Universitätsklinikum Ulm
Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. G. Adler
Sektion Endokrinologie
Sektionsleiter: Prof. Dr. B. O. Böhm

T-Zellrezeptor-Bestimmung von proinsulinspezifischen T-Zell-Linien beim Typ-1-Diabetes

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Judith Gadesmann
aus
Esslingen am Neckar
2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernhard O. Böhm

2. Berichterstatter: PD Dr. Holger Cario

Tag der Promotion: 10.06.2011

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS III

1. EINLEITUNG

1.1 Typ-1-Diabetes 1

1.2 Autoimmunität 1

1.3 Potentielle Autoantigene 3

1.4 Th1- und Th2-Antwort 3

1.5 Aufbau und Funktion des T-Zell-Rezeptors 4

1.6 MHC und HLA-Assoziation 7

1.7 Unterschiede in den Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen 7

1.8 Zielsetzung 9

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material 10

2.1.1 Patientenproben 10

2.1.2 Proben des CMV-positiven Probanden 11

2.1.3 Proben von Kontrollpersonen 12

2.1.4 Antigene 12

2.2 Methoden 12

2.2.1 Isolierung von PBMC 12

2.2.2 T-Zell-Kultivierung 13

2.2.3 Ribonukleinsäure- (RNA-) Isolierung mit Rnazol®BD 13

2.2.4 cDNA-Synthese 14

2.2.5 Die Polymerasekettenreaktion (PCR) 15

2.2.6 Auswertung auf dem Agarose-Gel 18

2.2.7 Nested PCR 19

2.2.8 Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) 19

2.2.9 Konzentrationsvergleich mit Cyclophilin 22

2.2.10 Fragmentlängenanalyse 22

2.2.11 Sequenzierung der CDR3-Region 24
2.2.12 Titrationsreihen 29
2.2.13 Magnetische Zelltrennung 29
2.2.14 Cytokine Secretion Assay 29
2.2.15 Durchflusszytometrie (FACS) 31

3. ERGEBNISSE
3.1 TZR-Amplifikation der Vα- und Vβ-Familien mit der PCR 33
3.2 T-Zellrezeptor-Analyse der T-Zell-Linien 37
3.3 Nachweisbarkeit der TZR der proinsulinspezifischen T-Zell-Linien in PBMC 39
3.3.1 PCR (SD32.5) 39
3.3.2 RTQ-PCR mit SYBR Green (SD32.5) 39
3.3.3 RTQ-PCR (TaqMan®) mit Sonden 40
3.3.4 Nested PCR mit anschließender RTQ-PCR mit Sonde (SD32.5) 43
3.3.5 Cytokine Secretion Assay mit PBMC des Diabetes-Patienten (SD52c1) 43
3.4 Nachweisbarkeit der TZR der CMV-spezifischen T-Zell-Linien in PBMC
3.4.1 RTQ-PCR (TaqMan®) mit Sonden 45
3.4.2 Cytokine Secretion Assay mit PBMC des CMV-positiven Probanden 46

4. DISKUSSION 49
4.1 Vergleich der angewandten Methoden 49
4.2 Nachweisbarkeit von spezifischen T-Zellen in der Literatur 53
4.3 Nachweisbarkeit von spezifischen TZR in der vorliegenden Arbeit 55
4.4 Schlussfolgerung 57

5. ZUSAMMENFASSUNG 59

6. LITERATURVERZEICHNIS 61

ANHANG 66

DANKSAGUNG 67

LEBENSLAUF 68

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
APC	antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
BP	Basenpaarmarker
BSA	bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CD	cluster of differentiation
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDR	complementary determining regions
CMV	Cytomegalievirus
CSR	cycle sequencing reaction
D	Diversitätsgensegment
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ELISPOT	enzyme-linked immuno spot assay
FACS	fluorescence activated cell sorting
FAM	blauer Fluoreszenzfarbstoff des Primers der C-Region
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
GAD65	Glutamatdecarboxylase 65
HLA	humane Leukozytenantigene
IA-2	Tyrosinphosphatase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
J	joining (bindendes) Gensegment
LDA	limiting dilution assay
MACS	magnetic cell sorting
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex

mRNA	messenger RNA
NOD	non obese diabetic
PBMC	periphere Blutmonozyten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	peridinin chlorophyll protein
pH	potentia hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RTQ-PCR	real-time quantitative Polymerasekettenreaktion
SOC	Standardmedium zur Transformation
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TET	grüner Fluoreszenzfarbstoff des Primers der C-Region
Taq	Thermus aquaticus
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T-Zell-Rezeptor
T1D	Typ-1-Diabetes
U	Uracil
V	variables Gensegment
Vα	variable α-Familie des TZR
Vβ	variable β-Familie des TZR
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-b-D-Galactopyranosid

1. EINLEITUNG

1.1 Typ-1-Diabetes

Der Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine chronische Stoffwechselerkrankung. Bei der Entstehung spielen multiple genetische und umweltbedingte Faktoren eine Rolle. Es findet eine Autoimmunreaktion gegen verschiedene β-Zell-Autoantigene statt, beginnend mit einer zellulären Infiltration der Inselzellen durch CD4- und CD8-positive T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (Katz et al. 1995, Kolb et al. 1997). Wenn die Langerhansschen Inseln vollständig infiltriert sind, werden bei den meisten der prädiabetischen Patienten Autoantikörper gegen Inselzellantigene wie Insulin, Glutamatdecarboxylase 65 (GAD65) und Tyrosinphosphatase (IA-2) nachweisbar. Autoaggressive T-Zellen beginnen, die insulinproduzierenden β-Zellen des Pankreas selektiv zu zerstören. Klinische Symptome wie Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust treten auf, wenn ungefähr 90% der β-Zellen funktionsunfähig sind und damit ein absoluter Insulinmangel auftritt (Sun et al. 1974, Kerner et al. 2008).

1.2 Autoimmunität

Im Thymus findet die zentrale Kontrolle der Toleranzvermittlung statt. T-Zellen, deren Rezeptoren körpereigene Antigene erkennen, werden apoptotisch; dieser Prozess wird als negative Selektion bezeichnet. Während der positiven Selektion werden die T-Zellen ausgewählt, die körpereigene Haupthistokompatibilitäskomplex- (MHC-) Moleküle erkennen können. Wenn reife T-Zellen den Thymus verlassen, haben sie also nur wenig oder keine Affinität zu körpereigenen Antigenen, aber selbstverständlich können autoreaktive Zellen der negativen Selektion auch entgehen (Rose 2002). Autoreaktivität ist also ein normaler Teil des Immunsystems; Autoantikörper und autoreaktive T-Zellen kommen bei allen Individuen vor. In der Literatur wurden autoreaktive T-Zellen bei Gesunden beschrieben, beispielsweise regulatorische Interleukin (IL)-10-sezernierende T-Zellen, die körpereigene Antigene erkannten (Arif et al. 2004). Die potentiell

autoaggressiven T-Zellen werden im gesunden Organismus von sekundären Systemen kontrolliert und ignorieren deshalb in der Regel das Zielgewebe. Einer von vielen Kontrollmechanismen ist z. B. die klonale Anergie; sie tritt auf, wenn eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen zwar erkennt, aber notwendige kostimulatorische Signale nicht gegeben werden (Kamradt et al. 2001).

So kann eine lokale Infiltration oder Entzündung lange Zeit toleriert werden, das Gewebe wird währenddessen nicht zerstört. Eine Autoimmunerkrankung resultiert also nicht so sehr aus Fehlern bei der Toleranz, z.B. weil autoreaktive Lymphozyten nicht eliminiert werden können, sondern aus dem Zusammenbruch der Kontrollsysteme.

Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigten, wie die Autoimmunpathogenese ablaufen kann: Es wurde eine T-Zell-Linie generiert, die auf den meisten Zellen den TZR eines Klons trug, der Pankreas-spezifische Antigene erkannte. Dabei zeigte sich keine negative Selektion im Thymus, die T-Zell-Reaktivität in der Peripherie war normal. In den ersten Wochen wurden die Langerhansschen Inseln nicht infiltriert, obwohl potentiell aggressive T-Zellen in großer Anzahl im Immunsystem zirkulierten. Nach einigen Wochen folgte eine Insulitis. Dennoch konnten intakte β-Zellen noch persistieren, klinisch manifestierte sich der Diabetes erst Wochen später (Katz et al. 1993). TZR-transgene T-Zellen ignorieren also die Inselzellen wochenlang und infiltrieren sie sehr rasch. Eine ähnliche Verzögerung bei non obese diabetic (NOD-) Mäusen wurde bisher damit erklärt, dass autoreaktive Zellen erst rekrutiert und aktiviert werden müssen; bei T-Zell-Rezeptor- (TZR-) transgenen Mäusen mit ihrem schon bestehenden Repertoire kann das nicht der Fall sein (André et al. 1996).

Verschiedene Mechanismen wie z. B. molekulares Mimikry, d. h. die Ähnlichkeit eines infektiösen Agens mit körpereigenen Molekülen, könnten die Ursache dafür sein, dass die autoreaktiven T-Zellen im Sinne einer Kreuzreaktion plötzlich aktiv werden (Snell et al. 1976, Atkinson et al. 1994, Rose 2002). Eine autoimmune Infiltration kann durch eine Virusinfektion provoziert werden (Bach 2005). Allerdings könnte hier auch neben einem molekularen Mimikry die Tatsache eine Rolle spielen, dass durch die Infektion notwendige kostimulatorische Signale gegeben werden, die die Anergie der T-Zellen aufheben.

Beim Typ 1-Diabetes trägt wahrscheinlich ein Defekt der Suppressorzellen, der so genannten regulatorischen T-Zellen, auch im Zusammenhang mit einem Th_1/Th_2-Ungleichgewicht, zu einem Verlust der Toleranz bei, indem die anti-β-Zell-Immunantwort verstärkt wird (Bach 1994). Auch die Präsentation eines Superantigens durch Mikroorganismen könnte bei einer Infektion eine Autoimmunantwort begünstigen (Rose

2002). Auf der anderen Seite wird postuliert, dass Infektionen auch einen protektiven Effekt auf Autoimmunerkrankungen haben könnten (Bach 2005).

1.3 Potentielle Autoantigene

Körpereigene Antigene, die von autoreaktiven T-Zellen erkannt werden, heißen Autoantigene. Potentielle Autoantigene lassen sich von organspezifischen Antigenen wie GAD65, IA-2, Insulin, Proinsulin und Präproinsulin herleiten. Peptide dieser Autoantigene werden in den antigenpräsentierenden Zellen prozessiert und dann den T-Zellen durch MHC-/ Humane Leukozytenantigene- (HLA-) Moleküle präsentiert, wodurch ein Signal „Selbst“ plus Autoantigen vermittelt wird. Bei T1D-Patienten konnten Autoantikörper z. B. gegen Insulin schon vor Manifestation der Erkrankung im Serum nachgewiesen werden (Böhm et al. 1991, Strebelow et al. 1999). Auch bei der Zytokinsekretion wurden nach Stimulation von T-Zellen mit Autoantigenen wie Proinsulin- und IA-2-Peptiden signifikante Unterschiede zwischen T1D-Patienten und gesunden Kontrollen festgestellt (Arif et al. 2004).

Auf den β-Zellen des Pankreas werden nur kleine Teile des Proinsulin-Moleküls, so genannte Epitope, exprimiert. Es wurden bereits mehrere Epitope beschrieben, die beim Menschen immunodominant zu sein scheinen, d. h. eine Autoimmunreaktion auslösen können (Alleva et al. 2001), unter anderem das Peptid C18-A1 (Durinovic-Bello et al. 2002).

Die Immunantwort kann sich intramolekular innerhalb des Autoantigens und auch intermolekular auf Epitope anderer Autoantigene der β-Zellen ausbreiten (spreading).

1.4 Th1- und Th2-Antwort

1.4.1 Inflammatorische und regulatorische Th-Zellen beim Menschen

Cluster-of-differentiation- (CD-) 4-positive T-Zellen unterteilt man in aggressive Th1- und putativ regulatorische Th2-Zellen, die sich durch ihre Zytokinproduktion unterscheiden. Naive CD4-positive Zellen können sich abhängig vom während ihrer Aktivierung vorherrschenden Zytokinmilieu in Th1- oder in Th2-Effektorzellen differenzieren (Katz et al. 1995). Die Th1-Antwort besteht in der Sekretion von Interferon γ, Tumornekrosefaktor

(TNF) α oder IL-2 (Campbell 1991, Rothe 1994); bei der Th2-Antwort werden IL-4, -5 oder -10 produziert (Mueller 1996, Rabinovitch 1994). Beispielsweise können IL-10-sezernierende T-Zellen die Proliferation von Th1-Zellen supprimieren, während sie selbst durch eine IL-2-Zugabe gehemmt werden (Jonuleit et al. 2000). Für eine Immuntherapie des T1D beim Menschen müssten Th1-Klone in Th2-Zellen modifiziert werden, es müsste also eine Umwandlung von inflammatorischen in regulatorische Zellen stattfinden. Bei Katz et al. (1995) konnten Th2-Zellen eine Diabetesentwicklung jedoch nicht verhindern, auch wenn sie in der neunfachen Zahl gegenüber Th1-Zellen vorlagen.

1.4.2 Th1- und Th2-Antwort im Tiermodell

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die Funktion der regulatorischen Th-Zell-Subpopulation bei der Entstehung eines T1D gestört ist. Eine Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der Th1-Zellen löst die β-Zellzerstörung im Pankreas durch Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aus. Durch die Injektion des Peptids p277 bei NOD-Mäusen konnten Ablamunits et al. (1998) eine Reduzierung der Zahl der Interferon (IFN)-γ-sezernierenden Insel-T-Zellen auslösen und damit die Entwicklung eines T1D stoppen. Dabei fand ein Wechsel von einer proinflammatorischen Th1- zu einer antiinflammatorischen Th2-Autoimmunität statt.

1.5 Aufbau und Funktion des T-Zell-Rezeptors

Beim TZR handelt es sich um ein Zelloberflächenprotein, das für die Antigenerkennung verantwortlich ist. Voraussetzung für die Erkennung von Antigenfragmenten ist deren Präsentation auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APC). Die Präsentation der Peptide erfolgt durch Proteine, die zum MHC gehören. In Abbildung 1 ist die MHC-Peptid-TZR-Bindung schematisch dargestellt.

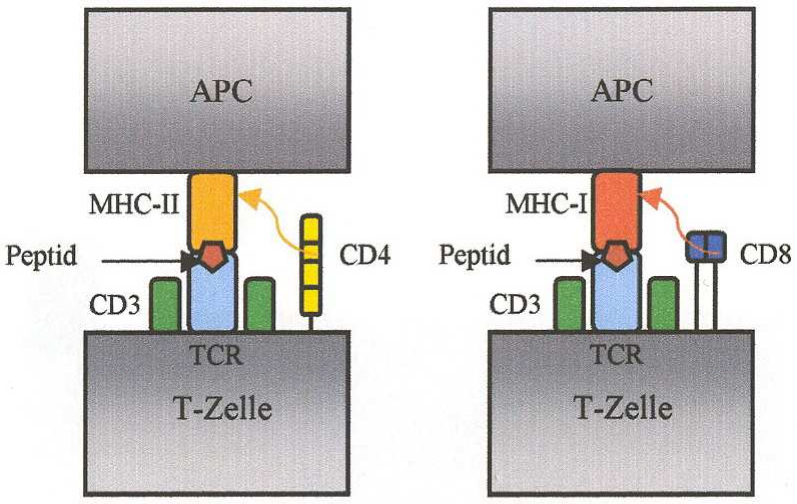


Abbildung 1: MHC-Peptid-TZR-Bindung

Der von einer APC präsentierte MHC-II-Peptid-Komplex wird vom TZR einer CD4-positiven T-Zelle erkannt (links), der MHC-I-Peptid-Komplex vom TZR einer CD8-positiven T-Zelle (rechts). Die Korezeptormoleküle CD4 und CD8 binden an das MHC-II-Molekül bzw. an das MHC-I-Molekül und steigern so die Empfindlichkeit der T-Zelle für das Antigen. Durch die Komplexbildung des TZR mit dem jeweiligen Korezeptor wird dann eine Kaskade von Signalreaktionen im Inneren der T-Zelle ausgelöst. Zum TZR-Komplex gehören auch die drei CD3-Proteine γ, δ und ε, die ebenfalls für die Signaltransduktion zuständig sind und außerdem für den Transport des TZR an die Zelloberfläche sorgen.

Abkürzungen: APC, antigenpräsentierende Zelle; MHC, Haupthistokompatibilitätskomplex; TZR / TCR, T-Zell-Rezeptor; CD, cluster of differentiation.

Kommt es zu einer Antigenerkennung, so expandiert die T-Zelle zu einem Klon; alle Zellen dieses Klons exprimieren dann den gleichen TZR. Der TZR ähnelt in seiner Struktur den Immunglobulinen; anders als diese wird er jedoch nicht sezerniert. Er besteht aus den beiden Polypeptidketten α und β. Es sind auch γ/δ-TZR bekannt; diese werden aber nur auf 1-10 % der T-Zellen im peripheren Blut exprimiert und sind für die Antigenerkennung wahrscheinlich nicht relevant.

T-Zell-Rezeptoren sind durch Rearrangement einzelner variabler Genabschnitte der α- und β-Ketten in der Lage, unterschiedlichste Peptide zu binden. Dabei treten die variablen Bereiche des TZR, die „complementary determining regions“ CDR1 und 2, mit dem MHC-Molekül der antigenpräsentierenden Zellen in Kontakt. Die Vielfalt der Rezeptoren beruht jedoch vor allem auf der Hypervariabilität der CDR3-Schleifen, die das Zentrum der antigenbindenden Region bilden und mit den präsentierten Peptidelementen interagieren

(Chothia et al. 1988). Abbildung 2 zeigt die Struktur des TZR sowie die Entstehung der Hypervariabilität schematisch.

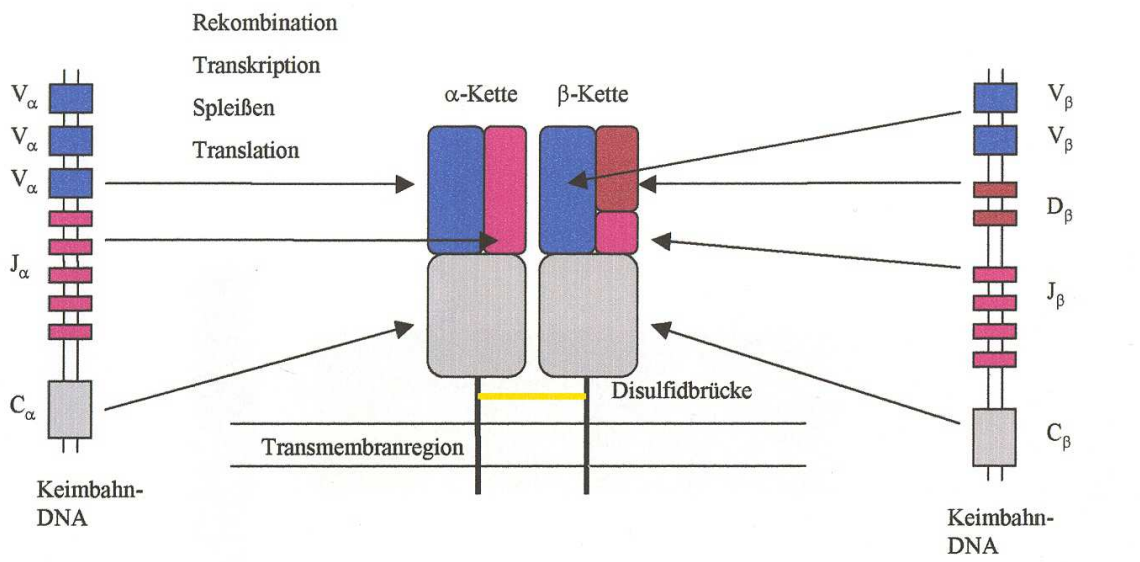


Abbildung 2: Struktur des T-Zell-Rezeptors

Der TZR besteht aus den beiden Polypeptidketten α und β, die jeweils eine N-terminale variable (blau und pink bzw. blau, rot und pink dargestellt) und eine C-terminale konstante Region (grau dargestellt) besitzen. Während der T-Zell-Reifung wird das TCRA-Gen aus den Gensegmenten V und J zusammengesetzt, das TCRB-Gen aus den Segmenten V, D und J (Williams et al. 1993). Die Hypervariabilität der CDR3-Schleifen entsteht durch V(D)J-Rekombination. Bei diesem Prozess werden V-, D- und J-Segmente zufällig kombiniert und außerdem zufällige Nukleotide, so genannte N-Sequenzen (nicht dargestellt), eingefügt (Grawunder 1998), so dass schließlich ein V-NDN-J-Exon entsteht. Am 3´- und am 5´-Ende findet jeweils ein Verlust von Nukleotiden – das V-bzw. J-Nibbling – statt.
Abkürzungen: TCR / TZR, T-Zell-Rezeptor; V, variable; D, diversity; J, Joining; CDR, complementary determining regions.

Um die Vielfalt der TZR zu strukturieren, wurden die TCRAV-Sequenzen in 32 Vα-Familien eingeteilt, für die TCRBV-Sequenzen wurden 25 Vβ-Familien definiert. Dabei wurden Segmente, die in ihrer Desoxyribonukleinsäure- (DNA-) Sequenz mehr als 75 % Ähnlichkeit zeigten, als Mitglieder einer Familie angesehen (Arden et al. 1995).

1.6 MHC und HLA-Assoziation

Die Gene des MHC umfassen die HLA-Gene A, B und C (Klasse-I-Region), die HLA-Gene HLA-DR, -DQ und -DP (Klasse-II-Region) sowie die Gene für die Komplementfaktoren (Klasse-III-Region). MHC Klasse I wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, Klasse II nur auf antigenpräsentierenden Zellen. Peptide, die an MHC-I-Moleküle gebunden sind, werden von CD8-positiven T-Zellen erkannt, während CD4-positive T-Zellen nur an MHC-II-Moleküle gebundene Peptide erkennen. MHC-I-Moleküle präsentieren Peptide, die beim Abbau von Antigenen im Cytosol entstanden sind. Die von MHC-II-Molekülen gebundenen Peptide stammen von Antigenen aus den zellulären Vesikeln.

Der HLA-Haplotyp eines Menschen besitzt unter den bisher verfügbaren Kriterien die größte Aussagekraft bezüglich des Risikos, eine Autoimmunerkrankung zu entwickeln (Rose 2002). Die HLA-Region erklärt mehr als 50 % der genetischen Prädisposition für den T1D. Der T1D ist mit den HLA-Klasse-II-Genen HLA-DR3, -DR4 bzw. HLA-DQ8, -DQ2 assoziiert (Svejgaard 1983, Thomson 1985). Bei Menschen mit Hochrisiko-HLA-Haplotypen präsentiert der MHC dem TZR offenbar auch Peptide, die von körpereigenen Antigenen wie Präproinsulin abgeleitet sind.

Die in dieser Arbeit untersuchten T-Zell-Linien stammten von einem T1D-Patienten, der homozygot für HLA-DRB1*0401 war. Dieses Allel gilt als eines der am stärksten T1D-assoziierten HLA-DR4-Allele (Undlien et al. 1997), lässt aber das T1D-Risiko nur bei gleichzeitigem Vorhandensein von DQB1*0302 steigen, was bei unserem Patienten der Fall war.

1.7 Unterschiede in den Frequenzen antigenspezifischer T-Zellen

Antigenspezifische T-Zellen zirkulieren in unterschiedlichen Frequenzen im peripheren Blut. Im Rahmen einer akuten Infektion findet beispielsweise eine Proliferation spezifischer T-Zellen statt, so dass sich ihre Zahl vorübergehend stark erhöht, während es sein kann, dass eine T-Zell-Antwort auf einen Tumor ohne in-vitro-Anreicherung nicht detektierbar ist. Durch die Sekretion von Zytokinen kann die Zahl der antigenspezifischen T-Zellen erhöht oder herunterreguliert werden.

Autoreaktive T-Zellen gehören zu den antigenspezifischen T-Zellen mit einer sehr niedrigen Frequenz im peripheren Blut. Es ist deshalb problematisch, sie zu detektieren

und zu analysieren (Laughlin et al. 2008). Im Gegensatz dazu haben virusspezifische T-Zellen eine hohe Frequenz in den peripheren Blutmonozyten (PBMC) und können so für einen Vergleich verschiedener Nachweisverfahren gut herangezogen werden. Für die Untersuchung der Frequenz von virusspezifischen T-Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit exemplarisch Cytomegalievirus- (CMV-) spezifische T-Zell-Linien generiert.

1.7.1 Cytomegalievirus

Das CMV ist ein DNA-Virus und gehört zur Familie der Herpesviridae, es wird auch als Humanes Herpesvirus 5 bezeichnet. Die Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch durch sehr engen körperlichen Kontakt, prä- bzw. perinatal, über Bluttransfusionen oder Organtransplantationen. Bei den meisten Menschen verläuft die Primärinfektion klinisch inapparent. Nach der Primärinfektion persistiert das Virus lebenslang in den Lymphozyten des menschlichen Körpers; durch bestimmte äußere Einflüsse kann es reaktiviert werden und erneut zu einer Erkrankung führen. Die Reaktivierung erfolgt z. B. durch Schwangerschaft, maligne Erkrankungen oder immunsuppressive Therapien. Erstinfektionen in der Schwangerschaft können schwere Schädigungen beim Ungeborenen auslösen. Die CMV-Infektion gilt als häufigste infektiologische Komplikation nach einer Organtransplantation (Benz et al. 2002). Bei immunsupprimierten Patienten treten Pneumonien mit Fieber, Leukopenie und Hepatitis auf. CMV-Retinitis und CMV-Encephalitis gehören zu den AIDS-definierenden Erkrankungen bei HIV-Infizierten.
Eine CMV-Infektion löst sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort aus. Da CMV selbst immunsuppressiv wirkt und über verschiedene Mechanismen versucht, die Immunabwehr zu unterlaufen, ist seine Interaktion mit dem Immunsystem überaus komplex; die wichtigste Komponente der Immunantwort stellen dabei die zytotoxischen T-Lymphozyten dar, jedoch nur bei gleichzeitiger Anwesenheit von CD4-positiven T-Helferzellen. Bei Transplantatempfängern konnte gezeigt werden, dass durch Übertragung von ex vivo generierten CMV-spezifischen T-Zellen die Inzidenz schwerer HCMV-Infektionen signifikant reduziert werden konnte; die infundierten CD8-positiven T-Zellen persistierten jedoch nur dann länger, wenn auch eine CMV-spezifische Immunantwort von CD4-positiven T-Zellen bestand (Riddell et al. 1992, Walter et al. 1995).

1.8 Zielsetzung

Da autoreaktive T-Zellen der Schlüssel zum Verständnis der Diabetesentwicklung und damit zu therapeutischen oder präventiven Möglichkeiten zu sein scheinen, sollten in der vorliegenden Arbeit die Frequenz von autoreaktiven T-Zellen im peripheren Blut eines T1D-Patienten untersucht und der Nachweis antigenspezifischer TZR-Klone erbracht werden. Das Ziel bestand darin, eine einfache Nachweismethode für das Vorhandensein antigenspezifischer autoreaktiver T-Zellen beim T1D zu etablieren. Zum einen könnte eine solche Methode als Screening zur Früherkennung des T1D bei prädiabetischen Individuen noch vor dem Auftreten einer klinischen Symptomatik dienen, zum anderen könnten mit ihrer Hilfe neue Erkenntnisse über die Entstehung des T1D gewonnen werden, beispielsweise bei Untersuchungen an Familien mit zwar HLA-identischen, aber bezüglich der Erkrankung diskordanten Individuen.

Die Problematik der Detektion von spezifischen autoreaktiven T-Zellen im peripheren Blut, die dort in niedrigen Frequenzen zirkulieren, sollte im Vergleich mit CMV-reaktiven, d. h. virusspezifischen T-Zellen, die hohe Frequenzen in den PBMC aufweisen können, mittels verschiedener Nachweisverfahren exemplarisch deutlich gemacht werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Patientenproben

Die in dieser Arbeit untersuchten T-Zell-Linien stammten von einem männlichen, zum Zeitpunkt der Diabetesmanifestation und der Generierung der T-Zell-Linien 27jährigen Patienten mit den HLA-Klasse-II-Allelen DRB1*0401, 0401, DQB1*0301, 0302, DRB4*01xx sowie den HLA-Klasse-I-Allelen A*02, 26 und B*0801, 4402, der erhöhte Antikörpertiter gegen GADA, IA-2A, IAA und ICA aufwies. Die während der weiteren Untersuchungen verwendeten Patienten-PBMC stammten von dem selben Patienten. In den PBMC des Patienten fanden sich alle 26 Vβ-Familien und -Subfamilien mit einem unauffälligen CDR3-Längenverteilungsmuster, d. h. ohne expandierte klonale Peaks, die auf eine T1D-assoziierte Veränderung im TZR-Repertoire hingedeutet hätten.
In Vorarbeiten wurden mittels Split-Well-Methode durch Stimulation mit den Antigenen Proinsulin, Insulin sowie mit verschiedenen überlappenden Peptiden des Proinsulins (p3, p4, p17, p18, p20 und p21) zwei T-Zell-Linien generiert.
Linie SD32.5 stellte sich als homogene Zellpopulation dar, die nach Stimulation mit Peptid A5-21 (p21) eine hohe IFN-γ-Sekretion und damit eine inflammatorische Th1-Antwort aufwies. Linie SD52 zeigte eine hohe IL-5-Sekretion nach Stimulation mit Peptid C18-A1 (p17), proliferierte jedoch auch nach Stimulation mit anderen Peptiden. Aus dieser Linie konnte der Subklon SD52c1 mit einer Spezifität für Peptid C18-A1 (p17) generiert werden, der neben geringen Mengen von IL-4 und IL-10 vor allem IFN γ sezernierte. Die Stimulation der untersuchten T-Zell-Subpopulationen induzierte also eher eine Th0-Antwort.
Die Linie SD32.5 könnte auch durch die zum Zeitpunkt der Untersuchung seit drei Monaten andauernde exogene Insulingabe induziert sein, da sie spezifisch für p21 war, das auch bei exogener Applikation vorhanden ist. SD52c1 kann jedoch als proinsulinspezifisch und damit als Produkt eines Autoimmunprozesses angesehen werden, da hier das

immunogene Peptid p17 als Verbindungssequenz zwischen C-Peptid und A-Kette nur während der Reifung von Insulin in den β-Zellen vorkommt.

Die T-Zell-Rezeptor-Analyse der T-Zell-Linien ergab, dass die monoklonale Linie SD32.5 nur die TZR-Familien Vα4 und Vβ14 exprimierte. SD52c1 bestand aus zwei Subpopulationen; eine dieser Subpopulationen war durch Vα11 und Vβ14 gekennzeichnet, die zweite durch Vα14 und Vβ22. Bei der Sequenzierung zeigten sich für jede dieser TZR-Familien jeweils mindestens zehn identische Sequenzen; dies spricht für einen sehr hohen Klonalitätsgrad beider Linien.

T-Zellen, die nach einem früheren Antigenkontakt als Effektorzellen bei erneuter Stimulation sehr schnell aktiviert werden, gehören zur Subpopulation der CD45RO-Gedächtniszellen (Sallusto et al. 1999). Eine Analyse der Oberflächenmarker zeigte, dass es sich bei SD32.5 und SD52c1 um $CD4^+CD45RO^+$-T-Zell-Linien handelte; so konnte nachgewiesen werden, dass in der Gruppe der Gedächtniszellen auch autoreaktive T-Zellen vorkommen.

Beide Linien waren HLA-DR-restringiert; dies wurde dadurch nachgewiesen, dass der anti-HLA-DR-Antikörper L243 in einem Proliferationstest die Peptidpräsentation blockierte und es deshalb zu einer vollständigen Hemmung der T-Zell-Proliferation kam, während andere Antikörper dies nicht bewirkten. Zur spezifischen Charakterisierung wurden Analysen mit HLA-transfizierten Mausfibroblasten durchgeführt, die das DRB1*0401-Molekül als Restriktionselement für beide Linien identifizierten; bei SD52c1 bestand jedoch zusätzlich eine geringere IFN-γ-Sekretion nach Peptidpräsentation über DRB4*0101.

2.1.2 Proben des CMV-positiven Probanden

Von einem CMV-positiven erwachsenen Probanden wurden PBMC und aus PBMC generierte T-Zell-Linien verwendet. Zum Zeitpunkt der Blutabnahme waren spezifische CMV-Immunglobulin- (Ig-) G-Antikörper mittels enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) im Serum nachweisbar.

2.1.3 Proben von Kontrollpersonen

Als Kontrollen dienten PBMC von gesunden Erwachsenen mit jeweils mindestens einem der T1D-assoziierten HLA-Allele (HLA-DR3, -DR4, DQ8, -DQ2), die keine Familienanamnese hinsichtlich eines T1D aufwiesen und deren Autoantikörpertiter im Normalbereich lagen.

2.1.4 Antigene

Das Peptid p17 mit der Aminosäuresequenz AGSLQPLALEGSLQKRG stammte aus der Synthese von 21 überlappenden Peptiden des Proinsulin-Moleküls (H. Kalbacher, Med.-Nat.wissenschaftliches Forschungszentrum der Universität Tübingen, Deutschland). Es deckte die Positionen C18 (C-Peptid) bis A1 (A-Kette) ab.
Für die Generierung von CMV-spezifischen T-Zell-Linien wurde das CMV-Antigen Nr. 1130 (Virion, Planegg, Deutschland) verwendet.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von PBMC

Die mit Heparin (Heparin-Natrium Braun „Multi“ 10 000 I.E. / ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) versetzten Blutproben wurden bei 2500 rpm zentrifugiert, um Plasma und Blutzellen zu trennen. Die erhaltenen Zellen wurden mit Penicillin/Streptomycin-haltigem RPMI Medium (Gibco BRL Life Technologies, Gaithsburg, USA) im Verhältnis 1:2 verdünnt und in ein Tube gegeben, das unterhalb einer Fritte Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) enthielt. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 2500 rpm waren Blutkuchen, Ficoll-Paque™ Plus, PBMC und Plasma/Medium wegen ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt, so dass die PBMC mit einer Pipette aufgenommen und in ein anderes Gefäß überführt werden konnten. 10 µl der Zellen wurden nach einem Waschschritt mit 90 µl Türkscher Lösung (Merck Diagnostica, Darmstadt, Deutschland) gefärbt, um sie in einer Neubauer Zählkammer (Superior Laboratory Glassware, Marienfeld, Deutschland) zählen

zu können. Falls die Zellen erst später verarbeitet werden sollten, wurden sie in je 1 ml Einfriermedium (s. Anhang) in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 T-Zell-Kultivierung

Für die Generierung von CMV-spezifischen T-Zell-Linien wurden PBMC des CMV-positiven Probanden auf 96 Well Rundbodenplatten (Corning incorporated Costar®, New York, USA) zu je 150 000 Zellen pro Well verteilt und mit 5-10 µg / ml CMV-Antigen stimuliert. Die Negativkontrolle bestand aus Zellen in Kulturmedium (s. Anhang) ohne Antigen. Nach 7 Tagen Inkubation im Brutschrank bei 37° und 6% CO_2 wurden 20 U / ml IL-2 (rh IL-2; Boehringer-Mannheim, Deutschland) zugegeben. Alle 2-3 Tage wurde nun das Kulturmedium ausgetauscht und neues IL-2 dazugegeben. Am 14. Tag erfolgte eine Restimulation, indem antigenpräsentierende Zellen des Probanden mit CMV-Antigen inkubiert, mit 40 Gray bestrahlt und dann zu den vorhandenen Zellen gegeben wurden. Durch die Anwendung der Split-Well-Methode nach Pette erfolgte dabei die Generierung von T-Zell-Linien: Zellkulturen, die unter dem Mikroskop Blasten erkennen ließen und damit Proliferation zeigten, wurden nach Entfernen des IL-2 auf mindestens zwei Wells aufgeteilt und daraufhin mit den CMV-Antigen-präsentierenden Zellen restimuliert, wobei ein Well als Negativkontrolle ungepulste APC enthielt, um die Spezifität der Linien ständig kontrollieren zu können. Alle 2-3 Tage wurde wieder IL-2 zugegeben, sowie das Kulturmedium ausgetauscht, am 28. und am 42. Tag erfolgten die nächsten Restimulationen. Falls die Zellen stark proliferierten, wurden sie je nach Zellzahl in 96 Well Flachboden-, 48 Well- oder 24 Well-Platten (Falcon, Becton Dickinson, Le Pond de Claix, Frankreich) überführt.
Wie die PBMC wurden auch die T-Zell-Linien entweder gleich verarbeitet oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.3 Ribonukleinsäure- (RNA-) Isolierung mit Rnazol®BD

Bei der Acid-Guanidinthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode bilden DNA-Moleküle unter sauren Bedingungen Komplexe mit Guanidin- und Wassermolekülen, wodurch sich DNA und Proteine in der organischen Phase befinden, während sich die RNA in der wässrigen Phase löst. Gleichzeitig werden die RNasen inaktiviert. Als Ergebnis erhält man

Gesamt-RNA, die neben ribosomaler RNA und Transfer-RNA die benötigte messenger RNA (mRNA) zu etwa 2 % enthält.

Nach Zentrifugation der aufgetauten Zellen mit 3000 rpm bei 21 °C für 2-3 Minuten und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 1 ml RNAzol®BD (Wak-Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Deutschland) resuspendiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend mit 200 µl Chloroform (Fluka, Buchs, Schweiz) gründlich gemischt. Durch Zentrifugieren mit 14000 rpm bei 4°C für 20 Minuten bildeten sich eine untere blaue Phenol-Chloroform-Phase, in der sich Proteine und kleine DNA-Fragmente lösten, eine Interphase mit den größeren DNA-Fragmenten und eine obere klare Phase, welche die RNA enthielt. Diese Phase wurde abpipettiert. Bei sehr kleiner Anzahl der Zellen wurde 1 µl Muschelglykogen (Roche, Mannheim, Deutschland) dazugegeben, um die Ausbeute an RNA zu erhöhen. Durch Hinzufügen von 250 µl 100%-igem Isopropanol (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde die RNA ausgefällt. Nach Zentrifugieren bei 4°C und Waschen mit 75%-igem Ethanol (Riedel-de-Haen, Seelze, Deutschland) wurde das Pellet luftgetrocknet, in RNase-freiem Wasser für 5 Minuten bei 75 °C gelöst, kurz zentrifugiert und dann bei -20°C eingefroren.

Die Konzentration und Reinheit der RNA wurde durch Messung der optischen Dichte bestimmt, damit bei der folgenden cDNA-Synthese jeweils gleiche Mengen an RNA eingesetzt werden konnten.

2.2.4 cDNA-Synthese

Die Herstellung einer zur mRNA komplementären DNA, der complementary DNA (cDNA), - als Ausgangsmaterial für die PCR - erfolgt durch reverse Transkription. Die reverse Transkriptase des Murine Leukemia Virus ist eine DNA-Polymerase, die RNA- und DNA-abhängig DNA synthetisiert. Als Primer werden Oligo-dT-Primer verwendet, die an das Poly-A^+-Ende von mRNAs binden, wodurch man komplette cDNAs synthetisieren kann. Alle Reagenzien des Reaktionsansatzes gehören zu einem Kit von Perkin Elmer (Weiterstadt, Deutschland).

Tabelle 1: Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese

Abkürzungen: cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure; dNTP, Desoxynukleosidtriphosphate; PCR, Polymerasekettenreaktion; RNA, Ribonukleinsäure

Reagenz	**Menge**
dNTP-Mix (10 mM)	16 µl
Magnesiumchloridlösung (25 mM)	8 µl
10x PCR-Puffer II	4 µl
RNase-Inhibitor (20 U / µl)	2 µl
Oligo-dT-Primer (50 µM)	2 µl
reverse Transkriptase (50 U / µl)	2 µl
RNA	ca. 2 µg
Σ	**ca. 40 µl**

20 Minuten lang wurde bei 42°C, dem Arbeitsoptimum der reversen Transkriptase, inkubiert, anschließend fünf Minuten bei 99°C denaturiert; die Lagerung der erhaltenen cDNA erfolgte bei 4°C.

2.2.5 Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine einfache Methode zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen, für die seit ihrer Entdeckung immer neue Anwendungen gefunden wurden. Sie ist aus der modernen Diagnostik nicht mehr wegzudenken, angefangen bei der pränatalen Diagnose der Sichelzellanämie (Saiki et al.) bis hin zu Vaterschaftstests, Routineuntersuchungen von Blutkonserven oder kriminaltechnischen Anwendungen des „genetischen Fingerabdrucks“. Die PCR wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt, um die für die α- bzw. β-Kette des T-Zell-Rezeptors codierenden Sequenzen selektiv zu vervielfältigen.

Der erste Schritt der PCR ist die Denaturierung der cDNA; sie erfolgt bei 95°C. Dabei trennen sich die beiden Stränge der cDNA. Im zweiten Schritt binden die Primer spezifisch an ihre Zielsequenz. Für dieses „Annealing“ oder Hybridisieren benötigen sie jeweils eine bestimmte Temperatur, die von ihrer Sequenz, d. h. ihrem Guanin- (G-) / Cytosin- (C-) Gehalt abhängt. Die Annealingtemperatur eines Primers kann nach verschiedenen Methoden errechnet werden, unter anderem nach Baldino et al. (1989), Rychlik et al. (1990) und Breslauer et al. (1986). In der eigenen Arbeitsgruppe wird eine vereinfachte Variante verwendet, bei der sich die Schmelztemperatur T_m aus dem GC-Gehalt des Primers errechnen lässt: T_m = 4 (Anzahl G bzw. C) + 2 (Anzahl A bzw. T), wobei T_m der Schmelztemperatur und T_a der Annealingtemperatur entspricht.

Die Annealingtemperatur T_a liegt 5 Kelvin darunter ($T_a = T_m - 5$ K), da der Primer im Bereich der Schmelztemperatur nicht mehr an das Template bindet, jedoch erst ca. 5 °C darunter hybridisiert. Bei dieser vereinfachten Berechnung wird außer Acht gelassen, dass nicht nur die Basenzusammensetzung des Primers, sondern auch die des amplifizierten Fragments, die Kationenkonzentration, die Oligonukleotidlänge und die Oligonukleotidsequenz die optimale Annealingtemperatur beeinflussen. Für die Konstruktion eines funktionierenden Primers gelten einige Regeln: Beispielsweise sollte ein Primer eine Länge von 18 bis 30 Basen haben, einen Anteil von 40 bis 60 % Guanin bzw. Cytosin enthalten, nicht mehr als vier gleiche Basen nacheinander aufweisen und eine Schmelztemperatur von 55 bis 80 °C besitzen. So können die Bildung von internen Sekundärstrukturen und Primer-Dimeren sowie Leserasterverschiebungen vermieden werden.

Anschließend synthetisiert die Polymerase bei 72°C, der für sie optimalen Temperatur, eine Kopie des DNA-Fragments, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt. Da dies an beiden Strängen der cDNA abläuft, verdoppelt sich die Anzahl der Template-DNAs im ersten Zyklus. Wenn der Zyklus danach mehrere Male abläuft, können auch die synthetisierten Abschnitte als Matrizen dienen, so dass sich die Fragmente exponentiell vervielfachen und damit eine nachweisbare Menge entsteht. In der Theorie würde ein einziges Templatemolekül bereits ausreichen, um durch die PCR ein auswertbares Produkt zu erhalten. In der praktischen Anwendung sollten jedoch wenigstens 10 000 Template-DNAs zur Verfügung stehen, um problemlos amplifizieren zu können – dies entspricht ungefähr der cDNA aus 0,1 µg RNA (Mülhardt C, 2000). Eine Unterschreitung dieser Menge ist meistens möglich, eine Überschreitung macht ein Fehlannealing wahrscheinlicher und beeinflusst damit die Qualität des PCR-Produktes ungünstig. In unseren Testreihen wurden zwischen 2 500 und 10 000 Templatemoleküle pro PCR-Ansatz eingesetzt. Die Wahrscheinlichkeit für ein Fehlannealing war somit gering.

Die Taq-Polymerase hat ihr Aktivitätsmaximum bei einem pH > 8, so dass ein PCR-Puffer zum Einsatz kommen sollte, dessen pH ebenfalls über 8 liegt und sich nicht temperaturabhängig ändert. Die Konzentration des Mg^{2+} im Reaktionsansatz beeinflusst das Primerannealing, die Denaturierung und ist für Fehler wie z. B. Primer-Dimere verantwortlich. Die Polymerase-Aktivität ist von freiem Mg^{2+} abhängig. Eine Optimierung der Mg^{2+}-Konzentration sollte für eine PCR immer stattfinden. Zunächst wurde ein PCR-Puffer verwendet, der einen pH von 8,3 bei Zimmertemperatur hatte und bereits 15 mM $MgCl_2$ enthielt. Er war in mehreren Vorversuchen ausgetestet worden. Im weiteren Verlauf

wurde das PCR-Protokoll verändert, da nun die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase eingesetzt wurde. Hier wurde der zugehörige GeneAmp® 10X PCR Buffer II, ebenfalls mit einem pH von 8,3 bei Zimmertemperatur, jedoch ohne $MgCl_2$ verwendet; es erfolgte ein Zusatz von 25 mM $MgCl_2$. Die Taq-DNA-Polymerase aus Thermus aquaticus ist nur eine von vielen Polymerasen, die für die PCR verwendet werden können. Da sie keine 3´-5´-Exonuclease-Aktivität besitzt, die „proofreading", also eine Korrekturaktivität, erlauben würde, liegt ihre Fehlerrate höher, so dass die amplifizierten Fragmente Mutationen in höherer Zahl enthalten als bei einer Polymerase mit Korrekturaktivität. Andererseits ist ihre Syntheserate vergleichsweise hoch, so dass ihr Einsatz durchaus gerechtfertigt erscheint.

Tabelle 2: Reaktionsansatz für die PCR

Abkürzungen: PCR, Polymerasekettenreaktion; dNTP, Desoxynukleosidtriphosphate.

Reagenz	**Hersteller**	**Menge**
dNTP-Mix (2,5 mM je Nukleotid)	Amersham Pharmacia, USA	4 µl
GeneAmp® PCR Buffer II	Applied Biosystems, Foster City, USA	5 µl
3´-Primer aus der konstanten Region	Interactiva, Ulm, Deutschland	1,5 µl
familienspezifischer 5´-Primer	Interactiva, Ulm, Deutschland	1 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	Applied Biosystems, Foster City, USA	5 µl
H_2O		32,25 µl
AmpliTaqGold® DNA Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA	0,25 µl
cDNA		1 µl
Σ		**50 µl**

Die Konzentration der Nukleotide im PCR-Ansatz betrug 200 µM je Nukleotid. Nach Mülhardt ist eine Konzentration von unter 200 µM je Nukleotid im PCR-Ansatz ausreichend für eine erfolgreiche PCR, wobei jedoch die Fehlerhäufigkeit der Taq-Polymerase bei einer geringeren Konzentration bis zu einer Grenze von 10 µM abnimmt. Eine Konzentration von 200 µM je Nukleotid wird auch in PCR-Protokollen der Herstellerfirmen, z. B. Applied Biosystems, empfohlen.

Tabelle 3: Temperaturprofil der PCR

Abkürzungen: PCR, Polymerasekettenreaktion.

95 °C	7 Minuten	
95 ° C	30 Sekunden	30-35 Zyklen
T_a	30 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
72 °C	10 Minuten	
4 °C	∞	

Solange genügend Nukleotide und Primer vorhanden sind, steigt die DNA-Menge mit jedem Zyklus exponentiell weiter an. Da die Amplifikationsprodukte ab einer bestimmten Menge miteinander statt mit einem Primer hybridisieren und die Reaktion zunehmend durch Endprodukte wie Pyrophosphat gehemmt wird, kann die Zyklenanzahl nicht unendlich gesteigert werden, um große Mengen an DNA zu erhalten. Vielmehr wird nach ca. 30 bis 35 Zyklen ein Plateau erreicht und die Vermehrungsrate nimmt stark ab.
Die PCR wurde in einem Thermocycler (GeneAmp PCR System 9600/2400, Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzen der Vα- und Vβ-familienspezifischen Primer wurden von Manfras et al. (1997) übernommen.

2.2.6 Auswertung auf dem Agarose-Gel

Für die Agarose-Gel-Elektrophorese werden jeweils 5µl der PCR-Produkte zusammen mit 2 µl Loading Buffer (s. Anhang) in die Taschen eines Agarose-Gels geladen. Das Gel besteht aus 0,75 g Agarose (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Schottland), 50 ml TAE-Puffer (s. Anhang) und 2 µl Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen, Deutschland). Nachdem eine Spannung von 100 V angelegt worden ist, wandern die Nukleinsäuren im elektrischen Feld zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Basenzahl (also höherem Molekulargewicht) ab, so dass die cDNA-Fragmente in einer bestimmten Zeit eine für ihre Länge charakteristische Strecke zurücklegen. Durch das Mitführen eines Basenpaarmarkers (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) können sie dann identifiziert werden. Da das Gel mit Ethidiumbromid gefärbt ist, fluoreszieren die Banden unter UV-Licht.

2.2.7 Nested PCR

Um auch kleinste Templatemengen nachzuweisen, reicht es nicht aus, die Zyklenanzahl der PCR zu erhöhen, da es dabei vermehrt zu Fehlhybridisierungen kommt. Wenn nur minimale cDNA-Mengen vorliegen, kann die nested PCR, also „verschachtelte“ PCR, angewendet werden. Dabei dient das Produkt einer PCR als Template für eine zweite Amplifikation, wobei das zweite Primerpaar sich zwischen dem ersten befindet.
In der vorliegenden Arbeit wurde in der nested PCR cDNA aus PBMC des T1D-Patienten mit dem familienspezifischen Primer Vα4 und dem AC3´-Primer aus der konstanten Region voramplifiziert. Im dNTP-Mix befand sich dabei statt dTTP dUTP, um Kontaminationen zu vermeiden. Das PCR-Produkt wurde dann in der real-time quantitative PCR mit Sonde als Template eingesetzt.

2.2.8 Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Eine Methode, Amplifikation und Nachweis des PCR-Produkts in einem Schritt zu ermöglichen, ist die real-time quantitative PCR. Das Prinzip besteht darin, die Amplifikation durch Einsatz einer Lichtquelle und einer Kamera im PCR-Gerät sichtbar zu machen, während die Amplifikation stattfindet. Wenn der Verlauf der Reaktion bekannt ist, können Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Templatemenge gezogen werden. Als PCR-Gerät verwendeten wir den AbiPrism 7700 SDS von Applied Biosystems. Der AbiPrism 7700 SDS vereint ein herkömmliches PCR-Gerät mit einem Argonlaser (488 nm), durch den eine Fluoreszenzanregung in den PCR-Tubes stattfindet. Die emittierte Fluoreszenz wird durch einen Spiegel auf einen Spektographen geleitet und durch eine Kamera in ein digitales Signal umgewandelt. Die Reagenzien stammten ebenfalls von Applied Biosystems (Foster City, USA).
Bei der RTQ-PCR gibt es verschiedene Ansätze für die Quantifizierung:

- RTQ-PCR mit SYBR Green

SYBR Green I ist ein Cyanin-Farbstoff, der unspezifisch in die doppelsträngige DNA interkaliert. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge λ_{max} = 494 nm und emittiert grünes Licht bei λ_{max} = 521 nm. Weitere Absorptionsmaxima liegen im UV-Bereich bei 284 nm und 382 nm, sie sind jedoch deutlich schwächer. Durch die messbar erhöhte Fluoreszenz kann indirekt die

synthetisierte DNA-Menge sichtbar gemacht werden. Allerdings kann nicht zwischen erwünschtem Produkt und Artefakt unterschieden werden.

Tabelle 4: Reaktionsansatz für die RTQ-PCR mit SYBR Green

Abkürzungen: RTQ-PCR, real-time quantitative Polymerasekettenreaktion; dNTP, Desoxynukleosidtriphosphate, AmpErase UNG, Uracyl-N-Glucosylase; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

Reagenz	**Menge**
10x SYBR PCR Buffer	4 µl
Magnesiumchloridlösung (25 mM)	4,8 µl
dNTP-Mix	3,2 µl
AmpliTaq Gold	0,2 µl
AmpErase UNG	0,4 µl
Primer A (5 µM)	0,5 µl
Primer B (5 µM)	0,5 µl
H_2O	25,4 µl
cDNA	1 µl
Σ	**40 µl**

Das Enzym Uracil-N-Glycosylase (AmpErase UNG) wurde verwendet, um Kontaminationen durch vorangegangene PCR-Läufe zu vermeiden. UNG bewirkt eine Hydrolyse der Uracil-glykosidischen Bindungen an dUracil enthaltenden DNA-Bereichen einzel- und doppelsträngiger DNA. Bezüglich RNA oder dThymin enthaltender DNA weist das Enzym UNG keinerlei Aktivität auf. Durch die Verwendung von UNG kann eine Reamplifikation von carry-over PCR-Produkten vermieden werden, sofern dTTP durch dUTP in den vorangegangenen PCR-Reaktionen ersetzt wurde. Um das Enzym zu aktivieren und ihm seine Arbeit zu ermöglichen, wird dem eigentlichen PCR-Zyklus ein zwei Minuten dauernder Schritt bei 50°C vorangestellt. Durch den darauf folgenden 95°C Schritt wird das Enzym vollständig inaktiviert und beeinträchtigt somit die nachfolgenden PCR-Reaktionen nicht.

- RTQ-PCR mit Sonden: das TaqMan®-Prinzip

Die präzisere RTQ-PCR-Methode mit einer fluorogenen Sonde nutzt den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer aus: Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5´-Ende einen fluoreszenten Reporter-Farbstoff trägt, während das 3´-Ende mit einem Quencher-Farbstoff markiert ist. Wird der Reporter-Farbstoff mit Licht einer bestimmten Wellenlänge λ_1 angeregt, strahlt er die aufgenommene Energie in Form von Licht der Wellenlänge λ_2 wieder ab. Befindet sich jedoch ein Quencher-Farbstoff in räumlicher Nähe, wird die Energie an diesen weitergegeben und Licht der Wellenlänge λ_3 abgestrahlt.

Während der PCR binden sowohl die Primer als auch die Sonde spezifisch an den DNA-Strang. Das Reporter-Signal λ_2 ist zu diesem Zeitpunkt nicht messbar, da es durch den Quencher „ausgelöscht“ wird. Die Taq-Polymerase beginnt mit der Synthese der komplementären DNA und trifft schließlich auf die hybridisierte Sonde. Durch die Verdrängung der Sonde und die damit entstehende Y-förmige Sekundärstruktur wird die 5´-3´-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase angeregt, es kommt zur Hydrolysierung der Sonde. Reporter und Quencher werden dadurch räumlich getrennt. Der Energie-Transfer kann nicht mehr stattfinden, so dass das Reportersignal λ_2 messbar wird.

Das Fluoreszenz-Signal wird nur dann generiert, wenn es zu einer Amplifikation der gewünschten Sequenz gekommen ist. Eine Detektion von unspezifischen Nebenprodukten findet nicht statt.

Beim Design einer optimalen Sonde müssen mehrere Faktoren berücksichtigt werden. Der GC-Gehalt der Sonde muss zwischen 20 und 80 %, im idealen Fall 50 %, betragen, damit sie stabil an die Zielsequenz binden kann. Gleichzeitig sollte sie nicht mehr als drei gleiche Nukleotide in Folge, insbesondere keine Poly-G-Bereiche, beinhalten. Die Sonde sollte etwa 20 bis 30 Nukleotide lang sein, da längere Sonden öfter störende Sekundärstrukturen ausbilden und zusätzlich eine zu hohe Annealingtemperatur schlecht zu kontrollieren ist. Die Annealingtemperatur der Sonde sollte ca. 5 – 10 °C höher als die Annealingtemperatur der Primer sein, um die Sonden-Template-Bindung zu stabilisieren; die Bindung der Primer an das Template wird bereits durch die DNA-Polymerase stabilisiert. Die Sonde muss innerhalb des Amplicons zwischen die beiden Primer placiert werden. Die Sequenzen dürfen aneinander angrenzen, sich aber nicht überlappen.

Primer und Sonden für die TaqMan®-PCR wurden in der vorliegenden Arbeit mit dem Programm Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA) bestimmt, das die genannten Faktoren bei der Auswahl der drei Oligonukleotide berücksichtigt.

Als Reporter-Farbstoff wurde FAM eingesetzt, als Quencher-Farbstoff TAMRA. Damit keine Extension des 3´-Endes stattfinden konnte, wurde die Sonde mit einem Phosphatrest blockiert.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die RTQ-PCR mit einer Sonde

Abkürzungen: RTQ-PCR, real-time quantitative Polymerasekettenreaktion; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

Reagenz	**Menge**
2x TaqMan Universal Master Mix	20 µl
H_2O	16 µl
Primer A (5 µM)	1 µl
Primer B (5 µM)	1 µl
Sonde (5 µM)	1 µl
cDNA	1 µl
Σ	**40 µl**

2.2.9 Konzentrationsvergleich mit Cyclophilin

Um sicherzustellen, dass in allen Reaktionsansätzen für eine RTQ-PCR jeweils die gleiche Menge cDNA enthalten war, wurde eine Normierung mithilfe eines Housekeeping-Gens durchgeführt. Als Housekeeping-Gene bezeichnet man Gene, die nicht reguliert sind, also unabhängig von Umwelteinflüssen in allen Zellen konstant exprimiert werden; sie werden häufig zur Normierung benutzt (Handschumacher et al. 1984, Savonet et al. 1997). Wir verwendeten ein Fragment des humanen Cyclophilin-Gens, das im gleichen Ansatz amplifiziert wurde und so als Standard diente, da die Template-Menge als bekannt vorausgesetzt werden konnte.

2.2.10 Fragmentlängenanalyse

Um herauszufinden, ob und welche TZR-Familien in den T-Zell-Linien dominierten, wurde eine Fragmentlängenanalyse durchgeführt. Aus den Linien gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben, die dann als Template für eine PCR diente.
In der PCR für eine Fragmentanalyse werden 3´-Primer eingesetzt, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, damit der Sequenzierer (ABI 373 A Sequencer, Applied Biosystems, Foster City, USA) die Proben anhand ihrer Fluoreszenz analysieren kann.

Tabelle 6: Pipettierschema für Fragmentlängenanalyse

Abkürzungen: dNTP, Desoxynukleosidtriphosphate; PCR, Polymerasekettenreaktion; TZR, T-Zell-Rezeptor; FAM, TET, Fluoreszenzfarbstoffe; (c)DNA, (komplementäre) Desoxyribonukleinsäure.

	Reagenz	Hersteller	Menge
Pro Mastermix:	dNTP-Mix (2 mM)	Amersham Pharmacia, USA	81 µl
	10x PCR-Puffer I mit 15 mM $MgCl_2$	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland	81 µl
	TZR-BC 3´-Primer mit FAM / TET	Interactiva, Ulm, Deutschland	8,1 µl
	AmpliTaq-DNA-Polymerase (50 U/µl)	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland	4,05 µl
	H_2O		540µl
	cDNA		8,1 µl
	Exogener Standard	Manfras et al. 1997	3 µl
Pro Ansatz:	familienspezifischer 5´-Primer	Interactiva, Ulm, Deutschland	3 µl
	Mastermix		27 µl

Tabelle 7: Temperaturprofil der Polymerasekettenreaktion

96 °C	1 Minute	
94 ° C	30 Sekunden	25 Zyklen
Annealing-Temperatur	30 Sekunden	
72 °C	30 Sekunden	
72 °C	7 Minuten	
4 °C	∞	

Die Annealing-Temperatur betrug für Vβ 3 und Vβ 21 58 °C, für Vβ 6 57 °C und für alle anderen Vβ-Familien 62 °C.

Für die Fragmentlängenanalyse musste ein Polyacrylamid-Gel vorbereitet werden; dieses bestand aus 30 g Harnstoff (Gibco BRL, Paisley, Scotland), 9 ml Acrylamidlösung (40 %, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland), 6 ml 10x TBE-Puffer (s. Anhang), 23,5 ml Aqua ad iniectabilia (Baxter, Unterschleißheim, Deutschland), 15 µl TEMED (Bio-Rad) und 350 µl APS-Lösung (10 %, s. Anhang).

Je 2 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Loading Buffer (s. Anhang) und 0,2 µl GeneScan-500 TAMRA Längenstandard (Applied Biosystems, Foster City, USA) auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Da zwei verschiedene Farbstoffe, FAM und TET (beide Interactiva, Ulm, Deutschland), benutzt wurden, konnten die TZR-Repertoire-Analysen von zwei T-Zell-Linien gleichzeitig durchgeführt werden, wenn die Proben der zweiten Zelllinie im Abstand von 40 Minuten zu den Proben der ersten aufgetragen wurden.

Nach 14 Stunden Laufzeit ergaben sich Peaks der CDR3-Längenverteilungsmuster, das heißt, dass einige der TZR-Familien stärker als andere vertreten waren.

2.2.11 Sequenzierung der CDR3-Region

- Reamplifikation

Die für die Fragmentanalyse hergestellten PCR-Produkte wurden mit dem „nested primer" Cβ-np an Stelle des TZR-BC-Primers reamplifiziert, um Fehlhybridisierungen zu vermeiden.

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Sequenzierung der CDR3-Region

Abkürzungen: CDR, complementary determining regions; dNTP, Desoxynukleosidtriphosphate; PCR, Polymerasekettenreaktion; DNA, Desoxyribonukleinsäure.

Reagenz	**Hersteller**	**Menge**
dNTP-Mix (2 mM)	Amersham Pharmacia, USA	2 µl
10x PCR-Puffer mit $MgCl_2$ (15 mM)	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland	2 µl
familienspezifischer 5´-Primer	Interactiva, Ulm, Deutschland	8 µl
Cβ-np-Primer	Interactiva, Ulm, Deutschland	1 µl
AmpliTaq DNA-Polymerase (50 U/µl)	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland	0,2 µl
H_2O		6,3 µl
PCR-Produkt		5 µl

Das Temperaturprofil entsprach der PCR zur Fragmentanalyse, es wurden jedoch nur 10 Zyklen durchgeführt.

- Reinigung der Reamplifikations-PCR-Produkte

Um die PCR-Produkte von Primern und unspezifischen Amplifikaten zu reinigen, wurden sie durch eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Low-melting-point-Gel wurde aus 50 ml TAE-Puffer (s. Anhang) und 0,75 g L.M.P. Agarose (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland) hergestellt und mit 2 µl Ethidiumbromid (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gefärbt. 20 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Loading Buffer (s. Anhang) aufgetragen. Nach einer Laufzeit von ca. 20 – 30 Minuten bei 80 Watt wurden die Banden unter UV-Licht ausgeschnitten und in 1,5 ml-Tubes gegeben.

Für die weitere Aufreinigung wurde das DNA-Purification Kit Easy Pure (Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland) verwendet. Pro 100 mg Agarose-Gel

wurden 300 µl Salzlösung SALT zugegeben. Die Gelstücke wurden etwas zerkleinert und dann im Heizblock bei 55 °C für ca. 5 – 10 Minuten inkubiert, um die Agarose zu lösen. Jeder Ansatz wurde mit 6 µl BIND-Lösung versetzt, einer Silicamatrix, die DNA-Fragmente bindet, die größer als 40 bp sind. Bei Raumtemperatur wurde 5 Minuten lang inkubiert und dabei immer wieder gemischt. Nach wiederholtem Zentrifugieren, Absaugen mit der Wasserstrahlpumpe, Zugeben von WASH-Lösung und Inkubieren wurde die DNA in einer Speed-Vac (Bachhofer, Reutlingen, Deutschland) getrocknet, in je 30 µl sterilem Wasser resuspendiert und nach Entfernen der BIND-Substanz bei –20 °C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

- Ligation

Die PCR-Fragmente wurden in Plasmid-Vektoren des pGEM-T Vektor-Systems (Promega, Madison, USA) kloniert. Dieser Vektor vermittelt Ampicillinresistenz. Außerdem beinhaltet der Vektor das LacZ´- Gen, das ein inkomplettes Gen der Bakterien ergänzt, so dass β-Galactosidase synthetisiert werden kann. Innerhalb dieses Gens befinden sich multiple Restriktionsenzymschnittstellen; durch Insertion des PCR-Fragments wird an einer dieser Schnittstellen das LacZ´-Gen unterbrochen. Deshalb haben die Bakterienkolonien mit einem Insert keine β-Galaktosidase-Aktivität und bleiben später nach Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß. Kolonien ohne Insert färben sich blau, da ihre β-Galaktosidase X-Gal spalten kann und dabei ein blaues Reaktionsprodukt entsteht.
Da die Polymerase während der PCR ein Adenosin-Nukleotid an die DNA-Fragmente hängt, wird die Ligation mit dem 5´-Thymidin-Überhang der Vektoren ermöglicht. Als Positivkontrolle dient die Ligation einer Kontroll-Insert-DNA mit dem Vektor, die Negativkontrolle ist ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die Ligation

Abkürzungen: DNA, Desoxyribonukleinsäure; pGEM, Plasmidvektor; PCR, Polymerasekettenreaktion.

Reagenz	**Menge**
T4 DNA-Ligase 2x Puffer	5 µl
pGEM-T Vektor (50 ng/ml)	1 µl
T4 DNA-Ligase (3 U/µl)	1 µl
PCR-Produkt bzw. 2 µl Kontroll-Insert	3 µl

Puffer, Ligase und Vektor stammten von Promega (Madison, USA). Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurde der Reaktionsansatz bei –20 °C eingefroren.

- Transformation

Nach der Ligation folgte die Transformation der Plasmide mit den inserierten DNA-Fragmenten in kompetente Bakterien (Epicurian Coli XL10-Gold Kan ultracompetent cells, Stratagene, La Jolla, USA).

Für jeden Transformationsansatz wurden 20 µl ultrakompetente Zellen mit 0,8 µl XL10-Gold β-Mercaptoethanol mix (Stratagene) in 14 ml PP-Rundboden-Falcon-Röhrchen (Falcon, Becton Dickinson, Le Pond de Claix, Frankreich) gegeben und vorsichtig mit je 2,5 µl der Ligationsreaktion gemischt. Als Positivkontrolle für die Transformation diente ein Ansatz, zu dem das pUC18-Plasmid gegeben wurde.

Nach einer Inkubation auf Eis für 30 Minuten fand die Transformation während einer 30 Sekunden dauernden Pulserhitzung bei 42 °C statt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 Minuten wurden 225 µl vorgewärmtes SOC-Medium in jedes Röhrchen gegeben. Das SOC-Medium bestand aus 20 g Trypton (Difco), 5 g Hefeextrakt (Difco), 0,5 g NaCl (Baker, Deventer, Holland), 1 l H_2O bidest., war autoklaviert und kurz vor der Verwendung mit 1 ml 20prozentiger Glucose (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) pro 50 ml versetzt worden.

Danach folgte eine Inkubation im Schüttelinkubator bei 37 °C für eine Stunde.

Die LB-Agarplatten waren bereits vorbereitet worden: LB-Agar war aus 10 g NaCl (Baker, Deventer, Holland), 10 g Trypton (Difco), 5 g Hefe-Extrakt (Difco), 20 g Agar (Difco) und 1 l H_2O gemischt, autoklaviert und nach Zugabe von Ampicillin (100 µg/ml, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) zur Herstellung der Agarplatten in Petrischalen gegossen worden. Auf den abgekühlten Platten wurden nun jeweils 30 µl SOC-Medium, 10 µl IPTG (100 mM, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) und 100 µl X-Gal (Sigma) gleichmäßig ausgestrichen. Pro Transformationsansatz wurden zwei Agarplatten mit 100 µl aus jedem Ansatz bestrichen, die Ligations- und die Transformationskontrolle wurden auf je eine Platte verteilt. Nachdem die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert worden waren, folgte die Aufbewahrung bei 4 °C, durch die die Blau-Weiß-Färbung der Bakterienkolonien deutlicher hervortrat.

- Über-Nacht-Kultivierung der Transformanten

Mit einer sterilen ungestopften 10 µl-Pipettenspitze wurde je eine weiße Kolonie von der Agarplatte „gepickt“ und zusammen mit der Pipettenspitze in ein 15 ml-Röhrchen mit LB-Medium geworfen. Das LB-Medium bestand aus 10 g NaCl, 10 g Trypton, 5 g Hefe-Extrakt und 1 l H_2O bidest und enthielt Ampicillin (100 µg/ml, Sigma, Taufkirchen,

Deutschland). Von jedem Ansatz wurden auf diese Weise 8 Kolonien entnommen und über Nacht bei 37 °C unter leichtem Schütteln kultiviert.

- Extraktion der Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit dem QIAprep 8 MiniPrep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) aus den Bakterien extrahiert. Dabei lysieren die Bakterienzellen im alkalischen Milieu, die DNA bindet an Silikatmembranen und kann anschließend eluiert werden.

Durch Zentrifugieren wurden die Bakterienzellen vom Flüssigmedium getrennt. Danach bewirkte die Zugabe verschiedener Puffer nacheinander die Lyse der Zellen, das Ausfällen von Zellbestandteilen und die Reinigung der Plasmid-DNA. Mit Hilfe des vakuumerzeugenden Systems QIAvac 6s manifold (Qiagen) wurde die Plasmid-DNA an Silikatmembranen gebunden und mit verschiedenen Waschpuffern und Ethanol aufgereinigt. Die mit Wasser eluierte DNA wurde nach photometrischer Konzentrationsbestimmung bei –20 °C gelagert.

- Cycle Sequencing Reaction (CSR)

Die CSR ist eine PCR, die zur Vorbereitung der Sequenzierung stattfindet. Das Prinzip ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger und Coulson. Dabei werden nicht nur die normalen Nukleotide eingebaut, sondern auch spezielle Terminator-Nukleotide. Diese vier Didesoxynukleotide sind mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch ihren Einbau wird die Extension gestoppt, so dass unterschiedlich lange Fragmente entstehen, die sich jeweils um ein Nukleotid unterscheiden. Das automatische Sequenziergerät detektiert dann während einer elektrophoretischen Auftrennung die Fluoreszenzfarbstoffe an den Enden der unterschiedlich langen Fragmente und kann so die gesuchte Sequenz analysieren.

Da der Ligations-Vektor einen T7-Promotor besitzt, wurde ein T7-Primer verwendet.

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Cycle Sequencing Reaction

Abkürzungen: DNA, Desoxyribonukleinsäure; dNTP, Desoxynukleosidtriphosphate.

	Reagenz	**Hersteller**	**Menge**
	DNA		2 µl
	T7-Primer	Interactiva, Ulm, Deutschland	1 µl
	H_2O		3 µl
Premix	dNTP und Terminator-Nukleotide	Perkin Elmer, Weiterstadt, Deutschland	4 µl
	Tris-HCl-Puffer		
	$MgCl_2$		
	thermostabile saure Phosphatase		
	AmpliTaq DNA Polymerase FS		

Tabelle 11: Temperaturprofil der Polymerasekettenreaktion

95 °C	4 Minuten	
95 °C	10 Sekunden	25 Zyklen
60 °C	5 Sekunden	
60 °C	4 Minuten	
4 °C	∞	

- Aufreinigung der Proben

Um nicht gebrauchte Terminator-Nukleotide und störende Salze vor der Sequenzierung zu entfernen, wurden die CSR-Produkte mit Natriumacetat (pH 4,6, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 100%-igem Ethanol gefällt und das Präzipitat mit 75%-igem Ethanol gewaschen und in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet.

- Elektrophoretische Sequenzierung

Nach Zugabe von je 4 µl Loading Buffer folgte eine Denaturierung der Proben für 2 Minuten bei 90 °C. Die abgekühlten Proben wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Sequenzierung erfolgte durch den ABI 373 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, USA), die anschließende Analyse der Sequenzen durch die Factura™- und Sequence Navigator™-Software.

2.2.12 Titrationsreihen

Um zu untersuchen, wo die Grenzen der Nachweisbarkeit von cDNA in der PCR liegen, wurden Titrationen durchgeführt. Zu jeweils einer Million PBMC einer Kontrollperson wurden 10^1 – 10^5 Zellen der untersuchten T-Zell-Linie titriert. Aus diesen fünf T-Zell-Aliquots wurde jeweils die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Das in der PCR eingesetzte Template enthielt dann die cDNA der Linie und der Kontrollperson im Verhältnis 1:100 000 bis 1:10.

2.2.13 Magnetische Zelltrennung

Ein Versuch, die Nachweisbarkeit der cDNA in der PCR zu erhöhen, war die Anreicherung der Zellen mit der gesuchten TZR-Familie vor der RNA-Isolierung.
Dazu wurden T-Zellen in magnetic cell sorting (MACS-) Puffer (PBS, 0,5% BSA, Serva, 2 mM EDTA, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gewaschen, zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Jeweils 1 Million Zellen wurde mit FITC-markierten Antikörpern (Serotec, Kidlington, Oxford, UK) gegen die untersuchte TZR-Familie inkubiert, gewaschen und mit MACS Anti-FITC Micro Beads (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland) gemischt. Nach Inkubation und erneutem Waschen erfolgte die magnetische Separation in einer LS-Säule (Miltenyi Biotec). Nach mehreren Waschschritten enthielt das Eluat die positiv selektierte Fraktion der T-Zellen mit der gewünschten TZR-Familie.

2.2.14 Cytokine Secretion Assay

Der Cytokine Secretion Assay (Cell Enrichment and Detection Kit human, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) wurde speziell für die Anreicherung und Analyse antigenspezifischer T-Zellen entwickelt. Er ermöglicht es, den natürlichen Verlauf einer Immunantwort nachzuahmen; gleichzeitig erhöht die Anreicherung der zu untersuchenden Zellen die Nachweisbarkeit in der späteren Analyse, beispielsweise in der PCR.
Für den Assay restimuliert man die Zellen für kurze Zeit mit dem Antigen, gibt ein zytokinspezifisches Catch Reagent dazu, das an der Oberfläche aller Leukozyten haftet, und inkubiert die Zellen kurze Zeit bei 37 °C, um die Zytokinsekretion zu ermöglichen.

Sezernierte Zytokine binden an das Catch Reagent der sezernierenden Zellen. Mit einem zweiten zytokinspezifischen Antikörper, der mit Phycoerythrin (PE) verbunden ist, werden diese positiven Zellen dann markiert, um während der später stattfindenden Durchflusszytometrie die Detektion zu ermöglichen.

Die zytokinsezernierenden Zellen werden schließlich mit Anti-PE Micro Beads magnetisch markiert und mit Hilfe einer MACS-Säule im magnetischen Feld angereichert.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Secretion Assay gleichzeitig für IFNγ- und IL-2-sezernierende Zellen durchgeführt. Ein Assay wurde mit PBMC des Diabetespatienten und einer gesunden Kontrollperson, ein weiterer mit PBMC des CMV-positiven Probanden durchgeführt. Dabei wurden die Zellen aus dem peripheren Blut isoliert, gewaschen und in Kulturmedium (RPMI mit L-Glutamin und PenStrep, 5 % Humanserum) aufgenommen. Die PBMC des Diabetespatienten und der Kontrollperson wurden ca. 4 Stunden lang mit dem Peptid p17 (10 µg/ml) stimuliert, die des CMV-positiven Probanden 12 Stunden mit CMV-Antigen (10 µg/ml). Die Stimulationsdauer war unterschiedlich, da p17 ein Peptid, das CMV-Antigen dagegen ein Protein ist.

Als Positivkontrollen dienten für die CMV-Stimulation eine CMV-Kontrolle (20 µg/ml) und für die p17-Stimulation PHA (2 µg/ml), als Negativkontrollen wurden Zellen in Medium ohne Antigen inkubiert.

Nach der Stimulation wurden die Zellen mit kaltem MACS-Puffer (PBS, 0,5% BSA, Serva, 2 mM EDTA, Sigma) gewaschen, bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abpipettiert, in kaltem Medium resuspendiert und mit 20 µl IFNγ Catch Reagent bzw. IL-2 Catch Reagent 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Inkubation für 45 Minuten bei 37 °C in 10 ml warmem Medium, um die Zytokinsekretion zu ermöglichen, wobei die Röhrchen alle 5 Minuten vorsichtig bewegt wurden, um die Zellen zu resuspendieren. Nach erneutem Waschen mit kaltem Puffer, Zentrifugieren bei 4 °C, Abnehmen des Überstands und Resuspendieren wurden je 20 µl des IFNγ bzw. IL-2 Detection Antibody (PE) hinzugefügt und die Proben 10 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die gewaschenen, zentrifugierten Zellen wurden nun während einer Inkubation für 15 Minuten auf Eis mit 20 µl Anti-PE Micro Beads magnetisch markiert.

Nach weiteren Wasch- und Zentrifugationsschritten folgte die Zelltrennung mit Hilfe einer MS-Säule im magnetischen Feld; jede Probe lief nacheinander durch zwei Säulen und wurde mehrmals mit MACS-Puffer gewaschen, um möglichst alle unmarkierten Zellen zu entfernen. Nach dem jeweils letzten Waschschritt wurden die Proben außerhalb des

magnetischen Feldes eluiert; das Eluat enthielt dann die Fraktion der angereicherten zytokinsezernierenden Zellen.

Ein Fünftel der zytokinsezernierenden Zellen wurden in der FACS-Analyse weiter untersucht, aus den verbleibenden Zellen wurde die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und für die TaqMan-PCR verwendet. Die unmarkierten Zellen wurden nicht verworfen, sondern als Negativkontrolle für die TaqMan-PCR benutzt.

2.2.15 Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting, FACS)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Untersuchung von Zellen anhand ihrer phänotypischen, biochemischen und molekularen Eigenschaften. Die Zellen fließen dabei an einem fokussierten Laserstrahl vorbei, fluoreszieren, und das emittierte Licht trifft auf Detektoren, die es in elektronische Signale umrechnen. Dadurch erhält man Informationen über Eigenschaften der Zellen wie beispielsweise Größe oder Granulierung, da diese die Brechung des Lichts beeinflussen. Fluoreszenzmarkierungen ermöglichen Aussagen über Struktur und Funktion der Zellen; Moleküle auf der Zelloberfläche können ebenso markiert werden wie Moleküle im Zytoplasma. In Abbildung 3 ist das Ergebnis einer durchflusszytometrischen Untersuchung schematisch dargestellt.

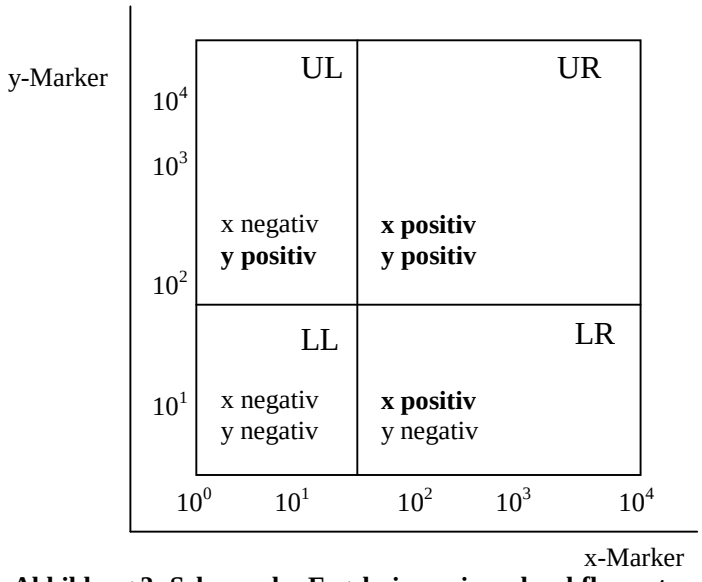


Abbildung 3: Schema des Ergebnisses einer durchflusszytometrischen Untersuchung

Auf der x- bzw. y-Achse werden die jeweiligen Fluoreszenzmarkierungen aufgetragen, anhand derer vier verschiedene Zellpopulationen unterschieden werden können. Beispielsweise befinden sich im linken oberen Quadranten die Zellen, die für Marker x negativ und für Marker y positiv sind.

Abkürzungen: UL, upper left, UR, upper right, LL, lower left, LR, lower right.

- Intrazelluläre Färbung

Ca. 200 000 Zellen waren pro Probe nach der Stimulation, aber vor Beginn des Secretion Assay, entnommen worden. Die Zytokinsekretion wurde mit Brefeldin A (10 µl + 228 µl Medium, davon 10 µl pro Well, Sigma, Taufkirchen, Deutschland) gestoppt, und es wurde eine intrazelluläre Färbung für die Zytokine mit Il-2 PE und IFNγ FITC durchgeführt; gleichzeitig erfolgte die Oberflächenmarkierung mit CD3 PerCP und CD4 APC, die auch nach dem Protokoll der intrazellulären Färbung vorgenommen werden kann.

- Oberflächenfärbung

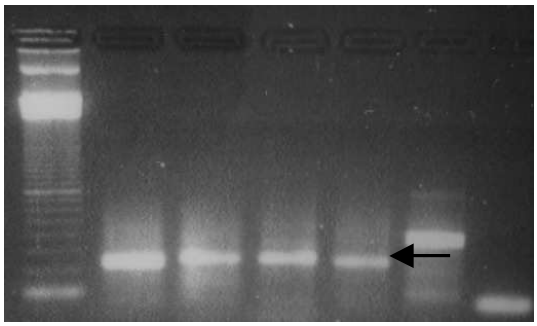
Ein Fünftel der Zellen aus dem Secretion Assay wurde mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD4 FITC und CD14 PerCP gegen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD14 gefärbt, die zytokinsezernierenden Zellen waren ja schon während des Secretion Assay (siehe 2.2.14) mit IL-2 und IFNγ Detection Antibody PE markiert worden.
Alle gefärbten Zellen konnten nun mit dem FACSCalibur™ (Becton Dickinson) und der CellQuest Software analysiert werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 TZR-Amplifikation der Vα- und Vβ-Familien mit der PCR

An peripheren Blutlymphozyten von Kontrollpersonen wurde zunächst untersucht, wie sensitiv die herkömmliche PCR als Nachweisverfahren für spezifische T-Zell-Rezeptoren sein kann. Dabei wurden verschiedene Taq-Polymerasen getestet, die Konzentrationen von Primern, Magnesiumchlorid, dNTP und cDNA aufeinander abgestimmt und die Bedingungen der PCR wie Zyklusanzahl und insbesondere Annealingtemperaturen optimiert.

In Abbildung 4 und 5 wird beim Vergleich von Vβ 16, 17 und 18 der Unterschied zwischen verschiedenen Taq-Polymerasen deutlich: Abbildung 4 zeigt PCR 24, in der AmpliTaq Gold verwendet wurde; für PCR 32 in Abbildung 5 wurde die Taq-Polymerase von Sigma eingesetzt. Wie in Abbildung 4 und 5 beispielhaft dargestellt, konnten im gesamten Studienverlauf mit der AmpliTaq Gold zuverlässigere Ergebnisse erzielt werden, die reproduzierbar waren und auch semiquantitative Vergleiche erlaubten.

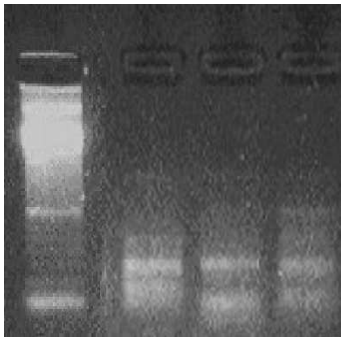


BP 13.1 16 17 18 i.K. H_2O

Abbildung 4: PCR 24

PCR mit AmpliTaq Gold als DNA-Polymerase. BP = Basenpaarmarker, 13.1,16, 17, 18 = PCR-Produkt nach Amplifikation mit dem entsprechenden Vβ-familienspezifischen Primer, i.K. = PCR-Produkt nach Amplifikation einer internen Kontrolle, H_2O = PCR-Produkt nach Amplifikation ohne Einsatz von cDNA. Der Pfeil markiert exemplarisch eine klare Bande für Vβ 18, die das Amplifikat der erwarteten Größe darstellt.

Abkürzungen: PCR, Polymerasekettenreaktion; DNA, Desoxyribonukleinsäure.



BP 16 17 18

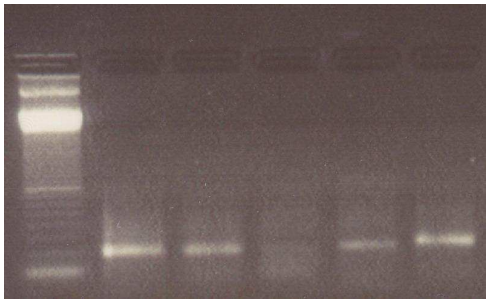
Abbildung 5: PCR 32

PCR mit Taq-Polymerase von Sigma. BP = Basenpaarmarker, 16, 17, 18 = PCR-Produkt nach Amplifikation mit dem entsprechenden Vβ-familienspezifischen Primer. Die Banden sind schlechter abgrenzbar als die in Abbildung 4 dargestellten Banden.

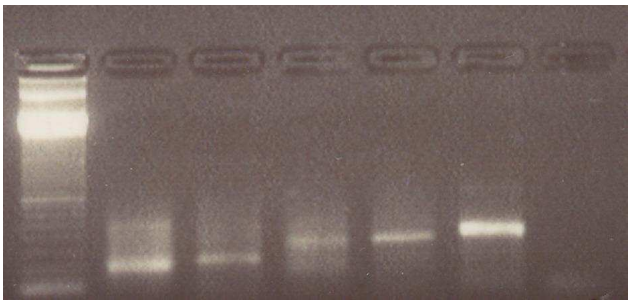
Abkürzungen: PCR, Polymerasekettenreaktion.

Die Amplifikation der familienspezifischen cDNA-Fragmente mit der herkömmlichen PCR erwies sich nach der Auswertung auf Agarose-Gelen als unzuverlässig, es waren nicht immer alle Familien jeweils gleichzeitig nachweisbar. Die Verwendung der Taq-Polymerase AmpliTaq Gold führte zwar zu besseren, aber auch nicht ausreichenden Ergebnissen, da sich nicht immer klare, distinkte Banden mit dem für die jeweilige Familie korrekten Molekulargewicht darstellen ließen.

In Abbildung 6 sind Beispiele von amplifizierten Vβ-TZR-Familien dargestellt. Für Vβ 10 ist keine Bande sichtbar. In allen durchgeführten Experimenten, auch nach Austausch des Primerpaares, konnte Vβ 10 höchstens als sehr schwache Bande dargestellt werden.



BP 1 5.2 10 11 12



BP 19 20 22 24 i.K. H_2O

Abbildung 6: PCR 26

BP = Basenpaarmarker, 1, 5.2, 10, 11, 12, 19, 20, 22, 24 = Amplifikation mit den entsprechenden Vβ-familienspezifischen Primern, i.K. = PCR-Produkt nach Amplifikation einer internen Kontrolle, H_2O = PCR-Produkt nach Amplifikation ohne Einsatz von cDNA.

Abkürzungen: PCR, Polymerasekettenreaktion; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

Es fiel auf, dass einige familienspezifische Primer mit einer Annealingtemperatur über 70 °C oder unter 60 °C schlechtere Ergebnisse erbrachten. Insbesondere Vβ 15 und Vβ 20 mit einer Annealingtemperatur von 76 °C konnten nur in 25 % bzw. 57 % der Experimente nachgewiesen werden, Vβ 13.2 und Vβ 24 mit einer Annealingtemperatur von 58 °C ließen sich nur in 46 % bzw. 28 % der Experimente darstellen.

Um die eigentliche Frage der Nachweisbarkeit eines TZR im peripheren Blut, der für eine bestimmte T-Zell-Linie spezifisch ist, zu beantworten, schien es also nicht sinnvoll, herkömmliche PCR-Bedingungen anzuwenden. Ein Experiment mit PBMC des T1D-Patienten und Primern für die T-Zell-Rezeptoren der T-Zell-Linien SD32.5 und SD52c1 wurde trotz der bisher unzuverlässigen Ergebnisse durchgeführt. Im peripheren Blut des T1D-Patienten konnten die spezifischen T-Zellrezeptoren wie erwartet mit der PCR nicht nachgewiesen werden.

Als Testmethode für die Funktionsfähigkeit von neu erstellten Primern, die Reinheit von alten Primern oder die Qualität von RNA und cDNA wurden die herkömmliche PCR und die Auswertung mittels Agarose-Gelen weiterhin eingesetzt.

Die PCR N2 und N3 in Abbildung 7 wurde zur Testung eines alten und eines neuen Primerpaares und wiederum zum Vergleich der Taq-Polymerasen durchgeführt. Das PCR-Produkt, das durch das neue Primerpaar und mit AmpliTaq Gold amplifiziert wurde, bildet auf dem Gel eine klare Bande (5). Das alte Primerpaar ist verunreinigt; es erscheinen zwei Banden auf dem Gel (6). Unter Verwendung der Sigma-Taq zeigen sich hingegen nur unzuverlässige Ergebnisse, die selbst semiquantitativ nicht korrelieren (1, 2 und 3), obwohl jeweils die gleiche cDNA-Menge als Template eingesetzt wurde.



BP 1 2 3 4 5 6 7 8

Abbildung 7: PCR N2 und N3

Vergleich von AmpliTaq Gold DNA-Polymerase und Taq-Polymerase von Sigma sowie Testung eines alten und neuen Primerpaares, Legende siehe Tabelle 12.

Abkürzungen: PCR, Polymerasekettenreaktion; DNA, Desoxyribonukleinsäure.

Tabelle 12: Legende zu Abbildung 7

BP	Basenpaarmarker	
1	Vα 4, neue Primer	Sigma Taq
2	Vα 4, alte Primer	Sigma Taq
3	Interne Kontrolle	Sigma Taq
4	H_2O-Kontrolle	Sigma Taq
5	Vα 4, neue Primer	AmpliTaq Gold
6	Vα 4, alte Primer	AmpliTaq Gold
7	Interne Kontrolle	AmpliTaq Gold
8	H_2O-Kontrolle	AmpliTaq Gold

In Abbildung 8 ist rechts das erwünschte Ergebnis einer RNA-Isolierung zu sehen. Links wurde ebenfalls das Produkt einer RNA-Isolierung auf das Gel aufgetragen. Die dritte Bande oberhalb der RNA-Banden besteht aus DNA, welche die RNA verunreinigt.

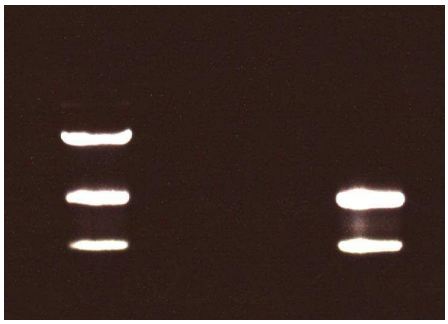


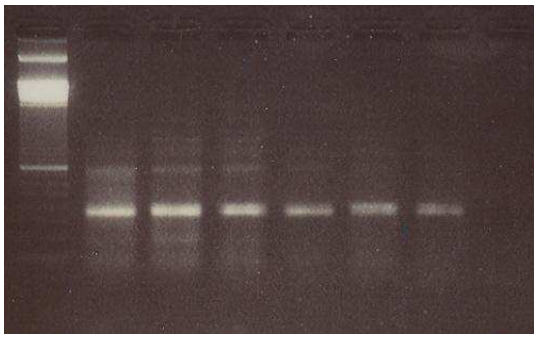
Abbildung 8: RNA-Isolierung

Rechts das erwünschte Ergebnis, links stellt sich als Folge einer Verunreinigung oberhalb der RNA-Banden eine dritte, aus DNA bestehende Bande dar.
Abkürzungen: RNA, Ribonukleinsäure; DNA, Desoxyribonukleinsäure.

Die herkömmliche PCR diente weiterhin zur Erstellung von cDNA-Verdünnungsreihen. Abbildung 9 zeigt beispielsweise die Agarose-Gel-Auswertung einer PCR, für die RNA einer Kontrollperson verwendet wurde. Es wurde ein Kontrollfragment aus dem konstanten Teil des T-Zell-Rezeptorgens amplifiziert. Als Template dienten drei verschiedene cDNAs: cDNA 1 war aus 2 µg RNA synthetisiert worden, cDNA 2 aus 1 µg RNA und cDNA 3 aus 0,5 µg RNA. Für die PCR wurden nun für jede cDNA zwei Ansätze hergestellt, indem jeweils einmal 1 µl und einmal 0,5 µl cDNA eingesetzt wurden, wodurch eine Verdünnungsreihe entstand. Sie zeigt, dass die PCR semiquantitative Vergleiche erlaubt, da die Intensität der Banden auf dem Gel mit der RNA- bzw. cDNA-Menge korreliert.

Tabelle 13: Legende zu Abbildung 9

BP	Basenpaarmarker
1	2 µg RNA, 1 µl cDNA
2	2 µg RNA, 0,5 µl cDNA
3	1 µg RNA, 1 µl cDNA
4	1 µg RNA, 0,5 µl cDNA
5	0,5 µg RNA, 1 µl cDNA
6	0,5 µg RNA, 0,5 µl cDNA
7	H_2O-Kontrolle



BP 1 2 3 4 5 6 7

Abbildung 9: Verdünnungsreihe PCR 3

Agarose-Gel-Auswertung einer Verdünnungsreihe nach Amplifikation eines Kontrollfragments. Eingesetzt wurden verschiedene RNA- und cDNA-Mengen, um darzustellen, dass in der PCR semiquantitative Vergleiche möglich sind. Legende siehe Tabelle 13.
Abkürzungen: PCR, Polymerasekettenreaktion; RNA, Ribonukleinsäure; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

3.2 T-Zellrezeptor-Analyse der T-Zell-Linien

3.2.1 TZR-Analyse der proinsulinspezifischen T-Zell-Linien SD32.5 und SD52c1

Die T-Zellrezeptor-Analyse der proinsulinspezifischen T-Zell-Linien SD32.5 und SD52c1 war bereits in Vorarbeiten vorgenommen worden. Dabei stellte sich heraus, dass SD32.5 monoklonal war und die TZR-Familien Vα 4 und Vβ 14 exprimierte, während SD52c1 aus zwei Subpopulationen bestand. Eine dieser Subpopulationen – SD52c1a - war durch Vα 11 und Vβ 14 gekennzeichnet, die zweite – SD52c1b - durch Vα 14 und Vβ 22. In Tabelle 14 sind die Ergebnisse der TZR-Analyse von SD32.5 und SD52c1 dargestellt. Bei allen Sequenzen konnte ein Vβ-, Jβ- bzw. ein Jα-Nibbling nachgewiesen werden.
Die PBMC des untersuchten T1D-Patienten zeigten in der TZR-Analyse eine Expression aller Vβ-Familien und Subfamilien mit einem normalen CDR3-Längenverteilungsmuster. Eine eventuell T1D-assoziierte starke Veränderung im TZR-Repertoire existierte folglich zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht.

Tabelle 14: T-Zell-Rezeptor-Analyse von SD32.5 und SD52c1 (Rosinger 2003)

Abkürzungen: Segm., Segment; Nibbl., Nibbling; V, variable; D, diversity; J, joining; C, konstant.

Zelllinie	V-Segm.	V-Nibbl.	NDN-Region	J-Nibbl.	J-Segm.	C-Segm.
SD32.5	AV4S2	0	TCTCATCCGCATA	4	AJ23*01	CA
	BV14S1	5	CCTAGAGCCAA	2	BJ2S3	CB
SD52c1a	AV11S1	0	ACC	5	AJ42*01	CA
	BV14S1	4	GGTCCTCGATTGGG	4	BJ1S5	CB
SD52c1b	AV14S2	0	TCATGAAGCTTAG	3	AJ6*01	CA
	BV22S1P	10	GGTATTGGCTCGG	3	BJ1S1	CB

3.2.2 TZR-Analyse der CMV-spezifischen T-Zell-Linien FR3 und FR4

Für die vorliegende Arbeit wurden zwei CMV-spezifische T-Zell-Linien generiert. Die TZR-Analyse wurde bei diesen Zelllinien auf die Vβ-Familien beschränkt. Linie FR3 exprimierte vor allem Vβ 2, aber in geringerem Ausmaß auch Vβ 6, 9 und 17, während FR4 ausschließlich durch Vβ 6 charakterisiert war. Vβ 6 zeigte sowohl bei FR3 als auch bei FR4 die exakt gleiche Sequenz. In Tabelle 15 sind die Ergebnisse der TZR-Analyse von FR3 und FR4 dargestellt. Bei allen Sequenzen konnten wir ein Vβ- und Jβ-Nibbling nachweisen.

Tabelle 15: T-Zell-Rezeptor-Analyse von FR3 und FR4

Abkürzungen: S., Segment; N., Nibbling; V, variable; D, diversity; J, joining, C, konstant.

Zelllinie	V-S.	V-N.	NDN-Region	J-N.	J-S.	C-S.
FR3	BV2S1	0	TCCCTCCGCAGGGGTAAGG	4	BJ1S5	CB
	BV6S5	4	CCGGGGAGGGGGCAAG	4	BJ1S1	CB
	BV9S1/2	4	CCCCGAGCGGATCTCTGGTGC	9	BJ2S5	CB
	BV17	7	ATGGTAGGACAGGGGGA	2	BJ2S2	CB
FR4	BV6S5	4	CCGGGGAGGGGGCAAG	4	BJ1S1	CB

3.3 Nachweisbarkeit der T-Zellrezeptoren der proinsulinspezifischen T-Zell-Linien SD32.5 und SD52c1 im peripheren Blut des T1D-Patienten

3.3.1 PCR (SD32.5)

Mit der herkömmlichen PCR konnte nicht gezeigt werden, dass der für SD32.5 spezifische TZR auch auf T-Zellen exprimiert wird, die im peripheren Blut des Patienten zirkulieren. Unter der Annahme, dass dies nicht auf ein vollständiges Fehlen dieser spezifischen T-Zellen zurückzuführen war, sondern dass das angewandte Nachweisverfahren nicht sensitiv genug war, um in geringer Zahl vorkommende Zellen zu detektieren, wurden nacheinander verschiedene Verfahren auf der Grundlage des TaqMan®-Prinzips erprobt.

3.3.2 RTQ-PCR mit SYBR Green (SD32.5)

Es wurden mehrere Experimente unter Anwendung der RTQ-PCR mit SYBR Green durchgeführt, in denen verschiedene Primerpaare getestet wurden. Für Vα 4 und Vβ 14 erstellten wir je zwei Primer. In cDNA-Verdünnungsreihen aus der T-Zell-Linie SD32.5 konnte die Funktionsfähigkeit der Primer gezeigt werden. In Abbildung 10 ist eine dieser Verdünnungsreihen, in der ein Primerpaar für Vβ 14 verwendet wurde, dargestellt. Bis zu einer Verdünnung von 1:100 000 ließ sich der für SD32.5 spezifische TZR detektieren; geringere Konzentrationen zeigten bei der Amplifikation keinen Unterschied zur H_2O-Kontrolle.

In einem weiteren Experiment konnte der für SD32.5 spezifische TZR in der cDNA aus PBMC des T1D-Patienten nicht nachgewiesen werden (Ergebnis nicht dargestellt). Die Frequenz der für SD32.5 spezifischen T-Zellen in den PBMC des T1D-Patienten war demnach niedriger als in der in Abbildung 10 dargestellten 1:100 000-Verdünnung der Linie SD32.5.

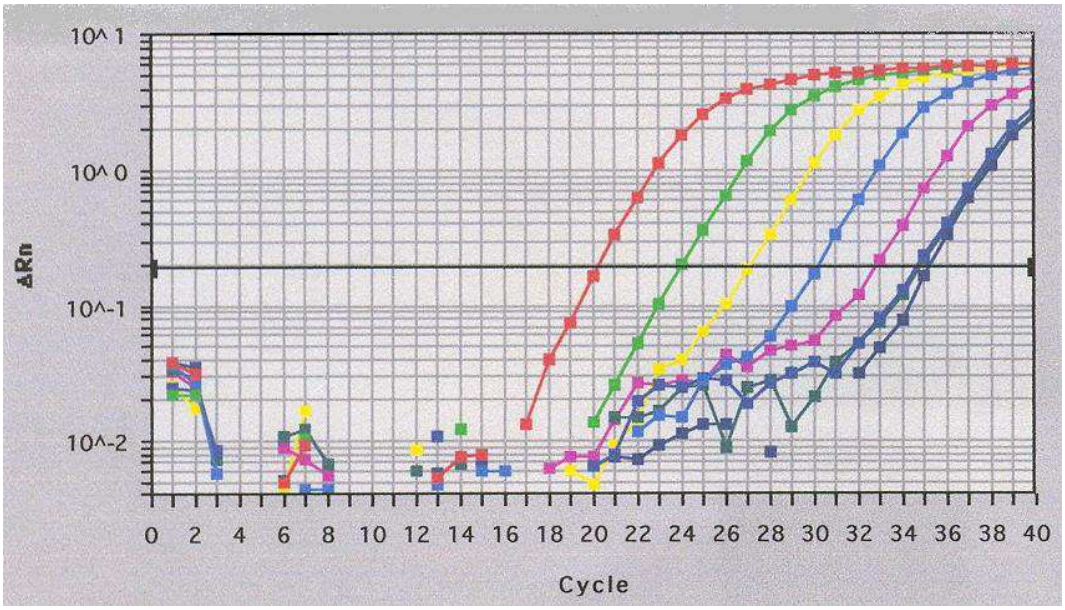


Abbildung 10: RTQ-PCR T1

Verdünnungsreihe mit SYBR Green und Primerpaar für Vβ 14. Als Template wurde cDNA der Linie SD32.5 in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Rot: 1:10, Hellgrün: 1:100, gelb: 1:1000, hellblau: 1:10 000, pink: 1:100 000, mittelblau: 1:1 Million, dunkelgrün: 1:10 Millionen, dunkelblau: H_2O-Kontrolle.

Abkürzungen: RTQ-PCR, real-time quantitative Polymerasekettenreaktion; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

3.3.3 RTQ-PCR (TaqMan®) mit Sonden

3.3.3a) T-Zell-Linie SD32.5

Für Vα 4 wurde eine FAM- bzw. TAMRA-markierte Sonde synthetisiert, die in der RTQ-PCR eingesetzt wurde. Wie in den Vorversuchen mit SYBR Green konnten Verdünnungsreihen, in denen cDNA aus der T-Zell-Linie SD32.5 eingesetzt wurde, erstellt werden; damit war die Funktionsfähigkeit der Sonde erwiesen. Der Nachweis des spezifischen TZR in PBMC des T1D-Patienten konnte jedoch auch mit der Sonde nicht erbracht werden. In Abbildung 11 ist eine dieser Verdünnungsreihen sowie der Nachweisversuch des spezifischen TZR aus PBMC dargestellt: Die rote, hellgrüne und gelbe Kurve zeigen die Amplifikation der cDNA aus Linie SD32.5 1:100, 1:1000 und 1:10 000 verdünnt, für die cDNA aus PMBC des T1D-Patienten (hellblau), aus PBMC einer Kontrollperson (pink) sowie für die H_2O-Kontrolle (dunkelblau) fand keine spezifische Amplifikation statt.

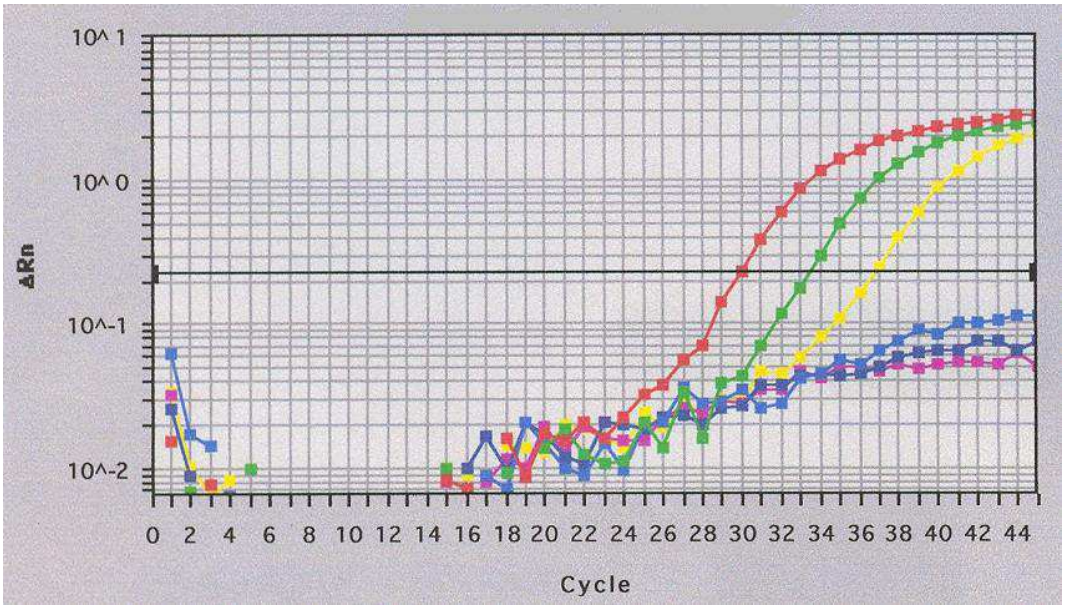


Abbildung 11: RTQ-PCR T15

Amplifikation der cDNA aus Linie SD32.5 1:100 (rot), 1:1000 (hellgrün) und 1:10 000 (gelb) verdünnt; Nachweisversuch des spezifischen T-Zell-Rezeptors in peripheren Blutmonozyten des T1D-Patienten (hellblau, negativ) bzw. einer Kontrollperson (pink, negativ). Dunkelblau: H_2O-Kontrolle.

Abkürzungen: RTQ-PCR, real-time quantitative Polymerasekettenreaktion; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

Um zu zeigen, wie viel cDNA mindestens als Template eingesetzt werden muß, um sie in der PCR noch nachweisen zu können, wurden weitere Titrationen durchgeführt. Zu jeweils einer Million PBMC einer Kontrollperson wurden 10^1 – 10^5 Zellen der T-Zell-Linie SD32.5 titriert. Anschließend folgten RNA-Isolierung und cDNA-Synthese. Das in der RTQ-PCR eingesetzte Template enthielt dann die cDNA der T-Zell-Linie und der Kontrollperson im Verhältnis 1:100 000 bis 1:10. Dabei erhielten wir bis zur Konzentration 1:10 000 verwertbare Signale in der RTQ-PCR. Daraus folgt, dass der nachzuweisende spezifische TZR auf mindestens 100 T-Zellen pro 1 Million PBMC exprimiert werden muss, um noch detektiert zu werden. Bei dem Versuch, den TZR der T-Zell-Linie SD32.5 in PBMC des T1D-Patienten nachzuweisen, war auch mit der Sonde für Vα 4 in der RTQ-PCR kein Signal zu detektieren, was darauf schließen lässt, dass dieser spezifische TZR auf weniger als 100 T-Zellen pro 1 Million PBMC exprimiert wird.

Abbildung 12 zeigt diesen Nachweisversuch: Die Kurven für die Amplifikation der Patienten- und der Kontroll-cDNA (mittelblau bzw. dunkelgrün) sowie für die H_2O-Kontrolle (dunkelblau) erreichen kein Plateau und bewegen sich in einem Bereich, in dem keine spezifische Amplifikation stattgefunden hat. Zusätzlich sind Amplifikationskurven der oben beschriebenen Titration dargestellt: 100 000 (rot), 10 000 (hellgrün), 1000 (gelb)

und 100 (hellblau) Zellen der T-Zell-Linie SD32.5 wurden zu jeweils einer Million PBMC titriert; die cDNA aus dieser Verdünnungsreihe wurde ebenfalls mit der Sonde für Vα 4 amplifiziert, um Vergleichskurven für die Patienten-cDNA zu haben. Pink dargestellt ist die Amplifikationskurve der 1:100 verdünnten Linie SD32.5 ohne Zusatz von PBMC.
Da vor dieser RTQ-PCR eine Normierung mit Cyclophilin stattgefunden hatte, konnten jeweils gleiche cDNA-Mengen eingesetzt werden, so dass die Titrationskurven semiquantitative Vergleiche erlauben.

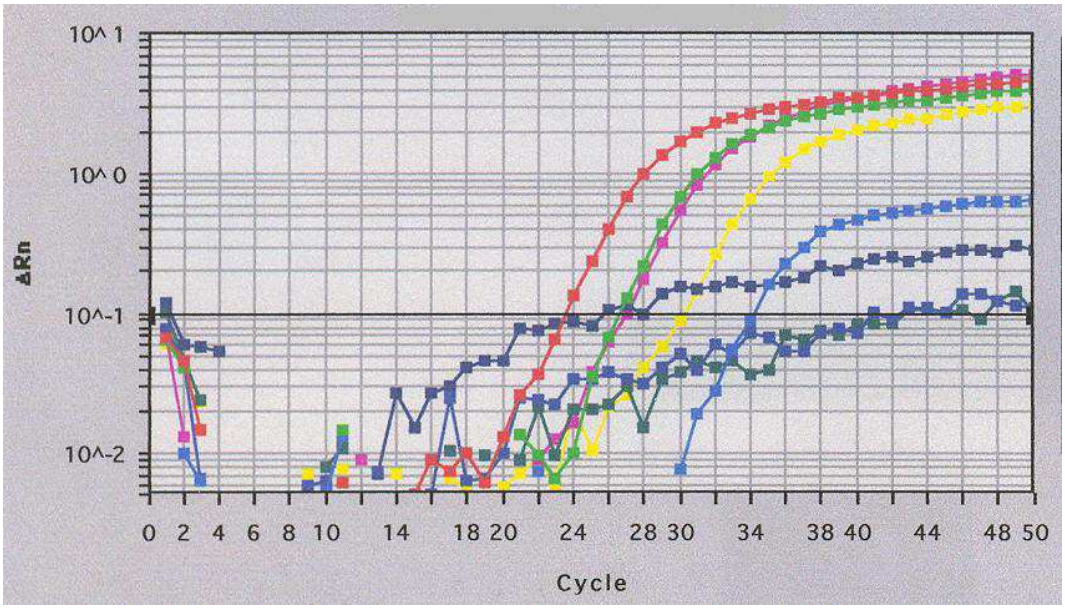


Abbildung 12: RTQ-PCR T25

Nachweisversuch des spezifischen TZR (SD32.5) mit Sonde für Vβ 14 in PBMC des T1D-Patienten (mittelblau, negativ), PBMC einer Kontrollperson (dunkelgrün, negativ), sowie Darstellung einer Verdünnungsreihe: Als Template wurde cDNA der Linie SD32.5 (1:100 verdünnt, pink) sowie cDNA aus einer Titration von x Zellen der Linie SD32.5 zu jeweils einer Million PBMC eingesetzt. x (Rot) = 100 000, x (Hellgrün) = 10 000, x (gelb) = 1000, x (hellblau) = 100. Dunkelblau: H_2O-Kontrolle.
Abkürzungen: RTQ-PCR, real-time quantitative Polymerasekettenreaktion; TZR, T-Zell-Rezeptor; PBMC, periphere Blutmonozyten; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure.

3.3.3b) T-Zell-Linie SD52c1

Um das Vorkommen des für eine der beiden Subpopulationen der T-Zell-Linie SD52 charakteristischen TZR im peripheren Blut des T1D-Patienten zu untersuchen, wurde eine FAM- bzw. TAMRA-markierte Sonde für Vβ 14 hergestellt und in der TaqMan®-PCR verwendet. Dieses Experiment wurde trotz der negativen Ergebnisse beim

Nachweisversuch des TZR der T-Zell-Linie SD32.5 im peripheren Blut durchgeführt, da die Möglichkeit bestand, dass die gesuchten T-Zellen in höherer Frequenz zirkulierten als die vorher untersuchten. Es zeigte sich, dass auch dieser TZR im peripheren Blut mit der TaqMan®-PCR nicht nachgewiesen werden konnte.

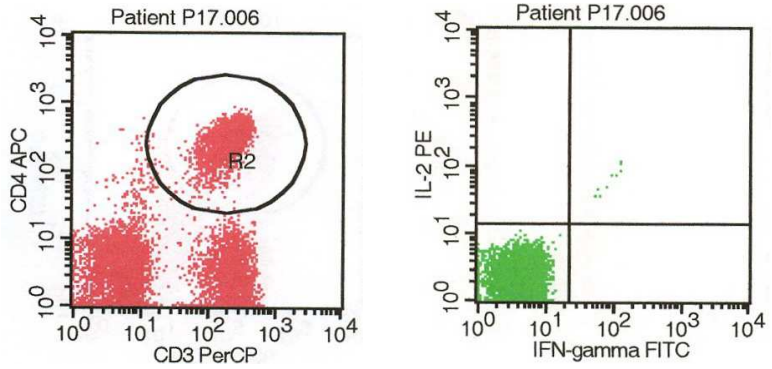
3.3.4 Nested PCR mit anschließender RTQ-PCR (TaqMan®) mit Sonde (SD32.5)

Mit Hilfe der „verschachtelten“ PCR erfolgte die Vervielfältigung kleinster cDNA-Mengen. Die cDNA aus PBMC des T1D-Patienten wurde mit dem familienspezifischen Primer Vα 4 und dem AC3´-Primer aus der konstanten Region voramplifiziert. Das Produkt dieser PCR diente dann als Template für die RTQ-PCR mit einer Sonde für Vα 4. Die nested PCR bewirkte jedoch keine Verbesserung der Nachweisbarkeit.

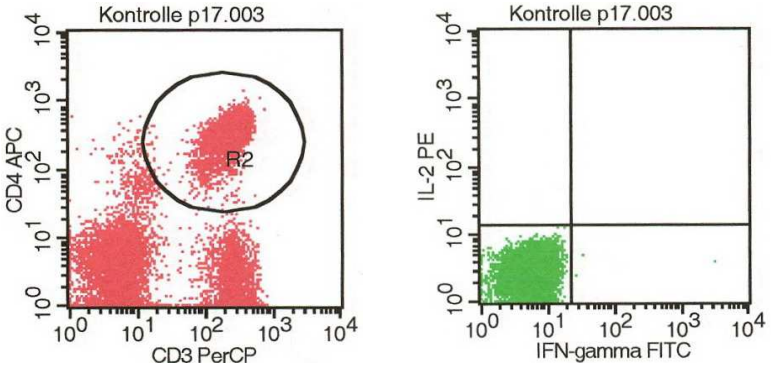
3.3.5 Cytokine Secretion Assay mit PBMC des Diabetes-Patienten (SD52c1)

Da die spezifischen T-Zellen im peripheren Blut des Patienten in zu geringer Frequenz für die üblichen Nachweisverfahren vorlagen, wurde ein Cytokine Secretion Assay durchgeführt, mit dessen Hilfe eine Anreicherung der gesuchten Zellen stattfinden sollte. Dafür erfolgte eine Stimulation mit dem Peptid p17, danach wurden die IFNγ- und IL-2-sezernierenden Zellen von den übrigen getrennt. In der folgenden durchflusszytometrischen Untersuchung (FACS) konnten IFNγ- und IL-2-positive Zellen, damit also wahrscheinlich autoreaktive Th1-Zellen, detektiert werden. In Abbildung 13 sind die IFNγ- und IL-2-positiven T-Zellen des T1D-Patienten (13a) und einer Kontrollperson (13b) nach Stimulation mit p17 sowie die IFNγ- und IL-2-positiven T-Zellen des T1D-Patienten nach Inkubation in Medium (13c) dargestellt. Abbildung 14 zeigt die IFNγ- und IL-2-positiven Zellen des T1D-Patienten nach der Anreicherung durch den Cytokine Secretion Assay.

a)



b)



c)

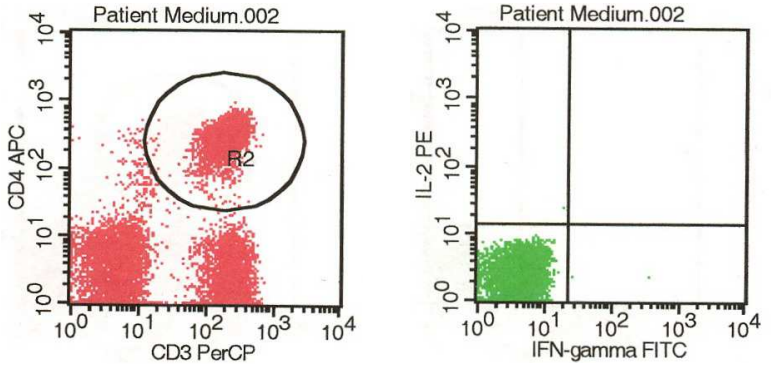


Abbildung 13: IFNγ- und IL-2-positive Zellen nach Stimulation mit p17

IFNγ- und IL-2-positive T-Zellen des T1D-Patienten (a) und einer Kontrollperson (b) nach Stimulation mit p17 sowie IFNγ- und IL-2-positive T-Zellen des T1D-Patienten.nach Inkubation in Medium (c).
Rot dargestellt ist jeweils links ein Dot-Plot von CD3 und CD4, wobei in Region R2 die CD3- und CD4-positiven Lymphozyten eingegrenzt sind. Grün dargestellt ist jeweils rechts ein Dot-Plot von INF-γ und IL-2; im rechten oberen Quadranten befinden sich die IFNγ- und IL-2-positiven Zellen.
Abkürzungen: IFN, Interferon; IL, Interleukin; p17, Peptid 17; T1D, Typ-1-Diabetes, CD, cluster of differentiation.

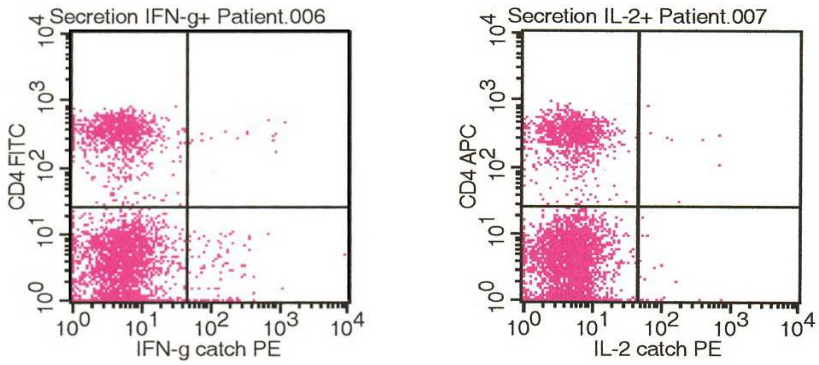


Abbildung 14: IFNγ- und IL-2-positive Zellen des T1D-Patienten nach dem Cytokine Secretion Assay
Nach Stimulation mit p17 und Anreicherung durch den Cytokine Secretion Assay links ein Dot-Plot von CD4 und IFNγ, im rechten oberen Quadranten befinden sich die IFNγ-positiven CD4-Zellen. Rechts ein Dot-Plot von CD4 und und IL-2; die IL-2-positiven CD4-Zellen sind im rechten oberen Quadranten dargestellt.
Abkürzungen: IFN, Interferon; IL, Interleukin; T1D, Typ-1-Diabetes; p17, Peptid 17; CD, cluster of differentiation.

Nach dem Secretion Assay erfolgte eine RTQ-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip mit einer Sonde für Vβ14, bei der die cDNA aus den IFNγ- und IL-2-positiven Zellen eingesetzt wurde; diese führte wiederum zu keinem positiven Signal.

3.4 Nachweisbarkeit der T-Zellrezeptoren der CMV-spezifischen T-Zell-Linien FR3 und FR4 im peripheren Blut des CMV-positiven Probanden

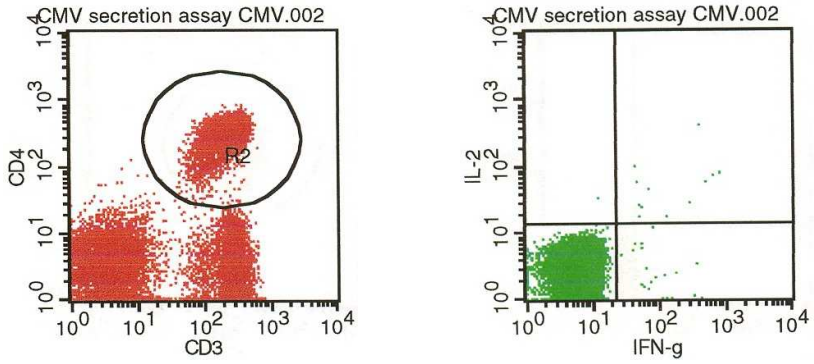
3.4.1 RTQ-PCR (TaqMan®) mit Sonden

Für Vβ 2 und Vβ 6 wurden FAM-markierte Sonden synthetisiert und in der RTQ-PCR (TaqMan®) eingesetzt. Beide Sonden zeigten gute Ergebnisse bei cDNA-Verdünnungsreihen und Titration (1 Mio. PBMC zu 10, 100, 1000, 10 000, 100 000 Zellen der Linie FR3), jedoch konnte auch hier zunächst kein Nachweis der beiden gesuchten TZR in PBMC des CMV-positiven Probanden erbracht werden. Nach Durchführung des Cytokine Secretion Assay (siehe 3.4.2) wurde in den folgenden RTQ-PCR-Versuchen jeweils ein Tube mit cDNA aus PBMC des CMV-positiven Probanden eingesetzt; hierbei konnte mit der Sonde für Vβ 6 reproduzierbar ein positives Ergebnis erzielt werden, ohne dass Veränderungen am PCR-Protokoll oder an der eingesetzten cDNA stattgefunden hatten. Eine positive Amplifikation ist in Abbildung 18 dargestellt.

3.4.2 Cytokine Secretion Assay mit PBMC des CMV-positiven Probanden

Da die CMV-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut des CMV-positiven Probanden ebenfalls in zu geringer Frequenz vorlagen, um sie direkt durch PCR oder RTQ-PCR nachzuweisen, wurde auch hier ein Cytokine Secretion Assay durchgeführt. Nach der Stimulation mit CMV-Antigen führten wir eine Zellseparation (MACS) durch, bei der die IFNγ- und IL-2-sezernierenden Zellen isoliert wurden. Danach konnten in der durchflusszytometrischen Untersuchung IFNγ- und IL-2-positive Zellen nachgewiesen werden. In Abbildung 15a sind die IFNγ- und IL-2-positiven T-Zellen des CMV-positiven Probanden nach Stimulation mit CMV-Antigen zu sehen, in 15b nach Inkubation in Medium ohne Antigen. Abbildung 16a zeigt die IFNγ-positiven, 16b die IL-2-positiven T-Zellen nach der Anreicherung durch den Cytokine Secretion Assay.

a)



b)

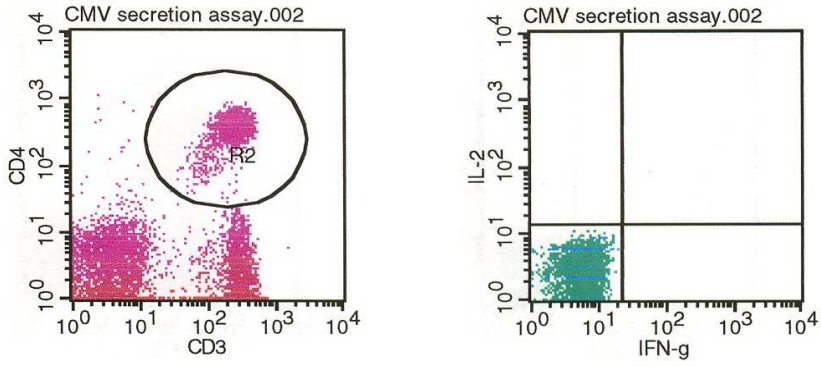


Abbildung 15: IFNγ- und IL-2-positive Zellen nach Stimulation mit CMV-Antigen

IFNγ- und IL-2-positive T-Zellen des CMV-positiven Probanden nach Stimulation mit CMV-Antigen (a) sowie nach Inkubation in Medium (b). Rot dargestellt ist links ein Dot-Plot von CD3 und CD4, wobei in Region R2 die CD3- und CD4-positiven Lymphozyten eingegrenzt sind. Grün dargestellt ist rechts ein Dot-Plot von INF-γ und IL-2; im rechten oberen Quadranten befinden sich die IFNγ- und IL-2-positiven Zellen.

Abkürzungen: IFN, Interferon; IL, Interleukin; CMV, Cytomegalievirus; CD, cluster of differentiation.

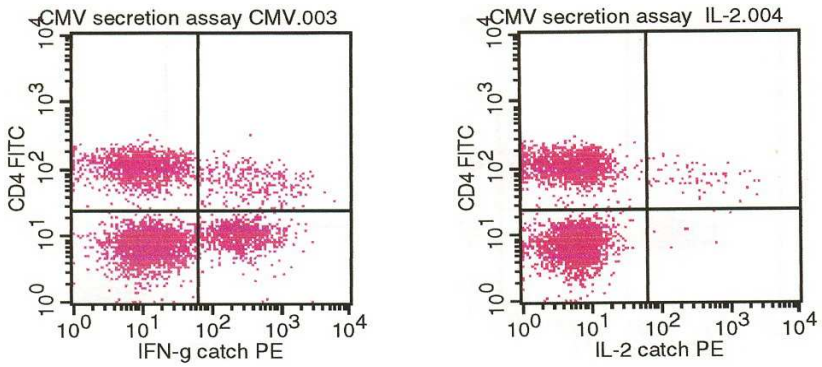


Abbildung 16: IFNγ- und IL-2-positive Zellen nach dem Cytokine Secretion Assay

Nach Stimulation mit CMV-Antigen und Anreicherung durch den Cytokine Secretion Assay links ein Dot-Plot von CD4 und IFNγ; im rechten oberen Quadranten befinden sich die IFNγ-positiven CD4-Zellen. Rechts ein Dot-Plot von CD4 und und IL-2; die IL-2-positiven CD4-Zellen sind im rechten oberen Quadranten dargestellt.
Abkürzungen: IFN, Interferon; IL, Interleukin, CMV, Cytomegalievirus; CD, cluster of differentiation.

Nach dem Secretion Assay wurde eine RTQ-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip mit Sonden für Vβ 2 und Vβ 6 durchgeführt, die Ergebnisse sind in den Abbildungen 17 und 18 dargestellt. Dabei konnten wir in der cDNA aus den IFNγ- und IL-2-positiven Zellen mit beiden Sonden den gesuchten TZR nachweisen. Zusätzlich gelang mit der Sonde für Vβ 6 der Nachweis des TZR aus PBMC des CMV-positiven Probanden. In mehreren Versuchen war dieser Nachweis der TZR, sowohl für die IFNγ- und IL-2-positiven Zellen, als auch für die PBMC des CMV-positiven Probanden, reproduzierbar. Die Amplifikation der cDNA einer CMV-negativen Kontrollperson, der cDNA aus den IFNγ- und IL-2-negativen Zellen sowie die H_2O-Kontrolle fielen jeweils negativ aus, so dass davon ausgegangen werden kann, dass hier tatsächlich der spezifische Nachweis des TZR der CMV-spezifischen T-Zell-Linien FR3 und FR4 erbracht wurde.

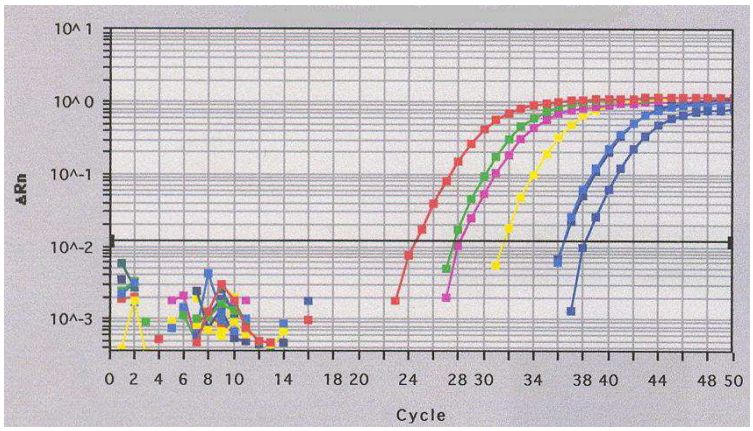


Abbildung 17: RTQ-PCR CMV 8 Vβ 2

Nachweis des CMV-spezifischen T-Zell-Rezeptors (Linie FR3) mit Sonde für Vβ 2: cDNA aus IFNγ- und IL-2-positiven Zellen (mittelblau bzw. dunkelblau) und Darstellung einer Verdünnungsreihe: Als Template wurde cDNA der Linie FR3 (1:100 verdünnt, pink) sowie cDNA aus einer Titration von x Zellen der Linie FR3 zu jeweils einer Million PBMC eingesetzt. x (Rot) = 100 000, x (Hellgrün) = 10 000, x (gelb) = 1000, x (hellblau) = 100. Keine Amplifikation fand statt für: cDNA aus PBMC des CMV-positiven Probanden und der CMV-negativen Kontrollperson, cDNA aus IFNγ- und IL-2-negativen Zellen sowie die H_2O-Kontrolle.

Abkürzungen: RTQ-PCR, real-time quantitative Polymerasekettenreaktion; CMV, Cytomegalievirus; IFN, Interferon; IL, Interleukin; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure; PBMC, periphere Blutmonozyten.

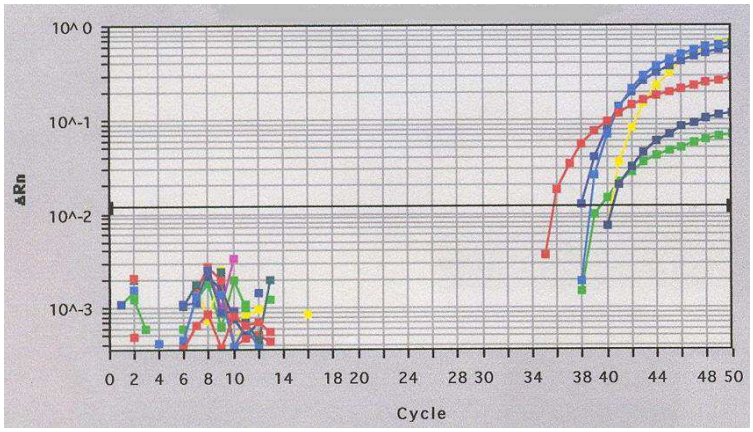


Abbildung 18: RTQ-PCR CMV 8 Vβ 6

Nachweis des CMV-spezifischen T-Zell-Rezeptors (Linie FR3 und FR4) mit Sonde für Vβ 6: cDNA aus PBMC des CMV-positiven Probanden (dunkelblau), cDNA aus IFNγ- und IL-2-positiven Zellen (hell- bzw. mittelblau) und Darstellung einer Verdünnungsreihe: Als Template wurde cDNA der Linie FR3 (1:100 verdünnt, gelb) sowie cDNA aus einer Titration von 100 000 Zellen der Linie FR3 (rot) und 10 000 Zellen (hellgrün) zu jeweils einer Million PBMC eingesetzt. Keine Amplifikation fand statt für: cDNA aus PBMC der CMV-negativen Kontrollperson, cDNA aus IFNγ- und IL-2-negativen Zellen sowie die H_2O-Kontrolle.

Abkürzungen: RTQ-PCR, real-time quantitative Polymerasekettenreaktion; CMV, Cytomegalievirus; IFN, Interferon; IL, Interleukin; cDNA, komplementäre Desoxyribonukleinsäure; PBMC, periphere Blutmonozyten.

4. DISKUSSION

Beim Typ-1-Diabetes zerstören autoreaktive T-Zellen selektiv die insulinproduzierenden β-Zellen des Pankreas. Sie sind der Schlüssel zum Verständnis dieser chronischen Erkrankung und stellen damit einen Ansatzpunkt für therapeutische oder präventive Möglichkeiten dar.
In der vorliegenden Arbeit sollten autoreaktive T-Zellen im peripheren Blut eines T1D-Patienten quantifiziert und der Nachweis antigenspezifischer TZR-Klone erbracht werden. Es wurden verschiedene Nachweisverfahren angewandt und verglichen, um eine einfache und gleichermaßen hochsensitive Screeningmethode für das Vorhandensein antigenspezifischer autoreaktiver T-Zellen beim T1D zu etablieren.
Da die Detektion spezifischer autoreaktiver T-Zellen im peripheren Blut entscheidend von ihrer Frequenz abhängt, wurden CMV-reaktive, also virusspezifische T-Zellen zum Vergleich mit den autoreaktiven proinsulinspezifischen T-Zellen untersucht.

4.1 PCR, RTQ-PCR mit SYBR Green, RTQ-PCR mit Sonden, Nested PCR mit anschließender RTQ-PCR mit Sonden, Cytokine Secretion Assay – ein Vergleich der angewandten Methoden

4.1.1 PCR

Die herkömmliche PCR ist eine einfaches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA-Molekülen. Als einfache Methode kann sie jedoch nur angesehen werden, wenn ein standardisiertes Protokoll befolgt wird, das unter immer gleichen Bedingungen angewendet werden kann. In der experimentellen Anwendung für die vorliegende Arbeit trugen die unterschiedlichsten Faktoren zu den Ergebnissen bei:

- Annealingtemperatur

Um eine zuverlässige, einfach durchzuführende Screeningmethode zu etablieren, müsste es möglich sein, alle TZR-Familien in einem einzigen PCR-Ansatz und somit mit einer Annealingtemperatur zu amplifizieren. Der in unserer Arbeitsgruppe verwendete R-Primer besitzt eine Annealingtemperatur von 72 °C. Vα- oder Vβ-familienspezifische Primer mit sehr hoher oder niedriger Annealingtemperatur können zu PCR-Produkten schlechterer Qualität führen, da die PCR in ihrem Fall nicht unter optimalen Bedingungen stattfindet.

- Auswertung auf Agarose-Gelen

Nach Amplifikation der familienspezifischen cDNA-Fragmente mit der herkömmlichen PCR waren nicht immer alle Familien jeweils gleichzeitig auf dem Agarose-Gel nachweisbar. Ein Grund dafür könnte sein, dass kleinere Mengen an PCR-Produkt auf einem Gel nicht sichtbar gemacht werden können, wenn der spezifische TZR zwar in der peripheren Blutprobe vorhanden war und auch amplifiziert wurde, seine Frequenz jedoch zu niedrig war. Anhand von Verdünnungsreihen konnte dies gezeigt werden. In der TaqMan-PCR waren PCR-Produkte nachweisbar, die aus bis zu 1:1Mio. verdünnter cDNA amplifiziert worden waren. Bei nachträglicher Auswertung auf einem Agarose-Gel konnten sie nur bis zu einer Verdünnung von 1:100 000 sichtbar gemacht werden.

- Primer

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer waren in mehreren anderen Arbeiten ausgetestet worden und hatten zuverlässige Ergebnisse geliefert (Manfras et al. 1997). Die oben angesprochenen Probleme mit der Annealingtemperatur traten nur dann auf, wenn mehrere Ansätze zu einer PCR zusammengefasst wurden; jeder Primer hatte vorher seine Zuverlässigkeit schon unter Beweis gestellt. Bei negativen Ergebnissen wurde immer auch der Primer separat auf Verunreinigungen etc. untersucht und im Zweifelsfall ausgetauscht.

- Taq-Polymerase, Puffer und $MgCl_2$-Konzentration

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Taq-Polymerasen, eine Taq-Polymerase von Sigma sowie die AmpliTaq Gold® DNA Polymerase von Applied Biosystems, verwendet. Mit der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase konnten zuverlässigere, reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Wahrscheinlich kann dies dem insgesamt veränderten PCR-Protokoll bei Einsatz der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase zugeschrieben werden. Zum einen wurden ein anderer Puffer, der ein optimales

Zusammenspiel mit der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase gewährleistet, und eine höhere $MgCl_2$-Konzentration eingesetzt; außerdem beinhaltete das PCR-Protokoll nun einen vor die eigentliche PCR geschalteten Inkubationsschritt bei 95 °C, um eine effiziente Hot Start PCR zu ermöglichen.

4.1.2 Real-time quantitative PCR

Bei der RTQ-PCR wird die Amplifikation durch Einsatz einer Lichtquelle und einer Kamera im PCR-Gerät sichtbar gemacht, während sie stattfindet. Der Verlauf der Reaktion lässt Rückschlüsse auf die ursprünglich vorhandene Templatemenge zu.

- RTQ-PCR mit SYBR Green

Die für Vα 4 und Vβ 14 erstellten Primer lieferten in Vorversuchen gute Ergebnisse. Dennoch konnte der für SD 32.5 spezifische TZR in der cDNA aus PBMC des T1D-Patienten nicht nachgewiesen werden. Falls in den Vorversuchen Artefakte produziert worden wären, hätten wir auch bei der Amplifikation des spezifischen TZR Artefakte erhalten und damit ein falsch positives Ergebnis erzielt. Da jedoch überhaupt kein PCR-Produkt nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass die Vorversuche erfolgreich waren und der spezifische TZR tatsächlich nicht in durch die SYBR-Green-Methode nachweisbaren Mengen vorhanden war.

- RTQ-PCR mit Sonden und Nested PCR mit anschließender RTQ-PCR

Wir verwendeten eine FAM- bzw. TAMRA-markierte Sonde für Vα 4, um den für die T-Zell-Linie SD32.5 charakteristischen TZR nachzuweisen, sowie eine in gleicher Weise fluorogene Sonde für Vβ 14, um den TZR von SD52c1 zu detektieren. In Verdünnungsreihen, in denen cDNA aus den T-Zell-Linien SD32.5 und SD52c1 eingesetzt wurde, zeigte sich die Funktionsfähigkeit der Sonden. In PBMC des T1D-Patienten konnten die spezifischen TZR jedoch auch mit dieser Methode nicht detektiert werden. Wie bei der SYBR-Green-Methode war hier überhaupt kein PCR-Produkt nachweisbar, während die Vorversuche ausnahmslos erfolgreich verlaufen waren. Dies scheint darauf hinzuweisen, dass der spezifische TZR jeweils in zu geringen Mengen im peripheren Blut vorliegt.

Auch die „nested“ PCR konnte die Nachweisbarkeit nicht verbessern. Hierfür wurde eine Voramplifikation mit dem familienspezifischen Primer Vα 4 und dem AC3´-Primer aus der konstanten Region durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde als Template für eine anschließende RTQ-PCR mit einer Sonde für Vα 4 verwendet. Dass auch hier der gesuchte TZR nicht detektiert werden konnte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass er im peripheren Blut zum Zeitpunkt der Blutentnahme gar nicht vorhanden war, denn mit der nested PCR könnten eigentlich auch extrem geringe cDNA-Mengen nachgewiesen werden (Chelly et al. 1989).
Um die für die T-Zell-Linien FR3 und FR4 spezifischen TZR im peripheren Blut des CMV-positiven Probanden zu detektieren, wurden für Vβ 2 und Vβ 6 FAM-/TAMRA-markierte Sonden synthetisiert und in der RTQ-PCR eingesetzt. Beide Sonden zeigten gute Ergebnisse bei cDNA-Verdünnungsreihen und Titrationen, jedoch konnte auch hier zunächst kein Nachweis der beiden gesuchten TZR in PBMC des CMV-positiven Probanden erbracht werden; dieser gelang erst nach wiederholt durchgeführten Versuchen mit der Sonde für Vβ 6. Auch diese spezifischen T-Zellen schienen also nur in sehr geringer Frequenz vorzuliegen.

4.1.3 Cytokine Secretion Assay

Unter der Annahme, dass die spezifischen TZR im peripheren Blut des T1D-Patienten und des CMV-positiven Probanden in zu geringer Frequenz für die üblichen Nachweisverfahren vorhanden waren, musste eine Anreicherung der gesuchten Zellen stattfinden. Hierzu führten wir zwei Cytokine Secretion Assays durch. Die cDNA aus den isolierten IFNγ- und IL-2-sezernierenden T-Zellen diente als Template für eine anschließende RTQ-PCR mit einer Sonde für Vβ 14, um den SD52.c1a-spezifischen TZR darzustellen, beziehungsweise Sonden für Vβ 2 und 6 für die FR3- und FR4-T-Zell-Linien.
Im Falle der proinsulinspezifischen TZR konnten IFNγ- und IL-2-sezernierende Zellen isoliert werden. Ein Beweis für das Vorkommen des SD52c1-spezifischen TZR konnte zwar nicht erbracht werden, allerdings deuten die IFNγ- und IL-2-sezernierenden Zellen auf das Vorhandensein von autoreaktiven, wahrscheinlich p17-spezifischen Th1-Zellen hin.
Auch aus dem peripheren Blut des CMV-positiven Probanden konnten T-Zellen gewonnen werden, die als Reaktion auf die Stimulation mit CMV-Antigen IFNγ und IL-2

sezernierten. Hier gelang nun auch der Nachweis der für FR3 und FR4 spezifischen TZR mittels RTQ-PCR. Der Assay kann also als alternative Methode eingesetzt werden, wenn Zellen in zu geringer Frequenz vorliegen, um durch eine RTQ-PCR detektiert zu werden.

4.2 Nachweisbarkeit von spezifischen T-Zellen in der Literatur

4.2.1 Antigenspezifische T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen

Bei Autoimmunerkrankungen zeigt das TZR-Repertoire häufig eine erhebliche Restriktion. In einer Studie von Oksenberg et al. (1990) wurden in den Gehirnläsionen von Multiple-Sklerose-Patienten nur 2 bis vier verschiedene Vα-TZR-Familien exprimiert. Battistini et al. konnten eine klonale Vδ2-Jδ3-TZR-Population ebenfalls bei Patienten mit Multipler Sklerose nachweisen (1995). Auch bei der rheumatoiden Arthritis konnten aktivierte T-Zellen in Synovialflüssigkeit detektiert werden, die ein restringiertes Vα- und Vβ-Repertoire aufwiesen (Fischer et al. 1996). Eine oligoklonale Immunantwort auf ein Antigen scheint also bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen eine Rolle zu spielen. Bei der Multiplen Sklerose wurden beispielsweise DR2-restringierte Vα3- und Vα8-T-Zell-Klone beschrieben, die spezifisch für ein Peptid des Myelin Basic Protein waren (Zang et al. 1998).
Auch beim T1D kann das TZR-Repertoire verändert sein. Es wird angenommen, dass in der Pathogenese des T1D ein Superantigen an die Membran pankreatischer Inselzellen bindet und dadurch eine ganze TZR-Familie stimuliert. Dabei findet gleichzeitig auch eine Aktivierung autoreaktiver, Inselzellantigen-spezifischer T-Zellen statt. Anschließend expandieren die spezifischen T-Zell-Klone selektiv. In Inselzellinfiltraten von T1D-Patienten, die post mortem untersucht wurden, konnten erhöhte Frequenzen eines Vβ7-T-Zell-Klons nachgewiesen werden (Conrad et al. 1994). Bei T1D-Patienten nach Pankreastransplantation waren GAD65-spezifische CD4-positive T-Zellen mit identischen TZR über mehrere Jahre selbst unter Immunsuppression in unterschiedlichen Frequenzen nachweisbar (Laughlin et al. 2008).

4.2.2 Nachweisverfahren

Antigenspezifische T-Zellen können über ihre Effektorfunktionen wie Zytokinproduktion oder Proliferation detektiert werden. Eines dieser Verfahren ist der enzyme-linked

immunospot assay (ELISPOT). Beim ELISPOT kann die Zytokinsekretion von T-Zellen nach in-vitro-Stimulation mit Antigen sichtbar gemacht werden. Für ELISPOT wird eine Sensitivität von einer Zelle pro 1 Million postuliert. Eine andere Nachweismethode ist der limiting dilution assay (LDA). Die beiden Verfahren haben gemeinsam, dass sie nur den Effekt darstellen, der nach der Bindung des TZR an den MHC-Peptid-Komplex eintritt, nicht die Bindung selbst. Mit der Tetramer-Technologie gelang der Schritt zur Visualisierung dieser Bindung: In der MHC-Klasse-II-Tetramer-Technologie „färben" fluoreszenzmarkierte MHC-Peptid-Multimere die antigenspezifischen T-Zellen und ermöglichen so ihren direkten Nachweis. In einigen Studien konnten multimer-positive, also antigenspezifische CD4-positive Zellen in PBMC erst detektiert werden, nachdem sie in vitro expandiert worden waren (Bill et al. 2002, Laughlin 2008). Meyer et al. zeigten, dass es möglich ist, antigenspezifische T-Zellen mit Hilfe der Tetramertechnologie in PBMC zu detektieren. Da das immunodominante Epitop von Borrelia burgdorferi stammte und PBMC von Patienten mit aktiver Lyme-Borreliose untersucht wurden, kann davon ausgegangen werden, dass hier die antigenspezifischen T-Zellen aufgrund der akuten Entzündungsreaktion in höherer Frequenz im peripheren Blut zirkulierten als autoreaktive T-Zellen beim T1D (Meyer et al. 2000).

Influenza-spezifische CD4-positive T-Zellen konnten von Lucas et al. ex vivo mittels Tetramertechnologie detektiert werden; hierbei wurden Frequenzen von 1:830000 bis 1:16400 (0,00012 bis 0,0061 % der CD4-Zellen) festgestellt (Lucas et al. 2004).

Bei transgenen Mäusen konnten T-Zellen mit BDC2.5-Spezifität mittels FACS und PCR nachgewiesen werden. Allerdings exprimierten dabei mehr als 95 % der $CD4^+$- und $CD8^+$-Zellen die BDC2.5-β-Kette; die untersuchten Zellen stammten aus peripheren Lymphknoten, sodass hier kein Vergleich mit unserer Methodik möglich ist (Katz et al. 1993).

Scriba et al. detektierten antigenspezifische CD4-positive Zellen mit Frequenzen von 1 : 250000 in humanen PBMC ex vivo, indem sie die Tetramertechnologie mit einer Anreicherung durch Magnetic Beads kombinierten (Scriba et al. 2005). Mit der gleichen Methodik konnten Day et al. HCV-spezifische CD4-Zellen mit Frequenzen von 1:1200 und 1:111000 nachweisen (Day u. Seth 2003).

Eine Charakterisierung CMV-spezifischer T-Zellen mittels IFNγ Secretion Assay führte Rauser 2003 durch. Hierbei wurden unter anderem CMV-spezifische CD4- positive T-Zell-Linien generiert. Nach Stimulation mit CMV-Lysat und Anreicherung durch einen Secretion Assay erfolgte der intrazelluläre IFNγ-Nachweis. Der Prozentsatz der IFNγ-

produzierenden CD4-positiven Zellen lag bei 0.57 % (1:175) in den PBMC und stieg nach Anreicherung und sieben Tagen Expansion auf 27.35 % (1:3,66) (Rauser 2003).

4.3 Nachweisbarkeit von spezifischen TZR in der vorliegenden Arbeit

4.3.1 Nachweisgrenze

Unsere Titrationsversuche ergaben, dass der nachzuweisende spezifische TZR auf mindestens 100 T-Zellen pro 1 Million PBMC exprimiert werden muss, um mit der RTQ-PCR detektiert zu werden. Eine bestimmte Antigenspezifität wird jedoch nur auf einer von 10^3 bis 10^5 T-Zellen exprimiert (Katz et al. 1993). Eine Million PBMC enthält ca. 450 000 bis 500 000 T-Helferzellen. Nach Katz wird demnach die nachzuweisende Antigenspezifität auf 5 bis 500 Zellen pro eine Million PBMC exprimiert; diese Zahlen bewegen sich also an der ermittelten Nachweisgrenze unserer RTQ-PCR. Ein positives Ergebnis wäre dann mehr oder weniger vom Zufall abhängig; als Grundlage für eine Screeningmethode ist dies nicht akzeptabel. Durch den Cytokine Secretion Assay wurde die Nachweisgrenze verschoben, so dass im Fall der CMV-spezifischen T-Zellen ein Nachweis des TZR mittels RTQ-PCR möglich wurde. Bei den proinsulinspezifischen T-Zellen konnte zwar nicht der TZR selbst nachgewiesen werden, jedoch das Vorhandensein von IFNγ- und IL-2-sezernierenden autoreaktiven, wahrscheinlich p17-spezifischen Th1-Zellen.

4.3.2 Gründe für die Schwierigkeiten beim Nachweis von spezifischen TZR

- Frequenz der T1D-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu virusspezifischen T-Zellen

Der Nachweis T1D-spezifischer autoreaktiver T-Zellen und Aussagen über ihre Frequenz sind problematisch. Durch die retroperitoneale Lage des Pankreas ist eine direkte Zellentnahme mittels Punktion nur unter hohem Komplikationsrisiko möglich. Autoreaktive Zellen müssen also im peripheren Blut nachgewiesen werden. Die Existenz autoreaktiver T-Zellen beim T1D wurde dadurch bewiesen, dass CD4-positive T-Zellklone aus peripherem Blut generiert wurden, die reaktiv gegen Inselzellautoantigene waren. Ein weiterer indirekter Beweis ist die gut dokumentierte Existenz von inselzellautoantigenspezifischem IgG bei T1D-Patienten zum Zeitpunkt der

Diagnosestellung, die auf das Vorhandensein von autoreaktiven T-Zellen hinweist (Peakman et al. 2001). Bei neudiagnostizierten T1D-Patienten kann die T-Zell-Reaktivität nach Stimulation mit Inselzellantigenen jedoch niedriger als bei antikörperpositiven Probanden sein (Durinovic-Bello et al. 1996); dies könnte den Nachweis der autoreaktiven T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt im Krankheitsverlauf – wie bei unserem T1D-Patienten – noch erschweren.

Die Frequenzen CMV-spezifischer CD4-T-Zellen zeigen eine starke interindividuelle Variabilität – auch unabhängig vom Stattfinden einer aktiven Virusreplikation (Benz et al. 2002). Unsere FACS-Analysen ergaben, dass bei den CMV-spezifischen T-Zellen durch den Cytokine Secretion Assay eine höhere Anreicherung als bei den p17-spezifischen T-Zellen stattgefunden haben muss (Abbildung 14 und Abbildung 16 im Ergebnisteil): Die Anzahl der IFNγ- und IL-2-positiven Zellen jeweils im rechten oberen Quadranten unterscheidet sich deutlich. Es ist zu vermuten, dass in den PBMC die Frequenz autoreaktiver T-Zellen ebenfalls viel niedriger ist als die Frequenz CMV-spezifischer T-Zellen.

- Frequenz der dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wie Makrophagen und B-Lymphozyten zu den antigenpräsentierenden Zellen; die dendritischen Zellen gelten dabei als potenteste antigenpräsentierende Zellen (Gallucci et al. 1999) und sind im Rahmen der Autoimmunität an der Peptidpräsentation beteiligt. Sie aktivieren T-Zellen in vivo und in vitro durch ihre Expression von MHC und co-stimulatorischen Molekülen sowie durch Sekretion von Zytokinen (Banchereau et al. 1998). Jedoch ist ihr Anteil in den PBMC wahrscheinlich zu gering, um die Reaktivität gegen verschiedene Antigene nachzuweisen. B-Zellen und Makrophagen sind zwar auch an der Antigenpräsentation beteiligt, aber die Präsentation von immunogenen Peptiden bei autoimmunen Prozessen scheint vor allem eine Aufgabe der dendritischen Zellen zu sein. In Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnten Prozessierung und Präsentation der Peptide aus dem Proinsulinmolekül durch autologe PBMC zunächst nicht nachgewiesen werden; durch die Verwendung angereicherter HLA-identischer dendritischer Zellen als antigenpräsentierende Zellen konnte jedoch dargestellt werden, dass sowohl das SD32.5 stimulierende Peptid A5-21 (p21) als auch das SD52c1 stimulierende Peptid C18-A1 (p17) aus dem Proinsulinmolekül prozessiert werden konnten (Rosinger 2003).

In mehreren Studien konnten Reaktivitäten gegen verschiedene Antigene z. B. durch Proliferations-Assays nicht nachgewiesen werden; dies ist eventuell ebenfalls auf die

niedrige Frequenz von dendritischen antigenpräsentierenden Zellen zurückzuführen (Dosch et al. 1999, Rudy et al. 1995, Schloot et al. 1996).

- Notwendigkeit von co-stimulatorischen Signalen

Eine weitere Schwierigkeit bei der Detektion autoreaktiver T-Zellen könnten die in vivo immer wieder stattgefundenen Restimulationen sein, die bewirkt haben könnten, dass die T-Zellen teilweise anerg sind. Dann wären co-stimulatorische Faktoren notwendig, um die autoreaktiven Zellen nachzuweisen. Allerdings wurde in der eigenen Arbeitsgruppe im Vorfeld untersucht, ob die Zugabe von CD28-Antikörpern als co-stimulatorisches Signal eine Auswirkung auf die Expression der Aktivierungsmarker Ox40 (CD134) und CD25 nach Stimulation von PBMC mit Tetanus Toxoid hat; dies war nicht der Fall (Rosinger 2003). Dies schließt jedoch nicht aus, dass andere co-stimulatorische Signale notwendig sein könnten, um anerge autoreaktive T-Zellen zu aktivieren und damit nachweisbar zu machen.

- Modifizierung der T-Zellen in vitro

Eine genaue Charakterisierung von T-Zellen ist nur unter Langzeitbedingungen möglich; diese in-vitro-Bedingungen können die Zellen jedoch modifizieren (Giuliani 2009). Beispielsweise führt IL-2 bei gleichzeitiger Anwesenheit von Antigen zu unspezifischem Wachstum und schafft ein Th1-Milieu. IL-2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche werden nach der Aktivierung der T-Zelle vermehrt. Dadurch kann die Zugabe von weiterem IL-2 eine ständige Proliferation bewirken (Rosinger 2003).

4.4 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Detektion antigenspezifischer T-Zellen die Nachweisgrenze der RTQ-PCR bei einer Zellzahl liegt, die gerade dem Vorkommen einer bestimmten Antigenspezifität in den PBMC entspricht. Mit einer Sonde für Vβ 6 gelang reproduzierbar der Nachweis des TZR aus PBMC des CMV-positiven Probanden mittels RTQ-PCR, obwohl dies in Vorversuchen mehrmals nicht erfolgreich gewesen war. Dies spricht dafür, dass sich die Zahl der spezifischen T-Zellen tatsächlich an der Nachweisgrenze bewegte und ihr Nachweis stochastisch möglich war, jedoch nicht so zuverlässig, wie es für eine Screeningmethode notwendig wäre. Der proinsulinspezifische TZR konnte mittels RTQ-PCR in den PBMC des T1D-Patienten

nicht detektiert werden. So konnte dargestellt werden, dass die Frequenz autoreaktiver T-Zellen in den PBMC niedriger ist als die Frequenz anderer antigenspezifischer T-Zellen.
Im Cytokine Secretion Assay konnte die Nachweisgrenze durch Anreicherung der IFNγ- und IL-2-positiven Zellen verschoben werden, jedoch nicht soweit, dass auch der proinsulinspezifische TZR direkt detektiert werden konnte. Allerdings konnte das Vorhandensein von autoreaktiven, wahrscheinlich p17-spezifischen Th1-Zellen durch den Nachweis IFNγ- und IL-2-sezernierender Zellen in den PBMC des T1D-Patienten gezeigt werden. Im Fall der CMV-spezifischen T-Zellen reichte die Anreicherung aus, um den anschließenden Nachweis des TZR mittels RTQ-PCR zu ermöglichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Typ-1-Diabetes (T1D) ist eine chronische Stoffwechselerkrankung. Bei der Pathogenese spielen autoreaktive T-Zellen, die die insulinproduzierenden β-Zellen des Pankreas selektiv zerstören, eine herausragende Rolle. Die Immunantwort richtet sich dabei gegen Autoantigene wie Glutamatdecarboxylase 65, Tyrosinphosphatase, Insulin, Proinsulin und Präproinsulin. T-Zellen werden in aggressive T-Helfer-(Th)1-Zellen, die Interferon (IFN) γ, Tumornekrosefaktor α oder Interleukin- (IL-) 2 sezernieren, und putativ regulatorische Th2-Zellen, deren Immunantwort in der Sekretion von IL-4, -5 oder -10 besteht, eingeteilt. Der T-Zell-Rezeptor (TZR) ist ein Zelloberflächenprotein der T-Zelle, das für die Erkennung von Antigenfragmenten verantwortlich ist, die von antigenpräsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden. Die Präsentation der Peptide erfolgt durch Proteine, die zum Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) gehören. Wie bei anderen Autoimmunerkrankungen kann das TZR-Repertoire beim T1D eine Restriktion zeigen. Bei der Immunantwort auf Inselzellantigene werden also bestimmte TZR-Genfamilien bevorzugt verwendet.

In Vorarbeiten waren zwei T-Zell-Linien generiert worden. Die monoklonale Linie SD32.5 exprimierte die TZR-Familien Vα4 und Vβ14 und war spezifisch für p21, ein Peptid des Proinsulins. SD52c1 war spezifisch für p17 und bestand aus zwei Subpopulationen; eine dieser Subpopulationen war durch Vα11 und Vβ14 gekennzeichnet, die zweite durch Vα14 und Vβ22. In der vorliegenden Arbeit sollte der Nachweis erbracht werden, dass die spezifischen TZR auch auf T-Zellen exprimiert werden, die im peripheren Blut des T1D-Patienten, von dem die Linien stammten, zirkulieren.

Da autoreaktive T-Zellen zu den antigenspezifischen T-Zellen mit einer sehr niedrigen Frequenz in den peripheren Blutmonozyten (PBMC) gehören, ist die Detektion autoantigenspezifischer TZR-Klone problematisch. Virusspezifische T-Zellen weisen dagegen eine hohe Frequenz im peripheren Blut auf. In der vorliegenden Arbeit wurden exemplarisch zwei Cytomegalievirus- (CMV-) spezifische T-Zell-Linien generiert, um verschiedene Nachweisverfahren zu vergleichen und dabei eine einfache Screeningmethode für das Vorhandensein antigenspezifischer autoreaktiver T-Zellen beim T1D zu etablieren. Die CMV-spezifische Linie FR3 exprimierte vor allem Vβ 2, aber in

geringerem Ausmaß auch Vβ 6, 9 und 17. FR4 war ausschließlich durch Vβ 6 charakterisiert.

Mit der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) konnten weder der für SD32.5 spezifische TZR noch der CMV-spezifische TZR im peripheren Blut des T1D-Patienten beziehungsweise des CMV-positiven Probanden nachgewiesen werden. Auch in der Real-time Quantitative (RTQ) PCR mit SYBR Green zeigte sich kein positives Signal für den SD32.5-spezifischen TZR. Mittels RTQ-PCR nach dem TaqMan®-Prinzip mit Sonden war in der RTQ-PCR ebenfalls kein positives Signal zu detektieren, was durch den Vergleich mit Titrationskurven darauf schließen ließ, dass dieser spezifische TZR auf weniger als 100 T-Zellen pro 1 Million PBMC exprimiert wird. Mit einer Sonde für Vβ 6 gelang jedoch der Nachweis des CMV-spezifischen TZR in PBMC des CMV-positiven Probanden, da die virusspezifischen Zellen in höherer Frequenz zirkulieren als die autoreaktiven Zellen. Zur Anreicherung der gesuchten Zellen wurden zwei Cytokine Secretion Assays durchgeführt. In beiden Assays konnten IFNγ- und IL-2-sezernierende T-Zellen isoliert werden. Die cDNA aus diesen T-Zellen diente als Template für eine anschließende RTQ-PCR mit einer Sonde für Vβ 14, um den SD52.c1a-spezifischen TZR darzustellen, bzw. Sonden für Vβ 2 und 6 für die FR3- und FR4-T-Zell-Linien. Der Nachweis des proinsulinspezifischen TZR im peripheren Blut des T1D-Patienten konnte wiederum nicht erbracht werden. Allerdings deutet das Vorhandensein von IFNγ- und IL-2-sezernierenden T-Zellen auf autoreaktive, wahrscheinlich p17-spezifische Th1-Zellen und damit auf das Vorkommen des SD52c1-spezifischen TZR hin. In der RTQ-PCR mit cDNA aus den isolierten IFNγ- und IL-2-sezernierenden T-Zellen des CMV-positiven Probanden gelang der Nachweis der für FR3 und FR4 spezifischen TZR.

Eine einfache und gleichermaßen hochsensitive Screeningmethode für das Vorhandensein antigenspezifischer autoreaktiver T-Zellen beim T1D konnte nicht etabliert werden, da die Frequenzen dieser T-Zellen unter der Nachweisgrenze der RTQ-PCR liegen. Durch Anreicherung im Cytokine Secretion Assay konnte die Nachweisgrenze zwar verschoben werden, jedoch nicht soweit, dass auch die proinsulinspezifischen T-Zellen detektiert werden konnten. Im Fall der CMV-spezifischen T-Zellen gelang schon in der RTQ-PCR der Nachweis des spezifischen TZR, nach Anreicherung im Cytokine Secretion Assay war dies jedoch noch zuverlässiger möglich. Eine RTQ-PCR im Anschluss an einen Cytokine Secretion Assay kann also als eine geeignete Methode angesehen werden, um antigenspezifische T-Zellen im peripheren Blut nachzuweisen, die eine höhere Frequenz als autoreaktive T-Zellen aufweisen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ablamunits V, Elias D, Reshef T, Cohen IR: Islet T Cells Secreting IFN-γ in NOD Mouse Diabetes: Arrest by p277 Peptide Treatment. Journal of Autoimmunity 11: 73-81 (1998)

2. Alleva DG, Crowe PD, Jin L, Kwok WW, Ling N, Gottschalk M, Conlon PJ, Gottlieb PA, Putnam AL, Gaur A: A disease-associated cellular immune response in type 1 diabetics to an immunodominant epitope of insulin. J Clin Invest 107: 173-180 (2001)

3. André I, Gonzalez A, Wang B, Katz J, Benoist C, Mathis D: Checkpoints in the progression of autoimmune disease: lessons from diabetes models. Proc Natl Acad Sci USA 93: 2260-2263 (1996)

4. Arden B, Clark SP, Kabelitz D, Mak TW: Human T-cell receptor variable gene segment families. Immunogenetics 42: 455 (1995)

5. Arif S, Tree TI, Astill TP, Tremble JM, Bishop AJ, Dayan CM, Roep BO, Peakman M: Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. J Clin Invest 113: 451-463 (2004)

6. Atkinson MA, Bowman MA, Campbell L, Darrow BL, Kaufman DL, Maclaren NK: Cellular immunity to a determinant common to glutamate decarboxylase and coxsackie virus in insulin-dependent diabetes. J Clin Invest 94: 2125-2129 (1994)

7. Bach JF: Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. Endocr Rev. 15: 516-42 (1994)

8. Bach JF: Infections and autoimmune diseases. J Autoimmun 25: 74-80 (2005)

9. Banchereau J, Steinman RM: Dendritic cells and the control of immunity. Nature 392: 245-252 (1998)

10. Baldino F, Chesselet M-F, Lewis ME: High-resolution in situ hybridization histochemistry. Meth Enzymol 168: 761-777 (1989)

11. Battistini L, Selmaj K, Kowal C, Ohmen J, Modlin RL, Raine CS, Brosnan CF: Multiple sclerosis: limited diversity of the V delta 2-J delta 3 T-cell receptor in chronic active lesions. Ann Neurol 37: 198-203 (1995)

12. Benz C, Utermöhlen O, Wulf A, Villmow B, Dries J, Goeser T, Koszinowski U, Busch D: Virus-specific T-cells as sensitive indicators of acutely and persistently enhanced anti-CMV immune reactions in liver tansplant patients. Gastroenterology 122: 1201-1215 (2002)

13. Bill JR, Kotzin BL: Use of soluble MHC class II/peptide multimers to detect antigen-specific T cells in human disease. Arthritis Res 4: 261-265 (2002)

14. Böhm BO, Manfras B, Seissler J, Schoffling K, Gluck M, Holzberger G, Seidl S, Kuhnl P, Trucco M, Scherbaum WA: Epidemiology and immunogenetic background of islet cell antibody-positive nondiabetic schoolchildren. Ulm-Frankfurt population study. Diabetes 40: 1435-1439 (1991)

15. Breslauer KJ et al.: Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc Natl Acad Sci USA 83: 3746-3750 (1986)

16. Campbell IL, Kay TW, Oxbrow L, Harrison LC: Essential role for interferon-gamma and interleukin-6 in autoimmune insulin-dependent diabetes in NOD/Wehi mice. J Clin Invest 87: 739-742 (1991)

17. Chelly J, Concordet JP, Kaplan JC, Kahn A: Illegitimate transcription: transcription of any gene in any cell type. Proc Natl Acad Sci USA 86: 2617-2621 (1989)

18. Chothia C, Boswell DR, Lesk AM: The outline structure of the T-cell alpha beta receptor. Embo J 7: 3745-3755 (1988)

19. Conrad B, Weidman E, Trucco G, Rudert WA, Behboo R, Ricordi C, Rodriguez-Rilo H, Finegold D, Trucco M: Evidence for superantigen involvement in insulin-dependent diabetes mellitus aetiology. Nature 371: 351-5 (1994)

20. Day CL, Seth NP: Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. J Clin Invest 112: 831-842 (2003)

21. Dosch H, Cheung RK, Karges W, Pietropaolo M, Becker DJ: Persistent T cell anergy in human type 1 diabetes. J Immunol 163: 6933-6949 (1999)

22. Durinovic-Bello I, Boehm BO, Ziegler AG: Predominantly Recognized ProInsulin T Helper Cell Epitopes in Individuals With and Without Islet Cell Autoimmunity. J Autoimmun 18: 55-66 (2002)

23. Durinovic-Bello I, Hummel M, Ziegler AG: Cellular immune response to diverse islet cell antigens in IDDM. Diabetes 45: 795-800 (1996)

24. Fischer DC, Opalka B, Hoffmann A, Mayr W, Haubeck HD: Limited heterogeneity of rearranged T cell receptor V alpha and V beta transcripts in synovial fluid T cells in early stages of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 39: 454-62 (1996)

25. Gallucci S, Lolkema M, Matzinger P: Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. Nat Med 5: 1249-1255 (1999)

26. Giuliani L, Mele R, Di Giovine M, Altieri L, Crinò A, Ravà L, Fierabracci A: Detection of GAD65 Autoreactive T-Cells by HLA Class I Tetramers in Type 1 Diabetic Patients. J Biomed Biotechnol 2009: 576219 (2009)

27. Grawunder U, West RB, Lieber MR: Antigen receptor gene rearrangement. Curr Opin Immunol 10:172-80 (1998)

28. Handschumacher R, Harding M, Rice J, Drugge R, Speicher D: Cyclophilin: A specific cytosolic binding protein for cyclosporin A. Science 226: 544-547 (1984)

29. Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH: Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. J Exp Med 192: 1213-1222 (2000)

30. Kamradt T, Mitchison NA: Tolerance and autoimmunity. N Engl J Med 344: 655-664 (2001)

31. Katz JD, Benoist C, Mathis D: T helper Cell subsets in Insulin-Dependent Diabetes. Science 268: 1185-1188 (1995)

32. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D: Following a Diabetogenic T Cell from Genesis through Pathogenesis. Cell 74: 1098-1100 (1993)

33. Kerner W, Brückel J: Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus. In: Scherbaum WA (Hrsg.): Praxis-Leitlinien der Deutschen Diabetes-Gesellschaft. Diabetologie und Stoffwechsel 2008, Band 3, Supplement 2, Thieme, Stuttgart New York, S. 131-133 (2008)

34. Kolb H: Benign versus destructive insulitis. Diabetes Metab Rev 13: 139-146 (1997)

35. Laughlin E, Burke G, Pugliese A, Falk B, Nepom G: Recurrence of Autoreaktive Antigen-specific CD4+ T Cells in Autoimmune Diabetes after Pancreas Transplantation. Clin Immunol 128: 23-30 (2008)

36. Lucas M, Day CL, Wyer JR, Cunliffe SL, Loughry A, McMichael AJ, Klenerman P: Ex vivo phenotype and frequency of influenza virus-specific CD4 memory T cells. J Virol 78: 7284-7287 (2004)

37. Manfras BJ, Rudert WA, Trucco M, Boehm BO: Analysis of the alpha/beta T-cell receptor repertoire by competitive and quantitative family-specific PCR with exogenous standards and high resolution fluorescence based CDR3 size imaging. J Immunol Methods 210: 235-249 (1997)

38. Meyer AL, Trollmo C, Crawford F, Marrack P, Steere AC, Huber BT, Kappler J, Hafler DA: Direct enumeration of *Borrelia*-reactive CD4 T cells *ex vivo* by using MHC class II tetramers. Proc Natl Acad Sci USA 97: 11433-11438 (2000)

39. Mülhardt C: Der Experimentator: Molekularbiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg Berlin, S. 71, 72 (2000)

40. Mueller R, Krahl T, Sarvetnik N: Pancreatic expression of interleukin-4 abrogates insulitis and autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. J Exp Med 184: 1093-1099 (1996)

41. Oksenberg JR, Stuart S, Begovich AB, Bell RB, Erlich HA, Steinman L, Bernard CC: Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients. Nature 345: 344-6 (1990)

42. Peakman M, Tree TI, Endl J, van Endert P, Atkinson MA, Roep BO: Characterization of Preparations of GAD65, Proinsulin, and the Islet Tyrosine Phosphatase IA-2 for Use in Detection of Autoreaktive T-Cells in Type 1 Diabetes. Diabetes 50: 1749-1754 (2001)

43. Pette M, Fujita K, Wilkinson D, Altmann DM, Trowsdale J, Giegerich G, Hinkkanen A, Epplen JT, Kappos L, Wekerle H: Myelin autoreacivity in multiple sclerosis: recognition of myelin basic protein in the context of HLA-DR2 products by T lymphocytes of multiple sclerosis patients and healthy donors. Proc Natl Acad Sci U S A 87:7968-7972 (1990)

44. Rabinovitch A: Immunoregulatory and cytokine imbalances in the pathogenesis of IDDM. Therapeutic intervention by immunostimulation? Diabetes 43: 613-621 (1994)

45. Rauser G: Generierung von virus-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer. S. 61, rer. nat. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen (2003)

46. Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD: Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. Science 257: 238 (1992)

47. Rose NR: Mechanisms of Autoimmunity. Autoimmune Hepatitis, Seminars in Liver Disease, 22: 387-394 (2002)

48. Rosinger S: Funktionelle Charakterisierung humaner T-Zellen beim Typ 1 Diabetes. S. 82, 102-104, 110, Humanbiol Dissertation, Universität Ulm (2003)

49. Rothe H, Faust A, Schade U, Kleemann R, Bosse G, Hibino T, Martin S, Kolb H: Cyclophosphamide treatment of female non-obese diabetic mice causes enhanced expression of inducible nitric oxide synthase and interferon-gamma, but not of interleukin-4. Diabetologia 37: 1154-1158 (1994)

50. Rudy G, Stone N, Harrison LC, Colman PG, McNair P, Brusic V, French MB, Honeyman MC, Tait B, Lew AM: Similar peptides from two beta cell autoantigens, proinsulin and glutamic acid decarboxylase, stimulate T cells of individuals at risk for insulin-dependent diabetes. Mol Med 1: 625-633 (1995)

51. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE: Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. Nucl Acids Res 18: 6409.6412 und Erratum: Nucl Acids Res 19: 698 (1990)

52. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354 (1985)

53. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A: Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401: 708-712 (1999)

54. Savonet V, Maenhaut F, Miot F, Pirson I: Pitfalls in the use of several “housekeeping” genes as standards for quantitation of mRNA: The example of thyroid cells. Anal Biochem 247: 165-167 (1997)

55. Schloot NC, Roep BO, Wegmann D, Yu L, Chase HP, Wang T, Eisenbarth GS: Altered immune response to insulin in newly diagnosed compared to insulin-treated diabetic patients and healthy control subjects. Diabetologia 40: 564-572 (1997)

56. Scriba TJ, Purbhoo M, Day CL, Robinson N, Fidler S, Fox J, Weber JN, Klenerman P, Sewell AK, Phillips RE: Ultrasensitive Detection and Phenotyping of CD4+ T Cells with Optimized HLA Class II Tetramer Staining. J Immunol 175: 6334-6343 (2005)

57. Snell GD, Dausset J, Nathenson S: Histocompatibility. New York Academic Press (1976)

58. Strebelow M, Schlosser M, Ziegler B, Rjasanowski I, Ziegler M: Karlsburg Type I diabetes risk study of a general population: frequencies and interactions of the four major Type I diabetes-associated autoantibodies studied in 9149 schoolchildren. Diabetologia 42: 661-670 (1999)

59. Svejgaard A, Platz P, Ryder LP: HLA and disease 1982 – a survey. Immunol Rev 70: 193-218 (1983)

60. Sun AM, Coddling JA, Haist RE: A study of glucose tolerance and insulin response in partially depancreatized dogs. Diabetes 23: 424-432 (1974)

61. Thomson G, Nicholas FW, Bodmer WF, O´Neill ME, Hedrick PW, Hudes E: Analysis of negative and multiple HLA antigen disease associations. Tissue Antigens 26: 293-306 (1985)

62. Undlien DE, Friede T, Rammensee HG, Joner G, Dahl-Jorgensen K, Sovik O, Akselsen HE, Knutsen I, Ronningen KS, Thorsby E: HLA-encoded genetic predisposition in IDDM: DR4 subtypes may be associated with different degrees of protection. Diabetes 46: 143-149 (1997)

63. Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ: Reconstitution of cellular immunity against cytomeglovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. N Engl J Med 333: 1038 (1995)

64. Williams AF, Strominger JL, Bell J, Mak TW, Kappler J, Marrack P, Arden B: Nomenclature for T-cell receptor (TCR) gene segments of the immune system: WHO-IUIS Nomenclature Sub-committee on TCR Designation. Bull World Health Org 71: 113 (1993)

65. Zang YC, Kozovska M, Aebischer I, Li S, Boehme S, Crowe P, Rivera VM, Zhang JZ: Restricted TCR Valpha gene rearrangements in T cells recognizing an immunodominant peptide of myelin basic protein in DR2 patients with multiple sclerosis. Int Immunol 10 (7): 991-8 (1998)

ANHANG

Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller
Kulturmedium	Iscoves modified Medium IMDM 1 % Penicillin-Streptomycin 7 % Humanserum	Gibco BRL Life Technologies, Gaithsburg, USA Gibco Bio Whittacker Cambrex Company, Walkersville, Maryland, USA
Einfriermedium	40% Humanserum 20% DMSO	Bio Whittacker Sigma Biosciences, St. Louis, USA
Loading buffer	50 mg Blue Dextran 1 ml 25 mM EDTA 4 ml Formamid	Sigma Sigma Sigma
10 x TBE-Puffer	108 g Tris-Base 55 g Borsäure 8,3 g Na_4EDTA 1 l H_2O ad iniectabilia	USB, Cleveland, USA Cabiochem, Bad Soden, Deutschland Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
10 % APS-Lösung	1 g Ammoniumpersulfat 10 ml H_2O bidest	Eastman chemical, Köln, Deutschland
50 x TAE-Puffer	242 g Tris-Base 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA H_2O bidest auf 1000 ml auffüllen	USB, Cleveland, USA Merck Diagnostica, Darmstadt, Deutschland Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Bernhard O. Böhm danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Experimente für diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können.

Herrn PD Dr. Burkhard Manfras bin ich sehr dankbar für die wissenschaftliche Unterstützung und Beratung.

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dr. Silke Rosinger bedanken, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Bei den Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. Böhm möchte ich mich herzlich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, mein besonderer Dank gilt dabei Frau Angelika Kurkhaus und Frau Andrea Wissmann.

Ein ganz spezieller Dank geht an meine Schwiegermutter Sophie Breitruck, die sich während der Erstellung dieser Arbeit liebevoll um ihren Enkel gekümmert hat.

Der wichtigste Platz in meinem Leben und in meinem Herzen gehört Jochen und Manuel Breitruck – ich danke Euch für alles!

LEBENSLAUF

Name:	Judith Gadesmann
Geburtsdatum:	13.01.1977
Geburtsort:	Esslingen am Neckar
Eltern:	Dorothea Gadesmann, geb. Müller
	Frieder Gadesmann
Familienstand:	verheiratet mit Jochen Breitruck
Kinder:	Manuel Breitruck
1983 – 1987	Grundschule Aichwald
1987 – 1996	Theodor-Heuss-Gymnasium Esslingen
19.06.1996	Abitur
1996 – 1997	Freiwilliges Soziales Jahr Diakonie Stetten
1997 – 2004	Studium der Medizin an der Universität Ulm
01.01.1998	Eintritt in die Bundeswehr
06.09.2000	Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03.09.2003	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003-2004	Praktisches Jahr an der Universitäts-kinderklinik Ulm, am General Hospital Wexford, Irland, am Universitätsspital Zürich, Schweiz, und an der Kreisklinik Biberach
17.11.2004	Ärztliche Prüfung
2004-2008	Tätigkeit als Sanitätsoffizier in der Abteilung Dermatologie des Bundeswehrkrankenhauses Ulm und in der Reinhardt-Kaserne Ellwangen
2008-2009	Elternzeit
seit Mai 2009	Tätigkeit als Sanitätsoffizier in der Abteilung Dermatologie, Bundeswehrkrankenhaus Ulm