

Aus dem
CharitéCentrum für Innere Medizin und Dermatologie
Forschungszentrum Immunwissenschaften
Direktor: Prof. Dr. A. Hamann
und Deutsches Rheumaforschungszentrum
Direktor: Prof. Dr. A. Radbruch

Habilitationsschrift

Bildung, Erhaltung und Funktion von humanen regulatorischen und Gedächtnis T-Zellen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Immunologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dr. rer. nat. Jens Albrecht Ernst Geginat
geboren am 12.10.1968 in Berlin

Eingereicht: Mai 2009

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. Busch

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Kabelitz

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	4
2. Einleitung	6
2.1 Die Stellung der T-Zellen im Immunsystem	6
2.2 Die Reifung der T-Zellen im Thymus	6
2.3 T-Zellen Aktivierung	7
2.4 Differenzierungslinien der T-Zellen	8
2.5 Regulatorische T-Zellen	9
2.6 Gedächtnis T-Zellen	10
2.7 Homöostase der T-Zellen	11
3. Ergebnisse	13
3.1 Zytokin-induzierte Proliferation und Differenzierung von humanen CD4+ naiven, „zentralen“ und Effektor-Gedächtnis T-Zellen	13
3.2. Proliferations- und Differenzierungspotenzial von humanen CD8+ Gedächtnis T-Zellpopulationen bei Stimulierung mit Antigen oder homöostatischen Zytokinen	14
3.3. Die Expression von Chemokinrezeptoren identifiziert T Helfer-1 Vorläufer (pre-Th1), pre-Th2 und nicht-polarisierte zentrale Gedächtnis T-Zellen	15
3.4. Die T-Zell Fitness wird von der Signalstärke bestimmt	16

3.5. Die Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors reguliert die Signaltransduktion des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R), die Sekundärexpansion und Differenzierung von aktivierten humanen CD4+IL-7R+ T-Zellen	17
3.6. Identifizierung und Charakterisierung von IFN- γ /IL-10-produzierenden, effektor-ähnlichen T-Zellen mit regulatorischer Funktion im humanen Blut	18
4. Diskussion	19
4.1. Die zytokin-induzierte Proliferation als möglicher Mechanismus der antigenunabhängigen Erhaltung von humanen Gedächtnis T-Zellen	19
4.2. Die Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors von naiven T-Zellen reguliert die Bildung von Gedächtnis T-Zellen	22
4.3. Die Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors bestimmt die regulatorischen Eigenschaften von IL-10 produzierenden T-Zellen	25
5. Literatur	27
6. Abkürzungsverzeichnis	33
7. Danksagung	34

1. Zusammenfassung

T-Zellen nehmen eine zentrale Stellung im adaptiven Immunsystem ein, da sie einerseits direkt Pathogene bekämpfen können und andererseits die Aktivitäten anderer Immunzellen regulieren. Wegen der experimentellen Schwierigkeiten werden sie aber zumeist im Maussystem erforscht, obwohl auch die Analyse humaner T-Zellen klinisch relevant ist.

In dieser Habilitationsschrift sind unsere Arbeiten über verschiedene Aspekte der humanen T-Zellen zusammengefasst. Sie gliedert sich in 3 Teile:

1) Analyse der antigen-unabhängige Erhaltung von verschiedenen T-Zell Populationen mit den „homöostatischen“ Zytokinen IL-7 und IL-15.

Dieser Teil umfasst 3 Originalveröffentlichungen (zwei im Journal of Experimental Medicine und eine in Blood), in denen aufgereinigte T-Zell-Populationen *in vitro* mit homöostatischen Zytokinen stimuliert werden, um die antigen-unabhängige Proliferation im humanen System zu untersuchen. Wir zeigten, dass CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen mit IL-7 und IL-15 unabhängig vom T-Zell Rezeptor proliferieren können. Außerdem haben wir herausgefunden, dass zentrale Gedächtniszellen dabei ein vom Antigen vorprogrammiertes Differenzierungsprogramm durchlaufen und zu Effektor Gedächtnis-ähnlichen Zellen werden. Chemokinrezeptoren identifizieren dabei CD4⁺ zentrale Gedächtniszellen die zur Th1 oder zur Th2 Zellen differenzieren. Auf diesen und anderen Arbeiten basierend haben wir ein Modell der Erhaltung der Gedächtniszellen vorgeschlagen, nach dem zentrale Gedächtniszellen für die Erhaltung des T-Zellgedächtnisses besonders wichtig sind, da sie durch homöostatische Proliferation nicht nur sich selbst erneuern können, sondern auch Effektor Gedächtniszellen ersetzen, die durch spontanen Zelltod sterben.

2) Die Bildung von Gedächtniszellen wird von der Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors reguliert.

Wie Gedächtniszellen von aktivierten T-Zellen gebildet werden, ist trotz großer wissenschaftlicher und klinischer Relevanz nur unvollständig verstanden. In zwei Originalarbeiten, die in Nature Immunology und im European Journal of Immunology veröffentlicht wurden, haben wir untersucht wie die Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors das Gedächtniszellpotenzial reguliert. Dabei haben wir den neuen Differenzierungsparameter „Fitness“ definiert: Die T-Zell Fitness beschreibt die Fähigkeit einer aktivierten T-Zelle, dem spontanen Zelltod zu entgehen und mit homöostatischen Zytokinen zu proliferieren und damit

zu einer Gedächtnis T-Zelle zu werden. Wir haben gezeigt, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen die Fitness progressiv mit der Stärke der T-Zellrezeptorstimulation zunimmt, und nur „fitte“ Maus T-Zellen *in vivo* überleben und ohne Antigen expandieren. Weiter haben wir gezeigt, dass auch aktivierte T-Zellen, die den IL-7R exprimieren, unterschiedliche Fitness und Gedächtniszellpotential haben, da die Zellen zu einem relevanten Gen unterschiedlich stark exprimieren und zum anderen der IL-7R unterschiedlich effizient an die PI 3 Kinasekaskade gekoppelt ist.

3) Analyse von adaptiven IL-10 produzierenden regulatorischen T- Zell Populationen.

T-Zellen mit regulatorischer Funktion produzieren meist auch das inhibitorische Zytokin IL-10 und werden in natürliche „Tregs“ und in adaptive „Tr1“ Zellen eingeteilt, die durch die Expression des IL-2R α (CD25) und des Transkriptionsfaktors Foxp3 grob unterschieden werden können. IL-10 produzierende T-Zellen können *in vitro* induziert werden, aber wie *in vivo* gebildete IL-10 produzierende Zellen im humanen System identifiziert werden können ist nicht bekannt. In einer Arbeit, die im Journal of Experimental Medicine publiziert wurde, haben wir gezeigt, dass T Helfer Zellen die weder CD25 noch den IL-7R exprimieren Tr1-ähnliche Zellen sind: Sie produzieren IL-10 und IFN- γ , aber kaum IL-2, und das von ihnen produzierte IL-10 supprimiert *in vitro* die T-Zellaktivierung. Diese Tr1-ähnlichen Zellen proliferieren *in vivo* und reagieren selektiv auf persistente Antigene, was vermuten lässt, dass es sich um chronisch aktivierte Th1 Zellen handelt. Außerdem haben wir in einer anderen Arbeit gefunden, dass nicht nur Th17 Zellen den Chemokinrezeptor CCR6 exprimieren, sondern auch autoreaktive IL-10 produzierende Gedächtniszellen (Rivino *et al.*, J. Exp. Med. 2010). Diese CCR6⁺ Zellen sind aber im Gegensatz zu den Tr1-ähnlichen Zellen IL-7R⁺, produzieren IL-2 und sind für nicht-persistente Impfantigene spezifisch. Die IL-10 produzierenden Gedächtniszellen sind nur bei suboptimaler Stimulation wie z.B. durch autologe dendritische Zellen suppressiv, da sie dann IL-10 aber kein IL-2 produzieren. Im Gegensatz dazu supprimieren die Tr1-ähnlichen Zellen, die nur wenig IL-2 machen können, nur bei starker Stimulation effektiv. Es gibt im humanen Blut also zwei unterschiedliche IL-10 produzierende Populationen, die beide nicht zu der natürlichen Treg Differenzierungslinie gehören und Eigenschaften von Effektor bzw. von Gedächtniszellen haben. Es ist wahrscheinlich, dass sie unterschiedliche Funktionen haben, und dass die Tr1-ähnlichen Zellen wie in der Maus Immunpathologie inhibieren, während die Gedächtniszellen zur Selbsttoleranz beitragen könnten.

2. Einleitung

2.1 Die Stellung der T-Zellen im Immunsystem

Das Immunsystem schützt höhere Organismen vor Pathogenen, da es in der Lage ist eigene und/oder harmlose Zellen und Moleküle von fremden und/oder gefährlichen zu unterscheiden und letztere unschädlich zu machen (1). Es wird traditionell in „angeboren“ und „adaptiv“ unterteilt. Zum angeborenen Immunsystem gehören Zellen und Moleküle, die direkt pathogene oder selbst-Strukturen erkennen und daher schnell reagieren. Sie bilden die erste Abwehrfront und sind häufig ausreichend um potenziell gefährliche Erreger zu bekämpfen. Zu ihnen gehören z.B. das Komplementsystem, Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Zum adaptiven Immunsystem gehören die T- und B-Lymphozyten, die spezifisch für einzelne molekulare Strukturen (Antigene) von Pathogenen sind, aber erst einen langen Aktivierungs- und Differenzierungsprozess durchlaufen müssen bevor sie zur Pathogenbekämpfung zur Verfügung stehen. Einige von ihnen überleben nach der Expansion und Differenzierung und bilden ein immunologisches Gedächtnis. T-Zellen können in mehrere Differenzierungslinien unterteilt werden: Neben den γ/δ T-Zellen und den NKT-Zellen, die Eigenschaften von angeborenen und adaptiven Zellen vereinen, unterscheidet man die CD8⁺ T-Zellen, die zu zytotoxischen Zellen reifen können und die CD4⁺ T-Zellen, die Helfer- und regulatorische Zellen umfassen. Während CD8⁺ T-Zellen wichtig sind um virus-infizierte Zellen zu töten, regulieren die CD4⁺ Zellen verschiedene Zelltypen des Immunsystems wie B-Zellen, antigen-präsentierende dendritische Zellen (DZ) und CD8⁺ T-Zellen und haben daher eine zentrale Stellung im Immunsystem.

2.2 Die Reifung der T-Zellen im Thymus

T-Zellen werden von Vorläuferzellen im Thymus gebildet. Dabei unterlaufen die Thymozyten mehrere Selektionsprozesse, die man in der Maus im Detail erforscht hat (1). Das Gen des T-Zellrezeptors (TZR) muß von den reifenden Thymozyten erst neu zusammengesetzt werden um für ein funktionelles Protein zu codieren, was an die Zelloberfläche transportiert werden kann. Bei dieser Neuzusammensetzung werden Teile des TZR Genes als plasmidartige DNA-Moleküle (T-Zellrezeptor excision circles, TRECS) herausgeschnitten, die in Abwesenheit von Zellteilungen ziemlich stabil sind und deswegen als Marker von frisch gebildeten neuen T-Zellen benutzt werden können (2). Thymozyten, die einen TZR exprimieren erhalten ein Überlebenssignal, während Zellen die kein funktionellen T-Zellrezeptor exprimieren können, sterben. Der Prozess der Neu-Zusammensetzung des TZR Genes hat starke Zufallskomponenten und es entsteht ein Repertoire an Thymozyten, von denen einige selbst-

Moleküle binden können. In der nun folgenden positiven und negativen Selektion überleben nur diejenigen Thymozyten, die zwar MHC Moleküle erkennen können (CD8⁺ T-Zellen MHC I und CD4⁺ T-Zellen MHC II), aber von ihnen in Abwesenheit fremder Peptide nicht zu stark aktiviert werden. Die positive Selektion erlaubt nur Thymozyten, die selbst-MHC Moleküle erkennen können zu überleben. Sie wird wahrscheinlich von Epithelzellen der Medulla des Thymus vorgenommen, den sogenannten „mTECs“. Diese Zellen haben die Besonderheit, dass sie Antigene anderer Gewebe exprimieren können (wie z.B. Insulin), ein Prozess der von dem Transkriptionsfaktor AIRE reguliert wird (3). Die negative Selektion eliminiert stark autoreaktive Thymozyten und wird wahrscheinlich von dendritischen Zellen vorgenommen, die aber auch die gewebespezifischen Antigene von den mTECS aufnehmen und präsentieren können. Diese Selektionsprozesse überlebt nur ein kleiner Teil der Thymozyten, die dann als sogenannte naive CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen den Thymus verlassen und von MHC Molekülen nur dann aktiviert werden, wenn ein besonderes Peptid z.B. das von einem Pathogen gebunden ist. Naive T-Zellen wandern ständig über das Blut in sekundäre Lymphorgane wie Lymphknoten und Milz, wo sie mit antigen-präsentierenden DZ interagieren und nach ihrem spezifischen Antigen „suchen“.

2.3 T-Zell Aktivierung

Wenn naive T-Zellen auf eine DZ treffen, die ihr spezifisches Antigen präsentieren so läuft ein komplexer Aktivierungsprozess ab. Obwohl die Stimulierung des TZR die Aktivierung auslöst, ist die TZR Stimulierung alleine meist unzureichend um eine volle Aktivierung zu bewirken (4). DZs exprimieren nach Reifung durch Kontakt mit Pathogenen eine ganze Reihe von kostimulierenden Rezeptoren und wandern verstärkt in Lymphknoten ein (5). Dadurch wird das Signal des TZR stark amplifiziert und die T-Zellen gehen mit den DZ stabile, lang anhaltende Kontakte ein, die zur vollen Aktivierung führen (6). Unreife dendritische Zellen hingegen gehen nur kurze instabile Kontakte mit T-Zellen ein und induzieren eine abortive Proliferation der T-Zellen (7). Der T-Zellrezeptor wird nach MHC Bindung phosphoryliert, was die Rekrutierung von Kinasen und von weiteren Signalmolekülen und deren Phosphorylierung zur Folge hat (8). Es werden in diesem großen Proteinkomplex, dem „Signalosom“, mehrere Signalkaskaden aktiviert wie verschiedene Mitogen aktivierte Protein (MAP) Kinasekaskaden und der PLC- γ Weg, der zur Aktivierung der Protein-kinase C und zum Einströmen von Calcium-Ionen führt (9). Außerdem aktiviert Ko-stimulierung insbesondere die PI 3 Kinasekaskade (10), die sowohl für das Überleben als auch durch Aktivierung der s6-Kinase für die Zellzyklusprogression wichtig ist (11). Während des

Aktivierungsprozesses produzieren DZ und T-Zellen aber auch andere Zellen Zytokine, die den Aktivierungsprozess beeinflussen und die T-Zelldifferenzierung regulieren (s. 2.4.). Sowohl Zytokine als auch der TZR aktivieren MAP-Kinasekaskaden und die PI 3 Kinasekaskade. Der Phospholipase C- γ Weg hingegen wird nur vom TZR aktiviert, während Zytokine aber nicht der TZR die STAT Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und so aktivieren können (12). Aktivierte naive T-Zellen beginnen dann verschiedene Kategorien von Genen sukzessive zu transkribieren, die es ihnen ermöglicht aus der Ruhephase in die G1 Phase des Zellzyklus einzutreten. Langanhaltende Stimulierung und das Zytokin IL-2 induzieren dann den Eintritt in die S Phase des Zellzyklus nach etwa 30 Stunden (13), in der die DNA repliziert wird und nach etwa 40 Stunden erfolgt die erste Zellteilung (14). Die aktivierten T-Zellen teilen sich dann mehrfach in wenigen Tagen und können dabei in verschiedene „Linien“ differenzieren.

2.4 Differenzierungslinien der T-Zellen

Die Differenzierung der T-Zellen wird vor allem von Zytokinen gesteuert (15), auch wenn eine lange andauernde TZR Stimulierung Voraussetzung für die Differenzierung ist (16). CD4⁺ T-Zellen können bei Stimulierung in Anwesenheit von IFN- γ und IL-12 zu Th1 Zellen differenzieren. Th1 Zellen produzieren dann selbst IFN- γ und sind daher in der Lage Makrophagen zu aktivieren, um intrazelluläre Bakterien abzutöten. Außerdem sind Th1 Zellen auch für die Bekämpfung viraler Infektionen wichtig, sie können aber unter bestimmten Bedingungen durch ihre IFN- γ Produktion auch anti-inflammatorisch wirken (17). Th1 Zellen behindern die Bildung von anderen T-Zelldifferenzierungslinien und exprimieren den „Master“-Transkriptionsfaktor T-bet, der das Transkriptionsprogramm der Th1 Zellen kontrolliert (18). Th1 Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 und werden daher von pro-inflammatorischen Chemokinen rekrutiert (19). Wenn naive T-Zellen in Anwesenheit von IL-4 aktiviert werden, so differenzieren sie meist zu Th2 Zellen. Th2 Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 und aktivieren Eosinophile und helfen B-Zellen zu IgE-produzierenden Zellen zu differenzieren. Sie haben eine wichtige Funktion bei der Bekämpfung parasitärer Würmer, sind aber auch für Allergien verantwortlich. Ihr Differenzierungsprogramm wird von dem Transkriptionsfaktor GATA3 kontrolliert und es inhibiert ebenfalls andere Differenzierungsprogramme (20). Th2 Zellen exprimieren die Chemokinrezeptoren CCR4 (19) und wie die Eosinophilen CCR3 (21). Obwohl die meisten antigen-erfahrenen CD8⁺ Zellen IFN- γ produzieren (Tc1) gibt es auch solche die IL-4 produzieren (Tc2) (22), aber ihre Funktion ist unklar. Eine dritte Differenzierungslinie, die

Th17 Zellen wurde vor kurzem identifiziert (23). In der Maus werden sie von TGF- β , IL-6 und IL-23 induziert (24), während im humanen System nur die Rolle von IL-23 unstrittig ist aber IL-1 oder andere pro-inflammatorische Zytokine auch eine Rolle zu spielen scheinen (25). Th17 Zellen produzieren IL-17A und IL-17F, die für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch Epithelzellen wichtig sind. Sie produzieren außerdem IL-21, IL-22 und im Menschen IL-26, exprimieren CCR6 und sind für die Bekämpfung extrazellulärer Bakterien wichtig. Sie haben auch eine pathogene Rolle in verschiedenen Autoimmunerkrankungen, aber da Th17 und Th1 Zellen Untereinheiten von Zytokinen und deren Rezeptoren teilen (IL-12p40 und IL-12R β 1 sind gemeinsame Untereinheiten von IL-12 und IL-23 bzw. des IL-12R und des IL-23R) waren Th1 Zellen ursprünglich als die pathogenen Zellen in Autoimmunerkrankungen identifiziert worden (26). Th17 Zellen exprimieren den Master Transkriptionsfaktor ROR γ t, und einige von ihnen können auch IFN- γ produzieren. Es wurden auch andere T-Zell Differenzierungslinien beschrieben, z.B. die folliculären T Helfer Zellen (27, 28), die CXCR5 und ICOS exprimieren, IL-21 produzieren und B Zellen helfen, da jedoch noch kein spezifischer „Master“-Transkriptionsfaktor identifiziert wurde, ist diese Differenzierungslinie noch umstritten (29). Eine vierte, anerkannte Differenzierungslinie sind die regulatorischen T-Zellen.

2.5 Regulatorische T-Zellen

T-Zellen, die Immunantworten inhibieren können, gehören zu den regulatorischen T-Zellen (Tregs). Man kann sie in so genannte natürliche und adaptive Tregs unterteilen (29). Natürliche Tregs sind CD4+, und durch die Expression des Transkriptionsfaktor Foxp3 und IL-2R α (CD25) zu identifizieren (30, 31). Entweder differenzieren sie schon im Thymus zu Tregs oder erst in der Peripherie bei schwacher chronischer TZR Stimulierung (32) und scheinen stärker autoreaktiv zu sein als Helfer T-Zellen. Sie produzieren IL-10 und TGF- β , aber nicht IL-2 oder IFN- γ und inhibieren T-Zell Aktivierung *in vitro* über einen unbekanntem, zell-kontaktabhängigen Mechanismus (33). *In vivo* hingegen scheinen TGF- β und IL-10 auch eine Rolle für ihre regulatorische Funktion zu spielen. Sie sind anerg *in vitro*, proliferieren aber *in vivo* (34). Im Gegensatz zu den natürlichen Tregs sind die adaptiven Tregs weniger gut erforscht, da keine für sie charakteristischen Oberflächenmarker oder Transkriptionsfaktoren bekannt sind. Es kann außerdem zwischen den IL-10 produzierenden type 1 regulatory (Tr1) Zellen (35) und den weniger erforschten TGF- β produzierenden Th3 Zellen unterschieden werden (36). Die *in vitro* Suppression von adaptiven Tregs ist im Gegensatz zu den natürlichen Tregs von der IL-10 und TGF- β Produktion abhängig (29). Tr1

Zellen können *in vitro* mit verschiedenen tolerogenen Protokollen induziert werden, aber da phänotypische Marker nicht beschrieben wurden wird *in vivo* meist die Produktion von IL-10 als hinreichendes Merkmal angesehen. Dies ist problematisch, da Th1, Th2 und Th17 Zellen IL-10 produzieren können (37) und die Tr1-Zellen daher wahrscheinlich keine eigene Differenzierungslinie darstellen. Th3 Zellen werden hingegen bei oraler Toleranz induziert (36), und die Expression von latentem TGF- β auf der Zelloberfläche scheint in der Maus ein guter Marker zu sein (38).

2.6 Gedächtnis T-Zellen

Aktivierte T-Zellen können zu Gedächtnis T-Zellen werden, wenn sie die der Expansionsphase folgenden Kontraktionsphase überleben, in der die meisten aktivierten T-Zellen sterben (39). Ob dies ein zufälliger Prozess ist oder von der antigenen Stimulierung vorprogrammiert wurde ist noch unklar, aber IL-7 scheint für das Überleben aktivierter CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wichtig zu sein (40, 41). In der Maus und in humanen System werden Gedächtniszellen meist an Hand ihres Phänotypes identifiziert: In der Maus exprimieren sie mehr CD44 und im humanen System exprimieren sie eine andere CD45 Isoform (RO statt RA). Dies ist aber nur eine Annäherung, da auch kürzlich aktivierte T-Zellen und antigen-unabhängig expandierte naive T-Zellen diesen Phänotyp in der Maus haben und einige humane Gedächtnis T-Zellen CD45RA exprimieren (42). Gedächtnis T-Zellen haben die Eigenschaft, dass sie sich kaum teilen, langlebig sind und Sekundärexpansionen nach Antigenkontakt unternehmen. Im Gegensatz dazu sind Effektor T-Zellen meist aktiviert, und sterben spontan oder nach antigener Restimulierung (43). Man kann sowohl CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen nach ihrem Zytokinprofil in verschiedene Unterpopulationen einteilen, z. B. solche die IFN- γ , IL-4 oder IL17 produzieren. Außerdem exprimieren einige Gedächtniszellen Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren, die es ihnen erlauben in nicht-lymphoides Gewebe auszuwandern. So kann man z.B. T-Zellen identifizieren die in den Darm oder die Haut wandern können. Außerdem kann man weniger differenzierte, sogenannte „zentrale“ Gedächtniszellen (T_{CM}) identifizieren, die ähnlich wie naive T-Zellen CCR7 und CD62L exprimieren, also Oberflächenproteine die zum Einwandern in sekundäres lymphatisches Gewebe wichtig sind (44, 45). Diese T_{CM} sind meist unpolarisiert und produzieren wie naive T-Zellen IL-2. Dagegen haben die „Effektor“ Gedächtniszellen (T_{EM}) die Expression von CCR7 oder CD62L verloren und exprimieren dafür Chemokinrezeptoren wie z. B. CCR5, die es ihnen erlauben in entzündetes, nicht-lymphatisches Gewebe

auszuwandern (46). Zu den T_{EM} gehören die voll differenzierten Th1 und Th2 Gedächtnis T-Zellen (47).

2.7 Homöostase der T-Zellen

Die Anzahl der T-Zellen ist in Abwesenheit einer Immunreaktion in etwa konstant, was darauf schließen lässt, dass T-Zellen einer homöostatischen Kontrolle unterliegen. Versuche mit lymphopenischen Mäusen haben suggeriert, dass naive und Gedächtniszellen dabei unterschiedliche Nischen besetzen, da sie unabhängig von ihrer Anfangszahl nur solange proliferierten bis sie eine recht konstante Zellzahl erreichten, sich aber gegenseitig kaum Konkurrenz machten (48). Ein wichtiger Unterschied zwischen naiven und Gedächtnis T-Zellen ist ihre Erneuerungsrate *in vivo*: Während naive T-Zellen sehr langlebig sind und sich kaum teilen, fallen Gedächtniszellen häufiger dem spontanen Zelltod zum Opfer und müssen sich als Ausgleich daher ab und zu teilen um nicht langsam auszusterben (49). Diese sporadischen antigen-unabhängigen Zellteilungen zur Aufrechterhaltung des numerischen zellulären Gleichgewichts werden als homöostatische Proliferation bezeichnet, die sich von der schnelleren, aber auch antigen-unabhängigen Proliferation zur Wiedererlangung des Gleichgewichts unter lymphopenischen Bedingungen in einigen Aspekten unterscheidet (50). Wie in 2.2 beschrieben werden unreife T-Zellen im Thymus von MHC-exprimierenden Zellen selektioniert, und nur diejenigen Thymozyten, die Selbst-MHC Moleküle mit geringer Affinität binden überleben (51). Auch in der Peripherie brauchen reife, naive T-Zellen noch den Kontakt mit selbst-MHC Molekülen um zu überleben (52), und sie sind zusätzlich auf IL-7 als Überlebensfaktor angewiesen (53). Das Überleben von Gedächtnis T-Zellen hingegen ist unabhängig vom so genannten „Kitzeln“ des T-Zellrezeptors durch Selbst-MHC Moleküle (54), aber die Funktionalität von Gedächtnis T-Zellen kann in der Abwesenheit von MHC Molekülen eingeschränkt sein (55). Nicht naive T-Zellen, die chronisch von ihrem spezifischen Antigen stimuliert werden, sind hingegen MHC-abhängig, aber diese Effektor-ähnlichen Zellen werden meist nicht zu den Gedächtniszellen gezählt (56). In der Maus wurde gezeigt, dass das Überleben der CD8⁺ Gedächtniszellen in Abwesenheit von MHC Molekülen im Gegensatz zu den naiven T-Zellen von IL-15 abhängt (57). Im Fall der CD4⁺ Gedächtnis T-Zellen hat sich inzwischen die Meinung durchgesetzt, dass sie wie naive Zellen IL-7 zum Überleben brauchen (58), aber IL-15 scheint für virus-spezifische Gedächtnis CD4⁺ T-Zellen auch eine wichtige Rolle zu spielen (59). Für natürliche Tregs wurde hingegen gezeigt, dass sie IL-2 für ihr Überleben und ihre Funktion brauchen (60).

Im humanen System ist über die homöostatische Proliferation wenig bekannt, aber von immundefizienten Transplantationspatienten weiss man, dass sich auch humane T-Zellen ohne offensichtliche Antigenerkennung stark vermehren können bis sich die Lymphozytenkonzentration sich wieder an normale Werte annähert (61). Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich im Blut mehr humane Gedächtniszellen als naive T-Zellen teilen und dass mehr Teilungen in Patienten mit chronischer HIV Infektion stattfinden (62). In grundlegenden Arbeiten wurde außerdem gezeigt, dass sich humane T-Zellen mit den Zytokinen IL-2, -4, -7 und -15 *in vitro* teilen können (63-65).

3. Ergebnisse

3.1 Zytokin-induzierte Proliferation und Differenzierung von humanen CD4⁺ naiven, „zentralen“ und Effektor-Gedächtnis T-Zellen (J. Exp. Med. 2001 194(12):1711-9)

Gedächtnis T-Zellen proliferieren *in vivo* in der Abwesenheit von Antigen und erhalten dabei Populationen von „zentralen“ und „Effektor“ Gedächtnis T-Zellen mit unterschiedlichen Funktionen und Migrationswegen. Wir verglichen Populationen von naiven, zentralen und Effektor-Gedächtnis T-Zellen in ihren Fähigkeiten mit Zytokinen, welche die T-Zell Homöostase regulieren, zu proliferieren. Interleukin (IL)-7 und -15 expandierten Effektor-Gedächtnis T-Zellen mit hoher Effizienz, während zentrale Gedächtnis T-Zellen weniger stark und naive T-Zellen gar nicht proliferierten. Dendritische Zellen oder die von ihnen produzierten Zytokine ermöglichten naiven T-Zellen mit IL-4 zu proliferieren, und verstärkten die Proliferation von zentralen Gedächtnis T-Zellen mit IL-7 und IL-15, indem sie die Expression der β - und der γ -Kette des IL-2/15-Rezeptors erhöhten. Die Aktivierung der ERK und der p38 MAP-Kinasen waren selektiv für die T-Zellrezeptor- und zytokin-induzierte Proliferation notwendig. Wenn zentrale Gedächtnis T-Zellen mit Zytokinen stimuliert wurden, so differenzierten einige von ihnen spontan zu Effektor-Gedächtnis-ähnlichen Zellen, da sie Effektorfunktionen akquirierten und die Expression von Chemokinrezeptoren von CCR7 auf CCR5 umstellten. Die antigenunabhängige Bildung von Effektor Gedächtnis T-Zellen von zentralen Gedächtnis T-Zellen stellt einen plausiblen Mechanismus dar, wie ein polyklonales und funktionell diversifiziertes T-Zellgedächtnis erhalten werden könnte.

3.2. Proliferations- und Differenzierungspotenzial von humanen CD8+ Gedächtnis T-Zellpopulationen bei Stimulierung mit Antigen oder mit homöostatischen Zytokinen

(Blood 2003 101:4260-6)

Vier humane CD8+ T Lymphozyten Populationen, naive (CCR7+CD45RA+), zentrale Gedächtnis (T_{CM}, CCR7+CD45RA-), Effektor-Gedächtnis (T_{EM}, CCR7-CD45RA-) und CD45RA+ Effektor-Gedächtnis T Lymphozyten (T_{EMRA}, CCR7-CD45RA+) wurden auf ihre Fähigkeit verglichen, mit Antigen oder homöostatischen Zytokinen zu proliferieren und zu differenzieren. Die Stimulierbarkeit durch Zytokine und die Expression des Interleukin-15-Rezeptors war gering in naiven Zellen und nahm progressiv von T_{CM} zu T_{EM} und T_{EMRA} zu. Im Gegensatz dazu zeigte die Expansionsfähigkeit nach antigener Stimulierung ein reziprokes Muster und war mit hoher Bcl-2 Expression und einer hohen Überlebensrate assoziiert. Während alle T-Zellrezeptor-stimulierten Zellen einen CD45RA-CCR7- Phänotyp aufwiesen, änderten zytokin-stimulierte Zellen ihren Phänotyp nicht. Nur T_{CM} machten dabei eine Ausnahme, da sie nach Stimulation mit Zytokinen CCR7, CD45RA und Perforin in verschiedenen Kombinationen exprimierten. Einzelne T_{CM} -aber nicht T_{EM}- Zellen konnten mit Zytokinen expandiert werden. Diese Klone hatten unterschiedliche Phänotypen, was auf eine Heterogenität der T_{CM} Population hindeutete. In der Tat konnten innerhalb der T_{CM} Population mit Hilfe der CCR4 Expression CCR4+ Tc2 Zellen und CCR4- zytotoxische Vorläuferzellen unterschieden werden. An Hand der *ex vivo* BrdU Inkorporation konnte schließlich gezeigt werden, dass diese Gedächtniszellpopulationen verschiedene *in vivo* Proliferationsraten hatten: die stärkste Proliferation hatten CCR4- T_{CM} und die geringste Proliferation zeigten T_{EMRA}. Diese Ergebnisse zeigen, dass die untersuchten Populationen von humanen CD8+ Gedächtniszellen verschiedene Proliferations- und Differenzierungspotentiale *in vitro* und *in vivo* besitzen. Außerdem suggerieren sie, dass T_{EMRA} von T_{CM} Vorläuferzellen nach homöostatischer Proliferation in Abwesenheit von Antigen gebildet werden könnten.

3.3. Die Expression von Chemokinrezeptoren identifiziert T Helfer-1 Vorläufer (pre-Th1), pre-Th2 und nicht-polarisierte zentrale Gedächtnis T-Zellen

(J. Exp. Med. 2004 200(6):725-35)

Wir haben in früheren Arbeiten gezeigt, dass zentrale Gedächtniszellen (T_{CM} Zellen), die aufgrund ihrer CCR7 und CD62L Expression in Lymphknoten rezirkulieren können, kaum Effektorfunktionen besitzen. T_{CM} Zellen akquirieren aber Eigenschaften von Effektor-Gedächtniszellen (d.h. CCR7⁻ Th-1 und Th-2 Zellen), wenn sie mit Liganden des T-Zellrezeptors oder mit homöostatischen Zytokinen stimuliert werden. Hier zeigen wir, dass die Expression von drei Chemokinrezeptoren die Einteilung in funktionell unterschiedliche Populationen von T_{CM} Zellen erlaubt. T_{CM} Zellen, die CXCR3 exprimierten sekretierten geringe Mengen von IFN- γ , während T_{CM} Zellen die CCR4 exprimierten etwas Interleukin(IL)-4 aber kein IL-5 produzierten. Nach Stimulierung mit IL-7 und IL-15 differenzierten CXCR3⁺ T_{CM} Zellen zu Th1 Effektorzellen, während CCR4⁺ T_{CM} Zellen Th2 Effektorzellen bildeten. Diese Ergebnisse suggerieren, dass CXCR3⁺ T_{CM} und CCR4⁺ T_{CM} Th1 und Th2 Vorläuferzellen (pre-Th1 und pre-Th2) darstellen. Im Gegensatz dazu blieben CXCR5⁺ T_{CM} Zellen, die weder CXCR3 noch CCR4 exprimieren unpolarisiert nach Zytokinstimulierung und exprimierten weiterhin CCR7 und CD62L. Alle Gedächtniszellpopulationen unterschieden sich aber von naiven Zellen, da sie einen geringen Gehalt an T-Zellrezeptor Exzisionsprodukten (TREC) hatten, BrdU *ex vivo* inkorporierten und tetanus-spezifische Zellen enthielten. Zellen, die für Cytomegalovirus und Vacciniavirus spezifisch waren, konnten hingegen nur in den CXCR3⁺ T_{CM} und T_{EM} Populationen detektiert werden. Wir schließen daraus dass antigen-spezifische Gedächtniszellen in T_{EM} und in verschiedenen T_{CM} Populationen zu finden sind. Unsere Ergebnisse könnten außerdem erklären, wie die Qualität des T-Zellgedächtnisses von T_{CM} Zellen in der Abwesenheit von Antigen erhalten wird.

3.4. Die T-Zell Fitness wird von der Signalstärke bestimmt

(Nat. Immunol. 2003 4(4): 355-60)

Naive T-Zellen, die nach antigener Stimulierung proliferieren, bilden entweder Effektor- und Gedächtniszellen oder sterben. Wie die Stimulierung diese Zellschicksale reguliert ist unklar. Ein autonomes Differenzierungsprogramm ist für CD8⁺ T-Zellen vorgeschlagen worden, aber dieses Modell erklärt die abortive Proliferation von T-Zellen nicht, die nach Stimulierung mit unreifen dendritischen Zellen stattfindet. Hier zeigen wir im Menschen und in der Maus, dass CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die kurz oder schwach über den T-Zellrezeptor stimuliert wurden, sich zwar mit Interleukin(IL)-2 teilen, aber nicht „fit“ sind, da sie *in vitro* ohne exogene Zytokine sterben, auf IL-7 und IL-15 nicht ansprechen und *in vivo* verschwinden. Eine starke oder lange Stimulierung hingegen fördert die T-Zell Fitness durch Verminderung der spontanen Apoptose und durch Erhöhung der zytokin-induzierten Zellteilung. Unsere Ergebnisse stützen das Modell, dass die Signalstärke eine progressive T-Zelldifferenzierung und das Erlangen von Fitness reguliert.

3.5. Die Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors reguliert die Signaltransduktion des Interleukin-7 Rezeptors (IL-7R), die Sekundärexpansion und Differenzierung von aktivierten humanen CD4+IL-7R+ T-Zellen

(Eur. J. Immunol. 2008 38:30-9)

Vorläufer von Gedächtnis T-Zellen in der Maus exprimieren die α -Kette des IL-7 Rezeptors (IL-7R), teilen sich mit homöostatischen Zytokinen und zeigen Sekundärexpansionen nach antigener Stimulierung. Hier haben wir analysiert, wie die Stärke der antigenen Stimulierung von naiven humanen CD4+ T-Zellen durch dendritische Zellen die Expression des IL-7Rs, die Stimulierbarkeit durch Zytokine und das sekundäre Expansionspotential reguliert. Die Expression des IL-7R war bei mittelstarker Stimulierung am höchsten, und isolierte CCR7+IL-7R+ und CCR7-IL-7R- Zellen hatten Eigenschaften von Gedächtnis- bzw. von Effektorzellen. CCR7+IL-7R+ Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen generiert wurden, hatten jedoch sehr unterschiedliche Eigenschaften. Eine progressive Zunahme der Stimulierungsstärke förderte die IL-7-induzierte Proliferation, welche mit reduzierter Expression der Phosphatase PTEN und mit einer verstärkten Aktivierung der s6-Kinase korrelierte. Diese Beobachtungen suggerieren, dass die Kopplung des IL-7R mit der PI 3 Kinasekaskade von der Stärke der antigenen Stimulierung feingesteuert wird. Genexpressions und funktionelle Analysen zeigten außerdem, dass mittelstark stimulierte CCR7+IL-7R+ Zellen unpolarisierten zentralen Gedächtniszellen ähnelten. Stark stimulierte CCR7+IL-7R+ Zellen hingegen hatten Eigenschaften von zirkulierenden pre-Th1 Zellen, da sie spontan mit Zytokinen zu Th1 Effektorzellen differenzierten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stärke der antigenen Stimulierung die Eigenschaften von aktivierten, IL-7R-exprimierenden T-Zellen reguliert. Sie suggerieren außerdem dass Gedächtnis T-Zell Populationen von CCR7+ Vorläuferzellen abstammen könnten, die unterschiedlich stark stimuliert worden sind.

3.6. Identifizierung und Charakterisierung von IFN- γ /IL-10-produzierenden, effektor-ähnlichen T-Zellen mit regulatorischer Funktion im humanen Blut

(J. Exp. Med. 2009 206(5): 1009-17)

Zwei Populationen von natürlichen und adaptiven regulatorischen T-Zellen (Treg) sind beschrieben worden, aber die Identität von adaptiven Typ1-regulatorischen (Tr1)-Zellen im humanen Immunsystem ist nicht bekannt. Wir haben eine CD4⁺CD45RA⁺- T-Zellpopulation im humanen Blut analysiert - Zellen, die weder CD25 oder IL-7R exprimierten - welche schnell große Mengen IL-10 und IFN- γ aber nur geringe Mengen IL-2 produzierten. Diese IL-7R⁻ Zellen waren selten, anergisch und die große Mehrheit war Foxp3⁻. Sie enthielten nur geringe Mengen an Bcl-2, aber viele exprimierten die Markerproteine Ki-67 und ICOS, was drauf hinweist dass sie kürzlich *in vivo* aktiviert worden sind. In Übereinstimmung mit dieser Annahme reagierten sie selektiv mit persistenten Fremd- und Autoantigenen. Im Unterschied zu CD25⁺Tregs war die von IL-7R⁻ Zellen vermittelte Inhibition der Proliferation von naiven und Gedächtniszellen abhängig von IL-10, und sie brauchten eine starke Stimulierung um effizient zu supprimieren. Nach unserem Wissensstand ist dies der erste Bericht der humane Tr1-ähnliche Zellen im humanen Blut identifiziert. Diese IL-10-sezernierenden Zellen haben Eigenschaften von chronisch aktivierten Th1 Effektorzellen und gehören nicht zu der Differenzierungslinie der CD25⁺ natürlichen regulatorischen T-Zellen.

4. Diskussion

4.1. Die zytokin-induzierte Proliferation als möglicher Mechanismus der antigen-unabhängigen Erhaltung von humanen Gedächtnis T-Zellen

In der Maus wird die die T-Zellhomöostase von den sogenannten homöostatischen Zytokinen IL-7 und IL-15 reguliert (66). Um die T-Zellhomöostase im humanen System besser zu verstehen, analysierten wir die Proliferation und Differenzierung von humanen CD4+ und CD8+ T-Zell Populationen in *in vitro* Kulturen mit IL-7 und IL-15 (14, 67). Die zytokin-induzierte Proliferation konnte als TZR-unabhängig klassifiziert werden, da sie sich in mehreren Kriterien von der antigen-induzierten Proliferation unterschied: Sie hatte eine langsamere Kinetik, sie brauchte den p38, aber nicht den ERK-Signaltransduktionsweg und die zytokin-induzierte Differenzierung folgte anderen Regeln. Naiven T-Zellen fehlten relevante Zytokinrezeptoren und sie sprachen daher kaum auf homöostatische Zytokine an, was ihre geringe *in vivo* Proliferationsrate erklären könnte. Die Präsenz von dendritischen Zellen oder die von ihnen produzierten Zytokine erhöhten aber die Zytokin Rezeptorexpression und induzierten TZR-unabhängige Proliferation auch von naiven T-Zellen, aber diese differenzierten dabei kaum. Zentrale Gedächtniszellen hingegen proliferierten mit IL-7 und IL-15 alleine, und einige differenzierten dabei spontan zu Effektor Gedächtnis-ähnlichen Zellen. CD8+ zentrale Gedächtniszellen konnten mit Zytokinen kloniert werden und obwohl die verschiedenen Klone im Phänotyp stark differierten, hatten Zellen desselben Klones immer denselben Phänotyp, was eine vom Antigen vorprogrammierte Differenzierung vermuten lässt. In Übereinstimmung mit dieser Annahme haben wir gezeigt, dass Chemokinrezeptoren Unterpopulationen von CD4+ zentralen Gedächtniszellen identifizieren, die nicht polarisiert waren oder zur Linie der Th1 Zellen oder der Th2 Zellen gehörten (68). Die Identifikation dieser pre-Th1 und pre-Th2 Zellen erlaubte es uns zu zeigen, dass die zytokin-induzierte Differenzierung zu Th1 und Th2 Effektorzellen vom Antigen vorprogrammiert wurde, und daher die Differenzierungslinie auch in Abwesenheit des Antigens beibehalten wird. Eine spätere Arbeit bestätigte, dass virus-spezifische nicht-polarisierte Gedächtniszellen vorprogrammiert sind und zu Th1 Zellen differenzieren (69). Diese Arbeiten bildeten die Grundlage für das Modell, dass Effektor Gedächtniszellen in Abwesenheit von Antigen kontinuierlich von zentralen Gedächtniszellen nachgebildet werden (47, 70). Spätere Arbeiten haben auch die Rolle des selbst-MHC für die *in vitro* Proliferation von humanen naiven und Gedächtnis Th2-Zellen dokumentiert (71), aber die Anwesenheit von Antigen in diesen Arbeiten ist nicht vollständig auszuschließen. Eine weitere relevante Publikation hat die *in vivo* Proliferation von zentralen und Effektor-

Gedächtniszellen untersucht. Es wurde eine niedrigere Proliferations- und Apoptosisrate in zentralen Gedächtniszellen im Vergleich zu Effektor-Gedächtniszellen gefunden (72). Diese Publikation ist mit unseren *in vitro* Ergebnissen vereinbar, und bestätigt auch die von uns gemessenen *ex vivo* BrdU Inkorporationen. Letzteres ist nicht überraschend, da schon vorher gezeigt wurde, dass die *ex vivo* BrdU Inkorporation die *in vivo* Proliferation widerspiegelt (62). Wir haben in unseren Arbeiten aber auch gezeigt, dass die *ex vivo* Proliferationsraten in verschiedenen zentralen Gedächtniszell-Populationen sehr unterschiedlich sind, und die gemessenen *in vivo* Proliferationsraten sind daher nur ein Durchschnitt von verschiedenen Unterpopulationen und lassen keine allgemeingültige Aussage über die Erneuerungsrate einzelner zentraler Gedächtniszellen zu. In der Tat zeigen wir in der Publikation 3.6, dass ein beträchtlicher Teil der proliferierenden Zellen im Blut keine Gedächtniszellen sondern antigen-aktivierte Effektorzellen oder regulatorische Zellen sind (73). Diese Populationen wurden in der oben erwähnten Arbeit aber nicht von den Gedächtniszellpopulationen ausgeschlossen. Das Blut ist außerdem nicht der einzige Ort, wo homöostatische Proliferation stattfindet, und es ist auch nicht möglich bei einer *in vivo* proliferierenden humanen T-Zelle eindeutig zu bestimmen, ob sie sich durch die Stimulation mit Zytokinen oder Antigen geteilt hat (73, 74). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die von uns und anderen publizierten Ergebnisse zeigen, dass sich einige humane Gedächtniszellen in Abwesenheit einer erkennbaren Immunreaktion teilen. Gedächtniszellklone, die spezifisch für Vaccinia-Virus Antigene sind können Jahrzehnte ohne antigene Stimulierung überleben (75), und die homöostatischen Zellteilungen sind wahrscheinlich wichtig um die spontane Apoptose ausgleichen. Die von uns dokumentierte *in vitro* Proliferation mit homöostatischen Zytokinen spricht außerdem dafür, dass die Gedächtnis T-Zellhomöostase im Menschen ähnlich wie in der Maus von IL-7 und IL-15 reguliert wird. Die von uns vorgeschlagene homöostatische Differenzierung von zentralen zu Effektor Gedächtniszellen ist ein plausibler Mechanismus der Homöostase humaner Gedächtnis T-Zellen, ob sie aber auch *in vivo* stattfindet ist zur Zeit noch unklar (72, 76). Ebenfalls unklar ist, ob die Stimulierung des T-Zellerezeptors durch selbst-MHC Moleküle für die Homöostase humaner Gedächtnis T-Zellen eine Rolle spielt. Wir und andere haben gefunden, dass einige CD4⁺ Gedächtniszellen mit autologen dendritischen Zellen in Abwesenheit ihres Antigens proliferieren können (71), Rivino *et al.*, eingereicht). Interessanterweise teilen sich diese Gedächtniszellen mehr mit IL-7 und IL-15 als Gedächtniszellen, die nicht mit autologen DZ kreuz-reagieren können. Es lässt sich daher spekulieren, dass wie in der Maus Signale des TZR und der Zytokine die Homöostase der humanen CD4⁺ Gedächtniszellen regulieren (77).

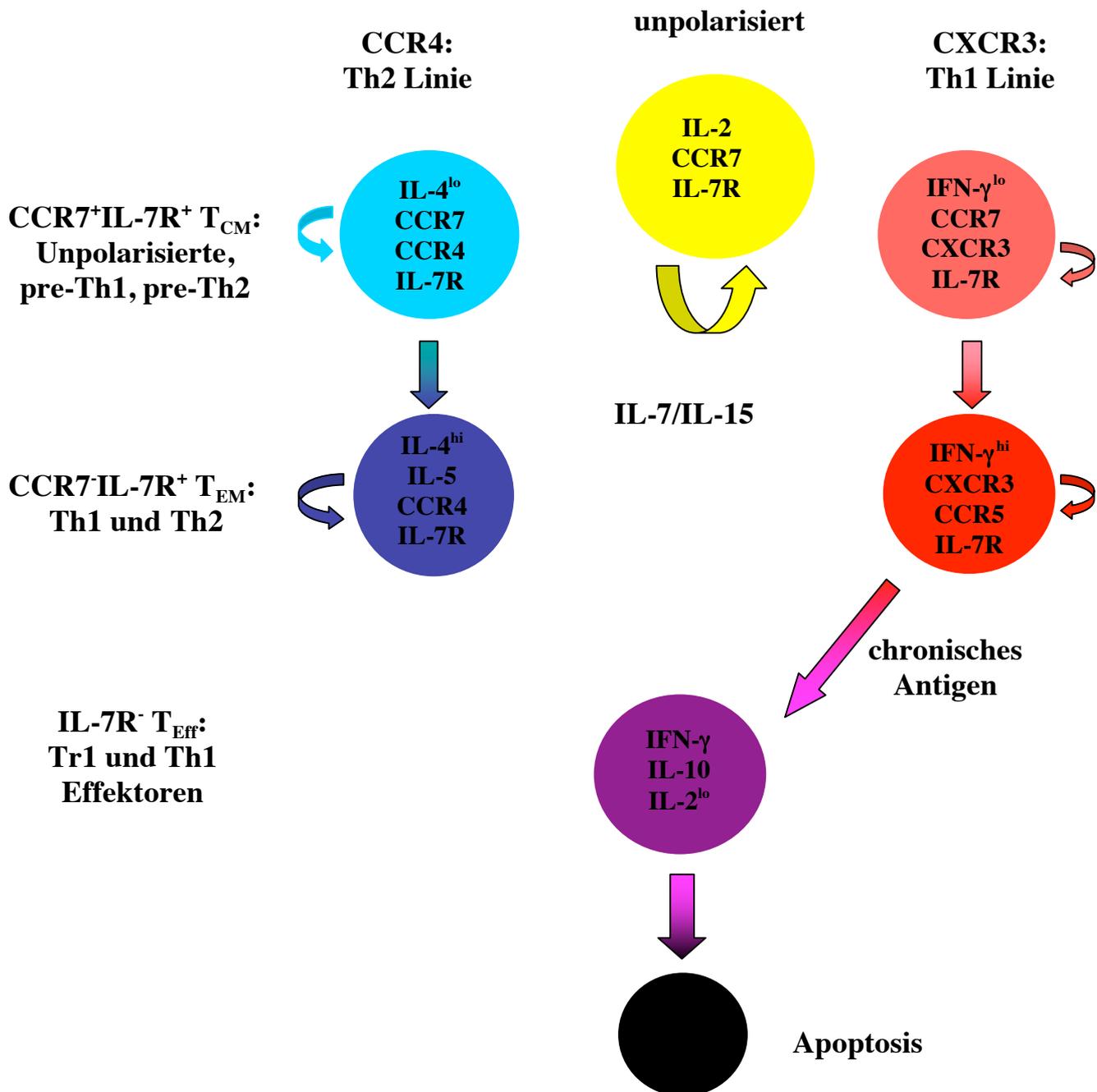


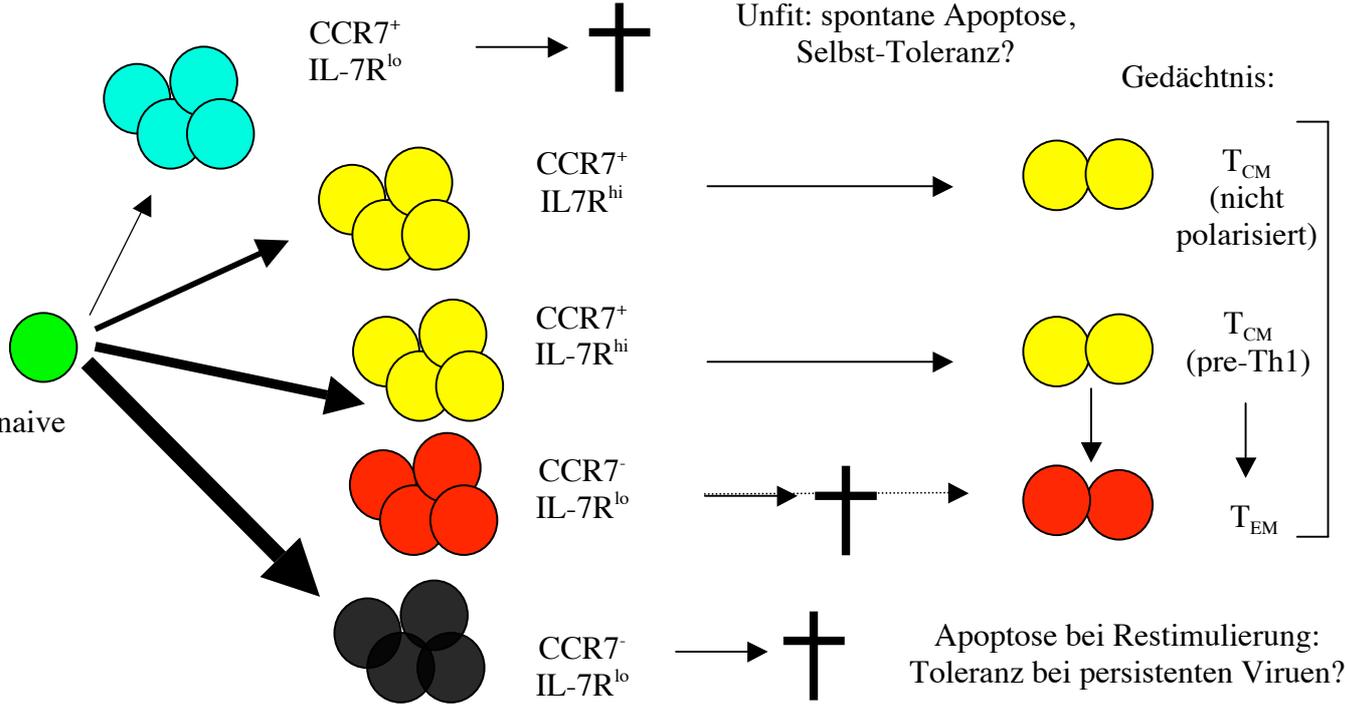
Abbildung 1: Modell der TZR-unabhängigen Homöostase von T_{CM} und T_{EM} sowie der TZR-abhängigen Bildung von Tr1 Zellen. Humane Gedächtniszellen können mit Hilfe der Expression der Chemokinrezeptoren CCR7, CXCR3 und CCR4 in unpolarisierte, pre-Th1 und pre-Th2 zentrale Gedächtniszellen sowie in Th1 und Th2 Effektor-Gedächtniszellen unterteilt werden. In Abwesenheit von Antigen erneuern diese Populationen sich selbst über homöostatische Proliferation unter dem Einfluß der Zytokine IL-7 und IL-15. Pre-Th1 und pre-Th2 Zellen differenzieren dabei zu Th1 bzw. Th2 Effektor Gedächtniszellen. Chronische antigene Stimulierung von Th1 Zellen hingegen führt zum Verlust der IL-7R Expression und zur Bildung von IL-10 produzierenden, regulatorischen Tr1-ähnlichen Zellen.

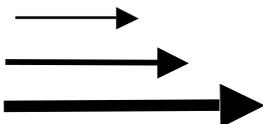
4.2. Die Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors von naiven T-Zellen reguliert die Bildung von Gedächtnis T-Zellen

Wie aus aktivierten T-Zellen langlebige Gedächtniszellen werden ist weitgehend unbekannt. Frühe Arbeiten haben gezeigt, dass aktivierte T-Zellen ohne weitere TZR Stimulierung zu Gedächtniszellen differenzieren können, vorausgesetzt sie überleben (39). Eine viel beachtete Arbeit zeigte, dass eine kurze Stimulierung von CD8⁺ T-Zellen ausreicht, damit diese zu Effektor- und Gedächtniszellen differenzieren (78). Die TZR-transgenen T-Zellen wurden dabei mit immobilisierten peptid-beladene MHC-I Komplexen für 2 Stunden *in vitro* stimuliert und dann in eine antigen-freie Maus transferiert. Eine mögliche Übertragung der Peptide auf MHC-I Moleküle der transferierten CD8⁺ T-Zellen kann dabei jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dieses könnte erklären, warum eine frühere Arbeit lange Aktivationszeiten von 20 Stunden gefunden hatte, die nötig waren um naive T-Zellen zur Proliferation zu programmieren (79). Diese Arbeit analysierte jedoch CD4⁺ und nicht CD8⁺ T-Zellen und es wurde daher spekuliert, dass CD4⁺ und CD8⁺ Zellen unterschiedlich lange stimuliert werden müssen. Unsere Publikation 3.4. definierte einen neuen Differenzierungsparameter der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, die T-Zell-„Fitness“ (80). Diese beruhte auf dem Modell, das der antigen-abhängigen Expansionsphase eine antigen-unabhängige Kontraktionsphase folgt, die nur Gedächtniszellen überleben. Aktivierte T-Zellen, die eine geringe spontane Apoptosisneigung zeigen und stark auf homöostatische Zytokine ansprechen, haben in dieser Phase einen Überlebensvorteil, sind also „fitter“. Wir haben daher den spontanen Zelltod und die Expansion mit IL-7 und IL-15 von aktivierten T-Zellen analysiert. Die Stärke der T-Zellstimulation wurde dabei variiert, in dem kurz (24h) oder lang (72h) mit anti-CD3 Antikörpern in Anwesenheit oder Abwesenheit von kostimulierenden anti-CD28 Antikörpern oder inhibitorischem TGF- β stimuliert wurde. Je stärker oder länger eine T-Zelle stimuliert wurde, desto fitter wurde sie. Diese Fitness korrelierte mit der Expression der relevanten Zytokin Rezeptoren und mit anti-apoptischen Molekülen. Das Erlangen der Fitness nach starker TZR Stimulierung konnte für CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Menschen und in der Maus gezeigt werden, und wenn die *in vitro* aktivierten T-Zellen in antigen-freie Mäuse transferiert wurden überlebten und expandierten nur fitter Zellen *in vivo*. Diese Arbeit wurde zusammen mit einer Arbeit von derselben Gruppe publiziert, die vorher publiziert hatte, dass 2 Stunden Aktivierung zur vollen Differenzierung von naiven CD8⁺ T-Zellen ausreicht. In ihrer neueren Arbeit finden diese Autoren aber wie wir, dass eine kurze Stimulierung eine abortive Proliferation induziert (81). Basierend auf

diesen und weiteren Arbeiten (16, 82) wurde das Modell der progressiven T-Zelldifferenzierung vorgeschlagen (47). Spätere Arbeiten dokumentierten, dass auch die Entzündungsreaktion das T-Zellschicksal wesentlich mitbestimmt (83). Als Gegenmodell wurde die Entdifferenzierung von virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen von Effektor zu zentralen Gedächtniszellen in der Maus entwickelt (84). Dieses Modell beruhte im Wesentlichen auf der Beobachtung, dass CD62L⁻ Effektorzellen nach adoptiven Transfer in antigen-freie Mäuse spontan CD62L⁺ werden und damit den Phänotyp von zentralen Gedächtniszellen annehmen. Es wurde aber später gezeigt, dass dies nur passiert, wenn unphysiologisch hohe Frequenzen von virus-spezifischen T-Zellen in den Mäusen aktiviert werden (85). Das Modell erfuhr außerdem eine Modifikation als gezeigt wurde, dass nur aktivierte CD8⁺ T-Zellen, die den IL-7R exprimieren, überleben und zu Gedächtniszellen werden können (41, 86). Die Expression von CD62L und IL-7R identifizierte dabei Vorläufer von zentralen Gedächtniszellen und von Effektor Gedächtniszellen sowie kurzlebige Effektorzellen (86). Um die relative Bedeutung der IL-7R Expression und der Fitness für die Gedächtniszellbildung zu verstehen, haben wir die Gedächtniszelleigenschaften von *in vitro* aktivierten humanen naiven CD4⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der Signalstärke und der IL-7R Expression analysiert (87). Ähnlich wie bei den *in vivo* aktivierten CD8⁺ Maus T-Zellen konnten aktivierte Zellen mit Eigenschaften von Effektor und zentralen Gedächtniszellen anhand der CCR7 und IL-7R Expression identifiziert werden. Allerdings hatten Zellen mit demselben Gedächtniszellphänotyp (CCR7⁺IL-7R⁺) die nach schwacher oder starker Stimulierung proliferierten sehr unterschiedliche Eigenschaften: schwach-stimulierte Zellen waren trotz IL-7R Expression unfit, zum Teil da der IL-7R nicht effizient an die PI3/s6-Kinasekaskade gekoppelt war. Stark stimulierte Zellen besaßen hingegen Fitness und Eigenschaften von pre-Th1 Gedächtniszellen. Mittelstark stimulierte Zellen hatten dafür die höchste IL-7R Expression, zeigten die effizientesten Sekundärexpansionen und blieben unpolarisiert. Unsere Ergebnisse bestätigen die Hypothese dass die IL-7R Expression alleine nicht ausreicht um Vorläufer von Gedächtniszellen zu identifizieren (88), und bestätigen die Hypothese dass Gedächtniszellen am effizientesten bei mittelstarker Stimulierung gebildet werden.

Abbildung 2: Modell der Bildung von unpolarisierten und pre-Th1 T_{CM} sowie von T_{EM} in Abhängigkeit der Signalstärke. Naive T-Zellen, die nach unterschiedlich starken TZR-abhängigen Stimuli proliferieren, haben unterschiedliche Eigenschaften. Schwach stimulierte Zellen sind nicht „fit“ und sterben spontan, da ihnen wichtige Überlebensmoleküle und Zytokin Rezeptoren fehlen. Stark stimulierte Zellen differenzieren zu Effektoren, die bei TZR Restimulierung sterben. Mittelstark stimulierte Zellen hingegen könnten zu Gedächtniszellen werden: Die etwas schwächer stimulierten haben Eigenschaften von unpolarisierten T_{CM}, die etwas stärker stimulierten von pre-Th1 T_{CM}, die mit IL-7 und IL-15 spontan weiter zu T_{EM} differenzieren.




 Signalstärke (TZR Stimulierung, Kostimulation, Dauer, Zytokine)

4.3. Die Stärke der Stimulierung des T-Zellrezeptors bestimmt die regulatorischen Eigenschaften von IL-10 produzierenden T-Zellen

IL-10 ist ein regulatorisches Zytokin das von verschiedenen Immunzellen produziert wird. In der Maus ist das von T-Zellen produzierte IL-10 wichtig um Autoimmunkrankheiten im Darm zu unterbinden, und um eine letale Immunpathologie bei gewissen parasitären Infektionen zu verhindern (37). Dabei kann IL-10 von regulatorischen T-Zellen (Tregs) oder von Th1 Zellen produziert werden. Im humanen System ist bekannt, dass IL-10 von Tregs und antigen-erfahrenen Helfer T-Zellen produziert wird. Es wurden verschiedene Protokolle publiziert, wie IL-10 produzierende regulatorische Zellen (Tr1) von naiven Zellen *in vitro* differenziert werden können (35, 89). Obwohl außerdem bekannt ist, dass humane T-Zellen IL-10 produzieren können, ist unklar wie Tr1-Zellen identifiziert werden können und ob sie regulatorische Funktionen haben. In der Publikation 3.6 haben wir gezeigt dass CD4⁺ T-Zellen, die CD25⁻ sind und den IL-7R verloren haben, Eigenschaften von Tr1 Zellen haben: Sie produzieren IL-10, und das von ihnen produzierte IL-10 inhibiert die T-Zellaktivierung. Außerdem besitzen sie Eigenschaften von chronisch aktivierten Th1 Zellen, da sie IFN- γ aber nicht IL-2 produzieren, selektiv auf persistente Antigene reagieren und sich *in vivo* geteilt haben. Das unterscheidet diese Effektor-ähnlichen Zellen von Gedächtniszellen, die sich kaum *in vivo* teilen, viel IL-2 produzieren und auch nicht-persistente Impfantigene erkennen. Diese Eigenschaften besitzen auch CCR6+IL-7R+ Gedächtniszellen, die ebenfalls viel IL-10 produzieren können (Rivino *et al.*, eingereicht). Diese IL-10 produzierenden CCR6+ Gedächtniszellen sind leicht autoreaktiv und produzieren inhibitorisches IL-10, aber kein IL-2 wenn sie suboptimal mit anti-CD3 oder autologen DZ stimuliert werden. Eine starke Stimulierung der CCR6 Gedächtniszellen hingegen induziert nicht nur IL-10 sondern zusätzlich auch IL-2, und IL-2 neutralisiert dabei die inhibitorischen Effekte von IL-10. Dieses kontext-abhängige Zytokinprofil kann auch in autoreaktiven CCR6+, tetanus toxoid-spezifischen Klonen beobachtet werden, was nahe legt, dass CCR6+ Gedächtniszellen eine kontext-abhängige Funktion haben können. Im Gegensatz dazu brauchen die IL-7R- Effektor-ähnlichen Zellen eine starke Aktivierung um IL-10 zu produzieren und inhibitorisch zu wirken. Es gibt also zwei IL-10 produzierende Populationen von Effektor- und Gedächtnis-ähnlichen Zellen im humanen Blut, deren IL-10 Produktion und regulatorische Funktion unterschiedlich von der Stärke der TZR Stimulierung reguliert wird. Beiden ist gemein, dass sie Foxp3⁻ sind und also nicht zu der natürlichen regulatorischen T-Zell Differenzierungslinie gehören. Außerdem werden beide Populationen chronisch stimuliert, auch wenn die Stimulierung bei den CCR6+ Gedächtniszellen anscheinend von kreuz-reagierenden

Antigenen verursacht wird und daher schwächer ist und nicht zur Proliferation, dem Verlust des IL-7R oder der IL-2 Produktion führt. Über die Funktion dieser beiden Populationen kann nur spekuliert werden. Die Effektor-ähnlichen IL-7R⁻ Zellen könnten wie in der Maus für die Inhibierung der Immunpathologie bei persistenten Infektionen wichtig sein (37). Die CCR6⁺ Gedächtniszellen hingegen könnten Autoimmunität in der Abwesenheit ihres Antigens inhibieren, aber zur Sekundärantwort beitragen, wenn ihr spezifisches Antigen wieder auftaucht.

Tabelle 1:

Vergleich von IL-10 produzierenden T-Helferzellen mit regulatorischer Funktion

	Gedächtnis-ähnlich	Effektor-ähnlich
Phänotyp	IL-7R ^{hi} CCR6 ⁺ CD25 ⁻	IL-7R ⁻ CD25 ⁻
Vorkommen	häufig (ca 45%)	selten (ca. 2%)
Voraussetzungen für die IL-10 Produktion	schwache TZR Stimulation IL-2-abhängig	starke TZR Stimulation CD28-abhängig
Kinetik der IL-10 Produktion	spät (>24h)	früh (>2h)
Stabilität der IL-10 Produktion	unstabil	stabil
Zytokinprofil	Stimulusabhängig: stark: IL-2 (IFN- γ) schwach: nur IL-10	produzieren IL-10 und IFN- γ , aber kaum IL-2
Aktivierungszustand	ruhend	aktiviert
Antigenspezifitäten	Autoreaktiv, Impfantigene	persistente Antigene
<i>in vitro</i> Suppression	bei schwacher Stimulierung	bei starker Stimulierung
mögliche Funktion	Kontext-abhängig: Gleichgewicht: Toleranz Sekundärantwort: Hilfe?	Inhibierung von Immunopathologie?

5. Literatur

1. Janeway, C.A.J., and P. Travers. 1997. Immunobiology. *Garland publishing Inc.*
2. Rufer, N., A. Zippelius, P. Batard, M.J. Pittet, I. Kurth, P. Corthesy, J.C. Cerottini, S. Leyvraz, E. Roosnek, M. Nabholz, and P. Romero. 2003. Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* 102:1779-1787.
3. Kyewski, B., and L. Klein. 2006. A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol* 24:571-606.
4. Jenkins, M.K., P.S. Taylor, S.D. Norton, and K.B. Urdahl. 1991. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* 147:2461-2466.
5. Steinman, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9:271-296.
6. Zheng, H., B. Jin, S.E. Henrickson, A.S. Perelson, U.H. von Andrian, and A.K. Chakraborty. 2008. How antigen quantity and quality determine T-cell decisions in lymphoid tissue. *Mol Cell Biol* 28:4040-4051.
7. Hernandez, J., S. Aung, W.L. Redmond, and L.A. Sherman. 2001. Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen. *J Exp Med* 194:707-717.
8. Straus, D.B., and A. Weiss. 1993. The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation. *J Exp Med* 178:1523-1530.
9. Bram, R.J., and G.R. Crabtree. 1994. Calcium signalling in T cells stimulated by a cyclophilin B-binding protein. *Nature* 371:355-358.
10. August, A., and B. Dupont. 1994. CD28 of T lymphocytes associates with phosphatidylinositol 3-kinase. *Int Immunol* 6:769-774.
11. Pai, S.Y., V. Calvo, M. Wood, and B.E. Bierer. 1994. Cross-linking CD28 leads to activation of 70-kDa S6 kinase. *Eur J Immunol* 24:2364-2368.
12. Minami, Y., T. Kono, T. Miyazaki, and T. Taniguchi. 1993. The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annual Review of Immunology* 11:245-268.
13. Geginat, J., G. Bossi, J.R. Bender, and R. Pardi. 1999. Anchorage dependence of mitogen-induced G1 to S transition in primary T lymphocytes. *J Immunol* 162:5085-5093.
14. Geginat, J., F. Sallusto, and A. Lanzavecchia. 2001. Cytokine-driven proliferation and differentiation of human naive, central memory, and effector memory CD4(+) T cells. *J Exp Med* 194:1711-1719.
15. Mosmann, T.R., and R.L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7:145-173.
16. Iezzi, G., E. Scotet, D. Scheidegger, and A. Lanzavecchia. 1999. The interplay between the duration of TCR and cytokine signalling determines T cell polarization. *Eur J Immunol* 29:4092-4101.
17. Feuerer, M., K. Eulenburg, C. Loddenkemper, A. Hamann, and J. Huehn. 2006. Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma. *J Immunol* 176:2857-2863.
18. Szabo, S.J., S.T. Kim, G.L. Costa, X. Zhang, C.G. Fathman, and L.H. Glimcher. 2000. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100:655-69.
19. Sallusto, F., D. Lenig, C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1998. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.* 187:875-883.

20. Zheng, W.-P., and R.A. Flavell. 1997. The Transcription Factor GATA-3 is Necessary and Sufficient for Th2 Cytokine Gene Expression in CD4 T Cells. *Cell* 89:587-596.
21. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 1997. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 277:2005-2007.
22. Sad, S., R. Marcotte, and T.R. Mosmann. 1995. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 2:271-279.
23. Park, H., Z. Li, X.O. Yang, S.H. Chang, R. Nurieva, Y.H. Wang, Y. Wang, L. Hood, Z. Zhu, Q. Tian, and C. Dong. 2005. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 6:1133-1141.
24. Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, and B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24:179-189.
25. Acosta-Rodriguez, E.V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2007. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 8:942-949.
26. McKenzie, B.S., R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol* 27:17-23.
27. Breitfeld, D., L. Ohl, E. Kremmer, J. Ellwart, F. Sallusto, M. Lipp, and R. Forster. 2000. Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. *J Exp Med* 192:1545-1552.
28. Moser, B., and L. Ebert. 2003. Lymphocyte traffic control by chemokines: follicular B helper T cells. *Immunology Letters* 85:105-112.
29. Chtanova, T., S.G. Tangye, R. Newton, N. Frank, M.R. Hodge, M.S. Rolph, and C.R. Mackay. 2004. T follicular helper cells express a distinctive transcriptional profile, reflecting their role as non-Th1/Th2 effector cells that provide help for B cells. *J Immunol* 173:68-78.
30. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
31. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299:1057-1061.
32. Kretschmer, K., I. Apostolou, E. Jaekel, K. Khazaie, and H. von Boehmer. 2006. Making regulatory T cells with defined antigen specificity: role in autoimmunity and cancer. *Immunol Rev* 212:163-169.
33. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological Reviews* 182:18-32.
34. Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B.L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198:737-746.
35. Groux, H., A. O'Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389:737-742.
36. Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.

37. O'Garra, A., and P. Vieira. 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 7:425-428.
38. Oida, T., X. Zhang, M. Goto, S. Hachimura, M. Totsuka, S. Kaminogawa, and H.L. Weiner. 2003. CD4⁺CD25⁻ T cells that express latency-associated peptide on the surface suppress CD4⁺CD45RB^{high}-induced colitis by a TGF-beta-dependent mechanism. *J Immunol* 170:2516-2522.
39. Swain, S.L., H. Hu, and G. Huston. 1999. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science* 286:1381-1383.
40. Kondrack, R.M., J. Harbertson, J.T. Tan, M.E. McBreen, C.D. Surh, and L.M. Bradley. 2003. Interleukin 7 regulates the survival and generation of memory CD4 cells. *J Exp Med* 198:1797-1806.
41. Kaech, S.M., J.T. Tan, E.J. Wherry, B.T. Konieczny, C.D. Surh, and R. Ahmed. 2003. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol* 4:1191-1198.
42. Michie, C.A., A. McLean, C. Alcock, and P.C. Beverley. 1992. Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature* 360:264-265.
43. Kaech, S.M., E.J. Wherry, and R. Ahmed. 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. 2:251-262.
44. Bradley, L.M., S.R. Watson, and S.L. Swain. 1994. Entry of naive CD4 T cells into peripheral lymph nodes requires L-selectin. *J Exp Med* 180:2401-2406.
45. Forster, R., A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Muller, E. Wolf, and M. Lipp. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99:23-33.
46. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
47. Sallusto, F., J. Geginat, and A. Lanzavecchia. 2004. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763.
48. Freitas, A.A., and B. Rocha. 2000. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu. Rev. Immunol.* 18:83-111.
49. Akbar, A.N., N. Borthwick, M. Salmon, W. Gombert, M. Bofill, N. Shamsadeen, D. Pilling, S. Pett, J.E. Grundy, and G. Janossy. 1993. The significance of low bcl-2 expression by CD45RO T cells in normal individuals and patients with acute viral infections. The role of apoptosis in T cell memory. *J Exp Med* 178:427-438.
50. Goldrath, A.W., P.V. Sivakumar, M. Glaccum, M.K. Kennedy, M.J. Bevan, C. Benoist, D. Mathis, and E.A. Butz. 2002. Cytokine Requirements for Acute and Basal Homeostatic Proliferation of Naive and Memory CD8(+) T Cells. *J Exp Med* 195:1515-1522.
51. Anderson, G., N.C. Moore, J.J. Owen, and E.J. Jenkinson. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14:73-99.
52. Goldrath, A.W., and M.J. Bevan. 1999. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* 11:183-190.
53. Schluns, K.S., W.C. Kieper, S.C. Jameson, and L. Lefrancois. 2000. Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nat Immunol* 1:426-432.
54. Murali-Krishna, K., L.L. Lau, S. Sambhara, F. Lemonnier, J. Altman, and R. Ahmed. 1999. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science* 286:1377-1381.

55. Kassiotis, G., S. Garcia, E. Simpson, and B. Stockinger. 2002. Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells. *Nat Immunol* 3:244-250.
56. Wherry, E.J., D.L. Barber, S.M. Kaech, J.N. Blattman, and R. Ahmed. 2004. Antigen-independent memory CD8 T cells do not develop during chronic viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16004-16009.
57. Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D.F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591-99.
58. Lenz, D.C., S.K. Kurz, E. Lemmens, S.P. Schoenberger, J. Sprent, M.B. Oldstone, and D. Homann. 2004. IL-7 regulates basal homeostatic proliferation of antiviral CD4⁺T cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9357-9362.
59. Purton, J.F., J.T. Tan, M.P. Rubinstein, D.M. Kim, J. Sprent, and C.D. Surh. 2007. Antiviral CD4⁺ memory T cells are IL-15 dependent. *J Exp Med* 204:951-961.
60. Furtado, G.C., M.A. de Lafaille, N. Kutchukhidze, and J.J. Lafaille. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J Exp Med* 196:851-857.
61. Rufer, N., C. Helg, B. Chapuis, and E. Roosnek. 2001. Human memory T cells: lessons from stem cell transplantation. *Trends Immunol* 22:136-141.
62. Lempicki, R.A., J.A. Kovacs, M.W. Baseler, J.W. Adelsberger, R.L. Dewar, V. Natarajan, M.C. Bosche, J.A. Metcalf, R.A. Stevens, L.A. Lambert, W.G. Alvord, M.A. Polis, R.T. Davey, D.S. Dimitrov, and H.C. Lane. 2000. Impact of HIV-1 infection and highly active antiretroviral therapy on the kinetics of CD4⁺ and CD8⁺ T cell turnover in HIV-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13778-13783.
63. Unutmaz, D., P. Pileri, and S. Abrignani. 1994. Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J. Exp. Med.* 180:1159-1164.
64. Unutmaz, D., F. Baldoni, and S. Abrignani. 1995. Human naive T cells activated by cytokines differentiate into a split phenotype with functional features intermediate between naive and memory T cells. *Int. Immunol.* 7:1417-1424.
65. Kanegane, H., and G. Tosato. 1996. Activation of naive and memory T cells by interleukin-15. *Blood* 88:230-235.
66. Tan, J.T., B. Ernst, W.C. Kieper, E. LeRoy, J. Sprent, and C.D. Surh. 2002. Interleukin (IL)-15 and IL-7 jointly regulate homeostatic proliferation of memory phenotype CD8⁺ cells but are not required for memory phenotype CD4⁺ cells. *J Exp Med* 195:1523-1532.
67. Geginat, J., A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2003. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 101:4260-4266.
68. Rivino, L., M. Messi, D. Jarrossay, A. Lanzavecchia, F. Sallusto, and J. Geginat. 2004. Chemokine receptor expression identifies Pre-T helper (Th)1, Pre-Th2, and nonpolarized cells among human CD4⁺ central memory T cells. *J Exp Med* 200:725-735.
69. Divekar, A.A., D.M. Zaiss, F.E. Lee, D. Liu, D.J. Topham, A.J. Sijts, and T.R. Mosmann. 2006. Protein vaccines induce uncommitted IL-2-secreting human and mouse CD4 T cells, whereas infections induce more IFN-gamma-secreting cells. *J Immunol* 176:1465-1473.
70. Tough, D.F. 2003. Deciphering the relationship between central and effector memory CD8⁺ T cells. *Trends Immunol* 24:404-407.
71. Watanabe, N., S. Hanabuchi, V. Soumelis, W. Yuan, S. Ho, R. de Waal Malefyt, and Y.J. Liu. 2004. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell homeostatic expansion. *Nat Immunol* 5:426-434.

72. Macallan, D.C., D. Wallace, Y. Zhang, C. De Lara, A.T. Worth, H. Ghattas, G.E. Griffin, P.C. Beverley, and D.F. Tough. 2004. Rapid turnover of effector-memory CD4(+) T cells in healthy humans. *J Exp Med* 200:255-260.
73. Häringer, B., L. Lozza, B. Steckel, and J. Geginat. 2009. Identification and characterization of IL-10/IFN-gamma producing effector-like cells with regulatory function in human blood. *J Exp Med* 206:1009-1017.
74. Sattler, A., U. Wagner, M. Rossol, J. Sieper, P. Wu, A. Krause, W.A. Schmidt, S. Radmer, S. Kohler, C. Romagnani, and A. Thiel. 2009. Cytokine-induced human IFN-gamma-secreting effector-memory Th cells in chronic autoimmune inflammation. *Blood* 113:1948-1956.
75. Hammarlund, E., M.W. Lewis, S.G. Hansen, L.I. Strelow, J.A. Nelson, G.J. Sexton, J.M. Hanifin, and M.K. Slifka. 2003. Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med* 9:1131-1137.
76. Baron, V., C. Bouneaud, A. Cumano, A. Lim, T.P. Arstila, P. Kourilsky, L. Ferradini, and C. Pannetier. 2003. The repertoires of circulating human CD8(+) central and effector memory T cell subsets are largely distinct. *Immunity* 18:193-204.
77. Seddon B, T.P., Zamoyska R. 2003. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate homeostasis of CD4 memory cells. *Nat Immunol* 4:680-686.
78. van Stipdonk, M.J., E.E. Lemmens, and S.P. Schoenberger. 2001. Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation. *Nat. Immunol.* 2:423-429.
79. Iezzi, G., K. Karjalainen, and A. Lanzavecchia. 1998. The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8:89-95.
80. Gett, A., F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2003. T lymphocyte fitness determined by signal strength. *Nat Immunol* 4:355-360.
81. van Stipdonk, M.J., G. Hardenberg, M.S. Bijker, E.E. Lemmens, N.M. Droin, D.R. Green, and S.P. Schoenberger. 2003. Dynamic programming of CD8+ T lymphocyte responses. 4:361-365.
82. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat. Immunol.* 1:311-316.
83. Badovinac, V.P., B.B. Porter, and J.T. Harty. 2004. CD8+ T cell contraction is controlled by early inflammation. *Nat Immunol* 5:809-817.
84. Wherry, E.J., V. Teichgraber, T.C. Becker, D. Masopust, S.M. Kaech, R. Antia, U.H. von Andrian, and R. Ahmed. 2003. Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. *Nat Immunol* 4:225-234.
85. Marzo, A.L., K.D. Klonowski, A. Le Bon, P. Borrow, D.F. Tough, and L. Lefrancois. 2005. Initial T cell frequency dictates memory CD8+ T cell lineage commitment. *Nat Immunol* 6:793-799.
86. Huster, K.M., V. Busch, M. Schiemann, K. Linkemann, K.M. Kerksiek, H. Wagner, and D.H. Busch. 2004. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:5610-5615.
87. Lozza, L., L. Rivino, G. Guarda, D. Jarrossay, A. Rinaldi, F. Bertoni, F. Sallusto, A. Lanzavecchia, and J. Geginat. 2008. The strength of T cell stimulation determines IL-7 responsiveness, secondary expansion, and lineage commitment of primed human CD4+IL-7Rhi T cells. *Eur J Immunol* 38:30-39.
88. Lacombe, M.H., M.P. Hardy, J. Rooney, and N. Labrecque. 2005. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol* 175:4400-4407.

89. Barrat, F.J., D.J. Cua, A. Boonstra, D.F. Richards, C. Crain, H.F. Savelkoul, R. de Waal-Malefyt, R.L. Coffman, C.M. Hawrylowicz, and A. O'Garra. 2002. In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195:603-616.

6. Abkürzungsverzeichnis

Bcl2: B cell lymphom 2

BrdU: Brom-deoxyUridin

CD: Cluster of differentiation

CCR: Chemokinrezeptor

DZ: dendritische Zelle

ICOS: inducible costimulator

IL: Interleukin

MAP Kinase: Mitogen aktivierte Protein Kinase

MHC: Major Histocompatibility Complex

PTEN: Phosphatase and Tensin-Homologue deleted on Chromosome 10

R: Rezeptor

TCM: zentrale Gedächtniszelle

Tc2: Type 2 zytotoxische Zelle

TEM: Effektor Gedächtniszelle

TEMRA: CD45RA+ Effektor Gedächtniszelle

Th: T Helfer

Tr1: Typ 1 regulatorische T-Zellen

Treg: natürliche regulatorische Zellen

TZR: T-Zell Rezeptor

7. Danksagung

Ich möchte allen danken, die zu dieser wissenschaftlichen Arbeit maßgeblich beigetragen haben, insbesondere Amanda Gett, Laura Rivino, Laura Lozza, Barbara Häringer und David Jarrossay. Insbesondere möchte ich Antonio Lanzavecchia danken, der wie kein Anderer mein wissenschaftliches Denken geprägt hat. Ich möchte außerdem Federica Sallusto, Alf Hamann, Ruggero Pardi und vor allem Andreas Radbruch danken, aber auch dem Schweizer National Fond und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für ihre Nachwuchsförderungsprogramme. Außerdem möchte ich meiner Familie für ihre konstante Unterstützung während dieser Arbeit danken. Ich möchte diese Habilitationsschrift meinen Eltern widmen, und insbesondere meiner Mutter, die an der Charité Medizin studiert hat, aber ihren Traum von einer Forscherkarriere nach der Geburt ihrer Kinder nicht weiterverfolgt hat.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG
gemäß der Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,

- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst oder von meinen Mitarbeitern gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und mit technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,

- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, 25.5.2009

Dr. Jens Geginat