

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

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. D. Reinhardt

&

Helmholtz Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit

**Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten und Unterschiede der N-Region
von NKT-Zellen bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr**



Dissertation

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

vorgelegt von

Matthias Thomas Janta

aus Würzburg

2009

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

Berichterstatter: PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernhard Przybilla

Priv. Doz. Dr. David Vöhringer

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Christine Prell

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

Tag der

mündlichen Prüfung: 12.03.2009

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Th1-/Th2-Zell-Paradigma	1
1.2 T-Helfer-Zellen	2
1.2.1 Differenzierung von CD4 ⁺ T-Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen	2
1.2.2 Th1-Zellen	3
1.2.3 Th2-Zellen	5
1.2.4 Kreuzregulation der Th1- und Th2-Zellen	6
1.3 NKT-Zellen	9
1.3.1 T-Zell-Rezeptor	9
1.3.2 Phänotyp	11
1.3.3 Nomenklatur und Definitionen	13
1.3.4 Entwicklung	13
1.3.5 Produktion und Sekretion von Zytokinen	15
1.3.6 Antigene und Liganden des T-Zell-Rezeptors	16
1.3.7 NKT-Zellen und Asthma	19
1.3.8 NKT-Zellen und atopische Dermatitis	21
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	22
1.4.1 Vorversuche der Arbeitsgruppe	22
1.4.2 Zielsetzung	23
2 Methoden	24
2.1 Probanden	24
2.2 Definitionen	25
2.3 Übersicht der molekularbiologischen Analysen	26
2.4 mRNA-Extraktion	27
2.5 cDNA-Synthese	27
2.6 PCR	29
2.7 Ligation	30
2.8 Transformation	32
2.9 Spezifische V α 24-J α 18 PCR	34
2.10 PCR Kontrollreaktion	35
2.11 Gelelektrophorese	35
2.12 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer	37
2.13 Sequenzierung	40

2.14	Statistik.....	41
3	Material	42
3.1	Geräte	42
3.2	Verbrauchsmaterialien	43
3.3	Chemikalien	43
3.4	Lösungen und Puffer	46
3.5	Oligonukleotide	48
3.5.1	Molekulargewichtsmarker	48
3.5.2	Oligonukleotidprimer	48
3.6	Enzyme und Reagenzienkits.....	48
3.7	Zellen	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Proben.....	49
4.2	Charakterisierung der Atopiker	52
4.3	Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten in AV24 ⁺ Klonen bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr	53
4.4	Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten mit N-Region in AV24 ⁺ Klonen bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr	55
4.5	Zusammenhang zwischen Frequenz an AV24-AJ18 Transkripten, dem Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region und dem elterlichen Atopiestatus	56
4.6	Zusammenhang zwischen der Frequenz an AV24-AJ18 Transkripten, dem Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region und IgE-Serumspiegeln	58
4.7	TZR-Sequenzanalysen	59
4.7.1	Unterschiede zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern.....	60
4.7.2	Aminosäuremuster im longitudinalen Verlauf.....	61
5	Diskussion.....	63
	Kurzfassung.....	68
	Schlagwörter.....	69
	Anhang.....	70
	Danksagungen.....	75
	Literaturverzeichnis	76
	Abbildungsverzeichnis	101
	Tabellenverzeichnis	102
	Eidesstattliche Erklärung	103
	Lebenslauf	104

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
°C	Grad Celsius
Ag	Antigen
AK	Antikörper
BP	Bromphenolblau
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	Complementarity Determing Region
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DN	Doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Di-Natriummethyldiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorter
FITC	Fluorescein Isothyocyanat
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
GT	Guanidinthioisocyanat
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
LB	Lysogeny broth
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min.	Minute
n/a	nicht zutreffend
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NKR-P	Natürlicher Killer Rezeptor Protein
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen

NS	Zeitpunkt der Blutabnahme: Geburt
NSB	Nabelschnurblut
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
RAST	Radio Allergo Sorbent Test
RNA	Reoxyribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SOB	Salt-optimized broth
SOC	Salt-optimized + carbon broth
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Th1	T-Helfer-Zellen vom Typ 1
Th2	T-Helfer-Zellen vom Typ 2
TZR	T-Zell-Rezeptor
V2	Zeitpunkt der Blutabnahme: Nach dem 4. Lebensmonat
V4	Zeitpunkt der Blutabnahme: Nach dem 12. Lebensmonat
V8	Zeitpunkt der Blutabnahme: Nach dem 36. Lebensmonat
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid

1 Einleitung

1.1 Th1-/Th2-Zell-Paradigma

Der Begriff Allergie wurde im Jahre 1906 von Clemens von Pirquet (Pirquet C von, 1906; Budd RC et al., 1987) als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“, definiert. Heute versteht man unter einer Allergie eine überschießende Abwehrreaktion des Immunsystems auf bestimmte und normalerweise harmlose Umweltstoffe.

Allergische Reaktionen treten auf, wenn ein Individuum, das als Antwort auf einen Kontakt mit einem Antigen IgE-Antikörper (IgE-AK) produziert hat, erneut mit demselben Antigen in Berührung kommt. Dann binden IgE-AK über hochaffine Fc-Rezeptoren an im Gewebe befindliche Mastzellen (Ra C et al., 1997), eosinophile Granulozyten (Gounni AS et al., 1994), neutrophile Granulozyten (Gounni AS et al., 2001) und an zirkulierende basophile Granulozyten (Kinet JP, 1999), die hierdurch aktiviert werden.

Nach heutigem Kenntnisstand sind an der Entstehung von allergischen Erkrankungen verschiedenen genetischen Faktoren, der Atopiestatus der Eltern (Poysa L et al., 1989) sowie positiv und negativ beitragenden Umweltfaktoren (Strachan DP, 1999; Burr ML et al., 1989; Braun-Fahrländer C et al., 1999; Kaiser HB, 2004) beteiligt. Dies alles beeinflusst das Gleichgewicht zwischen T-Helfer-Zellen.

T-Helfer-Zellen sind eine Lymphozytensubpopulation bei denen insbesondere zwei Typen, T-Helfer-Zellen vom Typ 1 (Th1-Zellen) und T-Helfer-Zellen vom Typ 2 (Th2-Zellen), mit charakteristischer Zytokinproduktion und Funktionalität unterschieden werden (Mosmann TR et al., 1986). Th2-Zellen produzieren Interleukine, die die allergische Immunantwort verstärken. Erhöhte Mukusproduktion und Atemwegshyperaktivität – beides bedeutende Charakteristika des Asthmas – werden durch das von ihnen sezernierte IL-13 hervorgerufen (Wills-Karp M, 1999; Umetsu DT et al., 2002).

Da zwischen Th1- und Th2-Zellen eine Kreuzregulation existiert, wurde lange angenommen, dass Th1-Zellen den Einfluss von Th2-Zellen auf atopische Erkrankungen reduzieren können und somit einen positiven Effekt auf zum Beispiel Asthma haben (Fernandez-Botran R et al., 1988). Es zeigte sich jedoch, dass Th1-Zellen auch pro-inflammatorische Effekte aufweisen und, dass die Entwicklung einer Th1-assoziierten Immunreaktion sogar zur Exazerbation von atopischen Erkrankungen führen kann (Han M et al., 1999).

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wird deutlich, dass die erhöhte Atopieprävalenz nicht alleine durch eine allgemeine Reduktion der Th1-assoziierten Elemente erklärt werden kann; es muss neben der Th1-Antwort auch andere Elemente des Immunsystems geben, die an der Entwicklung von atopischen Erkrankungen beteiligt sind. In diesem Zusammenhang wird häufig von regulatorischen T-Zellen gesprochen, die u. a. die Funktion anderer Immunzellen kontrollieren. Zu den regulatorischen T-Zellen gehören auch die NKT-Zellen, die über Zytokinsekretion das Th1-Th2-Gleichgewicht beeinflussen.

Im Folgenden wird zunächst auf die T-Helfer-Zellen und dann auf die regulatorischen T-Zellen mit Fokus auf NKT-Zellen eingegangen.

1.2 T-Helfer-Zellen

T-Helfer-Zellen sind eine CD4⁺ Subpopulation reifer Lymphozyten und lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Th1- und Th2-Zellen. Sie unterscheiden sich in der Expression der Oberflächenmoleküle und ihrer Funktionalität.

1.2.1 Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1- oder Th2-Zellen

In den peripheren lymphatischen Geweben wird mit dem Erstkontakt zwischen naiven CD4⁺ Lymphozyten und Ag-präsentierenden Zellen ein wesentlicher Schritt der adaptiven Immunantwort eingeleitet: Die Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen entscheidet, ob die Makrophagenaktivierung oder die Antikörperproduktion dominiert (Pfeiffer C et al., 1991).

Die IL-4 vermittelte Th2-Differenzierung tritt als Konsequenz auf bestimmte Umweltfaktoren, wie Allergene und Helminthen, auf (Romagnani S, 1994; Akdis CA et al., 2004). Bisher ist nicht geklärt, woher das IL-4 in dieser frühen Phase der Immunantwort – noch bevor sich die IL-4 sezernierenden Th2-Zellen entwickelt haben – stammt. Mögliche Quellen sind Mastzellen und basophile Granulozyten (Bradding P et al., 1994), die unter anderem IL-4 sezernieren, nachdem sie über Fc-Rezeptoren stimuliert wurden; aber auch dendritische Zellen (Chang CC et al., 2000) und NKT-Zellen (Bendelac A et al., 1995) sezernieren IL-4 und kommen als Quellen Frage.

Im Gegensatz zur Th2-Differenzierung findet die Ausreifung der $CD4^+$ Zelle zur Th1-Zelle unter dem Einfluss von IL-12, das von Ag-präsentierenden Zellen sezerniert wird, statt (Vries JE de et al., 1999). Da Makrophagen und NK-Zellen in der frühen Phase der Immunreaktion gegen Viren und einige intrazelluläre Bakterien IL-12 und IFN- γ ausschütten, herrschen bei solchen Infektionen die inflammatorischen Th1-Zellen vor (vgl. Abbildung 1-1).

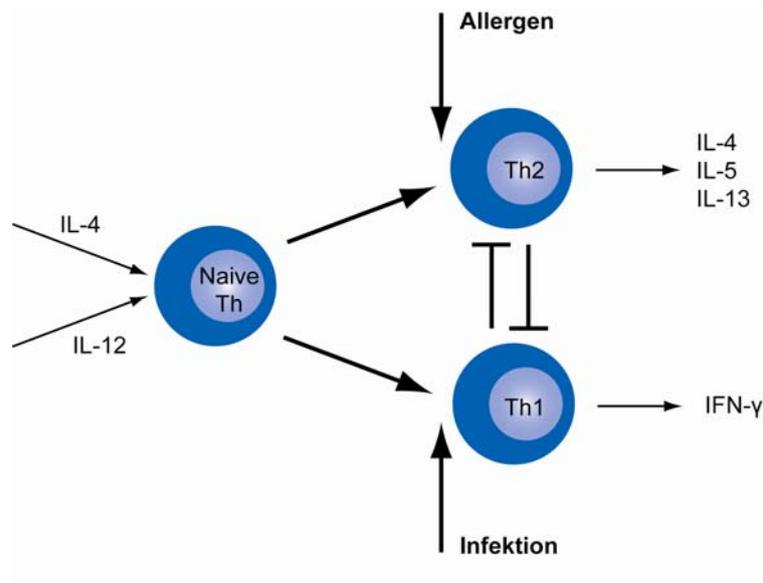


Abbildung 1-1: Differenzierung der naiven T-Zelle zur Th1- oder Th2-Zelle

Quelle: In Anlehnung an Ngoc LP et al., 2005, S. 162

1.2.2 Th1-Zellen

Th1-Zellen sind auf die Aktivierung des zellulären Teils der Immunantwort spezialisiert. Sie produzieren überwiegend IFN- γ , IL-2 und IL-3. Bei Sekretion kommt es zur Aktivierung von Makrophagen und $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (Del Prete G, 1992). Auf der Zelloberfläche der Th1-Zellen befinden sich der TZR, der CD40 Ligand zur Interaktion mit Ag-präsentierenden Zellen und unter anderem Rezeptoren für IL-4, IL-10, IL-12 und IFN- γ (Rogge L et al., 1997). Experimente *in vitro* haben gezeigt, dass sich durch IL-12 und IFN- γ stimulierte, naive $CD4^+$ T-Zellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit zu Th1- als zu Th2-Zellen entwickeln (Germann T et al., 1993).

Th1-Zellen aktivieren Makrophagen über zwei Signale: Durch Zytokinsekretion und durch direkten Kontakt. Das sezernierte IFN- γ bindet an den IFN- γ -Rezeptoren der Makrophagen und aktiviert die monozytären Zellen, unterstützt durch die direkte Interaktion zwischen dem CD40 Liganden der Th1-Zellen und dem CD40 Rezeptor der Makrophagen (vgl. Abbildung 1-2).

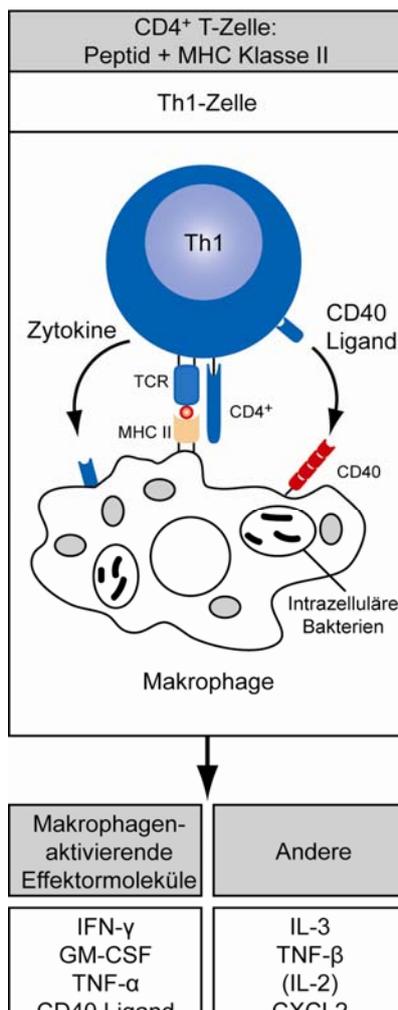


Abbildung 1-2: Übersicht Th1-Zelle mit Effektormolekülen

Quelle: In Anlehnung an Janeway CA et al., 2005, S. 347

Außerdem erhöhen Th1-Zellen die Proliferation von Monozyten im Knochenmark durch Stimulation der hämatopoetischen Stammzellen (IL-3 und GM-CSF), zum anderen sezernieren sie Zytokine, die die Expression von endothelialen Oberflächenproteinen unterstützen (TNF- β und MCF), so dass eine Adhäsion an das Gewebe und eine Migration in das Gewebe möglich wird. Zuletzt dirigieren sie durch Zytokine die chemotaktische Migration der monozytären Zellen zum Infektionsort (MCF und MIF). Neben den Monozyten werden auch zytotoxische T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen durch Th1-Zellen stimuliert (Croft M et al., 1997).

1.2.3 Th2-Zellen

Th2-Zellen sind auf die Aktivierung des humoralen Teils der Immunantwort spezialisiert. Sie sind unter anderem durch die Produktion von IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 charakterisiert (Del Prete G, 1992; Mosmann TR, 1993), wobei insbesondere IL-4 die B-Zell-Proliferation und -Reifung stimuliert (Croft M et al., 1997). Rezeptoren und Oberflächenmoleküle sind der TZR, der CD40 Ligand sowie unter anderem Rezeptoren für IL-4, IL-10. Th2-Zellen interagieren mit B-Zellen, wenn sie auf deren Oberfläche den geeigneten Peptid-MHC-II-Komplex erkennen. Wenn die Th2-Zelle und B-Zelle über Verbindungen zwischen dem TZR und dem MHC-II-Ag-Komplex einerseits und dem CD40 Ligand und CD40 andererseits verbunden sind, wird IL-4 von den Th2-Zellen direkt zur Kontaktstelle mit der B-Zelle sezerniert (vgl. Abbildung 1-3).

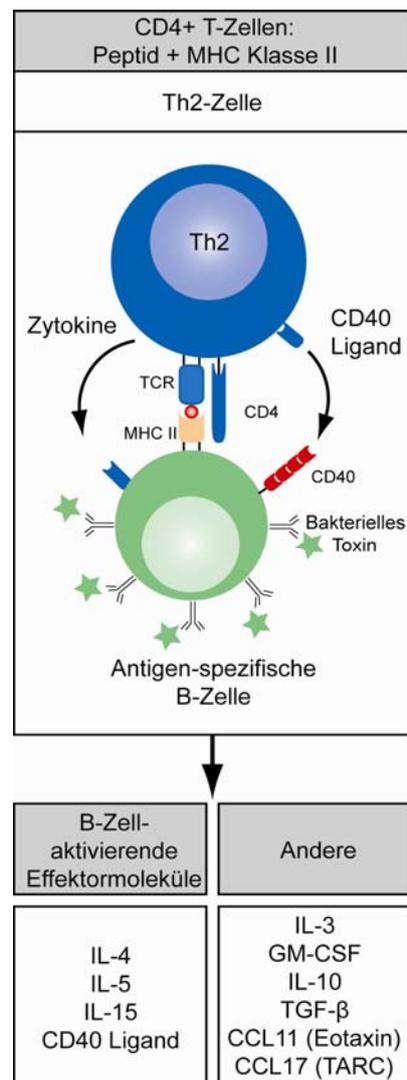


Abbildung 1-3: Übersicht Th2-Zelle mit Effektormolekülen

Quelle: In Anlehnung an Janeway CA et al., 2005, S. 347

IL-4 stimuliert die Th2- und B-Zell-Proliferation, sowie die B-Zell-Reifung und den „Ig-Isotyp-switch“ von IgM zu IgE und IgG1 (Croft M et al., 1997). Die Bedeutung von IL-4 wird bei Mäusen mit IL-4 Defizit deutlich; diese weisen ein Immundefizit mit eingeschränkter Fähigkeit zur IgE-Produktion auf (Brusselle GG et al., 1994).

Das ebenfalls sezernierte IL-5 führt neben der B-Zell-Proliferation auch zur Ausreifung der eosinophilen Granulozyten, die IgE produzieren. IL-9 bewirkt eine verstärkte Mastzelldifferentenzierung und IL-13 eine erhöhte Mukusproduktion in den Atemwegen sowie eine Atemwegshyperreagibilität (Wills-Karp M, 1999; Umetsu DT et al., 2002).

1.2.4 Kreuzregulation der Th1- und Th2-Zellen

Durch antagonistische Effekte der von Th1- und Th2-Zellen sezernierten Zytokine wird die Immunantwort gezielt entweder in Richtung Makrophagenaktivierung oder B-Zellstimulation dirigiert. Die initiale Richtung der Immunantwort der T-Helfer-Zellen wird durch gekoppelte Wirkungsmechanismen, insbesondere der Zytokine IL-10, TGF- β und IFN- γ , polarisiert (Fernandez-Botran R et al., 1988; Ouyang W et al., 1998).

Das von Th1-Zellen sezernierte IFN- γ wirkt inhibierend auf die Th2-Zell-Proliferation. Th2-Zellen sezernieren TGF- β und IL-10 und hemmen somit die Th1-Zell-Aktivität und deren Proliferation. IL-10 reduziert die von Makrophagen abhängige Aktivierung von Th1-Zellen – wahrscheinlich durch Blockade der IL-12 Synthese – und das direkt auf Th1-Zellen wirkende TGF- β inhibiert deren Proliferation. Verstärkt wird diese Kreuzregulation durch positive Feedback-Mechanismen: Das von Th2-Zellen sezernierte IL-4 regt diese selbst zur Proliferation an und das von Th1-Zellen sezernierte IL-12 aktiviert dendritische Zellen und fördert damit die Differenzierung von Th0- zu Th1-Zellen (vgl. Abbildung 1-4).

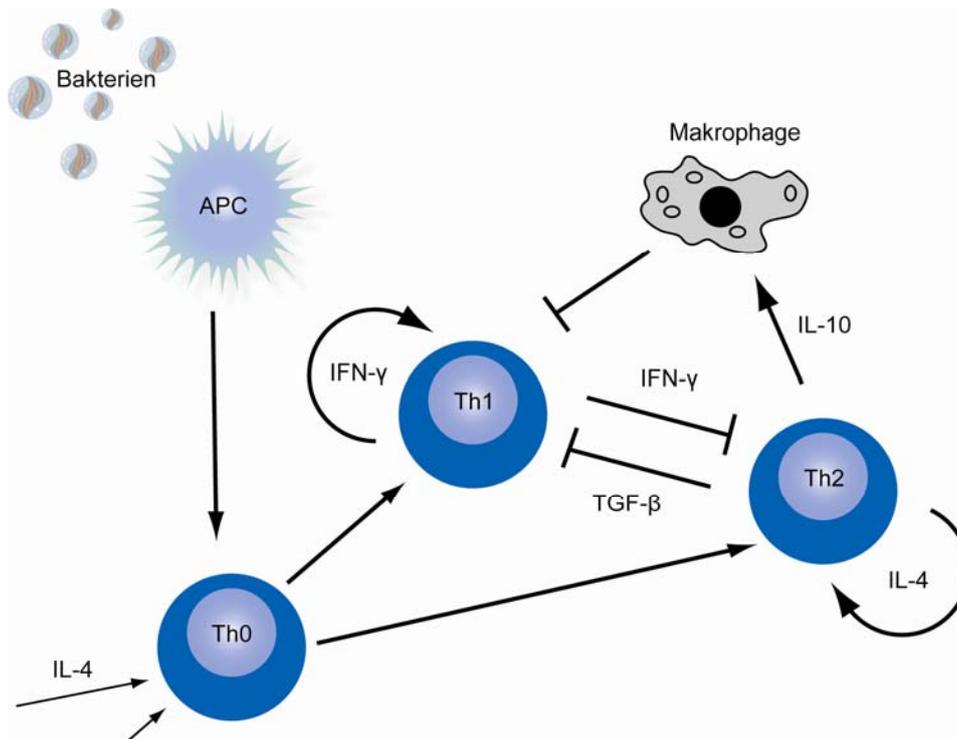


Abbildung 1-4: Kreuzregulation der Th1- und Th2-Zelle

Allergen-spezifische Th2-Zellen scheinen eine bedeutende Rolle bei atopischen Erkrankungen zu spielen. Über IL-4 induzieren sie die Produktion von IgE und stimulieren so die Proliferation, Differenzierung und Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Zusätzlich gelten die von Th2-Zellen sezernierten IL-3 und IL-4 als Mastzell-Wachstumsfaktoren (Del Prete G, 1992). Charakteristika des Asthmas, d. h. bronchiale Hyperreagibilität und eine erhöhte Mukusproduktion, werden durch das von den Th2-Zellen sezernierte IL-13 hervorgerufen (Wills-Karp M, 1999; Umetsu DT et al., 2002).

Hieraus wurde die Annahme abgeleitet, dass ein Th1-Th2-Ungleichgewicht mit Verschiebung in Richtung der Th2-Immunantwort zur Entstehung von atopischen Erkrankungen führen könne (vgl. Abbildung 1-5:).

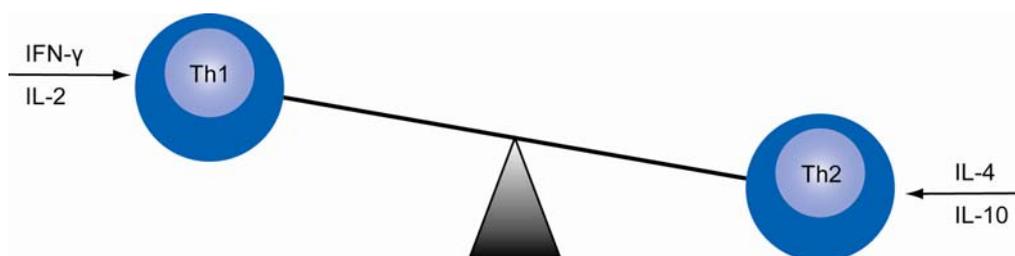


Abbildung 1-5: Th1-Th2-Ungleichgewicht bei atopischen Erkrankungen

Studien zeigen, dass eine Verschiebung der Th1-Th2-Balance zu Gunsten der Th2-Immunantwort über Zytokine zu einer erhöhten Zahl von Th2-Zellen im peripheren Blut sowie in Hautläsionen von Patienten mit Neurodermitis (Heijden FL van der et al., 1991), in Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis (Mucha SM et al., 2003) und in Schleimhaut der Luftwege von Asthmapatienten (Renauld JC, 2001) führt.

Die hohe Kapazität von NKT-Zellen für die IL-4-Produktion hat zu der Hypothese geführt, dass NKT-Zellen die Differenzierung von Th2-Zellen begünstigen (Laloux V et al., 2001). Ergebnisse neuerer Studien mit NKT-defizienten Mäusen bestätigen die Vermutung jedoch nicht (Hong S et al., 1999).

Das Gleichgewicht der Th1- und Th2-Zellen wird durch ein Netzwerk verschiedenster regulatorischer Zellen beeinflusst. Zur heterogenen Familie der regulatorischen T-Zellen gehören unter anderem Th3-Zellen, T_R -Zellen, $CD4^+CD25^+$ Zellen und NKT-Zellen. Sie scheinen eine Rolle bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen sowie Transplantatabstoßungen zu spielen und könnten auch eine Bedeutung bei der Genese von Allergien und Asthma haben. Während Th3-Zellen, T_R -Zellen, $CD4^+CD25^+$ Zellen eine inhibierende Wirkung auf T-Effektorzellen haben, können NKT-Zellen deren Differenzierung und Entwicklung stimulieren (vgl. Abbildung 1-6).

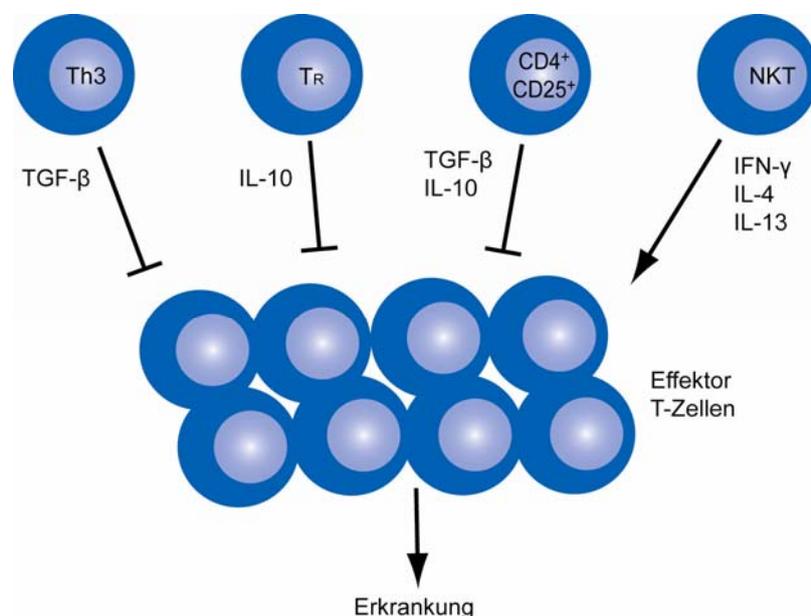


Abbildung 1-6: Regulatorische T-Zellen

Quelle: In Anlehnung an Akbari O et al., 2003, S. 628

1.3 NKT-Zellen

Bei Natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen) handelt es sich um eine spezialisierte T-Zellsubpopulation, die 1987 zum ersten Mal im Mausmodell beschrieben wurden (Fowlkes BJ et al., 1987; Budd RC et al., 1987).

1.3.1 T-Zell-Rezeptor

Das herausragendste und gemeinsame Charakteristikum aller T-Zellen ist der T-Zell-Rezeptor (TZR). Ähnlich der Immunoglobuline, die aus leichten und schweren Ketten bestehen, setzt sich der TZR aus über Disulfidbrücken verbundenen α - und β -Ketten zusammen (Haskins K et al., 1983; Meuer SC et al., 1983). TZR müssen imstande sein, eine Vielfalt von fremden Antigenen zu erkennen. Die hohe Diversität wird unter anderem durch das Gen-Rearrangement garantiert.

1.3.1.1 Gen-Rearrangement

Die α - und β -Ketten des TZR bestehen aus drei Teilen (vgl. Abbildung 1-7): Dem konstanten C-, dem variablen V- und dem verbindenden J-Segment; bei der β -Kette findet sich zusätzlich ein D-Segment. Für das variable Segment V der α -Kette des TZR kodieren 70 bis 80 Gensegmente und für das J-Segment 61 Gensegmente (Koop BF et al., 1994). Insgesamt sind auf Grund der unterschiedlichen Zusammenlagerung von je einem V- und einem J-Segment ungefähr 10^{18} verschiedene TZR möglich.

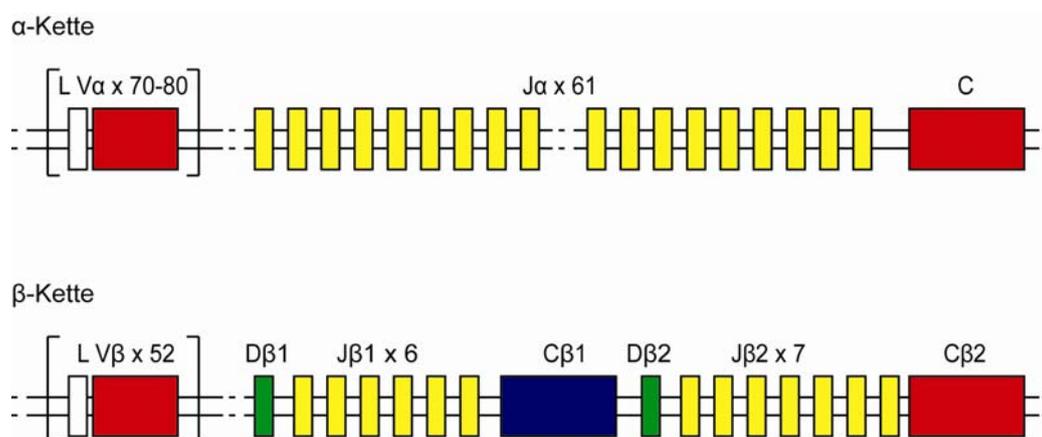


Abbildung 1-7: Organisation der humanen TZR-Gene

Quelle: In Anlehnung an Janeway CA et al., 2005, S. 149

Während der T-Zell-Entwicklung kommt es zum Rearrangement der einzelnen Gensegmente (vgl. Abbildung 1-8).

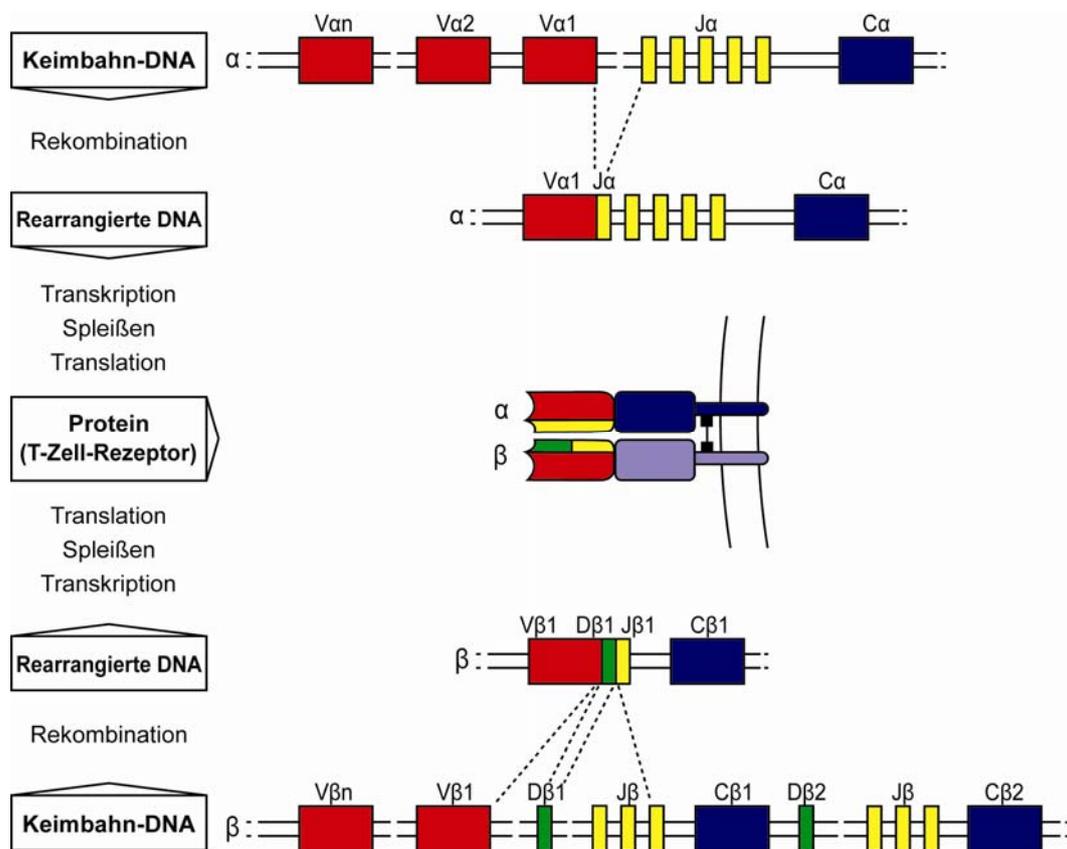


Abbildung 1-8: Rearrangierung und Expression der α - und β -Ketten des TZR

Quelle: In Anlehnung an Janeway CA et al., 2005, S. 150

Eine Leadersequenz ist dem V-Gensegment – durch ein Intron getrennt – vorgeschaltet. Das C-Segment wird von einem einzigen Gen kodiert, das stromabwärts von dem verbindenden J-Segment liegt. Ein Teil der DNA zwischen V- und C-Segment wird durch Deletion entfernt; das J-Segment verbindet V- und C-Segment. Durch Transkription des Gens entsteht das Transkript, das durch Spleißen in die reife mRNA überführt wird, die dann translatiert wird. Aus α - und β -Ketten entstehen die T-Zell-Rezeptoren.

1.3.1.2 N-Region

Ein weiterer Mechanismus zur Erhöhung der TZR-Diversität ist die ungenaue Verknüpfung der Gensegmente und das Einfügen von matrizenunabhängigen, kleinen und nicht-informativen Nukleotidsequenzen, der N-Region (Dellabonna P et al., 1994; Exley M et al., 1997). Durch Ergänzen von einzelnen Nukleotiden zwischen dem variablen Segment V und

dem verbindenden Segment J (Makino Y et al., 1993) entstehen hochvariable α -Ketten. Die Zahl möglicher TZR wird so ungefähr um den Faktor 20 erhöht (Davis MM et al., 1988).

Die N-Addition beträgt in der Regel zwischen drei und sieben Nukleotiden bei einer Schwankungsbreite von null bis 24 Nukleotiden (Davodeau F et al., 1997) und liegt im Zentrum der Ag-Bindungsstelle. Es ist nicht geklärt, ob Unterschiede in der Primärstruktur der N-Region die Bindung anderer Ag zur Folge hat.

1.3.2 Phänotyp

NKT-Zellen sind $CD3^+$ und werden in drei Untergruppen unterteilt ($CD4^+$, $CD8^+$ oder DN). Sie können durch Charakteristika ihres Oberflächenphänotyps identifiziert werden:

1. Humane NKT-Zellen exprimieren den für Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen) typischen Marker CD161 (NKR-P1A). CD161 sind transmembrane Rezeptorproteine, die an der Regulation der NKT-Zell-Aktivitäten beteiligt sind.

Weitere spezifische NK-Zell-Marker, wie CD16, CD94 oder KIR Protein, werden nicht oder nur in geringem Umfang exprimiert. Die Expression spezifischer NK-Zell-Marker kann durch Zytokine induziert werden (Arase H et al., 1993). Im Laufe der Entwicklung exprimieren murine NKT-Zellen den IL-7 Rezeptor, CD24, DX5, NK1.1 und Ly49 NK Rezeptoren (Benlagha K et al., 2002; Pellici DG et al., 2002; Stanic AK et al., 2004; Gadue P et al., 2002).

2. Phänotypisch handelt es sich bei NKT-Zellen um aktivierte ($CD45RO^+$, $CD62L^-$) Gedächtniszellen (Davodeau F et al., 1997). Im Allgemeinen illustriert eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD45RA und eine schwache Expression von CD45RO den naiven Status. Die Aktivierung einer naiven T-Zelle führt zu einem Verlust des CD45RA und der Akquisition des CD45RO. Sowohl humane, fetale NKT-Zellen, als auch NKT-Zellen im peripheren Blut des Erwachsenen zeigen dieses Repertoire ($CD45RO^+$, $CD62^-$). Diese Ergebnisse implizieren, dass sich NKT-Zellen ihren endgültigen Phänotyp bereits während der fetalen Periode aneignen und, dass sie auch schon während dieser aktiviert wurden (Prussin C et al., 1997; Vliet HJ van der et al., 2000).
3. Das herausragendste Charakteristikum der NKT-Zelle, was sie gleichzeitig am deutlichsten von der T-Zelle abgrenzt, ist ihr stark eingeschränktes Repertoire der α -Kette des TZR (Dellabonna P et al., 1994).

Murine NKT-Zellen exprimieren einen invarianten TZR mit $V\alpha 14$ - $J\alpha 281$ Gen-Rearrangement (Lantz O et al., 1994). Das humane Homolog zur murinen NKT-Zelle exprimiert einen TZR mit $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ Rearrangement (Porcelli S et al., 1996; Dellabonna P et al., 1994). Neben der Kombination verschiedener Segmente der α -Kette wird die Di-

versität des TZR von konventionellen T-Zellen durch Insertion von Nukleotiden erhöht. Von seltenen Ausnahmefällen abgesehen (Dellabonna P et al., 1994; Exley M et al., 1997), enthält die α -Kette des TZR bei NKT-Zellen beim Erwachsenen keine inserierten Nukleotide (Dellabonna P et al., 1994). Im Gegensatz zu NKT-Zellen findet sich bei konventionellen T-Zellen $V\alpha 24$ nur bei 2-10 %; fast ausschließlich auf DN T-Zellen; in nur 0,5 % der Fälle auf $CD4^+$ T-Zellen und in nur 0,1 % der Fälle auf $CD8^+$ T-Zellen (Han M et al., 1999).

Weiterhin ist $V\alpha 24$ - $J\alpha 18$ bei humanen NKT-Zellen fast immer mit $V\beta 11$ assoziiert. Diese β -Ketten sind polyklonal, d. h. sie lagern unterschiedliche D- und J-Gensegmente zusammen (vgl. Abbildung 1-9). Bei der Maus findet sich homolog hierzu $V\alpha 14$ - $J\alpha 281$, welches vorwiegend mit $V\beta 2$, $V\beta 7$ und $V\beta 8.2$ assoziiert ist (Dellabonna P et al., 1994; Maki-no Y et al., 1993; Porcelli S et al., 1996).

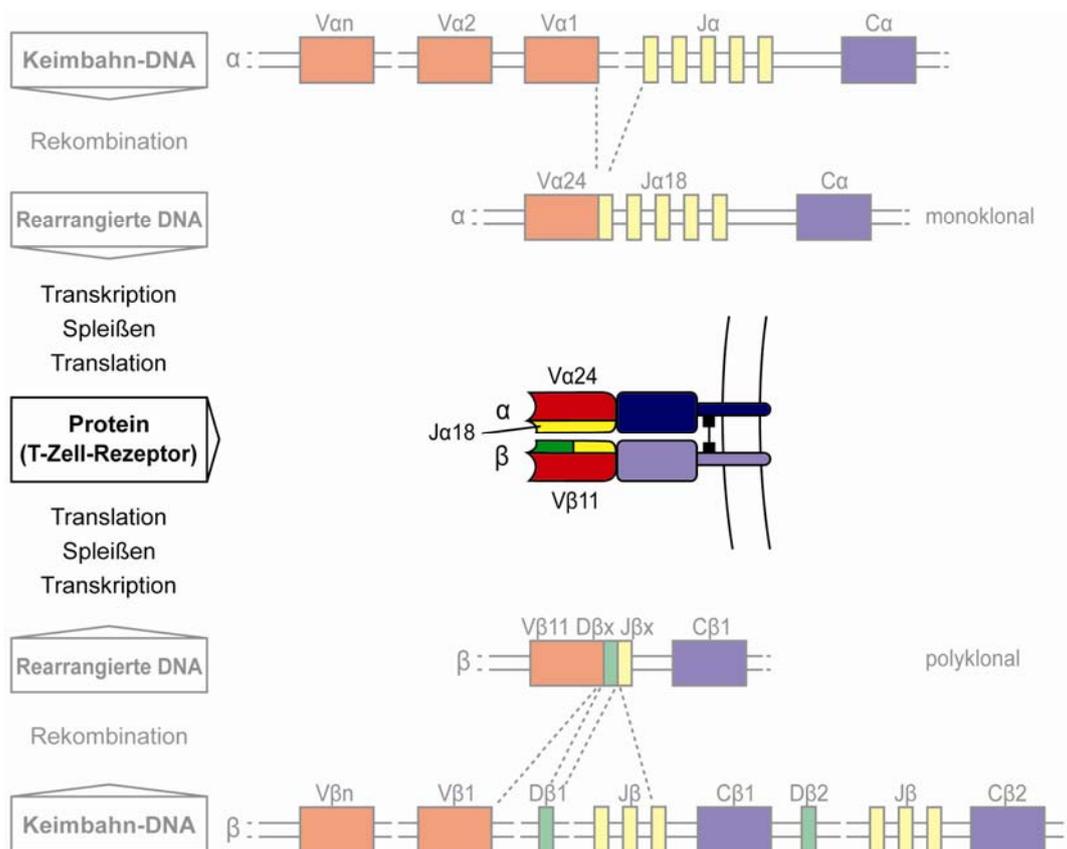


Abbildung 1-9: Rearrangierung und Expression der α - und β -Ketten des TZR bei NKT-Zellen

1.3.3 Nomenklatur und Definitionen

Mehrere Arbeitsgruppen haben in den letzten Jahren unterschiedliche Namen für denselben Zelltyp verwendet. Unter anderem NK1.1⁺ (like) T-Zellen (Gombert JM et al., 1996), natürliche T-Zellen (Joyce S et al., 1996, Bix M et al., 1995), NKT oder NKT-Zellen (Makino Y et al., 1995, Sato N et al., 1996), V α 14 invariante (V α 14i) T-Zellen (Lantz O et al., 1994) und iNKT-Zellen (Naumow YN et al., 2001).

Mittlerweile sind verschiedene Untergruppen von NKT-Zellen mit funktionellen Unterschieden identifiziert. Im Allgemeinen werden diese Subpopulationen zusammenfassend als NKT-Zellen bezeichnet (vgl. Tabelle 1-1).

	Typ I-Zellen (Klassische NKT-Zelle)	Typ II-Zellen (Nicht-klassische NKT-Zelle)	NKT-ähnliche Zellen (CD1d-unabhängige NK1.1⁺ T-Zelle)
CD1d dependent	Ja	Ja	Nein
α-GalCer reactive	Ja	Nein	Nein
TCR α-Kette	V α 14-J α 18 (Maus) V α 14-J α 18 (human)	Diverse, aber zum Teil V α 3.2-J α 9, V α 8 (Maus)	Diverse
TCR β-Kette	V β 8.2, V β 7 und V β 2 (Maus) V β 11 (human)	Diverse, aber zum Teil V β 8.2 (Maus)	Diverse
NK1.1 (CD161)	+ (resting mature) -/niedrig (unreife oder post Aktivierung)	+/-	+
Subsets	CD4 ⁺ und DN (Maus) CD4 ⁺ , CD8 ⁺ und DN (human)	CD4 ⁺ und DN (Maus)	CD4 ⁺ , CD8 ⁺ und DN
IL-4 Produktion	Ja	Ja	Nein
IFN-γ Produktion	Ja	Ja	Ja

Tabelle 1-1: Klassifikation der NKT-Zellen

Quelle: In Anlehnung an Godfrey DI et al., 2004, S. 234

In der hier vorliegenden Arbeit werden humane, V α 24-J α 18 NKT-Zellen behandelt, von denen im Folgenden als NKT-Zellen gesprochen wird.

1.3.4 Entwicklung

Wie auch konventionelle T-Zellen, entwickeln sich NKT-Zellen über CD4⁺CD8⁺ T-Zellen aus CD4⁺CD8⁻ Vorläuferzellen des Thymus.

Bei dem 'Instructional model' (vgl. Abbildung 1-10) wird davon ausgegangen, dass sich NKT-Zellen aus doppelt positiven (DP) Zellen nach CD1d Präsentation eines endogenen Liganden durch kortikalen Thymozyten entwickeln (Benlagha K et al., 2002; Pellici DG et al., 2002; MacDonald HR, 2002). Verantwortlich für diese Differenzierung ist entweder eine sehr

hohe Affinität bei der Erkennung des endogenen Ligandens durch CD1d oder die Selektion von anderen doppelt positiven Thymozyten (Gapin L et al., 2001).

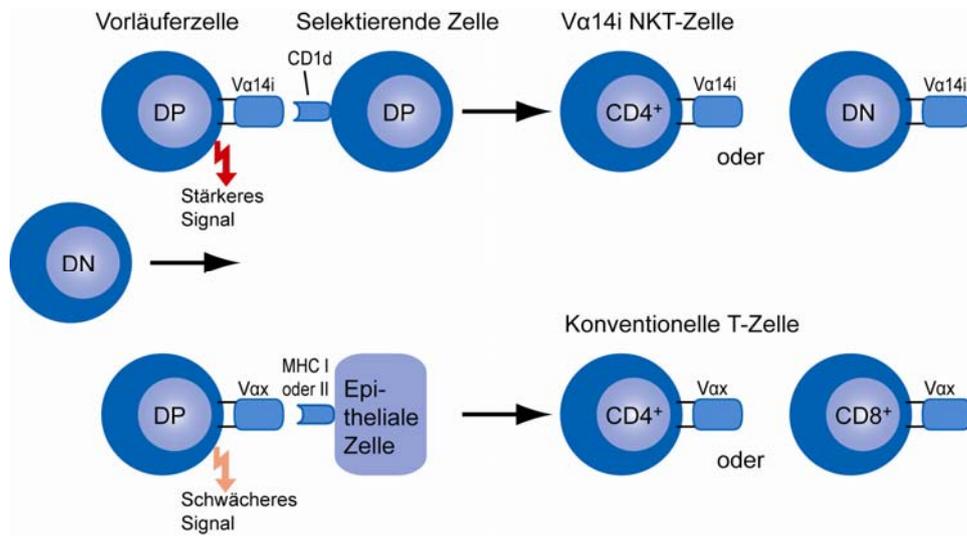


Abbildung 1-10: "Instructional model" der NKT-Zell-Entwicklung

Quelle: In Anlehnung an Kronenberg M, 2005, S. 881

1.3.5 Produktion und Sekretion von Zytokinen

Das immunoregulatorisch bedeutendste Charakteristikum der NKT-Zellen ist ihre Fähigkeit zur Sekretion von sehr großen Mengen IL-4 und IFN- γ . NKT-Zellen weisen eine 6-fach höhere Produktionsrate von IL-4 als gewöhnliche T-Zellen auf (Prussin C et al., 1997). Im Vergleich zu konventionellen T-Zellen findet die Zytokinfreisetzung in sehr kurzer Zeit (innerhalb von weniger als 60 Minuten) statt (Arase H et al., 1993; Yoshimoto T et al., 1994; Zlotnik A et al., 1992). Neben IL-4 und IFN- γ produzieren NKT-Zellen weitere Zytokine, darunter unter anderem IL-2, TNF, IL-5, IL-10, IL-13 und GM-CSF (vgl. Abbildung 1-11).

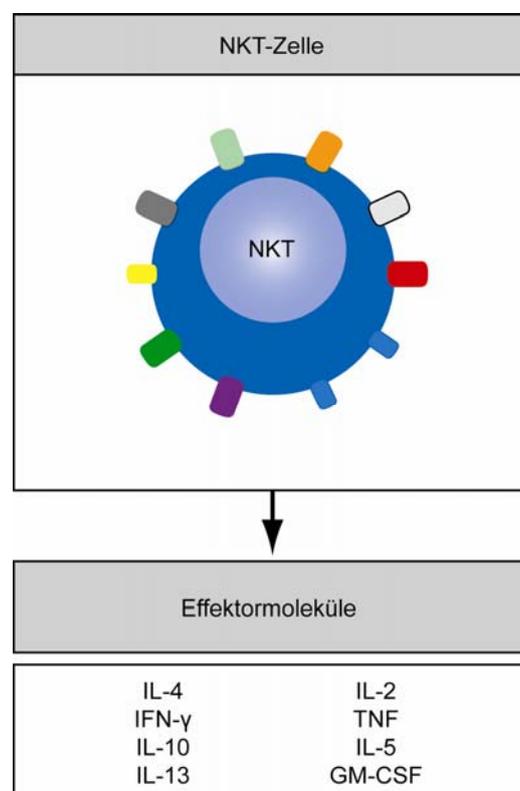


Abbildung 1-11: NKT-Zelle mit Effektormolekülen

Das genaue Profil der Zytokinsekretion ist abhängig von der Expression von Oberflächenmolekülen, der Anwesenheit verschiedener T-Zell-Subpopulationen und der Expression kostimulatorischer Faktoren (Gombert JM et al., 1996).

Die IFN- γ -Sekretion wird von IL-12 und IL-7 gefördert (Leite-De-Moraes MC et al., 1998). Die IL-4-Sekretion wird hingegen durch IL-18 stimuliert, was zu einem Anstieg der Expression von CD69, einem Aktivitätsmarker, auf B-Zellen führt (Leite-De-Moraes MC et al., 2001).

Mit ihrer Zytokinsekretion beeinflussen aktivierte NKT-Zellen hämatopoetische Zellen: B-Zellen werden aktiviert, sezernieren Immunglobuline und die Serumspiegel der Immunglobuline steigen an (Burdin N et al., 1999; Kitamura H et al., 2000; Galli G et al., 2003). Es kommt zu einer verstärkten NK-Zell-Proliferation mit erhöhter Sekretion von IFN- γ und zytotoxischer Aktivität (Matsuda JL et al., 2001).

Da NKT-Zellen sowohl Th1- (IFN- γ) als auch Th2-Zytokine (IL-4) sezernieren, stellt sich die Frage, wie eine zielgerichtete Immunantwort zustande kommt. Diskutiert werden verschiedene Hypothesen:

1. Zum einen wäre möglich, dass Subpopulationen humaner NKT-Zellen je nach ihrem Phänotyp unterschiedliche Zytokine produzieren. Während CD8⁺ NKT-Zellen vorwiegend IFN- γ synthetisieren (Emoto M et al., 2000), bilden CD4⁺ und DN NKT-Zellen hauptsächlich IL-4 (Davodeau F et al., 1997; Prussin C et al., 1997). Bei humanen NKT-Zellen gibt es starke Hinweise, dass diese vornehmlich IL-4 produzieren (Gumperz JE et al., 2002; Lee PT et al., 2002).
2. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass die Qualität des TZR Signals das Zytokinprofil der NKT-Zellen beeinflusst. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass unterschiedliche Liganden des TZR zu unterschiedlichen Mengen von IL-4 und IFN- γ führen (Miyamoto K et al., 2001; Stanic AK et al., 2003; Schmiege J et al., 2003).
3. Außerdem wäre es denkbar, dass von anderen Zellen sezernierte Zytokine das NKT-Zell-Zytokinprofil determinieren. IL-12, das von dendritischen Zellen produziert wird, führt zu einer verstärkten IFN- γ Sekretion bei humanen NKT-Zellen (Brigl M et al., 2003). Das Zytokinprofil der murinen NKT-Zelle ist vom Typ der Antigen-präsentierenden Zelle abhängig (Fujii S et al., 2002).

1.3.6 Antigene und Liganden des T-Zell-Rezeptors

Der TZR der NKT-Zelle dient nicht wie bei der T-Zelle der Erkennung von Peptid-Antigenen, die von Makrophagen über MHC Moleküle präsentiert werden, sondern der Erkennung von Lipiden, Lipopeptiden oder glykosylierten Lipidantigenen (Joyce S et al., 1998).

Die Präsentation der Lipidantigene erfolgt über Moleküle der CD1 Familie, die den MHC Molekülen ähneln (Bendelac A et al., 1997). Die Kristallstruktur des murinen CD1d Moleküls zeigt, dass die Antigenbindungsstelle wesentlich tiefer, enger und auch sehr viel hydrophober ist, als dies bei MHC Molekülen der Klasse I und II der Fall ist. Die hydrophobe Natur der Antigenbindungsstelle des CD1d Moleküls prädestiniert zur Präsentation von hydrophoben Antigenen (Zeng Z et al., 1997) und gibt somit indirekt Aufschluss über potentielle Liganden. Human NKT-Zellen erkennen ihr Antigen nur, wenn es durch CD1b, CD1c oder CD1d präsentiert wird (Brossay L et al., 1998; Sieling PA et al., 1995).

α -Galaktosylceramid und Phosphatidylinositol gehörten zu den ersten identifizierten Liganden, die humane und murine NKT-Zellen aktivieren können. Mit hoher Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei den Glykolipiden nicht um natürliche Liganden, da α -Galaktosylceramid nicht in Säugetiergewebe gefunden werden konnte und Phosphatidylinositol nur ein einziges NKT-Zell-Hybridom stimulieren kann (Kawano T et al., 1997; Spada FM et al., 1998).

Ein weiterer Ligand, der an den TZR der NKT-Zelle binden kann, ist das lysosomale Glykosphingolipid Isoglobotrihexosylceramid (iGb3). iGb3 wird sowohl von humanen als auch murinen NKT-Zellen erkannt, regt diese zur Proliferation und zur Zytokinausschüttung an (Zhou D et al., 2004). Mäuse mit einem genetischen Defizit an dem Enzym β -Hexosaminidase, welches für die Synthese des iGb3 mitverantwortlich ist (vgl. Abbildung 1-12), wiesen eine wesentlich geringere Anzahl an murinen V α 14 NKT-Zellen auf als Mäuse ohne diesen Defekt.

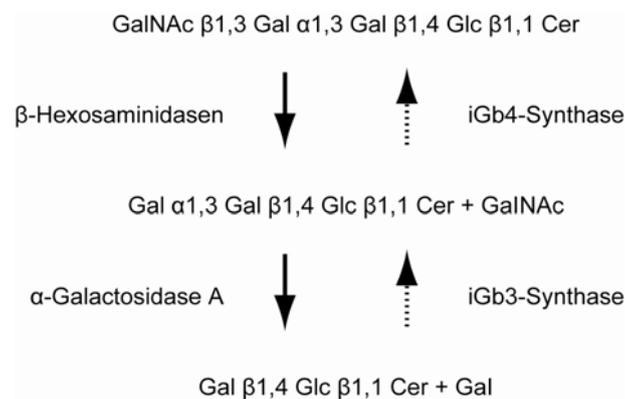


Abbildung 1-12: Schema der Synthese und des Abbaus von iGb3

Quelle: In Anlehnung Zhou D et al (2004), S. 1788

Die Ergebnisse von Zhou et al legen nahe, dass iGb3 sowohl an der positiven Selektion der NKT-Zellen im Thymus als auch an deren Aktivierung in der Peripherie beteiligt ist (vgl. Abbildung 1-13).

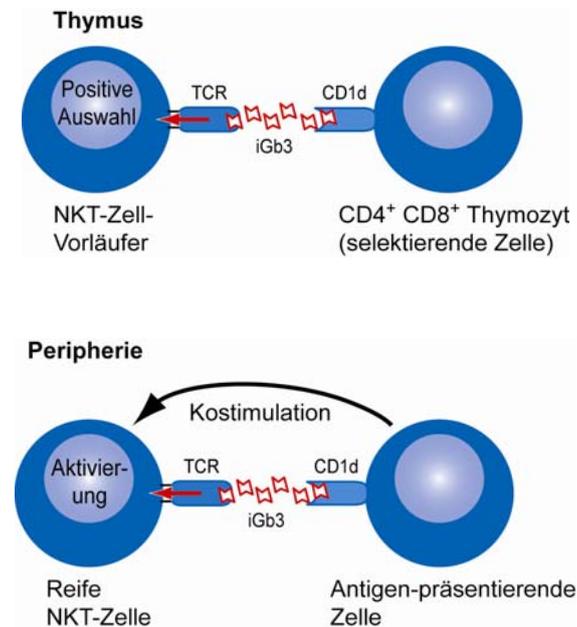


Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der Wirkung des Liganden iGb3: Selektion der NKT-Zellen im Thymus und Aktivierung der NKT-Zellen in der Peripherie

Quelle: In Anlehnung an Godfrey DI et al., 2004, S. 1687

Allerdings konnten Glykosphingolipide der Isoglobo-Gruppe, wie iGb3, bisher nur in wenigen Säugetieren nachgewiesen werden. Nachweise gelangen in Ratten- (Keusch JJ et al., 2000), Hunde- und Katzenmodellen (Teneberg S et al., 1996).

Auch mikrobielle Antigene sind in der Lage NKT-Zellen zu aktivieren (Kinjo Y et al., 2005). Glykosphingolipide von Sphingomonas Spezies, wie *S. paucimobilis* und *S. yanoikuyae* (Kawahara et al., 1991; Kawahara K et al., 2000; Kawahara K et al., 2002) führen bei NKT-Zellen zu IL-Sekretion in unterschiedlicher Höhe. Dies kann erklärt werden, da murine NKT-Zellen verschiedene V β -Segmente mit V α 14 kombinieren. Wegen der Expression unterschiedlicher β -Ketten ist es möglich, dass nur ein kleiner Anteil der V α 14 NKT-Zellpopulation auf die Stimulation mit dem Antigen reagieren kann (Kinjo Y et al., 2005).

NKT-Zellen lassen sich ebenfalls durch bakterielle Glykolipide aktivieren. Lipide der bakteriellen Zellmembran können als Ziele der angeborenen Immunantwort fungieren, da sie direkt vom invarianten TZR der NKT-Zellen erkannt werden. In FACS-Analysen konnten 100% der NKT-Zellen mit CD1d- α -Glucuronosylceramid gefärbt werden (Mattner J et al.,

2005). Auch ein Anstieg der IL-4 und IFN- γ Sekretion nach Stimulation von humanen und murinen NKT-Zellen konnte gemessen werden (Wu D et al., 2005).

Dieses Konzept der direkten Aktivierung von NKT-Zellen durch Infektion wird derzeit sehr kontrovers diskutiert. Es wurde festgestellt, dass nur relative geringe Anteile dieser Zellen auf Glykolipide der Zellwand von Bakterien reagieren (Kinjo Y et al., 2005).

1.3.7 NKT-Zellen und Asthma

Bei atopischen Erkrankungen besteht ein relatives Übergewicht von Th2-Lymphozyten. NKT-Zellen verschieben das Th1-Th2-Gleichgewicht durch Sekretion von IL-4 in Richtung Th2-Immunantwort (vgl. Abbildung 1-14).

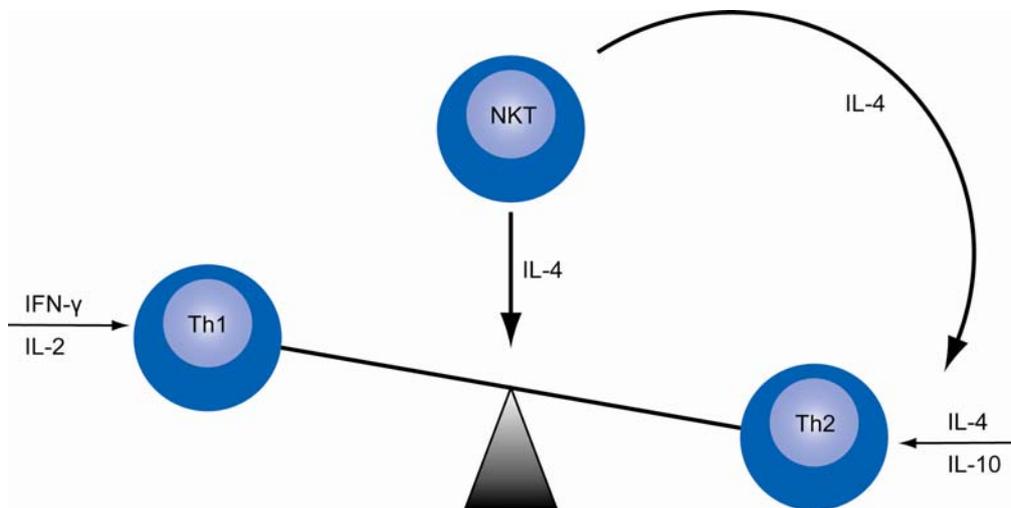


Abbildung 1-14: Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichts bei atopischen Erkrankungen durch IL-4

Neben der Polarisierung der Immunreaktion in Richtung Th2-Antwort in der Peripherie, kommt es in der Lunge durch die von Th2- und NKT-Zellen sezernierten Zytokine zur Proliferation der eosinophilen Zellen und zur IgE-Produktion. Charakteristika des Asthmas werden hierdurch hervorgerufen (vgl. Abbildung 1-15).

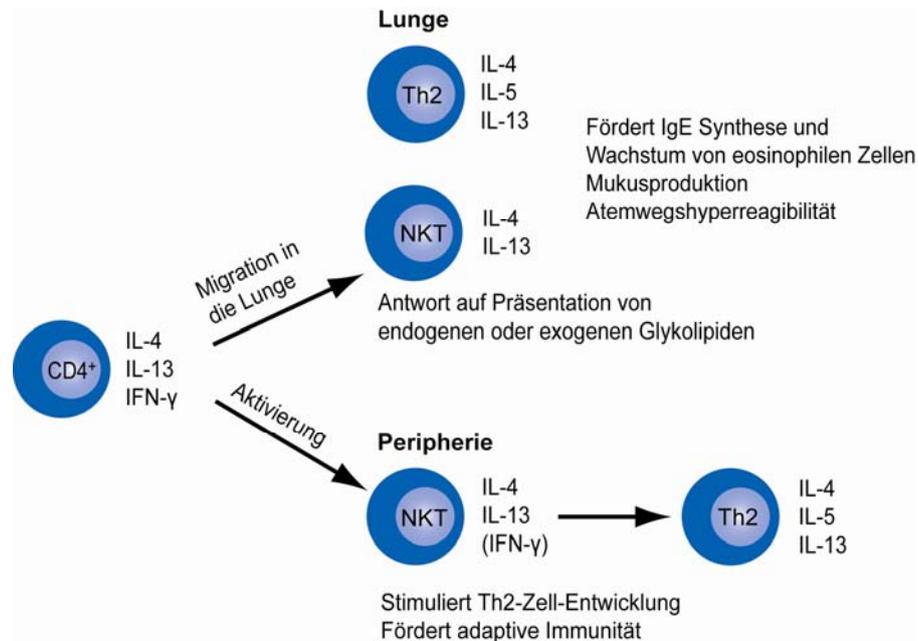


Abbildung 1-15: Model der Rolle von NKT-Zellen bei Asthma

Quelle: In Anlehnung an Umetsu DT et al., 2006, S. 3

In einer Studie von 2004 wurde der Einfluss der NKT-Zellen auf die Entwicklung allergischer Entzündungen durch häufige Aeroallergene untersucht (Bilenki L et al., 2004). Für eine Beteiligung von NKT-Zellen an der Genese von atopischen Erkrankungen spricht, dass CD1-defiziente Mäuse, im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen, eine signifikant verminderte Zahl von eosinophilen Zellen in den Luftwegen und eine verminderte Mukusproduktion zeigten. Auch die Allergen-bedingten IL-4 Produktion, das spezifische IgE und auch das Gesamt-IgE waren in CD1 defizienten Mäusen signifikant vermindert.

1.3.8 NKT-Zellen und atopische Dermatitis

Bei der atopischen Dermatitis handelt es sich um eine häufige inflammatorische Erkrankung der Haut multifaktorieller Genese (Leung DYM, 2001). Verschiedene Untersuchungen zeigen widersprüchliche Ergebnisse: Bei Takahashi war die Zahl der DN V α 24 NKT-Zellen bei Patienten mit atopischer Dermatitis reduziert und korrelierte negativ mit dem Quotienten aus Th1-Zellen/Th2-Zellen (Takahashi T et al., 2003). Eine Korrelation zwischen NKT-Zellen und dem Serum IgE-Spiegel war nicht nachweisbar. Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Oishi (Oishi Y et al., 2000) zeigen bei drei Patienten mit atopischer Dermatitis und sechs Patienten mit Asthma eine reduzierte Zahl von DN V α 24 NKT-Zellen gegenüber der Kontrollgruppe; die Zahl der CD4⁺ V α 24 NKT-Zellen war nicht verringert. Magnan zeigte bei 30 Patienten mit atopischer Dermatitis eine Reduktion der Zahl von CD4⁺ V α 24 NKT-Zellen (Magnan A et al., 2000). In einer Studie der Arbeitsgruppe konnte kein Unterschied bezüglich der Häufigkeit von V α 24 CD161 NKT-Zellen zwischen Probanden mit atopischer Erkrankung und gesunden Probanden aus der Kontrollgruppe festgestellt werden (Prell C et al., 2003).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Bei Patienten mit atopischen Erkrankungen besteht ein relatives Übergewicht von Th2-Lymphozyten, die IL-4 für ihre Ausreifung und Differenzierung benötigen. Als Produzenten von IL-4 und somit als Verantwortliche für die Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichts in Richtung Th2 kommen unter anderem NKT-Zellen in Frage, da sie in kurzer Zeit große Mengen an IL-4 produzieren. Mit der Arbeit sollte untersucht werden, ob es zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern Unterschiede im ersten Lebensjahr gibt, was die Frequenz von AV24-AJ18-Transkripten angeht und, ob Unterschiede innerhalb der N-Region existieren.

1.4.1 Vorversuche der Arbeitsgruppe

In einer Studie der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass V α 24 CD161⁺ NKT-Zellen zwischen erwachsenen Atopikern und erwachsenen Nicht-Atopikern auf zellulärem und molekularem Niveau im peripher-venösen Blut keine signifikanten Unterschiede aufweisen (Prell C et al., 2003). In einer Pilotstudie wurde die Frequenz von AV24-AJ18 Transkripten in Nabelschnurblutproben und peripherem Blut von zwölf Kindern im Alter von vier, zwölf und sechsunddreißig Monaten untersucht. Fünf der untersuchten Kinder waren bis zum Erreichen des dritten Lebensjahres gesund; bei sieben wurde eine atopische Dermatitis diagnostiziert. Alle Kinder waren Teilnehmer der GINI-Studie (Berg von A et al., 2003). Anders als man auf Grund der Ergebnisse bei Erwachsenen hätte erwarten können, zeigten sich bei der Pilotstudie überraschende Ergebnisse.

Gesunde Kinder hatten deutlich mehr AV24-AJ18 Transkripte, als Kinder, die bis zu ihrem 3. Lebensjahr eine atopische Dermatitis entwickelten.

Dieser Unterschied fand sich ausschließlich im Nabelschnurblut und nicht mehr zu späteren Zeitpunkten. Bei gesunden Kindern war die Anzahl an AV24-AJ18 Transkripten im Nabelschnurblut deutlich höher als im späteren longitudinalen Verlauf.

Außerdem war bei gesunden Kindern die Frequenz von AV24-AJ18 Transkripten im Nabelschnurblut deutlich höher als im peripheren Blut von Erwachsenen.

Ferner enthielt die N-Region bei Kindern wesentlich häufiger inserierte Nukleotide als dies bei Erwachsenen der Fall war, so dass das TZR-Repertoire kindlicher NKT-Zellen eine wesentliche höhere Diversität und Variabilität aufwies, als adulte NKT-Zellen.

Die Analyse der N-Region ermöglichte wegen der geringen Anzahl an sequenzierten Proben jedoch keine weiteren Schlussfolgerungen.

1.4.2 Zielsetzung

Resultierend aus den Vorversuchen ergaben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

1. Ist der Unterschied in der Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern zu verschiedenen Zeitpunkten im ersten Lebensjahr statistisch signifikant?

(vgl. Kapitel 4.3)

2. Gibt es einen Unterschied bezüglich des Vorhandenseins einer N-Region zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr?

(vgl. Kapitel 4.4)

3. Existieren bei einzelnen Probanden oder Probanden-übergreifend longitudinal konservierte Aminosäuremuster der N-Region der AV24⁺AJ18⁺ Zellen? Wenn ja, unterscheiden sich diese zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern?

(vgl. Kapitel 4.7)

4. Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen der Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte beziehungsweise dem Vorhandensein einer N-Region bei Kindern im ersten Lebensjahr und dem elterlichen Atopiestatus?

(vgl. Kapitel 4.5)

5. Gibt es einen statistischen Zusammenhang zwischen der Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte beziehungsweise dem Vorhandensein einer N-Region bei Kindern im ersten Lebensjahr und erhöhten IgE-Serumspiegeln?

(vgl. Kapitel 4.6)

2 Methoden

2.1 Probanden

Alle Probanden sind Münchner Teilnehmer der GINI-Studie (German Infant Nutrition Intervention Study). Die Allergiepräventionsstudie wurde im September 1996 begonnen und untersuchte als Schwerpunkt den Einfluss von hypoallergenen Säuglingsnahrungen auf die Allergieinzidenz (Schoetzau A et al., 2002).

Die Studienteilnehmer haben mindestens einen Elternteil mit einer atopischen Erkrankung oder eine/einen unter Atopie leidende/n Schwester/Bruder. Damit haben die Teilnehmer ein auf 20 % bzw. bei zwei atopischen Verwandten ein auf 32 % erhöhtes Risiko selbst eine atopische Erkrankung zu entwickeln (Berg von A et al., 2003). Die parallel zur Hochrisikokohorte für allergische Erkrankungen mitgeführte Begleitkohorte hatte kein erhöhtes Allergierisiko.

Aus dieser Studienpopulation (Atopiker und Nicht-Atopiker) wurden Probanden für die vorliegende Arbeit blind bezüglich des Atopiestatus ausgewählt. Die Entblindung fand erst nach Beendigung des experimentellen Teils der Arbeit statt.

Die Probanden wurden gestillt oder erhielten doppelblind eine von vier Formelnahrungen unterschiedlichen Hydrolysegrades (Kumilchformula, schwaches Molkehydrolysat, starkes Molkehydrolysat, starkes Caseinhydrolysat) bis zum 6. Lebensmonat. Die Studienernährung wurde nur dann vorgeschlagen, wenn der Säugling nicht gestillt werden konnte. Es wurden keine Einschränkungen der Diät verordnet, außer dass der zusätzlichen Fütterung von festen Nahrungsbestandteilen in den ersten vier Monaten abgeraten wurde. Anschließend wurden die Eltern gebeten, den Anteil an fester Nahrung wöchentlich um nur einen Bestandteil zu erhöhen und Milchprodukte, Eier, Sojaprodukte, Fisch, Nüsse, Tomaten und Zitrusfrüchte im ersten Lebensjahr zu meiden.

Die ersten Probanden sind jetzt über 10 Jahre alt und werden hinsichtlich des Auftretens allergischer Manifestationen weiter beobachtet. Impfungen, interkurrente Erkrankungen, Medikamenteneinnahme und Ernährung (letztere nur bis zum 6. Lebensmonat) wurden durch standardisierte Befragungen und Untersuchungen im Alter von 4, 8, 12, 18, 24 und 36 Monaten ergänzt und durch Elterntagebücher komplettiert. Zusätzlich füllten alle Eltern (Interventionsgruppen und Begleitkohorte) einmal im Jahr einen identischen Fragebogen zu Lebensumständen und Gesundheit des Kindes (Schwerpunkt allergische Erkrankungen) aus. Weitere klinische Untersuchungen für die gesamte Kohorte erfolgten im Alter von sechs

und zehn Jahren (Blutentnahme, Hautuntersuchung). In Nabelschnurblut (auch von der Begleitkohorte vorhanden) und in peripherem Blut im Alter von 1, 12 und 36 Monaten wurden Gesamt-IgE und spezifisches IgE gegen Casein, α/β -Lactoglobulin, Dermatophagoides pterygoide und farinae, Eiklar, Soja, Katzenschuppen, Lieschgras und Birke bestimmt. Von den Eltern liegen ebenfalls IgE-Werte vor.

Durch diese Daten ist die Studienpopulation außergewöhnlich gut definiert und mögliche Störfaktoren können in der Auswertung berücksichtigt werden.

Seit Oktober 1996 wurde von allen Münchner Teilnehmern (Interventionsgruppe und Begleitkohorte) der GINI-Studie Nabelschnurblut lysiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Guanidin-Isocyanat-Puffer gelagert. Von der Interventionsgruppe wurde zusätzlich GT-Lysat von peripherem Blut im Alter von vier, zwölf und sechsunddreißig Monaten gesammelt.

2.2 Definitionen

Ein Proband wurde analog der vor Beginn der Studie festgelegten Kriterien aus der GINI-Studie (Berg von A et al., 2003) als Atopiker definiert. Das bedeutet, wenn innerhalb des ersten Lebensjahres mindestens eine der folgenden atopischen Erkrankungen dokumentiert wurde: Atopische Dermatitis, allergische Urtikaria, allergisches Asthma bronchiale oder eine Lebensmittelallergie mit gastrointestinaler Manifestation. Im sechsten und zehnten Lebensjahr wurden die Kinder erneut klinisch untersucht.

Die atopische Dermatitis wurde auf Basis der modifizierten Kriterien nach Hanifin aus dem Jahr 1980 diagnostiziert (Hanifin JM et al., 1980): A) Typische Morphologie und typisches Verteilungsmuster (Gesicht, Hals, Nacken, Gelenkbeugen, Hände und Extensorseiten der Extremitäten). B) Juckreiz (oder Kratzspuren). C) Dauer von mehr als 14 Tagen oder chronische Erkrankung mit Rezidiven. Die morphologische Diagnose musste von einem zweiten Arzt (Allergologe des GINI Studien Teams) bestätigt werden. Alle genannten drei Kriterien mussten zur Diagnosestellung erfüllt werden.

Eine allergische Urtikaria wurde diagnostiziert, wenn mindestens zwei Episoden von kratzenden Eruptionen oder Schwellungen mit typischem Aussehen, hervorgerufen durch ein Allergen, von den Eltern oder dem Arzt beobachtet werden konnten. Im Fall einer einzigen Episode waren entweder immunologische Beweise (Prick Test mit nicht verdünntem, nativem Antigen und einer Reaktion von $> 2\text{mm}$ oder ein allergenspezifisches IgE-Level $> 0.34\text{ KU/I}$; CAP, Pharmacia, Uppsala, Schweden) oder ein positiver Provokationstest mit dem verdächtigen Antigen zur definitiven Diagnosestellung notwendig.

Asthma bronchiale wurde nach den Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Pneumologie diagnostiziert. Zu den Kriterien gehörten drei Episoden mit trockenen Nebengeräuschen

(Giemen, Pfeifen, Brummen) während der letzten sechs Monate, Atopiemanifestation (z.B. atopisches Ekzem) in der Eigenanamnese beziehungsweise mehrere "Schwachzeichen" der Atopie (Ohrläppchenrhagaden, doppelte Lidfalte (Dennie-Morgan), Hertoghe-Zeichen), familiäre Asthma- und/oder Atopiebelastung, Hospitalisierung wegen bronchialer Obstruktion, Rhinorrhoe ohne gleichzeitigen Luftwegsinfekt sowie Nachweis einer Sensibilisierung (spezifisches IgE im Serum).

Für die Diagnose einer Nahrungsmittelallergie war mindestens eines der folgenden Symptome notwendig: Stuhl mit Blutauflagerungen, Diarrhoe, Erbrechen oder häufige Regurgitation, Bauchschmerzen. Gleichzeitig mussten die Symptome bei Elimination des verdächtigten Nahrungsmittels verschwinden und die Wiederaufnahme des Nahrungsmittels musste die Beschwerden wiederholt provozieren können. Bei gestillten Kindern wurde geraten, keine Kuhmilch, Eier, Fisch oder Nüsse zu essen. Falls die Symptomatik bei den Kindern persistierte, wurde das Stillen beendet und durch Aminosäure-Kindernahrung (Neocate; SHS, Heilbronn, Deutschland) ersetzt. Eine Nahrungsmittelallergie mit gastrointestinalen Symptomen wurde diagnostiziert, wenn die standardisierten Eliminations- und Provokationstests durchgeführt wurden und es positive Resultate unter Aufsicht eines GINI Studien Team Mitglieds im Krankenhaus (frühe Reaktionen) oder zu Hause (Spätreaktion) gegeben hat. Doppelt verblindete, placebo-kontrollierte Nahrungsmittelprovokationstests wurden bei nicht eindeutigen Ergebnissen durchgeführt.

2.3 Übersicht der molekularbiologischen Analysen

Die Arbeit umfasste folgende molekularbiologische Schritte:

1. mRNA-Extraktion aus eingefrorenen Vollblutproben der GINI-Probanden mit modifizierter saurer Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform Methode
2. cDNA-Synthese mittels reverser Transkription aus der extrahierten mRNA
3. PCR zur DNA-Amplifikation
4. Ligation des amplifizierten DNA-Produkts in den pCR®2.1 Vektor
5. Hitzeschock-Transformation des Ligationsproduktes in *E. coli*
6. Spezifische PCR zum Nachweis und zur Bestimmung der Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten (94 Bakterienklone pro Proband und Zeitpunkt)
7. Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) zur Identifikation möglicher N-Regionen bei Vorliegen von AV24-AJ18 Transkripten
8. Sequenzierung bei Vorhandensein einer N-Region

2.4 mRNA-Extraktion

Zunächst wurde mRNA aus den eingefrorenen Vollblutproben der GINI-Probanden isoliert. Hierfür wurde eine modifizierte Methode der sauren Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform Extraktion verwendet (Chomczynski P et al., 1987). Grundlage dieser Methode ist die Komplexbildung von RNA mit Guanidin- und Wasserstoffmolekülen, wodurch hydrophile Interaktionen mit DNA und Proteinen verhindert werden. Dies führt zu einer Abtrennung von DNA und Proteinen in einer organischen Phase, während die RNA in wässriger Lösung bleibt.

Es wurden jeweils 750 µl des GT-β-Me Lysat (125 µl EDTA-Blut und 625 µl Guanidinthioisocyanat, GT-Puffer) mit 75 µl Natriumacetat (2 M, pH 4) vermischt und dann mit 1000 µl eines wasser-gesättigten Phenol-Chloroform-Gemisches (untere Phase) für 10 Sekunden gevortext. Durch das Hinzufügen des Phenol-Chloroform-Gemisches wurde die RNA extrahiert. Anschließend wurde der Ansatz 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Trennung von DNA und RNA beruht darauf, dass die zellmatrixorientierte DNA an Mikrosomen haften bleibt und deshalb in der organischen Phase oder der Interphase separiert wird. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 40mm Rotorradius, 7571g, 20 min, 14 °C) wurde die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt; das Volumen sollte ungefähr die Hälfte des Ausgangsvolumens haben. Zur Fällung der RNA wurde das Reaktionsgefäß mit einem identischen Volumen Isopropanol aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch mindestens 1 Stunde bei -20 °C gelagert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 40mm Rotorradius, 7571g, 4 °C, 15 min) wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 300 µl GT-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Zur zweiten Fällung wurden zu dem vollständig gelösten Pellet 300 µl Isopropanol hinzugegeben und bei -20 °C eine Stunde gelagert. Nachdem das Gemisch wieder aufgetaut war, wurde es zentrifugiert (13000 rpm, 40mm Rotorradius, 7571g, 4 °C, 12 min). Der Überstand wurde wiederum verworfen und das RNA-Pellet wurde, ohne suspendiert zu werden, in 200 µl Ethanol 70 % gewaschen. Der Waschvorgang diente zur Entfernung von Salzen, die die reverse Transkription stören. Im Anschluss erfolgte ein letzter Zentrifugationsschritt (13000 rpm, 40mm Rotorradius, 7571g, 4 °C, 12 min) und der abpipettierte Überstand wurde verworfen. Das gereinigte RNA-Pellet wurde in 19 µl Aqua dest. (DEPC 0,1%) resuspendiert. Außerdem erfolgte die Zugabe von 1 µl RNase Inhibitor (RNAsin) zur Inaktivierung von RNAsen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde die RNA für höchstens 4 Tage bei -80 °C gelagert.

2.5 cDNA-Synthese

Die isolierte mRNA wurde mittels reverser Transkription in die komplementäre DNA umgeschrieben. Als komplementäre DNA bezeichnet man die einzel- oder doppelsträngige Kopie

eines RNA Moleküls. Für die Synthese der cDNA wird eine RNA-abhängige DNA-Polymerase benötigt. Diese sogenannte reverse Transkriptase benutzt die RNA als Matrize für die Synthese eines DNA-Stranges. Hierbei entsteht initial ein RNA/DNA-Hybridmolekül. Um mit der Strangsynthese zu beginnen, benötigt die Reverse Transkriptase kurze doppelsträngige Nukleinsäurebereiche. Hierzu dienen zufällig an die RNA angelagerte Hexanukleotide, an deren 3' Enden die Reverse Transkriptase binden kann. Als „Primer“ wurde ein Gemisch aus Hexanukleotiden verwendet, um zu garantieren, dass alle mRNA-Sequenzen der heterogenen Population gleichmäßig in der Mischung von cDNA-Molekülen repräsentiert sind. Der 25 µl Ansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

Hexanukleotid-Mix (1:10)	2 µl
RNA	20 µl
<u>Aqua ad iniectabilia</u>	<u>3 µl</u>
Gesamtvolumen	25 µl

Die Komponenten wurden auf Eis pipettiert. Um die Sekundärstruktur der mRNA aufzulösen, wurde der Ansatz für 10 Minuten auf 70 °C erhitzt. Im Anschluss an die Denaturierung der RNA wurde der Ansatz sofort auf Eis gelagert.

Zur denaturierten RNA wurden 25 µl des Mastermixes hinzugegeben:

Aqua ad iniectabilia	4,5 µl
5xPuffer	10 µl
DTT	5 µl
dNTP (10 mM)	2,5 µl
Superscript	2 µl
<u>RNAsin</u>	<u>1 µl</u>
Gesamtvolumen Mastermix	25 µl

Die Synthese des komplementären DNA-Stranges erfolgte über 70 Minuten bei 42 °C. Die Synthese wurde nach 70 Minuten durch Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Die cDNA wurde dann entweder direkt weiterverarbeitet oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren.

2.6 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren, mit dem DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Nukleotid-Sequenzen, den „Primern“, eingerahmt werden, spezifisch amplifiziert werden können. Das Prinzip beruht auf drei sich zyklisch wiederholenden Schritten: Die Nukleinsäuren werden hitzedenaturiert, die spezifischen Primer lagern sich an die komplementäre Sequenz des Einzelstranges an (Annealing), woraufhin die Taq-Polymerase die Primer (Vα24 Xho I und TZRα Spe I) zum Doppelstrang ergänzt (Extension). Durch Wiederholen dieser Schritte kommt es in jedem Amplifikationszyklus theoretisch zu einer Verdopplung des Ausgangsmaterials. Dabei dienen auch die neu synthetisierten DNA-Stränge als Matrize und tragen zur Vervielfältigung der Ziel-DNA bei. Der PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

cDNA	5	μl
dNTPs (2,5 mM)	4	μl
10xPuffer (10mM)	5	μl
Vα24 Xho I	2	μl
TZRα Spe I	2	μl
Aqua ad iniectabilia	31,6	μl
Taq-Polymerase	0,4	μl
Gesamtvolumen PCR-Ansatz	50	μl

Die DNA wurde nach dem folgenden PCR-Protokoll amplifiziert:

	Denaturierung	Annealing und Amplifizierung			Vervollständigendes Annealing	Kühlung
		Hitzedenaturierung	Annealing	Extension		
Anzahl der Zyklen	1	37			1	1
Zieltemperatur	95°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
Inkubationszeit	3'	40''			7'	∞

Tabelle 2-1: PCR-Protokoll

2.7 Ligation

Die Ligation des amplifizierten PCR-Produkts und des Vektors wurde mit dem TA Cloning Kit von Invitrogen durchgeführt. Das PCR Produkt wurde dabei in den pCR®2.1 Vektor inseriert (vgl. Abbildung 2-1).

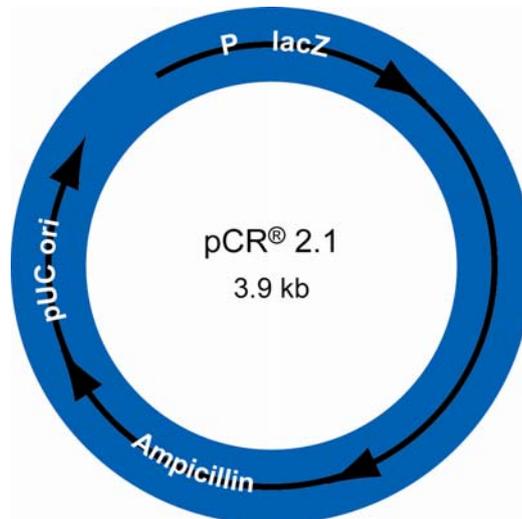


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des pCR®2.1 Vektors

Die folgende Tabelle beschreibt die wichtigsten Bestandteile des Vektors.

<i>lac</i> promotor (P lac)	Notwendig zur bakteriellen Expression von β -Galaktosidase
Ampicillin Resistenz Gen (Ampicillin)	Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin
pUC origin (pUC ori)	Notwendig zur Initiierung der Replikation in <i>E. coli</i>

Tabelle 2-2: Bestandteile des pCR®2.1 Vektors

Die zur Ligation verwendete Taq Polymerase fügt einzelnen Deoxyadenosine (A) an das 3'-Ende des PCR-Produkts an. Der lineare Vektor pCR®2.1 des Kits hat an beiden 3'-Enden einzelne Deoxythymidinreste (T). Auf Grund dieser Tatsache kann das PCR-Produkt mit dem Vektor ligiert werden (vgl. Abbildung 2-2).

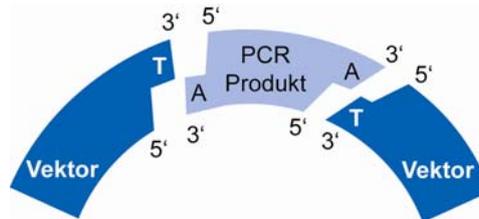


Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Ligation des PCR Produkts in den pCR®2.1 Vektor

Um optimale Ligationsergebnisse zu erreichen, wurde prinzipiell ein frisches PCR Produkt verarbeitet (< 1 Tag alt).

Mittels der folgenden, von Invitrogen, vorgegebene Formel

$$x \text{ ng PCR Produkt} = (Y \text{ bp PCR Produkt}) \cdot (50 \text{ ng pCR } \textcircled{R} 2.1 \text{ Vektor})$$

(Größe in bp des pCR®2.1 Vektors: ~ 3900)

wurde die Menge des einzusetzenden PCR Produktes abgeschätzt, um ein für die Ligation ideales Verhältnis von Insert (PCR Produkt) und Plasmid zu erreichen. Das Verhältnis Vektor: Insert = 1:1 ergab die besten Ergebnisse.

Der 10 µl Ligationsansatz setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

PCR Produkt	0,5 bis 1,0 µl
10xLigationspuffer	1 µl
pCR®2.1 Vektor (25ng/µl)	2 µl
Steriles Wasser	5,0 bis 5,5 µl
<u>T4 DNA Ligase (4.0 Weiss Units)</u>	<u>1 µl</u>
Gesamtvolumen	10 µl

Der Ansatz wurde über Nacht bei 14 °C inkubiert. Falls das Ligationsprodukt nicht direkt weiterverarbeitet wurde, wurde es bei -20 °C eingefroren.

2.8 Transformation

Da die Häufigkeit von NKT-Zellen gering ist, sind quantitative Unterschiede schwierig zu ermitteln. Aus diesem Grund wurden die amplifizierte PCR-Produkte in *E. coli* kloniert. Somit konnte die Häufigkeit von AV24-AJ18-Transkripten innerhalb der AV24 TZR α -Zellen ermittelt werden. Je Zeitpunkt und Proband wurden 94 Bakterienklone untersucht.

Zur Transformation, d. h. der Aufnahme des Vektors in *E. coli* Bakterien, wurde die Hitzeschock-Methode durchgeführt.

Thermokompetente Zellen und der Ligationsansatz, d. h. der Vektor mit dem inserierten PCR-Produkt, wurden auf Eis aufgetaut. 2 μ l des Ligationsansatzes wurden vorsichtig in 50 μ l suspendierte Zellen pipettiert. Während der Arbeitsschritte wurden die Zellen kalt gehalten. Anschließend wurden die Zellen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem 30 Sekunden langen 42 °C Hitzeschock wurden die Zellen mit 250 μ l SOC-Medium („Salt-optimized + carbon broth“) bei Raumtemperatur versetzt und eine Stunde lang bei 37 °C geschüttelt. Im Anschluss wurden die Zellen auf mit Ampicillin und X-Gal (40 μ l) behandelten LB-Platten ausplattiert.

Ampicillin und X-Gal dienen zur positiven Selektion der Bakterienklone, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen hatten. Nur *E. coli* Bakterienklone mit dem Plasmid konnten auf den mit Ampicillin behandelten Platten wachsen, da das Plasmid ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthielt. Das X-Gal wurde von Klonen verstoffwechselt und führte zur Blaufärbung der entsprechenden Kolonien. Nach 24 Stunden Inkubation bei 37°C wurden 94 blaue Bakterienklone je Probe in 1 ml Ampicillin LB-Medium aufgenommen und für ungefähr 8 Stunden bei 37 °C geschüttelt (vgl. Abbildung 2-3).

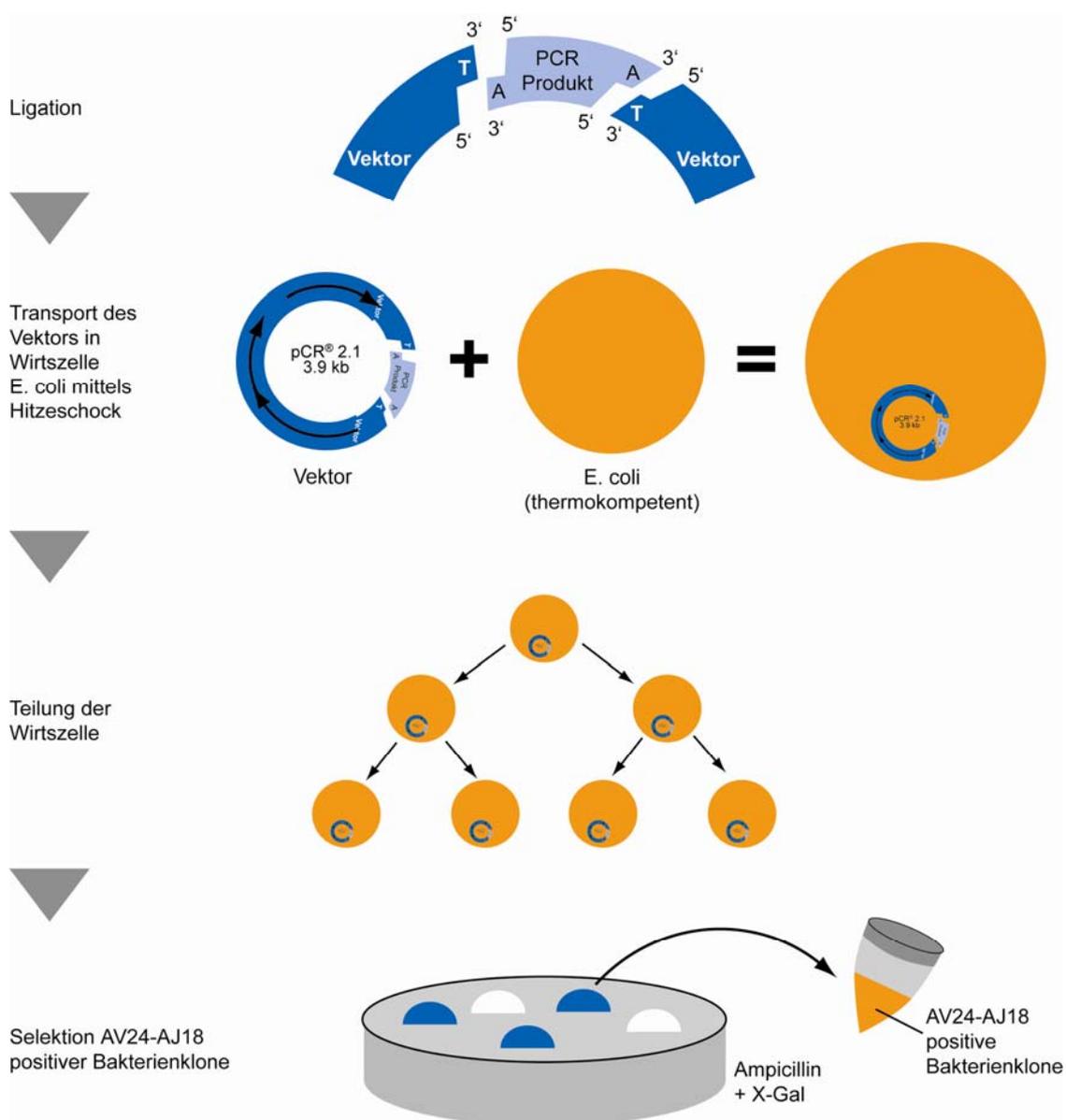


Abbildung 2-3: Molekularbiologische Arbeitsschritte

2.9 Spezifische V α 24-J α 18 PCR

Die angesetzten Kulturen von 94 Bakterienklonen je Probe wurden anschließend auf das Vorhandensein des V α 24 J α 18 Segmentes mittels einer PCR mit spezifischen Primern überprüft. Pipettiert wurde ein 100x Mastermix für 94 Proben eines Probanden, die zur Amplifikation jeweils 28 μ l Mastermix und 2 μ l DNA enthielten. Der 100x Mastermix setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

dNTPs	200	μ l
10xPuffer	300	μ l
V α 24	200	μ l
J α 18	300	μ l
Aqua ad inectabilia	1780	μ l
<u>Taq-Polymerase</u>	20	μ l
Gesamtvolumen Mastermix	2800	μ l

Die DNA wurde anschließend nach dem folgenden PCR-Protokoll amplifiziert:

	Denaturierung	Annealing und Amplifizierung			Vervollständigendes Annealing	Kühlung
		Hitzedenaturierung	Annealing	Extension		
Anzahl der Zyklen	1	30			1	1
Zieltemperatur	95°C	94°C	56°C	72°C	72°C	4°C
Inkubationszeit	3'	40''	40''	60''	7'	∞

Tabelle 2-3: PCR-Protokoll für die V α 24-J α 18-PCR

2.10 PCR Kontrollreaktion

Die Kontamination der Reagenzien mit Fremd-DNA wurde durch eine Negativkontrolle überprüft, die statt DNA Wasser enthielt. Falls sich in der Gelelektrophorese eine positive Negativkontrolle zeigte, wurde die PCR wiederholt.

2.11 Gelelektrophorese

Nukleinsäuren können bei geeignetem pH-Wert als geladene Makromoleküle innerhalb eines elektrischen Feldes in einer Agarose-Gelmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. RNA und DNA sind im pH Bereich des Puffers (pH 8,0) aufgrund ihres Phosphatrests negativ geladen und wandern daher zur Anode. Im Anschluss an die PCR kann so anhand der Größe des amplifizierten Produkts dessen Reinheit und Spezifität überprüft werden.

Eine 2,5% Agarosesuspension wurde in 1xTAE angesetzt und die Agarose durch Kochen gelöst. Zu der abkühlenden Agaroselösung wurde Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration 0,5 g/ml) zugegeben und die Agaroselösung auf einen Gelträger gegossen. Nach Erstarren des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 1xTAE gefüllte horizontale Elektrophoresekammer gegeben. Die DNA-Proben sowie ein DNA-Molekulargewichtsmarker wurden in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde für ca. eine Stunde bei einer Spannung von 70 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Agarosegel zur Auswertung im UV-Licht photographiert.

Von jedem Probanden wurden 94 PCR-Produkte der Bakterienklone einschließlich der positiven und negativen Kontrollreaktionen auf das Agarosegel aufgetragen.

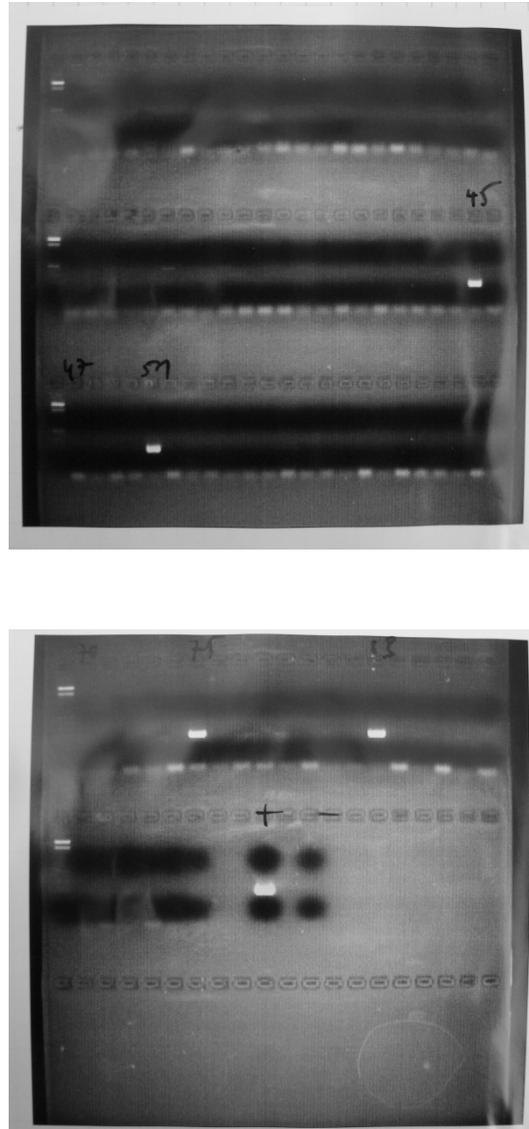


Abbildung 2-4: Agarose-Gel unter UV-Beleuchtung mit vier Bakterienklonen mit AV24AJ18-Rearrangement (Nr. 45, 51, 75, 83) einer Nabelschnurblutprobe eines Probanden sowie Positiv- und Negativ-Kontrolle

In der obigen Abbildung eines Agarose-Gels unter UV-Beleuchtung (vgl. Abbildung 2-4) sind 4 von 94 Bakterienklone positiv, d. h. sie weisen ein AV24-AJ18 Rearrangement auf. Die fehlende Bande der Negativkontrolle und das Vorhandensein einer Bande bei der Positivkontrolle sprechen für korrekt durchgeführte Experimente ohne Kontamination.

2.12 Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer

Um zu überprüfen, ob NKT-Zellen bei den beiden Probandengruppen innerhalb der Complementarity determining region 3 (CDR3) Unterschiede aufweisen, wurde die CDR3 auf Einzelnukeotidebene analysiert. Untersucht wurden hierfür Bakterienklone, die ein positives Ergebnis bei der V α 24-J α 18 PCR hatten.

Für die Analyse auf Einzelnukeotidebene wurde eine auf real-time PCR basierende Technologie (Light Cycler) verwendet, welche es ermöglicht, eine große Anzahl von Bakterienklonen zu testen und zudem kostengünstiger als die Sequenzierung von allen positiven Proben ist. Bei diesem Verfahren werden neben den konventionellen „Primern“ zwei fluorochrommarkierte Sonden (FITC („Anchor probe“), LC-Red („Detection probe“)) verwendet. Diese beiden Sonden, „Anchor probe“ und „Detection probe“, liegen in unmittelbarer Nachbarschaft voneinander, wobei die Fluoreszenzfarbstoffe das 3'-Ende der ersten Sonde und das 5'-Ende der zweiten Sonde markieren und dadurch direkt nebeneinander liegen (vgl. Abbildung 2-5).

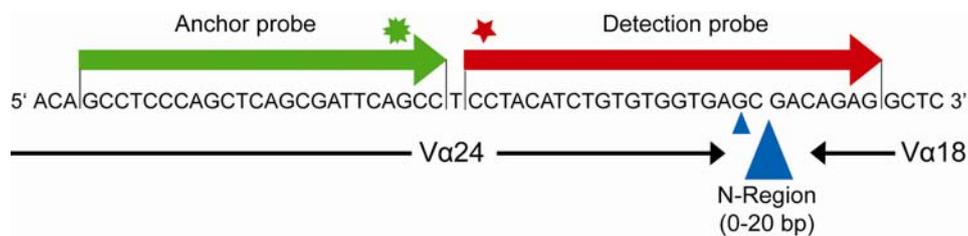


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Position von "Anchor" und "Detection probe"

Quelle: In Anlehnung an Prell C et al. (2003), S. 6

Der FITC-markierte „Primer“, die „Anchor probe“, 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) emittiert. Dieser Vorgang wird als Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) bezeichnet.

Die Energieübertragung kann nur stattfinden, wenn sich die beiden Sonden in direkter räumlicher Nähe befinden (vgl. Abbildung 2-6).

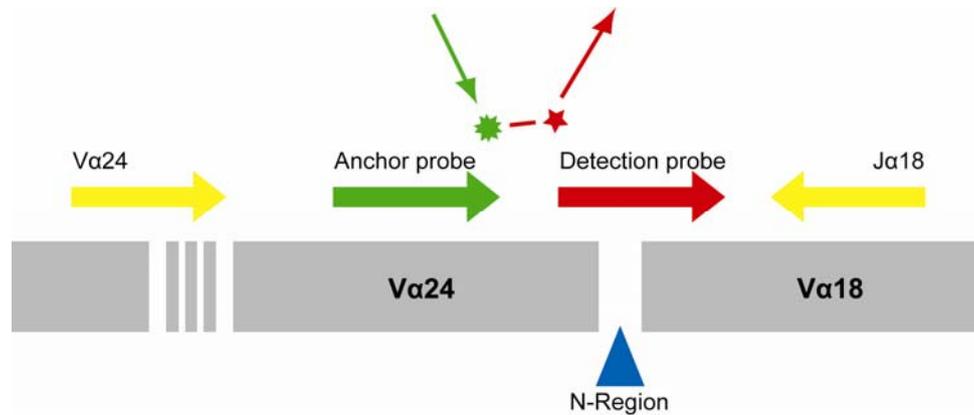


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der FRET-Analyse

Quelle: In Anlehnung an Prell C et al. (2003), S. 6

Bei abweichenden Sequenzen mit Insertionen von nur einem Nukleotid im Bereich der N-Region bindet die „Detection probe“ mit verminderter Affinität und führen dadurch zu einer Veränderung des Fluoreszenzsignals. Bei mehreren eingefügten Nukleotiden und somit größeren Mismatches kann die detektierende Sonde nicht mehr binden, so dass die Energieübertragung auf Grund räumlicher Trennung der beiden Sonden schwächer wird; dies kann soweit gehen, dass das zweite Fluoreszenzsignal verschwindet. Bei Proben ohne N-Region war die 100%ige Komplementarität von der Detection probe und der AV24 AJ18 überlappenden Region gegeben, was eine hohe Affinität bedeutet und somit eine, relativ gesehen, hohen Schmelzpunkt.

Um die Schmelzkurve graphisch besser abzubilden, wurden die Daten konvertiert. Die Änderung der Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Temperatur (dargestellt als negative 1. Ableitung der Fluoreszenz zur Temperatur $-dF/dT$) wird gegen die Temperatur aufgetragen. Es entsteht eine Spitze bei einer für jedes Produkt spezifischen Temperatur, der Schmelzpunkt.

Die Abbildung 2-7 zeigt Schmelzkurventemperatur-Analysen von zwei Klonen mit AV24-AJ18 Regionen. In grau dargestellt die Kurve eines Klons mit AV24-AJ18 Rearrangement ohne N-Region (starke Bindungskräfte zwischen Detection probe und AV24-AJ18 und somit hoher Schmelzpunkt); der zur schwarzen Schmelzkurve gehörige Bakterienklon besitzt eine N-Region, d. h. inserierte Nukleotide zwischen AV24 und AJ 18 und somit einen niedrigeren Schmelzpunkt wegen geringerer Bindungskräfte zwischen Detection probe und der AV24-AJ18.

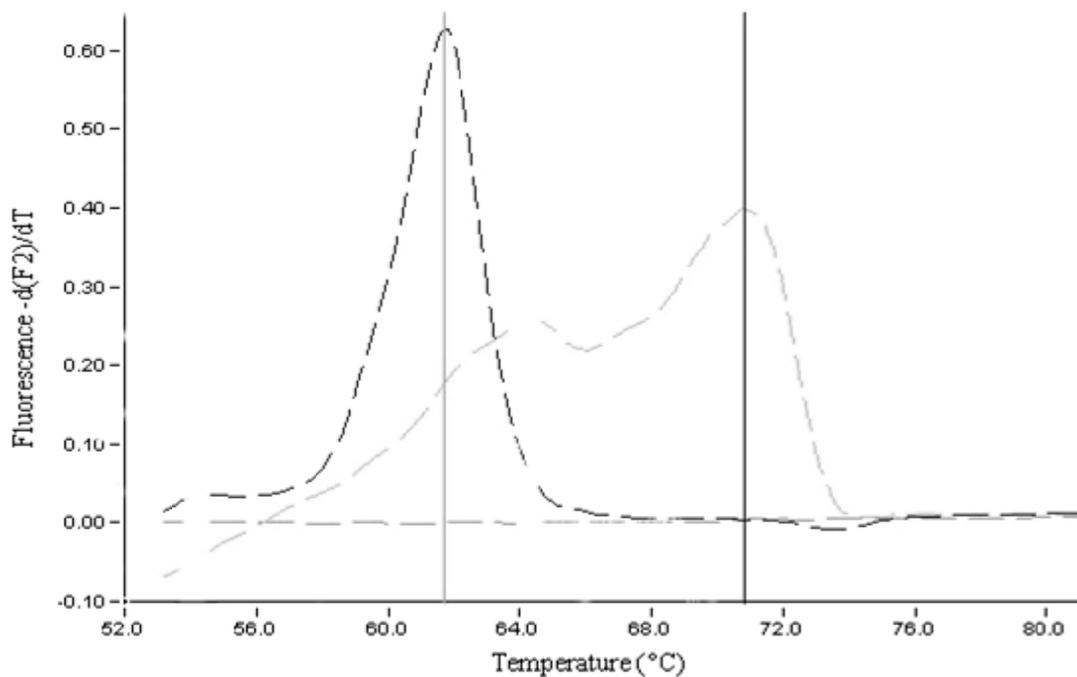


Abbildung 2-7: Schmelzkurven-Analyse von zwei Klonen. In schwarz mit N-Region, in grau ohne N-Region.

Die reduzierte Schmelztemperatur ermöglicht es jedoch nicht, zu unterscheiden, ob es sich um ein eingefügtes Nukleotid innerhalb der N-Region handelt oder ein Polymorphismus innerhalb des AV24- bzw. AJ18-Gens.

Für PCR und Schmelzkurvenanalyse wurde das folgende Protokoll verwendet:

	Denaturierung	Annealing und Amplifizierung		
		Hitzedenaturierung	Annealing	Extension
Anzahl der Zyklen	1	30		
Zieltemperatur	95°C	95°C	56°C	72°C
Inkubationszeit	10'	2''	10''	10''
Temperaturänderung/Zeit	20°C/s	20°C/s		

	Kühlung	Schmelzkurvenanalyse		
Anzahl der Zyklen	1	1		
Zieltemperatur	40°C	95°C	51°C	95°C
Inkubationszeit	30''	0''	60''	0''
Temperaturänderung/Zeit	20°C/s	20°C/s	20°C/s	0,1°C/s

Tabelle 2-4: Light Cycler Protokoll

2.13 Sequenzierung

Gereinigte DNA, bei denen die FRET-Analyse im Light Cycler darauf hinwies, dass inserierte Nukleotide vorliegen, wurde zur Sequenzierung zur Firma medigenomix GmbH, Fraunhoferstr. 22, 82152 Martinsried geschickt.

2.14 Statistik

Für die Gruppenvergleiche zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern bezüglich der Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten, dem prozentualen Anteil AV24-AJ18 positiver Zellen mit N-Region an AV24-AJ18 positiven Zellen wurden die erhobenen Daten auf Normalverteilung überprüft. Je nachdem, ob diese vorlag oder nicht, wurden parametrische Testverfahren (t-Test) beziehungsweise nicht-parametrische (Mann-Whitney-U-Test) eingesetzt. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn die Nullhypothese mit einem α -Fehler von 0,05 verworfen werden konnte.

Zusätzlich wurden eventuelle Korrelationen zwischen dem Atopiestatus der Eltern beziehungsweise erhöhten IgE-Serumspiegeln und der Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten beziehungsweise dem prozentualen Anteil AV24-AJ18 positiver Zellen mit N-Region an AV24-AJ18 positiven Zellen überprüft.

Die statistischen Auswertungen wurden mit SPSS und R programming language vorgenommen.

3 Material

3.1 Geräte

Autoclav	Webco (Bad Schwartau)
Eismaschine	Scotsman (Mailand, Italien)
Elektrophoresekammern/-zubehör	Peqlab (Erlangen)
Easy-Cast	
Gefrierschrank –20 °C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe)
Gefrierschrank –80 °C	Kendro (Langenselbold)
Gel-Gießkammern <i>Multi Casting Chamber</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Kamera (UV) für DNA-Gele	Dunco (Berlin)
Magnetrührer	Kika Labortechnik (Staufen)
Mikroskop	Leica (Wetzlar)
Mikrowellenherd	Moulinex (Radolfzell)
Mischgerät <i>Vortex-Genie</i>	Scientific-Industries, Inc (Bohemia, USA)
Multipette 4780	Eppendorf (Hamburg)
Neubauer- <i>improved</i> [®] Zählkammer	Planoptik (Elsoff)
PCR-Gerät Thermocycler Uno II	Biometra (Göttingen)
Pipetten research (0-2 ml, 2-20 ml, 10-100 ml, 100-1000 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Spannungsgerät Power Pac 2000	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Roche LightCycler [®]	Roche Diagnostics (Mannheim)
Roche LightCycler Software, Version 3.3	
Schüttler	Eppendorf (Hamburg)
Taq Man ABI 7700 Sequence Detection System [®]	Applied Biosystems (Darmstadt)
Temperaturzyklusautomat UNO II	Biometra (Göttingen)

Tischzentrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg)
Ultrazentrifuge	Heraeus (Osterode)
UV Transilluminator	Bachofer (Reutlingen)
Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Waage <i>Feinwaage 1265 MP</i>	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad	Eppendorf (Hamburg)

Tabelle 3-1: Geräte

3.2 Verbrauchsmaterialien

Anti CD-4/-14 Microbeads	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
FACS Glasröhrchen	Becton Dickenson (Heidelberg)
MS-Magnetsäulen	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach)
PCR-Gefäße (0,2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen (blau, gelb, mit Filter)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Tubes (15 ml/50 ml)	Becton Dickenson (Heidelberg)
Reaktionsgefäße (1,5 ml/2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Roche LightCycler® Glaskapillaren	Boehringer (Mannheim)

Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien

3.3 Chemikalien

5xPuffer	Sigma (München)
Anchor probe (FITC)	Tib MolBiol (Berlin)
Aceton	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG (Melsungen)
Aqua bidestilata	Gibco BRL (Eggenstein)
Aqua distilata	Gibco BRL (Eggenstein)
Bromphenolblau Na ⁺ -Salz	Merck (Darmstadt)

Diethylpyrocarbonat (DEPC)0,1%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Detection probe (LC-Red 640 nm)	Tib MolBiol (Berlin)
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Dithiotreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Eisessig (Essigsäure 100%)	Merck (Darmstadt)
Ethanol 100%	Sigma (München)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Fetales Kälberserum (FCS)	Fa. Gibco BRL (Eggersheim)
Ficoll Hypaque	Sigma (München)
Glycerin	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Glycogen	Life Technologies (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Hexanukleotide	Life Technologies (Karlsruhe)
Isomylalkohol (3-Methyl-1-Butanol)	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
n-Laurylsarcosin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Methanol	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Natriumacetat 2m pH 4	Merck (Darmstadt)
Natriumacetatrihydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
di-Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck (Darmstadt)

Natriumhydrogenphosphatmonohydrat	Merck (Darmstadt)
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Natriumdisulfit	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Oligonukleotide	Life Technologies (Karlsruhe)
Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs)	Life Technologies (Karlsruhe)
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
PBS	Life Technologies (Paisley, Scotland)
Phenol	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Phenol / Chloroform (49:1)	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
2- Propanol	Carl Roth GmbH&Co (Karlsruhe)
Reverse Transkriptase (Superscript I)	Life Technologies (Karlsruhe)
Ribonuklease Inhibitor (RNAsin)	Promega (Mannheim)
Roche LightCycler FastStart Master	Boehringer (Mannheim)
Roche RNA-Isolation Kit	Boehringer (Mannheim)
RPMI Medium	Gibco (München)
Salzsäure	Life Technologies (Paisley, Scotland)
SDS	Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA)
TRIS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Trypton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Ultra pure DEPC treated water	Invitrogen (Paisley, UK)
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim)

Tabelle 3-3: Chemikalien

3.4 Lösungen und Puffer

Agarose-Gel-Basislösung	100 ml	10xTAE
	1,5 g	Agarose
	7 µl	Ethidiumbromid
BP-Loading Buffer	1 ml	SD1 1%
	5 ml	Glycerin
	2 ml	EDTA 0,5%, pH 8
	2 ml	Aqua dest.
	10 mg	Bromphenolblau (BP)
GT-Puffer	236,3 g	Guanidinthiocyanat
	2,5 g	N-Lauroylsarcosin
	3,7 g	Trisodiumcitrat
	3,5 ml	2-Mercaptoethanol
	ad 500 ml	Aqua dest., pH 7
LB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	950 ml	deionisiertes Wasser, pH 7
	Autoklavieren und evtl. Antibiotikumzugabe	
LB-Platten	siehe LB Medium	
	15 g/l	Agar vor dem Autoklavieren
	Autoklavieren und evtl. Antibiotikumzugabe	
	Platten gießen, umdrehen und bei 4 °C lagern	

10x Ligationspuffer	60 mM	Tris-HCl pH 7,5
	60mM	MgCl ₂
	50mM	NaCl
	1 mg/ml	bovines Albuminserum
	70 mM	Mercaptoethanol
	1 mM	ATP
	20 mM	Dithiothreitol
	10 mM	Spermidin
Nukleotidlösung	2,5mM	je d'NTP
10x PBS	80 g	NaCl
	2,0 g	KCl
	11,5 g	Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
	2,0 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1l	Aqua dest., pH 7,4
SOC Medium	20 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	0,5g	NaCl
	950 ml	deionisiertes Wasser, pH 7
	10 ml	250 mM KCl
	10 ml	2 M Glucose
	10 ml	1 M MgCl ₂
10x TAE	48,4 g	TRIS
	11,4 ml	Eisessig
	20 ml	EDTA 0,5M pH 8
	ad 200 ml	Aqua dest.

4 Ergebnisse

4.1 Proben

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Blutproben von 57 Probanden bearbeitet (vgl. Abbildung 4-1). Von den Probanden liegen Blutproben zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten vor. Probenentnahmen erfolgte aus der Nabelschnur (NS = Nabelschnurblut), nach dem 4. Lebensmonat (V2) und nach dem 12. Lebensmonat (V4).

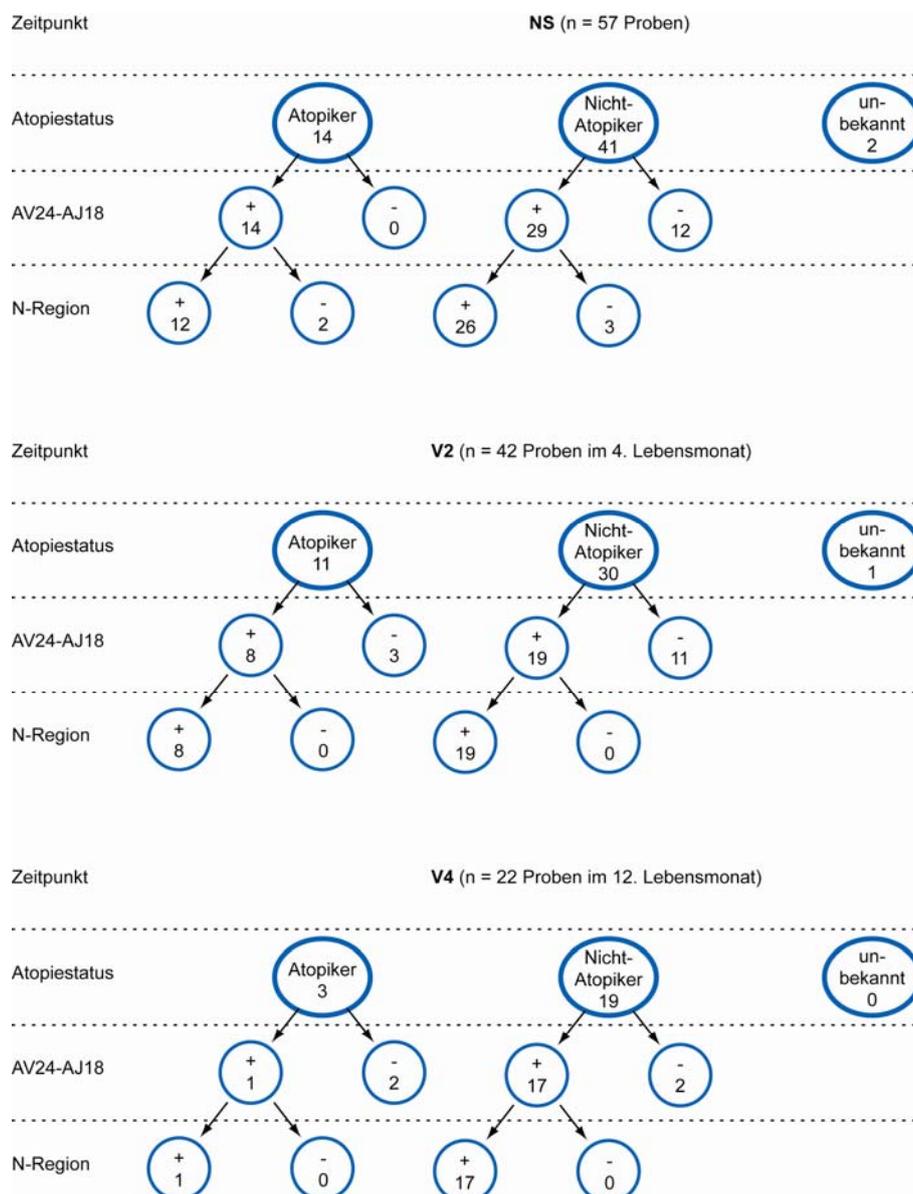


Abbildung 4-1: Übersicht der Anzahl bearbeiteter Proben zu drei Zeitpunkten (NS, V2, V4) unter Angabe von Atopiestatus, AV24AJ18 Rearrangement und N-Region

Unter den 57 Probanden fanden sich 14 mit atopischen Erkrankungen, im Folgenden als Atopiker bezeichnet. Von diesen 14 Atopikern konnten 14 Nabelschnurblutproben, elf Proben, die nach dem 4. Lebensmonat und 3 Proben, die nach dem zwölften Lebensmonat abgenommen wurden, untersucht werden.

AV24-AJ18 Transkripte waren bei 45 Nabelschnurblutproben, bei 28 Proben von Probanden am Ende des 4. Lebensmonats und bei 18 Proben von Probanden am Ende des 12. Lebensmonats nachweisbar. (vgl. Tabelle 4-1).

	NS	V2	V4
Gesamt	45	28	18
Atopiker	14	8	1
Nicht-Atopiker	29	19	17
Atopiestatus unbekannt	2	1	0

Tabelle 4-1: Anzahl mittels Real Time PCR analysierter Proben nach Zeitpunkt und Atopiestatus

Bei Probanden, bei denen AV24-AJ18 Transkripte nachweisbar waren, wurden FRET-Analysen zum Nachweis von N-Regionen durchgeführt. Beim Nachweis einer N-Region wurden die Proben sequenziert. Chronologisch gegliedert liegt folgende Anzahl von Einzelnukleotidanalysen vor (vgl. Tabelle 4-2, Anhang):

	NS	V2	V4	V8	Gesamt
Gesamt	33	18	13	2	66
Atopiker	10	3	0	0	13
Nicht-Atopiker	23	15	13	2	53

Tabelle 4-2: Chronologische Gliederung auf Einzelnukleotidebene analysierter Proben

Von 4 Probanden liegen longitudinale Serien analysierter Proben von Nabelschnurblut und Proben im Alter von 4 und 12 oder 36 Monaten vor. Von 3 Probanden konnten Nabelschnurblutproben und Proben im Alter von 4 Monaten untersucht werden. Von 3 Probanden liegen Ergebnisse von analysiertem peripherem Blut im Alter von 4 und 12 Monaten vor. Von 13 Probanden konnte ausschließlich Nabelschnurblut analysiert werden. Von einem Proband liegt nur eine Probe analysierten peripheren Blutes im Alter von 4 Monaten und von 3 Probanden liegen nur Proben analysierten peripheren Blutes im Alter von 12 Monaten vor (vgl. Tabelle 4-3).

Zeitpunkte	Anzahl Probanden
NS + V2 + V4 oder V8	4
NS + V2	3
V2 + V4	3
Nur NS	13
Nur V2	1
Nur V4	3
Gesamt	27

Tabelle 4-3: Anzahl auf Einzelnukleotidebene analysierter Proben nach Serien

Zusätzlich wurden alle molekularbiologischen Schritte an fünf Erwachsenen vorgenommen. Wie schon bei vorherigen Untersuchungen (Dellabonna P et al., 1994), konnten bei keinem der fünf erwachsenen Probanden AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region nachgewiesen werden. Die durchgeführten FACS-Analysen waren alle positiv für NKT-Zell-spezifische Marker.

4.2 Charakterisierung der Atopiker

Unter den Probanden, die bezüglich des Atopiestatus blind ausgewählt wurden, fanden sich 14 Atopiker. Bei zwölf ist die Diagnose einer atopischen Dermatitis gestellt worden. Asthma konnte in zwei Fällen diagnostiziert werden.

Da die Probanden alle aus einer Risikokohorte stammen, war mindestens ein Elternteil Atopiker; bei sechs Kindern waren beide Eltern Atopiker und bei acht Kindern nur jeweils ein Elternteil.

Bei drei der 14 Kinder mit atopischer Erkrankung lag eine IgE-Sensibilisierung (spezifisches IgE) vor; ein Mal gegenüber Nahrungsmitteln und zwei Mal in Form einer Pollenallergie. Die Sensibilisierung gegenüber Nahrungsmitteln wurde im ersten Lebensjahr festgestellt, die gegenüber Pollen im dritten Lebensjahr (vgl. Tabelle 4-4).

Atopiker gesamt	14
Diagnose Atopische Dermatitis innerhalb der ersten drei Lebensjahre	12
Diagnose Asthma bis zum 3. Lebensjahr	2
Atopiestatus Eltern: beide Eltern Atopiker	6
Atopiestatus Eltern: ein Elternteil Atopiker	8
IgE-Sensibilisierung gesamt	3
- Nahrungsmittelallergene	1
- Luftallergene	2

Tabelle 4-4: Charakterisierung der Atopiker

4.3 Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten in AV24⁺ Klonen bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr

Atopiker zeigen im Vergleich zu Nicht-Atopikern im Nabelschnurblut und in peripheren Blutproben nach dem vierten Lebensmonat niedrigere Mittelwerte was die Anzahl an AV24-AJ18 Transkripten innerhalb der AV24 TZR α -Zellen anbelangt. Allerdings zeigt der Mann-Whitney *U* Test hierfür keine statistische Signifikanz (vgl. Tabelle 4-5).

NS	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	p
Atopiker	14	5,71	1	17	0,794
Nicht-Atopiker	29	6,31	1	23	
4. LM					
	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	
Atopiker	8	4,63	2	9	0,593
Nicht-Atopiker	19	5,05	1	10	
12. LM					
	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	
Atopiker	1	n/a	n/a	n/a	0,202
Nicht-Atopiker	17	3,59	1	7	

Tabelle 4-5: Anzahl von AV24-AJ18 Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr und Mann-Whitney *U*

Auch der t-Test für Mittelwertgleichheit zeigt zu keinem der betrachteten Zeitpunkte einen statistisch signifikanten Unterschied der Häufigkeit von AV24-AJ18-Transkripten innerhalb der AV24 TZR α -Zellen zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern (vgl. Tabelle 4-6).

NS	n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	p	Konfidenzintervall	
Atopiker	14	5,71	4,48	1	17	0,713	-3,84	2,65
Nicht-Atopiker	29	6,31	5,14	1	23			
4. LM	n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	p	Konfidenzintervall	
Atopiker	8	4,63	2,62	2	9	0,704	-2,72	1,87
Nicht-Atopiker	19	5,05	2,66	1	10			
12. LM	n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	p	Konfidenzintervall	
Atopiker	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Nicht-Atopiker	17	3,59	1,70	1	7			

Tabelle 4-6: AV24-AJ18 Transkripte bei Atopikern und Nicht-Atopikern (t-Test)

Sowohl bei gesunden, als auch bei erkrankten Kindern kommt es im Laufe der ersten vier Lebensmonate zu einer Abnahme des Mittelwertes der AV24-AJ18 Transkripte (vgl. Tabelle 4-7). Für Atopiker liegt nur eine Probe nach dem 12. Lebensmonat vor.

NS	NS	4. LM	12. LM
Atopiker	5,71	4,63	n/a
Nicht-Atopiker	6,31	5,05	3,59

Tabelle 4-7: Mittelwerte der AV24-AJ18 Transkripte bei Atopikern und Nicht-Atopikern im Nabelschnurblut, und Blutproben nach dem 4. und 12. Lebensmonat

Der longitudinale Abfall der AV24-AJ18-Transkripte lässt sich durch die lineare Gleichung

$$y = 7,08 + (-1,18) * x$$

beschreiben (Statistik Programm "R programming language, Version 2.5.0"). Da $p < 0,05$ ($p = 5,72 \cdot 10^{-8}$), kann der Abfall der Mittelwerte der AV24-AJ18 Transkripte sowohl bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr als signifikant angesehen werden. Der Atopiestatus ist hierbei keine signifikante Einflussgröße ($p = 0,727$).

4.4 Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten mit N-Region in AV24⁺ Klonen bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr

Um zu überprüfen, ob es einen Unterschied bezüglich des Vorhandenseins einer N-Region zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr gibt, wurden Bakterienklone, die ein positives Ergebnis bei der V α 24-J α 18 PCR hatten mittels FRET analysiert. Während der Mittelwert der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region bei Nicht-Atopikern im Nabelschnurblut mit 70,69% an allen AV24-AJ18 Transkripten über dem Mittelwert der Atopiker (54,73%) lag, zeigte sich zu späteren Zeitpunkten ein umgekehrtes Ergebnis. Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (vgl. Tabelle 4-8, Tabelle 4-9).

NS	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	p
Atopiker	12	54,73	0	100	0,12
Nicht-Atopiker	26	70,69	14,3	100	
4. LM					
	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	
Atopiker	8	66,67	50	100	0,667
Nicht-Atopiker	19	61,46	20	100	
12. LM					
	n	Mittelwert	Minimum	Maximum	
Atopiker	1	100,00	100,00	100,00	0,201
Nicht-Atopiker	17	61,64	20	100	

Tabelle 4-8: Prozentualer Anteil der AV24-AJ18-Transkripte mit N-Region an den AV24-AJ18-Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr und Mann-Whitney *U* Test

NS	n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	p	Konfidenzintervall	
Atopiker	12	54,73	31,87	0	100	0,115	-35,99	4,07
Nicht-Atopiker	26	70,69	27,67	14,3	100			
4. LM	n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	p	Konfidenzintervall	
Atopiker	8	66,67	21,82	50	100	0,623	-16,33	26,75
Nicht-Atopiker	19	61,46	25,89	20	100			
12. LM	n	Mittelwert	Standardabweichung	Minimum	Maximum	p	Konfidenzintervall	
Atopiker	1	100,00	n/a	100	100	n/a	n/a	n/a
Nicht-Atopiker	17	61,64	25,94	20	100			

Tabelle 4-9: AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region bei Atopikern und Nicht-Atopikern (t-Test)

4.5 Zusammenhang zwischen Frequenz an AV24-AJ18 Transkripten, dem Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region und dem elterlichen Atopiestatus

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob der Atopiestatus der Eltern einen Einfluss auf die Anzahl der AV24-AJ18-Transkripte hat. Da die Probanden aus einem Hochrisikokollektiv stammen, liegen nur Daten von Probanden vor, bei denen bei mindestens einem Elternteil (1) eine Allergie vorlag. Zum Teil sind auch beide Elternteile (2) betroffen (vgl. Tabelle 4-10).

	NS	4. LM	12. LM
n	43	27	18
Pearson Korrelationskoeffizient	-0,99	0,473	0,400
p-Wert	0,530	0,013	0,100

Tabelle 4-10: Korrelation zwischen Atopiestatus der Eltern und Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation)

Mit einem p-Wert von 0,013 zeigt sich ausschließlich im 4. Lebensmonat eine signifikante Korrelation. Wenn beide Elternteile Atopiker sind, ist die Anzahl der AV24-AJ18 Transkripte erhöht.

Eine Korrelation zwischen dem Atopiestatus der Eltern und dem prozentualen Anteil der AV24-AJ18-Transkripte mit N-Region an der Gesamtzahl der AV24-AJ18-Transkripte konnte zu keinem Zeitpunkt im ersten Lebensjahr gezeigt werden; zu allen Zeitpunkten ist der p-Wert größer als 0,05 (vgl. Tabelle 4-11).

	NS	4. LM	12. LM
n	39	27	18
Pearson Korrelationskoeffizient	-0,35	-0,197	-0,293
p-Wert	0,834	0,324	0,238

Tabelle 4-11: Korrelation zwischen Atopiestatus der Eltern und Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation)

4.6 Zusammenhang zwischen der Frequenz an AV24-AJ18 Transkripten, dem Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region und IgE-Serumspiegeln

Ein weiterer Bestandteil der GINI-Studie war die Erhebung von Sensibilisierung gegenüber Nahrungsmittel- und Aeroallergenen. Diese Informationen wurden genutzt, um etwaige Assoziationen zwischen AV24-AJ18-Transkripte und IgE-Spiegeln herauszufinden.

Eine Korrelation konnte weder zwischen einem erhöhtem spezifischem IgE-Spiegel und der Frequenz der AV24-AJ18-Transkripte (vgl. Tabelle 4-12), noch zwischen einem erhöhten spezifischem IgE-Spiegel und dem prozentualen Anteil der AV24-AJ18-Transkripte mit N-Region an der Gesamtzahl der AV24-AJ18-Transkripte (vgl. Tabelle 4-13) im ersten Lebensjahr nachgewiesen werden.

	NS	4. LM	12. LM
n	42	26	18
Pearson Korrelationskoeffizient	-0,203	0,219	-0,015
p-Wert	0,198	0,282	0,954

Tabelle 4-12: Korrelation zwischen erhöhtem spezifischem IgE-Spiegel und Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation)

	NS	4. LM	12. LM
n	39	26	18
Pearson Korrelationskoeffizient	0,142	-0,113	-0,285
p-Wert	0,387	0,582	0,252

Tabelle 4-13: Korrelation zwischen erhöhtem spezifischem IgE-Spiegel und Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation)

4.7 TZR-Sequenzanalysen

Insgesamt liegen Sequenzen von 66 AV24-AJ18 Transkripten von 27 Probanden vor. Eine vollständige Liste aller sequenzierten Klone findet sich im Anhang. Vier der 27 Probanden sind Atopiker, 23 Probanden Nicht-Atopiker. Von den getesteten 66 AV24-AJ18+ Bakterienklonen sind 13 von Atopikern und 53 von Nicht-Atopikern (vgl. Tabelle 4-14).

	Probanden	Sequenzen
Gesamt	27	66
Atopiker	4 (14,8%)	13 (19,7%)
Nicht-Atopiker	23 (85,2%)	53 (80,3%)

Tabelle 4-14: Anzahl Analysen auf Einzelnukleotidebene nach Atopiestatus

Um die Zusammensetzung der durch die Triplets kodierten Aminosäuren strukturiert wiederzugeben, wurde eine Einteilung der Aminosäuren auf Grund ihrer Strukturen und ihrer biochemischen Eigenschaften vorgenommen. Unterschieden wurden polare und unpolare Aminosäuren. Zur Gruppe der polaren Aminosäuren gehören ungeladene, saure und basische Aminosäuren (vgl. Tabelle 4-15).

Ungeladene AS	Saure AS	Basische AS
Asparagin (Asn)	Asparaginsäure (Asp)	Histidin (His)
Glutamin (Gln)	Glutaminsäure (Glu)	Lysin (Lys)
Serin (Ser)		Arginin (Arg)
Threonin (Thr)		

Tabelle 4-15: Gruppe polarer Aminosäuren

Zur Gruppe der unpolaren Aminosäuren gehören Aliphaten und Aromaten (vgl. Tabelle 4-16).

Aliphatische AS	Aromatische AS
Glycin (Gly)	Phenylalanin (Phe)
Alanin (Ala)	Tryptophan (Trp)
Isoleucin (Ile)	Tyrosin (Tyr)
Leucin (Leu)	
Valin (Val)	
Methionin (Met)	
Prolin (Pro)	
Cystein (Cys)	

Tabelle 4-16: Gruppe unpolarer Aminosäuren

4.7.1 Unterschiede zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern

Der prozentuale Anteil an Codons, der für polare Aminosäuren kodiert, ist für Atopiker und Nicht-Atopiker nahezu gleich. Dies gilt auch für den prozentualen Anteil an Codons, die für unpolare Aminosäuren kodieren (vgl. Tabelle 4-17).

	Codons polarer	Codons unpolarer	Anzahl der inserierten Codons
Gesamt	60	68	128
Atopiker	14 (46,7%)	16 (53,3%)	30
Nicht-Atopiker	46 (46,9%)	52 (53,1%)	98

Tabelle 4-17: Anteil Codons polarer Aminosäuren

Auch die Aufschlüsselung in Codons, die für aliphatische, aromatische, ungeladene, saure und basische Aminosäuren kodieren, zeigt nur minimale Unterschiede zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern (vgl. Tabelle 4-18).

	Aliphatisch	Aromatisch	Ungeladen	Baisch	Sauer	Gesamt
Gesamt	63	5	32	21	7	128
Atopiker	15 (50,0%)	1 (3,3%)	8 (26,7%)	5 (16,7%)	1 (3,3%)	30
Nicht-Atopiker	48 (49,0%)	4 (4,1%)	24 (24,5%)	16 (16,3%)	6 (6,1%)	98

Tabelle 4-18: Anteil Codons ungeladener, saurer und basischer Aminosäuren

4.7.2 Aminosäuremuster im longitudinalen Verlauf

Ziel der Arbeit war es herauszufinden, ob NKT-Zellklone mit einer bestimmten Primärstruktur der N-Region positiv selektioniert werden, d. h. im longitudinalen Verlauf wiederholt auftreten. Lediglich bei einem von 27 Probanden, einem Nicht-Atopiker, konnte ein NKT-Zellklon mit derselben N-Region aus dem Nabelschnurblut und auch noch aus peripherem Blut nach 4 Monaten isoliert werden. Nach 12 Monaten war dieser Klon jedoch nicht mehr zu isolieren. Die Sequenz der N-Region lautet CCC CCT CAC. Diese kodiert für die Aminosäurefolge Prolin – Prolin – Histidin (vgl. Tabelle 4-19).

Probanden-Nr.	t	Klon-Nr.	AV24			N-Region				AJ18			
			Val	Val	Ser					Asp	Arg	Gly	Ser
			GTG	GTG	AGC	GAC	AGA	GGC	TCA				
						Pro	Pro	His					
1	NSB	25	GTG	GTG		CCC	CCT	CAC			AGA	GGC	TCA
						Pro	Pro	His					
1	4. LM	92	GTG	GTG		CCC	CCT	CAC			AGA	GGC	TCA

Tabelle 4-19: Konservierte Aminosäuremuster im longitudinalen Verlauf (I)

Bei weiteren Nicht-Atopikern finden sich N-Region bei denen die Polarität der Aminosäuren, für die die Codons kodieren, im Verlauf der Entwicklung gleich bleibend ist (vgl. Tabelle 4-20). Im longitudinalen Verlauf lassen sich bei Atopikern derartige Muster nicht feststellen.

Probanden-Nr.	t	Klon-Nr.	AV24			N-Region				AJ18			
			Val	Val	Ser					Asp	Arg	Gly	Ser
			GTG	GTG	AGC	GAC	AGA	GGC	TCA				
						Ala							
1	NSB	28	GTG	GTG		GCC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Gly							
1	12. LM	72	GTG	GTG	AGC	GGG						GGC	TCA
						Ser							
5	4. LM	63	GTG	GTG		AGT				GAC	AGA	GGC	TCA
						Thr							
5	12. LM	88	GTG	GTG		ACG				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Asn						
84	NSB	94	GTG	GTG	AGC	GCG	AAC				AGA	GGC	TCA
						Val	Thr						
84	4. LM	46	GTG			GTA	ACC			GAC	AGA	GGC	TCA

Tabelle 4-20: Konservierte Aminosäuremuster im longitudinalen Verlauf (II)

5 Diskussion

Bei Patienten mit allergischen Erkrankungen ist das Th1-Th2-Gleichgewicht in Richtung Th2-Immunantworten verschoben. Für die Ausreifung und Differenzierung von Th2-Zellen wird IL-4 benötigt. Als Produzenten von IL-4 und somit als Mitverantwortliche für die Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichts in Richtung Th2-Immunantwort kommen unter anderem NKT-Zellen in Frage, da sie in kurzer Zeit große Mengen an IL-4 produzieren. Auf Grund dieser Tatsache wird vermutet, dass zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern Unterschiede bei NKT-Zellen bestehen. Fragestellung der vorliegenden Arbeit war es, ob sich die Frequenzen von AV24-AJ18 Transkripten mit und ohne N-Region zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr unterscheiden.

Alle Probanden der Arbeit sind Teilnehmer der GINI-Studie aus München und stellen eine sehr gut definierte Probandengruppe mit strikten Diagnosekriterien für atopische Erkrankungen dar. Alle Proben wurden blind bezüglich des Atopiestatuses ausgewählt und bearbeitet. Sozioökonomischer Status, Anzahl von Geschwistern, Stillen, Haustiere, Impfungen und Infektionskrankheiten in der Kindheit sowie zahlreiche weitere Parameter wurden erfasst.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern im Nabelschnurblut und in Blutproben, die nach dem 4. sowie 12. Lebensmonat abgenommen wurden, nicht unterscheidet. Auch die Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten mit N-Region variiert zu verschiedenen Zeitpunkten im ersten Lebensjahr zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern nicht.

Jedoch kommt es im Verlauf des ersten Lebensjahres zu einer Abnahme der AV24-AJ18 Transkripte bei Atopikern sowie Nicht-Atopikern. Dies spricht dafür, dass NKT-Zellen bereits im fetalen Leben eine wichtige immunoregulatorische Rolle spielen und ergänzt Ergebnisse von Prussin und Vliet, die zeigen konnten, dass sich NKT-Zellen ihren endgültigen Phänotyp bereits während der fetalen Periode aneignen und, dass sie auch schon während dieser aktiviert wurden (Prussin C et al., 1997; Vliet HJ van der et al., 2000).

In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass V α 24 CD161⁺ NKT-Zellen zwischen erwachsenen Atopikern und Nicht-Atopikern auf zellulärem und molekularem Niveau im peripher-venösen Blut keine signifikanten Unterschiede aufweisen (Prell C et al., 2003). Im Gegensatz dazu deuteten Ergebnisse einer Pilotstudie mit 13 Kindern (sieben Atopiker, fünf Nicht-Atopiker) darauf hin, dass gesunde Kinder im Nabelschnurblut mehr AV24-AJ18 Transkripte haben, als Kinder, die bis zu ihrem 3. Lebensjahr eine atopische Dermatitis entwickelten.

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit liegen exakt dieselben molekularbiologischen Methoden wie der Pilotstudie zu Grunde und es wurden ebenfalls Blutproben von Teilnehmern der GINI-Studie verwendet. Bei einer größeren Probandenzahl dieser Arbeit (57 Probanden, darunter 14 Atopiker) lässt sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern nachweisen. Allerdings wurde nach Entblindung das Verhältnis von Probanden mit und ohne Atopie offensichtlich: Unter den 57 Probanden fanden sich nur 14 Atopiker; auf Einzelnukeotidebene liegen Analysen von vier Atopikern gegenüber 23 Nicht-Atopikern vor.

In der Literatur liegen nur wenige Studien vor, die Unterschiede von NKT-Zellen zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern untersuchen. Die existierenden Untersuchungen zeigen teilweise widersprüchliche Ergebnisse (Magnan A et al., 2000; Oishi Y et al., 2000; Takahashi T et al., 2003; Prell C et al., 2003):

Magnan et al. untersuchten 70 erwachsene Probanden (30 Probanden mit atopischer Dermatitis) und stellten eine vermehrte Anzahl von $CD4^+$ NKT-Zellen ($V\alpha 24^+ V\beta 11^+$) bei Atopikern fest, was mit höheren IL-4- und IgE-Spiegeln korrelierte. Die Gruppe der Atopiker war jedoch unscharf definiert und die Atopiediagnose wurde lediglich über Hauttestung (Prick-Test) gestellt.

Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Oishi zeigen bei drei Patienten mit atopischer Dermatitis und sechs Patienten mit Asthma eine reduzierte Zahl von DN $V\alpha 24$ NKT-Zellen gegenüber fünf gesunden Probanden; die Zahl der $CD4^+ V\alpha 24$ NKT-Zellen war nicht verändert. Nach Aktivierung der NKT-Zellen produzierten diese hauptsächlich IFN- γ , aber kein IL-4.

In einer Studie mit 31 Atopikern und 71 gesunden Probanden von Takahashi war die Zahl der DN $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ NKT-Zellen bei Patienten mit atopischer Dermatitis reduziert und korrelierte negativ mit dem Quotienten aus Th1-Zellen/Th2-Zellen.

Dass NKT-Zellen früh eine Rolle in der Immunregulation spielen könnten, zeigen Untersuchungen an Nabelschnurblut, bei denen ein Th2-Übergewicht festgestellt wurde und die AV24-AJ18 Transkripte in hoher Frequenz gefunden wurden (D'Andrea et al., 2000; Der Vliet et al., 2000). Ergebnisse was die Frequenz AV24-AJ18 Transkripte im ersten Lebensjahr anbelangt, sind bislang nicht publiziert.

Diese widersprüchlichen Aussagen zwischen den einzelnen Studien lassen sich durch die zum Teil geringen Fallzahlen der untersuchten Probanden, durch ungenügende Kriterien der Probandenauswahl und fehlende strikte Diagnosekriterien sowie durch nicht adäquate statistische Tests (parametrische Tests bei kleinen Fallzahlen) zumindest teilweise erklären. Außerdem ist eine hohe interindividuelle Variabilität bezüglich der Häufigkeit von $V\alpha 24^+ V\beta 11^+$ NKT-Zellen bekannt, weshalb kleine Fallzahlen zu einer fehlerhaften Interpretation der Ergebnisse führen können.

In der vorliegenden Arbeit wurden nicht-parametrische und parametrische Tests durchgeführt. Die Ergebnisse basieren auf einer deutlichen größeren Anzahl an Probanden, die alle aus einem sehr gut charakterisierten Kollektiv stammen. Eine atopische Erkrankung wurde nur bei Vorliegen strikter, a priori definierter Kriterien diagnostiziert. In Übereinstimmung mit Magnan et al. und Takahashi et al. war eine Korrelation zwischen AV24-AJ18 Transkripten und erhöhten IgE-Serumspiegeln nicht nachweisbar. Im Falle einer Atopiediagnose bei beiden Elternteilen war die Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte im 4. Lebensmonat bei Atopikern und Nicht-Atopikern reduziert ($p = 0,013$). Weder im Nabelschnurblut, noch in späteren Proben zeigte sich ein solches Resultat. Ansonsten hatte die Tatsache, dass ein oder beide Elternteile Atopiker waren, keinerlei Einfluss auf die Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte oder den Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region.

Um zu testen, ob sich AV24-AJ18 positive Zellen aus Blutproben aus dem ersten Lebensjahr von AV24-AJ18 positive NKT-Zellen im peripheren Blut von Erwachsenen unterscheiden, wurden AV24-AJ18 Transkripte aus Nabelschnurblut und aus Blutproben des 4. und 12. Lebensmonats auf Einzelnukleotidebene untersucht. Kombiniert wurde hierzu die FRET Technologie mit der Schmelzkurvenanalyse. Mit dieser Methode war es möglich eine große Anzahl von NKT-Zell-Klonen zu testen. Im peripheren Blut von Erwachsenen exprimieren AV24-AJ18 positive NKT-Zellen einen invarianten TZR. Von seltenen Ausnahmefällen abgesehen (Dellabonna P et al., 1994; Exley M et al., 1997), enthält die α -Kette des TZR bei NKT-Zellen beim Erwachsenen keine inserierten Nukleotide (Dellabonna P et al., 1994; Han M et al., 1999; Prell C et al., 2003). Das Ergebnis der Sequenzanalyse zeigte eine große Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten mit N-Region bei den Probanden im ersten Lebensjahr. Diese Variante zeigte sich auch in peripheren Blutproben, die nach dem 4. und 12. Lebensmonat abgenommen wurden. Bei Untersuchungen von Kontrollproben von Erwachsenen ($n = 5$) mit denselben molekularbiologischen Methoden fanden sich keine N-Regionen, was mit bisherigen Erkenntnissen übereinstimmt. Die Verteilung der Aminosäuren, für die die Codons der N-Region kodieren, variierte zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern nur in geringem Maße. Bei Nicht-Atopikern lag eine größere Anzahl an für verschiedene Aminosäuren kodierenden Codons als bei Atopikern vor. Statistisch konnte jedoch kein Unterschied zwischen der Verteilung der Codons bei Atopikern und Nicht-Atopikern nachgewiesen werden (Chi-Quadrat-Test). Im longitudinalen Verlauf konservierte Aminosäuremuster fanden sich nur bei einem gesunden Probanden. Bei Atopikern ließen sich derartige Muster nicht feststellen. Insgesamt spricht dies eher gegen die Selektion von NKT-Zellen mit bestimmter Primärstruktur der N-Region.

NKT-Zellen sind unter anderem über die Expression eines invarianten AV24-AJ18 TZR definiert. Es ist möglich, dass die in dieser Arbeit untersuchten AV24-AJ18 positiven Klone von NKT-Zellen stammen oder theoretisch auch von konventionellen T-Zellen. Allerdings ist

der Anteil an AV24-AJ18 positiven T-Zellen in peripheren Blutproben sehr gering (Dellabonna P et al., 1994; Han M et al., 1999; Prell C et al., 2003). Im Gegensatz zu NKT-Zellen findet sich bei konventionellen T-Zellen V α 24 nur bei 2-10 %; fast ausschließlich auf DN T-Zellen; in nur 0,5 % der Fälle auf CD4⁺ T-Zellen und in nur 0,1 % der Fälle auf CD8⁺ T-Zellen. Zum anderen wurde die Methodik der Arbeit an fünf Erwachsenen überprüft. Die FACS-Analysen bei Erwachsenen waren positiv für NKT-Zell-spezifische Marker und in der Sequenzanalyse der Proben zeigten sich AV24-AJ18 TZR ohne N-Region.

Da von den Probanden nur lysierte Blutproben zur Verfügung standen, war es nicht möglich NKT-Zellen direkt zu isolieren, um deren N-Region auf Einzelnukeotidebene zu analysieren. Die Isolation von NKT-Zellen aus peripherem Blut mit anschließender Analyse der N-Region wäre eine Möglichkeit gewesen; der Atopiestatus der Kinder wäre allerdings unbekannt geblieben. Durch Verwendung von Proben der Probanden aus der GINI-Studie, die heute über zehn Jahre alt sind, ist der Atopiestatus jedes Probanden bekannt.

Die Tatsache, dass keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auf AV24-AJ18 Transkript-Ebene gefunden werden konnten, könnte auch durch die Tatsache bedingt sein, dass Vollblut-Proben verwendet wurden. In zukünftigen Studien könnten möglicherweise 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.

Für unsere Untersuchungen wurde Nabelschnurblut und peripheres Blut 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 NKT-Zellen 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 NKT-Zellen entsprechend der Immuntoleranz. Bei immuntoleranten Mäusen konnte eine hohe IL-4 Sekretion aufrechterhalten werden, während nicht-tolerante Mäuse bei höherer Entzündungsreaktion mehr IFN γ 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.

Kurzfassung

Bei Patienten mit atopischen Erkrankungen ist das Th1-Th2-Gleichgewicht in Richtung Th2-Immunantwort verschoben. Für die Ausreifung und Differenzierung von Th2-Zellen wird IL-4 benötigt. Es besteht die Hypothese, dass NKT-Zellen als Produzenten von IL-4 mitverantwortlich für die Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichts in Richtung Th2-Immunantwort sind.

Diese Arbeit untersucht molekulare Unterschiede von NKT-Zellen zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr. Unter den 57 Probanden befanden sich 14 Atopiker; bei zwölf von ihnen wurde innerhalb der ersten drei Lebensjahre eine atopische Dermatitis diagnostiziert, bei zwei Kindern lag allergisches Asthma bronchiale vor. Alle Probanden sind Teilnehmer der GINI-Studie aus München und stellen eine sehr gut definierte Probandengruppe mit strikten Diagnosekriterien für atopische Erkrankungen dar.

Bestimmt wurde die Frequenz von AV24-AJ18 Transkripten im Nabelschnurblut und in Blutproben, die im 4. sowie 12. Lebensmonat entnommen wurden. Hierbei wurden Unterschiede zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern bezüglich des Vorhandenseins einer N-Region, d. h. von inserierten, nicht-informativen Nukleotidsequenzen, untersucht. Außerdem wurde überprüft, ob longitudinal konservierte Aminosäuremuster der N-Region existieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass sich die Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern im Nabelschnurblut und in Blutproben, die nach dem 4. sowie 12. Lebensmonat abgenommen wurden, nicht unterscheidet. Jedoch kommt es im Verlauf des ersten Lebensjahres zu einer Abnahme der AV24-AJ18 Transkripte bei Atopikern sowie Nicht-Atopikern. Auch die Häufigkeit von AV24-AJ18 Transkripten mit N-Region bei Atopikern und Nicht-Atopikern unterscheidet sich im ersten Lebensjahr nicht. Ein Zusammenhang zwischen dem Atopiestatus der Eltern und der Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte beziehungsweise dem Vorhandensein von AV24-AJ18 Transkripten mit N-Region bei Kindern im ersten Lebensjahr konnte nicht festgestellt werden.

Nur bei einem gesunden Probanden konnte im ersten Lebensjahr eine konservierte Sequenz der N-Region gezeigt werden. Die Sequenz der N-Region lautet CCC CCT CAC und kodiert für die Aminosäurefolge Prolin–Prolin–Histidin.

In zukünftigen Studien könnten NKT-Zell-Subpopulationen von Atopikern und Nicht-Atopikern untersucht werden. Auch funktionelle Studien von NKT-Zellen bei Atopikern und Nicht-Analysen und Untersuchungen in verschiedenen Geweben bieten sich an, um den Einfluss von NKT-Zellen bei atopischen Erkrankungen zu klären.

Schlagwörter

NKT-Zellen

AV24-AJ18

N-Region

Atopie

Atopiker

Nicht-Atopiker

Anhang

Probanden-Nr.	t	Klon-Nr.	AV24			N-Region				AJ18			
			Val	Val	Ser					Asp	Arg	Gly	Ser
			GTG	GTG	AGC	GAC	AGA	GGC	TCA				
						Pro	Pro	His					
1	NSB	25	GTG	GTG		CCC	CCT	CAC			AGA	GGC	TCA
						Ala							
1	NSB	28	GTG	GTG		GCC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Gly						
1	NSB	71	GTG	GTG	AGC	GCG	GGC			GAC	AGA	GGC	TCA
						Pro	Pro	His					
1	4. LM	92	GTG	GTG		CCC	CCT	CAC			AGA	GGC	TCA
						Asp	Ile						
1	12. LM	12	GTG	GTG	AGC	GAC	ATA			GAC	AGA	GGC	TCA
						Gly							
1	12. LM	72	GTG	GTG	AGC	GGG						GGC	TCA
						Arg	Arg	Gly					
2	NSB	63	GTG	GTG		CGA	AGA	GGC					TCA
						Thr							
2	4. LM	4	GTG	GTG		ACC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala							
2	4. LM	85	GTG	GTG		GCC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Gly							
2	12. LM	16	GTG	GTG		GGT				GAC	AGA	GGC	TCA
						Thr	Gln						
2	12. LM	73	GTG	GTG		ACT	CAA			GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Val	Gly					
3	NSB	25	GTG	GTG	AGC	GCG	GTG	GGA					
						Val	Ser						

3	NSB	3	GTG			GTT	TCC					GGC	TCA
						Ile							
3	4. LM	14	GTG			ATC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Trp							
3	36. LM	18	GTG			TGG	AGG			GAC	AGA	GGC	TCA
						Thr	Pro						
3	36. LM	2	GTG	GTG		ACC	CCT				AGA	GGC	TCA
						Ser							
5	4. LM	63	GTG	GTG		AGT				GAC	AGA	GGC	TCA
						Thr							
5	12. LM	88	GTG	GTG		ACG				GAC	AGA	GGC	TCA
						Gly	Leu						
14	NSB	40	GTG	GTG	AGC	GGG	CTT			GAC	AGA	GGC	TCA
						His							
14	NSB	78	GTG	GTG	AGC	CAC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Val	Ser						
58	NSB	25	GTG			GTT	TCC			GAC	AGA	GGC	TCA
						Val	Ala	Arg	Gln				
58	NSB	71	GTG			GTT	GCC	CGA	CAG	G		GGC	TCA
						Ile							
62	12. LM	5	GTG	GTG		ATT				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Lys						
62	12. LM	78	GTG	GTG	AGC	GCG	AAG				AGA	GGC	TCA
						Ser	Ser						
65	NSB	25	GTG	GTG	AGC	TCA	AGC				AGA	GGC	TCA
						Trp							
65	NSB	33	GTG	GTG	AGC	TGG				GAC	AGA	GGC	TCA
						Thr							
67	NSB	19	GTG	GTG		ACG					AGA	GGC	TCA
						Trp							
69	NSB	67	GTG	GTG	AGC	TGG					AGA	GGC	TCA

						Glu							
72	4. LM	23	GTG	GTG	AGC	GAG					AGA	GGC	TCA
						Asn							
m72	4. LM	43	GTG	GTG	AGC	AAC					AGA	GGC	TCA
						Pro							
72	12. LM	2	GTG	GTG	AGC	CCC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Leu	Pro	Ser					
73	NSB	93	GTG	GTG	AGC	CTC	CCG	TCA				GGC	TCA
						Gly							
74	NSB	34	GTG	GTG		GGC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Asp	Gly					
74	NSB	79	GTG	GTG		GCC	GAC	GGC		GAC	AGA	GGC	TCA
						Thr							
74	4. LM	47	GTG	GTG		ACC					AGA	GGC	TCA
						Gly							
76	NSB	6	GTG	GTG	AGC	GGG				GAC	AGA	GGC	TCA
						Asn							
78	4. LM	38	GTG	GTG		AAC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ser							
78	4. LM	83	GTG	GTG		TCC				GAC	AGA	GGC	TCA
						Asp	Arg						
79	12. LM	86	GTG	GTG	AGC	GAC	CGA			GAC	AGA	GGC	TCA
						Ser	Gln						
81	12. LM	42	GTG	GTG		AGC	CAG			GAC	AGA	GGC	TCA
						Ser	Arg						
81	12. LM	45	GTG	GTG		AGC	CGA					GGC	TCA
						Ala	Arg	Ala	Ala				
82	NSB	86	GTG	GTG	AGC	GCG	CGA	GCT	GCA			GGC	TCA
						Pro							
83	NSB	60	GTG	GTG	AGC	CCG						GGC	TCA
						Pro							

83	NSB	64	GTG	GTG	AGC	CCG						GGC	TCA
						Tyr	Arg						
83	4. LM	21	GTG	GTG	AGC	TAT	CGA			GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Ala	Ala					
83	4. LM	79	GTG	GTG	AGC	GCT	GCA	GCC			AGA	GGC	TCA
						Ala	Asn						
84	NSB	94	GTG	GTG	AGC	GCG	AAC				AGA	GGC	TCA
						Val	Thr						
84	4. LM	46	GTG			GTA	ACC			GAC	AGA	GGC	TCA
						Asn	Arg						
85	NSB	17	GTG			AAT	AGG			GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Lys	Glu	Glu	Val			
86	NSB	39	GTG	GTG	AGC	GCG	AAG	GAG	GAG	GTG			TCA
						Arg	Gly						
88	4. LM	11	GTG	GTG		AGG	GGC				AGA	GGC	TCA
						Ser	Ala	Arg	Val				
88	4. LM	40	GTG	GTG		AGC	GCG	AGG	GTG		AGA	GGC	TCA
						Cys							
88	12. LM	84	GTG	GTG		TGC				GAC	AGA	GGC	TCA

Tabelle: Ergebnisse Sequenz-Analyse Nicht-Atopiker

Probanden-Nr.	t	Klon-Nr.	AV24			N-Region				AJ18			
			Val	Val	Ser					Asp	Arg	Gly	Ser
			GTG	GTG	AGC	GAC	AGA	GGC	TCA				
						Thr	Ser						
11	NSB	29	GTG			ACT	TCC			GAC	AGA	GGC	TCA
						Lys							
11	NSB	35	GTG	GTG		AAG				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Arg	Glu					
11	NSB	55	GTG	GTG	AGC	GCG	AGG	GAA			AGA	GGC	TCA
						Pro							
11	NSB	82	GTG	GTG	AGC	CCT				GAC	AGA	GGC	TCA
						Ala	Asn	Arg					
11	NSB	92	GTG	GTG	AGC	GCG	AAC	CGA				GGC	
						Pro	Gly						
12	NSB	57	GTG	GTG	AGC	CCG	GGG				AGA	GGC	TCA
						Ala	Ser	Ser	Gly				
12	NSB	58	GTG	GTG	AGC	GCG	TCA	AGC	GGG	GAC	AGA	GGC	TCA
						Thr	Phe	Met	Ser				
12	4. LM	20	GTG	GTG		ACC	TTT	ATG	AGC		AGA	GGC	TCA
						Arg	Gly	Gly					
12	4. LM	24	GTG	GTG	AGC	CGA	GGA	GGA				GGC	TCA
						Lys	Gly						
12	4. LM	59	GTG	GTG		AAG	GGC				AGA	GGC	TCA
						Ala	Ser						
25	NSB	68	GTG	GTG	AGC	GCG	AGC						TCA
						Ala	Pro						
37	NSB	55	GTG	GTG	AGC	GCG	CC?			GAC	AGA	GGC	TCA
						Ile							
37	NSB	58	GTG	GTG		ATA						GGC	TCA

Tabelle: Ergebnisse Sequenz-Analyse Atopiker

Danksagungen

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

Meiner Betreuerin, Frau PD Dr. med. Susanne Krauss-Etschmann, danke ich für die Betreuung in ihrem Forschungslabor, die Heranführung an das umfangreiche und vielseitige Gebiet der Immunologie und die Überlassung des außerordentlich interessanten Themas. Ihre kontinuierlichen Verbesserungsvorschläge und Ihre Geduld beim Schreiben der Arbeit weiß ich sehr zu schätzen.

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.

Ganz herzlichen Dank möchte ich Frau Dr. med. Christine Prell und vor allem Frau Conny Dalibor für die Einführung in die labortechnischen Methoden der Molekularbiologie aussprechen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen!

Nicht zu vergessen ist auch Julia Braun, die mir bei statistischen Fragestellungen unter die Arme gegriffen hat.

Auch meine Eltern und mein Bruder Marius haben einen erheblichen Beitrag geleistet. Ihre unerbittliche Unterstützung und permanente Motivation, ihr kritisches Hinterfragen von meinen bisherigen (und hoffentlich auch zukünftigen) Entscheidungen haben mir sehr geholfen, „meinen“ Weg zu gehen.

Mein größter Dank gilt meiner Lebensgefährtin Sabrina. Ich bin froh, dass ich von Ihr in jeder Lebenslage und trotz jeder Gemütssituation 100%ige Unterstützung erfahren durfte und darf.

Sicherlich wäre noch eine Reihe weitere Menschen zu nennen, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Aber hier ist Schluss! Ich hoffe, Ihr versteht dies. Trotzdem – auch an Euch – DANKE für alles!

Literaturverzeichnis

Akbari O et al., 2003

Akbari O, Stock P, Meyer E, Kronenberg M, Sidobre S, Nakayama T, Taniguchi M, Grusby MJ, DeKruyff RH, Umetsu DT: Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat Med* 2003; 9:582-558

Akdis CA et al., 2004

Akdis CA, Blaser K, Akdis M: Genes of tolerance. *Allergy* 2004; 59:897-913

Alberts B et al., 2002

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: *Molecular Biology of the Cell* 2002.

Alm JS et al., 1999

Alm JS, Swartz J, Lilja G, Scheynius A, Pershagen G: Atopy in children of families with an anthroposophic lifestyle. *Lancet* 1999; 353:1485-1488

Amano K, 1987

Amano K: Deficiency of peptidoglycan and lipopolysaccharide components in *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 1987; 55:2290-2292

Apostolou I et al., 2000

Apostolou I, Cumano A, Gachelin G, Kourilsky P: Evidence for two subgroups of CD4-CD8-NKT cells with distinct TZR alpha beta repertoires and differential distribution in lymphoid tissues. *J Immunol* 2000; 165:2481-2490

Arase H et al., 1996

Arase H, Arase N, Saito T: Interferon gamma production by natural killer (NK) cells and NK1.1+ T cells upon NKR-P1 cross-linking. *J Exp Med* 1996; 183:2391-2396

Arase H et al., 1993

Arase H, Arase N, Nakagawa K, Good RA, Onoe K: NK1.1⁺ CD4⁺ CD8⁻ thymocytes with specific lymphokine secretion. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23:307-310

Assarsson E et al., 2000

Assarsson E, Kambayashi T, Sandberg JK, Hong S, Taniguchi M, Van-Kaer L, Ljunggren HG, Chambers BJ: CD8⁺ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation in vitro and in vivo. *J Immunol* 2000; 165:3673-3679

Bach J, 2002

Bach J: The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic disease. *N Eng J Med* 2002; 347:911-920

Baxter AG et al., 1997

Baxter AG, Kinder SJ, Hammond KJ, Scollay R, Godfrey DI: Association between alpha-betaTCR⁺CD4⁺CD8⁻ T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 1997; 46:572-582

Belkaid Y et al., 2002

Belkaid Y, Piccirillo C, Mendez S, Shevach E, Sacks D: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 2002, 420:502-507

Bendelac A, 1995

Bendelac A: Mouse NK1⁺ T cells. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:367-374

Bendelac A et al., 1995

Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR: CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes. *Sciences* 1995; 268:863-865

Bendelac A et al., 1996

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

Bendelac A et al., 1997

Bendelac A, Rivera M, Park SH, Roark JH: *Annu Rev Immunol* 1997; 15; 535

Benlagha K et al., 2002

Benlagha K, Kyin T, Beavis A, Teyton L, Bendelac A: A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 2002; 296:553-555

Berg von A et al., 2003

Berg von A, Koletzko S, Grübl A, Filipiak-Pittroff B, Wichmann HE, Bauer CP, Reinhardt D, Berdel D: The effect of hydrolyzed cow's milk formula for allergy prevention in the first year of life: The German Infant Nutritional Intervention Study, a randomized double blinded trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111:533-40

Bilenki L et al., 2004

Bilenki L, Yang J, Fan Y, Wang S, Yang X: Natural killer T cells contribute to airway eosinophilic inflammation induced by ragweed through enhanced IL-4 and eotaxin production. *Eur J Immunol* 2004; 34(2):345-54

Bix M et al., 1995

Bix M, Locksley RM: Natural T cells - cells that co-express NKRP-1 and TCR. *J Immunol* 1995; 155:1020-1022

Bluestone JA et al., 2003

Bluestone JA, Abbas AK: Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:253-257

Bradding P et al., 1994

Bradding P, Roberts JA, Britten KM, Montefort S, Djukanovic R, Mueller R, Heusser CH, Howarth PH, Holgate ST: Interleukin-4, -5, -6 and tnf-alpha in normal and asthmatic airways: evidence for the human mast cell as a source of these cytokines. *Am J Respir Cell Mol* 1994; 10(5):471-80

Braun-Fahrländer C et al., 1999

Braun-Fahrländer C, Gassner M, Grize L, Neu U, Sennhauser FH, Varonier HS, Vuille JC, Wuthrich B: Prevalence of hay fever and allergic sensitization in farmer's children and their peers living in the same rural community. *Clin Exp Allergy* 1999; 29:28-34

Brigl M et al., 2003

Brigl M, Bry L, Kent SC, Gumperz JE, Brenner MB: Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 2003; 4:1230-37

Brossay L et al., 1998

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

Brossay L, 1998

Brossay L: CD1d-mediated recognition of an alpha-galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution. *J Exp Med* 1998; 188:1521-1528

Brusselle GG et al., 1994

Brusselle GG, Kips JC, Tavernier JH, van der Heyden JG, Cuvelier CA, Pauwels RA, Bluethmann H: Attenuation of allergic inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 1994; 24(1):73-80

Brutkiewicz RR et al., 2002

Brutkiewicz RR, Sriram V: Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002; 41:287-298

Budd RC et al., 1987

Budd RC, Schreyer M, Miescher GC, MacDonald HR: T cell lineages in the thymus of *lpr/lpr* mice. Evidence for parallel pathways of normal and abnormal T cell development. *J Immunol*. 1987; 139:2200-2210

Bukantz SC, 2002

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

Burdin N et al., 1999

Burdin N, Brossay L, Kronenberg M: Immunization with α -galactosyl-ceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur J Immunol* 1999; 29:2014-25

Burr ML et al., 1989

Burr ML, Miskelly FG, Butland BK, Merrett TG, Vaughan-Williams E: Environmental factors and symptoms in infants at high risk of allergy. *J Epidemiol Community Health* 1989; 43(2):125-32

Chang CC et al., 2000

Chang CC, Wright A, Punnonen J: Monocyte-derived CD1a⁺ and CD1a⁻ dendritic cell subsets differ in their cytokine production profiles, susceptibilities, and capacities to direct Th cell differentiation. *J Immunol* 2000; 165(7):3584-91

Chen Y et al., 1994

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL: Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994; 265:1237-1240

Chomczynski P et al., 1987

Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9

Conzelmann E et al., 1980

Conzelmann E, Sandhoff K: *Adv Exp Med Biol* 1980; 125:295

Cottrez F et al., 2000

Cottrez F, Hurst SD, Coffmann RL, Groux H: T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. *J Immunol* 2000; 165:4848-4853

Croft M et al., 1997

Croft M, Dubey C: Accessory molecule and costimulation requirements for CD4 T cell response. *Crit Rev Immunol* 1997; 17:89-118

Cui J et al., 1997

Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Taura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M: Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 1997; 278:1623-1626

C'Andrea A et al., 2000

D'Andrea A, Goux D, De Lalla C, Koezuka Y, Montagna D, Moretta A, Dellabonna P, Casorati G, Abrignani S: Neonatal invariant V α 24⁺ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur J Immunol* 2000; 30(6):1544-50

Davis MM et al., 1988

Davis MM, Bjorkman PJ: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334:395-402

Davodeau F et al., 1997

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

Del Prete G, 1992

Del Prete G: Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in pathophysiology of atopy. *Allergy* 1992; 47(5):450-5

Dellabonna P et al., 1993

Dellabonna P, Casorati G, Fiedli B, Angman L, Tunnacliffe A, Roosneek E, Lanzavecchia A: In vivo persistence of expanded clones specific for bacterial antigens within the human T cell receptor α / β CD4⁺ subset. *J Exp Med* 1993; 177(6):1763-71

Dellabonna P et al., 1994

Dellabonna P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A: An invariant V α 24-J α Q/V β 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1994; 180:1171-1176

Denkers EY et al., 1996

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

DiSanto JP et al., 1993

DiSanto JP, Bonnefoy JY, Gauchat JF, Fischer A, de Saint Basile G: CD40 Ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper-IgM. *Nature* 1993; 361(6412):541-3

Doherty DG et al., 1999

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

Dretzen G et al., 1981

Dretzen G, Bellard M, Sassone-Corsi P, Chambon P: A reliable method for the recovery of DNA fragments from agarose and acrylamide gels. *Anal Biochem* 1981; 112:295-298

Eberl G et al., 1999

Eberl G, Lowin-Kropf B, MacDonald HR: Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn-deficient mice. *J Immunol* 1999; 163:4091-94

Emoto M et al., 1999

Emoto M, Emoto Y, Buchwalow IB, Kaufmann SH: Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by myobacterium bovis bacillus calmette guerin. *Eur J Immunol* 1999; 29:650-659

Emoto M et al., 2000

Emoto M, Zerrahn J, Miyamoto M, Perarnau B, Kaufmann SH: Phenotypic characterization of CD8(+)NKT cells. *Eur J Immunol* 2000; 30:2300-2311

Exley M et al., 1997

Exley M, Garcia J, Balk SP, Porcelli S: Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J Exp Med* 1997; 186:109-120

Fernandez-Botran R et al., 1988

Fernandez-Botran R, Sanders VM, Mosmann TR, Vitetta ES: Lymphokine-mediated regulation of the proliferative response of clones of T helper 1 and T helper 2 cells. *J Exp Med* 1988; 168(2):543-58

Finkelman FD et al., 2000

Finkelman FD, Morris SC, Orekhova T, Mori M, Donaldson D, Reiner SL, Reilly NL, Schopf L, Urban JF: Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 2000; 164:2303-2310

Flesch IE et al., 1997

Flesch IE, Wandersee A, Kaufmann SH: IL-4 secretion by CD4⁺ NK1⁺ T cells induces monocyte chemoattractant protein-1 in early listeriosis. *J Immunol* 1997; 159:7-10

Fowlkes BJ et al., 1987

Fowlkes BJ, Kruisbeek AM, Ton-That H, Weston MA, Coligan JE, Schwartz RH, Pardoll DM: A novel population of T-cell-receptor ab-bearing thymocytes which predominantly express a single V β gene family. *Nature* 1987; 329:251-254

Fujii S et al., 2002

Fujii S, Shimizu K, Kronenberg M, Steinman RM: Prolonged IFN- γ -producing NKT response induced with α -galactosylceramide-loaded DCs. *Nature Immunol* 2002; 3:867-874

Gadue P et al., 1999

Gadue P, Morton N, Stein PL: The Src family tyrosine kinase Fyn regulates natural killer T cell development. *J Exp Med* 1999; 190:1189-96

Gadue P et al., 2002

Gadue P, Stein PL: NK T cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation. *J Immunol* 2002; 169:2397-406

Galli G et al., 2003

Galli G, Nuti S, Tavarini S, Galli-Stampino L, De Lalla C, et al.: CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2003; 197:1051-57

Gapin L et al., 2001

Gapin L, Matsuda JL, Surh CD, Kronenberg M: NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat Immunol* 2001; 2:971-978

Gereda JE et al., 2000

Gereda JE, Leung DY, Thatayatikom A, Streib JE, Price MR, Klinnert MD, Liu AH: Relation between house-dust endotoxin exposure, type 1 T-cell development, and allergen sensitisation in infants at high risk of asthma. *Lancet* 2000; 355:1680-1683

Germann T et al., 1993

Germann T, Gately MK, Schoenhaut DS, Lohoff M, Mattner F, Fischer S, Jin SC, Schmitt E, Rude E: Interleukin-12/T cell stimulating factor, a cytokine with multiple effects on T helper type 1 (Th1) but not on Th2 cells. *Eur J Immunol* 1993; 23:1762-1770

Godfrey DI et al., 2004

Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L: NKT cell: What's in a name? *Nat Rev Immunol* 2004; 4:231-37

Godfrey DI et al., 2004

Godfrey DI, Pellicci DG, Smyth MJ: The elusive NKT cell antigen – is the search over? *Science* 2004; 306:1687-1689

Gombert JM et al., 1996

Gombert JM, Tancrede-Bohin E, Hameg A, Leite-de-Moraes MC, Vicari A, Bach JF, Herbelin A: IL-7 reverses NK1+ T cell-defective IL-4 production in the non-obese diabetic mouse. *Int Immunol* 1996; 8:1751-1758

Gounni AS et al., 1994

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

Gounni AS et al., 2001

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

Groux H et al., 1997

Groux H et al.: A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 1997; 389:737-742

Gruber R et al., 1993

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

Gumperz JE et al., 2002

Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB: Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* 2002; 195:625-36

Hammond KJ et al., 1999

Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, Smyth MJ, van-Driel IR, Scollay R, Baxter AG, Godfrey DI: NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur J Immunol* 1999; 29:3768-3781

Han M et al., 1999

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

Hanifin JM et al., 1980

Hanifin JM, Rajka G: Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm. Venerol Suppl.* 1980; 92:44-7

Hansen G et al., 1999

Hansen G, Berry G, DeKruyff RH, Umetsu DT: Allergen-specific Th1 cells fail to counterbalance Th2 cell-induced airway hyperreactivity but cause severe airway inflammation. *J Clin Invest* 1999; 103; 175-183

Haskins K et al., 1983

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

Heijden FL van der et al., 1991

Van der Heijden FL, Wierenga EA, Bos JD, Kapsenberg ML: High frequency of IL4 CD4+ allergen specific T lymphocytes in atopic dermatitis lesional skin. *J Invest Dermatol* 1991; 97:389-394

Holt PG et al., 1995

Holt PG et al.: Postnatal maturation of immune competence during infancy and childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 1995; 6:59-70

Hong S et al., 1999

Hong S, Scherer DC, Singh N, Mendiratta SK, Serizawa I, Koezuka Y, Kaer L van: Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout mice. *Immunol. Rev.* 1999; 169:31-44

Hwang ES et al., 2002

Hwang ES, White IA, Ho IC: An IL-4-independent and CD25-mediated function of c-maf in promoting the production of Th2 cytokines. *Proc Natl Sci USA* 2002; 99(20):13026-30

Illes Z et al., 2000

Illes Z, Kondo T, Newcombe J, Oka N, Tabira T, Yamamura T: Differential expression of NK T cell Valpha24JalphaQ invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *J Immunol* 2000; 164:4375-4381

Ishikawa H et al., 2000

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

Janeway CA et al., 2005

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: Immunobiology 2005.

Jonuleit H et al., 2001

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH: Identification and functional characterization of human CD4+CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. J Exp Med 2001; 193:1285-1294

Joyce S et al., 1996

Joyce S et al.: Expansion of natural (NK1+) T cells that express alpha-beta T cell receptors in transporters associated with antigen presentation-1 null and thymus leukemia antigen positive mice. J Exp Med 1996; 184:1579-1584

Joyce S et al., 1998

Joyce S, Woods AS, Yewdell JW, Bennink JR, De Silva AD, Boesteanu A, Balk SP, Cotter RJ, Brutkiewicz RR: Natural Ligand of Mouse CD1d1: Cellular Glykosylphosphatidylinositol. Science 1998; 279:1541-1544

Joyce S, 2001

Joyce S: CD1d and natural T cells: how their properties jump-start the immune system. Cell Mol Life Sci 2001; 58; 442-469

Kaiser HB, 2004

Kaiser HB: Risk factors in allergy/asthma. Allergy Asthma Proc 2004; 25(1):7-10

Kakimi K et al., 2000

Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV: Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Exp Med 2000; 192:921-930

Katagiri K et al., 2002

Katagiri K, Zhang-Hoover J, Mo J, Stein-Streilein J, Streilein J: Using tolerance induced via the anterior chamber of the eye to inhibit Th2-dependent pulmonary pathology. J Immunol 2002; 169:84-89

Kawahara et al., 1991

Kawahara K et al.: Chemical structure of glycosphingolipids isolated from *Sphingomonas paucimobilis*. FEBS Lett 1991; 292:107-110

Kawahara K et al., 2000

Kawahara K, Moll H, Knirel YA, Seydel U, Zahringer U: Structural analysis of two glycosphingolipids from the lipopolysaccharide-lacking bacterium *Sphingomonas capsulata*. Eur J Biochem 2000; 267:1837-1846

Kawahara K et al., 2002

Kawahara K, Kubota M, Sato N, Tsuge K, Seto Y: Occurrence of an alpha-galacturonosylceramide in the dioxin-degrading bacterium *Sphingomonas wittichii*. FEMS Microbiol Lett 2002; 214:289-294

Kawano T et al., 1997

Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H, Taniguchi M: CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. Science 1997; 278:1626-1629

Keusch JJ et al., 2000

Keusch JJ, Manzella SM, Nyame KA, Cummings RD, Baenzinger JU: J Biol Chem 2000; 275:25308

Kinet JP, 1999

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

Kinjo Y et al., 2005

Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing GW, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara A, Wong CH, Kronenberg M: Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. Nature 2005; 434:520-525

Kitamura H et al., 2000

Kitamura H, Ohta A, Sekimoto M, Sato M, Iwakabe K, Nakui M, Yahata T, Meng H, Koda T, Nishimura S, Kawano T, Taniguchi M, Nishimura T: alpha-Galactosylceramide induces early B-Cell activation through IL-4 production by NKT-Cells. *Cell Immunol* 2000; 199:37-42

Kojo S et al., 2001

Kojo S, Adachi Y, Keino H, Taniguchi M, Sumida T: Dysfunction of T cell receptor α V24 α J18+, β V11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 2001; 44:1127-1138

Koop BF et al., 1994

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

Kronenberg M, 2005

Kronenberg M: Toward an Understanding of NKT Cell Biology: Progress and Paradoxes. *Annu Rev Immunol* 2005; 26:877-900

Laloux V et al., 2001

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

Lantz O et al., 1994

Lantz O, Bendelac A: An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of MHC class I specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J exp Med* 1994; 180:1097-1106

Lee PT et al., 2002

Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A: Distinct functional lineages of human V α 24 natural killer T cells. *J Exp Med* 2002; 195:637-41

Lehuen A et al., 1998

Lehuen A, Lantz O, Beaudoin L, Laloux V, Carnaud C, Bendelac A, Bach JF, Monteiro RC: Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J Exp Med* 1998; 188:1831-1839

Leite-De-Moraes MC et al. 1995

Leite-De-Moraes MC, Herbelin A, Machavoine F, Vicari A, Gombert JM, Papiernik M, Dy M: MHC class I-selected CD4-CD8-TCR-alpha beta+ T cells are a potential source of IL-4 during primary immune response. *J Immunol* 1995; 155:4544-4550

Leite-De-Moraes MC et al., 1998

Leite-De-Moraes MC, Moreau G, Arnould A, Machavoine F, Garcia C, Papiernik M, Dy M: 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* 1998; 28:1507-1515

Leite-De-Moraes MC et al., 2001

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

Leung DYM, 2001

Leung DYM: Pathogenesis of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104:99-110.

Leynaert B et al., 2001

Leynaert B, Neukirch C, Jarvis D, Chinn S, Burney P, Neukirch F: Does living on a farm during childhood protect against asthma, allergic rhinitis, and atopy in adulthood? *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:1829-1834

Lin Met al., 2003

Lin M, Rikihisa Y: Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.* 2003; 71:5324-5331

Löffler G et al., 1997

Löffler G, Pertrides PE: Biochemie und Pathobiochemie 1997.

Loza MJ et al., 2002

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

MacDonald HR, 2002

MacDonald HR: T before NK. Science 2002; 296:481-482

Maeda T et al., 1999

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

Magnan A et al., 2000

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

Makino Y et al., 1993

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

Makino Y et al., 1995

Makino Y, Kanno R, Ito T, Higashi K, Taniguchi M: Predominant expression of invariant V α 14' TCR alpha chain in NK1.1+ T cell populations. Int Immunol 1995; 7:1157-1161

Mattner J et al., 2005

Mattner J, DeBord KL, Bendelac A et al.: Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. Nature 2005; 434:525-529

Matsuda JL et al., 2001

Matsuda JL et al.: Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor β repertoire and small clone size. Proc. Natl Acad Sci USA 2001; 98:12636-12641

Matsuura A et al., 2000

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

Mempel M et al., 2000

Mempel M, Flageul B, Suarez F, Ronet C, Dubertret L, Kourilsky P, Gachelin G, Musette P: Comparison of the T cell patterns in leprous and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of V α 24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor V α repertoire. Am J Pathol 2000; 157:509-523

Meuer SC et al., 1983

Meuer SC, Cooper DA, Hodgdon JC, Hussey RE, Fitzgerald KA, Schlossman SF, Reinherz EL: Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. Science; 222:1239-1242

Miyamoto K et al., 2001

Miyamoto K, Miyake S, Yamamura T: A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing Th2 bias of natural killer T cells. Nature 2001; 413:531-34

Mosmann TR et al., 1986

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986; 136(7):2348-57

Mosmann TR, 1993

Mosmann, TR: T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1993; 664:89-92

Mucha SM et al., 2003

Mucha SM, Baroody FM: Sinusitis update. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; 3(1):33-8

Mutius E von et al., 2000

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

Naumow YN et al., 2001

Naumow YN et al.: Activation of CD1d-restricted T cells protects NOD mice from developing diabetes by regulating dendritic cell subsets. *Proc Nat Acad Sci USA* 2001; 98:13838-13843

Ngoc LP et al., 2005

Ngoc LP, Gold DR, Tzianabos AO, Weiss ST, Celedón JC: Cytokines, allergy, and asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2005; 5:161-166

Oishi Y et al., 2000

Oishi Y, Sakamoto A, Kurasawa K, Nakajima H, Nakao A, Nakagawa N, Tanabe E, Saito Y, Iwamoto I: CD4⁺CD8⁻ T cells bearing invariant V α 24J α Q TCR alpha-chain are decreased in patients with atopic diseases. *Clin Exp Immunol* 2000; 119:404-411

Ouyang W et al., 1998

Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K; Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM: Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 1998; 9:745-755

Parronchi P et al., 2000

Parronchi P, Brugnolo F, Sampognaro S, Maggi E: Genetic and environmental factors contributing to the onset of allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121:2-9

Pellici DG et al., 2002

Pellici DG, Hammond KJ, Uldrich AP, Baxter AG, Smyth MJ, Godfrey DI: A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1- CD4⁺ CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* 2002; 195:835-844

Pfeiffer C et al., 1991

Pfeiffer C, Murray J, Madri J, Bottomly K: Selective Activation of TH1- and TH2-like cells in vivo - Response to Human Collagen IV. *Immunol Rev* 1991; 123:65-84

Pied S et al., 2000

Pied S, Roland J, Louise A, Voegtle D, Soulard V, Mazier D, Cazenave PA: Liver DC4-CD8-NK1.1+ TCR alpha beta intermediate cells increase during experimental malaria infection and are able to exhibit inhibitory activity against the parasite liver stage in vitro. *J Immunol* 2000; 164:1463-1469

Pirquet C von, 1906

Pirquet,C von: Allergie. *Munch Med Wschr.* 1906; 30:1457-1458

Porcelli S et al., 1996

Porcelli S, Gerdes D, Fertig AM, Balk SP: 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* 1996; 48:63-67

Porcelli SA et al., 1999

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

Poulton LD et al., 2001

Poulton LD, Smyth MJ, Hawke CG, Silveira P, Shepherd D, Naidenko OV, Godfrey DI, Baxter AG: Cytometric and functional analyses of NK and NKT cell deficiencies in NOD mice. *Int Immunol* 2001; 13:887-896

Powrie F et al., 1994

Powrie F, Correa-Oliveira R, Mauze S, Coffmann RL: Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. *J Exp Med* 1994; 179:589-600

Poysa L et al., 1989

Poysa L, Remes K, Korppi M, Juntunen-Backman K: Atopy in children with and without a family history of atopy. I. Clinical manifestations, with special reference to diet in infancy. *Acta Paediatr Scand* 1989; 78(6):896-901

Prell C et al., 2003

Prell C, Konstantopoulos N, Heinzemann B, Frankenberger B, Reinhardt D, Schendel DJ, Krauss-Etschmann S: Frequency of $V\alpha 24+CD161+$ natural killer T cells and invariant TCRAV24-AJ18 transcripts in atopic and non-atopic individuals. *Immunobiol* 2003; 207:1-14

Prescott SL et al., 1998

Prescott SL et al.: Transplacental priming of the human immune system to environmental allergens: universal skewing of initial T cell responses toward the Th2 cytokine profile. *J Immunol* 1998; 160:4730-4737

Prescott SL et al., 1999

Prescott SL, Macaubas C, Smallacombe T, Holt BJ, Sly PD, Holt PG: Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 1999; 353:196-200

Prussin C et al., 1997

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

Ra C et al., 1997

Ra C, Jouvin M H, Blank U, Kinet JP: A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature* 1999; 341:752-754

Reinhardt C et al., 1999

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

Renauld JC, 2001

Renauld JC: New insights into the role of cytokines in asthma. *J Clin Pathol* 2001; 54(8):577-89

Ritz SA et al., 2002

Ritz SA, Cundall MJ, Gajewska BU, Alvarez D, Gutierrez-Ramos JC, Coyle AJ, McKenzie AN, Stampfli MR, Jordana M: Granulocyte macrophage colony-stimulating factor-driven respiratory mucosal sensitization induces Th2 differentiation and function independently of interleukin-4. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002; 27(4):428-35

Rogge L et al., 1997

Rogge, L., Barberis Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F: Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J. Exp. Med.* 1997; 185:825-31

Romagnani S, 1994

Romagnani S: Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:227-257

Sakaguchi S et al., 1995

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M: Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164

Sato N et al., 1996

Sato N et al.: Functional characterization of NK1.1+ Ly-6c' cells. *Immunol Lett* 1996; 54:5-9

Saubermann LJ et al., 2000

Saubermann LJ, Beck P, De-Jong YP, Pitman RS, Ryan MS, Kim HS, Exley M, Snapper S, Balk SP, Hagen SJ, Kanauchi O, Motoki K, Sakai T, Terhorst C, Koezuka Y, Podolsky DK, Blumberg RS: Activation of natural killer T cells by α -galactosylceramide in the presence of CD1d provides protection against colitis in mice. *Gastroenterology* 2000; 119:119-128

Schmieg J et al., 2003

Schmieg J, Yang G, Franck RW, Tsuji M: Superior protection against malaria and melanoma metastases by a C-glycoside analogue of the natural killer T cell ligand α -galactosylceramide. *J. Exp. Med.* 2003; 198:1631-41

Schoetzau A et al., 2002

Schoetzau A, Filipiak-Pittroff B, Franke K, Koletzko S, Von Berg A, Gruebl A, Bauer CP, Berdel D, Reinhardt D, Wichmann HE; GINI Study Group: Effect of exclusive breast-feeding and early solid food avoidance on the incidence of atopic dermatitis in high-risk infants at 1 year of age. *Pediatr Allergy Immunol* 2002; 13(4):234-42

Schofield L et al., 1999

Schofield L, McConville MJ, Hansen D, Campbell AS, Fraser-Reid B, Grusby MJ, Tachado SD: CD1d-restricted immunoglobulin G formation to GPI-anchored antigens mediated by NKT cells. *Science* 1999; 283:225-229

Sieling PA et al., 1995

Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ: CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 1995; 269:227-230

Singh N et al., 1999

Singh N, Hong S, Scherer DC, Serizawa I, Burdin N, Kroneberg M, Koezuka Y, Van-Kaer L: Cutting edge: activation of NK T cells by CD1d and alpha-galactosylceramide directs conventional T cells to the acquisition of a Th2 phenotype. *J Immunol* 1999; 163:2373-2377

Spada FM et al., 1998

Spada FM, Koezuka Y, Porcelli SA: CD1d-restricted recognition of synthetic glycolipid antigens by human Natural Killer T cells. *J Exp Med* 1998; 188:1529-1534

Stanic AK et al., 2003

Stanic AK, Shashidharamurthy R, Bezbradica JS, Matsuki N, Yoshimura Y, et al.: Another view of T cell antigen recognition: cooperative engagement of glycolipid antigens by V α 14J α 18 natural T (iNKT) cell receptor [corrected]. *J Immunol* 2003; 171:4539-51. Erratum *J Immunol* 2004; 172-717

Stanic AK et al., 2004

Stanic AK, Bezbradica JS, Park JJ, Matsuki N, Mora AL et al.: NK-k B controls cell fate specification, survival, and molecular differentiation of immunoregulatory natural T lymphocytes. *J Immunol* 2004; 172:2265-73

Strachan DP, 1999

Strachan DP: Hay fever, hygiene, and household size: *BMJ* 1999; 299:1259-1260

Sumida T et al., 1998

Sumida T, Maeda T, Taniguchi M, Nishioka K, Stohl W: TCR AV24 gene expression in double negative T cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1998; 7:565-568

Takahashi T et al., 2003

Takahashi T, Nakamura K, Chiba S, Kanda Y, Tamaki K, Hirai H: V α 24 natural killer T cells are markedly decreased in atopic dermatitis patients. *Hum Immunol* 2003; 64:586-592

Teneberg S et al., 1996

Teneberg S, Lönnroth I, Torres López JF, Galili U, Halvarsson MO, Angström J, Karlsson KA: Molecular mimicry in the recognition of glycosphingolipids by Gal α 3 Gal β 4 GlcNAc β -binding Clostridium difficile toxin A, human natural anti α -galactosyl IgG and the monoclonal antibody Gal-13: characterization of a binding-active human glycosphingolipid, non-identical with the animal receptor. *Glycobiology* 1996; 6:599-609

Trop S et al., 2002

Trop S, Ilan Y: NK1.1+ T cell: A two-faced lymphocyte in immune modulation of the IL-4/IFN- γ paradigm. *J Clin Immunol* 2002; 22:270-280

Umetsu DT et al., 2002

Umetsu D, McIntire J, Macaubas C, Akbari O, DeKruyff RH: Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* 2002; 3:715-720

Umetsu DT et al., 2003

Umetsu DT, Akbari O, DeKruyff RH: Regulatory T cells control the development of allergic disease and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:480-487

Umetsu DT et al., 2006

Umetsu DT, DeKruyff RH: Immune dysregulation in asthma. *Current Opinion in Immunology* 2006; 18:1-6

Vliet HJ van der et al., 2000

van der Vliet HJ, Nishi N, de Gruijl TD, von Blomberg BM, van den Eertwegh AJ, Pinedo HM, Giaccone G, Scheper RJ: Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood* 2000; 95:2440-2442

Vries JE de et al., 1999

de Vries JE, Carballido JM, Aversa G: Receptors and cytokines involved in TH2 cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103:S492-S496

Weiner HL, 2001

Weiner HL: Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001; 182:207-214

Wills-Karp M, 1999

Wills-Karp M: Immunologic basis of antigen-induced airway hyperresponsiveness. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:255-281

Wilson SB et al., 1998

Wilson SB, Kent SC, Patton KT, Orban T, Jackson RA, Exley M, Porcelli S, Schatz DA, Atkinson MA, Balk SP, Strominger JL, Hafler DA: Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 1998; 391:177-181

Wood KJ et al., 2003

Wood KJ, Sakaguchi S: Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:199-210

Wu D et al., 2005

Wu D, Xing GW, Poles MA, Horowitz A, Kinjo Y, Sullivan B, Bodmer-Narkevitch V, Plettenburg O, Kronenberg M, Tsuji M, Ho DD, Wong CH: Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(5):1351-1356

Yoshimoto T et al., 1994

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

Yoshimoto T et al., 1995

Yoshimoto T, Bendelac A, Watson C, Hu-Li J, Paul WE: Role of NK1.1+ cells in a TH2 response and in immunoglobulin E production. *Science* 1995; 270:1845-1847

Zeng Z et al., 1997

Zeng Z, Castano AR, Segelke BW, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA: Crystal structure of mouse CD1: an MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove. *Science* 1997; 277:339-345

Zhang Y et al., 1996

Zhang Y, Rogers KH, Lewis DB: Beta 2-microglobulin-dependent T cells are dispensable for allergen-induced T helper 2 responses. *J Exp Med* 1996; 184:1507-1512

Zhou D et al., 2004

Zhou D, Mattner J, III CC, Schrantz N, Yin N, Gao Y, Sagiv Y, Hudspeth K, Wu Y, Yamashita T, Teneberg S, Wang D, Proia RL, Lavery SB, Savage PB, Teyton L, Bendelac A: Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 2004; 306:1786-1789

Zlotnik A et al., 1992

Zlotnik A, Godfrey DI, Fischer M, Suda T: Cytokine production by mature and immature CD4⁻ CD8⁻ T cells. Alpha beta-T cell receptor⁺ CD4⁻CD8⁻ T cells produce IL-4. *J. Immunol.* 1992; 149 :1211-1215

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Differenzierung der naiven T-Zelle zur Th1- oder Th2-Zelle	3
Abbildung 1-2: Übersicht Th1-Zelle mit Effektormolekülen	4
Abbildung 1-3: Übersicht Th2-Zelle mit Effektormolekülen	5
Abbildung 1-4: Kreuzregulation der Th1- und Th2-Zelle	7
Abbildung 1-5: Th1-Th2-Ungleichgewicht bei atopischen Erkrankungen.....	7
Abbildung 1-6: Regulatorische T-Zellen	8
Abbildung 1-7: Organisation der humanen TZR-Gene.....	9
Abbildung 1-8: Rearrangement und Expression der α - und β -Ketten des TZR.....	10
Abbildung 1-9: Rearrangement und Expression der α - und β -Ketten des TZR bei NKT-Zellen	12
Abbildung 1-10: "Instructional model" der NKT-Zell-Entwicklung.....	14
Abbildung 1-11: NKT-Zelle mit Effektormolekülen	15
Abbildung 1-12: Schema der Synthese und des Abbaus von iGb3	17
Abbildung 1-13: Schematische Darstellung der Wirkung des Liganden iGb3: Selektion der NKT-Zellen im Thymus und Aktivierung der NKT-Zellen in der Peripherie.....	18
Abbildung 1-14: Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichts bei atopischen Erkrankungen durch IL-4.....	19
Abbildung 1-15: Model der Rolle von NKT-Zellen bei Asthma	20
Abbildung 2-1: Schematische Darstellung des pCR@2.1 Vektors.....	30
Abbildung 2-2: Schematische Darstellung der Ligation des PCR Produkts in den pCR@2.1 Vektor.....	31
Abbildung 2-3: Molekularbiologische Arbeitsschritte.....	33
Abbildung 2-4: Agarose-Gel unter UV-Beleuchtung mit vier Bakterienklonen mit AV24AJ18-Rearrangement (Nr. 45, 51, 75, 83) einer Nabelschnurblutprobe eines Probanden sowie Positiv- und Negativ-Kontrolle	36
Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Position von "Anchor" und "Detection probe".....	37
Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der FRET-Analyse.....	38
Abbildung 2-7: Schmelzkurven-Analyse von zwei Klonen. In schwarz mit N-Region, in grau ohne N-Region.....	39
Abbildung 4-1: Übersicht der Anzahl bearbeiteter Proben zu drei Zeitpunkten (NS, V2, V4) unter Angabe von Atopiestatus, AV24AJ18 Rearrangement und N-Region.....	49

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: Klassifikation der NKT-Zellen	13
Tabelle 2-1: PCR-Protokoll.....	29
Tabelle 2-2: Bestandteile des pCR®2.1 Vektors.....	30
Tabelle 2-3: PCR-Protokoll für die V α 24-J α 18-PCR.....	34
Tabelle 2-4: Light Cycler Protokoll	40
Tabelle 3-1: Geräte	43
Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien	43
Tabelle 3-3: Chemikalien.....	45
Tabelle 4-1: Anzahl mittels Real Time PCR analysierter Proben nach Zeitpunkt und Atopiestatus	50
Tabelle 4-2: Chronologische Gliederung auf Einzelnukleotidebene analysierter Proben	50
Tabelle 4-3: Anzahl auf Einzelnukleotidebene analysierter Proben nach Serien.....	51
Tabelle 4-4: Charakterisierung der Atopiker.....	52
Tabelle 4-5: Anzahl von AV24-AJ18 Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr und Mann-Whitney <i>U</i>	53
Tabelle 4-6: AV24-AJ18 Transkripte bei Atopikern und Nicht-Atopikern (t-Test).....	54
Tabelle 4-7: Mittelwerte der AV24-AJ18 Transkripte bei Atopikern und Nicht-Atopikern im Nabelschnurblut, und Blutproben nach dem 4. und 12. Lebensmonat	54
Tabelle 4-8: Prozentualer Anteil der AV24-AJ18-Transkripte mit N-Region an den AV24-AJ18-Transkripten bei Atopikern und Nicht-Atopikern im ersten Lebensjahr und Mann-Whitney <i>U</i> Test.....	55
Tabelle 4-9: AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region bei Atopikern und Nicht-Atopikern (t-Test).....	56
Tabelle 4-10: Korrelation zwischen Atopiestatus der Eltern und Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation)	56
Tabelle 4-11: Korrelation zwischen Atopiestatus der Eltern und Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation)	57
Tabelle 4-12: Korrelation zwischen erhöhtem spezifischem IgE-Spiegel und Frequenz der AV24-AJ18 Transkripte im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation)	58
Tabelle 4-13: Korrelation zwischen erhöhtem spezifischem IgE-Spiegel und Anteil der AV24-AJ18 Transkripte mit N-Region im ersten Lebensjahr (Pearson Korrelation).....	58
Tabelle 4-14: Anzahl Analysen auf Einzelnukleotidebene nach Atopiestatus.....	59
Tabelle 4-15: Gruppe polarer Aminosäuren	59
Tabelle 4-16: Gruppe unpolarer Aminosäuren	60
Tabelle 4-17: Anteil Codons polarer Aminosäuren.....	60
Tabelle 4-18: Anteil Codons ungeladener, saurer und basischer Aminosäuren	61
Tabelle 4-19: Konservierte Aminosäuremuster im longitudinalen Verlauf (I)	61
Tabelle 4-20: Konservierte Aminosäuremuster im longitudinalen Verlauf (II)	62

Eidesstattliche Erklärung

Ich habe die Dissertation selbständig angefertigt und mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient. Alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft der Fundstelle einzeln nachgewiesen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum 13.09.1980
Geburtsort Würzburg
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig
Wohnort Alte Glockengießerei 4, 69115 Heidelberg

Schule

1986-1990 Geschwister-Scholl Grundschule, Schwalbach am Taunus
1990-1993 Liebig Gymnasium, Frankfurt am Main
1993-1999 Gymnasium Wertingen

Studium

Oktober 2000 Immatrikulation Humanmedizin, LMU München
August 2002 Ärztliche Vorprüfung, LMU München
August 2003 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München
Mai 2006 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München
Mai 2007 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, LMU München

Praktisches Jahr

Innere Medizin: Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston, USA
Harvard Medical School
Pädiatrie: Kinderspital, Zürich, Schweiz
Universität Zürich
Chirurgie: Maria-Theresia-Klinik, München, Deutschland
Ludwig-Maximilians-Universität

Beruflicher Werdegang

Seit Mai 2007 Berater in der Praxisgruppe Health Care
The Boston Consulting Group GmbH, Frankfurt