

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Univ. Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

&

Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt

Vergleich der T-Zellrezeptor N-Region bei fetalen und nicht fetalen $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Natürlichen Killer T-Zellen



Dissertation

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

vorgelegt von

Susanne Harner

aus Aichach

2012

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

Berichterstatter: PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Martin Dreyling
PD Dr. Klaus Dornmair

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser, FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 09.02.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einführung.....	7
1.1 Natürliche Killer T-Zellen: Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem	7
1.1.1 Merkmal des angeborenen Immunsystems: CD161	8
1.1.2 Merkmal des adaptiven Immunsystems: T-Zellrezeptor	8
1.1.3 Weitere Oberflächenmarker	12
1.1.4 Antigenerkennung	13
1.1.5 Zytokinproduktion	14
1.1.6 Definition von NKT-Zellen	14
1.1.7 Immunregulation durch NKT-Zellen.....	15
1.1.8 NKT-Zellen und das fetale Immunsystem.....	16
1.1.8.1 Besonderheiten des fetalen Immunsystems	16
1.1.8.2 Fetale NKT-Zellen	18
2 Zielsetzung	21
3 Material und Methoden	23
3.1 Material	23
3.1.1 Glas- und Plastikmaterial.....	23
3.1.2 Reagenzien.....	23
3.1.3 Antikörper.....	24
3.1.4 Oligonukleotide	24
3.2 Geräte	25
3.3 Methoden.....	25
3.3.1 Probandenauswahl	25
3.3.2 Fraktionierung mittels Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation	26
3.3.3 Durchflusszytometrie.....	27
3.3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie	27
3.3.3.2 Auswahl geeigneter Antikörper	31
3.3.3.3 Titrierung der nötigen Antikörpermenge	31
3.3.3.4 Durchführung der Durchflusszytometrie und der durchflusszytometrischen Zellsortierung	31
3.3.4 RNA-Isolation	33
3.3.5 cDNA-Synthese	33
3.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	34

Inhaltsverzeichnis

3.3.7	Gelektrophorese	35
3.3.8	Sequenzierung	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Häufigkeit von NKT-Zellen im peripheren venösen Blut Erwachsener	37
4.2	Vergleich verschiedener Antikörper	38
4.3	Ermittlung der nötigen Antikörpermenge	39
4.4	Häufigkeitsverteilung der NKT-Subpopulationen	41
4.4.1	Erwachsene	41
4.4.2	Fetale NKT-Zellen	41
4.5	NKT-Zellen Erwachsener haben keine N-Region	42
4.6	NKT-Zellen aus Nabelschnurblut haben keine N-Region	43
4.7	V α 24 ⁺ V β 11 ⁻ NKT-Zellen im Nabelschnurblut	45
5	Diskussion	47
5.1	NKT-Zellen	47
5.1.1	Unterschiedliche Definitionen von NKT-Zellen	47
5.1.2	NKT-Zellen verschiedener Kompartimente	48
5.2	Probandenauswahl	49
5.3	Nabelschnurblut	50
5.4	Durchflusszytometrische Sortierung	51
5.5	DN und CD8 ⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut	52
5.6	Unterschiede zu Vorarbeiten	53
5.7	V α 24J α 18-positive T-Lymphozyten mit N-Regionen	55
5.8	Fetale V α 24 ⁺ V β 11 ⁺ -Zellen: Hauptakteure des fetalen Immunsystems	56
6	Zusammenfassung	61
7	Anhang	62
7.1	Abbildungsverzeichnis	62
7.2	Tabellenverzeichnis	62
7.3	Quellenverzeichnis	63
7.4	Chromatogramme	71
7.5	Danksagung	77

Abkürzungsverzeichnis

α GalCer	Alpha-Galactosylceramid
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
CCR, CXCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation, Gruppe immunphänotypischer Oberflächenmoleküle
CD4 ⁺	CD4 positive T-Zellen
CD8 ⁺	CD8 positive T-Zellen
cDNA	complementary DNA
DN	CD4/CD8 doppelt negative T-Zellen
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter, Durchflusszytometer
FCS	Fetal calf serum, Fetales Rinderserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Forward Angle Light Scatter, Vorwärtsstreuung
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
HLA	Human leukocyte antigen, humanes Leukozytenantigen
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
iGb3	Isoglobotrihexosylceramid
IL	Interleukin
J α 18	J-Segment 18 der alpha-Kette
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
MNZ	Mononukleäre Zelle
mRNA	Messenger RNA (Ribonukleinsäure)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	Natürliche Killer T-Zelle

Abkürzungsverzeichnis

NSB	Nabelschnurblut
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridin Chlorophyllprotein-cyanine dye 5.5
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
RAG	Recombination activating gene, Rekombination aktivierende Gene
RPM	Rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Zellkulturmedium für Leukozyten
SSC	Side Angle Light Scatter, Seitwärtsstreuung
TdT	Terminale Desoxyribonucleosyltransferase
Treg	Regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor alpha
V α 24	Variables Segment 24 der alpha-Kette
V β 11	Variables Segment 11 der beta-Kette

1 Einführung

1.1 Natürliche Killer T-Zellen: Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem

Natürliche Killer T-Zellen (NKT-Zellen) sind besondere T-Lymphozyten, die Eigenschaften von T-Zellen und Natürlichen Killerzellen vereinen und eine große Rolle bei der Regulation des Immunsystems spielen. NKT-Zellen tragen einen T-Zellrezeptor und sind daher per definitionem T-Lymphozyten. Gleichzeitig haben sie Oberflächenrezeptoren, die nicht bei konventionellen T-Lymphozyten zu finden sind, sondern typisch für Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind und stehen somit an der Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem. T-Lymphozyten und NK-Zellen gehen beide aus lymphopoetischen Stammzellen hervor, unterscheiden sich jedoch in ihrer Funktion und ihrer Morphologie deutlich voneinander. NK-Zellen werden zum angeborenen Immunsystem gezählt, da sie ein breites Spektrum von bei Pathogenen häufig vorkommenden Oberflächenmerkmalen erkennen, die als PAMPS (pathogen associated molecular patterns, Pathogen assoziierte Molekülstrukturen) oder MAMPS (microbe associated molecular patterns, Mikroben assoziierte Molekülstrukturen) bezeichnet werden. NK-Zellen sind in der frühen Phase der Abwehrreaktion aktiv. T-Lymphozyten gehören dem spezifischen Immunsystem an und erkennen mit ihren jeweils spezifischen T-Zellrezeptoren nur ein für jede T-Zelle individuelles Antigen. Die Reifungs- und Aktivierungsphase der T-Lymphozyten ist länger, ihre Spezifität jedoch um ein Vielfaches höher. Das gleichzeitige Vorhandensein von Merkmalen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems deutet auf einen zentralen Platz der NKT-Zellen bei der Regulation des Immunsystems hin. Neben der simultanen Expression von T-Zellrezeptor (TZR) und CD161, einem Oberflächenmarker, der charakteristisch für NK-Zellen ist, weisen NKT-Zellen weitere einzigartige Eigenschaften auf. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen, deren T-Zellrezeptorvielfalt die Erkennung einer Vielzahl verschiedener Antigene ermöglicht, haben NKT-Zellen ein extrem restringiertes TZR-Repertoire. Ihr T-Zellrezeptor tritt nicht mit MHC-Molekülen in Kontakt, sondern mit MHC-verwandten Molekülen, die als CD1d-Moleküle bezeichnet werden. Diese sind deutlich weniger polymorph als die MHC-Moleküle und präsentieren im Gegensatz zu MHC-Molekülen nicht Peptidfragmente, sondern Lipide und Glykolipide. NKT-Zellen binden

Einführung

daher nicht wie konventionelle T-Zellen an MHC-Proteinkomplexe, sondern an CD1d-Glykolipidkomplexe. CD1-Gene sind im Gegensatz zu MHC-Genen stark konserviert und unterscheiden sich kaum bei verschiedenen Spezies (15). NKT-Zellen sind in der Lage, in kurzer Zeit große Mengen von Zytokinen zu sezernieren und damit andere Zellen zu aktivieren. Die Fähigkeit der NKT-Zellen andere Immunzellen zu steuern und damit Einfluss auf die Immunfunktion des Organismus zu nehmen, ist möglicherweise *in utero* aktiviert und trägt beim Fetus zur Immunregulation bei. Diese charakteristischen Eigenschaften von NKT-Zellen sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

1.1.1 Merkmal des angeborenen Immunsystems: CD161

CD161 ist ein bei humanen NK-Zellen (Natürlichen Killerzellen) vorkommender Oberflächenmarker. Es handelt sich dabei um ein Typ-II-Membran-Glykoprotein, das als ein durch Disulfidbrücken verbundenes Homodimer vorliegt. CD161 wird zur Familie der C-Typ Lektin Superfamilie gerechnet. Bei Mäusen entspricht der Oberflächenmarker NK1.1 dem humanen CD161. Ursprünglich wurde angenommen, dass NK1.1 nur auf Natürlichen Killerzellen exprimiert wird (42). 1990 wurden erstmals murine T-Lymphozyten beschrieben, die neben T-Zellrezeptoren auch NK1.1 exprimierten (67; 104) und deshalb als „Natürliche Killer T-Zellen“ bezeichnet wurden. Der T-Zellrezeptor dieser Natürlichen Killer T-Zellen war monoklonal. Dieser monoklonale T-Zellrezeptor wurde vier Jahre später auch bei einer Subpopulation humaner T-Zellen nachgewiesen (65) und damit humane NKT-Zellen erstmals beschrieben. Humane NKT-Zellen tragen auf der Oberfläche das dem murinen NK1.1 homologe Oberflächenmolekül CD161. Die Funktion von CD161 ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Bindung eines Liganden an CD161 bei Natürlichen Killerzellen kann *in vitro* zu einer Verminderung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen führen. Daneben existieren auch Berichte, dass die Bindung eines monoklonalen Antikörpers an CD161 eine gesteigerte Proliferation von NK-Zellen auslöst (85). Untersuchungen von Pozo et al. deuten darauf hin, dass CD161 nach Bindung eines Liganden mit dem Enzym saure Sphingomyelinase in Interaktion tritt, dieses aktiviert und so intrazelluläre Signalkaskaden in Gang setzt (85).

1.1.2 Merkmal des adaptiven Immunsystems: T-Zellrezeptor

Konventionelle T-Zellen zeichnen sich durch eine enorme Vielfalt ihres T-Zellrezeptorrepertoires aus. Der T-Zellrezeptor ist aus einer α - und einer β -Kette aufgebaut, die je aus einer variablen (V-) und einer konstanten (C-)Region bestehen. Die α -Kette besteht aus einem V-, einem J- und einem C-Segment, die β -Kette hat zusätzlich zwischen V- und J-Segment

Einführung

ein D-Segment. Das Gen für den T-Zellrezeptor enthält mehrere verschiedene Kopien der einzelnen Segmente. Zunächst wird aus den verschiedenen V-Segmenten zufällig eines ausgewählt und mit einem ebenso zufällig ausgewählten J-Segment verbunden. Bei der β -Kette erfolgt zunächst eine Verbindung von einem zufällig ausgewählten V-Segment mit einem D-Segment und dann die Verbindung dieses Komplexes mit einem zufällig ausgewählten J-Segment. V- und J-Segment und bei der β -Kette V-, D- und J-Segment werden mit dem C-Teil verbunden (Abbildung 1). Die Verknüpfung erfolgt dabei stets so, dass die beiden Segmente, die verbunden werden sollen, durch Schleifenbildung der DNA nebeneinander gelangen und enzymatisch verknüpft werden, während die DNA-Schleife abgespalten wird.

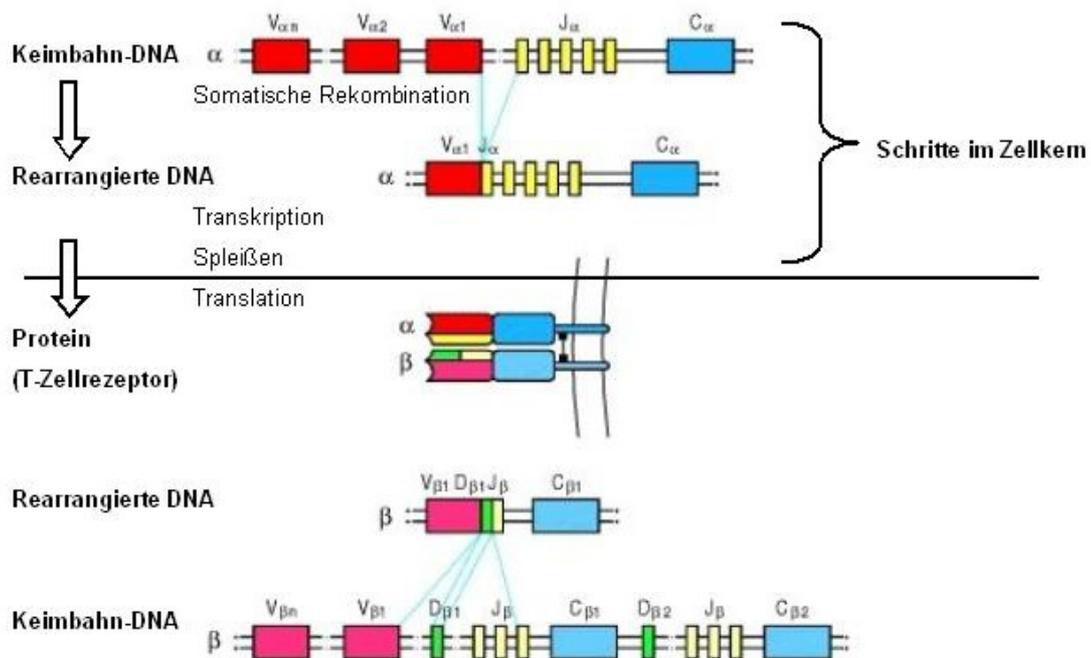


Abbildung 1: Rearrangement der T-Zellrezeptor α - und β -Kette (adaptiert von (50))

Im oberen Abbildungsteil ist die Bildung der α -Kette dargestellt. Aus ungefähr 70 verschiedenen V-Segmenten und 61 J-Segmenten wird zufällig je eines ausgewählt und diese beiden Segmente miteinander und mit dem C-Teil verknüpft. Der so rekombinierte DNA-Strang der α -Kette wird dann transkribiert, das heißt in mRNA umgeschrieben und anschließend nicht codierende Abschnitte entfernt (Spleißen). Bis hierhin findet die Bildung des T-Zellrezeptors im Zellkern statt. Der anschließende Schritt der Translation, die Übersetzung der mRNA-Sequenz in die Proteinstruktur der α -Kette, findet im Zytoplasma der T-Zelle statt. Die Bildung der β -Ketten verläuft auf die gleiche Weise: hier wird aus circa 52 V-Segmenten, 2 D-Segmenten und 13 J-Segmenten wiederum je eines ausgewählt, verknüpft und mit dem C-Teil verbunden. Nach Transkription, Spleißen und Translation können die fertigen α - und β -Ketten zum T-Zellrezeptor zusammengelagert werden.

Einführung

Die zufällige Auswahl und Kombination verschiedener Segmente wird als somatische Rekombination bezeichnet und führt in jeder T-Zelle zu einer neuen individuell rearrangierten DNA für α - und β -Kette des T-Zellrezeptors. Diese wird in mRNA übersetzt und nach dem Spleißen in das Zytoplasma der Zelle transportiert, wo am Endoplasmatischen Retikulum die Übersetzung des Nukleotidcodes in eine Proteinsequenz stattfindet. Hier werden dann die fertigen α - und β -Ketten zusammengefügt und auf die Zelloberfläche transportiert. Bei der Zusammenlagerung der einzelnen V- und J-Segmente werden nach dem Zufallsprinzip zusätzliche Nukleotide eingefügt, die nicht auf der Keimbahn DNA codiert sind und deshalb als N-Nukleotide bezeichnet werden. Zunächst werden dazu bestimmte Abschnitte des Gensegments, die sogenannten Rekombinationssequenzen, durch RAG-Komplexe gespalten. Rekombinationssequenzen bestehen aus drei Elementen, einem Abschnitt von sieben konservierten Nukleotiden und einem Abschnitt aus neun konservierten Nukleotiden, die von einer entweder 12 oder 23 Basenpaare langen Sequenz nicht konservierter Nukleotide getrennt sind (71). RAG-Komplexe sind Enzymkomplexe mit mehreren enzymatischen Funktionen, die von RAG-Genen codiert werden, wobei RAG für „recombination activating gene“ steht und die Funktion des RAG-Komplexes für den Beginn der somatischen Rekombination ausdrückt. RAG-Komplexe erkennen auf dem DNA-Doppelstrang Rekombinationssequenzen, binden dort an die DNA und spalten einen der freien Stränge. Das nun freie 5'-Ende des gespaltenen Stranges reagiert mit dem gegenüberliegenden komplementären Strang, der noch nicht gespalten ist. Dies führt zum Bruch des bis dahin noch intakten Stranges und zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen. Diese Haarnadelstrukturen werden wiederum enzymatisch durch den RAG-Komplex gespalten (Abbildung 2). Dabei gelangen ehemals gegenüberliegende komplementäre Basen nebeneinander und bilden zwei einzelsträngige, palindromartige DNA-Abschnitte, die miteinander an kurzen Stellen Basenpaarungen eingehen können. Aufgrund ihrer palindromartigen Anordnung werden diese Nukleotide P-Nukleotide genannt.

Einführung

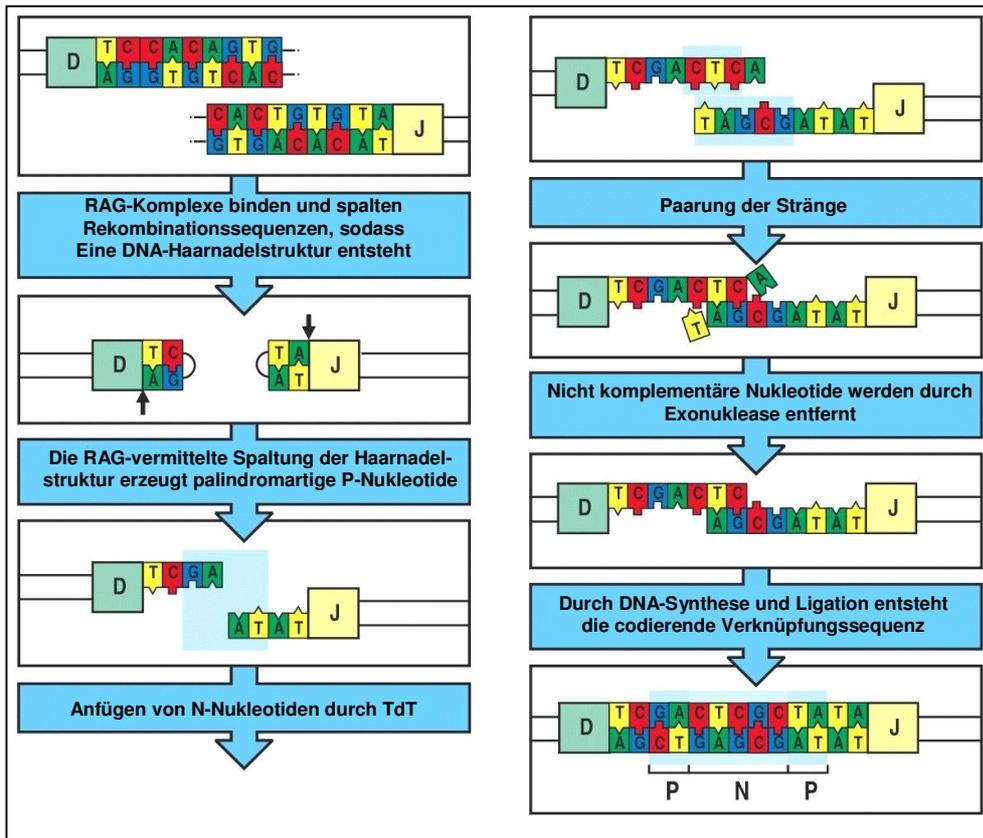


Abbildung 2: Einfügen von N-Nucleotiden durch TdT (adaptiert aus (50))

Nun können durch die Terminale Desoxynucleotidyltransferase (TdT) bis zu 20 weitere, nicht von der DNA-Matrize codierte Nucleotide (sogenannte N-Nucleotide), enzymatisch an die Einzelstrangenden angefügt werden (97). Da nicht alle Basen komplementäre Gegenstücke finden, werden ungepaarte Nucleotide durch DNA-Reparaturenzyme entfernt, so dass im Durchschnitt 3 bis 5 zusätzliche Nucleotide bestehen bleiben (40). Lücken werden durch DNA-Ligasen aufgefüllt und der neu entstandene Strang anschließend mit den P-Nucleotiden verbunden. Die N-Regionen bedingen durch ihre Position innerhalb der α - und β -Ketten eine große Diversität in der CDR3-Region des T-Zellrezeptors, die der Antigenbindestelle entspricht. Die hohe Variabilität der Nucleotidsequenz des T-Zellrezeptors (rechnerisch 10^{18} Möglichkeiten) führt zu einem großen Repertoire verschiedener T-Zellen, wobei jede mehrere T-Zellrezeptoren trägt, die aber bei einer Zelle immer die gleiche Antigen-spezifität besitzen. Dies ermöglicht die Erkennung einer Vielzahl verschiedener Antigene.

Anders als bei konventionellen T-Lymphozyten ist die Variabilität des TZR bei NKT-Zellen stark eingeschränkt. So ist die α -Kette monoklonal und die Auswahl an vorkommenden β -Ketten ist streng limitiert (83). NKT-Zellen besitzen immer die gleiche α -Kette $V\alpha 24J\alpha 18$, da bei der somatischen Rekombination immer das V-Segment 24 und das J-Segment 18 ausgewählt und verknüpft werden. Die Sequenzierung des T-Zellrezeptors von NKT-Zellen

Einführung

Erwachsener ergab zudem, dass diese α -Kette, von äußerst seltenen Ausnahmen abgesehen (23; 28; 86), keine N-Region enthält (28; 83).

Während bei normalen T-Zellen jede beliebige α -Kette mit jeder beliebigen β -Kette kombiniert werden kann, liegt bei NKT-Zellen im humanen System in den meisten Fällen die Kombination V α 24V β 11 vor (83).

1.1.3 Weitere Oberflächenmarker

Natürliche Killer T-Zellen können, wie konventionelle T-Zellen, die kostimulatorischen Moleküle CD4 und CD8 tragen (72). Die Angaben über die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Subtypen doppelt-negativ (DN), CD4-positiv (CD4⁺) und CD8-positiv (CD8⁺) variiert in verschiedenen Literaturangaben. So sprechen einige Autoren von einer Mehrheit der DN NKT-Zellen (32), andere weisen den CD4⁺ Zellen den größten Anteil zu (18; 95) oder sprechen von einer vergleichbaren Häufigkeit beider Gruppen (66). Da eine Studie von Jing et al. (52) darauf hinweist, dass die Häufigkeiten der einzelnen Subtypen sich im Alter verändern, ist es möglicherweise schwer, allgemeingültige Werte anzugeben. Einigkeit herrscht dagegen über die geringe Anzahl von CD8⁺ NKT-Zellen, die nur circa 3% aller NKT-Zellen ausmachen (49; 88; 106). Bei konventionellen T-Lymphozyten kommen zwei Untergruppen vor: CD4⁺ T-Zellen mit Helferfunktion und zytotoxische CD8⁺ T-Zellen. T-Helferzellen werden wiederum in Th1- und Th2-Zellen unterteilt. Diese Unterscheidung beruht auf der unterschiedlichen Zytokinsekretion und deren Wirkung bei der Immunregulation. Th1-Zellen synthetisieren hauptsächlich Interferon γ (IFN- γ), Interleukin 12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) und bewirken eine Aktivierung der zellulär vermittelten Immunität. Dies geschieht vor allem durch Stimulation von Makrophagen. Th2-Zellen dagegen produzieren vornehmlich die Interleukine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und vermitteln die humorale Immunität, indem sie Mastzellen und Granulozyten anlocken und B-Zellen aktivieren. Die Balance beider Formen der Immunantwort stellt eine Abwehr von intrazellulären und extrazellulären Pathogenen sicher. CD4⁺ T-Zellen erkennen an MHC-II gebundene, durch Denaturierung in Lysosomen entstandene Peptidfragmente. CD8⁺ T-Zellen dagegen erkennen an MHC-I gebundene Peptide, die durch enzymatischen Abbau zytosolischer Proteine in Proteasomen entstehen. MHC-I Moleküle präsentieren damit ein Abbild der im Zellinneren vorhandenen Proteine. Deshalb spielen CD8⁺ Zellen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Tumorzellen oder virusinfizierten Zellen, da diese veränderte Proteine bilden.

Einführung

Auch bei Natürlichen Killer T-Zellen unterscheiden sich die Subpopulationen CD4⁺, DN und CD8⁺ in der Ausprägung von Oberflächenmolekülen, in der Sekretion von Zytokinen und Chemokinen (siehe unten) und in der vermutlichen Funktion. DN und CD8⁺ Subpopulationen sezernieren hauptsächlich Th1-Zytokine, während die CD4⁺ Population sowohl Th1- als auch Th2-Zytokine ausschütten kann (68).

Neben CD161 tragen Natürliche Killer T-Zellen weitere für Natürliche Killerzellen typische Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel CD94 und NKG2a (CD159a). NKT-Zellen tragen außerdem das für T-Lymphozyten spezifische Oberflächenmolekül CD3, CD7, ein für T-Zellen typisches Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie, das auf T-, B- und NK-Zellen vorkommende CD27 und CD28, ein zur Aktivierung von T-Zellen nötiges Molekül (95).

1.1.4 Antigenerkennung

Konventionelle T-Lymphozyten erkennen an MHC-Moleküle gebundene Peptide, NKT-Zellen dagegen binden spezifisch an Lipide, die ihnen an CD1d-Molekülen präsentiert werden (15; 103). CD1-Moleküle ähneln im Aufbau MHC-Molekülen, sind aber im Gegensatz zu diesen monomorph und stark konserviert (13; 116). Die CD1-Familie besteht aus CD1a, b und c einerseits und CD1d andererseits, wobei nur CD1d-Moleküle von NKT-Zellen erkannt werden (15). CD1d-Moleküle werden auf Monozyten in geringem Maß exprimiert, außerdem auf dendritischen Zellen und Makrophagen und in höherer Zahl auf B-Zellen und auch auf Tumorzellen (11; 29; 31). Die Spezifität der NKT-Zellen für an CD1d gebundene Lipide wurde bei Forschungsarbeiten mit α -Galactosylceramid (α GalCer), einem synthetischen Glykosphingolipid entdeckt. Die Präsentation von α GalCer durch dendritische Zellen hat eine sehr starke Aktivierung der NKT-Zellen zur Folge (2; 46). Da dieses synthetische Molekül α GalCer nicht der natürliche Ligand von NKT-Zellen sein kann, wurden verschiedene natürlich vorkommende Glykolipide, die α GalCer ähneln, als natürliche exogene NKT-Liganden vorgeschlagen. So gibt es bestimmte Bakterien, deren Zellwand α GalCer-ähnliche Glykolipide aufweisen (4). Ein endogener Ligand wurde bis heute noch nicht sicher identifiziert. Von einigen Autoren wurde iGb3 (Isoglobotrihexosylceramid) als endogener Ligand postuliert (4), inzwischen wird dies jedoch wieder bezweifelt (84; 102).

Einführung

1.1.5 Zytokinproduktion

NKT-Zellen zeichnen sich durch rasche und unmittelbare Zytokinproduktion nach Antigenerkennung aus (62), die keiner weiteren Reifung und Aktivierung durch Zytokine bedarf, wie dies bei konventionellen T-Zellen der Fall ist. NKT-Zellen können eine Vielzahl von Zytokinen freisetzen: IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IL-21, TNF α , TGF- β und GM-CSF (20; 75; 93). Ein einzigartiges Merkmal unter den Lymphozyten ist aber ihre schnelle und andauernde IL-4 Produktion nach Aktivierung. Sie sind also in der Lage sowohl klassische Th1-Zytokine, wie IFN- γ , IL-12 und TNF α , als auch typische Th2-Zytokine, wie IL-5, IL-10, und IL-13 zu produzieren. Wie konventionelle T-Zellen können sich auch NKT-Zellen im Laufe ihrer Entwicklung in Richtung Th1 oder Th2-Profil differenzieren.

1.1.6 Definition von NKT-Zellen

Aufgrund der Vielzahl hervorstechender Merkmale von NKT-Zellen ergaben sich verschiedene Definitionsmöglichkeiten für diese Zellen. Die ursprüngliche Definition der NKT-Zellen als T-Lymphozyten, die zusätzlich CD161 als NK-typischen Marker tragen, geriet in die Kritik, als man entdeckte, dass auch konventionelle T-Lymphozyten nach Stimulation, z.B. durch Virusinfektion, CD161 exprimieren können (23; 100). Deshalb wird die klassische Definition der NKT-Zellen als CD161-positive T-Lymphozyten von einigen Autoren als unzureichend bezeichnet (42; 61; 72). Hinzu kommt, dass CD161 erst im Laufe der Entwicklung auf NKT-Zellen exprimiert wird und somit bei unreifen Zellen noch nicht vorhanden sein kann (5; 36; 81). Da wir mit Nabelschnurblut arbeiteten, entschieden wir uns gegen diese Definition, um auch solche NKT-Zellen erfassen zu können, die CD161 noch nicht exprimieren. Somit bieten sich noch die Reaktivität mit an CD1d gebundenen Glykoproteinen und der invariante T-Zellrezeptor zur Definition der NKT-Zellen an. Die mit Hilfe dieser Merkmale bestimmten Zellpopulationen sind jedoch nicht völlig deckungsgleich, da manche CD1d reaktiven T-Lymphozyten den invarianten V α 24 V β 11 T-Zellrezeptor nicht tragen (15; 30; 42) und als Typ II NKT-Zellen bezeichnet werden (42). Da in der vorliegenden Arbeit der invariante T-Zellrezeptor genauer untersucht werden sollte, definierten wir NKT-Zellen als solche T-Lymphozyten, die in der Durchflusszytometrie parallel die TZR-Ketten V α 24 und V β 11 exprimieren und daher in der Durchflusszytometrie mit Antikörpern gegen V α 24 und V β 11 beide Antikörper gleichzeitig binden können. Diese Definition wurde in einer zusammenfassenden Arbeit von Berzins et al. (8) als „geeignet für die meisten Anwendungen beim Menschen“ bezeichnet.

Einführung

1.1.7 Immunregulation durch NKT-Zellen

NKT-Zellen spielen bei vielen Vorgängen des Immunsystems eine wichtige Rolle, da sie verschiedene Zellen des Immunsystems beeinflussen (62). So können sie dendritische Zellen, die ihnen an CD1d gebundene Lipidantigene präsentieren, stimulieren, so dass diese bestimmte Rezeptoren hochregulieren. Dies bewirkt eine weitere Aktivierung von NKT-Zellen und NK-Zellen, deren IFN- γ Sekretion und zytolytische Aktivität gesteigert wird (16; 25; 59; 111). Bei dendritischen Zellen werden kostimulatorische Rezeptoren vermehrt an der Oberfläche exprimiert und die Prozessierung und Präsentation von Antigenen an MHC Molekülen verstärkt. So wird eine effektive Aktivierung auch des adaptiven Immunsystems ermöglicht (33; 34). *In vitro* Studien konnten zudem zeigen, dass NKT-Zellen B-Zellen stimulieren und zur Antikörperproduktion anregen (37; 38). NKT-Zellen können durch das von ihnen produzierte IFN- γ neutrophile Granulozyten anlocken (90). Die regulatorischen Einflüsse von NKT-Zellen auf das Immunsystem werden auch daran deutlich, dass NKT-Zellen und CD4⁺CD25⁺ Regulatorische T-Zellen (Tregs) sich gegenseitig beeinflussen und die gleichen Signalwege benutzen (18).

Die regulatorischen Fähigkeiten der NKT-Zellen wurden auch hinsichtlich ihres Einflusses auf die Entstehung und Bekämpfung von Krankheiten hin untersucht. Dabei zeigte sich bei Studien am Mausmodell mit den Bakterien *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Borrelia burgdorferi*, dass das Vorhandensein von NKT-Zellen mit einer geringeren Ausprägung von Krankheitssymptomen und höheren Überlebenschancen assoziiert war (54; 63). Des Weiteren weisen einige Studienergebnisse, sowohl im Mausmodell als auch im humanen System, darauf hin, dass NKT-Zellen an der Bekämpfung von Tumorzellen beteiligt sind (21; 46; 55; 101). Studien mit dem Ziel, die Rolle der NKT-Zellen bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen zu beleuchten, brachten sowohl Ergebnisse, die auf einen protektiven Effekt der NKT-Zellen hinweisen (19; 35; 48; 99), als auch solche, die eher auf eine krankheitsfördernde Wirkung hindeuten (58; 107; 118). Dies trifft auch auf Studien zu, die einen Zusammenhang zwischen der Anzahl von NKT-Zellen in der bronchioalveolären Lavage und der Ausprägung von Asthma bronchiale herzustellen suchten (1; 110; 114). Dennoch scheinen bestimmte NKT-Zellen, die den IL-17 Rezeptor exprimieren, für die Entstehung von Asthma nötig zu sein (108). Die Ergebnisse von Meyer et al. (73) deuten zudem darauf hin, dass NKT-Zellen vor allem für schwere steroidresistente Formen von Asthma pathogenetisch von Bedeutung sind, da sie nicht wie konventionelle T-Zellen durch Steroide an der Zytokinausschüttung gehindert werden (76).

Einführung

1.1.8 NKT-Zellen und das fetale Immunsystem

Wie oben dargestellt, gibt es viele Hinweise auf eine wichtige immunregulatorische Funktion der NKT-Zellen beim Erwachsenen. In Anbetracht der Erkenntnis, dass bereits im frühen Kindesalter Weichen für eine spätere Manifestation von Krankheiten im Erwachsenenalter gestellt werden können, werden NKT-Zellen auch im Hinblick auf ihren Einfluss auf das frühkindliche Immunsystem betrachtet.

1.1.8.1 Besonderheiten des fetalen Immunsystems

Fetale Zellen tragen auf ihrer Oberfläche sowohl mütterliche als auch väterliche Antigene. Trotzdem kommt es in den meisten Fällen zu einem Fortbestehen der Schwangerschaft und nicht zu einer Abstoßung wie bei Organtransplantationen. Dieses Phänomen ist nicht dadurch zu erklären, dass der Fetus durch den Uterus fast vollständig vom mütterlichen Immunsystem abgeschirmt wäre, denn fetale Trophoblastzellen wandern aktiv in das Myometrium ein und eröffnen dort die uterinen Spiralarterien. Zudem funktioniert die mütterliche Toleranz gegenüber dem sich entwickelnden Fetus nicht nur, wenn alleine die vom Vater geerbten Antigene für das mütterliche Immunsystem Fremdatigene darstellen, sondern auch bei Schwangerschaften, die durch Eizellspende zustande kamen. Bis jetzt ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Mechanismen die Toleranz des eigentlich fremden Gewebes während der Schwangerschaft bewirken. Zahlreiche Studien weisen jedoch darauf hin, dass dies durch eine Th2-Polarisation von fetaler und maternaler Immunität geschieht (115). An diesem Wechsel von Th1 zu Th2 ist wahrscheinlich unter anderem die hormonelle Umstellung während der Schwangerschaft beteiligt. Es gibt jedoch auch Hinweise, dass fetale Zellen zu der Umwandlung des mütterlichen Immunsystems beitragen. So können Trophoblastzellen durch die Expressierung von HLA-G mütterliche Makrophagen, T-Zellen und Natürliche Killerzellen regulieren (17). Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Th2-typische Zytokine, die von fetalen Zellen produziert werden, auch zu einer Th2-Polarisierung des maternalen Immunsystems beitragen. Während diese bevorzugte Differenzierung des Immunsystems in Richtung Th2 für die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft Voraussetzung zu sein scheint, gibt es auch Hinweise auf nachteilige Effekte dieser Balanceverschiebung zu Th2. Man vermutet, dass die Th2-Polarisierung des neonatalen und kindlichen Immunsystems zu einer weniger effizienten Abwehr von Pathogenen führt, weshalb auch von einer „Unreife des kindlichen Immunsystems“ gesprochen wird. Dies äußert sich in der hohen Anfälligkeit Neugeborener und Säuglinge für bakterielle und virale Infektionen. Nach Angaben der WHO sterben jährlich 1,7 Millionen Kinder im Alter

Einführung

zwischen ein und zwölf Monaten an akuten meist respiratorischen oder gastrointestinalen Infektionen (113), während diese Infektionen bei älteren Kindern meist nicht tödlich verlaufen. Versuche, diese Beobachtungen mit Unterschieden zwischen Immunzellen Erwachsener und Neugeborener zu korrelieren, konnten zeigen, dass fetale T-Lymphozyten weniger Zytokine produzieren und geringere zytolytische Aktivität als T-Zellen Erwachsener zeigen, während B-Lymphozyten weniger Antikörper produzieren (siehe Übersichtsarbeit (10)). Aber nicht nur T- und B-Lymphozyten, sondern auch andere immunologisch aktive Zellen verhalten sich je nach Alter unterschiedlich. So konnte gezeigt werden, dass sich die „Unreife“ des neonatalen Immunsystems nicht auf T- und B-Lymphozyten beschränkt, sondern dass auch fetale Antigenpräsentierende Zellen (APZ) im Vergleich zu APZ Erwachsener in geringerem Ausmaß aktiviert werden können oder selbst weniger in der Lage sind, Zytokine zu produzieren und andere Zellen zu aktivieren. Dies deutet darauf hin, dass weniger ein Defekt einzelner Zellen für die besonderen Eigenschaften des frühkindlichen Immunsystems verantwortlich ist, sondern das Zusammenspiel und die gegenseitige Regulation der Immunzellen. Untersuchungen im Mausmodell konnten zeigen, dass T-Zellen, die aus der Milz neugeborener Mäuse isoliert und dann auf erwachsene Mäuse transferiert wurden, in der Lage waren, eine Th1-Antwort gegen *Pneumocystis carinii* zu induzieren, obwohl die neugeborenen Mäuse ursprünglich nicht dazu in der Lage waren (89). *In vitro* Studien an menschlichen und tierischen T-Zellen zeigten zudem, dass große Mengen IL-4 ausreichen, die Synthese eines Bestandteils des IL-12 Rezeptors zu unterbinden, was zu einer Th2-Ausrichtung der T-Zellen führt (60). Um die Mechanismen genauer zu verstehen, die dazu führen, dass das fetale Immunsystem in dieser Weise arbeitet, und um in Zukunft Möglichkeiten zu finden, die Th2-Polarisierung des Neugeborenen therapeutisch zu beeinflussen, um beispielsweise die Anfälligkeit für Infektionen zu verringern, ist es nötig, die beteiligten Zellen genauer zu untersuchen und ihre Rolle im Zusammenspiel des Immunsystems abzuschätzen.

Im Zusammenhang mit therapeutischen Möglichkeiten, die sich durch das genauere Verständnis der immunologisch aktiven Zellen ergeben, soll auch eine weitere Besonderheit des fetalen Immunsystems genannt werden. Die Beeinflussung möglicher Krankheitsrisiken durch „Programmierung“ während der Fetalperiode rückt immer stärker ins Interesse der Wissenschaft. Am Beispiel des allergischen Asthmas lässt sich die Beeinflussbarkeit des fetalen Immunsystems im Hinblick auf die spätere Immunfunktion beleuchten. Schon seit längerer Zeit ist bekannt, dass Rauchen während der Schwangerschaft ein erhöhtes Risiko für die spätere Entwicklung von Asthma bei den Nachkommen darstellt. Jüngere Forschungen

Einführung

konnten dabei zeigen, dass dies nicht nur durch eine Störung der fetalen Lungen- und Bronchialentwicklung (91), sondern auf eine Beeinflussung des fetalen Immunsystems zurückzuführen ist (80). Vergleiche an Kindern, deren Mütter während der Schwangerschaft unterschiedlichen Umweltfaktoren ausgesetzt waren, zeigten zum Beispiel, dass Kinder aus landwirtschaftlichen Familien seltener an Asthma leiden als Stadtkinder. Dabei fiel auf, dass die Umweltfaktoren, die während der Pränatalzeit, also noch *in utero*, auf das Kind einwirken von wesentlicher Bedeutung für eine spätere Erkrankungsneigung sind (45; 87). So konnten Schaub et al. zeigen, dass im Blut von Neugeborenen, deren Mütter auf einem Bauernhof lebten und arbeiteten, mehr regulatorische T-Zellen (Tregs) zu finden waren als bei Kontrollen ohne Bauernhofumgebung (98). Leidet eine Mutter an Asthma ist das Risiko der Nachkommen an Asthma zu erkranken höher, als wenn der Vater Asthmatiker ist, was wiederum dafür spricht, dass dieser Einfluss während der Schwangerschaft bereits prägend für das kindliche Immunsystem ist. Diese Hinweise verdeutlichen die Modulierbarkeit des fetalen Organismus und des Immunsystems. Geht man davon aus, dass man diese suszeptible Phase therapeutisch nutzen kann, ergäben sich vielversprechende Möglichkeiten, Krankheitsrisiken frühzeitig zu identifizieren und durch gezieltes Eingreifen auf Programmierungsmechanismen während der Fetalperiode präventiv auf eine Vielzahl von Krankheiten Einfluss zu nehmen. Da aber bis jetzt die Mechanismen, die einerseits zu einer Dominanz der Th2-Immunantwort beim Neugeborenen und andererseits zu der großen Beeinflussbarkeit des Immunsystems pränatal führen, noch nicht bis ins Detail geklärt sind, ist es wichtig, zelluläre Grundlagen des fetalen Immunsystems genauer zu untersuchen. Da die verschiedenen Bestandteile des Immunsystems, die zellulären wie auch die löslichen Plasmabestandteile, bei Erwachsenen und Neugeborenen in gleicher Weise vorhanden sind, sind die Unterschiede möglicherweise durch verschiedenartige Regulationsmechanismen im fetalen und neonatalen Immunsystem verursacht. Da NKT-Zellen, die bei Erwachsenen eine große Rolle bei der Regulation anderer Immunzellen spielen, möglicherweise auch bei Neugeborenen wesentlich zur Immunregulation beitragen, sollen diese funktionell und strukturell näher beleuchtet werden.

1.1.8.2 Fetale NKT-Zellen

Da NKT-Zellen nicht nur reine Effektorzellen sind, sondern regulatorische Funktion ausüben und damit möglicherweise essentiell zu den besonderen, vom ausgereiften Immunsystem abweichenden, Eigenschaften des fetalen Immunsystems beitragen, untersuchten wir diese Zellpopulation im Nabelschnurblut. NKT-Zellen kommen beim Menschen, nicht jedoch in

Einführung

der Maus, auch im Nabelschnurblut vor und zeigen deutliche Unterschiede sowohl zu anderen fetalen T-Zellen als auch zu NKT-Zellen Erwachsener. Normalerweise zeigen fetale T-Zellen einen naiven Phänotyp, was bedeutet, dass sie noch nicht mit Antigenen in Kontakt gekommen sind. Nach Antigenkontakt verändern Immunzellen das Expressionsmuster ihrer Oberflächenmarker. Von besonderer Bedeutung ist hierbei der Marker CD45, eine Protein-Tyrosin-Phosphatase, die bei der Steuerung von Zellwachstum, Differenzierung und Mitose eine große Rolle spielt und wichtig für die von T- und B-Zellrezeptoren vermittelten Signalwege ist. Von dem Oberflächenmarker CD45 existieren verschiedene Isoformen, die als CD45RO (für „memory“) und CD45RA (für „naiv“) bezeichnet werden. Bei Effektor- und Gedächtniszellen, die schon mit Antigenen in Kontakt waren, kommt hauptsächlich die Isoform CD45RO vor (43).

Da mononukleäre Zellen aus Nabelschnurblut noch keinen Antigenkontakt hatten, zeigen sie eine hohe Expression von CD45RA und eine geringe Expression von CD45RO. Wenn diese Zellen dann mit Antigenen in Kontakt kommen, wird CD45RA herunter- und CD45RO heraufreguliert. Außerdem wird die Expression von CD62L, einem Zelladhäsionsmolekül aus der Familie der Selektine, das als Rezeptor für die Zielsteuerung von Lymphozyten dient und als Marker für den naiven Zustand einer Zelle gilt, verringert (94; 112).

NKT-Zellen dagegen zeigen schon bei Geburt den Phänotyp, der charakteristisch für Effektor- und Gedächtniszellen ist. Sie exprimieren CD45RO in hohem Maß, CD45RA und CD62L dagegen kaum (112). Ein großer Anteil fetaler NKT-Zellen trägt außerdem CD25, einen weiteren Oberflächenmarker, der eine vor kurzer Zeit stattgefundenen Aktivierung anzeigt (22; 112). Bei CD25 handelt es sich um ein Typ I Transmembranprotein, das die α -Kette des IL-2 Rezeptors darstellt.

Dies deutet darauf hin, dass NKT-Zellen schon *in utero* Antigenkontakt haben und daher möglicherweise an der Immunregulation und Toleranz des Fötus wesentlich beteiligt sind. Somit vereinen fetale NKT-Zellen Merkmale von naiven und reifen Zellen, da sie zwar den Phänotyp von schon mit Antigen in Kontakt gekommenen Zellen tragen, ihre Funktionalität jedoch der von naiven Zellen entspricht (22).

Die Mehrzahl fetaler NKT-Zellen ist CD4⁺ (26; 32; 96), während bei Erwachsenen CD4⁺ und DN NKT-Zellen ungefähr gleich häufig vorkommen. Kadowaki et al. konnten zeigen, dass fetale NKT-Zellen nach längerer Kultur mehr IL-4 und weniger IFN- γ produzieren, sich aber leichter als NKT-Zellen Erwachsener durch Kokultur mit entsprechenden dendritischen Zellen zu einer Änderung ihres Zytokinexpressionsprofils treiben lassen (53). Die beiden oben genannten Arbeitsgruppen und die Gruppe um Fujibayashi zeigten unabhängig

Einführung

voneinander, dass NKT-Zellen, die aus Nabelschnurblut gewonnen wurden, nicht sofort bei Stimulation *in vitro* Zytokine produzieren, sondern erst bei einer zweiten Stimulation (22; 32; 53).

Fetale NKT-Zellen unterscheiden sich auch in der Ausprägung von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche von NKT-Zellen Erwachsener. Chemokine sind Botenstoffe, die von Zellen ausgeschüttet werden und die Wanderung von Immunzellen entlang eines Gradienten bewirken, was als Chemotaxis bezeichnet wird. Es gibt zwei Gruppen von Chemokinen: Die „CC-Chemokine“ enthalten zwei benachbarte Cysteinreste, während bei „CXC-Chemokinen“ die Cysteinreste durch eine andere Aminosäure getrennt sind. Die Rezeptoren für Chemokine sind aus sieben die Plasmamembran durchspannenden Domänen aufgebaut und bewirken eine Weiterleitung des Signals über G-Proteine ins Zellinnere. Bei Untersuchungen an NKT-Zellen von Erwachsenen zeigte sich, dass diese die Chemokinrezeptoren CXCR3, CCR5, CCR6 in hohem Maß exprimieren, die Rezeptoren CXCR4, CXCR6 und CCR4 mittelstark und die Rezeptoren CCR7, CXCR1 und CX₃CR1 gering, während CCR1 und CCR2 variabel ausgeprägt werden (109). Im Vergleich zu konventionellen CD4⁺ T-Lymphozyten exprimieren NKT-Zellen mehr CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR3, CXCR6 und CX₃CR1 (109). Eger et al. zeigten, dass der prozentuale Anteil CCR4⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut höher ist als im peripheren Blut Erwachsener. CCR4 gilt zusammen mit CCR8 als ein typischer Chemokinrezeptor für Th2-polarisierte Zellen. In Vorarbeiten unserer eigenen Arbeitsgruppe gab es zudem Hinweise, dass NKT-Zellen aus Nabelschnurblut häufiger CCR4⁺ und CCR8⁺ sind und dass sie häufiger IL-4 produzieren als NKT-Zellen Erwachsener. Diese Ergebnisse wurden mittels Durchflusszytometrie an fetalen V α 24⁺V β 11⁺ ermittelt, wobei nicht geklärt war, ob sich diese Zellen mit NKT-Zellen Erwachsener gleichsetzen lassen. Denn der typische Aufbau des T-Zellrezeptors von NKT-Zellen, bei dem die α -Kette aus einer Kombination von V α 24 und J α 18 besteht und der keine zusätzlich eingefügte N-Nukleotide enthält, wurde bei fetalen NKT-Zellen noch nie untersucht. Auf mögliche Unterschiede bei dem Aufbau des T-Zellrezeptors weisen Untersuchungen von D'Andrea et al. hin, die zeigten, dass fetale NKT-Zellen ein polyklonales V β 11-Muster zeigen, während bei NKT-Zellen Erwachsener die V β 11-Kette oligoklonal ist (22). Damit ist noch unklar, ob es sich bei den untersuchten Zellen um fetale NKT-Zellen handelt, ob diese aber eventuell strukturelle Unterschiede im T-Zellrezeptor aufweisen, oder ob Studien, die fetale NKT-Zellen untersuchten, sich in Wirklichkeit mit fetalen NKT-ähnlichen Zellen beschäftigten.

2 Zielsetzung

NKT-Zellen bei Erwachsenen sind bezüglich ihres strukturellen Aufbaus und ihrer Funktionen gut charakterisiert. Zu fetalen NKT-Zellen, beziehungsweise je nach Definition $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ T-Zellen oder CD1d reagiblen T-Zellen, existieren weitaus weniger Untersuchungen. Diese ergaben jedoch Anhaltspunkte, dass NKT-Zellen Neugeborener und NKT-Zellen Erwachsener Unterschiede aufweisen, wobei alle Untersuchungen auf der Annahme gründen, dass auch fetale $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ T-Zellen NKT-Zellen sind und damit den invarianten T-Zellrezeptor haben, dessen α -Kette aus der Kombination des variablen Segments 24 und des Joining-Segments 18 entsteht. Deshalb untersuchten wir den T-Zellrezeptor fetaler NKT-Zellen im Hinblick auf die Frage, ob fetale $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ T-Zellen tatsächlich NKT-Zellen sind. Da die strukturelle Besonderheit der NKT-Zellen im Vergleich zu konventionellen T-Zellen in ihrem invarianten T-Zellrezeptor mit einer α -Kette liegt, die aus der Kombination des V-Segments 24 und des J-Segments 18 besteht und keine N-Nukleotide besitzt, stellten wir uns die Frage, ob die funktionellen Unterschiede zwischen fetalen und nicht-fetalen NKT-Zellen ein strukturelles Korrelat haben und sich durch Unterschiede im Aufbau des T-Zellrezeptors erklären lassen. Hinweise darauf geben Pilotversuche unserer Arbeitsgruppe an Nabelschnurblut. Diese weisen darauf hin, dass sich fetale NKT-Zellen in der Struktur des T-Zellrezeptors von NKT-Zellen Erwachsener unterscheiden. In den Vorversuchen wurde mRNA aus Nabelschnurblut isoliert, in cDNA umgeschrieben, alle $V\alpha 24$ positiven T-Zellrezeptoren amplifiziert und mit Hilfe von Bakterien kloniert. Diese Klonierungsprodukte wurden anschließend einer spezifischen $V\alpha 24J\alpha 18$ PCR unterzogen und die Sequenz analysiert. Dabei zeigte sich, dass $V\alpha 24J\alpha 18$ Transkripte im Nabelschnurblut deutlich variabler ausfallen als bei Vergleichsproben aus peripherenvenösem Blut Erwachsener. Um sicher zu stellen, dass es sich bei diesen Transkripten wirklich um Amplifikate der T-Zellrezeptor α -Kette von NKT-Zellen handelt, sollte zusätzlich eine durchflusszytometrische Zellsortierung vorgenommen werden, um dann die mRNA aus den sortierten Zellen zu gewinnen. Wir stellten die These auf, dass fetale NKT-Zellen im Vergleich mit adulten NKT-Zellen überproportional N-Regionen enthalten.

Diese These sollte in der vorliegenden Doktorarbeit überprüft werden.

Im Einzelnen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Unterscheiden sich die Nukleotidsequenzen des T-Zellrezeptors bei den NKT-Subpopulationen „doppelt-negativ“, „CD4-positiv“ und „CD8-positiv“

Zielsetzung

innerhalb der beiden Gruppen fetale NKT-Zellen und nicht-fetale NKT-Zellen?

- Unterscheiden sich fetale NKT-Zellen hinsichtlich der Nukleotidsequenz des Gens für den T-Zellrezeptor AV24AJ18 von den NKT-Zellen Erwachsener?
- Unterscheiden sich einzelne Subpopulationen der fetalen NKT-Zellen hinsichtlich der AV24AJ18 Nukleotidsequenz von nicht-fetalen NKT-Zell-Subpopulationen?
- Liegen bei fetalen NKT-Zellen im Gegensatz zu nicht-fetalen NKT-Zellen N-Regionen vor?
- Handelt es sich bei fetalen $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ T-Zellen um fetale NKT-Zellen?
- Handelt es sich bei den in Vorversuchen gefundenen T-Zellen mit N-Regionen um fetale $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Glas- und Plastikmaterial

- 50 ml Perfusion Syringe BD, Heidelberg
- Safety-Multifly-Set Sarstedt, Nümbrecht
- Zellkulturflaschen (80cm²) Nunc, Langensebold
- Stripetten (5ml, 10ml, 25ml) Sarstedt, Nümbrecht
- 15ml/50ml Röhrchen Greiner, Frickenhausen
- Pipettenspitzen SafeSeal (2,5; 20; 100; 200; 1000µl) Biozym, Oldendorf
- Pipettenspitzen Eppendorf, Hamburg
- QIACube Rotor Adapters QIAGEN, Hilden
- RNeasy Mini Spin Columns QIAGEN, Hilden
- QIAshredder Spin Columns QIAGEN, Hilden
- Collection tubes (1,5ml) Sarstedt, Nümbrecht
- Safe-lock tubes (1,5ml, 2ml) Eppendorf, Hamburg
- QIACube Pipettenspitzen QIAGEN, Hilden
- PCR-Reaktionsgefäße (0,2ml) Eppendorf, Hamburg

3.1.2 Reagenzien

- Heparin-Natrium 25000I.E. / 5ml Ratiopharm, Ulm
- VLE RPMI 1640 Medium Biochrom AG, Berlin
- Biocoll Separating Solution Biochrom AG, Berlin
- DPBS GIBCO Invitrogen, Karlsruhe
- FACS Flow BD, Heidelberg
- FACS Clean BD, Heidelberg
- FACS Shutdown Solution BD, Heidelberg

Material und Methoden

- Ethanol 100% Roth, Karlsruhe
- Buffer RLT QIAGEN, Hilden
- Buffer RW1 QIAGEN, Hilden
- Buffer RPE QIAGEN, Hilden
- RNase-Free Water QIAGEN, Hilden
- gDNA Wipeout Buffer QIAGEN, Hilden
- Quantiscript Reverse Transcriptase QIAGEN, Hilden
- PCR Puffer Roche, Mannheim
- Taq-Polymerase (500Units 5U/ μ l) Roche, Mannheim
- Agarose Invitrogen, Karlsruhe
- Ethidiumbromid Roth, Karlsruhe

3.1.3 Antikörper

- V α 24 / FITC Beckman-Coulter, Krefeld
- CD161 / PE BD, Heidelberg
- V β 11 / PE Beckman-Coulter, Krefeld
- CD8 / PerCp-Cy5.5 BD, Heidelberg
- CD4 / APC BD, Heidelberg

3.1.4 Oligonukleotide

- Primer: Metabion, Martinsried
V α 24 neu: 5'-GAA CTG CAC TCT TCA ATG C-3'
J α 18 neu: 5'-TCC AAA GTA TAG CCT CCC CAG-3'
- Molekulargewichtsmarker:
50 bp DNA ladder Roche, Mannheim
- Reverse Transcriptase Primer Mix QIAGEN, Hilden
- dNTPs Roche, Mannheim

Material und Methoden

3.2 Geräte

- Zentrifuge Centrifuge 5810 R Eppendorf, Hamburg
- Pipettierhilfe Easypet Eppendorf, Hamburg
- Mikropipetten Eppendorf, Hamburg
- Kühlschrank 4°C Bosch, Gerlingen
- Gefriergerät -20°C Bosch, Gerlingen
- Zentrifuge Rotanta 460 R Hettich, Tuttlingen
- Vortex Genie 2 Scientific Industries
Bohemia, NY, USA
- Durchflusszytometer FACS Canto BD, Heidelberg
- QIA Cube QIAGEN, Hilden
- Nano Drop Thermo Fisher Scientific
Inc., Massachusetts, US
- PCR-Cycler: TGradient Biometra, Göttingen
- Mikrowelle Bosch, Gerlingen
- MoFlo Cellsorter Beckman Coulter, Fort
Collins, Colorado, US

3.3 Methoden

3.3.1 Probandenauswahl

Zunächst wurden erwachsene Blutspender rekrutiert. Eingeschlossen wurden weibliche und männliche Probanden im Alter zwischen 18 und 65 Jahre. Die Ausschlusskriterien waren chronische Erkrankungen, atopische Erkrankungen, aktuelle Infektion, die Behandlung mit immunsuppressiven Medikamenten, Schwangerschaft und Personen, die jünger als 18 Jahre oder älter als 65 Jahre waren. Die bei der Durchflusszytometrie ermittelte Häufigkeit von NKT-Zellen im peripheren Blut wurde als Auswahlkriterium für die weiteren Versuche gewählt. Nur Blutspender mit einer prozentualen Häufigkeit von mehr als 0,1% NKT-Zellen gemessen an der Gesamtzahl der Lymphozyten wurden als mögliche Spender für die folgenden Versuche selektiert. Von diesen geeigneten Spendern wurden nach dem

Material und Methoden

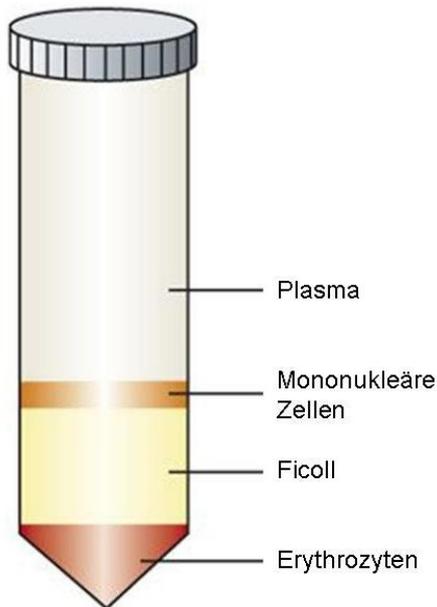
Zufallsprinzip drei ausgewählt, erneut zur Blutabnahme einbestellt und das hierbei gewonnene Blut für die Sortiersuche verwendet.

Bei den Nabelschnurblutproben wurden sowohl vaginal als auch per Kaiserschnitt entbundene reife Neugeborene als Probanden zugelassen, da wir strukturelle Unterschiede bei NKT-Zellen aufdecken wollten, die unabhängig vom Geburtsmodus sind. Mütterliche Atopie, Frühgeburtlichkeit und akute Erkrankungen des Neugeborenen galten als Ausschlusskriterium, da diese bereits eine Vorselektionierung der Immunzellen darstellen könnten, indem bestimmte Zellen stärker proliferieren oder aktiviert werden, während andere inhibiert werden, was die Untersuchungsergebnisse verfälschen könnte. Zum Ausschluss der Kontamination mit mütterlichem Blut wurde von den Nabelschnurblutproben vor der weiteren Verarbeitung Serum abgenommen und dieses auf das Vorhandensein von IgA getestet. Bei allen verwendeten Proben lag der IgA-Gehalt unter 5 mg/dl und damit unter der Nachweisgrenze.

3.3.2 Fraktionierung mittels Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation

In Zellkulturflaschen wurden 70ml RPMI für die Versuche mit adulten Spendern und 160ml RPMI für die Versuche mit Nabelschnurblut vorgelegt und die Wände gut benetzt. 50ml heparinisiertes Vollblut erwachsener Spender bzw. 50 ml heparinisiertes Nabelschnurblut wurden mit dem vorgelegten RPMI gemischt und dann je 30 ml des Gemisches langsam auf 20 ml Ficoll geschichtet. Dabei ist zu beachten, dass das Blut möglichst wenig mit der Ficoll-Lösung in Kontakt kommt und sich die Phasen nicht vermischen, da Ficoll zytotoxisch ist. Danach wurden die Röhrchen 20 Minuten bei 2000 RPM ohne Bremse zentrifugiert. Ficoll ist ein stark verzweigtes Polymer aus Saccharosemolekülen. Die standardisierte Dichte liegt bei 1,077 g/ml und ist damit größer als die Dichte von Lymphozyten, Monozyten und Thrombozyten, aber geringer als die Dichte von Erythrozyten. Durch die besonderen Dichteigenschaften der Ficolllösung bildet sich nach der Zentrifugation eine Schichtung (Abbildung 3), so dass eine ringförmige Phase, die die Lymphozyten enthält, sichtbar wird.

Material und Methoden



Die milchige Schicht der mononukleären Zellen (MNZ) wurde vorsichtig mit 10ml Pipetten abgenommen und in neue Röhrchen überführt. Diese wurden auf 45ml aufgefüllt und 10 Minuten bei 1900 RPM mit Bremse zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgenommen, die Zellpellets in 2ml RPMI aufgenommen und in ein gemeinsames Röhrchen überführt.

Abbildung 3: Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation
Ausbildung der Schichtung nach erfolgter Zentrifugation
(adaptiert von (77))

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer. Anschließend wurde die Zellsuspension mit DPBS auf 45ml aufgefüllt und nochmals 10 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in so viel FACS-Puffer (DPBS & 2%FCS) aufgenommen, dass eine Konzentration von 10^8 Zellen pro 1ml vorlag.

3.3.3 Durchflusszytometrie

3.3.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Unterscheidung von Zellen oder anderen Partikeln nach Größe, Granularität und dem Vorhandensein markierbarer extra- oder intrazellulärer Strukturen oder Moleküle, indem die zu analysierenden Zellen einzeln von Lasern angestrahlt werden und das dabei reflektierte Licht gemessen wird. Zunächst wird die Probenflüssigkeit eingesaugt und durch eine Düse in die sog. „flow cell“ eingespeist. Hier umgibt eine schneller fließende Trägerflüssigkeit die Probe, was eine Fokussierung der Probenflüssigkeit im Zentrum des Flüssigkeitsstrahls bewirkt. Dies hat zur Folge, dass die einzelnen Zellen hintereinander in einem laminaren Fluss das Messsystem des Durchflusszytometers durchlaufen und jeweils einzeln von Lasern angestrahlt werden können (Abbildung 5). Das Ausmaß und die Richtung des gestreuten Lichts werden anschließend von einem

Material und Methoden

Detektorsystem erfasst, in Digitalwerte umgewandelt und diese dann an einen Computer weitergeleitet. Somit lassen sich Größe und Granularität der Zellen erfassen. Die Größe der Zellen wird ermittelt, indem das ungestreute Licht gemessen wird, das an einer Zelle vorbei auf den Detektor gelangt. Die Granularität lässt sich aus dem Anteil des um 90° zur Einfallsebene abgestrahlten Lichts bestimmen. Zudem können Strukturen auf der Oberfläche der Zellen oder intrazelluläre Proteine vor der Durchflusszytometrie mit fluoreszierenden Farbstoffen, sog. Fluorochromen, markiert werden. Trifft ein Laserstrahl auf eine mit Fluorochromen markierte Zelle, wird das vom Laser ausgestrahlte Licht in einer anderen Wellenlänge zurückgeworfen und ermöglicht somit eine weitere Charakterisierung der zu untersuchenden Zellen bezüglich des Vorhandenseins der zuvor markierten Strukturen. Die von diesem Messsystem erfassten Daten werden auf dem Computerbildschirm in Form sogenannter Dotplots sichtbar gemacht. Dabei werden jeweils zwei Eigenschaften auf einem Achsensystem gegeneinander aufgetragen, zum Beispiel Vorwärtsstreuung als Maß für die Größe der Zellen und Seitwärtsstreuung als Maß für die Granularität. Werden Antikörper zur Markierung der Zellen eingesetzt, kann mit Hilfe des Diagramms eine Einteilung in Zellen, die einen Antikörper binden, Zellen, die beide Antikörper binden und solche, die weder den einen noch den anderen binden, getroffen werden (Abbildung 4).

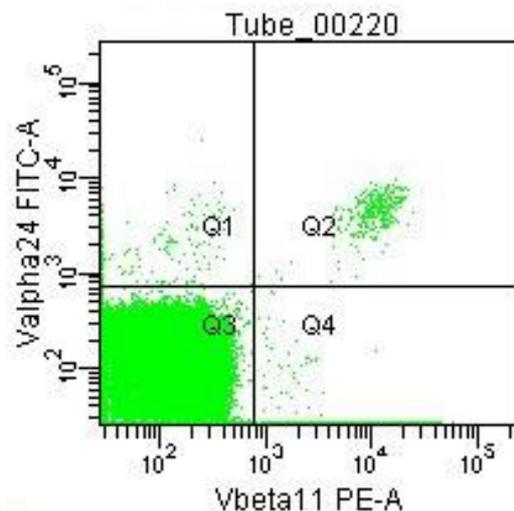


Abbildung 4: Prinzip der Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen im Diagramm

Das Diagramm wird in vier Quadranten unterteilt. In Q1 werden die Zellen abgebildet, die nur den Antikörper der y-Achse (hier Antikörper gegen Va24) auf der Oberfläche tragen. In Q4 erscheinen die Zellen, die nur den Antikörper der x-Achse tragen (hier Antikörper gegen Vβ11). Im Quadranten Q2 kommen diejenigen Zellen zur Darstellung, die beide mit Antikörpern zu markierenden Oberflächenstrukturen besitzen, während die Zellen in Q3 keines der Merkmale tragen und daher keinen der beiden Antikörper binden können.

Material und Methoden

Die einzelnen Zellen erscheinen im Diagramm als Punkte, Gruppen gleicher Zellen werden als Punktwolken dargestellt. Hier können nun einzelne Untergruppen markiert werden, indem ein elektronisches Fenster um eine Zellpopulation gelegt wird, was als „gating“ bezeichnet wird, und deren prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl oder einer vorher definierten größeren Subpopulation berechnet werden. Auch die durchflusszytometrische Zellsortierung bedient sich dieses Prinzips. Im Unterschied zur einfachen Durchflusszytometrie wird hier eine elektrisch leitende Trägerflüssigkeit eingesetzt. Von einem piezoelektrischen Wandler erzeugte Schwingungen bewirken, dass der kontinuierliche Flüssigkeitsstrahl, in dem sich die Probe befindet, in einzelne Tröpfchen abreißt. Idealerweise befindet sich genau im Zentrum eines Tropfens eine Zelle. Das so entstehende Tröpfchen kann dann elektrisch aufgeladen werden, indem genau in dem Moment, wenn sich das Tröpfchen bildet, eine positive oder negative Spannung an die Trägerflüssigkeit angelegt wird. Das Tröpfchen fällt dann der Schwerkraft folgend nach unten und gelangt so in ein elektrisches Feld, das durch zwei gegenüberliegende, gegensätzlich aufgeladene Platten erzeugt wird. Je nachdem, welche Ladung das Tröpfchen zuvor erhalten hat, wird es nun entweder nach rechts oder links von seiner ursprünglichen Flugbahn abgelenkt und kann in einem Röhrchen oder einer well-Platte aufgefangen werden. Nicht aufgeladene Zellen werden verworfen, während die sortierten Zellen für weitere Anwendungen zur Verfügung stehen (Abbildung 5).

Material und Methoden

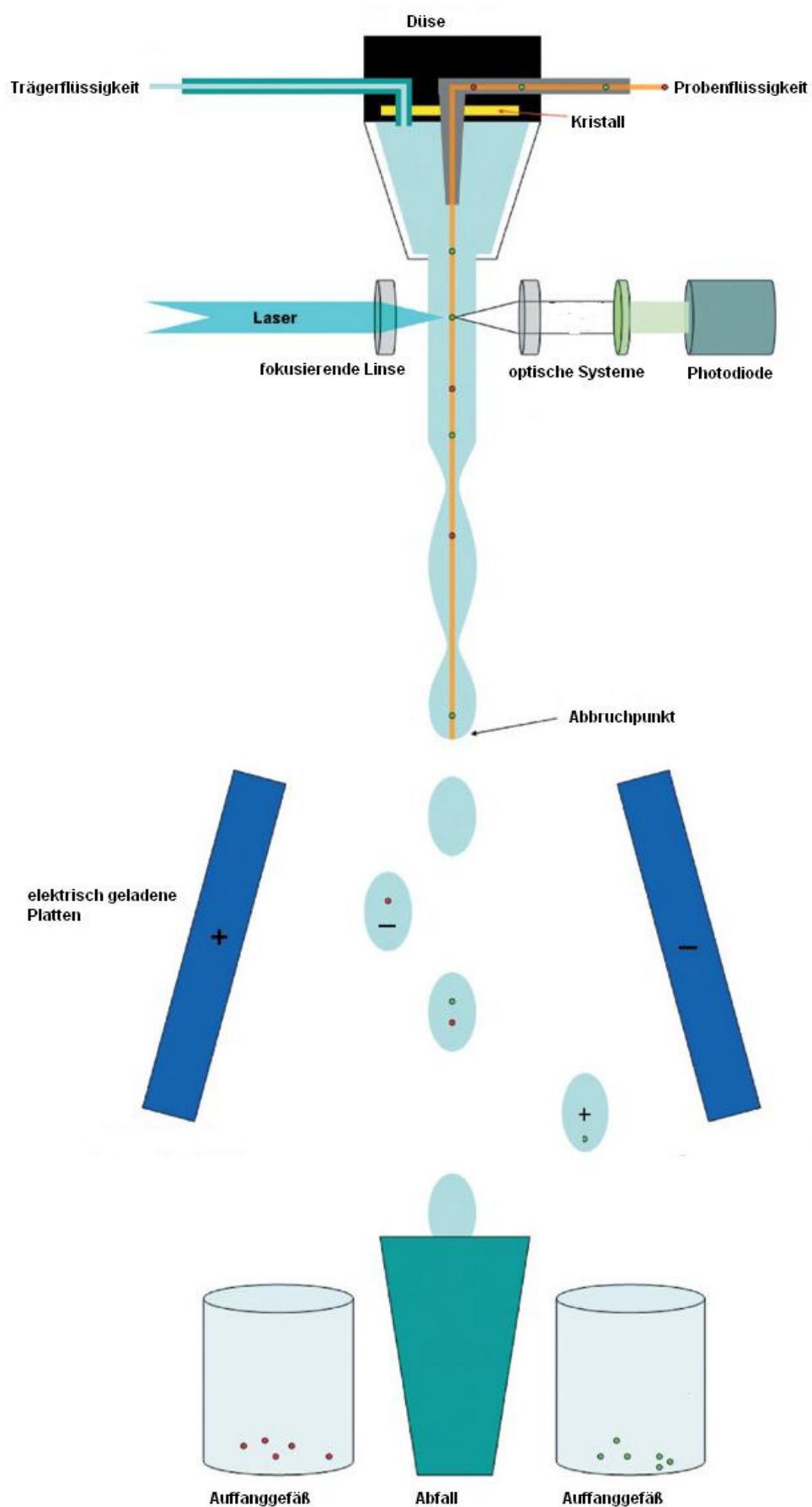


Abbildung 5: Prinzip der durchflusszytometrischen Zellsortierung (adaptiert aus (12))

Material und Methoden

3.3.3.2 Auswahl geeigneter Antikörper

Zunächst wurde die ursprüngliche Definition der NKT-Zellen als CD161 exprimierende T-Zellen als Grundlage für die Markierung mit Antikörpern verwendet. Dabei wurde CD161 mit PE und die für NKT-Zellen charakteristische α -Kette des T-Zellrezeptors $V\alpha 24$ mit FITC markiert. Da jedoch, wie oben dargelegt, diese Methode der NKT-Definition von einigen Autoren sehr kritisch bewertet wird und zudem in den eigentlichen Versuchen mit Nabelschnurblut gearbeitet werden sollte, wurde ein Vergleich der oben genannten Markierung mit der Antikörperkombination $V\alpha 24$ /FITC und $V\beta 11$ /PE durchgeführt.

3.3.3.3 Titrierung der nötigen Antikörpermenge

Mit Hilfe eines Titrationsversuches konnte die optimale Antikörpermenge ermittelt werden. Dazu wurden mehrere Ansätze vorbereitet, wobei jeweils circa 10^6 Zellen pro Ansatz in einer Zellsuspension vorlagen. Im ersten Ansatz wurden je 20 μ l von jedem Antikörper verwendet, im zweiten Ansatz je 10 μ l und im dritten je 5 μ l Antikörper. Die 20-minütige Inkubation erfolgte bei 4°C im Kühlschrank. Nach der zweimal durchgeführten Auswaschung ungebundener Antikörper (siehe unten), wurden die drei Ansätze im Durchflusszytometer gemessen und anhand der auf dem Bildschirm dargestellten Diagramme und der vom Computer berechneten Populationsgröße verglichen.

3.3.3.4 Durchführung der Durchflusszytometrie und der durchflusszytometrischen Zellsortierung

Für die Vorversuche wurden jeweils 5 μ l von $V\alpha 24$ /FITC und CD161/PE oder $V\beta 11$ /PE, sowie je 5 μ l von CD4/APC und CD8/PerCP-Cy5.5 zu 50 μ l Zellsuspension mit ca. 10^6 Zellen gegeben.

Die Inkubation von 20 Minuten erfolgte bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden 1,5ml FACS-Puffer zugegeben und die Zellen gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde abgenommen und das Pellet in 360 μ l FACS-Puffer aufgenommen und sofort durchflusszytometrisch analysiert. Bei Nabelschnurblut wurde das Pellet statt in FACS-Puffer in 360 μ l Erythrozytenlysepuffer aufgenommen.

Für die Zellsortierung wurden jeweils 10^6 Zellen in fünf 15ml Rörchen überführt. Ein Ansatz blieb ungefärbt, die restlichen vier Rörchen wurden jeweils mit einer Farbe gefärbt. Dazu wurden je 5 μ l Antikörper und 50 μ l FACS-Puffer zur Zellsuspension gegeben. Die restlichen Zellen wurden mit allen Farben gefärbt, wobei wieder 5 μ l Antikörper pro 10^6 Zellen zugegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Dunkeln erfolgten zwei

Material und Methoden

Waschschritte. Die Zellen wurden danach resuspendiert, so dass eine Konzentration von 10^8 Zellen pro 1ml vorlag und dunkel sowie auf Eis zum Sorten gebracht.

Die gewünschte Zellpopulation der für $V\alpha 24$ und $V\beta 11$ doppelpositiven Zellen wurde am Computerbildschirm mit einem elektronischen Fenster eingegrenzt. Innerhalb dieser Population wurden weitere Fenster um die $CD4^+$, die $CD8^+$ und um die für diese Oberflächenmerkmale doppelnegativen Zellen gelegt (Abbildung 6). Die Einstellung des MoFlo Cellsorters erfolgte so, dass die drei verschiedenen Populationen $V\alpha 24^+ V\beta 11^+ DN$, $V\alpha 24^+ V\beta 11^+ CD4^+$ und $V\alpha 24^+ V\beta 11^+ CD8^+$ in einzelne Röhrrchen sortiert wurden.

In einem zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen nur mit Antikörpern gegen $V\alpha 24$ und $V\beta 11$ gefärbt, wobei wieder $5\mu l$ Antikörper pro 10^6 Zellen eingesetzt wurden. Dann wurde je ein Fenster auf die $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ doppelpositive Population und auf die $V\alpha 24^+$ positive $V\beta 11^-$ negative Population gelegt und diese mit Hilfe des MoFlo Cellsorters sortiert.

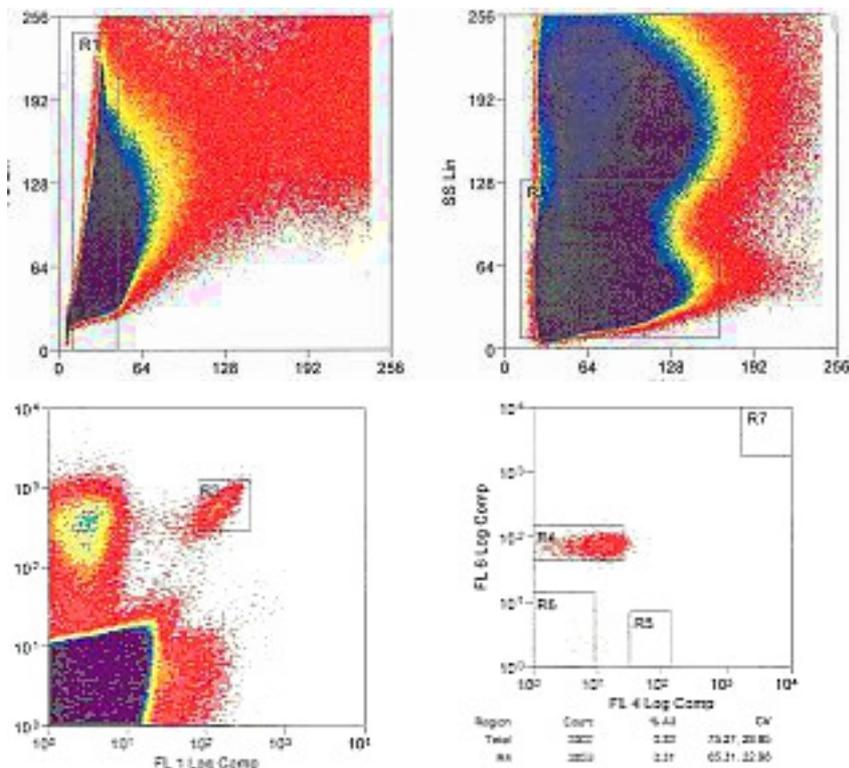


Abbildung 6: Strategie für das Setzen des elektronischen Fensters im Diagramm

Zuerst wird ein elektronisches Fenster auf die Lymphozyten gesetzt (R2). Danach werden die für die Antikörper $V\alpha 24$ und $V\beta 11$ doppelpositiven Zellen eingestellt (R3, linkes Bild untere Reihe). Innerhalb dieser Population werden die jeweiligen Subpopulationen, die $CD4/CD8$ doppelnegativ (R6), $CD4$ positiv (R4) und $CD8$ positiv (R5) sind, markiert (rechtes Bild untere Reihe). Deutlich sichtbar ist hier das Überwiegen von $CD4^+$ NKT-Zellen.

Material und Methoden

3.3.4 RNA-Isolation

In Vorversuchen wurde zunächst mit nicht-gesorteten Zellen gearbeitet. Dazu wurden die restlichen Zellen, die nicht für die Durchflusszytometrie verwendet worden waren, erneut zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Dann wurde soviel RLT-Puffer des RNeasy Mini Kits zugegeben, dass eine Konzentration von $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ Zellen pro 600 μ l RLT-Puffer vorlag. Jeweils 600 μ l des Lysats wurden in 2ml Eppendorfgefäße pipettiert und diese in die vorgesehenen Vertiefungen des QIA-Cubes gesteckt. Die Rotoradptoren wurden mit 1,5ml Auffanggefäßen, den RNeasy Mini Kit Säulen und den RNeasy Shredder Säulen bestückt. Es wurde das Programm QIAshredder bei einem Eluationsvolumen von 30 μ l gewählt.

Die durch das Sorten gewonnene reine NKT-Zellsuspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet in 350 μ l RLT Puffer resuspendiert. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen lysiert und das Lysat homogenisiert.

Je 350 μ l Zelllysat in RLT-Puffer wurden dann in 2ml Eppendorf Gefäße gegeben und in die vorgesehenen Vertiefungen des QIACube gesteckt. Die Rotoradptoren wurden mit 1,5ml Auffanggefäßen und den RNeasy Micro Kit Säulen bestückt. Für die Isolierung der RNA wurde das Programm RNeasy Micro bei einem Eluationsvolumen von 14 μ l gewählt. Mit Hilfe des QIACubes wird die Gesamt-RNA danach in einem automatisierten Verfahren isoliert, indem zuerst Ethanol zugefügt wird, um optimale Bindungsbedingungen zu schaffen, und das Gemisch dann auf eine Silica-Gelmembran aufgebracht wird, an die die RNA bindet. Die übrigen Bestandteile werden ausgewaschen und die reine RNA anschließend in Wasser eluiert. Danach wurde 1 μ l des Eluats verwendet, um den RNA-Gehalt der einzelnen Proben photometrisch zu messen und die Reinheit mit Hilfe des Quotienten A260/A280 überprüft.

3.3.5 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese bedient man sich eines Enzyms aus Retroviren, der Reversen Transkriptase. Diese ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, das heißt sie benutzt einen RNA-Einzelstrang als Matrize für die Synthese eines DNA-Doppelstrangs und wurde ursprünglich aus Retroviren isoliert. Retroviren enthalten ihr Genom in Form von RNA, welche sie mit der Reversen Transkriptase in DNA umschreiben, bevor sie sich in ein Wirtsgenom integrieren.

Zuerst wurde eventuell noch vorhandene genomische DNA eliminiert. Dazu wurden zum errechneten Volumen mit 1 μ g RNA-Gehalt 2 μ l gDNA Wipeout Puffer gegeben und mit RNase-freiem Wasser auf 14 μ l aufgefüllt. In den Vorversuchen, bei denen nicht gesortete

Material und Methoden

Zellen verwendet wurden, erlaubte die große Menge extrahierter RNA jeweils soviel RNA einzusetzen, dass der RNA-Gehalt genau 1µg betrug. Die geringe Zahl der NKT-Zellen brachte es jedoch mit sich, dass nach der durchflusszytometrischen Zellsortierung trotz des kleinstmöglichen Eluationsvolumens von 14µl der RNA-Gehalt stets unter 1µg lag. Deshalb wurden jeweils 7µl des Eluats für die Umschreibung und die restlichen 6µl für die Kontrolle zum Ausschluss genomischer DNA verwendet. Zunächst wurde die Elimination genomischer DNA wie oben beschrieben durchgeführt und die Ansätze anschließend durch Vortexen gut gemischt, danach zentrifugiert und 2 Minuten bei 42°C inkubiert.

Währenddessen wurde der Mastermix für die Reverse Transkription vorbereitet.

Pro Reaktion wurden eingesetzt:

Puffer:	4µl
Primer Mix	1µl
Reverse Transkriptase	1µl
	<hr/>
	6µl

Je 6µl des Mastermix wurden dann zu den 14µl gegeben und gemischt. Die Proben wurden dann 15 Minuten bei 42°C und anschließend 3 Minuten bei 95°C inkubiert.

Zur Kontrolle wurde jedes Mal eine Reaktion ohne Reverse Transkriptase durchgeführt, um bei der PCR eine Amplifikation genomischer DNA ausschließen zu können.

3.3.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um die spezifischen Sequenzen der invarianten T-Zellrezeptor α -Kette zu amplifizieren, wurde eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei erfolgt durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C eine Denaturierung des cDNA-Doppelstrangs und damit eine Auftrennung in zwei Einzelstränge.

Durch Erniedrigung der Temperatur können die Primer spezifisch an die komplementären Abschnitte auf der nun als Einzelstränge vorliegenden DNA binden, was als „annealing“ bezeichnet wird. Die optimale Annealing-Temperatur von 58,3°C wurde zuvor mit Hilfe eines Gradientenprogrammes ermittelt. Dabei werden während einer PCR-Reaktion in den 12 nebeneinander liegenden Vertiefungen des PCR-Cyclers unterschiedliche Annealing-Temperaturen erzeugt. Wir wählten hierzu eine Temperaturspanne von 53°C bis 65°C aus.

Material und Methoden

Durch Vergleich der dabei entstandenen PCR-Produkte wurde die Temperatur 58,3°C als beste Temperatur ausgewählt.

Die Komplementarität von Primer und DNA-Sequenz ermöglicht die Ausbildung von Basenpaarungen und schafft eine stabile Startstelle für die DNA-Polymerase.

Nun wird die Temperatur wieder erhöht, um die optimale Arbeitstemperatur für die DNA-Polymerase zu schaffen. Diese beginnt von den Primern ausgehend mit der Neusynthese eines komplementären Strangs, indem die vorliegenden Einzelstränge jeweils als Vorlage benutzt werden. Sind die gewünschten Abschnitte zum Doppelstrang ergänzt, werden sie durch erneute Denaturierung wieder in Einzelstränge getrennt und der Zyklus beginnt von vorne.

Die PCR wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Schritt 1: 95°C	3Minuten
Schritt 2: 94°C	40 Sekunden
Schritt 3: 58,3°C	40 Sekunden
Schritt 4: 72°C	1 Minute

Die Schritte 2 bis 4 wurden 37-mal wiederholt, so dass insgesamt 38 Amplifikationszyklen gefahren wurden. Anschließend erfolgte für 7 Minuten eine Inkubation bei 72°C. Danach wurden die PCR-Produkte entweder sofort auf ein Agarosegel aufgetragen oder bis dahin bei 4°C aufbewahrt.

3.3.7 Gelelektrophorese

Um die Reinheit der PCR zu beurteilen und das Vorhandensein eines PCR-Produkts zu kontrollieren, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt.

Dazu wurde zunächst das Agarosegel gegossen: 2,5g Agarose wurden in 100ml TAE-Puffer aufgelöst und das Gemisch einige Minuten in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Dann wurden 5µg Ethidium-Bromid zugegeben und das Gel in eine mit einem Kamm bestückte Gelkammer gegossen. Beim Abkühlen wird das Gel fest und kann, nachdem der Kamm entfernt wurde, verwendet werden.

Dazu wurden je 5µl PCR-Produkt mit 1µl Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert und das Gel in eine mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gegeben. Durch Anlegen einer Spannung von 90 Volt für 40 Minuten wurden die PCR-Produkte nach Größe aufgetrennt.

Material und Methoden

3.3.8 Sequenzierung

Nach der Überprüfung der Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe der Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte sequenziert. Dazu wurden je circa 10 bis 15 μl des PCR-Produkts und 15 μl des Primers V α 24, der zuvor auf eine Konzentration von 2 pmol/ μl verdünnt worden war, zur Sequenzierung an die Firma MWG Eurofins, Ebersberg geschickt.

Die Resultate wurden anhand der Chromatogramme auf ihre Eindeutigkeit geprüft und dann mit der von Porcelli et al. (83) beschriebenen Sequenz verglichen. Dazu wurden beide Sequenzen mit Hilfe des Programms „Pairwise Alignment Algorithms“ von EBI bezüglich ihrer Übereinstimmung analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Häufigkeit von NKT-Zellen im peripheren Blut Erwachsener

Die Häufigkeit der NKT-Zellen im peripheren Blut schwankt interindividuell sehr stark (95). Deshalb wurden zunächst Probanden hinsichtlich der NKT-Frequenz im Blut getestet. Insgesamt wurden 20 Probanden untersucht, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund waren und nicht an atopischen Erkrankungen litten. Die Häufigkeit der NKT-Zellen betrug im Mittel 0,17%, wobei die Spannweite von 0,0% bis 0,6% NKT-Zellen, gemessen an der Gesamtzahl der Lymphozyten, reichte (Abbildung 7). Es wurden nur solche Probanden für die nachfolgenden Versuche rekrutiert, bei denen der NKT-Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl mindestens 0,1% betrug.

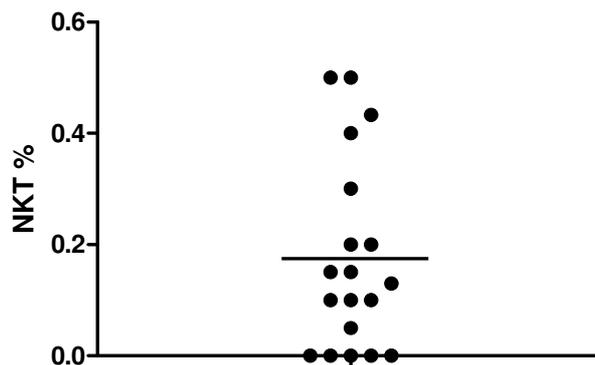


Abbildung 7: Prozentueller Anteil der NKT-Zellen

Ein Punkt repräsentiert die NKT-Zellzahl eines Spenders gemessen an der Gesamtlymphozytenzahl im peripheren Blut Erwachsener.

Die Verteilung der NKT-Subpopulationen wurde bei den Probanden mit messbaren NKT-Zellzahlen bestimmt. Die Häufigkeit der DN Subpopulation betrug im Mittel 56,73% gemessen an der Gesamtzahl der NKT-Zellen, die Häufigkeit der CD4⁺ NKT-Zellen betrug im Mittel 37,51% von allen NKT-Zellen und die Häufigkeit der CD8⁺ NKT-Zellen betrug im Mittel 4,62% aller NKT-Zellen. Auffällig war eine breite Streuung der Subpopulationen-Verteilung bei verschiedenen Individuen (Tabelle 1).

Ergebnisse

Subpopulation	Minimum	Maximum	Mittelwert
DN	34,9	86,0	56,73
CD 4 ⁺	13,6	60,8	37,51
CD 8 ⁺	0	20,7	4,62

Tabelle 1: NKT-Subpopulationen bei Erwachsenen

Häufigkeit der DN, CD4⁺ und CD8⁺ NKT-Zellen in % gemessen an der Gesamtzahl der NKT-Zellen.

4.2 Vergleich verschiedener Antikörper

Zunächst wurden die Blutproben, gemäß der ursprünglichen Definition der NKT-Zellen als CD161-positive T-Zellen, mit den Antikörpern gegen V α 24 und CD161 markiert. Die Markierung mit Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 diente der Identifizierung der NKT-Subpopulationen. Bei Versuchen mit Erwachsenenblut konnte mit dieser Methode in der Durchflusszytometrie eindeutig die Zellpopulation der NKT-Zellen identifiziert werden und mit einem elektronischen Fenster am Bildschirm markiert werden, so dass der prozentuale Anteil der NKT-Zellen an der Gesamtzahl der Lymphozyten berechnet werden konnte. Bei Versuchen mit Nabelschnurblutproben fiel auf, dass hier die Markierung der Zellen mit den Antikörpern gegen CD161 und V α 24 keine eindeutig abgrenzbare Population ergab (Abbildung 8, links). Bei der Verwendung von zwei Antikörpern, die an die spezifischen Ketten des NKT T-Zellrezeptors V α 24 und V β 11 binden und diese somit markieren, zeigte sich dagegen auch bei Nabelschnurblutproben in dem Quadranten, der die Zellen abbildet, auf denen beide mit Antikörpern markierten Oberflächenmoleküle vorhanden sind (hier: Q2-6, Abbildung 8, rechts), eine eindeutig abgrenzbare Zellwolke, die somit als fetale NKT-Zellen identifiziert werden konnte. Die unterschiedlich gute Identifizierung fetaler NKT-Zellen mit verschiedenen Antikörperkombinationen hängt möglicherweise damit zusammen, dass CD161 bei fetalen NKT-Zellen nur in geringem Maß exprimiert wird und erst im Laufe der Reifung heraufreguliert wird, wie eine Studie von Kadowaki nahe legt (96). Um die durchflusszytometrische Zellsortierung durchzuführen, muss die zu sortierende Zellpopulation auf dem Bildschirm eindeutig zu markieren sein, um eine Kontamination mit anderen Zellen zu vermeiden. Deshalb wurde die Antikörperkombination gegen V α 24 und V β 11 für alle folgenden Versuche bei Erwachsenen und Nabelschnurblut benutzt.

Ergebnisse

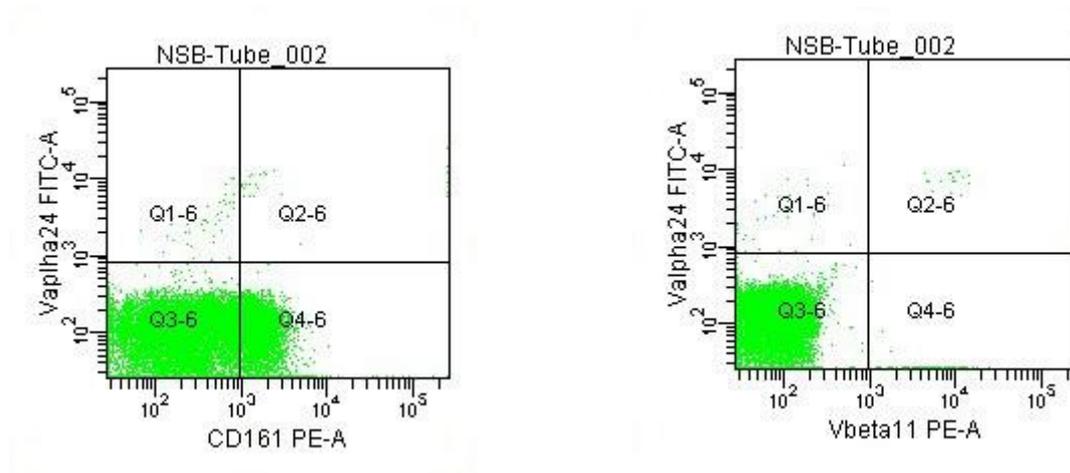


Abbildung 8: Markierung von Nabelschnur (NSB) NKT-Zellen mit zwei verschiedenen Antikörperkombinationen

Im Quadranten Q2-6 kommen diejenigen Zellen zur Abbildung, die mit beiden Oberflächenrezeptoren gegen die die verwendeten Antikörper gerichtet sind, ausgestattet sind. Die Kombination der Antikörper gegen V α 24 und CD161 zeigt keine klar abgegrenzte NKT-Population im Quadranten Q2-6 (linke Abbildung), während die Kombination der Antikörper gegen V α 24 und V β 11 eine definierte Subpopulation sichtbar macht, erkennbar einer klar abgrenzbaren Zellwolke in Quadrant Q2-6 (rechte Abbildung).

4.3 Ermittlung der nötigen Antikörpermenge

Mit Hilfe eines Titrationsversuches konnte die für die Färbung optimale Antikörpermenge ermittelt werden. Dazu wurden zu 10^6 Zellen von jedem Antikörper einmal $20\mu\text{l}$, einmal $10\mu\text{l}$ und einmal $5\mu\text{l}$ gegeben und die Ergebnisse verglichen. Dabei zeigte sich, dass hinsichtlich der Abgrenzbarkeit der Populationen und bezüglich der vom Computer berechneten prozentuellen Anzahl von NKT-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl kein Unterschied zwischen den Konzentrationen $5\mu\text{l}$ pro 10^6 Zellen, $10\mu\text{l}$ pro 10^6 Zellen und $20\mu\text{l}$ pro 10^6 Zellen bestand (Abbildung 9). Deshalb wurde u.a. aus Kostengründen mit der Konzentration $5\mu\text{l}$ pro 10^6 Zellen weitergearbeitet.

Ergebnisse

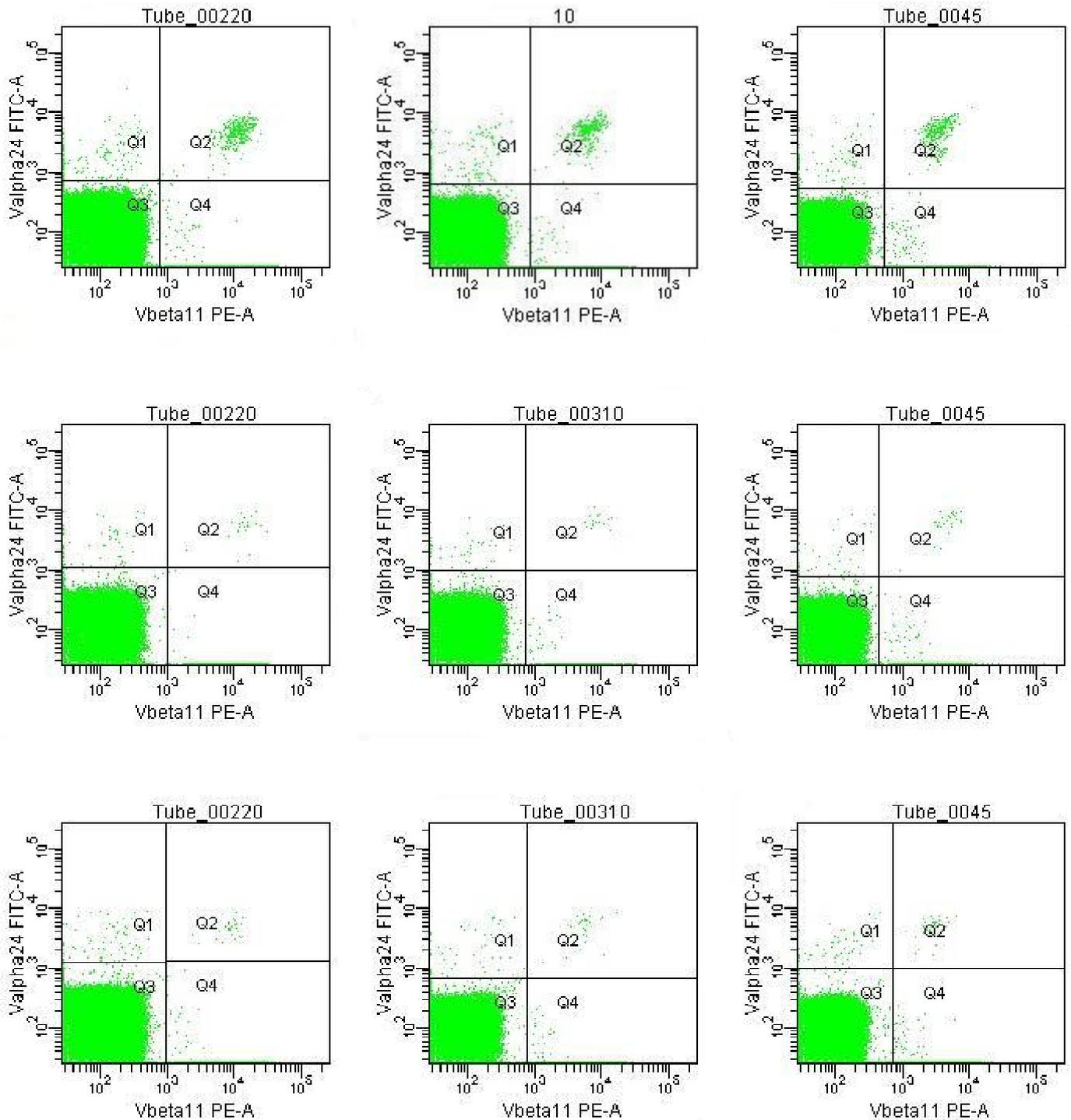


Abbildung 9: Vergleich verschiedener Antikörpermengen

In einer Reihe dargestellt jeweils Markierung mit je 20µl (erste Spalte), 10µl (zweite Spalte) und 5µl Antikörper (dritte Spalte) pro 10⁶ Zellen. Eingesetzt wurden dabei pro Röhrchen die angegebene Menge Va24-Antikörper und die gleiche Menge Vβ11-Antikörper. Die Messung wurde mit Blutproben von drei verschiedenen Spendern (biologische Replikate) getrennt durchgeführt (Reihe 1 – 3). NKT-Zellen kommen im Quadranten Q2 zur Darstellung.

Ergebnisse

4.4 Häufigkeitsverteilung der NKT-Subpopulationen

4.4.1 Erwachsene

Mögliche Blutspender wurden in Vorversuchen hinsichtlich der Häufigkeit von NKT-Zellen im peripheren Blut untersucht. Aus dieser Gruppe von Spendern wurden drei Blutspender mit bei den Vorversuchen über dem Durchschnitt liegenden NKT-Zahlen ausgewählt. Diese drei Blutspender wurden für die Versuche, bei denen NKT-Zellen durchflusszytometrisch sortiert werden sollten, als Probanden herangezogen und erneut von jedem eine Blutprobe von 50ml gewonnen. Hierbei zeigte sich, dass trotz der Auswahl der Spender, die eine möglichst hohe Ausbeute an NKT-Zellen garantieren sollte, die Häufigkeit der NKT-Zellen bei einzelnen Individuen schwankt. Bei den drei ausgewählten erwachsenen Spendern reichte die Häufigkeit der NKT-Zellen im peripheren Blut von 0,01% bis 0,29%. Der Mittelwert betrug 0,19%, wobei die Gesamtlymphozytenzahl 100% entspricht. Dabei waren im Mittel 44,01% der NKT-Zellen CD4⁺, 34,89% DN und 0,19% CD8⁺. Auffallend ist hier die breite Streuweite der Verteilung der einzelnen Subpopulationen (Tabelle 2). Die Subpopulationen DN und CD4⁺ machen bei allen drei Spendern den größten Anteil aus, während CD8⁺ NKT-Zellen jeweils die kleinste Gruppe bilden.

Spender	NKT %	DN	CD4 ⁺	CD8 ⁺
1	0,29	74,29	11,43	12,38
2	0,01	19,3	75,44	0
3	0,26	11,08	45,17	28,8

Tabelle 2: Prozentueller Anteil der NKT-Subpopulationen bei Erwachsenen

Die Anzahl der NKT-Zellen gemessen an der Gesamtzahl der Lymphozyten reichte bei den verschiedenen Spendern von 0,01% bis 0,26%. Der prozentuale Anteil der Subpopulationen an der Gesamt-NKT-Zahl variiert bei den einzelnen Spendern stark.

4.4.2 Fetale NKT-Zellen

Bei drei Nabelschnurblutproben von verschiedenen Spendern reichte die Häufigkeit der NKT-Zellen von 0,01% bis 0,03% bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten. Der Mittelwert betrug 0,02%. Der überwiegende Anteil fetaler NKT-Zellen war CD4⁺ (Mittelwert: 85,85%), während die DN NKT-Zellen deutlich seltener vorhanden waren (Mittelwert: 8,05%) und CD8⁺ NKT-Zellen (Mittelwert: 0,33%) kaum vertreten waren (Tabelle 3). Besonders in der

Ergebnisse

Gruppe der DN NKT-Zellen fällt eine deutliche Variabilität bei den drei verschiedenen Spendern auf. Der prozentuelle Anteil der DN NKT-Zellen reichte von 0,23% bis 18,18%.

Spender	NKT %	DN	CD4 ⁺	CD8 ⁺
NSB 1	0,03	18,18	81,82	0
NSB 2	0,01	5,75	86,37	0,99
NSB 3	0,01	0,23	89,37	0

Tabelle 3: NKT-Subpopulationen im NSB

4.5 NKT-Zellen Erwachsener haben keine N-Region

Wie zu erwarten, zeigten die NKT-Zellen, die aus dem Blut Erwachsener gewonnen worden waren, keine N-Region an der Verknüpfungsstelle zwischen dem variablen Segment 24 und dem Joining-Segment 18. Die Sequenz des T-Zellrezeptors stimmte mit der von Porcelli et al. (83) angegebenen Sequenz überein (Tabelle 4). Wenn möglich wurden hierbei die unterschiedlichen Subpopulationen DN, CD4⁺ und CD8⁺ jeweils getrennt analysiert. Es zeigten sich keine Unterschiede in den einzelnen Untergruppen. Sowohl die Sequenzen als auch die Chromatogramme (Beispielchromatogramm, Abbildung 10) stimmten überein.

		V	N	J
Erwartete Sequenz (83)		tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
Spender 1	DN	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
	CD4 ⁺	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
	CD8 ⁺	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
Spender 2	DN	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
	CD4 ⁺			
	CD8 ⁺			
Spender 3	DN	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
	CD4 ⁺	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
	CD8 ⁺	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg

Tabelle 4: Vergleich der T-Zellrezeptor Sequenzen

Bei Spender 2 waren schon bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung keine CD8⁺ NKT-Zellen vorhanden. Trotz vorhandener CD4⁺ NKT-Zellen gelang hier bei sehr geringem Ausgangsmaterial auch keine Amplifikation der CD4⁺ Probe.

Ergebnisse

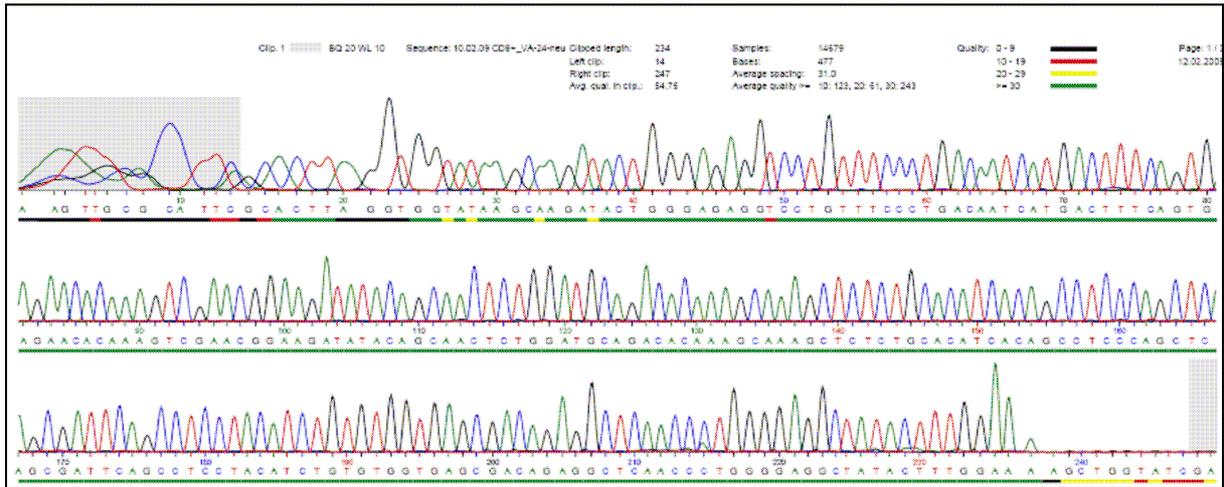


Abbildung 10: Beispielchromatogramm nach erfolgter Sequenzierung

Jede Spitze steht dabei für eine Base. Die unterschiedlichen Farben repräsentieren die vier Basen Adenin (grün), Guanin (schwarz), Thymin (rot) und Cytosin (blau). Da eindeutige Spitzen abgrenzbar sind und der Strich unterhalb der Basenabfolge grün eingefärbt ist, kann eine eindeutige Basensequenz angenommen werden.

4.6 NKT-Zellen aus Nabelschnurblut haben keine N-Region

Da fetale NKT-Zellen hauptsächlich $CD4^+$ waren, reichte das Material der übrigen Subpopulationen nicht für eine erfolgreiche Reverse Transkription und PCR aus, weshalb nur die T-Zellrezeptoren der $CD4^+$ Zellen sequenziert werden konnten. Entgegen unserer These zeigte sich jedoch auch bei den fetalen NKT-Zellen, dass diese zwischen dem variablen Segment 24 und dem Joining-Segment 18 keine N-Regionen enthalten und mit der ursprünglichen von Porcelli et al. definierten Sequenz lückenlos übereinstimmen (Tabelle 5). Auch die Chromatogramme zeigen die ursprüngliche Sequenz (Abbildung 11).

	V	N	J
Erwartete Sequenz (83)	tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
NSB 1	$CD4^+$ tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
NSB 2	$CD4^+$ tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg
NSB 3	$CD4^+$ tac atc tgt gtg gtg agc		gac aga ggc tca acc ctg

Tabelle 5: T-Zellrezeptorsequenzen im NSB

Ergebnisse

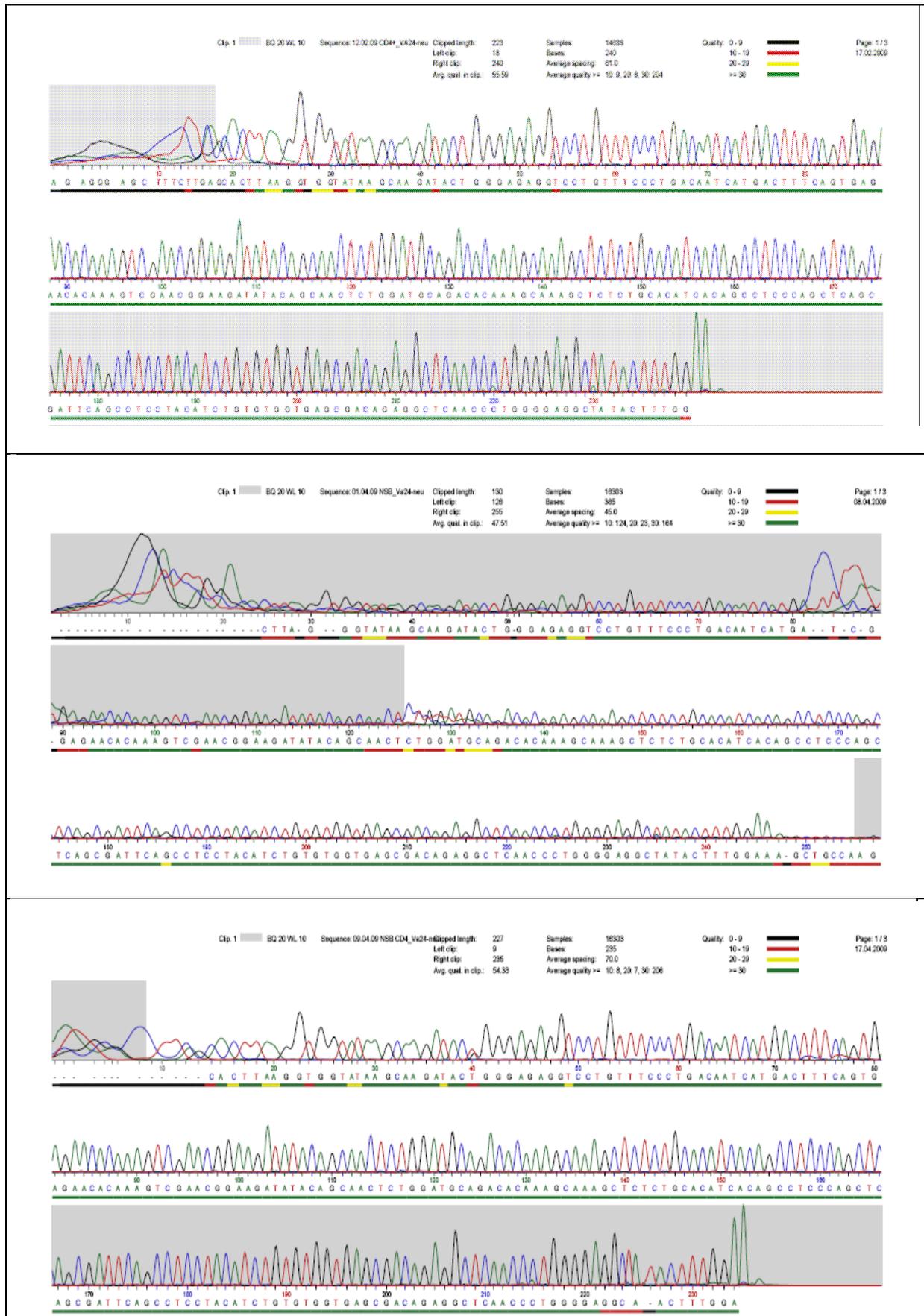


Abbildung 11: Sequenzen der CD4⁺ gesorteten NKT-Zellen aus Nabelschnurblut

Ergebnisse

4.7 $V\alpha 24^+V\beta 11^-$ NKT-Zellen im Nabelschnurblut

Um mögliche Unterschiede zwischen $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ und $V\alpha 24^+V\beta 11^-$ NKT-Zellen zu untersuchen, wurden diese in einer zweiten Versuchsreihe verglichen. Die Sequenzen der amplifizierten α -Kette von $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Proben ergaben die erwartete Sequenz ohne N-Regionen. Bei einer der Proben aus $V\alpha 24^+V\beta 11^-$ NKT-Zellen gelang in der PCR keine Amplifikation der α -Kette, in der zweiten Probe entsprach die Sequenz der erwarteten Sequenz. Bei der dritten Probe entsprach die ermittelte Nukleotidsequenz der erwarteten Sequenz ohne N-Nukleotide, das Chromatogramm unterschied sich jedoch in diesem Fall deutlich von den bisher sequenzierten Proben. Genau am Übergang von $V\alpha 24$ zu $J\alpha 18$ brach die eindeutige Sequenz ab und es zeigte sich ein „Rauschen“ im Chromatogramm (Abbildung 12). (Abbildung der anderen Chromatogramme: siehe Anhang)

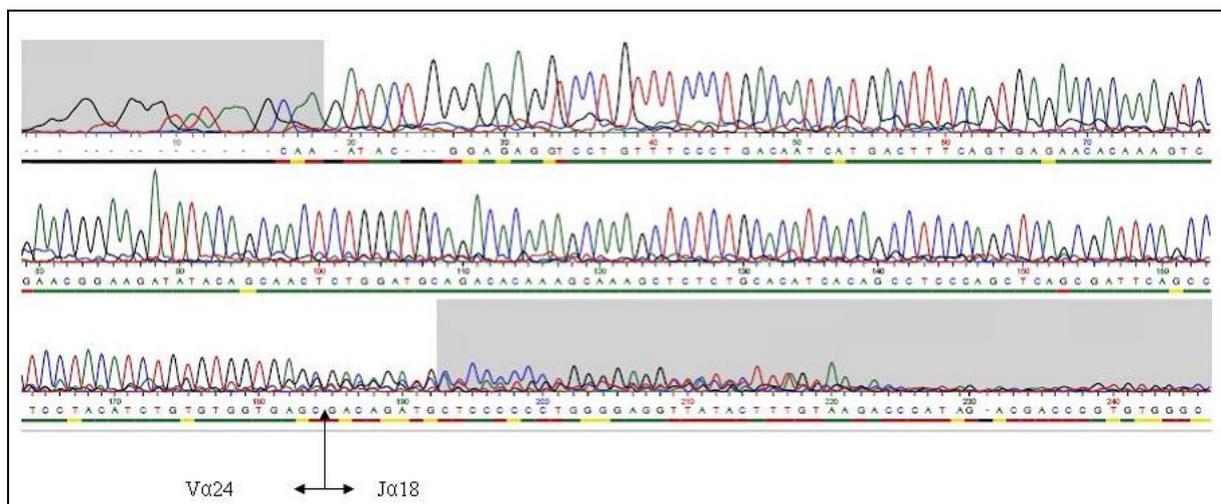


Abbildung 12: Sequenz $V\alpha 24^+V\beta 11^-$

Am Übergang von $V\alpha 24$ zu $J\alpha 18$ bricht die eindeutige Sequenz ab und es zeigt sich ein Rauschen im Chromatogramm.

Ergebnisse

Um einen Fehler bei der Sequenzierung, der zufällig zu einem Abbruch des Chromatogramms am Übergang von Va24 zu Ja18 geführt haben könnte, auszuschließen, wurde eine Wiederholung der PCR mit der cDNA, die dieses Sequenzierergebnis erbracht hatte, durchgeführt und dieses PCR-Produkt erneut zum Sequenzieren gegeben. Auch bei der Wiederholung der Sequenzierung zeigte sich ein Rauschen im Chromatogramm genau am Übergang von Va24 zu Ja18. Die angegebene Nukleotidsequenz stimmte zwar wiederum mit der erwarteten Originalsequenz überein, doch die Farbverteilung des Chromatogramms zeigt, dass diese Sequenz nicht wie zuvor eindeutig ist, erkennbar an einem grünen Unterstrich, sondern einen hohen Anteil an Diskrepanzen aufweist, was durch die gelbe beziehungsweise rote Markierung verdeutlicht wird (Abbildung 13).

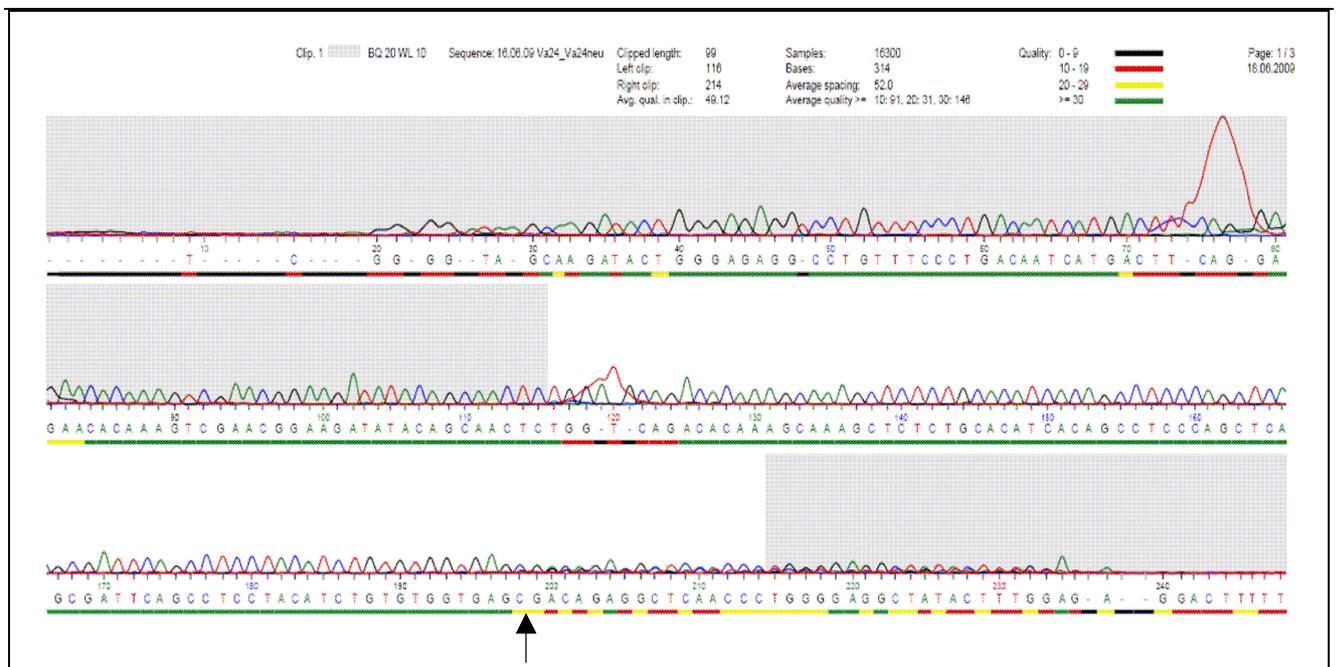


Abbildung 13: Wiederholung der Sequenzierung der Probe Va24*Vβ11⁺ NKT-Zellen

Auch bei der Wiederholung der Sequenzierreaktion bricht das eindeutige Signal im Chromatogramm genau am Übergang von Va24 zu Ja18 ab (→), erkennbar am Wechsel der grünen Farbmarkierung zu gelb und rot.

5 Diskussion

5.1 NKT-Zellen

5.1.1 Unterschiedliche Definitionen von NKT-Zellen

Der Begriff „Natürliche Killer T-Zelle“ wird für sehr unterschiedliche Zellen verwendet. Die ursprüngliche Definition der NKT-Zellen als T-Zellen, die CD161 auf ihrer Oberfläche tragen, wird inzwischen meist nicht mehr als ausreichende Klassifikation angesehen (41; 42; 72). Die Definition über den T-Zellrezeptor der NKT-Zellen, wie sie dieser Arbeit zugrunde liegt, wird jedoch nicht von allen Autoren verwendet. Viele Arbeitsgruppen stützen sich auch auf die Reaktivität der NKT-Zellen mit dem Molekül α Galactosylceramid (α GalCer). Da es auch α GalCer reaktive T-Zellen gibt, die nicht den konservierten, invarianten T-Zellrezeptor tragen, lassen sich Ergebnisse von Studien, die unterschiedliche Definitionen für NKT-Zellen verwenden, nicht zwangsläufig vergleichen, obwohl beide für sich in Anspruch nehmen NKT-Zellen untersucht zu haben. Vergleicht man die verschiedenen Möglichkeiten NKT-Zellen zu definieren, stellt sich jedoch die Frage, ob es sinnvoll ist, einen Zelltyp anhand seiner Reaktivität auf ein künstliches Molekül zu definieren. α Galactosylceramid kommt im menschlichen Organismus natürlicherweise nicht vor, da es sich um ein künstlich modifiziertes Molekül handelt, dessen Ausgangsstoff Bestandteil eines Meeresschwamms ist. Versuche, die darauf abzielen den Phänotyp und die Funktion bestimmter Zellen *in vivo* besser zu verstehen, können nur dann aussagekräftige Ergebnisse liefern, wenn die zu untersuchenden Zellen nach der Gewinnung möglichst wenigen unnatürlichen Reizen ausgesetzt sind. Da man bis jetzt nicht exakt weiß, welche Umweltbedingungen die Entwicklung und Funktion von NKT-Zellen in ihrer natürlichen Umgebung steuern, ist es entscheidend eine Definition zu wählen, die nicht von der Aktivierung der Zellen abhängt. Die Definition, die sich der Aktivierbarkeit von NKT-Zellen durch α GalCer, das an CD1d-Moleküle gebunden werden kann, bedient, führt daher zu Ergebnissen, die nur eingeschränkt auf NKT-Zellen *in vivo* übertragbar sind. Denn diese Aktivierung stellt einen unphysiologischen Reiz für die Zellen dar. Möglicherweise reagieren nur bestimmte NKT-Populationen auf α GalCer, während andere nicht aktiviert werden und daher bei der Auswertung von Versuchen nicht beachtet werden. Es könnte auch sein, dass die Aktivierung der NKT-Zellen durch α GalCer Regulationsmechanismen in den Zellen in Gang bringt, die zu einer Änderung von Oberflächenrezeptoren und zu einer gesteigerten oder verminderten

Diskussion

Synthese bestimmter mRNA-Transkripte führt. Dies wiederum kann sich auf die Interaktion mit anderen Zellen und auf die Produktion von Zytokinen und Chemokinen auswirken. Werden diese Parameter schon von vornherein durch die Ausgangsbedingungen des Versuches beeinflusst, ohne dass man genau weiß, in welchem Ausmaß und mit welchem Ergebnis, lassen sich die erzielten Versuchsergebnisse nur eingeschränkt interpretieren. Durch diese Versuche kann zwar dargelegt werden, inwiefern sich T-Zellen nach der Aktivierung mit α GalCer weiter verhalten und welche ihrer Gene aktiv sind, über die Situation *in vivo* liefern diese Ergebnisse jedoch allenfalls Hinweise. Deshalb entschieden wir uns dafür, eine Definition zu wählen, die sich nicht auf funktionelle Aspekte, sondern auf morphologische Gesichtspunkte stützt, wie schon die ursprüngliche Definition als CD161⁺ T-Zellen. Die Kombination der spezifischen T-Zellrezeptorketten V α 24 und V β 11 ermöglichte somit zum einen eine Suche nach strukturellen Unterschieden in der T-Zellrezeptorsequenz bei Neugeborenen und Erwachsenen und gestattete zum anderen eine Überprüfung von Vorarbeiten, die an fetalen V α 24 und V β 11 exprimierenden Zellen durchgeführt worden waren, hinsichtlich der Frage, ob es sich bei diesen wirklich um NKT-Zellen handelte. Aufgrund der hier gewählten Definition sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht auf anders definierte NKT-Zellen übertragbar. Dies bedeutet, dass es „NKT-Zellen“ – in diesem Fall besser als α GalCer-reaktive T-Zellen bezeichnet – geben kann, die N-Regionen tragen. Dies wäre vereinbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die α GalCer-reaktive T-Zellen ohne die spezifische NKT-Zellrezeptor Kombination V α 24 V β 11 beschrieben haben (15; 30; 42). Diese T-Zellen mit beliebiger Kombination einer α -Kette mit einer β -Kette besitzen damit nicht die eingeschränkte Rezeptorvariabilität „invarianter“ NKT-Zellen und haben möglicherweise auch N-Regionen wie konventionelle T-Zellen.

5.1.2 NKT-Zellen verschiedener Kompartimente

In der vorliegenden Arbeit wurden die NKT-Zellen aus dem peripheren venösen Blut erwachsener Spender beziehungsweise aus plazentarem Nabelschnurblut isoliert. NKT-Zellen kommen auch in anderen Geweben vor und unterscheiden sich dort teilweise von den NKT-Zellen, die im Blut vorhanden sind. NKT-Zellen konnten aus Knochenmark (30), Leber (56) und Decidua (14) isoliert werden. Die Häufigkeit von NKT-Zellen im humanen Thymus ist zwar sehr gering (3; 8), dennoch konnte in einer Studie von Baev et al. gezeigt werden, dass die im Thymus vorkommenden NKT-Zellen vorwiegend CD4⁺ sind und auch bei bis zu fünf Jahre alten Kindern nicht in der Lage sind, IL-4 oder IFN- γ zu produzieren, was durch intrazelluläre Antikörpermarkierung dieser Botenstoffe und Analyse mittels Durchfluss-

Diskussion

zytometrie gezeigt wurde. Erst nach einer dreiwöchigen *in vitro* Kultur war ein kleiner Teil dieser aus Thymusgewebe isolierten NKT-Zellen in der Lage IL-4 und IFN- γ zu synthetisieren, während bei NKT-Zellen aus Nabelschnurblut bereits nach einer Kulturzeit von sieben Tagen ein größerer Prozentsatz der Zellen IL-4 und IFN- γ produzieren konnte (3). Berzins et al. (7) zeigten ebenfalls, dass NKT-Zellen aus Thymusgewebe hauptsächlich CD4⁺ sind und den Oberflächenmarker CD161 in geringerem Maß exprimieren als NKT-Zellen aus peripherem Blut. Somit unterscheiden sich NKT-Zellen aus verschiedenen Kompartimenten bezüglich CD4- und CD8-Verteilung, Reaktivität und Zytokinsekretion mitunter deutlich voneinander (3; 7; 14). Da in der vorliegenden Arbeit nur NKT-Zellen aus Nabelschnurblut und peripherem Blut Erwachsener untersucht wurden, kann hier keine Aussage zu möglichen Unterschieden bei NKT-Zellen aus anderen Kompartimenten gemacht werden. Die Isolation fetaler NKT-Zellen aus anderen Kompartimenten als dem Blut ist zwar denkbar, praktisch jedoch im humanen System schwer durchführbar. Fetales Thymusgewebe wird zwar bei Herzoperationen im Neugeborenenalter entfernt und stünde Untersuchungen zur Verfügung, bei den „Spendern“ handelt es sich in diesem Fall aber um schwerstkranke Kinder, was die Übertragbarkeit der so gewonnenen Ergebnisse auf die natürliche Situation *in vivo* bezweifeln lässt. Zudem verlangen nur wenige, sehr seltene Herzfehler eine sofortige Operation nach der Geburt, weshalb eine adäquate Fallzahl auch schwierig zu erreichen sein dürfte.

5.2 Probandenauswahl

Die in den Vorexperimenten erfolgte Auswahl geeigneter Probanden sollte eine möglichst hohe NKT-Zellzahl für die eigentlichen Versuche garantieren. Warum bei Spenderin 2, bei der im Vorversuch 0,5% NKT-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten gemessen worden waren, die NKT-Zellzahl bei der durchflusszytometrischen Zellsortierung nur 0,01% betrug, konnte nicht geklärt werden. Auch Sandberg et al. (95) beobachteten während einer Beobachtungszeit von 11 Wochen Schwankungen der NKT-Zellzahlen, die jedoch geringer ausfielen als im oben genannten Beispiel. Hier wurden allerdings auch nur je 3 Probanden pro Gruppe untersucht, was eine höhere Variabilität der NKT-Zellzahl eines Individuums nicht vollständig ausschließen kann. Mögliche hormonelle Einflüsse, gerade bei weiblichen Probanden, sind nicht unwahrscheinlich, da zum Beispiel auch eine Erhöhung der NKT-Zellzahl während der Schwangerschaft beobachtet wurde (64).

5.3 Nabelschnurblut

Aufgrund der mittlerweile stark verbreiteten Praxis, Nabelschnurblut als Quelle für Stammzellen einzulagern, gestaltete es sich als nicht einfach genügend Nabelschnurblutproben für die Versuche zu erhalten. Die Beschränkung auf gesunde und termingerecht entbundene Neugeborene schränkte den Pool möglicher Spender zusätzlich ein. Deshalb entschieden wir uns zunächst mit einer kleinen Fallzahl ($n=3$) zu arbeiten. Da insgesamt sechsmal $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Proben bezüglich der T-Zellrezeptorsequenz analysiert wurden und bei keinem ein Hinweis auf N-Regionen gefunden werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass auch bei größerer Fallzahl N-Regionen in überdurchschnittlich hoher Anzahl zu finden wären. Dass in Einzelfällen fetale $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen N-Regionen tragen, kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dies wäre jedoch kein Unterschied zu NKT-Zellen Erwachsener, da seltene Fälle von N-Regionen bei NKT-Zellen Erwachsener beschrieben sind (23; 28; 86).

Die Isolierung von NKT-Zellen aus Nabelschnurblut brachte es mit sich, dass die Versuche nicht in höchstem Maß standardisiert ablaufen konnten, wie es bei der Isolierung aus Erwachsenenblut der Fall war. Anders als die standardisierten Blutentnahmen bei erwachsenen Spendern, die zeitlich geplant werden konnten, erhielten wir die Nabelschnurblutproben, wenn die Geburten stattgefunden hatten und damit zu allen möglichen Tageszeitpunkten. Dies brachte es mit sich, dass die Nabelschnurproben in einigen Fällen einige Stunden aufbewahrt werden mussten, bevor sie weiterverarbeitet werden konnten. Zudem konnte nicht immer die gleiche Menge Nabelschnurblut gewonnen werden. Dennoch halten wir die Isolation von NKT-Zellen aus Nabelschnurblut für eine geeignete Methode möglichst atraumatisch humane fetale Zellen untersuchen zu können, da sich größere Blutentnahmen an Neugeborenen zu Forschungszwecken ohne medizinische Indikation aus ethischen Gründen verbieten. Um dies zu ermöglichen, müsste auf ein Tiermodell ausgewichen werden, was jedoch mit einigen Nachteilen verbunden wäre. So sind Ergebnisse, die im Tiermodell ermittelt werden, nie eins zu eins auf das menschliche System übertragbar. Deutlich wird dies, wenn man bedenkt, dass murine NKT-Zellen zwar einen ähnlichen stark konservierten NKT-Zellrezeptor besitzen, dieser aber aus der Kombination $V\alpha 24$ mit $V\beta 8.2$, $V\beta 2$ oder $V\beta 7$ entsteht und dass bei Mäusefeten gar keine NKT-Zellen gefunden wurden. Wie sich die Verhältnisse bei anderen Tierarten darstellen und inwiefern sie dort mit denen beim Menschen vergleichbar sind, ist wenig erforscht.

Diskussion

Natürlich ergibt sich auch die Frage, inwieweit Zellen, die aus Nabelschnurblut isoliert werden, die Verhältnisse *in utero* während der Schwangerschaft widerspiegeln. Die Möglichkeit einer raschen postnatalen Änderung von Organfunktionen ist von der Adaptation des kindlichen Herz-Kreislaufsystems bekannt und wäre auch für das Immunsystem denkbar. Im humanen System ist eine Überprüfung dieser Annahme nicht möglich, es gibt jedoch Hinweise aus Tiermodellen, dass Nabelschnurblut in ausreichendem Maß die immunologischen Verhältnisse des Feten während der späten Schwangerschaft abbildet.

5.4 Durchflusszytometrische Sortierung

Um die N-Region des T-Zellrezeptors fetaler NKT-Zellen zu untersuchen und eine Kontamination durch konventionelle T-Zellen auszuschließen, wurden die Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Dieses Verfahren ist geeignet auch sehr kleine Zellpopulationen mit großer Reinheit zu isolieren, was es ermöglichte, dass auch die NKT-Subpopulationen CD4⁺, DN und CD8⁺ hinsichtlich ihres T-Zellrezeptors untersucht werden konnten. Obwohl die Blutproben und die isolierten Zellen schonend gehandhabt wurden, indem sie beispielsweise nur gekühlt und unter Lichtabschirmung transportiert wurden, kann eine Beeinflussung der Zellstruktur durch die Prozedur nicht völlig ausgeschlossen werden. Der Vorgang der Durchflusszytometrie setzt die Zellen zahlreichen Stressoren aus. Sie sind hohen Drücken ausgesetzt, werden in kurzer Zeit auf bis zu 20 Meter pro Sekunde beschleunigt, von Lasern angestrahlt, mit mehreren hundert Volt aufgeladen, durch ein elektrisches Feld von mehreren Kilovolt pro Zentimeter geleitet und treffen dann mit einer Geschwindigkeit von bis zu 20 Meter pro Sekunde auf die Oberfläche einer Flüssigkeit auf (12). Diese mechanischen Einflussfaktoren könnten zu einer Herauf- oder Herunterregulierung von Oberflächenmolekülen führen. Ebenso denkbar wäre der teilweise Verlust der Integrität von Oberflächenmolekülen oder Rezeptoren. Würde dies diejenigen Oberflächenmoleküle betreffen, die mit spezifischen Antikörpern markiert wurden und zur Identifizierung der NKT-Zellen verwendet wurden, könnten sich Änderungen der Sortierergebnisse ergeben, da zum Beispiel nicht alle NKT-Zellen durch die Antikörpermarkierung detektierbar wären. Des Weiteren ist nicht geklärt, inwieweit sich die oben genannten physikalischen Belastungen auf die zuvor durchgeführte Antikörpermarkierung auswirken, wobei eine Lösung vorher fest gebundener Antikörper oder gar eine Verklebung an nicht komplementäre Zellstrukturen zu einer Verfälschung des Sortierergebnisses führen würden. Bei erwachsenen Spendern, die zuvor gescreent worden

Diskussion

waren, um Probanden mit einer möglichst hohen NKT-Zahl auszuwählen, fiel auf, dass der prozentuelle Anteil von NKT-Zellen bezogen auf die Gesamtzahl der Lymphozyten bei der Zellsortierung stets geringer war als zuvor in der einfachen Durchflusszytometrie. Eine Alternative zur durchflusszytometrischen Zellsortierung wäre die Anreicherung mit Hilfe von magnetgekoppelten Microbeads. Dabei werden die gewünschten Zellen wiederum mit Antikörpern markiert, die zusätzlich mit magnetischen Nanopartikeln gekoppelt sind. Anschließend werden die Zellen durch eine Säule geleitet, die durch ein starkes elektrisches Feld magnetisch aufgeladen wird, so dass die magnetisch markierten Zellen beim Spülen der Säule zurückbleiben. Durch anschließendes Spülen der Säule ohne elektrisches Feld kann dann die gewünschte Zellpopulation gewonnen werden. Die gewünschte Antikörperkombination V α 24 V β 11 ist jedoch nicht mit magnetisch gekoppelten Partikeln verfügbar, so dass eine andere NKT-Definition gewählt werden müsste. Zudem ist auch mit dieser Methode eine Beeinflussung des Zellphänotyps nicht auszuschließen.

5.5 DN und CD8⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut

Wie oben erläutert gelang bei der Amplifikation mit Hilfe der spezifischen V α 24J α 18 PCR bei Proben aus Nabelschnurblut nur die Amplifikation von CD4⁺ NKT-Zellen. Diese machen zwar den Hauptanteil der NKT-Zellen im Nabelschnurblut aus, es ließ sich jedoch auch immer eine geringe Zahl an doppelt negativen und sogar vereinzelt CD8⁺ NKT-Zellen nachweisen. Die Sequenzierung der CD4⁺ Proben erbrachte keinerlei Hinweise auf das Vorhandensein von N-Regionen in dieser Subpopulation. Es konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass DN und CD8⁺ fetale NKT-Zellen N-Regionen enthalten. Im nächsten Schritt wurde die RNA aus gesorteten NKT-Zellen isoliert, die nicht in Subpopulationen aufgeteilt worden waren, so dass die Gesamt-RNA von CD4⁺, CD8⁺ und DN NKT-Zellen gewonnen werden konnte. Da auch hier die Sequenzierung der PCR Amplifikate keine Hinweise auf N-Regionen ergab, kann man davon ausgehen, dass diese Aussage für alle Subpopulationen auch im fetalen System gilt.

5.6 Unterschiede zu Vorarbeiten

Die in den Vorarbeiten angewandte Methodik unterscheidet sich stark von dem in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Verfahren. So wurden damals in Guanidin-Isothiocyanat-Puffer (GT-Puffer) gelagerte Nabelschnurblutproben aus der GINI-Studie (German Infant Nutrition Intervention Study) als Probenmaterial verwendet. In dieser Allergiepräventionsstudie sollte der Einfluss allergenarmer Säuglingsnahrung auf die Entwicklung von Allergien untersucht werden. Dazu wurden Studienteilnehmer ausgewählt, die durch eine positive Familienanamnese für atopische Erkrankungen selbst ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Asthma oder Allergien hatten. Parallel dazu wurde eine Kontrollgruppe ohne erhöhtes Risiko für Atopie rekrutiert. Von allen Münchner Teilnehmern wurden dabei jeweils Nabelschnurblutproben in GT-Puffer bei -80°C aufbewahrt. Diese eingefrorenen Proben wurden circa zehn Jahre später als Ausgangsmaterial für die Versuche der vorausgehenden Arbeit verwendet. Dies ermöglichte es zwar, eine große Anzahl verschiedener Nabelschnurproben in kurzer Zeit bearbeiten zu können, aber es konnte nie mit frischem Blut gearbeitet werden. Das Aufbewahren von Zellen, selbst wenn deren Nukleinsäuren durch einen Lysepuffer vor Degradierung geschützt werden sollen, führt immer zu einer geringeren Ausbeute bei der RNA-Extraktion, weshalb mehrere Studien von der Aufbewahrung des Zellmaterials vor der Weiterverarbeitung abraten und eine sofortige RNA-Extraktion empfehlen (27; 70). Dies ist vor allem bei Untersuchungen an NKT-Zellen zu bedenken, da es sich hierbei um eine kleine Zellpopulation handelt, bei der schon geringe Schwankungen der RNA-Quantität eine anschließende Reverse Transkription aufgrund des zu geringen Ausgangsmaterials unmöglich machen können. Da nicht bekannt ist, ob und inwiefern die genaue Struktur und der Aufbau einer Nukleinsäure einen Einfluss auf höhere oder niedrige Resistenz gegenüber dem Prozess des Einfrierens und der Lagerung haben, kann es sein, dass durch Aufschieben der RNA-Extraktion nicht mehr alle vormals enthaltenen mRNAs der Extraktion zugeführt werden können und dass einige – eventuell durch anderen Aufbau definierte – vernachlässigt werden.

Des Weiteren wurde in den Vorversuchen die mRNA per Hand mit Hilfe einer modifizierten Methode der sauren Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion gewonnen. Dabei wird das Zelllysat mit Natriumacetat und einem wasser-gesättigten Phenol-Chloroformgemisch gemischt, was zu einer Phasentrennung des Gemisches in eine obere wässrige Phase und eine darunterliegende organische Phase, die hauptsächlich Chloroform enthält, führt. Die RNA liegt, da sie durch Guanidinium und Wasserstoff komplexiert wird, in der wässrigen Phase vor, während sich Proteine in der unteren organischen Phase sammeln.

Diskussion

DNA liegt hauptsächlich an der Phasengrenze vor. Um die RNA zu gewinnen wird dann mit einer Pipette die wässrige Phase abgenommen und die RNA mit Isopropanol gefällt. Hinzu kommen noch mehrere Inkubationsschritte bei -20°C und Waschschriffe mit Ethanol, um ungewünschte Salze wieder zu entfernen. Im Gegensatz zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methode, ist dies sehr vom Können und der Erfahrung des Laboranten abhängig und damit nie in der standardisierten Weise möglich, die eine automatische robotergesteuerte RNA-Extraktion ermöglicht. Studien zu unterschiedlichen Methoden der RNA-Extraktion zeigten, dass die Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion im Vergleich mit der Extraktion mit einer Silikamembran zu einer geringeren Ausbeute an RNA, häufiger zu einer Kontamination mit genomischer DNA (27), zu verminderter Integrität der RNA (78) und geringerer RNA-Qualität (47), gemessen am A260/A280 Quotient, führt.

Um die Kontamination der extrahierten RNA mit genomischer DNA auszuschließen, sollte stets bei der Reversen Transkription ein Teil der gewonnenen RNA ohne Zugabe der Reversen Transkriptase inkubiert werden und mit dem Produkt dann weiter verfahren werden wie mit den eigentlichen Proben. Da sich in der Probe ohne Zugabe von Reverser Transkriptase keine DNA befindet, findet die Taq-Polymerase als DNA-abhängige Polymerase in der PCR keine Matrize. Folglich erscheinen in der Gelelektrophorese des PCR-Produkts keine Banden. Fänden sich hier wider Erwarten Banden, darf die gesamte Probe nicht verwendet werden, da sie genomische DNA enthält. In der meiner Arbeit vorausgehenden Arbeit wurde trotz der größeren Gefahr einer Kontamination mit genomischer DNA, die durch die Phenol-Chloroform-Extraktion gegeben ist, sowohl auf einen DNase-Verdau als auch auf eine Kontrollreaktion ohne Zugabe der Reversen Transkriptase bei der cDNA-Synthese verzichtet. Es ist daher theoretisch möglich, dass die dort gefundenen N-Regionen auf eine Kontamination mit genomischer DNA zurückzuführen sind. So könnte sich genau zwischen V α 24 und J α 18 ein nur wenige Nukleotide langes DNA-Stück befinden, das in der genomischen DNA vor dem Spleißvorgang noch vorhanden ist, in der fertigen mRNA jedoch entfernt ist.

In der vorausgegangenen Arbeit wurde die gewonnene cDNA zunächst einer PCR unterzogen, die alle T-Zellrezeptor-Gensequenzen, die mit V α 24 beginnen, amplifizierte. Dazu wurden Primer verwendet, die so konstruiert waren, dass die Enden der entstehenden PCR-Produkte komplementär zu den Enden der mit Restriktionsenzymen geschnittenen E. coli Plasmide waren. Somit konnten Plasmide und PCR-Produkte ligiert werden, von E. coli aufgenommen werden und die Plasmide mit den verschiedenen T-Zellrezeptorsequenzen kloniert werden. Diejenigen Klone, die Plasmide aufgenommen hatten, wurden ausgewählt

Diskussion

und die Plasmide aufgereinigt, um die DNA wiederum einer PCR zu unterziehen, die diesmal identisch mit der in der vorliegenden Arbeit verwendeten V α 24J α 18 PCR war. Dieses Vorgehen erlaubt die Vermehrung von theoretisch allen vorhandenen T-Zellrezeptorsequenzen eines Individuums, birgt aber auch einige Probleme. So arbeitet keine DNA-Polymerase ganz fehlerfrei, weshalb die Ungenauigkeit des PCR-Produkts durch viele hintereinander geschaltete Polymerase-Ketten-Reaktionen zunimmt. Ein Fehler, der bereits bei der ersten PCR, die von V α 24 bis zum C-Teil des T-Zellrezeptorgens reichte, auftritt, würde in der zweiten PCR in jedem Zyklus vervielfältigt, ohne, dass dies bei der Sequenzierung als Fehler sichtbar wäre, da alle PCR-Produkte von Anfang an diese Veränderung tragen würden. Ein Rauschen im Chromatogramm wäre demnach nicht sichtbar und der Fehler als solcher nicht erkennbar. Ob es zu Fehlern bei der ersten PCR kommen konnte, und ob dies überdurchschnittlich häufig vorkam, wurde nicht überprüft, da die PCR-Produkte der ersten PCR nicht sequenziert wurden, sondern direkt zum Einbau in die Plasmide genutzt wurden. Dies würde jedoch nur dann zu dem Ergebnis führen, dass bei fetalen NKT-Zellen in hohem Maß N-Regionen vorliegen, wenn die Polymerase hauptsächlich am Übergang zwischen V α 24 und J α 18 Fehler eingebaut hätte.

5.7 V α 24J α 18-positive T-Lymphozyten mit N-Regionen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass fetale V α 24⁺V β 11⁺ NKT-Zellen keine N-Nukleotide zwischen dem variablen Segment 24 und dem Joining-Segment 18 besitzen. Somit ergibt sich die Frage, um welche Art von Zellen es sich bei den in Nabelschnurblut gefundenen Zellen handelt, die N-Regionen aufwiesen. Es wäre denkbar, dass diese Zellen die spezifische NKT α -Kette gepaart mit einer anderen β -Kette als V β 11 tragen. Die getrennte Untersuchung von V α 24⁺V β 11⁺ NKT-Zellen und V α 24⁺V β 11⁻ T-Zellen zeigte, dass bei einer der gesorteten V α 24⁺V β 11⁻ T-Zellen genau am Übergang zwischen V α 24 und J α 18 das Chromatogramm der Sequenzierung ein Rauschen zeigte. Dies spricht dafür, dass hier nicht alle in der Probe vorhandenen PCR-Produkte die gleiche Sequenz aufweisen, sondern es genau hier zu Unterschieden in der Nukleotidsequenz kommt, was ein Hinweis auf das Vorliegen von N-Regionen in dieser Probe sein könnte. Es wäre daher möglich, dass die in Vorarbeiten gefundenen T-Zellen mit N-Regionen V α 24⁺V β 11⁻ T-Zellen und nicht NKT-Zellen im eigentlichen Sinn waren. Im Gegensatz zu murinen NKT-Zellen gibt es bei humanen NKT-Zellen nicht nur eine einzige Kombination von α - Kette und β -Kette, obwohl die Kombination

Diskussion

V α 24⁺V β 11⁺ die bei weitem am häufigsten vorkommende ist. Schon von Porcelli et al. (83) wurde beschrieben, dass bei NKT-Zellen des Menschen zwar hauptsächlich V β 11 vorkommt, jedoch nicht ausschließlich. So wurden auch V β 2, V β 8 und V β 13 überdurchschnittlich oft gefunden (83). Auch Kadowaki et al. (53) kamen zu dem Schluss, dass V α 24⁺V β 11⁻ T-Zellen, im Gegensatz zu V α 24⁺V β 11⁺ NKT-Zellen, am Übergang zwischen V- und J-Segment keine identische Nukleotidsequenz aufweisen, und dass sich auch die J-Segmente dieser Zellen unterscheiden. In der Literatur gibt es jedoch keine Angaben zu der Häufigkeit von V α 24⁺V β 11⁻ T-Zellen im Nabelschnurblut und im peripheren Blut Erwachsener. Zudem existieren keine Untersuchungen darüber, ob bei Neugeborenen neben V β 11 die gleichen anderen β -Ketten vorkommen, die beim Erwachsenen gefunden wurden. Hier wäre eine genauere Charakterisierung der β -Ketten fetaler V α 24⁺ T-Zellen angezeigt. Interessant wäre auch die Häufigkeitsverteilung von verschiedenen V β -Segmenten im Nabelschnurblut genauer zu untersuchen, mit NKT-Zellen aus Erwachsenenblut zu vergleichen und zu untersuchen, ob gerade die NKT-Zellen mit von V β 11 abweichenden β -Ketten diejenigen sind, die N-Regionen aufweisen.

Es bleibt die Frage, warum NKT-Zellen als wichtige regulatorische Zellen des Immunsystems nicht mit der für T-Lymphozyten typischen Variabilität des T-Zellrezeptors ausgestattet sind. Diese Tatsache lässt vermuten, dass das Hauptaufgabenfeld der NKT-Zellen *in vivo* nicht die direkte Interaktion mit Fremdanigenen ist, sondern sie hauptsächlich über die Regulation körpereigener Immunzellen zur Abwehrreaktion beitragen. Dieser, bis jetzt noch nicht identifizierte, Ligand wäre demnach auf der Oberfläche der Zellen zu finden, mit denen NKT-Zellen hauptsächlich interagieren. Die Konserviertheit des TZR von NKT-Zellen deutet auf einen starken Selektionsdruck während der Evolution hin und könnte bedeuten, dass NKT-Zellen und der dazugehörige Ligand eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Immunsystems spielten. Möglicherweise bringt die weitere Erforschung von Immunzellen, die erst kürzlich in das Interesse der Wissenschaft gelangten, wie zum Beispiel die CD4⁺CD25⁺ Tregs, weitere Erkenntnisse über den natürlichen Liganden der NKT-Zellen.

5.8 Fetale V α 24⁺V β 11⁺-Zellen: Hauptakteure des fetalen Immunsystems

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es sich bei Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe an fetalen V α 24⁺V β 11⁺ T-Zellen tatsächlich um NKT-Zellen handelt. So konnten wir zeigen, dass fetale NKT-Zellen vornehmlich CD4⁺ sind, wie dies auch von anderen Autoren beschrieben wurde (7; 26; 96). Dies könnte darauf hinweisen, dass fetale

Diskussion

NKT-Zellen eher regulatorische Funktionen ausüben und weniger als Effektorzellen zum Einsatz kommen. Diese Überlegung beruht auf der Tatsache, dass konventionelle CD4⁺ T-Zellen für die Aktivierung anderer Immunzellen verantwortlich sind, während CD8⁺ T-Zellen Effektorfunktion besitzen und zytolytisch aktiv sind. NKT-Zellen Erwachsener wurden von anderen Autoren bereits hinsichtlich ihres Chemokinrezeptorprofils beschrieben, wobei sich zeigte, dass diese die Th1 assoziierten Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR3 in hohem Maß exprimieren (44; 109). Wir konnten nun zeigen, dass fetale NKT-Zellen im Gegensatz dazu einen Th2 assoziierten Phänotyp ausprägen, da die Häufigkeit der NKT-Zellen, die die Th2 typischen Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR8 auf ihrer Oberfläche exprimieren im Nabelschnurblut höher war als im peripheren Blut Erwachsener, während der Anteil CCR5 und CXCR3 exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut geringer war als in den Kontrollen mit Blut Erwachsener (79). Auch Eger et al. (26) zeigten, dass fetale NKT-Zellen einen höheren Anteil an CCR4⁺ Zellen aufweisen und dass die Expression von CCR4 durch Stimulation in einem Th2 begünstigenden Milieu gesteigert werden kann. Hierbei stellt sich jedoch die Frage, ob das Vorherrschen Th2 typischer Chemokinrezeptoren durch das Überwiegen CD4⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut bedingt ist oder unabhängig von der NKT-Subpopulation auftritt, da es Hinweise auf ein generelles Überwiegen Th2 typischer Chemokinrezeptoren bei CD4⁺ NKT-Zellen auch bei Erwachsenen gibt (57; 109). Unsere Versuche zeigten auch, dass die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR5, denen eine Rolle bei der Lymphozytenwanderung zum Lymphknoten zugeschrieben wird, häufiger bei fetalen NKT-Zellen vorkommen. Dass fetale NKT-Zellen auch eine hohe Expression des Oberflächenmoleküls CD62L zeigen, wie von Eger et al. dargelegt (26), unterstützt die Vermutung, dass fetale NKT-Zellen bevorzugt zu den Lymphknoten wandern. Zudem wurde bereits am Mausmodell beschrieben, dass CCR7 während der Reifung muriner NKT-Zellen herunterreguliert wird, da NK1.1⁻ Zellen bei Vorhandensein des CCR7 Liganden SLC/CCL21 Migration zeigten, während NK1.1⁺ Zellen dies nicht taten. (Hierbei entspricht NK1.1 dem humanen CD161, weshalb NK1.1⁺ Zellen als reife und NK1.1⁻ Zellen als unreife NKT-Zellen angesehen werden.) Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Prozentsatz von NKT-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR6 exprimieren im Nabelschnurblut höher ist als bei Erwachsenen. Auch zu diesem Chemokinrezeptor existieren bereits Untersuchungen am Mausmodell, wobei sich dort zeigte, dass CXCR6 am Ende der Reifung hochreguliert wird. Von den Autoren der Studie wurde postuliert, dass CXCR6 essentiell für die Zytokinproduktion und das Überleben der NKT-Zellen ist (39). Insgesamt deuten die Ergebnisse zu der Frequenz der Chemokinrezeptoren bei fetalen NKT-Zellen darauf hin, dass

Diskussion

diese teilweise aktiviert sind, da sie zum einen den Oberflächenmarker CD45RO tragen, der auf einen stattgefundenen Antigenkontakt hindeutet und typisch für Effektor- und Gedächtniszellen ist, zum anderen aber auch Merkmale zeigen, die typisch für naive, noch nicht vollständig ausgereifte Zellen sind. Dies könnte bedeuten, dass fetale NKT-Zellen trotz der phänotypischen Ähnlichkeit mit Effektor- und Gedächtniszellen andere Funktionen ausüben, als CD45RO tragende Zellen des Erwachsenen.

Bis vor einiger Zeit nahm man an, dass das heranwachsende Kind intrauterin durch eine weitgehend sterile Umgebung vor Antigenexposition geschützt ist und sich dadurch die postulierte Unreife des neonatalen Immunsystems erklären lässt, da dieses vor der Geburt keine Möglichkeit gehabt hätte, sich an die Anforderungen des postnatalen Lebens und die damit verbundene Antigenflut zu adaptieren. Tatsächlich stellt die intrauterine Umgebung jedoch keinesfalls eine antigenfreie Zone dar, sondern ermöglicht bereits dem Feten Antigenkontakt (6; 24; 82; 105). Dass dieser Kontakt auch eine Rolle bei der späteren Entwicklung und Funktionalität des kindlichen Immunsystems spielen kann, wird durch die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Billingham (9) gestützt, die zeigte, dass Antigenexposition während der Fetalperiode zu einer Toleranz gegenüber dem zuvor zugeführten Antigen führte, während der Kontakt zum gleichen Antigen zu einer Sensibilisierung führte, wenn er erst nach der Geburt erfolgte. In diesem Zusammenhang könnten NKT-Zellen dafür sorgen, dass das Immunsystem des Fetus auf Antigene nicht so reagiert, wie man es von einem „reifen“ Immunsystem kennt, was zu einer Sensibilisierung führen würde, sondern stattdessen eine Toleranzinduktion gegenüber diesen Antigenen in Gang setzt. Die Erkenntnis, dass fetale NKT-Zellen Th2 polarisiert sind, wird unterstützt durch die Analyse Chemokinrezeptorpositiver $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ fetaler T-Zellen, die mit fetalen NKT-Zellen gleichzusetzen sind, wie in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden konnte. Dabei zeigte sich, dass bei Betrachtung aller NKT-Zellen, IL-4 produzierende NKT-Zellen in Nabelschnurblut häufiger vorkommen als im peripheren Blut Erwachsener (92), was auch von Kadowaki et al. (53) gezeigt wurde. Dieser Effekt war bei den DN NKT-Zellen deutlicher ausgeprägt als bei den $CD4^+$ NKT-Zellen, wobei bei den $CD4^+$ NKT-Zellen IFN- γ produzierende Zellen weniger häufig vorkamen als bei Erwachsenen. Insgesamt ließ sich dadurch eine Präferenz fetaler NKT-Zellen für IL-4 im Vergleich zu IFN- γ erkennen. In den Chemokinrezeptor tragenden Subpopulationen waren vor allem die DN NKT-Zellen für ein Überwiegen von IL-4 bei fetalen NKT-Zellen verantwortlich, was dafür spricht, dass diese Präferenz nicht daran liegt, dass fetale NKT-Zellen überwiegend $CD4^+$ sind. Zudem zeigte sich, dass nicht nur die NKT-Zellen mit den Th2 assoziierten Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR8 häufiger IL-4

Diskussion

produzierten, als die entsprechenden NKT-Zellen Erwachsener, sondern fast alle CCR⁺ Subpopulationen. Die Tatsache, dass während der Schwangerschaft sowohl das fetale als auch das mütterliche Immunsystem mit semi-allogenen Antigenen konfrontiert ist, es aber trotzdem nur in den seltensten Fällen zu einer immunologischen Reaktion und damit zu einer Abstoßung gegen das partiell unbekannte Gewebe kommt, kann nur durch ein tolerogenes Milieu während der Schwangerschaft erklärt werden. Inzwischen wird vor allem eine Th2 Ausrichtung des fetalen und mütterlichen Immunsystems für dieses tolerogene Milieu verantwortlich gemacht. In Anbetracht der weitreichenden immunregulatorischen Einflüsse von NKT-Zellen beim Erwachsenen vermuten wir, dass NKT-Zellen die Toleranz zwischen mütterlichem Organismus und dem Fetus ermöglichen, indem sie die Ausprägung eines Th2 typischen Milieus gewährleisten. So konnte gezeigt werden, dass eine gehäufte Anzahl von Spontanaborten mit einer erniedrigten Zahl von NKT-Zellen in der Decidua assoziiert ist (117). Daneben könnte der tolerogene Einfluss der NKT-Zellen auch Auswirkungen auf die Funktion des neonatalen Immunsystems haben. Lange Zeit wurde das Immunsystem Neugeborener als unreif bezeichnet, da eine effektive Bekämpfung von Mikroorganismen beim Erwachsenen durch eine Th1-Antwort des Immunsystems vermittelt wird und Neugeborene aufgrund der vorherrschenden Th2-Antwort folglich anfälliger für bakterielle und virale Infektionen sind. Doch diese „Unreife“ des neonatalen Immunsystems ist möglicherweise nicht nur Ausdruck eines noch nicht so gut funktionierenden Abwehrsystems, das erst noch heranwachsen muss, sondern stellt vielleicht eine beabsichtigte Modulation eines bereits reif angelegten Systems dar. Michaelsson et al. (74) konnten zeigen, dass T-Lymphozyten Neugeborener in der Lage wären, effiziente Immunreaktionen zu generieren, dass deren Aktivität aber durch bis jetzt nicht umfassend verstandene Mechanismen herunterreguliert wird. Die Autoren dieser Studie postulierten, dass die Anwesenheit von CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (Treg) für diese Inhibierung der fetalen T-Lymphozyten verantwortlich ist. Mehrere Studien weisen darauf hin, dass NKT-Zellen und Treg eng miteinander interagieren und dass NKT-Zellen für die Aktivierung von Treg erforderlich sein könnten (51; 69). So könnten NKT-Zellen über die Aktivierung von Treg *in utero* und postnatal zu einer Herabmodulation des kindlichen Immunsystems führen. In Anbetracht der Gefahren eines überschießenden Immunsystems, wie man es beispielsweise vom sog. „toxic shock syndrom“ kennt, wo die massive systemische Zytokinausschüttung zu einer Dysregulation aller Körperfunktionen einschließlich Körpertemperatur, Gerinnungssystem und Blutdruck führt, könnte diese Herunterregulation auch ein Schutz des Neugeborenen sein. Der Wechsel von der intrauterinen zur extrauterinen Umgebung

Diskussion

konfrontiert das Neugeborene mit einer Vielzahl neuer und zum größten Teil unbekannter Antigene, weshalb es möglicherweise sinnvoller ist, eine höhere Anfälligkeit für Infektionen in Kauf zu nehmen, um eine schädliche und eventuell tödliche Überaktivierung des Immunsystems zu vermeiden.

6 Zusammenfassung

Natürliche Killer T-Zellen sind in vielfacher Hinsicht an der Regulation des Immunsystems beteiligt und besitzen charakteristische Merkmale, die sie von konventionellen T-Zellen unterscheiden. Eine dieser Besonderheiten stellt der T-Zellrezeptor von NKT-Zellen dar, dessen α -Kette immer durch eine Kombination des Variablen Segments 24 und des Joining-Segments 18, ohne Einfügung von N-Nukleotiden, entsteht und meist mit einer $V\beta 11$ -Kette kombiniert wird. Die Besonderheit des fetalen Immunsystems, die durch eine Neigung zu Th2 Immunantworten und durch die Fähigkeiten in hohem Maße Toleranz zu induzieren gekennzeichnet ist, und die Möglichkeit durch besseres Verständnis der fetalen Immunregulation Hinweise auf Mechanismen von Toleranz und Atopie zu erhalten, verdeutlichen die Notwendigkeit fetale NKT-Zellen genauer zu untersuchen. Da sowohl in anderen als auch in der eigenen Arbeitsgruppe wesentliche Unterschiede zwischen fetalen NKT-Zellen und NKT-Zellen Erwachsener festgestellt wurden, stellten wir uns die Frage, ob sich diese Unterschiede auch auf den T-Zellrezeptor und im Besonderen auf die N-Region erstrecken. In vorausgehenden Arbeiten mit Nabelschnurblut gab es Hinweise darauf, dass fetale NKT-Zellen T-Zellrezeptoren mit N-Regionen tragen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass auch fetale NKT-Zellen keine N-Nukleotide besitzen und dass es sich bei den in Pilotversuchen gefundenen $V\alpha 24^+ J\alpha 18^+$ -Zellen möglicherweise nicht um NKT-Zellen der Definition $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ handelt. Es fanden sich jedoch Hinweise, dass die gefundenen N-Regionen von $V\alpha 24^+ V\beta 11^-$ T-Zellen stammen könnten und dass diese nicht immer den charakteristischen invarianten T-Zellrezeptor tragen.

Diese Ergebnisse ermöglichen vorausgehende Arbeiten an fetalen $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ T-Zellen in einem größeren Zusammenhang zu sehen, da diese eindeutig als NKT-Zellen eingeordnet werden können und somit mit NKT-Zellen Erwachsener verglichen werden können. Dabei zeigte sich, dass fetale NKT-Zellen sowohl im Hinblick auf ihr Chemokinrezeptorprofil als auch im Hinblick auf die synthetisierten Zytokine phänotypische und funktionelle Eigenschaften von Th2-typischen Zellen besitzen. Dass die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft in wesentlichem Maß von der Einstellung und Aufrechterhaltung eines Th2 Milieus abhängt, gibt somit einen Hinweis darauf, dass NKT-Zellen auch bei diesem immunologisch kontrollierten Prozess eine wesentliche Rolle spielen.

7 Anhang

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rearrangement der T-Zellrezeptor α - und β -Kette (adaptiert von (50))	9
Abbildung 2: Einfügen von N-Nukleotiden durch TdT (adaptiert aus (50))	11
Abbildung 3: Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation	27
Abbildung 4: Prinzip der Unterscheidung verschiedener Zellpopulationen im Diagramm.....	28
Abbildung 5: Prinzip der durchflusszytometrischen Zellsortierung (adaptiert aus (12)).....	30
Abbildung 6: Strategie für das Setzen des elektronischen Fensters im Diagramm	32
Abbildung 7: Prozentueller Anteil der NKT-Zellen	37
Abbildung 8: Markierung von Nabelschnur (NSB) NKT-Zellen mit zwei verschiedenen Antikörper-kombinationen	39
Abbildung 9: Vergleich verschiedener Antikörpermengen	40
Abbildung 10: Beispielchromatogramm nach erfolgter Sequenzierung	43
Abbildung 11: Sequenzen der CD4 ⁺ gesorteten NKT-Zellen aus Nabelschnurblut.....	44
Abbildung 12: Sequenz V α 24 ⁺ V β 11 ⁻	45
Abbildung 13: Wiederholung der Sequenzierung der Probe V α 24 ⁺ V β 11 ⁻ NKT-Zellen	46

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: NKT-Subpopulationen bei Erwachsenen	38
Tabelle 2: Prozentueller Anteil der NKT-Subpopulationen bei Erwachsenen	41
Tabelle 3: NKT-Subpopulationen im NSB	42
Tabelle 4: Vergleich der T-Zellrezeptor Sequenzen	42
Tabelle 5: T-Zellrezeptorsequenzen im NSB.....	43

7.3 Quellenverzeichnis

1. **Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlstrom J, Kronenberg M, DeKruyff RH, Umetsu DT.** 2006. CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 354:1117-1129.
2. **Arrenberg P, Halder R, Kumar V.** 2009. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol* 218:246-250.
3. **Baev DV, Peng X-h, Song L, Barnhart JR, Crooks GM, Weinberg KI, Metelitsa LS.** 2004. Distinct homeostatic requirements of CD4+ and CD4- subsets of V α 24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood* 104:4150-4156.
4. **Bendelac A, Savage PB, Teyton L.** 2007. The biology of NKT cells. *Annual Review of Immunology* 25:297-336.
5. **Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A.** 2002. A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science (New York, NY)* 296:553-555.
6. **Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Guggenmoos-Holzmann I, Forster J, Bauer CP, Wahn V, Zepp F, Wahn U.** 1997. Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. *Clin Exp Allergy* 27:752-760.
7. **Berzins SP, Cochrane AD, Pellicci DG, Smyth MJ, Godfrey DI.** 2005. Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue samples. *Eur J Immunol* 35:1399-1407.
8. **Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI.** 2005. Working with NKT cells--pitfalls and practicalities. *Curr Opin Immunol* 17:448-454.
9. **Billingham RE, Brent L, Medawar PB.** 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172:603-606.
10. **Bjorksten B.** 1999. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol* 104:1119-1127.
11. **Blumberg RS, Terhorst C, Bleicher P, McDermott FV, Allan CH, Landau SB, Trier JS, Balk SP.** 1991. Expression of a nonpolymorphic MHC class I-like molecule, CD1D, by human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 147:2518-2524.
12. **Boenisch T, Brotherick I, Hoy T, Hudson J, Jespersgaard C, Lopez P, Orfao A, Overton WR, Pursley SW, Ransom J, Sharpe J, Stewart CC, Storie I, Winther L.** Guide to Flow Cytometry. In: Wulff S editor. Fort Collins, Colorado, USA.
13. **Borg NA, Wun KS, Kjer-Nielsen L, Wilce MCJ, Pellicci DG, Koh R, Besra GS, Bharadwaj M, Godfrey DI, McCluskey J, Rossjohn J.** 2007. CD1d-lipid-antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. *Nature* 448:44-49.
14. **Boyson JE, Rybalov B, Koopman LA, Exley M, Balk SP, Racke FK, Schatz F, Masch R, Wilson SB, Strominger JL.** 2002. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:13741-13746.
15. **Brigl M, Brenner MB.** 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annual Review of Immunology* 22:817-890.
16. **Carnaud C, Lee D, Donnars O, Park SH, Beavis A, Koezuka Y, Bendelac A.** 1999. Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol* 163:4647-4650.
17. **Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J.** 1999. HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex. *Immunol Today* 20:60-62.
18. **Cava AL, Kaer LV, Fu Dong S.** 2006. CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators. *Trends in Immunology* 27:322-327.
19. **Chen YG, Choisy-Rossi CM, Holl TM, Chapman HD, Besra GS, Porcelli SA, Shaffer DJ, Roopenian D, Wilson SB, Serreze DV.** 2005. Activated NKT cells

Anhang

- inhibit autoimmune diabetes through tolerogenic recruitment of dendritic cells to pancreatic lymph nodes. *J Immunol* 174:1196-1204.
20. **Coquet JM, Kyparissoudis K, Pellicci DG, Besra G, Berzins SP, Smyth MJ, Godfrey DI.** 2007. IL-21 is produced by NKT cells and modulates NKT cell activation and cytokine production. *J Immunol* 178:2827-2834.
 21. **Crowe NY, Smyth MJ, Godfrey DI.** 2002. A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* 196:119-127.
 22. **D'Andrea A, Goux D, De Lalla C, Koezuka Y, Montagna D, Moretta A, Dellabona P, Casorati G, Abrignani S.** 2000. Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *European Journal of Immunology* 30:1544-1550.
 23. **Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, 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* 180:1171-1176.
 24. **Devereux G, Barker RN, Seaton A.** 2002. Antenatal determinants of neonatal immune responses to allergens. *Clin Exp Allergy* 32:43-50.
 25. **Eberl G, MacDonald HR.** 2000. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur J Immunol* 30:985-992.
 26. **Eger KA, Sundrud MS, Motsinger AA, Tseng M, Van Kaer L, Unutmaz D.** 2006. Human natural killer T cells are heterogeneous in their capacity to reprogram their effector functions. *PLoS ONE* 1:e50.
 27. **Eikmans M, Baelde HJ, De Heer E, Bruijn JA.** 2000. Processing renal biopsies for diagnostic mRNA quantification: improvement of RNA extraction and storage conditions. *J Am Soc Nephrol* 11:868-873.
 28. **Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S.** 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *the Journal of Experimental Medicine* 186:109-120.
 29. **Exley M, Garcia J, Wilson SB, Spada F, Gerdes D, Tahir SM, Patton KT, Blumberg RS, Porcelli S, Chott A, Balk SP.** 2000. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology* 100:37-47.
 30. **Exley MA, Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Joyce R, Avigan D, Sackstein R, Balk SP.** 2001. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol* 167:5531-5534.
 31. **Fiedler T, Walter W, Reichert TE, Maeurer MJ.** 2002. Regulation of CD1d expression by murine tumor cells: escape from immunosurveillance or alternate target molecules? *Int J Cancer* 98:389-397.
 32. **Fujibayashi Y, Fujimori Y, Kasumoto I, Kai S, Hara H, Okamura H, Tsutsui H, Ogawa H, Nakanishi K.** 2007. Interleukin-18 regulates T helper 1 or 2 immune responses of human cord blood CD4+ V alpha 24+V beta 11+ natural killer T cells. *International Journal of Molecular Medicine* 20:241-245.
 33. **Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM.** 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* 199:1607-1618.
 34. **Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM.** 2003. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med* 198:267-279.

Anhang

35. **Furlan R, Bergami A, Cantarella D, Brambilla E, Taniguchi M, Dellabona P, Casorati G, Martino G.** 2003. Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma. *Eur J Immunol* 33:1830-1838.
36. **Gadue P, Stein PL.** 2002. NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation. *J Immunol* 169:2397-2406.
37. **Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, Casorati G, Dellabona P, Abrignani S.** 2003. CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* 197:1051-1057.
38. **Galli G, Pittoni P, Tonti E, Malzone C, Uematsu Y, Tortoli M, Maione D, Volpini G, Finco O, Nuti S, Tavarini S, Dellabona P, Rappuoli R, Casorati G, Abrignani S.** 2007. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104:3984-3989.
39. **Germanov E, Veinotte L, Cullen R, Chamberlain E, Butcher EC, Johnston B.** 2008. Critical Role for the Chemokine Receptor CXCR6 in Homeostasis and Activation of CD1d-Restricted NKT Cells. *The Journal of Immunology* 181:81-91.
40. **Gilfillan S, Benoist C, Mathis D.** 1995. Mice lacking terminal deoxynucleotidyl transferase: adult mice with a fetal antigen receptor repertoire. *Immunological reviews* 148:201-219.
41. **Godfrey DI, Kronenberg M.** 2004. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of Clinical Investigation* 114:1379-1388.
42. **Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Kaer LV.** 2004. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol* 4:231-237.
43. **Gray D.** 1993. Immunological memory. *Annu Rev Immunol* 11:49-77.
44. **Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB.** 2002. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 195:625-636.
45. **Haitchi HM, Bassett DJ, Bucchieri F, Gao X, Powell RM, Hanley NA, Wilson DI, Holgate ST, Davies DE.** 2009. Induction of a disintegrin and metalloprotease 33 during embryonic lung development and the influence of IL-13 or maternal allergy. *J Allergy Clin Immunol*.
46. **Hayakawa Y, Godfrey DI, Smyth MJ.** 2004. Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application. *Curr Med Chem* 11:241-252.
47. **Hoffmann G, Ijzer J, Brinkhof B, Schotanus BA, van den Ingh TS, Penning LC, Rothuizen J.** 2009. Comparison of different methods to obtain and store liver biopsies for molecular and histological research. *Comp Hepatol* 8:3.
48. **Hong S, Wilson MT, Serizawa I, Wu L, Singh N, Naidenko OV, Miura T, Haba T, Scherer DC, Wei J, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L.** 2001. The natural killer T-cell ligand alpha-galactosylceramide prevents autoimmune diabetes in non-obese diabetic mice. *Nat Med* 7:1052-1056.
49. **Ishihara S, Nieda M, Kitayama J, Osada T, Yabe T, Ishikawa Y, Nagawa H, Muto T, Juji T.** 1999. CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver. *European journal of immunology* 29:2406-2413.
50. **Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M.** 2001. *Immunobiology: the immune system in health and disease*. New York: Garland Publishing.
51. **Jiang S, Game DS, Davies D, Lombardi G, Lechler RI.** 2005. Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells? *Eur J Immunol* 35:1193-1200.
52. **Jing Y, Gravenstein S, Chaganty NR, Chen N, Lyerly KH, Joyce S, Deng Y.** 2007. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset

Anhang

- composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. *Exp Gerontol* 42:719-732.
53. **Kadowaki N, Antonenko S, Ho S, Rissoan M-C, Soumelis V, Porcelli SA, Lanier LL, Liu Y-J.** 2001. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine* 193:1221-1226.
 54. **Kawakami K, Yamamoto N, Kinjo Y, Miyagi K, Nakasone C, Uezu K, Kinjo T, Nakayama T, Taniguchi M, Saito A.** 2003. Critical role of Valpha14+ natural killer T cells in the innate phase of host protection against *Streptococcus pneumoniae* infection. *Eur J Immunol* 33:3322-3330.
 55. **Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M.** 1997. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278:1626-1629.
 56. **Kenna T, Golden-Mason L, Porcelli SA, Koezuka Y, Hegarty JE, O'Farrelly C, Doherty DG.** 2003. NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells. *J Immunol* 171:1775-1779.
 57. **Kim CH, Butcher EC, Johnston B.** 2002. Distinct subsets of human Valpha24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression. *Trends in Immunology* 23:516-519.
 58. **Kim HY, Kim HJ, Min HS, Kim S, Park WS, Park SH, Chung DH.** 2005. NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production. *J Exp Med* 201:41-47.
 59. **Kitamura H, Iwakabe K, Yahata T, Nishimura S, Ohta A, Ohmi Y, Sato M, Takeda K, Okumura K, Van Kaer L, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T.** 1999. The natural killer T (NKT) cell ligand alpha-galactosylceramide demonstrates its immunopotentiating effect by inducing interleukin (IL)-12 production by dendritic cells and IL-12 receptor expression on NKT cells. *J Exp Med* 189:1121-1128.
 60. **Kovarik J, Siegrist C-A.** 1998. Immunity in early life. *Immunology Today* 19:150-152.
 61. **Kronenberg M.** 2005. TOWARD AN UNDERSTANDING OF NKT CELL BIOLOGY: Progress and Paradoxes. *Annu Rev Immunol* 23:877-900.
 62. **Kronenberg M, Gapin L.** 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat Rev Immunol* 2:557-568.
 63. **Kumar H, Belperron A, Barthold SW, Bockenstedt LK.** 2000. Cutting edge: CD1d deficiency impairs murine host defense against the spirochete, *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 165:4797-4801.
 64. **Kwak-Kim J, Yang KM, Gilman-Sachs A.** 2009. Recurrent pregnancy loss: a disease of inflammation and coagulation. *J Obstet Gynaecol Res* 35:609-622.
 65. **Lantz O, Bendelac A.** 1994. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8-T cells in mice and humans. *The Journal of Experimental Medicine* 180:1097-1106.
 66. **Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A.** 2002. Distinct Functional Lineages of Human V{alpha}24 Natural Killer T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 195:637-641.
 67. **Levitsky HI, Golumbek PT, Pardoll DM.** 1991. The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. *J Immunol* 146:1113-1117.
 68. **Lin H, Nieda M, Hutton JF, Rozenkov V, Nicol AJ.** 2006. Comparative gene expression analysis of NKT cell subpopulations. *J Leukoc Biol* 80:164-173.

Anhang

69. **Liu R, La Cava A, Bai XF, Jee Y, Price M, Campagnolo DI, Christadoss P, Vollmer TL, Van Kaer L, Shi FD.** 2005. Cooperation of invariant NKT cells and CD4+CD25+ T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia. *J Immunol* 175:7898-7904.
70. **Mack E, Neubauer A, Brendel C.** 2007. Comparison of RNA yield from small cell populations sorted by flow cytometry applying different isolation procedures. *Cytometry A* 71:404-409.
71. **Market E, Papavasiliou FN.** 2003. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *PLoS Biol* 1:E16.
72. **Matsuda JL, Mallevaey T, Scott-Browne J, Gapin L.** 2008. CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system. *Current Opinion in Immunology* 20:358-368.
73. **Meyer EH, DeKruyff RH, Umetsu DT.** 2008. T cells and NKT cells in the pathogenesis of asthma. *Annual Review of Medicine* 59:281-292.
74. **Michaelsson J, Mold JE, McCune JM, Nixon DF.** 2006. Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol* 176:5741-5748.
75. **Michel ML, Keller AC, Paget C, Fujio M, Trottein F, Savage PB, Wong CH, Schneider E, Dy M, Leite-de-Moraes MC.** 2007. Identification of an IL-17-producing NK1.1(neg) iNKT cell population involved in airway neutrophilia. *J Exp Med* 204:995-1001.
76. **Milner JD, Kent SC, Ashley TA, Wilson SB, Strominger JL, Hafler DA.** 1999. Differential responses of invariant V alpha 24J alpha Q T cells and MHC class II-restricted CD4+ T cells to dexamethasone. *J Immunol* 163:2522-2529.
77. **Munoz NM, Leff AR.** Highly purified selective isolation of eosinophils from human peripheral blood by negative immunomagnetic selection.
78. **Muyal JP, Muyal V, Kaistha BP, Seifart C, Fehrenbach H.** 2009. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies. *Diagn Pathol* 4:9.
79. **Nadas K.** Häufigkeit Chemokinrezeptor exprimierender V α 24⁺V β 11⁺ Natürlicher Killer T-Zellen im Nabelschnurblut und im peripheren Blut Erwachsener. *Medizinische Fakultät*. München: Ludwig-Maximilians-Universität München.
80. **Pachlopnik Schmid JM, Kuehni CE, Strippoli MP, Roiha HL, Pavlovic R, Latzin P, Gallati S, Kraemer R, Dahinden C, Frey U.** 2007. Maternal tobacco smoking and decreased leukocytes, including dendritic cells, in neonates. *Pediatr Res* 61:462-466.
81. **Pellicci DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI.** 2002. A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *The Journal of experimental medicine* 195:835-844.
82. **Piccinni MP, Mecacci F, Sampognaro S, Manetti R, Parronchi P, Maggi E, Romagnani S.** 1993. Aeroallergen sensitization can occur during fetal life. *Int Arch Allergy Immunol* 102:301-303.
83. **Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP.** 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. *The Journal of Experimental Medicine* 178:1-16.
84. **Porubsky S, Speak AO, Luckow B, Cerundolo V, Platt FM, Gr \ddot{a} hne H-J.** 2007. Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104:5977-5982.

Anhang

85. **Pozo D, Vales-Gomez M, Mavaddat N, Williamson SC, Chisholm SE, Reyburn H.** 2006. CD161 (human NKR-P1A) signaling in NK cells involves the activation of acid sphingomyelinase. *J Immunol* 176:2397-2406.
86. **Prell C, Konstantopoulos N, Heinzelmann B, Frankenberger B, Reinhardt D, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S.** 2003. Frequency of Valpha24+CD161+ natural killer T cells and invariant TCRAV24-AJ18 transcripts in atopic and non-atopic individuals. *Immunobiology* 208:367-380.
87. **Prescott SL, Clifton V.** 2009. Asthma and pregnancy: emerging evidence of epigenetic interactions in utero. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*.
88. **Prussin C, 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* 159:5862-5870.
89. **Qureshi MH, Garvy BA.** 2001. Neonatal T cells in an adult lung environment are competent to resolve *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Immunol* 166:5704-5711.
90. **Ranson T, Bregenholt S, Lehuen A, Gaillot O, Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Berche P, Di Santo JP.** 2005. Invariant V alpha 14+ NKT cells participate in the early response to enteric *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 175:1137-1144.
91. **Rehan VK, Asotra K, Torday JS.** 2009. The effects of smoking on the developing lung: insights from a biologic model for lung development, homeostasis, and repair. *Lung* 187:281-289.
92. **Runge A.** Vergleichende Untersuchung der Funktion fetaler Natürlicher Killer T-Zellen mit Natürlichen Killer T-Zellen aus peripherem Blut Erwachsener. *Medizinische Fakultät*. München: Ludwig-Maximilians-Universität München.
93. **Sakuishi K, Oki S, Araki M, Porcelli SA, Miyake S, Yamamura T.** 2007. Invariant NKT cells biased for IL-5 production act as crucial regulators of inflammation. *J Immunol* 179:3452-3462.
94. **Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A.** 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
95. **Sandberg JK, Bhardwaj N, Nixon DF.** 2003. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur J Immunol* 33:588-596.
96. **Sandberg JK, Stoddart CA, Brilot F, Jordan KA, Nixon DF.** 2004. Development of innate CD4+ alpha-chain variable gene segment 24 (Valpha24) natural killer T cells in the early human fetal thymus is regulated by IL-7. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:7058-7063.
97. **Sandor Z, Calicchio ML, Sargent RG, Roth DB, Wilson JH.** 2004. Distinct requirements for Ku in N nucleotide addition at V(D)J- and non-V(D)J-generated double-strand breaks. *Nucleic acids research* 32:1866-1873.
98. **Schaub B, Liu J, Hoppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S, Wieczorek G, Illi S, von Mutius E.** 2009. Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123:774-782 e775.
99. **Singh AK, Wilson MT, Hong S, Olivares-Villagomez D, Du C, Stanic AK, Joyce S, Sriram S, Koezuka Y, Van Kaer L.** 2001. Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 194:1801-1811.
100. **Slifka MK, Pagarigan RR, Whitton JL.** 2000. NK Markers Are Expressed on a High Percentage of Virus-Specific CD8+ and CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology* 164:2009-2015.
101. **Smyth MJ, Crowe NY, Hayakawa Y, Takeda K, Yagita H, Godfrey DI.** 2002. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr Opin Immunol* 14:165-171.

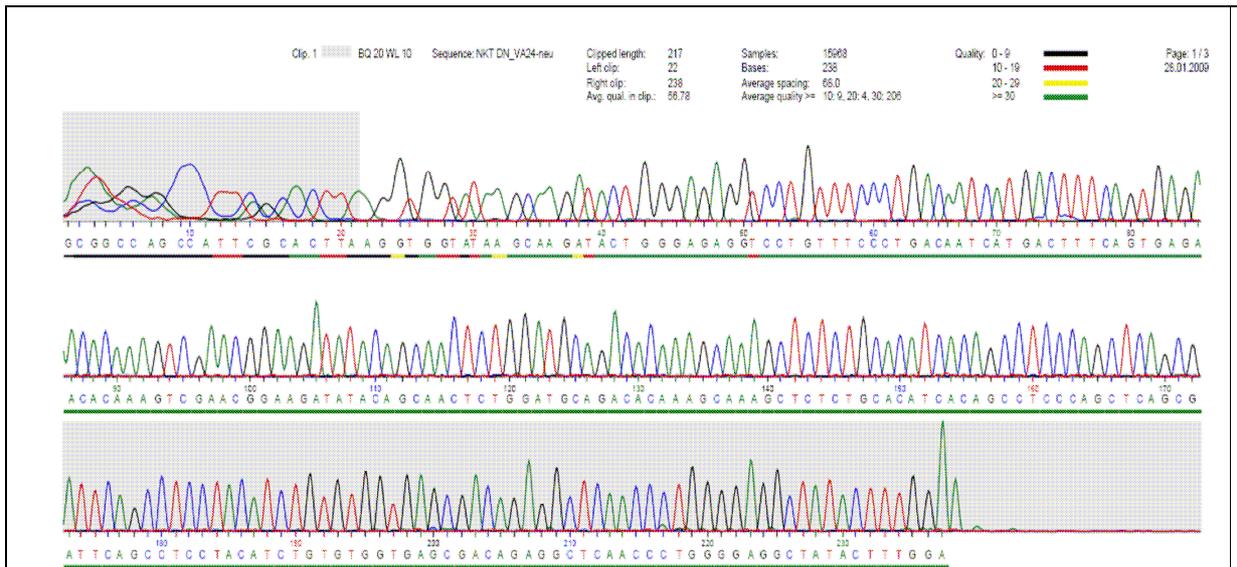
Anhang

102. **Speak AO, Salio M, Neville DCA, Fontaine J, Priestman DA, Platt N, Heare T, Butters TD, Dwek RA, Trottein F, Exley MA, Cerundolo V, Platt FM.** 2007. Implications for invariant natural killer T cell ligands due to the restricted presence of isoglobotrihexosylceramide in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States* 104:5971-5976.
103. **Sullivan BA, Nagarajan NA, Kronenberg M.** 2005. CD1 and MHC II find different means to the same end. *Trends in Immunology* 26:282-288.
104. **Sykes M.** 1990. Unusual T cell populations in adult murine bone marrow. Prevalence of CD3+CD4-CD8- and alpha beta TCR+NK1.1+ cells. *J Immunol* 145:3209-3215.
105. **Szefalusi Z, Nentwich I, Gerstmayr M, Jost E, Todoran L, Gratzl R, Herkner K, Urbanek R.** 1997. Prenatal allergen contact with milk proteins. *Clin Exp Allergy* 27:28-35.
106. **Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, Juji T, 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* 168:3140-3144.
107. **Takeda K, Hayakawa Y, Van Kaer L, Matsuda H, Yagita H, Okumura K.** 2000. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5498-5503.
108. **Terashima A, Watarai H, Inoue S, Sekine E, Nakagawa R, Hase K, Iwamura C, Nakajima H, Nakayama T, Taniguchi M.** 2008. A novel subset of mouse NKT cells bearing the IL-17 receptor B responds to IL-25 and contributes to airway hyperreactivity. *The Journal of Experimental Medicine* 205:2727-2733.
109. **Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, Olson DP, Strominger JL, Brenner MB, Gumperz JE, Wilson SB, Luster AD.** 2003. CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* 171:2571-2580.
110. **Thomas SY, Lilly CM, Luster AD.** 2006. Invariant natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 354:2613-2616; author reply 2613-2616.
111. **Tomura M, Yu WG, Ahn HJ, Yamashita M, Yang YF, Ono S, Hamaoka T, Kawano T, Taniguchi M, Koezuka Y, Fujiwara H.** 1999. A novel function of Valpha14+CD4+NKT cells: stimulation of IL-12 production by antigen-presenting cells in the innate immune system. *J Immunol* 163:93-101.
112. **van der Vliet HJJ, Nishi N, de Gruijl TD, von Blomberg BME, van den Eertwegh AJM, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ.** 2000. Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood* 95:2440-2442.
113. **Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA.** 2006. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clinical Immunology* 121:251-259.
114. **Vijayanand P, Seumois G, Pickard C, Powell RM, Angco G, Sammut D, Gadola SD, Friedmann PS, Djukanovic R.** 2007. Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *The New England Journal of Medicine* 356:1410-1422.
115. **Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR.** 1993. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon? *Immunology today* 14:353-356.
116. **Wun KS, Borg NA, Kjer-Nielsen L, Beddoe T, Koh R, Richardson SK, Thakur M, Howell AR, Scott-Browne JP, Gapin L, Godfrey DI, McCluskey J, Rossjohn J.** 2008. A minimal binding footprint on CD1d-glycolipid is a basis for selection of the unique human NKT TCR. *The Journal of Experimental Medicine* 205:939-949.
117. **Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N, Mori H.** 1999. Proportion of CD56+3+ T cells in decidual and peripheral lymphocytes of normal pregnancy and spontaneous

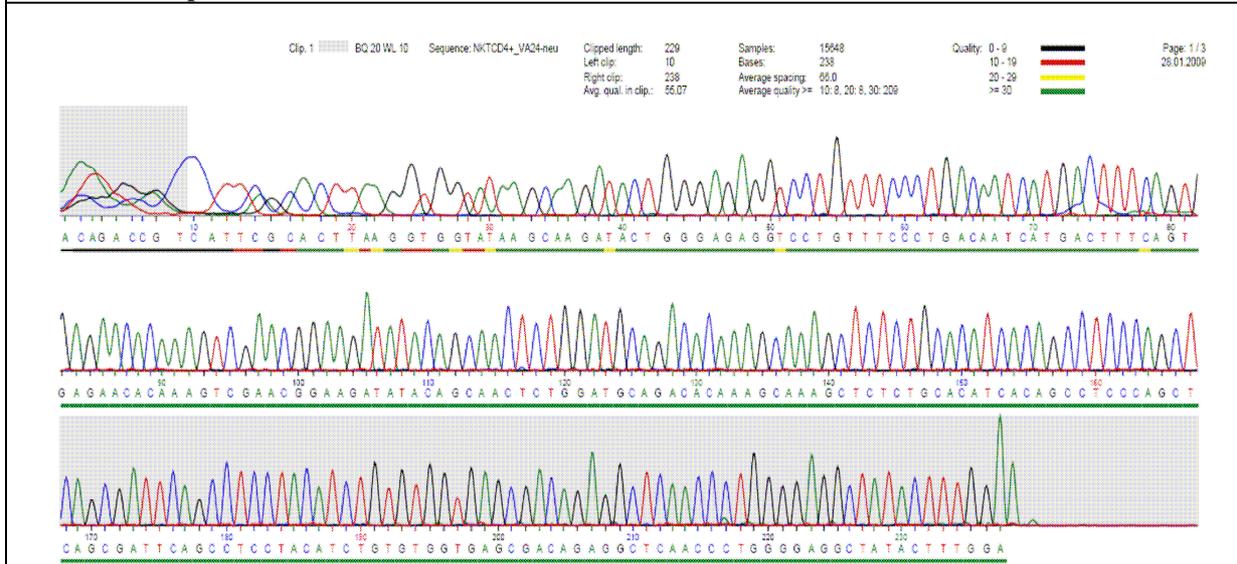
Anhang

- abortion with and without history of recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 42:355-360.
118. **Zeng D, Liu Y, Sidobre S, Kronenberg M, Strober S.** 2003. Activation of natural killer T cells in NZB/W mice induces Th1-type immune responses exacerbating lupus. *J Clin Invest* 112:1211-1222.

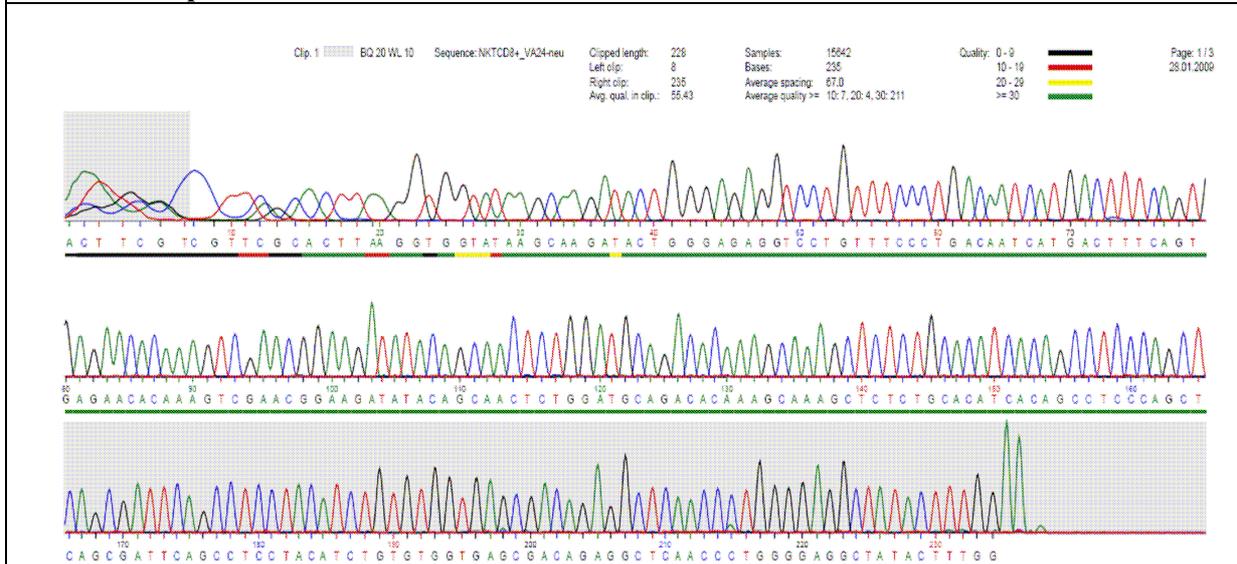
7.4 Chromatogramme



Erwachsener Spender 1: DN

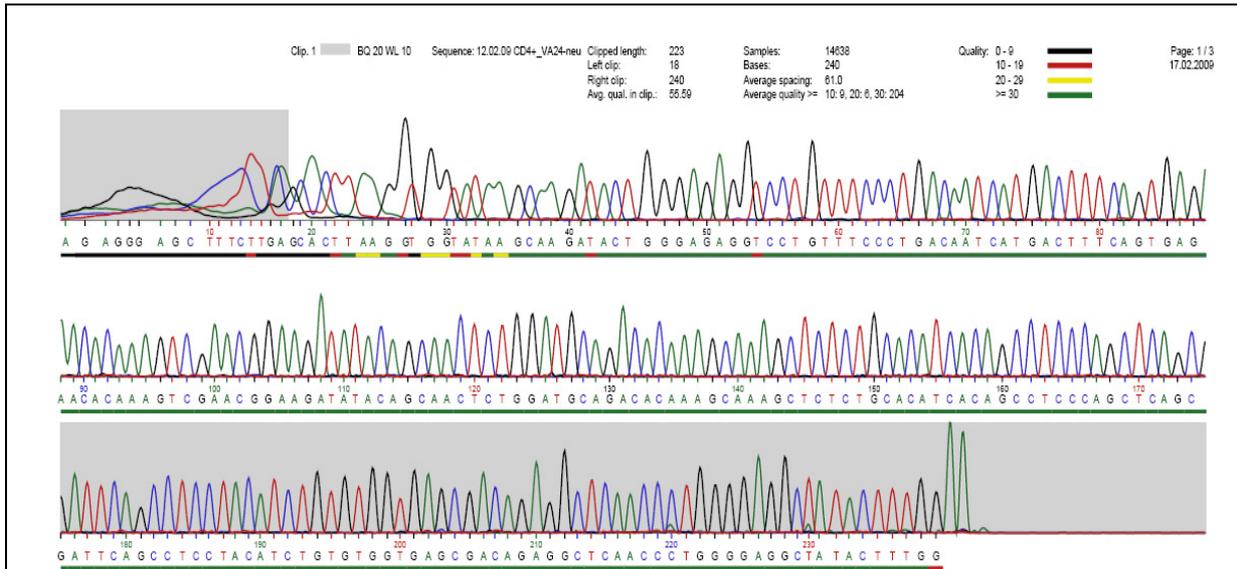


Erwachsener Spender 1: CD4⁺

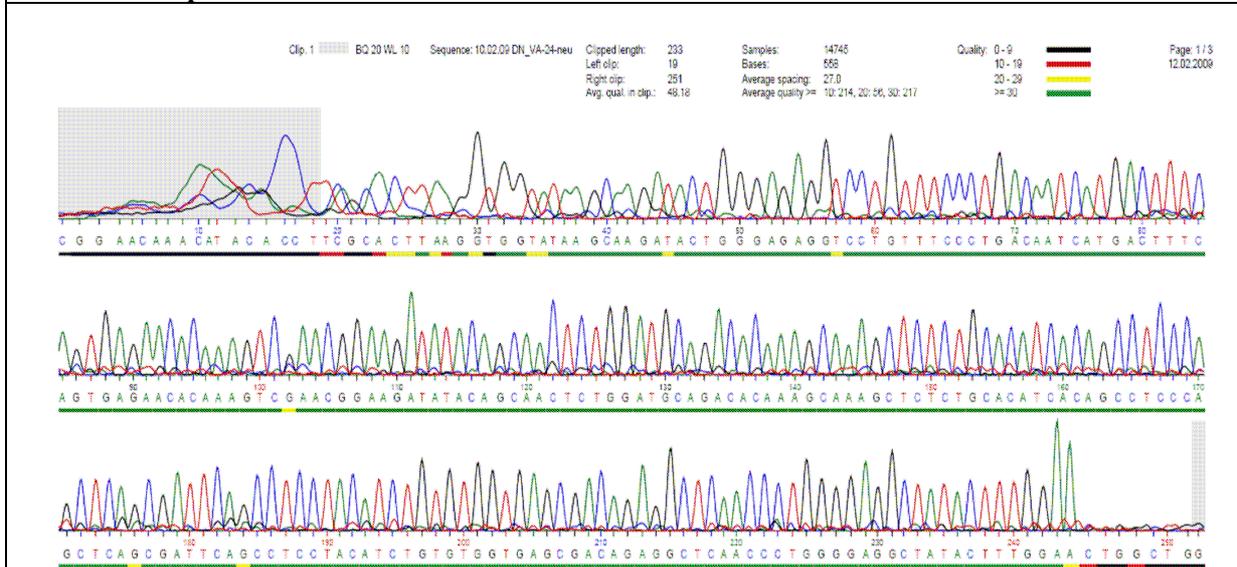


Erwachsener Spender 1: CD8⁺

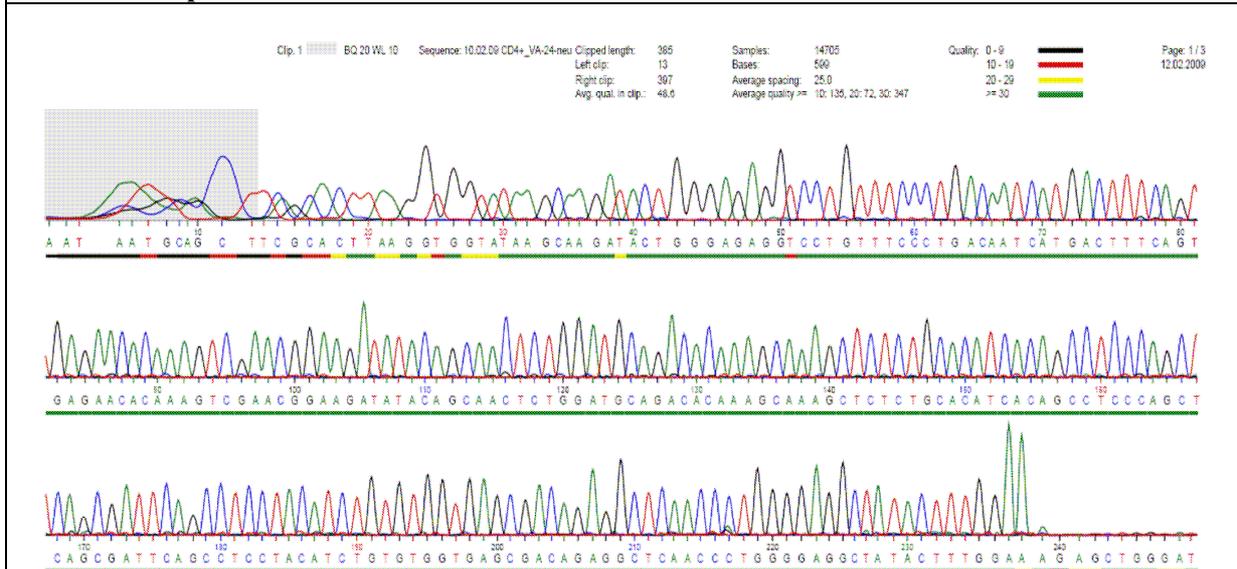
Anhang



Erwachsener Spender 2: CD4⁺

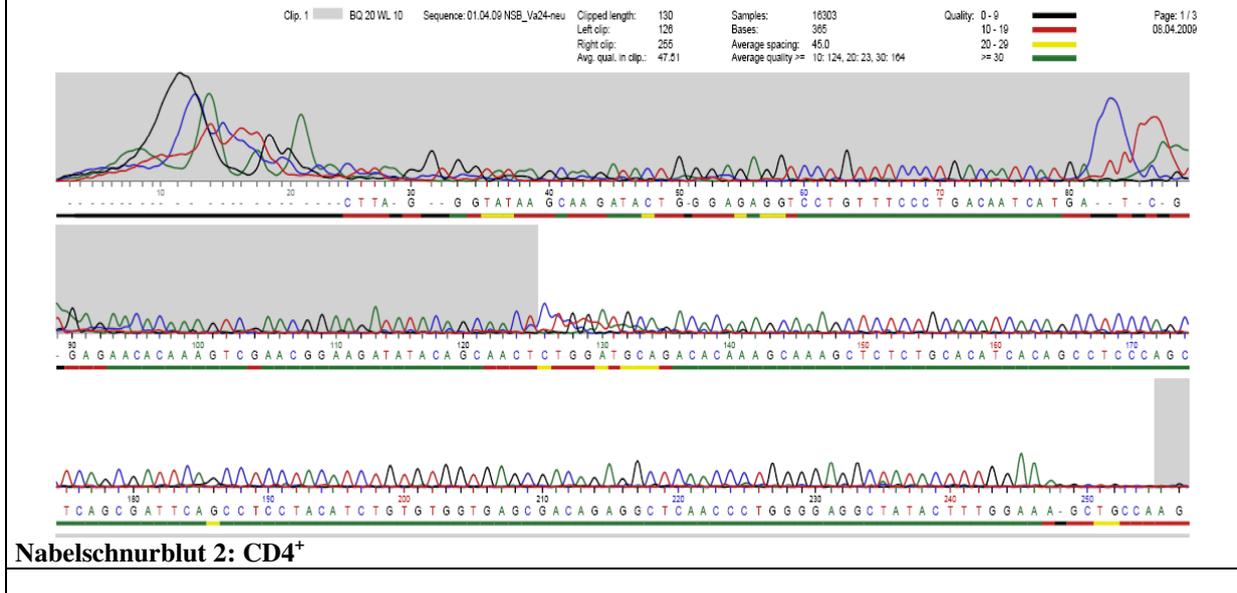
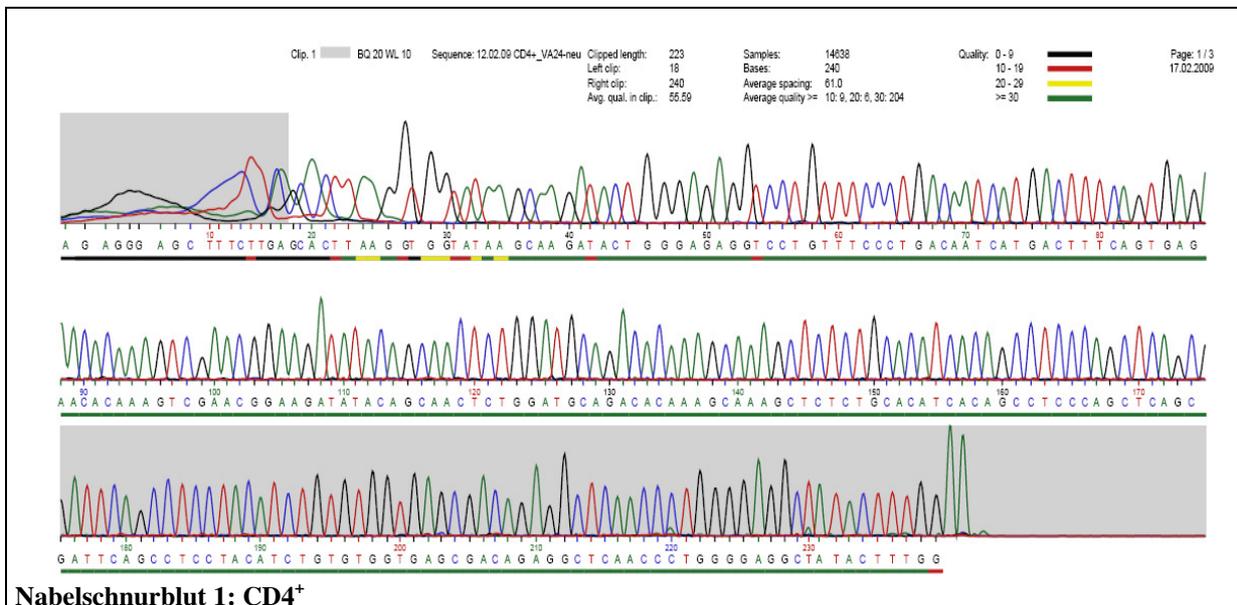
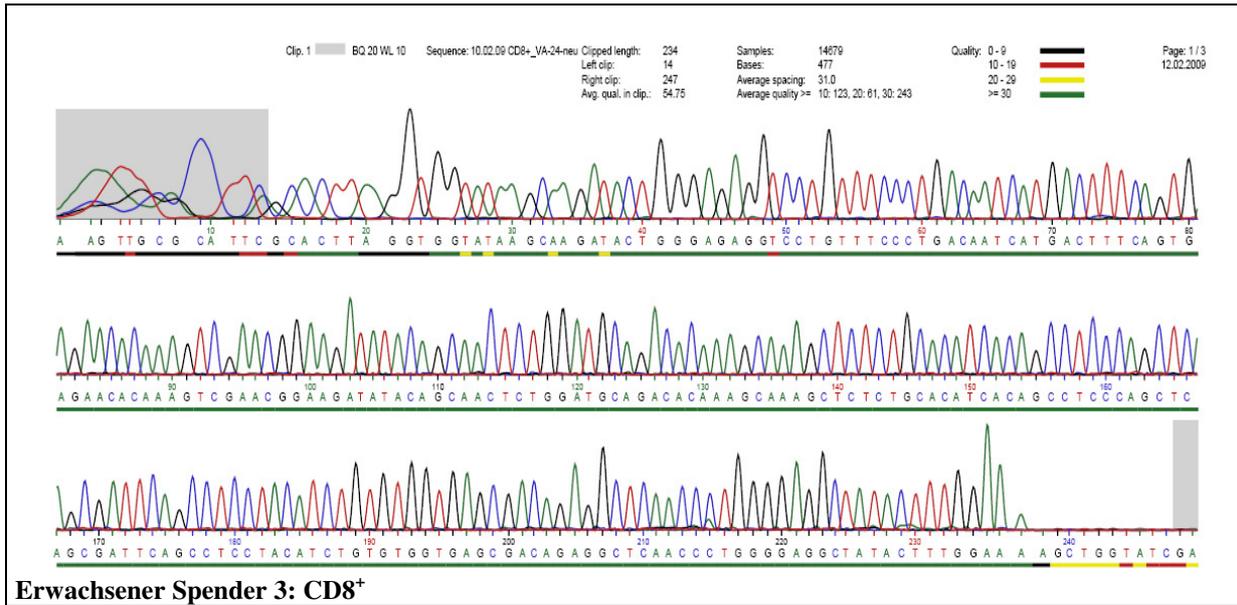


Erwachsener Spender 3: DN

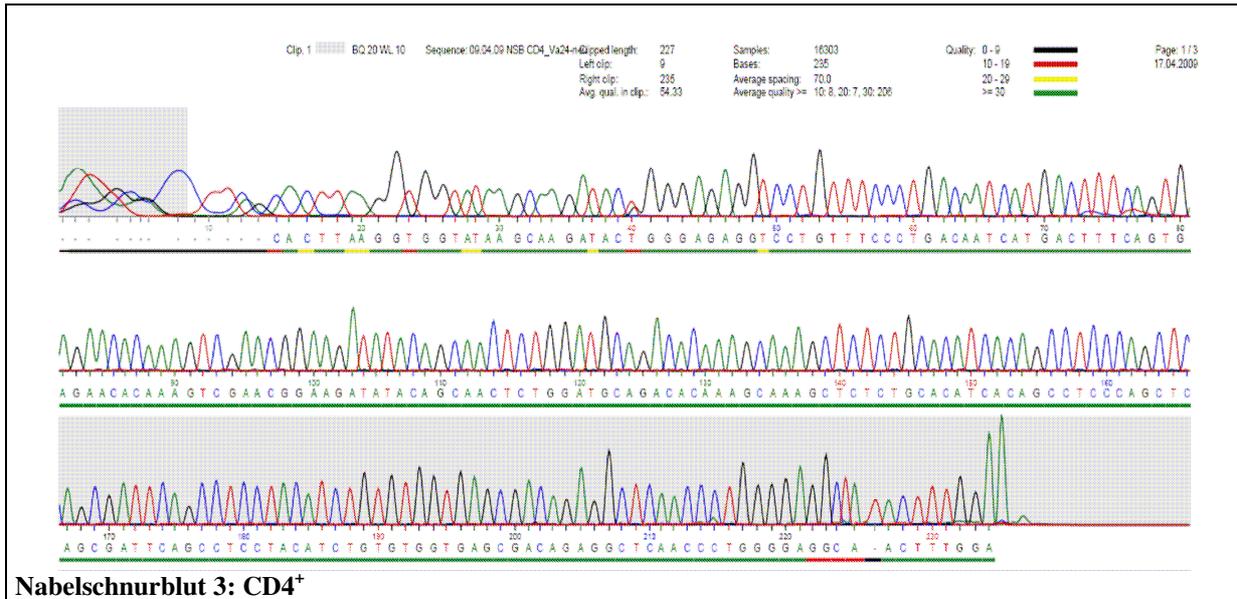


Erwachsener Spender 3: CD4⁺

Anhang

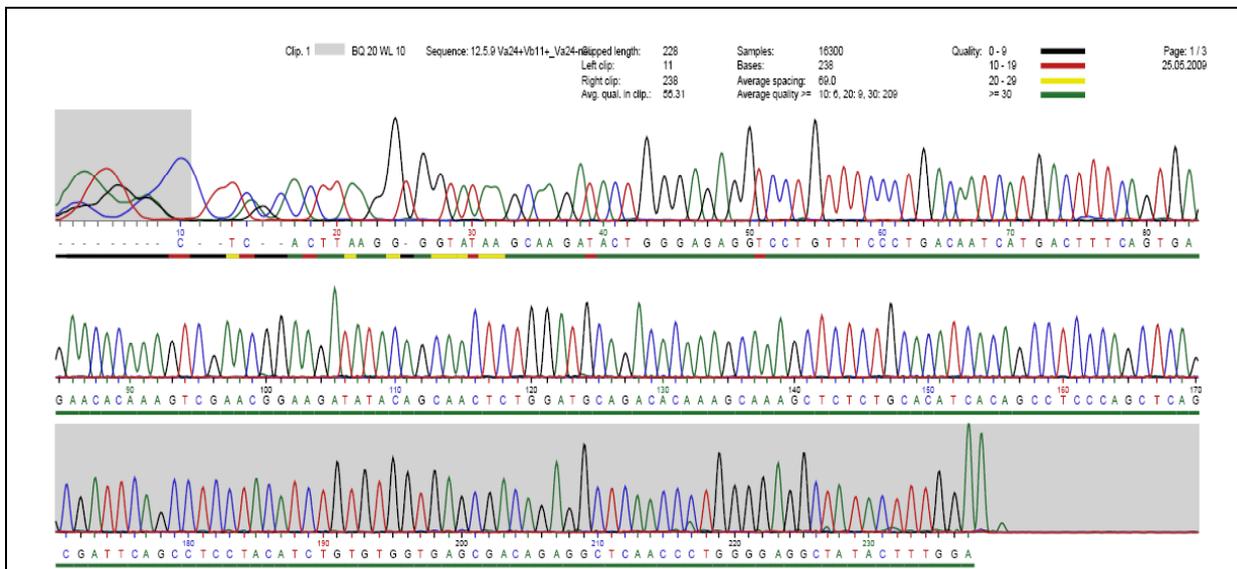


Anhang

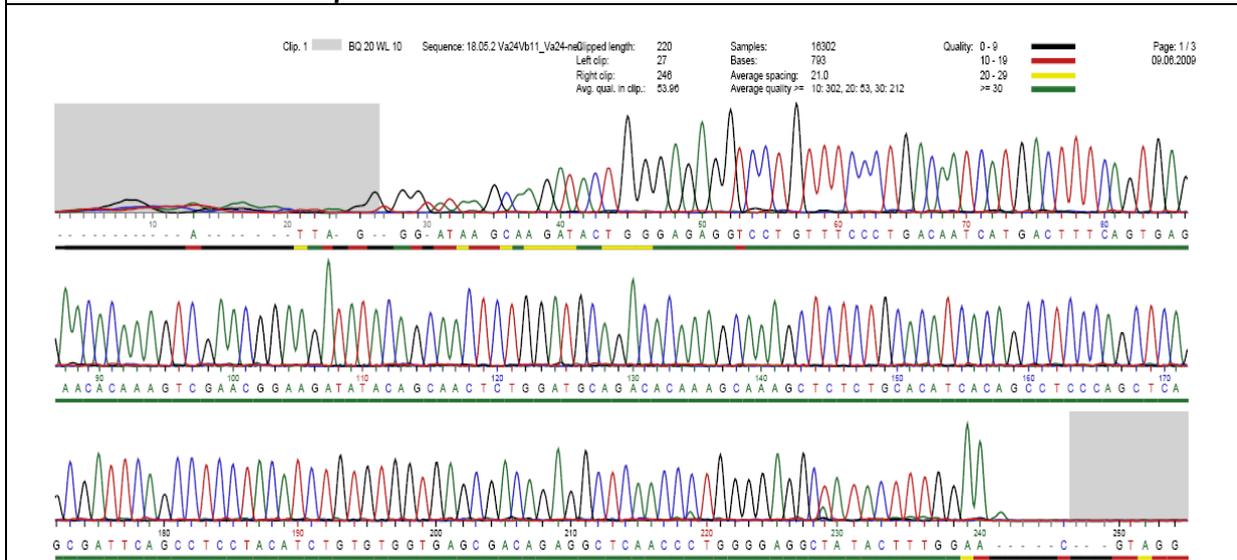


Nabelschnurblut 3: CD4⁺

Chromatogramme der Sequenzen des T-Zellrezeptors bei fetalen NKT-Zellen

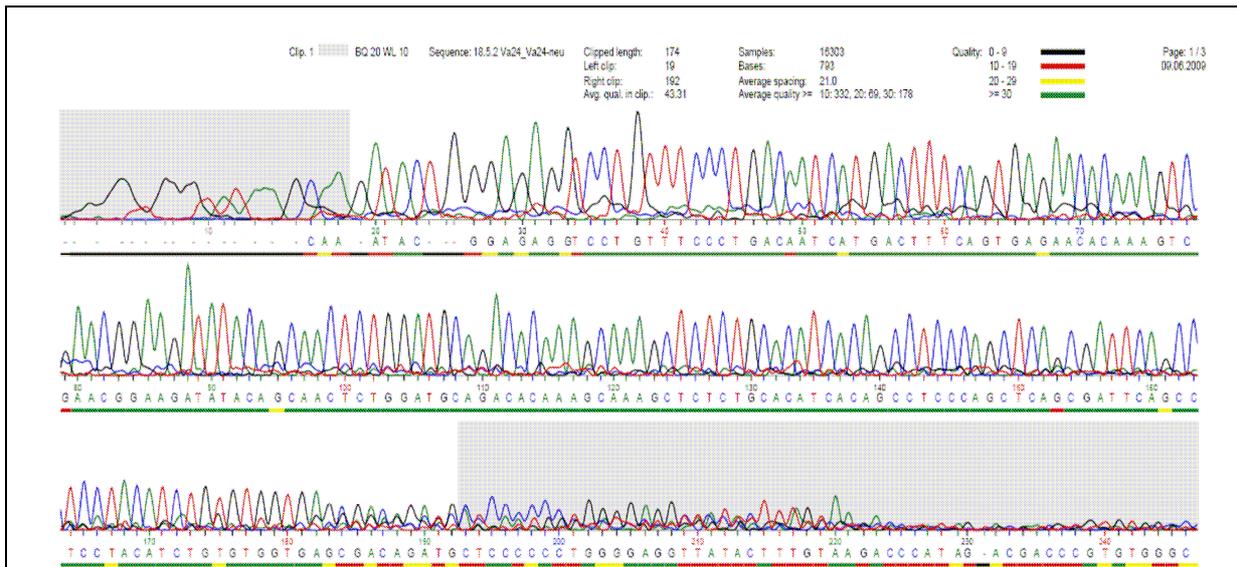


Nabelschnurblut 4: Va24⁺Vb11⁺

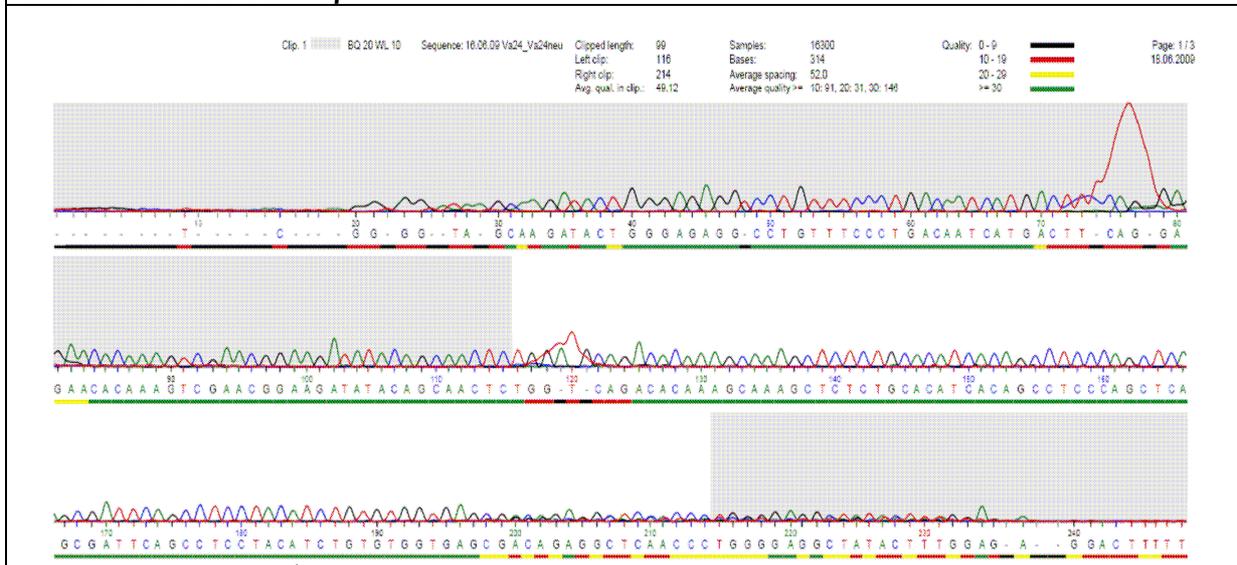


Nabelschnurblut 5: Va24⁺Vb11⁺

Anhang

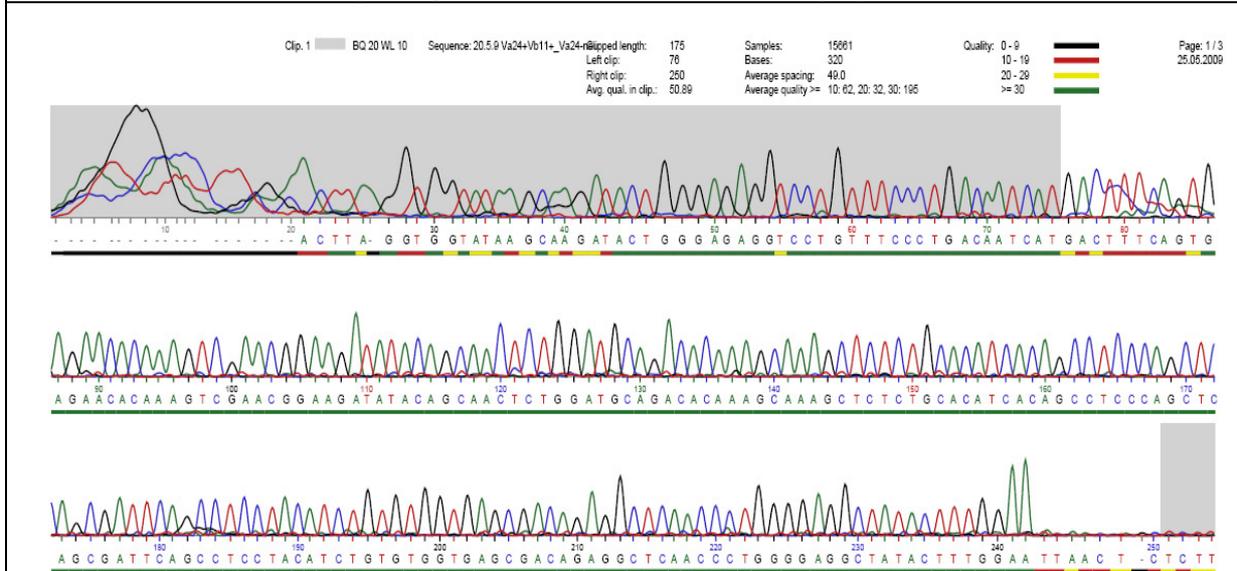


Nabelschnurblut 5: Va24⁺Vβ11⁻



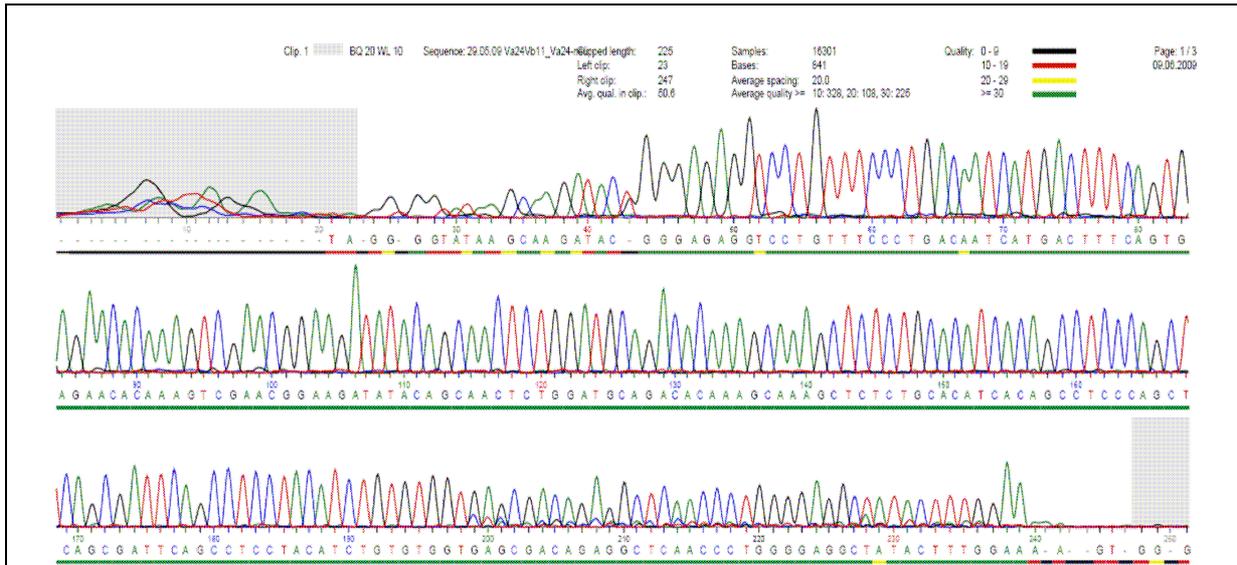
Wiederholung der Va24⁺Vβ11⁻ Probe von Nabelschnurblut 5

Auch hier Abbruch der eindeutigen Sequenz am Ende von Va24 zum Übergang Ja18

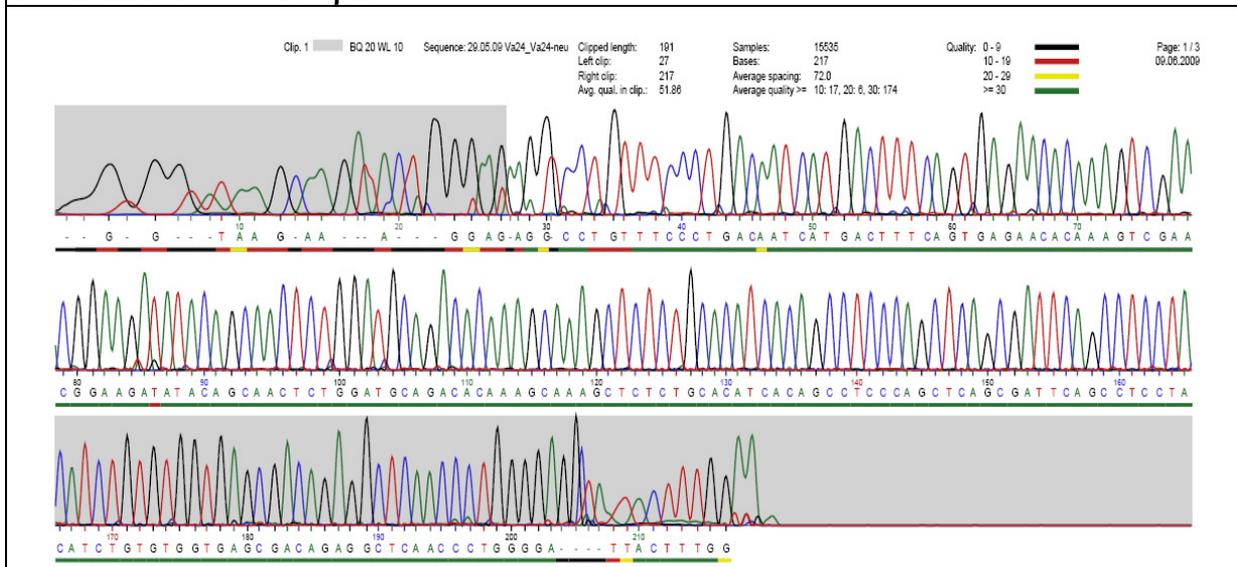


Nabelschnurblut 6: Va24⁺Vβ11⁺ (nicht in Ergebnisse einbezogen, da IgA >5mg/dl)

Anhang



Nabelschnurblut 7: Va24⁺Vβ11⁺



Nabelschnurblut 7: Va24⁺Vβ11⁻

Chromatogramme bei Va24⁺Vβ11⁺ versus Va24⁺Vβ11⁻ Zellen

7.5 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann, die mir das Thema für meine Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat und mir damit ermöglicht hat wissenschaftliches Arbeiten anhand einer interessanten Thematik zu erlernen und mich in allen Hochs und Tiefs während der experimentellen Phase und beim Schreiben meiner Doktorarbeit unterstützte.

Ohne meine Mitdoktorandinnen Nikola Schulz, Inge Müller, Tatiana Binder, Rodica Bernatowicz und Barbara Berschneider hätte ich niemals die Methoden der experimentellen Laborarbeit erlernen können. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite, wenn ein Problem auftauchte und halfen mir mit konstruktiven Ideen weiter.

Bedanken möchte ich mich auch bei den Medizinisch Technischen Angestellten unserer Arbeitsgruppe, Conny Dalibor und Gaby Heilig. Conny führte mich in die Methode der $V\alpha 24J\alpha 18$ PCR ein, erklärte mir die Anwendung aller Laborgeräte und war immer bereit auch zu Unzeiten mit mir an meinen Versuchen zu arbeiten.

Großer Dank gebührt auch Prof. Dr. Busch vom Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene am Klinikum Rechts der Isar, der meine Arbeit von Beginn an unterstützte und den Kontakt zum Sorterlabor des Instituts ermöglichte. Dr. Matthias Schiemann und seinen Mitarbeiterinnen Katleen Götsch und Lynette Henkel danke ich für die Hilfe bei der Planung meiner Versuche und die große Flexibilität bei der Terminplanung, die es möglich machte, dass ich immer kurzfristig zum Sorter kommen konnte, wenn ich frische Nabelschnurblutproben erhalten hatte.

Einen wesentlichen Beitrag zum Gelingen meiner Arbeit leisteten alle, die mir Nabelschnurblutproben von gesunden Neugeborenen zur Verfügung stellten. Mein besonderer Dank gilt hierbei Frau Dr. Schiessl, Dr. Fabienne Faber und den Hebammen der Frauenklinik der LMU München, die mich bei der Gewinnung von Nabelschnurblut zu jeder Tages- und Nachtzeit unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, für alles!