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

Direktor: Professor Dr. med. D. Reinhardt

Häufigkeit von AV24^{+}-CD161^{+} NKT-Zellen und AV24-AJ18-TZR-Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern

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

vorgelegt von
Nikolaos Konstantopoulos
aus
Erlenbach/Main
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. W. Zimmermann Priv. Doz. Dr. med. C. Buske
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. S. Krauss-Etschmann
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	26. 01 2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Seite

1 EINLEITUNG 1
1.1 Immunpathophysiologie der allergischen Krankheiten 1
1.1.1 Geschichte 1
1.1.2 IgE vermittelte Hypersensibilitätsreaktion 1
1.2 Die physiologische Rolle der T-Zellen 1
1.2.1 Ausreifung der T-Zellen 2
1.2.2 $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten 2
1.2.3 TH1/TH2 2
1.3 Der T-Zell-Rezeptor 3
1.3.1 Struktur 3
1.3.2 Funktion 4
1.3.3 Umordnung 4
1.3.4 N-Region 4
1.4 NKT-Zellen 5
1.4.1 Struktur 5
1.4.2 Funktion 6
1.4.3 Umordnung 9
2 ZIELSETZUNG 11
2.1 Fragestellungen 11
2.1.1 Zelluläre Ebene 11
2.1.2 Molekulare Ebene 11
2.1.3 Klinische Anwendung 11
3 PATIENTEN UND MATERIAL 12
3.1 Patientenauswahl 12
3.2 Geräte 13
3.3 Plastik- und Glasmaterial 14
3.4 Verbrauchsmaterial 14
3.4.1 Chemikalien & Ausgangsstoffe 14
3.4.2 Enzyme 15
3.4.3 Oligonukleotide 15
3.4.4 Sonstige Nukleinsäuren 16

3.4.5 Eschericia coli Stamm 16
3.4.6 Antikörper 17
3.4.7 Lösungen, Puffer und Medien 17
4 METHODEN 19
4.1 Probandencharakterisierung 19
4.2 Phänotypisierung von peripherem Blut mittels Durchflusszytometrie 20
4.2.1 Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern 20
4.2.2 Analyse mit Hilfe eines Durchflußzytometers 20
4.3 Methoden der Molekularbiologie 24
4.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Vollblut mit saurem Phenol 24
4.3.2 c-DNA Synthese 24
4.3.3 Präparative AV24-TZRα PCR 25
4.3.4 DNA-Reinigung und -Fällung 26
4.3.5 Restriktionsverdau von DNA Fragment und Vektor(PBS II sk+) 26
4.3.6 Präparative DNA-Isolierung mittels DEAE-Zellulose 26
4.3.7 Ligation eines gewünschten Fragments 27
4.3.8 Herstellung transformationskompetenter Bakterien 27
4.3.9 Transformation von E.choli mittels Hitzeschock 27
4.3.10 AV24-AJ18- PCR von Plasmid-DNA 28
4.3.11 N-Region Analyse mittels Hybridisierungs-Proben 28
4.3.12 Kultivierung und Kryokonservierung von E.coli 29
4.3.13 Plasmid-DNA Präparation 29
4.3.14 Denaturierung von Plasmid-DNA 30
4.4 Statistische Auswertung 31
5 ERGEBNISSE 32
5.1 Phänotypische Charakterisierung von NKT Zellen 32
5.2 Molekularbiologische Untersuchungen 34
5.2.1 Häufigkeit von AV24-AJ18 in $AV24^+$ Klonen bei Atopikern und Nicht-Atopikern 35
5.2.2 N-Region Analyse 36
6 DISKUSSION 41
7 ZUSAMMENFASSUNG 48
7.1 Einleitung 48
7.2 Methoden 48

7.3 Ergebnisse 49
7.4 Schlussfolgeung 50
8 ANHANG 51
8.1 Literaturverzeichnis 51
8.2 Danksagung 60
8.3 Lebenslauf 62

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
AK	Antikörper
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CDR	Complementarity Determining Region
DN	Doppelt Negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Di-Natriumethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Isothyocyanat
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
FSC	Forward angle light scatter
H_2O	Wasser
IFN-γ	Interferon-γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKR-P	Natürlicher Killer Rezeptor Protein
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
RNA	Reoxyribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCC	Side angle light scatter
TH	T-Helper (Zelle)
TZR	T-Zell-Rezeptor

1 EINLEITUNG

1.1 Immunpathophysiologie der allergischen Krankheiten

1.1.1 Geschichte

Der Begriff Allergie wurde im Jahre 1911 ursprünglich von Clemens von Pirquet (Bukantz, 2002; Pirquet, 1906) als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“ definiert.
Heute definiert man Allergie als eine „Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem ansonsten harmlosen Antigen ausgelöst wird (Ring, 2005).
Die Allergie gehört zu einer Klasse von Immunreaktionen, die man als Hypersensibilität bezeichnet.

1.1.2 IgE vermittelte Hypersensibilitätsreaktion

Allergische Reaktionen treten auf, wenn ein Individuum, das auf den Kontakt mit einem Antigen oder Allergen IgE-Antikörper (IgE-AK) produziert hat, erneut mit demselben Allergen in Berührung kommt.
IgE-AK binden über den hochaffinen Fc_{ε}-Rezeptor an sich im Gewebe befindende Mastzellen (Ra et al., 1989), eosinophile Granulozyten (Gounni et al., 1994), neutrophile Granulozyten (Gounni et al., 2001) und an zirkulierende basophile Granulozyten (Kinet, 1999). Auf diese Weise werden diese Zellen gegenüber bestimmten Antigenen sensibilisiert. Bei entsprechender Exposition vermittelt die Antigenbindung eine Vernetzung der zellständigen IgE-AK und es resultiert eine Aktivierung von IgE-bindenden Mastzellen in dem betroffenen Gewebe, die eine für die Allergie charakteristische Reaktionskette auslöst.

1.2 Die physiologische Rolle der T-Zellen

Lymphozyten stammen von im Knochenmark gebildeten pluripotenten Stammzellen ab. Als Vorläuferzellen verlassen sie das Knochenmark, um in primären und sekundären lymphatischen Gewebe zu immunkompetenten B- oder T-Lymphozyten heranzureifen.

1.2.1 Ausreifung der T-Zellen

T-Lymphozyten erfahren ihre Reifung im Thymus. Die Einwanderung von Stammzellen in den Thymus geschieht nicht zufällig, sondern ist das Resultat von chemotaktischen Signalen, die periodisch vom Thymus freigesetzt werden.
Sie sind Hauptträger der zellulären Immunantwort und erkennen mittels ihres T-Zell-Rezeptors spezifische Antigene.

1.2.2 $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten

Reife Lymphozyten lassen sich in zwei Haupt-Populationen einordnen, die sog. $CD4^+$ T-Helferzellen und die $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen.
Die $CD4^+$ T-Helferzellen regen mit Hilfe von Zytokinen B-Zellen zur Proliferation und weiteren Differenzierung an und aktivieren zytotoxische T-Zellen. $CD8^+$ T-Zellen sind dagegen für die zytotoxische Aktivität verantwortlich und wirken hemmend auf B-Zellaktivität und T-Zell-Proliferation ein.

1.2.3 TH1/TH2

Naive $CD4^+$ T-Zellen können sich nach einer Aktivierung entweder zu einer TH1- oder TH2-Zelle entwickeln, die nach ihrer Stimulierung unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich daher in ihrer Funktion unterscheiden.
Die TH1-Zellen sind wesentlich verantwortlich für zytotoxische Immunreaktionen, die Abwehr von Tumorzellen, die Zytolyse von virusinfizierten Zellen. Hinzu spielen sie bei der Transplantatabstoßung eine wichtige Rolle und finden sich bei vielen Autoimmunprozessen wieder.
Im Gegensatz hierzu spielen die TH2-Zellen in der Vermittlung der allergischen Reaktion, der IgE- und IgA-Synthese und in der Abwehr von Parasiten eine entscheidende Rolle.
Beide Populationen unterscheiden sich aufgrund ihres Zytokinprofils. TH1-Zellen sezernieren IL-2 und IFN-γ, während TH2-Zellen durch die selektive Produktion von IL-4 und IL-10 charakterisiert sind.
Wie die Differenzierung der naiven $CD4^+$ T-Zellen gesteuert wird, weiß man nicht genau. Sie kann aber offensichtlich stark durch die Zytokine beeinflusst werden, die während der ersten proliferativen Phase naiver T-Zellen zugegen sind.
In Gegenwart von IL-12 und IFN-γ entwickeln sich erstmalig stimulierte $CD4^+$ T-Zellen meist zu TH1-Zellen. Dagegen neigen in Gegenwart von IL-4 aktivierte $CD4^+$

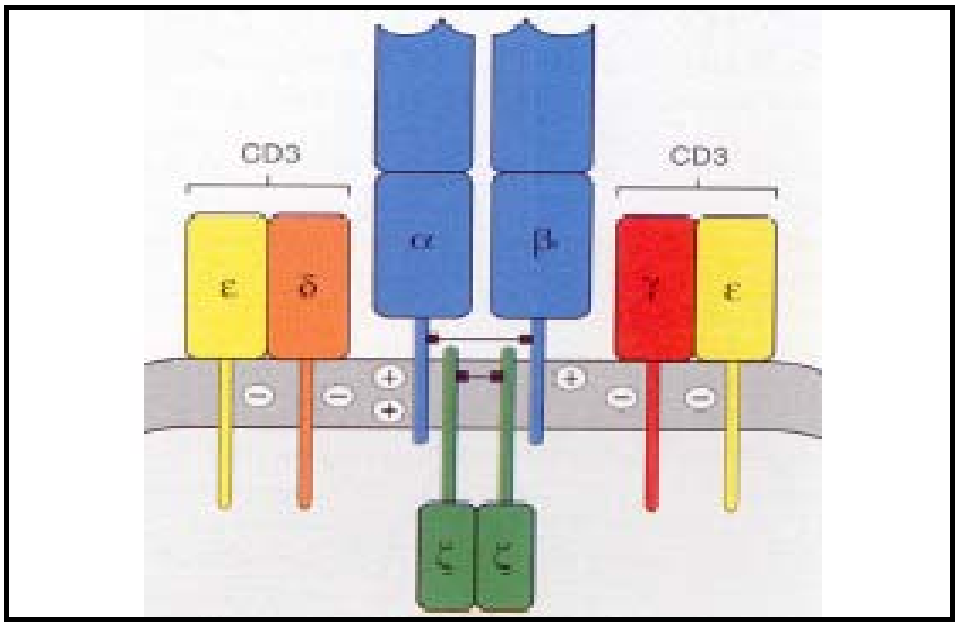
T-Zellen sich zu TH2-Zellen zu entwickeln, da IL-4 die Differenzierung zu TH2-Zellen fördert, während IL-4 die Bildung von TH1-Zellen hemmt. Das zur Bildung von TH2-Zellen benötigte IL-4 stammt möglicherweise aus einer spezialisierten Untergruppe von $CD4^+$ oder $CD4^-CD8^-$ (Doppelt Negative; DN) T-Zellen.

1.3 Der T-Zell-Rezeptor

1.3.1 Struktur

Die meisten T-Lymphozyten (90%) exprimieren αβ T-Zell-Rezeptoren (TZR). Der αβ TZR ist ein Heterodimer, das aus jeweils einer, über Disulfidbrücken verbundenen, α- und β-Kette besteht (Haskins et al., 1983; Meuer et al., 1983). Er sitzt an der Oberfläche der T-Zelle und ist assoziiert mit dem sog. CD3-Komplex, der aus vier Peptid-Ketten besteht (Abb. 1).

Abbildung 1: Signaltransduktion des TZR (Janeway, Jr., 2001)



Signaltransduktion des TZR bestehend aus: α-, β- und ζ-Kette; γ-, δ- und zweimal ε-Kette(CD3)

1.3.2 Funktion

Die T-Zell-Rezeptoren müssen imstande sein eine Vielfalt von fremden Antigenen zu erkennen. Der Umfang des TZR-Repertoires wird auf über 10^{15} verschiedene Spezifitäten geschätzt (Davis and Bjorkman, 1988). Verschiedene Faktoren führen zu dieser hohen Diversität der TZR: 1. Der Zusammenbau des Gens durch Kombination jeder V-Familie mit jedem J-Segment, 2. Die Flexibilität in der Position der Gen-Segmente, in der die Zusammenlagerung passiert 3. Die Kombination unterschiedlicher TZR α-Ketten mit β-Ketten und 4. Die große Vielfalt der N-Region.

1.3.3 Umordnung

Der TZR ist ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Kette mit jeweils einem konstanten und einem variablen Anteil, ähnlich den Immunglobulinen. Der variable Anteil der α-Kette besteht aus einem V- und einem J-Segment, bei der β-Kette ist noch ein D-Segment dazwischen geschaltet. Auf Keimbahnebene gibt es für die α-Kette etwa 70-80 V-Gene sowie ca. 60 J-Gene (Koop and Hood, 1994). V-Gensegmente, die eine Sequenzhomologie von mehr als 75% aufweisen, werden zu Gensegmentfamilien zusammengefasst (Arden et al., 1995). Bei konventionellen T-Zellen werden jeweils ein V- und ein J-Gen zusammengelagert. Dadurch ist eine hohe Rezeptorvielfalt zur Erkennung eines breiten Antigenspektrums gewährleistet.

1.3.4 N-Region

Ein weiterer Mechanismus zur Diversifizierung des TZR-Repertoires ist die ungenaue Verknüpfung der V-, (D-) und J-Segmente und das Einfügen von matrizenunabhängigen Nukleotiden. Während des Aneinanderfügens sind Exonukleasen aktiv, die von den einzelnen Bausteinen die Enden abspalten können. Zwei der drei hypervariablen Schleifen liegen innerhalb des V-Segmentes. Die dritte Schleife liegt in der Verknüpfungsstelle zwischen dem V- und dem J- Segment. In dieser sogenannten CDR3 erhöht sich die Vielfalt durch die Deletion und das Hinzufügen von P- bzw. N-Nukleotiden. P-Nukleotide umfassen palindrome (P) Sequenzen, die an den Enden der Gensegmente während der Rekombination durch die Aktivität von Endonukleasen entstehen.

Die N-Region besteht aus kleineren, palindromischen, nicht informativen Nukleotidsequenzen, die durch ein Enzym, die terminale Desoxynucleotidyl-

transferase (TdT), zufällig und matrizenunabhängig zwischen den V- und J-Gensegmenten eingefügt werden (Dellabona et al., 1994; Exley et al., 1997; Makino et al., 1993).

Die N-Addition beträgt in der Regel zwischen drei und sieben Nukleotiden bei einer Schwankungsbreite von null bis 24 Nukleotiden (Davodeau et al., 1997). Man kann bis heute nicht mit Sicherheit sagen, ob ein einziges, unterschiedliches Nukleotid den TZR so verändert, dass er ein anderes Antigen erkennt. Die N-Region entspricht der hypervariablen sog. „complementarity determining region 3“ (CDR3-Region) des TZR. Das entspricht die Region des TZR, die mit dem Antigen in unmittelbaren Kontakt tritt (Janeway, Jr., 1997).

1.4 NKT-Zellen

Natural Killer T-Zellen (NKT-Zellen) gehören zu einer lymphatischen Zell-Linie, die von konventionellen $\alpha\beta$ T-Zellen abstammt. Erstmals wurden sie im Jahr 1987 in Maus-Modellen von 2 verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben (Budd et al., 1987; Fowlkes et al., 1987). Die meisten Arbeitsgruppen beschäftigen sich mit Maus NKT-Zellen, da sie aus verschiedenen Organen isoliert werden können.

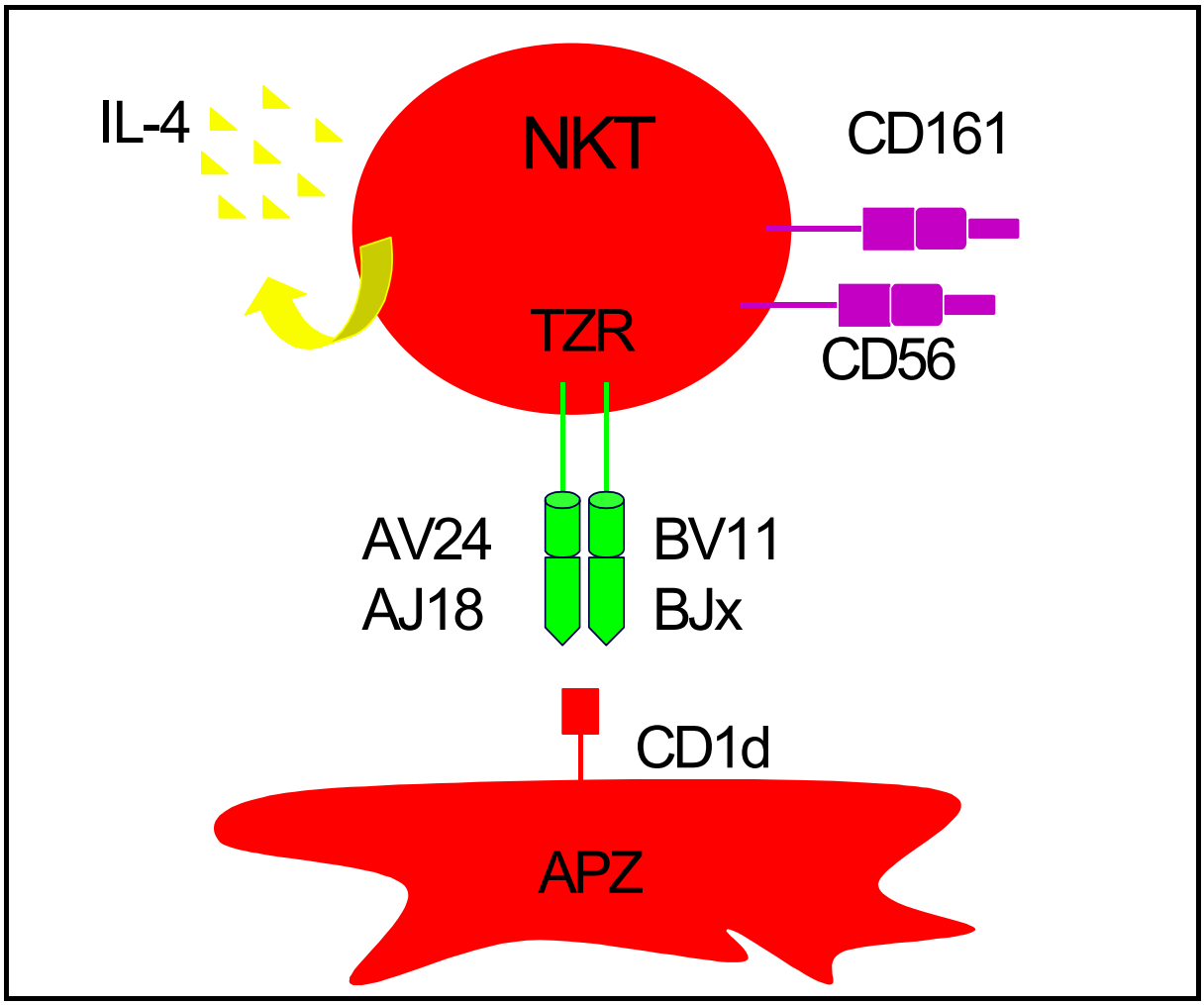
1.4.1 Struktur

NKT-Zellen sind CD3 positiv und werden in 3 Untergruppen ($CD4^+$, $CD8^+$ oder DN) verteilt. Sie werden durch zwei Charakteristika ihres Oberflächen-Phänotyps identifiziert.

1. Sie exprimieren an ihrer Oberfläche das CD161 (NKR-P1A) Antigen bzw. das homologe NK1.1 in der Maus. Dieser Oberflächenmarker ist sonst ausschließlich auf Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) zu finden. Die Ähnlichkeit dieser Subpopulationen führt zu der Behauptung, dass beide von einer früheren Population, die das NKR-P1A nicht exprimiert, abstammen. Zusätzlich werden weitere Marker exprimiert (CD122 und CD56) (Prussin and Foster, 1997), die ebenfalls am NK-Lokus kodiert sind. Andere klassische NK-Oberflächenproteine, wie CD16, CD94, CD57 oder die Kir-Proteine sind dagegen sehr selten oder überhaupt nicht vorhanden (Assarsson et al., 2000).

2. Es werden zusätzlich Marker exprimiert, die typisch für aktivierte Gedächtnis T-Zellen sind ($CD25^{high}$, $CD45RB^{low}$, $CD45RO^{high}$ und $CD62L^{low}$) (Davodeau et al., 1997; Prussin and Foster, 1997)(Abb. 2).

Abbildung 2: Struktur der NKT-Zellen



Oberflächenmarker von NKT-Zellen. Lila: NK-Marker, grün: T-Zell-Rezeptor

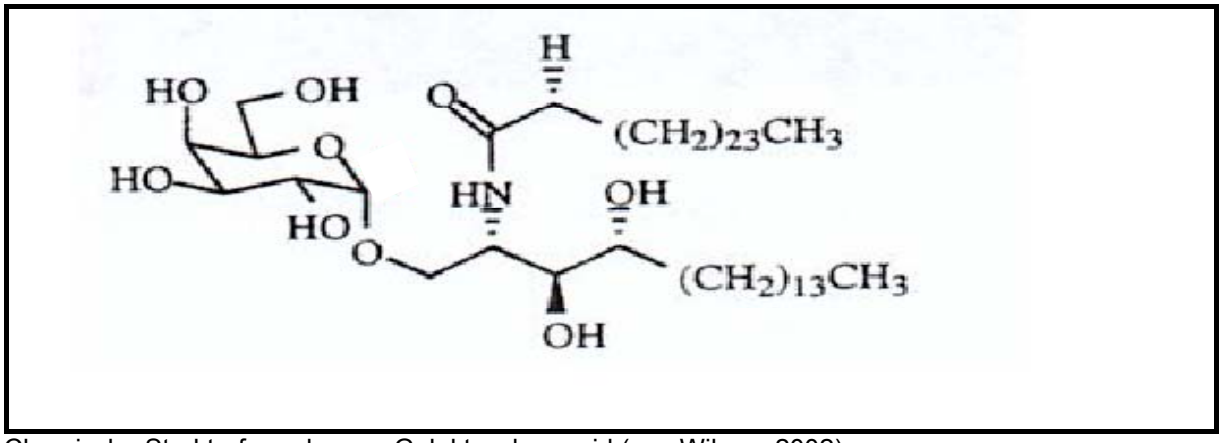
1.4.2 Funktion

Die NKT-Zellen unterscheiden sich von gewöhnlichen T-Zellen nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell. Die T-Zellrezeptoren (TZR) erkennen ihr jeweiliges MHC-Molekül via CDR1 und CDR2 und das darin gebundene Peptid via CDR3. Dagegen erkennen humane NKT-Zellen ihr Antigen nur, wenn es durch CD1b oder CD1c präsentiert wird (Brossay et al., 1998; Porcelli et al., 1992; Sieling et al., 1995). Während MHC-Moleküle hochpolymorph sind, handelt es sich bei CD1a-d um nicht-polymorphe Moleküle mit ähnlicher Zellverteilung wie MHCII. Eine Ausnahme ist CD1d, das auf intestinalem Epithel exprimiert wird (Porcelli and Modlin, 1999). Die intrazellulären Wege der Antigenverarbeitung scheinen ebenfalls anders zu sein, als bei MHC-gebundenen Peptiden (Sugita et al., 1996).

Die via CD1 präsentierten Antigene sind vor allem Lipide und Glykolipide (Beckman et al., 1994; Kawano et al., 1997; Prigozy et al., 1997) oder stark hydrophobe Peptide.

Obwohl der natürliche Ligand, der von CD1d präsentiert wird, noch nicht genau bekannt ist, wird in den meisten Studien das Modellantigen α-Galactosylceramide (α-GalCer) als Ersatz verwendet (Abb. 3). Das α-GalCer ist ein Glykolipid, das von einem Meeresschwamm (Agelas mauritianus) abgeleitet wird. CD1d bindet und stimuliert sehr stark sowohl $CD4^+$ T-Zellen als auch DN T-Zellen (Hong et al., 1999; Kawano et al., 1997). Viele Studien konzentrieren sich auf *in vitro* und *in vivo* Stimulation der NKT-Zellen mit a-GalCer, das von $CD1d^+$ Zellen präsentiert wird (Joyce et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass eine solche Stimulation unterschiedliche und widersprüchliche Reaktionen der T-Helfer Zellen auslösen kann.

Abbildung 3: a-Galaktosylceramid



Chemische Strukturformel von a-Galaktosylceramid (aus Wilson, 2002).

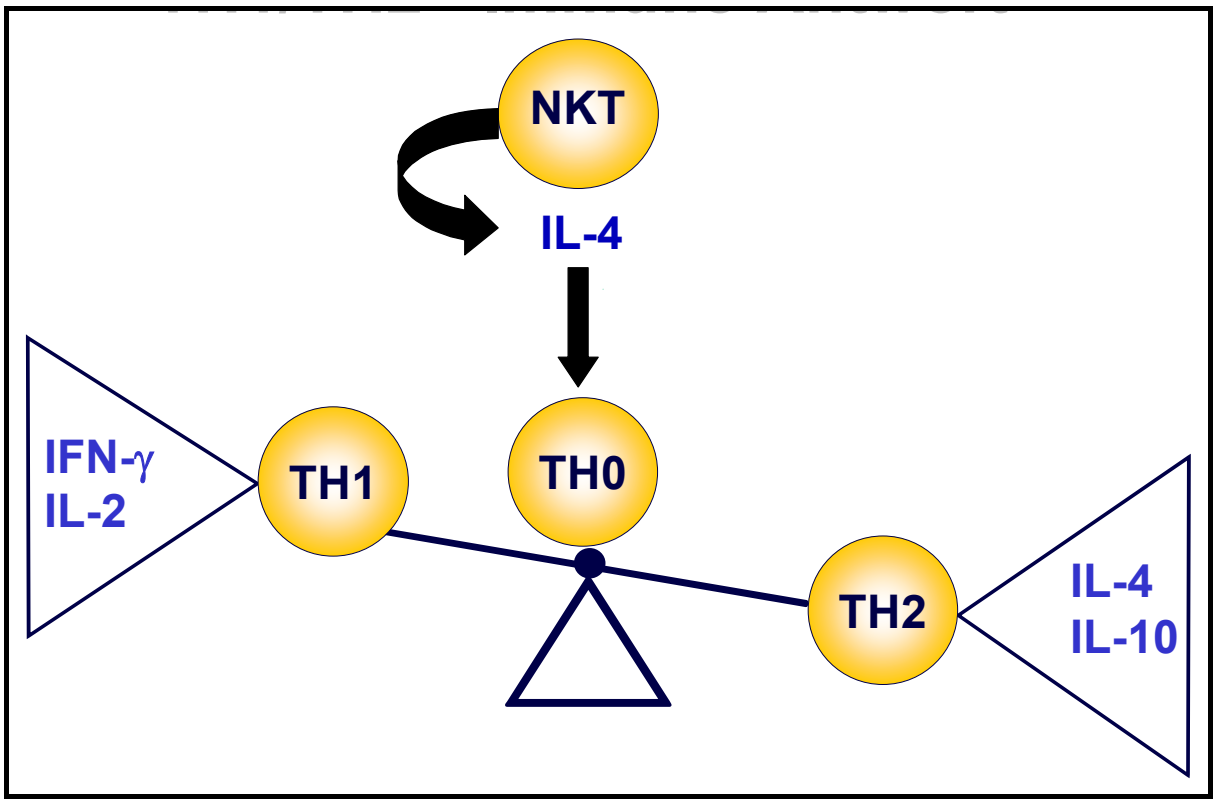
Eine zusätzliche Eigenschaft der NKT-Zellen ist deren Fähigkeit zur Produktion mehrerer Zytokine, wie z.B. IL-4 (Leite-De-Moraes et al., 1997; Leite-De-Moraes et al., 1998; Yoshimoto and Paul, 1994) und das in sehr kurzer Zeit. Im Mausmodell konnte *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden, dass NKT-Zellen nach Stimulation des TZR mit CD3mAb oder Staphylokokkensuperantigen (Enterotoxin B) oder nach Injektion von anti-IgD sehr hohe Mengen IL-4 sezernieren. Zusätzlich erfolgt die IL-4 Freisetzung ungewöhnlich schnell (<1h), so dass von einem „explosive burst" gesprochen wird (Arase et al., 1993; Yoshimoto and Paul, 1994; Zlotnik et al., 1992). Umgekehrt sind in Mausstämmen (NOD, SJL), die kein IgE und IL-4 synthetisieren können, NKT-Zellen nicht nachweisbar (Yoshimoto et al., 1995). NKT-Zell-defiziente Mausstämme (β_2m-/-) produzieren nach Gabe von anti-IgD kein IL-4. Wird jedoch

einmalig exogen IL-4 zugesetzt, wird die Fähigkeit zur IL-4-Synthese wiederhergestellt, da das exogene IL-4 die NKT-Zellen ersetzt und eine Ausreifung von IL-4 sezernierenden TH2-Zellen bewirkt (Yoshimoto et al., 1995). Andere Studien zeigten dagegen, dass NKT-Zell-defiziente Mäuse durchaus in der Lage sind, eine TH2-Antwort zu generieren, normale IgE-Spiegeln haben und OvA-spezifische IgE-Antworten generieren (Korsgren et al., 1999; Zhang et al., 1996).

Weiterhin konnten Studien *in vitro* zeigen, dass $CD4^{+}CD62L^{low}$ Zellen (eine Population, die NKT-Zellen beinhaltet), für die Differenzierung von naiven TH0-Zellen in IL-4-sezernierende Zellen notwendig sind (Gollob and Coffman, 1994) und dass eine NKT-Zell-Aktivierung *in vivo* eine Immunantwort vom TH2-Typ begünstigt.

Diese starke Kapazität für IL-4-Produktion hat zu der Spekulation geführt, dass die NKT-Zellen die Differenzierung von TH2-Zellen begünstigen (Laloux et al., 2001) (Abb. 4).

Abbildung 4: Differenzierung von TH2-Zellen.



TH1/TH2 hypothetische Immunantwort zugunsten von TH2 nach IL-4-Produktion durch NKT-Zellen

Die meisten Studien mit NKT-defizienten Mäusen bestätigen diese Vermutung nicht (Hong et al., 1999).

Dennoch bedeutet das nicht, dass sie nicht eine sehr wichtige Rolle in verschiedenen TH2-Reaktionen spielen. Versuche mit z.B. NKT-überexprimierenden transgenen Mäusen zeigen, dass diese etwa 60fach mehr IL-4 als transgennegative Mäuse sezernieren und deutlich erhöhte IgE-Basaltiter haben (Bendelac et al., 1996). Die Anzahl von verschiedenen immunologischen Reaktionen, die den NKT-Zellen zugeschrieben werden, ist sehr groß. Eine selektive Reduktion von NKT-Zellen wurde bei Autoimmunkrankheiten wie systemische Sklerose (Illes et al., 2000; Kojo et al., 2001), rheumatische Arthritis (Kojo et al., 2001; Maeda et al., 1999) und bei insulinabhängigem Diabetes Mellitus (Wilson et al., 1998) beobachtet. Dagegen wurde eine Erhöhung von NKT-Zellen bei Myasthenia gravis (Reinhardt and Melms, 1999) und Lepra (Mempel et al., 2000) gesehen. Alle diese Reaktionen sind TH1 induziert.

1997 wurde gezeigt, dass humane AV24 invariante $CD4^-CD8^-$ NKT-Zellklone nach Stimulation mit CD3mAb oder glutaraldehyfixierten CD1d-Transfektanten ebenfalls sehr hohe Mengen IL-4, jedoch auch IFNγ produzieren (Exley et al., 1997). AV24-variante $CD4^+CD8^-$ NKT-Zellen wiesen dagegen eine erheblich schwächere Zytokinproduktion auf.

Zusammengefasst geht aus den genannten Daten hervor, dass das genaue Zytokin-Profil der NKT-Zellen abhängig von mehreren Parametern ist, wie z.B. von den unterschiedlichen NKT-Subpopulationen und der Interaktion zwischen verschiedenen Oberflächenmolekülen und NKT-Zellen.

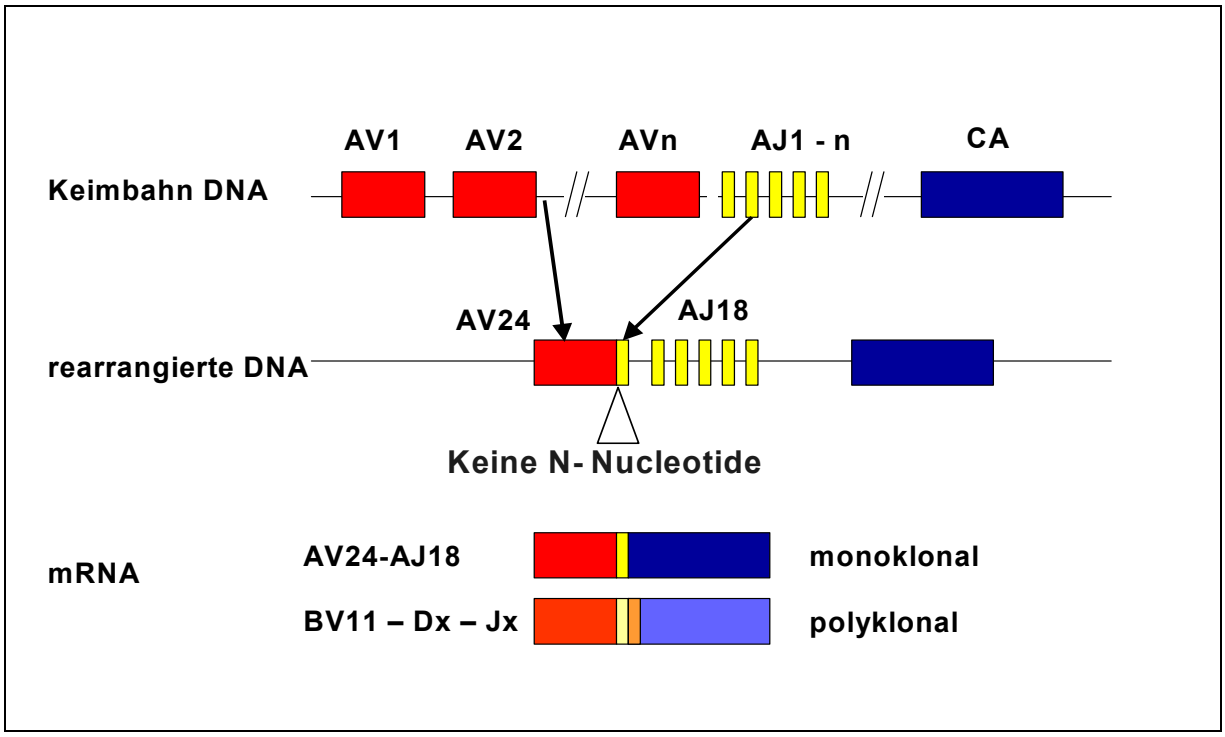
1.4.3 Umordnung

Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen ist der VJ-Gengebrauch der α-Kette bei NKT-Zellen extrem eingeschränkt. So wird beim Menschen ausschließlich AV24 mit AJ18 rearrangiert bzw. in der Maus (Lantz and Bendelac, 1994) das homologe AV14 mit AJ281. Von äußerst seltenen Ausnahmen abgesehen (Dellabona et al., 1994; Exley et al., 1997), enthält die N-Region der TZR-alpha Kette keine Nukleotide (Dellabona et al., 1994; Han et al., 1999; Porcelli et al., 1993). Konventionelle T-Zellen benutzen AV24 sehr selten. Nur 2-10 % der konventionellen T-Zellen verwenden AV24. Dies findet sich aber fast ausschließlich auf DN T-Zellen und nur auf 0,5 % der $CD4^+$ T-Zellen und 0,1 % der $CD8^+$ T-Zellen. Weiterhin assoziiert AV24-AJ18 beim Menschen fast immer mit BV11. Diese TZR β-Ketten sind jedoch polyklonal, d.h. sie lagern mit unterschiedlichen D- und J-Genen zusammen.

Diese Kette ist homolog zu der AV14-AJ281 Kette der Maus, die vorwiegend mit BV8.2, BV7 und BV2 assoziiert ist (Dellabona et al., 1994; Makino et al., 1993; Porcelli et al., 1996).

Es wird vermutet, dass BV11 sich aus strukturellen Gründen gut mit AV24 paart oder dass es sich um eine periphere Expansion seltener Klone durch Bindung an einen monomorphen Liganden handelt (Abb. 5).

Abbildung 5: AV24-AJ18 Rearrangement bei NKT-Zellen



Rot: Variable Familien; Gelb: Joining-Segmente; Blau: Konstantes Gen

2 ZIELSETZUNG

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das von NKT-Zellen sezernierte IL-4 die Differenzierung von naiven TH0-Zellen in TH2-Zellen begünstigt, die ihrerseits den Isotyp-Switch zu IgE bewirken.
Der direkte Nachweis, dass humane IL-4-sezernierende NKT-Zellen über Induktion von TH2-Zellen ebenfalls zu einer erhöhten IgE-Synthese führen, steht jedoch noch aus.
Wenn diese Hypothese zutrifft, ist zu erwarten, dass Atopiker gegenüber nicht-Atopikern vermehrt invariante AV24-AJ18-T-Zell-Rezeptoren aufweisen.

2.1 Fragestellungen

Aus der oben genannten Hypothesen ergeben sich mehrere Fragestellungen, die in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden sollen.

2.1.1 Zelluläre Ebene

Weisen Atopiker gegenüber gesunden Probanden vermehrt NKT-Zellen im peripheren Blut auf?
Wenn ja, sind diese Unterschiede auch in den NKT-T-Zell-Subpopulationen vergleichbar?

2.1.2 Molekulare Ebene

Wie häufig sind $AV24^+$ TZR-Klone von Atopikern gegenüber Nicht-Atopikern auch AJ18 positiv?
Existiert eine N-Region zwischen AV24 und AJ18?
Wenn ja, ist ihre Sequenz homolog oder unterscheidet sich zwischen den beiden zu untersuchenden Populationen?

2.1.3 Klinische Anwendung

Eignet sich der Nachweis von NKT-Zellen (zellulär oder molekular) als prädiktiver Marker für die Entstehung von atopischen Erkrankungen?

3 PATIENTEN UND MATERIAL

3.1 Patientenauswahl

Es wurde venöses Blut von 29 freiwilligen Probanden für diese Studie abgenommen. 24 Blutproben (je 1 ml frisch gewonnenes EDTA-Blut) wurden jeweils in 5 ml Guanidinthiocyanat-β-Mercaptoethanol-Puffer (GT-Puffer) aufgenommen und sofort lysiert. Anschließend bei –80°C für molekularbiologischen Analysen aufbewahrt. Peripheres EDTA-Blut von 22 Probanden standen zur Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie zur Verfügung (Tab. 1).

Tabelle 1: Analysen and Anzahl von Probanden

	Probanden (n=29)
Molekulare und zelluläre Analyse	17
Nur molekulare Analyse	7
Nur zelluläre Analyse	5

Blutproben von 17 Probanden für beiden, 7 nur für molekulare und 5 nur für zelluläre Analysen verwendet.

Serum IgE Spiegel wurden mittels kommerzieller Kits (UniCAP 100, Pharmacia; IgE-Elecsys, Fa. Roche) bestimmt. Die RAST-Ergebnisse für 40 Allergene wurden bei 22 von 29 Probanden mittels dem CAP System IgE FEIA von Pharmacia und für die restlichen 7 Probanden mittels dem MAST CLA® Allergen Specific IgE Präparationssystem (Hitachi Diagnostics, USA) nach Vorschriften des Herstellers ermittelt. Die Probanden wurden in 2 Gruppen aufgeteilt. Jeder Proband musste jeweils alle 3 Kriterien, die für diese Studie festgelegt wurden, erfüllen (Tab. 2).

Tabelle 2: Kriterien zur Studien-Teilnahme

Status	Allergiker	Gesunde Kontrollen
klinische Symptome	Ja	Nein
IgE (kU/ml)	>150	<50
spezifisches IgE (RAST-Klasse)	>3	0

Kriterien zur Studien-Teilnahme waren die klinische Symptomatik, das Gesamt- und das spezifische IgE der Probanden.

3.2 Geräte

Name	Firma
Durchflusszytometer (FACS Calibur)	Becton Dickinson
Elektrophorese Kammer	Owl Scientific
Elektrophorese Kämme	Owl Scientific
Inkubationsschrank (B5060)	Heraeus
Mikropipetten (Research)	Eppendorf
Mischgerät (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries
Multipipette (4780)	Eppendorf
pH-Elektrode	Beckman
pH-Meter	Beckman
Pipettierhilfe	Eppendorf
Temperaturzyklusautomat UNO II	Biometra
Thermomixer (5437)	Eppendorf
Thermoschüttler	Heraeus
Tischzentrifugen (5415, 5415C)	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Heraeus
UV-Transluminator	Bachofer
Vakuumpumpe (Laborport)	KNF

3.3 Plastik- und Glasmaterial

Name	Firma
Glasgefäße	Roth
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Eppendorf
Petrischalen (85 mm/150 mm Durchmesser)	Greiner
Plastikröhrchen (10 ml/15 ml/50 ml)	Falcon
Plastikröhrchen (15 ml)	Greiner
Plastikspitzen für Mikropipetten (Filtertips)	Pharmacia
Plastikspitzen für Mikropipetten (Kristallin/gelb/blau)	Eppendorf
Reaktionsgefäße (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf

3.4 Verbrauchsmaterial

3.4.1 Chemikalien & Ausgangsstoffe

Name	Firma
Ammoniumacetat	Merck
Ampicillin, Natriumsalz	Roth
Aqua für PCR	Gibco
Bacto-Agar	Merck
Bacto-Hefeextrakt	Merck
Bacto-Trypton	Difco
Bromphenolblau	Sigma
Calciumchlorid [CaCl2]	Merck
Chloroform [H3CCl]	Roth
Di-Natriumethylendiamintetraacetat (EDTA)	Gibco
Essigsäure, 100% (Eisessig) [CH3COOH]	Merck
Ethanol [C2H5OH]	Merck
Ethidiumbromid	Biorad
Glycerin, 99%	Merck
Kaliumacetat [CH3COOK]	Merck
Kaliumchlorid [KCl]	Merck
Manganchlorid [MnCl2]	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat [MgSO4*7H2O]	Merck

3-Methyl-1-Butanol (Isoamylalkohol) [C5H11OH]	Fluka
Natriumacetat [CH3COONa]	Roth
Natiumchlorid [NaCl]	Fluka
Nukleotide:	
- Desoxyadenosintriphosphat (dATP)	Pharmacia
- Desoxycytidintriphosphat (dCTP)	Pharmacia
- Deasoxyguanosintriphosphat (dGTP)	Pharmacia
- Desoxythymidintriphosphat (dTTP)	Pharmacia
NuSieve 3:1 Agarose	Biozym
Phenol, Trisgesättigt [C6H5OH]	Roth
2-Propanol (Isopropanol) [C3H7OH]	Roth
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat [C6H5O7Na3*2H2O]	Roth
Ultra Pure-Agarose	Gibco

3.4.2 Enzyme

Name	**Firma**
Alkalische Phosphatase	Roche
DNA-Ligase von Bakteriophage T4	Gibco
DNA-Polymerase von Thermus aquaticus	Pharmacia
Reverse Transkriptase (Superscript II)	Gibco
Ribonuklease A (RNase A)	Qiagen
Ribonukleaseinhibitor (RNasin)	Promega

3.4.3 Oligonukleotide

Plasmid	**Firma**
pBS II SK+ (pBluescriptIISK+)	Labor PD
(Freundlich überlassen durch Frau Christine Federle)	Dr. Engelmann

T-Zell-Rezeptor (α-Kette)-Primer

Name	**Firma**
AV24 5´-GGAGGGAAAGAACTGCACTCTT-3´	MWG
TZRα 5´-GGTGAATAGGCAGACAGACTTGTCACTGGA-3´	MWG
AJ18 5´-TCCAAAGTATAGCCTCCCCAG-3´	MWG

Primer für die AV24-TZRα Klonierung

AV24 Xho I 5´-ATCCTCGAGGGAAAGAACTGCACT-3´	MWG
TCα Spe I 5´-GGTGAATAGGCAGACAGACTAGTCACTGGA-3´	MWG

3.4.4 Sonstige Nukleinsäuren

Molekulargewichtsmarker (1 kb/50 bp/100 bp Leiter)	Gibco

3.4.5 Eschericia coli Stamm

DH5α	Labor PD
(Freundlich überlassen durch Frau Christine Federle)	Dr. Engelmann

3.4.6 Antikörper

Spezifität	Markierung	Isotyp	Firma
Vα24	FITC	IgG1	Immunotech
Vβ11	PE	IgG2α	Immunotech
CD161	PE	IgG2α	Immunotech
CD8	PC5	IgG2α	Pharmingen
CD4	APC	IgG1	Pharmingen
Isotyp-Kontrolle	FITC	IgG1	Immunotech
Isotyp-Kontrolle	PE	IgG2α	Immunotech

3.4.7 Lösungen, Puffer und Medien

Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Puffer

Phenol (25 Vol.)
Chloroform (24 Vol.)
Isoamylalkohol (1 Vol.)

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0
1 mM EDTA

50xTAE-Puffe

2 M Tris
0,05 M EDTA
mit Eisessig auf pH 8,0

Hochsalzpuffer

50 mM Tris-HCl pH 8
1 mM EDTA pH 8
1 M NaCl

GT-Puffer

236,3 g Guanidinthiocyanat
2,5 g N-Lauroylsarcosine
3,7 g TriSodiumCitrat
3,5 ml β-Mercaptoethanol
ad 500 ml Aqua bidest.

PBS-Puffer

150 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na_2HPO_4
2 mM KH_2PO_4

Erythrozyten-Lyse-Puffer

4,15 g NH_4Cl
500 mg $KHCO_3$
18 mg EDTA
ad 500 ml Aqua bidest.

LB-Medium

1 % Bacto-Trypton
0,5 % Bacto-Hefeextrakt
0,34 M NaCl

TYM-Medium

2 % Bacto-Trypton
0,5 % Bacto-Hefeextrakt
1 M NaCl
10 mM MgSO4

TFB1-Medium

30 mM KOAc
50 mM $MnCl_2$
100 mM KCl
10 mM$CaCl_2$
15 % Glycerin

TFB2-Medium

10 mM Na-MOPS
75 mM CaCl2
10 mM KCl
15% Glycerin

5x Puffer

100 mM Tris-HCl (pH 7,4)
23 mM $MgCl_2$
450 mM KCl
0,75 mM β-NAD^+
50 mM $(NH_4)_2SO_4$

10x Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
50 mM KCL
0,1 mM EDTA
1 mM DTT
50% (v/v) Glycerol
0,1 % (w/v) Triton X-100
200 µg/ml BSA

4 METHODEN

4.1 Probandencharakterisierung

Entsprechend der Kriterien zur Studien–Teilnahme wurden insgesamt 29 freiwillige Probanden für die Studie selektioniert. Dreizehn Probanden erfüllten alle Kriterien als „Allergiker“ und sechzehn Probanden alle drei Kriterien als „Gesunde Kontrollen“.
Alle Allergiker hatten spezifisches IgE (RAST Klasse >3) gegen mindestens eins von 40 Allergenen, inklusive Hausstaubmilben, Tierhaaren, Gräser, Pollen, Eier, Milch, Nüsse, Früchte und Gemüse. Sechs davon hatten mehr als eine relevante allergische Diagnose. Keiner nahm orale Corticosteroide oder andere Medikamente ein. Lediglich ein Allergiker wurde mit inhalativen β2-Antagonisten behandelt. Kein Proband der Kontroll-Gruppe nahm Medikamente ein. Die IgE-Spiegel unterschieden sich signifikant zwischen Allergikern und Nicht-Allergikern ($p<0,0001$) (Tab. 3).

Tabelle 3: Probanden Charakterisierung

	Allergiker (n=13)	**Gesunde Kontrollen** (n=16)
Alter (Median, Spannweite)	33 J. (21–41)	27 J. (22–47)
Geschlecht (M/W)	6/7	7/9
IgE (kU/ml)	621[a] (151–1923)	21[a] (5–86)
Klinische Diagnose[b]	13	0
Atopische Dermatitis	8	0
Allergische Rhinitis	7	0
Allergisches Asthma	4	0
RAST Klasse >3[c]	13	0

[a] $p<0.0001$, Mann-Whitney-*U Test;* [b] Sechs Patienten hatten mehr als eine klinische Diagnose; [c] Alle Allergiker hatten RAST Klasse 4 für 3 bis zu 12 Allergenen

4.2 Phänotypisierung von peripherem Blut mittels Durchflusszytometrie

Für die Durchflusszytometrie werden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Das lässt sich durch spezifische Antikörper, die gegen Antigene der Zelloberfläche gerichtet sind und an die ein Farbstoffmolekül gekoppelt ist, direkt erreichen.

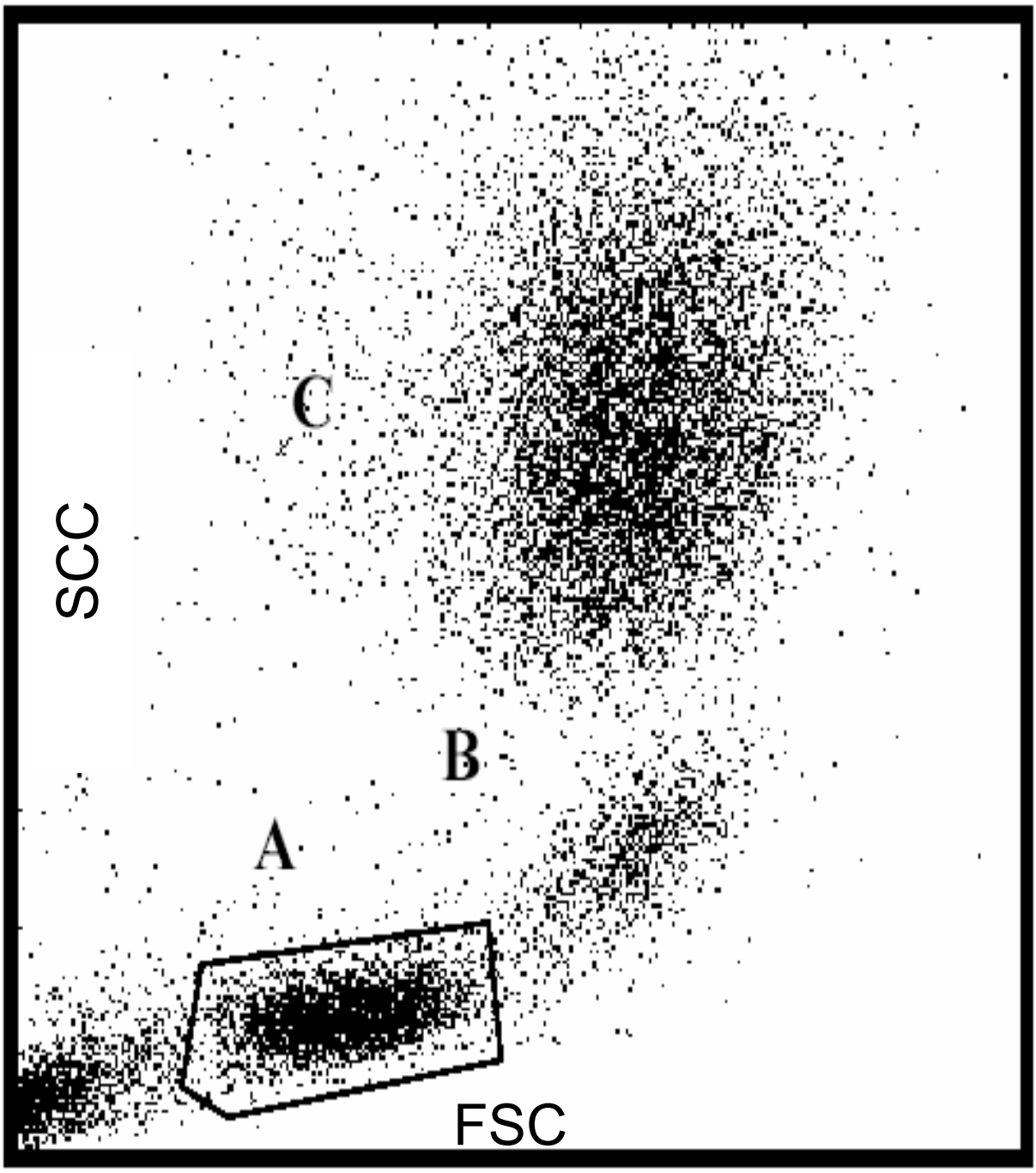
4.2.1 Anfärbung mit monoklonalen Antikörpern

Pro Proband wurden 50 µl frisches EDTA-Blut in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den spezifischen Antikörpern. Die Antikörper waren mit vier verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen direkt markiert, so dass eine mehrfache Färbung möglich war. Jeder Antikörper wurde vor Gebrauch austitriert. Nach der Austitrierung wurden die Antikörper in PBS-Puffer individuell verdünnt und mit 10 µl eingesetzt. Die Inkubation erfolgte für 20 min. bei 4°C im Dunkeln. Diese Zeit ist für das Binden der Antikörper an die äquivalenten Oberflächenmoleküle notwendig. Nach der Inkubation wurde das Vollblut mit 1ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation (4 min./300 g/Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und der Rest in 1 ml Ammoniumchlorid Puffer aufgenommen, um die restlichen Erythrozyten zu lysieren und somit eine Überlagerung der Lymphozyten-Population zu vermeiden. Die gefärbten Proben wurden innerhalb von max. 4 Stunden analysiert und bis zur Messung im Kühlschrank dunkel aufbewahrt.
Zur Überprüfung der Spezifität der Messungen wurden 50 µl EDTA-Blut des jeweiligen Probanden mit direkt markierten Isotyp-Kontrollen inkubiert und wie oben beschrieben vorbereitet (Gruber et al., 1993).

4.2.2 Analyse mit Hilfe eines Durchflußzytometers

Isolierte Zellen, die mit fluoreszierenden Antikörpern beschichtet werden, können mit Hilfe eines FACS-Geräts in verschiedene Zellpopulationen getrennt werden. Die Messungen werden auf dem Bildschirm optisch umgesetzt und der Anteil der jeweiligen Populationen im Verhältnis zu der Gesamtzahl der Zellen statistisch ausgerechnet. Zusätzlich misst das Gerät die Größe und die Granularität der Zellen, so dass jede Zellpopulation als eigenständige Wolke optisch dargestellt wird (Abb. 6).

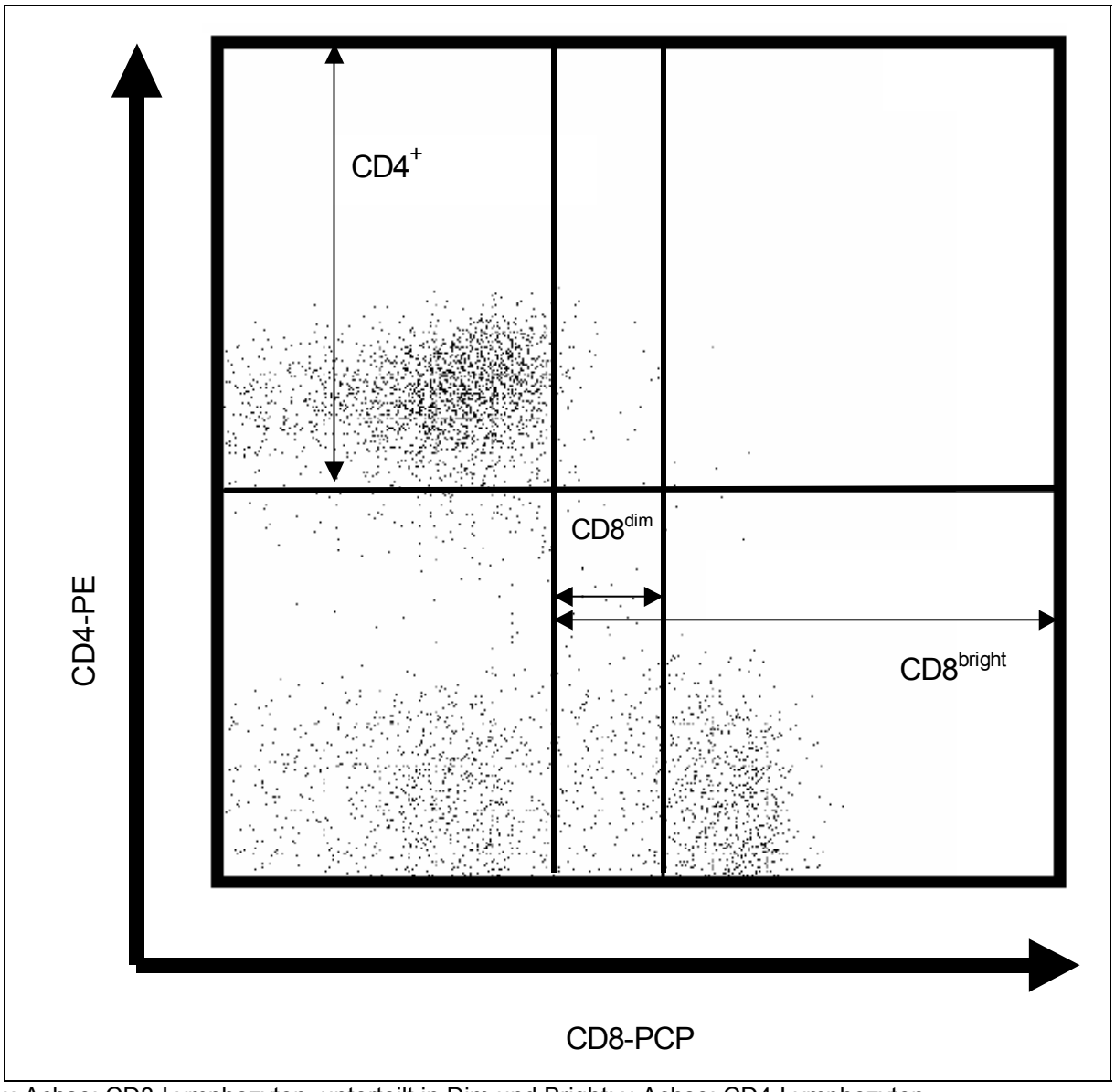
Abbildung 6: Lymphozyteneingrenzung im Vollblut mittels FACS-Analyse.



Im peripheren Vollblut wurden anhand des FSC/SCC-Plots die Lymphozyten (A) von den Monozyten (B) und Granulozyten (C) abgegrenzt.

Zur dieser Studie wurde die Auswertung nur für die Lymphozyten-Population durchgeführt. Aus dem Primärfenster (FSC/SCC) wurde die eingegrenzte Lymphozytenpopulation auf weitere Fenster zur Analyse spezifischer Marker übertragen. Dabei wurden im Punktehistogramm jeweils zwei Marker (CD4 und CD8) gegenübergestellt. Der Anteil von $CD4^+$-, $CD8^{+(dim\ und\ bright)}$ und $CD4^-CD8^-$-Zellen wurde ermittelt, indem man Abgrenzlinien zog und die Quadrantenstatistik errechnen ließ (Abb. 7).

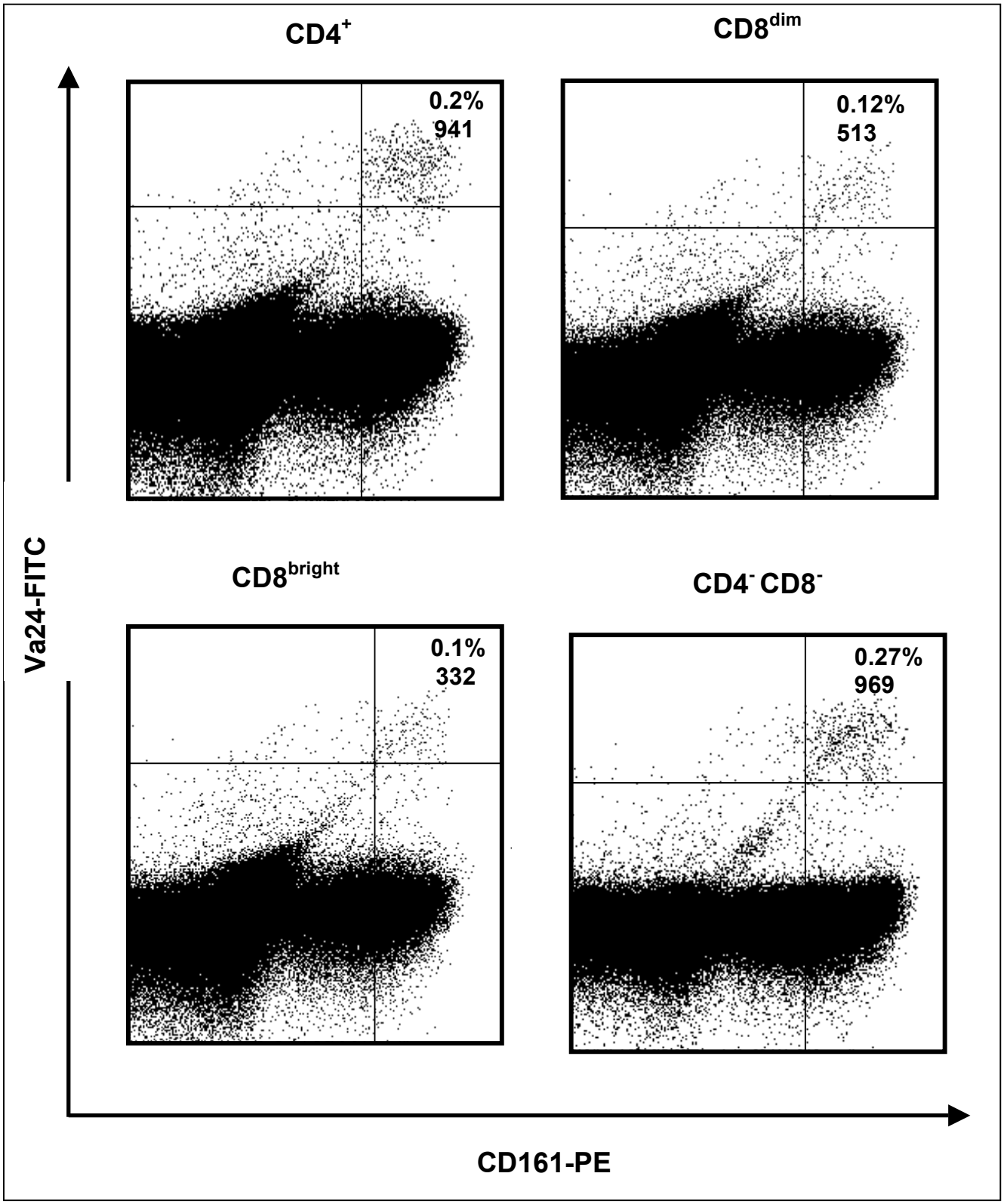
Abbildung 7: Anteil der Lymphozyten Subpopulationen



x-Achse: CD8-Lymphozyten, unterteilt in Dim und Bright; y-Achse: CD4-Lymphozyten

Entsprechend wertete man die Anzahl der NKT-Zellen auf $CD4^+$, $CD8^+$ und DN T-Zellen aus. Dabei benutzte man die Isotyp-Kontrolle des entsprechenden Immunglobulins, um unspezifische Bindungen zu berücksichtigen (Abb.8).

Abbildung 8: Darstellung von NKT-Zellen mittels FACS-Analyse



NKT-Zellen werden innerhalb der Lymphozyten Subpopulationen, durch die gleichzeitige Expression von Vα24 und CD161-Zellen präsentiert (oberes, rechtes Rechteck). In diesem Beispiel werden 5 x 10^5 Zellen gezeigt.

4.3 Methoden der Molekularbiologie

4.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus Vollblut mit saurem Phenol

Zur RNA-Isolation wurde eine Modifikation der sauren Phenolmethode verwendet (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Zu 750 µl GT-Lysat wurden nacheinander 75 µl Natriumazetat, 750 µl Phenol und 150 µl Chloroform/Isoamylalkohol gegeben, 10 s gevortext und 15 min. auf Eis gestellt. Nach Zentrifugation (20 min./13000 rpm/Raumtemperatur) wurde die obere wässrige Phase entfernt und 1 Vol. Isopropanol zugegeben. Nach Durchmischen wurde der Ansatz gefällt (60 min./-20°C), dann erneut zentrifugiert (15 min./13000 rpm/Raumtemperatur) und der Überstand verworfen. Das flüssigkeitsfreie RNA-Pellet wurde mit 300 µl GT-Puffer resuspendiert, gevortext und mit 300µl Isopropanol gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min./13000 rpm/ Raumtemperatur) wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde schließlich in 20 µl steriles H_2O gelöst und sofort in cDNA umgeschrieben.

4.3.2 cDNA-Synthese

Als komplementäre DNA (cDNA) wird die einzel- oder doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls bezeichnet.

Für die Synthese der cDNA wurde eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verwendet, die sogenannte Reverse Transkriptase. Diese benötigt als Starter einen kurzen doppelsträngigen Nukleinsäurebereich, der durch die Reaktion der RNA mit sog. Random-Hexamer Primern herbeigeführt wird. Der gesamte folgende Ansatz wurde auf Eis durchgeführt.

Für die reverse Transkription wurden:

20 µl Gesamt-RNA
2 µl 1x "random hexamer" Primer
3 µl H_2O

gemischt und in einem PCR-Gerät inkubiert (10 min./70°C)

Nach Abkühlung auf Eis wurde dem Reaktionsgemisch:

10,0 µl	5x Puffer,
5,0 µl	DTT(0,1 M),
4,5 µl	H_2O,
2,5 µl	dNTP-Mix (jeweils 10 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP),
2,0 µl	Reverse Transkriptase (Superscript II, 200 U/µl)
1,0 µl	RNAsin (1 U/µl)

zugegeben und in cDNA umgeschrieben (70 min./42°C).
Es folgte ein Denaturierungsschritt (5 min./95°C). Die synthetisierte cDNA wurde auf 150 µl Endvolumen mit Aqua bidest. aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

4.3.3 Präparative AV24-TZRα PCR

Für die präparative PCR wurden insgesamt jeweils 30 µl cDNA benötigt. Um die etablierten PCR-Bedingungen nicht zu modifizieren, wurden jeweils 6 Ansätze pro Probe vorbereitet. Nach Ende der PCR wurden die Aliquots wieder gepoolt und 5 µl des gesamten PCR-Fragments anschließend auf einen 3% Agarose-Gel aufgetrennt, um den Erfolg der präparativen PCR zu überprüfen.
Für einen 50 µl PCR-Ansatz wurden

5,0 µl	cDNA
2,0 µl	AV24-XhoI- Primer (10 pmol/µl)
2,0 µl	TZRα-SpeI- Primer (10 pmol/µl)
4,0 µl	dNTP (jeweils 2,5mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
5,0 µl	10x Puffer
0,2 µl	Taq DNA-Polymerase (Fa. Invitrogen, 5 U/µl)
31,8 µl	H_2O

zusammengemischt und mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

Denaturierung:		95°C,	180 s
37 Zyklen:	Denaturierung:	94°C,	40 s
	Annealing:	56°C,	40 s
	Synthese:	72°C,	60 s
Endpolymerisation:		72°C,	420 s

4.3.4 DNA-Reinigung und -Fällung

Zu der wässrigen DNA-Lösung wurde 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) gegeben und 10 s gevortext. Nach Zentrifugation (8 min./3500 rpm/4°C) wurde die obere, wässrige Phase, welche die gelöste DNA enthält, vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß transferiert.
Anschließend wurde die DNA in 0,1 Vol. 3 M Natriumazetat sowie 2 Vol. 100% Ethanol gefällt. Nach Inkubation (30 min./-20°C) und anschließender Zentrifugation (10 min./14000 rpm/4°C), wurde das DNA-Pellet mit 100 µl 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert (5 min./14000 rpm/4°C) und bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Schließlich wurde die DNA in 80 µl sterilem H_2O gelöst.

4.3.5 Restriktionsverdau von DNA Fragment und Vektor (PBS II sk+)

11,4 µl Plasmidvektor (0,35 µg/ µl) und 75 µl des phenolisierten und gefällten AV24-TZRα PCR-Produkts wurden jeweils mit 2,5 µl Restriktionsendonuklease XhoI (40 U/ µl), 5 µl Restriktionsendonuklease SpeI (10 U/µl), 10 µl Puffer H und H_2O ad 100 µl verdaut (2 h/37°C). Anschließend wurde nur der Vektor, um eine Vektorenligation zu vermeiden, mit 1 µl alkalischer Phosphatase (1 U/µl) dephosphoryliert.

4.3.6 Präparative DNA-Isolierung mittels DEAE-Zellulose

Zur DNA-Isolierung wurden 100 µl des verdauten PCR-Produktes auf einen 3% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach ca. 1 Stunde wurde das Agarose-Gel unter UV-Licht auf der anodalen Seite des zu isolierenden DNA-Fragmentes geschlitzt, und in den Spalt ein Streifen der aktivierten DEAE-Zellulose platziert.
Zur Aktivierung wurde die DEAE-Zellulose in 10 mM NaEDTA pH8 (10 min.) und anschließend in 0,5 M NaOH (5 min.) getränkt und daraufhin mehrmals mit H_2O gewaschen. Die Lagerung erfolgte bei 4°C in 0,1 mM NaEDTA-Lösung.
Die DNA wurde ca. 5 min. bei 100 Volt weiter elektrophoretisch aufgetrennt, um die Bindung der DNA an die Membran zu ermöglichen. Der DNAhaltige Zellulosestreifen wurde aus dem Gel genommen, und in 500 µl Hochsalzpuffer eluiert (30 min./65°C). Anschließend wurde das Eluat nach Vorschrift gefällt und gewaschen und die DNA in 30 µl H_2O aufgenommen.
Die DNA-Proben (1 µl), ein DNA-Molekulargewichtsmarker sowie DNA-Standardmengen wurden mit 0,1 Vol. des Gesamtvolumens Gelauftragslösung auf

einen 3% Agarose-Gel aufgetrennt. Nach Beendigung der Elektrophorese (ca.2 h/100 Volt) wurde das Agarose-Gel unter UV-Licht photographiert.
Die Konzentrationen der DNA-Proben wurden anhand der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu den Fluoreszenzintensität der DNA-Standardmengen abgeschätzt und dokumentiert.

4.3.7 Ligation eines gewünschten Fragments

20, 6, und 2 ng geschnittenes und gereinigtes DNA-Fragment wurden mit jeweils 1 µl Vektor, 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl T4 DNA-Ligase (Fa. Invitrogen, 300 µg/ml) und H_2O ad 10 µl ligiert (24 h/16°C). Das gleiche Verfahren wurde auch für die negative Kontrolle mit 0 ng DNA durchgeführt.

4.3.8 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Escherichia coli (DH5α) wurden in 500 µl TYM-Medium bis zu einer optischen Dichte von 0,5 bei λ 550 nm kultiviert (37°C). Zur Kompetenzinduktion wurden die Bakterien auf Eis abgekühlt, abzentrifugiert (15 min/2800 g/4°C) und in 100ml eiskaltem, sterilfiltriertem TFB1-Medium 10 min. inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min./2500 g/4°C) wurden die Bakterien in 20 ml eiskaltem TFB2-Medium resuspendiert. Diese Suspension wurde aliquotiert und bei –80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.3.9 Transformation von E. coli mittels Hitzeschock

100µl kompetente Bakterien wurden mit 10 µl Ligationsansatz für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach 90 s Hitzeschock bei 42°C, wurde das Gemisch auf Eis mit 1 ml LB-Medium verdünnt. Nach Kultivierung in einem Schüttelinkubator (1 h/37°C/200 rpm) wurden die Bakterien auf ampizillinhaltige LB-Agarplatten ausplattiert. Nach 10-16h Inkubation (37°C) wurden die transformierten Bakterienkolonien sichtbar. 94 Kolonien wurden anschließend in 500 µl ampizillinhaltiges LB-Medium eingeführt und im Schüttelinkubator kultiviert (9 h/37°C/200 rpm). Die Platten mit den restlichen Kolonien wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

4.3.10 AV24-AJ18- PCR von Plasmid-DNA

Um die erfolgreiche Transformation zu überprüfen und die Anzahl der AV24-AJ18 positiven Klone pro Proband zu bestimmen, wurde eine spezifische PCR durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurde eine Plasmid-DNA mitamplifiziert, die vorher sequenziert wurde und das AV24-AJ18 Fragment sicher enthielt. Die Ergebnisse wurden anschließend mittels Agarose-Gels überprüft.

Für einen 30 µl Ansatz wurden

2,0 µl	Plasmid-DNA
2,0 µl	AV24-Primer (10 pmol/µl)
3,0 µl	AJ18-Primer (10 pmol/µl)
2,0 µl	dNTP (jeweils 2,5 mM von dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
3,0 µl	10x Puffer,
0,2 µl	Taq DNA-Polymerase (Fa. Invitrogen, 5 U/µl),
17,8 µl	Aqua bidest

zusammengemischt und mit folgendem PCR-Programm amplifiziert:

Denaturierung:		95°C,	180 s
30 Zyklen:	Denaturierung:	94°C,	40 s
	Annealing:	56°C,	40 s
	Synthese:	72°C,	60 s
Endpolymerisation:		72°C,	420 s

4.3.11 N-Region Analyse mittels Hybridisierungs-Proben

Um zu überprüfen, ob AV24-AJ18 positive Klone innerhalb der CDR3-Region Unterschiede aufweisen, wurde die CDR3-Region auf Einzelnukleotid-Ebene analysiert. Hierfür wurde eine neue, Real-time PCR basierte Technologie etabliert, welche es ermöglicht, eine große Anzahl von Klonen zu testen. Bei diesem Verfahren werden neben den konventionellen Primern zwei fluorochrommarkierte Sonden (FITC, LC-Red) verwendet. Die Sonden liegen in unmittelbarer Nachbarschaft, wobei die Fluoreszenzfarbstoffe das 3´- und das 5´-Ende der ersten bzw. zweiten Sonde markieren und dadurch direkt nebeneinander liegen. Der FITC-markierte Primer wird mittels einer Laserquelle zur Fluoreszenz (530 nm) angeregt. Die emittierte Energie wird auf das zunächst nicht fluoreszierende LC-Red-Molekül übertragen, das nun ein

eigenes Fluoreszenzsignal (640 nm) entsendet. Dieser Vorgang wird als “Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer” (FRET) bezeichnet. Die Energieübertragung findet nur statt, solange sich die beiden Sonden in enger räumlicher Nähe befinden. In unserem Projekt wurde die Sondenlage so gewählt, dass die detektierende LC-Red-markierte Sonde die N-Region überragt. Bei abweichenden Sequenzen mit Insertion von wenigen Nukleotiden (≥1 Nukleotid) bindet die detektierende Sonde mit verminderter Affinität, was zu einer erniedrigten Schmelztemperatur der Sonde führt.

4.3.12 Kultivierung und Kryokonservierung von E. coli

Die E.coli-Bakterien wurden in LB-Medium in einem Schüttelinkubator kultiviert (37°C/200 rpm). Zur Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Medium Ampizillin zugegeben, dessen entsprechendes Resistenzgen auf dem von uns verwendete Plasmid kodiert war. Zur Langzeitkonservierung wurden jeweils 500 µl Aliquots der Bakterienkulturen in 500 µl (20% Glycerinhaltiges) LB-Medium bei –80°C eingefroren. Zur erneuter Kultur kryokonservierter Bakterien wurden 5 ml Kulturmedium mit wenigen Mikroliter der angetauten Bakteriensuspension angeimpft.

4.3.13 Plasmid-DNA-Präparation

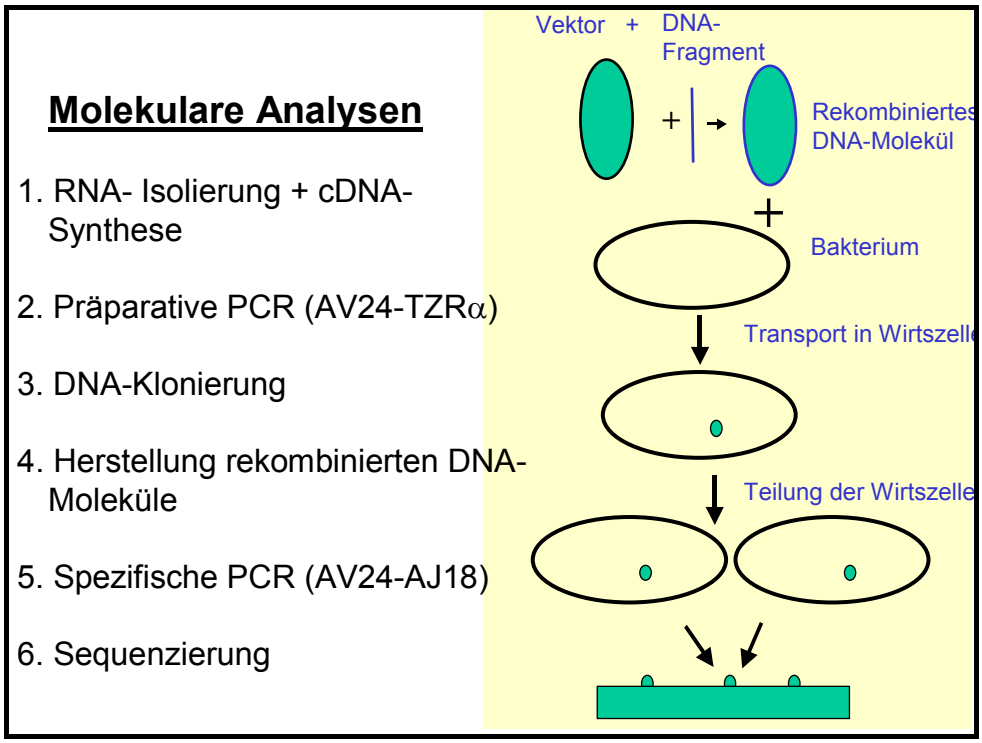
5 ml ampizillinhaltiges LB-Medium wurde mit plasmidhaltigen Bakterien angeimpft. Nach Kultivierung über Nacht wurden 2 ml der Bakterienkultur zentrifugiert (5 min./12000 rpm/Raumtemperatur). Das flüssigkeitsfreie Bakterienpellet wurde in 100 µl Maxi-Lösung resuspendiert und auf Eis gestellt. Zu 100 µl Bakteriensuspension wurde 200 µl frisches 0,2 n NaOH/1%SDS zugegeben und gemischt. Nach Inkubation (5 min./auf Eis), wurde 150 µl Kaliumazetat (5 M) zugegeben und die Röhrchen durch vortexen gemischt. Ausflockendes Zellmaterial wurde abzentrifugiert (3 min./12000 rpm/Raumtemperatur) und der wässrige Überstand (1,5 ml) in 1,5 ml Isopropanol aufgenommen. Nach Inkubation (30 min./–20°C) wurde zentrifugiert (10 min./14000 rpm/Raumtemperatur) und der Überstand abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde mit 70 µl Ethanol (70%) gewaschen und anschließend mit 75 µl 1x Rnase verdaut (30 min./37°C), um RNA Reste zu entfernen. Jede Probe wurde auf 500 µl mit TE-Puffer aufgefüllt und gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamyl zugeben und gemischt. Nach Zentrifugation (10 min./12000 rpm/Raumtemperatur) wurde der

Überstand mit 3Vol Ethanol (100%) gemischt und gefällt (30 min./–20°C). Nach erneuten Zentrifugation (15 min./12000 rpm/Raumtemperatur), wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 100 µl H_2O gelöst. Anschließend wurde 1 µl der Plasmid-DNA durch Agarose-Gel aufgetrennt und die Konzentration mittels Standards geschätzt.

4.3.14 Denaturierung von Plasmid-DNA

Um das DNA-Plasmid zu denaturieren, wurden 1-2 µg Plasmid-DNA jeweils in 100 µl H_2O aufgenommen und nach Vorschrift gefällt. Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit 100 µl Ethanol (70%) gewaschen und der Überstand abgesaugt. Zum Anschluss wurde das getrocknete DNA-Pellet zur Firma MWG zur Sequenzierung verschickt (Abb. 9).

Abbildung 9: Molekularbiologische Analysen



Vereinfachte schematische Darstellung der molekularbiologischen Untersuchungen von der RNA-Isolierung bis zur Sequenzierung.

4.4 Statistische Auswertung

Alle statistische Analysen wurden mit dem SPSS Programm (Version 10, SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA) berechnet.

Mann-Whitney *U* Test wurde verwendet, um Unterschiede zwischen den beiden Gruppen zu testen. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

Spearman rho Test wurde verwendet, um die Korrelation zwischen den Subpopulationen zu errechnen. Bei einem r Wert größer 0,3 wurde eine Korrelation angenommen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Phänotypische Charakterisierung von NKT Zellen

Für die FACS-Analysen standen 22/29 Vollblut-Proben zur Verfügung. Davon stammten 8/13 aus der Gruppe der Allergiker und 14/16 aus der Kontroll-Gruppe. Die restlichen Proben konnten wegen Lagerungsproblemen nicht frisch verarbeitet werden und wurden nur für molekularbiologische Untersuchungen verwendet

Bei dieser Studie wurden alle Lymphozyten, die sowohl Vα24 als auch CD161 positiv waren, als NKT Zellen definiert. Die Frequenz von Vα24$^+$CD161$^+$ NKT-Zellen wurden innerhalb der CD4$^+$, CD8^{bright}, CD8^{dim} und CD4$^-$CD8$^-$ (doppelt negativ, DN) Lymphozyten-Populationen bestimmt (Tab. 4).

Tabelle 4: Prozentsatz und absolute Anzahl von NKT-Zellen.

	Allergiker Vα24$^+$ CD161$^+$ n=8/13		Kontroll-Gruppe Vα24$^+$ CD161$^+$ n=14/16	
	%[a]	pro 10^5 Lymphozyten	%	pro 10^5 Lymphozyten
CD4$^+$	0,09[b] (0,03-0,5)[c]	42[b] (8–194)[c]	0,1 (0–0,23)	52 (0–200)
CD8^{bright}	0,02 (0-0,55)	8 (0–116)	0,03 (0–0,13)	10 (0–69)
CD8^{dim}	0,31* (0–8,28)	9 0–236	0,04* (0–1,41)	21 (0–106)
DN	0,12 (0-2,26)	37 (0–685)	0,09 (0-1,27)	58 (0–398)

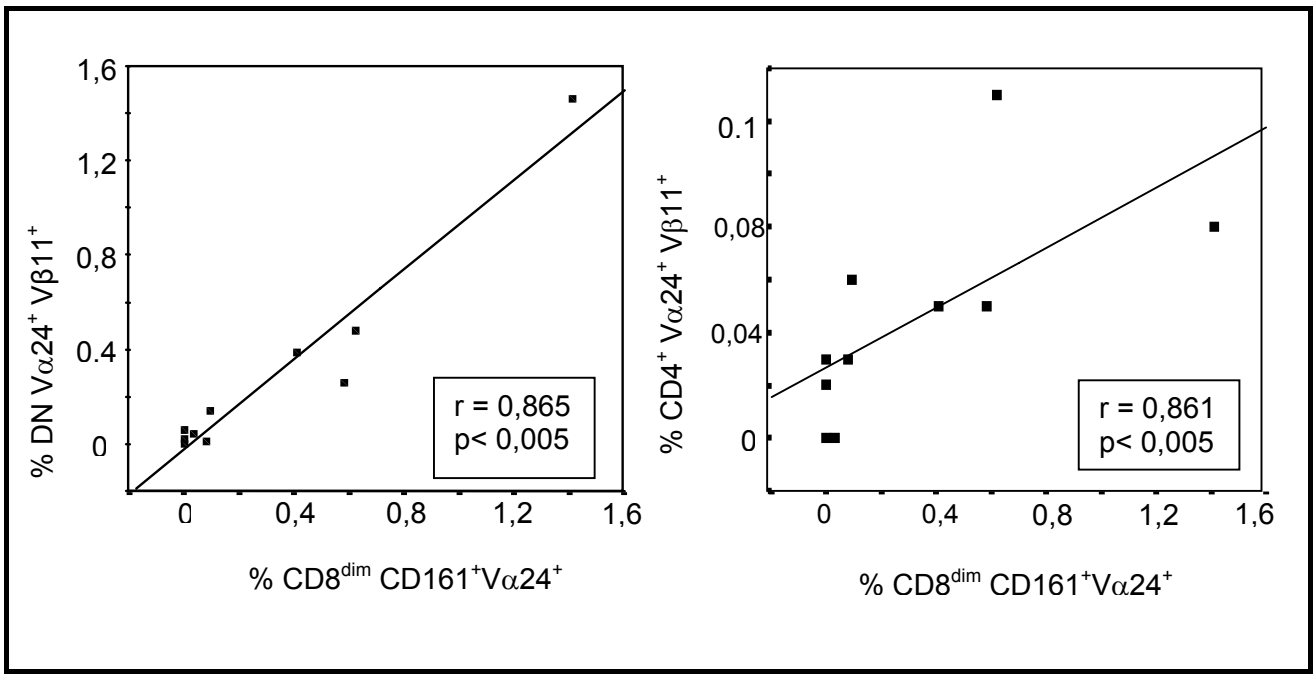
[a] Prozentsatz von Vα24$^+$CD161$^+$ Zellen innerhalb der T-Lymphozyten-Populationen (linke Spalten) und errechnete absolute Anzahl von NKT-Zellen per 10^5 total Lymphozyten (rechte Spalten)
[b] Median; [c] Spannweite; * $p < 0.2$ (Mann-Whitney-U)

Der Prozentsatz aller $V\alpha24^+$ Zellen betrug Median 0,35% (Spannweite: 0,03-1,45%) ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Zwischen der Anzahl aller $V\alpha24^+$ Zellen und $CD8^{dim}$ $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen bestand ein statistischer Zusammenhang (r=0,648; p<0,03; Spearman rho). $CD4^+$ und DN NKT-Zellen, definiert als $V\alpha24^+$ $CD161^+$ Zellen, waren regelmäßig nachweisbar (20/22 Probanden) mit höheren Absolutzahlen als $CD8^{dim\&bright}$ NKT-Zellen.

Bei sechs von 22 Probanden waren keinerlei $CD8^+$ $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen nachweisbar. Von diesen sechs Probanden gehörten drei der Kontroll-Gruppe und drei der Allergiker-Gruppe an. Die verbleibenden 16 Probanden hatten nur sehr wenige $CD8^{bright}$ NKT-Zellen. $CD8^{dim}$ NKT-Zellen waren – wenn sie nachweisbar waren – zahlreicher als $CD8^{bright}$ NKT-Zellen und tendierten bei Allergikern zu einer höheren Anzahl als bei der Kontroll-Gruppe (statistisch nicht signifikant). Ein Proband der Kontroll-Gruppe hatte keinerlei nachweisbare $V\alpha24^+CD161^+$Zellen, weder in der gesamten Lymphozyten-Population noch in den einzelnen Lymphozyten-Subpopulationen. Bei der Kontroll-Gruppe waren $CD4^+$ $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen sowie DN NKT-Zellen tendenziell zahlreicher, ohne dass ein signifikanter Unterschied bestand.

Bei einigen Probanden wurde der Prozentsatz $V\alpha24^+V\beta11^+$ Zellen bestimmt. Auch hier tendierten die $CD4^+$ $V\alpha24^+V\beta11^+$ Zellen zu höheren Zellzahlen bei gesunden Probanden und waren in der $CD8^{bright}$ Subpopulation praktisch nicht nachweisbar. $CD8^{dim}$ $V\alpha24^+V\beta11^+$ NKT-Zellen waren bei keinem von vier untersuchten allergischen Probanden nachweisbar, dagegen bei 4/6 gesunden Probanden. Ebenso wie bei $V\alpha24^+CD161^+$ DN NKT-Zellen waren die Absolutzahlen von $V\alpha24^+V\beta11^+$ DN NKT-Zellen bei gesunden Probanden etwas höher (nicht signifikant). DN $V\alpha24^+V\beta11^+$ waren relativ und absolut zahlreicher als $CD4^+$ $V\alpha24^+V\beta11^+$ Zellen. Zwischen dem Prozentsatz $CD8^{dim}$ $V\alpha24^+$ $CD161^+$ und $CD4^+$ $V\alpha24^+V\beta11$ bzw. DN $V\alpha24^+V\beta11^+$ (Abb. 10) und ferner zwischen $CD4^+$ $V\alpha24^+V\beta11^+$ und DN $V\alpha24^+V\beta11^+$ NKT-Zellen (r= 0,832; p<0,003; Spearman rho) bestand eine hohe Korrelation.

Abbildung 10:



Korrelation zwischen dem Prozentsatz $CD8^{dim}$ und DN $V\alpha24^+V\beta11^+$ NKT-Zellen (links) und $CD8^{dim}$ und $CD4^+$ $V\alpha24^+V\beta11^+$ NKT-Zellen (rechts)

Bei den allergischen Individuen fand sich keinerlei Korrelation zwischen NKT-Subtypen und Serum-IgE-Spiegeln.

5.2 Molekularbiologische Untersuchungen

Da $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen (NKT-Zellen) nicht notwendigerweise mit AV24-AJ18 TZR-Zellen identisch sind, sollte mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden untersucht werden, ob sich der Anteil von AV24-AJ18-Transkripten (NKT-Zellen) bei Allergikern und gesunden Probanden unterscheidet.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen standen Proben von allen 13 Allergikern und von 11/16 Probanden der Kontroll-Gruppe zur Verfügung.

In einer früheren Arbeit der gleichen Arbeitsgruppe wurde bei dem gleichen Probandengut untersucht, ob sich der Anteil von AV24-AJ18-Transkripten an allen TZR-alpha-Ketten bei Allergikern und gesunden Probanden unterscheidet. Die AV24-AJ18/TZRα-Relationen variierten von 2,18–71,44% (Median 20,69%) und waren gleichmäßig zwischen beiden Gruppen verteilt (Tab. 5).

Tabelle 5: Quotient von AV24-TZR-Transkripten zu allen TZR α-Kette-Kopien.

Allergische Patienten n=13/13	Kontroll-Gruppe n=11/16
21,26[a] (2,18–71,44)[b]	18,07[a] (8,13–48,64)[b]

[a]Median; [b]Spannweite

5.2.1 Häufigkeit von AV24-AJ18 in AV24$^+$ Klonen bei Atopikern und Nicht-Atopikern

Da allgemein angenommen wird, dass die Häufigkeit dieser Zellen zu gering ist, um quantitativen Unterschiede zu ermitteln, haben wir AV24$^+$ TZRα-Ketten in E. coli kloniert. Somit konnten wir quantitativ die Häufigkeit von AV24-AJ18-Transkripten innerhalb der AV24 TZRα-Zellen ermitteln.

Es wurden mindestens 94 und maximal 188 Klone pro Proband untersucht. Um die Spezifität der Transkripte zu überprüfen, wurden 40 AV24-AJ18-Klone zusätzlich sequenziert. Davon wiesen 39 Klone die erwartete Sequenz des AV24-AJ18-Rearrangements auf und nur ein Klon (von einem Nicht -Allergiker), der nur eine sehr schwache Bande im Gel gezeigt hatte, erwies sich als AV24-AJ29-Rearrangement.

Der relative Anteil der AV24-AJ18-Transkripte von allen Individuen lag zwischen 0 und 55%. Zwischen den Probandengruppen bestand kein statistisch signifikanter Unterschied (Tab. 6).

Tabelle 6: Prozentuale Häufigkeit von TZR AV24-AJ18$^+$-Transkripten innerhalb aller TZR AV24$^+$-Klone.

Atopische Patienten n=13/13	**Kontroll-Gruppe** n=11/16
5,26[a] (0–55,32)[b]	9,04[a] (0–40)[b]

[a] Median; [b] Spannweite

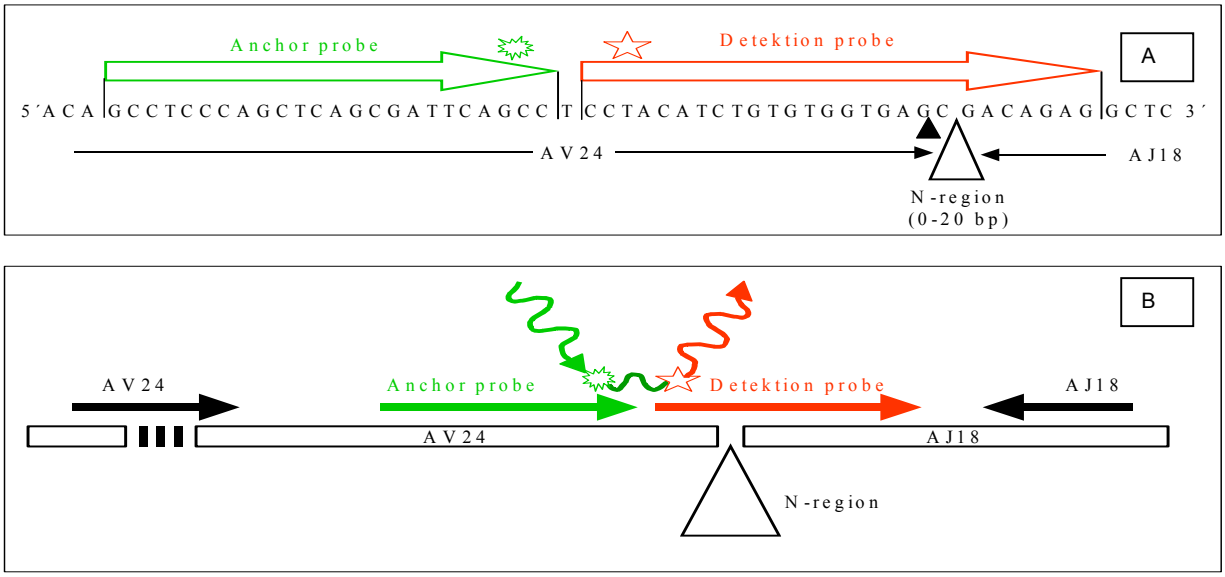
Ferner bestand keine Korrelation zwischen dem relativen Anteil der AV24-AJ18-Transkripte und den Serum-IgE-Werten bei den allergischen Probanden.

Zusätzlich wurde überprüft, ob eine Relation zwischen NKT-Zellen, definiert als AV24-AJ18 positive Klone, und NKT-Zellen, definiert durch die Expression der Oberflächenmoleküle ($V\alpha24^+CD161^+$ Zellen), besteht.
Die Analyse zeigte eine signifikante Korrelation zwischen dem Prozentsatz der positiven Klone und der Anzahl der DN $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen ($r = 0{,}588$; $p < 0.05$).

5.2.2 N-Region Analyse

Um zu überprüfen ob NKT-Zellen bei den beiden Probandengruppen innerhalb der ”Complementarity determining region three ” (CDR3-Region) Unterschiede aufweisen, wurde die CDR3-Region auf Einzelnukleotid-Ebene mittels “Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer” (FRET) kombiniert mit Schmelztemperatur-Kurven Ermittlung analysiert. Hierfür wurde von uns eine neue auf Real-time RT-PCR basierte Technologie etabliert, welche es ermöglicht, eine große Anzahl von Klonen zu testen. Bei diesem Verfahren werden neben den konventionellen Primern zwei fluorochrommarkierte Sonden (FITC, LC-Red) verwendet. Die Sonden liegen in unmittelbarer Nachbarschaft, wobei die Fluoreszenzfarbstoffe das 3´- und das 5´-Ende der ersten bzw. zweiten Sonde markieren und dadurch direkt nebeneinander liegen. Der FITC-markierte Primer wird mittels einer Laserquelle zur Fluoreszenz (530nm) angeregt. Die emittierte Energie wird auf das zunächst nicht fluoreszierende LC-Red-Molekül übertragen, das nun ein eigenes Fluoreszenzsignal (640nm) entsendet. Dieser Vorgang wird als ”Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer” (FRET) bezeichnet. Die Energieübertragung findet nur dann statt, solange sich die beiden Sonden in sehr enger räumlicher Nähe befinden. In unserem Projekt wurde die Sondenlage so gewählt, dass die detektierende LC-Red-markierte Sonde die zu untersuchenden N-Region überragt (Abb.11).

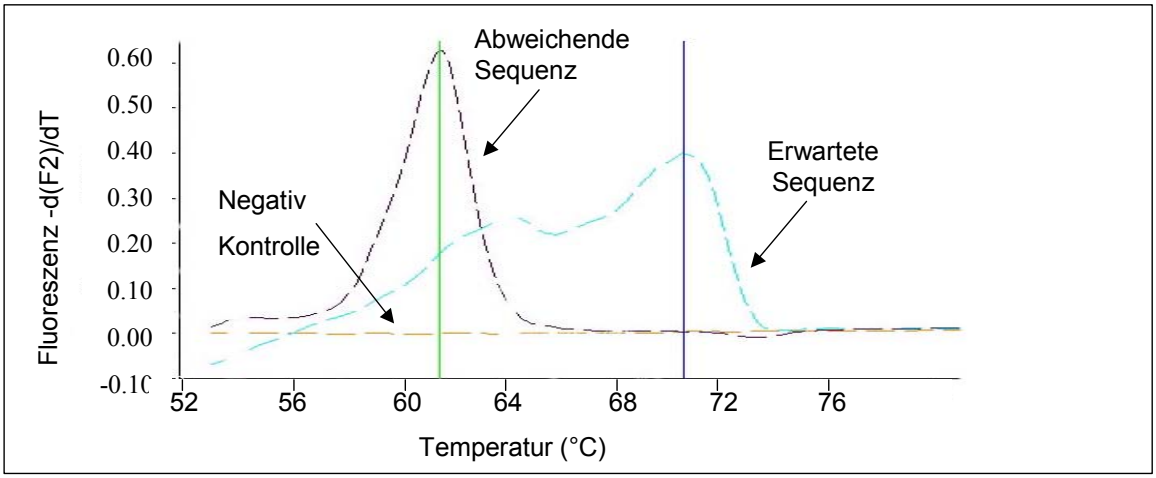
Abbildung 11: N-Region Analyse mittels FRET.



A: Positionierung der Anchor-Probe (FITC-markiert) und der Detektion-Probe (LC-Red-markiert).
B: Schematische Darstellung des Prinzips der FRET-Analyse. Hier werden die konventionelle AV24- und AJ18-Primer sowie die fluorochrommarkierte Sonden gezeigt. Die Energieübertragung findet nur statt, wenn sich beide Sonden in enger räumlicher Nähe befinden.

Bei abweichenden Sequenzen mit Insertion von wenigen Nukleotiden ($\geq$ 1 Nukleotid) bindet die detektierende Sonde mit verminderter Affinität, was zu einer erniedrigten Schmelztemperatur der Sonde führt. Bei größeren Mismatches kann die detektierende Sonde nicht mehr binden, so dass die Energieübertragung schwächer wird und das zweite Fluoreszenzsignal verschwindet (Abb. 12).

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Schmelztemperatur-Analyse.



Schmelztemperatur-Analyse von zwei AV24-AJ18 TZR-Klone. In blau wurde der Klon mit der klassischen Sequenz ohne N-Region dargestellt. Der Klon in schwarz dargestellt, beinhaltet einen einzelnen Nukleotidaustausch (C statt G) in der Position, die mit schwarzem Dreieck in der Abbildung 11A markiert ist. Das führte zur einer reduzierten Schmelztemperatur.

Begründet durch die Literatur nahmen wir an, dass die N-Region der AV24-AJ18 TZR keine N-Nukleotide beinhaltet.

Von jedem Proband wurden 33% aller AV24-AJ18 positiven Klone untersucht. Insgesamt waren es 72 von 221 positiven Klonen. Davon waren 46 von Atopikern und 26 von Nicht-Atopikern.

Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu bestätigen, wurde ein PCR-Klon mittels FRET fünf mal analysiert, was fünf mal zu den gleichen Ergebnis führte. Insgesamt hatten 56 der 72 Klone eine Schmelztemperatur von 71°C.

21 von diesen 56 Klonen wurden mittels Zufallsprinzip ausgesucht und anschließend sequenziert. Das Sequenzmuster aller 21 untersuchten Klonen war identisch mit jenem des regulären AV24AJ18 Klons. Das bedeutet dass bei diesen Klonen die Verbindungsstelle zwischen AV24 und AJ18 keine zusätzliche Nukleotide beinhaltet. Somit existiert die N-Region nicht (Tab. 7).

Tabelle 7: Nukleotid-Sequenz von 56 AV24-AJ18-TZR-Klonen

	AV24	N-Region	AJ18
AV24-AJ18 Sequenz	***ile cys val val ser*** ATC TGT GTG GTG AGC		***asp arg gly ser thr leu*** GAC AGA GGC TCA ACC CTG

Nukleotid-Sequenz von 26 der 56 AV24-AJ18-TZR-Klonen, die eine Schmelztemperatur von 71°C aufwiesen. Alle hatten das gleiche Sequenzmuster wie jenes des regulären AV24AJ18-Klons.

Bei den restlichen 16 Klonen wurde eine reduzierte Schmelztemperatur ermittelt, was zur Annahme geführt hat, dass diese Klone höchstwahrscheinlich zugefügte Nukleotide beinhalten. Da eine reduzierte Schmelztemperatur nicht zwischen einer existenten N-Region und zwischen N-Region nahen Polymorphismen des AV24- bzw. AJ18-Gensegments unterscheidet, wurden alle 16 Klone sequenziert. Elf dieser Klone hatten jeweils einen einzelnen Nukleotid-Austausch am Ende des AV24-Gensegments und einer am Anfang des AJ18-Gensegments. Bei den verbliebenen vier Klonen (zwei von Allergikern und zwei von Kontrollen) wurden mehrere eingefügte Nukleotide gefunden, die eine N-Region bildeten.

Trotz der eingefügten Nukleotide wurde bei 3 der 4 untersuchten Klone, die eine N-Region bildeten, die gleiche Aminosäuresequenz gebildet, wie bei der klassischen AV24-AJ18-Sequenz. Nur bei einem Klon mit N-Region war ein Valin gegen ein Tyrosin ausgetauscht (Tab. 8).

Tabelle 8: Sequenzen von 72 AV24-AJ18 TZR-Klonen mit potentieller N-Region und abgeleiteter Aminosäure-Sequenz

	abgeleiteter Aminosäure Sequenz		
	AV24	N-Region	AJ18
Klassische AV24-AJ18 Sequenz (56 Klone)	***ile cys val val ser*** ATC TGT GTG GTG AGC		***asp arg gly ser thr leu*** GAC AGA GGC TCA ACC CTG
Einzelne Nukleotid Austausch innerhalb von AV24 od. AJ18 (12 Klone)	ACC TGT GTG GTG AGC ACC TGT GTG GTG AGC ATC TGT GTG GTG AGT ATC TGT GTG GTG ACC ATC TGT GTG GTG AAC ATC TGT GTG GTG AAC ATC TGT GTG GTG AAC ATC TGT GTG GTG GGC ATC TGT GTG GCG AGC ATC TGT GTG GTG ACC ATC TGT GTG GTG ACC ATC TGT GTG GTG AGC		GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAC AGA GGC TCA ACC CTG GAT AGA GGC TCA ACC CTG
AV24-AJ18 mit N-Region (4 Klone)	ATC TGT GTG GTG	***tyr ile*** TAC ATC	AGA GGC TCA ACC CTG
	ATC TGT GTG	***val ser*** GTC TCC	GAC AGA GGC TCA ACC CTG
	ATC TGT GTG	***val ser*** GTC TCC	GAC AGA GGC TCA ACC CTG
	ATC TGT	***val val ser*** GTA GTA TCC	GAC AGA GGC TCA ACC CTG

Bei Klone mit reduzierter Schmelztemperatur wurde eine N-Region vermutet. Alle 16 wurden sequenziert, um zwischen einzelnen Nukleotidaustausch und wahre N-Region zu unterscheiden.

6 DISKUSSION

Die bei Patienten mit allergischen Erkrankungen dominierenden TH2-Effektor-Lymphozyten benötigen IL-4 für ihre Ausreifung und Differenzierung. Obwohl TH2-Zellen selber IL-4 synthetisieren, ist bisher unbekannt, woher das IL-4 stammt, welches zur initialen Verschiebung des TH1/TH2- Gleichgewichts führt. Als mögliche Quelle wurden sogenannte NKT-Zellen diskutiert, da sie IL-4 rasch und in großer Menge sezernieren können.

Es konnte daher vermutet werden, dass NKT-Zellen bei Atopikern häufiger vorkommen als bei Nicht-Atopikern.

Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob sich die Frequenz von NKT-Zellen im peripheren Blut von Erwachsenen mit atopischen Erkrankungen gegenüber Nicht-Atopikern unterscheidet. Dieses sollte sowohl auf der zellulären als auch auf der molekularen Ebene untersucht werden.

In der Literatur liegen uns wenige und widersprüchliche Berichte vor. Magnan et al. untersuchten insgesamt 70 Probanden, davon waren 30 „Atopiker“. Die Gruppe der Atopiker war wenig definiert, es lagen z.B. keine klinische Details über Art der Atopie, Symptomatik und Therapie vor. Die Diagnose der „Atopie“ wurde lediglich anhand von Pricktests gestellt. IgE und IL-4 waren bei den Atopikern signifikant gegenüber den Nicht-Atopikern erhöht. NKT-Zellen waren insgesamt in beiden Gruppen nicht unterschiedlich. Als NKT-Zellen wurden die Zellen bezeichnet, die sowohl Vα24 als auch Vβ11 exprimieren. $CD4^+$ NKT-Zellen waren signifikant häufiger in der Atopie-Gruppe vertreten und korrelierten mit der Höhe der IgE-Spiegel und IL-4 Produktion. $CD8^+$ NKT-Zellen unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen und zeigten keine Korrelation zu IgE und IL-4.

Die Autoren kamen zu den Schluss, dass die Subpopulation $CD4^+$ der NKT-Zellen eine Rolle in der Atopie-Genese spielt. Untersuchungen auf molekularer Ebene liegen nicht vor (Magnan et al., 2000).

Oishi et al. untersuchten NKT-Zellen bei einer relativ geringen Zahl von 9 Patienten mit Atopie und stark erhöhten IgE-Spiegeln und 5 Kontrollen mittels Durchflusszytometrie. Eine genaue Angabe über die Anzahl der Zellen, die mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden, liegt nicht vor. Invariante AV24-AJ18 DN-T-Zellen (NKT-Zellen) waren deutlich vermindert bei atopischen Probanden, während kein Unterschied bei AV24-AJ18 $CD4^+$ T-Zellen nachgewiesen wurde. Außerdem

produzierten NKT-Zellen hauptsächlich IFNγ, aber kein IL-4 nach Aktivierung. Die Autoren schließen aus diesen Befunden, dass NKT-Zellen keine wesentliche Rolle bei der TH2-vermittelten atopischen Erkrankung spielen, jedoch die Verminderung der IFNγ-produzierenden-NKT-Zellen in die Pathogenese der Entstehung von atopischen Erkrankungen involviert ist. Diese Ergebnisse sind schwierig zu interpretieren, da die Fallzahl gering ist und nur parametrische statistische Tests angewandt wurden (Oishi et al., 2000).

Takahashi et al. untersuchten eine größere Anzahl von Probanden, 31 mit Allergien und 71 gesunde Kontrollen. Sie fanden eine verminderte Anzahl von $CD4^-V\alpha24^+/V\beta11^+$ NKT-Zellen bei den Atopikern. Keine Korrelation wurde gefunden zwischen der Anzahl von $CD4^-$ und $CD4^+$ Zellen und IgE Spiegeln. Die Ratio der IL-4/IFNγ produzierenden Zellen war höher bei den Atopikern. Es bestand eine inverse Korrelation zwischen den IL-4/IFNγ produzierenden Zellen und den $CD4^-V\alpha24^+/V\beta11^+$ NKT-Zellen bei den Atopikern. Molekulargenetische Untersuchungen wurden bei dieser Arbeit nicht durchgeführt (Takahashi et al., 2003).

Unsere Untersuchungen befassen sich mit der Häufigkeit von NKT-Zellen bei erwachsenen atopischen und nicht atopischen Probanden, sowohl auf der zellulären als auch auf der genetischen Ebene.

Auf der zellulären Ebene bestimmten wir die Häufigkeit von NKT-Zellen, definiert durch die gleichzeitige Oberflächen Expression von Vα24 und CD161 in $CD4^+$,$CD8^{bright}$, $CD8^{dim}$ und DN T-Zellen. In Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen aus der Literatur (Davodeau et al., 1997; Dellabona et al., 1994) waren $CD8^{bright}$ NKT-Zellen kaum auffindbar. Im Gegensatz dazu waren $CD8^{dim}$ NKT-Zellen, die aller Wahrscheinlichkeit nach den CD8αα NKT-Zellen entsprechen (Prussin and Foster, 1997) eindeutig häufiger.

Unsere Ergebnisse basieren auf der Messung einer größeren Anzahl von mehr als $1x10^5$ Zellen pro Probe bei den meisten Patienten.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Angaben aus der Literatur (Magnan et al., 2000; Oishi et al., 2000; Takahashi et al., 2003) fanden wir keine eindeutigen Unterschiede zwischen der Anzahl der $V\alpha24^+$ $CD161^+$ NKT-Zellen in den zwei Gruppen, obwohl die Absolutzahl der $CD8^{dim}$ NKT-Zellen bei den Atopikern in der Tendenz niedriger war als in der Kontroll-Gruppe.

Diese Diskrepanzen gegenüber der Literatur lassen sich teilweise erklären durch geringe Fallzahl der untersuchten Probanden (Oishi et al., 2000), durch

ungenügende Kriterien für die Patientenauswahl (Magnan et al., 2000; Oishi et al., 2000; Takahashi et al., 2003) und durch nicht adäquate statistische Tests. Unsere Kriterien zur Auswahl der Probanden waren sehr streng, alle drei Parameter mussten erfüllt sein (IgE, spezifisches IgE und klinische Symptomatik). Im Gegensatz zu der Untersuchung von Takahashi et al. erhielten unsere Patienten mit atopischer Dermatitis keine immunmodulierenden Externa. Da die interindividuelle Variabilität in der Frequenz der $V\alpha24^+$ $CD161^+$ NKT-Zellen bei den gesunden Menschen sehr hoch ist (Davodeau et al., 1997; Dellabona et al., 1994), wandten wir nur nicht-parametrische Tests für unsere Auswertung an, da eine normale Verteilung bei kleineren Gruppen nicht zu erwarten ist.

In Übereinstimmung mit Takahashi et al. und Magnan et al. fanden wir ebenfalls keine Korrelation zwischen NKT-Zellen aller Subtypen und IgE Spiegeln bei den Allergikern.

Zusätzlich zu den Untersuchungen auf der zellulären Ebene wurden auch molekulargenetischen Methoden eingesetzt, da $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen nicht notwendigerweise identisch mit den TZR-AV24-AJ18-Zellen sind, um eventuell Unterschiede zwischen Allergikern und gesunden Probanden auf der m-RNA-Ebene herauszufinden.

Zwei Strategien stehen zur Verfügung für diese Untersuchungen: Die Häufigkeit der TZR-AV24-AJ18-Transkripten innerhalb aller TZR-α-Ketten und der relative Anteil der TZR-AV24-AJ18-Transkripten innerhalb der AV24-TZR-α-Ketten. Da in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe festgestellt wurde, dass das Vorkommen der TZR-AV24-AJ18-Transkripten innerhalb aller TZR-α-Ketten zu niedrig ist, um signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu entdecken, wurde die zweite Strategie gewählt.

Allerdings wurde auch mit dieser Methode kein statistisch signifikanter Unterschied in dem relativen Anteil der AV24-AJ18-Transkripten zwischen Allergikern und Kontroll-Gruppe gefunden. Ferner bestand keine Korrelation zwischen der Anzahl der AV24-AJ18-Transkripten und den Serum IgE-Werten bei den Allergikern.

Bei der Überprüfung, ob eine Relation zwischen NKT-Zellen auf der zellulären Ebene und der molekularen Ebene besteht, ergab sich eine signifikante Korrelation zwischen den Prozentsatz der positiven Klone und der Anzahl der DN $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen.

Zusätzlich untersuchten wir die CDR3-Region der NKT-Zellen mittels FRET Technologie kombiniert mit Schmelztemperatur-Analyse, um eventuelle Unterschiede zwischen beiden Gruppen zu finden. Mit einer von uns etablierten Technologie war es möglich eine größere Anzahl von Klonen zu testen. Überwiegend wurde in der Literatur (Dellabona et al., 1994; Han et al., 1999; Porcelli et al., 1993) beschrieben, dass die N-Region der AV24-AJ18-TZR keine N-Nukleotide beinhaltet. 16 Klone mit reduzierter Schmelztemperatur wurden zur Identifizierung sequenziert. Übereinstimmend mit ähnlichen Beobachtungen von Exley et al. und Dellabona et al. fanden wir bei 4 (2 von Allergikern und 2 von der Kontroll-Gruppe) der 16 untersuchten Klone mehrere eingefügte Nukleotide in der N-Region. Interessanterweise blieb die Aminosäuresequenz bei 3 der 4 Klone identisch mit der Sequenz der NKT-Zellen, die keine N-Region aufweisen. Wenn diese Transkripte sich von konventionellen AV24-AJ18-T-Zellen ableiten, könnte dieser Befund bedeuten, dass eine gewisse funktionelle Selektion für eine Antigen-Spezifität stattgefunden hat. Eine andere Erklärung wäre, dass diese Zellen von einer kleinen Subpopulation der NKT-Zellen stammen, die Nukleotide enthalten, obwohl eigentlich angenommen wird, dass NKT-Zellen sich entwickeln, bevor Lymphozyten terminale Deoxynukleotidyl-transferase exprimieren können, die für die Diversität der N-Region erforderlich ist. Elf der 16 Klone hatten Einzelnukleotidaustausche innerhalb des AV24-Gens, ein Klon innerhalb des AJ18-Gens. Da keine Pfu-Taq-Polymerase verwendet wurde, blieb offen, ob es sich um Lesefehler der Polymerase handeln könnte. Allerdings wäre die Fehlerrate dann außergewöhnlich hoch, die nach Hersteller-Aussagen im Mittel bei $42x10^{-6}$ liegt. Vier dieser 12 Klone, die von verschiedenen Probanden stammen, identische Mutationen innerhalb der CDR3-Region, die eine fehlerhafte Amplifikation zusätzlich unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Zusammenfassend konnten unsere Untersuchungen sowohl auf der zellulären als auch auf der molekulargenetischen Ebene, keine signifikanten Unterschiede im Anteil der NKT-Zellen bei Atopikern und Nicht-Atopikern nachweisen. Folgende Faktoren könnten daran ursächlich beteiligt sein:

1. Es wurden nur erwachsene Individuen untersucht mit längerer allergischen Anamnese. Allergische Erkrankungen beginnen häufig in der Kindheit. Es ist möglich, dass die NKT-Zellen nach Initiierung der TH2 gewichteten Imbalance bei Beginn der Erkrankung anschließend wieder zu Normalwerten zurückkehren. Unter dieser

Annahme würde das TH2-Übergewicht, durch die IL-4 produzierenden TH2-Zellen selbst aufrechterhalten. Dass NKT-Zellen tatsächlich früh eine Rolle spielen, beweisen Untersuchungen an Nabelschnurblut, wo ein TH2-Übergewicht existiert und die AV24-AJ18-Transkripte in hoher Frequenz gefunden wurden (D'Andrea et al., 2000; Der Vliet et al., 2000). Dieses bestätigen auch Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe. Hier fanden sich bei gesunden Kindern deutlich mehr AV24-AJ18-Transkripte als bei Kindern, die bis zum 3. Lebensjahr eine atopische Dermatitis entwickelten.

Eine Untersuchung an Kleinkindern mit obstruktiver Bronchitis („wheezing“) von Gereda et al. konnte zeigen, dass eine frühe Exposition gegenüber Hausstaub-Endotoxin vor Sensibilisierung schützt und mit einem hohen Anteil von Interferon-γ produzierenden $CD4^+$ T-Zellen einhergeht, während IL-4, IL-5 und IL-13 produzierende Zellen nicht vermehrt waren (Gereda et al., 2000). Obwohl die genaue Art der Antigen-Bindung von NKT-Zellen noch unbekannt ist, konnten einige Studien zeigen, dass sie in der Abwehr gegenüber mikrobiellen Infektionen eine Rolle spielen. So wurden in tierexperimentellen Untersuchungen bei Mäusen protektive Effekte gegenüber Plasmodium (Pied et al., 2000), Protozoen wie z.B Leishmanien (Ishikawa et al., 2000), Toxoplasma gondii (Denkers et al., 1996) und gegenüber Bakterien wie z.B Listerien (Flesch et al., 1997) beschrieben. Die Untersuchungen von Emoto et al. konnten zeigen, dass bei der Infektion durch Mykobakterium Bovis bacillus Calmette Guerin die Zytokin-Produktion der $CD4^+$ NKT-Zellen von IL-4 zu IFNγ durch Induktion von IL-12 wechselt (Emoto et al., 1999). In einem direkteren Ansatz konnte Schofield et al. nachweisen, dass NKT-Zellen, die GPI-Anker-Proteine (präsentiert durch CD1d) von Plasmodium falciparum und Trypanosoma brucei erkennen, zur IgG-Immunantwort gegen diesen Mikroben beitragen (Schofield et al., 1999). Es kann daher spekuliert werden, dass die Erkennung mikrobieller Produkte durch NKT-Zellen in früher Kindheit ihre Zytokin-Produktion beeinflusst und somit die Entwicklung von TH2 vermittelten Antworten entweder begünstigt oder unterdrückt. Epidemiologische Untersuchungen konnten zeigen, dass die Exposition gegenüber Mikroorganismen in früher Kindheit vor Atopien schützt (von Mutius et al., 2000). Ob diese Beobachtung mit dem Anteil der NKT-Zellen und ihrem Zytokin-Profil zusammenhängt ist noch nicht geklärt.

2. Die Tatsache, dass keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf der molekulargenetischen Ebene gefunden werden konnten, kann teilweise damit erklärt

werden, dass Vollblut-Proben verwendet wurden. In zukünftigen Studien könnten möglicherweise solche Unterschiede zwischen atopischen und nicht-atopischen Individuen entdeckt werden, wenn isolierte Subpopulationen untersucht werden, die z.B $CD4^+$ oder DN-Zellen enthalten. Oishi et al. fanden eine Verminderung im Anteil der AV24-AJ18 Rearrangements in der DN-Subpopulation bei atopischen Probanden verglichen mit Gesunden. Unsere Berechnungen der absoluten Zahlen der $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen ergab allerdings, dass die meisten NKT-Zellen zur $CD4^+$ Subpopulation gehörten, gefolgt von den DN-Zellen und den $CD8^+$ Zellen. Außerdem korrelierten die AV24-AJ18-Transkripte signifikant mit der Anzahl der $CD4^+$ und DN NKT-Zellen. Das beweist, dass die durch unsere Klonierungsstrategie zuerst entdeckten NKT-Zellen zu diesen Untergruppen gehören. Da unsere aufwändigen Untersuchungen sowohl auf der zellulären als auch der molekularen Ebene keine Unterschiede aufdecken konnten, ist es unwahrscheinlich, dass ein wesentlicher Unterschied auf der Ebene der Subpopulationen besteht.

3. Für unsere Untersuchungen wurde frisches peripheres unstimuliertes Blut von Erwachsenen verwendet. Möglicherweise üben NKT-Zellen im peripheren Blut keinen regulatorischen Einfluss auf Zellen aus, die an der kranken Haut oder in der Lunge *in situ* ihre Funktion ausüben. Wenn Lymphozyten in diesen Geweben direkt analysiert werden, können eventuell Veränderungen der Anzahl der NKT-Zellen bei erwachsenen atopischen Patienten gefunden werden.

Tierexperimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass Phänotyp und Funktion von NKT-Zellen in verschiedenen Organen variieren (Emoto et al., 2000; Hammond et al., 1999; Matsuura et al., 2000) und auch innerhalb des gleichen Gewebes heterogen sind (Apostolou et al., 2000). Doherty et al. fanden in Leberbiopsieproben, die aus Lebertransplantaten stammten, ebenfalls eine sehr heterogene Population von NKT-Zellen (Doherty et al., 1999).

Peripheres Blut mag daher weniger geeignet sein Differenzen im Anteil und Phänotyp von NKT-Zellen zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern aufzudecken. Allerdings stoßen Untersuchungen an Frischgewebe an ethische Grenzen.

Ein weiterer möglicher Untersuchungsansatz könnte sein, neben der Zahl der NKT-Zellen funktionelle Studien bei Gesunden und Atopikern durchzuführen, um ihre Rolle bei der Atopie-Genese zu definieren.

Trop und Ilan fanden in einem experimentellen Colitis-Modell bei Mäusen unterschiedliche Zytokinproduktion der NK-Zellen entsprechend der Immuntoleranz.

Bei immuntoleranten Mäusen konnte eine hohe IL-4 Sekretion aufrechterhalten werden, während nicht-tolerante Mäuse bei höherer Entzündungsreaktion mehr IFNγ aufwiesen (Trop and Ilan, 2002). Loza et al. beobachteten in humanen NKT-Zellen eine Veränderung in Phänotyp und Zytokinproduktion im Verlauf des Reifungsprozesses (Loza et al., 2002).

Aus diesen beiden Untersuchungen geht hervor, dass möglicherweise bei Atopikern die Produktion unterschiedlicher Zytokine eine größere Rolle in der Entstehung des TH1/TH2-Ungleichgewichtes spielt als die Zahl der NKT-Zellen.

In der vorliegenden Studie war die Menge der verfügbaren Proben leider zu gering, um das Zytokin-Profil der NKT-Zellen in beiden Gruppen zu analysieren.

Ein wesentlicher Punkt zur Erforschung der Rolle der NKT-Zellen bei der Genese der allergischen Erkrankungen wäre die Durchführung von Langzeitstudien an einer größeren Kohorte im Kindesalter. Diese Studien könnten auch darüber hinaus aufdecken, ob NKT-Zellen zur Initiierung oder zum Schutz vor allergischen Erkrankungen beitragen in Abhängigkeit von ihrer Zytokinprofil. Solche Studien könnten auch unsere Beobachtungen an vier Fällen bestätigen, dass NKT-Zellen N-Nukleotide enthalten, die persistierende Klone repräsentieren.

7 ZUSAMMENFASSUNG

7.1 Einleitung

In der Pathogenese atopischer Erkrankungen spielt IL-4 eine wichtige Rolle, da es den Switch zu IgE bewirkt. Außerdem führt IL-4 zur Ausreifung von naiven T-Zellen in TH2-Effektor-Zellen, welche die IL-4-Produktion ihrerseits aufrecht erhalten. Es konnte vermutet werden, dass diese Ausreifung durch sog. NKT-Zellen – die durch die gleichzeitige Expression eines T-Zell-Rezeptors mit einem NK-Zell-Marker sowie eine sehr hohe IL-4-Produktion charakterisiert sind - geschieht. Diese Zellen lassen sich durch die hochselektive Verwendung einer monoklonalen TZR-α-Kette (AV24) nachweisen.
Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob Atopiker gegenüber Nicht-Atopikern vermehrt NKT-Zellen aufweisen

7.2 Methoden

Die Untersuchungen wurden in peripherem Blut freiwilliger, erwachsener Probanden durchgeführt. Atopiker wurden durch das gleichzeitige Vorhandensein klinischer Symptome, erhöhten Gesamt-IgEs und erhöhten spezifischen IgEs definiert. Bei den gesunden Probanden lagen weder klinische Symptome vor, noch waren Gesamt-IgE oder spezifisches IgE erhöht.
Auf der zellulären Ebene wurden die Blutproben mittels Durchflusszytometrie analysiert. Innerhalb der $CD4^+$, $CD8^{bright}$, $CD8^{dim}$ sowie DN Lymphozyten wurde die Frequenz der $Va24^+CD161^+$ NKT- Zellen bestimmt.
Auf der molekularen Ebene wurde der Anteil der AV24-AJ18-Transkripte an allen TZR-α-Ketten untersucht. Zur Überprüfung der Spezifität wurden 40 AV24-AJ18-Klone zusätzlich sequenziert. Um eventuelle Unterschiede innerhalb der CDR3-Region zwischen den beiden Probanden-Gruppen zu entdecken, wurde diese auf der Einzelnukleotidebene analysiert und hierfür eine neue Real-Time-PCR basierte Methode etabliert. Neben konventionellen Primer wurden zwei fluoreszenzmarkierte Sonden (FITC, LC-Red) verwendet, wobei es bei enger räumlicher Nähe zu einer Energieübertragung auf die fluoreszierende LC-Red Sonde kommt. Die Sondenlage wurde so gewählt, dass die detektierende Sonde die N-Region überragt und es

inserierten N-Nukleotiden zu einer erniedrigten Schmelztemperatur kommt. Die genaue Sequenz eingefügter N-Nukleotide wurde durch Sequenzierung der Proben mit erniedrigter Schmelztemperatur überprüft.

7.3 Ergebnisse

Insgesamt wurden 29 erwachsene Probanden untersucht, 13 Atopiker und 16 gesunde Kontrollpersonen.

Der Prozentsatz aller $V\alpha24^+$ Zellen betrug im Median 0,35% (Spannweite: 0,03-1,45%) ohne signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Zwischen der Anzahl aller $V\alpha24^+$ Zellen und $CD8^{dim}$ $V\alpha24^+CD161^+$ Zellen bestand ein statistischer Zusammenhang ($r=0,648$; $p<0,03$; Spearman rho). Bei allen Probanden war die Absolutzahl der $CD4^+$ und DN NKT-Zellen höher als die der $CD8^+$ NKT Zellen. $CD8^{dim}$ NKT-Zellen waren bei den Atopikern tendenziell niedriger. Diese Erniedrigung war jedoch nicht signifikant. Es bestand keine Korrelation zwischen IgE-Spiegeln und NKT-Subtypen bei den Allergikern.

Auch in den molekulargenetischen Untersuchungen fanden sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Die AV24-AJ18/TZR α-Ketten Relation war gleichmäßig zwischen den Probandengruppen verteilt und betrug im Median bei den Allergikern 21,3% und bei den Kontrollen 18,1%.

Der relative Anteil der AV24-AJ18 Transkripte innerhalb aller $AV24^+$ Klone ergab ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung zwischen beiden Probandengruppen ohne statistisch signifikanten Unterschied. Er betrug bei den Atopikern Median 5,3% (Spannweite 6 - 55,3%) und bei den Kontrollen Median 9,4% (Spannweite 6 - 40%). Auch hier bestand keine Korrelation mit Serum IgE-Werten.

Bei der Analyse der N-Region zwischen AV24 und AJ18 mittels FRET und Schmelzkurvenanalyse fand sich bei 16/72 Klonen eine erniedrigte Schmelztemperatur. Vier dieser 16 Klone (zwei von Allergikern und zwei von Kontrollen) wiesen N-Nukleotide auf. Bei drei dieser Klone führte dies zu einer Aminosäuresequenz, die identisch mit der Aminosäuresequenz von NKT-Zellen ohne N-Region war, da gleichzeitig Aminosäuren im AV24-Gen deletiert waren. Nur ein von einem Allergiker stammender Klon zeigte eine abweichende Aminosäuresequenz.

.

7.4 Schlussfolgerung

Mit den beschriebenen Methoden konnten weder auf zellulärer noch auf molekulargenetischer Ebene signifikante, quantitative Unterschiede bei erwachsenen Atopikern und Nicht-Atopikern festgestellt werden. Da Allergien in frühem Kindesalter geprägt werden, ist es jedoch möglich, dass NKT-Zellen in diesem Lebensalter erhöht sind und nach Etablierung eines TH2-Ungleichgewichtes auf ihre Ausgangswerte zurückkehren.

Ein weiterer Untersuchungsansatz zur Klärung der Rolle von NKT-Zellen bei der Atopiegenese wären funktionelle Studien. Weiter ist es möglich, dass sich Veränderungen von NKT-Zellen in peripherem Blut nicht widerspiegeln, sondern nur erkrankte Gewebe wie Lunge oder Haut betreffen.

8 ANHANG

8.1 Literaturverzeichnis

Apostolou,I, A Cumano, G Gachelin, P Kourilsky, 2000, Evidence for two subgroups of $CD4^{-}CD8^{-}$ NKT cells with distinct TCR alpha beta repertoires and differential distribution in lymphoid tissues: J. Immunol., v. 165, p. 2481-2490.

Arase,H, N Arase, K Nakagawa, R A Good, K Onoe, 1993, $NK1.1^{+}$ $CD4^{+}$ $CD8^{-}$ thymocytes with specific lymphokine secretion: Eur. J. Immunol., v. 23, p. 307-310.

Arden,B, S P Clark, D Kabelitz, T W Mak, 1995, Human T-cell receptor variable gene segment families: Immunogenetics, v. 42, p. 455-500.

Assarsson,E, T Kambayashi, J K Sandberg, S Hong, M Taniguchi, L Van Kaer, H G Ljunggren, B J Chambers, 2000, $CD8^{+}$ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo: J. Immunol., v. 165, p. 3673-3679.

Beckman,EM, S A Porcelli, C T Morita, S M Behar, S T Furlong, M B Brenner, 1994, Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha $beta^{+}$ T cells: Nature, v. 372, p. 691-694.

Bendelac,A, R D Hunziker, O Lantz, 1996, Increased interleukin 4 and immunoglobulin E production in transgenic mice overexpressing NK1 T cells: J. Exp. Med., v. 184, p. 1285-1293.

Brossay,L, O Naidenko, N Burdin, J Matsuda, T Sakai, M Kronenberg, 1998, Structural requirements for galactosylceramide recognition by CD1-restricted NK T cells: J. Immunol., v. 161, p. 5124-5128.

Budd,RC, M Schreyer, G C Miescher, H R MacDonald, 1987, T cell lineages in the thymus of lpr/lpr mice. Evidence for parallel pathways of normal and abnormal T cell development: J. Immunol., v. 139, p. 2200-2210.

Bukantz,SC, 2002, Clemens von Pirquet and the concept of allergie: J. Allergy Clin. Immunol., v. 109, p. 724-726.

Chomczynski,P, N Sacchi, 1987, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Anal. Biochem., v. 162, p. 156-159.

D'Andrea,A, D Goux, C De Lalla, Y Koezuka, D Montagna, A Moretta, P Dellabona, G Casorati, S Abrignani, 2000, Neonatal invariant Valpha24^{+} NKT lymphocytes are activated memory cells: Eur. J. Immunol., v. 30, p. 1544-1550.

Davis,MM, P J Bjorkman, 1988, T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition: Nature, v. 334, p. 395-402.

Davodeau,F, M A Peyrat, A Necker, R Dominici, F Blanchard, C Leget, J Gaschet, P Costa, Y Jacques, A Godard, H Vie, A Poggi, F Romagne, M Bonneville, 1997, Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains: J. Immunol., v. 158, p. 5603-5611.

Dellabona,P, E Padovan, G Casorati, M Brockhaus, A Lanzavecchia, 1994, An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4^{-}8^{-} T cells: J. Exp. Med., v. 180, p. 1171-1176.

Denkers,EY, T Scharton-Kersten, S Barbieri, P Caspar, A Sher, 1996, A role for CD4^{+} NK1.1^{+} T lymphocytes as major histocompatibility complex class II independent helper cells in the generation of CD8+ effector function against intracellular infection: J. Exp. Med., v. 184, p. 131-139.

Der Vliet,HJ, N Nishi, T D de Gruijl, B M von Blomberg, A J van den Eertwegh, H M Pinedo, G Giaccone, R J Scheper, 2000, Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth: Blood, v. 95, p. 2440-2442.

Doherty,DG, S Norris, L Madrigal-Estebas, G McEntee, O Traynor, J E Hegarty, C O'Farrelly, 1999, The human liver contains multiple populations of NK cells, T cells, and $CD3^+CD56^+$ natural T cells with distinct cytotoxic activities and Th1, Th2, and Th0 cytokine secretion patterns: J. Immunol., v. 163, p. 2314-2321.

Emoto,M, Y Emoto, I B Buchwalow, S H Kaufmann, 1999, Induction of IFN-gamma-producing $CD4^+$ natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin: Eur. J. Immunol., v. 29, p. 650-659.

Emoto,M, J Zerrahn, M Miyamoto, B Perarnau, S H Kaufmann, 2000, Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells: Eur. J. Immunol., v. 30, p. 2300-2311.

Exley,M, J Garcia, S P Balk, S Porcelli, 1997, Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24$^+$ $CD4^-CD8^-$ T cells: J. Exp. Med., v. 186, p. 109-120.

Flesch,IE, A Wandersee, S H Kaufmann, 1997, IL-4 secretion by $CD4^+$ $NK1^+$ T cells induces monocyte chemoattractant protein-1 in early listeriosis: J. Immunol., v. 159, p. 7-10.

Fowlkes,BJ, A M Kruisbeek, H Ton-That, M A Weston, J E Coligan, R H Schwartz, D M Pardoll, 1987, A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family: Nature, v. 329, p. 251-254.

Gereda,JE, D Y Leung, A Thatayatikom, J E Streib, M R Price, M D Klinnert, A H Liu, 2000, Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma: Lancet, v. 355, p. 1680-1683.

Gollob,KJ, R L Coffman, 1994, A minority subpopulation of CD4+ T cells directs the development of naive $CD4^+$ T cells into IL-4-secreting cells: J. Immunol., v. 152, p. 5180-5188.

Gounni,AS, B Lamkhioued, L Koussih, C Ra, P M Renzi, Q Hamid, 2001, Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI): role in asthma: FASEB J., v. 15, p. 940-949.

Gounni,AS, B Lamkhioued, K Ochiai, Y Tanaka, E Delaporte, A Capron, J P Kinet, M Capron, 1994, High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites: Nature, v. 367, p. 183-186.

Gruber,R, C Reiter, G Riethmuller, 1993, Triple immunofluorescence flow cytometry, using whole blood, of $CD4^+$ and $CD8^+$ lymphocytes expressing CD45RO and CD45RA: J. Immunol. Methods, v. 163, p. 173-179.

Hammond,KJ, S B Pelikan, N Y Crowe, E Randle-Barrett, T Nakayama, M Taniguchi, M J Smyth, I R van Driel, R Scollay, A G Baxter, D I Godfrey, 1999, NKT cells are phenotypically and functionally diverse: Eur. J. Immunol., v. 29, p. 3768-3781.

Han,M, L Harrison, P Kehn, K Stevenson, J Currier, M A Robinson, 1999, Invariant or highly conserved TCR alpha are expressed on double-negative ($CD3^+CD4^-CD8^-$) and CD8+ T cells: J. Immunol., v. 163, p. 301-311.

Haskins,K, R Kubo, J White, M Pigeon, J Kappler, P Marrack, 1983, The major histocompatibility complex-restricted antigen receptor on T cells. I. Isolation with a monoclonal antibody: J. Exp. Med., v. 157, p. 1149-1169.

Hong,S, D C Scherer, N Singh, S K Mendiratta, I Serizawa, Y Koezuka, L Van Kaer, 1999, Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout mice: Immunol. Rev., v. 169, p. 31-44.

Illes,Z, T Kondo, J Newcombe, N Oka, T Tabira, T Yamamura, 2000, Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: J. Immunol., v. 164, p. 4375-4381.

Ishikawa,H, H Hisaeda, M Taniguchi, T Nakayama, T Sakai, Y Maekawa, Y Nakano, M Zhang, T Zhang, M Nishitani, M Takashima, K Himeno, 2000, CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with Leishmania major: Int. Immunol., v. 12, p. 1267-1274.

Janeway,CA, Jr., 1997, Immunology.

Janeway,CA, Jr., 2001, How the immune system protects the host from infection: Microbes. Infect., v. 3, p. 1167-1171.

Joyce,S, A S Woods, J W Yewdell, J R Bennink, A D De Silva, A Boesteanu, S P Balk, R J Cotter, R R Brutkiewicz, 1998, Natural ligand of mouse CD1d1: cellular glycosylphosphatidylinositol: Science, v. 279, p. 1541-1544.

Kawano,T, J Cui, Y Koezuka, I Toura, Y Kaneko, K Motoki, H Ueno, R Nakagawa, H Sato, E Kondo, H Koseki, M Taniguchi, 1997, CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides: Science, v. 278, p. 1626-1629.

Kinet,JP, 1999, The high-affinity IgE receptor (Fc epsilon RI): from physiology to pathology: Annu. Rev. Immunol., v. 17, p. 931-972.

Kojo,S, Y Adachi, H Keino, M Taniguchi, T Sumida, 2001, Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18^{+}, BV11^{+} double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases: Arthritis Rheum., v. 44, p. 1127-1138.

Koop,BF, L Hood, 1994, Striking sequence similarity over almost 100 kilobases of human and mouse T-cell receptor DNA: Nat. Genet., v. 7, p. 48-53.

Korsgren,M, C G Persson, F Sundler, T Bjerke, T Hansson, B J Chambers, S Hong, L Van Kaer, H G Ljunggren, O Korsgren, 1999, Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice: J.Exp.Med., v. 189, p. 553-562.

Laloux,V, L Beaudoin, D Jeske, C Carnaud, A Lehuen, 2001, NK T cell-induced protection against diabetes in V alpha 14-J alpha 281 transgenic nonobese diabetic mice is associated with a Th2 shift circumscribed regionally to the islets and functionally to islet autoantigen: J. Immunol., v. 166, p. 3749-3756.

Lantz,O, A Bendelac, 1994, An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific $CD4^+$ and $CD4^-8^-$ T cells in mice and humans: J. Exp. Med., v. 180, p. 1097-1106.

Leite-De-Moraes,MC, A Herbelin, J M Gombert, A Vicari, M Papiernik, M Dy, 1997, Requirement of IL-7 for IL-4-producing potential of MHC class I-selected CD4-CD8- TCR alpha beta+ thymocytes: Int. Immunol., v. 9, p. 73-79.

Leite-De-Moraes,MC, G Moreau, A Arnould, F Machavoine, C Garcia, M Papiernik, M Dy, 1998, IL-4-producing NK T cells are biased towards IFN-gamma production by IL-12. Influence of the microenvironment on the functional capacities of NK T cells: Eur. J. Immunol., v. 28, p. 1507-1515.

Loza,MJ, L S Metelitsa, B Perussia, 2002, NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production: Eur. J. Immunol., v. 32, p. 3453-3462.

Maeda,T, H Keino, H Asahara, M Taniguchi, K Nishioka, T Sumida, 1999, Decreased TCR AV24AJ18$^+$ double-negative T cells in rheumatoid synovium: Rheumatology.(Oxford), v. 38, p. 186-188.

Magnan,A, L Mely, S Prato, D Vervloet, F Romagne, C Camilla, A Necker, B Casano, F Montero-Jullian, V Fert, B Malissen, P Bongrand, 2000, Relationships between natural T cells, atopy, IgE levels, and IL-4 production: Allergy, v. 55, p. 286-290.

Makino,Y, N Yamagata, T Sasho, Y Adachi, R Kanno, H Koseki, M Kanno, M Taniguchi, 1993, Extrathymic development of V alpha 14-positive T cells: J. Exp. Med., v. 177, p. 1399-1408.

Matsuura,A, M Kinebuchi, H Z Chen, S Katabami, T Shimizu, Y Hashimoto, K Kikuchi, N Sato, 2000, NKT cells in the rat: organ-specific distribution of NK T cells expressing distinct V alpha 14 chains: J. Immunol., v. 164, p. 3140-3148.

Mempel,M, B Flageul, F Suarez, C Ronet, L Dubertret, P Kourilsky, G Gachelin, P Musette, 2000, Comparison of the T cell patterns in leprous and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire: Am. J. Pathol., v. 157, p. 509-523.

Meuer,SC, D A Cooper, J C Hodgdon, R E Hussey, K A Fitzgerald, S F Schlossman, E L Reinherz, 1983, Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes: Science, v. 222, p. 1239-1242.

Oishi,Y, A Sakamoto, K Kurasawa, H Nakajima, A Nakao, N Nakagawa, E Tanabe, Y Saito, I Iwamoto, 2000, $CD4^{-}CD8^{-}$ T cells bearing invariant Valpha24JalphaQ TCR alpha-chain are decreased in patients with atopic diseases: Clin. Exp. Immunol., v. 119, p. 404-411.

Pied,S, J Roland, A Louise, D Voegtle, V Soulard, D Mazier, P A Cazenave, 2000, Liver $CD4^{-}CD8^{-}$ $NK1.1^{+}$ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro: J. Immunol., v. 164, p. 1463-1469.

Pirquet,Cv.,1906, Allergie: Munch Med Wschr., v. 30, p. 1457-1458.

Porcelli,S, D Gerdes, A M Fertig, S P Balk, 1996, Human T cells expressing an invariant V alpha 24-J alpha Q TCR alpha are $CD4^{-}$ and heterogeneous with respect to TCR beta expression: Hum. Immunol., v. 48, p. 63-67.

Porcelli,S, C T Morita, M B Brenner, 1992, CD1b restricts the response of human $CD4^{-}8^{-}$ T lymphocytes to a microbial antigen: Nature, v. 360, p. 593-597.

Porcelli,S, C E Yockey, M B Brenner, S P Balk, 1993, Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood $CD4^-8^-$ alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain: J. Exp. Med., v. 178, p. 1-16.

Porcelli,SA, R L Modlin, 1999, The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids: Annu. Rev. Immunol., v. 17, p. 297-329.

Prigozy,TI, P A Sieling, D Clemens, P L Stewart, S M Behar, S A Porcelli, M B Brenner, R L Modlin, M Kronenberg, 1997, The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules: Immunity., v. 6, p. 187-197.

Prussin,C, B Foster, 1997, TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation: J. Immunol., v. 159, p. 5862-5870.

Ra,C, M H Jouvin, U Blank, J P Kinet, 1989, A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit: Nature, v. 341, p. 752-754.

Reinhardt,C, A Melms, 1999, Elevated frequencies of natural killer T lymphocytes in myasthenia gravis: Neurology, v. 52, p. 1485-1487.

Ring,J, 2005, Klinik und Einteilung allergischer Erkrankungen. Geschichliche Entwicklung., Angewandte Allergologie.

Schofield,L, M J McConville, D Hansen, A S Campbell, B Fraser-Reid, M J Grusby, S D Tachado, 1999, CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells: Science, v. 283, p. 225-229.

Sieling,PA, D Chatterjee, S A Porcelli, T I Prigozy, R J Mazzaccaro, T Soriano, B R Bloom, M B Brenner, M Kronenberg, P J Brennan, ., 1995, CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens: Science, v. 269, p. 227-230.

Sugita,M, R M Jackman, E van Donselaar, S M Behar, R A Rogers, P J Peters, M B Brenner, S A Porcelli, 1996, Cytoplasmic tail-dependent localization of CD1b antigen-presenting molecules to MIICs: Science, v. 273, p. 349-352.

Takahashi,T. K Nakamura, S Chiba, Y Kanda, K Tamaki, H Hirai, 2003, V alpha 24^{+} natural killer T cells are markedly decreased in atopic dermatitis patients: Hum. Immunology, v. 64, p. 586-592.

Trop,S, Y Ilan, 2002, NK 1.1^{+} T cell: a two-faced lymphocyte in immune modulation of the IL-4/IFN-gamma paradigm: J. Clin. Immunol., v. 22, p. 270-280.

von Mutius,E, C Braun-Fahrlander, R Schierl, J Riedler, S Ehlermann, S Maisch, M Waser, D Nowak, 2000, Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy: Clin. Exp. Allergy, v. 30, p. 1230-1234.

Wilson,SB, S C Kent, K T Patton, T Orban, R A Jackson, M Exley, S Porcelli, D A Schatz, M A Atkinson, S P Balk, J L Strominger, D A Hafler, 1998, Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes: Nature, v. 391, p. 177-181.

Yoshimoto,T, A Bendelac, J Hu-Li, W E Paul, 1995, Defective IgE production by SJL mice is linked to the absence of $CD4^{+}$, NK1.1^{+} T cells that promptly produce interleukin 4: Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A, v. 92, p. 11931-11934.

Yoshimoto,T, W E Paul, 1994, CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3: J.Exp.Med., v. 179, p. 1285-1295.

Zhang,Y, K H Rogers, D B Lewis, 1996, Beta 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses: J. Exp. Med., v. 184, p. 1507-1512.

Zlotnik,A, D I Godfrey, M Fischer, T Suda, 1992, Cytokine production by mature and immature $CD4^{-}CD8^{-}$ T cells. Alpha beta-T cell receptor^{+} $CD4^{-}CD8^{-}$ T cells produce IL-4: J. Immunol., v. 149, p. 1211-1215.

8.2 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlichst bei allen bedanken, die mir beim Zustandekommen und Realisieren dieser Arbeit geholfen haben.

Meiner Betreuerin, Frau Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann, danke ich ganz besonders für die langjährig bestehende Beschäftigung in ihrem Forschungslabor, die Heranführung an das umfangreiche und vielseitige Gebiet der Immunologie und die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas. Unter ihrer Anleitung und engagierten Betreuung erlernte ich das kritische Interpretieren, Präsentieren und Publizieren wissenschaftlicher Daten auf internationaler Ebene. Ihr Optimismus half mir nach manchen von Fehlschlägen geprägten Versuchswochen nie die Freude an der Forschung zu verlieren. Ich bin ihr für all das zu großem Dank verbunden.

Herrn Prof. Dr. D. Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Arbeit im Labor für Molekulare Allergologie und in den Laboratorien der AG Pädiatrische Immunologie am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Einen ganz speziellen Dank gilt Frau Professor Christine Bender-Götze für das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit. Ihre freundliche, hilfsbereite und geduldige Art half mir aus mancher frustranen Situationen heraus. Ohne ihrer treibenden Kraft, wäre diese Arbeit nicht erfolgreich zum Abschluss gekommen.

Ganz herzlichen Dank möchte ich Frau Christine Federle für die Einführung in die labortechnischen Methoden der Molekularbiologie aussprechen. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.

Herrn Bernhard Frankenberger aus dem GSF-Institut für molekulare Immunologie danke ich für die Einarbeitung in die Methodik der Real-Time RT-PCR und seinen kritischen Rat.

Bei meinen Kollegen unserer Forschungsgruppe Christine Prell und Dominic Hartl, möchte ich mich für die vielen netten Stunden im Labor und für Ihre Hilfestellungen bedanken.

Bei meiner Familie und besonders bei meinen Eltern, die mir durch ihre ununterbrochene Förderung, Unterstützung und Zuneigung das Medizinstudium und damit diese Promotion erst ermöglicht haben, möchte ich mich besonders bedanken.

Mein größter Dank an dieser Stelle gilt meiner Frau Ana Luisa und meiner Tochter Elisabet Maria, die bei jeder Gemütsschieflage für den notwendigen seelischen Ausgleich sorgten und ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

8.3 Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	04.11.1970
Geburtsort	Erlenbach/Main
Staatsangehörigkeit	griechisch
Familienstand	verheiratet
Wohnort	Implerstr. 57
	81371 München

Schulbildung

1976-1982	Grundschule Veria/Griechenland
1983-1989	Gymnasium Athen/Griechenland

Studium

11/1989	Immatrikulation an der LMU München
08/1992	Ärztliche Vorprüfung
08/1994	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/1996	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/1997	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

1.Tertial Innere Medizin: Medizinische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

2.Tertial Chirurgie: Kinderchirurgische Klinik der Universität von Athen und Chirurgische Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

3.Tertial Pädiatrie: Kinderklinik und Kinderpoliklinik am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München

Assistenzarzt

seit 02/1999 Kinderklinik und Poliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München