

**Aus dem Institut für Neuroimmunologie der Universität München
Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld**

**Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bei
der Polymyositis:
Untersuchungen mit Hilfe der
Technik des CDR3-Spectratyping**

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

vorgelegt von
Solveigh Charlotte Wiesener
aus Ruit auf den Fildern
2003

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Reinhard Hohlfeld

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Brocker
Priv. Doz. Dr. med. Hans Lochmüller

Mitbetreuung durch einen
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Norbert Goebels

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 2003

A	Inhaltsverzeichnis	I
1	Einführung	1
1.1	Aufbau und Funktion des T-Zell-Rezeptors	1
1.1.1	Das Immunsystem.....	1
1.1.2	T-Lymphozyten.....	2
1.1.3	Der T-Zell-Rezeptor.....	4
1.1.4	Die klonale Expansion einer T-Zelle.....	7
1.1.5	Autoreaktive T-Zellen.....	7
1.2	Die Polymyositis	8
1.2.1	Histologie.....	8
1.2.2	Klinische Symptome der Polymyositis.....	9
1.3	Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bei der Polymyositis	11
2	Material und Methoden	15
2.1	CDR (Complementarity-determining region) 3–Spectratyping	15
2.1.1	Die Identifikation klonal expandierter T-Zell-Populationen.....	17
2.1.2	Aufbau des T-Zell-Rezeptors.....	17
2.1.3	Familien-PCR.....	19
2.1.4	Fragment-Analyse.....	20
2.2	Durchführung der Versuche	24
2.2.1	Gewinnung und Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial: Muskelgewebe von Polymyositis-Patienten.....	24
2.2.2	Gewinnung und Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial: Peripher-venöse Blutlymphozyten.....	24
2.2.3	Präparation der Gesamt-RNA (Ribonukleinsäure).....	25
2.2.4	Erstellung von cDNA (complementäre Desoxyribonukleinsäure) mittels reverser Transkription.....	26
2.2.5	PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion).....	26

2.2.6	Fragment-Analyse der PCR-Produkte: „CDR3-Spectratyping“.....	30
2.2.7	Sequenzierung der CDR3-Region von expandierten T-Zell-Klonen.....	31
2.2.8	Immunhistochemie: Fluoreszenzfärbung.....	33
2.2.9	HLA (Humanes-Leukozyten-Antigen) –Typisierung.....	34
2.3	Materialien.....	35
2.4	Geräte.....	40
3	Experimente und Ergebnisse	43
3.1	Die Technik des CDR3-Spectratyping.....	46
3.2	Ergebnisse bei der Polymyositis.....	55
3.2.1	Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire in der Muskelbiopsie.....	55
3.2.1.1	Semi-quantitative Untersuchungen.....	55
3.2.1.2	Qualitative Untersuchungen.....	59
3.2.2	Vergleich der Ergebnisse von Muskelbiopsie und Blut.....	65
3.2.3	Veränderungen im CDR3-Spectratyping unter Therapie.....	68
3.2.4	Immunhistochemie.....	73
3.2.5	HLA-Typisierung.....	77
3.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	77
4	Diskussion	79
4.1	Diskussion der Methode.....	79
4.2	Untersuchungsergebnisse bei der Polymyositis.....	82
4.3	Weiterführende Versuche.....	85
5	Zusammenfassung	89
B	Anhang	III
C	Abkürzungsverzeichnis	V
D	Literaturverzeichnis	VII
E	Abbildungsverzeichnis	XIII

Kapitel 1

Einführung

1.1 Aufbau und Funktion des T-Zell-Rezeptors

1.1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem des Menschen besteht aus zahlreichen Komponenten, die unterschiedliche Aufgaben erfüllen und in komplexer Art und Weise zusammenarbeiten. Der Organismus soll vor schädlichen Einflüssen von Fremdkörpern (Viren, Bakterien, Pilzen und Protozoen) sowie des eigenen Körpers (Tumorzellen) geschützt werden. Für eine optimale Funktion muß das Abwehrsystem bestimmte Eigenschaften besitzen: Spezifität, Sensitivität, Diversität, die Fähigkeit zur Gedächtnisbildung, Autoregulation und Unterscheidung zwischen Fremd und Selbst. Diese Aufgaben werden von den verschiedenen Komponenten übernommen, die in einen unspezifischen und einen spezifischen sowie einen humoralen und einen zellulären Anteil unterschieden werden können. Der unspezifische, humorale Anteil besteht aus dem Komplementsystem, der unspezifische, zelluläre Anteil aus Makrophagen und Granulozyten. Zur Einheit der spezifischen, humoralen Abwehr gehören die Antikörper, zur spezifischen, zellulären Abwehr die B- und T-Lymphozyten [Roitt et al. 1988]. Die Spezifität der T-Zellen ist definiert durch ihren Rezeptor, mit dem potentielle Antigene spezifisch erkannt werden. [Acuto et al. 1985]

1.1.2 T-Lymphozyten

Die Vorläufer der T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark aus Stammzellen und wandern in den Thymus ein, wo sie reifen und sich hauptsächlich zu zwei Subpopulationen weiterentwickeln: den T-Helfer-Zellen und den zytotoxischen T-Zellen. Außerdem sollen im Thymus funktionsunfähige und autoreaktive T-Zellen aussortiert werden.

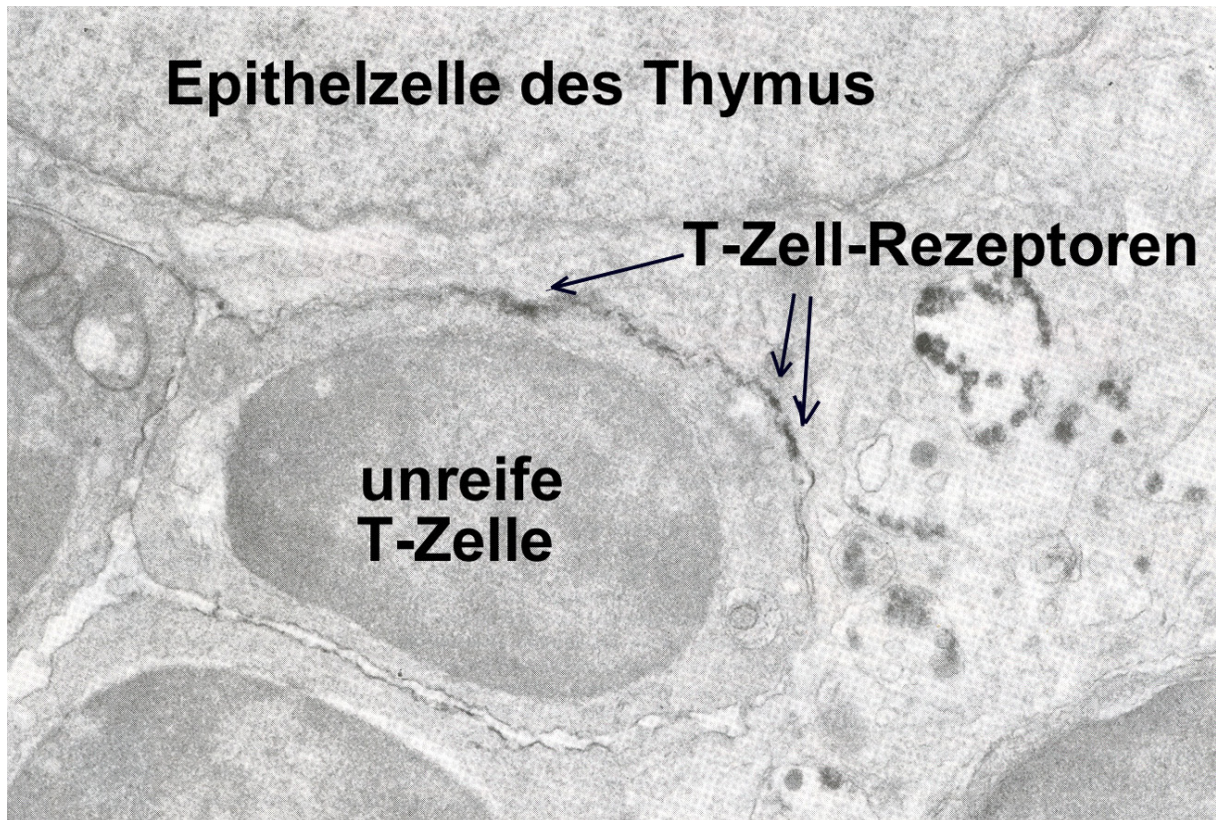


Abb 1: *Bindung einer T-Zelle im Thymus*

20900-fache Vergrößerung einer unreifen T-Zelle, die sich an eine Epithelzelle des Thymus gebunden hat. Die dunkel erscheinenden Bindungsstellen sind Rezeptormoleküle. Sie haben sich wahrscheinlich an Proteine auf der Epithelzelle geheftet, die diese als „selbst“ auszeichnen. Codiert werden die Proteine von einem als Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC) bezeichneten Bereich der DNA. Die Bindung regt möglicherweise zur Reifung an. Ausgereifte T-Zellen haben zwar eine geringe Affinität zu „Selbst“-MHC-Proteinen, zeigen aber eine hohe Affinität zu solchen Proteinen, wenn diese mit Antigenen assoziiert sind. T-Zellen lösen eine Immunreaktion normalerweise nur gegen infizierte „Selbst“-Zellen oder gegen „Fremd“-Zellen transplanteder Gewebe aus. [Marrack et al. 1994]

Die Aufgabe der T-Helfer-Zellen besteht in der Aktivierung von T- und B-Lymphozyten, in der Makrophagenaktivierung und der Unterhaltung einer Entzündungsreaktion. Sie erfüllen diese Aufgabe über die Sekretion von Zytokinen. Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie ein Protein, welches nach der „Cluster of differentiation“-Nomenklatur CD4 genannt wird. Zytotoxische T-Zellen lysieren die Zielzellen direkt. Sie sind durch den Oberflächenmarker CD8 charakterisiert. Die Oberflächenproteine CD4 und CD8 sind Ko-Rezeptoren des T-Zell-Rezeptors.

Sowohl $CD4^+$ als auch $CD8^+$ T-Zellen erkennen nur Peptidantigene, die bereits an ein Oberflächenprotein einer anderen körpereigenen Zelle gebunden sind. Dieses Oberflächenprotein wird „major histocompatibility complex“ (MHC, bzw. Haupthistokompatibilitätskomplex) genannt. Es wird in zwei Gruppen unterteilt:

MHC-Moleküle der Klasse I werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert, sie präsentieren gegenüber $CD8^+$ T-Zellen normalerweise Peptide, die von der Zelle selbst synthetisiert wurden. Dagegen sind MHC-Moleküle der Klasse II normalerweise nur auf professionellen Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen und B-Zellen vorhanden, ihr Auftreten kann aber auch auf vielen anderen Zellen (z.B. Myoblasten) durch Einwirkung von Zytokinen induziert werden. MHC Klasse II Moleküle präsentieren extrazelluläre Peptide gegenüber $CD4^+$ T-Zellen.

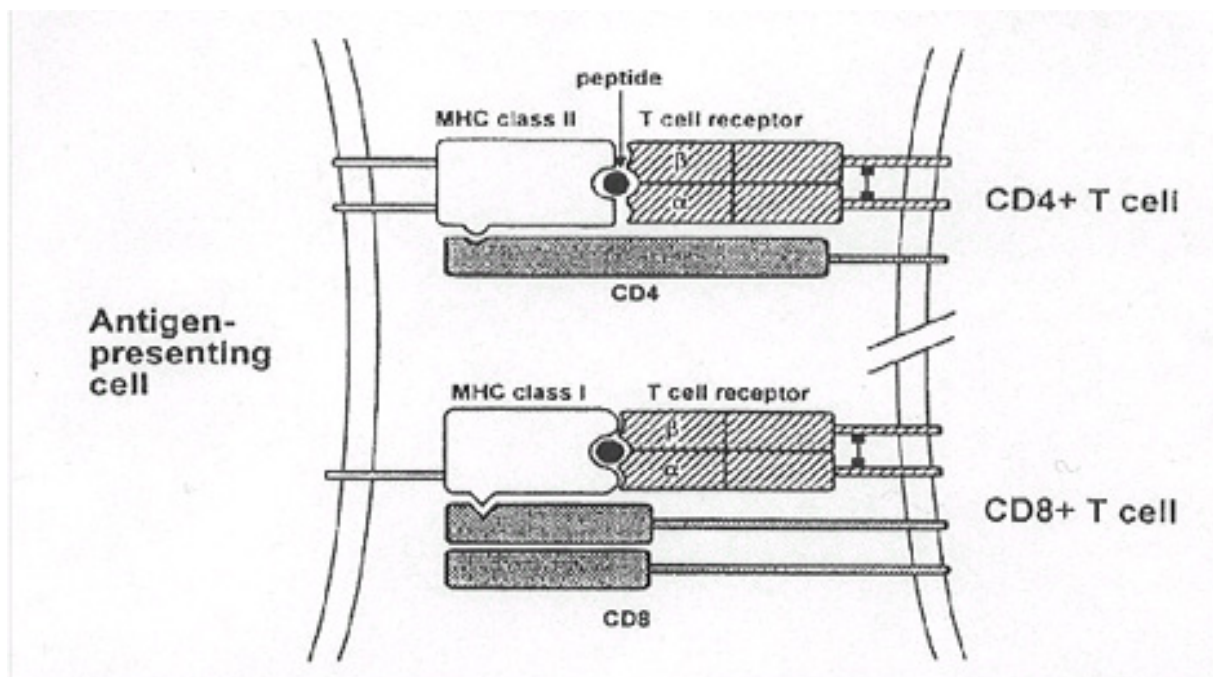


Abb. 2: Die Antigen-TZR-Bindung

Die Antigen-TZR-Bindung: Das Antigen-Peptid wird von $CD4^+$ T-Zellen nur erkannt, wenn es durch MHC-Klasse II Moleküle auf der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zellen APC (z.B. Makrophagen) präsentiert wird. $CD8^+$ T-Zellen erkennen „Fremd“-Peptide, wenn sie an MHC Klasse I Moleküle der APC gebunden sind.

[Hohlfeld et al. 1997]

Die T-Zelle kann nur mit der passenden allelen Form des MHC-Moleküls interagieren. Dieses Phänomen wird MHC-Restriktion der T-Zell-Erkennung genannt. Die genetische Information für die MHC-Moleküle befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom Nr. 6, für Klasse I-Moleküle kodieren die Gen-Loci HLA-A, HLA-B und HLA-C, für Klasse II-Moleküle die Loci HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. Es existieren zahlreiche Allele für jeden Genlocus, wodurch eine extrem große Variabilität zustandekommt und somit die Vielfalt an existierenden Antigenen durch MHC-Moleküle präsentiert werden kann. ([Janeway et al. 1997] Kapitel 4:1)

1.1.3 Der T-Zell-Rezeptor

Die T-Zelle als Teil des Abwehrsystems des Körpers ist durch ihren speziellen Rezeptor definiert. Mit seiner Hilfe werden Antigene erkannt und nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“ gebunden. Dies führt durch Induktion einer primär zellvermittelten Entzündungsreaktion zur Zerstörung der gebundenen Zielzellen.

Der T-Zell-Rezeptor ist ein Heterodimer aus zwei transmembranen Glykoproteinketten, der α - und der β -Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Beide Ketten bestehen aus einer konstanten Domäne, die für die Verankerung in der Zelle zuständig ist, einer variablen Domäne, die mit dem MHC-Molekül interagiert und einer hypervariablen Region, die das Antigen erkennt. Zudem wurde ein alternativer Typ eines T-Zell-Rezeptors beschrieben, der aus sogenannten δ - und γ -Ketten aufgebaut ist. Seine Funktion konnte bisher nicht in allen Einzelheiten geklärt werden. [Janeway et al. 1988]

Die Signalübermittlung einer Antigenbindung in das Zellinnere geschieht mit Hilfe von drei transmembranen Polypeptidketten (CD3 ϵ , CD3 δ , CD3 γ) und einem Homodimer aus ζ -Ketten. Dieser Komplex ist räumlich assoziiert mit dem TZR und leitet das Signal der Rezeptorstimulation über Tyrosin-Kinasen weiter. Das CD3-Protein ist weiterhin notwendig für die Expression des TZR auf der Zelloberfläche und ist ein Markermolekül für T-Zellen [Samelson et al. 1986].

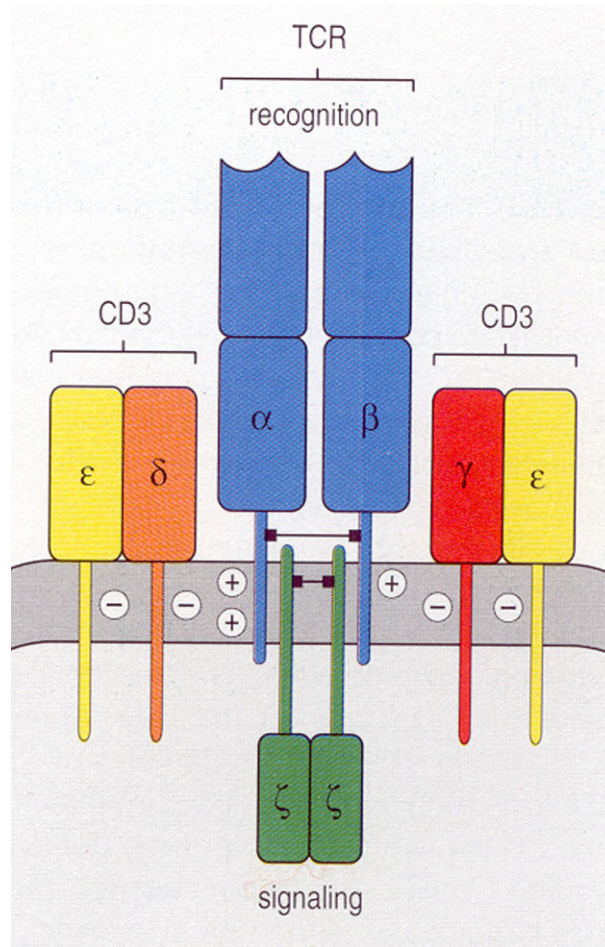


Abb. 3: *Signaltransduktion des TZR*

Der T-Zell-Rezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette, die über Disulfid-Brücken verbunden sind. Er ist für die Antigenerkennung verantwortlich und sitzt an der Oberfläche der T-Zelle. Der T-Zell-Rezeptor ist assoziiert mit dem sog. CD3-Komplex, vier Peptid-Ketten. Seine Funktion ist in Kombination mit der ζ -Kette (einem Disulfidverknüpften Dimer) die Signalisierung ans Zellinnere, daß eine Antigenbindung stattgefunden hat. Diese Aufgabe wird durch Tyrosin-Kinasen geleistet. ([Janeway et al. 1997] Kapitel 4:39)

Auf der Ebene der genetischen Codierung des T-Zell-Rezeptors existieren einige Besonderheiten, die für die große Vielfalt an unterschiedlichen Rezeptoren verantwortlich sind: Die somatische Rekombination von Gensegmenten, das enzymatische Einfügen von Nukleotiden zwischen die Gensegmente und die Kombination einer α - mit einer β -Kette.

In der Keimbahn des Menschen existieren für die verschiedenen Bausteine des Rezeptors eine Vielzahl an möglichen Gensegmenten (V-, D-, J- und C-Region). Während

der Reifung der T-Zellen wird nach dem Zufallsprinzip je eine Möglichkeit ausgewählt und die Bausteine miteinander kombiniert. Im Falle der α -Kette liegt die genetische Information auf Chromosom 14 und besteht aus 46 Varianten (aufgrund von Sequenzhomologien in 18

Familien zusammengefasst) für die „Variable Region“, 61 für die „Joining Region“ und einem Gensegment für die „Constant Region“. Chromosom 7 birgt den genetischen Code für die β -Kette mit 48 Segmenten der „Variable Region“ (aufgrund von Sequenzhomologien zu 26 Familien zusammengefasst), 2 der „Diversity Region“ (in der α -Kette nicht vorhanden), 13 der „Joining Region“ und 2 der „Constant Region“ [Rowen et al. 1996] [Lefranc et al. 2001].

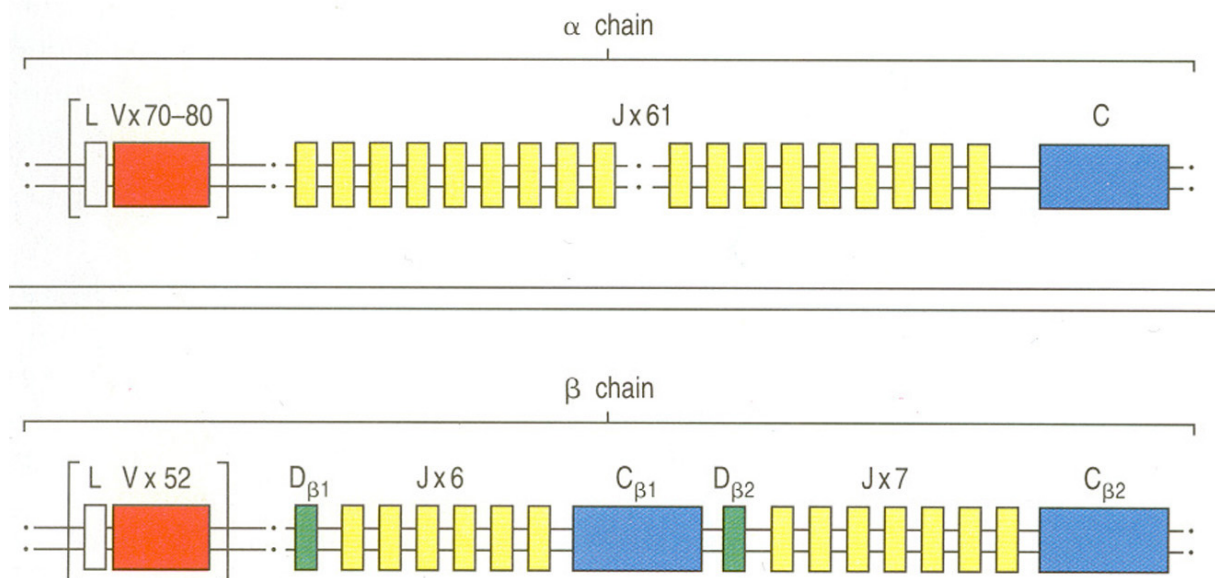


Abb. 4: *Die genetische Organisation der α - und β -Kette am Beispiel der Maus*

Hier besteht das Genom der α -Kette aus 70-80 unterschiedlichen Segmenten, jedes besteht aus einem Exon, welches für eine Möglichkeit der „Variable“ Region codiert. Diesem Exon ist eine „Leader Sequence“ L vorangestellt, die für den Transport des Proteins an die Zelloberfläche verantwortlich ist. Der genetische Code für die weiteren Teile der α -Kette („Joining“- und „Constant“-Region) ist auf separaten Exons untergebracht. In der Keimbahn sind die Gen-Segmente linear angeordnet. Diese Anordnung ist auf die β -Kette übertragbar. ([Janeway et al. 1997] Kapitel 4:35)

Zwischen die genomisch kodierten V-, D- und J-Segmente werden nicht im Genom kodierte Nukleotide enzymatisch eingefügt, in Art und Anzahl rein zufällig angeordnet. Die exprimierten α - und β -Polypeptidketten werden schließlich nach dem Zufallsprinzip miteinander kombiniert.

So entsteht ein Repertoire an möglichen T-Zell-Rezeptoren mit ca. 10^{16} Kombinationen. Diese große Variabilität der spezifischen T-Zell-Rezeptoren sorgt dafür, daß eine praktisch unbegrenzte Vielfalt von potentiell auftretenden MHC-Antigen-Komplexen erkannt werden kann. ([Janeway et al. 1997] Kapitel 4) [Davis 1990]

1.1.4 Die klonale Expansion einer T-Zelle

Um bei einer Konfrontation des Immunsystems mit potentiell schädlichen Antigenen adäquat reagieren zu können, muß die passende T-Zelle in angemessener Anzahl vorliegen. Die gezielte Vermehrung der spezifischen T-Zellen findet als klonale Expansion statt: Das Zusammentreffen von Antigen-präsentierender Zelle (APC) mit korrespondierendem T-Zell-Rezeptor und Antigen führt über ein komplexes Zusammenspiel der Zellen zur Vervielfältigung der reaktiven T-Zell-Klone. Hierbei muß der Antigen-MHC-Komplex der APC vom TZR erkannt werden und die Stimulation von Rezeptoren auf der T-Zelle (z.B. B 7.1-2) sowie die Sekretion von Zytokinen (z.B. IL-2, $TNF\alpha$, $IFN-\gamma$) führt zur Induktion der klonalen Expansion dieser T-Zelle. ([Janeway et al. 1997] Kapitel 1:13)

1.1.5 Autoreaktive T-Zellen

Als Folge der großen Diversität des nach dem Zufallsprinzip generierten T-Zell-Rezeptor-Repertoires ergibt sich die Gefahr, daß auch T-Zellen entstehen, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind. Diese Zellen werden während der Reifung im Thymus aussortiert und vernichtet. Das gleiche geschieht mit T-Zellen, die nicht an körpereigenes MHC binden können und daher nutzlos sind. Auf diese Weise werden ca. 98% der initial gebildeten T-Zellen eliminiert. [Scollay et al. 1980]

Trotzdem entkommen einige autoreaktive T-Zellen dieser negativen Selektion im Thymus und gelangen nach Abschluß ihrer Reifung von dort in die systemische Zirkulation. Allerdings benötigen diese T-Zellen zur Aktivierung und Proliferation eine Ko-Stimulation über Moleküle, die in peripherem Gewebe physiologischerweise nicht vorkommen.

Ein Versagen der geschilderten Schutzmechanismen kann zu einem immunologischen Angriff gegen körpereigene Strukturen und damit zu einer Autoimmunerkrankung führen [Engel et al. 1994]. Die Ursachen hierfür sind in den meisten Fällen unbekannt. Es werden verschiedene Faktoren als Krankheitsauslöser vermutet: Genetische Einflüsse, Umweltbedingungen und Infektionen. Krankheitserreger können die Antigenität körpereigenen Gewebes verändern oder im Sinne eines „Molecular Mimikry“ funktionieren.

1.2 Die Polymyositis

Hinsichtlich Inzidenz, Klinik, Verlaufsform und histologischer Kriterien können verschiedene Formen entzündlicher Muskelerkrankungen unterschieden werden, wozu die Polymyositis, die Dermatomyositis und die Einschlußkörperchenmyositis gehören. Alle drei Formen sind durch „idiopathische“, d.h. ohne erkennbaren Auslöser beginnende Entzündungsreaktionen im Muskelgewebe gekennzeichnet. Bei der Dermatomyositis treten zusätzlich Hauteffloreszenzen auf. Für die Dermatomyositis und die Polymyositis konnte eine Assoziation der Erkrankung mit malignen Tumoren, Kollagenosen und verschiedenen Autoimmunerkrankungen aufgezeigt werden, was Hinweise auf ein systemisches Geschehen gibt [Dalakas et al. 1991].

1.2.1 Histologie

Kennzeichnend für die Polymyositis ist ein vorwiegend endomysiales entzündliches Infiltrat, das aus T-Lymphozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen besteht. Es können autoinvasive T-Zellen, die nicht-nekrotische Muskelfasern attackieren, von weiteren Zellen des Immunsystems unterschieden werden, die die ausgelöste Entzündungsreaktion aufrecht erhalten. Bei diesen autoinvasiven Zellen handelt es sich größtenteils um $CD8^+$ T-Lymphozyten. Ebenso besteht ein Unterschied in der räumlichen Anordnung der Lymphozyten: Einige befinden sich im Endomysium, andere umlagern gezielt Muskelfasern, greifen sie an und dringen in sie ein. Die Muskelzellen gehen schließlich zugrunde. [Engel et al. 1984, Engel et al. 1994]

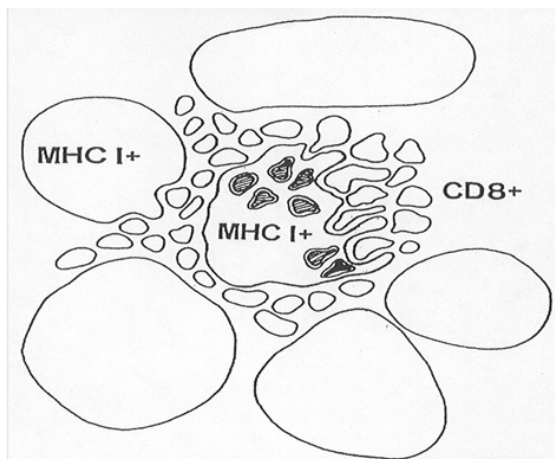


Abb. 5: Schematische Darstellung: Entzündetes Muskelgewebe (Polymyositis)
 $CD8^+$ T-Zellen lagern sich im Endomysium an, sie umzingeln nicht-nekrotische MHC-Klasse-I-Molekül⁺ Muskelfasern und infiltrieren sie. Schließlich geht die attackierte Muskelfaser zugrunde.
 [Hohlfeld et al. 1994]

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß invadierte Muskelfasern oder solche, die sich in deren Nähe befinden, MHC Klasse I Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren. MHC Klasse I Moleküle sind in gesundem Muskelgewebe normalerweise nicht nachweisbar [Engel et al. 1994].

Im Sinne der MHC-Restriktion erkennen CD8⁺ T-Lymphozyten Antigene, die von MHC Klasse I Molekülen dargeboten werden. Diese wiederum befinden sich auf kernhaltigen Zellen des Körpers und präsentieren endogen prozessiertes Protein, bei welchem es sich um einen viralen Bestandteil oder um körpereigenes Material handeln kann. Virale Zielantigene oder deren genetische Sequenzen konnten bisher nicht identifiziert werden [Leff et al. 1992]. Auslöser der Polymyositis ist wahrscheinlich ein bisher unbekanntes Selbstpeptid. Dieses wird von Muskelfasern gegenüber T-Lymphozyten als Antigen präsentiert, was zur Entzündungsreaktion und letztlich zum Untergang von Muskelgewebe führt [Goebels et al. 2000a].

1.2.2 Klinische Symptome der Polymyositis

Die Polymyositis (PM) ist eine seltene Erkrankung. Die Inzidenz der entzündlichen Muskelerkrankungen beträgt insgesamt etwa 1:100.000. Frauen sind doppelt so häufig von der Polymyositis betroffen wie Männer, der Altersgipfel liegt im fünften bis sechsten Lebensjahrzehnt [Dalakas 1991].

Wie bei vielen anderen Autoimmunkrankheiten zeigt sich eine Assoziation zwischen der Erkrankung an Polymyositis und bestimmter Haplotypen humaner Leukozyten-Antigene: HLA-B8, HLA-DR3 und HLA-B7, HLA-DRw52 kommen gehäuft vor [Dalakas 1991].

Bei bis zu 28% der an Polymyositis erkrankten Patienten ist zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ein maligner Tumor bekannt oder wird im weiteren Krankheitsverlauf diagnostiziert [Callen 1988].

Die Symptome der Polymyositis entwickeln sich meistens über Wochen und Monate: Eine fortschreitende symmetrische Muskelschwäche im Bereich der Schultern und des Beckengürtels, teilweise assoziiert mit muskelkaterartigen Schmerzen. In schweren, fortgeschrittenen Stadien sind die Patienten auf den Rollstuhl angewiesen und können sich nicht mehr selbst versorgen. Schwäche der Schluck- und Atemmuskulatur kann lebensbedrohliche Komplikationen hervorrufen. Es sind auch generalisierte Formen beschrieben worden, bei denen Herz und Lunge mitbetroffen waren. Die Prognose verschlechtert sich bei gleichzeitigem Auftreten von Kollagenosen, einer sogenannten „Overlap“-Symptomatik [Dalakas 1991].

Im Rahmen der immunologischen Labordiagnostik lassen sich bei bis zu 30% der Patienten mit entzündlichen Muskelerkrankungen Antikörper gegen Autoantigene nachweisen. In den häufigsten Fällen sind sie gegen die Histidyl-tRNA-Synthetase gerichtet. Diese sogenannten Jo-1-Antikörper treten bei ca. 50% der Patienten mit Lungenbeteiligung auf [Dalakas 1991]. Ein Anstieg der Serum-Kreatinkinase, ausgelöst durch den Zerfall von Muskelgewebe, stellt ein wichtiges diagnostisches Kriterium dar und wird zur Kontrolle des Krankheitsverlaufes

benutzt. Die Elektromyographie zeigt meist ein myopathisches Muster, bei florider Entzündung auch pathologische Spontanaktivität. Das wichtigste differentialdiagnostische Kriterium ist allerdings die histologische und immunhistochemische Beurteilung der Muskelbiopsie.

Eine kausale Therapie der Polymyositis ist bislang nicht möglich, da die Ursache der Entzündungsreaktion unbekannt ist. Um die Immunreaktion einzudämmen, die für die Schädigung körpereigenen Muskelgewebes verantwortlich ist, werden im akuten Stadium mehrere Wochen Kortikosteroide hochdosiert verabreicht. Da häufig eine Langzeit-Immunsuppression erforderlich ist, wird die Therapie mit Azathioprin fortgesetzt und die Steroide reduziert. Medikamente der zweiten Wahl sind Methotrexat und Cyclosporin A [Goebels et al. 1998]. Hochdosierte, intravenös gegebene, polyklonale Immunglobuline kommen ebenfalls zum Einsatz. Cyclophosphamid ist schweren Krankheitsverläufen mit extramuskulärer Organmanifestation vorbehalten [Mastaglia et al. 1998, Dalakas 1998].

1.3 Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bei der Polymyositis

Die bisherigen Erkenntnisse über die Krankheit, sowie die Tatsache, daß der Ort der Entzündung auf einfache Weise morphologisch untersucht werden kann, macht die Polymyositis zu einem idealen Modell für T-Zell-vermittelte inflammatorische Autoimmunerkrankungen.

In einer Muskelbiopsie, die Patienten zu diagnostischen Zwecken entnommen wird, sind Zielzelle (multinukleäre Muskelfaser) und Zellen des Immunsystems leicht voneinander zu unterscheiden. Weiterhin können verschiedene Komponenten des Abwehrsystems identifiziert werden: Während sich autoaggressive T-Lymphozyten an primär gesunde Muskelfasern anlagern und in sie eindringen, halten sich im Gegensatz dazu sogenannte „Bystander“-Zellen im Interstitium auf. Sie sind wohl nicht ursächlich für die Erkrankung verantwortlich. Wahrscheinlich besitzen sie regulatorische Aufgaben oder werden unspezifisch an den Ort der Entzündung „gelockt“. Ist eine Entzündungsreaktion bereits ausgelöst, so finden in der angegriffenen Muskelzelle Umbauvorgänge statt, an denen sämtliche Zellen des Immunsystems beteiligt sind [Steinman 1996].

Der Modellvorstellung nach aktiviert ein bisher unbekanntes Antigen, welches von MHC-Molekülen der Klasse I präsentiert wird, spezifische CD8⁺ T-Zellen. Diese stellen die Gruppe der pathogenetisch relevanten, invasiven Zellen dar. Die Aktivierung führt zu einer im entzündeten Gewebe klonal expandierten T-Zell-Population. Man erwartet also bei Patienten, die an Polymyositis leiden, ein oligo-klonales T-Zell-Verteilungsmuster. Weitere polyklonale T-Zell-Populationen können zwar quantitativ überrepräsentiert sein, gehören aber wahrscheinlich nicht zu der Gruppe dieser autoaggressiven Zellen [Bender et al. 1995].

Unterstützt wird diese Vorstellung durch eine Reihe von Studien, die ein erhöhtes Vorkommen von T-Zellen mit bestimmten BV-Ketten bei der Polymyositis beschreiben. Bender et al. [Bender et al. 1995] kombinierte bestimmte PCR-Techniken mit der Immunhistochemie und konnte zeigen, daß das erhöhte Vorkommen einer BV-Familie noch nicht für deren pathogenetische Relevanz spricht. Ein überdurchschnittlich häufiges Auftreten von BV5.1⁺T-Zellen stellte sich als klonal heterogene Population heraus, wobei die Zellen in der Immunhistochemie hauptsächlich interstitiell lokalisiert waren. Dagegen war eine ebenfalls dominante Population BV13.1⁺T-Zellen, die aus wenigen expandierten Klonen zusammengesetzt war, unter den autoinvasiven, wahrscheinlich an der Pathogenese beteiligten Lymphozyten zu finden.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires in Muskelgewebe und venösem Blut von Polymyositis-Patienten bezüglich klonal expandierter Subpopulationen und deren Autoaggressivität. Es ergeben sich folgende Fragestellungen:

Kann mit Hilfe des CDR3-Spectratyping, einer neuartigen molekulargenetischen Methode, systematisch das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bei der Polymyositis nach solchen klonal expandierten Subpopulationen hin untersucht werden? Mittels der Immunhistochemie können T-Zellen durch BV-Familien-spezifische Antikörper gefärbt und hinsichtlich ihrer Lage zur Muskelfaser beurteilt werden. Stellen Mitglieder eines im CDR3-Spectratyping identifizierten Zell-Klons invasive, autoreaktive T-Lymphozyten dar, weist dies auf einen ursächlichen Zusammenhang dieser klonal expandierten T-Zellen mit der Erkrankung hin.

Können mit der Technik des CDR3-Spectratyping im Muskelgewebe als klonal expandiert identifizierte T-Zell-Populationen im Blut wiedergefunden werden? Bisher konnten T-Zellen, die in Muskelgewebe als autoreaktiv und klonal expandiert identifiziert worden waren, in anderen Kompartimenten des Körpers nicht nachgewiesen werden [Bender et al. 1995]. Ein Übereinstimmen des Verteilungsmusters in Muskel und Blut würde für die systemische Natur der Erkrankung sprechen. Krankheitsfälle mit Befall weiterer Organsysteme sind beschrieben, ebenso eine erhöhte Koinzidenz von Polymyositis und anderen Systemerkrankungen, bzw. neoplastischen Syndromen.

Wie verändert sich das Untersuchungsergebnis im CDR3-Spectratyping unter Therapie der Erkrankung mit Immunsuppressiva? Zeigen die Veränderungen eine Übereinstimmung mit dem Krankheitsverlauf, dann unterstützt dies die Relevanz der gefundenen Klone in Bezug auf die Polymyositis.

Bender et al. [Bender et al. 1995] nutzten für ihre Untersuchungen Material (Blut und Muskelbiopsie) eines Patienten (Patient W.), das auch für diese Arbeit zur Verfügung stand. Der Vergleich der beiden Arbeiten zeigt die Validität des CDR3-Spectratyping: Unterschiedliche Methoden führen zu ähnlichen Ergebnissen, aber die Erfassung des TZR-Repertoires anhand der neuen Technik des CDR3-Spectratyping zeigt durch ihre Systematik ein genaueres Bild der Vorgänge im entzündeten Gewebe.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 CDR (Complementarity-determining region) 3 - Spectratyping

Die Identifikation klonal expandierter T-Zell- Populationen mit Hilfe des CDR3-Spectratyping wurde bereits in mehreren Veröffentlichungen beschrieben [Puissieux et al. 1994] [Pannetier et al. 1995] [Even et al. 1995] [Liu et al. 1995]. Kourilsky et al. wendeten diese Methode bei Tumoren (Melanome) und entzündlichen Erkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Graft-versus-host-disease nach Knochenmarktransplantation) erfolgreich an.

Die Technik des CDR3-Spectratyping basiert auf dem natürlichen Längenpolymorphismus der dritten hypervariablen Region, dem Teil des T-Zell-Rezeptors, der für die spezifische Antigenerkennung am wichtigsten ist. Eine polyklonale T-Zell-Population enthält heterogene T-Zell-Rezeptoren mit unterschiedlichen CDR3-Längen im Sinne einer Gauß-Normalverteilung. Klonal expandierte Lymphozyten besitzen eine einheitliche CDR3-Länge. Das verstärkte Vorkommen einer definierten CDR3-Länge stellt sich im CDR3-Spectratyping als „Peak“ dar und weist auf einen expandierten T-Lymphozyten-Klon hin. Innerhalb einer Subpopulation von T-Zellen ist häufig die Sequenzierung des expandierten Klons möglich.

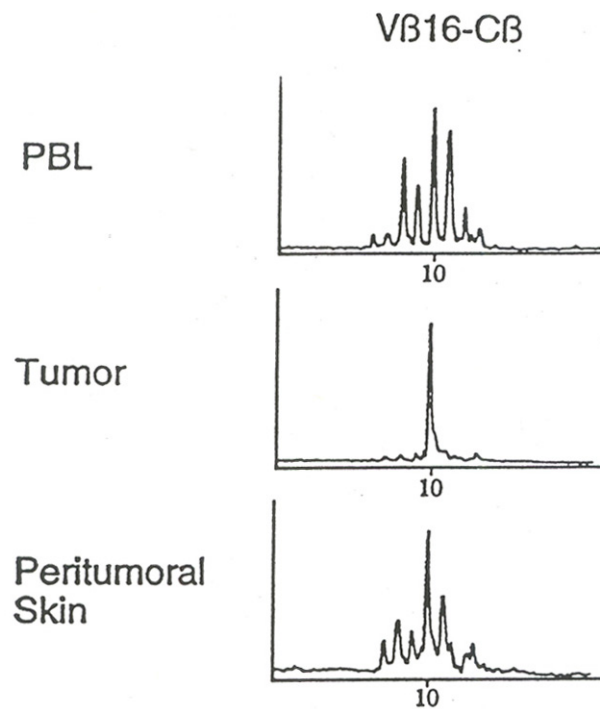


Abb. 6: *Untersuchungen von Even et al. bei malignem Melanom*

Es sind die Muster der Längenverteilung der CDR3-Regionen von T-Lymphozyten dargestellt. Es handelt sich um BV16⁺ T-Zellen eines Patienten, der an einem spontan regressiven malignen Melanom erkrankt war. Die erste Graphik stellt die Situation im peripher-venösen Blut dar, die zweite im Tumorgewebe und die dritte in der Haut, welche direkt den Tumor umgibt. Die erste Graphik entspricht weitgehend einer Gauß-Kurve, in der zweiten ist ein einzelner Peak bei einer bestimmten Sequenzlänge zu erkennen und in der dritten stellt sich ein Ausreißer innerhalb einer Normalverteilung bei genau dieser CDR3-Länge dar. Even et al. beschreiben eine BV16-BJ 2.1 positive klonal expandierte T-Zell-Population. Im Rahmen des „Tumor Infiltrating Leucocytes“(TIL)-Konzepts wird angenommen, daß dieser klonal expandierte T-Zell-Klon in Zusammenhang mit der spontanen Tumorregression zu sehen ist. Dieser Klon konnte sowohl mit Hilfe konservativer Methoden (Klonierung, Zellkultur und Sequenzierung) als auch durch die Technik des CDR3-Spectratyping identifiziert werden. Er ließ sich in beiden Fällen im Tumorgewebe nachweisen und konnte im peripher-venösen Blut nicht identifiziert werden. Die Vorteile der Technik des CDR3-Spectratyping, nämlich die Vermeidung von in-vitro Artefakten während Zellkultur und der geringere methodische Aufwand werden von Even et al. hervorgehoben.

[Even et al. 1995]

2.1.1 Die Identifikation klonal expandierter T-Zell-Populationen

Die Suche nach einer klonal expandierten T-Zell-Population ist technisch aufwendig: Bisherige Methoden waren hinsichtlich Zeitaufwand, Sensitivität und Objektivität nicht zufriedenstellend. Diese Methoden beinhalten das Sequenzieren nach dem Zufallsprinzip, RNase Protektions Essays [Okada et al. 1989, Singer et al. 1990] oder die quantitative Analyse mittels BV-Familien-spezifischer monoklonaler Antikörper (soweit diese vorhanden sind) [Genevée et al. 1994].

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Erstellung von TZR-Mini-Bibliotheken in *E. coli* Bakterien durch Anker- oder inverse PCR, deren Kultivierung und Sequenzierung [Rieux-Laucat et al. 1993] [Uematsu 1991]. Bender et al. charakterisierten mit Hilfe dieser zuletzt genannten Techniken das T-Zell-Rezeptor-Repertoire von Polymyositis-Patienten [Bender et al. 1995]. Teilweise konnte dasselbe Ausgangsmaterial (Muskelbiopsie und periphere Blutlymphozyten) im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels CDR3-Spectratyping untersucht werden. Die Ergebnisse lassen den direkten Vergleich der unterschiedlichen Methoden zu (s. Kapitel 3.1).

Die Vorteile des CDR3-Spectratyping liegen in der Unabhängigkeit von in-vitro Artefakten (z.B. Zell-Kultur) und der Systematik der Untersuchung, welche eine Übersicht über das gesamte T-Zell-Rezeptor-Repertoire eines Individuums gibt [Pannetier et al. 1995]. Es handelt sich bei der Technik des CDR3-Spectratyping um eine neuartige, verbesserte Methode zur Identifikation klonal expandierter T-Zell-Populationen auf polyklonalem Hintergrund.

2.1.2 Aufbau des T-Zell-Rezeptors

Die Technik des CDR3-Spectratyping macht sich die Besonderheiten des TZR-Aufbaus sowie dessen genetischer Kodierung auf DNA- und RNA-Ebene zunutze.

Das TZR-Protein besteht aus einer α - und einer β -Kette. Diese setzen sich aus jeweils einem konstanten Teil (C-Region), der in der Zellmembran verankert ist, und einem variablen

Teil, der der Antigenerkennung dient, zusammen. Dieser variable Teil setzt sich aus der V(variable)- und der J(joining)-Region zusammen. Im Falle der β -Kette existiert weiterhin eine D(diversity)-Region.

In der Keimbahn-DNA des Menschen liegen für jede dieser Regionen zahlreiche Varianten in linearer Anordnung vor. Während der somatischen Rekombination wird jeweils ein V-, D- und J-Element (β -Kette), bzw. ein V- und ein J-Element (α -Kette) zufällig zusammengefügt. Es entstehen funktionsfähige Exons. Hierdurch kommt es zu einer großen, nach dem Zufallsprinzip generierten Vielfalt an unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren. Diese Vielfalt wird nochmals potenziert durch das Einfügen von N-Nucleotiden zwischen diese Gensegmente nach dem Zufallsprinzip. Das rekombinierte Gen-Element, bestehend aus V-D-J, bzw. V-J bildet zusammen die sogenannte „dritte hypervariable“ oder auch „CDR3“-Region. Sie ist für die Spezifität des T-Zell-Rezeptors verantwortlich. Diese Mechanismen

dienen der Erkennung möglichst vieler unterschiedlicher Antigene und wurden in Kapitel 1.1.3 eingehend beschrieben.

Die so entstandene rekombinierte DNA ist einzigartig für diesen einen T-Zell-Klon und wird zu messenger-RNA transkribiert, woraus der Rezeptor als Protein translatiert wird.

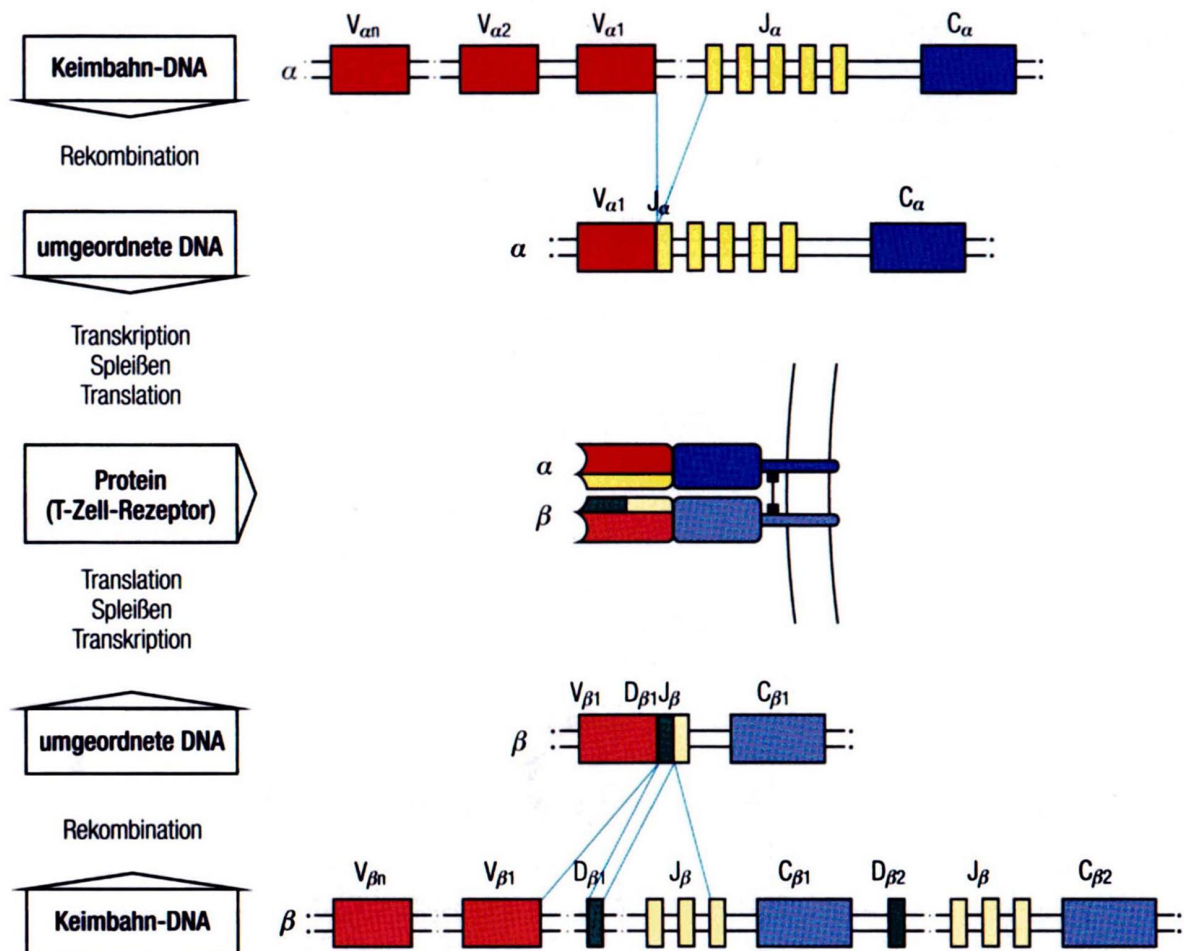


Abb. 7: Von der Keimbahn-DNA zum TZR-Protein

Die Entstehung des T-Zell-Rezeptor-Proteins aus der Keimbahn-DNA: Während der somatischen Rekombination werden die Gensegmente für die V-, D- und J-Region zu einem funktionsfähigen Exon rearrangiert. Durch die Transkription, Splicing und Kombination mit dem Segment der C-Region wird die messenger-RNA gebildet. Schließlich wird die mRNA zum Protein (α -, bzw. β -Kette) translatiert. Die Kombination einer α -Kette mit einer β -Kette führt zu einem funktionsfähigen T-Zell-Rezeptor.

[(Janeway et al. 1997) Kapitel 4:35]

Ausgangsprodukt für die Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Dissertation war „Gesamt“-RNA, welche aus CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten des peripheren Blutes sowie aus Muskelgewebe gewonnenen werden konnte.

2.1.3 Familien-PCR

Die mRNA besteht aus zufällig kombinierten V(variable)-D(diversity)-J(joining)-C(constant)-Regionen (β -Kette), bzw. V(variable)-J(joining)-C(constant)-Regionen (α -Kette). Diese einzelnen Bausteine sind linear angeordnet. Zwischen V-D-J, bzw. V-J können sich noch nach dem Zufallsprinzip eingeschobene Nucleotide befinden. Diese Genfragmente kodieren jeweils für eine Kette des T-Zell-Rezeptors, welche sich als Protein mit einer anderen Kette paart und somit wiederum die Variabilität des TZR erhöht. Eine Zuordnung der beiden Ketten ist auf Ebene der RNA nicht möglich.

Die überwiegende Zahl der T-Zell-Rezeptoren bestehen aus einer α - und einer β -Kette. Für die V-Region der β -Kette sind 52 Varianten bekannt, für die D-Region 2 und für die J-Region 13. Im Falle der α -Kette handelt es sich um ca. 70 alternative V-Regionen und 61 J-Regionen [(Janeway et al. 1997) Kapitel 4:37].

Die Untersuchungen mit Hilfe des CDR3-Spectratyping werden an der β -Kette durchgeführt, wobei 26 verschiedene BV-Familien-spezifische Primer die 48 Varianten erfassen. Am 3'-Ende wird ein BC-spezifischer Primer eingesetzt [Monteiro et al. 1996]. Vor Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion wird die gewonnene RNA in stabile complementäre DNA umgeschrieben.

In einer ersten PCR-Runde entstehen nun 26 verschiedene BV-Familien-spezifische PCR-Produkte aus der cDNA, bzw. ursprünglichen „Gesamt“-RNA.

In einer zweiten PCR werden fluoreszenzmarkierte Primer benutzt, welche spezifisch an die 13 unterschiedlichen J-Regionen [Puissieux et al. 1994], bzw. an die C-Region binden. Es entstehen insgesamt 364 (= 26 x 14) fluoreszenzmarkierte „Run-off“-Transkripte.

Gemeinsam sind den Transkripten eines jeden dieser Produkte die Art der Fluoreszenzmarkierung, die Zugehörigkeit zu einer BV-Familie am 5'-Ende und zu einer BJ-, bzw. C-Region am 3'-Ende. Unterschiede weisen die Transkripte innerhalb eines PCR-Produktes hinsichtlich der D-Region und der zufällig eingeschobenen Nucleotide auf. Hierdurch kommt es zu Längenunterschieden der Fragmente.

Mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes werden die Fragmente auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel innerhalb ihrer Produkt-Gruppe der Länge nach aufgetrennt und stehen zur Spectratype-Analyse zur Verfügung.

Markierung von DNA-Fragmenten mit fluoreszierenden Partikeln

1.Schritt: PCR, Programm „Immuno“, unmarkierte Primer



2.Schritt: PCR, Programm „Run-off“, markierte Primer

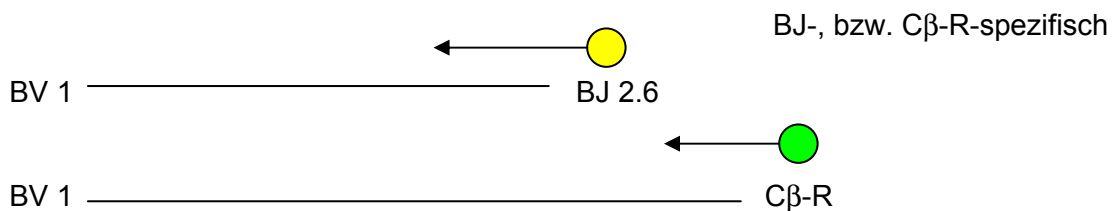


Abb. 8: *Markierung von DNA-Fragmenten mit fluoreszierenden Partikeln*
Die schematische Darstellung der Amplifizierung und Fluoreszenzmarkierung während der verschiedenen PCR-Programme am Beispiel der BV-Familie 1 – BJ-Subfamilie 2.6.

2.1.4 Fragment-Analyse

Die Fragment-Analyse zeigt die Auftrennung der amplifizierten Transkripte hinsichtlich ihrer Nucleotid-Anzahl, d.h. ihrer Länge. Die Anzahl an Transkripten einer Länge bestimmt die Leuchtintensität der fluoreszierenden Partikel. Die graphische Darstellung (Abszisse Basenpaarlänge und Ordinate relative Leuchtintensität) des Ergebnisses zeigt im Falle einer polyklonalen T-Zell-Population eine Gauß-Kurve:

Der Längenpolymorphismus der CDR3-Region folgt einer Normalverteilung.

Zusammensetzung der β -Kette des T-Zell-Rezeptors

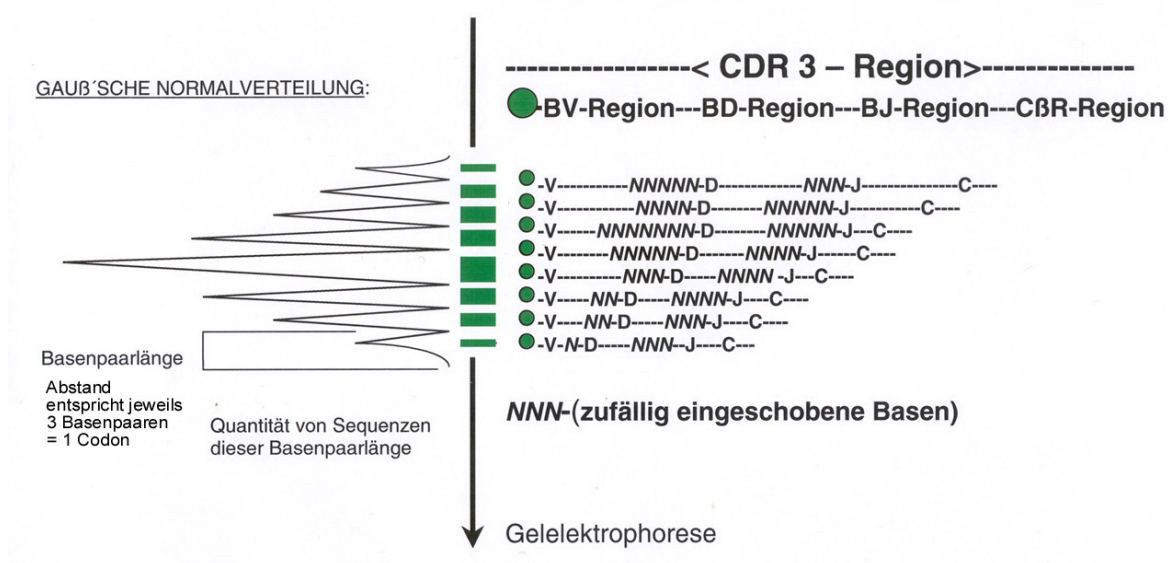


Abb. 9: Zusammensetzung der β -Kette des TZR

Die hypervariable (CDR3-) Region der α - und β -Kette des TZR ist für die Antigen-erkennung verantwortlich. In der vorliegenden Arbeit wird die CDR3-Region mit Hilfe der PCR aus der cDNA des Ausgangsmaterials amplifiziert und fluoreszenzmarkiert. Das abgebildete Schema zeigt die Auftrennung der markierten DNA-Fragmente ihrer Länge nach während der Gelelektrophorese. Nach der ersten PCR („Immuno“) besteht das PCR-Produkt aus amplifizierten DNA-Fragmenten einer BV-Familie, da diese als Primer der Reaktion vorgegeben war. Unterschiede innerhalb der Fragmente bezüglich der D- und J-Region, bzw. der Art und Anzahl der eingeschobenen „N“-Nukelotide. Nach dem Prinzip der Normalverteilung ist eine mittlere Größe an Sequenzlängen am häufigsten vertreten, extrem lange oder kurze Sequenzen sind selten. Dementsprechend ergibt die graphische Darstellung der markierten DNA-Fragmente unter Berücksichtigung von Basenpaarlänge und Quantität eine Gauß-Kurve. Da je drei Nukleotide für eine Aminosäure kodieren, ergeben nur Sequenzen einer durch drei teilbaren Basenpaaranzahl eine sinnvolle CDR3-Region. Daher zeigt die graphische Darstellung der Fragment-Analyse im Abstand von drei Basenpaarlängen ein Produkt, dies entspricht einer wellenförmigen Kurve.

Die Überrepräsentanz einer bestimmten CDR3-Sequenzlänge innerhalb des PCR-Produktes stellt sich als Peak (mathematisch ein „Ausreißer“) dar, der aus der Gauß-Kurve herausragt. Eine solche Abweichung von der Normalverteilung legt die Vermutung nahe, daß es sich um eine klonal expandierte Population von T-Zellen handelt: Bei der Cycle-Sequenzierung des PCR-Produktes kann sich dann oft eine lesbare Nucleotidabfolge durchsetzen.

Ein signifikanter Peak auf Ebene der BV-Familien-spezifischen PCR-Produkte deutet auf eine größere Population dieses Klon hin. Die nähere Charakterisierung und Sequenzierung allerdings gelingt oft erst nach der zweiten, BJ-spezifischen PCR.

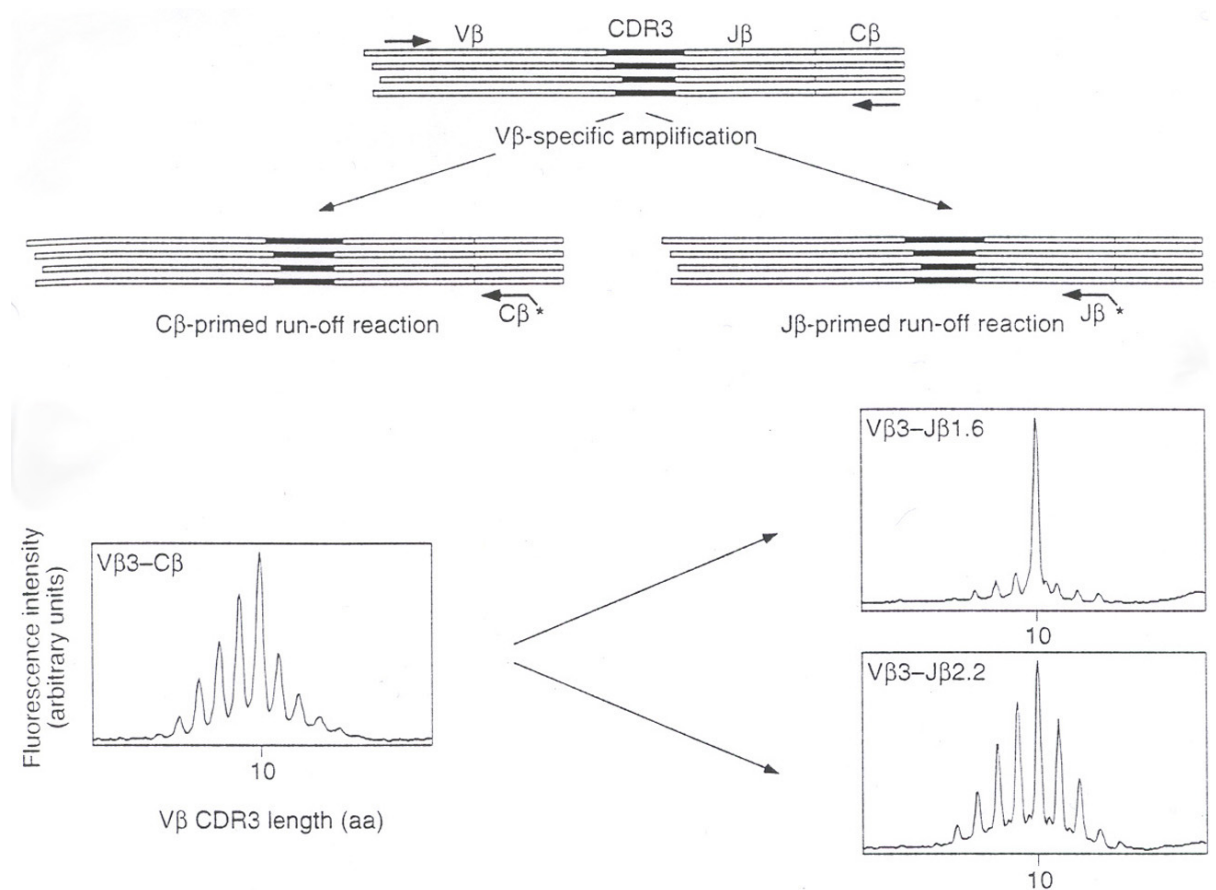


Abb. 10: Untersuchungen von Pannetier et al. bei malignem Melanom

Das Prinzip der Analyse des TZR mittels CDR3-Spectratyping am Beispiel von peripher-venösem Blut eines Patienten mit malignem Melanom. Oben ist die BV-familien-spezifische PCR und Fluoreszenzmarkierung (*) von cDNA-Fragmenten dargestellt. Unten ist die Auswertung der Ergebnisse beschrieben: Links im Bild ist die graphische Darstellung des natürlichen Längenpolymorphismus der CDR3-Region der BV3⁺ T-Lymphozyten. Bei einer leichten Abweichung von einer Gauß-Kurve mit einem Peak bei der Länge von 10aa (Aminosäuren) wurde die Subamplifikation mit BJ-spezifischen Primern durchgeführt. Rechts im Bild ist in der Subfamilie BJ1.6 ein Peak zu erkennen, der aus der Normalverteilungskurve deutlich herausragt. Die überdurchschnittliche Menge an DNA-Fragmenten einer spezifischen CDR3-Länge läßt auf eine klonal expandierte Population schließen. Andere BJ-Profile (z.B. BJ2.2) entsprechen einer Gauß-Kurve und bestehen somit aus einer polyklonalen Zell-Population. [Pannetier et al. 1995]

Der Nachweis einer solchen klonal expandierten Population inmitten polyklonaler T-Zellen gelingt mit Hilfe des CDR3-Spectratyping bis zu einer Verdünnung von etwa 1:5.000. Die Sensitivität der Methode variiert in Abhängigkeit von den verwendeten BV-BJ Kombinationen und der Größe des PCR-Produktes des jeweiligen T-Zell-Klons im Vergleich mit denen der polyklonalen Population [Cochet et al. 1992].

2.2 Durchführung der Versuche

2.2.1 Gewinnung und Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial: Muskelgewebe von Polymyositis-Patienten

Im Friedrich-Baur-Institut, Klinikum Innenstadt der LMU München, wurden aus entzündetem Muskelgewebe von Polymyositis Patienten zwei bis drei 1,5cm³ große Biopsate zu diagnostischen Zwecken entnommen.

Die Muskelstückchen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Bei einem Durchmesser der T-Zellen von durchschnittlich 7µm wurden ca. 15µm dicke Gewebsschnitte aus unterschiedlichen Tiefen der Biopsie am Kryostaten hergestellt und etwa 30 Schnitte in einem Eppendorf-Tube der Qualität „Biopur“ eingefroren bei -20°C. Unter einer sterilen Arbeitsbank wurde dem Material 750µl Trizol[®]LS Reagent und 250µl DEPC-behandeltes H₂O zugefügt und durch mehrmaliges resuspendieren die Schnitte lysiert.

2.2.2 Gewinnung und Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial: Peripher-venöse Blutlymphozyten

Unter Verwendung von EDTA-Monovetten wurden 20ml venöses Blut von Polymyositis-Patienten und einer Kontrollperson entnommen.

Zunächst erfolgte die Isolierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBML) durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation. Das venöse Blut wurde mit 20ml PBS gemischt und in zwei 50ml-Falcon-Tubes auf jeweils 14ml „Lymphoprep“ überschichtet. Anschließend konnten die PBML der Blutprobe durch 20-minütige Zentrifugation bei 2000U/min und Raumtemperatur in der Interphase zwischen Serum und „Lymphoprep“ gesammelt und abpipettiert werden.

Die gewonnenen Lymphozyten wurden in einem 50ml Falcon-Tube vereint und 15 min. bei 1200U/min. und 4°C zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 3ml PBS 1% BSA aufgenommen und in 3 „Biopur“-Eppendorf-Tubes zu je 1ml aufgeteilt. Aus einem Reaktionsgefäß wurden 5µl entnommen, mit 45µl PBS und 50µl Trypan-Blau verdünnt und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer die Zellzahl ermittelt. Blau gefärbte Zellen besitzen eine lädierte Zellwand und sind nicht vital. Zum Teil wurden für die Versuche auch kryopräservierte Zellen verwendet.

Die Separation in CD4- und CD8-positive Zellen erfolgte mit Hilfe von „Dynabeads“ (Antikörpern, welche an magnetische Polystyrolpartikel gebunden sind). Zu 1ml Zellsuspension wurden 100µl der anti-CD4, bzw. anti-CD8 Dynabeads gegeben und 30 min. bei 4°C unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Eppendorf-Reaktionsgefäß in eine Halterung mit Magnet im Bereich des Bodens des Reaktionsgefäßes eingesetzt, wodurch sich die Dynabeads (gebunden an das jeweilige Antigen) als Pellet sammeln. Der Überstand wurde abpipettiert.

Die entstandenen Pellets wurden in 1ml PBS resuspendiert und wieder in die spezielle Halterung gegeben, dieser Waschriff wurde 3 mal wiederholt. Endgültig wurden die Zellen in 250µl PBS aufgenommen, 5µl zur Zählung entnommen und durch Hinzugabe von 750µl Trizol[®]LS Reagent und mehrmaliges Resuspendieren lysiert.

Bei der Isolation von CD4⁺, bzw. CD8⁺ T-Zellen konnten Zellzahlen zwischen 0,6x10⁶ und 2,7x10⁶ pro 30ml entnommenem Blut erreicht werden.

2.2.3 Präparation der Gesamt-RNA (Ribonukleinsäure)

Nach Lyse der Zellen verteilt sich die RNA in der hydrophilen Phase und kann durch das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten bei saurem pH von DNA und Proteinen isoliert werden. [Chomzynski et al. 1987]

Die Trizol[®]LS Reagent-Zellsuspension in den Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200µl Chloroform hinzugefügt und die Gefäße geschüttelt, wiederum schloß sich eine Inkubation bei Raumtemperatur von 5 min. an. Daraufhin wurden die Proben 15 min. bei 14.000U/min. und 4°C zentrifugiert und der klare, RNA-enhaltende Überstand in ein neues „Biopur“-Eppendorf-Reaktionsgefäß transferiert. Dieser wurde mit 10µg Glykogen als Fällungshilfe und 600µl Isopropyl-Alkohol versetzt und 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Fällung wurden die Proben 10 min. bei 14.000U/min. und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml 80% Ethanol gewaschen. Die Reaktionsgefäße wurden dann 5 min. bei 9.000U/min. und 4°C zentrifugiert, der Überstand wiederum verworfen und das Pellet einige Minuten an der Luft getrocknet.

Die präzipitierte RNA wurde endgültig in 21µl DEPC-behandeltem H₂O resuspendiert, 1µl zur Bestimmung der Konzentration entnommen und entweder zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gestellt oder bei -80°C eingefroren.

Die quantitative Bestimmung der erhaltenen RNA wurde mittels Spektralphotometrie durchgeführt, wobei die Probe im Verhältnis 1:80 mit DEPC-behandeltem H₂O verdünnt und die Absorbtion bei 260 und 280nm gemessen wurde.

Die Konzentration konnte nach folgender Gleichung errechnet werden:

$$c = OD_{260} \times f \times n \text{ [mg/ml]}$$

c = Konzentration

OD = optische Dichte

F = Verdünnungsfaktor

N = 40 mg/ml für RNA

Die Reinheit der präparierten RNA wurde über das Verhältnis von OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ definiert, optimale Werte liegen bei 2.

2.2.4 Erstellung von cDNA (complementäre Desoxyribonukleinsäure) mittels reverser Transkription

Aus der isolierten RNA und dem Enzym Reverse Transkriptase wurde komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) hergestellt, welche im Vergleich zu mRNA wesentlich stabiler ist und mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion amplifiziert werden kann.

In ein „Biopur“Eppendorf-Reaktionsgefäß wurde 0,5µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer zu 1-5µg Gesamt-RNA gegeben und 10 min. auf einem Heizblock bei 70°C erhitzt, dann angeschleudert und auf Eis gestellt. Nach dieser Denaturierung und Anlagerung des Primers an das Poly-A-Ende des mRNA-Stranges wurden dem Reaktionsansatz 4µl 5-fach Pufferlösung (5xFirst Strand Buffer), 2µl 0,1M DTT, 1µl 10mM dNTP Mix sowie 10U Ribonukleaseinhibitor hinzugefügt, vorsichtig gemischt und 2 min. auf dem Heizblock bei 42°C inkubiert. Daraufhin wurden 200U der Reversen Transkriptase zu dem Ansatz pipettiert

und die Probe 50 min. auf dem Heizblock bei 42°C inkubiert. Die Synthesereaktion wurde durch ein 15-minütiges Erhitzen der Probe auf 70°C beendet. Anschließend wurde das Syntheseprodukt in 50µl DEPC-behandeltes H₂O aufgenommen und entweder zur direkten Weiterverarbeitung auf Eis gestellt oder bei -20°C eingefroren.

2.2.5 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion können DNA-Sequenzen spezifisch amplifiziert, d.h. vervielfältigt werden, so daß sie als Ausgangsmaterial für weitere Analysen zur Verfügung stehen. DNA-Fragmente können entweder markiert oder quantitativ vervielfältigt werden, um einen Nachweis zu ermöglichen [Mullis et al. 1994]. Die Entwicklung dieser Technik gelang Kary B. Mullis, der 1993 hierfür den Nobelpreis für Chemie verliehen bekam.

Als erster Schritt wird durch Inkubation bei 94°C die Doppelhelix entwunden und in Einzelstränge geteilt. Dann erfolgt die Anlagerung komplementärer Oligonukleotide zur Probe als Startpunkte der Vervielfältigung. Die hierzu benötigte Temperatur ist abhängig von Länge und Zusammensetzung der verwendeten Oligonukleotide. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurden 59°C gewählt. Bei 72°C katalysiert schließlich die Polymerase den Einbau von Nukleotiden zu einem neuen, komplementären Strang. Um eine möglichst große Ausbeute zu erhalten werden diese Schritte in mehreren Zyklen wiederholt, wobei die synthetisierte DNA-Menge exponentiell ansteigt. Bei 4°C wird die Reaktion beendet.

Die zu einem kleinen Bereich der gegebenen DNA komplementären Oligonukleotide werden synthetisch hergestellt und setzen voraus, daß die Sequenz dieses Abschnitts bekannt ist. Sie dienen der PCR als Primer und starten die Amplifikation nur in ihrer spezifischen Richtung, d.h. es gibt zwei Primer pro Doppelstrang-DNA-Probe.

Die Technik der PCR wurde in dieser Arbeit angewandt um T-Zell-Rezeptor-spezifische cDNA zu amplifizieren und mit fluoreszenzmarkierten Primern zu graphisch darzustellen. Die Produkte stehen für weitere Untersuchungsmethoden, wie der Fragment-Analyse und der Sequenzierung, zur Verfügung.

Amplifikation BV-Familien-spezifischer cDNA

Der Ansatz zur PCR wurde in 96-well-Mikrotiterplatten unter der sterilen Arbeitsbank pipettiert. Das Volumen des Reaktionsansatzes pro well betrug 50µl und wurde mit einem Tropfen Nujol-Öl abgedeckt, um ein Verdampfen zu verhindern.

Zur Amplifikation von 1µl cDNA pro well wurden 2,5µl von je einem der 26 verschiedenen 10µM BV-Region-spezifischen Primer vorgelegt und als Mastermix 2,5µl 10µM Cβ-Region-spezifischen Primers, 0,5µl 10mM dNTP Mix, 5µl 10xPCR-Puffer, 1U Taq-Polymerase und 38,3µl DEPC-behandeltes H₂O hinzugefügt.

PCR-Programm „Immuno“:

6min.	94°C	Schritt 1
1min.	94°C	Schritt 2
1min.	59°C	Schritt 3
1min.+0,3sek. pro Zyklus	72°C	Schritt 4
40 x →	Schritt 2 bis Schritt 4	Schritt 5
7min.	72°C	Schritt 6
	4°C	Schritt 7

Ende.

Die erfolgreiche Amplifikation wurde durch elektrophoretische Auftrennung der DNA in einem mit Ethidium-Bromid versetzten Agarose-Gel und der anschließenden Fotografie im UV-Licht überprüft.

Dazu wurden 2,5g Agarose in 250ml 1xTBE aufgelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht, anschließend 6µl Ethidium-Bromid 1% hinzugefügt. Aus der flüssigen Masse wurde ein Gel mit Taschen gegossen. Je 6µl der 26 PCR-Produkte wurden mit 4µl Auftragspuffer versetzt und in die Taschen eingefüllt. Zur Überprüfung der Sequenzlänge diente ein Längenmarker, als Positiv-Kontrolle wurden spezifische Primer für β-Aktin und als Negativ-Kontrolle H₂O anstatt cDNA verwendet. Diese Substanzen wurden ebenfalls jeweils mit 4µl Auftragspuffer gemischt und wie eine Probe behandelt.

Die Kammer wurde mit 1xTBE-Puffer aufgefüllt und 30 min: eine Spannung von 100 Volt angelegt. Anschließend wurde das Ethidiumbromid, welches in die DNA-Doppelhelix interkaliert, durch UV-Licht angeregt und die daraufhin sichtbar gewordenen Banden fotografiert.

Da die Amplifikation während der PCR später noch einmal bezüglich Vollständigkeit und Basenpaarlänge überprüft wird (Fragment-Analyse mittels Polyacrylamid-Gel), dient dieser Schritt zur Dokumentation der erfolgreichen PCR-Amplifikation.

Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte

Um die erhaltenen Produkte sichtbar zu machen, wurden in einer zweiten PCR fluoreszenzmarkierte BV-Familien-spezifische „Run-off“-Transkripte erstellt. Anschließend konnten diese im automatischen Sequenzier-Gerät über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und vom Laser detektiert werden.

Von den 26 verschiedenen PCR-Produkten der „Immuno“-Reaktion wurden je 2µl in jeweils einer Mikrotiterplatte vorgelegt, 8µl eines unter der sterilen Arbeitsbank angesetzten Mastermixes hinzugefügt und mit einem Tropfen Nujol-Öl abgedeckt. Das Mastermix enthielt pro well 1µl 10xPCR-Puffer, 0,1µl des 10µM Cβ-spezifischen fluoreszenzmarkierten Primers, 0,1µl 10mM dNTP Mix, 0,04µl Taq-Polymerase und 6,76µl DEPC-behandeltes H₂O.

Zur Fluoreszenzmarkierung standen die Farbstoffe 6-FAM, HEX und TET zur Verfügung.

PCR-Programm „Run-Off-3“:

10min.	94°C	Schritt 1
1min.	94°C	Schritt 2
1min.	59°C	Schritt 3
10min.	72°C	Schritt 4
2 x →Schritt 2 bis Schritt 4		Schritt 5
	4°C	Schritt 6

Ende.

„Semiquantitative PCR“

Der Unterschied zu dem PCR-Ansatz „Immuno“ besteht in der mehrmaligen, zeitlich versetzten Entnahme von PCR-Produkt.

Die Amplifikation der cDNA während der PCR folgt einer Sättigungskinetik, die abhängig von der initialen Häufigkeit der amplifizierten Sequenz nach unterschiedlicher Zyklenzahl ihr Maximum erreicht. Bei gleicher PCR-Effizienz sind PCR-Produkte dominanter

BV-Familien nach weniger Zyklen nachweisbar als die unterrepräsentierter BV-Familien. Um semiquantitativ die Häufigkeit der einzelnen BV-Familien einschätzen zu können, wurden daher nach 30, 35 und 40 Zyklen Aliquots aus den PCR-Reaktionen entnommen und später separat der „Run-Off“-Reaktion zugeführt.

Diese Methode wurde bei der Muskelbiopsie als Ausgangsmaterial angewendet um Aufschluß darüber zu erlangen, welche BV-Familien quantitativ besonders stark am Ort der Entzündung vertreten sind.

**BJ-Subfamilien spezifische
Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte**

Zur genaueren Analyse des T-Zell-Rezeptor-Repertoires wurden die 26 verschiedenen BV-spezifischen PCR-Produkte der PCR „Immuno“ in einer zweiten PCR jeweils mit 13 BJ-spezifischen Primern kombiniert und gemäß dem Prinzip der „semi-nested“-PCR Transkripte erstellt. Hierbei wurden mit den fluoreszierenden Farbstoffen 6-FAM, HEX und TET markierte Primer verwendet. Da die Ausgangsmenge der DNA-Fragmente, die fluoreszenzmarkiert wurden, wesentlich geringer war als nach der BV-Familien-spezifischen Amplifikation, lief die PCR zwei Zyklen länger.

In 96-well-Mikrotiterplatten wurden unter der sterilen Arbeitsbank pro well 5µl des Primers vorgelegt und in zwölf „Biopur“Eppendorf-Reaktionsgefäßen als Mastermix die weiteren Reaktionsstoffe der PCR angesetzt. Außerhalb der sterilen Arbeitsbank wurden die PCR-Produkte aus Programm „Immuno“ hinzugefügt. Um die Arbeitsvorgänge zu ökonomisieren wurden pro well zwei, bzw. drei der BV-spezifischen PCR-Produkte kombiniert. Aus dem Mastermix wurde nun zu dem vorgelegten Primer pro well 0,1µl dNTP-Mix, 1µl 10xPCR-Puffer, 0,04µl Taq-Polymerase, 1µl des BV-spezifischen PCR-Produkts und bei zwei dieser Produkte 1,86 µl DEPC-behandeltes H₂O, bei drei Produkten 0,86 µl hinzugefügt.

Die Kombination der BV-Familien wurde aufgrund der spezifischen Länge der Amplifikationsprodukte festgelegt:

BV1 + BV18 + BV23	BV9 + BV16
BV2 + BV4 + BV8	BV11 + BV12
BV3 + BV13.1	BV15 + BV13.2
BV5.2 + BV5.1	BV14 + BV17
BV6 + BV20	BV19 + BV24
BV7 + BV22	BV10 + BV21

Der Reaktionsansatz betrug pro well 10,1µl und wurde mit einem Tropfen Nujol-Öl abgedeckt. Das Programm der PCR-Maschine lautete wie folgt:

PCR-Programm „Run-Off-5“:

10min.	94°C	Schritt 1
1min.	94°C	Schritt 2
1min.	59°C	Schritt 3
10min.	72°C	Schritt 4
4 x →Schritt 2 bis Schritt 4		Schritt 5
	4°C	Schritt 6

Ende.

2.2.6 Fragment-Analyse der PCR-Produkte: „CDR3-Spectratyping“

Die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurden im Sequenzier-Gerät über ein Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, von einem Laser detektiert und einer bestimmten Basenpaarlänge zugeordnet. Dies war möglich, weil mit den Proben auf jeder Spur ein definierter Längenstandard aufgetragen wurde, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff TAMRA markiert war. Durch Denaturierung der Proben in einem Formamid-haltigen Auftragspuffer wurden Sekundärstrukturen der DNA beseitigt.

Da für die fluoreszenzmarkierten Primer drei verschiedene Farbstoffe (HEX, 6-FAM, TET) zur Verfügung standen und der Laser den Längenstandard TAMRA als eine weitere Farbe identifiziert, konnten pro Spur „Run-Off-Produkte“ von 3 verschiedenen BJ-Sub-Familien von jeweils zwei, bzw. drei BV-Familien aufgetrennt werden. Diese waren aufgrund der Längenunterschiede bereits in der „Run-Off-Reaktion“ gemeinsam generiert worden.

In eine Mikrotiterplatte wurden jeweils 1µl von drei PCR-Produkten, die mit Primern in drei unterschiedlichen Farben gewonnen worden waren, zusammenpipettiert.

Die Kombinationen ergaben sich wie folgt

(Eine Zeile entspricht einer Spur auf dem Gel):

(BV1+BV18+BV23) x (BJ1.1 HEX+BJ1.2 FAM+BJ1.3 TET)

(BV1+BV18+BV23) x (BJ1.4 HEX+BJ1.5 FAM+BJ1.6 TET)

(BV1+BV18+BV23) x (BJ2.1 HEX+BJ2.2 FAM+BJ2.3 TET)

(BV1+BV18+BV23) x (BJ2.4 HEX+BJ2.5 FAM+BJ2.6 TET)

(BV1+BV18+BV23) x (BJ2.7 HEX+Cβ TET)

(BV2+BV4+BV8) x (BJ1.1 HEX+BJ1.2 FAM+BJ1.3 TET)

u.s.w.

Die Proben wurden bei 95°C 20 min. in der PCR-Maschine ohne Verschluss erhitzt und so auf ca.1µl Gesamtvolumen reduziert. Anschließend wurden pro well 0,5µl des Längenstandard TAMRA, 2,5µl Formamid und 1µl Genescan Pufferlösung „loading buffer“, als Mastermix angesetzt, hinzugefügt. Die Proben wurden mit dem Deckel der Mikrotiterplatte verschlossen und durch 5minütiges Erhitzen in der PCR-Maschine bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und mit flachen Pipettenspitzen in die Taschen des Gels am Sequenzier-Gerät geladen.

Zur Herstellung der Polyacrylamid-Gele wurden ABI Prism 377 36cm Glasplatten und Long Ranger™ Gel Lösung verwendet. Die Polymerisation der Gele dauerte 2h. Um Taschen zur Auftragung der Proben zu formen wurde ein 36-well Kamm eingesetzt, wobei die Region der Glasplatten, in der hinterher die Taschen gebildet werden sollten, vorher mit Bindsilan benetzt worden war.

Am Sequenzier-Gerät wurde das Programm „Genescan“ gestartet. Die Pufferkammern wurden mit 1xTBE-Puffer gefüllt und der Vorlauf zur gleichmäßigen Erhitzung der Platten auf 51°C und Markierung der Taschen mit einer Dextranblau/Formamid-Lösung durchgeführt. Zum Starten des eigentlichen Laufs wurden die

Proben in die Gel-Taschen pipettiert, eine Spannung von 3000 Volt angelegt und der Lauf auf 2h eingestellt.

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe von Farbstandards auf dem Rechner eine Matrix erstellt, um die verwendeten Farbstoffe optimal voneinander abgrenzen zu können. Mit Hilfe der Software der Firma Perkin Elmer konnten die gewonnenen Daten graphisch in Spectratype-Kurven umgewandelt werden. Sie spiegeln den Längenpolymorphismus der CDR3-Region wieder und stellen die Grundlage des CDR3-Spectratyping dar, anhand dessen klonal expandierte T-Zell-Populationen identifiziert werden können.

2.2.7 Sequenzierung der CDR3-Region von expandierten T-Zell-Klonen

Zur Analyse der Gensequenz der CDR3-Region von identifizierten expandierten T-Zell-Klonen müssen die Ausgangsprodukte zuerst spezifisch vervielfältigt und aufgereinigt werden. Anschließend wird die eigentliche Sequenzierreaktion durchgeführt, die Proben werden gefällt und im Sequenzier-Gerät ausgewertet.

Die Ergebnisse der Fragment-Analyse weisen auf klonal expandierte T-Zell-Populationen innerhalb der BV-Familien, bzw. BJ-Subfamilien hin. Um das Ausgangsprodukt für die Sequenzierreaktion spezifisch zu vervielfältigen, wird das PCR-Produkt der „Immuno“-Reaktion der entsprechenden BV-Familie entnommen und einer weiteren PCR zugeführt. Als Primer dienen unmarkierte Oligonukleotide, die die Amplifikation vom 5'Ende her spezifisch für die identifizierte BV-Familie und vom 3'Ende spezifisch für die auffällige BJ-Familie. Diese weitere Vervielfältigung entspricht dem Prinzip der „Semi-Nested PCR“.

Amplifikation des Ausgangsproduktes der Sequenzierreaktion

Zur Vervielfältigung von 1µl PCR-Produkt pro well wurden je 2,5µl von dem BV- und dem BJ-Region-spezifischen Primer vorgelegt und als Mastermix 0,5µl 10mM dNTP Mix, 5µl 10xPCR-Puffer, 1U Taq-Polymerase und 38,3µl DEPC-behandeltes H₂O hinzugefügt.

PCR-Program „N-25“:

6min.	94°C	Schritt 1
1min.	94°C	Schritt 2
1min.	59°C	Schritt 3
1min.	72°C	Schritt 4
25 x →Schritt 2 bis Schritt 4		Schritt 5
7min.	72°C	Schritt 6
	4°C	Schritt 7

Ende.

Die PCR-Produkte wurden mittels Microcon-Säulen mit einer molekularen Ausschlußgröße von 30.000 Daltons aufgereinigt. Durch Zentrifugation wurden Puffer,

Nukleotide und Primer durch eine Membran gepreßt, welche die zu sequenzierenden DNA-Fragmente nicht passieren können.

Die Microcon-Säulen wurden in der Eppendorf-Zentrifuge auf die mitgelieferten Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgesteckt und 200µl Wasch-Puffer eingefüllt. Zu diesem wurden 15µl des zu sequenzierenden PCR-Produktes hinzugegeben. Nun wurden die Säulen bei 9.000U/min. und Raumtemperatur 10 min. zentrifugiert. Zur Elution wurden daraufhin 15µl des Wasch-Puffers nachgegeben und 5 min. inkubiert, so daß sich die DNA-Fragmente darin lösen konnten. Um die DNA als Eluat zu gewinnen wurden die Säulen umgedreht, auf neue Eppendorf-Reaktionsgefäße aufgesteckt und bei 10.000U/min. und Raumtemperatur 15 sek. zentrifugiert. Das gereinigte Ausgangsmaterial zur Sequenzierung wurde entweder weiterverarbeitet oder bei -20°C eingefroren.

Die Sequenzierreaktion wurde nach der Didesoxy-Terminations-Methode durchgeführt, wobei nach dem Prinzip der PCR zur vorgelegten DNA komplementäre Stränge entstehen, die durch zufälligen Einbau von 2,3-Didesoxynukleotid-5'-Triphosphaten an unterschiedlichen Stellen der Extensionsreaktion abbrechen. Diese terminierenden Triphosphate sind fluoreszenzmarkiert: Adenosintriphosphat mit dichloro[R6G], Cytidintriphosphat dichloro[TAMRA], Guanidintriphosphat mit dichloro[R110] und Thymidintriphosphat mit dichloro[ROX]. Durch die zufälligen Abbrüche entstehen Stränge unterschiedlicher Länge, die nun jede Position der Sequenz entsprechend dem an dieser Position vorkommenden Nukleotid unterschiedlich farblich markieren. Nach Denaturierung können die Proben im Sequenzier-Gerät elektrophoretisch aufgetrennt werden und vom Laser die Sequenz abgelesen werden.

Als Startpunkte für die Extension der komplementären Stränge wurden dieselben Primer wie bei der PCR „Run-Off-5“ unmarkiert verwendet. Um Strang und Gegenstrang zu sequenzieren wurden für jedes PCR-Produkt zwei Reaktionen angesetzt, einmal mit dem BV-spezifischen Primer und einmal mit dem BJ, bzw. Cβ-spezifischen Primer.

Die Sequenzierreaktion wurde in einer 96-well-Mikrotiterplatte durchgeführt, wobei pro well 1µl Primer(10µmol) mit 2µl des aufgereinigten PCR-Produktes, 4µl der Sequenzierlösung „Cycle Sequence Mix“ und 13µl DEPC-behandeltes H₂O angesetzt und mit einem Tropfen Nujol-Öl verschlossen wurde.

PCR-Programm „Sequence“:

30sek.	96°C	Schritt 1
15sek.	55°C	Schritt 2
4min.	60°C	Schritt 3
25 x →Schritt 1 bis Schritt 3		Schritt 4
	4°C	Schritt 5

Ende.

Durch eine Fällungsreaktion wurden die Proben von Primern, Nujol-Öl, fluoreszenzmarkierten Nukleotiden u.ä. befreit: In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 3µl Natriumacetat mit 19µl Sequenzierprodukt gemischt und mit 60µl 100% Ethanol versetzt,

angeschleudert, und bei -20°C 10 min. inkubiert. Anschließend wurden die Eppendorf-Reaktionsgefäße bei 14.000U/min. und 4°C 30 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und 200µl 75%-iges Ethanol (4°C) zum Pellet hinzugefügt. Wiederum wurden die Proben bei 14.000U/min. und 4°C 5 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen und nach 5-minütigem Trocknen das Pellet in 1µl Genescan Auftragspuffer und 3µl Formamid gelöst. Die Mikrotiterplatte wurde zur Denaturierung der Proben in der PCR-Maschine bei 95°C 5 min. inkubiert und dann auf Eis gestellt.

Die Herstellung des Polyacrylamid-Gels verlief entsprechend dem Verfahren bei der Fragment-Analyse.

Am Sequenzier-Gerät wurden die Pufferkammern mit 1xTBE gefüllt, der Vorlauf mit Dextranblau/Formamid-Lösung durchgeführt, die Proben mit flachen Pipettenspitzen aufgetragen und das Programm SEQ E 2400 mit einer Laufzeit von 4h und einer Spannung von 3000Volt eingestellt.

Zur Auswertung der vom Laser abgelesenen Werte wurde die vorher mit den verwendeten Farbstoffen erstellte Matrix dem Rechner zur Verfügung gestellt. Im Programm „Navigator“ konnte die Sequenz der Proben als farbige Elektrophoresekurve und als Buchstabenkombination dargestellt werden. In der Farbkurve stand jeder Peak auf der y-Achse für eine bestimmte der 4 verschiedenen Basen und auf der x-Achse konnte die Sequenz abgelesen werden. Weiterhin konnte die zu je drei Basen (= 1 Kodon) gehörende Aminosäure angezeigt werden, wobei zunächst alle drei möglichen Leseraster errechnet wurden.

2.2.8 Immunhistochemie: Fluoreszenzfärbung

Ein Vorteil der Polymyositis als Modell einer entzündlichen Erkrankung liegt darin, daß aus diagnostischen Gründen angefertigte Muskelbiopsien in der Immunhistochemie mit Hilfe von markierten Antikörpern gefärbt werden können. Somit kann die Infiltration des betroffenen Gewebes durch Zellen des Immunsystems dargestellt werden.

Es wurden zwei bis drei 1,5cm³ große Biopsate aus entzündetem Muskelgewebe von Polymyositis Patienten im Friedrich-Baur-Institut, Klinikum Innenstadt der LMU München, zu diagnostischen Zwecken entnommen.

Nach Entnahme wurden die Muskelstückchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Am Kryostaten wurden zwischen 5 und 7µm dicke Schnitte bei -20°C hergestellt und auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen. Anschließend wurden die Schnitte 1h bei Raumtemperatur getrocknet und entweder bei -20°C eingefroren oder direkt im Anschluß mit der Färbung begonnen.

Zur Fixierung der Schnitte wurden sie in Färbeküvetten bei -20°C 5 min. in Aceton bei gestellt und hinterher für 15 min. bei Raumtemperatur getrocknet.

Um eine unspezifische Anfärbung zu verhindern wurden die Kryostatschnitte der Biopsien 30 min. in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur mit einer Kombination von Antiseren (Lösung B, s. Kap. 2.3) blockiert. Überschüssige Lösung B wurde durch einen dreimaligen je 5-minütigen Waschgang der Objektträger in Färbeküvetten mit 1xPBS bei Raumtemperatur entfernt.

Nach dieser Vorbereitung der Gewebsschnitte begann die eigentliche Färbung, die in drei Schritten durchgeführt wurde:

- 1. Antikörper:** **monoklonaler Maus-anti-TZR-Antikörper**
(gegen die im CDR3-Spectratyping als klonale Population identifizierte BV-Familie gerichtet)

- 2. Antikörper:** **Cy3(Carboxymethylindocyanin)-konjugierter polyklonaler Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörper**
(bindet an das F(ab')₂-Fragment des 1. Antikörpers, fluoreszenzmarkiert)

- 3. Antikörper:** **FITC(Fluoreszein-Isothiocyanat)-konjugierter anti-CD8-Antikörper**
(Gegenfärbung und Identifizierung der CD8+T-Zellen, fluoreszenzmarkiert)

Die Antikörper wurden in Lösung A (s. Kap. 2.3) verdünnt. Die Muskelschnitte wurden vollständig mit der Antikörper-Lösung bedeckt (50µl) und in einer feuchten Kammer inkubiert, wobei der 1. Antikörper 45 min., der 2. und 3. Antikörper 30 min. auf den Schnitten belassen wurde. Zwischen den Inkubationsschritten wurden jeweils 3x10minütige Waschgänge mit 1xPBS durchgeführt.

Die fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden bei 4°C und im Dunkeln inkubiert.

Die gefärbten Muskelschnitte wurden mit Einbettmedium bedeckt, mit Deckgläsern versehen und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografiert.

2.2.9 HLA (Humanes-Leukozyten-Antigen) Typisierung

Der T-Zell-Rezeptor kann nur Antigene erkennen, die an ein MHC-Molekül einer Antigen-präsentierenden Zelle gebunden sind. MHC-Moleküle sind auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und sind für die Unterscheidung) - der Abwehrzellen des Körpers zwischen Eigen und Fremd verantwortlich. Es besteht ein extremer Polymorphismus bezüglich des genetischen Codes für den MHC. Der menschliche MHC wurde zuerst in Zusammenhang mit Antikörper-Reaktionen bei weißen Blutzellen untersucht und trägt seither den Namen Humanes Leukozyten Antigen(HLA)-System. [Janeway et al. 1997, Abbas et al. 1994]

Klinisch bedeutsam ist der HLA-Typus vor allem in der Transfusions- und Transplantationsmedizin hinsichtlich einer Abstoßungsreaktion. Bei einigen Autoimmunkrankheiten wurden bestimmte HLA-Haplotypen besonders häufig gefunden (z.B. HLA-B 27 bei Spondylitis ankylopoetica, DR3/ DR4 bei Insulin-pflichtigem Diabetes mellitus) [Janeway et al. 1997].

Für die HLA-Bestimmung wurden 40ml venösen Blutes entnommen, wobei 20ml in EDTA-Monovetten, 10ml in einer Heparin-Monovette und 10ml in einer zur Serumgewinnung bestimmten Monovette aufgefangen wurde. Die Proben wurden innerhalb 24h nach Blutabnahme im Labor für Immungenetik (Nationales Referenzlabor für Gewebetypisierung, München) verarbeitet.

2.3 Materialien

Antikörper:

Ziege-anti-Maus-IgG-mAb (Cy™3)	10µg/ml; in Lösung A verdünnt Anregung 554nm Emission 568nm Farbe: ROT	Dianova, Hamburg, D.
Maus-anti-BV 1-mAb	10µg/ml; in Lösung A verdünnt	Serotec, Vertrieb Biozol, Eching, D.
Maus-anti-BV 3-mAb	10µg/ml; in Lösung A verdünnt	Immunotech, Marseille, F.
Maus-anti-CD8-mAb (FITC)	0,9µg/ml; in Lösung A verdünnt Anregung 488nm Emission 525nm Farbe: GRÜN	Immunotech, Marseille, F.
Maus-anti-BV 13.1-mAb	Unverdünnter Überstand	Zur Verfügung gestellt von Dr. Philippa Marrack, National Jewish Center for Immunology and Respiratory Medicine, Denver, CO, USA
„Biopur“ Eppendorf-Tubes	Steril Pyrogenfrei RNAse-frei DNA-frei ATP-frei	Eppendorf, Hamburg, D.
36-well Kamm		Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
5xFirst Strand Buffer		GibcoBRL, Eggenstein, D.
96-well-Mikrotiterplatten zur PCR		Biozym, Hess. Oldendorf, D.
Agarose	Agarose LM-MP	Boehringer Mannheim, D.
„Dynabeads“ anti-CD4 M-450 CD4	Mit Antikörpern versehene magnetische Partikel, 1,4x10 ¹⁰ /ml	Dynal, Hamburg, D.

„Dynabeads“ anti-CD8 M-450 anti-CD8	Mit Antikörpern versehene magnetische Partikel, 1,4x10 ¹⁰ /ml	Dynal, Hamburg, D.
Auftragspuffer (Agarose-Gel)	100ml Sucrose 40% 50mg Xylencyanol 50mg Bromphenolblau	Sigma, Taufkirchen, D. Sigma, Taufkirchen, D. Merck, Darmstadt, D.
Bindesilan	Stocklösung: 0,5ml Ethanol 125µl 10% Essigsäure 1,5µl γ-Methacryl- oxypropyl- Trimethoxysilane	Riedel-de Haen, Taufkirchen, D. Sigma, Taufkirchen, D.
BSA	RNAse/DNAse-frei	Pharmacia Biotech, Erlangen, D.
Chloroform		Merck, Darmstadt, D.
Cycle Sequence Mix	ABI Prism™dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, mit AmpliTaq®DNA Polymerase,FS	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
DEPC-behandeltes H ₂ O		ICN Biomedicals, Eschwege, D.
Dextranblau	5%	Sigma, Taufkirchen, D.
Dextranblau/Formamid- Lösung	Dextranblau 5% in Formamid 1:20	Sigma, Taufkirchen, D. Merck, Darmstadt, D.
dNTP Mix	10µM	Pharmacia Upjohn, Erlangen, D.
DTT	0,1M Dithiothreitol	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Einbettmedium	2,4g Mowiol, 6g Glycerol und 6ml H ₂ O 5h bei Raumtemperatur inkubieren, 12ml 0,2M Tris (pH 8,5) hinzufügen und 10 min. bei 50°C inkubieren, 15 min. 15.000U/min. zentrifugieren, den Überstand verwenden	Hoechst, Frankfurt, D. Tris(hydroxymethyl)- amino-methan Merck, Darmstadt, D.

Ethanol 80%		Riedel deHaen, Taufkirchen, D.
Ethidium-Bromid	1%	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Falcon-Tubes		Sarstedt, Nürnberg, D.
Flache Pipettenspitzen	Miniflex 0,2mm flat tips	Sorenson, Amersham Bioscience, Freiburg, D.
Fluoreszenzfarbstoffe, an Primer gekoppelt	Phosphoramidverbindg. 6-FAM, HEX, TET: 6-carboxyfluorescein und chlorierte Analoge	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Formamid		Merck, Darmstadt, D.
Genescan Auftragspuffer	Genescan-500 Tamra: Dextranblau 5% EDTA 25 mM	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Gestopfte Pipettenspitzen		Biozym, Hess. Oldendorf, D.
Glykogen	2%	Boehringer Mannheim, Mannheim, D.
Isopropyl-Alkohol		Riedel-de Haen, Taufkirchen, D.
Längenmarker	Low DNA mass ladder	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Long Ranger TM Gel Lösung Single Pack for 377-36cm	Fertigprodukt enthält: Harnstoff 6M Long Ranger 5% 1xTBE APS 0.05% TEMED 0.07%	FMC BioProducts, Rockland, ME, U.S.A.
Lösung A	1xPBS BSA2% 0,001% Amphotericin, steril filtriert: 0,22 Micron Cellulose Acetat Membran	s.o. s.o. s.o. Sigma, Taufkirchen, D. Corning Glass Works, Schiphol, N.L.

Lösung B	1xPBS BSA 2% Humanserum 10% Pferdeserum 5%	s.o. s.o. inaktivierte Seren: Blutspendedienst Baden-Baden GibcoBRL, Eggenstein, D.
Lymphoprep		Nycomed, Amersham Bioscience, Freiburg, D.
Microcon-Säulen	Microcon-30 Microconcentrators	Amicon, Beverly, MA, U.S.A.
Monovetten		Sarstedt, Nümbrecht, D.
Natriumacetat	3M	Merck, Darmstadt, D.
Nujol-Öl	Mineralöl	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Objektträger, mit Gelatine beschichtet	1% Gelatine in deion. H ₂ O bei 80°C auflösen, 0,5g KCr(SO ₄) ₂ hinzufügen, Objektträger eintauchen und 24h trocknen	Merck, Darmstadt, D. Merck, Darmstadt, D.
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer		GibcoBRL, Eggenstein, D.
PBS	1xPBS 0,2g KCL 8,0g NaCl 1,42g Na ₂ HPO ₄ 1,38g NaH ₂ PO ₄ auf 1l mit deionisiertem H ₂ O, pH 7,4	
Primer: (Sequenzen siehe Anhang)		
Primer für TZR-PCR	Gebrauchslösung: 10µM Endkonzentration: 0,5µM	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Fluoreszenzmarkierte Primer für „Run-off“- Transkripte	Gebrauchslösung: 10µM Endkonzentration: 0,1µM	
Programm „Genescan“	Software für ABI 377	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.

Programm „Navigator“	Software für ABI 377	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Programm „Sequence Analysis“	Software für ABI 377	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Reverse Transkriptase	Superscript™II, 200U/μl	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Ribonukleaseinhibitor	10U/μl	GibcoBRL, Eggenstein, D.
TAMRA	Genescan-500 Tamra: Längenstandard	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Taq-Polymerase	AmpliTaq Gold™, 5U/μl	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
TBE-Puffer	10xTBE 108g Tris 55g Borsäure 7,4g EDTA auf 1l mit deionisiertem H ₂ O, pH 7,4	
Trizol®LS Reagent	RNA-Extraktionslösung	GibcoBRL, Eggenstein, D.
Wasch-Puffer	10xPCR-Puffer aus dem Kit der AmpliTaq Gold™ in DEPC-behandeltem H ₂ O 1:50	Perkin Elmer, Applied Biosystems, Weiterstadt, D. ICN Biomedicals, Eschwege, D.
β-Aktin	<u>Primer-Sequenzen:</u> GGCATCGTGATG GACTCC GCTGGAAGGTGG ACAGCGA	MWG Biotech, Ebersberg, D.

2.3 Geräte

Automatisches Sequenziergerät	Perkin Elmer; ABI Prism 377, Applied Biosystems, Weiterstadt, D.
Cryostat	Modell CM 3050, Leica, Solms, D.
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Modell Axioplan 2, Jena, D.
Magnet zur Zellseparation	(MPC)-M, Dynal, Hamburg, D.
PCR-Maschine	PTC-100, MJ Research Inc., Mass., U.S.A.
Spektralphotometer zur Bestimmung der RNA-Konzentration	Pharmacia Biotech, Modell Genequant II, Amersham Bioscience, Freiburg, D.
Zentrifuge für Eppendorf-Gefäße	Modell 5417 R, Eppendorf, Hamburg, D.
Zentrifuge für Falcon-Tubes	Megafuge 10R, Heraeus, Hanau, D.

Kapitel 3

Experimente und Ergebnisse

Ziel der Experimente war die Charakterisierung der klonalen Zusammensetzung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires von Polymyositis-Patienten mit Hilfe der Technik des CDR3-Spectratyping. Das Prinzip dieser Technik, welche auf der Polymerase-Ketten-Reaktion basiert, beinhaltet die graphische Darstellung des Längenpolymorphismus der DNA-Sequenzen, die für die CDR3-Region der β -Kette des T-Zell-Rezeptors kodieren. Dieses Protein ist wesentlich für die Antigen-Erkennung der T-Zelle verantwortlich. Die Sequenzen von Proben, welche bei systematischer Untersuchung Auffälligkeiten im Verteilungsmuster der T-Zellen zeigten, wurden analysiert.

Als Untersuchungsmaterial dienten Muskelbiopsien und venöses Blut unterschiedlicher Abnahmezeitpunkte von vier Polymyositis-Patienten. Die Diagnosen sowie Daten der Materialgewinnung sind im Folgenden dargestellt:

	Patient W.	Patient B.	Patient S.	Patient Z.
Alter/ Geschlecht	56 Jahre männlich	36 Jahre männlich	60 Jahre weiblich	81 Jahre weiblich
Diagnose	Diffuse Polymyositis	Floride Polymyositis, perifaszikulärer Typ	Jo1-Syndrom mit Myositis und extramusk. Manifestation	Chron. Polymyositis seit 15 Jahren
Entnahme der Muskelbiopsie				
Blutentnahme Zeitpunkt PBL I	1 Woche Therapie 80mg 6-Methyl- prednisolon	3 Tage Ø Therapie	1 Tag Glukokortikoide niedrig dosiert vor 5 Wochen	6 Wochen Ø Therapie
Blutentnahme Zeitpunkt PBL II	6,5 Jahre Therapie 4 Jahre Azathioprin; aktuell: 100mg Azathioprin + 15mg Prednison	13 Tage Therapie 150mg Azathioprin + 100mg Prednisolon	10 Monate Therapie 150mg Azathioprin + 7,5mg Prednisolon	10 Monate Ø Therapie
Blutentnahme Zeitpunkt PBL III	Ø Material	1,5 Jahre Therapie 50mg Cyclo- phosphamid + 10mg Prednisolon	Ø Material	Ø Material

Bereits sieben Wochen vor Entnahme der Muskelbiopsie und erster Blutentnahme – einen Tag später – war eine Behandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika und Glukokortikoiden begonnen worden. Trotzdem wurde die Patientin intensivpflichtig und litt zum Zeitpunkt PBL I unter dem Vollbild einer Myositis mit myocardialer und pulmonaler Beteiligung.

Aufgrund des stabilen Krankheitsverlaufs und des hohen Lebensalters wurde bei Patientin Z. auf eine immunsuppressive Therapie verzichtet.

Abb. 11: Patientendaten

Es sind tabellarisch Angaben zu Person, klinischer Diagnose und Therapie der untersuchten Patienten sowie der zeitliche Verlauf der Probenentnahmen dargestellt.

Die Ergebnisse der Muskelbiopsie und das lokale Verteilungsmuster des T-Zell-Infiltrates wurden mit CD4- und CD8-Subfraktionen des venösen Blutes verglichen. Eine zeitliche Veränderung der klonalen Zusammensetzung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires wurde durch Vergleich der Ergebnisse des venösen Blutes vor und während Therapie untersucht.

Abschließend wurde mit Hilfe der Immunhistochemie die Verteilung von expandierten T-Zell-BV-Familien im Muskelgewebe untersucht, wobei spezifische Antikörper für bestimmte Familien der β -Kette verwendet wurden.

3.1 Die Technik des CDR3-Spectratyping

Zunächst wurde die Technik des CDR3-Spectratyping an CD4- und CD8-positiven T-Lymphozyten aus peripher-venösem Blut eines gesunden Probanden durchgeführt. Die Ergebnisse dienen als Negativ-Kontrolle.

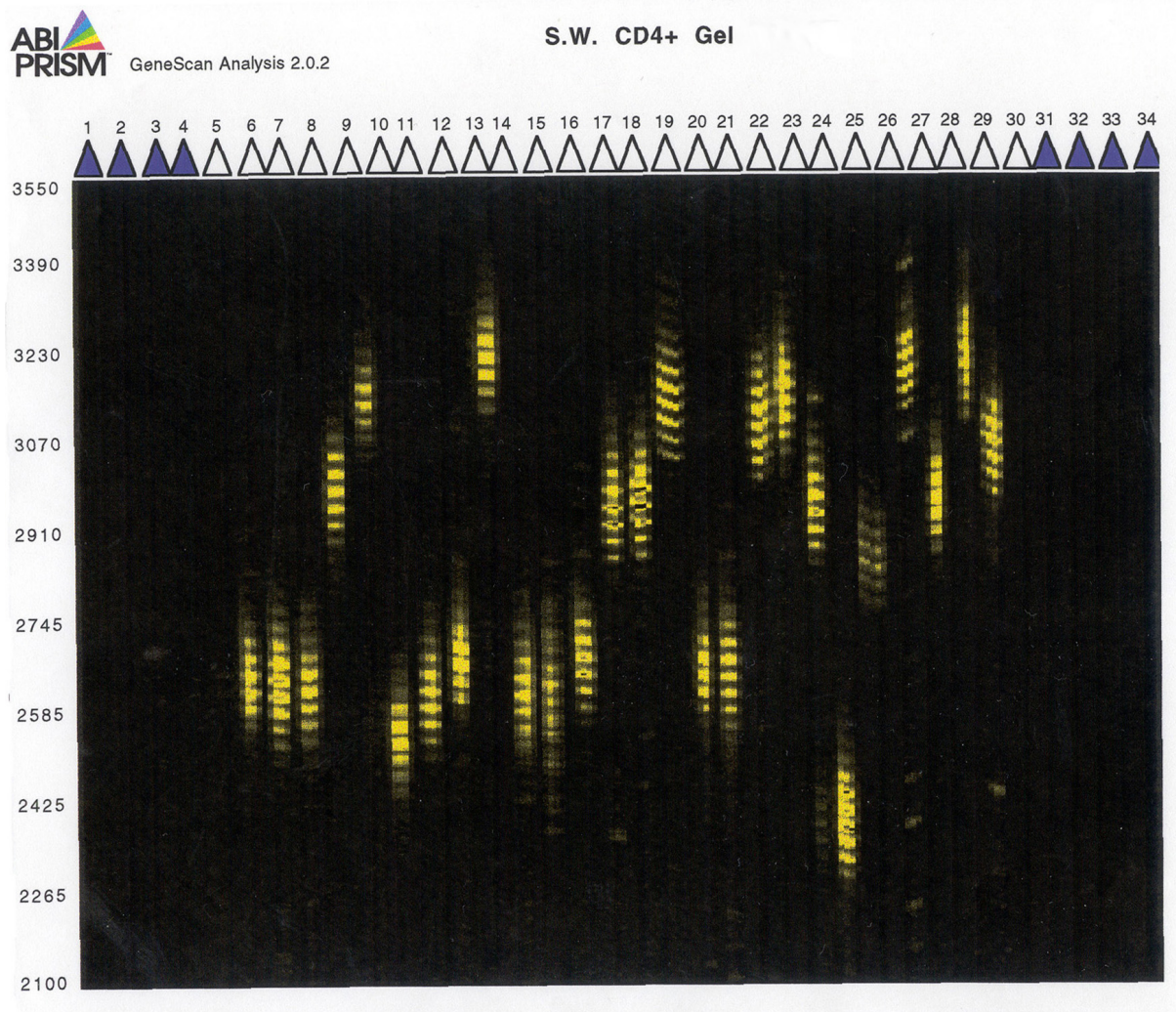
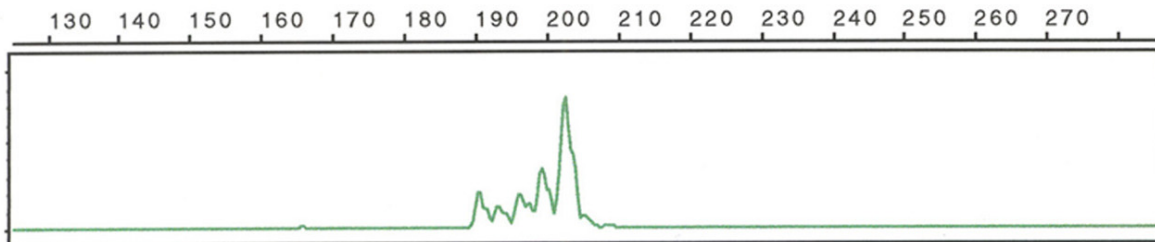


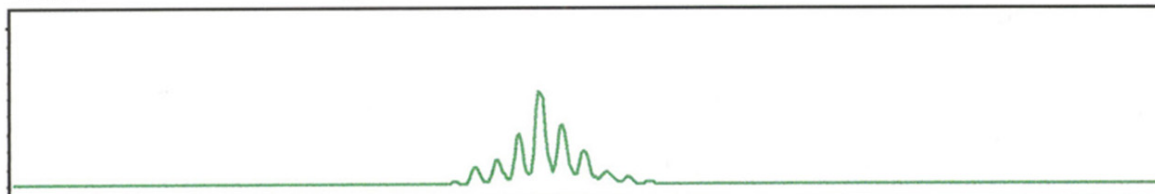
Abb. 12: *Negativ-Kontrolle CD4⁺ T-Zellen (Gelphoto)*

Die Ergebnisse des CDR3-Spectratyping von CD4⁺ T-Lymphozyten peripher-venösen Blutes eines gesunden Probanden. Die Abbildung zeigt 26 vertikal aufgetrennte Proben nach Elektrophorese über ein Polyacrylamidgel. Eine Spur beinhaltet das PCR-Produkt der CDR3-Region einer BV-Familie. Die Auswertung am Computer mit Hilfe spezieller GeneScan-Software führt zu charakteristischen Graphiken (s.u.), wobei auf der Abszisse die Basenpaarlänge aufgetragen ist und auf der Ordinate die Leuchtintensität entsprechend der relativen Menge an PCR-Produkt.

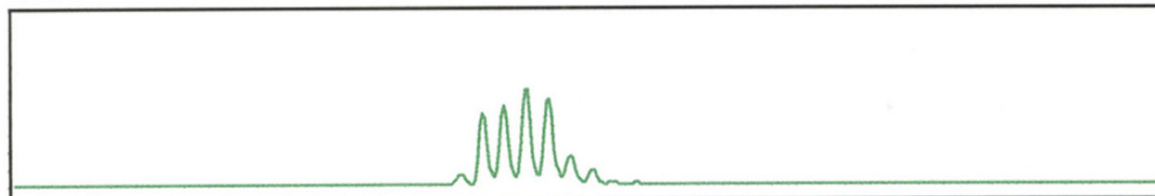
Die Normalverteilung der CDR3-Längen ist bereits auf diesem Ausdruck zu erkennen: Innerhalb einer BV-Familie befindet sich ein Maximum an Leuchtintensität bei mittleren DNA-Fragment-Längen. Die Leuchtintensität nimmt entsprechend den Extremvarianten von Basenpaarlängen der CDR3-Region gleichmäßig ab.



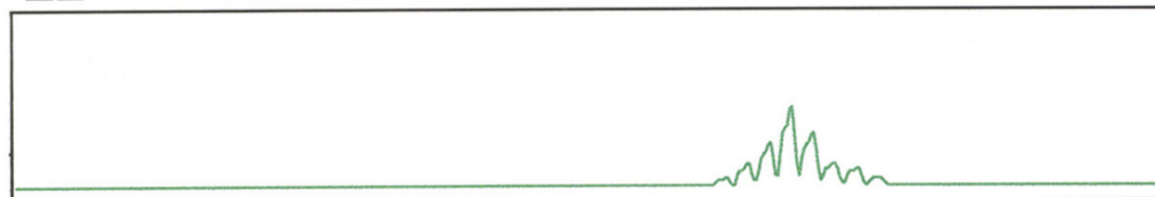
1G: vB 1 / nach 40 Zyklen PCR entnommen



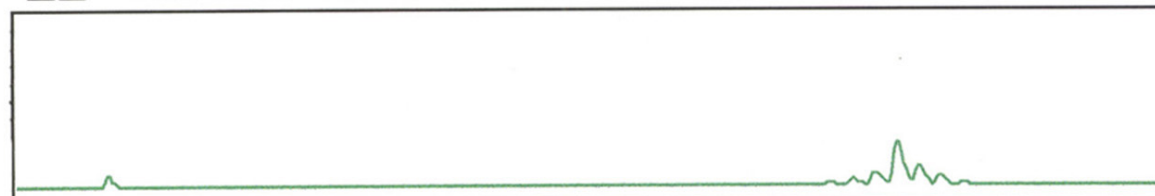
2G: vB 2 / nach 40 Zyklen PCR entnommen



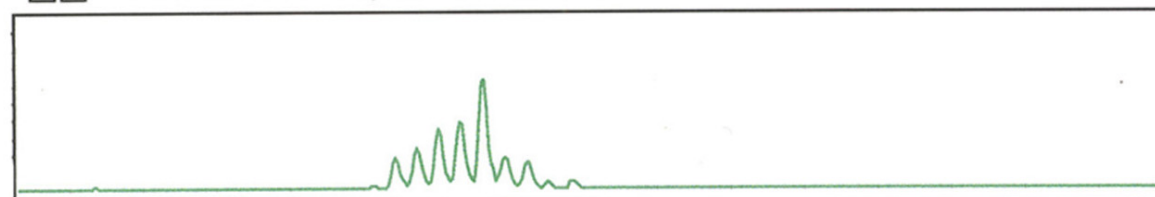
3G: vB 3 / nach 40 Zyklen PCR entnommen



4G: vB 4 / nach 40 Zyklen PCR entnommen



5G: vB 5.1 / nach 40 Zyklen PCR entnommen



6G: vB 5.2 / nach 40 Zyklen PCR entnommen

Abb. 13: *Negativ-Kontrolle CD8⁺-T-Zellen*

Die CDR3-Längen der BV-Familien BV1 bis BV5.2 von CD8⁺ T-Lymphozyten aus peripher-venösem Blut eines gesunden Probanden zeigen eine weniger gleichmäßige Verteilung. Dies entspricht der Erkenntnis, daß auch im Blut von gesunden Individuen oligoklonale T-Zell-Expansionen vorhanden sind. Sie sind meist aktivierte CD8⁺ Lymphozyten und stellen vermutlich die Antwort zu persistierenden Infektionen dar [Schwab et al. 1997].

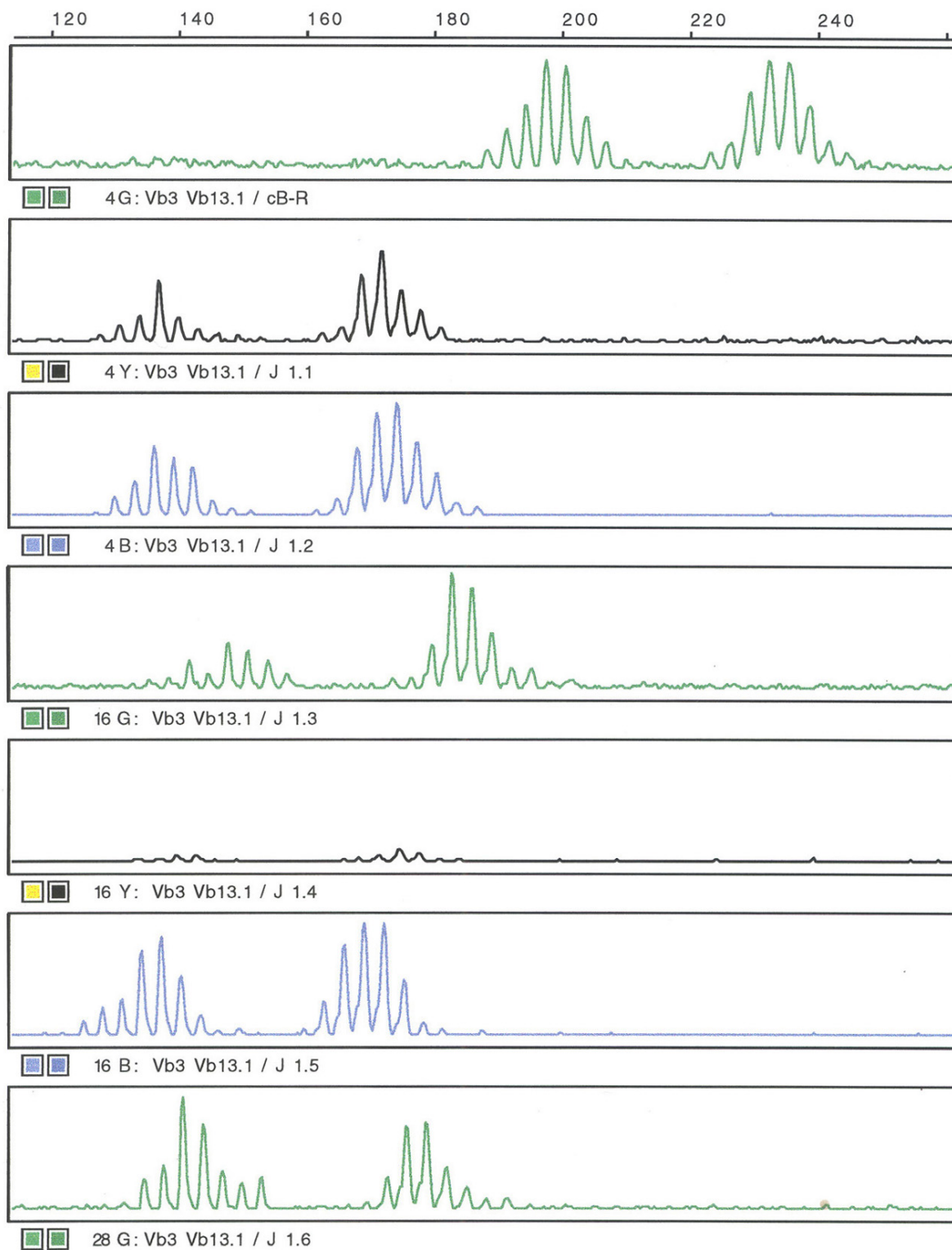


Abb. 14: *Negativ-Kontrolle CD4⁺-T-Zellen*

Die Darstellung zeigt Ergebnisse des CDR3-Spectratyping von CD4⁺T-Lymphozyten der BV-Familie 3 und 13.1 eines gesunden Probanden. Zur optimalen Ausnutzung der Laborkapazitäten wurden BV-Familien während der PCR gezielt miteinander kombiniert, ohne daß sich die Ergebnisse überlagern. Die erste Zeile stellt den Längenpolymorphismus der CDR3-Region innerhalb der BV-Familie dar. In den weiteren Zeilen sind die Ergebnisse der Subamplifikation mit BJ-Primern abgebildet.

Da $CD4^+$ T-Zellen in der Pathogenese der Polymyositis nach bisherigen Erkenntnissen keine Rolle spielen, zeigen die unauffälligen Graphiken des CDR3-Spectratyping von $CD4^+$ -Lymphozyten des peripher-venösen Blutes der Polymyositis-Patienten, daß die positiven Ergebnisse der $CD8^+$ Zellen keine methodisch bedingten Erscheinungen sind.

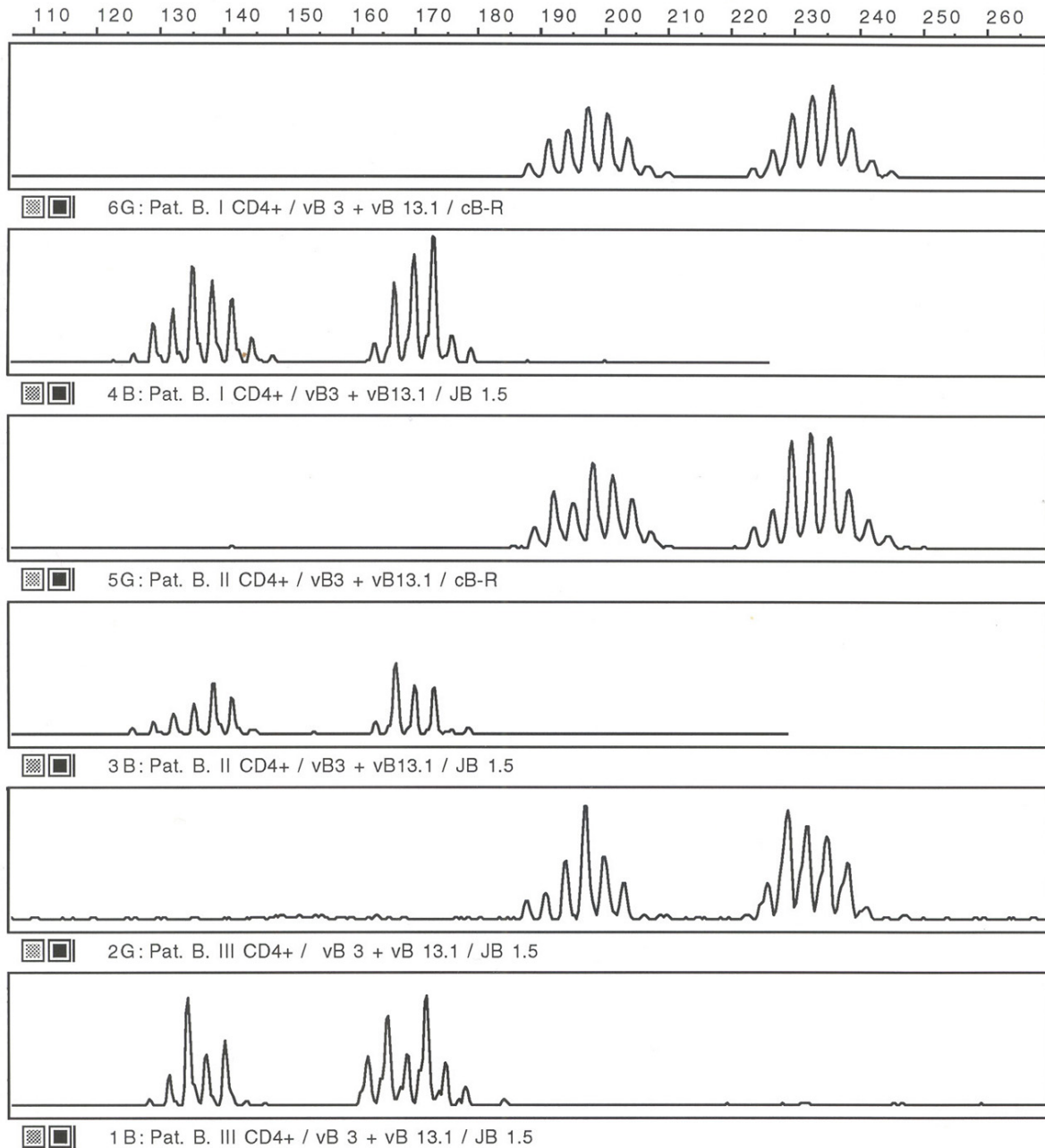


Abb. 15: *Patient B. $CD4^+$ -T-Zellen*

Die graphischen Ergebnisse des CDR3-Spectratyping von $CD4^+$ T-Zellen der BV-Familie 3 und 13.1 von peripher-venösem Blut des Patienten B. zu den Zeitpunkten PBLI, PBLII und PBLIII. Die gleichmäßigen Kurven im Sinne einer Gauß'schen Normalverteilung weisen auf eine polyklonale Population hin.

Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit der Methode wurden an zwei verschiedenen Stücken eines Muskelbiopsates von Patient B. durchgeführt. Bis zur Kryokonservierung gemeinsam behandelt, wurden sie zeitlich getrennt am Kryostaten geschnitten, die Proben aufbereitet und das CDR3-Spectratyping angewendet. Bis auf die Primer wurden die Chemikalien jeweils neu angesetzt, die Versuche allerdings in identischer Art und Weise durchgeführt.

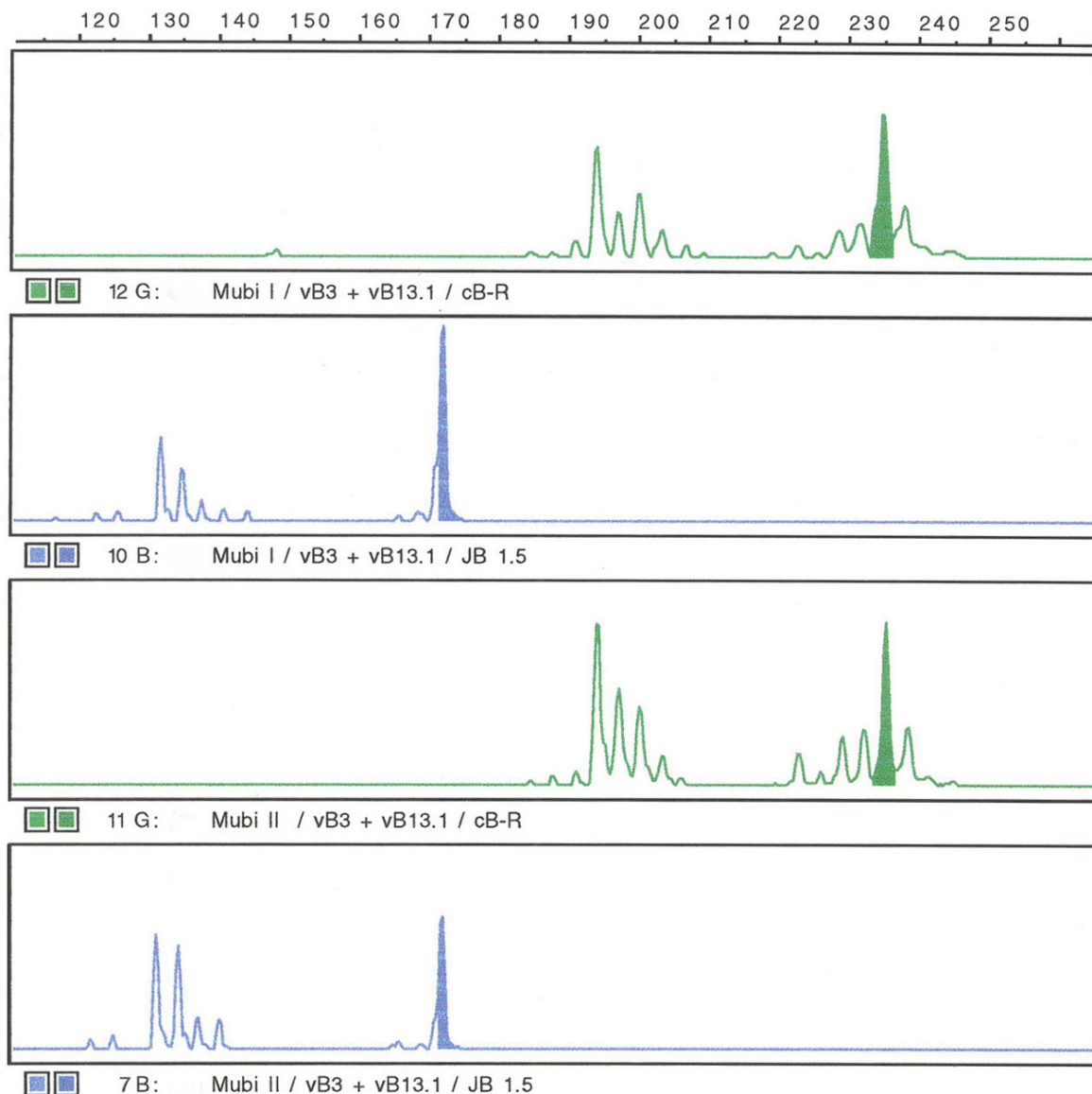


Abb. 16: Patient B. Muskelbiopsat I und II

Die farblich markierten Peaks innerhalb der BV13.1⁺Familie, bzw. BJ1.5⁺Subfamilie befinden sich bei identischer Basenpaarlänge. Sie stellen denselben expandierten T-Zell-Klon in zwei verschiedenen Muskelbiopsaten dar. Das Ausgangsmaterial wurde zur gleichen Zeit entnommen, aber getrennt bearbeitet.

Trotz leicht voneinander abweichenden Kurvenverläufen ergibt die Spectratype-Analyse die gleiche Aussage:
Eine klonal expandierte T-Zell-Subpopulation der Familie BV13.1-BJ1.5 mit identischer Länge der CDR3-Sequenz.

3.2 Ergebnisse bei der Polymyositis

3.2.1 Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire in der Muskelbiopsie

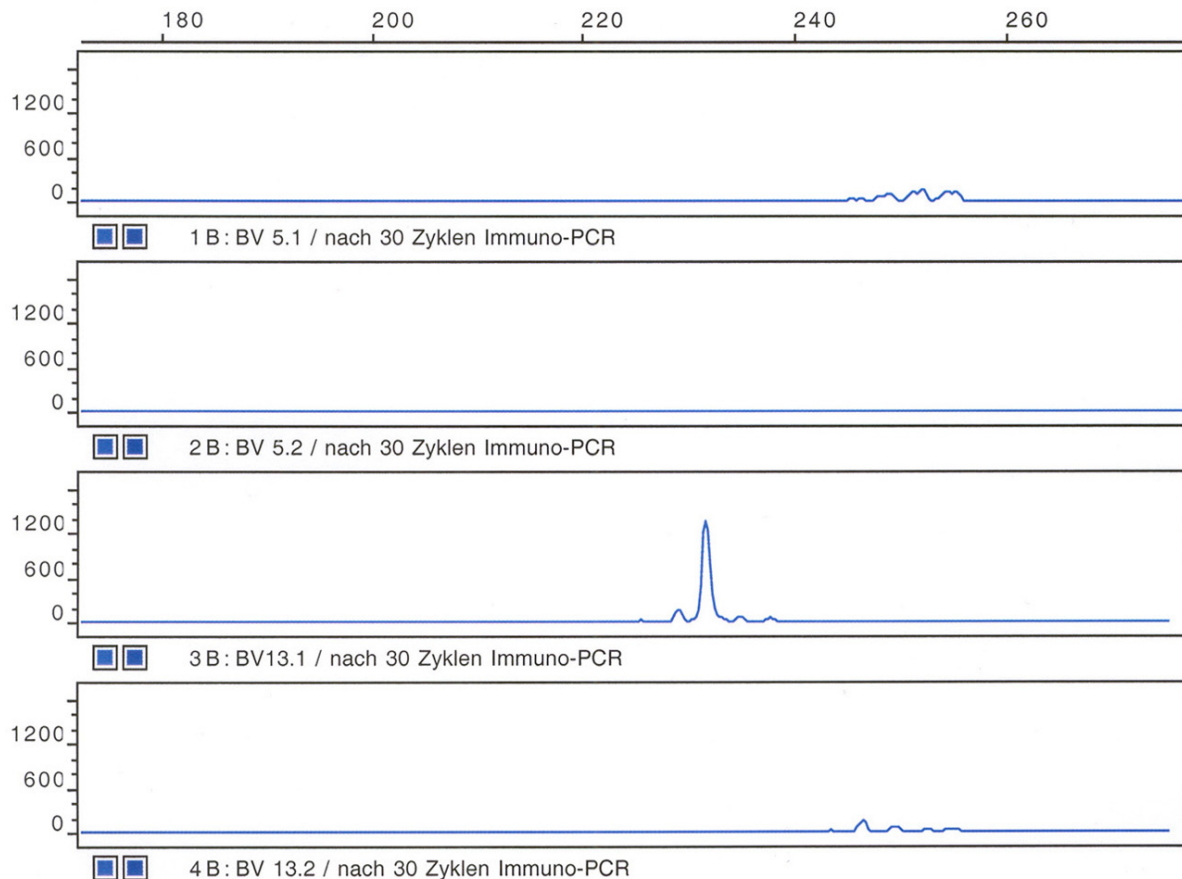
Die Kombination verschiedener Methoden (semi-quantitative und qualitative Untersuchungen durch CDR3-Spectratyping sowie automatische Sequenzierung) führt zu der Möglichkeit, das T-Zell-Rezeptor-Repertoire von Polymyositis-Patienten charakterisieren und klonal expandierte T-Zell-Populationen identifizieren zu können.

3.2.1.1 Semi-quantitative Untersuchungen

Um eine Aussage über die relative Redundanz expandierter T-Zell-Klone im entzündeten Muskel treffen zu können, wurde das CDR3-Spectratyping auch semi-quantitativ angewandt. Hierbei wurde das aus Muskelgewebe gewonnene Ausgangsmaterial BV-Familien-spezifisch amplifiziert und PCR-Produkt-Aliquots nach unterschiedlichen Zyklenzahlen entnommen, fluoreszenzmarkiert und über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Dadurch sind sowohl die charakteristische Verteilung von Sequenzlängen als auch die zyklenabhängige Zunahme des PCR-Produktes zu beurteilen. Die gewonnenen Ergebnisse sind allerdings nur von relativer Aussagekraft: In einer Biopsie ist die Menge an PCR-Produkt (entsprechend der Höhe des Peaks) einer BV-Familie mit der von anderen BV-Familien nur vergleichbar, wenn es sich um dieselbe Zyklenzahl handelt und die gleiche PCR-Effizienz der Primer vorausgesetzt werden kann.

Die Muskelbiopsien aller vier Polymyositis-Patienten wurden auf diese Weise nach dominanten expandierten T-Zell-Klonen in den einzelnen BV-Familien untersucht. Es entsteht bei einigen BV-Familien bereits nach 30 Amplifikationszyklen nachweisbares PCR-Produkt, die graphische Darstellung zeigt jedoch oft ein polyklonales Spektragramm, was eine deutlich klonal expandierte Zellpopulation ausschließt. Nach 40 Zyklen besteht im PCR-Ansatz kein weiteres Potential zur Vervielfältigung und sämtliche BV-Familien zeigen Peakhöhen, die nicht mehr mit den unterschiedlichen Ausgangsmengen korrelieren.

Als Beispiel dient Patient W. Hier erkennt man nach 30 Zyklen PCR-Produkt in der BV-Familie 13.1 und 5.1, während in anderen Familien (hier BV5.2) wesentlich weniger bis gar kein Material zu sehen ist. Zum Vergleich der graphischen Darstellung von Produkt einer Zyklenzahl wurde eine einheitliche Skalierung der Ordinate (relative Fluoreszenzintensität) verwendet.

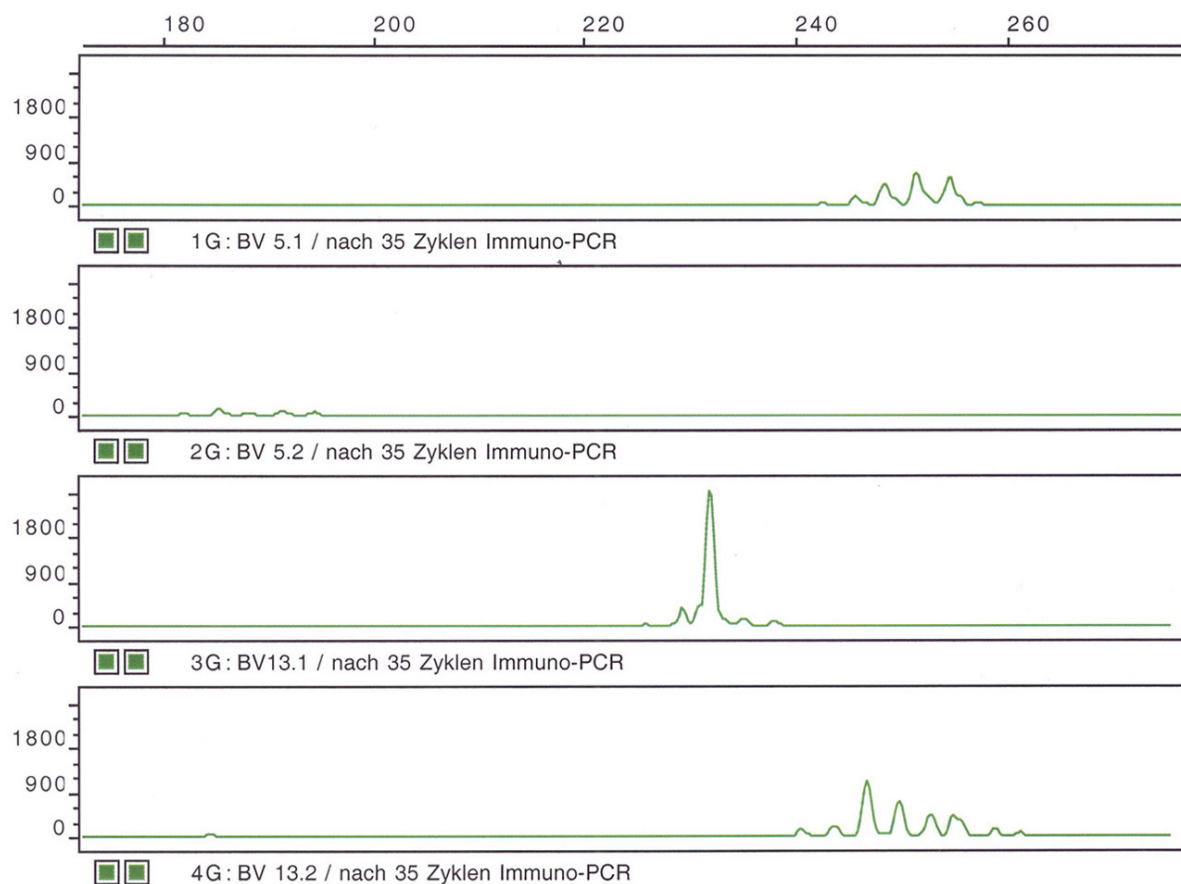


Patient W. Muskelbiopsie – 30 Zyklen PCR –

Abb. 17a: *Patient W. Muskelbiopsie nach 30 Zyklen*

Material der Muskelbiopsie von Patient W. wurde entsprechend aufbereitet und eine PCR im Programm „Immuno“ durchgeführt. PCR-Produkt wurde nach 30, 35 und 40 Zyklen entnommen und eine Fragment-Analyse durchgeführt. Beispielhaft sind hier die Ergebnisse des CDR3-Spectratyping der BV-Familien-spezifischen Amplifikation von 5.1, 5.2, 13.1 und 13.2 dargestellt. Auf der Ordinate ist die Leuchtintensität des Fluoreszenzfarbstoffs entsprechend der Menge an PCR-Produkt aufgetragen. Die Abszisse beschreibt die Basenpaarlänge der Fragmente.

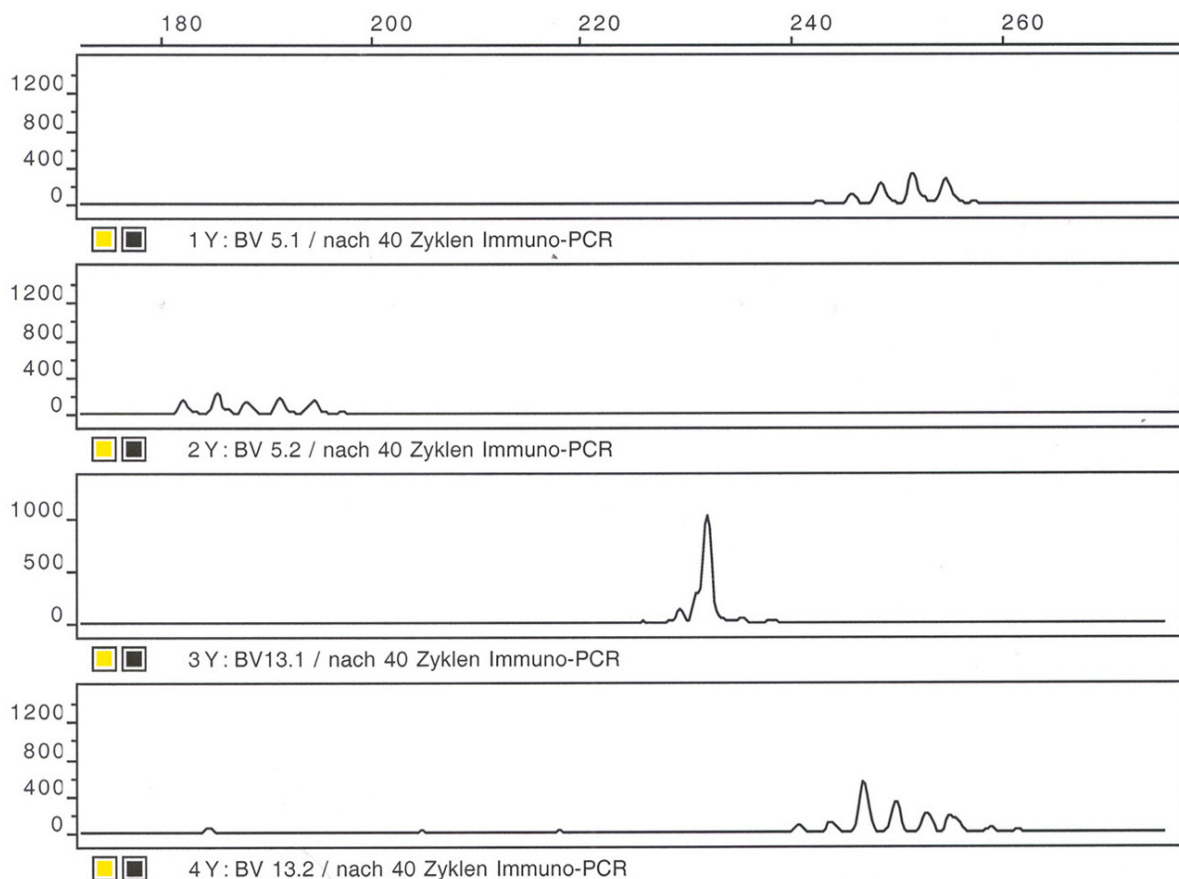
Die BV 5.1 und BV 13.2-spezifische Amplifikation (Zeile 1 und 4) zeigt nach 30 Zyklen relativ wenig Produkt unterschiedlicher Sequenzlängen im Bereich von 240-260 kBp. Nach dieser geringen Anzahl von Zyklen mit BV 5.2-spezifischen Primern zur Vervielfältigung kann kein Produkt detektiert werden (Zeile 2). Im Gegensatz hierzu entsteht relativ viel Produkt nach Amplifikation mit BV 13.1-spezifischen Primern verschiedener Längen, jedoch herausragend viel der CDR3-Sequenzlänge 231 kBp (Zeile 3).



Patient W. Muskelbiopsie – 35 Zyklen PCR –

Abb. 17b: *Patient W. Muskelbiopsie nach 35 Zyklen*

Das CDR3-Spectratyping nach 35 Zyklen „Immuno“-PCR ist vom Verteilungsmuster her mit dem Ergebnis nach 30 Zyklen identisch, allerdings ist nun auch mit BV 5.2-spezifischen Primern PCR-Produkt im Bereich von 180-200 kBp nachweisbar (Zeile 2).



Patient W. Muskelbiopsie – 40 Zyklen PCR –

Abb. 17c: Patient W. Muskelbiopsie nach 40 Zyklen

Nach 40 Zyklen PCR im Programm „Immuno“ ist die Amplifikationsrate weitgehend gesättigt, d.h. die Menge an PCR-Produkt korreliert nicht mehr mit der Ausgangsmenge an cDNA. Die BV-Familien 5.1, 5.2 und 13.2 haben zu nahezu gleicher Menge an Produkt geführt, die Verteilung der Sequenzlängen entspricht einer Gauß-Kurve. Im Unterschied hierzu erscheint nach BV 13.1-spezifischer Amplifikation überproportional viel Produkt bei genau einer Nukleotidsequenzlänge von 231kbp.

Die Ergebnisse der Fragment-Analyse nach semiquantitativer PCR beschreiben beispielhaft das T-Zell-Rezeptor-Repertoire der Muskelbiopsie des Patienten W.:

BV 5.1 dient als Beispiel einer quantitativ stark vertretenen, aber polyklonalen BV-Familie. (PCR-Produkt unterschiedlicher Basenpaarlänge ist bereits nach 30 Zyklen erkennbar, s. Abb.16a).

Eine klonal expandierte Zellpopulation, die quantitativ stark vertreten ist, stellt BV 13.1 dar (Ein dominanter Peak einer bestimmten Basenpaarlänge weicht von der Gauß'schen Verteilung ab und ist bereits nach 30 Zyklen PCR deutlich zu sehen, s. Abb.16a).

Zellen dieser Gruppe sind wahrscheinlich pathogenetisch relevant und sollen mit Hilfe des CDR3-Spectratyping identifiziert werden.

Im Gegensatz hierzu ist BV-Familie 5.2 das Beispiel einer weniger stark vertretenen polyklonalen Population (PCR-Produkt ist erst nach 35 Zyklen nachweisbar).

Das frühe Erscheinen von PCR-Produkt spricht für größere Redundanz sowohl von BV 13.1- als auch von BV 5.1-positiven Zellen, wobei die BV-Familie 5.1 als polyklonale Population vertreten ist. PCR-Produkt spezifisch für BV-Familie 5.2 wird erst nach 35 Zyklen sichtbar. Nach 40 Zyklen kann man in den BV-Familien 5.1 und 5.2 PCR-Produkt erkennen, das sich aus DNA-Fragmenten unterschiedlicher Längen zusammensetzt. Bei BV-Familie 13.1 besteht die Hauptmenge des entstandenen Produkts aus Fragmenten mit der Länge von 231 Basenpaaren. Die hohe Konzentration von PCR-Produkt einer Basenpaarlänge erklärt die relativ größere Peakhöhe.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß im entzündeten Muskel von Patient W. relativ mehr mRNA von BV 13.1- und BV 5.1-positiven Zellen vorhanden ist, allerdings nur das Spektragramm der BV-Familie 13.1 auf eine klonal expandierte Lymphozytenpopulation hindeutet. Weitere Untersuchungen sind notwendig um nachzuweisen, ob diese BV13.1-positiven T-Zellen tatsächlich pathogenetisch relevant sind, und ob die BV 5.1-positiven Zellen eventuell unspezifisch an der Entzündungsreaktion beteiligt sind.

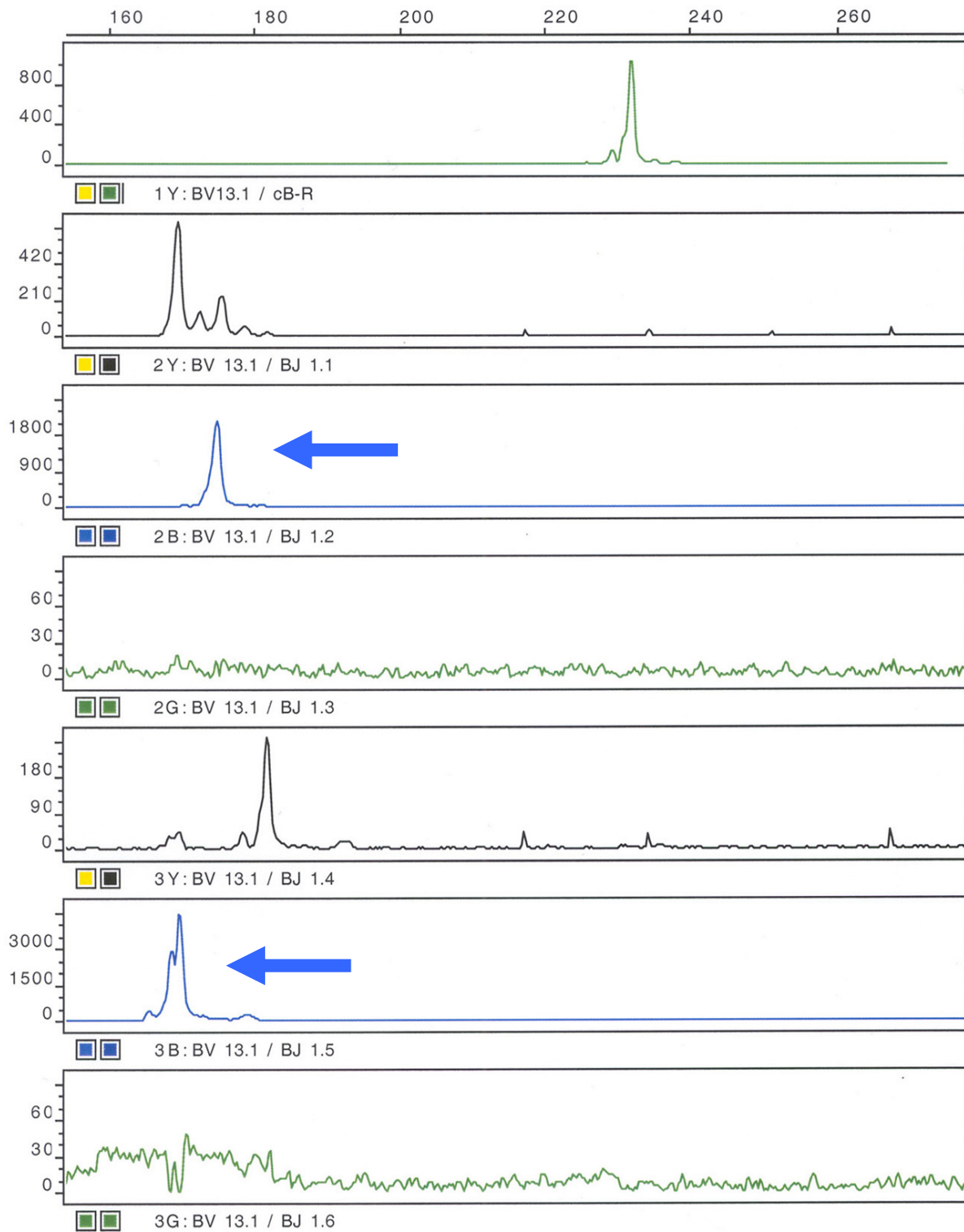
3.2.1.2 Qualitative Untersuchungen

Obwohl semi-quantitative Untersuchungen durch die Anwendung der PCR-Technik möglich sind, besteht das Ergebnis des CDR3-Spectratyping aus der qualitativen Aussage der graphischen Darstellung des CDR3-Polymorphismus.

Bei den vier Patienten zeigen die Ergebnisse des CDR3-Spectratyping der Muskelbiopsien deutliche Abweichungen von einer Normalverteilung der CDR3-Fragmentlängen. BV-Familien-spezifische PCR-Produkte, welche Peaks bei einer bestimmten Sequenzlänge besitzen, wurden auf Ebene der BJ-Subfamilien näher auf die verantwortliche Zell-Sub-Population hin untersucht.

Die folgende Graphik zeigt die Ergebnisse des CDR3-Spectratyping der BV-Familie 13.1 in der Muskelbiopsie von Patient W.:

**Patient W. BV 13.1⁺-T-Zellen
Subamplifiziert mit 13 BJ-spezifischen Primern:**

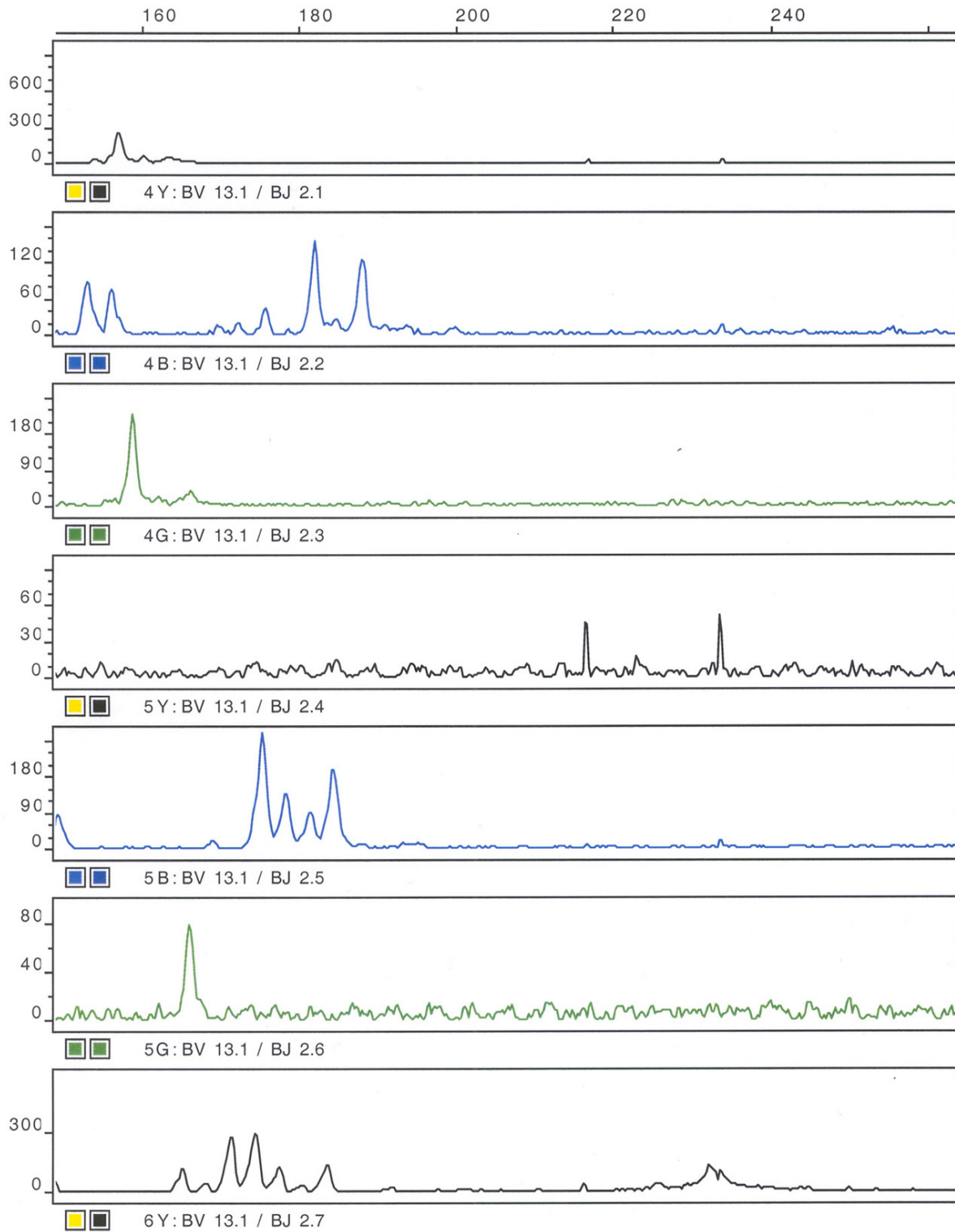


Konstante Region, BJ-Subfamilien 1.1-1.6

Abb. 18a: *Patient W. Muskelbiopsie BV 13.1, subamplifiziert mit 13 BJ-Primern*

In der ersten Zeile ist das Ergebnis des CDR3-Spectratyping der BV-Familie 13.1 aus Material der Muskelbiopsie von Patient W. dargestellt, in den weiteren Zeilen die Subpopulationen der verschiedenen BJ-Familien. Es fällt die vergleichsweise große Menge an PCR-Produkt in der Subpopulation BJ 1.2 und BJ 1.5 auf. Die Form der Graphik deutet gleichzeitig auf eine klonal expandierte Subpopulation hin.

**Patient W. BV 13.1⁺-T-Zellen
Subamplifiziert mit 13 BJ-spezifischen Primern:**



BJ-Subfamilien 2.1-2.7

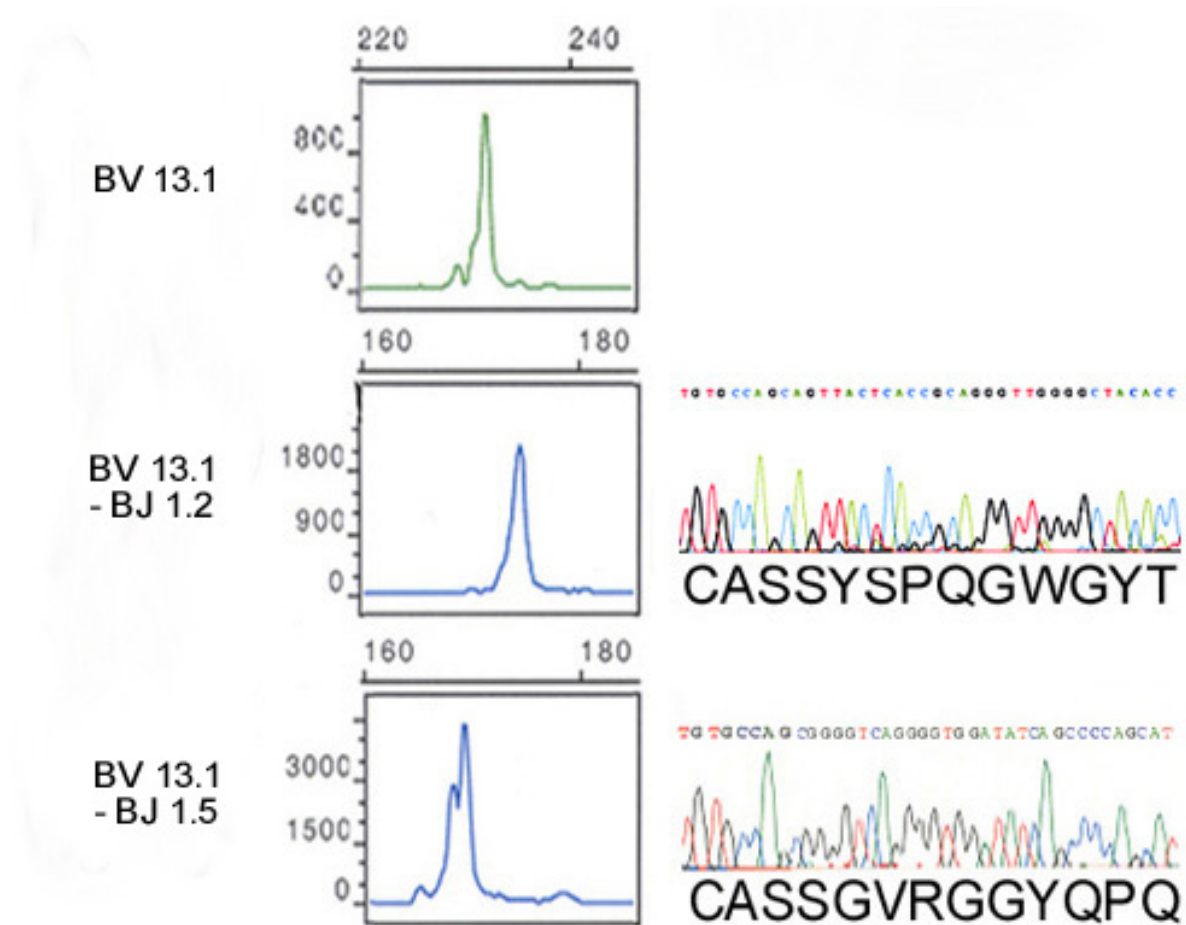
Abb. 18b:

Im Gegensatz hierzu ist z.B. durch BJ 1.3-spezifische Primer kein Produkt nachweisbar, ein einzelner Peak ist in der Subpopulation BJ 2.6 zu erkennen. Dieser deutet auf eine klonal expandierte Zell-Population hin, allerdings ist die Fluoreszenzintensität sehr gering, was dafür spricht, daß diese Population in der Muskelbiopsie quantitativ unterrepräsentiert ist. Die Subpopulation der BJ 2.7-positiven T-Zellen wiederum stellt sich als quantitativ stark vertreten und polyklonal dar.

Bei Patient W. kann man sowohl in der Subfamilie BJ1.2 als auch BJ1.5 deutliche Peaks erkennen, die im Vergleich zu anderen BJ-Subfamilien unter einer geringen Vergrößerung auffallen (siehe Skala der Ordinate). Der auffällige Peak (Ausreißer der Normalverteilung) in der graphischen Darstellung der BV13.1-positiven Zellen könnte sich aus diesen beiden Subpopulation zusammensetzen.

Die Konzentration des PCR-Produktes bei einer bestimmten Basenpaarlänge läßt zwar die Vermutung zu, daß es sich dabei um eine einzige Sequenz handelt, es kann jedoch kein Beweis sein. Erst durch die Sequenzierung der PCR-Produkte konnten die Subpopulationen identifiziert werden:

Patient W. Muskelbiopsie



**CDR3-
Spectratyping**

**Nukleotidabfolge und
Aminosäuresequenz**

Abb. 19: *Patient W. Muskelbiopsie BV 13.1-BJ 1.2 und -BJ 1.5*

Zunächst ist die sowohl in der Muskelbiopsie quantitativ (s. „semi-quantitative“ PCR und Immunhistochemie) stark vertretene als auch im CDR3-Spectratyping als klonal expandierte Population erscheinende BV-Familie 13.1 abgebildet. Danach sind die BJ-Subfamilien 1.2 und 1.5 dargestellt, aus denen sich der Peak auf BV-Ebene zusammensetzen könnte. Diese konnten ohne Subklonierung sequenziert (Cycle-Sequenzierung) werden, die Nukleotidabfolge ist eindeutig lesbar und die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen der CDR3-Region sind im Bild rechts zu erkennen. Die cDNA-Transkripte, welche mit Hilfe der BJ-Primer erstellt wurden, sind kürzer als diejenigen mit CB-R spezifischem Primer. Dies liegt an der linearen Anordnung der BV-BD-BJ-CB-Regionen (s. Abb.9).

Im Elektrospherogramm ist die eindeutige Basenabfolge erkennbar. Die Aminosäuresequenz der CDR3-Region der BV13.1-BJ1.2⁺T-Zellpopulation in der Muskelbiopsie von Patient W. lautet CASS-**YSPQGW**-GYT; im Falle der BV13.1-BJ1.5⁺ T-Lymphozyten lautet sie CASS-**GVRGGY**-QPQ.

Wäre der einzelne Peak durch eine Überlagerung von DNA-Fragmenten zustande gekommen, die rein zufällig die gleiche Länge besitzen, aber unterschiedliche Sequenzen aufweisen, würden sich verschiedene Basen überlagern und die Sequenz wäre nicht lesbar.

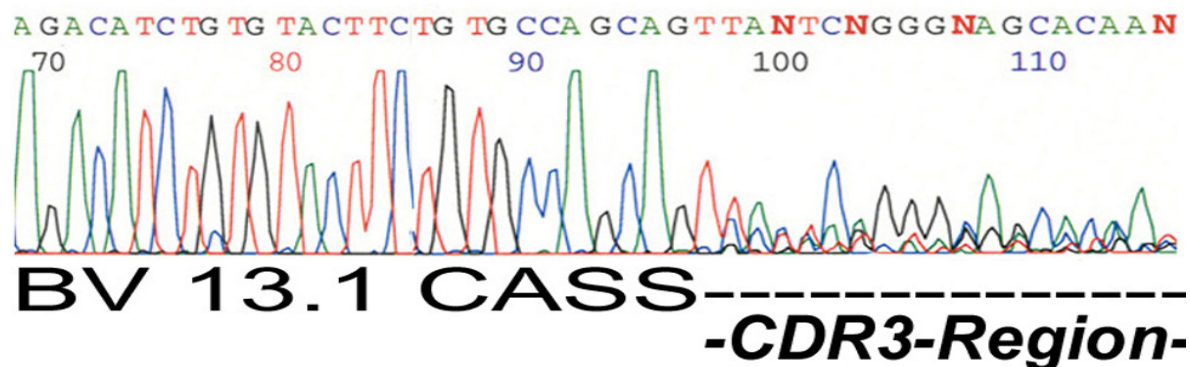


Abb. 20: *Beispiel einer unlesbaren Sequenz:
Patient B. - Zeitpunkt PBL III CD8⁺-T-Zellen*

Als Beispiel für die Sequenzierung einer polyklonalen Population sind in dieser Abbildung CD8⁺ und BV 13.1-BJ 1.5⁺ T-Lymphozyten des peripher-venösen Blutes von Patient B. (PBL III) untersucht worden. Die Nukleotidabfolge ist während der Sequenzierung der variablen Region BV 13.1 eindeutig. Bei Erreichen der 3. hypervariablen Region überlagern sich die unterschiedlichen Nukleotide und das Signal wird abgeschwächt und unleserlich.

Die Bestätigung einer klonale expandierten Zusammensetzung der Zell-Population, welche dem „Peak“ entspricht, ist durch die Lesbarkeit der Sequenz demonstriert [Even et al. 1995].

3.2.2 Vergleich der Ergebnisse von Muskelbiopsie und Blut

Nachdem mit Hilfe des CDR3-Spectratyping im entzündeten Muskelgewebe expandierte Lymphozytenklone systematisch erfaßt werden konnten, stellt sich die Frage, ob sich diese auch im Blut wiederfinden lassen. Zwar spielt sich das Krankheitsgeschehen bei der Polymyositis hauptsächlich im Muskelgewebe ab, ein Widerspiegeln des charakteristischen Verteilungsmusters von Lymphozyten im Blut macht aber deutlich, wie stark die Dominanz einer autoreaktiven T-Zelle innerhalb der Abwehrzellen eines Organismus ist. Außerdem sind bei der Polymyositis Krankheitsfälle mit Befall von weiteren

Organen außerhalb des Skelettmuskels beschrieben. Es ist also zu erwarten, daß ein pathogener expandierter T-Zell-Klon auch außerhalb des Kompartiments „Muskel“ vertreten ist.

Bei drei der vier Patienten konnte peripher-venöses Blut vor Therapiebeginn abgenommen werden. An CD4⁺ und CD8⁺ Subpopulationen des peripheren Blutes wurde ebenfalls eine CDR3-Spectratyping Analyse durchgeführt und die Ergebnisse mit denen der Muskelbiopsie verglichen. Die anschließende Sequenzierung läßt den direkten Vergleich der Basenpaarabfolge der CDR3-Region zu. Am Beispiel des Patienten B. läßt sich die charakteristische Längenverteilung der CDR3-Region von der BV 13.1- BJ 1.5-positiven Zellpopulation in Muskel und Blut vergleichen:

Patient B. - Klon BV 13.1-BJ 1.5 - CDR3-Spectratyping Muskelbiopsie und CD8⁺-T-Zellen Zeitpunkt PBL I

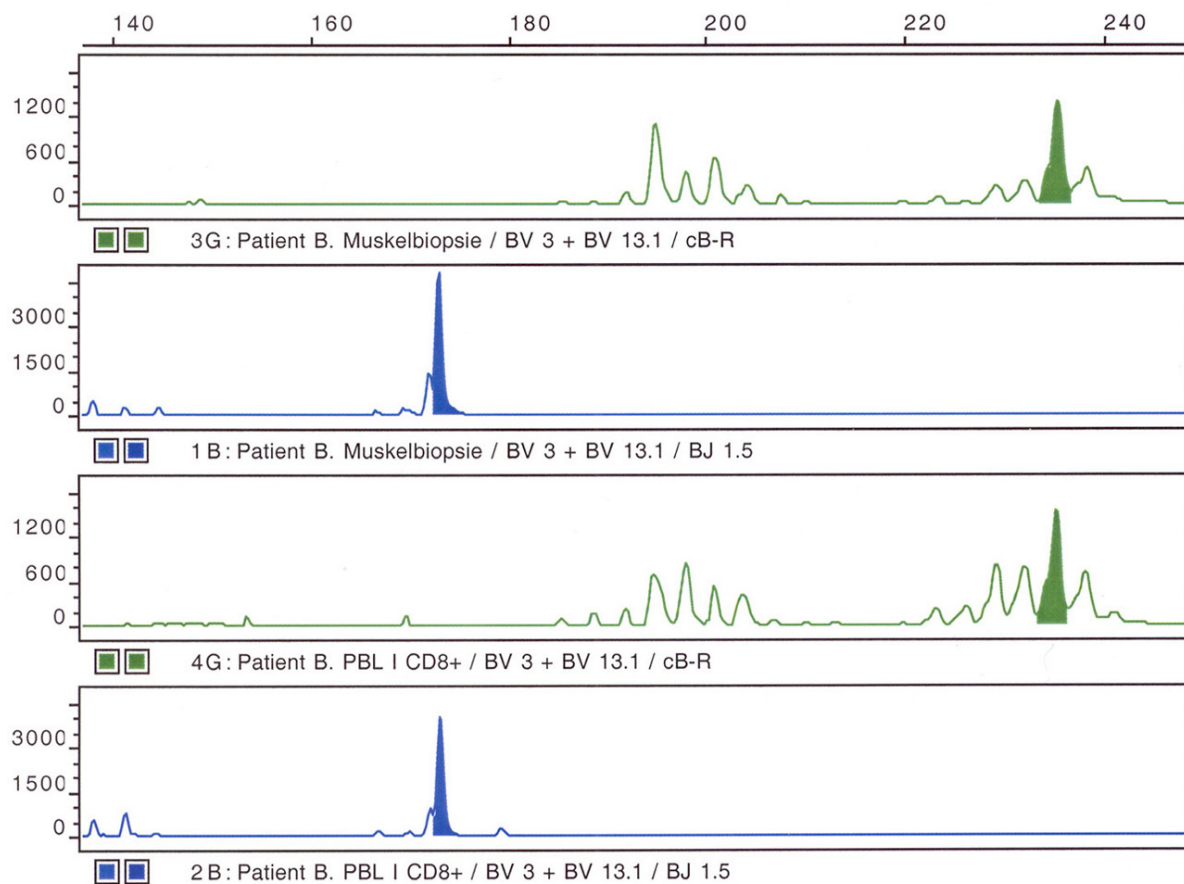


Abb. 21: *Patient B. Muskelbiopsie und CD8⁺-T-Zellen (PBL I) CDR3-Spectratyping*
Die Ergebnisse zeigen eine Übereinstimmung in der Untersuchung der BV 13.1-BJ1.5⁺T- Zellpopulation. Die entsprechenden Peaks sind farbig markiert. Aus technischen Gründen sind verschiedene BV- und BJ-spezifische Transkripte in Kombination erstellt worden (hier BV 3 und BV 13.1, s. Kap. 2.2.5)

Der Peak bei Basenpaarlänge 234 erhebt sich zwar in der Muskelbiopsie wie unter den CD8⁺ Zellen des Blutes über die eigentliche Größe einer Normalverteilungskurve, aber es zeigt sich jeweils auch bei anderen Sequenzlängen PCR-Produkt. Die Dominanz des farbig markierten Peaks ist im Blut wesentlich weniger stark ausgeprägt, was auf die dort vorhandene größere klonale Heterogenität der T-Zellen hinweist. Die Ergebnisse des CDR3-Spectratyping der BV13.1⁺ Lymphozyten weisen also auf eine relevante Modifikation des T-Zell-Rezeptor-Repertoires hin, da sie auch im Gesamtblut nachweisbar sind.

Als verantwortliche Subpopulation für den auffälligen Peak in der Ebene der BV-Familie 13.1 konnten BJ1.5-positive Zellen identifiziert werden. Die Sequenzierung von Material aus Muskelbiopsie und CD8⁺ peripheren Blutlymphozyten erbrachte übereinstimmende Ergebnisse:

Die Aminosäuresequenz der CDR3-Region lautet CASS-YSGTVG-QPQ.

**Patient B. Klon BV 13.1-BJ 1.5
-CDR3-Region-**

**Nukleotidabfolge und
Aminosäuresequenz**

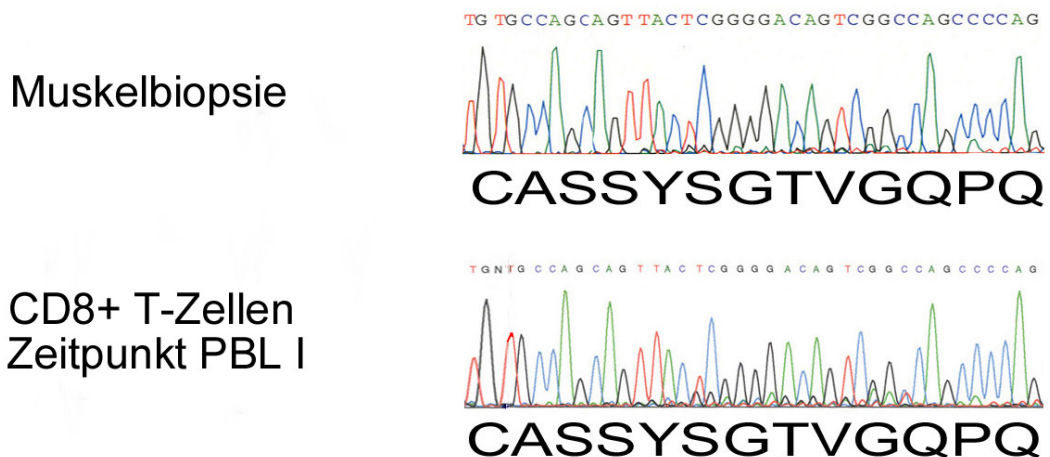


Abb. 22: Patient B. Muskelbiopsie und CD8⁺-T-Zellen (PBL I)- Sequenz
Die obere Sequenz stellt die BV 13.1-BJ 1.5 positive Subpopulation der Muskelbiopsie dar, die untere Sequenz die BV 13.1-BJ 1.5 positive Subpopulation der CD8⁺ T-Lymphozyten des peripher-venösen Blutes zu Zeitpunkt I. Die Nucleotidabfolge ist identisch, die Aminosäuresequenz der CDR3-Region lautet CASS-YGTVG-QPQ.

3.2.3 Veränderungen im CDR3-Spectratyping unter Therapie

Die gegenwärtig angewendeten therapeutischen Konzepte der Polymyositis beinhalten eine unspezifische Immunsuppression. Im Akutstadium wird die Entzündung mit Glucokortikoiden bekämpft, im chronischen behandlungsbedürftigen Stadium mit Langzeit-Immunsuppressiva wie Azathioprin.

Bei zwei der vier untersuchten Patienten konnte eine klonal expandierte T-Zell-Population in der Muskelbiopsie und im Blut identifiziert und die Veränderungen im CDR3-Spectratyping unter Therapie beobachtet werden. Ein Patient wurde als Kontrolle im zeitlichen Verlauf ohne Therapie verfolgt (eine immunsuppressive Therapie war abgelehnt worden). Vom vierten Patienten war keine Blutentnahme vor Therapiebeginn durchgeführt worden, so daß das Nichtvorhandensein des Klon zu späteren Zeitpunkten unter immunsuppressiver Therapie keine weiteren Schlüsse zuläßt.

Am Beispiel von Patient B. sind die Veränderungen im CDR3-Spectratyping von T-Zellen des peripheren Blutes deutlich erkennbar (s. Abb.23).

Unter immunsuppressiver Therapie verschwindet der dominante Peak in einer polyklonalen Population mit annähernd normalverteiltem CDR3-Spektragramm. Das relative Übermaß von amplifizierten DNA-Fragmenten einer bestimmten Basenpaarlänge, hervorgerufen durch eine klonal expandierte Lymphozytenpopulation, weicht zugunsten anderer Sequenzlängen. Besonders gut zu erkennen ist dies auf der Ebene der BV-Familien und C β -R spezifisch amplifizierten PCR-Produkte, da es sich hierbei um eine wesentlich größere Zellmenge handelt. Eine Bestimmung der Sequenz ist nicht mehr möglich.

Die Veränderungen im CDR3-Spectratyping zeigen eine der Therapie und dem Krankheitsverlauf entsprechende Entwicklung: Nach zwei Wochen Steroidtherapie (PBL II) kann in der Subpopulation von CD8-BV 13.1-BJ 1.5-positiven Zellen des Patienten B. weiterhin eine klonal expandierte Population nachgewiesen werden, deren CDR3-Spektragramm dem in Muskelbiopsie und unbehandeltem Blut identifizierten Klon entspricht. Die Dominanz des Peaks ist aber schwächer ausgeprägt. Nach eineinhalb Jahren Immunsuppression durch Cyclophosphamid und klinischer Remission bis auf eine leichte Muskelschwäche hat sich das T-Zell-Rezeptor-Repertoire des Patienten wesentlich verändert. Im polyklonalen Verteilungsmuster ist kein dominanter Peak mehr zu erkennen.

Patient B. Klon BV 13.1-BJ1.5

CDR3-
Spectratyping

Nukleotidabfolge
und Aminosäure-
sequenz

CD8+ T-Zellen
Zeitpunkt PBL I:
BV 13.1-Cβ-R

BV 13.1-BJ 1.5



CD8+ T-Zellen
Zeitpunkt PBL II:
BV 13.1-Cβ-R

BV 13.1-BJ 1.5



CD8+ T-Zellen
Zeitpunkt PBL III:

BV 13.1-Cβ-R

BV 13.1-BJ 1.5



Abb. 23: Patient B. – Klon BV 13.1-BJ 1.5 unter Therapie

Im Bild sind mittig die Spectrogramme der CD8⁺ T-Lymphozyten des peripher-venösen Blutes von Pat. B. unter Therapie zu den Zeitpunkten I, II und III zu sehen: Während zu Zeitpunkt PBL I die relevanten Peaks deutlich hervortreten, verschwinden sie unter Therapie in einer polyklonalen Population mit annähernd normalverteiltem CDR3-Spectrogramm. Rechts im Bild sind die Ergebnisse der Sequenzierreaktion von CD8⁺ T-Lymphozyten des peripher-venösen Blutes von Patient B. zu den verschiedenen Zeitpunkten unter Therapie. Die V-Region ist jederzeit eindeutig zu erkennen, da sie durch die Primer vorgegeben wird. Zu späteren Zeitpunkten unter Therapie überlagern sich verschiedene Nucleotide ab dem Beginn der CDR3-Region. Das Ergebnis der Sequenzierreaktion wird unlesbar als Zeichen für die Polyklonalität der Population.

Diese Entwicklung ist bei Pat. S. ebenfalls vorhanden, allerdings ist die Remission entsprechend des klinisch protrahierten Verlaufs weniger deutlich (s. Abb. 24).

Die Sequenzierung der BV 3 positiven Lymphozyten-Populationen von Patient S. aus Muskelbiopsie und CD8⁺ T-Zellen des peripher-venösen Blutes zeigt eine identische Nukleotidabfolge. Die Sequenz ist sowohl zu Zeitpunkt PBL I, als auch zu Zeitpunkt PBL II lesbar. Die Aminosäuresequenz der CDR3-Region lautet CASS-**SIQGS**-NEQ.

Patient S. Klon BV 3-BJ 2.1

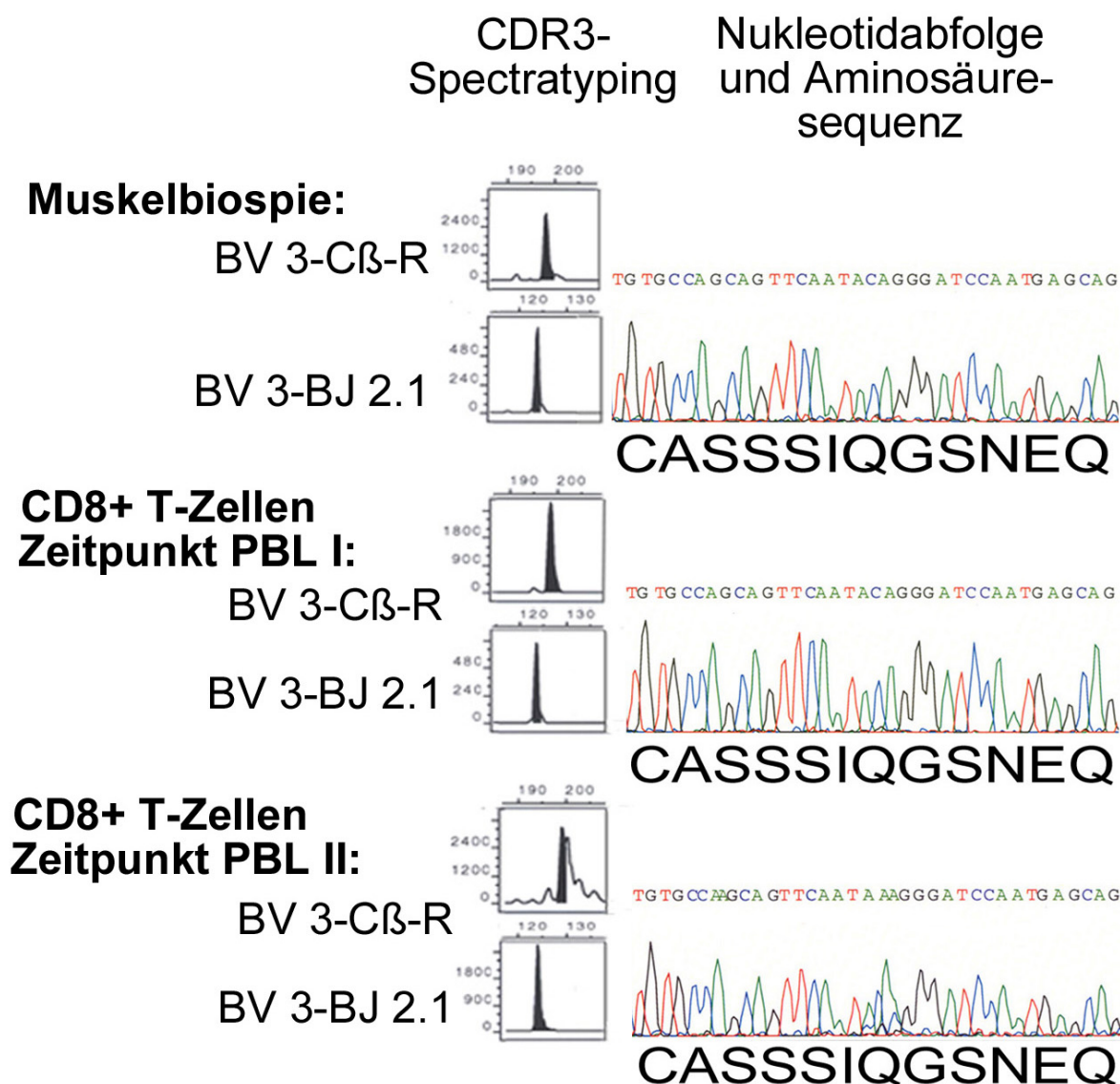


Abb. 24: Patient S. – Klon BV 3-BJ 2.1 unter Therapie

Bei Patient S. ist im Verlauf unter Therapie lediglich zu Zeitpunkt PBL II (10 Monate Einnahme von Immunsuppressiva) in der Population der BV 3⁺-T-Zellen die Andeutung einer polyklonalen Verteilung der CDR3-Längen zu erkennen. Die Patientin zeigte einen schweren Krankheitsverlauf und war zu Zeitpunkt PBL II klinisch immer noch stark eingeschränkt (respiratorisch insuffizient, intensivpflichtig). Entsprechend ist die Sequenz stets eindeutig.

Patient Z. Klon BV 1-BJ 2.6

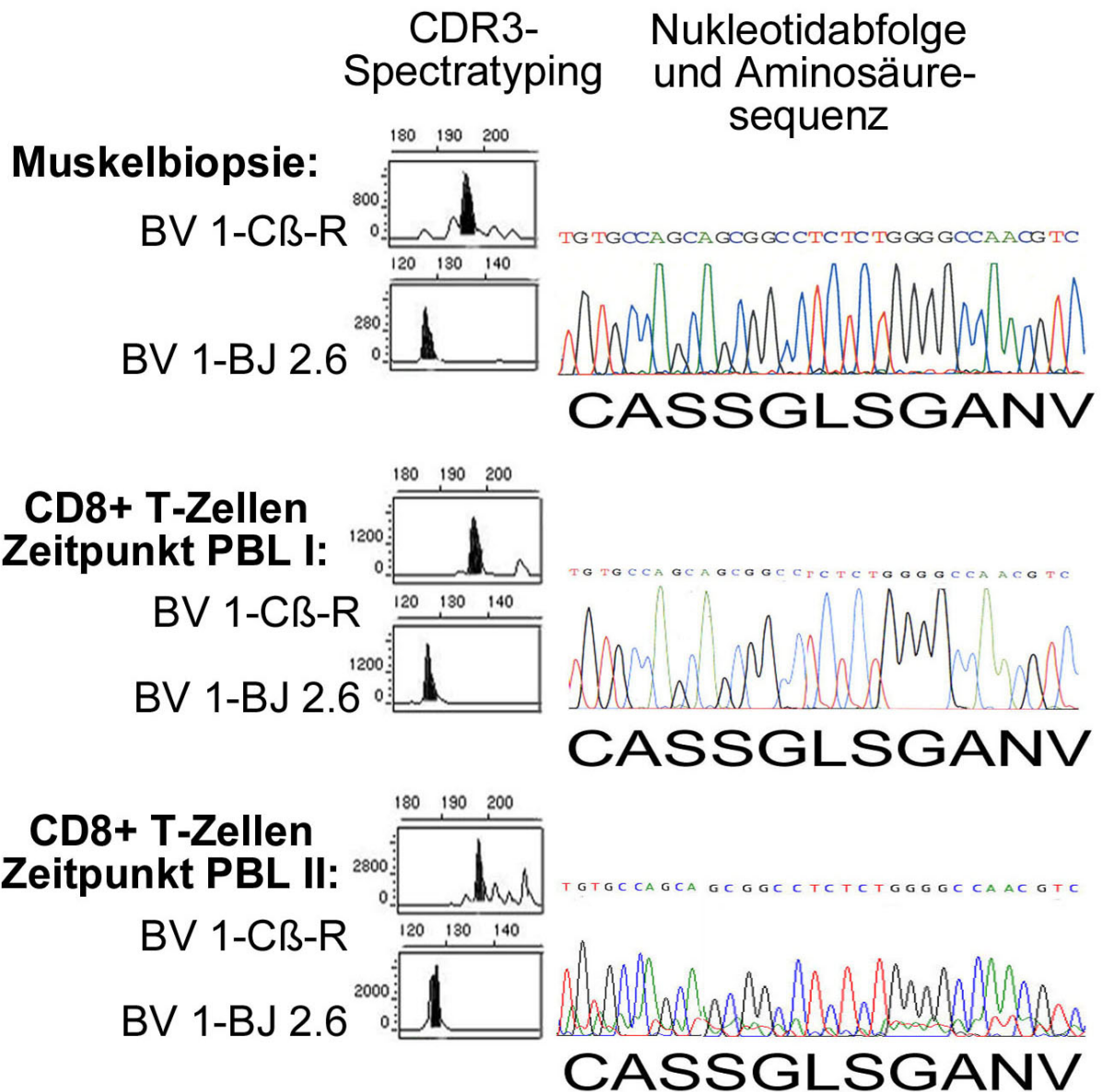


Abb. 25: Patient Z. – Klon BV 1-BJ 2.6 im zeitlichen Verlauf ohne Therapie

In der Abbildung sind zum Vergleich die Ergebnisse des CDR3-Spektrotyping von Muskelbiopsie und peripher-venösem Blut dargestellt. BV 1-BJ 2.6 positive T-Zell-Populationen fallen als stark klonal expandiert auf. Die folgende Sequenzierung nach „Nested PCR“ zeigt eine identische Nukleotidabfolge: Die vorgefundene Situation im Blut persistiert im zeitlichen Verlauf (10 Monate) ohne Therapie (Eine immunsuppressive Therapie war bei klinisch weitgehend stabilem Verlauf, hohem Lebensalter und Nebenerkrankungen abgelehnt worden).

Im Vergleich hierzu steht Patient Z. im zeitlichen Verlauf von 10 Monaten ohne Therapie (s. Abb. 25). Aus medizinischen Gründen (hohes Lebensalter, Nebenerkrankungen, klinisch stabiler Krankheitsverlauf über 15 Jahre) wurde bei dieser Patientin keine immunsuppressive Therapie durchgeführt. Die charakteristischen Veränderungen im CDR3-Spectratyping bleiben unter Fortschreiten der Krankheit bestehen.

Die Aminosäuresequenz der CDR3-Region der identifizierten klonal expandierten T-Zell-Population lautet: CASS-**GLSG**-ANV.

3.2.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ermöglicht einen Einblick in die lokale Situation im entzündeten Muskelgewebe. Aus den Muskelbiopsien der Polymyositis-Patienten wurden 5-10µm dicke Kryostatschnitte hergestellt und die T-Zellen mit Hilfe von BV-Familien spezifischen Antikörpern fluoreszenzgefärbt. Bei den vier Patienten waren mit der molekularbiologischen Methode des CDR3-Spectratyping jeweils bestimmte klonal expandierte T-Zell-Populationen identifiziert worden. Zur Gegenfärbung kamen fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen CD8 zur Anwendung.

BV-Familien spezifisch gefärbte Zellen wurden im Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich ihrer Lage zu den Muskelfasern bestimmt: CD8⁺-T-Zellen, die sich an unbeschädigte Muskelfasern anlagern und in sie eindringen, konnten als autoinvasiv und wahrscheinlich pathogenetisch relevant charakterisiert werden. Vermutlich unterhalten die T-Zellen im Interstitium unspezifisch die Entzündungsreaktion [Steinman 1996] [Bender et al. 1995].

Eine quantitative Untersuchung der Muskelbiopsie von Patient W. wurde von Bender et al. [Bender et al. 1995] durchgeführt und veröffentlicht (s. Kapitel 4.2). Im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen mittels Einzel-Zell-PCR konnten Aussagen über den relativen Anteil bestimmter Zell-Klone innerhalb der Gruppe Muskelfaser-invadierender BV 13.1⁺ Lymphozyten in den Muskelbiopsien von Patient B. und Patient W. getroffen werden (s. Kapitel 4.2) [Hofbauer et al. 2003].

Patient B. CD8⁺ T-Zellen

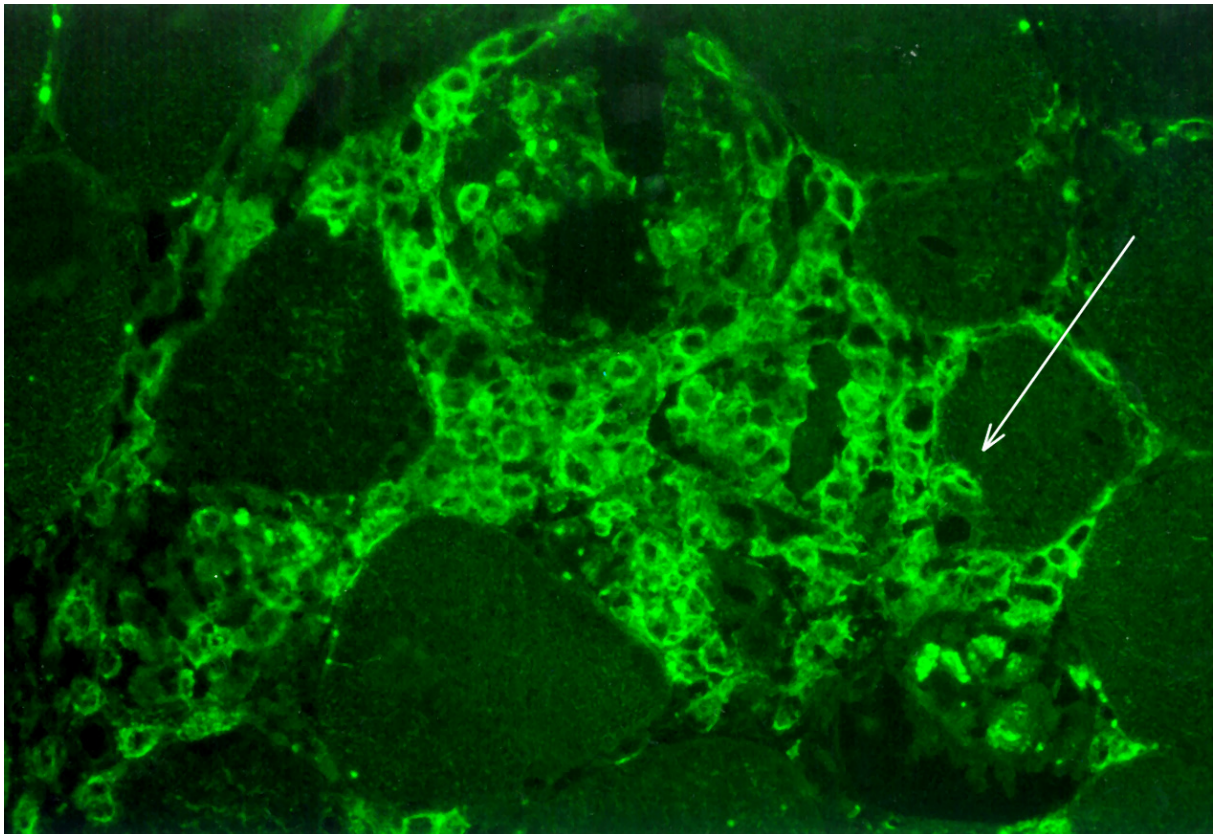


Abb. 26: *Patient B. CD8⁺ T-Zellen (Immunhistochemie)*

Das Dia zeigt am Beispiel eines Kryostat-schnittes der Muskelbiopsie von Patient B. das typische endomysiale Infiltrat bei der Polymyositis. Die CD8⁺ T-Lymphozyten sind Fitc-markiert und erscheinen grün. Der Pfeil deutet auf eine autoaggressive T-Zelle, welche eine bisher unbeschädigte Muskelfaser invadiert. (Ø T-Lymphozyt ca. 7µm)

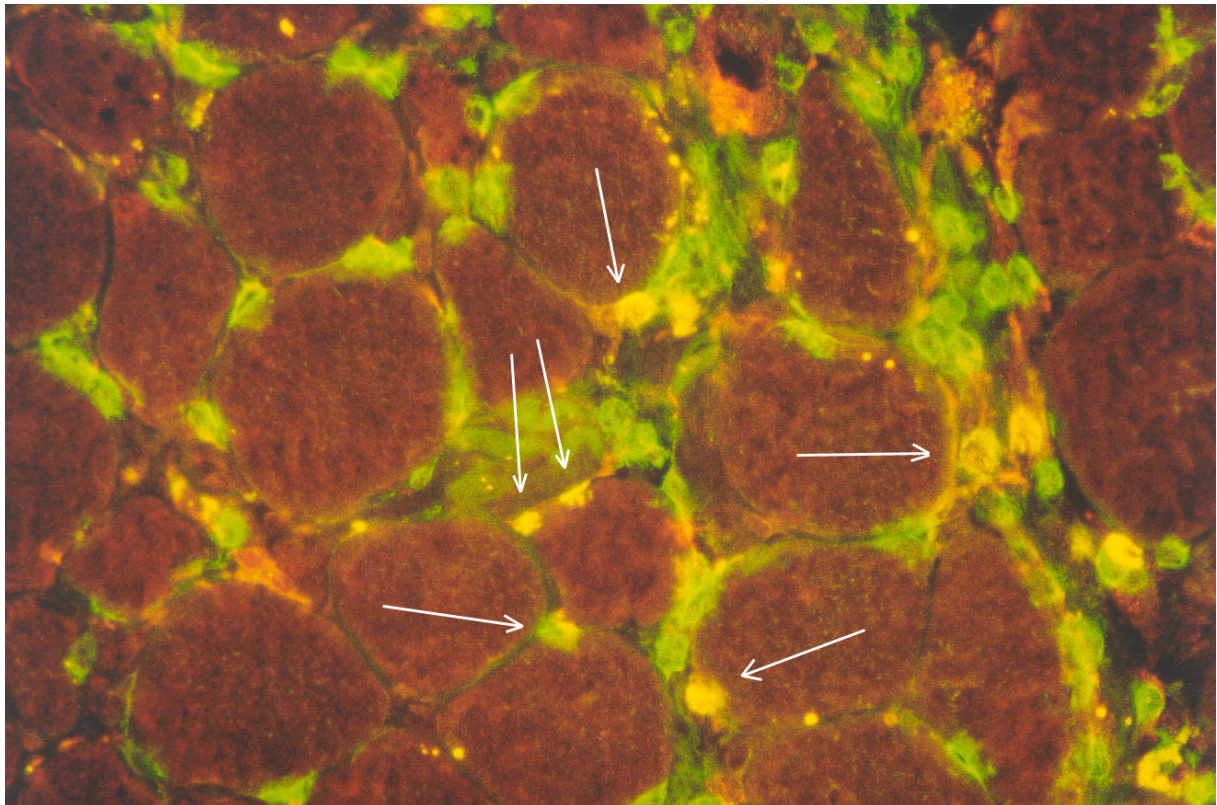
Patient B. CD8⁺BV13.1⁺ T-Zellen

Abb. 27: *Patient B. CD8⁺BV13.1⁺ T-Zellen (Immunhistochemie)*

Diese Abbildung zeigt die Muskelbiopsie von Patient B. in der Doppelfärbung CD8⁺ Fitc-markiert (grün) und BV13.1⁺ Cy3 (rot). Doppel positive Zellen erscheinen gelb-orange. Die Pfeile deuten auf CD8⁺ T-Zellen, die der BV-Familie 13.1 angehören. Sie lagern sich an intakte Muskelfasern an. (Ø T-Lymphozyt ca. 7µm)

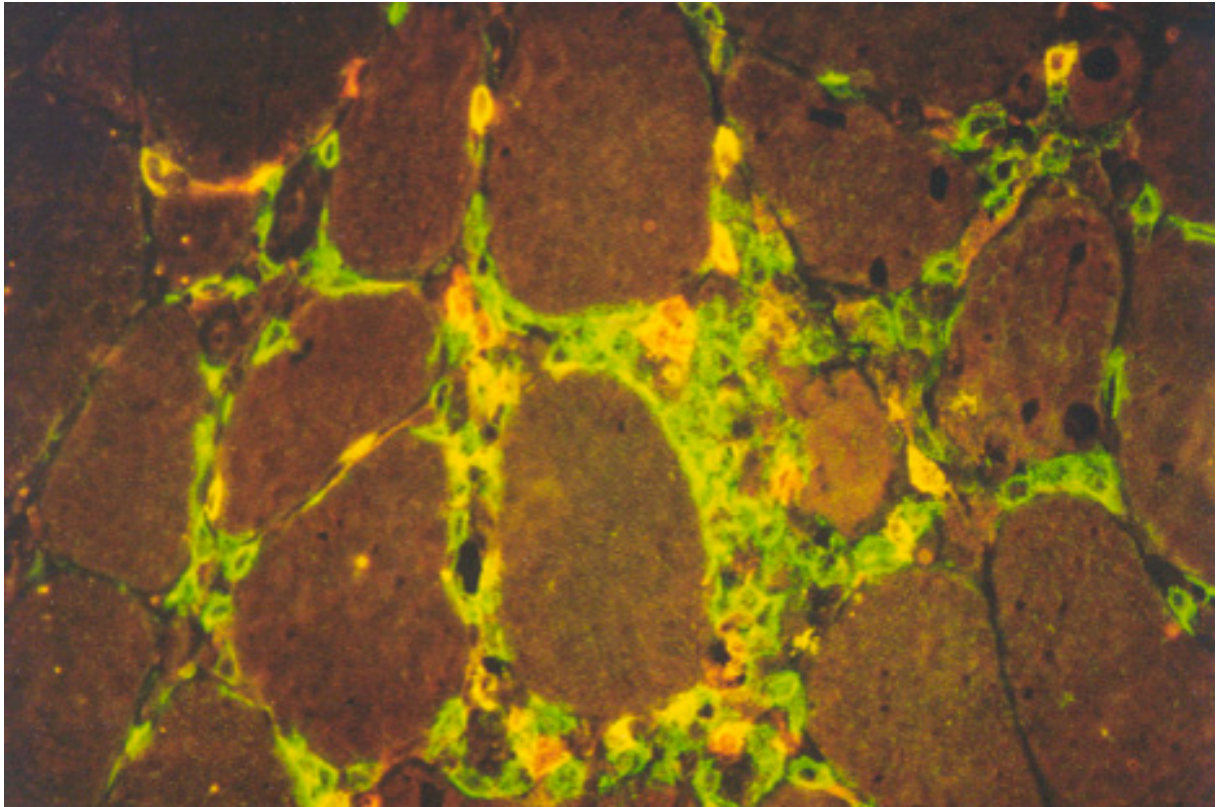
Patient W. CD8⁺BV13.1⁺ T-Zellen

Abb. 28: *Patient W. CD8⁺BV13.1⁺ T-Zellen (Immunhistochemie)*

Immunfluoreszenzfärbung eines ca. 7µm dicken Kryostatschnittes der Muskelbiopsie des Patienten W. CD8-positive T-Lymphozyten leuchten grün, BV 13.1-positive Zellen rot. In der Doppelfärbung erscheinen Zellen gelb-orange, welche beide Marker aufweisen. Die überdurchschnittlich starke Vertretung der BV-Familie 13.1 fällt auf. (Ø T-Lymphozyt ca. 7µm)

3.2.5 HLA-Typisierung

Die Rolle des MHC-Komplexes für die Vermittlung von T-Zell-Bindung an Zielantigene wurde bereits in den Kapiteln 1.1.2, 1.1.3 und 2.1.9 diskutiert.

Bei den untersuchten Polymyositis-Patienten konnten folgende Konstellationen an HLA-Typen identifiziert werden:

Patient W.:	A2/32	B27/44	Cw2/w3	DR2/w11
Patient B.:	A2/33	B7/50	Cw6/w7	DR2/11
Patient S.:	A26/28	B8/38	Bw4/6	DR3/10
Patient Z.:	A24/31	B8/50	Cw7	DR3/11

Die Ergebnisse stammen aus dem Labor für Immungenetik (Nationales Referenzlabor für Gewebetypisierung, München).

3.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchungen des T-Zell-Rezeptor-Repertoires von vier Polymyositis-Patienten mit der Technik des CDR3-Spectratyping zeigen folgende Ergebnisse:

Bei einem Patienten (Patient W.) konnten aus Material der Muskelbiopsie klonal expandierte Subpopulationen identifiziert werden. Diese Zellklone waren 1995 bereits beschrieben worden. Die damaligen Untersuchungen waren mit anderen Techniken durchgeführt worden, welche das Erstellen von TCR-Mini-Bibliotheken in *E. coli* Bakterien, deren Kultivierung und Sequenzierung sowie die Immunhistochemie beinhalten. [Bender et al. 1995]

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in Muskelbiopsie und Blut von drei Patienten (Patient B., S. und Z.) wurden jeweils übereinstimmende expandierte T-Zell-Klone in Muskel und Blut mittels des CDR3-Spectratyping wiedergefunden. Das Material zu diesen Untersuchungen war vor Beginn einer spezifischen Therapie der Polymyositis gewonnen worden.

Weitere Blutentnahmen fanden bei den vier Patienten zu späteren Zeitpunkten statt. Drei wurden mit Immunsuppressiva behandelt, einer (Patient Z.) erhielt keine Therapie. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse zeigt den Rückgang der Dominanz der expandierten T-Zell-Klone innerhalb des TZR-Repertoires der drei Patienten, bei welchen eine immunsuppressive Therapie durchgeführt worden war. Bei der unbehandelten Patientin Z. persistierte der identifizierte T-Zell-Klon.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Diskussion der Methode

Das Identifizieren von klonal expandierten, autoaggressiven T-Zellen im Rahmen von Autoimmunerkrankungen gestaltet sich schwierig und kann nur über den Antigen-spezifischen, Zell-Klon-eigenen T-Zell-Rezeptor stattfinden. Zur Identifikation von expandierten Zell-Klonen ist eine gleichwohl sensitive wie in der Anwendung praktikable Methode nötig. Dies scheint mit der Technik des CDR3-Spectratyping gegeben zu sein. Aufgabe der vorliegenden Arbeit ist zunächst die Beurteilung dieser molekularbiologischen Methode hinsichtlich dieser Zielsetzung. Im weiteren wurde die Technik zur Charakterisierung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires bei der Polymyositis eingesetzt.

Die Technik des CDR3-Spectratyping, angewendet an cDNA aus Muskelgewebe und Subfraktionen des peripheren Blutes von Polymyositis-Patienten, wurde in verschiedenen Versuchen bezüglich ihrer Validität, Reliabilität und Sensitivität überprüft. Das Ziel der Untersuchungen besteht in der Identifikation klonal expandierter Subpopulationen inmitten einer polyklonalen Gesamtmenge an T-Lymphozyten. Erstmals beschrieben wurde die Methode von Kourilsky et al. [Pannetier et al. 1995] in Zusammenhang mit malignen Erkrankungen.

Ein direkter Vergleich der Methode mit anderen Techniken ist möglich, da Bender et al. [Bender et al. 1995] Material von Patient W. hinsichtlich derselben Fragestellung untersuchten. Es wurden BV-spezifische PCR-Produkte mittels bakterieller Vektoren subkloniert und eine limitierte Anzahl der resultierenden Kolonien sequenziert. Sie fanden eine ausgeprägte Prädominanz von BV5.1 und BV13.1 positiven T-Zellen im Muskelgewebe, wobei die BV13.1⁺ Zellpopulation aus wenigen expandierten Lymphozyten-Klonen

zusammengesetzt war, während die BV5.1⁺ Population eine heterogene Zusammensetzung aufwies. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Muskelbiopsie des Patienten W. in der semi-quantitativen Untersuchung eine verstärkte Repräsentanz der BV5.1⁺ und der BV13.1⁺ T-Zellpopulationen. Die CDR3-Spectratyping Muster stellen im Fall der BV5.1⁺-Lymphozyten eine polyklonale Population mit einer Gauß'schen Verteilung der Sequenzlängen dar. In der Gruppe der BV13.1⁺ Lymphozyten findet sich ein dominanter Peak (Ausreißer der Normalverteilung), der in der BJ-Subanalyse zu zwei klonal expandierten Subpopulationen führt. Die in unseren Versuchen bestimmte Sequenz der CDR3-Region dieser Subpopulationen ist identisch mit den Ergebnissen von Bender et al.

Muskelbiopsie Patient W.:

Klon BV13.1-BJ1.2: Aminosäuresequenz der CDR3-Region: CASS-**YSPQGW**-GYT

Klon BV13.1-BJ1.5: Aminosäuresequenz der CDR3-Region: CASS-**GVRGGY**-QPQ

Die übereinstimmenden Ergebnisse, die mit Hilfe von zwei unterschiedlichen Methoden erreicht werden konnten, sind ein Beleg für die Validität des CDR3-Spectratyping.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde peripher-venöses Blut von Polymyositis-Patienten mit Hilfe von Antikörpern (welche an magnetische Polystyrolpartikel gebunden sind) in CD4- und CD8-positive Lymphozyten aufgeteilt und durch CDR3-Spectratyping auf klonal expandierte Subpopulationen hin untersucht. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß die entzündlichen Infiltrate bei der Polymyositis durch CD8⁺T-Lymphozyten charakterisiert sind, die HLA-Klasse I positive Muskelfasern umgeben, in sie eindringen und zerstören [Hohlfeld et al. 1994] [Dalakas 1991] [Engel et al. 1994]. CD4-positive T-Zellen spielen wahrscheinlich keine pathogenetisch relevante Rolle. Dies spiegelt sich in den Ergebnissen des CDR3-Spectratyping wieder: Die Gruppe der CD4⁺Lymphozyten zeigt keine auffälligen Abweichungen von der Normalverteilung der Sequenzlängen. Es gibt keinen Hinweis auf klonal expandierte Zell-Populationen von CD4⁺-T-Lymphozyten der untersuchten Patienten. Dies unterstreicht die Variabilität der Methode.

In Kapitel 3.1 ist in der zeitlich getrennten Untersuchung zwei verschiedener Muskelbiopsiestücke (zu gleicher Zeit demselben Patienten entnommen) die Reproduzierbarkeit des CDR3-Spectratyping dargestellt: Die erhaltenen Graphiken sind nicht identisch, beinhalten aber dieselbe Aussage, die Prädominanz eines BV13.1 positiven Zellklons. Diese Untersuchung zeigt zudem die räumliche Persistenz expandierter T-Zell-Klone im entzündeten Muskelgewebe.

Untersuchungen zur Sensitivität des CDR3-Spectratyping wurden von Cochet et al. [Cochet et al. 1992] veröffentlicht und zeigen die Nachweismöglichkeit eines T-Zell-Klons bis zu einer Verdünnung von ca. 1:5.000 in einer polyklonalen Population. Mit Hilfe der bisher verwendeten Untersuchungstechniken (Klonierung, Zellkultur und Sequenzierung) konnte die Prädominanz bestimmter im entzündeten Muskelgewebe stark angereicherten BV-Familien bei der Polymyositis gezeigt werden [Mantegazza et al. 1993] [Lindberg et al. 1994], es gelang jedoch nicht der Nachweis von klonal expandierten Populationen außerhalb des Kompartiments „Muskel“ [Bender et al. 1995] (Dieser Vergleich bezieht sich nicht auf

Patient W., da das Untersuchungsmaterial Blut (PBL I) nach Therapiebeginn gewonnen wurde und auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit keinen Nachweis des im Muskel identifizierten T-Zell-Klons im Blut zeigen). Allerdings scheint die Spezifität auf Ebene der BJ-spezifischen Subfamilien eingeschränkt zu sein. Im Rahmen von weiterführenden Untersuchungen wurden durch Einzel-Zell-PCR von BV 13.1⁺ T-Zellen der Muskelbiopsie von Patient B. zwei weitere expandierte Zell-Klone identifiziert (BJ 1.2 und BJ 2.2). Diese waren quantitativ annähernd gleich stark vertreten wie die BJ 1.5⁺ Zellpopulation. [Hofbauer et al. 2003]

Mit Hilfe der Technik des CDR3-Spectratyping konnten mehrere der im Muskel identifizierten klonal expandierten T-Lymphozyten-Populationen bei Untersuchungen von peripher-venösem Blut von Polymyositis-Patienten nachgewiesen werden, solange die Blutentnahme vor spezifischer hochdosierter immunsuppressiver Therapie und im akuten Erkrankungszustand stattfand. Mehrfach wurde ein Befall weiterer Organsysteme bei der PM beschrieben [Hohlfeld et al. 1993] [Goebels et al. 1998]. Dieses Ergebnis korreliert mit der systemischen Natur der Polymyositis und legt die Vermutung nahe, daß der bisher nicht gelungene Nachweis der T-Zell-Klone im Blut z.T. auf die mangelnde Sensitivität früherer Untersuchungsmethoden zurückzuführen ist.

Der Vorteil des CDR3-Spectratyping liegt in der Systematik der Technik, die unabhängig ist von zufälligen in-vitro Erscheinungen bei Transfektion und Zellkultur. Bezüglich der Sensitivität bestehen große Vorzüge im Vergleich mit anderen Untersuchungsmethoden, die Spezifität kann durch Kombination mit der Einzel-Zell-PCR erhöht werden. Das Verfahren ist zur Charakterisierung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires und zur Identifikation von expandierten T-Lymphozyten-Klonen sehr gut geeignet.

4.2 Untersuchungsergebnisse bei der Polymyositis

Klonal expandierte CD8⁺-T-Lymphozyten-Populationen sind sowohl bei der Polymyositis [Bender et al. 1995] [Mantegazza et al. 1993] als auch bei anderen entzündlichen Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose [Babbe et al. 2000] und der Rheumatoiden Arthritis [Hall et al. 1998] beschrieben worden. Eine funktionelle Bedeutung bei der Pathogenese dieser Erkrankungen wird vermutet, die potentiell gewebeschädigende Wirkung von CD8⁺-T-Zellen konnte bereits demonstriert werden [Goebels et al. 1996].

Positive Ergebnisse bei der Suche nach klonal expandierten T-Zell-Populationen sind allerdings nur der erste Schritt auf dem Weg der Charakterisierung pathogener Zellinfiltrate. Es stellt sich die Frage, ob in entzündetem Gewebe identifizierte T-Zell-Klone nur das Abbild des T-Lymphozyten-Verteilungsmuster des Blutes eines Individuums darstellen. Diese klonal expandierten Zell-Populationen könnten sich unspezifisch in Entzündungen anreichern und nicht ursächlich am Entstehungsprozeß der Erkrankung beteiligt sein. Auch im Blut von gesunden, insbesondere älteren Individuen konnten expandierte T-Zell-Klone, hauptsächlich in der CD8-positiven Fraktion, gefunden werden [Schwab et al. 1997]. Inwieweit diese beim Menschen ein Abbild seiner persönlichen Antigen-Erfahrung darstellen bleibt weiterhin zu untersuchen. Das charakteristische Muster der CDR3-Region zeigt bei gesunden Individuen keinen Anhalt einer HLA-Abhängigkeit und eine gewisse Stabilität in zeitlicher Entwicklung [Pannetier et al. 1995]. Beispielsweise konnte die klonale Expansion von $\alpha\beta$ -CD4⁻CD8⁻ Escherichia coli-spezifischen T-Zellen bis zu 7% der peripheren Blutlymphozyten bei gesunden Probanden gezeigt werden [Dellabona et al. 1993].

Abgesehen von einem oligoklonalen Verteilungsmuster der CD8⁺ T-Zellen bei Gesunden können Subpopulationen von klonal expandierten Zellen in Läsionen von Kranken gefunden werden: Tumor-infiltrierende Lymphozyten von Melanom-Patienten zeigen expandierte T-Zell-Klone, die sich nur bedingt im Gesamtblut widerspiegeln und zum Teil unter Tumorregression verschwinden [Ferradini et al. 1991]. Im Falle eines abgestoßenen Herz-Transplantats bei einer Ratte fand sich unter den infiltrierenden Lymphozyten eine auffällige Dominanz eines bestimmten BV-Gen-Segments [Shirwan et al. 1993].

Im Falle der Polymyositis stellt sich ebenfalls die Frage nach der pathogenetischen Relevanz identifizierter expandierter Lymphozyten-Populationen. Durch die Möglichkeit der Entnahme einer Muskelbiopsie und somit der morphologischen Untersuchung des entzündlichen Infiltrates konnten bisher wichtige Erkenntnisse über die Interaktion von T-Lymphozyten und Ziel-Muskelfasern gewonnen werden. Goebels et al. zeigte in Aufnahmen mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie die Attacke von sich an die Muskelfaser anlagernden T-Zellen: Intrazellulär nachgewiesenes Perforin, ein zytotoxisches Effektormolekül, war vektoriell gegen die Muskelzelle ausgerichtet [Goebels et al. 1996]. Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, daß einige CD8⁺ T-Zellen und Makrophagen die Basallamina der anfangs nicht nekrotischen Muskelzelle durchdringen und dort spikeähnliche Ausläufer bilden [Arahata et al. 1986]. Die CD8⁺ T-Zellen innerhalb der

entzündlichen Infiltrate bei der Polymyositis können zwei unterschiedlichen Arten angehören: Einige lagern sich an intakte Muskelfasern an, umzingeln sie und dringen schließlich in sie ein.

Andere T-Zellen befinden sich hauptsächlich im Interstitium und beteiligen sich wahrscheinlich unspezifisch an einer bereits initiierten Entzündung im Muskelgewebe [Engel et al. 1994] [Dalakas et al. 1996] [Hohlfeld et al. 1994]. Weitere Zellen des Immunsystems unterhalten die Entzündungsreaktion, was zu der Degeneration der Muskelfaser führt. Somit gibt es Hinweise, daß die Lokalisation von CD8⁺ T-Lymphozyten eine Aussage über deren pathogenetische Relevanz zuläßt. Bender et al. [Bender et al. 1995] fanden unter Anwendung einer Kombination von Immunhistochemie und konventioneller PCR Hinweise dafür, daß klonal expandierte T-Lymphozyten vermehrt direkt um und in Muskelfasern bei der Polymyositis zu finden sind, während im Interstitium lokalisierte T-Zellen eine polyklonale Zusammensetzung aufweisen. Bender et al. verwendeten bei ihren Untersuchungen unter anderem dasselbe Muskelbiopsat von Patient W., welches auch für die Versuche dieser Arbeit mittels CDR3-Spectratyping zur Verfügung stand. Bender et al. konnten ein stark erhöhtes Vorkommen von T-Zellen der BV-Familie 5.1 und 13.1 zeigen, allerdings war die Gruppe der BV5.1⁺ T-Zellen heterogen, während BV13.1⁺ T-Zellen klonal expandiert waren. Das Ergebnis der Immunhistochemie zeigte einen Anteil von 32% BV13.1⁺ und 16% BV5.1⁺ Zellen an der Gesamtpopulation der CD8⁺ T-Lymphozyten, aber in der Gruppe der autoinvasiven T-Lymphozyten lag der Anteil an BV13.1⁺ Zellen bei 60% und der BV5.1⁺ Zellen bei nur 10%. In weiterführenden Untersuchungen wurden die durch CDR3-Spectratype-Analyse identifizierten klonal expandierten T-Zell-Populationen der vier Patienten bezüglich ihrer Invasivität überprüft. Hofbauer et al. [Hofbauer et al. 2003] führten bei Patient W. und Patient B. sowie zwei weiteren Polymyositis-Patienten Untersuchungen mittels Einzel-Zell-PCR durch. BV-Familien-spezifische monoklonale Antikörper wurden zur Färbung der als autoinvasiv geltenden T-Zellen verwendet. Die so markierten, Muskelfaser-infiltrierenden Zellen konnten nun durch eine Laser-assistierte Einzel-Zell Microdissektion aus der Muskelbiopsie herausgelöst werden. Mit Hilfe der PCR wurde die Nukleotidabfolge der CDR3-Region dieser Zellen bestimmt. Die Ergebnisse bestätigen die Invasivität, also die potentielle Pathogenität der in der CDR3-Spectratype-Analyse identifizierten CD8⁺-T-Zell-Klone. Bei Patient W. zeigten sich 36,4% der zur Einzel-Zell-PCR gewonnen invasiven T-Zellen als BV 13.1-BJ 1.2 (Aminosäuresequenz: CASS-**YSPQGW**-GYT) positiv, 18,2% waren BV 13.1-BJ 1.5 (Aminosäuresequenz: CASS-**GVRGGY**-QPQ) positiv (in dieser Gruppe war eine Zelle ohne Muskelkontakt). Bei Patient B. stellte sich heraus, daß die Technik des CDR3-Spectratyping als Screening-Methode zwar geeignet ist, mit Hilfe der Einzel-Zell-PCR allerdings auf Ebene der BJ-Subfamilien zwei weitere klonal expandierte Populationen identifiziert werden konnten (s. Kapitel 4.1). Der in dieser Arbeit beschriebene Klon BV 13.1-BJ 1.5 (Aminosäuresequenz: CASS-**YSGTVG**-QPQ) entsprach 12,5% der gewonnenen Zellen. Eine BV 13.1-BJ 1.2⁺ Population (Aminosäuresequenz: CASS-**RDTRD**-GYT) entsprach 10,4% (2 von 5 Sequenzen waren identifizierbar, aber nicht vollständig lesbar) und eine BV 13.1-BJ 2.2⁺ Population (Aminosäuresequenz: CASS-**RTNLGD**-TGE) machte 12,5% der untersuchten Zellen aus.

Die Suche in Muskelgewebe und Blut von Polymyositis-Patienten nach klonal expandierten T-Lymphozyten-Populationen, welche als invasiv und pathogenetisch relevant betrachtet werden können, scheint ein erfolgsversprechender Schritt in Richtung der Untersuchung der Ätiologie der Polymyositis zu sein. Die Technik des CDR3-Spectratyping stellt eine sensitive Methode zur Erfassung solcher klonal expandierter T-Zell-Populationen dar. In der vorliegenden Arbeit konnten die Ergebnisse von Bender et al. [Bender et al. 1995] bestätigt und bei weiteren drei Polymyositis-Patienten klonal expandierte Lymphozyten-Populationen im entzündeten Muskelgewebe identifiziert werden. Weiterhin konnte bei diesen drei Patienten peripher-venöses Blut vor Beginn einer spezifischen Therapie gewonnen und untersucht werden. Identische klonal expandierte T-Zell-Populationen ließen sich auch in der Gesamtmenge an CD8⁺Lymphozyten des peripheren Blutes nachweisen. Das Auftreten der Muskel-pathogenen T-Zell-Klone im Blut war in bisherigen Veröffentlichungen nicht beschrieben worden, ist aber mit dem z.T. systemischen Erscheinungsbild der Polymyositis gut in Einklang zu bringen: Es treten prognostisch ungünstige Formen der Erkrankung mit Befall von Herz (Rhythmusstörungen, Perikarditis, dilatierende Kardiomyopathie) und Lunge (interstitieller Lungenfibrose) auf. Generalisierte Symptome wie Fieber, Gewichtsverlust und Arthralgien bestehen bei einer Assoziation der entzündlichen Muskelerkrankung mit Kollagenosen [Dalakas 1991].

Mit der Möglichkeit, im Muskelgewebe klonal expandierte T-Lymphozyten auch in peripher-venösem Blut nachweisen zu können, bietet sich die Chance einer Korrelation von Klinik, Therapie und Veränderungen im CDR3-Spectratyping. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen das schrittweise „Untertauchen“ der dominanten Peaks im CDR3-Spectratyping (welche eine klonal expandierte Zell-Population charakterisieren) in einer Gauß-Kurve (welche eine polyklonale Zell-Population darstellt) unter Therapie und klinischer Besserung. Somit stellt das CDR3-Spectratyping eine Möglichkeit zur Überwachung des Krankheitsverlaufes der Polymyositis dar. Die Parallelität zwischen den Ergebnissen des CDR3-Spectratyping und immunsuppressiver Therapie unterstützt die Relevanz eines identifizierten CD8⁺ Zell-Klons bezüglich der Pathogenese der Polymyositis. Bei Patient Z. war keine immunsuppressive Therapie durchgeführt worden und dementsprechend keine Veränderung im CDR3-Spectratyping in zeitlichem Verlauf zu beobachten, eine spontane Fluktuation des T-Zell-Rezeptor-Repertoires bei Polymyositis-Patienten kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Letztlich ist nicht geklärt, ob Muskel-spezifische T-Zellen peripher aktiviert werden, klonal expandieren und sich dann in Muskelgewebe anreichern, oder ob die Aktivierung lokal im Muskel stattfindet und die expandierten T-Zell-Klone sekundär ins Blut übertreten. Weiterhin unbekannt bleibt der Mechanismus der Aktivierung der pathogenen T-Zellen sowie die Antigen-Spezifität.

4.3 Weiterführende Versuche

Die aktuellen Therapiemöglichkeiten der Polymyositis sind begrenzt. Sie bestehen zum einen aus einer symptomatischen Behandlung, insbesondere bei extramuskulärer Manifestation, und einer immunsuppressiven, bzw. immunmodulierenden Therapie mit gravierenden unerwünschten Wirkungen [Goebels et al. 1998] [Mastaglia et al. 1998] [Dalakas 1998]. In den Fällen einer tumorassoziierten Manifestation der Polymyositis steht die Bekämpfung der malignen Grunderkrankung im Vordergrund. Eine spezifische Behandlungsmöglichkeit unter Schonung des Gesamtorganismus ist langfristiges Ziel derzeitiger Untersuchungen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, wie mit Hilfe der Technik des CDR3-Spectratyping die Charakterisierung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires bei Polymyositis-Patienten gelingt. Es konnten klonal expandierte T-Zellen in Muskelbiopsie und peripher-venösem Blut identifiziert werden. Der Nachweis oligoklonaler T-Zell-Populationen in Läsionen Polymyositis-Erkrankter ist bereits in früheren Untersuchungen mit anderen Techniken beschrieben worden [Mantegazza et al. 1993] [Lindberg et al. 1994] [Bender et al. 1995]. Die Autoaggressivität der beschriebenen Klone konnte gezeigt werden [Bender et al. 1995]. Mit der Technik des CDR3-Spectratyping steht nun eine sensitive Methode zur Verfügung, welche ein objektives Bild des gesamten T-Zell-Rezeptor-Repertoires eines Individuum wiedergibt.

Allerdings ist es mit den bisher verwendeten Methoden nicht möglich, den vollständigen genetischen Code der pathogenen T-Zellen zu entschlüsseln. So gibt es keine Information zur α -Kette, bzw. der Kombination von α - und β -Kette der autoinvasiven Lymphozyten. Bei der Untersuchung von mehreren Zellen als Ausgangsmaterial ist dies aus technischen Gründen nicht möglich, da die Informationen zu α -Kette und β -Kette im Genom zu weit auseinanderliegen, um während der PCR gemeinsam vervielfältigt zu werden. Eine Zuordnung zur ursprünglichen Kombination ist somit nicht zu erreichen. Eine Perspektive zur exakten Sequenz-Analyse stellt die Einzel-Zell-PCR dar: Im Muskelgewebe von Polymyositis-Patienten werden durch die Methoden der Immunhistochemie T-Zellen gefärbt und können in ihrer Lage zur Muskelfaser bestimmt werden. Als autoinvasiv identifizierte T-Zellen werden mit Hilfe von Mikromanipulatoren oder durch Laserdissektion isoliert, die TZR-Sequenz amplifiziert und sequenziert [Roers et al. 1998] [Babbe et al. 2000].

Diese weiterführenden Untersuchungen wurden mit z.T. demselben Ausgangsmaterial durchgeführt und kürzlich veröffentlicht [Hofbauer et al. 2003]. Die Ergebnisse unterstreichen die Eignung des CDR3-Spectratyping als Screening-Methode: Die Analyse der dritten hypervariablen Region des T-Zell-Rezeptors von immunhistochemisch als autoinvasiv beschriebenen CD8⁺-T-Zellen entsprechen den mit Hilfe des CDR3-Spectratyping identifizierten Sequenzen. Offensichtlich besteht allerdings auf der Ebene der BJ-spezifischen Subfamilien keine der Einzel-Zell-PCR entsprechende Genauigkeit: Im Falle von Patient B. wurden zwei weitere klonal expandierte T-Zell-Populationen identifiziert, die sich im CDR3-Spectratyping nicht dargestellt hatten.

Ansätze für neue Therapiemöglichkeiten ergeben sich durch die exakte Identifikation der pathogenen T-Zellen. Hofbauer et al. [Hofbauer et al. 2003] konnten mit Hilfe der Einzel-Zell-PCR bei einem Polymyositis-Patienten drei verschiedene BV 13.1-BJ 2.7⁺CD8⁺ T-Zellen finden, welche trotz unterschiedlicher Nukleotidabfolge zur selben Aminosäuresequenz führten. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, daß ein gemeinsames spezifisches Antigen verschiedene T-Zellen zur klonalen Expansion aktiviert. Unterstrichen wird diese These durch die zeitliche Persistenz der Klone. Die Aktivierung der CD8⁺T-Zellen findet wahrscheinlich mittels eines oder mehrerer bisher unbekannter Antigene statt. Mit der Identifikation der Polymyositis-pathogenen T-Zell-Klone besteht allerdings die Möglichkeit dieses Peptid zu charakterisieren. Mit Hilfe rekombinanter T-Zell-Rezeptor-Technologien ergibt sich ein Weg zur Klärung der Ätiologie der Polymyositis. Bei bekanntem Antigen können spezifische Therapieformen entwickelt werden, wie z.B die Unterbrechung der Aktivierung von T-Zellen durch dieses Antigen. Diese Therapieform stellt beispielsweise beim Rheumatischen Fieber eine etablierte Methode dar, durch Penicillingabe wird die krankheitsauslösende Streptokokkeninfektion bekämpft. Durch Beendigung der Stimulation des Immunsystems kommt auch die Entzündung als Autoimmunprozess zum Stillstand [Maisch 1994]. Denkbar ist auch die Entwicklung einer Vakzination gegen die krankheitsauslösenden Lymphozyten. Diese Behandlungsmöglichkeit kommt beispielsweise bei malignen Erkrankungen zum Einsatz [Stewart et al. 2000].

Die Ergebnisse solcher weiterführender Versuche können also unmittelbare therapeutische Konsequenzen haben: Die Identifikation der pathogenen klonal expandierten T-Zell-Populationen könnte einerseits zu einer spezifischen Immuntherapie führen, andererseits bedeutet die Klärung der Ätiologie der Polymyositis die Möglichkeit der Entwicklung einer Prophylaxe.

Schließlich dient die Polymyositis als Modell für andere entzündliche Autoimmunerkrankungen, beispielsweise gibt es auch bei der Multiplen Sklerose Hinweise für die pathogenetische Relevanz klonal expandierter T- und B-Lymphozyten [Goebels et al. 2000b]. Die beschriebenen Techniken könnten auch in der Erforschung dieser Erkrankungen hilfreich sein zur Charakterisierung pathogener T-Zell-Populationen und Entwicklung neuer Therapien.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Die Antigen-spezifische zelluläre Immunantwort des Menschen zeichnet sich durch eine fast unbegrenzte Diversität aus. Diese Vielfalt der Antigen-spezifischen Immunrezeptoren bei T-Zellen wird im Falle der β -Kette durch die zufällige somatische Rekombination von V (variable), D (diversity), J (junction) und C (constant) Gensegmenten erreicht. V, D, und J Region zusammen bilden die Dritte Hypervariable Region (CDR3-Region) der β -Kette des T-Zell-Rezeptors, die maßgeblich an der Antigenerkennung beteiligt ist. Da es für jede der V, D und J Genorte zahlreiche, genomisch kodierte Möglichkeiten gibt, wird durch die Zahlenschloß-artige Kombination dieser Segmente eine große Vielfalt unterschiedlicher Immunrezeptoren generiert. Potenziert wird diese Vielfalt durch das willkürliche Einfügen einer variablen Anzahl von nicht genomisch kodierten „N“-Nukleotiden zwischen die einzelnen Segmente, so daß potenziell jedes beliebige Fremd- und Selbstantigen erkannt werden kann. Dieses zusätzliche Einfügen von „N“-Nukleotiden bewirkt zudem eine Längenvariation der CDR3-Region, die bei $CD4^+$ T-Lymphozyten des Gesunden „normalverteilt“ ist.

Autoimmunerkrankungen entstehen durch die Aktivierung und Vermehrung präexistenter autoreaktiver Immunzell-Klone. Bisher stützte sich die Identifizierung autoreaktiver Immunzellen vor allem auf Daten aus Zellkultur und Tierexperimenten. Ziel dieser Arbeit ist es, klonal expandierte T-Zellen direkt aus Blut und Biopsiematerial molekularbiologisch zu identifizieren und zu charakterisieren. Hierzu wurde ein mehrstufiges „semi-nested“ PCR-Verfahren etabliert, das „CDR3-Spectratyping“. Ausgehend von der cDNA wird zunächst das Fragment zwischen der V-Region und der C-Region BV-Familien-spezifisch amplifiziert, anschließend werden mit fluoreszenzmarkierten, J-Region-spezifischen Primern Transkripte erstellt, die mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden können.

Während sich bei der Analyse eine polyklonale Lymphozytenpopulation aufgrund der Variation der CDR3-Längen im Spectrogramm „normalverteilt“ (Gauß-Kurve) darstellt, haben klonal expandierte Lymphozyten jeweils dieselbe CDR3-Länge und können als „Peak“ (Ausreißer) identifiziert und sequenziert werden. Ziel ist über die Sequenzinformation dieser klonal expandierten, wahrscheinlich autoaggressiven T-Lymphozyten durch weitere Untersuchungen Rückschlüsse auf Zielantigen und Pathomechanismus von Autoimmunerkrankungen ziehen zu können.

Die Technik des CDR3-Spectratyping fand Anwendung bei der Polymyositis, einer Autoimmunerkrankung des Skelettmuskels, bei der MHC-Klasse I positive Muskelfasern von CD8⁺T-Zellen infiltriert und zerstört werden. Aus Vorarbeiten gibt es Hinweise, daß aus der großen Vielfalt der T-Zell-Rezeptoren des menschlichen Immunrepertoires nur bestimmte Varianten für die Erkrankung verantwortlich sind und daß die CD8⁺T-Zellen mit diesen Rezeptoren im betroffenen Muskel klonal expandiert sind.

Bei der Untersuchung von Muskelbiopsie und peripher-venösem Blut von vier Polymyositis-Patienten konnte mittels der Technik des CDR3-Spectratyping in einem Fall bereits als autoinvasiv charakterisierte T-Zell-Klone im Biopsat identifiziert und somit die früheren Ergebnisse bestätigt werden. In drei Fällen wurde Blut von den Patienten gewonnen, bevor eine immunsuppressive Therapie begonnen worden war. Hier ließen sich expandierte Zell-Klone in Muskelbiopsie und Blut nachweisen und sequenzieren. Die teilweise Mitbeteiligung anderer Organe neben dem Skelettmuskel bei der Polymyositis läßt auf einen systemischen Immunprozeß schließen. Bisher konnte ein in der Muskelbiopsie identifizierter autoreaktiver T-Zell-Klon mit den üblichen Techniken nicht im peripher-venösen Blut nachgewiesen werden.

Bei drei Patienten fanden weitere Blutabnahmen statt: In zwei Fällen zeigte sich im CDR3-Spectratyping unter immunsuppressiver Therapie ein „Untertauchen“ der expandierten Lymphozytenpopulationen in polyklonalen, „normalverteilten“ CD8-positiven T-Zellen. In einem Fall war keine Therapie durchgeführt worden und der expandierte T-Zell-Klon persistierte.

Die Technik des CDR3-Spectratyping erwies sich als sensitive Methode, um in Muskelbiopsie und Blut klonal expandierte Subpopulationen von T-Lymphozyten zu identifizieren und die Auswirkung der heute üblichen immunsuppressiven Therapie auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire bei der Polymyositis aufzuzeigen.

B Anhang

BV-PRIMER [Monteiro et al. 1996]

cAAcAgTTcccTgAcTTgcAc	BV 1
TcAAccATgcAAgccTgAccT	BV 2
TcTAgAgAgAAgAAggAgcgc	BV 3
cATATgAgAgTggATTTgTcATT	BV 4
TTcAgTgAgAcAcAgAgAAAc	BV 5.1
ccTAAcTATAgcTcTgAgcTg	BV 5.2
AggccTgAgggATccgTcTc	BV 6
cTgAATgccccAAcAgcTcTc	BV 7
TAcTTTAAcAAcAAcgTTccg	BV 8
AAATcTccAgAcAAAgcTcAc	BV 9
cTccAAAAAcTcATccTgTAccTT	BV 10
AcAgTcTccAgAATAAggAcg	BV 11
gAcAAAggAgAAgTcTcAgAT	BV 12
gAccAAggAgAAgTccccAAT	BV 13.1
gTTggTgAgggTAcAAcTgcc	BV 13.2
gTcTcTcgAAAAGAgAAgAggAAT	BV 14
gTcTcTcgAcAggcAcAggcT	BV 15
gAgTcTAAAcAggATgAgTcc	BV 16
cAcAgATAgTAAATgAcTTTcAg	BV 17
gAgTcAggAATgccAAAggAA	BV 18
TccTcTcAcTgTgAcATcggccA	BV 19
TcTgAggTgccccAgAATcTc	BV 20
gATATgAgAATgAggAAgcAg	BV 21
cAgAgAAgTcTgAAATATTcgA	BV 22
TcATTTcgTTTTATgAAAAGATgc	BV 23
AAAgATTTTAAcAATgAAgcAgAc	BV 24

BJ-PRIMER [Puisseux et al. 1994]

AcTgTgAgTcTggTgccTTgT	BJ 1.1
AcAAcggTTAAccTggTccccgAA	BJ 1.2
ggTccTcTAcAAcAgTgAgccAAc	BJ 1.3
AAgAcAgAgAgcTgggTTccAcTg	BJ 1.4
ggAgAgTcgAgTcccATcA	BJ 1.5
TgTcAcAgTgAgccTggTcccATT	BJ 1.6

ccTggccccgAAgAAcTgcTcA	BJ 2.1
gTccTccAgTAcggTcAgccTAgA	BJ 2.2
TgccTgggccAAAATAcTgcg	BJ 2.3
TccccggcggcAAgTAcTgAA	BJ 2.4
TcgAgcAccAggAgccgc	BJ 2.5
cTgcTgccggccccgAAAgtc	BJ 2.6
TgAccgTgAgccTggTgcccc	BJ 2.7

CB-PRIMER [Puisseux et al. 1994]

cTTcTgATggcTcAAAcAc	CB-R
---------------------	------

C **Abkürzungsverzeichnis**

APC	Antigen-präsentierende Zelle
Ak	Antikörper
BJ	J-Segment des TZR (β -Kette)
BV	β -Ketten Familie des TZR
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR3	3. hypervariable Region des TZR
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
MHC	Haupthistokompatibilitäts-komplex
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PM	Polymyositis
RNA	Ribonukleinsäure
TIL	Tumor-infiltrierende Leukozyten
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TZR	T-Zell-Rezeptor

D Literaturverzeichnis

Abbas, A., Lichtman, A., Pober, J. (1994) *W.B. Saunders*, Philadelphia, U.S.A.
„Cellular and Molecular Immunology“, 2nd Edition

Acuto, O., Reinherz, E. (1985) *N. Engl. J. Med.* 312:1100-1111
„The human T cell receptor, structure and function“

Arahata, K., Engel, A. (1986) *Ann. Neurol.* 29:498-507
„Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies III: Immunelectron microscopy aspects of cell-mediated muscle fiber injury“

Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schroder, R., Deckert, M., Schmid, S., Ravid, R., Rajewsky, K. (2000)
J. Exp. Med. 192(3):393-404
„Clonal expansions of CD8⁺ T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction“

Bender, A., Ernst, N., Iglesias, A., Dornmair, K., Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (1995)
J. Exp. Med. 181:1863-1868
„T cell receptor repertoire in polymyositis: Clonal expansion of autoaggressive CD8⁺ T cells“

Callen, J. (1988) *Clin. Dermatology* 6:55
„Malignancy in Polymyositis, Dermatomyositis“

Chomzynski, P., Sacchi, N. (1987) *Anal Biochem* 162:156-159
„Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenylchloroform extraction“

Cochet, M., Pannetier, C., Regnault, A., Darce, S., Leclerc, C. Kourilsky, P. (1992)
Eur. J. Immunol. 22:2639-2647
„Molecular detection and in vivo analysis of the specific T cell response to a protein antigen“

Dalakas, M. (1991) *N. Engl. J. Med.* 21:1487-1498
„Polymyositis, Dermatomyositis and Inclusion-body-myositis“

Dalakas, M., Sivakumar, K. (1996) *Curr. Opin. in Neurol.* 9:235-239
„The immunopathologic and inflammatory differences between dermatomyositis, polymyositis and sporadic inclusion body myositis“

Dalakas, M. (1998) *Neurology (Suppl 5)* 51:37-45
„Controlled studies with high-dose intravenous immunoglobulin in the treatment of dermatomyositis, inclusion body myositis and polymyositis“

Davis, M. (1990) *Annu. Rev. Biochem.* 59:475-496
„T cell receptor gene diversity and selection“

Dellabona, P., Casorati, G., Friedli, B., Angman, L., Sallusto, F., Tunnacliffe, A., Roosneek, E., Lanzavecchia, A. (1993) *J. Exp. Med.* 177:1763-1771
„In vivo persistence of expanded clones specific for bacterial antigens within the human T cell receptor α/β CD4⁺CD8⁻ subset“

Engel, A., Arahata, K. (1984) *Ann. Neurol.* 16:193-215
„Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies: II. Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis“

Engel, A., Hohlfeld, R., Banker, B. (1994) *McGraw-Hill Inc.*, New York, U.S.A.
„The polymyositis and dermatomyositis syndromes“
„Myology“, 2nd Edition 1335-1383
A. Engel, C. Franzini-Armstrong (Hrsg.)

Even, J., Lim, A., Puisieux, I., Ferradini, L., Dietrich, P., Toubert, A., Hercend, T., Triebel, F., Pannetier, C., Kourilsky, P. (1995) *Res. Immunol.* 146:65-80
„T-cell repertoires in healthy and diseased human tissues analysed by T-cell receptor β -chain CDR3 size determination : evidence for oligoclonal expansions in tumours and inflammatory diseases“

Ferradini, L., Mackensen, A., Genevée, C (1993) *J. Clin. Invest.* 1183-1190
„Analysis of T cell receptor variability in tumor-infiltrating lymphocytes from a human regressive melanoma. Evidence for in situ T cell clonal expansion“

Genevée, C., Farace, F., Chung, V. (1994) *Int. Immun.* 6:1497-1504
„Influence of human leukocyte antigen genes on TCR V gene segment frequencies“

Goebels, N., Michaelis, D., Engelhardt, M., Huber, S., Bender, A., Pongratz, D., Johnson, M., Wekerle, H., Tschopp, J., Jenne, D., Hohlfeld, R. (1996) *J. Clin. Invest.* 97:2905-2910
„Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis“

Goebels, N., Pongratz, D. (1998) *Kohlhammer*, Stuttgart, Berlin, Köln, Mainz
„Myositiden“
in „Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen“ 1120-1137
Brandt, Th., Dichgans, J., Diener, H.C. (Hrsg.)

Goebels, N., Hohlfeld, R. (2000a) *Humana Press Inc.*, Totowa, New Jersey, USA
„Principles of Molecular Rheumatology“ 363-374
„Inflammatory myopathies“

Goebels, N., Hofstetter, H., Schmidt, S., Brunner, C., Wekerle, H. und Hohlfeld, R. (2000b) *Brain* 508-518
„Repertoire dynamics of autoreactive T cells in multiple sclerosis patients and healthy subjects: epitope spreading versus clonal persistence“

Hall, F., Thomson, K., Procter, J., McMichael, A., Wordsworth, B. (1998) *Ann. Rheum. Dis.* 57:319-322
„TCR β spectratyping in RA: evidence of clonal expansions in peripheral blood lymphocytes“

Hofbauer, M., Wiesener, S., Babbe, H., Roers, A., Wekerle, H., Dornmair, K., Hohlfeld, R., Goebels, N. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 4090-4095
„Clonal tracking of autoaggressive T cells in polymyositis by combining laser microdissection, single-cell PCR and CDR3-spectratype analysis“

Hohlfeld, R., Goebels, N., Engel, A (1993) *Balliere`s Tindall*
„Inflammatory myopathies“
In „Inflammatory myopathies“ 617-635
Mastiglia, F. (Hrsg.)

Hohlfeld, R., Engel, A. (1994) *Immunol. Today* 15:269-274
„The immunobiology of muscle“

Janeway, Ch. (1988) *Nature* 333:804-805
„Frontiers of the immune system“

Janeway, Ch., Travers, P. (1997) Garland Publishing Inc.,
New York, London
„Immunobiology-The Immune System in health and disease“, 3rd Edition

Leff, R., Love, L., Miller, F., Greenberg, S., Klein, E., Dalakas, M., Plotz, P. (1992)
Lancet 1192-1195
„Viruses in idiopathic inflammatory myopathies: Absence of candidate viral genomes in muscle“

Lefranc, M., Lefranc, G. (2001) *Academic Press*, San Diego, U.S.A.
„The T-cell receptor. Facts book“

Lindberg, C., Oldfors, A., Tarkowski, A. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24:2659-2663
„Restricted use of T cell receptor V genes in endomysial infiltrates of patients with inflammatory myopathies“

Liu, D., Callahan, J., Dau, P. (1995) *J. Immun. Meth.* 16:139-150
„Intrafamily fragment analysis of the T-cell receptor beta chain CDR3 region“

Maisch, B. (1994) *Urban & Schwarzenberg* München, Wien, Baltimore
„Entzündliche Herzerkrankungen“
in „Innere Medizin“ 3. Auflage 1162-1166
Classen, M., Diehl, V., Kochsiek, K. (Hrsg.)

Mantegazza, R., Andreetta, F., Bernasconi, P., Baggi, F., Oksenberg, J., Simoncini, O., Mora, M., Cornelio, F., Steinman, L. (1993) *J. Clin. Invest.* 91:2880-2886
„Analysis of T cell receptor repertoire of muscle-infiltrating T-lymphocytes in polymyositis“

Marrack, P., Kappler, J. (1988) *Spektrum der Wissenschaft*
„Der T-Zell-Rezeptor“ in „Immunsystem“, S. 99
Die Aufnahme stammt von A. G. Farr, University of Washington, U.S.A.

Mastaglia, F., Phillips, B., Zilko, P. (1998) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 65:107-110
„Immunoglobulin therapy in inflammatory myopathies“

- Monteiro, J., Hingorani, R., Peroglizzi, R., Apatoff, B., Gregersen, P. (1996) *Autoimmun.* 23:127-138
„Oligoclonality of CD8⁺ T cells in multiple sclerosis“
- Mullis, K., Ferré, F., Gibbs, R. (1994) *Birkhauser Boston*
„The Polymerase Chain Reaction“
- Okada, C., Weissman, I. (1989) *J. Exp. Med.* 169:1703-1719
„Relative V beta transcript levels in thymus and peripheral lymphoid tissues from various mouse strains. Inverse correlation of I-E and MIs expression with relative abundance of several V beta transcripts in peripheral lymphoid tissue“
- Pannetier, C., Even, J., Kourilsky, P. (1995) *Immunol. Today* 16:176-181
„T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples“
- Puissieux, I., Even, J., Pannetier, C., Jotereau, F., Favrot, M., Kourilsky, P. (1994) *J. Immunology* 153:2807-2818
„Oligoclonality of Tumor-Infiltrating Lymphocytes from Human Melanomas“
- Rieux-Laucat, F., Le Deist, F., Selz, F., Fischer, A., de Villartay, J. (1993) *Eur. J. Immunol.* 23:928-934
„Normal T cell receptor V beta usage in a primary immunodeficiency associated with HLA class II deficiency“
- Roers, A., Montesinos-Rongen, M., Hansmann, M., Rajewsky, K., Kuppers, R. (1998) *Eur. J. Immunol.* 28(8):242-2431
„Amplification of TCR- β gene rearrangements from micromanipulated single cells: T cells rosetting around Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease are polyclonal“
- Roitt, I., Brstoff, J., Male, D. (1988) Gower Medical Publishing, London, New York
„Immunology“
- Rowen, L., Koop, B., Hood, L. (1996) *Science* 272:1755-1762
„The complete 685-kilobase DNA sequence of the human β T cell receptor locus“
- Samelson, L., Patel, M., Weissman, A., Harford, J., Klausner, R. (1986) *Cell* 46:1083-1090
„Antigen activation of murine T cells induces tyrosine phosphorylation of a polypeptide associated with the T cell antigen receptor“
- Schwab, R., Szabo, P., Manavalan, J., Weksler, M., Posnett, D., Pannetier, C., Kourilsky, P., Even, J. (1997) *J. Immunol.* 158:4493-4499
„Expanded CD4⁺ and CD8⁺ T cell clones in elderly humans“
- Scollay, R., Butcher, E., Weissman, I. (1980) *Eur. J. Immunol.* 10:210-218
„Thymus cell migration - Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice“
- Shirwan, H., Chi, D., Makowka, L., Cramer, D. (1993) *J. Immunol.* 151:5228-5238
„Lymphocytes infiltrating rat cardiac allografts express a limited repertoire of T cell receptor V beta genes“

Singer, P., Balderas, R., Theofilopoulos, A. (1990) *EMBO J.* 9:3641-3648
„Thymic selection defines multiple T cell receptor V beta ‘repertoire phenotypes’ at the CD4/CD8 subset level“

Steinman, L. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:2253-2256
„A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: A tale of smart bombs and the infantry“

Steinman, L. (2001) *J. Exp. Med.* 194: F27-30
„Myelin-specific CD8 T Cells in the Pathogenesis of Experimental Allergic Encephalitis and Multiple Sclerosis“

Stewart, J., Rosenberg, S. (2000) *J. Immunotherapie* 23(4):401-404
„Long-term survival of anti-tumor lymphocytes generated by vaccination of patients with melanoma with a peptide vaccine“

Uematsu, Y. (1991) *Immunogenetics* 34:174-178
„A novel and rapid cloning method for the T-cell receptor variable region sequences“

E Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Bindung einer T-Zelle im Thymus.....	2
Abb. 2	Die Antigen-TZR-Bindung.....	3
Abb. 3	Signaltransduktion des TZR.....	5
Abb. 4	Die genetische Organisation der α - und β -Kette am Beispiel der Maus....	6
Abb. 5	Schematische Darstellung: Entzündetes Muskelgewebe (Polymyositis)...	8
Abb. 6	Untersuchungen von Even et al. bei malignem Melanom.....	16
Abb. 7	Von der Keimbahn-DNA zum TZR-Protein.....	18
Abb. 8	Markierung von DNA-Fragmenten mit fluoreszierenden Partikeln.....	20
Abb. 9	Zusammensetzung der β -Kette des TZR.....	21
Abb. 10	Untersuchungen von Pannetier et al. bei malignem Melanom.....	22
Abb. 11	Patientendaten.....	44
Abb. 12	Negativ-Kontrolle CD4 ⁺ T-Zellen (Gelphoto).....	46
Abb. 13	Negativ-Kontrolle CD8 ⁺ T-Zellen.....	48
Abb. 14	Negativ-Kontrolle CD4 ⁺ T-Zellen.....	50
Abb. 15	Pat. B. CD4 ⁺ T-Zellen.....	52
Abb. 16	Pat. B. Muskelbiopsat I und II.....	53
Abb. 17a	Pat. W. Muskelbiopsie nach 30 Zyklen.....	56
Abb. 17b	Pat. W. Muskelbiopsie nach 35 Zyklen.....	57
Abb. 17c	Pat. W. Muskelbiopsie nach 40 Zyklen.....	58
Abb. 18a	Pat. W. Muskelbiopsie BV 13.1, subamplifiziert mit 13 BJ-Primern.....	60
Abb. 18b	Pat. W. Muskelbiopsie BV 13.1, subamplifiziert mit 13 BJ-Primern.....	62
Abb. 19	Pat. W. Muskelbiopsie BV 13.1-BJ 1.2 und -BJ 1.5.....	64
Abb. 20	Beispiel einer unlesbaren Sequenz.....	65
Abb. 21	Pat. B. Muskelbiopsie und CD8 ⁺ T-Zellen (PBL I)-CDR3-Spectratyping.....	66

Abb. 22	Pat. B. Muskelbiopsie und CD8 ⁺ T-Zellen (PBL I)-Sequenz.....	67
Abb. 23	Pat. B. Klon BV 13.1-BJ 1.5 unter Therapie.....	69
Abb. 24	Pat. S. Klon BV 3-BJ 2.1 unter Therapie.....	71
Abb. 25	Pat. Z. Klon BV 1-BJ 2.6 im zeitlichen Verlauf ohne Therapie.....	72
Abb. 26	Pat. B. CD8 ⁺ T-Zellen (Immunhistochemie).....	74
Abb. 27	Pat. B. CD8 ⁺ BV 13.1 ⁺ T-Zellen (Immunhistochemie).....	75
Abb. 28	Pat. W. CD8 ⁺ BV 13.1 ⁺ T-Zellen (Immunhistochemie).....	76

CURRICULUM VITAE

Solveigh Charlotte Wiesener

Geburtsdatum 20.11.1973
Nationalität deutsch

Ausbildung

1992 Abitur
Fanny-Leicht-Gymnasium, Stuttgart

1992-1995 Studium der Humanmedizin
Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

1995-1999 Fortsetzung des Studiums
Ludwig-Maximilians-Universität, München

1998/99 Auslandsaufenthalte während des
„Praktischen Jahres“
Yale University, New Haven, CT, U.S.A.
New York University, NYC, NY, U.S.A.
Faculté des Enfants Malades, Paris, F.

1999 III. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit

April 2000 bis September 2001
Seit Oktober 2001 Tätigkeit als Ärztin im Praktikum
Assistenzärztin
Institut für Anästhesiologie
Klinikum Benjamin-Franklin
Freie Universität Berlin

Abstracts

Oktober 1997
Posterpräsentation Researchfestival '97, München
„Klonale T-Zell-Expansion bei Autoimmun-
erkrankungen am Beispiel der Polymyositis“

Oktober 1999
Mini-Symposium 72. Kongress der Deutschen Gesellschaft für
Neurologie, Magdeburg
„Nachweis identischer expandierter CD8+ T-Zell-
Klone im Muskel und im peripheren Blut von
Polymyositis-Patienten: Korrelation von CDR3-
Spectratyping und Einzelzell-PCR“

Publikation

April 2003 Hofbauer, M., Wiesener, S. et al. (2003)
PNAS vol. 100:4090-4095
„Clonal tracking of autoaggressive T cells in
polymyositis by combining laser microdissection,
single-cell PCR and CDR3-spectratype analysis“

