DOPPELT NEGATIVE T-LYMPHOZYTEN, LÖSLICHER FAS REZEPTOR UND LÖSLICHER FAS LIGAND BEI KINDERN MIT HÄUFIGEN INFEKTIONEN

Christian Renner

2004

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt)

DOPPELT NEGATIVE T-LYMPHOZYTEN, LÖSLICHER FAS REZEPTOR UND LÖSLICHER FAS LIGAND BEI KINDERN MIT HÄUFIGEN INFEKTIONEN

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

vorgelegt von
Christian Renner
aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Michael Weiß
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. H. Engelmann
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. J. Schirra
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. J. Schendel
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter
Tag der mündlichen Prüfung:	11.03.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG 2
1.1. T-LYMPHOZYTEN 4
1.1.1. BILDUNG UND REIFUNG DER T-LYMPHOZYTEN 4
1.1.2. T-ZELL-REZEPTOR UND CD3 8
1.1.3. AUFBAU VON CD4,CD8 10
1.1.4. AUFBAU VON MHC I UND MHC II 11
1.1.5. FUNKTION VON T-LYMPHOZYTEN 13
1.1.5.1. βTCR-T-LYMPHOZYTEN 13
1.1.5.2. δTCR-T-LYMPHOZYTEN 15
1.2. APOPTOSE 16
1.2.1. PERFORIN VERMITTELTE APOPTOSE 17
1.2.2. DISC VERMITTELTE APOPTOSE 18
1.2.2.1. FAS (CD95, APO-1) 19
1.2.2.2. FAS LIGAND 22
1.2.2.3. LÖSLICHE FORMEN VON FAS UND FAS LIGAND 23
1.2.3. DIE CASPASENKASKADE 24
1.2.4. REGULATIONS- UND HEMMMECHANISMEN DER APOPTOSE 26
1.3. HINTERGRUND UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT 28

2. PATIENTEN UND METHODEN 30
2.1. DEFINITION DER EINSCHLUSSKRITERIEN 30
2.2. BESCHREIBUNG DER PATIENTEN 31
2.2.1. PATIENTEN OHNE NACHWEISBAREN IMMUNDEFEKT 32
2.2.2. PATIENTEN MIT NACHWEISBAREM IMMUNDEFEKT 33
2.3. METHODEN 34
2.3.1. BESTIMMUNG DER VERTEILUNG VON $CD4^+$-, $CD8^+$- UND DN-T-LYMPHOZYTEN 35
2.3.2. BESTIMMUNG DER SFASL SPIEGEL IM PLASMA 36
2.3.3. BESTIMMUNG DER SFAS SPIEGEL IM PLASMA 39

3. ERGEBNISSE 42
3.1. TABELLARISCHE DATENZUSAMMENFASSUNG 42
3.2. ALLGEMEINES ZU DEN UNTERSUCHTEN PROBEN 43
3.3. CD4 UND CD8 POSITIVE LYMPHOZYTEN 44
3.4. $CD4^-CD8^-CD3^+$ DOPPELT NEGATIVE T-LYMPHOZYTEN (DN-T-LYMPHOZYTEN) 45
3.5. CD4/CD8 RATIO 46
3.6. SFASL 47
3.7. SFAS 48
3.8. VERHÄLTNIS DN-T-LYMPHOZYTEN ZU SFASL 49
3.9. VERHÄLTNIS DN-T-LYMPHOZYTEN ZU SFAS 50
3.10. VERHÄLTNIS SFASL ZU SFAS 51

4. DISKUSSION 52

5. ZUSAMMENFASSUNG 60

6. LITERATURVERZEICHNIS 62

7. QUELLEN DER ABBILDUNGEN 72

8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 73

9. DANKSAGUNG 75

10. CURRICULUM VITAE 76

1. Einleitung

Das Immunsystem des Menschen ist aufgegliedert in viele Untersysteme, die nur gemeinsam die Gesundheit des Organismus aufrechterhalten können. Diese Untersysteme werden von unterschiedlichen Zell-, Protein- und Gewebearten gebildet und arbeiten durch ein genau ausgearbeitetes Kommunikationssystem zusammen. Die zum Teil strenge Hierarchie der Kommunikationswege beinhaltet jedoch auch Risiken. Fällt ein Untersystem aus, kann es durch Ausfälle von nachfolgenden Systemen zu mehr oder minder schweren Defekten im Organismus kommen.

Das Immunsystem ist im Großen in zwei Systeme untergliedert, das humorale und das zellvermittelte Abwehrsystem.

Das humorale Abwehrsystem wird durch in Körperflüssigkeiten gelöste Stoffe, insbesondere durch Immunglobuline, gebildet. Diese werden nach Kontakt mit einem als körperfremd erkannten Antigen von Plasmazellen (umgewandelte B-Lymphozyten) als Antikörper produziert, binden sich an das Antigen und lösen dieses vor allem mit Hilfe des Komplementsystems auf oder inaktivieren es und/oder markieren es zum Beispiel für Makrophagen zur Phagozytose.

Das zellvermittelte Abwehrsystem wird von unterschiedlichen Zellarten (unter anderem T-Lymphozyten, Makrophagen, Granulozyten, natürliche Killerzellen) gebildet. Eine wichtige Schlüsselrolle fällt hier den Helfer-T-Lymphozyten zu, die von den Killer-T-Lymphozyten unterschieden werden. Helfer-T-Lymphozyten werden aktiviert, indem ihnen andere Zellen – zum Beispiel Makrophagen – ein Antigen präsentieren. Sie setzen dann Stoffe – Lymphokine – frei, die als Mediatorsubstanzen auf Granulozyten, Makrophagen und B- und T-Lymphozyten wirken.

Die Killer-T-Lymphozyten können dagegen – nach Aktivierung – Zellen abtöten.

Aktivierte Immunzellen können auch körpereigene Gewebe angreifen. Um dies zu vermeiden, muss die Anzahl an aktivierten Immunzellen durch deren Elimination begrenzt gehalten werden. Dies geschieht vor allem durch den programmierten Zelltod (Apoptose). Dabei handelt es sich um ein kompliziertes System, an dem viele Proteine als Enzyme und Signalträger und –empfänger (zum Beispiel der Fas Rezeptor und sein Ligand FasL) beteiligt sind, welches zur kontrollierten Selbstauflösung der Zelle führt.

Die Bedeutung dieses Systems erkennt man, wenn Defekte in diesem System zu Erkrankungen führen.

Es gibt Hinweise, dass es bei bestimmten Defekten in der Apoptose, bei denen bestimmte Signalträger oder –empfängerproteine verändert sind, zu einem Krankheitsbild kommen kann, welches durch Vergrößerung und Vermehrung von Lymphknoten, einer Hepatosplenomegalie, Fieber und immunologischen Auffälligkeiten charakterisiert ist, wie zum Beispiel der Anhäufung von T-Lymphozyten, die weder den Helfer-T-Lymphozyten noch den Killer-T-Lymphozyten zuzuordnen sind und daher doppelt negative T-Lymphozyten genannt werden.

Diese Arbeit befasst sich mit Untersuchungen zum Zusammenhang von diesen doppelt negativen T-Lymphozyten, bestimmten apoptosemodulierenden Proteinen – löslichem Fas (soluble Fas, sFas) und dem löslichen Fas Liganden (soluble Fas Ligand, sFasL) – und rezidivierenden Infektionen bei Kindern.

1.1. T-Lymphozyten

1.1.1. Bildung und Reifung der T-Lymphozyten

Es gibt verschiedene Subpopulationen von T-Lymphozyten, die sich in ihrem Aufbau und ihren Aufgaben unterscheiden. T-Lymphozyten tragen charakteristische Oberflächenproteine. Einige dieser Proteine werden von allen T-Lymphozyten getragen, andere nur von bestimmten Untergruppen. Alle T-Lymphozyten tragen einen T-Zell-Rezeptor (TCR), der eine wichtige Rolle bei der Kontaktaufnahme mit anderen Zellen spielt. Der TCR wird aus zwei transmembranösen Proteinketten gebildet. Man kennt vier Proteinketten, die den TCR bilden können, und man hat sie α, β, γ, δ-Kette genannt. Es kann entweder eine α mit einer β-Kette oder eine γ mit einer δ-Kette einen TCR bilden (αβTCR, γδTCR).

Das CD3 Protein ist mit dem TCR eng verbunden, beziehungsweise ein Bestandteil davon, und für die ordnungsgemäße Funktion des TCR notwendig. Es wird von allen T-Lymphozyten exprimiert.

Zwei weitere für die Funktion der T-Lymphozyten wichtige Oberflächenproteine sind CD4 und CD8. Diese kommen im peripheren Blut nur auf T-Lymphozyten mit dem αβTCR vor, und immer alternativ entweder das CD4 Protein oder das CD8 Protein. Daher kann man anhand dieser Proteine die αβTCR-Lymphozyten in $CD4^+$-T-Lymphozyten und $CD8^+$-T-Lymphozyten unterscheiden. Die $CD4^+$-T-Lymphozyten stellen die Untergruppe der Helfer-T-Lymphozyten dar, die $CD8^+$-T-Lymphozyten die Killer-T-Lymphozyten.

Mit der CD-Klassifikation wird ein Code zur Unterscheidung von Proteinen bezeichnet, der „**C**luster of **D**ifferentiation“ benannt wurde.

Die Stammzellen aller T-Lymphozyten befinden sich im Knochenmark, zur Reifung wandern die unreifen Vorstufen in den Thymus. Diese Vorstufen tragen noch keine für T-Lymphozyten charakteristischen Oberflächenproteine (CD3, CD4, CD8, TCR), man nennt sie in diesem Stadium Thymozyten. Während der ca. dreiwöchigen Reifung wandern sie vom Thymus-Kortex zur Thymus-Medulla, und durchlaufen verschiedene Reifestadien, die durch Veränderungen der exprimierten Oberflächenproteine gekennzeichnet werden. Die unreifen Thymozyten, die weder CD4 noch CD8 exprimieren, werden als doppelt negative Thymozyten bezeichnet.

In einem Zwischenstadium beginnen die Thymozyten ihre TCR Gene zu transkribieren, und entweder den αβTCR oder den γδTCR zu bilden. Siehe Abbildung 1.

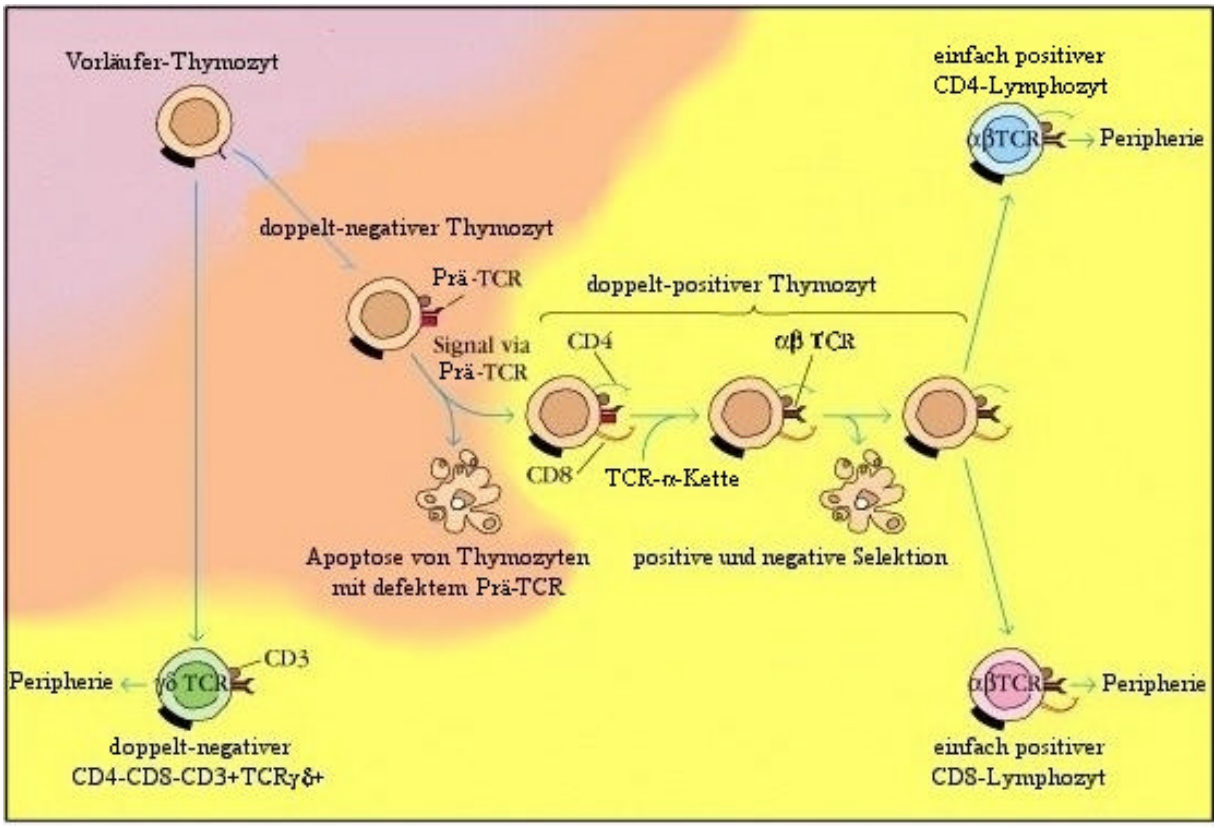

Abbildung 1. Schematische Darstellung des Reifewegs von Thymozyten im Thymus [Kuby et al., 2000]

Die Thymozyten, die einen γδTCR ausbilden, gehen einen anderen Reifungsweg als die Thymozyten, die einen αβTCR ausbilden, denn erstere reifen schneller, bilden kein CD4 oder CD8 Oberflächenprotein und werden, nach Ausbildung eines CD3 Oberflächenproteins, als γδTCR doppelt negative T-Lymphozyten ($CD4^-CD8^-CD3^+TCR\gamma\delta^+$) den Thymus verlassen. Sie kommen physiologisch zu weniger als 5% aller T-Lymphozyten im Körper des Menschen vor [Bank et al., 1986; Brenner et al., 1986; Chien et al., 1996; Lanier et al., 1987; Lanier et al., 1987].

Die meisten der doppelt negativen Thymozyten beginnen jedoch über eine Vorstufe den αβTCR sowie CD3, CD4 und CD8 auszubilden. Diese doppelt positiven Thymozyten ($CD4^+CD8^+CD3^+TCR\alpha\beta^+$) beginnen zu proliferieren, entweder CD4 oder CD8 von der Zelloberfläche zu entfernen, und dann den Thymus als $CD4^+$-αβTCR-Thymozyt oder $CD8^+$-αβTCR-Thymozyt zu verlassen, um dann außerhalb des Thymus zu vollfunktionstüchtigen T-Lymphozyten heranzureifen [Blackman et al., 1990; Carbone et al., 1988; Fowlkes et al., 1988; Kuby et al., 2000; MacDonald et al., 1988].

Während ihrer Reifung durchlaufen die TCRαβ-Thymozyten verschiedene Selektionsvorgänge, die dafür sorgen, dass nur voll funktionstüchtige Thymozyten, die nicht körpereigenes Gewebe angreifen, sich weiterentwickeln und alle anderen absterben (Siehe Abbildung 2).

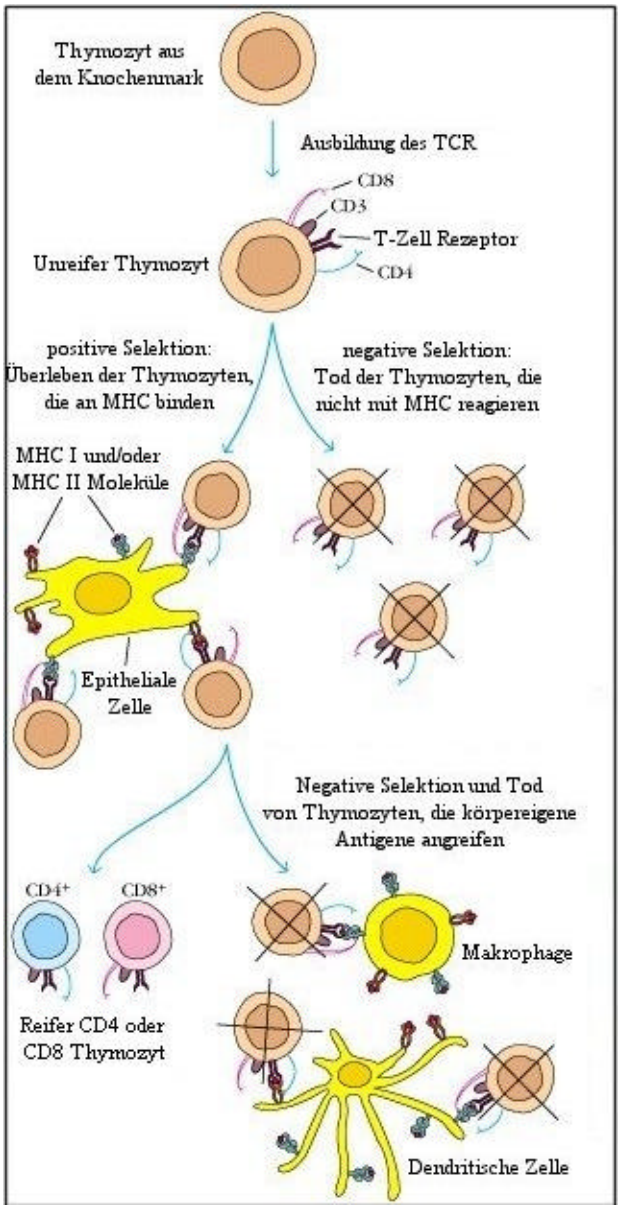

Abbildung 2. Schematische Darstellung der negativen und positiven Selektion der Thymozyten im Thymus [Kuby et al., 2000]

T-Lymphozyten dürfen und können körperfremde Stoffe (Antigene) nur erkennen, wenn sie Ihnen von Zellen in Verbindung mit bestimmten Molekülen, sogenannten MHC Molekülen, präsentiert werden. Von den MHC Molekülen gibt es verschiedene Klassen, wobei für die T-Lymphozyten nur die Klassen I und II wichtig sind. CD4 kann sich nur an MHC II und CD8 nur an MHC I anlagern.

Damit gewährleistet ist, dass der αβTCR Antigene nur in Verbindung mit MHC Molekülen erkennt, wird den Thymozyten im Thymus MHC I und MHC II präsentiert. Die Thymozyten, die sich an diese MHC Moleküle nicht anlagern, sterben ab (negative Selektion), während Thymozyten, die sich anlagern weiterleben (positive Selektion) [Fowlkes und Schweighoffer, 1995; Hogquist et al., 1994; Hogquist et al., 1994]. In diesem Schritt wird auch festgelegt, ob das CD4 oder das CD8 von der Zelloberfläche des in dieser Phase noch doppelt positiven Thymozyten entfernt wird, da sich der Thymozyt entweder an MHC I oder an MHC II anlagert, und dabei das CD4 oder CD8 Protein, das nicht zu der MHC Klasse passt, von der Zelloberfläche entfernt wird.

In einer zweiten Selektionsstufe werden den Thymozyten, die die positive Selektion überlebt haben, körpereigene Antigene in Verbindung mit MHC präsentiert. In diesem Schritt sterben die Thymozyten, die sich an diese Antigene anlagern ab (negative Selektion) [Saito und Watanabe, 1998; Sprent und Webb, 1995]. Hierdurch werden autoaggressive Thymozyten, die zur Selbstzerstörung des Organismus führen können, eliminiert.

Dafür, dass auch die γδTCR-Thymozyten positive und negative Selektionsschritte durchlaufen, gibt es Hinweise [Haas et al., 1993], jedoch auch dagegen [Iwashima et al., 1991], insgesamt ist der Reifungsweg der γδTCR-Thymozyten noch nicht vollständig erforscht.

Die meisten Thymozyten (98%) sterben auf dem Reifungsweg durch natürlichen Zelltod (Apoptose) [Nagata und Golstein, 1995], damit nur die Thymozyten den Thymus verlassen, die auch so funktionieren, dass keine Gefahr einer Selbstzerstörung des Organismus droht.

1.1.2. T-Zell-Rezeptor und CD3

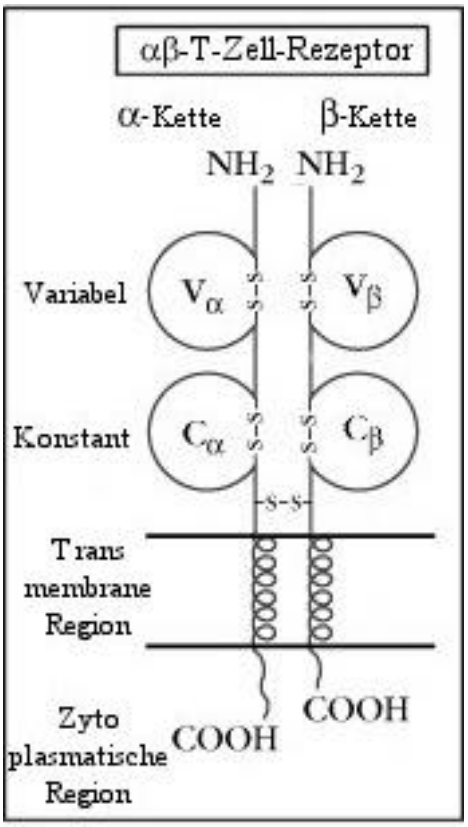

Abbildung 3. Schematische Darstellung des a b TCR [Kuby et al., 2000]

Der T-Zell (TCR) Rezeptor ist ein transmembranöses Protein, das aus zwei durch Disulfidbrücken verbundenen Aminosäurenketten besteht, deren Struktur der von Immunglobulinen gleicht, weswegen der TCR zur Superfamilie der Immunglobuline zählt (Siehe Abbildung 3). Das N-terminale Ende wird durch variable Sequenzen gebildet, die für die Vielfalt der TCR sorgen. Vor den variablen Sequenzen befinden sich wie bei den Immun-globulinen konstante Sequenzen, die bei allen TCR gleich sind und bei der Antigenbindung beteiligt sind.

Die variablen Sequenzen werden wie bei Immunglobulinen durch unterschiedliche Kombination verschiedener Gen-Produkte gebildet, die man in die Gruppen C, D, J und V zusammengefasst hat. Jede dieser Gruppen hat ein unterschiedliches Repertoire an möglichen Gensegmenten, beziehungsweise -produkten (siehe Tabelle 1). Die α-Kette und die γ-Kette werden aus den jeweils einem Segment der Gruppe C, J und V codiert, während die β-Kette und die δ-Kette aus einem Gensegment aller vier Gruppen C, D, J, V codiert werden. [Garcia und Teyton, 1998; Wilson und Garcia, 1997] (Siehe Abbildung 4)

Tabelle 1. Anzahl der einzelnen Gensegmente, die für den TCR codieren [Kuby et al., 2000]

	Anzahl von Gensegmenten			
	C	D	J	V
α-Kette	1		70	50
β-Kette	2	2	13	57
γ-Kette	2		5	14
δ-Kette	1	4	3	3

Der TCR bildet mit einem Oberflächenprotein (CD3) (Siehe Abbildung 5) einen funktionellen Komplex (TCR-CD3-Komplex). Wie wichtig CD3 für den TCR ist, kann man daran erkennen, dass bei Verlust des für CD3 codierenden Genes der gesamte TCR-CD3-Komplex wegfällt.

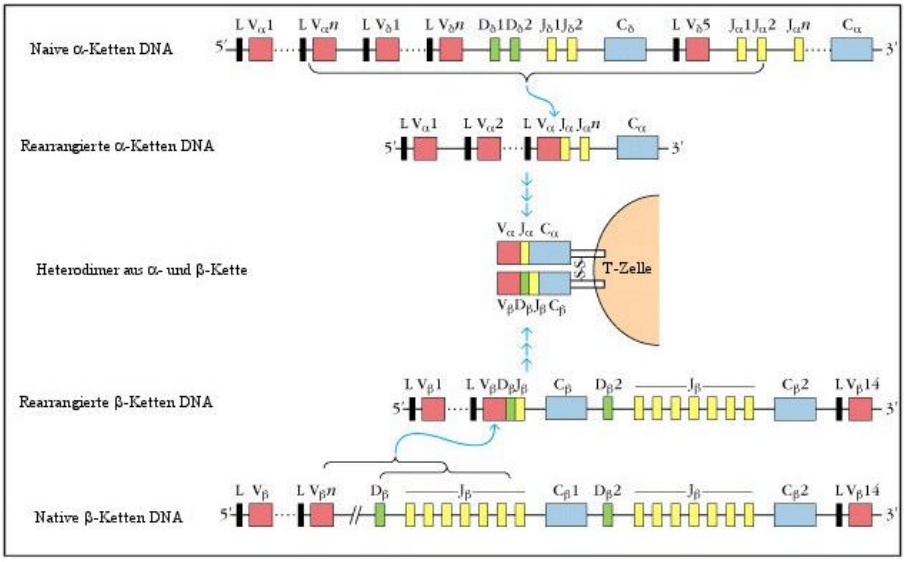

Abbildung 4. Schematische Darstellung der Rearrangierung der a- und b-Kette des T-Zell Rezeptors [Kuby et al., 2000]

Der CD3-Komplex besteht aus einer ζζ Doppelkette und zwei heterodimeren Doppelketten (γε und εδ). Die drei Doppelketten sind durch zum TCR unterschiedliche Ladung an den TCR gebunden.

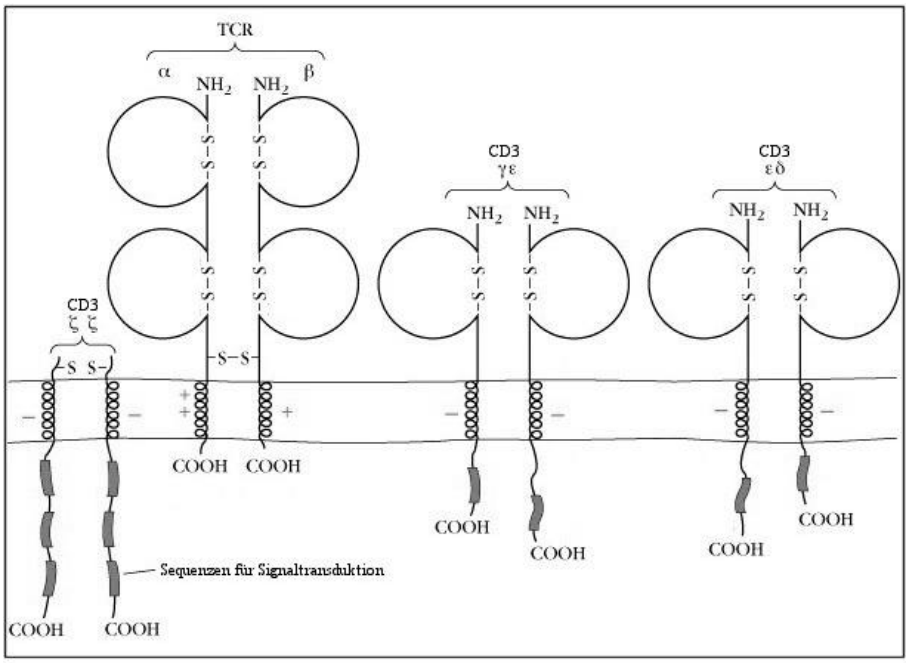

Abbildung 5. Schematische Darstellung des TCR-CD3 Komplex [Kuby et al., 2000]

Die Funktion von CD3 ist die Hilfe bei der Signalübermittlung zwischen T-Lymphozyt und der über den TCR gebundenen Zelle.

1.1.3. Aufbau von CD4,CD8

Die für die Funktion der αβTCR-T-Lymphozyten wichtigen Oberflächenproteine CD4 und CD8 haben eine Aufgabe bei der Bindung an das MHC II Molekül beziehungsweise MHC I Molekül.

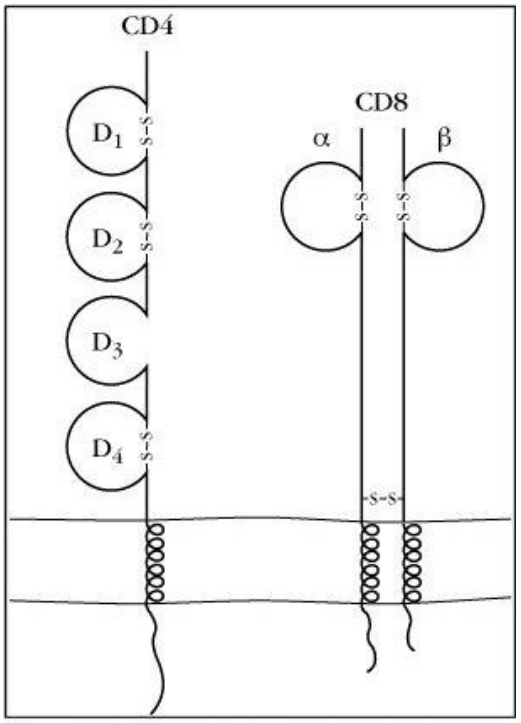

Abbildung 6. Schematische Darstellung des Aufbaus von CD4 und CD8 [Kuby et al., 2000]

CD4 ist ein 55-kDa monomeres Membranglykoprotein, mit vier immunglobulinähnlichen Domänen (D_1-D_4), einer hydrophoben transmembranösen Region und einem langen zytoplasmatischen Rest, mit drei phosphorylierbaren Serin-Resten (Siehe Abbildung 6).

CD8 besteht aus zwei, durch eine Disulfid-Brücke verbundenen Ketten, mit ca. 30-38 kDa. Jede dieser Ketten trägt eine einzelne immunglobulinähnliche Domäne, eine hydrophobe transmembranöse Region und einen zytoplasmatischen an mehreren Stellen phosphorylierbaren Rest (Siehe Abbildung 6).

Beide Moleküle haben eine Doppelfunktion: Erkennung des MHC Moleküls und Signaltransduktion. Außerdem erhöht das Vorhandensein von CD4 oder CD8 die Bindungskraft des TCR. Nach Bindung der CD4 oder CD8 Moleküle an das entsprechende MHC Molekül werden Signale durch die zytoplasmatischen Reste in die Zelle abgegeben [Sakihama et al., 1995; Zamoyska, 1998].

1.1.4. Aufbau von MHC I und MHC II

Die MHC Moleküle kommen auf verschiedenen Körperzellen vor. Es existieren drei verschiedene Klassen. Für diese Arbeit interessant sind die Klassen I und II.
Klasse I ist auf nahezu allen kernhaltigen Zellen eines Organismus zu finden. Klasse II sind in den Membranen von B-Zellen, aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Langerhanszellen der Epidermis und Spermatozyten gefunden worden. Klasse III sind Serumproteine. Das MHC System dient der Steuerung einer Immunantwort, der Erkennung von körpereigenen Zellen und ist an der Antigenpräsentation beteiligt.

Das MHC I Molekül besteht aus einer großen 45 kDa α-Kette, die in drei ca. 90 Aminosäuren umfassende Unterdomänen α1, α2, α3 untergliedert ist und einem kleineren, durch nichtkovalente Bindung an die α-Kette gebundenem, 12 kDa β_2-Mikroglobulin (siehe Abbildung 7). Die α-Kette

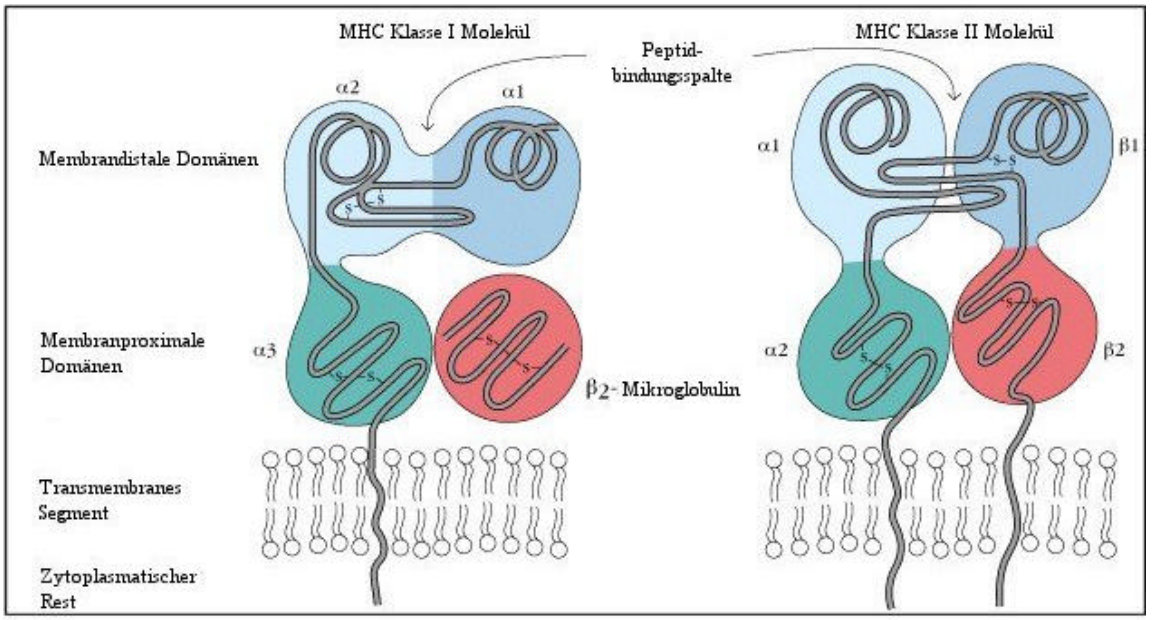

Abbildung 7. Schematische Aufbau des MHC I und des MHC II Moleküls. [Kuby et al., 2000]

ist in der Membran durch einen hydrophoben transmembranösen Anteil verankert und besitzt einen zytoplasmatischen Rest. Die Interaktion mit CD8 findet an der α3-Domäne statt.

Das MHC II wird von zwei Ketten gebildet, einer 33 kDa α-Kette und einer 28 kDa β-Kette, die durch nichtkovalente Bindung gebunden sind. Beide Ketten sind membrangebundene Glykoproteine, die durch einen hydrophoben transmembranösen Anteil an die Membran gebunden sind, und eine zytoplasmatischen Rest besitzen. Die Ketten sind in jeweils zwei Unterdomänen α1, α2, β1, β2 untergliedert. Die Interaktion mit CD4 erfolgt durch die α2-Domäne.

An beiden MHC Molekülen befindet sich an dem membrandistalen Ende eine Peptidbindungsspalte, an der Antigen präsentiert wird.

MHC I Moleküle binden über Peptidbindung endogene, intrazelluläre Proteine, die von der Zelle aufgenommen, an das MHC I Molekül gebunden und dann an der Zelloberfläche exprimiert werden.

MHC II Moleküle binden exogene Proteine die über Exozytose an MHC II Moleküle gebunden werden [Bjorkman und Burmeister, 1994].

1.1.5. Funktion von T-Lymphozyten

Wie aus dem vorgehendem ersichtlich, unterscheidet man die T-Lymphozyten aufgrund unterschiedlicher TCR in αβTCR-T-Lymphozyten und γδTCR-T-Lymphozyten.

1.1.5.1. αβTCR-T-Lymphozyten

αβTCR-T-Lymphozyten gehören zu den spezifischen Abwehrzellen des Organismus. Man untergliedert sie in die Helfer-T-Lymphozyten und in die Killer-T-Lymphozyten. Sie unterscheiden sich neben ihren Aufgaben unter anderem durch membranständige Oberflächenproteine. Helfer-T-Lymphozyten tragen ein CD4 Protein und Killer-T-Lymphozyten ein CD8 Protein. Alle T-Lymphozyten tragen an ihrer Zelloberfläche das CD3 Protein.

Zellen des Organismus tragen die unterschiedlichsten Oberflächenproteine, die sie für die verschiedensten Aufgaben benötigen. Die CD4 beziehungsweise CD8 Proteine haben zum Beispiel folgende funktionelle Aufgaben: Sie dienen zum einen als Zell-Zell-Adhäsionsmolekül, zum anderen können die CD4 und CD8 Moleküle Signale von der T-Zelle zu einer gebundenen Zelle weiterleiten oder verstärken. Auch gewährleisten sie, dass sich der Lymphozyt nur an die Zellen anlagert, die ein MHC Molekül tragen, das zu dem jeweiligen CD Protein passt, da CD4 nur an MHC II andockt und CD8 nur an MHC I.

Viele Oberflächenproteine werden auch zur immunologischen Unterscheidung von Zellen benutzt, da sie für bestimmte Zellen spezifisch sind. Das Zusammenspiel der Oberflächenproteine führt zu Veränderungen in den beteiligten Zellen, wodurch letztlich eine Immunantwort entsteht.

αβTCR-T-Lymphozyten müssen aktiviert werden, um als immunkompetente Zellen bei der Abwehr von körperfremden Stoffen mitzuwirken. Die Aktivierung von T-Helferzellen geschieht nach Antigenpräsentation durch eine antigenpräsentierende Zelle (APC= antigen presenting cell). Damit die T-Helferzelle das Antigen, zum Beispiel ein Virus, erkennen kann, muss es von der APC in Proteinbestandteile zerlegt werden (Antigenprozessierung), die dann an der Zelloberfläche der APC zusammen mit einem Oberflächenprotein (MHC II) exprimiert werden (Antigenpräsentation) (Siehe Abbildung 8). Helfer-T-Lymphozyten lassen sich nur durch Antigene, die an MHC II Moleküle gebunden sind, aktivieren, wobei der Bindung von CD4 und MHC II eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung zufällt. Die aktivierte T-Helferzelle tritt nach einer Kaskade von biochemischen Ereignissen aus einem G_0-Stadium, in welchem sie seit dem Verlassen des Thymus ruhte, in den Zellzyklus ein und teilt sich wiederholt sowohl in Effektorzellen als auch in Memoryzellen. Die Memoryzellen sind langlebige Helfer-T-Lymphozyten, die bei einem späteren Kontakt mit dem selben Antigen, durch welches sie aktiviert wurden, rasch reagieren können und für die sekundäre Immunantwort mitverantwortlich sind.

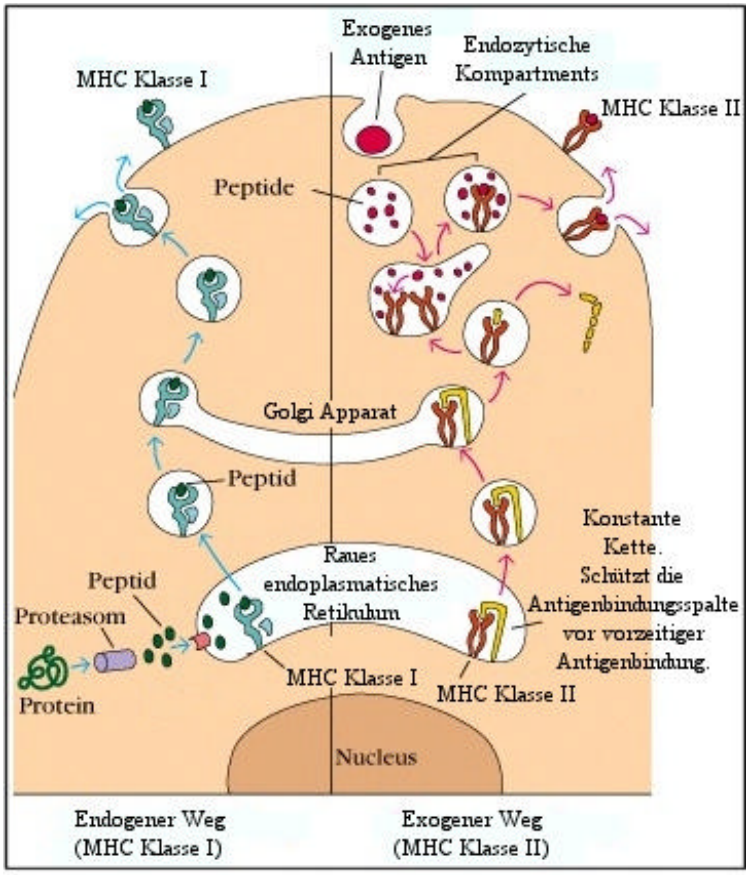

Abbildung 8. Schematische Darstellung des endogenen und exogenen Weges der Antigenprozessierung. [Kuby et al., 2000]

Die Effektorzellen schütten verschiedene Zytokine (Interleukine, TGF-β, IFN-γ, GM-CSF) aus, die zur Aktivierung anderer Zellen des Immunsystems (unter anderem Killer-T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen) notwendig sind.

Die T-Killerzelle kann nur durch diese Zytokine aktiviert werden, und wandelt sich dann in eine zytotoxische T-Zelle (CTL, Cytotoxic-T-Cell) um. Die CTL kann von einem Antigen – zum Beispiel einem Virus – befallene Zellen nur dann erkennen, wenn Bestandteile des Antigens zusammen mit einem Oberflächenprotein (MHC I) auf der Oberfläche der befallenen Zelle exprimiert werden. Zellen, die Antigene mit MHC I Molekülen exprimieren, nennt man Target (Ziel-) Zellen, da sie von CTL erkannt und abgetötet werden.

Dieser komplizierte Mechanismus, dass Antigene nur zusammen mit den MHC Molekülen I oder II erkannt werden, schützt den Körper davor, dass körpereigene gesunde Zellen von T-Lymphozyten autoaggressiv abgetötet werden und hilft die Immunantwort zu steuern.

In der Peripherie kommen αβTCR-T-Lymphozyten fast ausschließlich als CD4 oder CD8 positive Zellen vor. Jedoch hat man auch αβTCR-T-Lymphozyten beim Gesunden gefunden, die doppelt negativ sind, also weder CD4 noch CD8 zeigen [Levitsky et al., 1991; Sneller et al., 1992]. Man vermutet, dass sie im Gegensatz zu den γδTCR-T-Lymphozyten wahrscheinlich nicht primär entstehen, sondern sekundär durch Herunterregulation von CD4, beziehungsweise CD8 Oberflächenprotein, um sich nach Aktivierung und Erledigung ihrer „Arbeit“ auf den natürlichen Zelltod (Apoptose) vorzubereiten [Drappa et al., 1996].

1.1.5.2. γδTCR-T-Lymphozyten

γδTCR-T-Lymphozyten kommen bei gesunden Menschen zu weniger als 5% vor [Kuby et al., 2000]. Ihre Funktion ist noch nicht ganz geklärt, sie zeigen neben Ähnlichkeiten viele Unterschiede in ihrer Funktion zu den αβTCR-T-Lymphozyten [Bluestone et al., 1995; Chien et al., 1996].

Im Gegensatz zu den αβTCR-T-Lymphozyten findet man sie vor allem in epithelialem Gewebe (Haut, Lungen- und Darmepithelien). Sie zirkulieren auch nicht im Organismus wie die αβTCR-T-Lymphozyten.

Aus mehreren Studien zeigen sich Evidenzen, dass ihre Aufgaben in der frühen Immunantwort liegen [Ferrick et al., 1995; Haas et al., 1993; Hiromatsu et al., 1992; Ohga et al., 1990], sie keine Antigenprozessierung und -präsentation benötigen [Schild et al., 1994; Sciammas et al., 1994; Weintraub et al., 1994], und dass die von ihnen erkannten Antigene keine Proteine sein müssen [Constant et al., 1994; Schoel et al., 1994; Tanaka et al., 1995; Tanaka et al., 1994]. Dies befähigt sie, schnell und direkt eine frühe Antwort auf bestimmte pathogene Einwirkungen auf den Organismus (Tumor, Toxine, defekte Zellen) auszubilden, ohne von außen stimuliert werden zu müssen.

1.2. Apoptose

Apoptose gehört zu den wichtigsten Zellfunktionen aller Zellen. Unter Apoptose versteht man den natürlichen programmierten Zelltod mit kontrollierter Autodigestion. Dieser Vorgang steht im Gegensatz zur Nekrose, welche eine pathologische Form von Zelltod darstellt, die von einer akuten Verletzung der Zelle ausgeht [Seishima et al., 1996; Thompson, 1995; Vaux et al., 1994] und in der Regel mit einer Entzündung einhergeht.

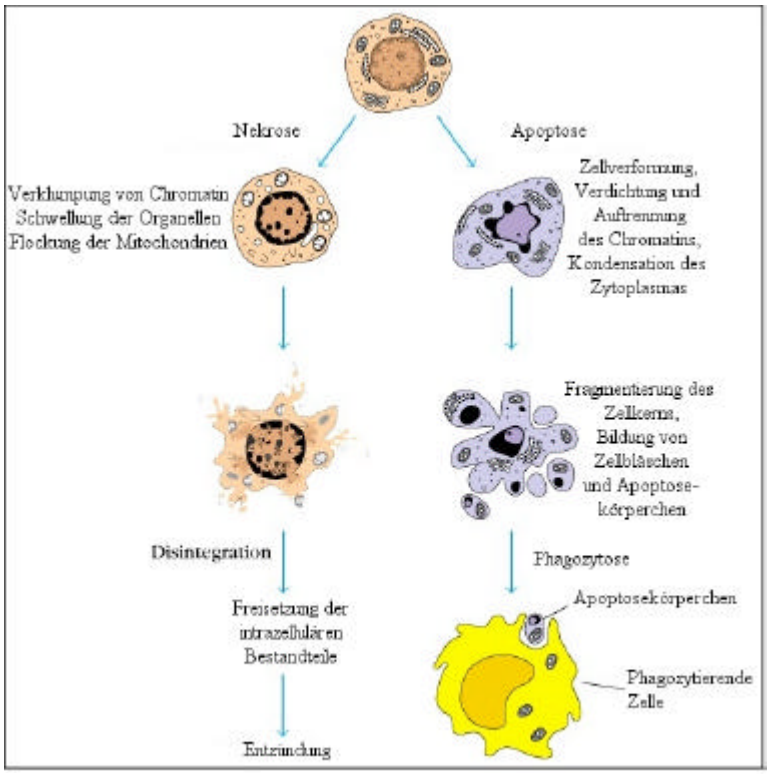

Abbildung 8. Schematischer Vergleich von Apoptose und Nekrose. [Kuby et al., 2000]

Das Zelltodprogramm durchläuft verschieden Stadien der Zellveränderungen, mit Verminderung des Zellvolumens, Veränderung des Zytoskeletts, Verdichtung des Zellkerns und Auflösen der DNA in kleine Fragmente, Auflösung der Zelle in kleine membranumhüllte Bläschen, die rasch von Makrophagen phagozytiert werden, um lytische und toxische Stoffe nicht austreten zu lassen. Somit wird eine Entzündung des umliegenden Gewebes verhindert (Siehe Abbildung 9). Apoptose wird vom Organismus verschiedentlich eingesetzt: Zum Beispiel für die Auflösung alter Zellen und Wiederverwertung von Zellbestandteilen, als Mittel bei der natürlichen Selektion während der Zellwachstumsphasen, zur Elimination von erkrankten Zellen (Tumorzellen, viral veränderten Zellen, autoreaktiven Lymphozyten [Rathmell et al., 1996; Russell et al., 1993; Singer und Abbas, 1994; Singer et al., 1994]), nicht mehr benötigten aktivierten Lymphozyten [Nagata, 1997; Saito, 1998], und auch zur Verhinderung von übermäßiger Proliferation von Zellen (zum Beispiel Lymphozyten).

Es gibt verschiedene Mechanismen, wie die Apoptose in einer Zelle eingeleitet werden kann. Die CTL benutzen zum Abtöten ihrer Targetzellen mittels Apoptose zwei davon, den Perforin vermittelten und den Fas vermittelten Mechanismus.

1.2.1. Perforin vermittelte Apoptose

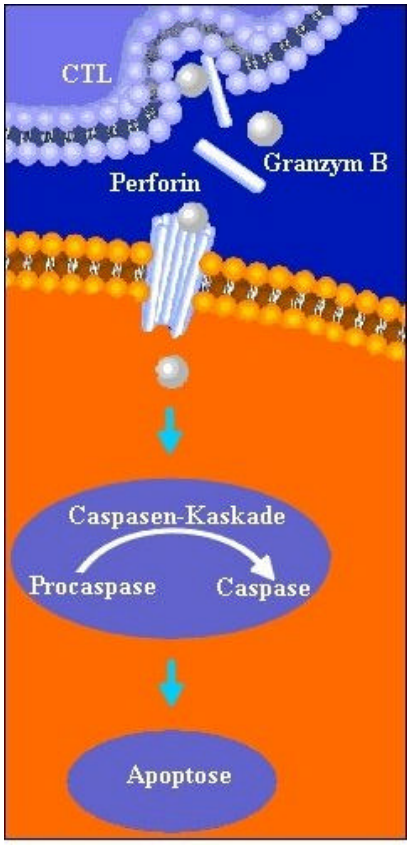

Abbildung 10. Schematische Darstellung des Perforin vermittelten Apoptose Weges. [http://biochem.roche.com/apoptosis/sciinf01.htm]

Dieser Mechanismus wird über Enzyme (Perforine) vermittelt, die nach Andocken der CTL an die Targetzelle in den intermembranösen Spalt zwischen CTL und Targetzelle ausgeschüttet werden (Siehe Abbildung 10). Die Perforine bilden Poren in der Zellmembran der Targetzelle, durch welche Proteasen (Granzyme) in die Targetzelle eingeschleust werden [Lowin et al., 1996; Nakajima et al., 1995; Schroter et al., 1995]. Hierbei spielt vor allem eine Serin Protease, das Granzym B (CTL proteinase-1, Fragmentin-2, RNKP-1), eine Rolle. Dieser Weg mündet in der Aktivierung von Enzymen (Caspasen), unter anderem Procaspase 3, die das Todessignal zum Zellkern und anderen Zellstrukturen weiterleiten (siehe Kapital 1.2.3.). Der CTL löst die Bindung zur Targetzelle und dockt an der nächsten Targetzelle an, während die Zelle in die Apoptose eintritt [Atkinson und Bleackley, 1995; Berke, 1995; Darmon et al., 1995; Griffiths, 1995; Irmler et al., 1995; Kagi et al., 1994; Kagi et al., 1994; Peitsch und Tschopp, 1994; Quan et al., 1996; Smyth und Trapani, 1995].

1.2.2. DISC vermittelte Apoptose

An einem anderer Weg, der unter dem Oberbegriff DISC (Death Inducing Signaling Complex) zusammengefasst wurde, ist das Fas Protein (beziehungsweise CD95 oder Apo-1) und sein Ligand (FasL) wesentlich beteiligt (siehe Abbildung 11) [Berke, 1995; Henkart und Sitkovsky, 1994; Kagi et al., 1994].

1.2.2.1. Fas (CD95, APO-1)

Fas wurde 1989 von 2 unabhängigen Gruppen entdeckt und von der einen Fas, von der anderen APO-1 betitelt [Trauth et al., 1989; Yonehara et al., 1989]. Als CD Code erhielt es die Bezeichnung CD95. Es handelt sich hierbei um ein Typ I Membranprotein [Itoh et al., 1991; Oehm et al., 1992] bestehend aus 319 Aminosäuren mit einer einfachen transmembranösen Domäne. Fas zeigt strukturelle Zugehörigkeit zur Familie des Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptors (TNFR) (siehe Tabelle 2) [Cheng et al., 1994; Dhein et al., 1992; Itoh et al., 1991; Krammer et al., 1994; Nagata und Golstein, 1995; Smith et al., 1994; Yonehara et al., 1989].

Tabelle 2. Aufstellung der Familienmitglieder des TNF-Rezeptors [Nagata, 1997]

TNFR-Familie
TNFR1, TNFR2, Lymphotoxin-b Rezeptor, NGF-Rezeptor (p75), CD40, CD27, CD30 [Nagata und Golstein, 1995], *DR-3* [Chinnaiyan et al., 1996; Kitson et al., 1996], *Wsl-1, human HVEM* [Montgomery et al., 1996], *chicken CAR1* [Brojatsch et al., 1996]

Rezeptoren der TNFR-Familie tragen charakteristischerweise 2-6 Cystein reiche Domänen (CRD) [Smith et al., 1994] in der extrazellulären Region (Fas: drei CRD (CRD1, 2, 3)), die für eine Bindung mit einem Liganden notwendig sind [Marsters et al., 1992; Orlinick et al., 1997; Welcher et al., 1991; Yan und Chao, 1991]. Nach der Bindung eines Liganden an diese CRD außerhalb der Zelle, erfolgt durch Umformung der Proteinstruktur eine Leitung des Signals an den intramembranösen Anteil [Schlessinger und Ullrich, 1992].

Einige Familienmitglieder (Fas, TNFR1, DR-3/Wsl-1, CAR1) zeigen auch in ihrem intrazellulären Aufbau eine gewisse Homologie untereinander. Sie tragen sechs amphipathische α-Helices [Huang et al., 1996], die Todesdomänen benannt wurden [Itoh und Nagata, 1993; Tartaglia et al., 1993], und zusammen aus ca. 70 Aminosäuren bestehen.

Bei Fas werden die intrazellulären Todesdomänen aus ca. 80 Aminosäurepaaren zusammengesetzt und bestehen aus mehreren hintereinander geschalteten intrazellulären Proteinen (TNF I, DR3-DR5). Weitere, mit Todesdomänen ausgestattete Proteine (FADD/MORT1, RIP, RAIDD) sind, über die Todesdomänen gebunden, nachgeschaltet [Nagata, 1997].

Die Signalweiterleitung kann man in drei verschiedene und unabhängige Wege untergliedern.

1. FADD/MORT1 spielt eine Rolle als Sammelstelle der vorgeschalteten Todesdomänenproteine. Über die C-terminale Todesdomäne (FADD) [Boldin et al., 1995; Chinnaiyan et al., 1995], wird es nach der Aktivierung von Fas an die Todesdomänen von Fas gebunden [Kischkel et al., 1995]. Die N-terminale Region (MORT1) ist eine sogenannte Todes Effektor Domäne (DED) und für die Signalweiterleitung in die Zelle verantwortlich. An sie kann ein weiterer mit zwei DED ausgestatteter Proteinkomplex gebunden werden, der ursprünglich FLICE (FADD-like ICE) oder MACH (MORT-1 associated CED-3 homologue) genannt, jetzt aber Caspase 8 betitelt wurde. Caspase 8 ist ein Einstieg in die Caspasenkaskade, die letztlich zum Tod der Zelle führt.

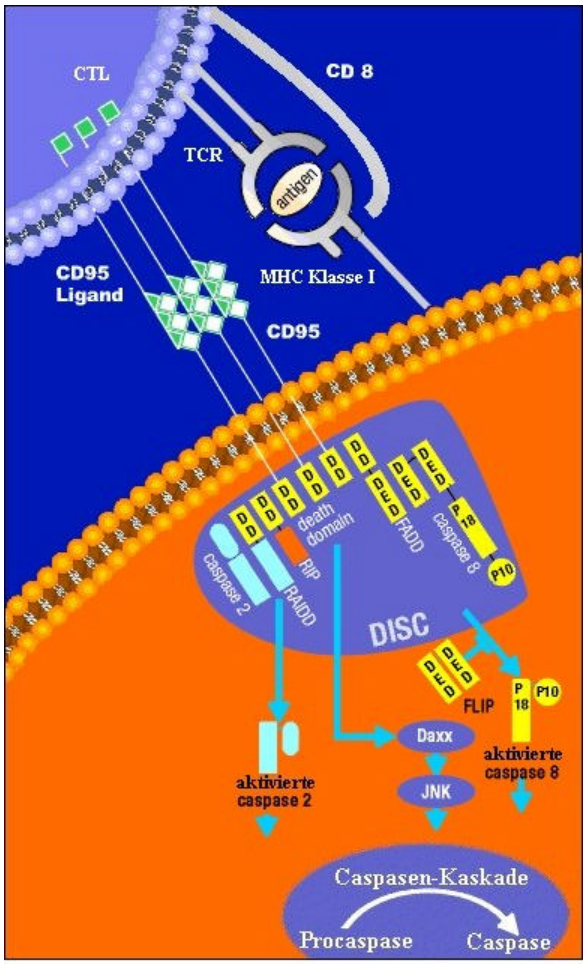

Abbildung 11. Schematische Darstellung der DISC vermittelten Apoptose. [http://biochem.roche.com/apoptosis/sciinf01.htm]

2. Ein alternativer Weg der Signalweiterleitung läuft über das RIP Protein. RIP ist eine Serin/Threonin Kinase, die eine Todesdomäne beinhaltet und an die intrazellulären Fas-Todesdomänen bindet. RIP benötigt ein weiteres nachgeschaltetes Protein RAIDD (Rip associated Death Domain), einerseits da RAIDD die Bindung von RIP an Fas unterstützt, andererseits übemimmt RAIDD die Signalweiterleitung in die Zelle, da RIP keine DED besitzt, über die das Signal weitergegeben werden könnte. Auch RAIDD besitzt keine DED, sondern aktiviert direkt eine Caspase (Caspase 2), durch die dann die Caspasenkaskade getriggert wird.
3. Die dritte Alternative geht über ein Protein ohne eigene Todesdomäne (DAXX = Fas death domain associated protein), welches direkt an die Todesdomäne von Fas bindet. DAXX aktiviert JNK (c-Jun N-terminal kinase), eine Kinase, die direkt die Caspasenkaskade aktiviert [Liu et al., 1996; Yang et al., 1997].

Fas wird von fast allen Zellen des Organismus exprimiert, was die Bedeutung dieses Proteins unterstreicht.

1.2.2.2. Fas Ligand

FasL ist ein Typ II Membranprotein und gehört zur TNF Familie [Gruss und Dower, 1995; Nagata und Golstein, 1995; Suda et al., 1993], und zeigt zur TNF Familie homologe extrazelluläre und intrazelluläre Regionen (siehe Tabelle 3 für eine Aufstellung der TNF-Familienmitglieder).

Tabelle 3. Aufstellung der Familienmitglieder des TNF [Nagata, 1997]

TNF-Familie
TNF, Lymphotoxin, CD30 Ligand, 4-1BB Ligand, CD40 Ligand, CD27 Ligand

Der intrazelluläre Bereich, eine 80 Aminosäuren lange prolinreiche Domäne, scheint Signale in die Zelle abgeben zu können, so dass die Signalleitung des Fas Liganden bidirektional ablaufen kann [Suzuki und Fink, 1998] und eine Fas/FasL Bindung zu einer Costimulation der Effektorzelle führen kann. Es gibt sogar unveröffentlichte Hinweise für Proteine, die an diesem intrazellulären Bereich des FasL binden können [Orlinick et al., 1999].

Membranständiger FasL wird vor allem von NK-Zellen (natürlich Killerzellen) und aktivierten CTL exprimiert, und spielt daher eine Rolle bei antiviralen und antitumorösen Reaktionen, sowie bei der Regulation der Lymphozytenentwicklung [Lynch et al., 1995].

Eine Bindung von FasL an membranständigen Fas führt zur Apoptose [Suda et al., 1995; Suda et al., 1993; Watanabe-Fukunaga et al., 1992].

1.2.2.3. Lösliche Formen von Fas und Fas Ligand

Fas und sein Ligand können außer als Zelloberflächenmolekül, zum Beispiel auf CTL, auch als lösliches Protein im Organismus vorkommen.

Die lösliche Form von Fas (soluble Fas, sFas), entsteht durch inkomplette Transkription des Fas Genes mit Fehlen der transmembranösen Aminosäuresequenz [Cheng et al., 1994] und wird wahrscheinlich von B- und T-Lymphozyten gebildet [Knipping et al., 1995].

Der membranständige Fas Ligand (FasL) wird durch die Einwirkung einer Metalloproteinase in die lösliche Form soluble FasL (sFasL) umgewandelt [Kayagaki et al., 1995; Tanaka et al., 1996; Tanaka et al., 1995]. sFasL ist ein 26-kDa Glykoprotein und besteht aus dem extrazellulären Anteil von membranständigem FasL.

Während sFas die Induktion von Apoptose hemmt, indem es durch Bindung an den membranständigen oder löslichen Fas Liganden eine Bindung des Liganden an membrangebundenes Fas verhindert [Cheng et al., 1994; Knipping et al., 1995; Tanaka et al., 1996], induziert sFasL selbstständig an membranständigem Fas die Apoptose der Zelle [Suda et al., 1995; Suda et al., 1993; Watanabe-Fukunaga et al., 1992]. Man hat jedoch gefunden, dass sFasL schwächere Apoptose induzierende Wirkung als membranständiger Fas Ligand besitzt, so dass man auch von einer apoptosehemmenden Wirkung ausgeht [Nagata, 1997; Suda et al., 1997].

1.2.3. Die Caspasenkaskade

Eine Schlüsselrolle im Ablauf der Apoptose kommt einer Enzymgruppe von Proteasen zu. Sie wurden zunächst als ICE (interleukin-1β-converting-enzyme) bezeichnet und aufgrund von Homologien in der Aminosäurensequenz in drei Gruppen aufgegliedert (ICE-like, ICH1-like und CPP32-like Proteasen) [Alnemri et al., 1996] (Siehe Tabelle 4). Jede von diesen Proteasen kann alleine Apoptose verursachen, wenn sie in ausreichender Menge in der Zelle vorkommt.

Da sie cysteinhaltige Proteasen sind und ihr Substrat hinter der Aminosäure Aspartam spalten, wurden sie Caspasen (Cystein-Aspartam Protease) benannt [Alnemri et al., 1996].

Caspasen kommen in allen Zellen als inaktive Procaspasen vor, die durch proteolytische Spaltung aktiviert werden können. Es gibt viele verschiedene Caspasen, die meisten bewirken nach ihrer Aktivierung ebenfalls eine Aktivierung durch proteolytische Spaltung von weiteren Procaspasen. Es gibt Hinweise, dass einige unterschiedliche Caspasen das selbe Substrat spalten, also redundant angelegt sind [Nagata, 1997]. Wie aus Tabelle 4 zu sehen ist, haben viele Caspasen Procaspasen als Substrat.

Tabelle 4. Aufstellung der Caspasen und Untergliederung in Superfamilien. [Nagata, 1997]

neuer Name	alter Name	Substrat
Caspase 1 Superfamilie		
Caspase 1	ICE	pro-Il1β, Procaspase 3, Procaspase 4
Caspase 4	ICErel-II, TX, ICH-2	
Caspase 5	ICErel-II, TY	
Caspase 2 Superfamilie		
Caspase 2	ICH-1	PARP
Caspase 9	ICE-LAP6	
Caspase 3 Superfamilie		
Caspase 3	CPP32, Yama, Apopain	PARP, DNA-PK, SRE/BP, rho-GDI
Caspase 6	Mch2	Lamin A
Caspase 7	Mch3,ICE-LAP3, CMH-1	PARP, Procaspase 6
Caspase 8	FLICE, MACH, Mch5	
Caspase 9	ICE-LAP6, Mch6	PARP
Caspase 10	Mch4	

Die bei der Perforin vermittelten Apoptose eingeschleusten Granzyme (Proteasen) aktivieren die Caspasenkaskade unter anderem durch Aktivierung der Procaspase 3 (CPP32beta).

Die Aktivierung der Caspasenkaskade durch FasL-Fas Bindung kann durch Caspase 8, Caspase 2 oder direkt durch das JNK (c-Jun N-terminal kinase) Enzym erfolgen.

Die Caspasenkaskade aktiviert sogenannte Todessubstrate, die für die intra- und extrazellulären Veränderungen (Zellverformung, Verdichtung und Auftrennung des Chromatins, Kondensation des Zytoplasmas, Zellkernfragmentierung, Bildung von Zellbläschen und Apoptosekörperchen) während der Apoptose verantwortlich sind.

1.2.4. Regulations- und Hemmmechanismen der Apoptose

Wichtig für den Organismus sind Mechanismen, die dafür sorgen, dass Apoptose nicht unkontrolliert eingeleitet wird. Jedoch bedienen sich auch Viren und andere Krankheitserreger bestimmter Proteine und Mechanismen, um die befallene Zelle vor der Apoptose zu schützen, bis der Vermehrungszyklus abgeschlossen ist.

1. Einige Viren hemmen bestimmte Caspasen [Thornberry et al., 1992], indem sie die Aktivierung der Procaspase verhindern. So tragen zum Beispiel das Kuhpockenvirus oder das Baculovirus Gene (crmA oder p35), die über eine Blockierung von Caspase 3 oder Caspase 1 die Fas vermittelte Apoptose blockieren [Enar i et al., 1995; Enari et al., 1996; Los et al., 1995; Tewari und Dixit, 1995].
2. Ein weiterer Mechanismus zum Schutz vor Apoptose hängt mit einem Protein zusammen, das man Bcl-2 genannt hat. Bcl-2 gehört zu einer Gruppe von Proteinen (Bcl-2 / Bcl-xL / Bax / Bcl-xS / Bak), die die Apoptose hemmen (Bcl-2, Bcl-xL) oder fördern (Bax, Bcl-xS, Bak) können. Das Verhältnis der fördernden und hemmenden Proteine entscheidet, ob die Zelle in Apoptose geht oder nicht. Wie Bcl-2 vor der Apoptose schützt, ist derzeit noch unklar. Diese Proteine sind vorwiegend an mitochondrialen Membranen lokalisiert. Man vermutet daher, dass ein Wirkmechanismus dieser Proteine in der Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials besteht, und sie somit einem entscheidenden „Point-of-no-Return“ Prozess entgegenwirken. Hierbei handelt es sich um einen Mechanismus, bei dem nach einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials bestimmte Proteine (AIF, Cytochrom C) aus dem Mitochondrium ausströmen [Craig, 1995; Kroemer, 1997; Williams und Smith, 1993; Yang et al., 1995], was unweigerlich zur Apoptose der Zelle führt.
3. FLIP (FLICE Inhibitory Protein) hemmt den FADD/MORT1-Caspase8 Weg durch Interaktion mit der DED und Hemmung der Bindung von Caspase 8 an MORT1. Viren, die befallene Zelle auf diesem Weg vor der Apoptose schützen, benutzen eine sogenannte v-FLIP (virale FLIP) [Thome et al., 1997].

Das Überleben von aktivierten B- und T-Lymphozyten bis zur Erfüllung ihrer Aufgabe wird über das Bcl-2 System gesteuert. Aktivierte Lymphozyten produzieren weniger Bcl-2 als naive Lymphozyten, so dass sie empfänglicher für Apoptose sind. Ein bestimmter Mechanismus schützt Lymphozyten vor Apoptose, solange sie Kontakt mit einem Antigen haben. Wird das Antigen eliminiert, fällt dieser Mechanismus weg, und die aktivierten Lymphozyt gehen nach Erledigung ihrer Arbeit in Apoptose über.

Ein anderes Beispiel für die Verwendung des Bcl-2, Bcl-xL vermittelten Schutzmechanismus stellen bestimmte Viren wie das Pocken oder Herpesvirus dar, die diesen Mechanismus nutzen, um die Zelle bis zur Vollendung des Replikationszyklus vor Apoptose zu schützen.

1.3. Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Canale und Smith beschreiben ein sehr seltenes Syndrom [Canale und Smith, 1967; Drappa et al., 1996; Kellerer und Mutz, 1976], das unter den Oberbegriff lymphoproliferative Syndrome fällt. Es handelt sich hierbei um einen Symptomkomplex, der zwischen dem ersten Lebensmonat und ca. zwei Lebensjahren auftritt und durch Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und autoimmunologische Erscheinungen wie hämolytische Anämie, Thrombozytose u.ä. gekennzeichnet ist. Die chronische, von infektiösen Erkrankungen unabhängige Lymphadenopathie führt zu einer massiven, zunehmenden, festen, nichteitrigen, nicht erythematösen Vergrößerung aller Lymphknoten (femoral, abdominal, inguinal, axillär, cervical etc.). Histologisch zeigt sich in den Lymphknoten eine Veränderung der Lymphknotenarchitektur, mit vielen Lymphozyten, abnormalen Histiozyten und monozytenartigen Zellen. Die Leber und Milz zeigen in der Regel, abgesehen von Zeichen einer extramedullären Hämatopoese, keine strukturellen Veränderungen. Im Knochenmark findet man häufig Zeichen vermehrter Zellreifung. Die Splenomegalie kann solche Ausmaße annehmen, dass eine Splenektomie zum Beispiel aufgrund einer Anämie oder Panzytopenie durchgeführt werden muss. Interessanterweise zeigen sowohl die vergrößerten Lymphknoten als auch die vergrößerte Leber und Milz eine Volumenminderung während infektiöser Erkrankungen. Diese gehen in der Regel mit normalem Fieber einher. Kortikosteroide, Antibiotika oder immunsuppressive Medikamenten scheinen eher nur geringe Wirkung zu zeigen.

Eine Analyse der T-Zellsubpopulationen zeigte einen im Vergleich zum Gesunden erhöhten Anteil von mehr als 20% an $CD4^-CD8^-CD3^+$-T-Lymphozyten. Als Ursache für dieses Syndrom haben Drappa et al. eine Mutation im Fas Gen, die zu Veränderungen der Todesdomänen führt, beschrieben [Drappa et al., 1996]. Für diese Erkrankung existieren Mausmodelle mit bestimmten Gendefekten, die man aufgrund der phänotypischen Veränderungen, die diese Defekte provozieren, „lpr“ (lymphoproliferation) und „gld“ (generalized lymphoproliferative disease) genannt hat. Diese Mäuse zeigen ähnliche Symptome wie Patienten, die am Canale-Smith-Syndrom leiden. Auch bei ihnen fand man einen erhöhten Anteil an DN-T-Lymphozyten [Adachi et al., 1995; Cohen und Eisenberg, 1991].

Den Zusammenhang der Symptome mit dem Defekt im Fas Gen versucht man durch eine eingeschränkte Apoptose zu erklären. So ist es denkbar, dass zum Beispiel Lymphozyten, die durch Apoptose abgetötet werden sollen, aufgrund des Apoptosedefektes weiter überleben, sich im lymphatischen Gewebe und im Blut anreichern und so zu den oben genannten Veränderungen führen. Da es noch weitere Apoptosemechanismen gibt, muss auch keine generalisierte Organvergrößerung oder ein Immundefekt vorliegen.

Man vermutet, dass aktivierte T-Lymphozyten nach Erfüllung ihrer Aufgabe ihre Oberflächenantigene CD4 und CD8 herunterregulieren, um sich für Fas-FasL vermittelte Apoptose zu sensibilisieren [Vignaux und Golstein, 1994]. Da diese Zellen bei Defekten des häufigsten – Fas vermittelten – Apoptoseweges nicht abgetötet werden können, ließe sich so die Anreicherung der doppelt negativen T-Lymphozyten erklären [Drappa et al., 1996].
Cheng et al. zeigten auf, dass, nachdem sie gesunden Mäusen sFas verabreichten, es zu einem Anstieg von DN-T-Lymphozyten und auch von einfach-positiven ($CD4^+$ oder $CD8^+$) T-Lymphozyten kam [Cheng et al., 1994]. Wie schon beschrieben vermutet man, dass sFas den Fas-Liganden blockiert, und dadurch antiapoptotisch wirkt. Die Anreicherung von einfach-positiven und doppelt negativen T-Lymphozyten kann man daher darauf zurückführen, dass nach Gabe von sFas weniger von diesen Zellen in Apoptose gehen. Dies zeigt die enge Beziehung und die Wichtigkeit von Fas und seinem Liganden für die Elimination von nicht mehr benötigten T-Lymphozyten.

Im Dr. von Haunerschen Kinderspital, München, stellen sich immer wieder Kinder mit rezidivierenden unspezifischen fieberhaften Infektionen vor, die deswegen zur weiteren Diagnostik stationär aufgenommen werden. Bei manchen Patienten bestehen Symptome, die an das Canale-Smith-Syndrom erinnern, wie Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und Fieber, ohne dass die Kinder einen auffällig reduziertem Allgemeinzustand zeigen.
In dieser Untersuchung wurde die Frage gestellt, ob man bei Kindern mit häufigen Infektionen einen vermehrten Anteil an DN-T-Lymphozyten finden kann. Dazu führte die Hypothese, dass aktivierte T-Lymphozyten über Herunterregulierung ihrer Oberflächenproteine sich auf die Apoptose vorbereiten [Drappa et al., 1996]. Bei Kindern mit häufigen Infektionen kann man annehmen, dass der Körper auf die Infektionen mit einer vermehrten Aktivierung von Abwehrzellen, also auch von T-Lymphozyten reagiert. Demnach wären bei Kindern mit häufigen Infektionen vermehrt aktivierte T-Lymphozyten und durch die Herunterregulation der Oberflächenproteine vermehrt DN-T-Lymphozyten zu erwarten.
Zusätzlich bestand die Aufgabe, eine Korrelation von DN-T-Zellen mit den löslichen apoptosemodulierenden Faktoren sFas und sFasL zu untersuchen, da hier Zusammenhänge vorbeschrieben wurden [Cheng et al., 1994; Drappa et al., 1996].

Wie aus der Aufstellung der an der Apoptose beteiligten Strukturen hervorgeht, handelt es sich bei der Fas vermittelten Apoptose um ein sehr komplexes System. Diese Arbeit soll als Ansatz verstanden werden, einen Teilaspekt zu untersuchen.

2. Patienten und Methoden

2.1. Definition der Einschlusskriterien

Die Auswahl der Blutproben erfolgte nach folgenden Kriterien:

- Rezidivierende Infektionen als Diagnose auf dem Anforderungsschein zur Lymphozyten-untersuchung.
- Keine HIV Erkrankung des Patienten bekannt.
- Keine Autoimmunerkrankung des Patienten bekannt.
- Blutprobe nicht älter als 24 h.
- Akte des Patienten im Dr. von Haunerschen Kinderspital vorhanden.

2.2. Beschreibung der Patienten

Es wurden 29 Patienten im Alter von 4 Lebensmonaten bis zu 38 Jahren (Mittelwert 8 Jahre, Standardabweichung 10 Jahre, Median 5 $^{8}/_{12}$ Jahre) untersucht:

Die Auswahl der Patienten erfolgte wie folgt:

Von den Patienten, deren Vollblut von Stationen oder Ambulanzen des Dr. von Haunerschen Kinderspitals dem immunologischen Labor zur Lymphozytendiagnostik übersandt wurde, waren anhand klinischer Angaben solche ausgewählt worden, die zur Zielsetzung dieser Studie passten.

Nach der Bestimmung der Lymphozytensubpopulationen mittels 2-fach markierter Durchflußzytometrie wurden weitere immunologische Untersuchungen aus den Natrium-Heparin-Vollblutproben durchgeführt. Zusätzlich wurde aus einem Teil der Vollblutprobe Plasma gewonnen, zur Bestimmung der löslichen Plasmaproteine sFas und sFasL.

Anhand der Anamnese und der immunologischen Diagnostik wurden die Patienten in zwei Gruppen unterteilt:

19 Patienten, bei denen kein Immundefekt nachweisbar war.

10 Patienten, bei denen ein Immundefekt nachgewiesen worden war.

2.2.1. Patienten ohne nachweisbaren Immundefekt

Tabelle 5. Diagnosen von 19 untersuchten Kindern ohne nachweisbaren Immundefekt.

Häufigkeit der Diagnose	Diagnose
3	Rezidivierende Lungenentzündungen
15	Rezidivierende Infektionen unklarer Genese
1	Zink und Eisenmangel und rezidivierende Infektionen
N=19	

Das Alter der 19 Patienten ohne nachweisbaren Immundefekt lag zwischen 4 Monaten und 28 Jahren und betrug im Median $3\,^{2}/_{12}$ Jahre.

Die Diagnosen der Patienten sind in der Tabelle 5 im Einzelnen aufgeführt.

2.2.2. Patienten mit nachweisbarem Immundefekt

Tabelle 6. Diagnosen von 9 untersuchten Kindern mit nachweisbarem Immundefekt.

Häufigkeit der Diagnose	Diagnose
1	autosomal rezessive Agammaglobulinämie
1	x-chromosomal rezessive Agammaglobulinämie M. Bruton
1	primär selektiver IgA Mangel
1	Angeborene Neutropenie
1	schwerer kombinierter Immundefekt (SCID)
1	Hypogammaglobulinämie und CD4 Lymphopenie
2	unklarer lymphopenischer Immundefekt
1	Monosomie 22q11, Neutropenie, lymphozytärer Immundefekt
N=9	

Das Alter der 9 Patienten mit nachweisbarem Immundefekt lag zwischen 5 Monaten und 38 Jahren und betrug im Median 6 $^{10}/_{12}$ Jahre.

Die Diagnosen der Patienten sind in der Tabelle 6 im Einzelnen aufgeführt.

2.3. Methoden

Bei allen Untersuchten wurde der prozentuale Anteil von einfach CD4 positiven, einfach CD8 positiven, und doppelt negativen T-Lymphozyten bestimmt. Aus zusätzlich vorhandenen Plasmaproben wurden die Plasmaspiegel von sFasL und sFas bestimmt.

Zur statistischen Bestimmung von signifikanten Unterschieden der Mittelwerte wurde der t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Zur Berechnung der Korrelationen von sFas, sFasL, $CD4^+$-T-Lymphozyten, $CD8^+$-T-Lymphozyten und DN-T-Lymphozyten wurde eine bivariate Korrelationsanalyse durchgeführt.

2.3.1. Bestimmung der Verteilung von $CD4^+$-, $CD8^+$- und DN-T-Lymphozyten

Für die Analyse der doppelt negativen T-Lymphozyten verwandten wir die Methode einer Dreifachmarkierung von Lymphozyten mit unterschiedlich fluoreszierenden Antikörpern gegen CD4, CD8 und CD3 sowie die Methode der Durchflußzytometrie.

Da die Bestimmung der T-Lymphozytensubpopulationen mit drei verschieden markierenden Antikörpern in der Durchflußzytometrie keine im Dr. von Haunerschen Kinderspital bisher verwendete Methode war, wurde diese speziell für diese Arbeit etabliert.

Für die Untersuchung der T-Lymphozyten wurde ein Flow-Cytometer des Typs FACScan™ der Firma Becton Dickinson[*] verwendet. Zur Bestimmung der Gesamtzahl der $CD3^+$ Zellen (entspricht der Anzahl aller T-Lymphozyten) wurde eine Lösung mit drei verschieden markierenden Antikörpern der Firma Becton Dickinson (FastImmune™ Control: γ_1 FITC / γ_1 PE[†] /$CD3^3$ PerCP[‡]) eingesetzt. Aus dieser Gesamtzahl der T-Lymphozyten, die graphisch ermittelt wurde, wurde mittels eines weiteren dreifachen Antikörpergemisches der Firma Becton Dickinson (Tritest™: $CD4^1$ FITC/$CD8^2$ PE[†] /$CD3^3$ PerCP[‡]) die prozentuale Menge der $CD4^+$ und $CD8^+$ Zellen bestimmt, und von der Gesamtzahl der $CD3^+$ T-Lymphozyten abgezogen. Das Ergebnis ergab den Anteil der DN-T-Lymphozyten.

Für jede Bestimmung wurden 50 µl Patientenblut (Natrium-Heparin Vollblut) und jeweils 10 µl der Antikörperlösung verwendet, miteinander vermengt und 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Danach erfolgte die Lyse der Erythrozyten mittels je 2 ml verdünnter Lysierungslösung (Lysinsolution) (Lysinsolution:Aqua dest.=1:10) (Firma Becton Dickinson) und weitere Inkubation (10 Minuten, Raumtemperatur). Zentrifugation bei 1500 U/min für 10 Minuten, zweimaliges Absaugen des Überstands, waschen mit je 2 ml PBS-Puffer und erneute Zentrifugation bei 1500 U/min für 10 Minuten und wiederum Absaugen des Überstands und Zugabe von 300µl PBS. Danach erfolgte die Messung unmittelbar nach erneutem Schütteln und Mischen (Vortex-Schüttler). Die Verarbeitung der Messdaten erfolgte mittels CellQuest™ Software (Becton Dickinson) für Apple Macintosh™.

---

[*] Becton Dickinson (Germany); Tullastr. 8-12; D-69126 Heidelberg

[†] US Patent No. 4.520.110; European Patent No. 76,695; Canadian Patent No. 1.179.942

[‡] US Patent No. 4.876.190

[1] Der Antikörper erkennt eine Antigen an der Bindungsstelle für MHC II von CD4

[2] Der Antikörper erkennt ein Antigen an der α-Kette von CD8

[3] Der Antikörper erkennt die ε-Kette von CD3

2.3.2. Bestimmung der sFasL Spiegel im Plasma

Aus dem nach der T-Lymphozytenanalyse verbleibendem Heparinvollblut wurde Plasma gewonnen und bei –80°C eingefroren. Hieraus wurden nach dem Auftauen auf Raumtemperatur die sFasL und sFas Spiegel mittels Enzymimmunoassay (ELISA, enzyme linked immunosorbent assay) bestimmt.

Die Bestimmung des sFasL Spiegels wurde mit einem ELISA Kit der Firma MBL* durchgeführt.

Der Testkit bestand aus:

- Mikrotiterplatte mit 96 Anti-FasL antikörperbeschichteten Wells.
- sFasL Standardkonzentrat (lyophilisiert)1 x 25 ng.
- Konjugatreagenz (x 101) 1 x 0,25 ml.
- Konjugatverdünnungslösung 1 x 14 ml.
- Probenverdünnungslösung 1 x 20 ml.
- Waschkonzentrat (x10) 2 x 50 ml.
- Substrat A (TMB) 1 x 10 ml.
- Substrat B (H_2O_2 0,2 %) 1 x 10 ml.
- Stoplösung ($2NH_2SO_4$) 1 x 18 ml.

* Code No. 5255; Medical & Biological Laboratories CO.,LTD 5-10 Marunouchi 3 chome, Naka-ku Nagoya 460 Japan

Vorbereitung der Reagenzien:

- Waschlösung: 50 ml des Waschkonzentrat wurden mit 450 ml Aqua bidest. verdünnt.
- Konjugatlösung: Das Konjugatreagenz wurde mit Konjugatverdünnungslösung im Verhältnis 1:100 verdünnt.
- Standardverdünnungsreihe: Das sFasL Standardkonzentrat wurde mit 100 µl Aqua bidest. verdünnt. Aus dieser Standardlösung wurde durch Verdünnung eine lineare Standardverdünnungsreihe gebildet (5 ng/ml, 2,5 ng/ml, 1,25 ng/ml, 0,63 ng/ml, 0,31 ng/ml). Die unverdünnte Probenverdünnungslösung wurde zur Kalibrierung des Nullwerts verwendet.
- Substratlösung: Substrat A und B wurden im Verhältnis 1:1 miteinander vermischt.
- Patientenplasma: Das Patientenplasma wurde jeweils im Verhältnis 1:1 mit der Probenverdünnungslösung verdünnt.

Durchführung der ELISA Testreaktion:

Schritt 1 (Waschen der Wells): Die Wells wurden vor dem Gebrauch mit Hilfe von Mehrkanalpipetten mit 300 µl Waschlösung pro Well gefüllt, und danach komplett entleert. Dies wurde insgesamt zweimal wiederholt.

Schritt 2 (Inkubation des Patientenplasmas und der Standards): 100 µl von jedem verdünnten Patientenplasma und von den Standards wurden in die mit Anti-FasL Antikörpern beschichteten Wells der Mikrotiterplatte gegeben. Danach erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit.

Schritt 3 (Waschen): Die Wells wurden vollständig entleert und fünfmal gewaschen, wie in Schritt 1 beschrieben.

Schritt 4 (Inkubation des Konjugats): In jedes Well wurden 100 µl der Konjugatlösung pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit.

Schritt 5 (Waschen): Die Wells wurden vollständig entleert und fünfmal gewaschen, wie in Schritt 1 beschrieben.

Schritt 6 (Färben): In jedes Well wurde 100 µl Substratlösung (Substrat A + B) mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit.

Schritt 7 (Reaktionsstop): In jedes Well wurden 100 µl Stoplösung mit einer Mehrkanalpipette pipettiert.

Schritt 8 (Lesen): Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stoplösung wurden die Titerplatten abgelesen. Zum Ablesen wurde ein ELISA Mikroplatten Lesegerät Typ MRX der Firma Dynex* mit einer Lichtquelle von 450 nm und einer Referenzlichtquelle von 620 nm verwendet.
Anhand der Standardkurve konnten die Messwerte unter rechnerischer Berücksichtigung von einzelnen Verdünnungen bestimmt werden.

Zur Messmethode ist zu erwähnen, dass Konzentrationen unter 0,1 ng/ml nicht gemessen werden können.

* Dynex Technologies (Germany); Justinus-Kerner-Strasse 32; D-73766 Denkendorf

2.3.3. Bestimmung der sFas Spiegel im Plasma

Für die Bestimmung des sFas Spiegels wurde ein ELISA Kit der Firma NMI* verwendet.

Der Testkit bestand aus:

- Mikrotiterplatte mit 96 Anti-Fas antikörperbeschichteten Wells.
- Biotinkonjugat Anti-Fas monoklonaler Mausantikörper 1 x 100 µl.
- Streptavidin-HRP 1 x 150 µl.
- sFas Standardkonzentrat 2 x 0,03 ml a 2000 pg/ml.
- Waschpufferkonzentrat 20 x (PBS mit 1 % Tween 20) 1 x 5 ml.
- Probenpufferkonzentrat 20 x (PBS mit 1% Tween 20 und 10% BSA).
- Probenverdünnungslösung 1 x 12 ml.
- Substratlösung I (TMB) 1 x 7 ml.
- Substratlösung II (H_2O_2 0,2 %) 1 x 7 ml.
- Stoplösung (1 Molare Phosphorsäure) 1 x 12 ml.

* Cat. No. N50561, Novus Molecular Inc. Vertrieb durch Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, Obere Hauptstr. 10b D-85386 Eching

Vorbereitung der Reagenzien:

- Waschlösung: 50 ml des Waschpufferkonzentrat wurden mit 950 ml Aqua bidest. verdünnt.
- Probenpufferlösung: Das Probenpufferkonzentrat wurde im Verhältnis 5:95 mit Aqua bidest. verdünnt.
- Biotinkonjugatlösung: Der Biotinkonjugat Anti-Fas monoklonale Mausantikörper wurde im Verhältnis 0,06:5,94 mit der Probenverdünnungslösung vermischt. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:100.
- Standardverdünnungsreihe: Das sFas Standardkonzentrat wurde mit 300 µl Probenpufferlösung verdünnt. Aus dieser Standardlösung wurde durch Verdünnung eine lineare Standardverdünnungsreihe gebildet (1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,2 pg/ml, 16 pg/ml). Die unverdünnte Probenverdünnungslösung wurde zur Kalibrierung des Nullwerts verwendet.
- Streptavidin-HRP: 0,05 ml des Streptavidin-HRP Reagenz wurden mit 12 ml der Probenpufferlösung vermischt. Es ergab sich so eine Verdünnung von 1:240.
- TMB-Substratlösung: Substratlösung I wurde im Verhältnis 1:1 mit Substratlösung II vermischt.
- Patientenplasma: Das Patientenplasma wurde jeweils im Verhältnis 1:9 mit der Probenverdünnungslösung verdünnt.

Durchführung der ELISA Testreaktion:

Schritt 1 (Waschen der Wells): Die Wells wurden vor dem Gebrauch mit Hilfe von Mehrkanalpipetten mit 300 µl Waschlösung pro Well gefüllt, und danach komplett entleert. Dies wurde insgesamt zweimal wiederholt.

Schritt 2 (Inkubation des Patientenplasmas und der Standards): 100 µl von jedem verdünnten Patientenplasma und von den Standards wurden in die mit Anti-Fas Antikörpern beschichteten Wells der Mikrotiterplatte gegeben, zusätzlich wurden noch 50 µl Biotinkonjugatlösung in jedes Well mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 37°C und Dunkelheit.

Schritt 3 (Waschen): Die Wells wurden vollständig entleert und zweimal gewaschen, wie in Schritt 1 beschrieben.

Schritt 4 (Inkubation von Streptavidin-HRP): In jedes Well wurden 100 µl Streptavidin-HRP pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation für 60 Minuten bei 37°C und Dunkelheit.

Schritt 5 (Waschen): Die Wells wurden vollständig entleert und dreimal gewaschen, wie in Schritt 1 beschrieben.

Schritt 6 (Färben): In jedes Well wurde 100 µl TMB-Substratlösung mit einer Mehrkanalpipette pipettiert. Danach erfolgte die Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur und Dunkelheit.

Schritt 7 (Reaktionsstop): In jedes Well wurden 100 µl Stoplösung mit einer Mehrkanalpipette pipettiert.

Schritt 8 (Lesen): Innerhalb von 30 Minuten nach Zugabe der Stoplösung wurden die Titerplatten abgelesen. Zum Ablesen wurde ein ELISA Mikroplatten Lesegerät Typ MRX der Firma Dynex mit einer Lichtquelle von 450 nm und einer Referenzlichtquelle von 620 nm verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Tabellarische Datenzusammenfassung

In der Tabelle 7 ist eine Zusammenfassung der Messungen dargestellt.

Tabelle 7. Darstellung der immunologischen Daten in Form von Median, Mittelwert, Standardabweichung, Maximal- und Minimalwert

Gruppe 1: Patienten ohne Immundefekt, n = 19

	$CD4^+$-T-Lymphozyten n=19 (%)	$CD8^+$-T-Lymphozyten N=19 (%)	CD4/CD8 Ratio n=19	DN-T-Lymphozyten n=19 (%)	sFasL n=17 (ng/ml)	sFas n=16 (ng/ml)
Median	59,12	30,22	1,99	7,00	0,30	1,65
Mittelwert	58,91	31,92	1,91	8,25	0,74	1,81
Standardabweichung	6,37	5,19	0,46	4,97	1,59	0,53
Maximalwert	67,91	41,54	2,74	22,64	7,00	2,89
Minimalwert	43,71	24,81	1,25	1,82	0,10	1,03

Gruppe 2: Patienten mit Immundefekt, n = 10

	$CD4^+$-T-Lymphozyten n=10 (%)	$CD8^+$-T-Lymphozyten n=10 (%)	CD4/CD8 Ratio n=10	DN-T-Lymphozyten n=10 (%)	sFasL n=9 (ng/ml)	sFas n=9 (ng/ml)
Median	54,12	36,70	1,48	5,09	0,20	2,47
Mittelwert	49,72	43,25	1,54	5,10	0,48	2,42
Standardabweichung	18,68	19,28	1,04	2,74	0,60	0,80
Maximalwert	75,59	89,45	3,94	11,67	2,10	4,35
Minimalwert	8,59	19,19	0,10	1,56	0,10	1,35

Kontrollen, n= 9

	$CD4^+$-T-Lymphozyten n=9 (%)	$CD8^+$-T-Lymphozyten n=9 (%)	CD4/CD8 Ratio n=9	DN-T-Lymphozyten n=9 (%)
Median	56,36	37,21	1,51	4,85
Mittelwert	57,66	36,29	1,63	4,54
Standardabweichung	4,67	4,24	0,34	1,88
Maximalwert	65,69	42,80	2,29	8,36
Minimalwert	50,52	28,64	1,25	1,67

3.2. Allgemeines zu den untersuchten Proben

Es wurden im Zeitraum zwischen November 1997 und Juni 1998 insgesamt 38 Vollblutproben untersucht. Diese gliederten sich in 29 Proben von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und 9 Kontrollproben von gesunden Freiwilligen, die für die angeforderten Routineuntersuchungen gewonnen wurden und als Referenzwerte für die Lymphozytenbestimmung dienten.
Der prozentuale Anteil der DN-T-Lymphozyten an allen T-Lymphozyten wurde von allen 38 Proben (Patientenproben und Kontrollproben) bestimmt. Die Messung von sFas und sFasL erfolgte nur von Patientenproben. Bei drei Patientenproben war nach der DN-T-Zellbestimmung keine ausreichende Plasmamenge zur weiteren Untersuchung übrig, so dass die sFas Spiegel bei 26 von 29 Patientenproben bestimmt wurden.
Bei einem Patienten war die Plasmamenge nur noch für die Messung von sFasL ausreichend, die insgesamt bei 27 von 29 Patienten durchgeführt wurde.

Im Folgenden werden die in Tabelle 7 dargestellten Daten beschrieben.

3.3. CD4 und CD8 positive Lymphozyten

In der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt zeigte sich ein signifikant ($p=0,044$) niedrigerer prozentualer Anteil an $CD8^+$-T-Lymphozyten (31,92%) als bei den Kontrollen (36,29%). In der Patientengruppe mit Immundefekt fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten, jedoch zeigten die Patienten mit Immundefekt nicht unerwartet eine viel breitere Streuung von CD4 und CD8 positiven Lymphozyten (CD4 von 8,59% bis 75,59%; CD8 von 19,19% bis 89,45%). Im Gegensatz dazu lag die prozentuale Verteilung der CD4 und CD8 positiven Lymphozyten bei den Patienten ohne Immundefekt ähnlich verteilt wie bei den Kontrollen (CD4 von 50,52% bis 65,69%; CD8 von 28,64% bis 42,80%).

3.4. $CD4^-CD8^-CD3^+$ Doppelt Negative T-Lymphozyten (DN-T-Lymphozyten)

In der Gruppe der Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt liegt der Mittelwert der DN-T-Lymphozyten (8,25%) signifikant ($p=0,047$) über dem Mittelwert der Kontrollen (4,54%). Es ließ sich kein signifikanter Unterschied im Mittelwert der DN-T-Lymphozyten zwischen der Gruppe von Patienten mit Immundefekt und den Kontrollen finden.

3.5. CD4/CD8 Ratio

Die CD4/CD8 Ratio wird durch Division des prozentualen Anteils der CD4 positiven Lymphozyten durch den prozentualen Anteil der CD8 positiven Lymphozyten bestimmt und liegt physiologisch bei Werten über eins. Ein Wert unter eins zeigt eine Umkehr der Verteilung von CD4-T-Lymphozyten und $CD8^+$-T-Lymphozyten an, wie sie zum Beispiel bei einem Immundefekt vorkommen kann.

In der Gruppe der Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt und bei den Kontrollen liegt der niedrigste Wert der CD4/CD8 Ratio bei 1,25, der Mittelwert bei 1,9 beziehungsweise 1,51. In der Gruppe von Patienten mit Immundefekt zeigten sich bei drei (30%) der untersuchten Proben pathologische Werte mit CD4/CD8 Verhältnissen <1,0.

3.6. sFasL

Der Median in der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt liegt bei 0,3 ng/ml und unterscheidet sich stark vom Mittelwert von 0,74 ng/ml. Man findet eine große Spannweite der Werte von 0,1 ng/ml bis 7 ng/ml. Ähnliches kann man in der Gruppe von Patienten mit Immundefekt beobachten, der Unterschied zwischen Mittelwert 0,48 ng/ml und Median 0,2 ng/ml ist ebenfalls hoch. Auch hier zeigt sich eine große Streuung der Werte von 0,1 ng/ml bis 2,1 ng/ml.

3.7. sFas

In der Gruppe der Patienten ohne Immundefekt liegt sowohl der Mittelwert (1,81 ± 0,53 ng/ml) als auch der Median (1,65 ng/ml) signifikant (p=0,039) unter dem Median (2,47 ng/ml) und Mittelwert (2,42 ± 0,80 ng/ml) der Gruppe mit Immundefekt.

3.8. Verhältnis DN-T-Lymphozyten zu sFasL

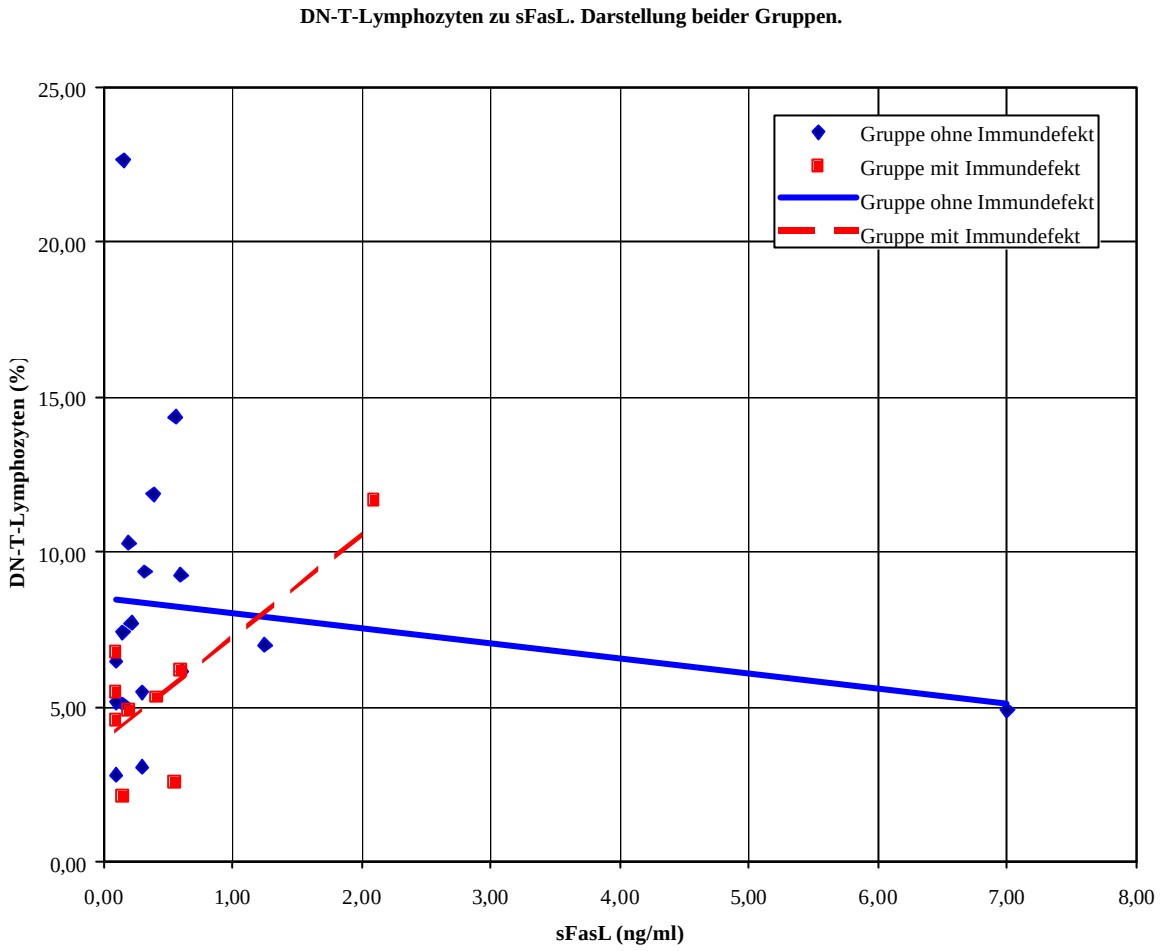

Abbildung 12. Gegenüberstellung von DN-T-Lymphozyten und sFasL Spiegeln. Es wurden Trendlinien eingefügt.

In der Abbildung 12 wurde der prozentuale Anteil der DN-T-Lymphozyten an allen Lymphozyten zu den sFasL Titern in Verhältnis gesetzt. Deutlich ist zu erkennen, dass der Anteil an DN-T-Lymphozyten in der Gruppe ohne Immundefekt bei mehreren Patienten über 10% aller T-Lymphozyten liegt. Anhand der eingefügten Trendlinien kann die signifikante Korrelation (Korrelation nach Pearson =0,779; p=0,013) zwischen sFasL und DN-T-Lymphozyten in der Gruppe mit Immundefekt optisch nachvollzogen werden.

Es muss jedoch angemerkt werden, dass die Korrelation von einem extremen Wert (2,1 ng/ml; 11,67%) stark abhängig ist, was auf die geringe Fallzahl zurückzuführen ist.

3.9. Verhältnis DN-T-Lymphozyten zu sFas

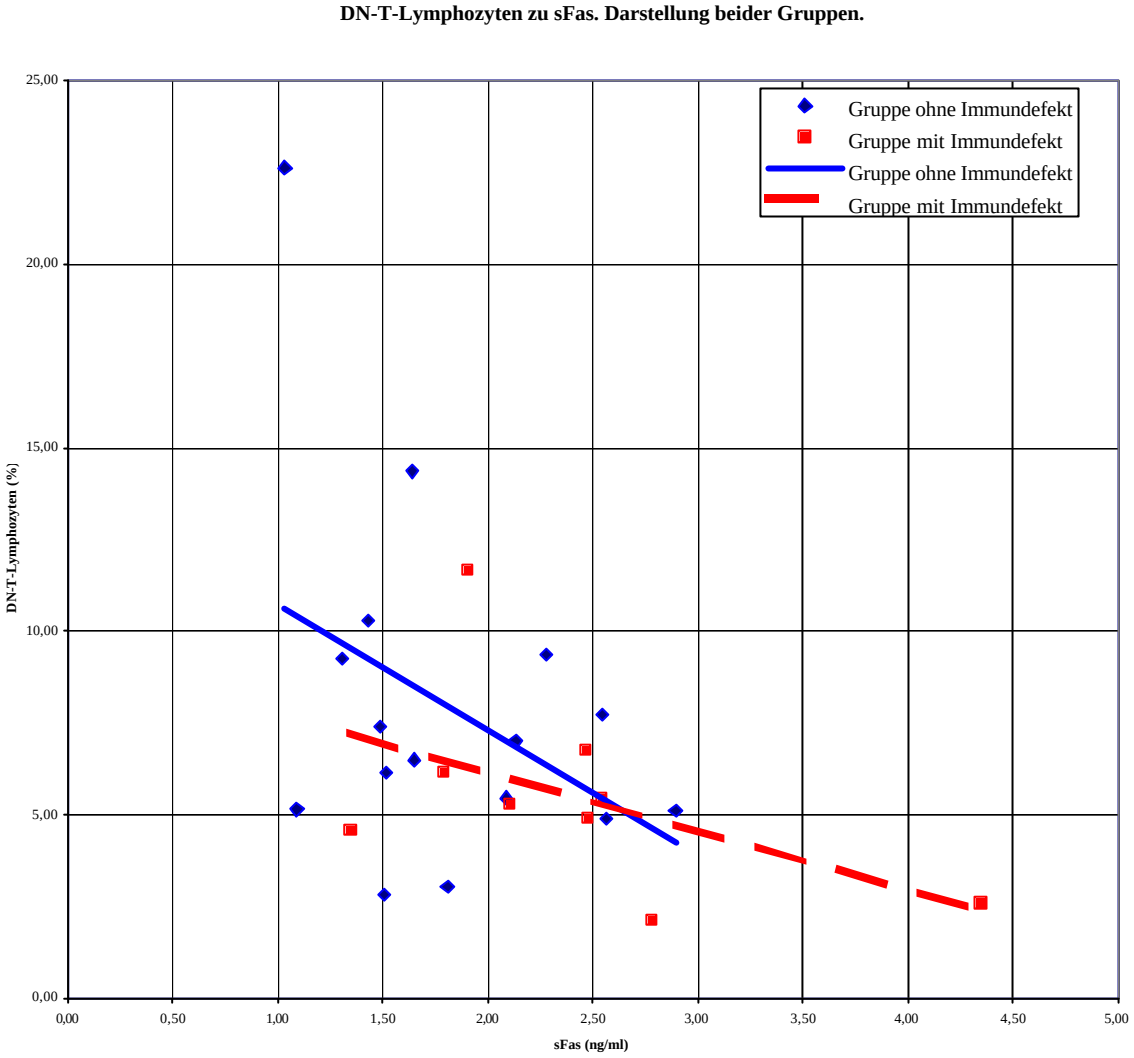

Abbildung 13. Gegenüberstellung von DN-T-Lymphozyten und sFas Spiegeln. Es wurden Trendlinien eingefügt.

In der Abbildung 13 wurden die sFas Titer gegen den prozentualen Anteil an DN-T-Lymphozyten von allen T-Lymphozyten aufgetragen. Erkennbar ist, dass die sFas Spiegel bei allen Patienten (mit und ohne Immundefekt) enger zusammenliegen als die sFasL Werte in Abbildung 12. Man erkennt anhand der Trendlinien, dass niedrige DN-T-Zell Zahlen mit höheren sFas Spiegeln einhergehen. Man erhält eine signifikante Korrelation (Korrelation nach Pearson =–0,446; p=0,025), wenn man beide Patientengruppen zusammenfasst (Nicht graphisch dargestellt).

3.10. Verhältnis sFasL zu sFas

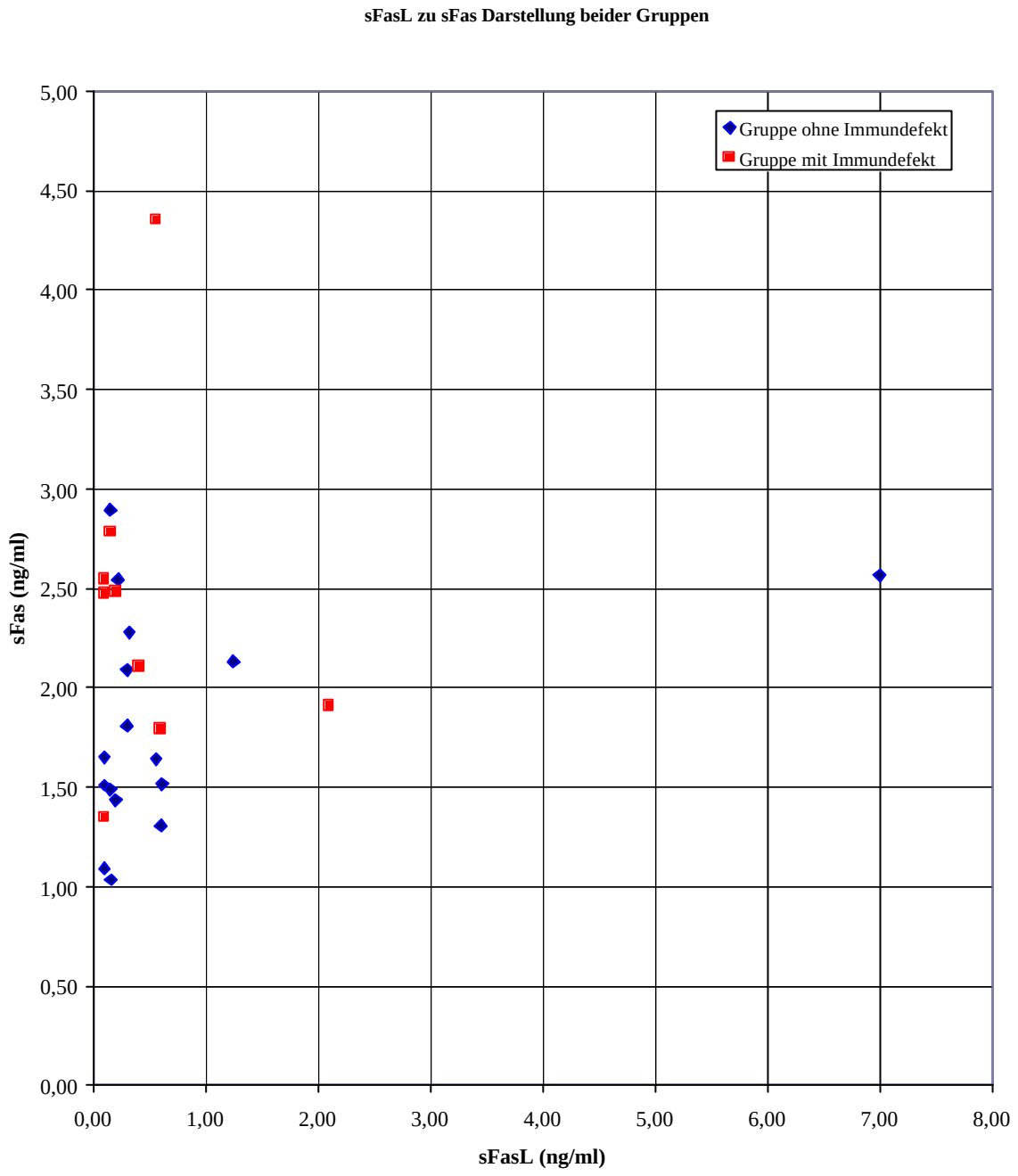

Abbildung 14. Gegenüberstellung von sFasL und sFas Spiegeln.

In der Abbildung 14 wurden die sFas Spiegel den sFasL Spiegeln gegenübergestellt. Man kann keine Korrelation beider Werte erkennen.

4. Diskussion

Es wurden in dieser Arbeit bei 29 Patienten mit rezidivierenden Infektionen der prozentuale Anteil an doppelt negativen T-Lymphozyten ($CD4^-CD8^-CD3^+$-DN-T-Lymphozyten) von allen T-Lymphozyten, sowie die Spiegel der Plasmaproteine sFas und sFasL bestimmt.
DN-T-Lymphozyten besitzen an ihrer Zelloberfläche als funktionelle Einheit einen T-Zell-Rezeptor (TCR) und das CD3-Oberflächenprotein, jedoch weder das CD4 oder das CD8 Oberflächenprotein, welche wichtig für den Zell-Zell-Kontakt und die Signaltransduktion zwischen Lymphozyten und anderen Zellen sind. Je nach Art des TCR können sie in γδTCR-DN-T-Lymphozyten oder αβTCR-DN-T-Lymphozyten unterschieden werden. Die αβTCR-DN-T-Lymphozyten entstehen sekundär durch Verlust der Oberflächenproteine nach Aktivierung. Aktivierte T-Lymphozyten und αβTCR-DN-T-Lymphozyten werden physiologisch durch Apoptose abgetötet. γδTCR-DN-T-Lymphozyten werden vermutlich ebenfalls durch Apoptose abgetötet, jedoch ist hierbei noch unklar, ob dies bestimmte Umstände fördern (zum Beispiel Aktivierung wie bei αβTCR-DN-T-Lymphozyten). Nur die αβTCR-Lymphozyten haben in ihrem Leben ein CD4 oder CD8 Oberflächenprotein exprimiert und waren zu dem Zeitpunkt entweder Helfer- oder Killerzelle. Die γδTCR-Lymphozyten reifen schon im Thymus als DN-T-Zellen heran.

Apoptose kann durch verschiedene Systeme in der Zelle aktiviert werden. Das Oberflächenprotein Fas ist ein sehr wichtiger Aktivator der Apoptose [Kagi et al., 1994]. Nach Kontakt mit dem membranständigen Liganden FasL löst es in der Zelle, von der es getragen wird, Apoptose aus. In der löslichen Form kann es jedoch die Apoptose hemmen, da es den Fas Liganden (FasL) binden kann, bevor er membranständiges Fas aktivieren kann [Cheng et al., 1994; Knipping et al., 1995; Tanaka et al., 1996]. Löslicher Fas Ligand kann über eine Bindung an membranständiges Fas Apoptose induzieren, jedoch hat es eine schwächere induzierende Wirkung als membranständiger Fas Ligand, kann also Apoptose induzieren und hemmen [Nagata, 1997; Suda et al., 1997; Suda et al., 1995; Suda et al., 1993; Watanabe-Fukunaga et al., 1992]. Durch die apoptosehemmende Wirkung von sFas und sFasL können diese bei erhöhten Spiegeln zu einer Anreicherung von DN-T-Lymphozyten führen, die eigentlich durch Apoptose abgetötet würden [Cheng et al., 1994].

Infektionen führen zu Abwehrreaktionen des Körpers, und damit unter anderem zur Aktivierung von T-Lymphozyten [Croft, 1994].
Daher ist es denkbar, dass man bei Patienten mit rezidivierenden häufigen Infektionen unter Umständen vermehrt aktivierte T-Lymphozyten nachweisen kann. Nach Erfüllung ihrer Aufgabe werden sie wahrscheinlich zu DN-T-Lymphozyten und gehen irgendwann in Apoptose. γδ-DN-T-

Lymphozyten haben anscheinend eine Aufgabe bei der raschen frühen Antigenelimination. Auch wenn sie noch nicht ausreichend erforscht sind, ist es zumindest denkbar, dass auch der Anteil an γδ-DN-T-Lymphozyten bei rezidivierenden Infektionen steigt.

Da Veränderungen von Leukozyten generell bei Infektionen keine seltene Beobachtung sind, und sowohl der Anteil an αβ-DN-T-Lymphozyten als auch der Anteil an γδ-Lymphozyten bei Patienten mit rezidivierenden Infektionen erhöht sein könnte, erschien es interessant bei dieser in der Kinderheilkunde sehr häufigen Patientengruppe, die Verteilung von $CD4^+$, $CD8^+$ und doppelt negativen T-Zellen zu untersuchen.
Als sich herausstellte, dass es tatsächlich signifikante Unterschiede zwischen den Patienten und den Kontrollen gab, führten wir angeregt durch Arbeiten von Canale und Smith, Kellerer und Mutz, Cheng et al. und Drappa et al., [Canale und Smith, 1967; Kellerer und Mutz, 1976; Cheng et al., 1994; Drappa et al., 1996;] noch weitere Untersuchungen, diesmal der apoptosemodulierenden Plasmaproteine sFas und sFasL durch.

Bei der Auswertung wurden 29 untersuchte Patienten, die an rezidivierenden Infektionen litten, in zwei Gruppen unterteilt, die sich durch das Vorhandensein beziehungsweise Nichtvorhandensein eines bekannten Immundefektes unterschieden, da bei Patienten mit Immundefekt die rezidivierenden Infektionen im Zusammenhang mit den verschiedenen Immundefekten stehen.
Die Patientenzahl lag in der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und Immundefekt bei 10 Patienten und in der Patientengruppe ohne Immundefekt bei 19 Patienten.
Es wurden die untersuchten Parameter (Anteil an CD8 positiven, CD4 positiven und doppelt negativen Zellen, sFas und sFasL) innerhalb der Gruppen und mit gesunden Kontrollen verglichen. Für sFas und sFasL wurden keine Spiegel bei gesunden Kontrollen bestimmt.

Der prozentuale Anteil der DN-T-Lymphozyten lag in der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt signifikant über dem der gesunden Kontrollen. Gleichzeitig fand sich jedoch ein im Vergleich zu den Kontrollen signifikant niedrigerer Anteil an $CD8^+$-T-Lymphozyten. Anscheinend zeigt dies einen Shift von $CD8^+$-T-Lymphozyten zugunsten von DN-T-Zellen an. Dies könnte auf einen verstärkten Deaktivierungsprozess durch Verlust der CD8-Oberflächenproteine hindeuten, zum Beispiel als Antwort auf eine vorrausgegangene infektionsbedingte vermehrte Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen, oder Ausdruck einer vermehrten Produktion von γδTCR-DN-T-Zellen sein.
In dieser Arbeit konnte durch den Testansatz jedoch keine Unterscheidung zwischen αβTCR- und γδTCR-DN-T-Lymphozyten gemacht werden.

Eine Untersuchung zur Differenzierung der TCR kann Ziel folgender Arbeiten sein.
Warum diese Beobachtung nicht bei der Patientengruppe mit Immundefekt auftrat, lässt sich zumindest hypothetisch so erklären, dass die Kinder ohne Immundefekt, aufgrund des intakten Immunsystems eine stärkere Antwort auf die Infektion ausbilden, mit einer Erhöhung der DN-T-Lymphozyten Fraktion, als die Kinder, bei denen die Immunantwort aufgrund des Immundefektes schwächer ausfällt.

Der sFas Spiegel unterschied sich signifikant zwischen beiden Patientengruppen. Die Gruppe mit Immundefekt zeigte einen signifikant höheren sFas Spiegel als die Gruppe von Patienten ohne Immundefekt.
Im Vergleich mit Werten von gesunden Probanden von anderen Autoren (2,26 ± 0,63 ng/ml; 155 Kontrollen [Seishima et al., 1996]; 2,3 ± 0,1 ng/ml; 62 Kontrollen [Nishigaki et al., 1997]; 2,6 ng/ml ± 0,1; 22 Kontrollen [Yasuda et al., 1998]) lag eher die Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und mit Immundefekt (Median 2,47 ng/ml; Mittelwert 2,42 ± 0,80 ng/ml) in einem vergleichbaren Bereich.
Geht man davon aus, dass der sFas Spiegel in der Patientengruppe ohne Immundefekt erniedrigt ist, erscheint die Antwort auf die Frage nach der Ursache schwierig. Insbesondere da in der Literatur vor allem erhöhte sFas Spiegel bei verschiedenen Erkrankungen beschrieben wurden. Wie oben schon erwähnt, lag in der Gruppe von Patienten ohne Immundefekt neben dem, verglichen mit der Gruppe von Patienten mit Immundefekt, niedrigen sFas Spiegel auch ein gegenüber den Kontrollen signifikant erhöhter DN-T-Lymphozyten Anteil vor. Möglich ist, dass bei einem erhöhten Anteil an DN-T-Lymphozyten niedrige sFas Spiegel die Apoptose stimulieren sollen, um wieder eine normale Verteilung der Lymphozyten zu erreichen. Unterstützen lässt sich diese These durch den Befund, dass sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem Anteil der DN-T-Lymphozyten und dem sFas Spiegel aufzeigen lässt, wenn man die Gruppe mit Immundefekt und die Gruppe ohne Immundefekt zusammenfasst (Kapitel 3.9, Abbildung 13).
Eine ähnliche Hypothese wurde von Hoshimoto et al. aufgestellt. Diese Arbeitsgruppe fand bei schwangeren Frauen im ersten Trimester eine signifikante Erniedrigung der sFas Spiegel [Hoshimoto et al., 2001]. Es wurde angenommen, dass eine Stimulation der Apoptose der Lymphozyten den Föten vor einer immunologischen Abstoßungsreaktion schützen soll.

Andererseits muss berücksichtigt werden, dass die verschiedenen Autoren jeweils unterschiedliche Test Kits verwendet haben. So erscheint es immerhin möglich, dass der in der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt gefundene durchschnittliche sFas Spiegel im Bereich des Normalniveaus für den hier verwendeten Test Kit liegt, somit also

der durchschnittliche sFas Spiegel der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und mit Immundefekt erhöht ist.
In diesem Fall wäre ein Gedankenansatz, den Zusammenhang der sFas Erhöhung mit dem Vorliegen eines Immundefektes zu begründen, da veränderte sFas Werte von anderen Autoren bei verschiedenen immunologischen Erkrankungen beschrieben wurden (siehe unten). Jedoch ist die Beantwortung der Frage nach der Interpretation und ob und inwieweit dies Ausdruck von Apoptosemodulation darstellt, aufgrund der Komplexität der Apoptosewege nur ungenügend möglich.

Zur Veranschaulichung der Bedeutung von sFas bei verschiedenen immunologischen Erkrankungen sind im Folgenden Daten aus anderen Studien beschrieben.

- Yasuda et al. fanden erhöhte sFas Spiegel bei Patienten mit schwerer COPD (chronic obstructive pulmonary disease; chronische obstruktive Lungenerkrankung) [Yasuda et al., 1998]. Die Autoren postulieren, dass die apoptosehemmende Wirkung von sFas vor allem die das Lungengewebe infiltrierenden T-Lymphozyten vor Apoptose schützt. Sie beziehen sich auf die Beobachtung, dass man bei Patienten mit schwerer COPD neben den erhöhten sFas Spiegeln auch vermehrt T-Lymphozyten im Lungengewebe gefunden hat [O'Shaughnessy et al., 1997], die man für die Hyperreagibilität des Bronchialsystems bei COPD mitverantwortlich macht. Bei leichter COPD konnten keine Unterschiede des sFas Spiegels zu gesunden Kontrollen aufgezeigt werden, daher vermuten Yasuda et al., dass sFas als Marker für die Schwere der Erkrankung verwendet werden könnte.
- Auch bei Non-Hodgkin-Lymphomen wurde eine Korrelation zwischen erhöhten sFas Spiegeln und Überlebensdauer der Patienten, mit kürzerer Überlebensdauer bei höheren sFas Spiegeln gefunden [Hara et al., 2000]. Die Autoren vermuten, dass die erhöhten sFas Spiegel das Überleben der Tumorzellen durch Apoptosehemmung steigern, und dadurch die Korrelation sich erklären lässt. Ob sFas bei dieser Erkrankung von Lymphomzellen produziert wird, ist unklar.
- Bei Patienten mit chronischer kongestiver Herzinsuffizienz wurden im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöhte sFas Spiegel gemessen [Nishigaki et al., 1997]. Auch hier korrelierte die Schwere der Erkrankung mit der Höhe des sFas Spiegels. Apoptose spielt anscheinend bei der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz eine Rolle, da Myozyten im Rahmen der Erkrankung durch Apoptose absterben [Narula et al., 1996; Sharov et al., 1996]. Der erhöhte sFas Spiegel könnte auf einen Versuch des Körpers hinweisen, der Apoptose der Myozyten bei Herzinsuffizienz entgegenzuwirken.
- sFas und sFasL scheinen eine wichtige Rolle bei Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel SLE [Cheng et al., 1994; Nozawa et al., 1997] zu spielen. Die Vermutung, dass die Fas vermittel-

te Apoptose eine große Bedeutung bei SLE habe, wird insbesondere auf die Beobachtung von SLE ähnlichen Symptomen (Nachweis von antinukleären Antikörpern, Rheumafaktor und zirkulierenden Immunkomplexen, Hypergammaglobulinämie, Arthritis, Glomerulonephritis) bei Mäusen mit einem Fas Gendefekt gestützt [Watanabe-Fukunaga et al., 1992]. Als Ursache wird ein Fehler in der negativen Selektion von selbstreaktiven T-Lymphozyten vermutet [Matsumoto et al., 1991; Zhou et al., 1991]. Den Zusammenhang zwischen sFas und sFasL und SLE beim Menschen konnten Nozawa et al. aufzeigen. Sie fanden erhöhte sFas und/oder sFasL Spiegel bei Patienten mit verschiedenen rheumatischen Erkrankungen (SLE, rheumatoide Arthritis, systemische Sklerose, Polymyositis, Dermatomyositis, Sharp Syndrom, Sjögren´s Syndrom) [Nozawa et al., 1997]. Vor allem bei Patienten mit SLE konnten erhöhte sFas und sFasL Spiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollen gefunden werden, die häufig nach Beginn einer Steroidtherapie sanken. Auch konnte die Beobachtung gemacht werden, dass die Patienten, die erhöhte sFas Spiegel zeigten, erhöhte sFasL Spiegel hatten. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch aufgrund der Komplexität des Krankheitsbildes derzeit noch nicht geklärt.

- Auch die Rolle von sFas und sFasL bei ITP ist derzeit noch nicht geklärt, jedoch haben Yoshimura et al. bei einigen Patienten die an einer ITP erkrankt waren, erhöhte sFas (17 von 54 Patienten; 32%) und auch sFasL (11 von 57 Patienten; 20%) Spiegel gefunden [Yoshimura et al., 2000]. Sie vermuten einen Zusammenhang der Plasmaproteine mit der Pathogenese der Erkrankung, jedoch können auch sie die Beobachtungen bisher nicht in ein Gesamtbild einpassen.
- Ein Zusammenhang zwischen erhöhten sFas Spiegeln und der Infektion mit Escherichia coli (Stamm:O157:H7) wurden von Masri et al. beschrieben. Vor allem bei Patienten, die ein hämolytisch urämisches Syndrom entwickeln, tritt dieses Phänomen stärker hervor. Die Bedeutung dieser Beobachtung ist jedoch ebenfalls noch unklar [Masri et al., 2000]

Die sFasL Spiegel lagen in beiden Patientengruppen mit dem Median (0,3 beziehungsweise 0,2 ng/ml) niedriger als Werte, die bei gesunden Kontrollen in mehreren Arbeitsgruppen gefunden wurden (0,56 ± 0,02 ng/ml; 22 Kontrollen [Yasuda et al., 1998], beziehungsweise 0,43 ± 0,01 ng/ml; 62 Kontrollen [Nishigaki et al., 1997]), jedoch erscheint es möglich, dass die Normwerte des in dieser Arbeit verwendeten ELISA Testkits niedriger liegen können, als bei anderen Testsätzen. Der Median wurde aufgrund der großen Streuung der Werte herangezogen. Ein signifikanter Unterschied des sFasL Spiegels zwischen beiden Gruppen lag nicht vor.

Bei einem Patienten ergab sich ein sFasL Spiegel von über 7 ng/ml, die übrigen immunologischen Werte lagen bei diesem Patienten im Normbereich. Ob dies ein wahrer Wert oder zum Beispiel auf eine Verunreinigung zurückzuführen ist, lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, jedoch erscheint eine Fehlbestimmung durchaus möglich.

Die folgenden Daten anderer Autoren sind aufgeführt um darzustellen, inwiefern der Körper sFasL einsetzt, um, wie es scheint, sich eher vor Apoptose zu schützen, als Apoptose auszulösen.

- Mizutani et al. fanden bei Patienten mit Harnblasenkarzinom höhere sFasL Spiegel als bei gesunden Kontrollen, und auch einen Zusammenhang des sFasL Spiegels mit der Tumorprogression mit steigenden Spiegeln bei Progression [Mizutani et al., 2001]. Auch der sFas Spiegel korrelierte signifikant invers mit der Überlebensrate [Mizutani et al., 1998] bei Blasenkarzinom. Es scheint, dass die Tumorzellen sich durch die apoptosehemmende Wirkung beider Plasmaproteine vor dem Zelltod durch Apoptose schützen. Diese These wird von der Beobachtung unterstützt, dass bestimmte Tumorzellen zum Teil eine große Anzahl von membranständigem FasL exprimieren, um so aktivierte T-Lymphozyten, die membranständiges Fas exprimieren, abzutöten, während sie den Tumor angreifen [Hahne et al., 1996; O'Connell et al., 1996]. Diese Beobachtung hat man mit dem englischen Begriff „counterattack model“
- Bei infektiösen Erkrankungen wird Fas vermittelte Apoptose vom Körper zur Elimination von erkrankten Zellen eingesetzt. Jedoch findet man auch Krankheitserreger die Apoptose als Waffe einsetzen. Bei der Malaria findet man in der akuten Erkrankungsphase eine vermehrte Apoptose peripherer mononukleärer Zellen [Balde et al., 1995], die von den Plasmodien selbst induziert wird [Toure-Balde et al., 1996]. Man vermutet, dass der bei Malaria bekannte T-Lymphozyten Abfall auf dieser plasmodieninduzierten Apoptose beruht. Da Kern et al. auch erhöhte sFasL Spiegel bei Patienten während der akuten Erkrankungsphase fanden, vermuten sie, dass der Körper die apoptosehemmende Wirkung von sFasL benutzt, um den Verlust der T-Lymphozyten durch Apoptose einzuschränken [Kern et al., 2000].

Es wurde eine statistisch signifikante negative Korrelation zwischen DN-T-Lymphozyten und sFas gefunden, nachdem beide Patientengruppen zur Auswertung zusammengefasst wurden.
Dies bedeutet, dass ein relativ hoher Anteil an DN-T-Zellen mit einem relativ niedrigem Spiegel von apoptosehemmenden sFas einhergeht und umgekehrt.
Wenn man davon ausgeht, dass DN-T-Zellen aus aktivierten T-Lymphozyten entstehen, die ihre CD4 oder CD8 Oberflächenproteine herunterreguliert haben um sich auf den Zelltod durch Apoptose vorzubereiten, kann man die hier gefundenen Daten so interpretieren, dass der Körper einen Anstieg des DN-T-Zell Anteils durch Apoptosehemmung mit sFas nicht noch fördern will.
Dass eine Verknüpfung zwischen Fas und DN-T-Zellen besteht, geht aus den Daten von Canale und Smith sowie Drappa et al. hervor [Canale und Smith, 1967; Drappa et al., 1996].

Das von Canale und Smith erstbeschriebene Canale-Smith-Syndroms zeichnet sich durch die Symptome Lymphadenopathie, Hepatosplenomegalie und Volumenminderung der lymphatischen Organe während infektiösen Erkrankungen aus [Canale und Smith, 1967]. Hämatologisch finden sich regelmäßig ein erhöhten Anteil an $CD4^-CD8^-CD3^+$ doppelt negativen T-Lymphozyten (DN-T-Lymphozyten).
Die Pathogenese der Symptome beruht anscheinend darauf, dass lymphatische Zellen und Gewebe, die durch Apoptose abgetötet werden sollten, aufgrund des Apoptosedefektes nicht absterben, sondern sich im lymphatischen Gewebe wie Lymphknoten oder Milz anreichern. Da es noch andere von Fas unabhängige Mechanismen gibt, die Apoptose verursachen können (zum Beispiel Perforin-Granzym B vermittelte Apoptose), die zum Beispiel bei Infektionen vermehrt aktiviert werden, lässt sich die Abschwellung des lymphatischen Gewebes während Infektionen erklären. Die DN-T-Lymphozyten scheinen aus einfach positiven T-Lymphozyten ($CD4^+$ oder $CD8^+$) zu stammen, die nach ihrer Aktivierung ihre CD4 oder CD8 Oberflächenproteine herunterregulieren, um sich auf die Apoptose vorzubereiten [Drappa et al., 1996].

Der Zusammenhang zwischen den Symptomen des Canale-Smith-Syndroms (CSS) und einem Defekt im Fas Rezeptor Gen wurde von Drappa et al. bei 4 Patienten aufgezeigt, die die Symptome des CSS zeigten [Drappa et al., 1996]
Der Ausfall von Fas führt zu einem Defekt der Apoptose, der letztlich zumindest einige der Symptome erklärt.

In der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und mit Immundefekt wurde eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen sFasL und dem prozentualen Anteil von DN-T-Lymphozyten gefunden.
Eine mögliche Hypothese hierfür wäre, dass ein hoher Anteil an DN-T-Lymphozyten die Produktion von löslichem Fas Ligand anregt, der die Induktion der Apoptose der DN-T-Lymphozyten unterstützen soll. Andererseits besitzt sFasL scheinbar auch eine apoptosehemmende Wirkung. Es lässt sich nur schwer erklären, dass eine Zusammenfassung beider Patientengruppen keine signifikante Korrelation von DN-T-Lymphozyten und sFasL zeigt.
Anzumerken ist auch, dass die dargestellte positive Korrelation von DN-T-Zellen und sFasL recht stark an einem (maximalen) Wert hängt. Die Ursache hierfür muss in der geringen Fallzahl in der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und mit Immundefekt gesucht werden.

Die Interpretation der in dieser Arbeit gewonnenen Beobachtungen gestaltet sich sehr schwierig, auch aufgrund der inhomogenen Untersuchungspopulation, die jedoch bewusst gewählt wurde, um

sich ein grobes, aber daher noch unscharfes Bild zu verschaffen, über die bisher im Zusammenhang mit rezidivierenden Infektionen noch nicht untersuchten Parameter doppelt-negative T-Zellen und die apoptosemodulierende Faktoren sFas und sFasL .

Eventuell lassen sich hieraus in Folgearbeiten neue Erkenntnisse –zum Beispiel ein weiterer, neuer Infektionsparameter– aus dem Gebiet der Apoptoseforschung finden.

5. Zusammenfassung

Es wurden 29 Patienten untersucht, die sich wegen häufigen Infektionen im Dr. von Haunerschen Kinderspital vorstellten, 10 davon mit einem bekannten Immundefekt. Hierbei wurde die prozentuale Verteilung von CD4-, CD8-positiven und doppelt negativen T-Lymphozyten bestimmt.

Bei den doppelt negativen T-Lymphozyten (DN-T-Lymphozyten) handelt es sich um eine besondere Untergruppe die doppelt negativ heißen, da sie weder das CD4- noch das CD8-Oberflächenprotein tragen. Bis zu 5% aller T-Lymphozyten sind physiologisch doppelt negativ. Eine gängige Hypothese ist, dass DN-T-Zellen ihre CD4 und CD8 Oberflächenproteine von der Zelloberfläche entfernt haben, um sich auf Apoptose vorzubereiten. Andererseits werden DN-T-Zellen auch direkt im Thymus gebildet.

Ebenfalls bestimmt wurden die Plasmaspiegel der Plasmaproteine sFas und sFasL.
Hierbei handelt es sich um die löslichen Pendants zu den Zelloberflächenproteinen Fas und Fas Ligand (FasL). Membranständiges Fas gibt ein Apoptosesignal in die Zelle ab, wenn es in Kontakt mit FasL kommt, welches den Zelltod einleitet. Lösliches sFas hingegen hemmt Apoptose, indem es den Fas Liganden blockiert.
sFasL kann zwar auch an Fas ein Apoptosesignal auslösen, jedoch ist seine Wirkung schwächer als von membranständigem FasL, so dass es gleichzeitig eine kompetitiv hemmende Wirkung besitzt.
Zusammenhänge einer prozentualen Vermehrung von doppelt-negativen T-Zellen und sFas wurden in anderen Arbeiten beschrieben.

In der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt lag der prozentuale Anteil an DN-T-Zellen signifikant über dem der gesunden Kontrollen. Gleichzeitig fand sich ein signifikant geringerer Anteil an $CD8^+$-T-Lymphozyten bei dieser Patientengruppe. Dies könnte entweder auf einen verstärkten Deaktivierungsprozess durch Verlust der CD8-Oberflächenproteine hindeuten – zum Beispiel als Antwort auf eine vorrausgegangene infektionsbedingte vermehrte Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen –, oder Ausdruck einer vermehrten Reifung von DN-T-Zellen im Thymus sein.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Mittelwertes von sFas beim Vergleich beider Patientengruppen. In der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und mit Immundefekt lag der sFas Spiegel signifikant über dem sFas Spiegel der Patientengruppe ohne Immundefekt. In der Literatur wurden bei den verschiedensten immunologischen Erkrankungen veränderte sFas

Spiegel berichtet. Die meisten Autoren vermuten eine vorwiegend apoptosehemmende Wirkung durch die erhöhten sFas Spiegel. Die hier gefundenen Werte könnten ebenfalls Ausdruck einer Apoptosemodulation sein, wobei die niedrigeren sFas Spiegel der Patienten ohne Immundefekt auf eine indirekte Aktivierung der Apoptose hindeuten.

Die sFasL Spiegel lagen in beiden Patientengruppen niedriger als Werte, die bei gesunden Kontrollen in mehreren Arbeitsgruppen gefunden wurden, ein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen fand sich nicht.

Nach Zusammenfassung beider Patientengruppen fanden sich in dieser Arbeit Hinweise für eine in der Literatur vorbeschriebene Abhängigkeit von sFas und DN-T-Lymphozyten. Hier jedoch korrelierten niedrige sFas Spiegel mit einem höherem Anteil an DN-T-Lymphozyten, während in der Literatur nach Injektion von sFas bei Mäusen eine Erhöhung von DN-T-Lymphozyten gefunden wurde . Ein Interpretationsversuch der in dieser Arbeit gewonnenen Daten lautet, dass der Körper durch eine Erniedrigung des Spiegels von apoptosehemmenden sFas einen Anstieg des Anteils an DN-T-Zellen nicht noch begünstigen will.

Hinweise für eine Abhängigkeit von sFasL und DN-T-Lymphozyten wurde in der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und mit Immundefekt gefunden, die darauf hindeuten, dass ein hoher Anteil an DN-T-Zellen mit einem relativ hohem sFasL Spiegel einhergeht. Als Hypothese wurde angeführt, dass ein hoher DN-T-Zell Anteil die Produktion von löslichem Fas Liganden anregt, der die Induktion von Apoptose der DN-T-Lymphozyten unterstützen soll.

Zusammenfassend fand sich in dieser Arbeit, dass

- die Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen aber ohne Immundefekt einen signifikant erhöhter Anteil an DN-T-Lymphozyten, bei gleichzeitig erniedrigten Anteil an $CD8^+$-T-Lymphozyten gegenüber gesunden Kontrollen zeigte.
- der prozentuale Anteil an DN-T-Lymphozyten negativ mit dem sFas Spiegel korrelierte.
- der prozentuale Anteil an DN-T-Lymphozyten positiv mit dem sFasL Spiegel in der Gruppe von Patienten mit rezidivierenden Infektionen und mit Immundefekt korrelierte.
- der sFas Spiegel in der Patientengruppe mit Immundefekt signifikant über dem Spiegel der Patientengruppe ohne Immundefekt lag.
- sFasL sich nicht zwischen beiden Patientengruppen unterschied.

6. Literaturverzeichnis

Adachi M, Suematsu S, Kondo T, Ogasawara J, Tanaka T, Yoshida N, Nagata S; Targeted mutation in the Fas gene causes hyperplasia in peripheral lymphoid organs and liver. Nat Genet, 1995;11:294-300.

Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, Salvesen G, Thornberry NA, Wong WW, Yuan J; Human ICE/CED-3 protease nomenclature. Cell, 1996;87:171.

Atkinson EA, Bleackley RC; Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. Crit Rev Immunol, 1995;15:359-384.

Balde AT, Sarthou JL, Roussilhon C; Acute Plasmodium falciparum infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. Immunol Lett, 1995;46:59-62.

Bank I, DePinho RA, Brenner MB, Cassimeris J, Alt FW, Chess L; A functional T3 molecule associated with a novel heterodimer on the surface of immature human thymocytes. Nature, 1986;322:179-181.

Berke G; Unlocking the secrets of CTL and NK cells. Immunol Today, 1995;16:343-346.

Bjorkman PJ, Burmeister WP; Structures of two classes of MHC molecules elucidated: crucial differences and similarities. Curr Opin Struct Biol, 1994;4:852-856.

Blackman M, Kappler J, Marrack P; The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. Science, 1990;248:1335-1341.

Bluestone JA, Khattri R, Sciammas R, Sperling AI; TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system. Annu Rev Cell Dev Biol, 1995;11:307-353.

Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D; A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. J Biol Chem, 1995;270:7795-7798.

Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL, Smith JA, Owen FL, Seidman JG, Ip S, Rosen F, Krangel MS; Identification of a putative second T-cell receptor. Nature, 1986;322:145-149.

Brojatsch J, Naughton J, Rolls MM, Zingler K, Young JA; CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. Cell, 1996;87:845-855.

Canale VC, Smith CH; Chronic lymphadenopathy simulating malignant lymphoma. J Pediatr, 1967;70:891-899.

Carbone AM, Marrack P, Kappler JW; Demethylated CD8 gene in CD4+ T cells suggests that CD4+ cells develop from CD8+ precursors. Science, 1988;242:1174-1176.

Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD; Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. Science, 1994;263:1759-1762.

Chien YH, Jores R, Crowley MP; Recognition by gamma/delta T cells. Annu Rev Immunol, 1996;14:511-532.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM; FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. Cell, 1995;81:505-512.

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Yu GL, Lyons RH, Garg M, Duan DR, Xing L, Gentz R, Ni J, Dixit VM; Signal transduction by DR3, a death domain-containing receptor related to TNFR-1 and CD95. Science, 1996;274:990-992.

Cohen PL, Eisenberg RA; Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. Annu Rev Immunol, 1991;9:243-269.

Constant P, Davodeau F, Peyrat MA, Poquet Y, Puzo G, Bonneville M, Fournie JJ; Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. Science, 1994;264:267-270.

Craig RW; The bcl-2 gene family. Semin Cancer Biol, 1995;6:35-43.

Croft M; Activation of naive, memory and effector T cells. Curr Opin Immunol, 1994;6:431-437.

Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC; Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. Nature, 1995;377:446-448.

Dhein J, Daniel PT, Trauth BC, Oehm A, Moller P, Krammer PH; Induction of apoptosis by monoclonal antibody anti-APO-1 class switch variants is dependent on cross-linking of APO-1 cell surface antigens. J Immunol, 1992;149:3166-3173.

Drappa J, Vaishnaw AK, Sullivan KE, Chu JL, Elkon KB; Fas gene mutations in the Canale-Smith syndrome, an inherited lymphoproliferative disorder associated with autoimmunity. N Engl J Med, 1996;335:1643-1649.

Enari M, Hug H, Nagata S; Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. Nature, 1995;375:78-81.

Enari M, Talanian RV, Wong WW, Nagata S; Sequential activation of ICE-like and CPP32-like proteases during Fas-mediated apoptosis. Nature, 1996;380:723-726.

Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H; Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. Nature, 1995;373:255-257.

Fowlkes BJ, Schwartz RH, Pardoll DM; Deletion of self-reactive thymocytes occurs at a CD4+8+ precursor stage. Nature, 1988;334:620-623.

Fowlkes BJ, Schweighoffer E; Positive selection of T cells. Curr Opin Immunol, 1995;7:188-195.

Garcia KC, Teyton L; T-cell receptor peptide-MHC interactions: biological lessons from structural studies. Curr Opin Biotechnol, 1998;9:338-343.

Griffiths G; The cell biology of CTL killing. Curr Opin Immunol, 1995;7:343-348.

Gruss HJ, Dower SK; Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. Blood, 1995;85:3378-3404.

Haas W, Pereira P, Tonegawa S; Gamma/delta cells. Annu Rev Immunol, 1993;11:637-685.

Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J; Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. Science, 1996;274:1363-1366.

Hara T, Tsurumi H, Takemura M, Goto H, Yamada T, Sawada M, Takahashi T, Moriwaki H; Serum-soluble fas level determines clinical symptoms and outcome of patients with aggressive non-Hodgkin's lymphoma. Am J Hematol, 2000;64:257-261.

Henkart PA, Sitkovsky MV; Cytotoxic lymphocytes. Two ways to kill target cells. Curr Biol, 1994;4:923-925.

Hiromatsu K, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Ohga S, Muramori K, Matsumoto K, Bluestone JA, Nomoto K; A protective role of gamma/delta T cells in primary infection with Listeria monocytogenes in mice. J Exp Med, 1992;175:49-56.

Hogquist KA, Jameson SC, Bevan MJ; The ligand for positive selection of T lymphocytes in the thymus. Curr Opin Immunol, 1994;6:273-278.

Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR; T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. Cell, 1994;76:17-27.

Hoshimoto K, Hayashi M, Ohkura T; Plasma levels of soluble fas during normal pregnancy. Gynecol Obstet Invest, 2001;51:96-98.

Huang B, Eberstadt M, Olejniczak ET, Meadows RP, Fesik SW; NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. Nature, 1996;384:638-641.

Irmler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A, Solari R, Tschopp J; Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. J Exp Med, 1995;181:1917-1922.

Itoh N, Nagata S; A novel protein domain required for apoptosis. Mutational analysis of human Fas antigen. J Biol Chem, 1993;268:10932-10937.

Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Sameshima M, Hase A, Seto Y, Nagata S; The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell, 1991;66:233-243.

Iwashima M, Green A, Bonyhadi M, Davis MM, Allison JP, Chien YH; Expression of a fetal gamma delta T-cell receptor in adult mice triggers a non-MHC-linked form of selective depletion. Int Immunol, 1991;3:385-393.

Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H; Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature, 1994;369:31-37.

Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P; Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. Science, 1994;265:528-530.

Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H; Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. J Exp Med, 1995;182:1777-1783.

Kellerer K, Mutz I; (Chronic pseudomalignant immuneproliferation (Canale-Smith syndrome) (author's transl)). Eur J Pediatr, 1976;121:203-213.

Kern P, Dietrich M, Hemmer C, Wellinghausen N; Increased levels of soluble Fas ligand in serum in Plasmodium falciparum malaria. Infect Immun, 2000;68:3061-3063.

Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME; Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. Embo J, 1995;14:5579-5588.

Kitson J, Raven T, Jiang YP, Goeddel DV, Giles KM, Pun KT, Grinham CJ, Brown R, Farrow SN; A death-domain-containing receptor that mediates apoptosis. Nature, 1996;384:372-375.

Knipping E, Debatin KM, Stricker K, Heilig B, Eder A, Krammer PH; Identification of soluble APO-1 in supernatants of human B- and T-cell lines and increased serum levels in B- and T-cell leukemias. Blood, 1995;85:1562-1569.

Knipping E, Krammer PH, Onel KB, Lehman TJ, Mysler E, Elkon KB; Levels of soluble Fas/APO-1/CD95 in systemic lupus erythematosus and juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 1995;38:1735-1737.

Krammer PH, Behrmann I, Daniel P, Dhein J, Debatin KM; Regulation of apoptosis in the immune system. Curr Opin Immunol, 1994;6:279-289.

Kroemer G; Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. Cell Death Differ, 1997;4:443-456.

Kuby J, Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. Immunology. 4th ed. ed New York: W.H. Freeman and Company, 2000

Lanier LL, Federspiel NA, Ruitenberg JJ, Phillips JH, Allison JP, Littman D, Weiss A; The T cell antigen receptor complex expressed on normal peripheral blood CD4-, CD8- T lymphocytes. A CD3-associated disulfide-linked gamma chain heterodimer. J Exp Med, 1987;165:1076-1094.

Lanier LL, Serafini AT, Ruitenberg JJ, Cwirla S, Federspiel NA, Phillips JH, Allison JP, Weiss A; The gamma T-cell antigen receptor. J Clin Immunol, 1987;7:429-440.

Levitsky HI, Golumbek PT, Pardoll DM; The fate of CD4-8- T cell receptor-alpha beta+ thymocytes. J Immunol, 1991;146:1113-1117.

Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M; Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. Cell, 1996;87:565-576.

Los M, Van de Craen M, Penning LC, Schenk H, Westendorp M, Baeuerle PA, Droge W, Krammer PH, Fiers W, Schulze-Osthoff K; Requirement of an ICE/CED-3 protease for Fas/APO-1-mediated apoptosis. Nature, 1995;375:81-83.

Lowin B, Mattman C, Hahne M, Tschopp J; Comparison of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated cytotoxicity in primary T lymphocytes. Int Immunol, 1996;8:57-63.

Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR; Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. Immunol Today, 1995;16:569-574.

MacDonald HR, Hengartner H, Pedrazzini T; Intrathymic deletion of self-reactive cells prevented by neonatal anti-CD4 antibody treatment. Nature, 1988;335:174-176.

Marsters SA, Frutkin AD, Simpson NJ, Fendly BM, Ashkenazi A; Identification of cysteine-rich domains of the type 1 tumor necrosis factor receptor involved in ligand binding. J Biol Chem, 1992;267:5747-5750.

Masri C, Proulx F, Toledano B, Clermont MJ, Mariscalco MM, Seidman EG, Carcillo J; Soluble Fas and soluble Fas-ligand in children with Escherichia coli O157:H7-associated hemolytic uremic syndrome. Am J Kidney Dis, 2000;36:687-694.

Matsumoto K, Yoshikai Y, Asano T, Himeno K, Iwasaki A, Nomoto K; Defect in negative selection in lpr donor-derived T cells differentiating in non-lpr host thymus. J Exp Med, 1991;173:127-136.

Mizutani Y, Hongo F, Sato N, Ogawa O, Yoshida O, Miki T; Significance of serum soluble Fas ligand in patients with bladder carcinoma. Cancer, 2001;92:287-293.

Mizutani Y, Yoshida O, Bonavida B; Prognostic significance of soluble Fas in the serum of patients with bladder cancer. J Urol, 1998;160:571-576.

Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, Spear PG; Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. Cell, 1996;87:427-436.

Nagata S; Apoptosis by death factor. Cell, 1997;88:355-365.

Nagata S, Golstein P; The Fas death factor. Science, 1995;267:1449-1456.

Nakajima H, Park HL, Henkart PA; Synergistic roles of granzymes A and B in mediating target cell death by rat basophilic leukemia mast cell tumors also expressing cytolysin/perforin. J Exp Med, 1995;181:1037-1046.

Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo TG, Kolodgie FD, Hajjar RJ, Schmidt U, Semigran MJ, Dec GW, Khaw BA; Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. N Engl J Med, 1996;335:1182-1189.

Nishigaki K, Minatoguchi S, Seishima M, Asano K, Noda T, Yasuda N, Sano H, Kumada H, Takemura M, Noma A, Tanaka T, Watanabe S, Fujiwara H; Plasma Fas ligand, an inducer of apoptosis, and plasma soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, in patients with chronic congestive heart failure. J Am Coll Cardiol, 1997;29:1214-1220.

Nozawa K, Kayagaki N, Tokano Y, Yagita H, Okumura K, Hasimoto H; Soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic diseases. Arthritis Rheum, 1997;40:1126-1129.

O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F; The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. J Exp Med, 1996;184:1075-1082.

Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al.; Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen. J Biol Chem, 1992;267:10709-10715.

Ohga S, Yoshikai Y, Takeda Y, Hiromatsu K, Nomoto K; Sequential appearance of gamma/delta- and alpha/beta-bearing T cells in the peritoneal cavity during an i.p. infection with Listeria monocytogenes. Eur J Immunol, 1990;20:533-538.

Orlinick JR, Vaishnaw A, Elkon KB, Chao MV; Requirement of cysteine-rich repeats of the Fas receptor for binding by the Fas ligand. J Biol Chem, 1997;272:28889-28894.

Orlinick JR, Vaishnaw AK, Elkon KB; Structure and function of Fas/Fas ligand. Int Rev Immunol, 1999;18:293-308.

O'Shaughnessy TC, Ansari TW, Barnes NC, Jeffery PK; Inflammation in bronchial biopsies of subjects with chronic bronchitis: inverse relationship of CD8+ T lymphocytes with FEV1. Am J Respir Crit Care Med, 1997;155:852-857.

Peitsch MC, Tschopp J; Granzyme B. Methods Enzymol, 1994;244:80-87.

Quan LT, Tewari M, O'Rourke K, Dixit V, Snipas SJ, Poirier GG, Ray C, Pickup DJ, Salvesen GS; Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996;93:1972-1976.

Rathmell JC, Townsend SE, Xu JC, Flavell RA, Goodnow CC; Expansion or elimination of B cells in vivo: dual roles for CD40- and Fas (CD95)-ligands modulated by the B cell antigen receptor. Cell, 1996;87:319-329.

Russell JH, Rush B, Weaver C, Wang R; Mature T cells of autoimmune lpr/lpr mice have a defect in antigen-stimulated suicide. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993;90:4409-4413.

Saito T; Negative regulation of T cell activation. Curr Opin Immunol, 1998;10:313-321.

Saito T, Watanabe N; Positive and negative thymocyte selection. Crit Rev Immunol, 1998;18:359-370.

Sakihama T, Smolyar A, Reinherz EL; Molecular recognition of antigen involves lattice formation between CD4, MHC class II and TCR molecules. Immunol Today, 1995;16:581-587.

Schild H, Mavaddat N, Litzenberger C, Ehrich EW, Davis MM, Bluestone JA, Matis L, Draper RK, Chien YH; The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. Cell, 1994;76:29-37.

Schlessinger J, Ullrich A; Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. Neuron, 1992;9:383-391.

Schoel B, Sprenger S, Kaufmann SH; Phosphate is essential for stimulation of V gamma 9V delta 2 T lymphocytes by mycobacterial low molecular weight ligand. Eur J Immunol, 1994;24:1886-1892.

Schroter M, Lowin B, Borner C, Tschopp J; Regulation of Fas(Apo-1/CD95)- and perforin-mediated lytic pathways of primary cytotoxic T lymphocytes by the protooncogene bcl-2. Eur J Immunol, 1995;25:3509-3513.

Sciammas R, Johnson RM, Sperling AI, Brady W, Linsley PS, Spear PG, Fitch FW, Bluestone JA; Unique antigen recognition by a herpesvirus-specific TCR-gamma delta cell. J Immunol, 1994;152:5392-5397.

Seishima M, Takemura M, Saito K, Sano H, Minatoguchi S, Fujiwara H, Hachiya T, Noma A; Highly sensitive ELISA for soluble Fas in serum: increased soluble Fas in the elderly. Clin Chem, 1996;42:1911-1914.

Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S; Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. Am J Pathol, 1996;148:141-149.

Singer GG, Abbas AK; The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. Immunity, 1994;1:365-371.

Singer GG, Carrera AC, Marshak-Rothstein A, Martinez C, Abbas AK; Apoptosis, Fas and systemic autoimmunity: the MRL-lpr/lpr model. Curr Opin Immunol, 1994;6:913-920.

Smith CA, Farrah T, Goodwin RG; The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell, 1994;76:959-962.

Smyth MJ, Trapani JA; Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. Immunol Today, 1995;16:202-206.

Sneller MC, Straus SE, Jaffe ES, Jaffe JS, Fleisher TA, Stetler-Stevenson M, Strober W; A novel lymphoproliferative/autoimmune syndrome resembling murine lpr/gld disease. J Clin Invest, 1992;90:334-341.

Sprent J, Webb SR; Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. Curr Opin Immunol, 1995;7:196-205.

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S; Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. J Exp Med, 1997;186:2045-2050.

Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S, Nakao K, Nagata S; Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. J Immunol, 1995;154:3806-3813.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S; Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. Cell, 1993;75:1169-1178.

Suzuki I, Fink PJ; Maximal proliferation of cytotoxic T lymphocytes requires reverse signaling through Fas ligand. J Exp Med, 1998;187:123-128.

Tanaka M, Suda T, Haze K, Nakamura N, Sato K, Kimura F, Motoyoshi K, Mizuki M, Tagawa S, Ohga S, Hatake K, Drummond AH, Nagata S; Fas ligand in human serum. Nat Med, 1996;2:317-322.

Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S; Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. Embo J, 1995;14:1129-1135.

Tanaka Y, Morita CT, Nieves E, Brenner MB, Bloom BR; Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells. Nature, 1995;375:155-158.

Tanaka Y, Sano S, Nieves E, De Libero G, Rosa D, Modlin RL, Brenner MB, Bloom BR, Morita CT; Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994;91:8175-8179.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV; A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. Cell, 1993;74:845-853.

Tewari M, Dixit VM; Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. J Biol Chem, 1995;270:3255-3260.

Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinl E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J; Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. Nature, 1997;386:517-521.

Thompson CB; Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science, 1995;267:1456-1462.

Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al.; A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. Nature, 1992;356:768-774.

Toure-Balde A, Sarthou JL, Aribot G, Michel P, Trape JF, Rogier C, Roussilhon C; Plasmodium falciparum induces apoptosis in human mononuclear cells. Infect Immun, 1996;64:744-750.

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH; Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. Science, 1989;245:301-305.

Vaux DL, Haecker G, Strasser A; An evolutionary perspective on apoptosis. Cell, 1994;76:777-779.

Vignaux F, Golstein P; Fas-based lymphocyte-mediated cytotoxicity against syngeneic activated lymphocytes: a regulatory pathway? Eur J Immunol, 1994;24:923-927.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S; Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. Nature, 1992;356:314-317.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S; The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. J Immunol, 1992;148:1274-1279.

Weintraub BC, Jackson MR, Hedrick SM; Gamma delta T cells can recognize nonclassical MHC in the absence of conventional antigenic peptides. J Immunol, 1994;153:3051-3058.

Welcher AA, Bitler CM, Radeke MJ, Shooter EM; Nerve growth factor binding domain of the nerve growth factor receptor. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991;88:159-163.

Williams GT, Smith CA; Molecular regulation of apoptosis: genetic controls on cell death. Cell, 1993;74:777-779.

Wilson IA, Garcia KC; T-cell receptor structure and TCR complexes. Curr Opin Struct Biol, 1997;7:839-848.

Yan H, Chao MV; Disruption of cysteine-rich repeats of the p75 nerve growth factor receptor leads to loss of ligand binding. J Biol Chem, 1991;266:12099-12104.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ; Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. Cell, 1995;80:285-291.

Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D; Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. Cell, 1997;89:1067-1076.

Yasuda N, Gotoh K, Minatoguchi S, Asano K, Nishigaki K, Nomura M, Ohno A, Watanabe M, Sano H, Kumada H, Sawa T, Fujiwara H; An increase of soluble Fas, an inhibitor of apoptosis, associated with progression of COPD. Respir Med, 1998;92:993-999.

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M; A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. J Exp Med, 1989;169:1747-1756.

Yoshimura C, Nomura S, Nagahama M, Ozaki Y, Kagawa H, Fukuhara S; Plasma-soluble Fas (APO-1, CD95) and soluble Fas ligand in immune thrombocytopenic purpura. Eur J Haematol, 2000;64:219-224.

Zamoyska R; CD4 and CD8: modulators of T-cell receptor recognition of antigen and of immune responses? Curr Opin Immunol, 1998;10:82-87.

Zhou T, Bluethmann H, Eldridge J, Brockhaus M, Berry K, Mountz JD; Abnormal thymocyte development and production of autoreactive T cells in T cell receptor transgenic autoimmune mice. J Immunol, 1991;147:466-474.

7. Quellen der Abbildungen

Abbildungen 1-9:
Kuby J GRA, Kindt T J, Osborne B A,. Immunology. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2000

Abbildungen 10 und 11:
Internet: URL: http://biochem.roche.com/apoptosis/sciinf01.htm

8. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosin Diphosphat.
AIF	apoptosis inducing factor; Apoptose induzierender Faktor.
APC	antigen presenting cell; Antigen präsentierende Zelle.
CAR	cytopathic avian leukosis sarcoma virus receptor; Rezeptor für das zytopathischen leukämisches Sarkom Virus der Vögel.
CD	Cluster of differentiation; Einteilung zur Unterscheidung von Proteinen.
CED-3	Bezeichnung für ein Gen, welches für eine Cystein Protease codiert, die für den Apoptoseweg wichtig ist.
COPD	chronic obstructive pulmonary disease; chronische obstruktive Lungenerkrankung)
CRD	cystein rich domain; Cystein reiche Domäne.
CSS	Canale-Smith-Syndrom
CTL	cytotoxic T lymphocyte; zytotoxischer T-Lymphozyt.
DAXX	Fas death domain associated protein; Fas Todesdomänen assoziiertes Protein. Die XX lassen Platz für später noch zu definierende Untergruppen dieses Proteins.
DED	death effektor domain; Todes Effektor Domäne.
DISC	death inducing signaling complex; Tod induzierender Signalkomplex.
DN-T- Lymphozyt	doppelt negativer T-Lymphozyt ($CD4^-CD8^-CD3^+$).
ELISA	enzyme linked immunsorbent assay; Enzymabhängiger Immunbindungstest; immunologische Bestimmung biologisch aktiver Substanzen in Körperflüssigkeiten.
FADD	Fas associated protein with death domain; Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne.
FITC	Fluorescein Isothyocyanate; grün fluoreszierender Farbstoff.
FLICE	FADD-like ICE (siehe unter ICE, FADD) entspricht Caspase 8.
FLIP	FLICE inhibiting protein (siehe unter FLICE); FLICE hemmendes Protein.
gld	Generalised lymphoproliferative disease; generalisierte lymphoproliferative Erkrankung.
GM-CSF	Granulocyte-makrophage colony-stimulating-factor; Faktor der die Bildung von Granulozyten und Makrophagen Kolonien stimuliert.
H_2O_2	Wasserstoff-Superoxid.
HVEM	herpes virus early mediator; früher Mediator des Herpes Virus.
ICE	interleukin-1β-converting enzyme; Enzym zur Aktivierung von Interleukin-1β aus einer Vorstufe.
IFN-γ	Interferon γ.

JNK	c-Jun N-terminal kinase; Apoptose vermittelndes Enzym.
lpr	lymphoproliferative; Lymphoproliferation.
MACH	MORT-1 associated CED-3 homologue; MORT-1 assoziiertes CED-3 Homolog (siehe CED-3, MORT-1).
MHC	major histocompatibility complex. Haupthistokompatibilitätskomplex.
MORT-1	Name einer DED (siehe DED).
NGF	nerve growth factor, Nervenwachstumsfaktor.
NK Zelle	natural killer (cell); natürliche Killerzelle, kann selbstständig Zellen abtöten.
PARP	poly-ADP ribose polymerase.
PE	Phycoerythrin; gelb-orange fluoreszierender Farbstoff.
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein; blau-grün fluoreszierender Farbstoff.
RAIDD	RIP-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain; RIP assoziierte ICH-1/CED-3 homologes Protein mit einer Todesdomäne (siehe RIP, ICH-1, CED-3).
RIP	receptor interactin protein; Protein, das mit den Todesdomänen des Fas-Rezeptor interagiert.
sFas	soluble Fas; löslicher Fas Rezeptor.
sFasL	soluble Fas Ligand; löslicher Fas Ligand.
SLE	systemischer Lupus erythematodes.
TCR	T cell receptor; T Zell Rezeptor.
TGF-β	tumor growth factor β; Tumorwachstumsfaktor β.
TMB	Tetramethylbenzidine.
TNF	tumor necrosis factor; Tumornekrosefaktor.
TNFR	tumor necrosis factor receptor; Rezeptor für den Tumornekrosefaktor.
TRADD	TNFR1 associating protein with death domain; TNFR assoziiertes Protein mit einer Todesdomäne (siehe TNFR).
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand; TNF verbundener Apoptose induzierender Ligand (siehe TNF).

9. Danksagung

Großen Dank möchte ich dem Leiter des Zytokinlabors im Dr. von Haunerschen Kinderspital und meinem Doktorvater PD Dr. med. Michael Weiß für seine hervorragende Betreuung und Förderung, sowie für die weitläufigen Einblicke in die immunologische Forschung, aussprechen.

Herzlichen Dank an Professor Dr. med. Bernd Belohradsky, dem Leiter der Abteilung für Infektiologie und Immunologie im Dr. von Haunerschen Kinderspital und an alle Mitarbeiter dieser Abteilung, die mich bei der Umsetzung dieser Arbeit unterstützt haben.

Vielen Dank an meine liebe Lebensgefährtin Sara Amir Oreja, für die starke tatkräftige und emotionale Unterstützung bei dieser Arbeit.

10. Curriculum vitae

	Christian Renner *26.04.1973 in München
	Familienstand: ledig
	Medizinische Ausbildung
1994-2000	Studium der Human-Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
03/1996	Physikum
03/1997	Erstes Staatsexamen
11/1998	Beginn der Dissertation am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Universität München unter der Leitung von PD Dr. med. Michael Weiß
03/1999	Zweites Staatsexamen
04/2000	Drittes Staatsexamen
	Famulatur
08/1997	Kinderchirurgie (KIC 3), Dr. von Haunersches Kinderspital, München
09/1997	Pädiatrie (Intern 1), Dr. von Haunersches Kinderspital, München
10/1997	Praxis für Innere Medizin, Dr. med. Hans Melderis, Hamburg
03/1998	Pathologie, Städtisches Krankenhaus, Schwabing, München
08/1998-09/1998	Neurologie, University of Rochester, NY, USA
	Praktisches Jahr
04/1999-07/1999	Innere Medizin, Kantonsspital Chur, CH
08/1999-11/1999	Chirurgie (Neurochirurgie, Plastische und Rekonstruktive Chirurgie), University of Stellenbosch, Capetown, SA
12/1999-03/2000	Pädiatrie, pädiatrische Intensivpflege Station, Dr. von Haunersches Kinderspital, München
	Ärztliche Tätigkeit
5/2000-10/2001	Arzt im Praktikum, Dr. von Haunersches Kinderspital München, Pädiatrie
11/2001-11/2002	Assistenzarzt, Kreiskrankenhaus Wasserburg, Chirurgie
	Schulische Ausbildung
1979-1992	Grundschule und Gymnasium Herterich-Grundschule (München), Günter-Stöhr-Gymnasium (München), Wittelsbacher-Gymnasium (München), allgemeine Hochschulreife