 synthetisierender CXCR4<sup>+</sup> NKT Zellen bei Erwachsenen und Feten ähnlich ist, spricht eher gegen eine Beteiligung dieser Population an der Aufrechterhaltung des Th2-Übergewichts. Weiter deuten diese Daten auf ein

unterschiedliches Migrationsverhalten fetaler versus adulter NKT-Zellen hin. Dies muss in künftigen Untersuchungen jedoch weiter überprüft werden.

## 8 Zusammenfassung

Natürliche Killer T-Zellen (NKT)-Zellen sind nach dem heutigen Wissensstand zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem anzusiedeln und spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation adaptiver Immunantworten. Es gibt in der Literatur Hinweise darauf, dass NKT-Zellen bereits *in utero* aktiviert sind und somit bereits vor der Geburt an der Regulation von Immunantworten teilnehmen<sup>128,129</sup>. Über die Funktion fetaler NKT-Zellen ist bisher jedoch wenig bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, das Chemokinrezeptor (CKR)-Expressionsmuster fetaler und adulter NKT-Zellen vergleichend zu untersuchen, um so Hinweise auf das Migrationsverhalten zu erhalten. Anhand der Expression Th1- bzw. Th2-assoziiierter CKR sollten Hinweise auf eine Th1- bzw. Th2- Funktion erarbeitet werden. In einem zweiten Schritt sollte das intrazelluläre Zytokinexpressionsmuster innerhalb der einzelnen CKR-exprimierenden NKT-Subpopulationen untersucht werden.

Für die Untersuchungen fetaler NKT-Zellen wurden isolierte mononukleäre Zellen aus plazentarem Nabelschnurblut reifer, gesunder Neugeborener verwendet. Adulte NKT-Zellen wurden in peripherem Blut erwachsener, gesunder Spender ohne Nikotinabusus und ohne allergische Erkrankung untersucht. NKT-Zellen wurden durchflusszytometrisch anhand der Oberflächenexpression von V $\alpha$ 24 und V $\beta$ 11 definiert. Die fetalen und adulten NKT-Zellen wurden weiter in CD4<sup>+</sup> und CD4-CD8-negative (doppelt-negative, DN) Subpopulationen unterschieden. Innerhalb dieser Subpopulationen wurde der Prozentsatz CKR-exprimierender NKT-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Im nächsten Schritt wurde die intrazelluläre IL-4 und IFN $\gamma$  - Synthese innerhalb der CKR-exprimierenden NKT-Subpopulationen durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurde ein angepasstes Stimulationsprotokoll etabliert.

Es konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz fetaler NKT-Zellen innerhalb der Lymphozyten signifikant niedriger als bei Erwachsenen ist. Innerhalb der NKT-Zellgesamtpopulation sind DN NKT-Zellen sowohl im Nabelschnurblut, als auch bei Erwachsenen häufiger als CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen. Alle bei adultem Blut untersuchten CKR auf NKT-Zellen sind auch auf fetalen NKT-Zellen zu finden. Obgleich der Prozentsatz aller fetalen NKT-Zellen niedriger als bei Erwachsenen ist, sind die Prozentsätze einzelner fetaler CKR<sup>+</sup>

NKT-Subpopulationen höher, was eine nicht-spiegelbildliche Verteilung zwischen Feten und Erwachsenen zur Folge hat. So sind vor allem Marker, die mit naiven T-Zellen assoziiert sind bzw. zu den homöostatischen Rezeptoren gehören, signifikant häufiger auf fetalen NKT-Zellen zu finden. (CCR7, CXCR4). Auch für Th2-assoziierte CKR trifft diese Beobachtung zu (CCR4, CCR8). Diese Befunde deuten auf ein unterschiedliches Wanderungsverhalten fetaler versus adulter NKT-Zellen hin. Fetale NKT-Zellen welche inflammatorische CKR (CCR2, CCR3, CCR5, CCR8, CXCR3) exprimieren, zeigen auf Zytokinebene im Vergleich zu NKT-Zellen Erwachsener eine Th2-Gewichtung. Dies gilt auch für CCR5, der sonst typischerweise mit Th1-Immunantworten in Verbindung gebracht wird. Die IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnisse spiegeln das Th2-Übergewicht in allen fetalen inflammatorischen CKR<sup>+</sup> NKT-Subpopulationen wider, mit Ausnahme von CCR2. Jedoch gilt diese Beobachtung nur für DN NKT-Zellen durchgängig, wobei die Frequenz CD4<sup>+</sup> NKT-Zellen möglicherweise zu niedrig war, um die entsprechenden Nachweise erbringen zu können (Ausnahme CCR2).

Fetale NKT-Zellen welche homöostatische CKR (CCR7, CXCR4) exprimieren, zeigen auf Zytokinebene keinen signifikanten Unterschied des IFN $\gamma$ /IL-4 Verhältnisses im Vergleich zu NKT-Zellen Erwachsener.

Aus den Ergebnissen lässt sich schlußfolgern, dass fetale NKT-Zellen sich von NKT-Zellen aus peripherem Blut Erwachsener sowohl phänotypisch als auch funktionell unterscheiden. Dies deutet darauf hin, dass NKT-Zellen im Laufe des Lebens unterschiedliche Funktionen einnehmen. Basierend auf diesen Beobachtungen wird weiter hypothetisiert, dass fetale „Effektor“ NKT-Zellen (i.e.S. NKT-Zellen, welche inflammatorische CKR exprimieren) an der Aufrechterhaltung der fetalen Th2-Gewichtung, welche für die Erhaltung der Schwangerschaft notwendig ist, beteiligt sind. NKT-Zellen, welche homöostatische CKR exprimieren, spielen dagegen für die Aufrechterhaltung der Th2-Gewichtung keine Rolle. Diese Hypothese muss in weiteren Untersuchungen geprüft werden.



---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des CC Chemokins .....	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des CXC Chemokins .....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung des CX Chemokins.....	5
Abbildung 4: Schematische Darstellung des CXXXC Chemokins .....	5
Abbildung 5: G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Domänen .....	6
Abbildung 6: Funktionale Klassifikation der humanen Chemokine und ihrer Rezeptoren.....	8
Abbildung 7: Rearrangement der TCR-Gene <sup>32</sup> .....	12
Abbildung 8: Vorderansicht des CD1d-Moleküls. (nach D. Wu et al., 2006).....	15
Abbildung 9: $\alpha$ -Galaktosylceramid (nach D. Wu et al., 2006) .....	15
Abbildung 10: Lymphozyteneingrenzung in ficolliertem Blut.....	35
Abbildung 11: Eingrenzung der NKT-Zellen innerhalb der aufgenommenen Lymphozyten.....	35
Abbildung 12: Darstellung der CD8 <sup>-</sup> , CD4 <sup>-</sup> , CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> (DP)- und CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>-</sup> (DN) - Lymphozyten.....	36
Abbildung 13: beispielhafte Darstellung der CKR <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> - und CKR <sup>+</sup> IL-4 <sup>+</sup> NKT-Zellen (DP NKT) .....	37
Abbildung 14: FACS Diva statistische Auswertung .....	38
Abbildung 15: Einschlusskriterien zur Auswertung der Proben.....	39
Abbildung 16: Prozentsätze CCR2 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	44
Abbildung 17: Frequenz CCR2 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	45
Abbildung 18: Prozentsätze CCR3 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	46
Abbildung 19: Frequenz CCR3 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	48
Abbildung 20: Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	50
Abbildung 21: Frequenz CCR4 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	51
Abbildung 22: Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	52

---

Abbildung 23: Frequenz CCR5 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	53
Abbildung 24: Prozentsätze CCR6 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	55
Abbildung 25: Frequenz CCR6 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	56
Abbildung 26: Prozentsätze CCR7 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	57
Abbildung 27: Frequenz CCR7 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	58
Abbildung 28: Prozentsätze CCR8 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	60
Abbildung 29: Frequenz CCR8 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	61
Abbildung 30: Prozentsätze CCR9 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	63
Abbildung 31: Frequenz CCR9 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	64
Abbildung 32: Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	66
Abbildung 33: Frequenz CXCR3 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	67
Abbildung 34: Prozentsätze CXCR4 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen.....	68
Abbildung 35: Frequenz CXCR4 <sup>+</sup> Zellen innerhalb fetaler und adulter CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	69
Abbildung 36: Prozentsätze CKR <sup>+</sup> adulter und fetaler NKT-Zellen .....	70
Abbildung 37: Prozentsätze CKR <sup>+</sup> adulter und fetaler DN NKT-Zellen .....	71
Abbildung 38: Prozentsätze CKR <sup>+</sup> adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	71
Abbildung 39: Prozentsätze IFN $\gamma$ - produzierende NKT-Zellen und NKT-Subpopulationen .....	73
Abbildung 40: Prozentsätze IL-4- produzierende NKT-Zellen und NKT-Subpopulationen.....	74
Abbildung 41: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR2 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	75
Abbildung 42: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR3 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	76
Abbildung 43: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR4 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	77
Abbildung 44: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR5 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	78

---

Abbildung 45: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR6 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	79
Abbildung 46: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR7 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	80
Abbildung 47: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR8 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	81
Abbildung 48: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CCR9 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	82
Abbildung 49: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CXCR3 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	83
Abbildung 50: IFN $\gamma$ - und IL-4- produzierende CXCR4 <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	84
Abbildung 51: IFN $\gamma$ /IL-4-Verhältnis von CKR <sup>+</sup> DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Subpopulationen .....	92
Abbildung 52: IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnis von CKR <sup>+</sup> DN NKT-Zellen.....	93
Abbildung 53: IFN $\gamma$ /IL-4- Verhältnis von CKR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen .....	93

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Antikörper .....	24
Tabelle 2: Antikörperkombinationen der einzelnen Tubes.....	30
Tabelle 3: Pipettierschema zur intrazellulären Färbung .....	32
Tabelle 4: Verwendete Fluorochrome und ihre Charakteristika.....	34
Tabelle 5: Charakterisierung von Erwachsenen .....	40
Tabelle 6: Charakterisierung der Neugeborenen .....	41
Tabelle 7: Blutparameter der Neugeborenen .....	41
Tabelle 8: Vergleich von fetalen und adulten Lymphozyten- und NKT-Subpopulationen.....	42
Tabelle 9: Prozentsatz an DN- und CD4 <sup>+</sup> NKT-Zellen innerhalb aller Lymphozyten bei Neugeborenen und Erwachsenen.....	43
Tabelle 10: Prozentsätze CCR2 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	44
Tabelle 11: Prozentsätze CCR2 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	45
Tabelle 12: Prozentsätze CCR3 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	46
Tabelle 13: Prozentsätze CCR3 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	47
Tabelle 14: Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	49
Tabelle 15: Prozentsätze CCR4 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	50
Tabelle 16: Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	52
Tabelle 17: Prozentsätze CCR5 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	53
Tabelle 18: Prozentsätze CCR6 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	54
Tabelle 19: Prozentsätze CCR6 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	55
Tabelle 20: Prozentsätze CCR7 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	57

---

Tabelle 21: Prozentsätze CCR7 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	58
Tabelle 22: Prozentsätze CCR8 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	59
Tabelle 23: Prozentsätze CCR8 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	60
Tabelle 24: Prozentsätze CCR9 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	62
Tabelle 25: Prozentsätze CCR9 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	63
Tabelle 26: Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	65
Tabelle 27: Prozentsätze CXCR3 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	66
Tabelle 28: Prozentsätze CXCR4 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler Lymphozyten, CD4 <sup>+</sup> - und NKT-Zellen .....	68
Tabelle 29: Prozentsätze CXCR4 <sup>+</sup> exprimierender adulter und fetaler CD4 <sup>+</sup> -und DN NKT-Zellen .....	69
Tabelle 30: Prozentsätze zytokinproduzierender NKT-Zellen und deren CD4 <sup>+</sup> - und DN-Subpopulationen .....	72
Tabelle 31: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR2 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	75
Tabelle 32: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	76
Tabelle 33: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	77
Tabelle 34: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR5 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	78
Tabelle 35: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR6 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	79
Tabelle 36: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR7 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	80
Tabelle 37: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR8 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	81
Tabelle 38: Prozentsätze zytokinproduzierender CCR9 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	82
Tabelle 39: Prozentsätze zytokinproduzierender CXCR3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	83
Tabelle 40: Prozentsätze zytokinproduzierender CXCR4 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> - und DN NKT-Zellen.....	84
Tabelle 41: Verhältnis von IFN $\gamma$ zu IL-4 sezernierenden DN und CD4 <sup>+</sup> CCR2 <sup>+</sup> NKT-Zellen..	85
Tabelle 42: Verhältnis von IFN $\gamma$ zu IL-4 sezernierenden DN und CD4 <sup>+</sup> CCR3 <sup>+</sup> NKT-Zellen..	86
Tabelle 43: Verhältnis von IFN $\gamma$ zu IL-4 sezernierenden DN und CD4 <sup>+</sup> CCR4 <sup>+</sup> NKT-Zellen..	86
Tabelle 44: Verhältnis von IFN $\gamma$ zu IL-4 sezernierenden DN und CD4 <sup>+</sup> CCR5 <sup>+</sup> NKT-Zellen..	87
Tabelle 45: Verhältnis von IFN $\gamma$ zu IL-4 sezernierenden DN und CD4 <sup>+</sup> CCR6 <sup>+</sup> NKT-Zellen..	88
Tabelle 46: Verhältnis von IFN $\gamma$ zu IL-4 sezernierenden DN und CD4 <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> NKT-Zellen..	88

- 
- Tabelle 47: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR8<sup>+</sup>NKT-Zellen.. 89
- Tabelle 48: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CCR9<sup>+</sup>NKT-Zellen.. 89
- Tabelle 49: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CXCR3<sup>+</sup>NKT-Zellen90
- Tabelle 50: Verhältnis von IFN $\gamma$  zu IL-4 sezernierenden DN und CD4<sup>+</sup> CXCR4<sup>+</sup>NKT-Zellen91

---

## Literaturverzeichnis

- 1 Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173
- 2 Romagnani, S. (1997) Atopic allergy and other hypersensitivities interactions between genetic susceptibility, innocuous and/or microbial antigens and the immune system. *Curr Opin Immunol* 9 (6), 773-775
- 3 Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A. and Coffman, R.L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136 (7), 2348-2357
- 4 Kim, K.H., Solvay, M.J. and Thomas, D.W. (1985) Cellular requirements for antigen processing by antigen-presenting cells: evidence for different pathways in forming the same antigenic determinants. *Cell Immunol* 96 (2), 267-276
- 5 Seder, R.A. and Paul, W.E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol* 12, 635-673
- 6 Firestein, G.S., Roeder, W.D., Laxer, J.A., Townsend, K.S., Weaver, C.T., Hom, J.T., Linton, J., Torbett, B.E. and Glasebrook, A.L. (1989) A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. *J Immunol* 143 (2), 518-525
- 7 Chaplin, D.D. (2003) 1. Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2 Suppl), S442-459
- 8 Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. (1989) Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv Immunol* 46, 111-147
- 9 Yazdanbakhsh, M., Kremsner, P.G. and van Ree, R. (2002) Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. *Science* 296 (5567), 490-494
- 10 Prahalad, S. (2000) Atopy, autoimmunity, and the T(H)1/T(H)2 balance. *J Pediatr* 137 (4), 446-449
- 11 Janeway C. A., T.P., Walport M., Shlomchik M. (2001) *Immunobiology. The Immune System in Health and Disease*, Churchill Livingstone
- 12 Mosmann, T.R. and Sad, S. (1996) The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17 (3), 138-146
- 13 Wills-Karp, M., Gavett, S.H., Schofield, B. and Finkelman, F. (1996) Role of interleukin-4 in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Adv Exp Med Biol* 409, 343-347
- 14 Butcher, E.C., Williams, M., Youngman, K., Rott, L. and Briskin, M. (1999) Lymphocyte trafficking and regional immunity. *Adv Immunol* 72, 209-253
- 15 Cyster, J.G. (1999) Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286 (5447), 2098-2102
- 16 Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392 (6676), 565-568
- 17 Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242
- 18 Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12 (2), 121-127
- 19 Moser, B. and Loetscher, P. (2001) Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol* 2 (2), 123-128

- 
- 20 Mackay, C.R. (2001) Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2 (2), 95-101
- 21 Loetscher, P., Moser, B. and Baggiolini, M. (2000) Chemokines and their receptors in lymphocyte traffic and HIV infection. *Adv Immunol* 74, 127-180
- 22 Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *J Cell Sci* 115 (Pt 3), 455-465
- 23 Kim, C.H. (2004) Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 4 (4), 343-361
- 24 Rogers, T.J., Steele, A.D., Howard, O.M. and Oppenheim, J.J. (2000) Bidirectional heterologous desensitization of opioid and chemokine receptors. *Ann N Y Acad Sci* 917, 19-28
- 25 Foxman, E.F., Campbell, J.J. and Butcher, E.C. (1997) Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol* 139 (5), 1349-1360
- 26 Proudfoot, A.E. (2002) Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol* 2 (2), 106-115
- 27 Godfrey, D.I., Hammond, K.J., Poulton, L.D., Smyth, M.J. and Baxter, A.G. (2000) NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol Today* 21 (11), 573-583
- 28 Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H. and Roark, J.H. (1997) Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15, 535-562
- 29 Godfrey, D.I., MacDonald, H.R., Kronenberg, M., Smyth, M.J. and Van Kaer, L. (2004) NKT cells: What's in a name? *Nat Rev Immunol* 4 (3), 231-237
- 30 Bendelac, A. (1995) Mouse NK1+ T cells. *Curr Opin Immunol* 7 (3), 367-374
- 31 Kawakami, K., Kinjo, Y., Uezu, K., Yara, S., Miyagi, K., Koguchi, Y., Nakayama, T., Taniguchi, M. and Saito, A. (2001) Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection. *J Immunol* 167 (11), 6525-6532
- 32 Porcelli, S., Yockey, C.E., Brenner, M.B. and Balk, S.P. (1993) Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med* 178 (1), 1-16
- 33 Dellabona, P., Padovan, E., Casorati, G., Brockhaus, M. and Lanzavecchia, A. (1994) An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med* 180 (3), 1171-1176
- 34 Spada, F.M., Koezuka, Y. and Porcelli, S.A. (1998) CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human natural killer T cells. *J Exp Med* 188 (8), 1529-1534
- 35 Brossay, L., Chioda, M., Burdin, N., Koezuka, Y., Casorati, G., Dellabona, P. and Kronenberg, M. (1998) CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 188 (8), 1521-1528
- 36 Prell, C., Konstantopoulos, N., Heinzlmann, B., Frankenberger, B., Reinhardt, D., Schendel, D.J. and Krauss-Etschmann, S. (2003) Frequency of Valpha24+CD161+ natural killer T cells and invariant TCRAV24-AJ18 transcripts in atopic and non-atopic individuals. *Immunobiology* 208 (4), 367-380
- 37 Gellert, M. (2002) V(D)J recombination: RAG proteins, repair factors, and regulation. *Annu Rev Biochem* 71, 101-132



- 
- 38 Gauss, G.H., Domain, I., Hsieh, C.L. and Lieber, M.R. (1998) V(D)J recombination activity in human hematopoietic cells: correlation with developmental stage and genome stability. *Eur J Immunol* 28 (1), 351-358
- 39 Benedict, C.L., Gilfillan, S., Thai, T.H. and Kearney, J.F. (2000) Terminal deoxynucleotidyl transferase and repertoire development. *Immunol Rev* 175, 150-157
- 40 Krayevsky, A.A., Victorova, L.S., Arzumanov, A.A. and Jasko, M.V. (2000) Terminal deoxynucleotidyl transferase. catalysis of DNA (oligodeoxynucleotide) phosphorylation. *Pharmacol Ther* 85 (3), 165-173
- 41 Janeway C. A., T.P., Walport M., Shlomchik M. (2002) *Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag GmbH
- 42 Nikolich-Zugich, J., Slifka, M.K. and Messaoudi, I. (2004) The many important facets of T-cell repertoire diversity. *Nat Rev Immunol* 4 (2), 123-132
- 43 Exley, M., Garcia, J., Balk, S.P. and Porcelli, S. (1997) Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 186 (1), 109-120
- 44 Porcelli, S., Gerdes, D., Fertig, A.M. and Balk, S.P. (1996) Human T cells expressing an invariant V alpha 24-J alpha Q TCR alpha are CD4- and heterogeneous with respect to TCR beta expression. *Hum Immunol* 48 (1-2), 63-67
- 45 Prussin, C. and Foster, B. (1997) TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol* 159 (12), 5862-5870
- 46 D'Andrea, A., Goux, D., De Lalla, C., Koezuka, Y., Montagna, D., Moretta, A., Dellabona, P., Casorati, G. and Abrignani, S. (2000) Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur J Immunol* 30 (6), 1544-1550
- 47 Kronenberg, M. (2005) Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol* 23, 877-900
- 48 Godfrey, D.I. and Kronenberg, M. (2004) Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest* 114 (10), 1379-1388
- 49 Berzins, S.P., Uldrich, A.P., Pellicci, D.G., McNab, F., Hayakawa, Y., Smyth, M.J. and Godfrey, D.I. (2004) Parallels and distinctions between T and NKT cell development in the thymus. *Immunol Cell Biol* 82 (3), 269-275
- 50 Hayakawa, Y., Godfrey, D.I. and Smyth, M.J. (2004) Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application. *Curr Med Chem* 11 (2), 241-252
- 51 Hammond, K.J., Pellicci, D.G., Poulton, L.D., Naidenko, O.V., Scalzo, A.A., Baxter, A.G. and Godfrey, D.I. (2001) CD1d-restricted NKT cells: an interstrain comparison. *J Immunol* 167 (3), 1164-1173
- 52 Benlagha, K., Weiss, A., Beavis, A., Teyton, L. and Bendelac, A. (2000) In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers. *J Exp Med* 191 (11), 1895-1903
- 53 Kim, C.H., Rott, L., Kunkel, E.J., Genovese, M.C., Andrew, D.P., Wu, L. and Butcher, E.C. (2001) Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 108 (9), 1331-1339
- 54 Kim, C.H., Johnston, B. and Butcher, E.C. (2002) Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100 (1), 11-16

- 
- 55 Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401 (6754), 708-712
- 56 Warnock, R.A., Campbell, J.J., Dorf, M.E., Matsuzawa, A., McEvoy, L.M. and Butcher, E.C. (2000) The role of chemokines in the microenvironmental control of T versus B cell arrest in Peyer's patch high endothelial venules. *J Exp Med* 191 (1), 77-88
- 57 Kim, C.H., Butcher, E.C. and Johnston, B. (2002) Distinct subsets of human V $\alpha$ 24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends Immunol* 23 (11), 516-519
- 58 Bonecchi, R., Facchetti, F., Dusi, S., Luini, W., Lissandrini, D., Simmelink, M., Locati, M., Bernasconi, S., Allavena, P., Brandt, E., Rossi, F., Mantovani, A. and Sozzani, S. (2000) Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J Immunol* 164 (7), 3862-3869
- 59 Kim, C.H., Kunkel, E.J., Boisvert, J., Johnston, B., Campbell, J.J., Genovese, M.C., Greenberg, H.B. and Butcher, E.C. (2001) Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest* 107 (5), 595-601
- 60 Zabel, B.A., Agace, W.W., Campbell, J.J., Heath, H.M., Parent, D., Roberts, A.I., Ebert, E.C., Kassam, N., Qin, S., Zovko, M., LaRosa, G.J., Yang, L.L., Soler, D., Butcher, E.C., Ponath, P.D., Parker, C.M. and Andrew, D.P. (1999) Human G protein-coupled receptor GPR-9-6/CC chemokine receptor 9 is selectively expressed on intestinal homing T lymphocytes, mucosal lymphocytes, and thymocytes and is required for thymus-expressed chemokine-mediated chemotaxis. *J Exp Med* 190 (9), 1241-1256
- 61 Forster, R., Emrich, T., Kremmer, E. and Lipp, M. (1994) Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells. *Blood* 84 (3), 830-840
- 62 Gumperz, J.E. and Brenner, M.B. (2001) CD1-specific T cells in microbial immunity. *Curr Opin Immunol* 13 (4), 471-478
- 63 Porcelli, S.A. and Modlin, R.L. (1999) The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17, 297-329
- 64 Kronenberg, M. and Gapin, L. (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2 (8), 557-568
- 65 Brossay, L., Jullien, D., Cardell, S., Sydora, B.C., Burdin, N., Modlin, R.L. and Kronenberg, M. (1997) Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells. *J Immunol* 159 (3), 1216-1224
- 66 Wu, D., Zajonc, D.M., Fujio, M., Sullivan, B.A., Kinjo, Y., Kronenberg, M., Wilson, I.A. and Wong, C.H. (2006) Design of natural killer T cell activators: structure and function of a microbial glycosphingolipid bound to mouse CD1d. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (11), 3972-3977
- 67 Kobayashi, E., Motoki, K., Uchida, T., Fukushima, H. and Koezuka, Y. (1995) KR7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol Res* 7 (10-11), 529-534
- 68 Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., Koseki, H. and Taniguchi, M. (1997) CD1d-

- 
- restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278 (5343), 1626-1629
- 69 Hansen, D.S. and Schofield, L. (2004) Regulation of immunity and pathogenesis in infectious diseases by CD1d-restricted NKT cells. *Int J Parasitol* 34 (1), 15-25
- 70 Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., 3rd, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y.P., Yamashita, T., Teneberg, S., Wang, D., Proia, R.L., Levery, S.B., Savage, P.B., Teyton, L. and Bendelac, A. (2004) Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306 (5702), 1786-1789
- 71 Mattner, J., Debord, K.L., Ismail, N., Goff, R.D., Cantu, C., 3rd, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., Hoebe, K., Schneewind, O., Walker, D., Beutler, B., Teyton, L., Savage, P.B. and Bendelac, A. (2005) Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* 434 (7032), 525-529
- 72 Brigl, M., Bry, L., Kent, S.C., Gumperz, J.E. and Brenner, M.B. (2003) Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4 (12), 1230-1237
- 73 Kinjo, Y., Wu, D., Kim, G., Xing, G.W., Poles, M.A., Ho, D.D., Tsuji, M., Kawahara, K., Wong, C.H. and Kronenberg, M. (2005) Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* 434 (7032), 520-525
- 74 Kawasaki, S., Moriguchi, R., Sekiya, K., Nakai, T., Ono, E., Kume, K. and Kawahara, K. (1994) The cell envelope structure of the lipopolysaccharide-lacking gram-negative bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *J Bacteriol* 176 (2), 284-290
- 75 Kawahara, K., Moll, H., Knirel, Y.A., Seydel, U. and Zahringer, U. (2000) Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. *Eur J Biochem* 267 (6), 1837-1846
- 76 Gapin, L., Matsuda, J.L., Surh, C.D. and Kronenberg, M. (2001) NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2 (10), 971-978
- 77 Metelitsa, L.S., Naidenko, O.V., Kant, A., Wu, H.W., Loza, M.J., Perussia, B., Kronenberg, M. and Seeger, R.C. (2001) Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. *J Immunol* 167 (6), 3114-3122
- 78 Crowe, N.Y., Uldrich, A.P., Kyparissoudis, K., Hammond, K.J., Hayakawa, Y., Sidobre, S., Keating, R., Kronenberg, M., Smyth, M.J. and Godfrey, D.I. (2003) Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol* 171 (8), 4020-4027
- 79 Yoshimoto, T. and Paul, W.E. (1994) CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J Exp Med* 179 (4), 1285-1295
- 80 Matsuda, J.L., Gapin, L., Baron, J.L., Sidobre, S., Stetson, D.B., Mohrs, M., Locksley, R.M. and Kronenberg, M. (2003) Mouse V alpha 14i natural killer T cells are resistant to cytokine polarization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (14), 8395-8400
- 81 Smyth, M.J. and Godfrey, D.I. (2000) NKT cells and tumor immunity--a double-edged sword. *Nat Immunol* 1 (6), 459-460
- 82 Takahashi, T., Chiba, S., Nieda, M., Azuma, T., Ishihara, S., Shibata, Y., Juji, T. and Hirai, H. (2002) Cutting edge: analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells

- 
- activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 168 (7), 3140-3144
- 83 Lee, P.T., Benlagha, K., Teyton, L. and Bendelac, A. (2002) Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med* 195 (5), 637-641
- 84 Gumperz, J.E., Miyake, S., Yamamura, T. and Brenner, M.B. (2002) Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195 (5), 625-636
- 85 Takahashi, T., Nieda, M., Koezuka, Y., Nicol, A., Porcelli, S.A., Ishikawa, Y., Tadokoro, K., Hirai, H. and Juji, T. (2000) Analysis of human V alpha 24+ CD4+ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 164 (9), 4458-4464
- 86 Stetson, D.B., Mohrs, M., Reinhardt, R.L., Baron, J.L., Wang, Z.E., Gapin, L., Kronenberg, M. and Locksley, R.M. (2003) Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med* 198 (7), 1069-1076
- 87 Eberl, G. and MacDonald, H.R. (1998) Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* 9 (3), 345-353
- 88 Uldrich, A.P., Crowe, N.Y., Kyparissoudis, K., Pellicci, D.G., Zhan, Y., Lew, A.M., Bouillet, P., Strasser, A., Smyth, M.J. and Godfrey, D.I. (2005) NKT cell stimulation with glycolipid antigen in vivo: costimulation-dependent expansion, Bim-dependent contraction, and hyporesponsiveness to further antigenic challenge. *J Immunol* 175 (5), 3092-3101
- 89 Parekh, V.V., Wilson, M.T., Olivares-Villagomez, D., Singh, A.K., Wu, L., Wang, C.R., Joyce, S. and Van Kaer, L. (2005) Glycolipid antigen induces long-term natural killer T cell anergy in mice. *J Clin Invest* 115 (9), 2572-2583
- 90 Hammond, K.J. and Godfrey, D.I. (2002) NKT cells: potential targets for autoimmune disease therapy? *Tissue Antigens* 59 (5), 353-363
- 91 Forestier, C., Molano, A., Im, J.S., Dutronc, Y., Diamond, B., Davidson, A., Illarionov, P.A., Besra, G.S. and Porcelli, S.A. (2005) Expansion and hyperactivity of CD1d-restricted NKT cells during the progression of systemic lupus erythematosus in (New Zealand Black x New Zealand White)F1 mice. *J Immunol* 175 (2), 763-770
- 92 Hammond, K.J., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., Randle-Barrett, E., Nakayama, T., Taniguchi, M., Smyth, M.J., van Driel, I.R., Scollay, R., Baxter, A.G. and Godfrey, D.I. (1999) NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol* 29 (11), 3768-3781
- 93 Gombert, J.M., Herbelin, A., Tancrede-Bohin, E., Dy, M., Carnaud, C. and Bach, J.F. (1996) Early quantitative and functional deficiency of NK1+-like thymocytes in the NOD mouse. *Eur J Immunol* 26 (12), 2989-2998
- 94 Baxter, A.G., Kinder, S.J., Hammond, K.J., Scollay, R. and Godfrey, D.I. (1997) Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46 (4), 572-582
- 95 Hong, S., Wilson, M.T., Serizawa, I., Wu, L., Singh, N., Naidenko, O.V., Miura, T., Haba, T., Scherer, D.C., Wei, J., Kronenberg, M., Koezuka, Y. and Van Kaer, L. (2001) The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 7 (9), 1052-1056

- 
- 96 Sharif, S., Arreaza, G.A., Zucker, P., Mi, Q.S., Sondhi, J., Naidenko, O.V., Kronenberg, M., Koezuka, Y., Delovitch, T.L., Gombert, J.M., Leite-De-Moraes, M., Gouarin, C., Zhu, R., Hameg, A., Nakayama, T., Taniguchi, M., Lepault, F., Lehuen, A., Bach, J.F. and Herbelin, A. (2001) Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat Med* 7 (9), 1057-1062
- 97 Beaudoin, L., Laloux, V., Novak, J., Lucas, B. and Lehuen, A. (2002) NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells. *Immunity* 17 (6), 725-736
- 98 Araki, M., Kondo, T., Gumperz, J.E., Brenner, M.B., Miyake, S. and Yamamura, T. (2003) Th2 bias of CD4+ NKT cells derived from multiple sclerosis in remission. *Int Immunol* 15 (2), 279-288
- 99 Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Pellicci, D.G., Kyparissoudis, K., Kelly, J.M., Takeda, K., Yagita, H. and Godfrey, D.I. (2002) Sequential production of interferon-gamma by NK1.1(+) T cells and natural killer cells is essential for the antimetastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Blood* 99 (4), 1259-1266
- 100 Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H. and Godfrey, D.I. (2002) NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 14 (2), 165-171
- 101 Tahir, S.M., Cheng, O., Shaulov, A., Koezuka, Y., Buble, G.J., Wilson, S.B., Balk, S.P. and Exley, M.A. (2001) Loss of IFN-gamma production by invariant NK T cells in advanced cancer. *J Immunol* 167 (7), 4046-4050
- 102 Huber, S., Sartini, D. and Exley, M. (2003) Role of CD1d in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *J Immunol* 170 (6), 3147-3153
- 103 de Lalla, C., Galli, G., Aldrighetti, L., Romeo, R., Mariani, M., Monno, A., Nuti, S., Colombo, M., Callea, F., Porcelli, S.A., Panina-Bordignon, P., Abrignani, S., Casorati, G. and Dellabona, P. (2004) Production of profibrotic cytokines by invariant NKT cells characterizes cirrhosis progression in chronic viral hepatitis. *J Immunol* 173 (2), 1417-1425
- 104 Durante-Mangoni, E., Wang, R., Shaulov, A., He, Q., Nasser, I., Afdhal, N., Koziel, M.J. and Exley, M.A. (2004) Hepatic CD1d expression in hepatitis C virus infection and recognition by resident proinflammatory CD1d-reactive T cells. *J Immunol* 173 (3), 2159-2166
- 105 Grubor-Bauk, B., Simmons, A., Mayrhofer, G. and Speck, P.G. (2003) Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* 170 (3), 1430-1434
- 106 Cornish, A.L., Keating, R., Kyparissoudis, K., Smyth, M.J., Carbone, F.R. and Godfrey, D.I. (2006) NKT cells are not critical for HSV-1 disease resolution. *Immunol Cell Biol* 84 (1), 13-19
- 107 Pasquier, B., Yin, L., Fondaneche, M.C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G. and Latour, S. (2005) Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* 201 (5), 695-701
- 108 Bilenki, L., Yang, J., Fan, Y., Wang, S. and Yang, X. (2004) Natural killer T cells contribute to airway eosinophilic inflammation induced by ragweed through enhanced IL-4 and eotaxin production. *Eur J Immunol* 34 (2), 345-354

- 
- 109 Thomas, S.Y., Lilly, C.M. and Luster, A.D. (2006) Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 354 (24), 2613-2616; author reply 2613-2616
- 110 Delespesse, G., Yang, L.P., Ohshima, Y., Demeure, C., Shu, U., Byun, D.G. and Sarfati, M. (1998) Maturation of human neonatal CD4+ and CD8+ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors. *Vaccine* 16 (14-15), 1415-1419
- 111 Roth, I., Corry, D.B., Locksley, R.M., Abrams, J.S., Litton, M.J. and Fisher, S.J. (1996) Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin 10. *J Exp Med* 184 (2), 539-548
- 112 Piccinni, M.P., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Beloni, L., Giannarini, L., Sampognaro, S., Parronchi, P., Manetti, R., Annunziato, F., Livi, C. and et al. (1995) Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 155 (1), 128-133
- 113 van Der Vliet, H.J., Nishi, N., de Gruijl, T.D., von Blomberg, B.M., van den Eertwegh, A.J., Pinedo, H.M., Giaccone, G. and Scheper, R.J. (2000) Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood* 95 (7), 2440-2442
- 114 Kadowaki, N., Antonenko, S., Ho, S., Risoan, M.C., Soumelis, V., Porcelli, S.A., Lanier, L.L. and Liu, Y.J. (2001) Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J Exp Med* 193 (10), 1221-1226
- 115 Matsuda, J.L., Naidenko, O.V., Gapin, L., Nakayama, T., Taniguchi, M., Wang, C.R., Koezuka, Y. and Kronenberg, M. (2000) Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers. *J Exp Med* 192 (5), 741-754
- 116 Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. and Moser, B. (1994) Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *Faseb J* 8 (13), 1055-1060
- 117 Moro, O., Lamah, J. and Sadee, W. (1993) Serine- and threonine-rich domain regulates internalization of muscarinic cholinergic receptors. *J Biol Chem* 268 (10), 6862-6865
- 118 Thomas, S.Y., Hou, R., Boyson, J.E., Means, T.K., Hess, C., Olson, D.P., Strominger, J.L., Brenner, M.B., Gumperz, J.E., Wilson, S.B. and Luster, A.D. (2003) CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* 171 (5), 2571-2580
- 119 Eger, K.A., Sundrud, M.S., Motsinger, A.A., Tseng, M., Kaer, L.V. and Unutmaz, D. (2006) Human natural killer T cells are heterogeneous in their capacity to reprogram their effector functions. *PLoS ONE* 1, e50
- 120 Tsuda, H., Sakai, M., Michimata, T., Tanebe, K., Hayakawa, S. and Saito, S. (2001) Characterization of NKT cells in human peripheral blood and decidual lymphocytes. *Am J Reprod Immunol* 45 (5), 295-302
- 121 Loetscher, P., Ugucioni, M., Bordoli, L., Baggiolini, M., Moser, B., Chizzolini, C. and Dayer, J.M. (1998) CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *C R Biol* 391 (6665), 344-345
- 122 Krakauer, M., Sorensen, P.S., Khademi, M., Olsson, T. and Sellebjerg, F. (2006) Dynamic T-lymphocyte chemokine receptor expression induced by interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 64 (2), 155-163
- 123 Freysdottir, J., Zhang, S., Tilakaratne, W.M. and Fortune, F. (2006) Oral biopsies from patients with orofacial granulomatosis with histology resembling Crohn's disease have a prominent Th1 environment. *Inflamm Bowel Dis*

- 
- 124** Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner, H.L. and Hancock, W.W. (1999) CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (12), 6873-6878
- 125** Campbell, J.D. and HayGlass, K.T. (2000) T cell chemokine receptor expression in human Th1- and Th2-associated diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48 (6), 451-456
- 126** Lin, H., Mosmann, T.R., Guilbert, L., Tuntipopipat, S. and Wegmann, T.G. (1993) Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. *J Immunol* 151 (9), 4562-4573
- 127** Piccinni, M.P., Beloni, L., Livi, C., Maggi, E., Scarselli, G. and Romagnani, S. (1998) Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 4 (9), 1020-1024
- 128** Boyson, J.E., Rybalov, B., Koopman, L.A., Exley, M., Balk, S.P., Racke, F.K., Schatz, F., Masch, R., Wilson, S.B. and Strominger, J.L. (2002) CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (21), 13741-13746
- 129** Wang, S., Li, C., Kawamura, H., Watanabe, H. and Abo, T. (2002) Unique sensitivity to alpha-galactosylceramide of NKT cells in the uterus. *Cell Immunol* 215 (1), 98-105

---

## Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Susanne Krauss-Etschmann für die Bereitstellung des interessanten Themas sowie für die gute Betreuung und Korrektur meiner Doktorarbeit und für ihre fachliche Hilfestellung bei der Durchführung der experimentellen Arbeit.

Herrn Prof. Dr. D. Reinhardt danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Laboratorien der AG Pädiatrische Immunologie am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu können.

Ich danke Frau Prof. Dr. D. J. Schendel vom Institut für Molekulare Immunologie, GSF für die Unterstützung zur Durchführung dieser Arbeit.

Nicht zuletzt ein ganz herzliches Danke für die schöne Zeit, die gute Arbeitsatmosphäre und die vielen fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen an Gabi, Rania, Anastasia, Daniela, Conny, Silvia und Thomas.

Ich danke meinen Großeltern für alles, was sie die letzten Jahre für mich getan haben und die stets ein offenes Ohr für meine Anliegen hatten und mir oftmals einen anderen Blickwinkel auf die großen und kleinen Dinge des Lebens aufgezeigt haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich jahrelang in jeder Hinsicht in allen Lebenslagen unterstützt haben und immer in meine Fähigkeiten vertraut haben. Ich danke Ihnen für Ihre bedingungslose Liebe, Ihre ehrlichen Ratschläge und den Rückhalt, den ich immer erfahren habe und ohne den so Vieles ungleich schwerer wäre.

Weiterhin danke ich meinem Bruder Hauke für die Korrektur und Endbearbeitung meiner Arbeit und dafür, dass er immer für mich da war und mir in jeglichen Hochs und Tiefs beigestanden hat.



---

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

*Geburtstag:* 18. Juli 1978  
*Geburtsort:* Villingen-Schwenningen  
*Eltern:* Ingrid und Hans Heinrich Runge  
*Geschwister:* Hauke Runge

### **Schulbildung**

08/1985-07/1989 Grundschole Haagen  
08/1989-06/1998 Hebel-Gymnasium Lörrach

### **Studium**

#### Pharmazie

10/1998-10/1999 Albert-Ludwig-Universität Freiburg  
11/1999-10/2002 Ludwig-Maximilians-Universität München  
09/2000 1. Staatsexamen  
10/2002 2. Staatsexamen  
12/2003 3. Staatsexamen  
01/2004 Approbation

#### BWL

10/2004-10/2006 Wirtschaftsakademie Deutscher Apotheker, Bayreuth  
seit 11/2007 MBA Health Care Management, Universität Bayreuth

---

## **Praktika**

<i>11/1997-04/1998</i>	Bahnhof-Apotheke, Lörrach
<i>03/1999-05/1999</i>	Central-Apotheke, München
<i>11/2002-04/2003</i>	Zentralapotheke, Kreiskrankenhaus Lörrach
<i>05/2003-10/2003</i>	Schützen-Apotheke, München

## **Berufliche Tätigkeiten**

<i>01/2004-10/2006</i>	in Teilzeit angestellt als Apothekerin in der Schützen-Apotheke, München
<i>01/2004-05/2007</i>	Doktorandin am Dr. von Haunerschen Kinderspital, München
<i>seit 27.11.2006</i>	Inhaberin der Apotheke im Kaufland in Lörrach

Dateiname: Gesamt-Promotion 10.01.2008  
Verzeichnis: C:\dokumente und einstellungen\administrator\desktop  
Vorlage: C:\dokumente und  
einstellungen\administrator\anwendungsdaten\Microsoft\Vorlagen\Normal.dot  
Titel: Vergleichende Untersuchung der Funktion fetaler Natürlicher  
Killer T-Zellen mit Natürlichen Killer-T-Zellen aus dem peripheren Blut  
Erwachsener  
Thema: Vergleichende Untersuchung der Funktion fetaler Natürlicher  
Killer T-Zellen mit Natürlichen Killer-T-Zellen aus dem peripheren Blut  
Erwachsener  
Autor: Runge\_Anke  
Stichwörter:  
Kommentar:  
Erstelldatum: 10.02.2008 23:21:00  
Änderung Nummer: 8  
Letztes Speicherdatum: 11.02.2008 11:51:00  
Zuletzt gespeichert von: ankerunge  
Letztes Druckdatum: 11.02.2008 11:56:00  
Nach letztem vollständigen Druck  
Anzahl Seiten: 130  
Anzahl Wörter: 59.905 (ca.)  
Anzahl Zeichen: 388.789 (ca.)