

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
Chirurgische Klinik I

Direktor: Professor Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede

**Biologie der Transplantatabstoßung:
Nachweis antigenspezifischer T-Lymphozyten und
Charakterisierung ihres T-Zellrezeptor-Repertoires**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Tünde Kerteß

aus Sathmar, Rumänien

Würzburg, April 2007

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Otto
Korreferent: Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.07.2007

Der Promovendin ist Ärztin

Diese Arbeit ist meinen Eltern Eva und Stefan Kerteß
und ganz besonders meiner Großmutter Maria Kovács gewidmet.
Sie haben stets an mich geglaubt.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung	2
1.2	Der T-Zellrezeptor: Aufbau und Funktion.....	4
1.3	Der T-Zellrezeptor: Rezeptorrepertoire und Immunantwort.....	6
1.4	Zielsetzung.....	8
2	FRAGESTELLUNG	9
3	MATERIAL UND METHODEN	10
3.1	Tiere.....	10
3.2	Kulturmedium und Pufferlösungen	10
3.3	Zellisolierungen	11
3.4	Durchflusszytometrie	12
3.5	Zellfärbungen mit CFDASE	13
3.6	Der T-Zell-Proliferationsassay	14
3.7	Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	15
3.8	Der PCR-ELISA	18
3.9	Auswertung	20
3.10	Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten.....	23
4	ERGEBNISSE	24
4.1	Charakterisierung antigenspezifischer T-Lymphozyten	24
4.2	Nachweis der Proliferation antigenspezifischer T-Lymphozyten	33
4.3	Bestimmung des TCR V β -Repertoires antigenspezifischer T-Lymphozyten	39
4.3.1	Der PCR-ELISA	40
4.3.2	Das TCR V β -Repertoire von Thymozyten und T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten	42
4.3.3	Das TCR V β -Repertoire nach Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1....	46
4.3.4	Das TCR V β -Repertoire antigenspezifischer T-Lymphozyten nach <i>in vitro</i> Stimulierung	50
5	BEANTWORTUNG DER FRAGEN	53
6	DISKUSSION	55
7	AUSBLICK	62
8	ZUSAMMENFASSUNG	63
9	LITERATURVERZEICHNIS	65
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	
	DANKSAGUNG	
	LEBENS LAUF	

1 Einleitung

Die Organtransplantation entwickelte sich in der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts innerhalb kürzester Zeit von ihren experimentellen Anfängen zum etablierten klinischen Behandlungskonzept (Hariharan S et al., 2000). Seit 1954, als die erste Niere zwischen eineiigen Zwillingen durch Joseph E. Murray (Murray JE et al., 1955) erfolgreich übertragen wurde, steigt die Zahl der Organtransplantationen kontinuierlich an.

Doch hat die Transplantationsmedizin mit einem wesentlichen Nachteil zu kämpfen: noch immer wird ihr langfristiger Erfolg zu oft durch die Transplantatabstoßung gefährdet. Hierbei handelt es sich um eine vom Organtransplantat ausgelöste Immunantwort, die zu dessen Zerstörung führt. Die derzeit einzige Möglichkeit eine Abstoßung zu verhindern, ist die Unterdrückung des Empfängerimmunsystems mit so genannten Immunsuppressiva. Auch wenn diese, erstmals in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgreich eingesetzten, Medikamente ständig durch Verbesserte ersetzt werden, bleiben doch die von ihnen ausgelösten Nebenwirkungen weiterhin ein ernstzunehmendes Problem (Ratcliffe PJ et al., 1996). Sie unterdrücken die gesamte körpereigene Abwehr, was wichtig ist, um das Organtransplantat vor der Zerstörung zu schützen, doch bewirkt diese Immunsuppression auch, dass das Immunsystem der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren und Infektionen kaum adäquat entgegenwirken kann (Walz MK, 1992; Cobbold SP, 2005). Die Immunsuppression ist nach Daten von Eurotransplant auch wesentliche Ursache, dass Transplantatempfänger an Infektionen versterben (www.eurotransplant.nl). Hinzu kommt, dass diese Immunsuppressiva toxische Nebenwirkungen wie Nephro- und Neurotoxizität verursachen (Ratcliffe PJ et al. 1996, Hong JC 2000).

Das unveränderte Ziel der Transplantationsforschung bleibt auch weiterhin, die zur Transplantatabstoßung führende Immunantwort selektiv auszuschalten, ohne dabei die lebenswichtigen Abwehrfunktionen des Immunsystems zu beeinträchtigen (Gorantla VS et al., 2000; Otto C und Ulrichs K, 2004).

1.1 Immunologische Grundlagen der Transplantatabstoßung

Die klinische Organtransplantation stellt in aller Regel eine allogene Transplantation dar, womit die Übertragung zwischen genetisch nicht-identischen Individuen bezeichnet wird. Die zur Auslösung der Abstoßung wesentlichen Antigene – sie werden auch Transplantat- oder Alloantigene genannt – sind in erster Linie die polymorphen Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*) oder MHC (Bjorkman PJ et al., 1987; Rogers NJ und Lechler RI, 2001).

Wird ein allogenes bzw. MHC-inkompatibles Organ übertragen, so wird das Immunsystem des Empfängers aktiviert und die Transplantatabstoßung ausgelöst. Zwar handelt es sich hierbei um ein multizelluläres Geschehen, doch sind, wie Transplantationsversuche an immuninkompetenten Tieren belegen, CD4⁺ T-Lymphozyten zur Auslösung der Immunantwort unerlässlich (Bolton EM, 1989; Otto C (unveröffentlichte Daten)). Die Funktion der alloreaktiven CD4⁺ T-Lymphozyten besteht darin, unterschiedliche Effektorzellen des Immunsystems wie B-Lymphozyten, zytotoxische CD8⁺ T-Lymphozyten, NK-Zellen und Makrophagen zu aktivieren, die sich ihrerseits an der Transplantatabstoßung beteiligen (Rogers NJ und Lechler RI, 2001).

Lechler und Batchelor vertraten als Erste die Ansicht, dass Alloantigene T-Lymphozyten des Empfängers über zwei unterschiedliche Wege aktiviert werden (Lechler RI und Batchelor JR, 1982). Beim „direkten“ Weg der Alloantigenerkennung erkennen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten (Suchin et al., 2001) die allogenen MHC-Klasse-I und Klasse-II Moleküle direkt auf der Oberfläche von sowohl Zellen des Organtransplantates als auch auf "passenger leukocytes" (s. unten). Die eigentliche Funktion der MHC-Moleküle, nämlich T-Lymphozyten Peptidantigene zu präsentieren, wurde von Rolf Zinkernagel und Peter Doherty beschrieben (Zinkernagel R und Doherty P, 1974).

Die „passenger leukocytes“ oder Spenderleukozyten werden mit dem Transplantat übertragen und aktivieren alloreaktive T-Lymphozyten im Transplantatempfänger. Es sind die antigenpräsentierenden Zellen unter den Spender-

leukozyten, die hierfür verantwortlich sind, da sie die notwendigen kostimulatorischen Moleküle exprimieren (Haspot F et al., 2002). Als Ursache für den ungewöhnlich hohen Anteil an alloreaktiven T-Lymphozyten, die über den direkten Weg der Alloantigenerkennung aktiviert werden (ca. 1-10 Prozent), wird die Kreuzreaktivität der T-Zellrezeptoren auf diesen T-Lymphozyten gesehen (Lombardie G et al., 1990; Lechler RI et al., 1990). Nach aktuellen Erkenntnissen ist die Lebensdauer der „passenger leukocytes“ im Transplantatempfänger begrenzt, und mit ihrem Verschwinden kommt der direkte Weg der T-Zellaktivierung zum Erliegen. Der „indirekte Weg“ der Alloantigenerkennung wird durch antigenpräsentierende Zellen des Transplantat-Empfängers vermittelt. Diese phagozytieren verschiedenste Proteine, hierunter auch allogene Proteine des MHC-Komplexes, prozessieren diese zu Peptiden, um sie in Selbst-MHC-Klasse-II Molekülen den eigenen CD4⁺ T-Lymphozyten auf der Zelloberfläche zu präsentieren (Auchincloss H et al., 1993; Auchincloss H und Sultan H, 1996). Auch die indirekt aktivierten CD4⁺ T-Lymphozyten steuern über Zytokine weitere Effektorzellen (Abb. 1.1). Die besondere Bedeutung des indirekten Weges der Alloantigenerkennung liegt darin, dass er solange aktiv ist, wie sich das Transplantat im Empfänger befindet. Dieser Weg ist somit auch der Grund dafür, dass Transplantatempfänger ein lebenslang Immunsuppressiva einzunehmen haben.

An der Transplantatabstoßung ist zwar eine Vielzahl von Alloantigenen beteiligt, doch ist es möglich, Peptidantigene mit einem nachweisbaren Effekt auf die Transplantatabstoßung zu identifizieren. So wurden die an der Abstoßung allogener Organtransplantate in Lewis-Empfängern beteiligten MHC (RT1^U)-Peptidantigene in der eigenen Arbeitsgruppe charakterisiert (Sitaru, AG et al., 2002 und 2004; Otto, C et al., 2002). Insbesondere die Bedeutung des allo-genen Peptids P1, einem aus 19 Aminosäuren bestehenden Peptid, für die Allo-immunantwort wurde intensiv untersucht. So weisen P1-spezifische T-Lymphozyten ein ausgeprägtes Th1-Cytokin-Muster auf und ihre Beteiligung an der beschleunigten Abstoßung von Wistar-Furth-Organtransplantaten in Lewis-Ratten wurde nachgewiesen (Sitaru AG et al., 2004).

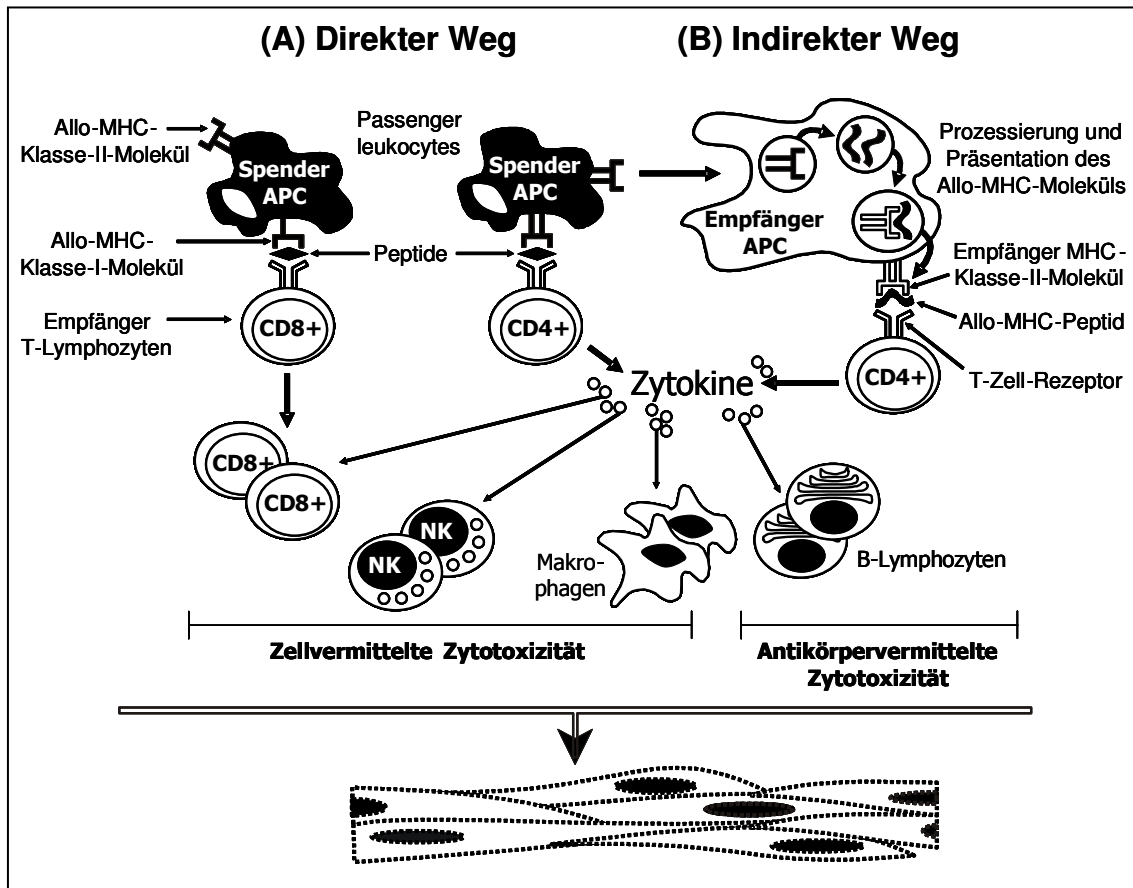


Abb. 1.1: Der direkte und indirekte Weg der Alloantigenerkennung. Beide Wege führen zur Aktivierung alloreaktiver T-Lymphozyten des Empfängers. Der direkte Weg ist durch die Interaktion antigenpräsentierender Zellen (APC) des Spenders („passenger leukocytes“) mit Empfänger-T-Lymphozyten charakterisiert. Dabei erkennen alloreaktive CD8⁺ und CD4⁺ T-Lymphozyten allogene MHC-Klasse I bzw. Klasse II Moleküle direkt (A). Dagegen werden beim indirekten Weg die MHC-Moleküle des Spenders von Empfänger-APC aufgenommen, prozessiert und den eigenen CD4⁺ T-Lymphozyten präsentiert (B).

1.2 Der T-Zellrezeptor: Aufbau und Funktion

Allen T-Lymphozyten ist der T-Zellrezeptor gemeinsam (Turner SJ et al., 2006). Beim Menschen befinden sich die Gene für den T-Zellrezeptor auf den Chromosomen 7 und 14. Der T-Zellrezeptor ist ein membrangebundenes Glykoprotein, bestehend aus zwei über Disulfidbrücken verbundenen Polypeptidketten. Hinsichtlich der beiden Untereinheiten werden so genannte α/β - oder γ/δ -Heterodimere unterschieden. Der T-Zellrezeptor ist mit dem zur Signalübermittlung wichtigen CD3-Komplex assoziiert (Abb. 1.2).

Der α/β -T-Zellrezeptor erkennt unter physiologischen Bedingungen „sein“ Peptidantigen nur dann, wenn es von körpereigenen MHC-Molekülen (s. oben) präsentiert wird. Der T-Zellrezeptor bindet dabei sowohl Determinanten des Antigens als auch des MHC-Moleküls. Diese Besonderheit der Antigenerkennung durch T-Lymphozyten ist als „MHC-Restriktion“ bzw. „Zinkernagel-Doherty-Phänomen“ bekannt (s. oben).

Innerhalb der T-Lymphozyten lassen sich zwei Subpopulationen unterscheiden: 1.) Die $CD4^+$ T-Lymphozyten, die auch als T-Helfer-Zellen bezeichnet werden, erkennen ein Antigen wenn es von MHC-Klasse-II Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen präsentiert wird. Hierbei stabilisiert das $CD4$ -Molekül den Komplex aus T-Zellrezeptor, MHC-Klasse-II Molekülen und Fremdanigen; 2.) Die zytotoxischen $CD8^+$ T-Lymphozyten binden Antigene bevorzugt in Assoziation mit MHC-Klasse-I Molekülen. Hierbei hat auch das $CD8$ -Molekül die Funktion, die Bindung zum MHC-Klasse-I Molekül zu stabilisieren.

Mehr als 95% der humanen T-Lymphozyten exprimieren den α/β T-Zellrezeptor auf ihrer Zelloberfläche. Ähnlich den Immunglobulinmolekülen der B-Lymphozyten weist auch der T-Zellrezeptor einen großen extrazellulären Anteil auf, der aus einer konstanten („constant region“, C-) und einer antigenbindenden, variablen (V-) Domäne besteht (Abb. 1.2). Über eine so genannte H-Region („hinge“) werden beide Ketten miteinander verbunden. Die Verankerung der beiden Ketten des T-Zellrezeptors in der Zellmembran erfolgt jeweils durch zwei hydrophobe Transmembranregionen. Im Gegensatz zum B-Zellrezeptor weist der T-Zellrezeptor nur eine Antigenbindungsstelle (Monovalenz) auf, die von beiden Peptidketten geformt wird. Die Größe der α -Kette liegt zwischen 47 bis 52 kDa und die der β -Kette zwischen 40 bis 44 kDa (Abb. 1.2). Der T-Zellrezeptor wird von weiteren Proteinketten (vier beim Menschen und fünf bei der Maus) umgeben, die als $CD3$ -Proteine bezeichnet werden und für die Signaltransduktion von Bedeutung sind. Sie signalisieren in das Zellinnere, dass eine Antigenerkennung stattgefunden hat.

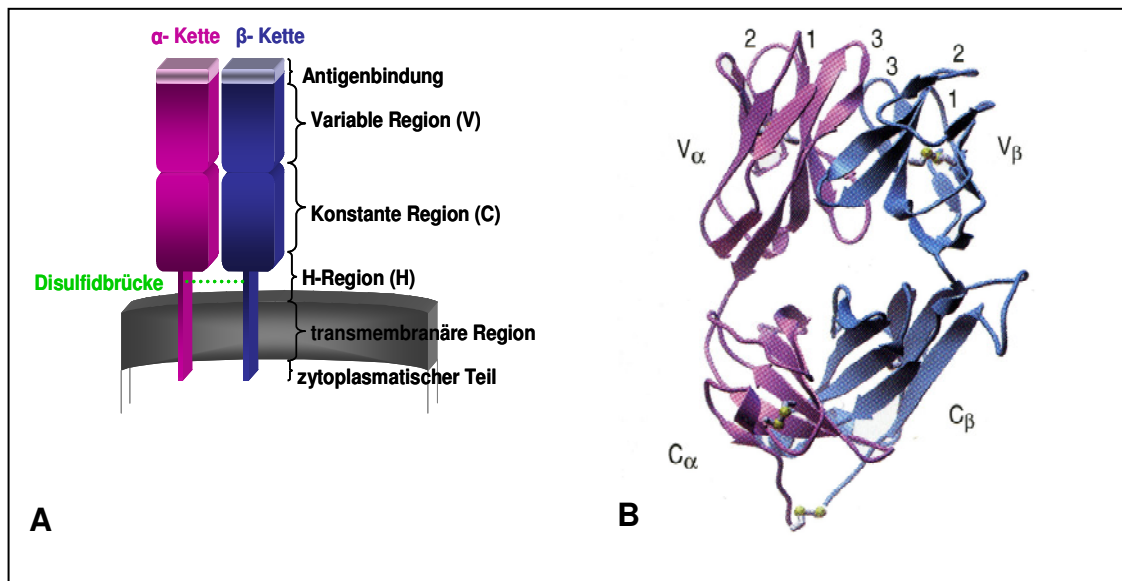


Abb. 1.2: Der α/β T-Zellrezeptor. Dieser T-Zellrezeptor besteht aus einer α - und β -Kette, die über eine Disulfidbrücke in der H-Region miteinander verbunden sind (A). Der extrazelluläre Bereich jeder Kette besteht aus einer variablen und einer konstanten Domäne. Beide Ketten sind zudem über ihre Transmembranregionen, die aus hydrophoben und ungeladenen Aminosäuren bestehen, in der Plasmamembran verankert, wobei ein kurzer zytoplasmatischer Bereich in das Zellinnere ragt. In Abb. 1.2 B ist das Raummodell des T-Zellrezeptors nach Ergebnissen aus Röntgenstrukturanalysen dargestellt. Der obere Bereich zeigt das Faltungsmuster der variablen Domänen von α - und β -Kette und der untere Bereich die Faltungsmuster der konstanten Domänen. Beide Ketten weisen eine charakteristische Anordnung von β -Faltblättern auf (breite Pfeile). In der variablen Domäne beider Ketten sind die hypervariablen Komplementaritätsdeterminanten (*complementary determination regions* oder CDR) lokalisiert und als Schleifen 1, 2 und 3 im Modell zu erkennen. Sie bilden zusammen die Antigenbindungsstelle. Bei der Antigenerkennung bilden die α - und β -Kette des T-Zellrezeptors, die Moleküle des MHC-Komplexes und das antigene Peptidfragment einen ternären Komplex (Seth A et al., 1994). Dabei nehmen die CDR1- und CDR2-Bereiche Kontakt mit den MHC-Helices auf, während CDR3 an das Peptid bindet.

1.3 Der T-Zellrezeptor: Rezeptorrepertoire und Immunantwort

T-Lymphozyten stellen neben B-Lymphozyten die zellulären Träger der spezifischen Immunantwort dar. Charakteristisch für beide ist, dass sie zur Antigenerkennung eine nahezu unbegrenzte Rezeptorvielfalt erzeugen. Durch die Antigenerkennung werden sie aktiviert, beginnen sich zu teilen und differenzieren sich zu antigenspezifischen Effektorzellen. Ist die Ursache ihrer Aktivierung – z.B. eine bakterielle Infektion – beseitigt, so gehen nahezu sämtlich aktivierte Zellen zugrunde (Apoptose). Doch stellen Gedächtniszellen sicher, dass bei einem erneuten Auftreten des Antigens die Immunantwort rasch und effektiv

ausgelöst wird (immunologisches Gedächtnis). Diese Art der antigenspezifischen Selektion von T- und B-Lymphozyten wird als adaptive Immunität genannt. Alle von einem aktivierten Lymphozyten abstammenden Zellen weisen dieselbe Rezeptorspezifität auf und werden daher als Klon bezeichnet. Damit der T-Lymphozyt vollständig aktiviert wird, sind zum Antigen noch weitere Signale über Korezeptoren wie CD4, CD80/86 (B7.1/B7.2), CD28 und CD152 (CTLA-4) notwendig (June CH et al., 1994; Agadjanyan MG et al., 1999). Die Gesamtheit dieser Signalkaskaden führt zur Proliferation antigenspezifischer Zellen.

Die sehr große Anzahl potentieller Antigene erfordert eine Vielzahl von T-Zellrezeptoren mit unterschiedlicher Spezifität. Würde jeder Rezeptor vollständig von einem Gen kodiert werden, so wären mehr Gene notwendig, als der Zelle überhaupt zur Verfügung stünden. Aus diesem Grund wird die große Vielfalt an Rezeptorproteinen durch einen komplexen genetischen Mechanismus mit der Bezeichnung somatische Rekombination gesichert. Hierzu befindet sich die genetische Information für die vollständige α - und β -Kette in getrennten Gensegmenten. Während der T-Zellentwicklung im Thymus werden diese Gensegmente mit der Bezeichnung V („variable“), D („diversity“) und J („joining“) durch somatische Rekombination zufallsbedingt verknüpft. Das für die α -Kette gebildete Gen besteht aus den Segmenten V_{α} - J_{α} und das für die β -Kette gebildete Gen aus den Segmenten V_{β} - D_{β} - J_{β} . Diese funktionellen Gene werden transkribiert und das primäre RNA-Transkript durch „Splicing“ modifiziert. Hierdurch werden die nichtkodierenden Intronsequenzen entfernt und die kodierenden Exonsequenzen miteinander verbunden und an das so genannte C- („constant“) Segment geknüpft. Die so entstandene mRNA enthält die vollständige genetische Information, um an den Ribosomen die α - bzw. β -Kette herzustellen (Translation).

In den 80er und 90er Jahren des 20. Jahrhunderts wurde in zahlreichen Publikationen gezeigt, dass es in bestimmten Phasen von Autoimmunerkrankungen zur Anreicherung von T-Zellklonen mit bestimmten V_{β} -Elementen in ihren T-Zellrezeptoren kommt (Zamvil S et al, 1985; Acha-Orbea H et al. 1988; Goronzy

JJ et al., 1998; Spits H et al., 1991; Navarette C und Bottazzo GF, 1993; Bucht A et al., 1992; Segurado OG und Schendel DJ, 1993a; Zagon et al., 1994). Auch bei der Transplantatabstoßung wurde das Phänomen einer dominanten T-Zellrezeptor V β -Verteilung sowohl im Tiermodell (Shirwan H et al., 1993; Douillard P et al., 1996; Shirwan H et al., 1997; Brouard S et al., 1999) als auch in der Klinik (Hall BL et al., 1993; Barth C et al., 1996) beobachtet, auch wenn die Ergebnisse häufig widersprüchlich sind (Kato M et al., 2004).

1.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde das T-Zellrezeptor V β -Reperoire alloreaktiver CD4⁺ T-Lymphozyten der Lewis-Ratte charakterisiert, die mit dem allogenen Peptid P1 über den indirekten Weg der Alloantigenerkennung aktiviert wurden (Abb. 1.1). Dieser Weg, der für die Transplantatabstoßung von großer Bedeutung ist, ermöglicht zudem, im Gegensatz zur direkten Alloantigenerkennung, die Induktion spenderspezifischer Toleranz (Shoskes DA und Wood KJ, 1994; Game DS und Lechler RI, 2002).

Mit dem allogenen Peptid P1 steht ein gut charakterisiertes Antigen zur Verfügung, das an der Transplantatabstoßung beteiligte alloreaktive T-Lymphozyten in Lewis Ratten induziert (Sitaru et. al., 2004). P1, das aus 19 Aminosäuren besteht, ist mit einem Bereich des MHC-Klasse-I-Moleküls der Wistar-Furth-Ratte (RT1^u) identisch.

Ziel dieser Arbeit war, das T-Zellrezeptor V β -Repertoire P1-spezifischer T-Lymphozyten zu charakterisieren. Hierzu wurden sie *in vitro* mehrfach restimuliert, um zu untersuchen, welche T-Zellklone sich letztlich nach mehrfachem Antigenkontakt „durchsetzten“: Diese T-Zellrezeptor V β -Elemente sollten eine hohe Affinität zum Peptidantigen P1 aufweisen. Zum Vergleich wurde das T-Zellrezeptor V β -Repertoire von sowohl Thymozyten als auch T-Lymphozyten nicht-immunisierter Tiere untersucht. Für diese Analysen wurde eine Methode etabliert, die die Sensitivität der Polymerase-Kettenreaktion mit der Kapazität eines ELISA kombiniert: der PCR-ELISA.

2 Fragestellung

In dieser Arbeit wurde das T-Zellrezeptor V β -Repertoire antigenspezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten untersucht. Folgende Fragen sollten dabei beantwortet werden:

1. Die subkutane Injektion des alloogenen Peptids P1 aktiviert das adaptive Immunsystem. Welche Effekte sind hierbei zu beobachten?
2. Das T-Zellrezeptor V β -Repertoire von Thymozyten und T-Lymphozyten verschiedener Lymphknotenstationen wurde analysiert. Welche Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede sind festzustellen?
3. Das T-Zellrezeptor V β -Repertoire antigenspezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten wurde untersucht. Was sind die Ergebnisse?

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Es wurden männliche Ratten des Inzuchtstammes Lewis (LEW, RT1^l) zur Isolierung von T-Lymphozyten verwendet. Bei Organentnahme waren die Tiere durchschnittlich 8-10 Wochen alt und wogen 150 bis 200 g. Sie wurden von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen.

3.2 Kulturmedium und Pufferlösungen

3.2.1 Kulturmedium

Das Standardmedium bestand aus RPMI 1640 Medium mit folgenden Zusätzen (Angaben als Endkonzentrationen): 20 mmol/L HEPES, 1 mmol/L Natrium-Pyruvat, 2 mmol/L L-Glutamin, 100 U/mL Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 50 µmol/L 2-Mercaptoethanol, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 10% fetales Kälberserum (CellConcepts, Umkirch, alle weiteren Reagenzien von Gibco/Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland).

3.2.2 PBS (Phosphat buffered saline)

Die phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,2, enthielt 140 mmol/L Natriumchlorid, 2,7 mmol/L Kaliumchlorid, 7,2 mmol/L Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, 1,47 mmol/L Kaliumdihydrogenphosphat.

3.2.3 Erythrozyten-Lysepuffer

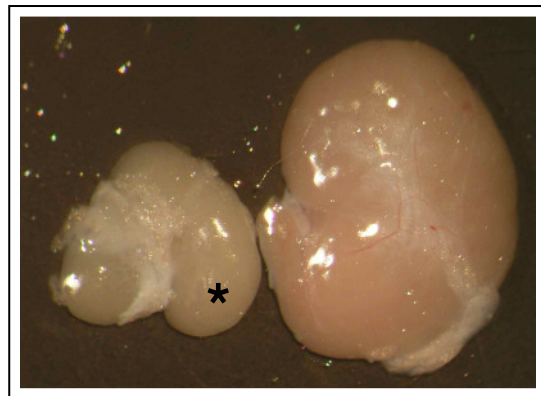
Der zur selektiven Zerstörung von Erythrozyten verwendete hypotonische Lysepuffer enthielt 1,68 mol/L Ammoniumchlorid, 0,1 mol/L Kaliumhydrogencarbonat und 12,6 mmol/L EDTA. Diese 10-fach konzentrierte Stammlösung wurde vor Gebrauch im Verhältnis 1:10 mit sterilem Aqua dest. verdünnt.

3.3 Zellisolierungen

3.3.1 Isolierung von Lymphknoten- und Milzzellen

Die entnommenen Lymphknoten und Milzen wurden mit dem Stempel einer 5 mL-Spritze durch ein 70 µm Nyloonsieb (*"Cell Strainer"* der Firma Falcon bezogen über die Firma Noras, Würzburg, Deutschland) gepresst, die Zellsuspension gesammelt und bei 402 xg für 6 Minuten zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden mit 3 mL Lysepuffer innerhalb von 2-3 Minuten zerstört. Anschließend wurden zwischen 15 und 30 mL PBS zugegeben und die Zellen zweimal gewaschen. Hierzu wurden sie bei 402 xg für 6 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Milzzellen wurden in 5 mL, die Lymphknotenzellen in 1 mL PBS resuspendiert und ihre Zellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmt. Hierzu wurden die Zellen mit einer 0,04-prozentigen Trypanblau-Lösung (Ausgangskonzentration: 0,4 Prozent von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) angefärbt. Die Zellzahl errechnete sich aus dem Produkt des Mittelwertes der gezählten Zellen, dem Kammer- sowie Verdünnungsfaktor und dem Volumen, in dem die Zellen resuspendiert waren.

Abb. 3.1: Darstellung der Größenverhältnisse von poplitealen (links) und cervicalen (rechts) Lymphknoten einer 8-12 Wochen alten Lewis-Ratte. Die entnommenen Lymphknoten wurden mit einer Digitalkamera (Olympus C-5050) an einem Operationsmikroskop der Firma Wild, Heerbrugg, Schweiz, bei 16-facher Vergrößerung fotografiert. Der Kleinere der beiden poplitealen Lymphknoten (*) weist eine Länge von ca. 1 bis 1,5 mm auf. Aus den vier poplitealen Lymphknoten einer nicht-immunisierten Ratte lassen sich ca. $2,6 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ (n=3) Lymphknotenzellen isolieren.



3.3.2 Immunmagnetische Isolierung aktivierter (CD25⁺) T-Lymphozyten

Die auf 2×10^7 Zellen/mL eingestellten Lymphknotenzellen wurden mit dem anti-CD25 Antikörper NDS61 für 25 Minuten bei kontinuierlicher Bewegung auf Eis inkubiert. Zur Berechnung der notwendigen Antikörpermenge wurde der Anteil der Zielzellen mit 10 Prozent kalkuliert und 0,3 µg Antikörper pro 1×10^6 Zellen eingesetzt. Diese Vorgehensweise wurde in Vorversuchen ausgetestet. Nach

zweimaligem Waschen mit Medium ohne Zusätze (bei 402 xg für jeweils 6 Minuten) wurden die nicht gebundenen Antikörper entfernt. Die Zellen wurden erneut in Medium ohne Zusätze resuspendiert und auf 2×10^7 Zellen/mL eingestellt. Pro Zielzelle wurden vier paramagnetische Mikropartikel (CELLlection Pan Mouse IgG Dynabeads, Dynal Biotech Oslo, Norwegen) zugegeben und für 20 Minuten auf Eis in kontinuierlicher Bewegung inkubiert. Im Anschluss wurden die CD25^{POS}-Zellen mit einem Magneten („Magnetic Particle Concentrator“ für 1,5 mL Reaktionsgefäße von Dynal) von den restlichen Zellen separiert. Um die Dynabeads von den positiv-selektierten CD25^{POS}-Zellen zu entfernen, wurden sie in 200 µL Standardmedium (s. oben) resuspendiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 5 µL DNase (5 U/µL) inkubiert. Die von den Dynabeads durch die DNase abgelösten Zellen verblieben im Überstand, während die paramagnetischen Partikel mit einem Magneten entfernt wurden. Anschließend wurden die Zielzellen bei 402 xg für 6 Minuten gewaschen und ihre Zellzahl mit der Neubauerzählkammer bestimmt.

3.4 Durchflusszytometrie

Für diese Analysen wurden 5×10^5 Zellen in 50 µL PBS eingesetzt und jeweils mit einer entsprechenden Menge an monoklonalen Antikörpern (ca. 3-5 µL) für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. In Vorversuchen war die jeweils notwendige Menge an Antikörpern (Tab. 3.1) ausgetestet worden. Für die anschließende Messung am Durchflusszytometer wurden die Zellen in einem Endvolumen von 300 µL PBS aufgenommen.

Die Messungen wurden an einem FACScan (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit einem 488 nm Argonlaser durchgeführt. Eine Zellprobe, die nicht mit Antikörpern versetzt war, wurde als Kontrolle stets mit gemessen. FITC- oder PE-konjugierte Mausantikörper (IgG_{1,k}) wurden als Isotypenkontrollen eingesetzt (Becton Dickinson Pharmingen). Die toten Zellen wurden mit 7-AAD (7-Amino-Actinomycin D) identifiziert. Jeweils 10.000 Ereignisse wurden am Durchflusszytometer mit dem „Software“-Programm CellQuest™ Pro in der Version 5.1 der Firma Becton Dickinson GmbH gezählt und gespeichert. Die Auswertung erfolgte mit dem im Internet frei erhältlichen „Soft-

ware-Programm“ WinMDI (*"windows multiple document interface flow cytometry application"*) in der Version 2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>).

Tab. 3.1: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, ihre Spezifität und ihre Bezugsquelle. TCR = T-Zellrezeptor. Weitere Informationen sind bei van den Berg TK et al., 2001 zu finden.

Antikörper		Spezifität	Bezugsquelle
Epitop	Zielzellen		
Ox 1	CD45	alle Leukozyten	Linaris, Wertheim
Ox 6	RT1 ^b	alle MHC Klasse II-positiven Zellen	
Ox 22	CD45RC	T-Helferzellen	
Ox 39	CD25	aktivierte T-Lymphozyten	
NDS61			
R73	$\alpha\beta$ TCR	$\alpha\beta$ -T-Lymphozyten	
W3/25	CD4	CD4 ⁺ T-Lymphozyten (in Kombination mit R73)	Medac, Hamburg

3.5. Zellfärbungen mit CFDASE

Die CFDASE Stammlösung (Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester) mit 10 $\mu\text{mol/L}$ wurde entsprechend den Herstellerangaben angesetzt. Hierzu wurden 500 μg gefriergetrocknetes CFDASE (MoBiTec, Göttingen, Deutschland) in 90 μL DMSO (Dimethylsulfoxid) gelöst. Diese Stammlösung wurde in einem weiteren Schritt mit PBS auf 1 $\mu\text{mol/L}$ verdünnt (= "Arbeitslösung"). Fünfhunderttausend Zellen in 1 mL PBS wurden mit 50 nmol/L CFDASE (Endkonzentration) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Freies CFDASE wurde durch Zugabe des fünffachen Volumens an Standardmedium verdünnt. Während der fünfminütigen Inkubation bei 4°C wurde freies CFDASE durch den großen Proteinanteil im Medium gebunden. Nach dem Abzentrifugieren der Zellen wurde der Überstand verworfen, und die Ausgangsfluoreszenz der gefärbten Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Hierzu wurden 10.000 Ereignisse gezählt. Da die Zellen bis zu 60% des aufgenommenen Farbstoffes verlieren können, ohne sich geteilt zu haben (Current Protocols in Cytometry; 1998; Ka-

pitel 9.11.1), war es erforderlich, sie zunächst für 24 Stunden in Standardmedium bei 37°C und 5 Prozent CO₂ zu inkubieren. Erst danach war eine stabile Fluoreszenz zu messen und als Ausgangswert zu verwenden (Abb.3.2). Aus diesem Grund wurden die mit CFDASE markierten und nicht-stimulierten Zellen bis zu drei Tage nach Markierung auf ihre Fluoreszenzintensität untersucht.

CFDASE gelangt während der Inkubation über Diffusion in das Cytoplasma der Zellen, wo es von intrazellulären Esterasen hydrolysiert wird. Die freigesetzten Carboxylatgruppen des Calceins verhindern eine Diffusion aus dem Zytoplasma in das Medium. Zudem wird CFDASE in fluoreszierende Farbstoffe umgewandelt, wodurch eine Detektion der markierten Zellen über einen Zeitraum von mehreren Tagen möglich wird. Nach Aktivierung der CFDASE-markierten Zellen ist eine Abnahme der Fluoreszenz aufgrund der Zellteilungen zu beobachten, da die Menge an CFDASE einer Zelle jeweils auf die beiden Tochterzellen verteilt wird. Dies verringert die Fluoreszenzintensität und die Anzahl der gemessenen „Fluoreszenzspitzen“ entspricht der Anzahl der Zellteilungen (Abb. 3.2).

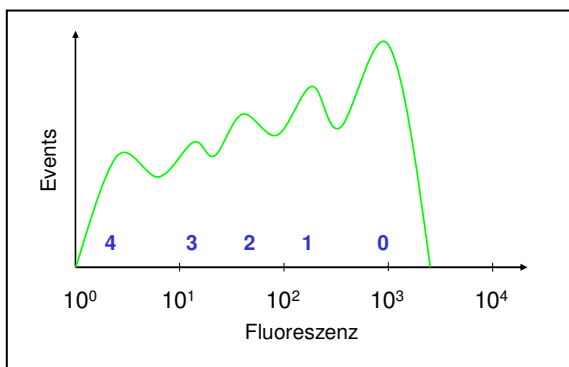


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Fluoreszenzmusters sich teilender Zellen im Durchflusszytometer, die mit CFDASE markiert sind. Jeder „Peak“ steht für eine Zellteilung und mit jeder Zellteilung nimmt die Intensität der Fluoreszenz ab. Die Zahlen geben die Anzahl der Zellteilungen an. X-Achse: Fluoreszenzintensität in logarithmischer Skalierung. Y-Achse: Anzahl der Ereignisse zu einer bestimmten Fluoreszenz

3.6 Der T-Zell-Proliferationsassay

Dieser Assay wurde in Zellkultur-Mikroplatten mit 96 Rundboden-Vertiefungen ("96-well-Platten") von Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland, durchgeführt. Popliteale Lymphknotenzellen (jeweils 10⁵ Zellen pro Vertiefung) wurden ohne weitere Aufreinigung mit 20 Gray bestrahlt, syngenen DCs (10⁴ Zellen pro Vertiefung) und 5 µg Peptid P1 pro Vertiefung (= 33 µg/mL) in einem End-

volumen von jeweils 150 µL inkubiert. Die Platten wurden für 3 Tage bei 37°C und 5 Prozent CO₂-Sättigung kultiviert. Die letzten 6 Stunden wurden die Zellen mit 0,5 µCi/Vertiefung [³H]-Thymidin inkubiert ("gepulst"). Der [³H]-Thymidin-Einbau wurde mit einem "β-plate"-Szintillationsmeßgerät in der Einheit "counts per minute" (cpm) bestimmt (Institut für Virologie und Immunbiologie der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg).

3.7 Die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um eine enzymatische Reaktion, mit der sich definierte DNA-Sequenzen *in vitro* vervielfältigen lassen (Saiki RK et al., 1985). In Kombination mit einer vorgeschalteten, weiteren enzymatischen Reaktion – der reversen Transkription – die mRNA in cDNA (*complementary DNA*) überführt, lässt sich die Genexpression von Zellen überprüfen.

a) RNA-Isolierung

Für sämtliche RNA-Isolierungen wurden 1x10⁶ Zellen eingesetzt. Bei der Zellverarbeitung wurden alle Schritte bis zur Zugabe von eiskaltem Ethanol unter dem Abzug durchgeführt. Mit 1 mL Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Zellen lysiert und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Bei diesem Schritt wurden RNA, DNA sowie Proteine freigesetzt. Anschließend wurden 200 µL 4°C kaltes Chloroform (Roth, Gernsheim, Deutschland) zugegeben, für 15 Sekunden kräftig gemischt, 5 Minuten bei 4°C inkubiert und für weitere 15 Minuten bei 16.060 xg und 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase mit der RNA wurde in ein steriles 1,5 mL Reaktionsgefäß (Eppendorf) mit 500 µL 4°C kaltem Isopropanol (Merck, Karlsruhe, Deutschland) überführt und die RNA über Nacht bei -20°C gefällt. Am nächsten Tag wurde die RNA bei 13.684 xg, 4°C für 10 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL 75%-igem Ethanol (angesetzt mit nukleasefreiem Wasser) gewaschen. Danach wurde die Lösung erneut für 5 Minuten bei 5.646 xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die am Boden des Gefäßes haftende RNA bei 37°C für ca. 20-30 Minuten luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA mit 40 µL 1 mmol/L

Natriumcitratpuffer (Ambion, Texas, USA) resuspendiert und für 10 Minuten bei 57°C im Thermomixer (Eppendorf) geschüttelt. Die RNA wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder bei -80°C aufbewahrt.

b) Reverse Transkription: cDNA Synthese

Nach der RNA-Isolierung wurde die cDNA mit Oligo-dT16-Primern synthetisiert. Hierzu wurden 5 µL RNA in einem 20 µL Ansatz in cDNA umgeschrieben (Angaben als Endkonzentration): 1x PCR Puffer (10x Stammlösung: 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,3, 5 mmol/L MgCl₂, 2,5 µmol/L Oligo-dT16-Primer, 1 mmol/L dNTP-Gemisch (dNTP = Desoxynukleotidtriphosphat; Promega, USA), 1U/µL RNase-Inhibitor und 2,5 µmol/L MuLV Reverse Transkriptase. Alle Reagenzien wurden von der Firma Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, Deutschland, bezogen.

c) Polymerase-Kettenreaktion

Für die anschließende Polymerase-Kettenreaktion wurden 2,5 µL cDNA in 25 µL-Ansätze vorgelegt (Angaben als Endkonzentration): 1x PCR Puffer II (10x Stammlösung: 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8,3), 1,5 mmol/L MgCl₂, 2 U AmpliTaq Gold (alle Reagenzien von Applied Biosystems GmbH) und 0,5 µmol/L der entsprechenden Primer (synthetisiert durch MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland). Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurde als Positiv-Kontrolle ("house-keeping" Gen) verwendet.

Tab. 3.2: Das für die Polymerase-Kettenreaktion gewählte Temperaturprofil sowie Cyclendauer und -zahl. Die Primer sind in Tab. 3.3 aufgelistet.

Cyclus	Temperatur und Dauer	Anzahl der Cyclen
Denaturierung	95°C für 5 Minuten	1x
Denaturierung	95°C für 1 Minute	} 30x
Primer Annealing	62°C für 30 Sekunden	
Primer Extension	72°C für 30 Sekunden	
Primer Extension (final)	72°C für 10 Minuten	1x

Tab. 3.3: Nukleotidsequenzen der TCR V β -Primer, des Digoxigenin-gekoppelten TCR C β -Primers, des biotinierten internen Oligonukleotids (der so genannten Biotin-Sonde), sowie die Position der Forward-Primer in der jeweiligen cDNA-Sequenz. Die Primer sind der Publikation von Shirwan et al., 1993, entnommen. Das biotinierte interne Oligonukleotid wurde selbst konstruiert. Die Primersequenz für die GAPDH basiert auf der Veröffentlichung von Kruse JJ et al., Cytokine 1999; 11: 179-185. Das Temperaturprofil der PCR-Reaktion ist in Tabelle 3.2 aufgeführt.

Primer		Sequenz 5' -> 3'	Position ^{*)}
V β 1	forward	CCT GTC TTG TGG AAA CCG TAC	32 - 52
V β 2	forward	CTG GGG ACA AAG AGG TCA AAT C	230 - 251
V β 3.3	forward	GCT AGC AGG CTC TTT GGA TTG CC	36 - 58
V β 4	forward	TCT GGT GGC AGT CAC AGG GAG TG	87 - 109
V β 5.2	forward	GTG TGG CCT GGT ACC AAC AGA CTC	---
V β 6	forward	TCT CCT TGC AGT AGGA AAC CAC AC	36 - 58
V β 7	forward	GAC CCA GAT CTG GGG CTA CGG	194 - 214
V β 8.1	forward	AGA GGT GAC ATT GAG CTG TCG C	138 - 159
V β 8.2	forward	AAA GGT GAC ATT GAG TTG TAA G	138 - 159
V β 8.3	forward	AAA TGT GAC GTT CAA CTG TCA C	105 - 126
V β 9	forward	GGT TAT GCA GAA CCC AAG ATA C	75 - 86
V β 10	forward	ATG TTT AGC TAC AAC AAT AAG C	95 - 116
V β 11	forward	ACA AAT GCT GGT GTC ATC CA	55 - 74
V β 12	forward	AGG GCC ACA ATG ATC TTT TC	137 - 158
V β 13	forward	GCA ATC ATA CAG GAA AGT CAG AC	87 - 109
V β 14	forward	TGG CAG GCT CCA GGA GGG ACC C	159 - 180
V β 15	forward	TCA CAC TGA GGG TGT TCA GGC C	109 - 130
V β 16	forward	GCA GGA CAC ACA GGA CCC AAC	49 - 69
V β 17	forward	GTA ACC CAG ACT CCA AGA TAC	67 - 87
V β 18	forward	TGT TGT TGA TAG TCA AGT TGC	112 - 132
V β 19	forward	AAG AAG CTG GGA GAA GAC CTC	167 - 187
V β 20	forward	TTT ACT TTC AGA ATC AAC GGC C	201 - 225
C β	reverse	AAG GGC CCA GCT CAG CTC CAC ATG GTC AAG	
Biotinsonde		TGG GTG GAG TCA CCG TTT TCA G	
GAPDH	forward	GCG CAC CCA CTT CAA GCC CT	
	reverse	CCA CCA CAG TTG CTG GCT CA	

^{*)} Smith LR, Kono DH, Theofilopoulos AN. Complexity and sequence identification of 24 rat V β genes. *J Immunol* 1991; 147: 375-379.

d) Überprüfen der Amplifikate im Agarosegel

Jeweils 10 µL der Amplifikate wurden mit 1,5 µL 6-fach Probenpuffer (*Blue/Orange Loading Dye* von Promega, Mannheim, Deutschland) gemischt und in die Taschen eines 2-prozentigen Agarosegels (Amresco über MoBiTec GmbH Göttingen, Deutschland) mit 0,01 Prozent Ethidiumbromid (Promega, Mannheim, Deutschland) aufgetragen. Die Amplifikate wurden innerhalb von ca. 30 Minuten bei 75 V elektrophoretisch aufgetrennt (Elektrophoresekammer von Biometra, Göttingen, Deutschland), unter UV-Licht ausgewertet und zur Dokumentation fotografiert (ImageMaster UDS, Pharmacia Biotech, Ebersberg, Deutschland). Der verwendete Laufpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 40 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L Na-Acetat, 2 mmol/L EDTA in destilliertem Wasser; pH 8,0 (Merck, Karlsruhe, Deutschland).

3.8 Der PCR-ELISA

Beim PCR-ELISA handelt es sich um die Kombination der molekularbiologischen Technik PCR (s. oben) mit der immunologischen Methode ELISA („enzyme-linked immunosorbent assay“). Die mit der PCR synthetisierten TCR V β -Amplifikate lassen sich mit der ELISA-Technik, die für parallele Untersuchung großer Probenzahlen ausgerichtet ist, quantifizieren (VanderBorghet A et al., 1999).

Jeweils 20 µL der 22 V β Amplifikate (Tab. 3.3) wurden nach einem 10-minütigen Denaturierungsschritt bei 95°C mit 1 µL (dies entspricht 10 µmol/L) der biotinierten C β -Sonde (Tab. 3.3) bei 55°C für 30 Minuten inkubiert („Annealing“-Schritt). Als nächstes wurden die so biotinierten Amplifikate in jeweils 2 Vertiefungen einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte mit 96 Vertiefungen („High Bind Streptawell-Platten“ der Firma Roche, Penzberg, Deutschland) überführt. In diese Vertiefungen waren bereits jeweils 90 µL einer Mischung aus Denaturierungs- und Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:10 (Roche, Penzberg, Deutschland) vorgelegt worden. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde in jede Vertiefung 50 µL einer 0,5%-igen

Gelatine-Lösung (Endkonzentration: 0,16 Prozent) verteilt und bei 4°C über Nacht (16 Stunden) inkubiert.

Am Folgetag wurden die Vertiefungen mit jeweils 200 µL einer Lösung aus 0,5%-igem Tween-20 in PBS dreimal gewaschen. Der Peroxidase-konjugierte anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, Penzberg, Deutschland) wurde mit 0,05%-iger Tween-Lösung 1:5.000 verdünnt, jeweils 100 µL in die Vertiefungen verteilt und für eine Stunde inkubiert. Die Vertiefungen wurden viermal mit jeweils 200 µL einer 0,5%-igen Tween-PBS-Lösung gewaschen. Anschließend wurden 100 µL vom Peroxidasesubstrat BM Blue (Roche, Penzberg, Deutschland) zugegeben, für 25 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Reaktion mit 100 µL Schwefelsäure (2,5 mol/L) abgestoppt (Farbumschlag nach gelb). Die Mikrotiterplatten wurden im ELISA-Reader (Dynatech Microplate Reader MRX) bei 450 nm Wellenlänge innerhalb der nächsten halben Stunde gemessen.

Aus den Mittelwerten der Optischen Dichten der einzelnen 22 Vβ-Amplifikate wurde die Summe gebildet und der individuelle Wert der einzelnen Vβ-Elemente als prozentualer Anteil der Summe der Optischen Dichten aller Vβ-Elemente nach folgender Formel berechnet:

$$\% V\beta_x = [\text{OD}_{450}(\text{Mittelwert } V\beta_x) \times 100] / \sum \text{OD}_{450}(\text{Mittelwert } V\beta_{1-22})$$

Als Negativ-Kontrolle wurde bei jeder ELISA-Messung DNase-freies Wasser von Promega (Mannheim, Deutschland) eingesetzt. Die optische Dichte dieser „Blanks“ betrug ca. $0,073 \pm 0,006$ OD (n=50). Es wurden nur solche ELISA-Messungen ausgewertet, deren Kontrollen eine Optische Dichte von nicht größer als 0,08 aufwiesen. Von insgesamt 55 Versuchen wurden 5 wegen eines zu hohen Blanks nicht ausgewertet. Zusätzlich wurde überprüft, ob aufgrund der Spezifität von Streptavidin zum Biotin - wie erwartet - auch tatsächlich ausschließlich biotinierte Amplifikate an die ELISA-Platte binden. In anschließenden Versuchen wurde außerdem die Spezifität des anti-Digoxigenin-Antikörpers untersucht, um auszuschließen, dass nicht-digoxigenierte Amplifikate von ihm

erkannt werden. Ebenso wurde getestet, ob mögliche freie Bindungsstellen auf der Kunststoffoberfläche zu blockieren sind, um eine unspezifische Bindung des anti-Digoxigenin-Antikörpers zu verhindern.

3.9 Auswertung

a) PCR-ELISA:

Für sämtliche Versuchsserien wurden pro Ratte jeweils zwei Proben von 1×10^6 Zellen aufgearbeitet und im PCR-ELISA in Doppelbestimmungen untersucht. Aus den bei 450 nm ermittelten Optischen Dichten für jedes TCR V β -Element (mindestens vier, maximal acht Werte) wurden Mittelwerte und Standardabweichungen mit dem Microsoft-Programm "Excel" berechnet (Abb. 3.4). Die 22 Mittelwerte für das TCR V β -Repertoire wurden anschließend in obige Formel eingesetzt und der prozentuale Anteil jedes TCR V β -Elements an der Summe der aus den 22 V β -Elementen errechneten Optischen Dichte ermittelt. Die Grenze von sieben Prozent wurde als Marke für eine Überexpression festgelegt (s. hierzu auch Abb. 4.17). Die optischen Dichten von OD₁-OD₄ schwankten zwischen 2 und 5 Prozent; die Schwankungen zwischen OD₁-OD₄ und OD₅-OD₈ betragen max. 15 Prozent (Abb. 3.3).

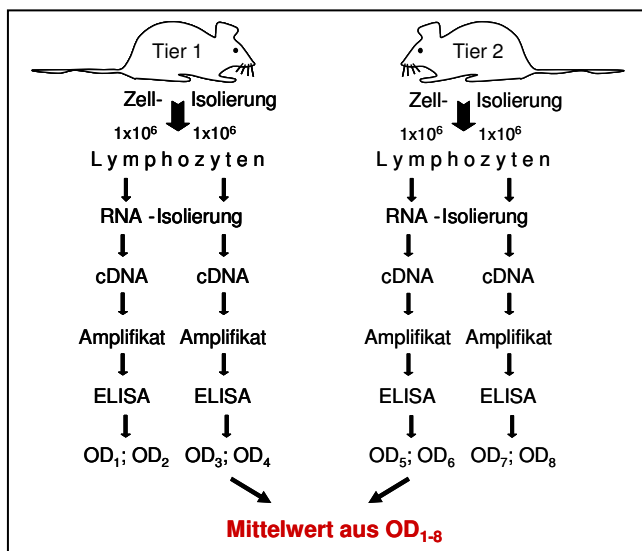
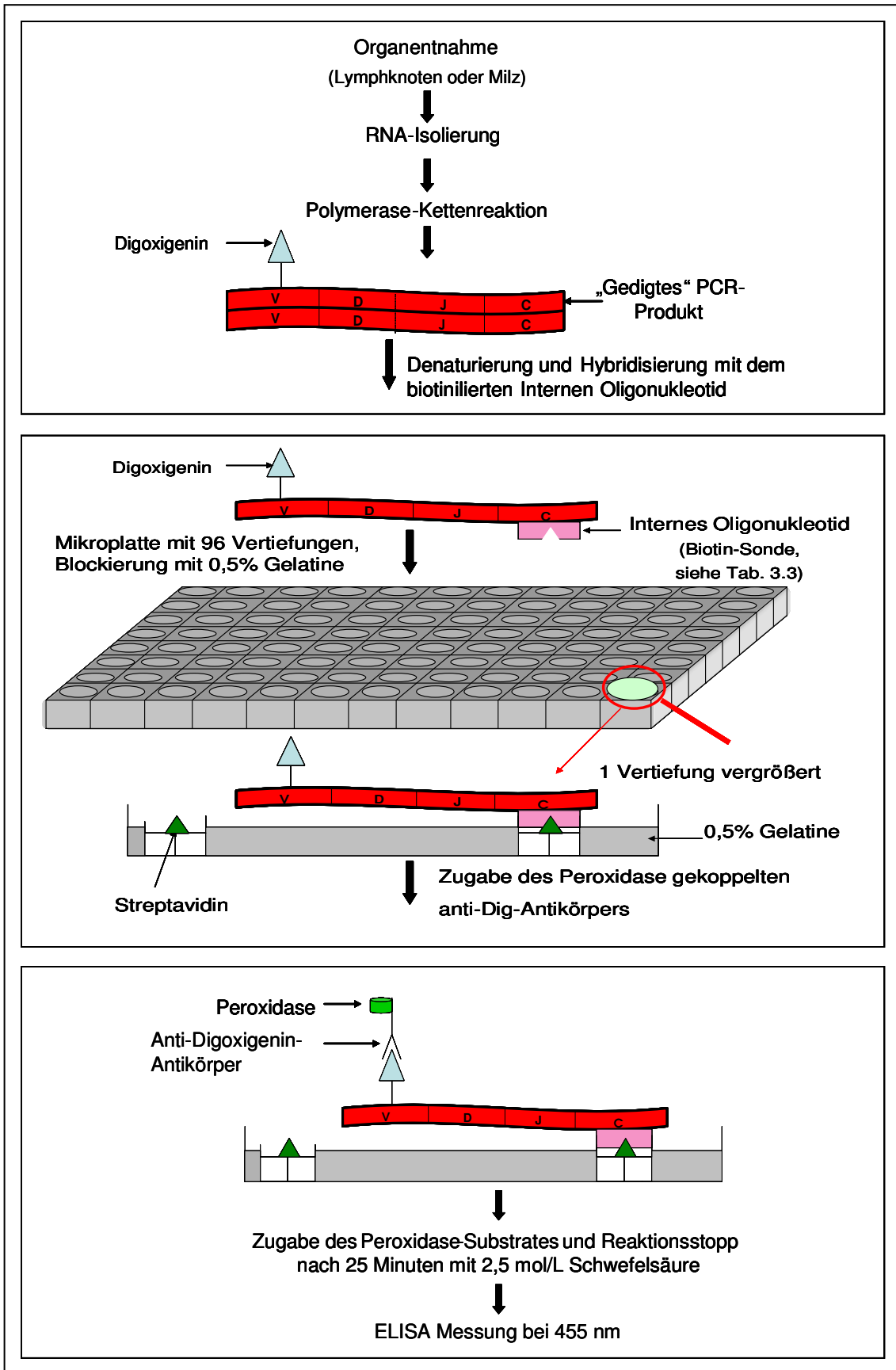


Abb. 3.3: Schematische Darstellung über das Zustandekommen der im PCR-ELISA gemessenen Proben. Pro Tier wurden 2 Proben zu je 1×10^6 Lymphozyten/Thymozyten unabhängig voneinander verarbeitet (RNA-Isolierung). Für jede Probe wurde anschließend eine Doppelbestimmung im PCR-ELISA durchgeführt. Jeder Mittelwert errechnete sich aus 4 - bzw. bei 2 Tieren - aus 8 Versuchsdaten. Diese stellen die Grundlage zur Berechnung der prozentualen Expressionsstärke der einzelnen TCR V β -Elemente dar.

b) Proliferationsassay:

Die aus den Proliferationsexperimenten ermittelten Werte (mindestens fünf Parallelwerte) in der Einheit "counts per minute" (cpm) wurden als Mittelwert und Standardabweichung ebenfalls mit dem Microsoft-Programm "Excel" berechnet. Bei Wiederholungen wurden alle Einzelwerte zur Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung herangezogen. Bei offensichtlichen Fehlmessungen (wenn der Einzelwert um mehr als 50 Prozent um den Mittelwert schwankte) wurde dieser verworfen. Bei 5 Einzelwerten wurde jedoch nicht mehr als 1 Wert gestrichen, ansonsten wurde das Experiment nicht ausgewertet. Die Kontrollen wurden mit Lymphknotenzellen aus P1-immunisierten Tieren angesetzt, um die Proliferation in Abwesenheit von Peptid P1 und syngenen DC zu bestimmen (= "pLNC-solo"). Die Ergebnisse hierzu lagen stets um 3.600 ± 250 cpm und sind in den Diagrammen nicht dargestellt.

Abb. 3.4 (Seite 22): Schematische Darstellung des PCR-ELISA. Die mit der Polymerase-Kettenreaktion, den 22 TCR V β Primern und dem Digoxigenin-gekoppelten TCR C β -Primer hergestellten Amplifikate werden nach ihrer Denaturierung mit dem internen Oligonukleotid (Biotin-Sonde) hybridisiert (Sequenzen in Tab. 3.3). Anschließend werden die Amplifikate in die Vertiefungen einer ELISA-Platte überführt und diese über den biotinierten Primer an Streptavidin gebunden. Nach Zugabe des Peroxidase-gekoppelten anti-Dig-Antikörpers und des Substrates wird die Farbreaktion gestartet. Nach Abstoppen der Reaktion wird der Farbumschlag von blau nach gelb im ELISA bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.



3.10 Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten

Das allogene Peptid P1 verfügt über eine starke aktivierende Wirkung auf T-Lymphozyten der Lewis-Ratte. P1 ist mit einem der acht Beta-Faltblätter identisch, die den Boden der Bindungstasche des extrazellulären Bereichs des MHC-Klasse-I-Moleküls bilden (Abb. 3.5). In diesem aus 19 Aminosäuren bestehenden Bereich sind 3 Aminosäuren charakteristisch für das MHC-Klasse-I-Molekül von Wistar-Furth-Ratten (sog. Allo-Determinanten). Aus diesem Grund beschleunigen P1-spezifische T-Lymphozyten die Abstoßung von Organtransplantaten aus Wistar-Furth-Ratten in Lewis-Ratten (Sitaru A. G. et al., 2002 u. 2004).

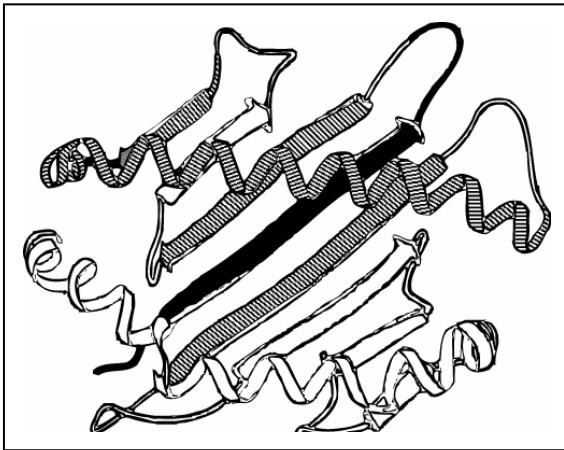


Abb. 3.5: Darstellung des extrazellulären Bereichs eines MHC-Klasse-I Moleküls mit der Peptidbindungstasche. P1 ist Bestandteil der ersten Faltblattstruktur der α 1-Domäne (schwarz dargestellt). Weitere Informationen zu den allogenen MHC-Klasse-I-Peptiden sind in der Promotionsschrift von Frau Dr. A. G. Sitaru: "Modulation der T-Zell-Reaktivität durch MHC-Klasse-I-Peptide und ihre Varianten" zu finden. P1 wurde durch die Firma Jerini AG (Berlin, Deutschland) nach publizierten Aminosäuresequenzen (Joly E et al., 1995; Chowdhury NC et al., 1998) synthetisiert. Die Reinheit lag bei 95 Prozent.

Lewis-Ratten wurden mit dem Peptid P1 immunisiert. Hierzu erhielten sie 25 μ L einer Suspension aus 12,5 μ L Peptid-Lösung (Stamm-Lösung: 1 mg/mL) und 12,5 μ L TiterMax (Alexis GmbH, Grünberg, Deutschland). Dieses Gemisch wurde ihnen subkutan in die Fußsohlen beider Hinterfüße in kurzer Isofluran-Narkose injiziert. Nach sieben Tagen wurden die poplitealen Lymphknoten entnommen und für weitere Untersuchungen aufgearbeitet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung antigenspezifischer T-Lymphozyten

Zur Induktion antigenspezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten wurden Lewis-Ratten mit einem Gemisch zu gleichen Volumenanteilen aus Peptid P1 und dem Adjuvans TiterMax subkutan immunisiert. Nach sieben Tagen wurden die poplitealen Lymphknoten mit einem Durchmesser von ca. 6-8 mm (n=9) entnommen. Im Gegensatz dazu wiesen die poplitealen Lymphknoten nicht-immunisierter Tiere einen Durchmesser von ca. 1-2 mm auf (n=3). Die Größenzunahme der poplitealen Lymphknoten P1-immunisierter Tiere spiegelte sich auch in einem deutlichen Anstieg der Lymphknotenzellen wieder. Die Gesamtzellzahl aus zwei poplitealen Lymphknoten eines nicht-immunisierten Tieres betrug $0,26 \times 10^7 \pm 0,12 \times 10^7$ (n=3), während sieben Tage nach P1-Immunsierung die Zellzahl auf $7,3 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$ Zellen anstieg (n=9). Die durch die Immunisierung gebildeten antigenspezifischen T-Lymphozyten ließen sich *in vitro* mit P1-beladenen reifen dendritischen Zellen restimulieren (Abb. 4.1).

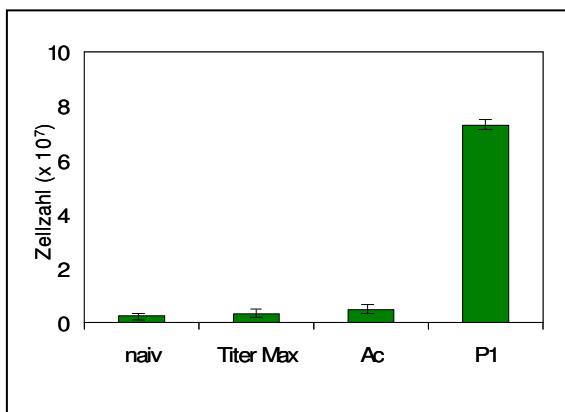


Abb. 4.1: Peptid P1 löst nach subkutaner Applikation eine Immunantwort in den poplitealen Lymphknoten aus. Vergleich der aus zwei poplitealen Lymphknoten (Abb. 3.1) isolierten Zellen nach Applikation von P1, dem nicht-immunogenen Kontrollpeptid Ac und TiterMax. Zur Kontrolle wurden die Zellzahlen poplitealer Lymphknoten nicht-immunisierter Lewis-Tiere ermittelt. Siehe hierzu auch Tab. 4.1. Zu den Bedingungen des Proliferationsassays siehe Abschnitt 3.6.

Nach Immunisierung mit dem nicht-immunogenen Kontrollpeptid Ac (Sitaru AG et al., 2004) waren keine wesentlichen Veränderungen zu beobachten. Die Lymphknoten wiesen eine Größe von ca. 2-3 mm auf (n=3), und der Anteil an Lymphozyten betrug $5,2 \times 10^6 \pm 0,75 \times 10^6$ (n=2) (Tab. 4.1). Da die Peptide vor ihrer Injektion mit dem Adjuvans TiterMax gemischt wurden, wurde auch diese Substanz hinsichtlich einer möglichen Immunaktivierung überprüft. Dabei stieg

die Zellzahl sieben Tage nach Immunisierung auf maximal $3,3 \times 10^6$ Zellen an (Tab. 4.1). Popliteale Lymphknoten, die bereits drei Tage nach Immunisierung entnommen wurden, zeigten zu diesem Zeitpunkt noch keine wesentlichen Veränderungen in der Größe und Zellzahl.

Tab. 4.1: Darstellung der Lymphknotengröße und der Gesamtzellzahl aus jeweils zwei poplitealen Lymphknoten drei bzw. sieben Tage nach Immunisierung mit P1, Ac und TiterMax. Als Kontrollen wurden nicht-immunisierte Tiere verwendet. Durch die Immunisierung mit dem immunogenen Peptid P1 erhöhte sich die Zellzahl am Tag 7 signifikant. n = Anzahl der getesteten Lewis-Ratten.

	Tag 3	Tag 7
Größe der Lymphknoten		
ohne Immunisierung	1-2 mm (n=3)	1-2 mm (n=3)
nach Immunisierung mit P1	2-3 mm (n=3)	6-8 mm (n=9)
nach Immunisierung mit Ac	2-3 mm (n=3)	2-3 mm (n=3)
nach Immunisierung mit TiterMax	2-3 mm (n=2)	2-3 mm (n=2)
Zellzahlen		
ohne Immunisierung	$2,2 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$ (n=3)	$2,6 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ (n=3)
nach Immunisierung mit P1	$2,4 \times 10^7 \pm 1,3 \times 10^6$ (n=3)	$7,3 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$ (n=9)
nach Immunisierung mit Ac	$4,2 \times 10^6 \pm 0,35 \times 10^6$ (n=3)	$5,2 \times 10^6 \pm 0,8 \times 10^6$ (n=3)
nach Immunisierung mit TiterMax	$2,9 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ (n=2)	$3,3 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$ (n=2)

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der Lymphknotenpopulation vor und nach Immunisierung mit P1 zeigten, dass der Anteil an CD8⁺ T-Lymphozyten nahezu unverändert blieb, während der Anteil an CD4⁺ T-Lymphozyten und B-Lymphozyten anstieg.

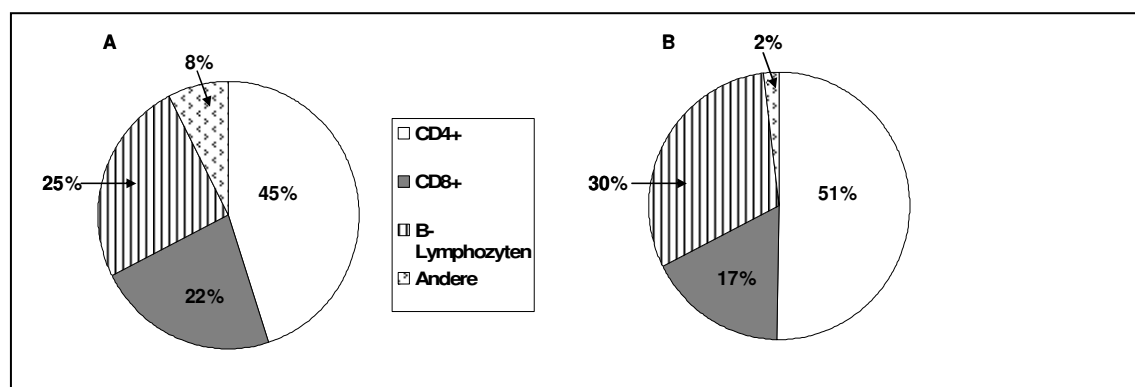


Abb. 4.2 (Seite 25): Verteilung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten, sowie der B-Lymphozyten in den poplitealen Lymphknoten vor (A) und nach (B) Immunisierung mit P1 (n=3). Die Immunisierung mit P1 führte zu leichten prozentualen Änderungen in der Lymphknotenpopulation.

Zusätzlich wurden die Auswirkungen der Immunisierung mit dem Peptid P1 auf die T-Lymphozyten durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 4.3 A-G und Abb. 4.3 H-N).

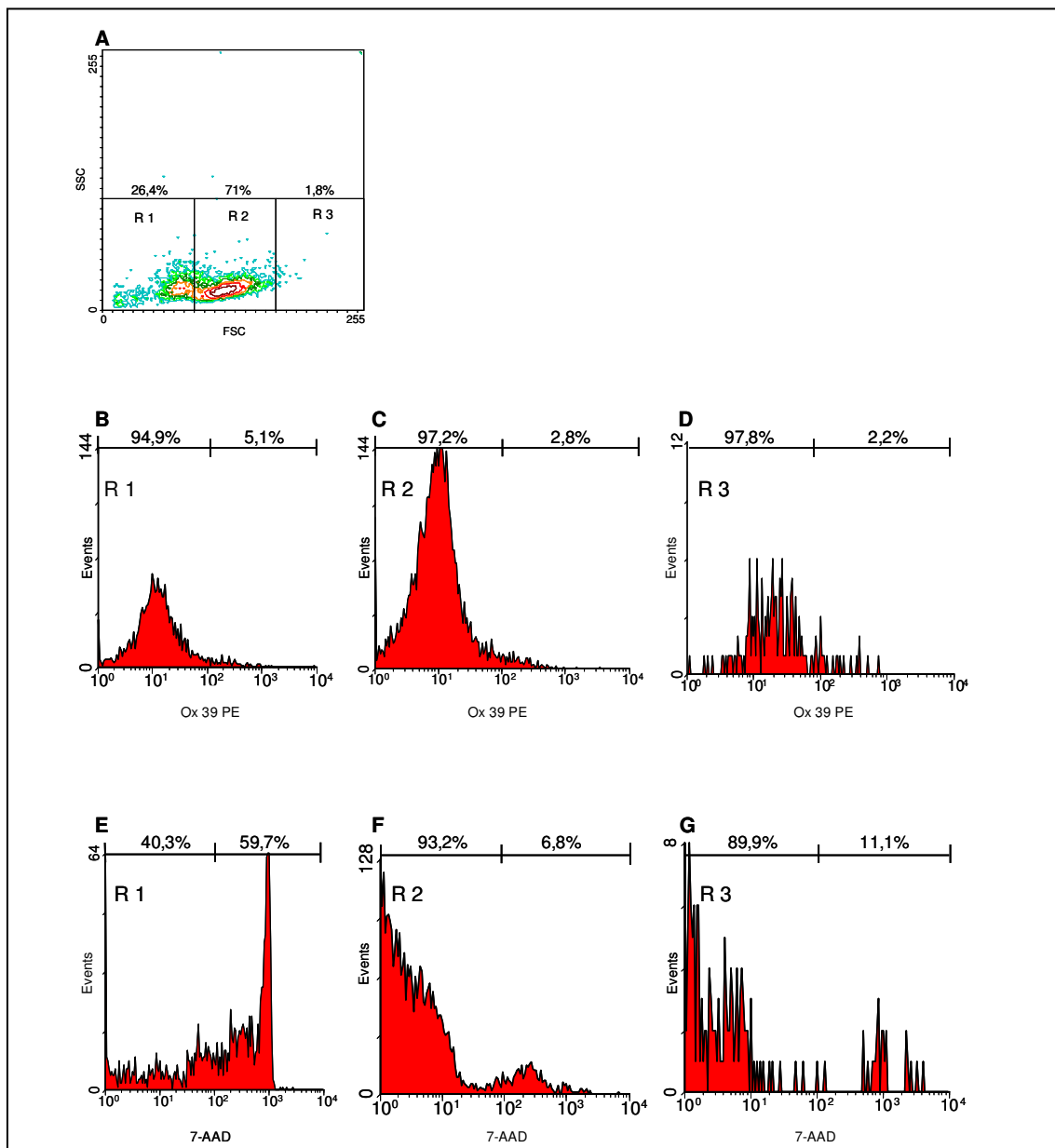


Abb. 4.3 A-G: Nachweis IL-2-Rezeptor-positiver T-Lymphozyten in nicht-immunisierten Lewis-Tieren. Darstellung der Lymphknotenzellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) sowie ihre Aufteilung in die drei Subpopulationen R1-R3 (A). Mit 71 Prozent stellen die in R2 befindlichen Zellen den größten Anteil. Bei den in R1 liegenden Zellen handelt es sich um 7-

AAD-positive (und somit tote) Zellen (E). Auch die in R2 und R3 sich befindlichen Zellen enthalten geringe Anteile toter Zellen (F, G). Sowohl in R2 als auch R3 befinden sich Ox39-positive (und somit aktivierte) T-Lymphozyten, die den IL-2 Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (C und D). Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um natürlich vorkommende regulatorische T-Lymphozyten (Kuckein O, 2006).

Der geringe Anteil aktivierter T-Lymphozyten nicht-immunisierter Tiere (Abb. 4.3 C-D) steigt nach Immunisierung mit P1 deutlich an (Abb. 4.3 J-K). Während es sich bei den aktivierten T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten mit großer Wahrscheinlichkeit um natürlich vorkommende regulatorische T-Lymphozyten handelt (Kuckein O, 2006), weisen aktivierte T-Lymphozyten P1-immunisierter Tiere – wie in Abbildung 4.6 gezeigt – eine Spezifität für das Peptid P1 auf.

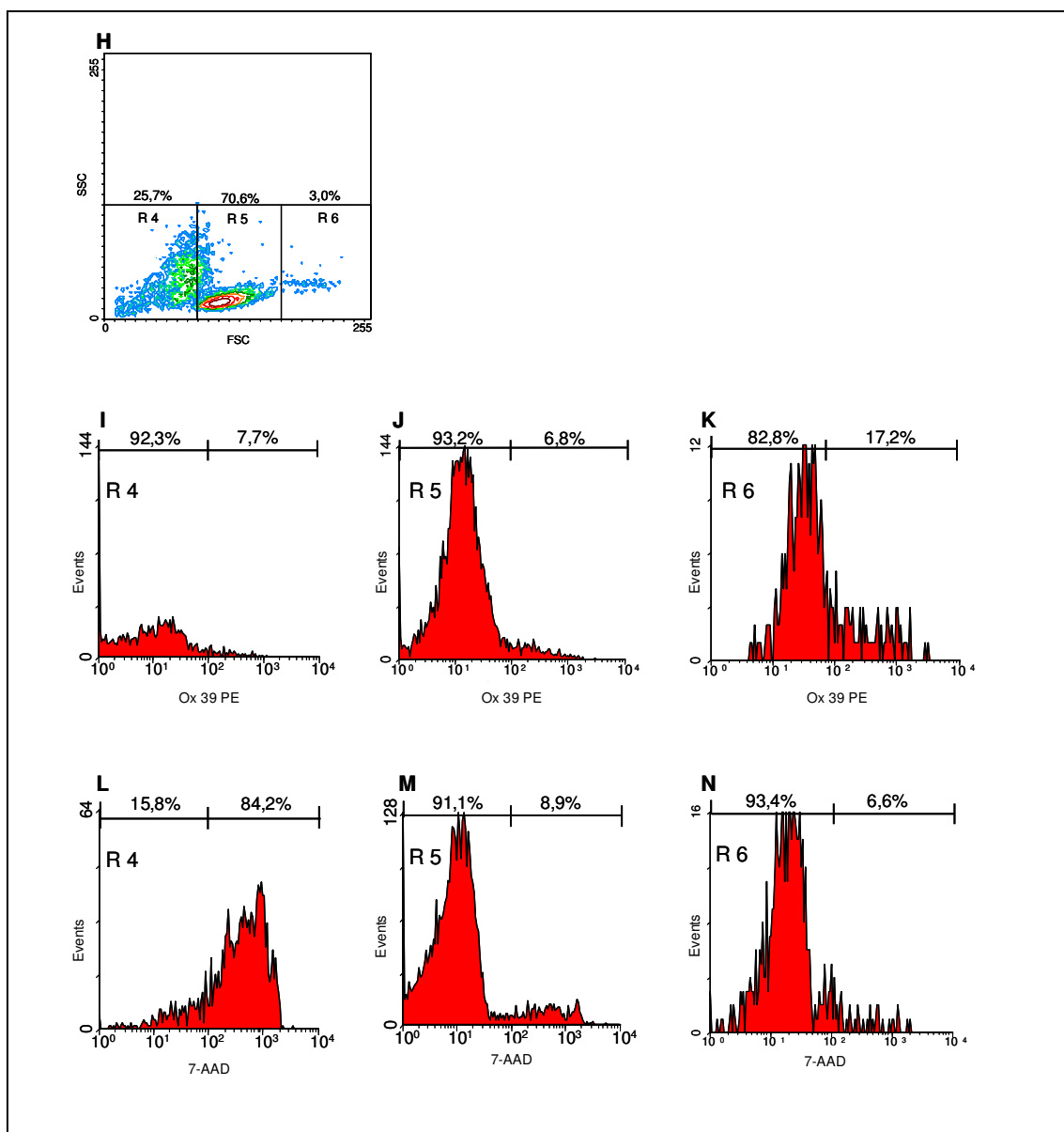


Abb. 4.3 H-N (Seite 27): Nachweis IL-2-Rezeptor-positiver T-Lymphozyten in Lewis-Tieren nach subkutaner Immunisierung mit dem immunogenen Peptid P1. Darstellung der Lymphknotenzellen nach Größe (FSC) und Granularität (SSC), sowie ihre Aufteilung in die drei Subpopulationen R4-R6 (A). Auffallend ist der deutliche Anstieg größerer Zellen in R6 von 1,8 Prozent (Abb. 4.3 A) auf 3 Prozent (Abb. 4.3 H) nach Immunisierung. Auch erhöhte sich in R6 der Anteil IL-2-Rezeptor-positiver Zellen von 2,2 Prozent vor Immunisierung auf 17,2 Prozent nach Immunisierung (4.2 K). Hierbei handelt es sich vermutlich um aktivierte antigenspezifische T-Lymphozyten. Ebenso erhöhte sich in R5 der Anteil IL-2-Rezeptor-positiver Zellen von 2,8 Prozent (Abb. 4.3 C) vor Immunisierung auf 6,8 Prozent nach Immunisierung (4.2 J).

In weiteren Versuchen wurden die isolierten P1-spezifischen T-Lymphozyten *in vitro* ein weiteres Mal mit dem Peptidantigen P1 in Kontakt gebracht. Nach 72 Stunden wurde in den Kulturen eine starke Proliferation beobachtet (Abb. 4.4).

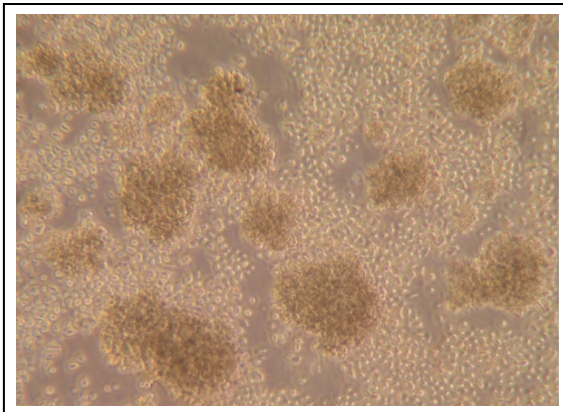


Abb. 4.4: Antigen-spezifische T-Lymphozyten lassen *in vitro* antigen-spezifisch restimulieren und bilden dabei Zellaggregate. Lymphozyten, isoliert aus den poplitealen Lymphknoten P1-immunisierter Lewis-Ratten, wurden sieben Tage nach Immunisierung für 72 Stunden *in vitro* mit P1-beladenen dendritischen Zellen restimuliert. Die sich teilenden T-Lymphozyten bilden sichtbare Zellaggregate. Lichtmikroskopische Aufnahme (200x Vergrößerung).

Als Positivkontrolle wurden naive popliteale Lymphozyten mit PMA und Ionomycin *in vitro* antigenunabhängig aktiviert. Nach dreitägiger Inkubation wurde ein hoher Anteil aktivierter T-Lymphozyten durchflusszytometrisch nachgewiesen (Abb. 4.5). So stieg der Anteil an T-Zellblasten auf über 40 Prozent an. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 4.6, dass auch der Anteil antigen-spezifischer T-Zellblasten nach Restimulierung mit P1-beladenen dendritischen Zellen auf über 12 Prozent in R6 anstieg (Abb. 4.6 D). In nicht-immunisierten Tieren betrug der Anteil dieser Zellen in R3 lediglich 1,6 Prozent (Abb. 4.6 A).

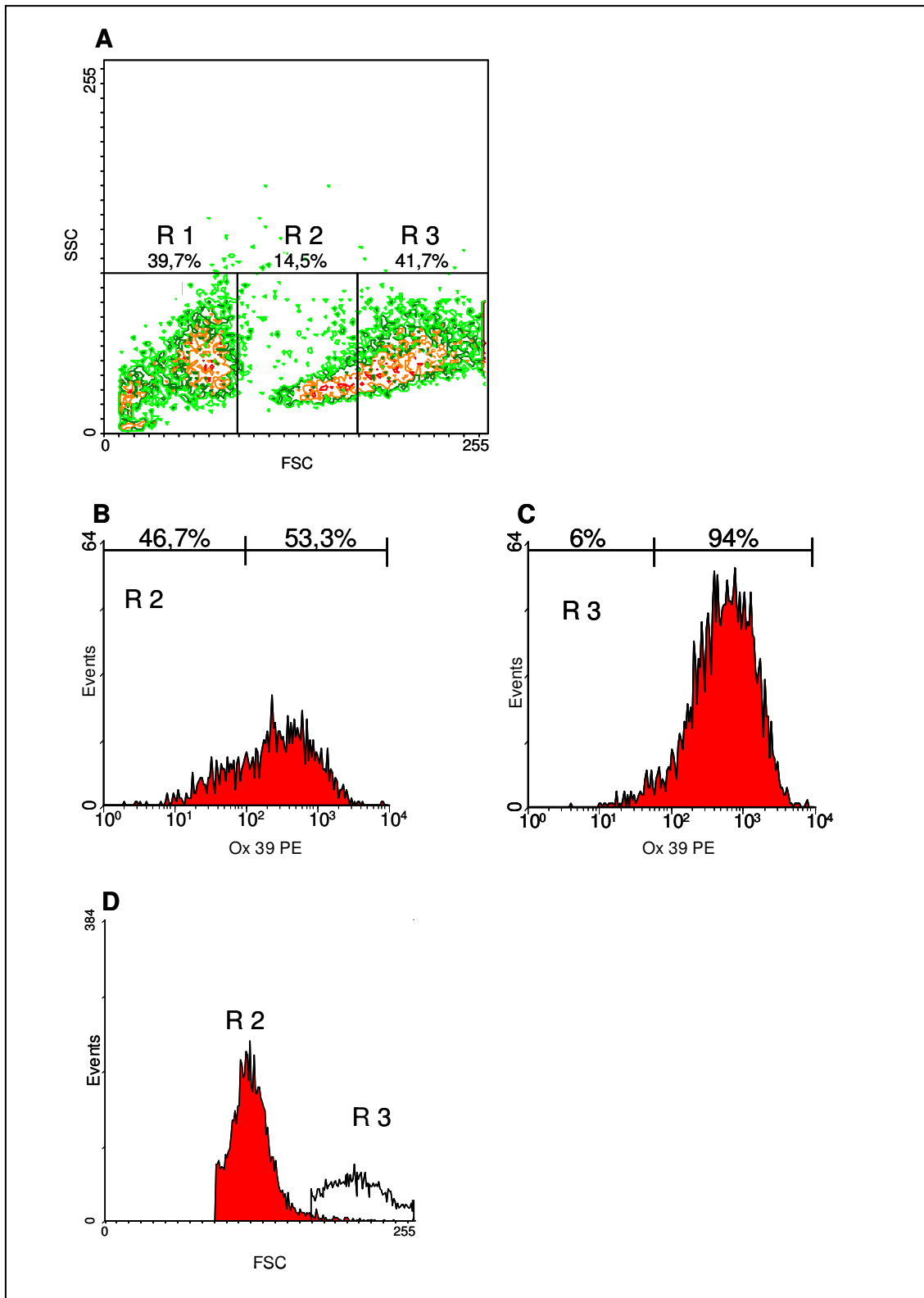


Abb. 4.5: Nachweis IL-2-Rezeptor-positiver T-Lymphozyten nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin. Darstellung der Lymphknotenpopulation nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) sowie ihre Aufteilung in die drei Subpopulationen R1-R3 (A). Nach dreitägiger Stimulierung *in vitro* sind über 50% der R2-Population und nahezu sämtliche Zellen der R3-Population aktiviert (B, C). Die in R3 befindlichen Zellen sind zudem deutlich größer (D).

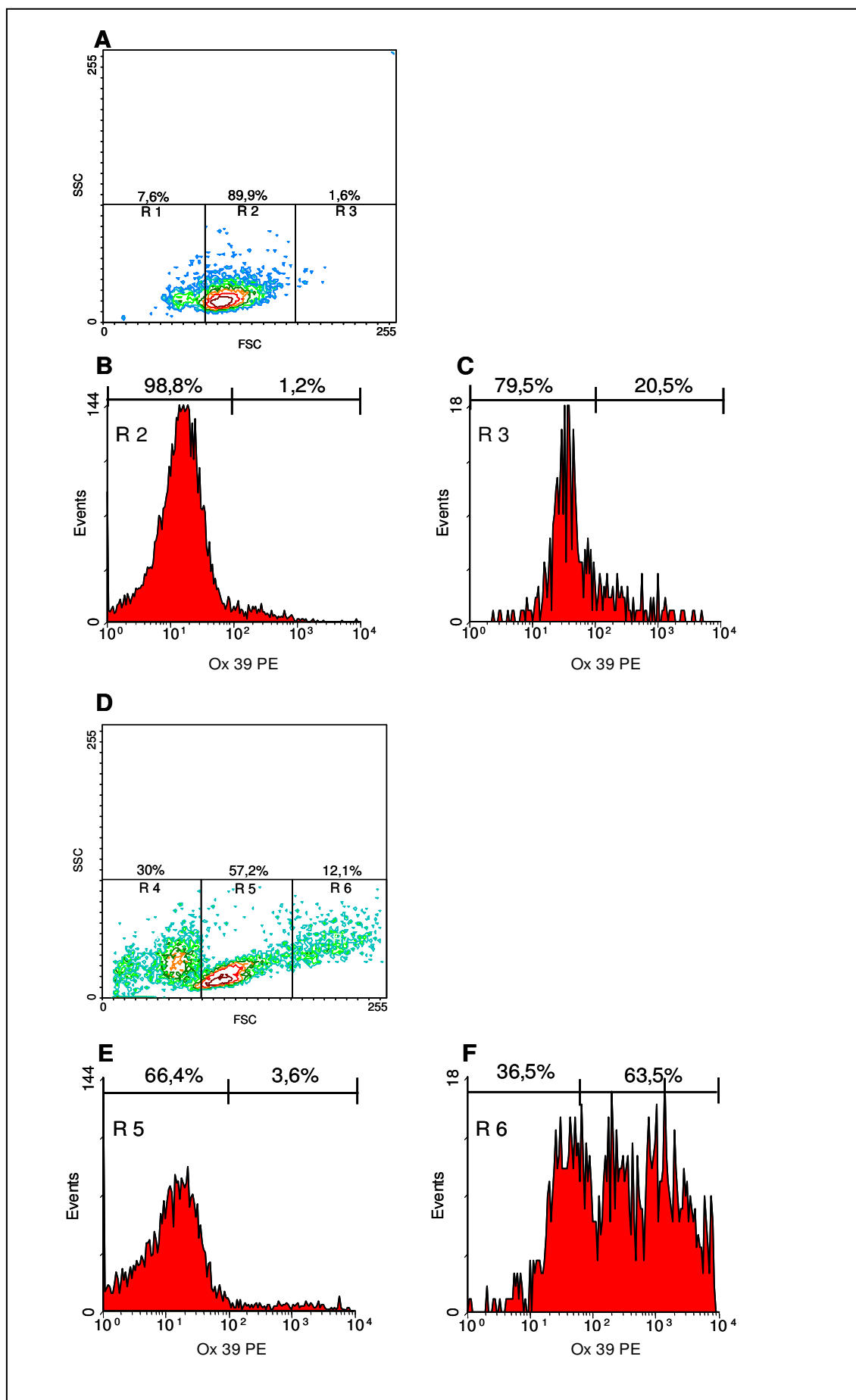
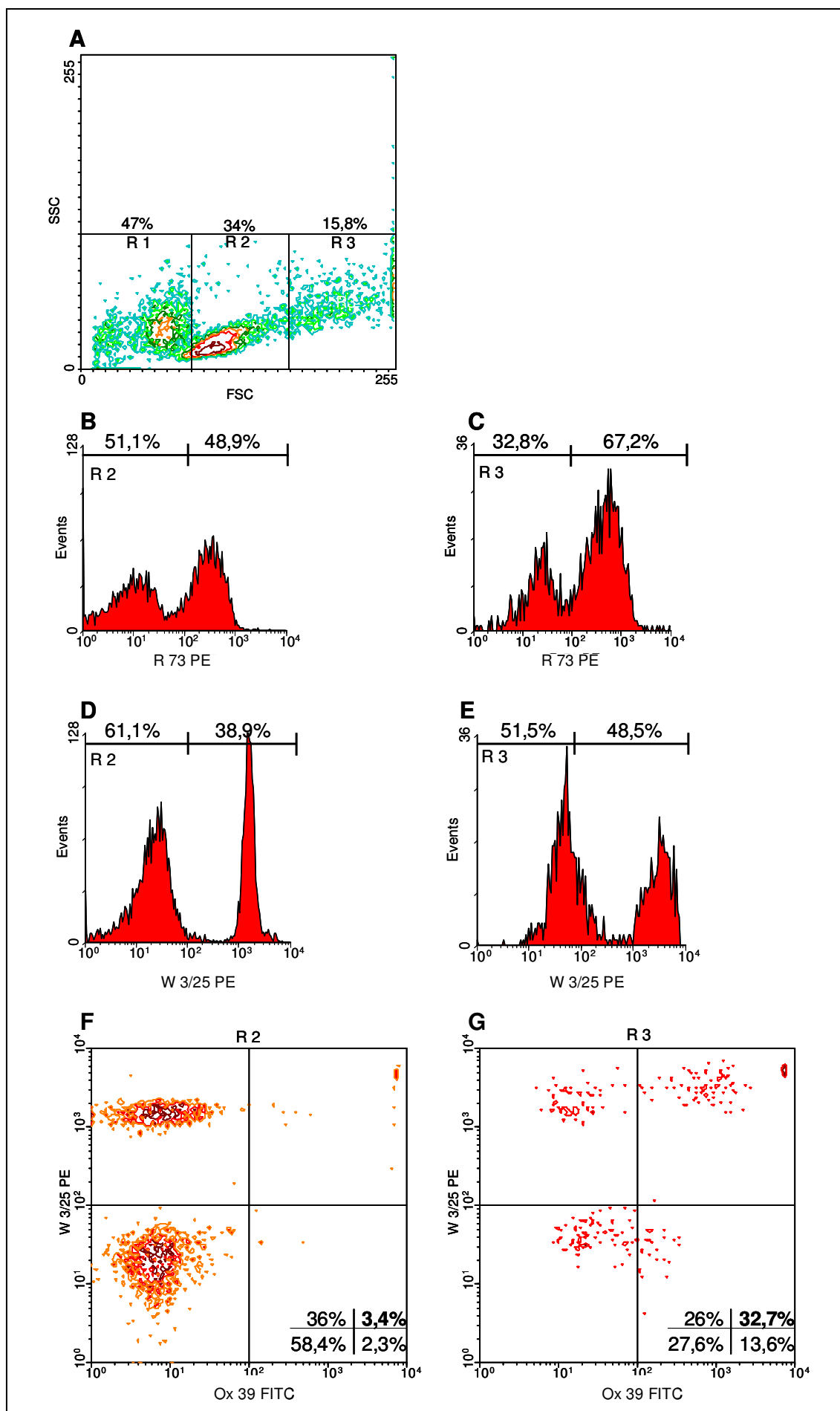


Abb. 4.6 (Seite 30): Der Anteil P1-spezifischer T-Lymphozyten wird durch eine dreitägige Restimulierung mit P1 *in vitro* erhöht. Durchflusszytometrische Darstellung der Größenverteilung (FSC) und Granularität (SSC) von Lymphknotenzellen nach siebentägiger Immunisierung mit P1 unmittelbar nach Zellisolierung (A-C) und nach dreitägiger Restimulierung mit P1 (D-F) *in vitro*. Der Anteil der aus immunisierten Tieren isolierten P1-spezifischen T-Lymphozyten nimmt nach dreitägiger Restimulierung mit P1 von 1,6 Prozent (A, R3) auf 12,1 Prozent (D, R6) zu. Dabei sind über 63 Prozent der in R6 befindlichen Zellen aktiviert (F). Von den mittelgroßen Lymphozyten (A, R2) exprimieren nach Immunisierung 1,2 Prozent der Zellen den IL-2 Rezeptor auf ihrer Oberfläche, nach Restimulation mit P1 bis zu 3,6 Prozent (E).

Somit lassen sich nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 antigenspezifische T-Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten isolieren, die zudem *in vitro* mit P1 restimulierbar waren. In Abbildung 4.7 (Seite 32) ist gezeigt, dass es sich bei den aktivierten IL-2-Rezeptor-positiven Zellen hauptsächlich, wie auch erwartet, um antigenspezifische CD4⁺ T Lymphozyten handelt (Abb. 4.7 F, G).

Abb. 4.7 (Seite 32): Der Anteil P1-spezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten wird durch eine dreitägige Restimulierung mit P1 *in vitro* erhöht. Abbildung A zeigt die Größenverteilung von Lymphozyten P1-immunisierte Lewis-Ratten nach dreitägiger Restimulierung *in vitro* mit P1 (Lymphozyten nach Immunisierung mit P1 siehe Abb. 4.3) sowie die Aufteilung in die drei Subpopulationen R1-R3 (A). Der Anteil an T-Lymphozyten und CD4⁺ T-Lymphozyten für R2 und R3 ist in B bis E analysiert. Der Anteil aktivierter CD4⁺ T-Lymphozyten in R2 und R3 ist in den Teilabbildungen F und G gezeigt. Bei den in R3 befindlichen Zellen handelt es sich im Wesentlichen um aktivierte CD4⁺ T-Lymphozyten (32 Prozent), auch wenn ein vergleichbarer Anteil der W3/25-positiven CD4⁺ T-Lymphozyten nicht aktiviert ist (G).



4.2 Nachweis der Proliferation antigenspezifischer T-Lymphozyten

4.2.1 Radioaktiver Nachweis der T-Zellproliferation

Der T-Zell-Proliferationsassay ist ein *in vitro* Test, bei dem die inkorporierte Radioaktivität sich teilender Zellen ermittelt wird, um hierüber ihre Proliferation zu bestimmen. Das Prinzip beruht darauf, dass aktivierte T-Lymphozyten sich teilen und radioaktiv markiertes Thymidin in ihre DNA einbauen. Die anschließende Messung der Radioaktivität erlaubt Aussagen über die Stärke der Proliferation. Mit dieser Methode wurde überprüft, in welchen Lymphknotenstationen antigenspezifische T-Lymphozyten sieben Tage nach Immunisierung mit P1 nachzuweisen waren (Abb. 4.8). Hierzu wurden Lymphozyten verschiedener Lymphknoten (popliteale, iliakale, mesenteriale und cervikale) isoliert und *in vitro* mit P1-beladenen dendritischen Zellen im Proliferationsassay stimuliert. Da sich mit diesem Assay unter den gegebenen Bedingungen ausschließlich antigenspezifische T-Lymphozyten aktivieren lassen, können so die einzelnen Lymphknotenstationen auf die Präsenz P1-spezifischer T-Lymphozyten überprüft werden. Die stärkste Proliferation wurde erwartungsgemäß in den poplitealen Lymphknoten gemessen, da die subkutane Injektionsstelle von diesen Lymphknoten drainiert wird. Je weiter die Lymphknotenstationen vom Injektionsort entfernt lagen, desto geringer wurde der Anteil antigenspezifischer T-Lymphozyten, was sich in der abnehmenden Proliferation bemerkbar machte.

Tab. 4.2: Proliferation P1-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro* (Abb. 4.8). Die Messwerte in cpm (counts per minute) sind als Mittelwert und Standardabweichung einer repräsentativen Messung von insgesamt 3 unabhängigen Versuchen dargestellt.

	Lymphknotenstationen			
	popliteale	iliakale	mesenteriale	cervicale
Thymidin-Inkorporation	27.971 ± 4.350	12.582 ± 2.340	9.537 ± 714	6.730 ± 1.406

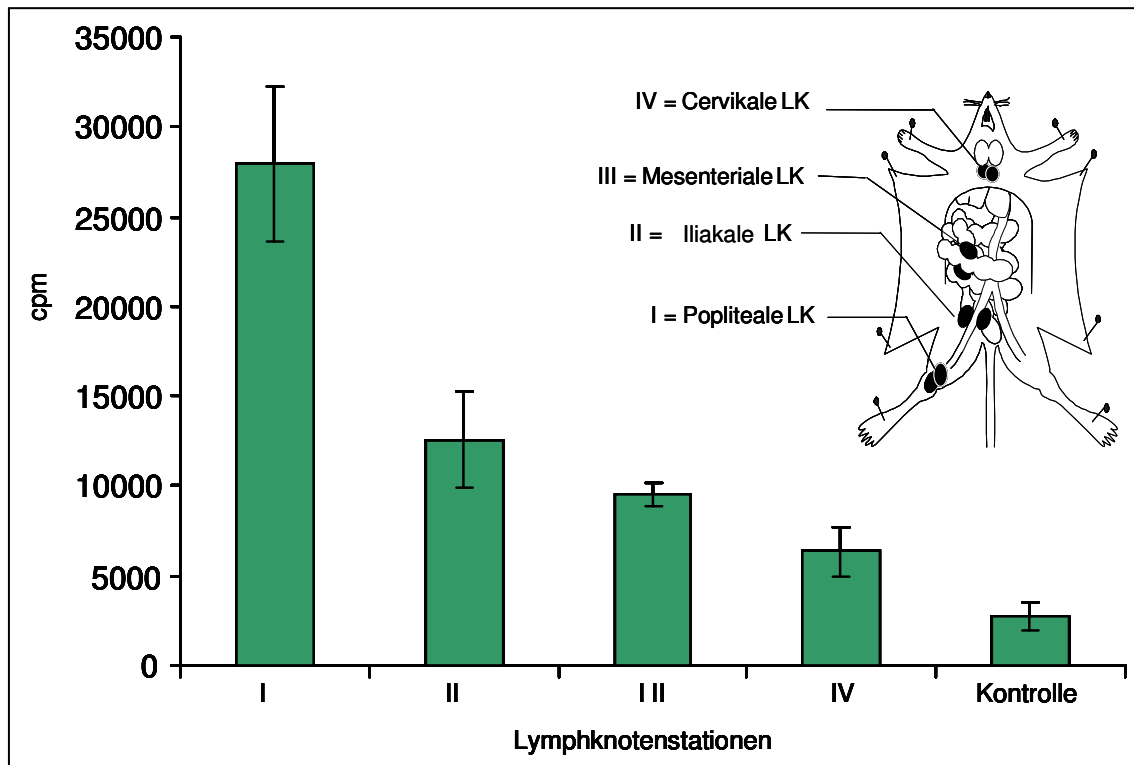


Abb. 4.8: Proliferation P1-spezifischer T-Lymphozyten *in vitro*. Lewis-Ratten wurden mit dem Peptid P1 immunisiert und nach sieben Tagen die poplitealen (I), iliakalen (II), mesenterialen (III), sowie cervikalen (IV) Lymphknoten entnommen und die Lymphknotenzellen mit P1-beladenen dendritischen Zellen für drei Tage inkubiert. Die Stärke dieser *in vitro* Restimulation lässt Rückschlüsse auf die Präsenz P1-spezifischer T-Lymphozyten in den einzelnen Lymphknotenstationen zu. Als Kontrolle dienten naive Lymphozyten. Je weiter sich die Lymphknotenstationen vom Injektionsort befanden, desto geringer war der Anteil antigenspezifischer T-Lymphozyten und desto geringer die gemessene Radioaktivität.

4.2.2 Durchflusszytometrischer Nachweis der T-Zellproliferation

Auch mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDASE ist die Proliferation zu messen; zudem lässt sich die Anzahl der Zellteilungen durchflusszytometrisch bestimmen. Dies ist mit der radioaktiven Methode nicht möglich und stellt somit einen grundlegenden Vorteil von CFDASE dar.

In ersten Versuchen wurde die optimale Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes bestimmt. Hierzu wurden Konzentrationen von 1, 5, 10, 50 und 100 nmol/L getestet. Die Versuchsergebnisse ergaben, dass für diese Versuche die optimale CFDASE-Konzentration bei 50 nmol/L lag. Hier lag die Ausgangsfluoreszenz am weitesten rechts auf der logarithmischen Skala (zwischen 10^3 und 10^4) (Abb. 4.9).

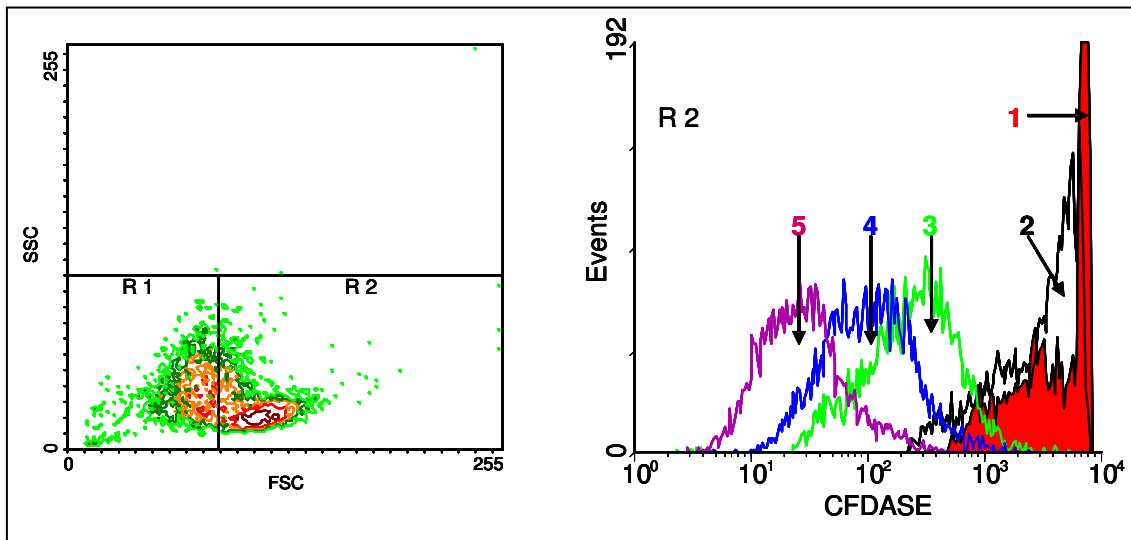


Abb. 4.9: Bestimmung der Fluoreszenzintensität mit unterschiedlichen CFDASE-Konzentrationen. Im linken FSC/SSC-Diagramm ist die Lymphozytenpopulation gezeigt. Dabei wurden die Zellen in R2 analysiert. Die gewählten Konzentrationen betragen 100 nmol/L (1); 50 nmol/L (2); 10 nmol/L (3); 5 nmol/L (4); 1 nmol/L (5). Je geringer die Konzentration an eingesetztem Farbstoff war, desto geringer war auch die zu messende Fluoreszenz auf der logarithmischen Skala. Für die Experimente wurde eine Konzentration von 50 nmol/L CFDASE gewählt.

Die Stabilität der CFDASE-Färbung wurde überprüft, da bis zu 60 Prozent der Zellen ihren Farbstoff unmittelbar nach der Färbung wieder abgeben (*Current Protocols in Cytometry*; 1998; 9.11.1-9.11.9). Dieses Phänomen wurde auch in dieser Arbeit beobachtet (Abb. 4.10).

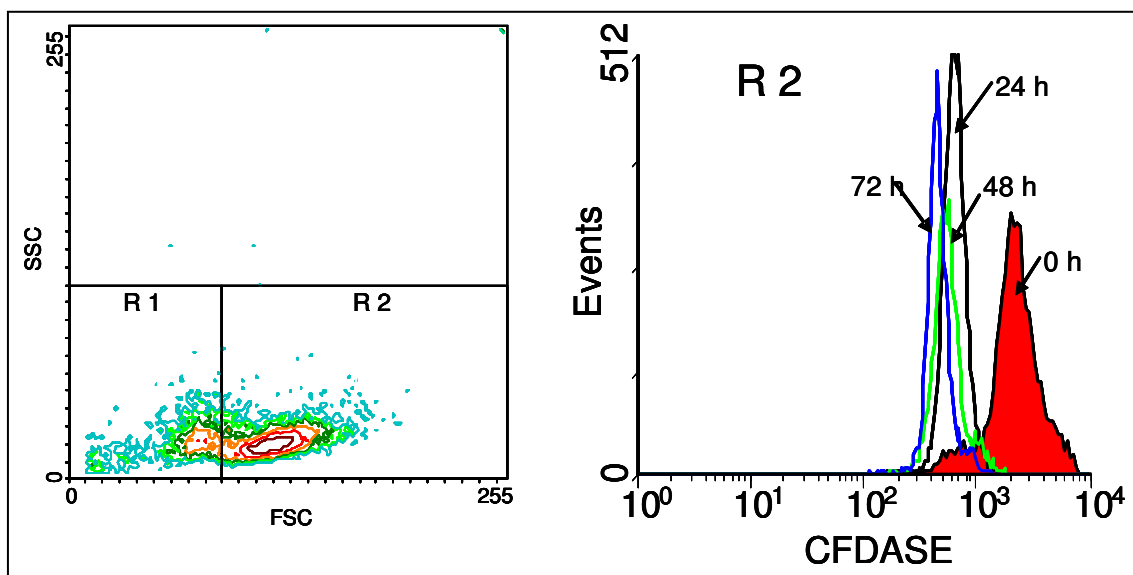


Abb. 4.10: Stabilität der CFDASE-Färbung. Nach Färbung mit CFDASE schwächte sich die Fluoreszenz innerhalb der ersten 24 Stunden um ca. das 5-fache ab und blieb anschließend nahezu stabil.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, ob mit CFDASE die Anzahl der Zellteilungen von T-Lymphozyten, die mit PMA und Ionomycin stimuliert wurden, bestimmt werden kann (Abb. 4.11). Die täglich am Durchflusszytometer gemessene Fluoreszenz blieb in den ersten 48 Stunden der Stimulation nahezu konstant, und nach 72 Stunden waren sicher 2 Zellteilungen möglicherweise sogar 3 nachweisbar (Abb. 4.11 F).

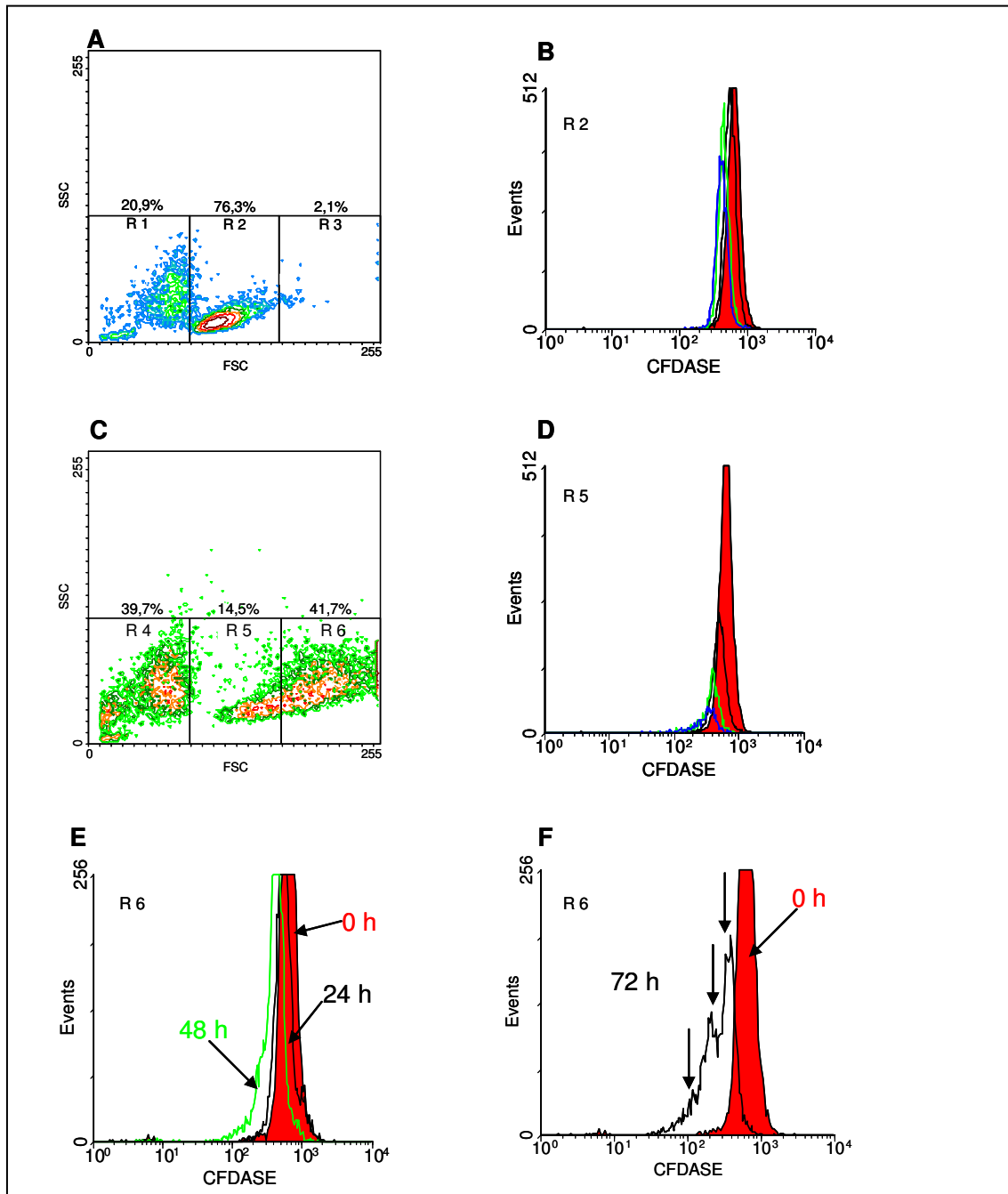


Abb. 4.11: Nachweis der Zellteilung von CFDASE-gefärbten und mit PMA und Ionomycin stimulierten T-Lymphozyten. Durchflusszytometrische Darstellung der Zellgrößenverteilung

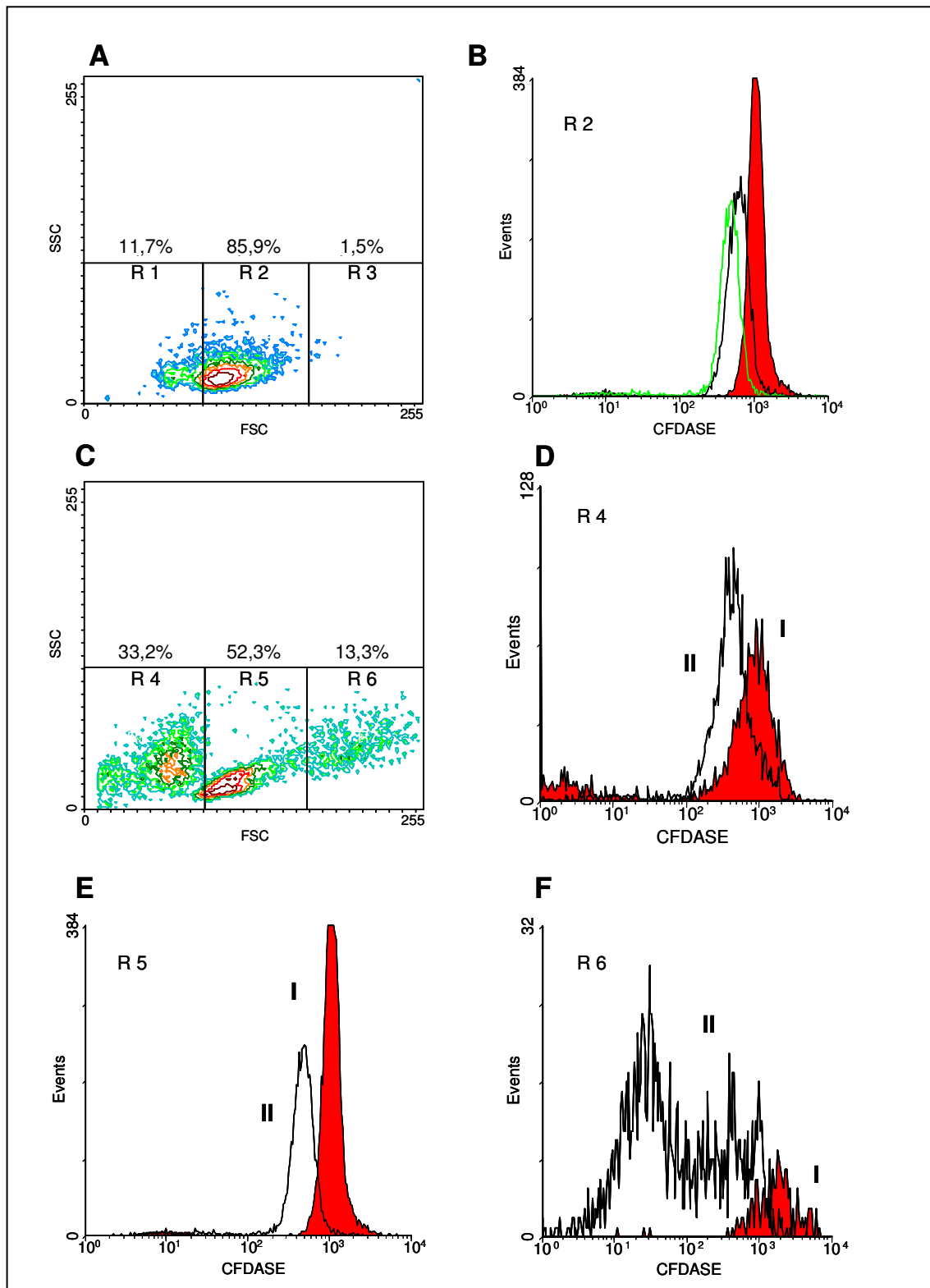
direkt nach Organentnahme (A), sowie 72 Stunden nach Stimulation mit PMA und Ionomycin *in vitro* (C). PMA und Ionomycin lösen eine antigenunabhängige T-Zellstimulierung aus. Die Fluoreszenz nicht-stimulierter Zellen in R2 und R5 bleibt nach CFDASE-Färbung über einen Zeitraum von 72 Stunden konstant (B, D). Die aktivierten T-Lymphozyten in R6 hingegen zeigen eine deutliche Abnahme der Fluoreszenz nach 72 Stunden (E, F).

Anschließend wurde untersucht, ob sich die Anzahl der Zellteilungen auch bei antigenspezifischen T-Lymphozyten bestimmen lässt, die mit dem Peptid P1 *in vitro* restimuliert wurden (Abb. 4.12). Die Auswertung der in R6 befindlichen T-Zellblasten belegt, dass diese Zellen innerhalb von 72 Stunden eindeutig eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zeigen (Abb. 4.12 F). Die genaue Anzahl der Zellteilungen ließ sich jedoch nicht eindeutig bestimmen. Zudem scheinen sich aktivierte T-Lymphozyten über IL-2 auch ohne Antigenstimulus zu stimulieren, worauf die in Abbildung 4.12 B gezeigte Abnahme der Fluoreszenz zurückzuführen sein könnte. Auch wäre möglich, dass es sich hierbei –wie in Abb. 4.10 gezeigt – um Messschwankungen handelt.

Interessant war zudem zu untersuchen, wie sensitiv die CFDASE-Färbung ist, d.h. wie viele CFDASE-gefärbte Zelle innerhalb einer bestimmten Anzahl ungefärbter Zellen sich eindeutig durchflusszytometrisch nachweisen lassen, wenn 10.000 Ereignisse gezählt werden. Hierzu wurden zu 5×10^5 ungefärbten Zellen jeweils 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 CFDASE-gefärbte Zellen hinzugefügt und diese Zellmischungen durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 4.13). Dabei zeigte sich, dass 1×10^5 CFDASE-gefärbte Zellen in 5×10^5 ungefärbten Zellen eindeutig detektierbar sind; dies entspricht einem Verhältnis von einer CFDASE-gefärbten Zelle auf 50 ungefärbte Zellen.

Abb. 4.12 (Seite 38): Nachweis von Zellteilungen CFDASE-gefärbter P1-spezifischer T-Lymphozyten nach Restimulierung *in vitro*. Durchflusszytometrische Darstellung poplitealer CFDASE-gefärbter Lymphozyten direkt nach Isolierung aus P1-immunisierten Tieren (A) und nach dreitägiger *in vitro* Restimulierung mit P1 (C). Zellteilungen der sich in R5 befindlichen P1-spezifischen T-Lymphozyten ist nach 72 Stunden eindeutig festzustellen (E). Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität ist jedoch unbestreitbar. Auch die in R6 befindlichen Zellen, für die in Abb. 4.7 G gezeigt wurde, dass es sich hierbei um aktivierte $CD4^+$ T-Lymphozyten handelt, ist eine

Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten. Die Bezeichnung „I“ steht für die Fluoreszenz-Intensität zu Beginn der *in vitro* Stimulierung und „II“ für die Fluoreszenz-Intensität nach 72-stündiger *in vitro* Restimulierung mit P1.



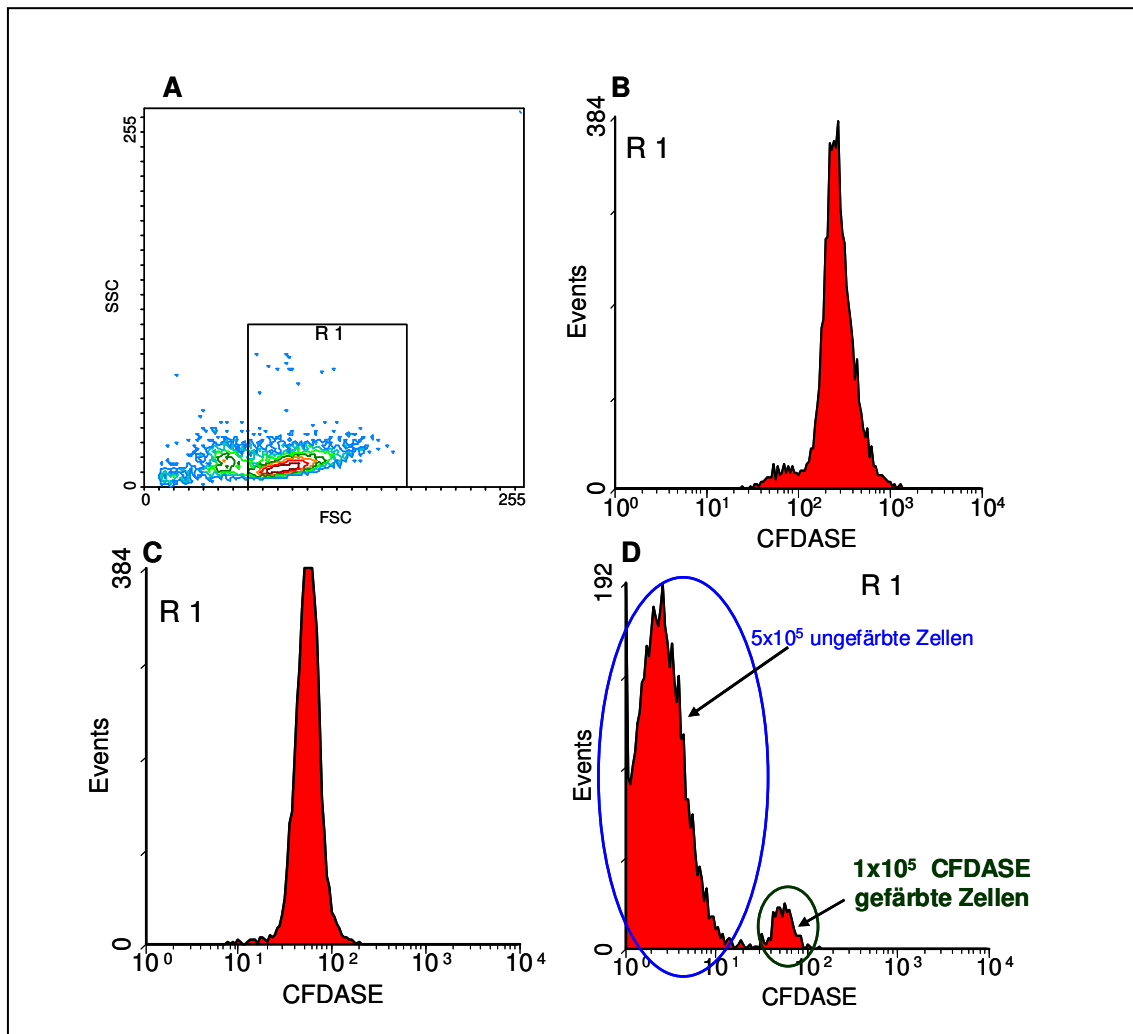


Abb. 4.13: Überprüfung der Sensitivität für CFDASE-gefärbte Zellen in der Durchflusszytometrie. Hierzu werden zu 5×10^5 ungefärbten Zellen jeweils 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 und 1×10^5 CFDASE-gefärbte Zellen hinzugefügt und diese Zellgemische durchflusszytometrisch analysiert. Bei 10.000 gezählten Ereignissen ist eine CFDASE-gefärbte Zelle in ungefähr 50 ungefärbten Zellen nachzuweisen.

4.3 Bestimmung des TCR V β -Repertoires antigenspezifischer T-Lymphozyten

Die weiteren Untersuchungen wurden mit dem Ziel durchgeführt, das T-Zell-rezeptor oder TCR V β -Repertoire P1-spezifischer T-Lymphozyten zu charakterisieren. Ihr Repertoire wurde mit dem TCR V β -Repertoire von T-Lymphozyten verschiedener Lymphknotenstationen und Thymozyten verglichen.

4.3.1 Der PCR-ELISA

Als erstes wurde der von VanderBorghet et. al. beschriebene PCR-ELISA den hiesigen Laborbedingungen angepasst und optimiert (VanderBorghet A et al., 1999).

In Vorversuchen wurde für jedes TCR V β -Element (Tab. 3.3) der Cyclus ermittelt, bei dem die exponentielle Phase beginnt. Diese Vorgehensweise ist notwendig, um später semiquantitative Aussagen zur Expression einzelner TCR V β -Elemente machen zu können. Die Bestimmung der exponentiellen Phase wäre auch mit dem PCR-ELISA möglich gewesen, doch erfordert dies einen nicht unerheblichen Aufwand. Deshalb wurde mit Hilfe der Echtzeit oder „real-time“ PCR die exponentielle Phase aller 22 V β -Primer bestimmt. Sie liegt, wie in Abb. 4.1 gezeigt, zwischen 23 und 28,5 Cyclen; im Mittel bei 26 Cyclen.

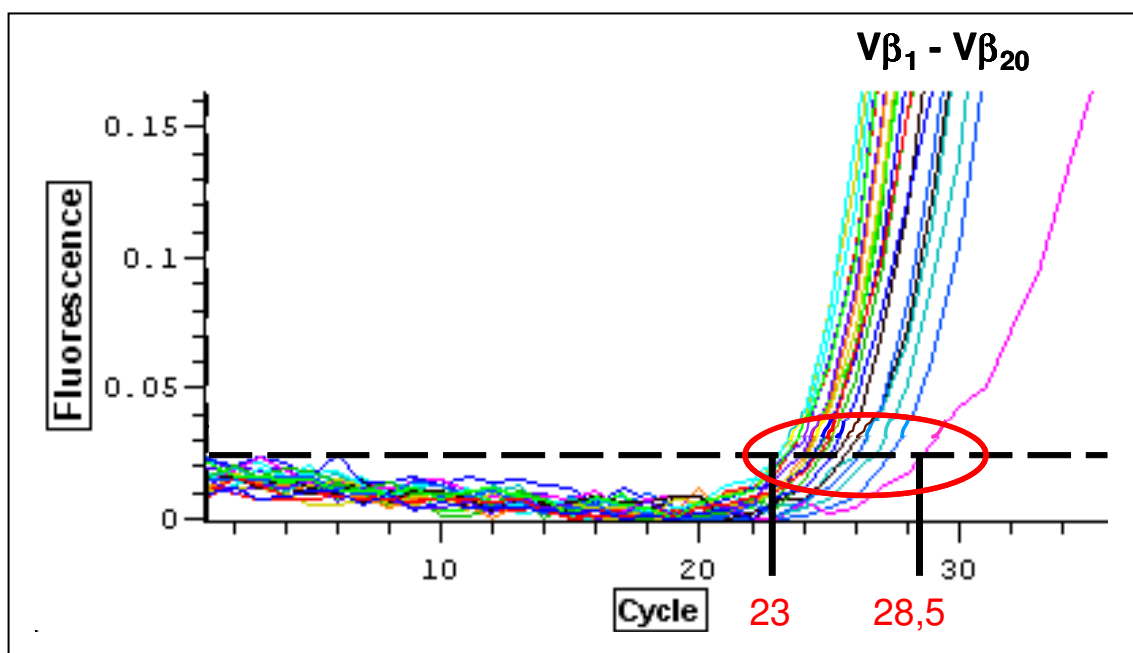


Abb. 4.14: Bestimmung der exponentiellen Phase der Polymerase-Kettenreaktion für die V β -spezifischen Primer in der Echt-Zeit oder „real time“ PCR. Auf der Abszisse ist die Cycluszahl und auf der Ordinate die Fluoreszenz aufgetragen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde CyberGreen verwendet (SYBR GREEN PCR Master Mix von Applied Biosystem). Die gestrichelte Linie markiert den „Threshold“, bei dem die enzymatische Reaktion in die exponentielle Phase übergeht. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus 1×10^6 Thymozyten isoliert (Abschnitt 3.7). Abbildung erstellt mit der Real-time PCR-Maschine PTC-200 (DNA Engine Cycler MJ Research) des Unternehmens BioRad Laboratories GmbH, München.

Da der ELISA zahlreiche Inkubationsschritte aufweist, die zu möglichen Falsch-positiven Ergebnissen führen könnten (Abb. 3.5), wurden im Vorfeld einige dieser Inkubationsschritte überprüft (Tab. 4.3). Die gemessene Optische Dichte für die so genannte „Blank“-Kontrolle – hier wurde in den entsprechenden Vertiefungen der ELISA-Platten kein PCR-Fragment zugegeben – betrug maximal $0,073 \pm 0,006$ ($n=50$). Es wurden ausschließlich solche Versuche ausgewertet, deren Kontrollen nicht die Optische Dichte von 0,08 überschritten. Von den 55 ELISA-Platten lagen die Kontrollen von fünf Platten über diesem Grenzwert (dies entspricht 9 Prozent).

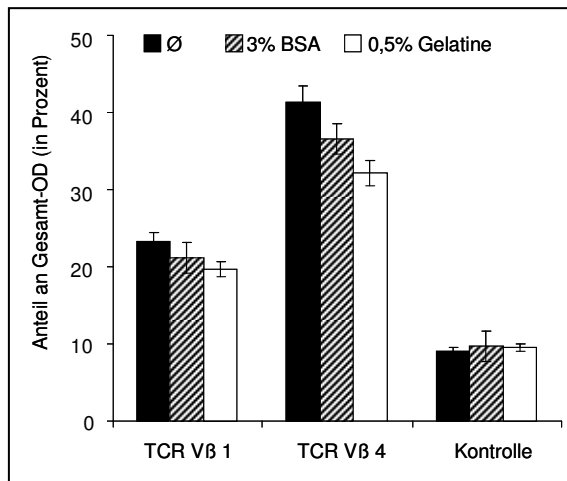


Abb. 4.15: Überprüfung der Notwendigkeit zur Blockierung mit BSA oder Gelatine.

Nachdem die PCR-Fragmente über die „Biotin-Sonde“ an die ELISA-Platte gebunden wurden (Abb. 3.4), wurde überprüft ob als nächster Schritt die Blockierung möglicher freier Stellen auf der ELISA-Platte notwendig ist. Die hier gezeigten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass ein Blockierungsschritt nicht zwingend erforderlich ist. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die „High Bind Streptawell-Platten“ der Firma Roche sehr dicht mit Streptavidin beschichtet sind.

In einem nächsten Schritt wurde überprüft, ob eine Absättigung mit 3 Prozent BSA oder 0,5 Prozent Gelatine notwendig ist, um den Hintergrund weiter zu verringern (Abb. 4.15). Hierzu wurden exemplarisch die TCR Vβ-Elemente 1 und 4 getestet. Die Ergebnisse zeigen, dass eine Blockierung zu keiner wesentlichen Verringerung der Hintergrundfärbung führte. So verringerte sich die Optische Dichte bei Vβ1 um max. 4 Prozent und bei Vβ4 um max. 10 Prozent nach Blockierung mit 0,5 Prozent Gelatine. Die Abnahme der Optischen Dichte fiel bei der Blockierung mit BSA noch geringer aus. Somit war eine Blockierung beim PCR-ELISA nicht notwendig.

Mit den folgenden Experimenten sollte die Spezifität des ELISA überprüft werden. So wurde z.B. kein Signal gemessen, wenn das eingesetzte PCR-Produkt nicht mit Digoxigenin markiert war und somit auch nicht an Streptavidin binden konnte (Abb. 3.4). Es wurde ebenfalls kein Signal gemessen, wenn das PCR-Produkt zwar digoxigeniert, das interne Oligonukleotid jedoch nicht biotiniliert war. Auch in den Messreihen, zu denen kein Detektionsantikörper bzw. kein Substrat zugegeben wurde (Abb. 3.4), wurde ebenfalls kein Signal gemessen.

Tab. 4.3: Überprüfung unterschiedlicher Bedingungen im PCR-ELISA zum Ausschluss falsch-positiver Ergebnisse. Dargestellt sind Mittelwert und Standardabweichung der gemessenen Optischen Dichten von jeweils 3 unabhängigen Experimenten. Ausnahme: Kontrollmessungen ohne PCR-Produkt (n=50).

	Optische Dichte
Kein PCR-Produkt	0,073 ± 0,006
Internes Oligonukleotid nicht biotiniliert; PCR-Produkt digoxigeniert	0,073 ± 0,005
Biotiniliertes internes Oligonukleotid; PCR-Produkt nicht digoxigeniert	0,072 ± 0,004
PCR-Produkt digoxigeniert; kein anti-Digoxigenin-Antikörper	0,075 ± 0,008
PCR-Produkt; kein Peroxidase-Substrat	0,077 ± 0,008
Negativkontrolle (Puffer)	0,074 ± 0,005

4.3.2 Das TCR V β -Repertoire von Thymozyten und T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten

Wie erwartet, ergaben die Analysen des TCR V β -Repertoires von Thymozyten und Lymphozyten verschiedener Lymphknotenstationen (cervikal, mesenterial, iliakal und popliteal) eine unterschiedlich starke Präsenz der 22 untersuchten TCR V β -Elemente. Thymozyten exprimieren alle 22 TCR V β -Elemente (Abb. 4.16), wobei die Ergebnisse des PCR-ELISA zeigten, dass TCR V β 14 mit 13,8 Prozent stark überrepräsentiert war (Abb. 4.17).

Abb. 4.16 (Seite 43): Das TCR V β -Repertoire von Thymozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten in der Polymerase-Kettenreaktion. Gelelektrophoretische Auftrennung der 22 TCR V β -Amplifikate. Repräsentatives Ergebnis zweier Tiere. BPL= 100-Basenpaar-Leiter.

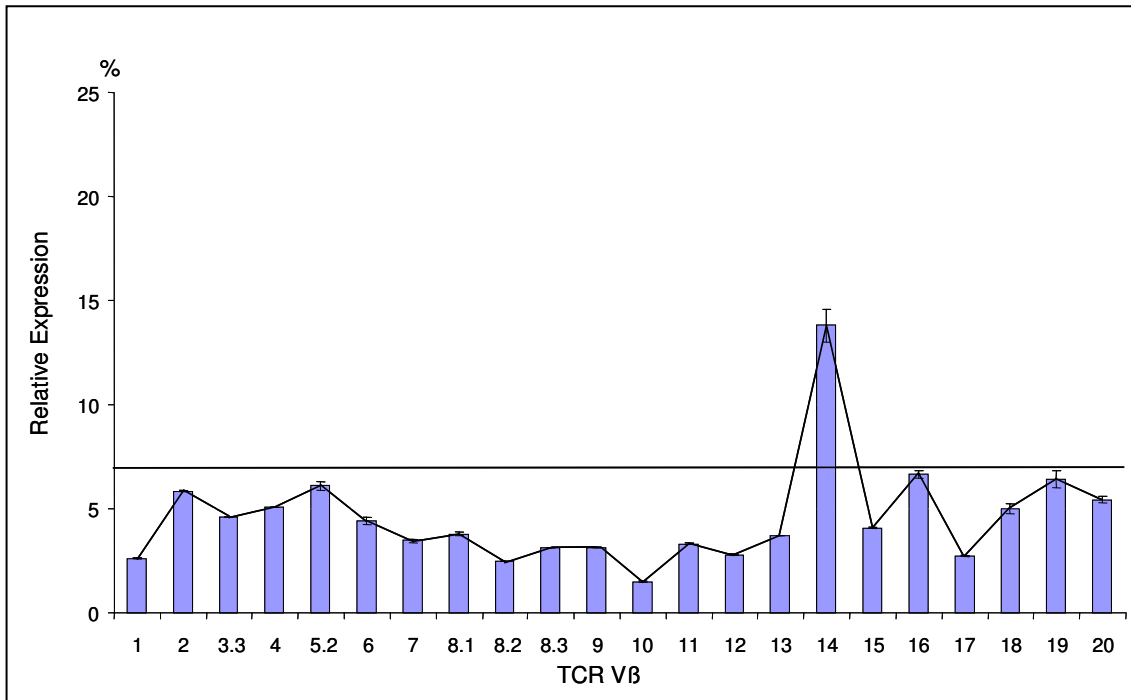
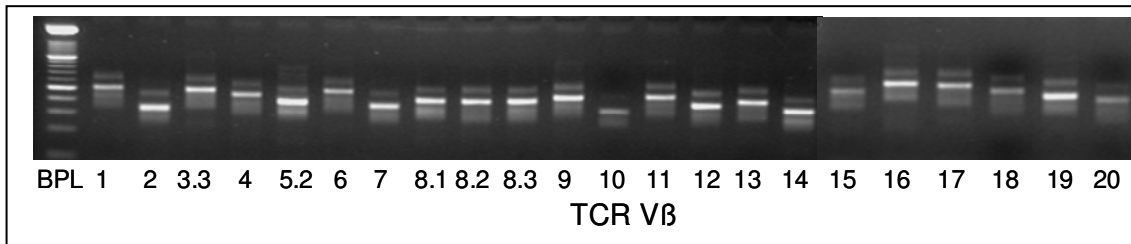


Abb. 4.17: Das TCR V β -Repertoire von Thymozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten im PCR-ELISA. Eine Überexpression des TCR V β 14-Elements ist festzustellen. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar. Die V β -Elemente, deren relative Expression über diesem Wert liegen, werden als „überexprimiert“ betrachtet.

Im Gegensatz zu den Thymozyten waren bei den cervikalen T-Lymphozyten von den 22 TCR V β -Elementen V β 1, 10, 11, 16 und 18 nicht im Agarosegel nachweisbar (Abb. 4.18).

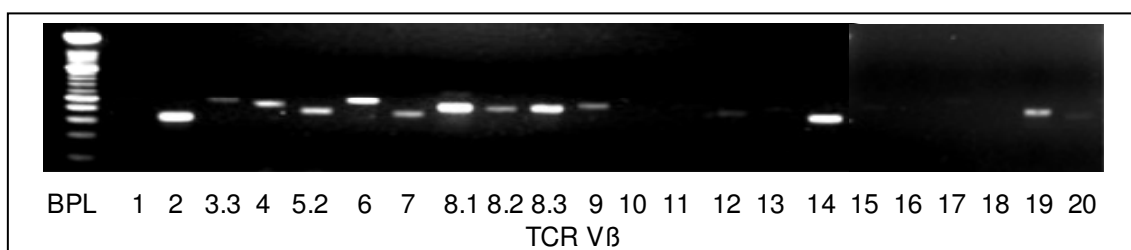


Abb. 4.18 (Seite 43): Das TCR V β -Repertoire cervikaler T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten in der Polymerase-Kettenreaktion. Gelelektrophoretische Auftrennung der 22 PCR-Produkte. Die Positivkontrolle GAPDH ist nicht gezeigt. BPL= 100-Basenpaar-Leiter.

Die Ergebnisse des PCR-ELISA zeigen, dass cervikale T-Lymphozyten bestimmte TCR V β -Elemente bevorzugt exprimieren. So lagen V β 2 (14,6%), V β 6 (11%), V β 8.3 (7,8%) und V β 16 (9,5%) über der „7 Prozent-Marke“ (Abb. 4.17). Die überexprimierten TCR V β -Elemente liegen über den gesamten Bereich des Repertoires verteilt.

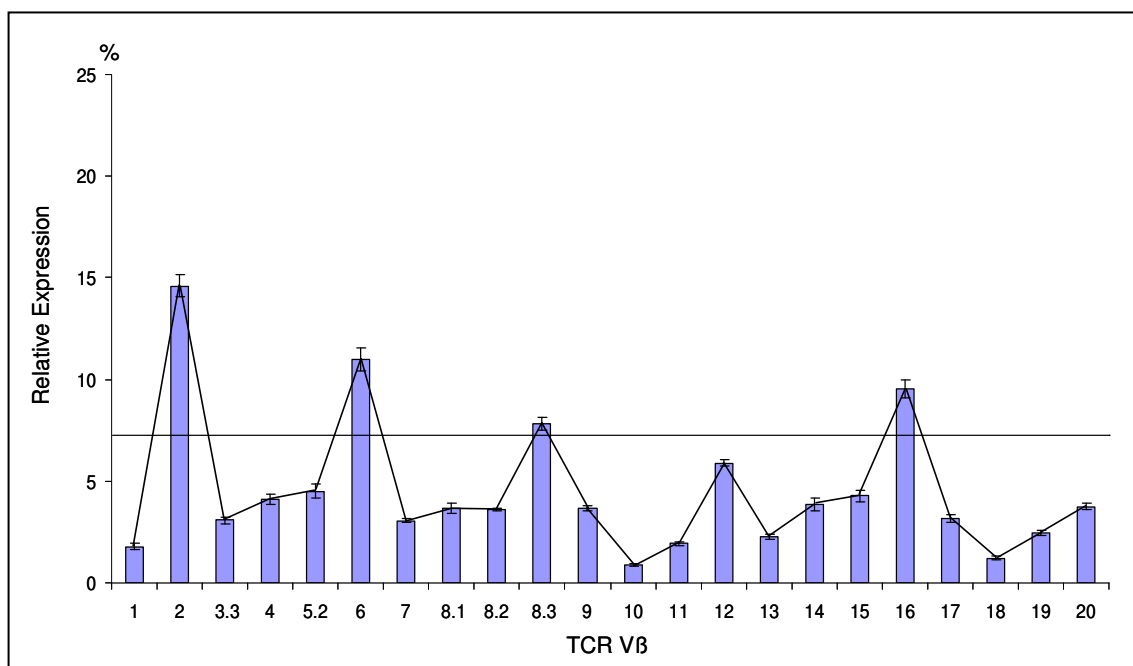


Abb. 4.19: Das TCR V β -Repertoire cervikaler T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten im PCR-ELISA. Die überexprimierten TCR V β -Elemente 2 (14,6%), 6 (11%), 8.3 (7,8%) und 16 (9,5%) sind über den gesamten Bereich des Repertoires verteilt. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

Auch mesenteriale T-Lymphknoten zeigten eine bevorzugte Expression bestimmter TCR V β -Elemente (Abb. 4.20). Diese sind TCR V β 2 (9,8%), V β 4 (8,9%) und V β 8.1 (10,0%). Hingegen waren für T-Lymphozyten aus iliakalen Lymphknoten keine Überexpression bestimmter TCR V β Elemente nachweisbar (Abb. 4.21). Einzige Ausnahme: V β 2 mit 8,5 Prozent.

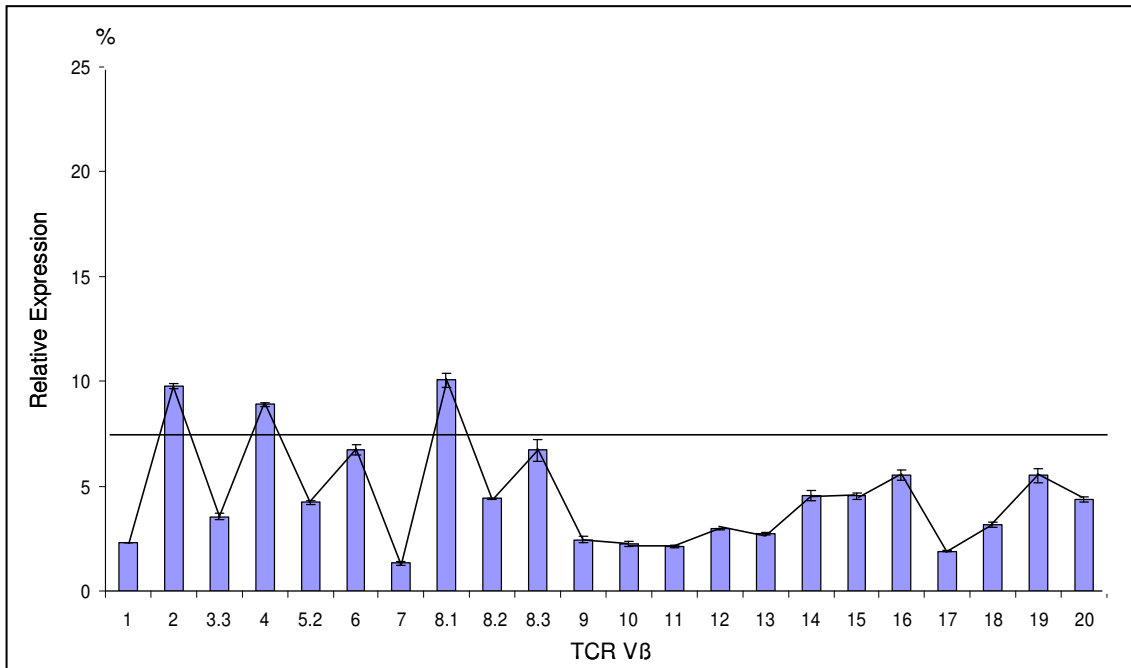


Abb. 4.20: Das TCR V β -Repertoire mesenterischer T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten im PCR-ELISA. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

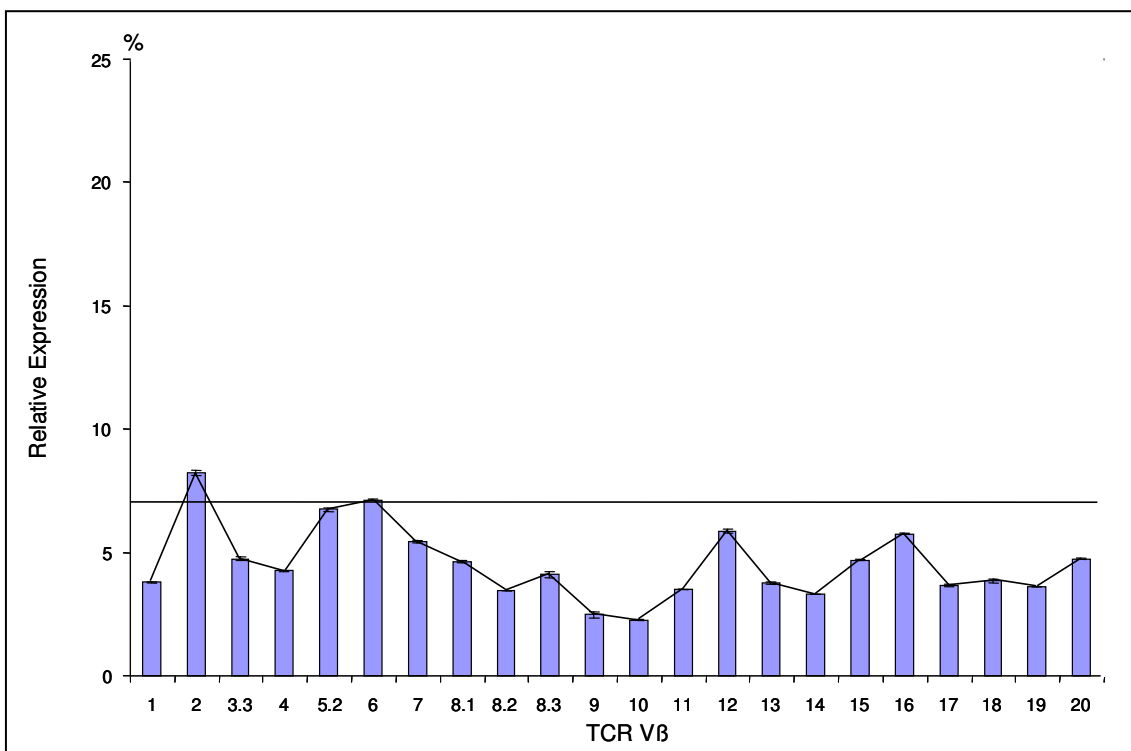


Abb. 4.21: Das TCR V β -Repertoire iliakaler T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten im PCR-ELISA. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

Von den poplitealen T-Lymphozyten wurden folgende TCR V β -Elemente bevorzugt exprimiert: V β 2 (11,8%), V β 4 (8,1%) und V β 9 (7,8%) (Abbildung 4.22). Somit weisen Thymozyten und T-Lymphozyten unterschiedlicher Lymphknotenstationen eine charakteristische Verteilung der 22 TCR V β -Elemente auf.

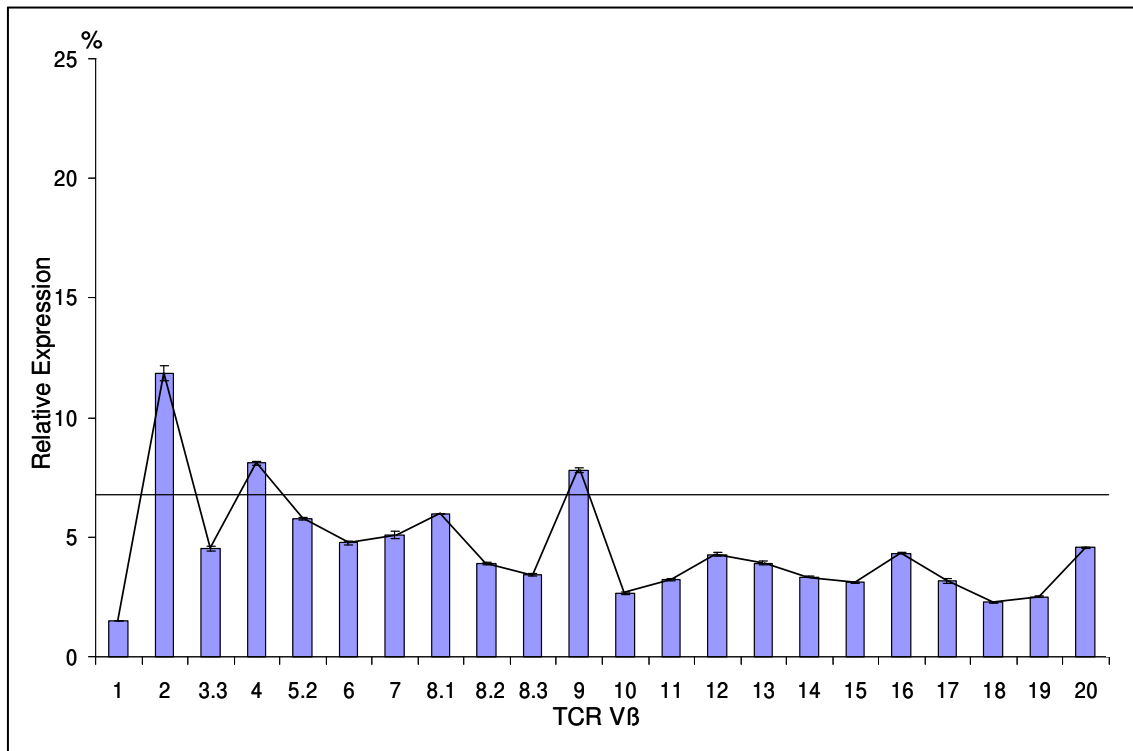


Abb. 4.22: Das TCR V β -Repertoire poplitealer T-Lymphozyten nicht-immunisierter Lewis-Ratten im PCR-ELISA. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

4.3.3. Das TCR V β -Repertoire nach Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1

Nachdem das TCR V β -Repertoire von Thymozyten und T-Lymphozyten verschiedener Lymphknotenstationen bestimmt war, wurde anschließend untersucht, wie sich das TCR V β -Repertoire von poplitealen T-Lymphozyten ändert, wenn die Tiere mit P1 immunisiert wurden. Sieben Tage nach Immunisierung wurden in den aufgereinigten R73⁺ T-Lymphozyten bis auf V β 18 sämtliche TCR V β -Elemente im Agarosegel nachgewiesen (Abb. 4.23).

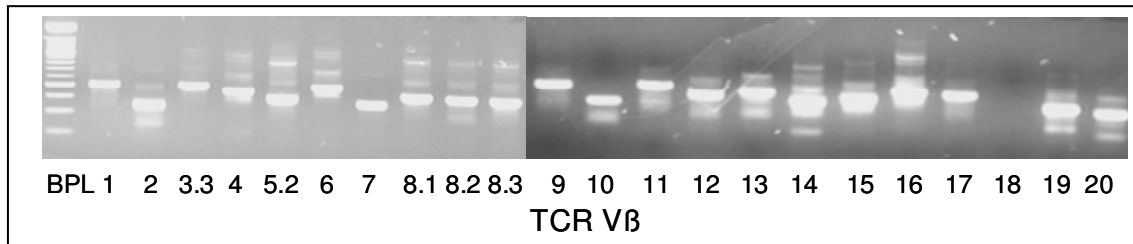


Abb. 4.23: Das TCR V β -Repertoire aufgereinigter antigenspezifischer R73⁺, poplitealer T-Lymphozyten der Lewis-Ratten. Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte. Die Positivkontrolle GAPDH ist nicht gezeigt. BPL= 100-Basenpaar-Leiter.

Die Ergebnisse des PCR-ELISA waren wie folgt: Eine starke Präsenz von TCR V β 15 (6,3%), V β 16 (8,5%), V β 17 (10%) und V β 20 (7,2%) wurde festgestellt (Abb. 4.24). Im Vergleich zu naiven poplitealen T-Lymphozyten (Abb. 4.22) wurde für die antigenspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten eine „Verschiebung“ der überrepräsentierten TCR V β -Elemente in den „hinteren“ Sequenzbereich beobachtet.

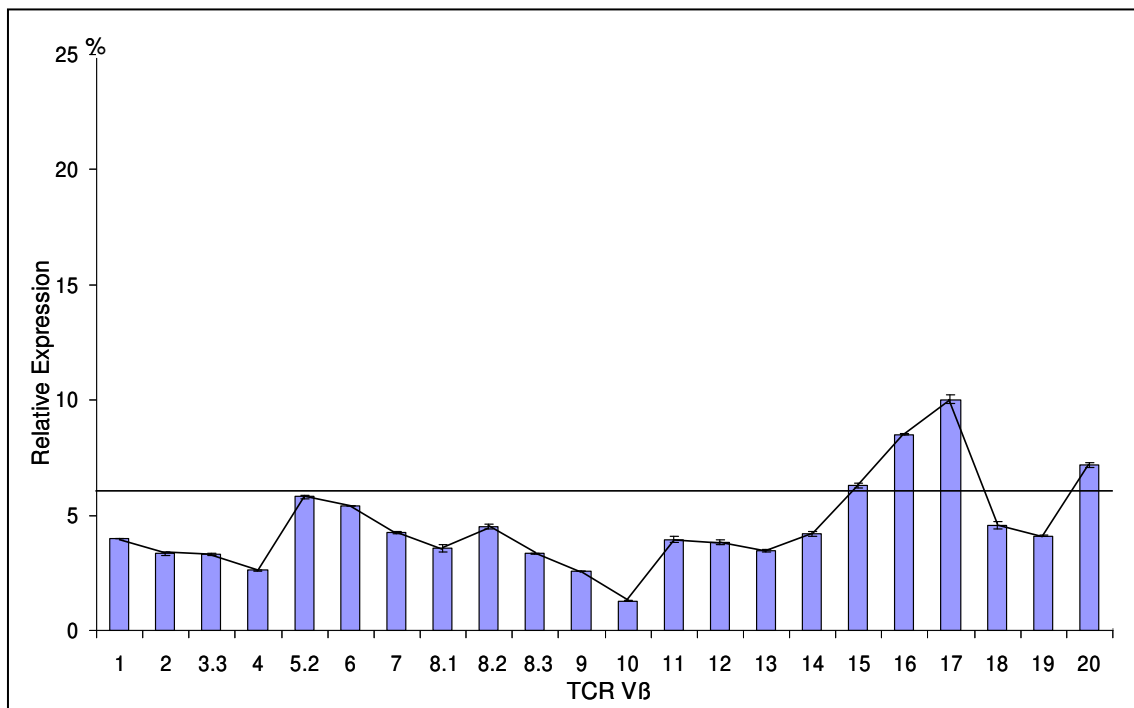


Abb. 4.24: Das TCR V β -Repertoire aufgereinigter, antigenspezifischer, R73⁺ T-Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten P1-immunisierter Lewis-Ratten im PCR-ELISA. Auffallend ist die Überexpression der TCR V β -Elemente 15, 16, 17 und 20, die so bei nicht immunisierten Tieren gefunden wurde (Abb. 4.22). Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

Auch wurde das TCR V β -Repertoire poplitealer T-Lymphozyten drei statt sieben Tage nach P1-Immunisierung untersucht (Abb. 4.25). Dabei zeigte sich, dass zu diesem Zeitpunkt das P1-spezifische TCR V β -Repertoire noch nicht vollständig ausgebildet war; doch war bereits V β 16 (9,4%) vertreten. Ein Hinweis dafür, dass ein Großteil der P1-spezifischen T-Lymphozyten V β 16-positiv ist. Dieses Ergebnis korreliert mit der Beobachtung, dass die Lymphknoten zu diesem Zeitpunkt noch keine Auffälligkeiten zeigten (Tab. 4.1).

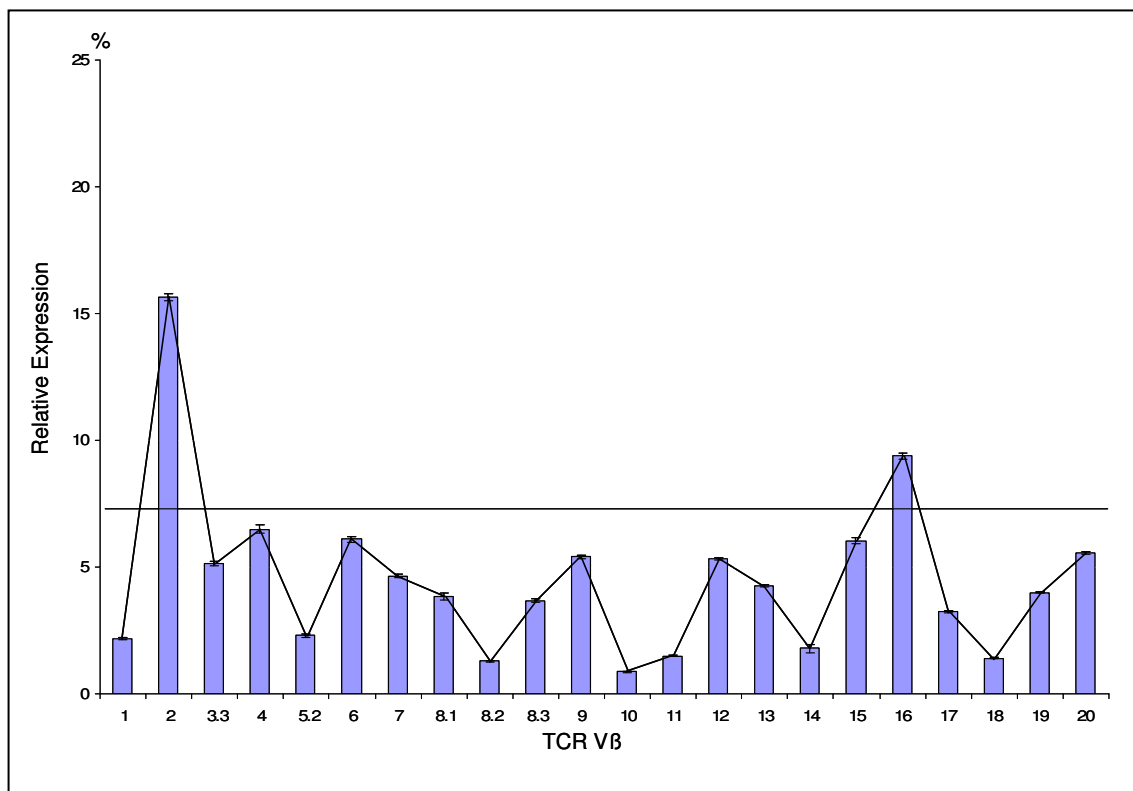


Abb. 4.25: Das TCR V β -Repertoire aufgereinigter, antigenspezifischer, R73⁺ T-Lymphozyten aus den poplitealen Lymphknoten drei Tage nach Immunisierung von Lewis-Ratten mit P1 im PCR-ELISA. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17). In Abbildung 4.24 ist das TCR V β -Repertoire antigenspezifischer T-Lymphozyten gezeigt, die 7 Tage nach Immunisierung aus den poplitealen Lymphknoten isoliert wurden.

Auch fünf Tage nach Immunisierung war noch nicht das P1-spezifische TCR V β -Repertoire von Tag 7 vollständig sichtbar (nicht gezeigt).

Als nächstes wurde untersucht, ob TiterMax, ein zur Immunisierung notwendiges Adjuvans, möglicherweise das TCR V β -Repertoire poplitealer T-Lymphozyten verändert. Nach Abbildung 4.26 ist dies jedoch nicht der Fall.

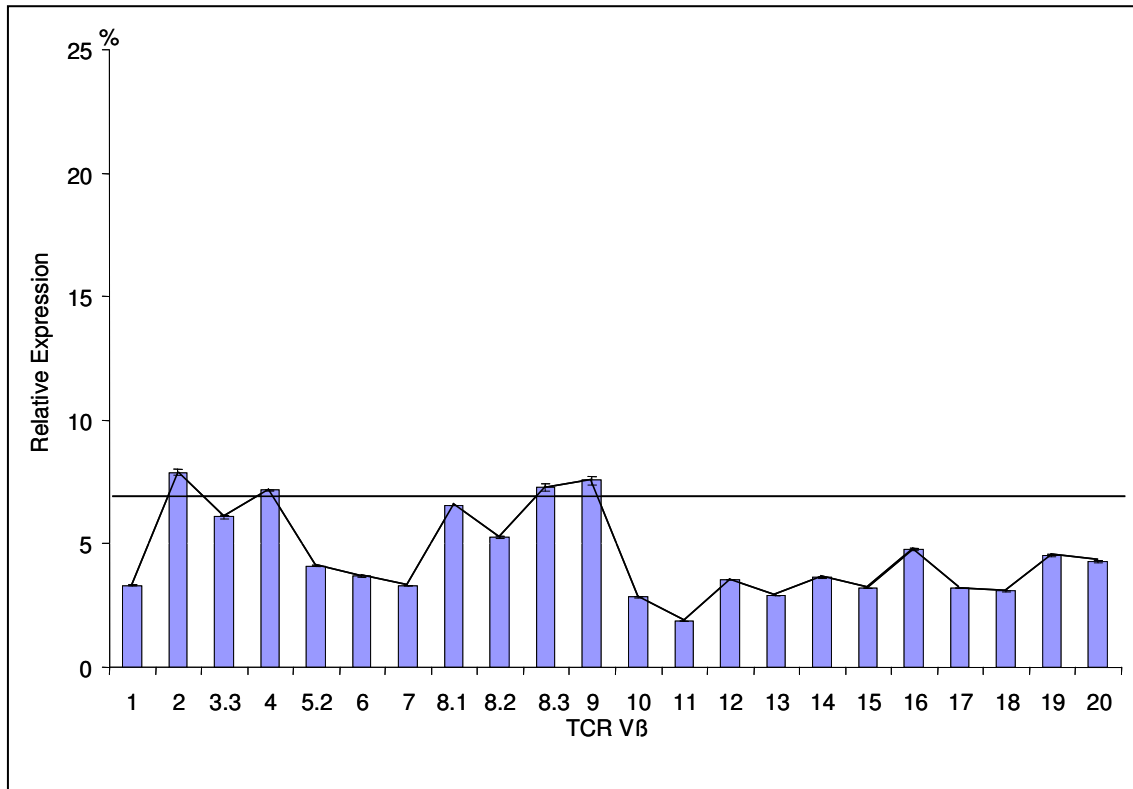


Abb. 4.26: Das TCR V β -Repertoire poplitealer T-Lymphozyten nach Immunisierung von Lewis-Ratten mit TiterMax im PCR-ELISA. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

Als weitere Kontrolle wurde das TCR V β -Repertoire nach Immunisierung mit dem nicht-immunogenen Peptid Ac bestimmt (Abb. 4.27). Hier ergab sich ein leicht verändertes Muster im Vergleich zu naiven poplitealen Lymphozyten (Abb. 4.22). Nach Immunisierung mit Ac wurde eine verstärkte Expression, von TCR V β 4 (7,5%), V β 14 (12,6%) und V β 16 (9,2%) registriert. Im Vergleich zum Repertoire P1-spezifischer T-Lymphozyten (Abb. 4.24) scheint V β 16 sowohl P1 als auch das Autoantigen Ac zu erkennen. Möglicherweise ist dies auf eine ausgeprägte Kreuzreaktivität zurückzuführen.

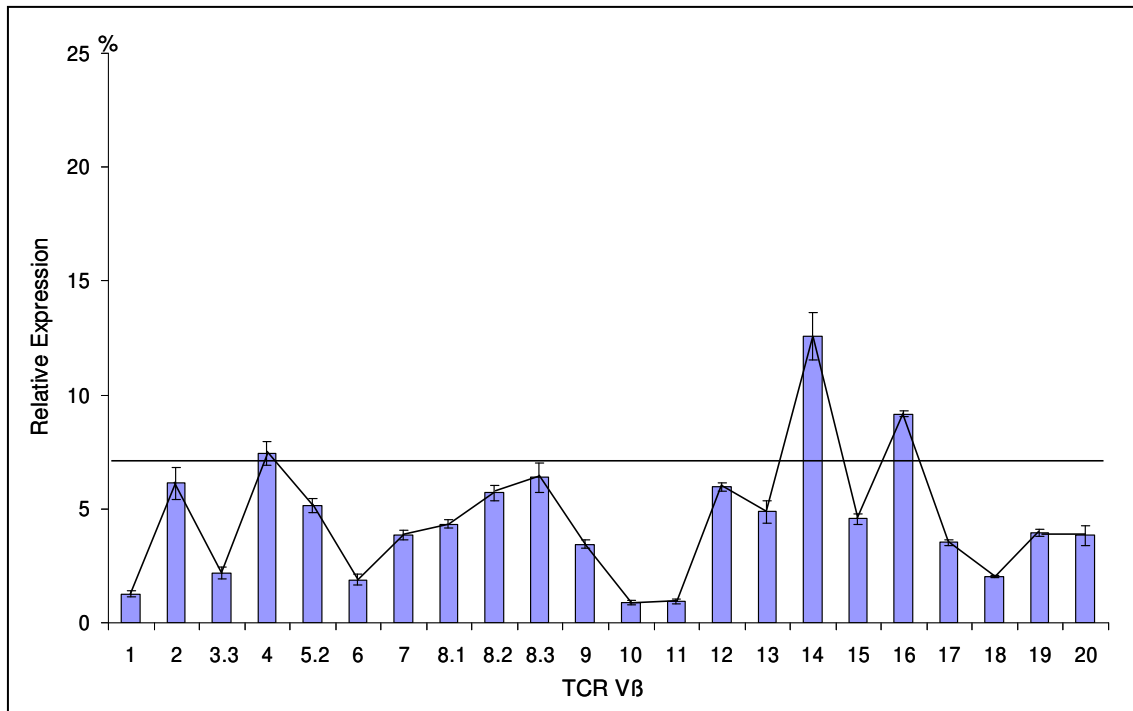


Abb. 4.27: Das TCR V β -Repertoire poplitealer T-Lymphozyten nach Immunisierung von Lewis-Ratten mit dem Peptid AC im PCR-ELISA. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

4.3.4 Das TCR V β -Repertoire antigenspezifischer T-Lymphozyten nach *in vitro* Restimulierung

Um noch deutlicher das TCR V β -Repertoire P1-spezifischer T-Lymphozyten darzustellen, wurden die antigenspezifischen T-Lymphozyten *in vitro* mit P1 restimuliert. Hierdurch wurden folgende TCR V β -Elemente überrepräsentiert (Abb. 4.28): V β 2 (15,3%), V β 4 (11,1 %), V β 8.3 (10%) und V β 16 (16,7%). Das Experiment wurde wiederholt und nun die aufgereinigten (aktivierten) CD25⁺ T-Lymphozyten untersucht. Dabei wurden TCR V β 8.3 (14,7%) und V β 15 (12,9%) und TCR V β 16 (20,4%) nachgewiesen (Abb. 4.29).

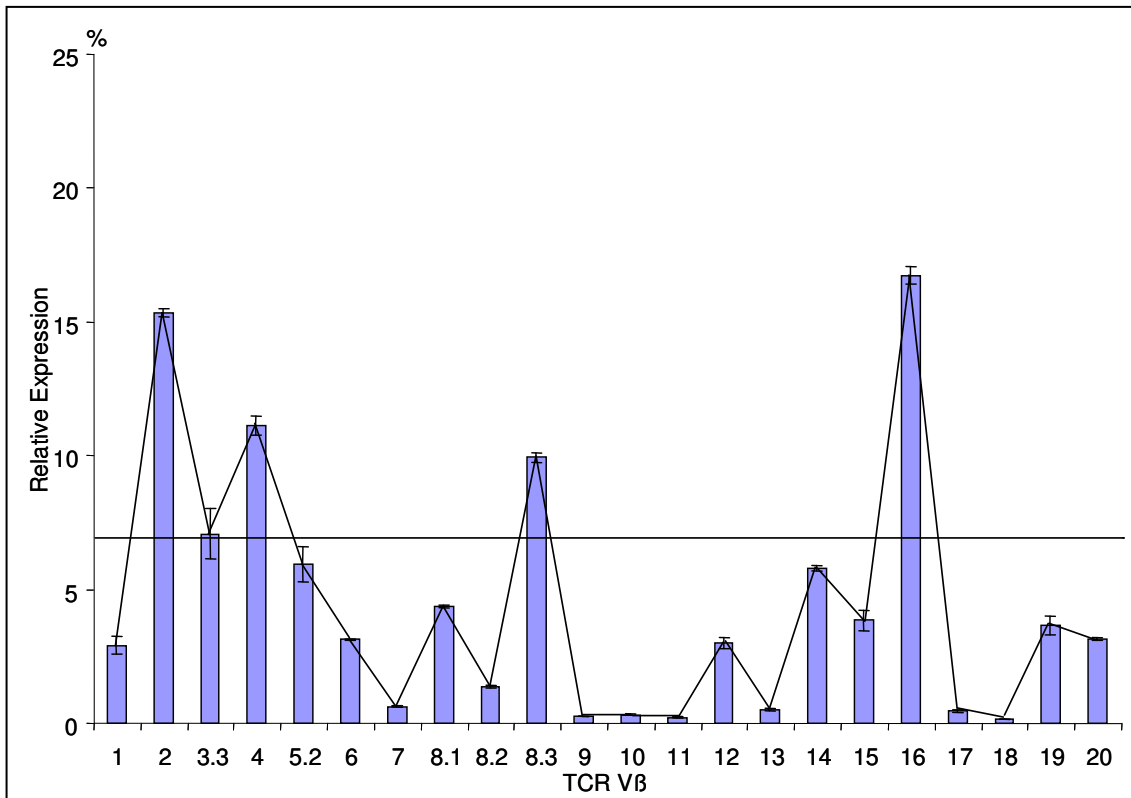


Abb. 4.28: Das TCR V β -Repertoire poplitealer T-Lymphozyten nach Immunisierung von Lewis-Ratten und nach zweimaliger *in vitro* Restimulierung mit P1 und IL-2. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

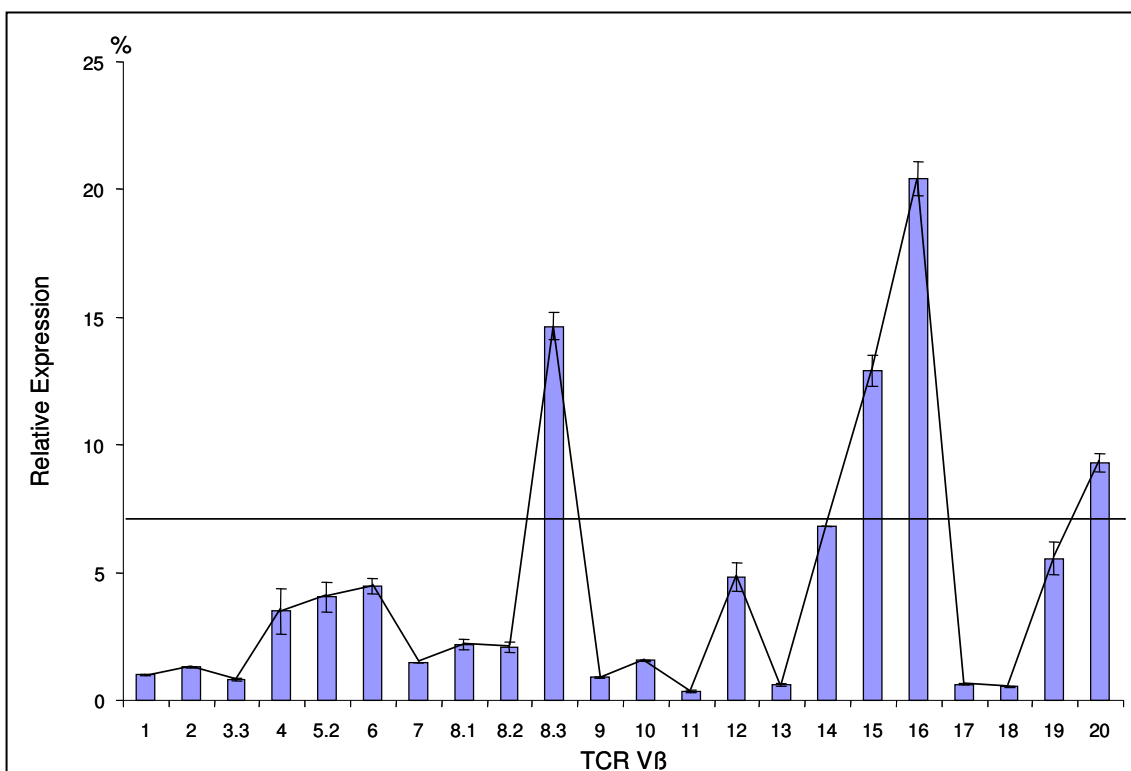


Abb. 4.29 (Seite 51): Das TCR V β -Repertoire poplitealer, aufgereinigter CD25⁺ T-Lymphozyten nach zweimaliger *in vitro* Restimulierung mit P1 und IL-2. Die Ergebnisse (der prozentuale Anteil der Optischen Dichte jedes TCR V β -Elements an der Gesamt-OD aller V β -Elemente) sind als Mittelwert und Standardabweichung aus jeweils 8 Einzelmessungen dargestellt (Abb. 3.3). Die schwarze Linie stellt die „7 Prozent-Marke“ dar (Abb. 4.17).

Somit weisen P1-spezifische T-Lymphozyten, die zweimal *in vitro* restimuliert wurden, ein oligoklonales T-Zellrezeptor-Repertoire mit den TCR V β -Elemente 8.3, 15, und 16 auf (Abb. 4.29).

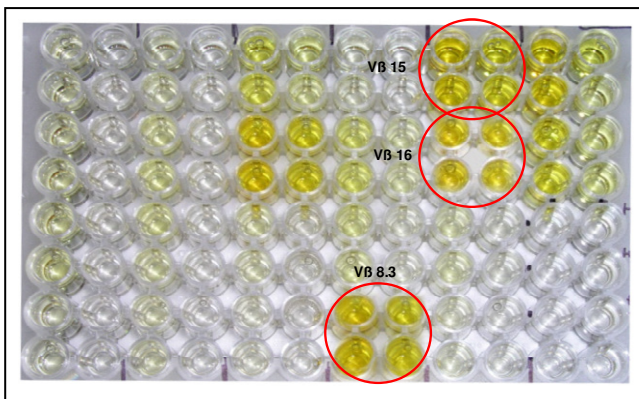


Abb. 4.30: Überexpression von TCR V β -Elementen aktivierter, poplitealer T-Lymphozyten von Lewis-Ratten nach zweimaliger *in vitro* Restimulierung mit P1 und IL-2. Bereits mit bloßem Auge sind Farbsignale in den Vertiefungen mit TCR V β 8.3, 15 und 16 gut sichtbar (Abb. 4.29).

5 Beantwortung der Fragen

1. Die subkutane Injektion des allogenen Peptids P1 aktiviert das adaptive Immunsystem. Welche Effekte sind hierbei zu beobachten?

Die Immunsierung mit P1 führte zu einer deutlichen Vergrößerung der poplitealen Lymphknoten (Tab. 4.1) und zum Anstieg der Lymphknotenzellen von $2,6 \times 10^6 \pm 1,1 \times 10^6$ auf $7,3 \times 10^7 \pm 1,9 \times 10^7$ (Tab. 4.1). Die Immunantwort war lokal begrenzt und P1-spezifische T-Lymphozyten waren in erster Linie in den poplitealen und iliakalen Lymphknoten nachzuweisen (Abb. 4.8). Durchflusszytometrische Analysen zeigten zudem, dass sich der Anteil aktivierter T-Lymphozyten nach Immunisierung deutlich erhöhte (Abb. 4.3 H-N). P1-spezifische T-Lymphozyten wurden *in vitro* im Proliferationsassay radioaktiv über den Einbau von [³H]-Thymidin bzw. nicht-radioaktiv mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFDASE nachgewiesen.

2. Das T-Zellrezeptor V β -Repertoire von Thymozyten und T-Lymphozyten verschiedener Lymphknotenstationen wurde analysiert. Welche Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede sind festzustellen?

Thymozyten exprimierten alle 22 TCR V β -Elemente (Abb. 4.16); einzig das TCR V β -Element 14 war überrepräsentiert. Die T-Lymphozyten der cervikalen, mesenterialen, inguinalen und poplitealen Lymphknoten zeigten ebenfalls eine charakteristische Überexpression bestimmter TCR V β -Elemente. Hierzu gehörten V β 2, 6, 8.3 und 16 für cervikale T-Lymphozyten; V β 2, 4, 8.1 für mesenteriale T-Lymphozyten; V β 2 und 6 für iliakale T-Lymphozyten und V β 2, 4, 9 für popliteale T-Lymphozyten. Die Immunisierung mit dem nicht-immunogenen Kontrollpeptid, dem Autoantigen Ac (Abb. 4.1 und Tab. 4.1), führte zu einer leichten Veränderung des T-Zellrezeptor-Repertoires, bei dem die TCR V β -Elemente 14 und 16 überexprimiert waren. Das Adjuvant TiterMax hingegen beeinflusste kaum das TCR V β -Repertoire (Abb. 4.26).

3. Das T-Zellrezeptor V β -Repertoire antigenspezifischer CD4⁺ T-Lymphozyten wurde untersucht. Was sind die Ergebnisse?

Im Gegensatz zur Immunisierung mit dem Autoantigen Ac (siehe oben) führte die Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 zu einer eindeutigen Beeinflussung des T-Zellrezeptor-Repertoires (Abb. 4.24). Popliteale T-Lymphozyten, die 7 Tage nach Immunisierung analysiert wurden, zeigten ein Repertoire, bei dem die TCR V β -Elemente 15, 16, 17 und 20 überexprimiert waren. Dieses Repertoire war am Tag 3 nach Immunisierung noch nicht so ausgebildet (Abb. 4.25). Wurden die antigenspezifischen T-Lymphozyten nach ihrer Isolierung mit P1 *in vitro* restimuliert, so waren in diesem T-Zellrezeptor-Repertoire die TCR V β -Elemente 8.3, 15, 16 und 20 überexprimiert (Abb. 4.29) im Vergleich zu naiven T-Lymphozyten mit den TCR V β -Elementen 2, 4 und 9 (s. oben). Damit wurde eine „Verschiebung“ im TCR V β -Repertoire zugunsten der V β -Elemente 15, 16 und 20 nach Immunisierung mit dem Peptidantigen P1 nachgewiesen.

6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde das T-Zellrezeptor V β -Repertoire alloreaktiver T-Lymphozyten charakterisiert. Die durch T-Lymphozyten vermittelte adaptive Immunantwort spielt sowohl bei der Transplantatabstoßung, als auch bei zahlreichen anderen Erkrankungen eine wesentliche Rolle (Hall BL et al., 1993; Douillard P et al., 1996; Barth C et al., 1996; Guillet M et al., 2002).

Andererseits können Mutationen in T-Lymphozyten selbst Ursache einer Erkrankung sein. So wurde zum Beispiel in lymphoblastischen Non-Hodgkin-Lymphomen eine Translokation innerhalb der Gene des T-Zellrezeptors nachgewiesen, die zur malignen Entartung führt (Alcaron B et al., 1988; Arnaiz-Villena A et al., 1992). Mutationen in den Rekombinasen RAG-1 oder RAG-2, die zur erfolgreichen V(D)J Rekombination des T-Zellrezeptors und der Immunglobuline notwendig sind, führt zum Mangel oder einem kompletten Verlust an T- oder B-Lymphozyten. Auch der autosomal rezessiv vererbte Verlust des CD3-Komplexes, der für die Signaltransduktion notwendig ist (s. Einleitung), führt vermehrt zu hämolytischen Anämien und Infekten des Bronchialsystems bzw. Gastrointestinaltraktes. Diese schweren Erkrankungen enden bereits im Alter von wenigen Monaten letal (Regueiro JR et al., 1986; Arnaiz-Villena A et al., 1993).

„Eurotransplant“ meldet stetig steigende Zahlen für Organtransplantationen (www.eurotransplant.nl), was den großen Bedarf dieser therapeutischen Option widerspiegelt. Jedoch stellt die weiterhin unverzichtbare Immunsuppression ein großes Problem dar (Matthews JB et al., 2003). Insbesondere der indirekte Weg der Alloantigenerkennung, der ebenfalls an der Transplantatabstoßung beteiligt ist (Abb. 1.1), erlaubt zudem - im Gegensatz zur direkten Alloantigenerkennung -, die Induktion spenderspezifischer Toleranz. Somit lassen sich von der Charakterisierung alloreaktiver T-Lymphozyten wichtige Informationen zur Verteilung der TCR V β -Elemente erwarten. Auch ließen sich solche T-Zellklone mit bestimmten TCR V β -Elementen etablieren (Seite 7) und ihre Bedeutung für Abstoßung und Toleranz im Detail untersuchen.

6.1 Effekte der Immunisierung mit dem Peptid P1

Eine subkutane Immunisierung mit dem Peptid P1 führt in den poplitealen Lymphknoten zu einer lokalen Immunantwort (Fig. 4.1), die einige Charakteristika aufweisen, wie vergrößerte Lymphknoten und ansteigende Zahlen für Lymphozyten (Tab. 4.1). Der Anteil antigenspezifischer T-Lymphozyten lässt sich erhöhen, wenn sie *in vitro* mit antigenbeladenen dendritischen Zellen inkubiert werden (Abb. 4.6 E, F). Dabei ist die induzierte Aktivierung bereits nach wenigen Tagen auch optisch zu erkennen (Abb. 4.4) Im Gegensatz zum allogenen Peptid P1, führt das nicht-immunogene Peptid Ac (Tab. 4.1) zu keinen wesentlichen Veränderungen bei der Größe der poplitealen Lymphknoten und bei der Anzahl an Lymphozyten.

Zur erfolgreichen Reaktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten sind dendritische Zellen notwendig, die neben MHC-Klasse-II-Molekülen zur Bindung des Peptidantigens kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) exprimieren (Sayegh MH et al., 1998; Clarkson MR et al., 2005). Wie Stefan Kottenmeier in seiner Promotionsschrift zeigte, exprimieren auch aktivierte T-Lymphozyten MHC-Klasse-II Moleküle auf ihrer Zelloberfläche. Beladen mit P1 sind diese Zellen in der Lage, P1-spezifische T-Lymphozyten wie antigenpräsentierende Zellen zu restimulieren. Für dieses als Autostimulation bezeichnete Phänomen sind ebenfalls kostimulatorische Signale notwendig. Die Blockade der MHC-Klasse-II-Moleküle mit dem Antikörper OX6 bzw. die selektive Depletion der MHC-Klasse-II-positiven T-Lymphozyten verhindern die Autostimulation. Auch die Blockade des IL2-Rezeptors durch den Antikörper NDS61 führt zu einer vollständigen Hemmung der Restimulation (Kottenmeier S, 2005). Im Gegensatz zur Ausschüttung von IL-2 und der Expression des IL2-Rezeptors - beides ist bereits wenige Stunden nach Aktivierung zu beobachten -, werden MHC-Klasse-II-Moleküle erst drei bis fünf Tage nach Aktivierung auf der Oberfläche von T-Lymphozyten exprimiert (Holling TM et al., 2004).

6.2 Nachweis der T-Zellproliferation

Seit der Etablierung der Zellfärbung mit Carboxyfluorescein Diacetat-succinimidylester oder CFDASE im Jahre 1994 durch Lyons gilt sie als Methode der Wahl, um T-Zellproliferation zu verfolgen (Lyons AB und Parish CR, 1994). Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass sie den Nachweis von acht bis zehn Zellteilungen ermöglicht (Lyons AB und Doherty KV, 1998). Ein weiterer Vorteil ist die Stabilität der Färbung (Lyons AB, 1997). Darüber hinaus beeinflusst diese Zellfärbung nicht den Nachweis von Cytokinen und die Markierung von Oberflächenmolekülen.

Der hohe Stellenwert der CFDASE Färbemethode zur Untersuchung von B- und T-Lymphozyten wird durch zahlreiche Publikationen belegt, wie diese kleine Auswahl folgender Publikationen zeigt: Lyons AB und Parish CR, 1994; Fulcher DA et al., 1996; Lyons AB, 1997; Kindler und Zubler, 1997; Wells AD et al., 1997; Hasbold J et al., 1998; Gett AV und Hodgkin PD, 1998; Lee WT und Pelletier WJ, 1998.

Das Prinzip der CFDASE-Färbung beruht darauf, dass der Farbstoff zunächst membrangängig ist und erst nach Abspaltung der Acetatgruppen durch endogene Esterasen im Zytosol der Zelle verbleibt und zudem fluoresziert. Zusätzlich reagiert der Succinimidylester mit freien Aminogruppen intrazellulärer Proteine und bildet gefärbte Nebenprodukte. Bei der Zellteilung werden die Farbstoffmoleküle gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, wie Lyons und Parish zeigten (Lyons AB und Parish CR, 1994). Als Grund, dass der Farbstoff bis zu sechs Monate nach Färbung noch in der Zelle nachzuweisen ist, nimmt man an, dass er in einige cytoskeletale Proteine eingebaut wird, die eine sehr geringe Erneuerungsrate aufweisen (Lyons AB et al., 2000). Die Anzahl der nachvollziehbaren Zellteilungen wird alleine durch die Autofluoreszenz nicht-gefärbter Zellen begrenzt. Wie auch die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen, verlieren frisch gefärbte Zellen innerhalb der ersten 24 Stunden bis zu 60 Prozent ihres Farbstoffs (Abb.4.10). Danach bleibt der Anteil gebundener Farbstoffmoleküle stabil und die Fluoreszenz verändert sich nicht, solange die

Zellen sich nicht teilen. Zudem haben die Versuche in dieser Arbeit gezeigt, dass die ideale Konzentration des Farbstoffs bei 50 nmol/L liegt (Abb. 4.9).

Wurden CFDASE-markierte T-Lymphozyten mit PMA und Ionomycin stimuliert, so waren innerhalb von 72 Stunden zwei, möglicherweise auch drei Zellteilungen nachzuweisen (Abb. 4.11). Auch bei der Restimulierung P1-spezifischer Zellen war eine eindeutige Abnahme der Fluoreszenzintensität zu beobachten (Abb. 4.12 F), doch ließ sich die genaue Anzahl der Zellteilungen nicht eindeutig bestimmen. Auch war die CFDASE-Färbung geeignet, um CFDASE-gefärbte Zellen in einem Pool ungefärbter Zellen nachzuweisen. So wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass 1×10^5 CFDASE-gefärbte Zellen in 5×10^5 ungefärbten Zellen eindeutig detektierbar sind; dies entspricht einem Verhältnis von einer CFDASE-gefärbten Zelle auf 50 ungefärbte Zellen. Somit stellt die Färbung mit CFDASE eine gute Möglichkeit dar, um auch *in vivo* Informationen über P1-spezifische T-Lymphozyten zu bekommen.

6.3 Methoden zum Nachweis des TCR V β -Repertoires

Verschiedene Methoden zur Bestimmung des T-Zellrezeptor V β -Repertoires wurden beschrieben. So wiesen Bröker B et al., 1993 und Huchonq A et al., 1995 Subpopulationen humaner T-Lymphozyten durchflusszytometrisch mit Subklassen-spezifischen monoklonalen Antikörpern nach. Um auswertbare Ergebnisse zu erhalten, sind jedoch ausreichende Zellmengen für solche Analysen notwendig. Für T-Lymphozyten der Ratte stehen zudem nicht für alle TCR V β -Elemente Subklassen-spezifische Antikörper zur Verfügung. Mit neuen molekularbiologischen Analysemethoden lässt sich die Bestimmung des T-Zellrezeptor V β -Repertoires weiter optimieren (Pannetier C et al., 1995; Segurado OG und Schendel DJ, 1993b; Banèr J et al., 2005).

Insbesondere Nachweismethoden, die auf der Polymerase-Kettenreaktion basieren, sind sehr sensitiv zum Nachweis des TCR V β -Repertoires. Die notwendigen spezifischen V β -Primer lassen sich, da der T-Zellrezeptor wie der B-Zellrezeptor zu den am besten untersuchten Oberflächenmolekülen gehört, mit

Hilfe umfangreicher Sequenzdaten leicht herstellen (Breit T und Van Dongen J, 1994; Vandevyver C et al., 1995). Zur Quantifizierung der zahlreichen Amplifikate eignet sich sehr gut die Kombination mit der ELISA-Technik. Der PCR-ELISA kann sogar unter bestimmten Umständen der „real-time“ PCR überlegen sein (Scotter JM et al., 2005). Zudem lässt sich die Sensitivität des ELISA mit Hilfe der Chemiluminiszenz steigern (Dufour V et al., 1999).

Der PCR-ELISA eignet sich sehr gut zum Nachweis des T-Zellrezeptor V β -Repertoires peripherer T-Lymphozyten, als auch von Zellen aus abgestoßenen Gewebeproben oder der Synovia bei Rheumatoider Arthritis (VanderBorghet A et al., 1999). Diese Technik benötigt kein radioaktives Material und keine besonders teure Ausrüstung. Sie erlaubt semiquantitative Aussagen zur Überexpression bestimmter antigenspezifischer TCR V β -Elemente bei weniger als 50.000 eingesetzten Zellen (VanderBorghet et al., 1999). Die Vorteile dieser Methode sind eine geringe Schwankungsbreite – im wesentlichen verursacht durch Unterschiede im Reaktionsvolumen oder bei der Reaktionstemperatur – und eine optimale Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (VanderBorghet et al., 1999).

6.4 Nachweis des TCR V β -Repertoires antigenspezifischer T-Lymphozyten

Neben Monozyten und Makrophagen sind $\alpha\beta$ T-Lymphozyten wesentlich für die Transplantatabstoßung (Alvarez CM et al., 2004; Ulbrich M, 2007). In einigen Arbeiten wurde jedoch berichtet, dass möglicherweise auch $\gamma\delta$ T-Lymphozyten wichtige Effektorzellen darstellen (Kirk AD et al., 1993; Dechanet J et al., 1999). Heute gilt als gesichert, dass sich weniger als 0,1 Prozent $\gamma\delta$ T-Lymphozyten im Transplantat zum Zeitpunkt der Abstoßung befinden (Gagne K et al., 2000).

Zur Untersuchung der TCR V β -Subtypen innerhalb der an der Transplantatabstoßung beteiligten CD4⁺ T-Lymphozyten ist die β -Kette besonders „informativ“, weil sich diese, wie in der Einleitung beschrieben, aus den Gensegmenten V β -D β -J β zusammensetzt, während die α -Kette aus den Gensegmenten V α -J α

gebildet wird (Turner SJ et. al., 2006). Die Antigenerkennung erfolgt über die die hypervariablen Komplementaritätsdeterminanten (*complementary determination rgions* oder CDR) 1, 2 und 3 (Abb. 1.2). Das CDR3-Element beider Ketten des T-Zellrezeptors bildet die zentrale Antigenbindungsstelle, wobei sich das CDR3 der β -Kette innerhalb des V-D-J-Gensegmentes befindet. Bei der Verknüpfung der V-, D- und J-Segmente kommt es zu Insertionen bzw. Deletionen von Nukleotiden, was die Variabilität dieser hypervariablen Region nochmals erhöht (Turner SJ et al., 2006)

Um beurteilen zu können, wie sich das T-Zellrezeptor-Repertoire nach Kontakt mit einem Antigen verändert, wurde als erstes das Repertoire naiver T-Lymphozyten unterschiedlicher Lymphknotenstationen und das Repertoire von Thymozyten untersucht. Die unterschiedlichen Expressionsmuster, die beobachtet wurden, lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die T-Lymphozyten, die während ihrer Entwicklung im Thymus einer so genannten positiven und negativen Selektion unterliegen, auch in der Peripherie selektiert werden (Turner SJ et al., 2006), z.B. während einer T-Zellantwort (Fasso M et al., 2000).

Durch die subkutane Injektion von P1 in die Fußsohle von Lewis-Tieren wurden in den poplitealen Lymphknoten P1-spezifische T-Lymphozyten aktiviert, die sich nach ihrer Isolierung *in vitro* durch eine verstärkte Proliferation nachweisen lassen. Die Ergebnisse verschiedener Experimente belegen, dass sich das TCR V β -Repertoire P1-spezifischer T-Lymphozyten in den „hinteren“ Bereich des Rezeptor-Repertoires verschoben hatte. P1-spezifische, CD25⁺ T-Lymphozyten zeigten nach Restimulierung *in vitro* eine oligoklonale Verteilung der TCR V β -Elemente 8.3, 15 und 16. Die Ergebnisse bestätigen weitestgehend die Daten von Sitaru et. al. (2002).

Auch aus klinischem Biopsiematerial akuter oder chronisch abgestoßener Nieren wurden T-Lymphozyten isoliert, die eine Dominanz bestimmter TCR V β -Elemente auswiesen (Barth C et al., 1996). Trotz seiner Spezifität verfügt der T-Zellrezeptor aber auch über eine ausgeprägte Kreuzreaktivität. Danach können

T-Zell-Rezeptoren mit unterschiedlichen CDR3-Regionen das gleiche Antigen bzw. T-Zell-Rezeptoren mit identischer CDR3-Region unterschiedliche Antigene erkennen. Dabei korreliert die Affinität des Rezeptors zum Antigen mit dem Grad der T-Zellaktivierung (Schodin BA et al., 1996). So berichteten Matsutani et al. 2003, dass Patienten, bei denen eine klonale Expansion von weniger als vier TCR V β -Gensegmenten nachgewiesen wurde, eine stabile Transplantatfunktion zeigten. Wurde hingegen eine klonale Expansion von mehr als vier TCR V β -Gensegmenten nachgewiesen, so verschlechterte sich die Prognose für die Transplantatfunktion und Abstoßungen wurden vermehrt beobachtet. Somit wäre möglicherweise der Nachweis einer begrenzten klonalen Expansion von TCR V β -Elementen ein guter Indikator zur Erkennung stabiler Transplantatfunktion (Alvarez CM et al., 2005). In weiterführenden Analysen ist zu zeigen, ob es sich hierbei wirklich um einen geeigneten Marker handelt.

7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde das TCR V β -Repertoire alloreaktiver T-Lymphozyten charakterisiert. Hierzu wurden P1-spezifische CD4⁺ T-Lymphozyten mehrfach *in vitro* restimuliert, um festzustellen, welche T-Zellklone sich „durchsetzen“, d.h. welche V β -Elemente eine hohe Affinität zum Peptidantigen aufweisen. Das Repertoire wurde nach zweimaliger *in vitro*-Stimulierung antigenspezifischer T-Lymphozyten oligoklonal und T-Lymphozyten mit solchen T-Zellrezeptor-Subtypen, bei denen die Beta-Kette 8.3, 15, 16 und 20 überrepräsentiert waren, wurden nachgewiesen. Die Identifizierung solcher T-Zellsubpopulationen ist Grundlage dafür, in weiterführenden Arbeiten ihre Bedeutung bei der Transplantatabstoßung zu untersuchen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen stellen eine wesentliche Voraussetzung dar, um P1-spezifische T-Zellklone zu etablieren.

In einem nächsten Schritt sollte die Länge der dritten hypervariablen Region auf der β -Kette (Abb. 1.2) untersucht werden. Diese ist sehr variabel und für die Antigenerkennung verantwortlich. Hierzu ist die Methode des „CD3 size spectratyping“ sehr gut geeignet (Pannetier C et al., 1995). Im Gegensatz zu den beiden anderen hypervariablen Regionen CDR1 und CDR2, ist CDR3 im Bereich V β -D β -J β lokalisiert. Bei Verknüpfung der Gensegmente kommt es zudem zur Insertion bzw. Deletion von Nukleotiden, wodurch die Variabilität der hypervariablen Region noch verstärkt wird. Mit dieser Methode ließe sich die P1-vermittelte klonale Expansion der TCR V β -Subtypen 8.3, 15, 16 und 20 weiter untersuchen.

8 Zusammenfassung

Die Organtransplantation stellt ein therapeutisches Verfahren für Patienten mit irreversibel geschädigten Organen dar. Doch weist dieses Behandlungskonzept weiterhin einen wesentlichen Nachteil auf: noch immer wird der langfristige Erfolg der Therapie zu oft durch die so genannte Transplantatabstoßung gefährdet. Hierbei handelt sich um eine vom Organtransplantat ausgelöste Immunantwort, die zu dessen Zerstörung führt. Die derzeit einzige Möglichkeit eine Abstoßung zu verhindern, ist die Unterdrückung des Immunsystems mit so genannten Immunsuppressiva. Auch wenn diese erstmals in den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts erfolgreich eingesetzten Medikamente ständig verbessert werden, bleiben die von ihnen ausgelösten Nebenwirkungen weiterhin ein ernstzunehmendes Problem. Sie unterdrücken die gesamte körpereigene Abwehr, was zum Schutz der Organtransplantate vor Abstoßung gewünscht ist, doch fördern sie hierdurch die Entstehung von Tumoren und Infektionen.

Bei der Transplantatabstoßung handelt es sich um eine von CD4⁺ T-Lymphozyten ausgelöste Immunantwort. Diese Lymphozyten werden von allogenen Peptiden, die von Spender-MHC-Molekülen stammen, über den indirekten Weg der Alloantigenerkennung aktiviert. An der Transplantatabstoßung ist zwar eine Vielzahl von Alloantigenen beteiligt, doch ist es möglich, Peptidantigene zu identifizieren, die einen nachweisbaren Effekt auf die Transplantatabstoßung ausüben. So wurde in der eigenen Arbeitsgruppe die für die Abstoßung allogener Organtransplantate beteiligten MHC (RT1^u)-Peptidantigene charakterisiert. Insbesondere die Bedeutung des aus 19 Aminosäuren bestehenden allogenen Peptids P1 für die Alloimmunantwort wurde intensiv untersucht. So weisen P1-spezifische T-Lymphozyten ein ausgeprägtes Th1-Cytokin-Muster auf und beschleunigen die Abstoßung von Wistar-Furth-Organtransplantaten in Lewis-Ratten.

Das Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des T-Zellrezeptor V β -Repertoires P1-spezifischer T-Lymphozyten mit der Methode des PCR-ELISA. In einem ersten Schritt wurden Thymozyten und T-Lymphozyten unterschied-

licher Lymphknotenstationen untersucht. Thymozyten exprimierten alle 22 TCR V β -Elemente und einzig TCR V β 14 war überrepräsentiert. Die T-Lymphozyten der cervikalen, mesenterialen, iliakalen und poplitealen Lymphknoten zeigten ebenfalls eine charakteristische Überexpression bestimmter TCR V β -Elemente. So exprimierten cervikale T-Lymphozyten bevorzugt die TCR V β -Elemente 2, 6, 8.3 und 16, mesenteriale T-Lymphozyten die TCR V β -Elemente 2, 4, und 8.1, illiakale T-Lymphozyten die TCR V β -Elemente 2 und 6 und popliteale T-Lymphozyten die TCR V β -Elemente 2, 4 und 9. Die Immunisierung mit dem nicht-immunogenen Kontrollpeptid (Autoantigen) Ac führte zu einer leichten Veränderung des T-Zellrezeptor-Repertoires, bei der die TCR V β -Elemente 14 und 16 überexprimiert waren. Das Adjuvant TiterMax beeinflusste kaum das TCR V β -Repertoire.

Die Immunisierung mit dem allogenen Peptid P1 führte zu einer eindeutigen Beeinflussung des T-Zellrezeptor-Repertoires. Popliteale T-Lymphozyten, die 7 Tage nach Immunisierung analysiert wurden, zeigten ein Repertoire, bei dem die TCR V β -Elemente 15, 16, 17 und 20 überexprimiert waren. Dieses Repertoire war am Tag 3 nach Immunisierung noch nicht so ausgebildet. Wurden die antigenspezifischen T-Lymphozyten nach ihrer Isolierung mit P1 *in vitro* restimuliert, so waren in diesem T-Zellrezeptor-Repertoire die TCR V β -Elemente 8.3, 15, 16 und 20 überexprimiert. Zum Vergleich: in naiven T-Lymphozyten waren die V β -Elemente 2, 4 und 9 überexprimiert. Damit war es zu einer deutlichen Verschiebung im T-Zellrezeptor-Repertoire antigenspezifischer T-Lymphozyten gekommen, die auf das Peptidantigen P1 zurückzuführen ist.

Mit der Methode des PCR-ELISA wurde das T-Zellrezeptor-Repertoire antigenspezifischer T-Lymphozyten bestimmt. Hiermit sind wesentliche Voraussetzungen geschaffen worden, um T-Zellklone zu etablieren und ihre Bedeutung für die Transplantatabstoßung genauer zu untersuchen.

9 Literaturverzeichnis

Acha-Orbea H, Mitchell DJ, Timmermann L, Wraith DC, Tausch GS, Waldor MK, Zamvil SS, McDevitt HO, Steinman L. Limited heterogeneity of T cell receptors from lymphocytes mediating autoimmune encephalomyelitis allows specific immune intervention. *Cell* 1988; 54: 263-273.

Agadjanyan MG, Kim JJ, Trivedi M, Wilsin D, Monzavi-Karbassi B, Morrison LD, Nottingham LK, Dentchev T, Tsai A, Dang K, Chalian AA, Maldonado MA, Williams WV, Weiner DB. CD28 (B7.2) can function to drive MHC-restricted antigen-specific CTL responses in vivo. *J Immunol* 1999; 162: 3417-3427.

Alcaron B, Regueiro JR, Arnaiz-Villena A, Terhorst C. Familial defect in the surface expression of the T-cell receptor-CD3 complex. *N Engl J Med* 1988; 319: 1203-1208.

Alvarez CM, Opelz G, Giraldo MC, Pelzl S, Renner F, Weimer R, Schmidt J, Arbeláez M, García LF, Süsal C. Evaluation of T cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. *Am J Transpl* 2005; 5: 746-756.

Arnaiz-Villena A, Timon M, Corell A, Perez-A ciego P, Martin-Villa JM, Regueiro JR. Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *N Engl J Med* 1992; 327: 529-533.

Arnaiz-Villena A, Timon M, Rodriguez-Gallego C, Iglesias-Cassarubios P, Pacheco A, Regueiro JR. T lymphocyte signalling defects and immunodeficiency due to the lack of CD3 gamma. *Immunodeficiency* 1993; 4: 121-129.

Auchincloss H, Lee R, Shea S, Markowitz JS, Grusby MJ, Glimcher LH. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class-II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 3373-3377.

Auchincloss H, Sultan H. Antigen processing and presentation in Transplantation. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 681-687.

Banèr J, Marits P, Nilsson M, Winqvist O, Landegren U. Analysis of T-cell receptor V beta gene repertoires after immune stimulation and in malignancy by use of padlock probes and microarrays. *Clin Chem* 2005; 51: 768-775.

Barth C, Von Menges A, Zanker B, Lammerding P, Stachowski J, Baldamus CA. Restricted T cell V beta repertoire in renal allografts during acute and chronic rejection. *Kidney Int* 1996; 50: 2020-2026.

Bjorkman PJ, Saper Ma, Samroui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 1987; 329: 506-512.

Bolton EM, Gracie JA, Briggs JD, Kampinga J, Bradley JA. Cellular requirements for renal allograft rejection in the athymic nude rat. *J Exp Med* 1989; 169: 1931-1946.

Breit T, Van Dongen J. Unravelling human T-cell receptor junctional region sequences. *Thymus* 1994; 22: 177-199.

Bröker B, Korthäuser U, Heppt P, Weseloch G, De La Camp R, Kroczeck R, Emmrich F. Biased T cell receptor V gene usage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1234.

Brouard S, Vanhove B, Gagne K, Neumann A, Douillard P, Moreau A, Cuturi C, Souillou JP. T cell repertoire alterations of vascularized xenografts. *J Immunol* 1999; 162: 3367-3377.

- Bucht A**, Oksenberg JR, Lindblad S, Gronberg A, Steinman L, Klareskog L. Characterisation of T-cell receptor α - β repertoire in synovial tissue from different temporal phases of rheumatoid arthritis. *Scand J Immunol* 1992; 35: 159-165.
- Chowdhury NC**, Saborio DV, Garrovillo M, Chandraker A, Magee CC, Waaga AM, Sayegh MH, Jin MX, Oluwole SF. Comparative studies of specific acquired systemic tolerance induced by intrathymic inoculation of a single synthetic Wistar-Furth (RT1^U) allo MHC class I (RT1.A^U) peptide or WAG (RT1.^U)-derived class I peptide. *Transplantation* 1998; 66: 1059-1066.
- Clarkson MR**, Sayegh MH. T-cell costimulatory pathways in allograft rejection and tolerance. *Transplantation* 2005; 80: 555-563.
- Cobbold SP**. New trends in immunosuppression. *Int Immunopharmacol* 2005; 5: 1-5.
- Dechanet J**, Merville P, Lim A, Retiere C, Pitard V, Lafarge X, Michelson S, Meric C, Hallet MM, Kourilsky P, Potaux L, Bonneville M, Moreau JF. Implication of gammadelta T cells in the human immune response to cytomegalovirus. *J Clin Invest* 1999; 103: 1437-1449.
- Douillard P**, Pannetier C, Josien R, Menoret S, Kourilsky P, Souillou JP, Cuturi MC. Donor-specific blood transfusion-induced tolerance in adult rats with a dominant TCR-Vbeta rearrangement in heart allografts. *J Immunol* 1996; 157: 1250-1260.
- Dufour V**, Arnauld C, Lantz O, Peguillet I, Morvilliers K, Emmanuel A, Jestin A. Quantification of porcine cytokine gene expression using RT-PCR, a homologous internal control and chemiluminescence for microplate detection. *J Immunol Methods* 1999; 229: 49-60.
- Fasso M**, Anandasabapathy N, Crawford F, Kappler J, Fathman CG, Ridgway WM. T cell receptor (TCR)-mediated repertoire selection and loss of TCR Vbeta diversity during the initiation of a CD4(+) T cell response in vivo. *J Exp Med* 2000; 192:1719-1730.
- Fulcher DA**, Lyons AB, Korn SL, Cook MC, Koleda C, Parish C, Fazekas de St Groth B, Basten A. The fate of self-reactive B cells depends primarily on the degree of antigen receptor engagement and availability of T cell help. *J Exp Med* 1996; 183: 2313-2328.
- Gagne K**, Brouard S, Giral M, Sebille F, Moreau A, Guillet M, Bignon JD, Imbert BM, Cuturi MC, Souillou JP. Highly altered V beta repertoire of T cells infiltrating long-term rejected kidney allografts. *J Immunol* 2000; 164: 1553-1563.
- Game DS**, Lechler RI. Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 2002; 10: 101-108.
- Gett AV**, Hodgkin PD. Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9488-9493.
- Gorantla VS**, Barker JH, Jones JW, Prabhune K, Maldonado C, Granger MD. Immunosuppressive agents in transplantation: mechanisms of action and current anti-rejection strategies. *Microsurgery* 2000; 20: 420-429.
- Goronzy JJ**, Zettl A, Weyand CM. T cell receptor repertoire in rheumatoid arthritis. *Int Rev Immunol* 1998; 17: 339-363.
- Guillet M**, Brouard S, Gagne K, Sebille F, Cuturi MC, Delsuc MA, Souillou JP. Different qualitative and quantitative regulation of V beta TCR transcripts during early acute allograft rejection and tolerance induction. *J Immunol* 2002; 168: 5088-5095.
- Hall BL**, Hand SL, Alter MD, Kirk AD, Finn OJ. Variables affecting the T cell receptor V beta repertoire heterogeneity of T cells infiltrating human renal allografts. *Transpl Immunol* 1993; 1: 217-227.

- Hariharan S**, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 2000; 342: 605-612.
- Hasbold J**, Lyons AB, Kehry MR, Hodgkin PD. Cell division number regulates IgG1 and IgE switching of B cells following stimulation by CD40 ligand and IL-4. *Eur J Immunol* 1998; 28: 1040-1051.
- Haspot F**, Villemain F, Laflamme G, Coulon F, Olive D, Tiollier J, Souillou JP, Vanhove B. Differential effect of CD28 versus B7 blockade on direct pathway of allorecognition and self-restricted responses. *Blood* 2002; 99: 2228-2234.
- Holling TM**, Schooten E, Langerak AW, van den Elsen PJ. Function and regulation of MHC Class II Molecules in T-Lymphocytes: Of Mice and Men. *Human Immunol* 2004; 65: 282-290.
- Hong JC**, Kahan BD. Immunosuppressive agents in organ transplantation: past present and future. *Semin Nephrol* 2000; 20: 108-125.
- Huchenq A**, Champagne E, Sevin J, Riond J, Tkauczuck J, Mazieres B, Combon-Thomsen A, Cantagrel A. Abnormal T cell receptor BV gene expression in the peripheral blood and synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13: 29-36.
- Joly E**, Clarkson C, Howard JC, Butcher GW. Isolation of a functional cDNA encoding the RT1.A^U MHC class I heavy chain by a novel PCR-based method. *Immunogenetics* 1995; 41: 326-328.
- June CH**, Bluestone JA, Nadler LM, Thompson CB. The B7 and CD28 receptor families. *Immunol Today* 1994; 15:321-328.
- Kato M**, Ono Y, Kinukawa T, Hattori R, Kamihira O, Ohshima S. Long time follow up of CD28-CD4+ T cells in living kidney transplant patients. *Clin Transplant* 2004; 18: 242-246.
- Kirk AD**, Ibrahim S, Dawson DV, Sanfilippo F, Fin OJ. Characterisation of T cells expressing the $\gamma\delta$ antigen receptor in human renal allografts. *Hum Immunol* 1993; 36: 9-11.
- Kottenmeier S**. Immunbiologie der Transplantatabstoßung: Untersuchungen zur antigenspezifischen T-Zellaktivierung in An- und Abwesenheit antigenpräsentierender Zellen. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005.
- Kuckein O**. Charakterisierung von CD4+ CD25+ T-Regulatorzellen (Treg) der Ratte: *In vitro* Kultivierung, Cytokinprofil und regulatorische Funktion. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2005.
- Lechler RI**, Batchelor JR. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts: effect of including chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. *J Exp Med* 1982; 156: 1835-1841.
- Lechler RI**, Lomardi G, Batchelor JR, Reinsmoen N, Bach FH. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11: 83-88.
- Lee WT**, Pelletier WJ. Visualizing memory phenotype development after *in vitro* stimulation of CD4(+) T cells. *Cell Immunol* 1998; 188: 1-11.
- Lombardi G**, Sidhu S, Daly M, Betchelor JR, Makgoba W, Lechler RI. Are primary allo-responses truly primary? *Int Immunol* 1990; 2: 9-13.
- Lyons AB**, Doherty KV. *Current protocols in Cytometry* 1998; 9.11.1-9.11.9.

Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; 171: 131-137.

Lyons AB. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods* 2000; 243: 147-154.

Lyons AB. Pertussis toxin pre-treatment alters the in vivo division behaviour and survival of B lymphocytes, after intravenous transfer. *Immunol Cell Biol* 1997; 75: 7-12.

Matsutani T, Ohashi Y, Yoshioka T, Tsuruta Y, Doi H, Satomi S, Suzuki R. Skew in T-cell receptor usage and clonal T-cell expansion in patients with chronic rejection of transplanted kidneys. *Transplantation* 2003; 75: 398-407.

Matthews JB, Ramos E, Bluestone JA. Clinical trials of transplant tolerance: slow but steady progress. *Am J Transplant* 2003; 3: 794-803.

Murray JE, Merrill JP, Harrison JH. Renal homotransplantation in identical twins. *Surg Forum* 1955; 6: 432-436.

Navarette C, Bottazzo GF. In search of TCR restriction in autoreactive T-cell in human autoimmunity: why is it so elusive? *Clin Exp Immunol* 1993; 91: 189-192.

Otto C, Gasser M, Waaga-Gasser AM, Rohde AC, Lenhard M, Jost S, Gassel, HJ, Ulrichs K, Timmermann W. Prolongation of small bowel allograft survival with a sequential therapy consisting of a synthetic MHC class II peptide and temporarily low-dose cyclosporine A. *Hum Immunol* 2002; 63: 880-887.

Otto C, Ulrichs K. The immunology of allograft rejection: A survey of current knowledge and a discussion of peptide-specific anti-rejection strategies. *Transplantationsmedizin* 2004; 16: 158-171.

Pannetier C, Even J, Kourilsky P. T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples. *Immunol Today* 1995; 16: 176-181.

Ratcliffe PJ, Dudley CR, Higgins RM, Firth JD, Smith B, Morris PJ. Randomised controlled trial of steroid withdrawal in renal transplant recipients receiving triple immunosuppression. *Lancet* 1996; 348: 643-648.

Regueiro JR, Arnaiz-Villena A, Ortiz de Landazuri M, Martin-Villa JM, Vicario JL, Pascual-Ruiz V, Guerra-Garcia F, Alcami J, Lopez-Botet M, Manzanares J. Familial defect of CD3 (T3) expression by T cells associated with rare gut epithelial cell autoantibodies. *Lancet* 1986; 1: 1274-1275.

Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001; 1: 97-102.

Sayegh MH, Turka LA. The role of T cell costimulatory activation in transplant rejection. *N Engl J Med* 1998; 338: 1813-1821.

Schodin BA, Tsomides TJ, Kranz DM. Correlation between the number of T cell receptors required for T cell activation and TCR-ligand affinity. *Immunity* 1996; 5:137-146.

Scotter JM, Chambers ST. Comparison of galactomannan detection, PCR-enzyme-linked immunosorbent assay, and real-time PCR for diagnosis of invasive aspergillosis in a neutropenic rat model and effect of caspofungin acetate. *Clinical Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1322-1327.

Seguardo OG, Schendel DJ. Restricted TCR repertoire and disease. *Immunol Today* 1993a; 14: 45.

- Seguardo OG**, Schendel DJ. Identification of predominant T-cell receptor rearrangements by temperature-gradient gel electrophoresis and automated DNA sequencing. *Electrophoresis* 1993b; 14: 747-52.
- Seth A**, Stern LJ, Ottenhoff TH, Engel I, Owen MJ, Lamb JR, Klausner RD, Wiley DC. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class II MHC and superantigen in vitro. *Nature* 1994; 369: 324-327.
- Shirwan H**, Barwari L, Cramer DV. Rejection of cardiac allografts by T cells expressing a restricted repertoire of T-cell receptor V beta genes. *Immunology* 1997; 90: 572-578.
- Shirwan H**, Chi D, Makowka L, Cramer DV. Lymphocytes infiltrating rat cardiac allografts express a limited repertoire of T cell receptor V beta genes. *J Immunol* 1993; 151: 5228-5238.
- Shoskes DA**, Wood KJ. Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today* 1994; 15: 32-38.
- Sitaru AG**, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. Allogeneic core amino acids of on immunodominant allopeptide are important for MHC binding and TCR recognition. *Hum Immunol* 2004; 65: 817-825.
- Sitaru AG**, Timmermann W, Ulrichs K, Otto C. Hierarchical Immunogenicity of Donor MHC Class I Peptides in Allotransplantation, *Human Immunol* 2002; 63: 871-879.
- Sitaru AG**. Modulation of the T cell response with MHC class I peptides and their analogues: perspectives for an antigen-specific therapy in transplantation, Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg 2003.
- Spits H**, Paliard X, Vandekerckhoven Y, von Vlasselaer P, de Vries JE. Functional and phenotypic differences between CD4⁺ and CD4⁻ T-cell-rezeptor-gamma delta clones from peripheral blood. *J Immunol* 1991; 147 (4): 1180-1188.
- Suchin EJ**, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells in vivo: new answers to an old question. *J Immunol* 2001; 166: 973-981.
- Turner SJ**, Doherty PC, McCluskey J, Rossjohn J. Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat Rev Immunol* 2006; 6: 883-894.
- Ulbrich M**. Die Rolle von T-Lymphozyten und Makrophagen bei der Abstoßung allogener Nebenschilddrüsentransplantate. Inaugural-Dissertation der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, 2007.
- van den Berg TK**, Puklavec MJ, Barclay AN, Dijkstra CD. Monoclonal antibodies against rat leukocyte surface antigens. *Immunol Rev* 2001; 184: 109-116.
- VanderBorgh A**, van der Aa A, Geusens P, Vandevyver C, Raus J, Stinissen P. Identification of overrepresented T-cell receptor genes in blood and tissue biopsies by PCR-ELISA. *J Immunol Meth* 1999; 223: 47-61.
- Vandevyver C**, Mertens N, van den Elsen P, Medaer R, Raus J, Zhang J,. Clonal expansion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis: restricted T cell receptor V gene rearrangements and CDR3 sequence. *Eur J Immunol* 1995; 25: 958-968.
- Walz MK**, Albrecht KH, Niebel W, Eigler FW. De novo malignant tumors during drug immunosuppression. The finding following 1245 cadaveric kidney transplants in 1080 patients. *Dtsch Med Wochenschr* 1992; 117: 927-934.

Wells AD, Gudmundsdottir H, Turka LA. Following the fate of individual T cells throughout activation and clonal expansion. Signals from T cell receptor and CD28 differentially regulate the induction and duration of a proliferative response. *J Clin Invest* 1997; 100: 3173-3183.

Zagon G, Tumans JR, Li Y, Friedman SM, Crow MK. Increased frequency of V β 17⁺ T- cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 1431-1440.

Zamvil S, Nelson P, Trotter J, Mitchell D, Knobler R, Fritz R, Steinman L. T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 1985; 317: 355-358.

Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251: 547-548.

Abbildungungsverzeichnis

- Abb. 1.1 Abbildung der eigenen Arbeitsgruppe (Dr. A.G. Sitaru)
- Abb. 1.2 Abb. 1.2 A selbst erstellt (PowerPoint),
Abb. 1.2 B aus Janeway C, Travers P et al. „Immunobiology“.
Lehrbuch der Immunologie, Aufl. 5, 2001, Seite 107, Abb. 3.13 A.
- Abb. 3.1 Abbildung der eigenen Arbeitsgruppe (Dr. C. Otto)
- Abb. 3.2 }
Abb. 3.3 } Selbst erstellt (PowerPoint)
Abb. 3.4 }
- Abb. 3.5 Verändert nach Björkman PJ et al. *Nature* 1987, 329: 506
- Abb. 4.1 - 4.3 Selbst erstellt (Excel, PowerPoint, WinMDI)
- Abb. 4.4 Selbst am Mikroskop mit Digitalkamera photographiert
- Abb. 4.5 - 4.7 Selbst erstellt (Excel, PowerPoint, WinMDI)
- Abb. 4.8 Abbildung der eigenen Arbeitsgruppe (Dr. C. Otto)
- Abb. 4.9 - 4.13 Selbst erstellt (Excel, Power Point, WinMDI)
- Abb. 4.14 Abbildung mit der Software der Echtzeit PCR-Maschine DNA
Engine Cycler MJ Research des Unternehmens BioRad
Laboratories GmbH, München, erstellt
- Abb. 4.15, 4.17, }
4.19 - 4.22, } Selbst erstellt (Excel)
4.24 - 4.29 }
- Abb. 4.16, 4.18, }
4.23 } Selbst erstellt (ImageMaster UDS)
- Abb. 4.30 Selbst mit Digitalkamera aufgenommen
-

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Prof. h.c. A. Thiede danke ich sehr für die Bereitstellung finanzieller Mittel zur Fertigstellung der vorliegenden Arbeit und für die Übernahme des Korreferates. Frau Dr. rer. nat. K. Ulrichs, Leiterin der Experimentellen Transplantations-Immunologie, danke ich für den hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatz im Forschungsbereich der Chirurgischen Klinik I.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. C. Otto für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung während der experimentellen Phase, sowie der hervorragenden Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit. Die anregenden Diskussionen zu vielfältigen immunologischen Fragestellungen, seine Geduld, sein Einsatz und seine moralische sowie praktische Unterstützung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Eine große Hilfe war zudem, dass er jeder Zeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand.

Ebenfalls sehr herzlich bedanken möchte ich mich bei Frau M. Koospal, Frau Ch. Lesch, Frau M. Schneider und Frau B. Schneiker, Technische Assistentinnen im Bereich der Experimentellen Transplantations-Immunologie, sowie bei allen weiteren Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern, Kolleginnen und Kollegen für ihre überaus nette und kompetente Unterstützung.

Lebenslauf

Name: Tünde Kerteß
Geburtsdatum: 01.02.1978
Geburtsort: Sathmar/ Rumänien
Religion: römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit: deutsch

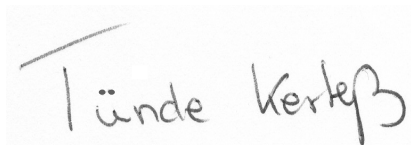
1984-1988 Grundschole in Sathmar (Ungarischer Zweig)
1988 Gymnasium Nr. 10 in Sathmar
1989-1998 Matthias- Grönewald- Gymnasium in Tauberbischofsheim
Juli 1998 Abitur

April bis Juni 1999 Beginn der Ausbildung zur Krankenschwester
Juli 1999 bis Sept. 2000 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
Okt. 2000 Julius Maximilians-Universität Würzburg
März 2002 Physikum
März 2003 1. Staatsexamen
Sept. 2005 2. Staatsexamen

Sept. 05 bis Jan. 06 Praktisches Jahr in der Inneren Medizin des Kantospitals Luzern, Schweiz
Feb. 06 bis Mai 06 Praktisches Jahr in der Chirurgischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Würzburg
Mai 06 bis Sept. 06 Praktisches Jahr im Wahlfach Pädiatrie an der Universitätskinderklinik Würzburg
09. Nov. 2006 3. Staatsexamen

Nov. 2006 bis April 2007 Assistenzärztin der SHG-Kinderklinik Merzig
seit 16. April 2007 Assistenzärztin der SHG-Kinderklinik Idar-Oberstein

Würzburg, 13.04.07



Tünde Kerteß
