

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
des Dr. von Haunerschen Kinderspitals
der Ludwig-Maximilians-Universität

Direktor: Prof. Dr. Dietrich Reinhardt

Häufigkeit von invarianten V α 24-J α 18 NKT-Zellen
bei atopischen und nicht-atopischen Individuen

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

vorgelegt von
Beatrix Carolin Heinzemann
aus
München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. F. Ruëff
Priv. Doz. Dr. H. J. Anders

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

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 23.11.2006

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

III

| | |
|---|-----------|
| 1. EINLEITUNG | 5 |
| 1.1. TH1/TH2 MODELL | 5 |
| 1.2. NKT ZELLEN | 7 |
| 1.3. EINGESCHRÄNKTE VARIABILITÄT DES T-ZELL-REZEPTORS BEI NKT ZELLEN | 10 |
| 1.4. FUNKTION VON NKT-ZELLEN | 12 |
| 1.5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT | 16 |
| 2. MATERIAL | 17 |
| 2.1. CHEMIKALIEN | 17 |
| 2.2. LÖSUNGEN UND PUFFER | 18 |
| 2.3. OLIGONUKLEOTIDE | 19 |
| 2.3.1 MOLEKULARGEWICHTSMARKER | 19 |
| 2.3.2 ULTRAPURE DNTP SET | 19 |
| 2.3.3 OLIGONUKLEOTIDPRIMER | 19 |
| 2.4. ENZYME UND REAGENZIENKITS | 20 |
| 2.6. SONSTIGES VERBRAUCHSMATERIAL | 20 |
| 2.7. GERÄTE | 21 |
| 3. METHODEN | 22 |
| 3.1. EINGANGSUNTERSUCHUNGEN UND AUSWAHL DER PROBANDEN | 22 |
| 3.3. PRÄPARATION VON NUKLEINSÄUREN | 24 |
| 3.3.1. RNA-ISOLIERUNG | 24 |
| 3.3.2. SYNTHESE VON CDNA AUS RNA DURCH REVERSE TRANSKRIPTION | 25 |
| 3.3.3. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) | 26 |
| 3.3.4. REAKTIONSSCHEMA DER ZYKLEN | 27 |
| 3.3.5. AMPLIFIKATION DES INTERNEN KONTROLLFRAGMENTES TC α | 28 |
| 3.3.6. AMPLIFIKATION DES V α 24-J α 18 GENSEGMENTS | 28 |
| 3.4. AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN | 29 |
| 3.5. AUSWERTUNG DER PCR | 30 |
| 3.5.1. NORMIERUNG DER CDNA KONZENTRATIONEN | 30 |
| 3.5.2. SEMIQUANTITATIVE ERMITTLUNG DER RELATIVEN V α 24-J α 18 CDNA KONZENTRATION | 35 |
| 3.6. STATISTISCHE AUSWERTUNG | 37 |

| | |
|--|-----------|
| 4. ERGEBNISSE | 38 |
| 4.1. PATIENTENCHARAKTERISIERUNG | 38 |
| 4.3. Vα24-Jα18 MRNA EXPRESSION VON T-ZELLEN | 40 |
| 4.3.1. NORMIERUNG DER CDNA MITTELS TC α | 41 |
| 4.3.2. AUSWAHL DER PRIMER | 43 |
| 4.3.3. AMPLIFIKATION VON V α 24-J α 18 | 44 |
| 5. DISKUSSION | 46 |
| 6. ZUSAMMENFASSUNG | 56 |
| 7. LITERATURVERZEICHNIS | 57 |
| ANHANG | 67 |
| DANKSAGUNG | 68 |
| LEBENS LAUF | 69 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--|--|
| A | Adenin |
| AJ18 | bevorzugtes J-Segment bei NKT Zellen |
| aGalCer | alpha-Galaktosylceramid |
| AV24-AJ18 | Gensegment für spezifische T-Zell Rezeptor α -Kette |
| β_2m | β_2 Mikroglobin |
| B α , B ϵ , B γ , B μ | Entwicklungsstufen von B-Lymphozyten |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin |
| CD | Cluster of differentiation, Oberflächenantigene |
| cDNA | komplementäre DNA |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DN | Doppelt-negativ (CD4-/CD8-) |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleotid |
| DTT | 1,4-Dithiothreitol |
| EDTA | <i>di</i> -Natrium-Ethylendiamintetraacetat, Titriplex III |
| FACS | Fluorescence activated cell sorter |
| G | Guanin |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor |
| GT- (β -ME) Lyse Puffer | Guanidinisothiocyanat- β -Mercaptoethanol Puffer |
| IDDM | Insulin-pflichtiger Diabetes mellitus |
| IE, IU | Internationale Einheiten, International Units |
| IFN- γ | Interferon γ |
| Ig | Immunglobulin |
| IgG _{1 (2a)} | Immunglobulin G, Subklassen 1 und 2a |
| IL | Interleukin |
| J α , J β | α/β -Kette des T-Zell Rezeptors |
| KIR-Proteine | "Killer- inhibitory receptor" Proteine |
| MHC | Major Histocompatibility Complex |
| mM | millimolar |
| mRNA | messenger RNA |
| m/w | männlich/weiblich |
| NaCl | Natriumchlorid |
| NK | Natürliche Killer Zellen |
| NK1.1 | murines } humanes } Oberflächenmolekül von NK- und |
| NKR-P1a = CD161 | T-Zellen das die NK Zytotoxizität reguliert |
| NKT | Natürliche Killer T Zellen |
| NKR | Natürliche Killer Zellen Rezeptor |
| NOD Maus | Non-obese-diabetes, Diabetes Mausmodell |
| NTP | Nukleotide ATP, CTP, GTP oder TTP |
| p | Signifikanzniveau bei statistischer Auswertung |
| PBL | periphere Leukozyten ("peripheral blood leucocytes") |
| PBS | Phosphatpuffer ("phosphate buffered saline") |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| pg | pico-Gramm |
| pmol | pico-Mol |

| | |
|-----------------------|--|
| r | Korrelationskoeffizient bei statistischer Auswertung |
| RAST | Radio Allergy Sorbent Test |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | RNA-spaltendes Enzym |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Reverse Transkriptase |
| RT-PCR | Reverse Transkriptase PCR |
| SDS | Natriumlaurylsulfat |
| SJL-Maus | Rheuma-Mausmodell |
| SLE | Systemischer Lupus erythematodes |
| T | Thymin |
| TC α | Konstante (C) Domäne der TCR α -Kette |
| TCR | T-Zell-Rezeptor |
| TCRAC | C Gensegment der T-Zell Rezeptor α -Kette |
| TCRAV/AJ | V /J Gensegmente der T-Zell Rezeptor α -Kette |
| TEN | Lösung aus TRIS-HCL, EDTA und Natriumchlorid |
| TGF- β | Tumor-Growth-Faktor β |
| Th0/Th1/Th2 | Differenzierungsstufen von T-Helferzellen |
| TNF- β | Tumor-Nekrose-Faktor β |
| TRIS | Tris(hydroxyl)-aminomethan |
| UV | Ultraviolett |
| V/cm | Volt pro Zentimeter; Einheit für die Feldstärke |
| V α ,V β | Variable Domäne der TCR α/β -Kette |
| /- | Homozygot negatives Merkmal |
| ' | Minute |
| '' | Sekunde |

1. Einleitung

1.1. Th1/Th2 Modell

Die gestörte Balance von Th1 und Th2 Lymphozyten spielt eine zentrale Rolle im derzeitigen Verständnis allergischer Erkrankungen. Es handelt sich hierbei um zwei CD3⁺/CD4⁺ Lymphozytensubpopulationen, die sich aus naiven Th0 Zellen differenzieren. Sie unterscheiden sich durch ihr antagonistisches Zytokinprofil und die Art der Immunantwort mit den dazugehörigen Erkrankungen [74] (Abb. 1.1).

Th1 Lymphozyten werden durch die Bildung der Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- β charakterisiert. In Abwesenheit von IL-4 ist das von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen freigesetzte IL-12 das wichtigste Zytokin für die Einleitung der Th1 Immunantwort (Abb. 1.1). Th1 Zellen sind vorrangig bei der Phagozytose-vermittelten Reaktion zur Abwehr intrazellulärer Pathogene beteiligt und spielen bei der zellulären Immunantwort eine entscheidende Rolle. Viele Autoimmunerkrankungen wie der Typ1 Diabetes, die juvenile rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose werden mit Th1 Immunreaktionen assoziiert [84].

Th2 Lymphozyten werden vor allem durch die Bildung der Zytokine IL-4 und IL-5 charakterisiert, wobei auch IL-10 und IL-13 von Th2 Zellen sezerniert werden [74]. IL-4 ist das Schlüsselzytokin der Th2 Immunantwort. Es führt zur Differenzierung und Proliferation von unreifen Th0 Zellen zu Th2 Lymphozyten und bewirkt zusammen mit IL-13 in B-Zellen den Isotyp-Switch von IgM zu IgE (Abb. 1.1). IL-5 ist ein wichtiges Th2-Zytokin, das zur Ausreifung eosinophiler Granulozyten führt. Th2 Zellen sind maßgeblich bei der humoralen Immunantwort beteiligt. Es besteht eine enge Assoziation zu atopischen und allergischen Erkrankungen [41,67].

Th1 Zytokine wie IFN- γ und IL-2 wirken in diesem System antagonistisch und hemmen die IgE-Immunantwort. Auch die Ausreifung naiver Th0 Zellen zu Th2 Effektorzellen wird durch IFN- γ antagonisiert. Umgekehrt wird die Differenzierung von Th0 zu Th1 Lymphozyten durch die Th2 Zytokine IL-4 und IL-10 supprimiert (Abb. 1.1). Wird eine Th1 oder Th2 Immunantwort erst einmal eingeleitet, so scheint

sie in die initiierte Richtung zu polarisieren, wobei sowohl die Th1- als auch die Th2-Antwort jeweils durch das Zusammenwirken der für die jeweilige Antwort spezifischen Zytokine kontrolliert wird. Die Ausreifung von Zellen derselben Immunantwort wird dabei gefördert, während die Differenzierung von Effektorzellen der anderen unterdrückt wird [78].

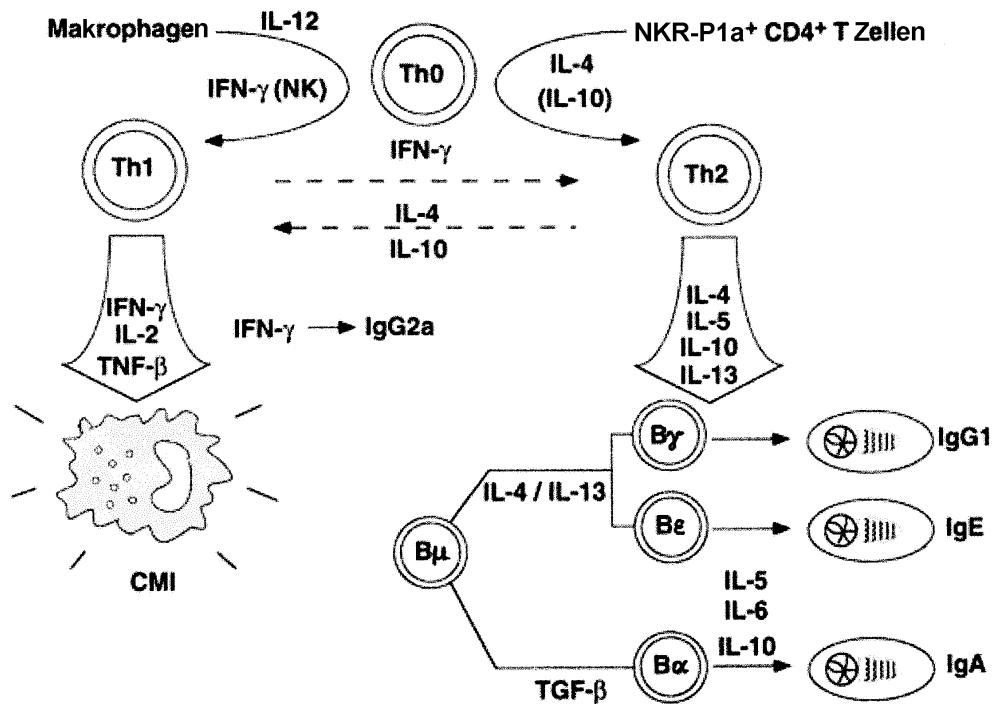


Abb. 1.1: Die Zelldichotomie funktioneller T-Helferzellen.

Sensibilisierte naive T-Zellen (Th0) bilden IL-2 und unterstützen das autokrine Wachstum und die Differenzierung in Th1- und Th2-Lymphozyten. Die Bildung von Th1-Lymphozyten wird vor allem durch IL-12 aus aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen eingeleitet. Th1-Lymphozyten sind durch die Bildung der Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- β charakterisiert und spielen eine entscheidende Rolle bei der zellulären Immunantwort. Das Schlüsselenzym für die Einleitung einer Th2-Immunantwort ist IL-4. Th2-Lymphozyten sind vor allem durch die Bildung der Zytokine IL-4 und IL-5 charakterisiert, sezernieren außerdem IL-10 und IL-13 und spielen eine entscheidende Rolle bei der humoralen Immunantwort. Das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2 Zellen kann durch die antagonistische Wirkung ihrer Zytokine gestört werden.

Es wird gegenwärtig angenommen, daß ein Th1/Th2 Ungleichgewicht zugunsten von Th2 Lymphozyten zur Entstehung atopischer Erkrankungen führt. Entsprechend konnten Th2 Zellen und deren Zytokine im peripheren Blut sowie in Hautläsionen von Patienten mit Neurodermitis, in Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis und in bronchoalveolärer Flüssigkeit von Asthmapatienten nachgewiesen werden [41,87,91,104].

Es wurden verschiedene Umweltfaktoren identifiziert, welche auf die Entstehung allergischer Erkrankungen begünstigend einwirken oder aber davor schützen [16,99]. So führt z.B. der frühe Kontakt mit Hausstaubmilben-Endotoxin zur Ausreifung von Th1 Lymphozyten [1,37,62].

Nach neueren Modellen wird die Balance zwischen einer Th1- und Th2-Immunantwort durch ein ganzes Netzwerk regulatorischer Zellen gesteuert [108]. Regulatorische Immunzellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Selbst-Toleranz und Autoimmunität [14]. Störungen ihrer Aktivität können Autoimmunerkrankungen und Allergien auslösen [95]. Zu den regulatorischen Immunzellen gehören in erster Linie verschiedene CD4⁺ T-Tell-Subpopulationen wie die Tr1- und Th3-Zellen, die in der Peripherie nach Antigen-Kontakt differenzieren, oder die im Thymus entstehenden CD4⁺CD25⁺ T Zellen [19,56,61], aber auch die CD1d-restringierten NKT-Zellen. Die Wechselwirkung der verschiedenen regulatorischen Immunzellen untereinander wird erst ansatzweise verstanden [47,63]. Ebenso sind die genauen Umstände, die zur Einleitung einer Th2 Immunantwort und einem Th2-lastigen Ungleichgewicht führen, weiterhin nicht ausreichend geklärt.

IL-4 gilt als zentrales Zytokin, welches das initiale Wachstum von Th2 Zellen anregt und somit maßgeblich an der Initiierung der Th2 Antwort beteiligt ist. Es sind aber auch andere IL-4-unabhängige Mechanismen zur Einleitung einer Th2 Antwort beschrieben worden [42,78,90]. Woher das initiale IL-4 stammt, bleibt weiterhin unbekannt. Zu den potentiellen Zellarten, die in der Lage sind, große Mengen von IL-4 zu synthetisieren, gehören Mastzellen [15], dendritische Zellen [20] und Natürliche Killer T-Zellen (NKT) [9,10].

1.2. NKT Zellen

Bei NKT Zellen handelt es sich um eine eigenständige Population regulatorischer Immunzellen, die strukturelle Ähnlichkeit mit konventionellen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK Zellen) aufweist und daher als Natürliche Killer T-Zellen (NKT Zellen) bezeichnet wird. Ihre Gensequenz ist hochkonserviert, d.h. die

Information auf DNA Ebene ist in humanen und murinen Zellen in höchstem Maße übereinstimmend [24].

Sie werden charakterisiert durch die Expression eines CD3 assoziierten T-Zell Rezeptors sowie durch die Koexpression der humanen NK-Zell Oberflächenmarker NKR-P1a (CD161), CD69 und CD94 (Abb. 1.2) [9,24,88].

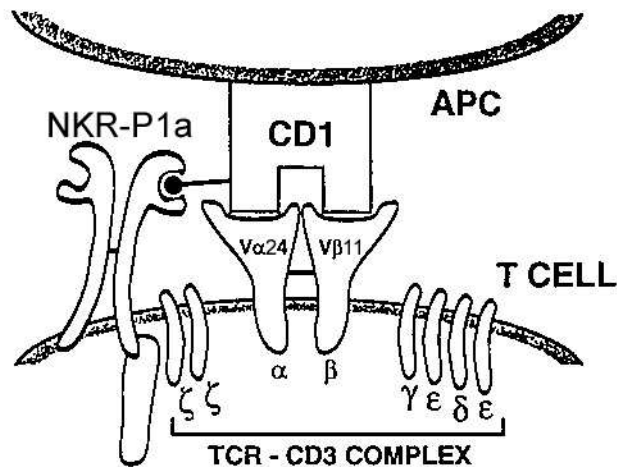


Abb. 1.2: Oberflächenrezeptoren auf NKT Zellen: Koexpression von T-Zell Rezeptor (TCR) und NK-Zell Rezeptor (NKR). Der TCR ist wie bei konventionellen T-Zellen CD3-assoziiert und besteht aus einem Heterodimer, zusammengesetzt aus einer α - und β -Domäne. CD3 ist für die Oberflächenexpression des TCR notwendig und dient der Signaltransduktion. Der humane NKR-P1a ist ein Homodimer aus einem extrazellulären C-Typ Lectin und einer cytoplasmatischen Tyrosinkinase. APC = Antigen präsentierende Zelle [65].

Andere typische NK Zell Oberflächenmarker wie CD16, CD56 oder KIR Proteine (p58, p70), welche bei der NK Zellfunktion eine Rolle spielen, werden von NKT Zellen nicht oder nur selten exprimiert [24,30,88]. Ihre Expression kann jedoch durch IL-2, IL-4 und IL-12 stimuliert werden [6,65].

Phänotypisch unterscheiden sich NKT Zellen deutlich von konventionellen T-Zellen (Tab. 1.1). Sie exprimieren Oberflächenmarker vom Aktivierungs- und Memory-Typ, wie $CD44^{high}$, $CD45RB^{low}$, $CD45RO^{high}$ und $CD62L^{low}$. Zusätzlich findet sich eine starke Expression der β -Kette des IL-2 Rezeptors (CD122), welche normalerweise auf NK Zellen vorkommt, auf konventionellen T-Zellen jedoch nur kurz nach deren Aktivierung nachgewiesen werden kann [24,65]. Während konventionelle, reife T-Zellen durch die Expression der Ko-Rezeptoren CD4 oder CD8 gekennzeichnet sind, sind humane NKT Zellen entweder $CD4^{+}$ positiv oder $CD4^{-}CD8^{-}$ doppelt negativ (DN). $CD8^{+}$ NKT Zellen kommen äußerst selten vor [24,25].

| Oberflächenmarker | NKT Zellen | naive T Zellen | Memory T Zellen |
|-------------------|---|--|--|
| NK1.1 | + | - | - |
| CD4/8 | CD4 ⁺ oder CD4 ⁻ 8 ⁻ | CD4 ⁺ oder CD8 ⁺ | CD4 ⁺ oder CD8 ⁺ |
| CD44 | high | low | high |
| CD45RB | low | high | low |
| CD62L | low | high | low |
| CD122(IL2-Rβ) | high | low | low |
| TCR-CD3 | intermediate | high | high |
| TCR Vβ | 2,7,8.2 | alle | alle |
| TCR Vα | 14 | alle | alle |

Tab. 1.1.: Phänotyp und TCR Repertoire am Mausmodell

Gegenüberstellung von NKT Zellen und konventionellen T-Zellen der Maus mit Vergleich der Expressionsstärke ihrer Oberflächenrezeptoren. Murines NK1.1, entsprechend dem humanen NKR-P1a, wird von NKT Zellen exprimiert, dagegen nicht von T-Zellen. Im Vergleich zu konventionellen T-Zellen haben NKT Zellen eine fast 3-fach geringere TCR Oberflächendichte (intermediate). Die Spezifität der α - und β -Domäne im TCR wird im folgenden Kapitel erläutert [65].

NKT Zellen können nach Aktivierung eine Vielzahl von Mediatoren wie z.B. IL-4, IL-5, IL-10, IFN- γ freisetzen, entsprechend dem Zytokin-Expressionsmuster von Th2 Lymphozyten und weniger dem von Th1 Lymphozyten. Dabei gleichen sie durch ihre Expression von CD44^{high} phänotypisch aktivierten Effektorzellen [10,13]. Andere von NKT Zellen exprimierte Marker wie CD25^{high}, CD45RO^{hi}, CD45RBD^{low} und CD62L^{low} entsprechen dem Phänotyp aktivierter Gedächtniszellen [24,88].

Ein Großteil der NKT-Zellen befinden sich im Thymus sowie in der Peripherie. Im Thymus machen sie etwa 20% des reifen Thymozyten-Kompartiments aus. Ein weiterer großer Anteil befindet sich vor allem im Knochenmark und in der Leber (15-50%), zu einem geringen Anteil befinden sie sich in der Milz (1% der T-Zell Population) und in peripheren Lymphknoten (0.3% der T-Zellen) [9,12,13].

1.3. Eingeschränkte Variabilität des T-Zell-Rezeptors bei NKT Zellen

Die charakteristischste Eigenschaft von NKT Zellen ist ihr extrem eingeschränktes Repertoire für die Bildung der T-Zell Rezeptor alpha Kette (TCR α). Diese ist wie bei konventionellen T-Zellen aus drei Abschnitten zusammengesetzt (Abb. 1.3): dem konstanten (C), dem variablen (V) und dem dazwischenliegenden Verbindungsstück (J). Auf molekularer Ebene sind für jeden einzelnen dieser Abschnitte eine Vielzahl von Gensegmenten bekannt, die auf Chromosom 14 kodiert werden. So liegen beispielsweise für den variablen Abschnitt der α -Kette ($V\alpha$) zwischen 70 und 80 AV-Gensegmente vor. Jedes Segment enthält jeweils ein für die variable Region

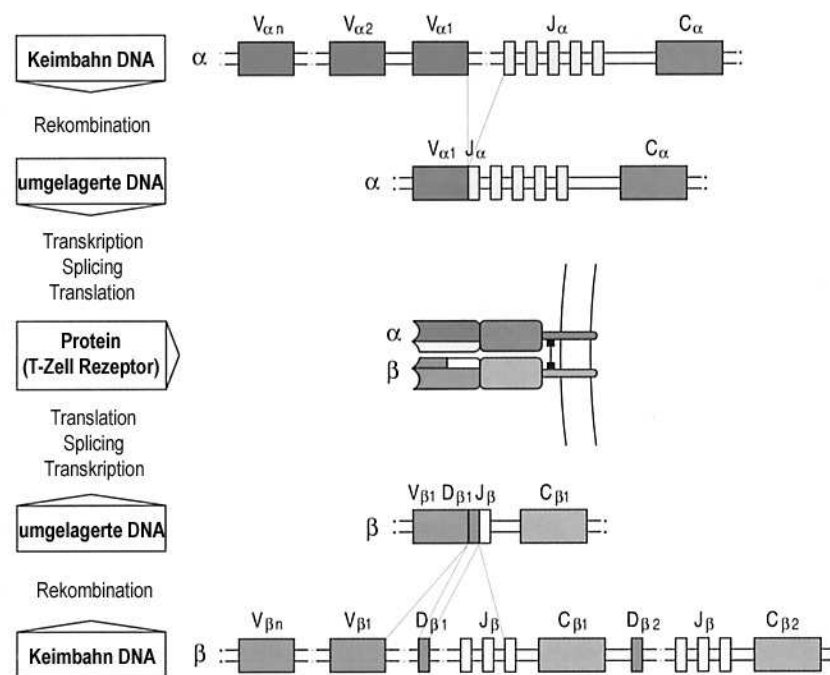


Abb. 1.3: Gen Rearrangement und Expression von α - und β -Kette des T-Zell Rezeptors (TCR)

Keimbahn-DNA für α - und β -Kette des TCR. Zur Bildung der α -Kette werden durch somatische Rekombination aus etwa 80 $V\alpha$ -Segmenten und ca. 60 $J\alpha$ -Segmenten jeweils ein $V\alpha$ -Segment mit einem $J\alpha$ -Segment zusammengelagert. Zusammen bilden sie ein funktionelles Exon. Durch Umschreiben (Transkription) und Zuschneiden (Splicing) des $VJ\alpha$ Exons an das $C\alpha$ -Segment entsteht die mRNA die im Folgenden zum α -Kettenprotein übersetzt (Translation) wird. Für die Bildung der β -Kette werden 3 Gensegmente, $V\beta$, $J\beta$ und $D\beta$ zum einem funktionellen Exon zusammengelagert und mit $C\beta$ zusammengefügt, bevor es zum β Kettenprotein übersetzt wird. α - und β -Kette bilden zusammen das Heterodimer des $\alpha\beta$ T-Zell Rezeptors. [46]

kodierendes Exon, gefolgt von einer Leader-Sequenz, die das Protein zur Zelloberfläche führt. Während für den J-Abschnitt ($J\alpha$) mehr als 60 AJ-Gensegmente bekannt sind, kodiert für die konstante Region ($C\alpha$) lediglich ein einziges AC-Gen. Während der Entwicklung kommt es durch somatische Rekombination zur Zusammenlagerung einzelner Gensegmente aus V, J und C. Hierbei werden zunächst V und J Gene zusammengelagert wodurch ein funktionelles Exon entsteht. In die sogenannte N-Region – zwischen V und J – werden durch die terminale Deoxynucleotidyltransferase zusätzlich einzelne, nicht auf der DNA-Matrix kodierte Nukleotide eingefügt. Durch Transkription und Spleißen des VJ Exons an das C Segment entsteht die mRNA, die zur α -Kette translatiert wird. Durch die Vielzahl an Gensegmenten (etwa 80 für AV und 60 für AJ) entstehen allein bei der VJ Rekombination mehr als 5000 verschiedene Möglichkeiten. Zusätzlich wird durch das Einfügen einzelner Nukleotide in die N-Region die Variabilität nochmals um den Faktor 20 erhöht. Es entstehen hochvariable α -Ketten Domänen [46].

NKT Zellen zeichnen sich besonders durch die konstante Verwendung von ausschließlich TCRAV24 und dessen hochselektive Zusammenlagerung mit TCRAJ18 aus. Diese spezifische Zusammenlagerung entspricht der homologen AV14-AJ281 Zusammenlagerung bei der Maus [68]. Darüber hinaus fehlen NKT Zellen die zusätzlich eingefügten Nukleotide der N-Region, die somit nicht vorhanden ist. Hiervon sind nur sehr selten Abweichungen beschrieben [25,30,80].

Konventionelle T-Zellen exprimieren TCRAV24 nur sehr selten. In FACS Analysen wurde gezeigt, daß innerhalb einer Gesamt T-Zell Population nur 2-10% der T-Zell Population $V\alpha 24$ exprimieren [25]. Dies aber fand sich vorwiegend bei CD4/CD8 doppelt negativen T-Zellen und lediglich bei 0,5% CD4 positiven und nur 0,1% CD8 positiver Lymphozyten. Dies verdeutlicht, daß $V\alpha 24$ von konventionellen T-Zellen kaum benutzt wird und fast ausschließlich bei NKT Zellen zu finden ist.

Falls unter der Vielzahl verschiedenster V-Segmente bei der V-J Rekombination von konventionellen T-Zellen TCRVA24 dennoch zum Einsatz kommt, so wird es mit variablen J-Genen zusammengelagert, zusätzlich sind in der N-Region einzelne Nukleotide eingefügt.

Eine weitere Einschränkung der TCR Variabilität von NKT Zellen ist die häufige Paarung der aus V α 24-J α 18 bestehenden Domäne mit der polyklonalen V β 11 Kette. TCRBV11 wird mit verschiedenen BJ Segmenten zusammengelagert und steht in Beziehung zu verschiedenen CD3 Regionen.

Während bei humanen NKT Zellen die Zusammenlagerung ausschließlich mit TCRBV11 stattfindet, sind bei murinen NKT Zellen drei verschiedene V-Segmente für die β -Kette beschreiben worden: BV2, BV7 und das dem humanen BV11 homologe BV8.2 [35]. Diese lagern mit verschiedenen TCRBJ Gen Segmenten zusammen [3].

1.4. Funktion von NKT-Zellen

Funktionell unterscheiden sich NKT-Zellen erheblich von konventionellen T Zellen. Die meisten T-Zellen sind MHC restringiert, d.h. gewöhnlich erfolgt die Antigenpräsentation über den MHC Komplex, z.B. durch dendritische Zellen. NKT Zellen dagegen erkennen Antigen nur, wenn es über CD1 präsentiert wird. Analog zu MHC sind auch CD1 Proteine spezialisierte, Antigen präsentierende Moleküle. Sie bilden eine Familie nicht-polymorpher Zelloberflächen-Glykoproteine, die dem MHC Komplex nur entfernt verwandt sind und außerhalb des MHC Locus kodiert werden [76]. Die CD1 Familie kann über Sequenzhomologien in 2 Gruppen eingeteilt werden: Gruppe I mit den Isotypen CD1a, b, c und Gruppe II mit CD1d, e [82,96]. In der Evolution der Säugetiere ist CD1 sehr homolog erhalten geblieben und zeigt in murinen und humanen Zellen eine vollständige Kreuzreaktivität [17]. Die CD1 Familie der Maus setzt sich aus den beiden zu 95% identischen Genen CD1.1 und CD1.2 zusammen. Sie sind homolog zum humanen CD1d. Die Expression von CD1 Molekülen befindet sich vorwiegend auf Antigen präsentierenden Zellen, sie spielen in der Zell-vermittelten Immunität eine funktionelle Rolle [82].

Die Antigen Präsentation durch CD1 Proteine erfordert die Aufnahme und die intrazelluläre Verarbeitung des Antigens in der präsentierenden Zelle. Hier werden über den Zellweg sowohl exogene als auch endogene Lipidantigene präsentiert. CD1 Proteine binden den hydrophoben Alkyl-Anteil während die polare oder hydrophile

Kopfgruppe aus gebundenen Lipiden und Glycolipiden dem T-Zell Antigen Rezeptor zur hochspezifischen Interaktion angeboten wird [48,82].

Für NKT Zellen konnte eine fast universelle Reaktion auf humanes CD1d Protein, das über Transfektion in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, gezeigt werden [82]. Nach Aktivierung kommt es zur Sekretion großer Mengen verschiedener Zytokine.

Für murine, CD1 restringierte NKT Zellen konnte gezeigt werden, daß diese synthetisch hergestellte, Ceramid enthaltende Glycolipid Antigene erkennen [50]. Eine Reaktion auf diese Glycolipide wurde auch entsprechend für humane, CD1d restringierte NKT Zell Klone untersucht [18,98]. Diese synthetische Komponente hat eine ungewöhnliche Struktur, bestehend aus einem α -anomerischen Hexose Zucker (Glukose oder Galaktose), der an ein Acylphytosphingosine Teil gebunden ist. Lipide dieser Struktur fand man zuerst in „Schwämmen“ marinen Ursprungs [18]. Inzwischen wurden weitere, über C1d präsentierte, endogene und exogene natürliche Liganden des invarianten T-Zell-Rezeptors von NKT-Zellen identifiziert. Phosphatidylinositol Mannosid (PIM) aus Mycobakterien aktiviert humane und murine NKT Zellen über CD1 und führt zu einer Antigen-spezifischen IFN- γ Produktion und zellvermittelten Zytotoxizität [33]. Verminderte Produktion von Isoglobotrihexosylceramid (iGb3), einem von humanen und murinen NKT Zellen erkannten lysosomalen Glycosphingolipid, führt zu einem schweren NKT Zell Mangel in Mäusen [113], was darauf hindeutet, daß dieser endogene Ligand an der Steuerung einer NKT-Zell-Antwort beispielsweise auf Infektionen, maligne Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen beteiligt ist. Glycosphingolipide (GSLs) von Sphingomonas, Gram-negativen α -Proteobakterien, die kein LPS enthalten, aktivieren humane NKT Zellen und führen zu einer IL-4 und IFN- γ Sekretion [107]. Glycosylceramide aus der Zellwand von Ehrlichia muris und Sphingomonas capsulata führen zu einer direkten Aktivierung von humanen und murinen NKT-Zellen, während Gram-negative Bakterien wie LPS-positive Salmonella typhimurium NKT-Zellen indirekt aktivieren über die Präsentation von endogenem lysosomalem Glycosphingolipid iGb3 durch LPS-aktivierte dendritische Zellen [71].

Die Fähigkeit zur Sekretion sehr großer Mengen von IFN- γ und IL-4 sowie weiterer Zytokine in außergewöhnlich kurzer Zeit ist ein charakteristisches Merkmal von NKT Zellen. Die rasche Sezernierung von IL-4 impliziert ein frühes Programmieren bei Immunantworten, die in manchen Fällen zu einer Th2 Antwort mit Antikörper Synthese und Immunität gegen extrazelluläre Parasiten führt. Dagegen wurde die Aktivierung in anderen Fällen mit der Th1 Entzündungsreaktion assoziiert. Andere Untersuchungen zeigen eine tiefgreifende Rolle von murinen NKT Zellen bei der IL-12 induzierten Abstoßung von Tumorzellen und eine mögliche Rolle bei der Regulation von Autoimmunität [82].

Das genaue Profil der von NKT Zellen sezernierten Zytokine ist von einigen Parametern abhängig. Dazu gehören die Aktivierung verschiedener Zell Oberflächenmoleküle mit den diversen Signalwegen in NKT Zellen, die Anwesenheit verschiedener NKT Zell Subpopulationen [59] sowie die Expression verschiedener kostimulatorischer Faktoren [39,59,60] und Liganden [52,98] in ihrer Mikroumgebung.

So führt sogenanntes Cross-linking von T Zell Rezeptoren – die Zusammenlagerung und Interaktion der Rezeptoren – vorwiegend zu einer IL-4 Synthese [58,109]. Cross-linking von NKR-P1a Rezeptoren führt hauptsächlich zur Bildung von IFN- γ [5]. Außerdem ist IL-7 für die optimale Synthese und Sekretion von IL-4 zuständig, während IL-12, ein proinflammatorisches Zytokin, die IFN- γ Synthese nach TCR Aktivierung steigert und somit das Verhältnis IL4/IFN- γ modifiziert. Kommt es nicht zu einem TCR Cross-linking, kann IL-18 zusammen mit IL-12 NKT Zellen aktivieren und zur Synthese von IFN- γ anregen [60]. IL-7 spielt bei der NKT Zell Reifung eine entscheidende Rolle [39].

Während für CD8+ NKT Zellen eine vorwiegende IFN- γ Synthese gezeigt wurde [29], synthetisieren CD4+ und DN NKT Zellen in erster Linie IL-4 [24,88]. Weiterhin wurden in mehreren Fällen TH0 Zytokinmuster gefunden [27].

Die Fähigkeit stimulierter NKT Zellen, sehr schnell große Mengen verschiedener Th1/Th2 Zytokine zu synthetisieren, führte zu der Hypothese, daß diese Zellen eine regulative Rolle bei der erworbenen Immunantwort spielen könnten. Untersuchungen von Th1- und Th2-assoziierten Erkrankungen in verschiedenen Mausmodellen unterstützen diese Hypothese. So werden beispielsweise V α 14-J α 281 transgene

NOD Mäuse durch Überexpression von NKT Zellen über einen IL-4 abhängigen Weg vor der Entwicklung eines IDDM geschützt [7,57,83]. Dies wird mit einem lokalen, auf die Inselregion begrenzten Th2 Shift assoziiert [55].

Vor einer Dextransulfat-induzierten-Colitis schützen murine, mit aGalCer aktivierte Milz-NKT Zellen [93]. Murine hepatische NKT Zellen, die durch Injektion von aGalCer aktiviert werden, verhindern durch den Anstieg von Interferonen die Replikation von Hepatitis B Viren [49].

Untersuchungen beim Menschen unterstützen ebenfalls die Vorstellung, daß NKT Zellen eine wichtige immunregulatorische Rolle spielen. So konnte bei Autoimmunerkrankungen wie IDDM [105], systemischer Sklerose [44,53], SLE [53,100] und rheumatoider Arthritis [53,66] eine selektive Abnahme von NKT Zellen beobachtet werden. Bei Myasthenia gravis [89] und der T Zell reaktiven Lepra [72] wurde dagegen ein Anstieg von NKT Zellen beobachtet. Die Mehrzahl dieser Erkrankungen sind Th1 modulierte Immunantworten.

Eine mögliche Rolle von NKT Zellen bei der Th2 Immunantwort konnte in vitro und in vivo am Mausmodell gezeigt werden. Nach Stimulation des TCR sezernieren NKT Zellen sehr große Mengen IL-4 innerhalb ungewöhnlich kurzer Zeit (<1h), weshalb von einem „explosive burst“ gesprochen wird [4,109,114]. Transgene Mäuse, die NKT Zellen überexprimieren, sezernieren 60-fach mehr IL-4 als Kontrollmäuse und haben deutlich erhöhte IgE Basaltiter [11]. Umgekehrt können in NOD- und SJL-Mausstämmen, die kein IgE und kein IL-4 synthetisieren können, auch keine NKT Zellen nachgewiesen werden [110]. Die Aktivierung von NKT Zellen mit aGalCer führte in einer mit Ovalbumin sensibilisierten Maus zu erhöhten Serum Spiegeln für Ovalbumin spezifisches IgE und zur Generierung von Antigen spezifischen Th2 Zellen [97]. NKT Zell-defiziente $\beta_2m^{-/-}$ Mausstämmen synthetisieren nach Stimulation kein IL-4. Wird jedoch einmalig exogen IL-4 zugesetzt, wird die Fähigkeit zur IL-4-Synthese wiederhergestellt, da das exogene IL-4 die NKT Zelle ersetzt und eine Differenzierung von Th Vorläuferzellen in IL-4 sezernierende Th2 Zellen bewirkt [111]. Im Gegensatz dazu bleibt in NKT-defizienten, $CD1^{-/-}$ Mäusen eine Th2 Immunantwort weiterhin erhalten und bei $\beta_2m^{-/-}$ Mäusen konnte eine Immunantwort mit spezifischem IgE für Ovalbumin gezeigt werden [112]. In einer weiteren Studie

wird die antigen-spezifische IgE Synthese sowie die Differenzierung in Th2 Lymphozyten durch murine, aGalCer-aktivierte NKT Zellen unterdrückt [23].

Der Beitrag von NKT Zellen zu Th1- oder Th2-assoziierten Erkrankungen bleibt somit weiterhin unklar.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Es wird gegenwärtig angenommen, daß von NKT-Zellen sezerniertes IL-4 an der Differenzierung von naiven Th0-Zellen in Th2-Zellen beteiligt ist, welche ihrerseits durch IL-4 Synthese den Isotyp-Switch von IgM zu IgE bewirken. Diese Hypothese wird durch die im Mausmodell erhaltenen Daten stark unterstützt. Beim Menschen existiert eine analoge Zellpopulation. Der direkte Nachweis, daß humane, IL-4 sezernierende NKT-Zellen über Induktion von Th2-Zellen ebenfalls zu einer erhöhten IgE-Synthese führen, steht jedoch noch aus. Wenn die Hypothese zutrifft, ist zu erwarten, daß Atopiker gegenüber nicht-Atopikern vermehrt NKT-Zellen und damit vermehrt spezifische, invariante $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ TCR aufweisen.

Ziel der vorliegenden Studie war, zu untersuchen, ob humane NKT Zellen bei der Pathogenese allergischer Erkrankungen eine Rolle spielen. Hierfür wurde die Häufigkeit von $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ positiven NKT Zellen im peripheren Blut Erwachsener mit manifester allergischer Erkrankung im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe untersucht. Dabei wurde die $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ mRNA-Expression semiquantitativ bezogen auf die Gesamtzahl aller T-Zell-Rezeptor alpha-Ketten.

2. Material

2.1. Chemikalien

| Material | Firma |
|--|--------------------------------------|
| Aceton | Merck, Darmstadt |
| Agarose, <i>NuSieve-SeaKem 3:1</i> | Life Technologies, Paisley, Scotland |
| Aqua ad iniectabilia | B.Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Bromphenolblau Na-Salz | Merck, Darmstadt |
| Chloroform | Merck, Darmstadt |
| DTT (1,4-Dithiothreitol) | Life Technologies, Paisley, Scotland |
| Eisessig (Essigsäure 100%) | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe |
| Glycerin | Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe |
| Guanidinisothiocyanat | Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe |
| Heparin-Natrium 25000 IE/ml | B. Braun Melsungen AG, Melsungen |
| Isoamylalkohol (3-Methyl-1-Butanol) | Merck, Darmstadt |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt |
| n-Laurylsarcosin | Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine UK |
| β -Mercaptoethanol | Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe |
| Methanol | Merck, Darmstadt |
| Natriumacetat Trihydrat | Merck, Darmstadt |
| NaCl 0,9% Infusionslösung | Pharmacia & Upjohn GmbH, Freiburg |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt |
| <i>d,l</i> -Natrium-Ethylendiamintetraacetat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat | Merck, Darmstadt |
| <i>d,l</i> -Natriumhydrogenphosphat Dihydrat | Merck, Darmstadt |
| Natriumdisulfit | Merck, Darmstadt |
| Natriumzitat | Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK |

| | |
|---|--------------------------------------|
| PBS Dulbecco´s | Life Technologies, Paisley, Scotland |
| Paraformaldehyd | Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK |
| Phenol | Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe |
| Phenol/Chloroform | Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe |
| 2-Propanol | Merck, Darmstadt |
| Salzsäure | Life Technologies, Paisley, Scotland |
| SDS (Natriumlauryl-sulfat) | Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA |
| TRIS Tris(hydroxyl)-aminomethan | Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) | Sigma-Aldrich Co.Ltd., Irvine, UK |

2.2. Lösungen und Puffer

| | | |
|-------------------------|-----------|-----------------------|
| GT-β-ME Lyse Puffer | 1 ml | Guanidinisothiocyanat |
| | 34 µl | 0,75 M Natriumzitat |
| | 18 µl | n-Laurylsarcosin 30% |
| | 7,4 µl | Mercaptoethanol |
| | pH 6,0 | |
| TEN | 100 µl | 1M Tris-HCL |
| | 2 µl | 0,5 M EDTA pH 8 |
| | 50 µl | 4 M NaCl |
| | ad 10 ml | Aqua dest. |
| Nukleotidlösung | 2,5 mM | je d'NTP |
| BP-Loading Buffer (BPB) | 1 ml | SDS 1% |
| | 5 ml | steriles Glycerin |
| | 2 ml | 0,5 EDTA pH 8 |
| | 2 ml | Aqua dest. |
| | 10 mg | Bromphenolblau |
| Agarosegel-Basislösung | 100 ml | 10xTAE |
| | 3 g | Agarose |
| | 4 µl | Ethidiumbromid |
| 10x TAE | 48,4 g | TRIS |
| | 11,4 ml | Eisessig |
| | 20 ml | 0,5 M EDTA pH 8,0 |
| | ad 200 ml | Aqua dest. |

2.3. Oligonukleotide

2.3.1 Molekulargewichtsmarker

| | |
|---------------|--------------------------------------|
| 50 bp Leiter | Life Technologies, Paisley, Scotland |
| 100 bp Leiter | Life Technologies, Paisley, Scotland |

2.3.2 Ultrapure dNTP Set

| | |
|--------------------------|-----------------------------------|
| (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) | Pharmacia & Upjohn GmbH, Freiburg |
|--------------------------|-----------------------------------|

2.3.3 Oligonukleotidprimer

PCR Primer, T-Zellrezeptor AV24-Gensegment:

| | |
|-----------------------|---|
| AV24 <i>neu</i> | 5'-GAA CTG CAC TCT TCA ATG C-3' |
| AV24 <i>Porcelli</i> | 5'-GAT ATA CAG CAA CTC TGG ATG CA-3' |
| AV24 <i>Dellabona</i> | 5'-GCA ACT GTC GAC GCAGAC ACA AAG CAG AGC-3' |
| AJ18 <i>neu</i> | 5'-TCC AAA GTA TAG CCT CCC CAG-3' |
| AJ18 <i>Porcelli</i> | 5'-GAG TTC CTC TTC CAA AGT ATA GCC-3' |
| AJ18 <i>Dellabona</i> | 5'-GGA TAG AAT TCC AGA CGG TCA ACT GAG TTC-3' |

AV24 *neu* und AJ18 *neu* wurden mit Hilfe der Computerprogramme Mac Molly® Tetra Version (Soft Gene, Bocholt) und Oligo 2.0 (National Biosciences Incorporation, Plymouth, MN, USA) ausgewählt

PCR Primer, T-Zellrezeptor internes Kontrollfragment:

| | | |
|---------|----------------------------------|-------------------------|
| P-5'αST | 5'-CTG TGC TAG ACA TGA GGT CT-3' | <i>antisense primer</i> |
| P-3'αST | 5'-CCT GCC TCT GCC GTG AAT GT-3' | <i>sense primer</i> |

Primer zur reversen Transkription:

P-C α ST 5'-CAC TGA AGA TCC ATC ATC TG-3'

P-C β ST 5'-TAG AGG ATG GTG GCA GAC AG-3'

random hexamer Primer: Hexanukleotidmischung Boehringer, Ingelheim

2.4. Enzyme und Reagenzienkits

| | |
|---|---------------------------------------|
| Taq-Polymerase | Pharmacia & Upjohn GmbH, Freiburg |
| Superscript™ II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase | Life Technologies, Paisley, Scotland |
| RNase Inhibitor <i>rRNAsin</i> | Promega |
| First Strand Buffer 10x conc. | Pharmacia & Upjohn GmbH, Freiburg |
| First Strand Buffer 5x conc. | Life Technologies, Paisley, Scotland |
| MastCLA ^R AllergenSpecific IgE Assay | Hitachi Chemical Diagnostics, Ca, USA |
| RAST CAP System IgE FEIA | Pharmacia & Upjohn GmbH, Freiburg |
| UniCAP 100 | Pharmacia & Upjohn GmbH, Freiburg |
| IgE-Elecsys | Fa. Roche, Basel, Schweiz |

2.5. Sonstiges Verbrauchsmaterial

| | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| PCR-Reaktionsgefäße | Eppendorf |
| Pipettenspitzen <i>safe seal tips</i> | Biozym Diagnostics GmbH |
| <i>Crystall</i> | Peschke GmbH |
| Reaktionsgefäße 1,5 ml, 2 ml | Eppendorf |

2.6. Geräte

| | | |
|--|--------------------|----------------------------------|
| Autoklav | | Webco |
| Eismaschine <i>AF-30</i> | | Scotsman |
| Elektrophoresekammern | | Easy-Cast |
| Elektrophoresezubehör | | |
| Abstandshalter, Kämmen | | Easy-Cast |
| FluorImager <i>Vistra FluorImager SI</i> | | Molecular Dynamics GmbH, Krefeld |
| <i>ScanControl</i> software | | |
| <i>ImageQuant</i> software | | |
| Gefrierschränke | -20° | Bosch |
| | -80° | Kendro |
| Gele-Gießkammer <i>Multi Casting Chamber</i> | | Bio-Rad |
| Kamera für DNA-Gele | | Dunco |
| Magnetrührer | | Kika Labortechnik |
| Mikropipetten | <i>Research</i> | Eppendorf |
| | <i>Modell 5000</i> | Nichiryo |
| Mikrowellenherd | | Moulinex |
| Mischgerät <i>Vortex-Genie</i> | | Scientific-Ind. |
| PCR-Gerät <i>ThermocyclerUno II</i> | | Biometra |
| Spannungsgerät <i>Power Pac 2000</i> | | Bio-Rad |
| UV Transilluminator | | Bachofer |
| Variable wavelength Monitor | | Mitsubichi/Hitachi |
| Waage <i>Feinwaage 1265 MP</i> | | Sartorius |
| Tischzentrifuge <i>5415c</i> | | Eppendorf |

3. Methoden

3.1. Eingangsuntersuchungen und Auswahl der Probanden

Für die Untersuchungen wurde venöses Blut von insgesamt 26 freiwilligen Teilnehmern nach schriftlicher Einwilligung verwendet. Die Probanden wurden aus dem Institutsumfeld rekrutiert.

Zunächst wurde Vollblut in Guanidinisothiocyanat- β -Mercaptoethanol (GT-Puffer) lysiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ asserviert.

Die Gesamt-IgE Bestimmungen im Serum wurden mit Hilfe der kommerziellen Reagenzienkits IgE-Elecsys und UniCAP 100 durchgeführt. Zur Bestimmung der Allergen-spezifischen Antikörper wurde ein Screening-Test auf insgesamt 40 Inhalations- und Nahrungsmittelallergene durchgeführt (CAP System IgE FEIA¹ und MAST CLA² specific IgE Assay). Die Allergene des Radio Allergy Sorbent Test¹⁺² (RAST) sind in Tabelle 3.1. aufgeführt.

| <i>Nahrungsmittelallergene¹</i> | <i>Inhaltationsallergene²</i> |
|--|---|
| Früchte Apfel, Birne, Pfirsich, Aprikose, Kiwi | Gräser Lieschgras, Wiesengras, Lolch, Beifuß, Nessel |
| Gemüse Tomate, Kartoffel, Paprika, Sellerie | Pollen Erle, Birke, Hasel, Eiche, Buche, Weide, Ulme, Esche, Linde, Roggen, |
| Nüsse Haselnuß, Mandel, Walnuß, Erdnuß | Hausstaubmilben Dermatophagoides pteronyssinus, Dermatophagoides farinae |
| Kuhmilch Casein, Lactalbumin | Tierhaare Hund, Katze, Pferd, Meerschweinchen |
| Hühnereiweiß Ovalbumin, Ovomuroid | Pilze Cladosporium, Aspergillus, Penicillium |

Tab. 3.1: Überblick der Inhalations-und Nahrungsmittelallergene des verwendeten RASTs.

Bei einigen Teilnehmern konnten nach schriftlicher Einwilligung aktuelle RAST- und Hautprick-Test Ergebnisse zum Zeitpunkt der Blutentnahme von deren Hausarzt eingeholt werden. Von Eltern, bei denen keine Ergebnisse vorlagen oder der Zeitpunkt der Untersuchung zu weit zurücklag, wurde erneut Blut abgenommen.

Die Teilnehmer wurden entsprechend definierter Kriterien in zwei Gruppen aufgeteilt: Probanden wurden der Atopiker-Gruppe zugeteilt, wenn Symptome einer Typ I Allergie vorhanden waren, das Gesamt-IgE im Serum über 150 IU/ml erhöht war und im RAST Test eine Sensibilisierung gegen mindestens ein Allergen in entsprechender Stärke, mindestens RAST-Klasse 3, vorlag. Probanden der Referenzgruppe wurden nur dann als gesund eingestuft, wenn keine klinischen Symptome vorlagen, die Werte für Gesamt-IgE unter 100 IU/ml lagen und im RAST-Test eine allergische Sensibilisierung nicht nachgewiesen werden konnte (Tab. 3.2).

| | Allergiker | Kontrollgruppe |
|---|------------------------|-----------------------|
| Klinische Symptome einer Typ I Allergie | Vorhanden | Nicht vorhanden |
| IgE-Titer | >150 IU/ml | <100 IU/ml |
| RAST-Klasse | Mindestens ein Wert >3 | alle Werte < 1 |

Tab. 3.2: Einschlusskriterien

3.2. Präparation von Nukleinsäuren

3.2.1. RNA-Isolierung

Zur Isolation der RNA wurde eine modifizierte Methode der sauren Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion [22] verwendet. Grundlage dieser Methode ist die Komplexbildung von RNA mit Guanidin- und Wasserstoffmolekülen, wodurch hydrophile Interaktionen mit DNA und Proteinen unterdrückt werden. Dies führt zu einer Abtrennung von DNA und Proteinen in einer organischen Phase, während die RNA in wässriger Lösung bleibt.

Im ersten Arbeitsschritt werden 750 µl Lysat (125 µl Vollblut mit 625 µl Guanidin-Thioisocyanat, GT-Puffer), 75 µl 2M Natriumacetat pH 4,0, sowie 750 µl H₂O gesättigtes Phenol eingesetzt und durch mehrfaches Resuspendieren mit einer Pipette gelöst. Die Extraktion der RNA erfolgt unter Zugabe von 250 µl Chloroform/Isoamylalkohol (49:1), kurzzeitigem Mischen und einer 15 minütigen Inkubation auf Eis.

Die Trennung von DNA und RNA beruht unter anderem darauf, daß die zellmatrixorientierte DNA an Mikrosomen haften bleibt und deshalb in der organischen Phase oder der Interphase separiert wird. Daher ist bei der RNA Extraktion auf eine exakte Einhaltung der Mischdauer von 10 sek zu achten, um in der kritischen Phase eine saubere Trennung zu erhalten. Andererseits muß ein zu heftiges Mischen vermieden werden, da hierdurch die DNA in Lösung geht und damit zu einer Verunreinigung der RNA führt.

Nach der Inkubation auf Eis wird das Gemisch bei 13000 rpm (ca. 2000*g, Heraeus Biofuge) für 20 min zentrifugiert. Im Anschluß wird die obere, durchsichtig-wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen soll etwa die Hälfte des Ausgangsvolumens haben. Zur Fällung der RNA wird ein identisches Volumen Isopropanol zugegeben und für 20 min auf Trockeneis gelagert. Das Gemisch wird anschließend bei 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Dabei bildet die RNA am Grund des Gefäßes ein weißes Pellet. Der Überstand wird abpipetiert und verworfen, das RNA-Pellet in 300 µl GT-Puffer gelöst und zur

zweiten Fällung mit 300 µl Isopropanol aufgefüllt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Trockeneis wird erneut für 15 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird verworfen und das RNA-Pellet mit 150 µl 70% Ethanol gewaschen. Der Ethanol Waschvorgang dient zur Reinigung der RNA von Salzen, welche die reverse Transkription stören würden.

Im Anschluß erfolgt ein letzter Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13000 rpm, der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen. Um die RNA wieder in Lösung zu bringen wird das Pellet in 20 µl Aqua ad iniectabilia resuspendiert. Zur Inaktivierung von RNasen wird die wässrige Lösung mit 1 µl RNasin versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.2. Synthese von cDNA aus RNA durch Reverse Transkription

In der hier dargestellten Arbeit wird ausschließlich cDNA-Einstrangsynthese durchgeführt, d.h. die Umschreibung von mRNA in einen komplementären DNA Einzelstrang. Zur Initiation der reversen Transkription werden mit einer Mischung kurzer DNA-Hexanucleotide alle theoretisch denkbaren Sequenzabfolgen geprimt. Hierbei wird garantiert, daß alle mRNA-Sequenzen aus einer heterologen Population gleichmäßig in der erhaltenen Mischung von cDNA-Molekülen repräsentiert sind, weil Sequenzen vom 3'-Ende der mRNA nicht wie beim Oligo(dt)-Priming begünstigt werden. Der Nachteil, daß der Anteil vollständig kopierter mRNA Moleküle sinkt, wird in Kauf genommen.

Der gesamte Ansatz wird auf Eis durchgeführt. In einem Reaktionsgefäß werden zu 20 µl RNA, 2 µl Hexanucleotid Primer pipettiert und mit Aqua ad iniectabilia auf insgesamt 25 µl aufgefüllt. Um die Sekundärstruktur der RNA aufzulösen, wird der Ansatz zunächst für 10 min auf 70°C erhitzt und im Anschluß an die Hitze Denaturierung sofort auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wird ein Mastermix aus jeweils 10 µl 5x FirstStrand Buffer, 5 µl DTT, 2,5 µl dNTPs, 2 µl Superscript™ II RNase H 200 U/µl, 1 µl RNase Inhibitor vorbereitet und mit Aqua ad iniectabilia auf ein Gesamtvolumen von 25 µl aufgefüllt. Zu dem auf Eis lagernden Ansatz wird das gleiche Volumen Mastermix gegeben, gemischt und für 70 min auf 42°C erhitzt.

Diese Temperatur entspricht dem Wirkoptimum der Reversen Transkriptase, bei dem die Synthese des komplementären DNA-Stranges stattfindet.

Der Syntheseschritt wird durch Zerstörung des Enzyms sowie der RNA durch 5-minütige Inkubation bei einer Temperatur von 95°C unterbrochen.

Der Ansatz kann beliebig erhöht werden, bei größeren Mengen ist es jedoch ratsam das Syntheseergebnis portioniert einzufrieren, da häufiges Auftauen und Einfrieren der Qualität der cDNA schadet.

3.2.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein in vitro-Verfahren zur Vervielfältigung von DNA - Abschnitten definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuren. Bei einer Temperatur von 94°C wird doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen aufgespalten (Denaturierung). Kurze, einzelsträngige Oligonukleotidsequenzen, sog. Primer, binden bei einer von der Primerlänge abhängigen Temperatur spezifisch an die dazu komplementäre Sequenz der zuvor denaturierten DNA (Annealing). Nach einer vereinfachten Regel errechnet sich die Annealing-Temperatur folgendermaßen:

$$T_m = y(A+T) \cdot 2^\circ\text{C} + z(G+C) \cdot 4^\circ\text{C}$$

$$T_a = T_m - 5^\circ\text{C}$$

(T_m = Schmelztemperatur, T_a = Annealing Temperatur, y bzw z = Anzahl der Nukleoside mit den nachfolgend aufgeführten Basen im Oligonukleotid)

An diese kurzen, doppelsträngigen Abschnitte lagern sich DNA-Polymerasen an und verlängern die DNA-Kette (Extension) mit Hilfe von im Überschuß zugegebener dNTPs bei der optimalen Enzymtemperatur (72°C für Taq Polymerase). Damit wird die zwischen den beiden komplementären Primern liegende DNA-Sequenz amplifiziert.

Die Gesamtreaktion kann automatisiert werden, wobei Denaturierung, Annealing und Extension in wiederkehrenden Zyklen hintereinander ablaufen (Tab. 3.3).

3.2.4. Reaktionsschema der Zyklen

| | 1 Zyklus | 36 / 40 Zyklen | 1 Zyklus |
|--------------------------|----------|--|----------|
| Prä-Denaturierung | 1' 94°C | | |
| Denaturierung | | 40" 94°C | |
| Annealing | | 40" 58°C TCRAC 40" 61°C TCR AV24-AJ18 | |
| Extension | | 60" 72°C | |
| Delay | | | 10' 72°C |

Tab. 3.3: PCR mit *TCRAC* und *TCRAV24-AJ18* am UNOII Thermocycler.

Durch den zyklischen Ablauf der Reaktion vermehrt sich die Zielsequenz exponentiell, ihre Kopienzahl läßt sich nach Abschluß der Reaktion theoretisch nach folgender Gleichung berechnen:

$$X = I * (1 + E)^n \quad [38]$$

X = Menge amplifizierter PCR Produkte = Ausbeute
 I = initial eingestetzte Menge
 E = tatsächliche Effektivität
 n = Anzahl der Zyklen

Für eine optimale Effektivität wird ein theoretischer Wert von max. 1 angenommen. Der exponentielle Charakter und die optimale Ausbeute einer Reaktion nimmt jedoch mit der Anzahl der Zyklen ab und erreicht, von der Ausgangskonzentration abhängig, bei ungefähr 10^8 Kopien ein Plateau [92].

Faktoren, die den exponentiellen Verlauf limitieren, sind eine abnehmende Enzymaktivität durch wiederholte Hitzedenaturierung, begrenzte Enzymaktivität bei ansteigendem molarem Überschuß der Ziel-DNA und Hybridisierung der Ampiflikate untereinander bei zunehmender Konzentration.

Um eine optimale Ausbeute anzustreben, muß die quantitative PCR standardisiert werden. Die Reaktionsbedingungen sollten so gewählt werden, daß möglichst alle Faktoren beseitigt sind, die den exponentiellen Verlauf stören.

3.2.5. Amplifikation des internen Kontrollfragments TCRAC

Nach Transkription der aus dem Probandenblut isolierten mRNA wurde die daraus erhaltene cDNA im Folgenden eingesetzt in eine PCR, die den konstanten, bei allen T-Zell Rezeptoren enthaltenen Abschnitt (auch als internes Kontrollfragment bezeichnet) amplifiziert. Zur Amplifikation wurde der P-3'αST sense primer und P-5'αST antisense primer verwendet.

Jede PCR Reaktion wird in einem 25 µl Ansatz durchgeführt:

Amplifikation des internen Kontrollfragments (TCα):

| | |
|--------|---|
| 2 µl | dNTP (2,5 mM) |
| 2,5 µl | 10x Puffer |
| 5 µl | P-3'αST (12,5 pmol) (<i>sense primer</i>) |
| 5 µl | P-5'αST (12,5 pmol) (<i>antisense primer</i>) |
| 0,3 µl | Aqua dest. |
| 0,2 µl | Taq Polymerase (5 U/µl) |
| 10 µl | cDNA |

3.2.6. Amplifikation des AV24-AJ18 Gensegments

Parallel zur Amplifikation des internen Kontrollfragmentes wurde die cDNA auf den für NKT Zellen spezifischen, variablen Abschnitt AV24-AJ18 des T-Zell Rezeptors amplifiziert. Um eine semiquantitative Aussage über den Anteil der NKT-Zellen an der gesamten T-Zell Population zu erhalten, wurde das Ergebnis der spezifischen AV24-AJ18 Transkripte pro Proband auf die TCRAC Transkripte pro Proband bezogen und folgender Quotient gebildet:

$$\frac{\text{AV24-AJ18 Transkripte pro Proband}}{\text{TCRAC Transkripte pro Proband}}$$

Zur spezifischen Amplifikation von AV24-AJ18 wurden zunächst drei verschiedene Primerpaare verwendet:

AV24*neu* und AJ18*neu* wurden mit Hilfe der Computerprogramme Mac Molly® Tetra Version (Soft Gene, Bocholt) und Oligo 2.0 (National Biosciences Incorporation, Plymouth, MN, USA) ausgewählt, die Primerpaare AV24-AJ18*Porcelli* und AV24-AJ18*Dellabona* wurden aus den Publikationen [81] und [25] entnommen. Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellt.

Jede PCR Reaktion wird in einem 30 µl Ansatz durchgeführt:

Amplifikation des spezifischen AV24-AJ18 Gensegments:

| | |
|--------|---|
| 2 µl | dNTP (2,5 mM) |
| 3 µl | 10x Puffer |
| 5 µl | AV24 Primer (20 pmol) |
| 5 µl | AJ18 Primer (30 pmol) |
| 9,8 µl | Aqua dest. |
| 0,2 µl | Taq Polymerase (5 U/µl) |
| 5 µl | cDNA in der entsprechend angeglichenen Verdünnung |

3.3. Auftrennung von Nukleinsäuren

Aufgrund ihrer negativen Ladung lassen sich Nukleinsäuremoleküle in einem elektrischen Feld in einer Agarosegelmatrix mittels horizontaler Gelelektrophorese auftrennen. Abhängig von der Größe der DNA-Fragmente und der Gelkonzentration wandern die Nukleinsäuremoleküle im elektrischen Feld in unterschiedlicher Geschwindigkeit. Große Moleküle besitzen trotz ihrer höheren Ladung eine geringere Motilität im Gelnetzwerk als kleinere, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit mit abnehmender Basenzahl exponentiell ansteigt.

Um die Nukleinsäuren sichtbar zu machen, wird beim Ansetzen der Gele Ethidiumbromid zugefügt, welches mit den Nukleinsäuren interkaliert. Bei Anregung mit UV-Licht von 260 nm Wellenlänge werden die Nukleinsäuren als orangefarbig fluoreszierende Banden dargestellt und können photographiert werden. Die Größe

der Fragmente kann durch den Vergleich mit einem geeigneten Größenstandard abgeschätzt werden.

Zum Ansetzen der Gele wie auch als Laufmedium wird TAE Puffer verwendet. Zur Herstellung eines 3% Gels wird 3g Agarose mit 100 ml Puffer aufgekocht. Nach kurzem Abkühlen auf 50-60°C werden 4 µl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gemisch in eine Gelkammer gegossen. Nach Erstarren des Gels werden die Kämme vorsichtig gezogen und das Gel in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die PCR-Amplifikate sowie ein geeigneter Molekulargewichtsmarker (50 oder 100 bp) werden zusammen mit einem Ladepuffer (BPB) in die Geltaschen pipettiert. Durch das im Ladepuffer enthaltene Glycerin sinkt die Probe in die Geltasche, das enthaltene Bromphenolblau wandert mit DNA-Fragmenten der Länge 10-100 bp, markiert somit die Lauffront und dient als Indikator dafür, wie weit die Proben im Gel in Richtung Anode gewandert sind. Die Auftrennung erfolgte bei einer Feldstärke von 2-8 V/cm für 1-2 Stunden.

3.4. Auswertung der PCR

3.4.1. Normierung der cDNA Konzentrationen

Wegen des exponentiellen Charakters der PCR-Reaktion und des Plateaus nach Erreichen einer gewissen Anzahl an Kopien, werden beim Einsatz ungleicher cDNA Ausgangsmengen stark divergierende Produktmengen erreicht. Ein quantitativer Vergleich ist unter diesen Bedingungen nicht möglich. Die Möglichkeit einer Quantifizierung der PCR Amplifikate durch Real-time RT-PCR stand zum Zeitpunkt der Arbeit nicht zur Verfügung. Es wurde daher auf die Methode der „semiquantitativen“ RT-PCR [21] zurückgegriffen. Für diese Methode ist zunächst die Qualität der RNA-Isolierung sowie der cDNA Synthese entscheidend, denn es muß sichergestellt werden, daß jede in eine Reaktion eingesetzte Probe etwa die gleiche Ausgangsmenge an cDNA enthält. Hierdurch wird vermieden, daß sich eine Reaktion schon im Plateau der Reaktion befindet, während in anderen Proben relevante Produkte nur schwach nachzuweisen sind.

Bei dieser Methode wird die Angleichung oder „Normierung“ der Ausgangs-cDNA Menge unter Zuhilfenahme eines Referenzgens bzw. eines sogenannten „Housekeeping“ Gens durchgeführt. Das Housekeeping Gen wird idealerweise von allen zu erfassenden Zellen konstant und in etwa gleichem Maß, unabhängig von Differenzierungsstadium und Aktivierungszustand exprimiert. Die mRNA Menge des Housekeeping Gens ist mittels PCR einfach zu bestimmen und korreliert direkt und linear mit der zu untersuchenden Ausgangs cDNA Menge [36].

Das für den konstanten Abschnitt der T-Zell Rezeptor alpha Kette kodierende TCRAC-Gen (Abb. 3.1) kommt den genannten Forderungen als Housekeeping Gen am nächsten. Da bis zu 99% aller T-Zellen einen aus einer α - und β - Kette zusammengesetzten T-Zell Rezeptor exprimieren, wird durch das TCRAC Gen nahezu die gesamte T-Zell Population erfasst. Nur eine Minderheit thymischer T-Zellen (sowie eine zu vernachlässigende Population peripherer T-Zellen) exprimieren einen T-Zell Rezeptor bestehend aus einer γ - und einer δ - Kette. TCRAC ist das einzige, für die konstante Domäne der T-Zell Rezeptor alpha Kette kodierende Gen, während für die variablen Abschnitte V und J eine Vielzahl verschiedener Gensegmente existieren, und unterliegt somit keiner Expressions-Variabilität. Es kann zudem davon ausgegangen werden, dass die TCRAC Expression unter den verwendeten Versuchsbedingungen keinem Regulationsphänomen unterliegt.

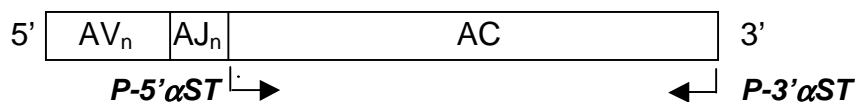


Abb. 3.1: Genabschnitt für die T-Zell Rezeptor alpha Kette

Die Skizze zeigt die für die TCR α -Kette kodierenden Genabschnitte. Als Housekeeping Gen wird das für die konstante Domäne der T-Zell Rezeptor α -Kette kodierende TCRAC Gensegment verwendet, welches von nahezu allen T-Zellen konstant und in gleichem Maß exprimiert wird. P-3'αST und P-5'αST sind die zur Amplifikation verwendeten sense und antisense primer.

Um die ungleichen cDNA Ausgangsmengen jeder einzelnen Probe auf gleiche cDNA Konzentrationen zu normieren, wurde als Referenz ein cDNA-Standard verwendet, wofür im Labor vorhandene, unspezifische rtPCR-Amplifikate aus früheren mRNA Isolationen zu einem Pool zusammengefasst wurden. Durch den darin vorhandenen TCRAC-Anteil wird erreicht, daß bei der spezifischen Amplifikation des Referenzgens

hohe cDNA-Produktmengen erzielt werden. Die cDNA Konzentration des Standards wurde so gewählt, daß sich unter den gewählten PCR Bedingungen seine Produktmenge im linearen Bereich der TCRAC PCR als auch im linearen Auswertungsbereich des FluorImagers befand. Anhand des Standards wurden die relativen TCRAC Konzentrationen der einzelnen Proben ermittelt und anschließend alle Proben auf die niedrigste Proben-Konzentration verdünnt, um gleiche TCRAC Ausgangskonzentrationen zu erzielen. Gleichzeitig dient der Standard als Positivkontrolle der Amplifikation des Referenzgens.

Dieser Standard wurde seriell in 1:3 Schritten verdünnt in die PCR eingesetzt. Die zu untersuchenden cDNA Proben wurden zunächst 1:10 vorverdünnt und dann ebenfalls in 1:3 Schritten seriell verdünnt für die PCR verwendet.

Neben der Normierung der cDNA Konzentration wurde die TCRAC PCR auch zur Qualitätskontrolle der RNA Isolierung und der reversen Transkription herangezogen. Fehlte nach einer PCR Reaktion das TCRAC-Amplifikat oder wurde eine sehr große Menge an eingesetzter cDNA für den TCRAC Nachweis benötigt, wurde dies als ein Hinweis auf RNA Degradierung oder auf schlechte cDNA Synthese gewertet. Diese Proben wurden nicht mehr weiterverfolgt.

3.5.2. Densitometrie und Fluorimaging

Die PCR Produkte wurden nach gelelektrophoretischer Auftrennung (Abb. 3.1 A) mit einem Scanner (Vistra FluorImagerSI) zur weiteren densitometrischen Bearbeitung eingelesen und anschließend mit der dazugehörigen Scan Control- und ImageQuant –Software bearbeitet (Abb. 3.1 B).

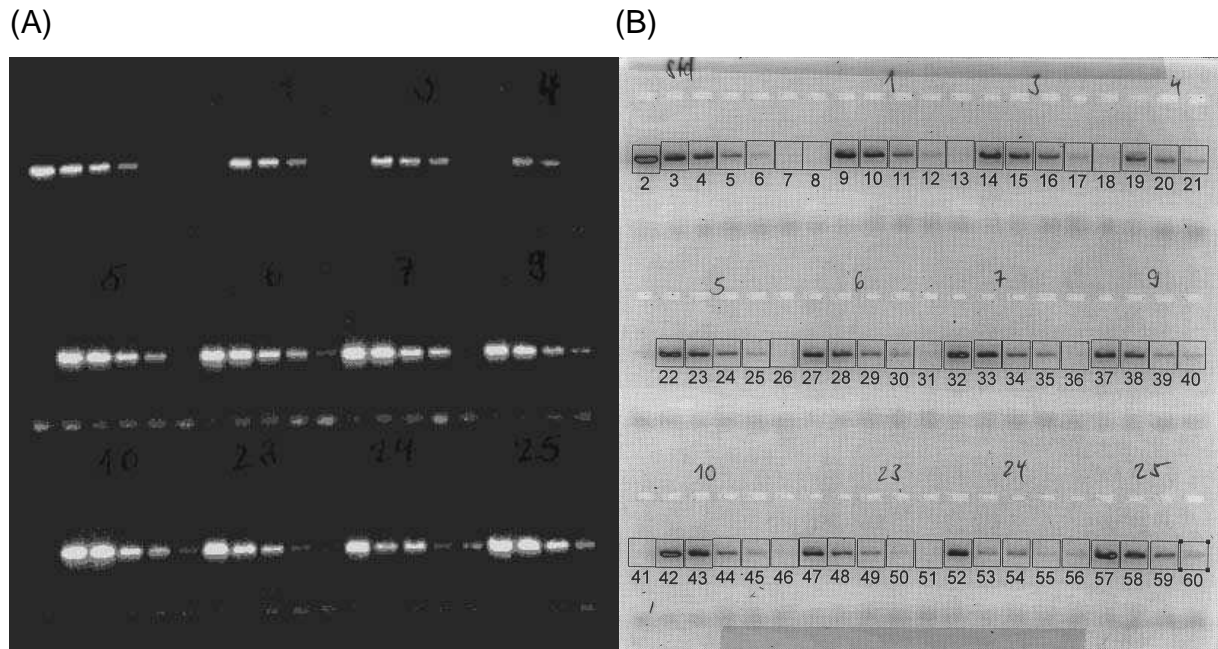


Abb. 3.1: PCR zur Normierung der cDNA Konzentration

Die Abbildung zeigt eine TCRAC PCR nach 36 Zyklen, (A) nach gelelektrophoretischer Auftrennung und (B) nach Bearbeitung mit dem FluorImager. Für die Reaktion wurde der Standard (in der Abb. als Std. abgekürzt) 7x seriell 1:3 verdünnt, die Probanden Ausgangs-cDNA (hier exemplarisch numeriert mit Proband 1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 2, 24 und 25) wurde je 5x 1:3 verdünnt eingesetzt.

Die Messung der einzelnen DNA Produktmengen erfolgte densitometrisch über den FluorImager, wobei die Ergebnisse als relative Fluoreszenzeinheiten (rfu) angegeben werden (Tab. 3.4)

| Name | Volume |
|---------|-------------|
| RECT- 2 | 13611052.07 |
| RECT- 3 | 6320195.60 |
| RECT- 4 | 4607180.03 |
| RECT- 5 | 2227019.19 |
| RECT- 6 | 696383.71 |
| RECT- 7 | 172814.90 |
| RECT- 8 | -503205.82 |

Tab. 3.4: Standard cDNA nach Bearbeitung mit der ScanControl- und ImageQuant Software.

Die einzelnen Banden der titrierten Standard cDNA, in Abb. 3.1 (B) in Kästchen dargestellt, sind in der oben abgebildeten Tabelle wieder als Kästchen 2-8 (RECT = rectangle) aufgeführt. Daneben stehen die jeweils gemessenen Produktmengen (Volume), die in relativen Fluoreszenzeinheiten (rfu) angegeben werden.

Aus den rfu-Werten des titrierten Standards wurde zunächst eine Standardkurve erstellt (Abb. 3.2), wobei die relative cDNA Konzentrationen des Standardpools in frei gewählten Einheiten dargestellt wurde. Der 81-fach verdünnte Standard entsprach dabei der relativen Konzentration von 1.

| | Amplifikatmenge (relative Fluoreszenzeinheiten) | cDNA Ausgangsmenge (frei definierte Einheiten) |
|----------------------|--|---|
| unverdünnter Std. | 13 611 052 | 81 |
| 1:3 verdünnter Std. | 6 320 195 | 27 |
| 1:9 verdünnter Std. | 4 607 180 | 9 |
| 1:27 verdünnter Std. | 2 227 019 | 3 |
| 1:81 verdünnter Std. | 696 383 | 1 |

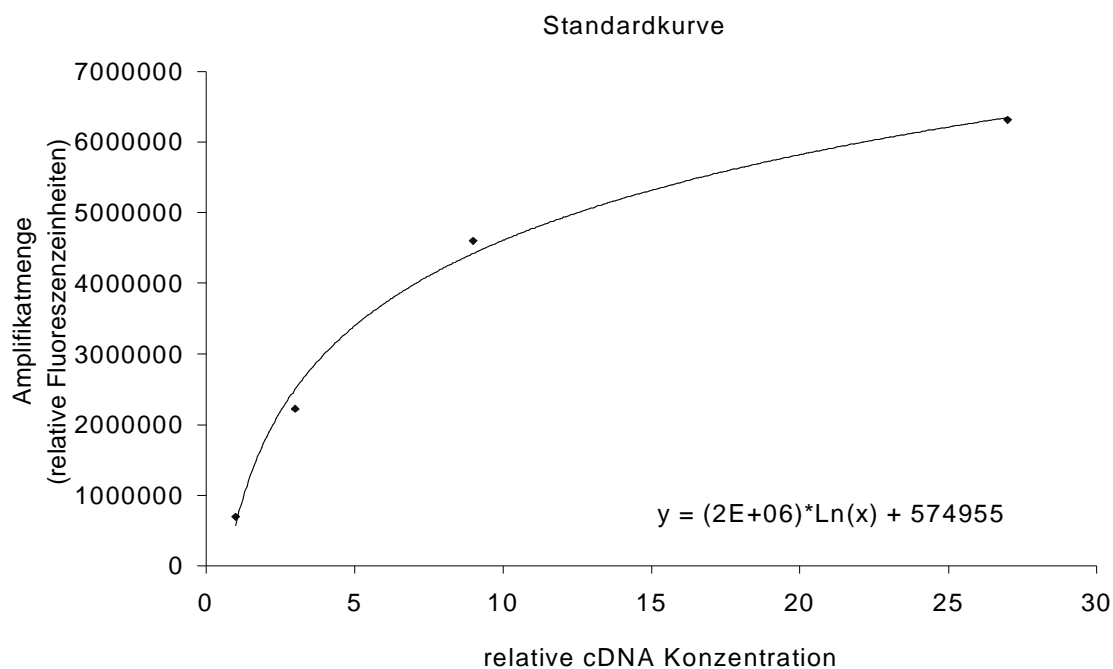


Abb. 3.2: Standardkurve aus den nach der densitometrischen Auswertung erhaltenen Werten (y = Amplifikatmenge (Volume/rfu), x = Konzentration, dargestellt in frei definierten Einheiten). Aus ihrer Funktion wurde die Konzentration (x) der untersuchten cDNA Proben ermittelt.

Funktion der Standardkurve: $y = (2E + 06) \cdot \ln(x) + 574955$
aufgelöst nach x $x = e^{(y-574955)/(2E+06)}$
zur Berechnung der Probanden cDNA Ausgangsmenge

Mit Hilfe der erhaltenen Standardkurve wurde jeweils die TC α cDNA Ausgangsmenge in allen zu untersuchenden Proben ermittelt (Modellrechnung im Anhang). Basierend auf diesen Daten wurden die cDNA Konzentrationen aller Proben so verdünnt, daß diese der Konzentration derjenigen Probe mit der geringsten Konzentration an TC α cDNA entsprach. Nach Angleichen der Konzentrationen durch Verdünnung sollten alle eingesetzten cDNAs bei gleicher Zyklenzahl in der PCR ein Signal ergeben, das dem Signal der Probe mit dem niedrigsten TCRAC cDNA Gehalt vergleichbar ist.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu zeigen und die Standardisierung zu verifizieren, wurde die quantitative PCR mit den verdünnten cDNAs bis zu fünf Mal wiederholt und anschließend für jeden einzelnen Probanden der Median aus den 5 PCRs ermittelt.

In allen Experimenten wurde durch die Entnahme von Proben nach 36 und 40 Zyklen der Einfluß der Zyklenzahl auf das Ergebnis der PCR untersucht. Nach jeder Reaktion wurde die Produktmenge für jede einzelne Reaktion anhand des jeweils mitgelaufenen Standards berechnet.

3.4.2. Semiquantitative Ermittlung der relativen AV24-AJ18 cDNA Konzentration

Die normierte cDNA jedes einzelnen Probanden wurde nun zur Amplifikation der für NKT-Zellen spezifischen α -Domäne – AV24-AJ18 – eingesetzt. Als Standard wurde hier ein AV24-AJ18 DNA enthaltendes Plasmid gewählt. Die Standardverdünnungsreihe wurde so gewählt, daß die PCR Produktmengen der zu untersuchenden Proben und des Standards in die gleiche Größenordnung fielen.

Die Quantifizierung der Amplifikate erfolgte analog zur TCRAC PCR nach der gelelektrophoretischen Auftrennung am FluorImager (Abb. 3.1/3.2). Die AV24-AJ18 cDNA Produktmengen der jeweiligen Proben wurden wieder mit Hilfe der Standardkurve berechnet. Anschließend wurde der Quotient aus der so ermittelten AV24-AJ18 cDNA Menge und der TCRAC cDNA Menge derselben Probe gebildet.

Dies ermöglichte den Vergleich der einzelnen AV24-AJ18 cDNA in Bezug auf die TCRAC Expression der jeweiligen Zellen.

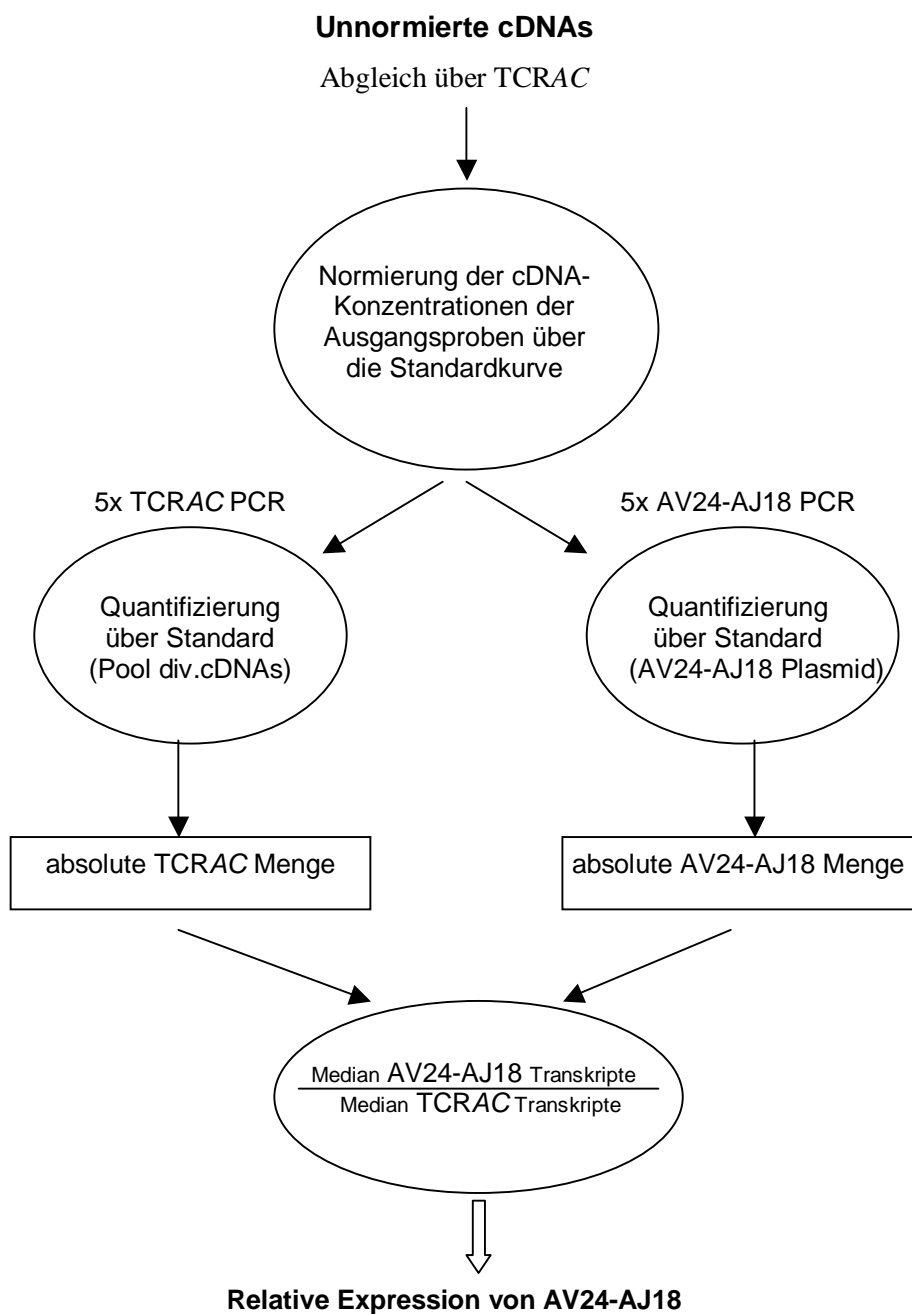


Abb. 3.3: Fließschema zu den einzelnen Arbeitsschritten der semiquantitativen RT-PCR. Die ungleichen Ausgangs-cDNA Mengen jedes Probanden werden mit Hilfe des internen Kontrollfragments TCRAC über die Standardkurve abgeglichen und durch individuelle Verdünnung auf gleiche Konzentrationen gebracht. Ausgehend davon werden für jeden Probanden 5 TCRAC-PCRs sowie 5 AV24-AJ18-PCRs durchgeführt. Die Produktmengen jedes Probanden werden jeweils mit Hilfe der entsprechenden Standardkurve berechnet, man erhält für jeden Probanden die absolute TCRAC Menge bzw. AV24-AJ18 Menge. Pro Proband und PCR werden 5 Ergebnisse erhalten aus welchen der Median ermittelt wird. Die Menge der spezifischen AV24-AJ18 Transkripte bezogen auf die Gesamtmenge der TZR -alpha Kette (TCRAC Transkripte) ergibt die relative AV24-AJ18 Expression.

Um Pipettierungenauigkeiten und Unterschiede innerhalb der PCR Reaktionen zu minimieren, wurden auch diese Reaktionen in bis zu 5 Wiederholungen durchgeführt und die PCR Amplifikatmengen jeweils nach 36 und 40 Zyklen bestimmt.

3.5. Statistische Auswertung

Da bei vorliegender Patientenzahl keine Normalverteilung zu erwarten war, wurden Ergebnisse als Median-Werte angegeben. Die Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mit dem Mann-Whitney-*U* Test berechnet. Das Signifikanzniveau wurde bei $p < 0,05$ festgelegt. Mit dem Spearman *rho* Test wurden Korrelationen der Zellpopulationen untereinander ermittelt. Eine signifikante Korrelation wurde angenommen, wenn der Korrelationskoeffizient r größer als 0,3 und das Signifikanzniveau p kleiner als 0,05 war. Für die Berechnungen wurde das SPSS-Statistikprogramm (Version 10.0, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Patientencharakterisierung

Es haben insgesamt 26 Probanden an der Studie teilgenommen. Davon erfüllten 13 Teilnehmer alle drei Einschlusskriterien für die Atopiker Gruppe (Tab. 3.2), 11 Probanden erfüllten die Kriterien für die gesunde Kontrollgruppe (Abb. 4.1) und wurden somit in die Studie aufgenommen. Ein Teilnehmer wurde wegen eines zu niedrigen IgE Titers (54 IU/ml) und RAST Klasse 2 ausgeschlossen, ein weiterer Patient wurde wegen RNA Degradierung nicht weiter verfolgt (Abb. 4.1)

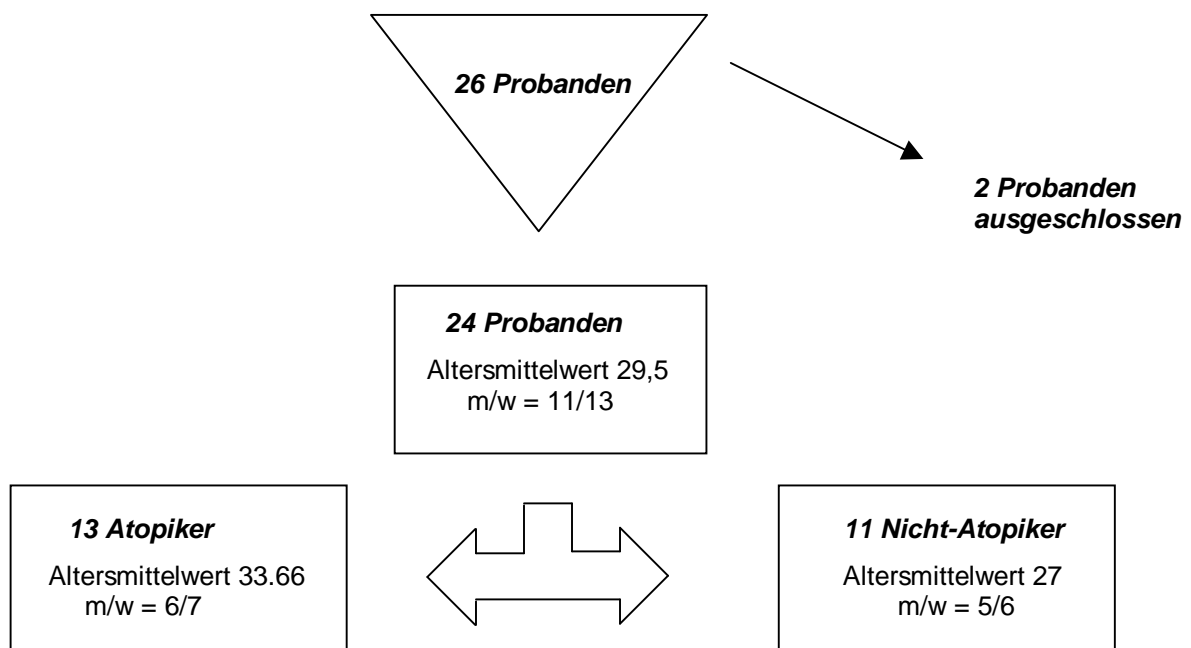


Abb. 4.1: Übersicht zur Gruppenverteilung

In der Gruppe der Atopiker lag der Altersmittelwert mit 33.66 Jahren (Range 25-41) etwas über dem der Vergleichsgruppe mit 27 Jahren (Range 22-47). Die Geschlechterverteilung lag in der Gruppe der Atopiker bei 6 Männer zu 7 Frauen, in der Gruppe der Gesunden befanden sich 5 Männer und 6 Frauen.

Die Werte für das Gesamt IgE lagen in der Gruppe der Atopiker im Mittel bei 749 IU/ml (Range 151-1923) und waren damit zur Vergleichsgruppe, Mittelwert 21 IU/ml (Range 5-86), signifikant erhöht ($p < 0.0001$; Mann-Whitney-U).

Für spezifisches IgE wurde von allen Atopikern RAST Klasse 4 erreicht mit einer Sensibilität für mindestens 3 von insgesamt 40 Nahrungs- und Inhalationsallergenen (Tab. 3.1). In der Kontrollgruppe reagierten 2 der Probanden schwach positiv, RAST 0-1, bei sonst nicht erhöhten Werten für Gesamt IgE (Tab. 4.1).

| Klinische Diagnose* | Atopiker (n=13) | Nicht-Atopiker (n=11) |
|----------------------|--------------------|--------------------------|
| Atopische Dermatitis | 7 | 0 |
| Allergische Rhinitis | 8 | 0 |
| Allergisches Asthma | 3 | 0 |
| IgE IU/ml | 749,4 | 20,7 |
| RAST Klasse 4-5 | 13 | 0 |

* 5 Patienten hatten mehr als 1 klinische Diagnose

Tab. 4.1: Verteilung und Charakterisierung der Probanden.

Sechs der Patienten aus der Gruppe der Atopiker hatten mehr als eine klinische Diagnose (Tab. 4.2). Ein Patient nahm ein inhalatives Kortikoid (Budenosid), Theophyllin sowie ein β -Mimetikum (Reproterol), ein weiterer wurde mit einem Antihistaminikum (Loratadin) behandelt. Orale Kortikosteroide wurden von keinem der Patienten eingenommen. Probanden aus der Kontrollgruppe nahmen keine Medikamente ein.

| Patient | Alter | Geschl. | Klinische Diagnose | Gesamt IgE | RAST Klasse |
|---------|-------|---------|--|------------|-------------|
| 1 | 40 | m | Allerg. Rhinitis | 545 IU/ml | 4 |
| 2 | 41 | w | Atopische Dermatitis | 866 IU/ml | 4 |
| 3 | 34 | m | Allerg. Asthma | 838 IU/ml | 4 |
| 4 | 31 | w | Allerg. Rhinitis | 621 IU/ml | 4 |
| 5 | 33 | w | Allerg. Asthma, Allerg Rhinitis | 923 IU/ml | 4 |
| 6 | 29 | m | Atopische Dermatitis | 1160 IU/ml | 4 |
| 7 | 35 | w | Allerg. Asthma, Allerg. Rhinitis | 616 IU/ml | 4 |
| 8 | 37 | w | Atopische Dermatitis, Allerg. Rhinitis | 1080 IU/ml | 5 |
| 9 | 39 | m | Atopische Dermatitis, Allerg. Rhinitis | 1160 IU/ml | 5 |
| 10 | 37 | w | Atopische Dermatitis | 170 IU/ml | 4 |
| 24 | 32 | m | Atopische Dermatitis | 151 IU/ml | 4 |
| 25 | 25 | m | Atopische Dermatitis, Allerg. Rhinitis | 377 IU/ml | 4 |
| 26 | 28 | w | Allerg. Rhinitis | 234 IU/ml | 4 |

Tab. 4.2: Charakteristik der Patienten in der Gruppe der Atopiker (Proband Nr. 1-10 und 24-26), die Teilnehmer der gesunden Kontrollgruppe (Proband Nr.11-23) sind hier nicht mit aufgeführt.

4.2. AV24-AJ18 mRNA Expression von T-Zellen

Die AV24-AJ18 Expression auf transskriptioneller Ebene wurde bei insgesamt 24 Probanden – 13 Atopiker und 11 Vergleichspersonen – mittels RT-PCR untersucht. Die Häufigkeit der AV24-AJ18 Amplifikate bezogen auf die T-Zell Rezeptor alpha Ketten bei Atopikern wurde denen der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Dafür wurde für jeden Probanden die AV24-AJ18 Amplifikatmenge semiquantitativ im Verhältnis zur TCRAC Gesamtmenge bestimmt.

4.2.1. Normierung der cDNA mittels TCRAC

Die cDNA der Probanden wurde über das interne Kontrollfragment (TCRAC) normiert und auf gleiche cDNA Konzentrationen gebracht. Die quantitativen PCR-Reaktionen wurden 4 bis 5 mal wiederholt und cDNA nach jeweils 36 und 40 Zyklen entnommen. Es zeigte sich, daß die ermittelten TCRCA cDNA Konzentrationen der normierten Proben reproduzierbar waren. In der Abbildung 4.2 sind Ergebnisse aus 5 PCR

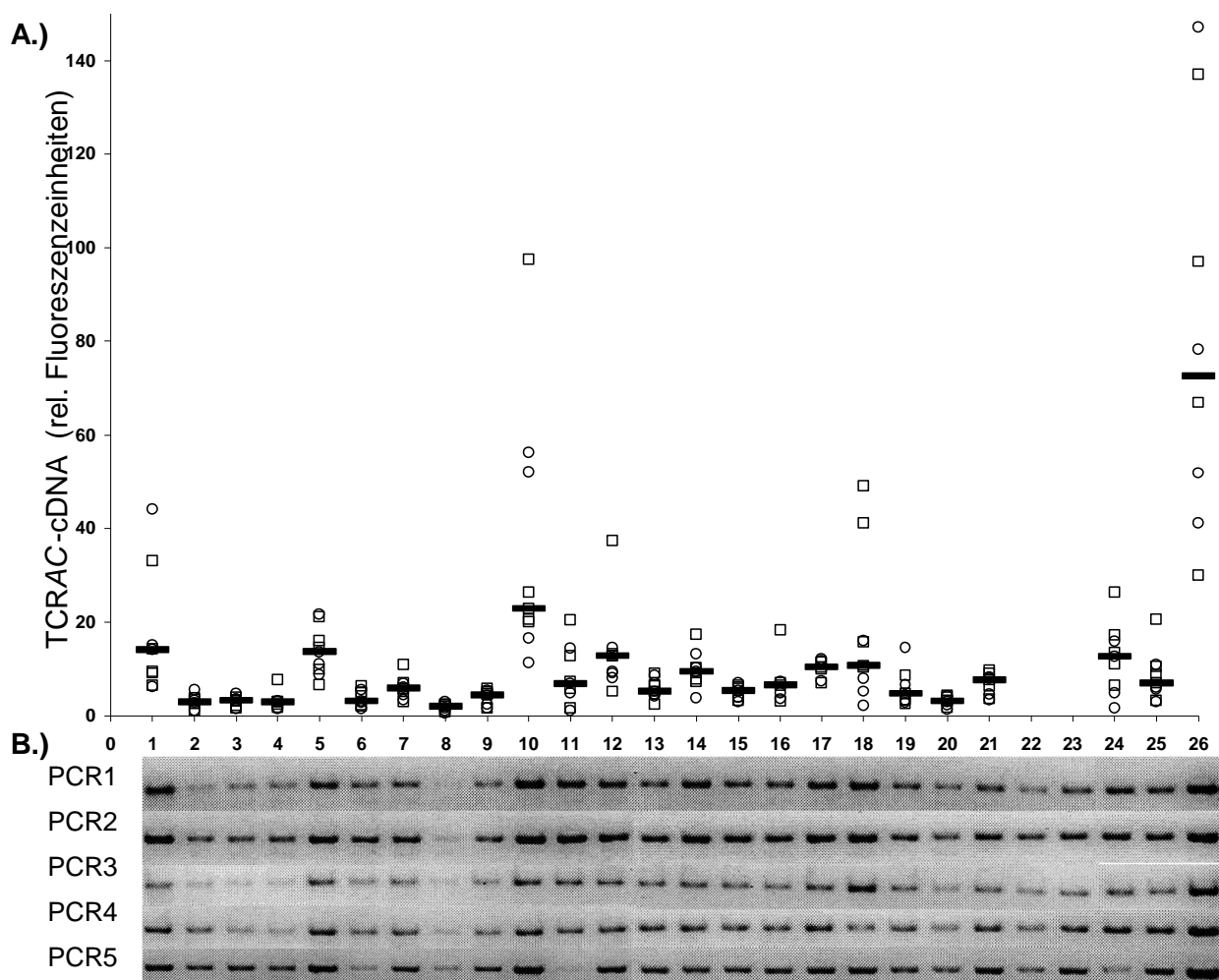


Abb. 4.2: Abbildung (B) zeigt beispielhaft 5 unabhängige TCRAC-PCR Reaktionen nach je 40 Zyklen nach Auftrennung auf einem 3% Agarosegel. In die Reaktion wurden die bereits normierten cDNA Proben der Probanden 1 bis 26 eingesetzt. Im Diagramm (A) sind die Ergebnisse der 5 PCR Reaktionen dargestellt, bei denen Amplifikat nach 36 (Kästchen) und nach 40 Zyklen (Kreise) entnommen wurde, die Mediane sind durch Balken gekennzeichnet. Bei einigen Probanden wurde in 2 PCR Reaktionen nach 36 Zyklen noch kein Ergebnis erzielt, sodaß im Diagramm vereinzelt nur 8 statt 10 Werte angegeben sind. Proband 22 und 23 wurden in den weiteren Auswertungen aufgrund Nichterfüllung der Einschlusskriterien nicht berücksichtigt.

Reaktionen nach 36 und 40 Zyklen und nachfolgender Auftrennung in einem 3% Agarosegel zusammengefaßt. In die Reaktionen wurde jeweils der titrierte Standard mit den bereits normierten cDNA Proben (Nr.1-26) eingesetzt. Im Diagramm der Abb. 4.2 sind die Ergebnisse aus den darunter aufgeführten 5 PCR Reaktionen nach densitometrischer Auswertung und Ermittlung der TCRAC Ausgangsmenge über die Standardkurve dargestellt.

Die Einzelwerte sind als relative Fluoreszenzeinheiten angegeben und in Abb. 4.2 als Kästchen nach 36 Zyklen und als Kreise nach 40 Zyklen dargestellt. Dabei zeigt sich kein Einfluß der Zyklenzahl, die Einzelwerte liegen jeweils um den gleichen Mittelwert gestreut. Da die Einzelwerte auf den Standard bezogen sind, ist die Unabhängigkeit der Ergebnisse von der Zyklenzahl im linearen Bereich der PCR zu erwarten, da die Verhältnisse der cDNA Ausgangsmengen erhalten bleiben.

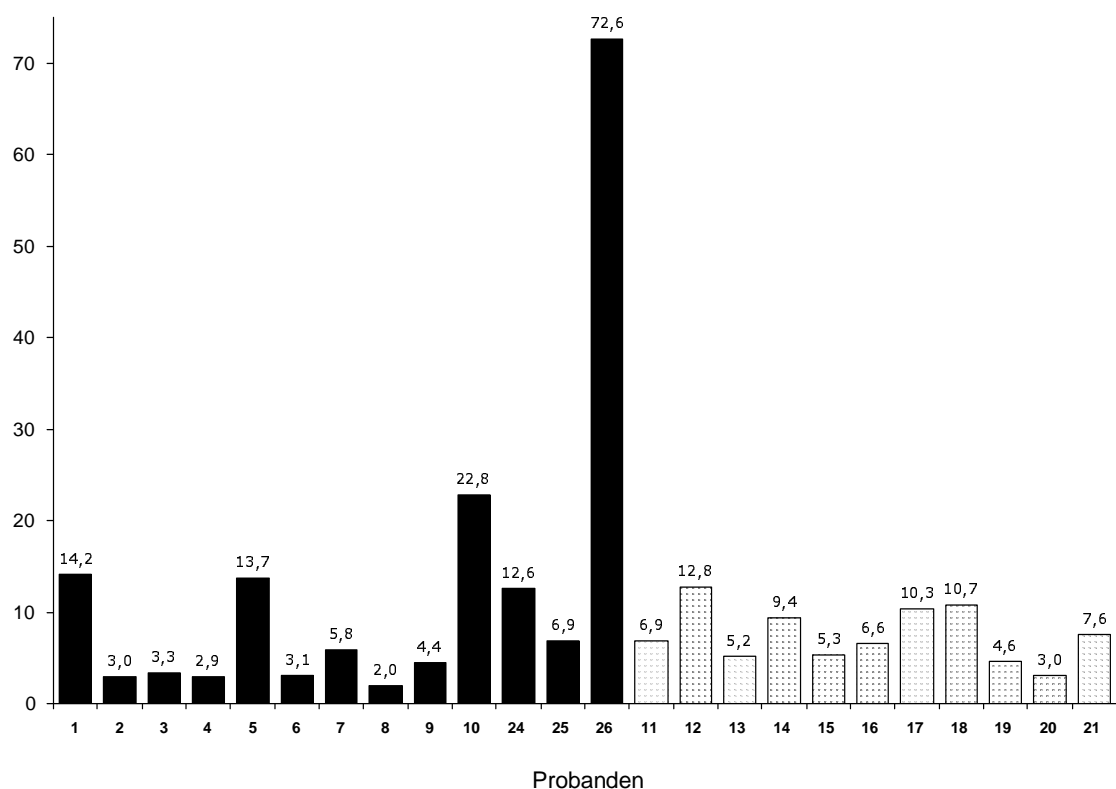


Abb. 4.3: Die Abbildung zeigt eine Übersicht der normierten cDNA Mengen nach 5 TCRAC-PCR Reaktionen. Für jeden Probanden sind die TCRAC Konzentrationen als Median angegeben, ermittelt aus 5 PCR Reaktionen nach 36 und 40 Zyklen. Auf der x Achse sind von 1-10 und 24-26 die Atopiker (schwarze Säulen) der Kontrollgruppe von 11-21 (getüpfelte Säulen) gegenübergestellt.

Methodisch bedingt kommt es bei den sehr geringen cDNA Ausgangsmengen zu großen Abweichungen vom Mittelwert (Balken). Durch Mittelwertbildung aus bis zu 9 Einzelwerten lässt sich eine vergleichsweise geringe mittlere Standardabweichung von 45% erreichen, wodurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse verdeutlicht wird. Da die PCR-Zykluszahl auf das Ergebnis keinen Einfluß hatte, wurde aus allen Ergebnissen der 5 PCR Reaktionen der Median für jeden Probanden ermittelt (Abb. 4.3). Zur Berechnung standen jeweils 7 bis 9 Werte zur Verfügung, da vereinzelt Banden nicht oder nur zu schwach nachzuweisen waren.

Um die Vergleichbarkeit der Proben untereinander zu gewährleisten, mußten in jedem Reaktionsansatz alle 26 Einzelproben beinhaltet sein. Die Reaktionen konnten aufgrund beschränkter cDNA Ausgangsmengen nur begrenzt wiederholt werden. Für die relative TC α Konzentration lagen die Mediane zwischen 2,0 (Nr.8) und 72,6 (Nr.26).

4.2.2. Auswahl der Primer

In Vorversuchen wurden zur Amplifikation der für NKT Zellen spezifischen Sequenz drei verschiedene Primerpaare – AV24-AJ18*Dellabona*, AV24-AJ18*Porcelli* und der selbst konstruierte Primer V α 24neu/J α 18neu – getestet. Hierfür wurde normierte Ausgangs cDNA von Probanden verwendet, von denen ausreichend Material vorlag. Als Positivkontrolle wurde auf ein, die Zielsequenz enthaltendes, Plasmid zurückgegriffen. Die besten Ergebnisse mit der effektivsten Amplifikation und den stärksten Banden wurden für das AV24-AJ18*Porcelli* Primerpaar erzielt.

Aufgrund der kürzeren Sequenz (150bp) amplifizierte dieser Primer im Vergleich effizienter, sodaß alle weiteren Reaktionen ausschließlich mit diesem Primerpaar durchgeführt wurden.

4.2.3. Amplifikation von V α 24-J α 18

Im Folgenden wurden die normierten cDNA's auf die Expression von AV24-AJ18 untersucht. Im Kontrollansatz und als Standard wurde ein V α 24-J α 18-DNA enthaltendes Plasmid verwendet. Mit dem Einsatz des Plasmids erlaubte die Methode den sicheren Nachweis der Zielsequenz bis zu einer Konzentration von 0,07 pg Plasmid/ml. Die Reaktionen wurden erneut in 5 Wiederholungen durchgeführt. Nach densitometrischer Auswertung wurden die cDNA Konzentrationen der einzelnen Proben über den titrierten Standard ermittelt.

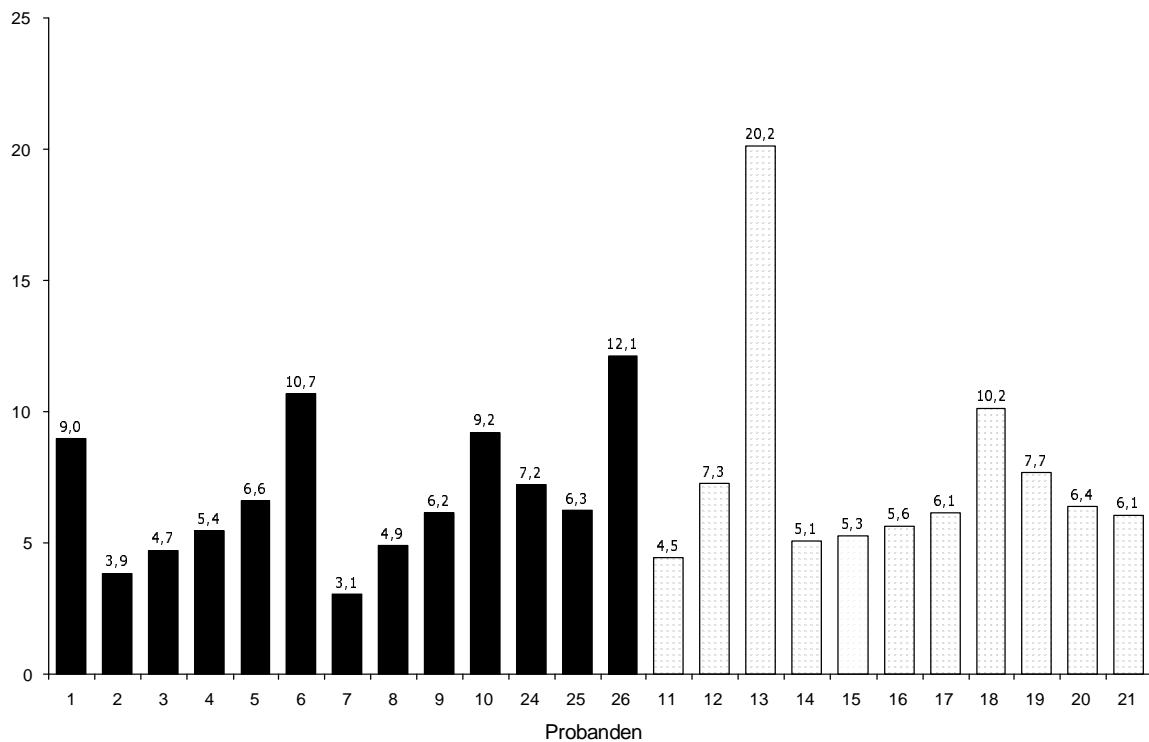


Abb. 4.4: Die Abbildung zeigt V α 24-J α 18 Amplifikatmengen (in frei definierten Fluoreszenzeinheiten) aus 5 PCR Reaktionen. Für jeden Probanden wurde aus 4 bis 6 Werten der Median ermittelt. Auf der x-Achse sind die Atopiker 1-10 und 24-26 (schwarze Säulen) der Kontrollgruppe 11-21 (getüpfelte Säulen) gegenüber gestellt.

Die Amplifikation von V α 24-J α 18 zeigte jedoch bei allen 24 Probanden eine sehr schwache Expression in allen untersuchten Proben (Abb. 4.4). Für die Auswertung konnten jeweils nur 4 bis 6 Werte der 10 durchgeführten Reaktionen verwendet werden, da bei 36 Zyklen in den meisten Reaktionen noch kein Produkt erhalten wurde und selbst bei 40 Zyklen vereinzelt Banden nicht oder zu schwach

nachweisbar waren. Für den ermittelten Median wurden Werte zwischen 3,1 und 20,2 erhalten. Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Atopiker und der Referenzgruppe.

In der Abbildung 4.5 wird beispielhaft eine PCR Reaktionen mit $V\alpha 24-J\alpha 18$ nach 40 Zyklen gezeigt. In allen Experimenten zeigte sich $V\alpha 24J\alpha 18$ auf sehr niedrigem Expressionsniveau.

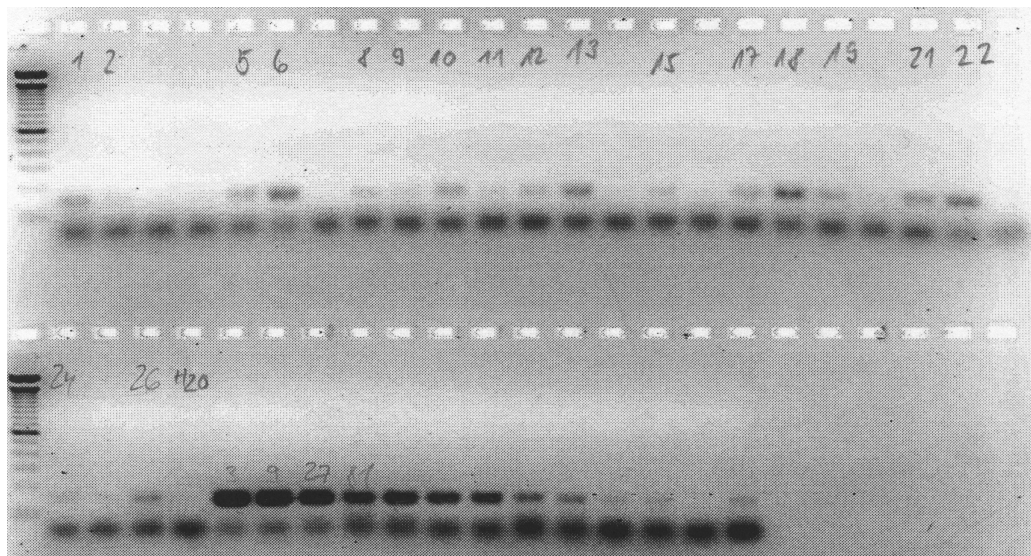


Abb. 4.5: Die Abbildung zeigt repräsentativ die Ergebnisse aus einer TCRAV24-AJ18 RT-PCR Reaktion. Eingesetzt wurden in den mit 1 bis 26 bezeichneten Lanes jeweils die normierte TCRAV cDNA der 26 Probanden (Atopiker 1-10 und 24-26, Kontrollgruppe 11-21, Proband 22 und 23 wurden nachträglich wegen Nichterfüllung der Einschlusskriterien ausgeschlossen). H₂O bezeichnet die Negativkontrolle mit Wasser. Als Standard wurde TCRAV24-AJ18-DNA enthaltendes Plasmid eingesetzt, das in insgesamt 13 Verdünnungsstufen jeweils 1:3fach titriert wurde (Lanes 3,9,27,81 usw.).

Für den quantitativen Vergleich wurde die $V\alpha 24-J\alpha 18$ Amplifikatmenge semiquantitativ im Verhältnis zur $TC\alpha$ Gesamtmenge für jeden Probanden bestimmt. Zur Berechnung des Quotienten wurden Medianwerte eingesetzt.

Für die relative $V\alpha 24-J\alpha 18/TC\alpha$ Expression wurden für Atopiker- und Referenzgruppe Verhältniswerte von 0,4 bis 3,45 (Median 0,89) erzielt (Abb. 4.6). Es zeigte sich kein Unterschied in der Verteilung der beiden Gruppen (Tab. 4.4).

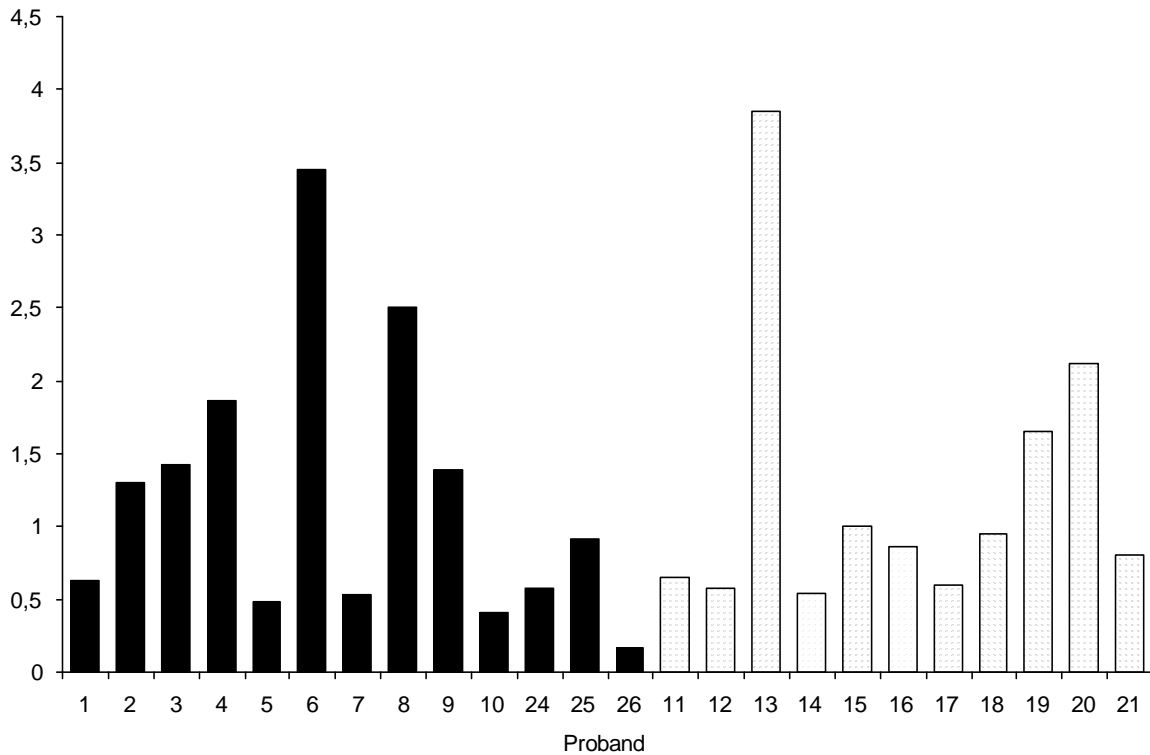


Abb. 4.6: Relative Vα24-Jα18 Expression; angegeben als Quotient aus der Menge der Vα24-Jα18 Amplifikate bezogen auf die Gesamtheit aller TCαKetten der jeweiligen Probe (Vα24Jα18/TCα). In der Abbildung werden Atopiker (1-10 und 24-26 in schwarzen Säulen) der Kontrollgruppe (11-21 in getüpfelten Säulen) gegenübergestellt.

| | Atopiker n=13 | Nicht-Atopiker n=11 |
|--------|------------------|------------------------|
| Median | 0,91 | 0,86 |
| range | (0,17 – 3,45) | (0,55 – 3,85) |

Tab. 4.4: relative Vα24-Jα18 Expression innerhalb beider Gruppen, Medianwerte

5. Diskussion

Für das derzeitige Verständnis allergischer Erkrankungen wird ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 CD4+ Effektorzellen verantwortlich gemacht. Welche Umstände zur Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung von Th2 Lymphozyten führen, ist nur unzureichend verstanden. Es wird gegenwärtig angenommen, daß IL-4 maßgeblich an der Einleitung der Th2 Immunantwort beteiligt ist. Wiederholt konnte im Mausmodell und beim Menschen gezeigt werden, daß murine und humane NKT Zellen, die in ihrer Gensequenz homolog sind, außergewöhnlich große Mengen IL-4 innerhalb kürzester Zeit sezernieren. Hierbei wird auch von einem „explosive burst“ gesprochen [4,109,114]. Ob diese Zellen eine immunregulatorische Rolle bei atopischen Erkrankungen spielen, soll in der hier vorliegenden Arbeit untersucht werden.

Dafür wurde molekulargenetisch durch Isolation von mRNA die Häufigkeit von NKT Zellen im peripheren Blut von Patienten mit atopischen Erkrankungen verglichen mit derjenigen einer gesunden Kontrollgruppe.

Semiquantitative Bestimmung der AV24-AJ18-mRNA-Expression

Bei den molekulargenetischen Untersuchungen wurde die Häufigkeit der AV24-AJ18 Amplifikate auf die Gesamtheit aller TC α Ketten bezogen. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit eine „real time“ PCR mittels Lightcycler oder Taqman nicht zur Verfügung stand, wurde hierfür eine Methode der RT-PCR verwendet, die es ermöglicht die AV24-AJ18 Expression auf mRNA Ebene semiquantitativ zu bestimmen. Die basale Expression der AV24-AJ18 Rezeptor alpha Kette konnte bei allen Teilnehmern trotz schwacher Expression dieses Genabschnittes nachgewiesen werden. Es konnte jedoch molekulargenetisch kein Unterschied in der AV24-AJ18 mRNA-Expression zwischen Atopikern und der gesunden Kontrollgruppe gefunden werden.

Die quantitative PCR wurde erstmals 1988 beschrieben [21]. Entscheidend für die Aussagekraft ist einerseits die Qualität der RNA Isolierung, einer anfälligen Methode

mit schlechter Ausbeute und großer Variationsbreite im Ergebnis. Andererseits ist die Qualität der cDNA Synthese entscheidend.

In dieser Arbeit wurde die cDNA Synthese unspezifisch mit Hexanukleotiden durchgeführt. Durch die unspezifische Umschreibung werden zwar größere Produktmengen erzielt, jedoch werden durch die unterschiedlich effektive Bindung der Hexanukleotide verschiedene cDNAs nicht gleich effektiv amplifiziert und das Verhältnis der absoluten cDNA-Mengen wird nicht korrekt wiedergespiegelt, insbesondere in Anbetracht der schwachen Expression von V α 24-J α 18. Da hier aber nur relative Mengenverhältnisse untersucht werden sollten, war die höhere Ausbeute in diesem Fall von größerer Bedeutung. Der cDNA Nachweis des internen Kontrollfragments (TC α) wurde nach jeder Reaktion in allen untersuchten Proben überprüft, bei unzureichender Nachweisbarkeit mit zu schwachen Banden wurden diese Proben von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die zur Quantifizierung durchgeführten Titrationsreihen von cDNA und Standard beinhalten eine relativ hohe Fehlerquote durch Pipettieren kleinster Mengen im Mikroliterbereich. Um diesen Fehler zu minimieren, wurden die Reaktionen 5-fach durchgeführt und zur Auswertung für jede Probe der Median ermittelt. Die Anwendung einer automatisierten Quantifizierungsmethode von PCR Produktmengen (Lightcycler oder Taqman) könnte den Titrationsfehler verringern. Diese Methoden standen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht zur Verfügung.

Geringe cDNA Ausgangskonzentrationen können bei der Amplifikation von Genabschnitten mit schwacher Basalexpression – wie sie auch bei V α 24-J α 18 vorliegt – zu unzuverlässigen Ergebnissen führen. Das Ergebnis ist davon abhängig, ob die Primer die limitierte Menge der Zielgen-cDNA bereits beim ersten Zyklus binden und damit die cDNA sofort amplifiziert wird, oder ob durch eine spätere Primerbindung (Annealing) die initiale cDNA Synthese erst zu einem späteren Zyklus einsetzt. Die daraus entstehenden Schwankungen potenzieren sich exponentiell, so daß im äußersten Fall nicht die Ausgangsmenge, sondern der Verlauf der ersten Zyklen gemessen wird [38,103]. In dieser Arbeit wurden daher alle PCR Reaktionen mehrfach durchgeführt, zusätzlich wurde Amplifikat nach unterschiedlicher Zykluszahl entnommen.

Da die Amplifikationskinetik einer PCR sigmoidal verläuft [8,92], ist der direkte Rückschluß von der Produktmenge auf die Ausgangsmenge nur dann möglich, wenn die Reaktion in der exponentiellen Phase gestoppt wird. Nur dann sind Ausgangsmenge und Produktmenge zueinander proportional [31]. Daher wurde nur Amplifikat berücksichtigt, das im linearen Bereich des mitgelaufenen Standards lag und somit in der exponentiellen Phase entnommen wurde.

Die mittels RT-PCR gemessene AV24-AJ18 cDNA Konzentration wurde auf die in der jeweiligen Probe enthaltene TC α cDNA Konzentration bezogen. Unter der Annahme, daß sich das Verhältnis von AV24-AJ18 mRNA zu TCRAC mRNA durch die Umschreibung in cDNA nicht ändert, wurde eine Vergleichbarkeit der AV24-AJ18 mRNA Expression auf quantitativer Ebene erreicht [36]. Das TCRAC Gen, das für den konstanten Abschnitt der T Zell Rezeptor α Kette (TC α) kodiert, ist hierbei das geeignetste Housekeeping Gen, da es auf 99% aller T-Lymphozyten exprimiert wird, so daß durch das TCRAC Gen nahezu die gesamte T-Zell Population erfaßt wird. Allerdings können eventuelle Expressionsunterschiede des Referenzgens die quantitative Auswertung beeinflussen. Eine erhöhte Expression würde zu einem falsch niedrigen und eine erniedrigte Expression zu einem falsch hohen Ergebnis führen. Bei Auftreten dieses Fehlers wären allerdings die Veränderungen für alle nachgewiesenen AV24-AJ18 Amplifikate einer Probe gleichsinnig. Das bedeutet, daß für eine Probe im Vergleich zu den anderen Proben entweder alle untersuchten AV24-AJ18-Amplifikate niedrig oder aber alle hoch bestimmt würden. Bei zwei Probanden der Studie konnte eine sehr hohe AV24-AJ18 Expression gefunden werden (Prob. Nr.6 und Nr.13). Ob es sich hierbei um eine vermehrte NKT-Zellzahl, um ein hohes AV24-AJ18 Expressionsniveau pro NKT-Zelle oder um eine relative Erhöhung als Konsequenz einer niedrigen TC α Expression handelt, kann nicht unterschieden werden. Die Verwendung mehrerer verschiedener Referenz-Gene zusammen mit den normierten cDNAs könnte hier mehr Klarheit schaffen.

Die verwendete Methode der quantitativen PCR ist reproduzierbar und valide. Sie ist aufgrund ihrer hohen Sensitivität und Spezifität besonders bei gering verfügbaren RNA Mengen und für den Nachweis niedrig exprimierter Gene gut geeignet. Durch den exponentiellen Charakter der PCR-Reaktionen ergeben sich große Abweichungen von Einzelwerten derselben Probe. Dabei entsteht durch das

Pipettieren kleinster Mengen bereits vor der PCR ein Fehler, der sich exponentiell verstärkt. Durch Mehrfachwerte und Mittelwertbildung wird dieser Fehler reduziert. In dieser Arbeit betrug die Standardabweichung dennoch für einzelne Proben bis maximal 50%.

Aufgrund der großen Variabilität in der Häufigkeit der NKT-Zellzahl und der diversen Fehler mit relativ großer Standardabweichung sind kleine Unterschiede zwischen Atopikern und Kontrollpersonen mit den bisherigen molekulargenetischen Untersuchungen nicht nachweisbar. Für den Nachweis geringer Unterschiede in der NKT-Zellzahl müssten von jedem Probanden nicht nur deutlich mehr Werte zur Mittelwertbildung beitragen, sondern beide Gruppen – Atopiker und Kontrollgruppe – müssten wesentlich größer gewählt werden.

Auswahlkriterien und Studiendesign

Auch bei der in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten durchflußzytometrischen Bestimmung der NKT Zellzahl [54] durch spezifisches Anfärben der von V α 24 kodierten Proteinsequenz und der Simultanfärbung des von NKT Zellen exprimierten NK-Zellmarkers CD161 innerhalb der CD4⁺, CD8^{bright}, CD8^{dim} und der CD4⁻CD8⁻ doppelt negativen (DN) Lymphozytensubpopulation konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Atopikern und der gesunden Kontrollgruppe gefunden werden. Sowohl beim molekulargenetischen als auch beim durchflußzytometrischen Nachweis von NKT Zellen kann die fälschliche Zählung anderer Zellen weitestgehend ausgeschlossen werden. Da in NKT-Zellen eine fast ausschließliche Zusammenlagerung von AV24 mit AJ18 gefunden wird [80], werden beim molekulargenetischen Nachweis der AV24-AJ18 Gensequenz hauptsächlich NKT Zellen und nur ein verschwindend geringer Anteil an konventionellen T-Zellen erfaßt, in denen die Kombination von AV24 mit AJ18 extrem selten ist. Bei der Durchflußzytometrie gelingt dies durch die parallele Färbung mit dem NK-Zell Marker CD161 [25], der auf konventionellen T Zellen mit akzidenteller V α 24-Expression nicht nachweisbar ist.

Widersprüchliche Ergebnisse fanden sich in Studien, bei denen die Häufigkeit von NKT Zellen bei Erwachsenen mit atopischen Erkrankungen untersucht wurde. So

zeigte sich bei Patienten mit Asthma eine signifikant verminderte Zahl zirkulierender $V\alpha 24^+$ NKT Zellen im peripheren Blut [43], in zwei weiteren Studien fand sich bei Patienten mit Asthma und Neurodermitis eine selektive Abnahme DN $V\alpha 24^+V\beta 11^+CD161^+$ Zellen [77,101], in einer anderen Studie wurde dagegen ein signifikanter Anstieg $CD4^+ V\alpha 24^+V\beta 11^+CD161^+$ Zellen gezeigt [67]. Diese kontroversen Ergebnisse könnten zumindest teilweise durch unterschiedliche, zum Teil unzureichende Kriterien für die Auswahl der Patienten erklärt werden [32,67,77]. In dieser Studie wurden strenge Einschlußkriterien definiert. Durch die Wahl von drei Parametern wurden beide Gruppen klar voneinander getrennt. Im Gegensatz zu anderen Untersuchungen [101] wurden hierbei Patienten mit atopischer Dermatitis – die zwei Drittel unserer Patientengruppe repräsentierten – nicht mit immunmodulierenden Therapeutika behandelt.

In zwei Studien wurde eine hohe interindividuelle Variabilität in der Häufigkeit von $V\alpha 24^+V\beta 11^+CD161^+$ Zellen bei gesunden Individuen gezeigt [24,88]. Die Untersuchung von zu kleinen Gruppen [77] könnte somit zu fehlerhaften Einschätzungen bei der Interpretation von NKT Zellen bei atopischen Erkrankungen führen. Das trifft vor allem auf Untersuchungen zu, bei denen zur statistischen Auswertung parametrische Tests herangezogen werden [77], da bei kleinen Gruppen keine Normalverteilung erwartet werden kann. Dieser Punkt wurde in unserer Studie berücksichtigt, indem nicht-parametrische Tests zur statistischen Auswertung verwendet wurden.

Systematische Einschränkungen bei Bestimmung der NKT-Zellzahl

Da die individuelle Lymphozytenzahl z.B. durch virale Infektionen starken Schwankungen unterworfen ist, kann die relative NKT Zellzahl – bezogen auf die gesamten Lymphozyten – nur mit einer entsprechenden Ungenauigkeit interpretiert werden. Signifikante Unterschiede zwischen Atopikern und Kontrollgruppe können mit dieser Methode nur festgestellt werden, wenn die relative NKT Zellzahl sich um ein Vielfaches unterscheidet.

Bei den molekulargenetischen Untersuchungen wurde die AV24-AJ18-mRNA-Expression bezogen auf die TC α -mRNA-Expression bestimmt unabhängig vom

Expressionsniveau pro Zelle. Es wurde nicht untersucht, ob sich das AV24-AJ18-mRNA-Expressionsniveau zwischen Atopikern und Kontrollgruppe unterscheidet. Die Expression des Rezeptors auf Zelloberflächen kann unterschiedlichen Regulationsmechanismen unterworfen sein. So kann es durch Antigenerkennung z.B. von Glykolipiden zur Rezeptorinternalisierung [106] kommen. Da der Rezeptor eventuell durchflußzytometrisch überhaupt nicht mehr nachweisbar ist und die Zellen dadurch falsch negativ gezählt werden könnten, entspricht der Rezeptornachweis auf Proteinebene nicht zwangsläufig der mRNA-Expression und es kann zu divergenten durchflußzytometrischen und molekulargenetischen Ergebnissen kommen. Die aus diesem Grund durchgeführten molekulargenetischen Untersuchungen erbrachten jedoch auch keinen Unterschied zwischen Atopikern und Kontrollgruppe.

Verschiedene Faktoren können dafür verantwortlich gemacht werden, daß sowohl auf molekulargenetischer als auch auf zellulärer Ebene keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von NKT Zellen im peripheren Blut von Atopikern im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen gefunden werden können. Bereits in der Kontrollgruppe mit gesunden Probanden besteht eine sehr große Variabilität der NKT-Zellzahl im peripheren Blut [24,88]. Es ist nicht bekannt, ob die NKT-Zellzahl wenigstens für einen bestimmten Probanden weitgehend konstant ist oder starken Schwankungen unterliegt. Da mit einer einzigen Blutabnahme je Proband nur eine Momentaufnahme erfolgt, kann darüber keine Aussage getroffen werden. Weiterhin ist bisher nicht bekannt, inwieweit andere Faktoren zur Variabilität der NKT Zellzahl beitragen. Diese Einschränkungen bei der Interpretierbarkeit der Ergebnisse können in weiteren Experimenten durch mehrere Blutabnahmen zu verschiedenen Zeitpunkten für jeden Probanden umgangen werden.

In dieser Arbeit wurde das Blut Erwachsener untersucht, während sich allergische Erkrankungen meist in der frühen Kindheit entwickeln. Es wäre möglich, daß zwar bei der Entstehung eines Ungleichgewichts zugunsten von Th2 Lymphozyten NKT Zellen vermehrt gefunden werden könnten. Sobald aber dieses Ungleichgewicht durch IL4 sezernierende Th2 Zellen selbst aufrecht erhalten wird, könnte die Häufigkeit der NKT Zellen im peripheren Blut möglicherweise wieder zu normalen Werten zurückgehen.

In Nabelschnurblut von Neugeborenen mit bestehendem Th2-Ungleichgewicht konnte durch den Nachweis von $V\alpha 24\text{-J}\alpha 18$ gezeigt werden, daß NKT Zellen tatsächlich bereits zu Beginn des Lebens eine Rolle spielen [86]. Einige Studien zeigen, daß NKT Zellen bei der Antwort gegen mikrobielle Infektionen beteiligt sind. So sind über CD1d präsentierte Glykolipide wie z.B. Phosphatidylinositol Mannosid aus Mycobakterien [33] oder Glykosylceramide aus Sphingomonas oder Ehrlichia muris [71,107] natürliche Liganden des invarianten T-Zell Rezeptors von NKT Zellen. NKT Zellen verwenden Schutzmechanismen gegen Plasmodien [79], Protozoen wie Leishmanien [45], oder Toxoplasma gondii [26] sowie gegen Bakterien wie Listerien [34] und Bacillus Calmette Guerin. Letzterer führt zu einer Verschiebung der NKT Zytokin Synthese von einem hohen Verhältnis von IL4/IFN- γ zu einem sehr geringen IL4/IFN- γ Verhältnis [28]. NKT Zellen erkennen Antigen, das von CD1d präsentiert wird und zu einer IgG Antwort gegen das Antigen führt [94]. Zusammenfassend kann spekuliert werden, daß durch die Erkennung von Mikroben durch NKT Zellen in der frühen Kindheit die Zytokin Synthese beeinflusst und darüber die Entwicklung einer Th2 Antwort entweder unterdrückt oder gefördert wird. Epidemiologische Studien zeigten, daß eine Mikroben Exposition in der frühen Kindheit vor Atopie schützt [75]. Neuere Studien konnten indirekt über den spezifischen und selektiven Liganden α -Galactosylceramid (aGalCer) eine Beteiligung von NKT-Zellen bei der Entstehung allergischer Erkrankungen nachweisen. Ovalbumin induzierte eosinophile Atemwegsentzündung konnte im Mausmodell durch einmalige subkutane Gabe von aGalCer zum Zeitpunkt der Ovalbumin Sensibilisierung vollständig unterdrückt werden, wohingegen eine kontinuierliche aGalCer-Gabe zur Verschlechterung der Atemwegsentzündung führte [73]. Ein bereits bestehendes eosinophiles Lungeninfiltrat bildete sich sogar nach einmaliger intraperitonealer aGalCer Injektion vollständig zurück [69], begleitet von deutlich niedrigeren IL-4 Konzentrationen in der Bronchiallavage. Bei intranasaler Applikation konnte im Mausmodell nur die kombinierte Gabe von Ovalbumin und aGalCer Asthma auslösen, nicht jedoch Ovalbumin oder aGalCer alleine [51]. In einer Studie mit Asthma-Patienten, bei der sich eine verminderte Zahl zirkulierender $V\alpha 24^+$ NKT Zellen im peripheren Blut im Vergleich zu Gesunden fand, war die Proliferationsantwort der NKT Zellen auf aGalCer bei Patienten und Kontrollgruppe nicht signifikant verschieden, so daß kein

Proliferationsdefekt der NKT Zellen für die Entstehung des Asthmas verantwortlich gemacht werden kann [43].

Longitudinalstudien bei Kindern sind nötig, um zu klären, ob NKT Zellen zur Entwicklung allergischer Erkrankungen in der frühen Kindheit beitragen. Darüber hinaus könnten Longitudinalstudien aufdecken, ob NKT Zellen – abhängig von ihrem Zytokinprofil – zur Initiierung von oder zum Schutz vor allergischen Erkrankungen beitragen.

Daß auf molekularer Ebene kein Unterschied zwischen Atopikern und gesunder Kontrollgruppe gefunden werden konnte, ist möglicherweise damit erklärbar, daß für die Experimente Vollblut untersucht wurde. Möglicherweise kann in künftigen Untersuchungen ein Unterschied zwischen Atopikern und Kontrollpersonen gefunden werden, indem einzelne Subpopulationen wie z.B. CD4+ T Zellen oder DN T Zellen isoliert werden.

Da unsere Ergebnisse keinen Unterschied in der Häufigkeit von V α 24-J α 18 in unstimuliertem peripherem Blut zwischen Atopikern und Gesunden zeigen, könnten NKT Zellen im peripheren Blut möglicherweise keinen immunmodulatorischen Einfluß auf Zellen ausüben, die sich in erkrankter Haut oder in der Lunge *in situ* befinden. Die Untersuchung von Lymphozyten aus betroffenen Arealen könnte eine veränderte NKT Zellzahl bei Atopikern zeigen. Tierversuche haben ergeben, daß NKT Zell-Phänotyp und -Funktion innerhalb verschiedener Organe [29,40,70] und sogar innerhalb eines bestimmten Gewebes variieren können [2]. Entsprechende Ergebnisse für die Heterogenität von NKT Zellen wurden auch in Leberbiopsien von humanen Spendern gefunden [27]. Möglicherweise ist deshalb peripheres Blut zur Bestimmung der NKT Zellen von Atopikern im Vergleich zu Gesunden ungeeignet. Obwohl die NKT Zellzahl in dieser Studie zwischen Atopikern und Kontrollgruppe keinen Unterschied zeigte, sind funktionelle Untersuchungen notwendig, um die tatsächliche Rolle von NKT Zellen in der Entwicklung atopischer Erkrankungen zu bestimmen. Abhängig von der Mikroumgebung [102] oder der individuellen Reife [64] können NKT Zellen IL-4 und IFN- γ in unterschiedlichen Verhältnissen exprimieren. Aus diesem Grund kann nicht ausgeschlossen werden, daß NKT Zellen beitragen zur Entstehung eines Th1/Th2 Ungleichgewichts bei Atopikern durch Expression verschiedener Zytokine bei gleicher Gesamt NKT Zellzahl von Atopikern und

Kontrollgruppe. Die Isolation von NKT Zellen aus PBL von Atopikern und Gesunden ist die Voraussetzung zur Untersuchung ihres Zytokinprofils. Die für diese Arbeit gewonnenen Mengen Blut waren viel zu gering für einen solchen Ansatz.

Darüber hinaus könnte die N-Region der V α 24-J α 18 Amplifikate auf deren Heterogenität untersucht werden. Durch die Sequenzierung der N-Region könnte eine Aussage darüber getroffen werden, ob Atopiker häufiger Amplifikate mit invarianter N-Region vorweisen. Mit Hilfe solcher Studien könnte geklärt werden, ob NKT-Zellen mit N-Nukleotiden persistierende Klone darstellen.

6. Zusammenfassung

Für das derzeitige Verständnis allergischer Erkrankungen wird ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 CD4⁺ Effektorzellen verantwortlich gemacht. Th2 Lymphozyten spielen bei Allergien vom Typ I eine zentrale Rolle. Woher das initiale IL-4 stammt, das zu einer Verschiebung des Th1/Th2 Gleichgewichtes zugunsten von Th2 Lymphozyten führt, ist unbekannt. V α 24⁺CD161⁺ Natürliche Killer T (NKT) Zellen sezernieren große Mengen an IL-4 und/oder Ifn- γ , und sind vermutlich an der Initiation von Th1/Th2 Immunreaktionen beteiligt. Ihr Beitrag zur Entstehung Th2- abhängiger Typ 1 Allergien wird kontrovers diskutiert.

Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen ob sich die Zahl der V α 24⁺CD161⁺ NKT Zellen bei Atopikern und Gesunden unterscheidet. Auf molekularer Ebene wurde bei 13 Atopikern und 11 Kontrollpersonen die Häufigkeit der V α 24-J α 18 (TCR) mRNA-Amplifikate im Verhältnis zu den mRNA-Amplifikaten aller T-Zell Rezeptor α -Ketten (TCA) bestimmt.

Bei der relativen V α 24-J α 18 Expression (V α 24-J α 18 bezogen auf TCA) zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Auf molekulargenetischer Ebene konnte also kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit von NKT Zellen aus peripherem Blut zwischen Atopikern und Gesunden gezeigt werden.

Falls NKT Zellen bei der Entwicklung von Allergien eine immunregulatorische Rolle spielen, so tun sie es zu einem früheren Erkrankungszeitpunkt oder in anderen Kompartimenten.

7. Literaturverzeichnis

- [1] Alm JS, Swartz J, Lilij G, Scheynius A, Pershagen G: *Atopy in children of families with an anthroposopic lifestyle*. Lancet 1999;353:1485-1488
- [2] Apostolou I, Cumano A, Gachelin G, Kourilsky P: *Evidence for two subgroups of CD4-CD8-NKT cells with distinct TCR alpha beta repertoires and differential distribution in lymphoid tissue*. J Immunol 2000; 165: 2481-2490.
- [3] Arase H, Arase N, Ogasawara K, Good RA, Onoe K. *An NK1.1+ CD4+8- single-positive thymocyte subpopulation that expresses a highly skewed T-cell antigen receptor V beta family*. Proc Natl Acad Sci U S A 1992;89(14):6506-10.
- [4] Arase H, Arase N, Nakagawa K, Good RA, Onoe K: *NK1.1+ CD4+ CD8- thymocytes with specific lymphokine secretion*. Eur J Immunology 1993; 23:307-310.
- [5] Arase H, Arase N, Saito T. *Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking*. J Exp Med 1996;183(5):2391-6.
- [6] Assarsson E, Kambayashi T, Sandberg JK, Hong S, Taniguchi M, Van-Kaer L, Ljunggren HG, Chambers BJ: *CD8+ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo*. J Immunol. 2000; 165:3673-3679.
- [7] Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI. *Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice*. Diabetes 1997;46(4):572-82.
- [8] Bell DA, DeMartini DM: *Excessive cycling converts PCR products to random-length higher molecular weight fragments*. Nucleic Acids Res. 1991;19:5079
- [9] Bendelac A: *Mouse NK1+ T cells* Current Opinion in Immunol. 1995; 7:367-374.
- [10] Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR: *CD1 Recognition by Mouse NK1+ T Lymphocytes*. Science 1995; 268: 863-865.
- [11] Bendelac A, Hunziker RD, Lantz O: *Increased Interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells*. J Exp Med 1996;184:1285-1293.
- [12] Bendelac A, Rivera MN, Park SH, Roark JH: *Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity and function*. Annu. Rev. Immunol. 15:535-62
- [13] Bix M, Locksley M: *Natural T Cells, cells that co-express NKRP-1 and TCR* . J Immunology 1995;1020-1022
- [14] Bluestone JA, Tang Q. *How do CD4+CD25+ regulatory T cells control autoimmunity?* Curr Opin Immunol. 2005; 17(6): 638-42

- [15] Bradding P, Roberts JA, Britten KM et al: *An IL-4, -5, -6 and tumor necrosis factor- α in normal and asthmatic airways:Evidenence for the human mast cell as a source of these cytokines.* Am J Resp Cell Biol. 1994; 10:471-480.
- [16] Braun-Fahrländer C, Gassner M, Grize L, Neu N, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC , Wuthrich: *Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community* Clin. Exp. Allergy 1999; 29:28-34
- [17] Brossay L, Naidenko O, Burdin N, Matsuda J, Sakai T, Kronenberg M: *Structural requirements for galactosylceramide recognition by CD1-restricted NKT cells.* J Immunol. 1998; 161:5124-5128.
- [18] Brossay L, Chioda MC, Burdin N, Koezuka Y, Casorati G, Dellabona P, Kronenberg M: *CD1d mediated recognition of a alpha-galactosylceramide by NKT cells is highly conserved through mammalian evolution.* J Exp Med 1998; 188:1521-29.
- [19] Caton AJ, Cozzo C, Larkin J 3rd, Lerman MA, Boesteanu A, Jordan MS. *CD4(+) CD25(+) regulatory T cell selection.* Ann N Y Acad Sci. 2004; 1029:101-14
- [20] Chang CC, Wright A , Punnonen J: *Monocyte-derived CD1a+ and CD1a-dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities to transfection and capacities to direct Th cell differentiation* J Immunol 2000; 165(7): 3584-3591.
- [21] Chelly J, Kaplan JC, Maire P, Gautron S, Kahn A: *Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue.* Nature 1988;333:858-860.
- [22] Chomczynski P, Sacchi N: *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.* Anal Biochem 1987; 156-159.
- [23] Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M. *Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors.* Science 1997;278(5343):1623-6.
- [24] Davodeau F, Peyrat MA, Necker A, Dominici R, Blanchard F, Leget C, Gaschet J, Costa P, Jacques Y, Godard A, Vie H, Poggi A, Romagne F, Bonneville M: *Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains.* J Immunol. 1997; 158: 5603-5611.
- [25] Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A: *An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells.* J Exp Med. 1994; 180: 1171-1176.
- [26] Denkers EY, Scharon-Kersten T, Barbieri S, Caspar P, Sher A. *A role for CD4+ NK1.1+ T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection.* J Exp Med 1996;184(1):131-9.

- [27] Doherty DG, Norris S, Mdrigal Estebas L, McEntee G, Traynor O, Hegarty JE, O'Farrelly C: *The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells and CD3+CD56+ Natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2 and Th0 cytokine secretion patterns.* J Immunol 1999; 2314-2321.
- [28] Emoto M, Emoto Y, Buchwalow IB, Kaufmann SH. *Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin.* Eur J Immunol 1999 Feb;29(2):650-9.
- [29] Emoto M, Zerrahn J, Miyamoto M, Perarnau B, Kaufmann SH: *Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells.* Eur J Immunol 2000; 30:2300-2311
- [30] Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S, *Recruitment for CD1d recognition by human invariant Valpha 24+ CD4-CD8- Tcells.* J Exp Med. 1997; 186:109-120.
- [31] Ferre F: *Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth.* PCR Methods 1992;Appl.2,1-9
- [32] Finkelmann FD, Morris SC, Orekhova T, Mori M, Donaldson D, Reiner SL, Reilly NL, Schopf L, Urban JF: *Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses.* J Immunol. 2000: 164:2303-2310.
- [33] Fischer K, Scotet E, Niemeyer M, Koebernick H, Zerrahn J, Maillet S, Hurwitz R, Kursar M, Bonneville M, Kaufmann SH, Schaible UE. *Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A. 2004;101(29):10685-90.
- [34] Flesch IE, Wandersee A, Kaufmann SH. *IL-4 secretion by CD4+ NK1+ T cells induces monocyte chemoattractant protein-1 in early listeriosis.* J Immunol 1997;159(1):7-10.
- [35] Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, Pardoll DM: *A novel population of T-cell receptor $\alpha\beta$ -bearing thymocytes which predominantly express a single V β 8 gene family.* Nature 1987; 329:251-255.
- [36] Gause WC, Adamovicz J: *The use of the PCR to quantitate gene expression.* PCR Methods 1994; Appl.3:123-135.
- [37] Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, Liu AH: *Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma.* Lancet 2000;355:1680-1683.
- [38] Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF: *Analysis of cytokine mRNA and DNA: detection and quantitation by competitive polymerase chain reaction.* Proc.Natl.Acad.Sci. USA 1990; 87:2725-2729.
- [39] Gombert JM, Tancrede-Bohin E, Hameg A, Leite-De-Moraes MC, Vicari A, Bach JF, Herbelin A: *IL-7 reverses NK1+ Tcell-defective IL-4 production in the non-obese diabetic mouse.* Int Immunol. 1996;8:1751-1758.

- [40] Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barret E, Nakayama T, Taniguchi M, Smyth MJ, van-Driel IR, Scollay R, Baxter AG, Godfrey DI: *NKT cells are phenotypically and functionally diverse*. Eur J Immunol 1999; 29:3768-3781.
- [41] Van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML: *High frequency of IL4 CD4+ allergen specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin*. J Invest. Dermatol. 1991, 97:389-394.
- [42] Hwang ES, White IA, Ho IC: *An IL-4 independent and CD25-mediated function of c-maf in promoting the production of Th2 cytokines* PNAS 2002; 99:13026-13030.
- [43] Ikegami Y, Yokoyama A, Haruta Y, Hiyama K, Kohno N. *Circulating natural killer T cells in patients with asthma*. J Asthma 2004; 41(8): 877-82
- [44] Illes Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T. *Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. J Immunol 2000;164(8):4375-81.
- [45] Ishikawa H, Hisaeda H, Taniguchi M, Nakayama T, Sakai T, Maekawa Y, Nakano Y, Zhang M, Zhang T, Nishitani M, Takashima M, Himeno K. *CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with Leishmania major*. Int Immunol 2000;12(9):1267-74.
- [46] Janeway/Travers/Walport/Shlomchik: *Immunobiology*. Churchill Livingstone, 5. Auflage, 2001
- [47] Jiang S, Game DS, Davies D, Lombardi G, Lechler RI. *Activated CD1d-restricted natural killer T cells secrete IL-2: innate help for CD4+CD25+ regulatory T cells?* Eur J Immunol. 2005;35(4):1193-200
- [48] Joyce S, Woods AS, Yewdell JW, Bennink JR, De Silva AD, Boesteanu A, Balk SP, Cotter RJ, Brutkiewicz RR: *Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol*. Science 1998; 279:1541-1544.
- [49] Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. *Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo*. J Exp Med 2000;192(7):921-30.
- [50] Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M: *CD1d restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides*. Science 278:1626-29
- [51] Kim JO, Kim DH, Chang WS, Hong C, Park SH, Kim S, Kang CY. *Asthma is induced by intranasal coadministration of allergen and natural killer T-cell ligand in a mouse model*. J Allergy Clin Immunol 2004; 114(6): 1332-38
- [52] Kitamura H, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Nakui M, Yahata T, Meng H, Koda T, Nishimura S, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T:

α-Galactosylceramide induces early B.cell activation through Il-4 production by NKT cells. Cell Immunol 2000;199:37-42.

[53] Kojo S, Adachi Y, Keino H, Taniguchi M, Sumida T. *Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases.* Arthritis Rheum 2001;44(5):1127-38.

[54] Konstantopoulos N. *Häufigkeit von AV24+CD161+ NKT-Zellen und AV24-AJ18-TZR-Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern.* Dissertation 2006, LMU Munich: Faculty of Medicine.

[55] Laloux V, Beaudoin L, Jeske D, Carnaud C, Lehuen A. *NK T cell-induced protection against diabetes in V alpha 14-J alpha 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen.* J Immunol 2001;166(6):3749-56.

[56] Lan RY, Ansari AA, Lian ZX, Gershwin ME. *Regulatory T cells: development, function and role in autoimmunity.* Autoimmun Rev. 2005; 4(6):351-63

[57] Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC. *Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes.* J Exp Med 1998;188(10):1831-9.

[58] Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Machavoine F, Vicari A, Gombert JM, Papiernik M, Dy M. *MHC class I-selected CD4-CD8-TCR-alpha beta+ T cells are a potential source of IL-4 during primary immune response.* J Immunol 1995;155(10):4544-50.

[59] Leite-De-Moraes MC, Moreau G, Arnould A, Machavoine F, Garcia C, Papiernik M, Dy M: *IL-4 producing NKT cells are biased towards IFN-γ production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NKT cells.* Eur J Immunol. 1998; 28:1507-1515.

[60] Leite-De-Moraes MC, Hameg A, Pacillo M, Koezuka Y, Taniguchi M, Van-Kaer L, Schneider E, Dy M, Herbelin A: *IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells.* J Immunol 2001;166:945-951.

[61] Levings MK, Roncarolo MG. *Phenotypic and functional differences between human CD4+CD25+ and type 1 regulatory T cells.* Curr Top Microbiol Immunol. 2005;293:303-26

[62] Leynaert B, Neukirch C, Jarvis D, Chinn S, Burney P, Neukirch F: *Does Living on a Farm during childhood Protect against Asthma, Allergic Rhinitis, and Atopy in Adulthood?* Am. J Respir. Crit Care Med. 164:1829-1834.

[63] Liu R, La Cava A, Bai XF, Jee Y, Price M, Campognolo DI, Christadoss P, Vollmer TL, Van Kaer L, Shi FD. *Cooperation of invariant NKT cells and CD4+CD25+ T regulatory cells in the prevention of autoimmune myasthenia.* J Immunol. 2005; 175(12):7898-904

- [64] Loza MJ, Metelitsa LS, Perussia B: *NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production*. Eur J Immunol 2002; 34:53-3462.
- [65] Mac Donald RH: *NK1.1+ T cell receptor α/β cells: new clues to their origin, specificity and function*. J Exp Med 1995; 182:633-638
- [66] Maeda T, Keino H, Asahara H, Taniguchi M, Nishioka K, Sumida T. *Decreased TCR AV24AJ18+ double-negative T cells in rheumatoid synovium*. Rheumatology (Oxford) 1999;38(2):186-8.
- [67] Magnan A, Mely L, Prato S, Vervloet D, Romagne F, Camilla C, Necker A, Casano B, Montero-Jullian F, Fert V, Malissen B, Bongrand P: *Relationships between natural T cells, atopy, IgE levels and IL-4 production*. Allergy 2000;55:286-290.
- [68] Makino Y, Yamagata N, Sasho T, Adachi Y, Kanno R, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M: *Extrathymic development of V alpha 14-positive T cells*. J Exp Med 1993; 177: 1399-1408.
- [69] Matsuda H, Suda T, Sato J, Nagata T, Koide Y, Chida K, Nakamura H: *Alpha-galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol 2005; 33(1): 22-31
- [70] Matsuura A, Kinebuchi M, Chen HZ, Katabami S, Shimizu T, Hashimoto Y, Kikuchi K, Sato N: *NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NKT cells expressing distinct V α 14 chains*. J Immunol 2000; 164: 3140-3148.
- [71] Mattner J, Debord KL, Ismail N, Goff RD, Cantu C 3rd, Zhou D, Saint-Mezard P, Wang V, Gao Y, Yin N, Hoebe K, Schneewind O, Walker D, Beutler B, Teyton L, Savage PB, Bendelac A. *Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections*. Nature. 2005 Mar 24;434(7032):525-9.
- [72] Mempel M, Flageul B, Suarez F, Ronet C, Dubertret L, Kourilsky P, Gachelin G, Musette P. *Comparison of the T cell patterns in leprous and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of V α 24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor V α repertoire*. Am J Pathol 2000;157(2):509-23.
- [73] Morishima Y, Ishii Y, Kimura T, Shibuya A, Shibuya K, Hegab AE, Iizuka T, Kiwamoto T, Matsuno Y, Sakamoto T, Nomura A, Taniguchi M, Sekizawa K. *Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide*. Eur J Immunol 2005; 35: 2803-14
- [74] Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: *Two types of murine helper T cellclone / Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. J.Immunol. 1986; 136:2348-57.
- [75] von Mutius E, Braun-Fahrlander C, Schierl R, Riedler J, Ehlermann S, Maisch S, Waser M, Nowak D. *Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy*. Clin Exp Allergy 2000;30(9):1230-4.

- [76] Nieda M, Nicol A, Koezuka Y, Kikuchi A, Takahashi T, Nakamura H, Furukawa H, Yabe T, Ishikawa Y, Tadokoro K, Juji T. *Activation of human Valpha24NKT cells by alpha-glycosylceramide in a CD1d-restricted and Valpha24TCR-mediated manner.* Hum Immunol 1999;60(1):10-9.
- [77] Oishi Y, Sakamoto A, Kurasawa K, Nakajima H, Nakao A, Nakagawa N, Tanabe E, Laito Y, Iwamoto I: *CD4-CD8-T cells bearing invariant Va24-JalphaQ TCR alpha-chain are decreased in patients with atopic diseases.* Clin Exp Immunol. 2000; 119:404-411.
- [78] Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, et al: *Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4 independent mechanism.* Immunity 1998;7:455-55.
- [79] Pied S, Roland J, Louise A, Voegtle D, Soulard V, Mazier D, Cazenave PA. *Liver CD4-CD8- NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro.* J Immunol 2000;164(3):1463-9.
- [80] Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP: *Analysis of T cell antigen receptor expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several Vbeta genes and an invariant TCR alpha chain.* J Exp Med. 1993;187:1-16.
- [81] Porcelli S, Gerdes D, Fertig AM, Balk SP: *Human T cells expressing an invariant Valpha 24-J alpha Q TCR alpha are CD4- and heterogeneous with respect to TCR beta expression.* Hum. Immunol. 1996;48:63-67
- [82] Porcelli SA, Modlin RL: *The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids.* Annu Rev Immunol. 1999;17:297-329.
- [83] Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, Silveira P, Shepherd D, Naidenko OV, Godfrey DI, Baxter AG. *Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice.* Int Immunol 2001;13(7):887-96.
- [84] Prahalad S. *Atopy, autoimmunity, and the T(H)1/T(H)2 balance.* J Pediatr 2000;137(4):446-9.
- [85] Prell C, Konstantopoulos N, Heinzelmann B, Frankenberger B, Reinhardt D, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S. *Frequency of Va24+CD161+ natural killer cells and invariant TCRAV24-AJ18 transcripts in atopic and non-atopic individuals.* Immunobiol. 2003; 208:367-380
- [86] Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG: *Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children.* Lancet 1999; 353: 196-200.
- [87] Del Prete GF, De Carli M, D'Elis MM, Maestrelli P, Ricci M, Fabbri L, Ronagham S: *Allergen exposure induces the activation of allergen-specific Th2 cells in the airway mucosa of patients with allergic respiratory disease* Eur. J. Immuno. 1993; 23:1445-1449.

- [88] Prussin C, Foster B: *TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation*. J Immunol. 1997; 159:5862-5870.
- [89] Reinhardt C, Melms A. *Elevated frequencies of natural killer T lymphocytes in myasthenia gravis*. Neurology 1999;52(7):1485-7.
- [90] Ritz SA, Cundall MJ, Gajewska BU, Alvarez D, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, McKenzie AN, Stampfli MR, Jordana M: *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor driven respiratory mucosal sensitization induces Th2 differentiation and function independently of interleukin-4*. Am.J.Respir. Cell Mol. Biol. 2002; 27:428-435.
- [91] Robinson DS, Hadis Q, Ying S, Tsiopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB: *Predominant Th2 like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma*. NEJM 1992, 326:298-304.
- [92] Ruano G, Brash DE, Kidd KK: *PCR: The first few cycles*. Amplifications 1997;7: 1-4
- [93] Saubermann LJ, Beck P, De Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ, Kanauchi O, Motoki K, Sakai T, Terhorst C, Koezuka Y, Podolsky DK, Blumberg RS. *Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice*. Gastroenterology 2000;119(1):119-28.
- [94] Schofield L, McConville MJ, Hansen D, Campbell AS, Fraser-Reid B, Grusby MJ, Tachado SD. *CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells*. Science 1999;283(5399):225-9.
- [95] Shi HZ, Qin XJ. *CD4CD25 regulatory T lymphocytes in allergy and asthma*. Allergy. 2005;60(8):986-95
- [96] Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Sorianno T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ et al: *CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens*. Science 1995; 269:227-230.
- [97] Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kronenberg M, Koezuka Y, Van Kaer L. *Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype*. J Immunol 1999;163(5):2373-7.
- [98] Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA: *CD1d-restricted Recognition of synthetic glycolipid antigens by human NKT cells*. J Exp Med. 1998;188:1529-1534.
- [99] Strachan DP: *Hay fever, hygiene and household size* BMJ 1989; 299:1295-1260
- [100] Sumida T, Maeda T, Taniguchi M, Nishioka K, Stohl W. *TCR AV24 gene expression in double negative T cells in systemic lupus erythematosus*. Lupus 1998;7(8):565-8.

- [101] Takahashi T, Nakamura K, Chiba S, Kanda Y, Tamaki K, Hirai H: *V α 24 Natural Killer T Cells are Markedly Decreased in Atopic Dermatitis Patients*. Hum. Immunol. 2003;64:586-592.
- [102] Trop S, Ilan Y: *A two-faced lymphocyte in immune modulation of the IL-4/IFN- γ paradigm*. J Clin Immunol 2003; 270-280.
- [103] Volkenandt M, Dicker AP, Banerjee D, Fanin R, Schweitzer B, Horikoshi T, Danenberg K, Danenberg P, Bertino JR: *Quantitation of gene copy number and mRNA using the polymerase chain reaction*. Proc.Soc.Exp.Med. 1992;200:1-6.
- [104] Wierenga EA., Snoek M., de Groot CJ., Chretien I., Bos JD., Jansen HM., Kapsenberg ML: *Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic dermatitis*. J.Immunol. 1990, 144:4651-4656.
- [105] Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA. *Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes*. Nature 1998;391(6663):177-81.
- [106] Wilson MT, Johansson C, Olivares-Villagomez D, Singh AK, Stanic AK, Wang CR, Joyce S, Wick MJ, Van Kaer L. *The response of natural killer T cells to glycolipid antigens is characterized by surface receptor down-modulation and expansion* . Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 16;100(19):10913-8
- [107] Wu D, Xing GW, Poles MA, Horowitz A, Kinjo Y, Sullivan B, Bodmer-Narkevitch V, Plettenburg O, Kronenberg M, Tsuji M, Ho DD, Wong CH. *Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005; 102(5):1351-6.
- [108] Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R: *Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis*. Science. 2002; 296(5567):490-4.
- [109] Yoshimoto T, Paul WE: *CD4+ NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3*. J Exp Med. 1994; 179:1285-95.
- [110] Yoshimoto T, Bendelac A, Hu-Li J, Paul WE: *Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of CD4+, NK1.1+ T cells that promptly produce interleukin 4*. Proc Nat Acad Sci 1995;92:11931-11934.
- [111] Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE: *Role of NK1.1+ T cells in a Th2 response and in immunoglobulin E production*. Science 1995;270:1845-1847.
- [112] Zhang Y, Rogers KH, Lewis DB. *Beta 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses*. J Exp Med 1996;184(4):1507-12.
- [113] Zhou D, Mattner J, Cantu C 3rd, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu YP, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Lavery SB, Savage PB,

Teyton L, Bendelac A. *Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells*. Science. 2004; 306(5702):1786-9.

[114] Zlotnik A, Godfrey DI, Fischer M, Suda T: *Cytokine production by mature and immature CD4-CD8- Tcells*. J Immunology 1992; 149:1211-1515.

Anhang

| Patient | Verdünnung | (y) gemessene Amplifikatmenge (rfu) | (x) berrechnete cDNA Menge (frei definierte Einheiten) | (z) | Mittelwert |
|----------|------------|--|---|-----|------------|
| Standard | 1:81 | 13611052 | 677,26 | | |
| | 1:27 | 6320196 | 17,68 | | |
| | 1:9 | 4607180 | 7,51 | | |
| | 1:3 | 2227019 | 2,28 | | |
| | 1:1 | 696384 | 1,06 | | |
| | 1:0,33 | 172816 | 0,82 | | |
| | | | | | |
| 1 | 1:1 | 7858381 | 38,16 | | 38,16 |
| | 1:3 | 5788605 | 13,56 | x3 | 40,68 |
| | 1:9 | 2875518 | 3,16 | x9 | 28,44 |
| | 1:27 | 868807 | 1,16 | x27 | 31,75 |
| 3 | 1 | 7799233 | 37,05 | x1 | 37,05 |
| | 1:3 | 4715030 | 7,93 | x3 | 23,79 |
| | 1:9 | 2359682 | 2,44 | x9 | 21,96 |
| | 1:27 | 883914 | 1,17 | x27 | 31,59 |
| | 1:81 | 129913 | 0,8 | x81 | 64,80 |
| 4 | 1 | 4760884 | 8,11 | x1 | 8,11 |
| | 1:3 | 2668452 | 2,85 | x3 | 8,55 |
| | 1:9 | 908082 | 1,18 | x9 | 10,62 |
| 5 | 1 | 7996750 | 40,89 | x1 | 40,89 |
| | 1:3 | 4928045 | 8,82 | x3 | 26,46 |
| | 1:9 | 2277312 | 2,34 | x9 | 21,06 |
| | 1:27 | 957833 | 1,21 | x27 | 32,85 |
| 6 | 1 | 6163936 | 16,35 | x1 | 16,35 |
| | 1:3 | 4245570 | 6,27 | x3 | 18,81 |
| | 1:9 | 2277173 | 2,34 | x9 | 21,06 |
| | 1:27 | 1446105 | 1,55 | x27 | 41,85 |
| 7 | 1 | 8607019 | 55,48 | x1 | 55,48 |
| | 1:3 | 6067927 | 15,59 | x3 | 46,77 |
| | 1:9 | 2511044 | 2,63 | x9 | 23,77 |
| | 1:27 | 1565400 | 1,64 | x27 | 44,28 |
| 9 | 1 | 5964875 | 14,8 | x1 | 14,80 |
| | 1:3 | 4194380 | 6,11 | x3 | 18,33 |
| | 1:9 | 1229280 | 1,39 | x9 | 12,51 |
| | 1:27 | 563448 | 0,99 | x27 | 26,73 |

Modellrechnung zur Bestimmung der TC α cDNA Ausgangsmengen aus den PCR Produktmengen (y) am Beispiel der Meßwerte der PCR 4 nach 36 Zyklen. Aus der Funktion der Standardkurve wurden die jeweiligen Konzentrationen(x) der TC α cDNA ermittelt die bei gleicher PCR Zyklenzahl ein dem unverdünnten Standard vergleichbares Signal ergaben(z). Auf die erhaltenen Ergebnisse basierend wurden alle Proben auf gleiche cDNA Konzentrationen angeglichen. Beispielhaft sind die Konzentrationen der Proben 3 und 5 in etwa gleich, während sich die Konzentrationen der Proben 4 und 5 um den Faktor 3 unterscheiden.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Promotionsarbeit beigetragen haben.

Insbesondere gilt mein Dank Frau Dr. Susanne Krauss-Etschmann für die Überlassung des so vielseitigen und außerordentlich interessanten Themas und für die Möglichkeit, dieses in ihrer Arbeitsgruppe bearbeiten zu können. Ich danke ihr ganz besonders für die kompetente Einführung in das faszinierende Gebiet der Immunologie und für die langwährende Betreuung.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. D. Reinhardt für die Möglichkeit, meine Dissertation im Rahmen eines DFG geförderten Projekts im Labor für Molekulare Allergologie und Pädiatrische Immunologie des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München anfertigen zu können und wissenschaftliche Erfahrung sammeln zu dürfen.

Ganz besonders danke ich Frau Christine Federle für die kompetente Einführung in einige molekulargenetischen Methoden, die darüberhinaus für meine vielen Fragen stets ein offenes Ohr und eine fundierte Antwort bereit hielt.

Frau Dr. Christine Prell danke ich für die kritische Durchsicht dieser Arbeit und die vielen hilfreichen Tips.

Aufrichtig danken möchte ich meinem Mann für seine unablässige Unterstützung und Motivation und für seine unglaublich hilfreichen Formatierungskünste. Ohne seine treibende Kraft wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Danke auch an Esther, Petra und Harald.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Beatrix Carolin Heinzelmann
Geburtsdatum: 2. Februar 1973 in Langenau bei Ulm
Konfession: evangelisch
Familienstand: verheiratet
Adresse: Bruderhofstr. 35
81371 München

SCHULBILDUNG

1984 – 1990 Friedrich Schiller Realschule in Langenau
mit Abschluß der Mittleren Reife
1990 – 1993 Friedrich List Gymnasium in Ulm
Abschluß mit Abitur

BERUFLICHE ORIENTIERUNG

Sept. 1993 – Sept. 1994 Freiwilliges Soziales Jahr im Rehabilitationskrankenhaus in Ulm
Okt. 1994 – April 1995 Ausbildung zur Medizinisch Technischen Radiologieassistentin
bis zum Beginn des Medizinstudiums

HOCHSCHULBILDUNG

Mai 1995 – Dez. 2002 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Sept. 1997 Ärztliche Vorprüfung
Aug. 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Dez. 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 2,49)

PRAKTISCHES JAHR

| | |
|------------------------|--|
| Okt. 2001 – Jan. 2002 | Pädiatrie an der Lachner Kinderklinik in München |
| Feb. 2002 – März 2002 | Chirurgie am Städtischen Krankenhaus München Schwabing |
| April 2002 – Mai 2002 | Kinderchirurgie am Memorial Sloan Kettering Cancer Center, New York |
| Juni 2002 – Juli 2002 | Innere Medizin an der Medizinischen Klinik der LMU |
| Aug. 2002 – Sept. 2002 | Innere Medizin am Royal Infirmary of Edinburgh, University of Edinburgh |

WEITERE TÄTIGKEITEN

| | |
|-----------------------|---|
| Mai 1995 – Dez 1997 | Pflegedienst an der Medizinischen Poliklinik der LMU sowie auf der internistischen und chirurgischen Intensivstation im Krankenhaus München-Bogenhausen |
| Dez. 1998 – Dez. 2000 | Mitarbeit im Kriseninterventionsteam in der Kinderwohngruppe des deutschen Kinderschutzbundes München e.V. |

BERUFLICHE TÄTIGKEITEN

| | |
|-----------------------|---|
| Jan. 2003 – Juli 2004 | Ärztin im Praktikum an der Kinderklinik des Krankenhauses Dritter Orden, München |
| Juli 2004 – Dez. 2004 | Assistenzärztin an der Kinderklinik des Krankenhauses Dritter Orden, München |
| Seit Jan. 2005 | Assistenzärztin an der Kinderklinik der Technischen Universität am Krankenhaus München-Schwabing |

WISSENSCHAFTLICHE TÄTIGKEITEN

Doktorarbeit am Institut für molekulare Immunologie der Kinderpoliklinik der LMU an einem durch die DFG geförderten Projekt über
„Häufigkeit von invarianten $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ NKT-Zellen bei atopischen und nicht-atopischen Individuen“

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATION

Prell C, Konstantopoulos N, Heinzelmann B, Frankenberger B, Reinhardt D, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S, *Frequency of $V\alpha 24$ + $CD161$ + natural killer T cells and invariant $TCRAV24$ - $AJ18$ transcripts in atopic and non-atopic individuals*. Immunobiology. 2003;208(4):367-80.

München, den 17. April 2006