Aus der Klinik für Neurologie
Arbeitsgruppe Neuroimmunologie
Direktor: Prof. Dr. W. H. Oertel
Des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

Einfluss von Alter und HLA-Haplotyp auf das TCR-VB-Repertoire und Lymphozyten Subtypen im peripheren Blut.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
(Dr. med.)

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Rami Gaber
aus Bottrop

Marburg/Lahn 2008

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.
Dekan: Prof. Dr. Rothmund
Referent: Prof. Dr. Bernhard Hemmer
1. Koreferent:

1. Zusammenfassung 5

2. Einleitung 7

2.1 Der T-Zell-Rezeptorkomplex 7

2.2 Signalübertragung bei Antigenerkennung 11

2.3 TCR Rearrangement 12

2.4 T-Zell-Selektion im Thymus 15

2.5 T-Zellaktivierung 16

2.6 Das HLA System 18

2.7 TCR – Auffälligkeiten bei Autoimmunkrankheiten. 20

2.8 Methoden zum Nachweis der TCR – Expression 21

2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) 21

2.8.2 Durchflusszytometrie 22

2.9 Fragestellung der Studie 22

3. Material und Methoden 24

3.1 Auswahl der Probanden 24

3.2 HLA Typisierung 24

3.3 Durchflusszytometrische Messungen (FACS®-Analysen) 25

3.4 Probenaufbereitung 27

3.5 Auswertungen der durchflusszytometrischen Analysen 29

3.6 TCR -VB-Ketten Analyse 30

3.6.1 Statistische Analysen 31

3.6.2 Multiples Testen 32

3.6.3 Der Subtypen Panel 33

4. Ergebnisse 34

4.1 TCR-VB-Ketten Expression auf unterschiedlichen T – Zellpopulationen 34

4.2 Expression der TCR-VB-Ketten in Abhängigkeit vom Alter 41

4.2.1 CD4+ und CD8+ T-Zellen 46

4.2.2 CD4+CD45RO+ und CD4+CD45RO- T-Zellen 46

4.2.3 CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen 46

4.3 Abweichung einzelner TCR-VB-Ketten vom Durchschnitt 47
4.4 Einfluss des HLA Haplotyps auf das TCR-VB-Repertoire 52
4.5 Altersabhängigkeit weiterer Lymphozyten Subtypen 55
4.5 Altersabhängigkeit weiterer Lymphozyten Subtypen 56

5. Diskussion 58
5.1 Normalverteilung des TCR-VB-Repertoires bei gesunden Kontrollpersonen . 58
5.2 Einfluss des Alters auf Lymphozyten und das TCR-VB-Repertoire 61
5.3 Einfluss von HLA auf das TCR-VB-Repertoire 64

6. Literatur 67

7. Anhang 84
7.1 Lebenslauf 84
7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer 85
7.3 Danksagung 85
7.4 Erklärung 85

1. Zusammenfassung

Diese Arbeit befasste sich mit flusszytometrischen Analysen von peripherem Blut gesunder Probanden. Entzündliche-, Autoimmun-, oder Tumorerkrankungen verändern das TCR-VB-Repertoire von gesunden Menschen. Um diese Veränderungen untersuchen zu können, muss man die Normalverteilung des TCR-VB-Repertoires kennen. Welche Faktoren neben den o. g. Erkrankungen beim Menschen Lymphozyten und das TCR-VB-Repertoire im peripheren Blut beeinflussen ist bisher nur unzureichend untersucht. Der Faktor Alter spielt eine Rolle, da sich T-Lymphozyten nach Antigenkontakt teilweise dauerhaft in ihrer Form und Funktion verändern. HLA spielt bei der T-Zellreifung im Thymus bei der positiven und negativen Selektion von T-Zellen eine entscheidende Rolle und somit bei der Entstehung des TCR-VB-Repertoires.

Unsere Probanden hatten im Vergleich untereinander ein sehr ähnliches TCR-VB-Repertoire. Man kann demnach die von uns erhobenen Daten als Referenzwerte nutzen, um mögliche Veränderungen bei entzündlichen oder Autoimmunerkrankungen zu untersuchen und weiterhin zur Verlaufskontrolle der T-Zell-Populationen bei Therapien.

Die Tatsache, dass sich bei Menschen mit unterschiedlichem HLA-Haplotyp dennoch ein sehr homogenes TCR-VB-Repertoire entwickelt, lässt darauf schließen, dass der Einfluss von HLA auf das entstehende TCR-VB-Repertoire insgesamt geringer ist, als der Einfluss von Faktoren in der Keimbahn. Dennoch fanden wir für einige HLA-Merkmale signifikante Unterschiede in der Expression einzelner TCR-VB-Ketten gegenüber Probanden, die dieses Merkmal nicht besaßen. Diese Unterschiede zeigten sich noch deutlicher beim Vergleich von homozygoten mit heterozygoten und nicht Allelträgern.

Die Expression einzelner TCR-VB-Ketten ist im Laufe des Lebens relativ stabil, wobei die Anzahl der expandierten Ketten bei älteren Menschen zunimmt. Hierbei handelt es sich um klonale Expansionen von T-Zellen, die im Laufe des Lebens auf-

grund von Infektionen entstanden sind. Für B-Zellen und Natürliche Killerzellen fanden wir keine signifikanten Veränderungen im Alter.

This study focused on flowcytometric analysis of peripheral blood of healthy donors. The TCR-VB-repertoire of healthy test persons is changed by inflammatory-, autoimmune- and tumour diseases. One has to know about the normal distribution of the TCR-VB-repertoire in order to explore these changes. Besides the above mentioned diseases, only little is known about factors influencing lymphocytes and the TCR-VB-repertoire in the peripheral blood. Age is a factor of importance as form and function of the T-lymphocytes are changed permanently after contact with antigens. HLA plays a decisive role in the T-cell maturation through the positive and negative selection in the thymus and thus in the development of the TCR-VB-repertoire.

In our population we found that the TCR-VB-repertoire was very homogeneous. Thus our data can be used as reference values for research on changes due to inflammatory- or autoimmune diseases as well as for clinical monitoring of the T-cell population in therapies.

The fact that humans with different HLA-haplotypes have a very homogenous TCR-VB-repertoire implies that the influence of HLA on the developing TCR-VB-repertoire is less important than germline-factors. Nevertheless for some HLA types the data showed significant differences in the expression of single TCR-VB-chains in comparison to test persons without the HLA type. These differences were even more distinct when comparing donors with homozygous alleles to donors with heterozygous alleles and donors without these alleles.

The expression of single TCR-VB-chains is constant in the course of life-time with an increasing number of expanded chains in the elderly. Those chains are clonal expansions of T-cells that were developed during the course of life through infections. We didn’t find any significant changes in B-cells and natural killer cells during the course of life-time.

2. Einleitung

Immunität wird durch zwei sich ergänzende Systeme erreicht. Die angeborene Immunität ist zum größten Teil über Granulozyten vermittelt. Diese Zellen, die Mikroorganismen aufnehmen und vernichten können, wurden deskriptiv nach den Granula benannt, die sich im Zytoplasma befinden. Sie beschreiben eine Gruppe von Zellen, zu denen z.B. auch Makrophagen, Monozyten und andere Zellen gehören.

Die erworbene Immunität wird über Lymphozyten gesteuert. Sie wird auf Grund von Infektionen oder Impfung generiert und bleibt ein Leben lang erhalten.

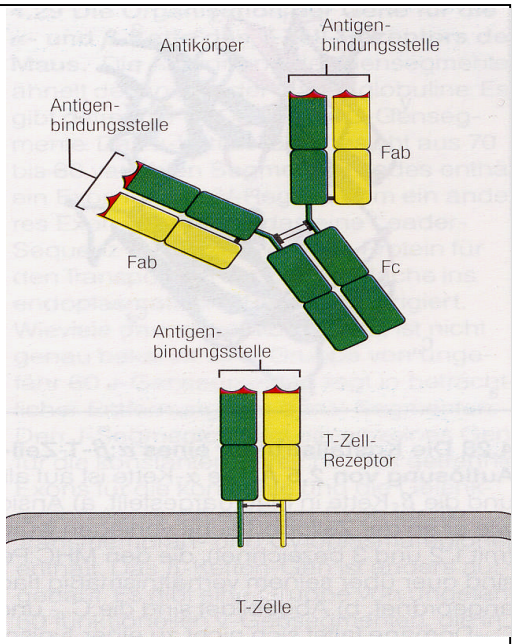
Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: B- und T-Lymphozyten. Beide Gruppen erkennen Antigene mittels hochvariabler Rezeptormoleküle, die auf der Oberfläche exprimiert werden. Bei den B-Zellen sind dies die Antikörper (Immunglobuline) und bei den T-Lymphozyten die T-Zell-Rezeptoren (TCR). T-Lymphozyten bzw. T-Zellen bilden wiederum zwei Klassen; zytotoxische T-Zellen und T-Helferzellen. Die zytotoxischen T-Zellen tragen als Korezeptor CD8. Diese Zellen erkennen an MHC (major histocompatability complex) Klasse I gebundene Peptide (z.B. von virusinfizierten Zellen) und sind in der Lage, diese Zellen zu lysieren. T-Helferzellen tragen den Korezeptor CD4. Diese Zellen erkennen an MHC Klasse II gebundene Peptide und aktivieren B-Zellen oder Makrophagen (1, 74). Beim Menschen wird MHC als HLA (Humanes Leukozyten Antigen) bezeichnet.

2.1 Der T-Zell-Rezeptorkomplex

T-Zellen, die den Korezeptor CD8 tragen (CD8+ T-Zellen), können die Anwesenheit intrazellulärer Krankheitserreger erkennen. Infizierte Zellen präsentieren auf ihrer Oberfläche Peptidfragmente, die aus den Proteinen der Krankheitserreger stammen. Diese fremden Peptide werden von spezialisierten Glykoproteinen, den MHC-Molekülen an die Oberfläche gebracht. T-Zellen erkennen mittels des T-Zell-Rezeptors die an MHC gebundenen Fremdantigene und leiten eine entsprechende Immunreaktion ein (siehe 2.2). Es gibt zwei unterschiedliche Klassen von MHC-Molekülen: MHC Klasse I und MHC Klasse II. Zytotoxische CD8+ T-Zellen erkennen den MHC I Peptidkomplex, CD4+ T-Helferzellen den MHC II Peptidkomplex

mittels des T-Zell-Rezeptors (54). Der T-Zell-Rezeptor zeigt signifikante morphologische Ähnlichkeiten mit Immunglobulinen. Dies liegt daran, dass sowohl für T-Zell-Rezeptoren als auch für Immunglobuline eine hohe Variabilität gewährleistet sein muss und die Mechanismen, die für diese hohe Variabilität der Rezeptoren sorgen, bei beiden sehr ähnlich sind.

Abb.1: Antikörper und T-Zell-Rezeptor
Gezeigt ist der strukturelle Aufbau eines Antikörper und eines T-Zell-Rezeptors. (Abbildung aus „Immunologie“ Charles A. Janeway und Paul Travers)



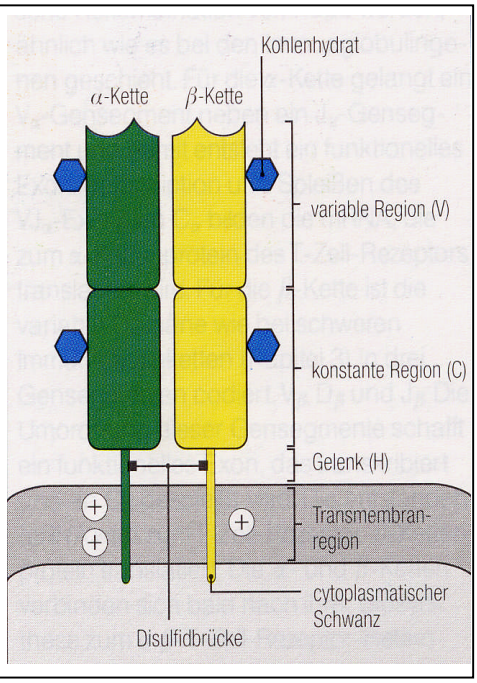
Immunglobuline (Abb.1) bestehen aus zwei schweren Ketten (heavy chains) und zwei leichten Ketten (light chains). Die beiden schweren Ketten als auch jeweils eine schwere sind mit einer leichten Kette durch eine Disulfidbrücke verbunden. Diese Moleküle besitzen die Form eines Y und lassen sich in zwei Fragmente unterteilen. Die Arme des Y enthalten Antigenbindungsstellen und werden deshalb als Fab-Fragmente bezeichnet (Fragment antigen binding). Der Stamm des Y wurde deskriptiv als Fc-Fragment (Fragment crystallizable) benannt, da man beobachtet hatte, dass dieses Fragment leicht zu kristallisieren ist. Der T-Zell-Rezeptor ähnelt dem Fab-Fragment eines Immunglobulins und ist ebenfalls an der Oberfläche gebunden, aber im Gegensatz zum B-Zell-Immunglobulin monovalent und wird niemals sezerniert (65).

Jede T-Zelle trägt ca. 30000 dieser Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Der Rezeptor besteht aus einer α- und einer β-Polypeptidkette, die durch eine Disulfidbrücke mit-

einander verbunden sind. Es gibt noch eine weitere Gruppe von T-Zell-Rezeptoren, die einen Dimer aus einer γ und einer δ Kette bildet, deren Funktion aber bisher noch weitgehend ungeklärt ist.

Beide Ketten besitzen eine variable Region sowie eine konstante Region und eine kurze Gelenkregion für die Disulfidbrücke. Am Ende der variablen V-Domäne des T-Zell-Rezeptors finden sich, analog zu Immunglobulinen, drei komplementaritätsbestimmende Regionen, CDR 1, CDR 2 und CDR 3, welche mit dem Peptid-MHC-Komplex in direktem Kontakt stehen. CDR 1 und CDR 2 bilden die Peripherie des Rezeptors und treten somit auch mit der Peripherie des Liganden MHC in Verbindung. Die CDR 3-Schleife bildet das Zentrum des Rezeptors und tritt daher auch mit dem Zentrum des Liganden in Verbindung, also mit dem präsentierten Antigen. Die CDR Schleifen lassen sich mit denen der Antikörper verhältnismäßig gut zur Deckung bringen. Jede Kette durchdringt die Lipiddoppelschicht der T-Zelloberfläche mit einer hydrophoben Transmembrandomäne. Die Transmembrandomäne der α-Kette enthält zusätzlich zwei positiv geladene Reste, die Transmembrandomäne der β-Kette einen Rest (6, 17).

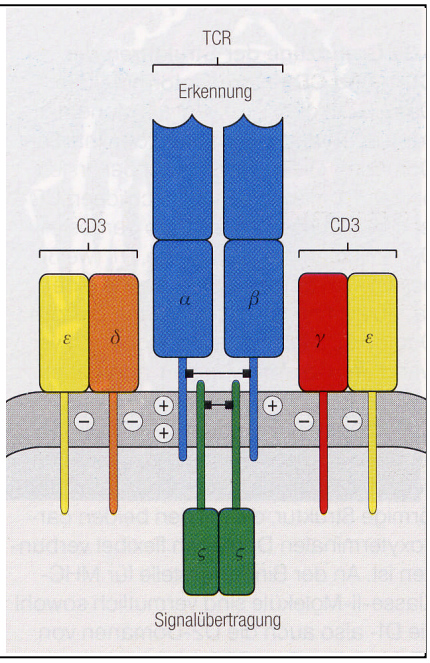
Abb.2: Strukturelle Einzelheiten des T-Zell-Rezeptors
Gezeigt sind die α und β Glykoproteinketten des T-Zell-Rezeptors (Abbildung aus „Immunologie“ Charles A. Janeway und Paul Travers)



Es fehlt allerdings eine Domäne, die eine Übertragung eines Signals an die Zelle bewerkstelligen könnte, wenn der T-Zell-Rezeptor seinen Peptid-MHC-Liganden

gebunden hat. Stattdessen übernimmt ein Komplex aus drei verschiedenen Proteinen diese Funktion. Es handelt sich um den so genannten CD3-Komplex, der mit dem TCR an der Oberfläche stabil verbunden ist. Man bezeichnet diese drei Moleküle als CD3γ, CD3δ und CD3ε. Darüber hinaus ist ein viertes Molekül, die so genannte ζ-Kette mit dem Rezeptor assoziiert. Die Transmembrandomänen von CD3γ, CD3δ und CD3ε sind durch einen negativ geladenen, sauren Rest gekennzeichnet, der mit den positiven, basischen Aminosäureresten in der Transmembranregion des T-Zell-Rezeptors eine Salzbrücke bilden kann. Diese CD3 Ketten signalisieren zusammen mit den ζ-Ketten dem Zellinneren, dass die Bindung eines Antigens stattgefunden hat (46).

Abb.3: T-Zell-Rezeptors CD3 Komplex
Der T-Zell-Rezeptorkomplex besteht aus acht Polypeptidketten. Zwei davon sind die Ketten des T-Zell-Rezeptors. Vier andere Ketten, die zusammen mit CD3 bezeichnet werden, verbinden sich mit dem TCR-Heterodimer und transportieren es an die Oberfläche. (Abbildung aus „Immunologie“ Charles A. Janeway und Paul Travers)

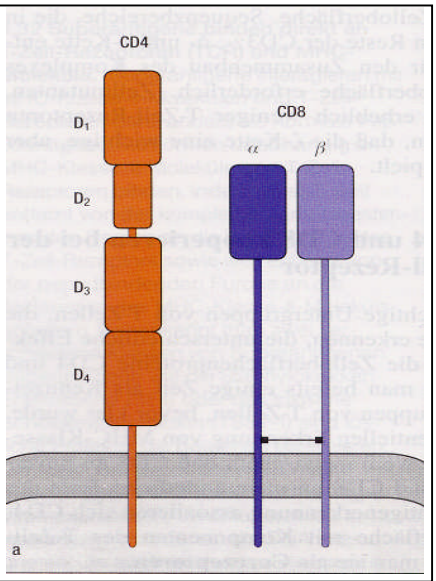


2.1.2 CD4 und CD8

CD4 ist ein einzelkettiges Molekül aus vier immunglobulinartigen Domänen D1-D4 (Abb.4). Die zytoplasmatische Domäne interagiert stark mit einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase namens Lck, die das CD4 Molekül befähigt, sich an der Signalübertragung zu beteiligen. CD4 verringert die benötigte Menge von Antigen, die für die Zellaktivierung notwendig ist, auf ein Hundertstel.

CD8 ist ein Heterodimer aus einer α- und einer β-Kette, die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. CD8 reagiert mit Lck über seinen cytoplasmatischen Schwanz und erhöht die Empfindlichkeit von T-Zellen für präsentiertes Antigen an MHC I um das 100fache. Trotz unterschiedlicher Strukturen, haben die beiden Korezeptoren CD4 und CD8 also sehr ähnliche Funktionen (34).

Abb.4: Grundzüge der Strukturen der CD4- und CD8-Korezeptormoleküle
Gezeigt ist der Aufbau des CD4 aus vier immunglobulinartigen Domänen (D1-D4) und der Aufbau des CD8 als Heterodimer aus einer α und β-Kette. (Abbildung aus „Immunologie“ Charles A. Janeway und Paul Travers)



2.2 Signalübertragung bei Antigenerkennung

Bei der Signalübermittlung arbeiten drei Systeme zusammen. Der TCR-CD3-Komplex, der jeweilige Korezeptor CD4 oder CD8 und CD45, das ebenfalls an der T-Zelloberfläche exprimiert wird. In diesem Beispiel wird die Signalübertragung mit CD4 beschrieben.

Kommt es zu einer Bindung des Liganden an den TCR-CD3-Komplex aggregieren der TCR, CD4 und CD45. In diesem System befinden sich zwei Tyrosinkinasen; zum einen Lck, das an den Korezeptor CD4 gebunden ist und zum anderen Fyn, das mit dem CD3 Komplex assoziiert ist.

CD45 besitzt eine Tyrosinphosphatase, die bei Ligandbindung inhibitorische Phosphatgruppen entfernt und somit Lck und Fyn aktiviert. Fyn und Lck induzieren die Aktivierung der ζ-assoziierten Tyrosinkinase Zap 70. Zap 70 und Fyn aktivieren das Enzym C-γ und Ras. C-γ spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PiP2) in Dia-

cylglycerin (DAG) und Inositoltrisphosphat (IP3). DAG aktiviert die Proteinkinase C, diese aktiviert den Transkriptionsfaktor NFkB. IP3 setzt inzwischen Ca^{2+} Ionen aus intrazellulären Speichern frei. Zusätzlich strömen extrazelluläre Ca^{2+} Ionen ein, da in der Membran der T-Zelle ein spezifischer Ionenkanal geöffnet wird. Durch die nun erhöhte Konzentration von Ca^{2+} Ionen wird Calcineurin aktiviert, das den T-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activated T cells) aktiviert. NFAT benötigt allerdings noch ein Protein aus der Transkriptionsfaktorfamilie AP-1, namens Fos. Hierfür aktiviert Ras eine Kaskade von Kinasen, die Fos induziert und aktiviert. NFkB, NFAT und AP-1 wirken jetzt gemeinsam auf die T-Zelle ein, wodurch diese zur Proliferation und Differenzierung und Effektorreaktionen angeregt wird (32).

2.3 TCR Rearrangement

Die hohe Zahl potentieller Antigene erfordert ein großes Repertoire an Antigenrezeptoren (Diversität), sei es als TCR oder Immunglobulin. Das vielfältige Repertoire wird bei Immunglobulinen und den TCRen auf ähnliche Weise gewährleistet. Die variable Region des TCRs wird von Anteilen dreier Gene kodiert. Diese Gene sind die so genannten V-Gene (variable segments), J-Gene (joining segments) und D-Gene (diversity segments) für die dritte hypervariable Region der β oder α Kette des TCRs (71). Die konstante Region wird allein aus einem Anteil von C-Genen (constant segments) kodiert.

Die Rekombination der Gene findet während der Reifung der αβ-T-Zellen im Thymus statt. Die β-Ketten werden vor den α-Ketten rekombiniert. Die Genfamilie der β-Ketten besteht aus Vβ-Genen, Jβ-Genen, zwei D-Genen und zwei C-Genen (Cβ1und Cβ2), deren Produkte sich aber in ihrer Funktion nicht zu unterscheiden scheinen. Bei der DNS-Rekombination wird eine Dβ-Genuntereinheit mit einer Jβ-Genuntereinheit gekoppelt und bildet einen DJ-Genkomplex. Im nächsten Schritt wird der DJ-Genkomplex mit einer Vβ-Untereinheit gekoppelt. Diesen Vorgang nennt man VDJ-Rekombination. Alternativ kann eine VJ-Rekombination stattfinden, wobei es zum Verlust des D-Gens kommt. Nach der VDJ- bzw. VJ- Rekombination wird die rekombinierte DNS transkribiert. Bei der RNS-Prozessierung werden die

rekombinierten VDJ- oder VJ-Genkomplexe nach dem Zufallsprinzip entweder mit dem Cβ1- oder Cβ2- Gen verbunden.

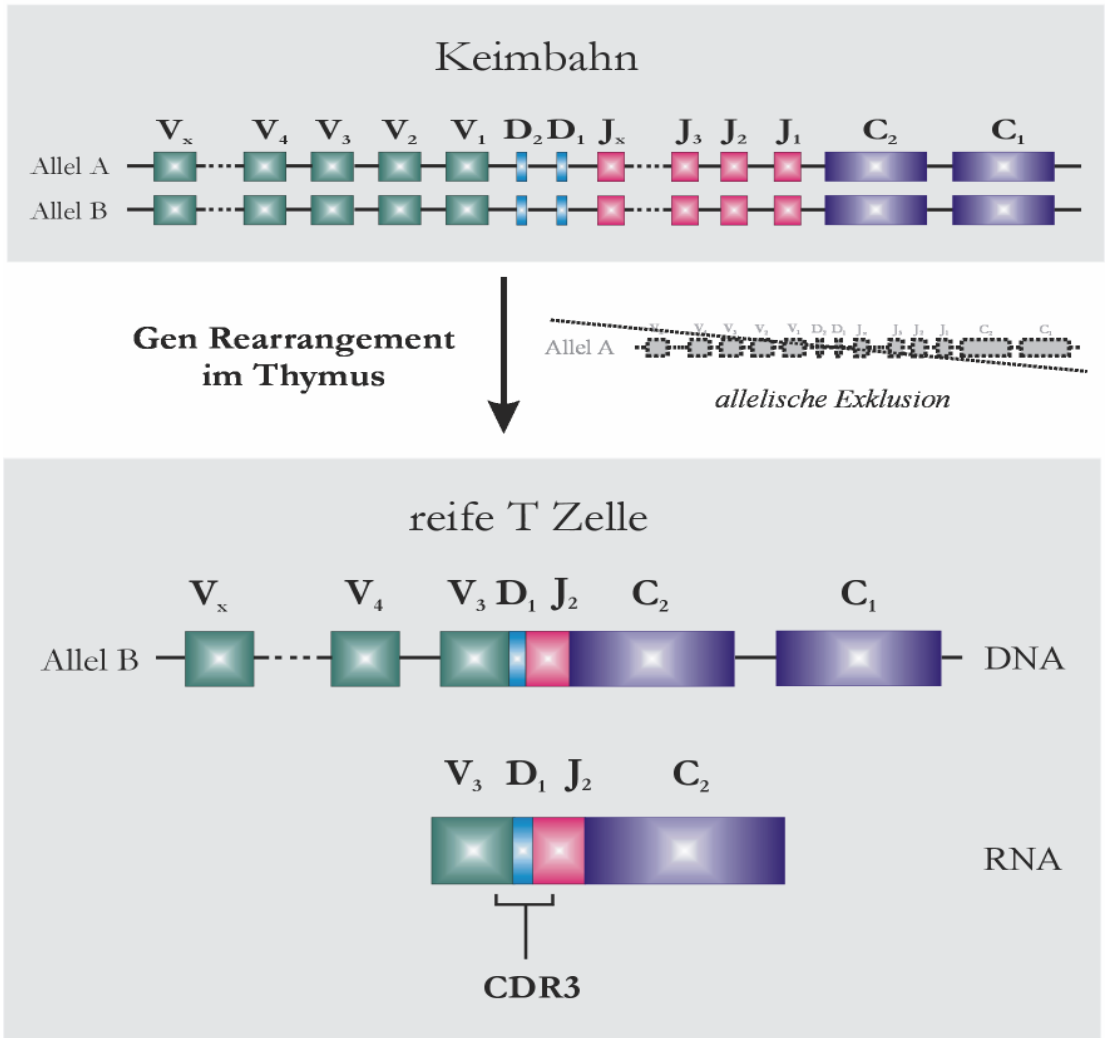


Abb.5: TCR Rearrangement im Thymus am Beispiel des T-Zellrezeptor ß-Gens
Gezeigt ist die Entwicklung des TCR ß-Gens von der Keimbahn, über die Vorgänge im Thymus, bis hin zur naiven T-Zelle in der Peripherie. Das TCR Rearrangement führt zur Verbindung jeweils eines V-, D-, J- und C-Elementes, welche nach dem Zufallsprinzip zusammengestellt werden. Die zwischen diesen Elementen liegenden Bereiche (Introns und Exons) werden entfernt. Die Verbindungen der Elemente werden bei diesem Vorgang „ungenau“ verknüpft, so dass es im Bereich des D-Elements zu Bildung einer hypervariablen Region (CDR3) kommt. Zu RNA transkribiert und translatiert wird nur ein V-, D-, J- und C-Element. (Abbildung aus „Immunologische und immungenetische Aspekte der multiplen Sklerose“ Mark Jacobsen)

Der α-Ketten-Genfamilie fehlen D-Gensegmente und bestehen dementsprechend nur aus J-Genen (Jα), V-Genen (Vα) und nur einem C-Gen (Cα). Folglich kann auch keine VDJ-Rekombination stattfinden wie bei den β-Ketten, sondern bloß ein VJ-Rekombination. Zwischen dem Gen Vα und Jα ist die δ-Ketten-Genfamilie des TCR eingefügt.

Bei der γ-Genfamilie fehlen ebenfalls Dγ-Gene und so kommt es auch hier nur zu einer VJ-Rekombination. Bei der δ-Genfamilie finden sich dafür wieder Vδ, Jδ und auch Dδ Gene und ein Cδ-Gen. Ist die Rekombination der α-Gene erfolgreich, werden die Gene der δ-Familie entfernt, da sie in die Region der α Familie integriert sind (18).

Wie bereits oben erwähnt, weist die dreidimensionale Struktur, die der TCR an seiner V-Region mit den drei CDR-Schleifen bildet, sehr große Ähnlichkeit mit den drei CDR-Schleifen eines Immunglobulins auf. Es bestehen aber Unterschiede in der Vielfalt der Schleifen zwischen Antikörpern und TCRen. CDR1- und CDR2- Schleifen, die jeweils die Peripherie bilden, weisen bei Antikörpern eine wesentlich höhere Vielfalt auf, als es bei TCRen der Fall ist, da die Peripherie des Liganden, den der TCR erkennen muss, immer ein MHC Molekül ist. Die höchste Variabilität findet man beim TCR also in der CDR3 Region, die das an MHC gebundene präsentierte Antigen erkennt (17). Die Variabilität der CDR1 und CDR2 Regionen ist auf die V-Gensegmente der Keimbahn beschränkt, somatische Hypermutationen, die die hohe Variabilität bei Immunglobulin bewirken, sind nicht bekannt. Wäre dies nicht der Fall, bestünde die Gefahr, dass durch Hypermutationen T-Zellen entstünden, die Selbst-Proteine erkennen, ohne dass diese im Thymus als solche erkannt würden. Außerdem muss gewährleistet sein, dass T-Zellen Selbst-MHC-Moleküle als Teil ihres Liganden erkennen, und diese Fähigkeit könnte durch Mutationen verloren gehen.

Zusammenfassend wird die TCR Diversität durch folgende Mechanismen gewährleistet: Multiple V-, D- und J-Gene, freie Kombinierbarkeit der V-, D- und J-Gene und freie Kombinierbarkeit der α- und β-Kette (101).

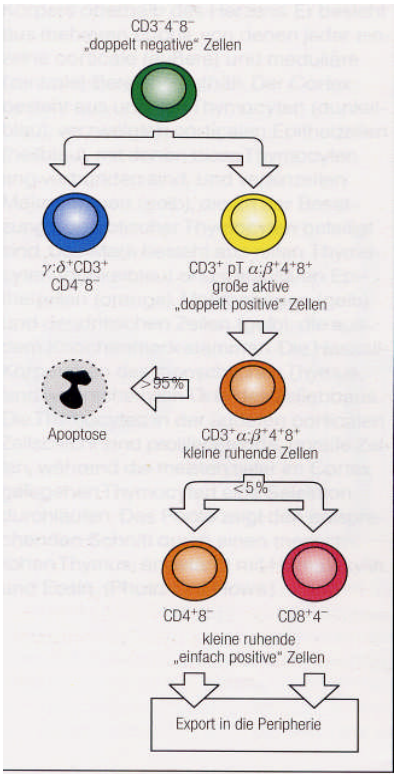
2.4 T-Zell-Selektion im Thymus

Nachdem die Thymozytenvorläuferzellen das Knochenmark verlassen haben, wandern sie in den Thymus. Der Thymus ist in drei Schichten gegliedert:

1. Subkapsulärer Bereich.
2. Kortex.
3. Mark.

Ziel der T-Zellreifung im Thymus ist es, ein Repertoire von T-Zellen zu erhalten, das zum einen körpereigenes MHC erkennt, aber nicht auf Selbstpeptide reagiert, die auf MHC präsentiert werden. Dies erlaubt eine optimale Erkennung von Fremdantigen und eine Aktivierung von T-Zellen. Die erste Voraussetzung wird „Selbst MHC Restriktion“ genannt und über die positive Selektion erreicht. Die zweite Voraussetzung wird als „Selbsttoleranz“ bezeichnet und über die negative Selektion erreicht.

Abb.6: T-Zellreifung im Thymus
Gezeigt sind die Änderungen der Oberflächenantigene während der T-Zellreifung im Thymus (Abbildung aus „Immunologie“ Charles A. Janeway und Paul Travers)



Wenn die Vorläuferzelle in den subkapsulären Bereich des Thymus eindringt, trägt sie weder den TCR noch CD4 oder CD8 (Abb.6), weshalb diese Zellen auch doppelt negative Zellen genannt werden. Hier proliferieren die Zellen zu doppelt positiven Zellen, das heißt, dass sie sowohl einen Vorläufer des TCR tragen, den so genannten Prä-T-Zell-Rezeptor, sowie CD4 und CD8. Die Zellen wandern nun weiter in den Kortex, in dem die positive Selektion stattfindet. Diese Selektion wird über MHC tragende dendritsche Zellen vermittelt. Erkennen die T-Zellen mit ihrem Prä-TCR den MHC I Komplex, reifen sie zu CD8+ T-Zellen, erkennen sie MHC II, zu CD4+ T-Zellen. Im Thymusmark findet man also nur noch reife, einfach positive T-Zellen. Die positive Selektion bestimmt in einem ersten Schritt, ob die Zellen überleben oder nicht. Findet keine Bindung an den Korezeptor statt, wird die Zelle apoptotisch. Darüber hinaus wird die Expression des Korezeptors bestimmt, nämlich CD4 oder CD8 (102).

Die negative Selektion findet nicht nur im Thymusstroma, sondern auch im Knochenmark statt und wird über antigenpräsentierende Zellen (APC) vermittelt. Zellen, die an MHC gebundenes körpereigenes Antigen erkennen und damit eine autoimmune Reaktion hervorrufen würden, bekommen ein Signal, über das die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (82).

2.5 T-Zellaktivierung

Nachdem T-Zellen ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben, gelangen sie ins Blut und von dort aus in die peripheren lymphatischen Organe. Anschließend kehren sie wieder in das Blut zurück. Sie zirkulieren so lange, bis sie auf Antigene treffen. Naive Lymphozyten, die täglich zwischen Blut und lymphatischen Organen zirkulieren, treffen jeden Tag mit vielen antigenpräsentierenden Zellen zusammen. Dadurch wird sichergestellt, dass jede naive T-Zelle mit hoher Wahrscheinlichkeit auf Antigene trifft, die an irgendeinem Infektionsherd von Pathogenen gebildet wurden. Für die Aktivierung der T-Zellen reicht jedoch das Erkennen von fremden Peptidfragmenten, die an Selbst-MHC-Moleküle gebunden sind nicht aus. Gleichzeitig wird ein kostimulierendes Signal von der antigenpräsentierenden Zelle benötigt. Die drei wichtigsten Arten der antigenpräsentierenden Zellen in den peripheren lymphati-

schen Organen sind Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen (64). Nur diese drei Zelltypen exprimieren die speziellen kostimulierenden Moleküle, die erforderlich sind, um naive T-Zellen zu aktivieren. Die am besten charakterisierten kostimulierenden Moleküle auf antigenpräsentierenden Zellen sind die strukturverwandten Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Der Rezeptor für diese Moleküle auf der T-Zelle ist das Molekül CD28 (43, 73). Findet eine Antigenbindung an den T-Zell-Rezeptor ohne Kostimulierung statt, geht die T-Zelle in einen anergischen Zustand über. Dies bedeutet, dass die T-Zelle auf eine Aktivierung nicht reagiert.

Naive T-Zellen können viele Jahre leben, ohne sich zu teilen. Diese kleinen, ruhenden Zellen haben ihr Chromatin kondensiert, kaum Cytoplasma und synthetisieren wenig RNA oder Proteine. Bei einer Aktivierung müssen sie wieder in den Zellzyklus eintreten und sich schnell teilen, um große Mengen an Nachkommen zu bilden, die sich in bewaffnete T-Effektorzellen umwandeln. Ihre Proliferation und Differenzierung wird durch einen Proteinwachstumsfaktor gesteuert, den man als Interleukin-2 (IL-2) bezeichnet und das von den aktivierten T-Zellen selbst gebildet wird (33, 52). IL-2 induziert also die klonale Expansion der Effektorzellen und die Differenzierung ihrer Nachkommen zu bewaffneten T-Effektorzellen. Spät in der Proliferationsphase der Antwort, nach vier bis fünf Tagen schnellen Wachstums wandeln sich diese T-Zellen in bewaffnete T-Effektorzellen um, die alle Proteine synthetisieren können, die für ihre spezielle Funktionen als Helfer- oder zytotoxische T-Zellen nötig sind. Alle Klassen von bewaffneten T-Effektorzellen durchlaufen außerdem verschiedene Veränderungen z.B. von Oberflächenmolekülen, die sie von naiven T-Zellen unterscheiden. Als Ergebnis dieser Veränderungen führt ein späteres Treffen mit ihrem spezifischen Antigen zu einem Immunangriff, ohne dass eine Kostimulierung erforderlich ist (3). Drei Oberflächenproteine, L-Selektin, CD44 und CD45, verändern sich beim Antigenkontakt besonders deutlich. L-Selektin geht bei den meisten T-Gedächtniszellen verloren, während die Konzentration an CD44 nach der Aktivierung auf allen Gedächtniszellen zunimmt. Die Isoform von CD45 wechselt infolge eines alternativen Splißens der Exons, die die extrazelluläre Domäne von CD45 codieren. Als Konsequenz dieser Veränderung von CD45RA zu CD45RO

wird die T-Zelle empfindlicher für eine Stimulierung durch geringe Konzentration von Peptid-MHC-Komplexen (7, 44, 51, 59).

Das Fehlen der Expression von CD45, das bereits in drei Fällen am Menschen beschrieben wurde, führt zu einer fast vollständigen T-Zell-Defizienz und zu schweren Störungen des gesamten Immunsystems mit meist letalen Folgen (13, 30, 89). Auch CD45-defiziente Mäuse besitzen kein funktionierendes Immunsystem (12, 38).

2.6 Das HLA System

T-Zellen können die Anwesenheit intrazellulärer Krankheitserreger erkennen, da infizierte Zellen auf ihrer Oberfläche Peptidfragmente präsentieren, die aus den Proteinen der Krankheitserreger stammen. Diese fremden Peptide werden von bestimmten spezialisierten Glykoproteinen der Wirtszellen an die Oberfläche gebracht. Dies sind die HLA Klasse I und HLA Klasse II Moleküle. Das HLA Klasse I besteht aus zwei Polypeptidketten, einer α- oder schwere Kette und einer kleineren, nichtkovalent angelagerten Kette, dem β2 Mikroglobulin. Das hervorstechendste Merkmal der HLA Moleküle ist jedoch die Struktur der α1- und α2- Domänen, die ein Paar bilden und so einen Spalt an der Oberfläche des Moleküls schaffen.

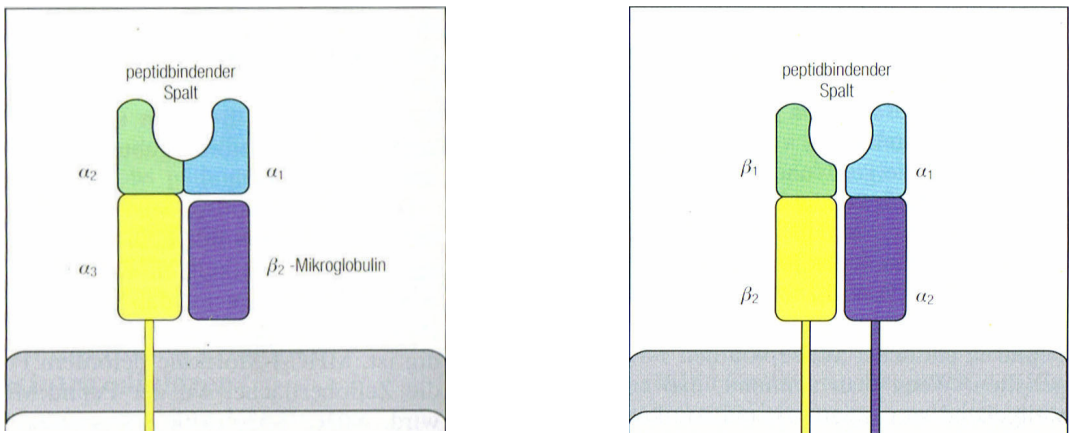


Abb.7: Struktur eines HLA Klasse I und HLA Klasse II Moleküls
Links sieht man die schematische Darstellung des HLA Klasse I Moleküls, rechts die des HLA Klasse II Moleküls. Das HLA Klasse I Molekül ist ein Heterodimer aus einer α-Kette, die sich durch die Membran erstreckt und die nicht kovalent mit dem β2-Mikroglobulin assoziiert. Die α-Kette spaltet sich in drei Domänen. Die Faltung der α1 und α2 Domänen erzeugen den peptidbindenden Spalt. Das HLA Klasse II Molekül besteht aus zwei Transmembranglykoproteinen. Jede Kette hat zwei Domänen. Die α1 und β1 Domänen erzeugen den peptidbindenden Spalt. (Abbildung aus „Immunologie“ Charles A. Janeway und Paul Travers)

Dieser Spalt ist die peptidbindende Stelle. HLA Klasse II Moleküle bestehen aus einem nichtkovalenten Komplex zweier Ketten, α und β, die beide die Membran durchdringen. Der wesentliche Unterschied zum HLA Klasse I Molekül besteht darin, dass die Enden des Spaltes bei HLA Klasse II Molekülen weiter geöffnet sind. HLA Klasse II Moleküle, die den CD4+ T-Zellen Peptide präsentieren, binden Peptide von Proteinen, die in angesäuerten Vesikeln der Zelle abgebaut werden. Typischerweise präsentieren Makrophagen, die mit Mykobakterien infiziert sind, oder eine B-Zelle, die ein bestimmtes Proteinantigen gebunden und aufgenommen hat, Peptide aus diesen fremden Proteinen, die an HLA Klasse II Moleküle gebunden sind, CD4+ T-Zellen. Diese aktivieren dann Makrophagen oder die B-Zelle.

HLA Klasse I Moleküle, die den CD8+ T-Zellen Peptide präsentieren, binden Peptide aus Proteinen, die im Cytosol der Zelle abgebaut werden. Typischerweise stammen fremde Peptide, die von HLA Klasse I Molekülen präsentiert werden, aus viralen Proteinen. Die CD8+ T-Zellen töten die infizierte Zelle, wenn sie den Komplex aus fremden Peptid und HLA Klasse I Molekül auf der Zelloberfläche erkennen. Die beiden Klassen von HLA Molekülen befördern also Peptide aus verschiedenen Kompartimenten an die Zelloberfläche, wo sie von T-Zellen erkannt werden die, verschiedene und geeignete Effektormechanismen in die Wege leiten.

Die Gene für alle HLA Proteine, mit Ausnahme des β2 Mikroglobulins (Chromosom 15) befinden sich in der Nähe des Zentromers auf Chromosom 6 und lassen sich topographisch in drei Klassen einteilen. HLA ist demnach polygen. Menschen haben drei α-Ketten Gene für die Klasse I, genannt HLA-A, -B und -C. Es gibt auch drei Paare von α- und β- Ketten Genen von für die Klasse II, genannt HLA-DR, - DP und -DQ. HLA ist auch polymorph; es gibt für jedes Gen multiple Alelle. Die Kombination von HLA Allelen auf einem bestimmten Chromosom bezeichnet man als HLA-Haplotyp. Jedes HLA Molekül bindet ein anderes Spektrum von Peptiden. Dadurch kann eine große Bandbreite an Peptiden präsentiert werden.

Zusammengefasst ermöglichen HLA Moleküle den T-Zellen zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden, sind Schlüsselmoleküle für die Initiierung der spezifi-

schen immunologischen Antwort und verantwortlich für die Reifung der T-Zellen im Thymus (s.2.4).

2.7 TCR – Auffälligkeiten bei Autoimmunkrankheiten.

Eine pathogene Immunreaktion, die sich gegen eine körperfremde Substanz richtet, die per se kein Schädigungspotential besitzt, wird als Allergie bezeichnet. Richtet sich die Immunreaktion gegen Selbstantigene (bei Verlust der Selbsttoleranz), spricht man von Autoimmunreaktionen, die zu Autoimmunerkrankungen führen können. Bei diesen Störungen findet man Auffälligkeiten in den T-Zell-Antworten, die wir im Folgenden betrachten wollen:

Allergische Reaktionen vom „Soforttyp“ (Typ 1-Reaktion) treten auf, wenn ein Individuum, das auf einen Kontakt mit einem harmlosen Antigen oder Allergen hin IgE-Antikörper produziert hat, erneut mit demselben Allergen in Berührung kommt. Dieses Allergen bindet an den B-Zell-Rezeptor der B-Zelle und gibt dieser ein Signal. Gleichzeitig wird das Antigen von der B-Zelle aufgenommen und in Peptide zerlegt, die bewaffnete T-Helferzellen aktivieren. Signale von dem gebundenen Antigen und der T-Helferzelle regen die B-Zelle dazu an, sich zu teilen und zu einer Plasmazelle zu entwickeln, die spezifische IgE Antikörper sezerniert. Zur Bildung von IgE werden von T-Helferzellen freigesetzte Cytokine, vor allem das IL-4 benötigt. Die T-Helferzellen wiederum entstehen, wenn naive T-Zellen in Gegenwart von IL-4 zum ersten Mal mit Antigenen in Berührung kommen. Man hat bei Mäusen nachgewiesen, dass eine frühe Produktion von IL-4 auf der Aktivierung einer kleinen Subpopulation von CD4+ T-Zellen mit ungewöhnlichen Eigenschaften beruht. Diese Subpopulation exprimiert T-Zell-Rezeptoren, die aus einem eingeschränkten Satz von β-Ketten und einer invariablen α-Kette bestehen (45, 93).

Allergische Reaktionen vom Spättyp (Typ 4-Reaktion) sind direkt durch T-Zellen vermittelt. Antigenpräsentierende Zellen im lokalen Gewebe verarbeiten Antigene und bieten sie auf MHC-Klasse-II Moleküle dar. Antigenspezifische T-Helferzellen an der Injektionsstelle können das Antigen erkennen und Chemokine und Cytokine freisetzen, die wiederum Makrophagen anlocken. Auch CD8+ T-Zellen können be-

teiligt sein, die das Gewebe hauptsächlich durch zellvermittelte Zytotoxizität schädigen (40).

Erkenntnisse zu der Funktion von T-Zellen bei Autoimmunerkrankungen wurden vor allem im Tierversuch mit sog. experimentellen Autoimmunerkrankungen erworben. Bei Mäusen kann man beispielsweise eine, der Multiplen Sklerose ähnliche Erkrankung induzieren; die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). In diesem Modell führt eine Immunisierung mit dem Myelin-basischen Protein (MBP) oder bestimmten immundominanten Peptiden des MBP zu einer demyelinisierenden enzephalomyelitischen Erkrankung des zentralen Nervensystems (47, 98). Eine EAE ist sowohl durch CD4+ T-Helfer-Zellen (95), wie auch durch myelinspezifische CD8+ T-Zellen übertragbar (31, 87). Die Erkenntnisse über enzephalitogene T-Zellklone im Mausmodell führten zu einer intensiven Suche nach zentralen Nervensystem-antigen-spezifischen T-Zellen beim Menschen. Untersuchungen zum T-Zell-Repertoire im Blut von MS-Patienten und gesunden Kontrollen – anhand von semiquantitativen PCR Analysen der TCR-Expression – zeigten Veränderungen in der Gruppe der MS-Patienten (25, 53, 58), die im Rahmen einer von dieser Labor-gruppe durchgeführten flusszytometrischen Studie nicht bestätigt werden konnten.

2.8 Methoden zum Nachweis der TCR – Expression

2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur Sequenzierung von DNA. Das Prinzip der PCR ist die wiederholte Synthese spezifischer DNA-Teile. Zunächst wird DNA durch Temperaturerhöhung denaturiert. An die nun vorliegenden Einzelstränge werden spezifische Starter-Oligonucleotide gebunden (hybridisiert), die für die Synthese der komplementären DNA-Stränge verantwortlich sind. Für den nächsten Start des Zyklus wird die Temperatur erneut erhöht. Die vervielfältigten DNA-Stränge können direkt mittels Agarosegelelektrophorese sichtbar gemacht und voneinander unterschieden werden. TCRen unterscheiden sich in ihrer CDR3 Region sowohl in der Länge als auch in der Sequenz. Benutzt man spezifische Primer für die Vβ-Gensegmente am einen Ende und für den konservierten Teil der C-Region am anderen Ende, kann man DNA-Fragmente generieren, die CDR3 Region umfassen, die dann mittels Agarose-

gelelektrophorese sichtbar gemacht werden können. Auf diese Weise ist eine quantitative Analyse verschiedener T-Zell-Subpopulationen möglich.

2.8.2 Durchflusszytometrie

Durch Färbung von Oberflächenproteinen mit entsprechenden Antikörpern lassen sich Lymphozyten in der Durchflusszytometrie unterscheiden. Mit einem Durchflusszytometer (FACS, fluoreszenz activated cell sorter) kann man mit Antikörpern gekennzeichnete Lymphozyten in die verschiedenen Subpopulationen sortieren und quantitativ auswerten. Durch die Möglichkeit, bis zu vier Antikörper in einer Analyse zu kombinieren, kann man aus einer Mischpopulation von Lymphozyten deutlich besser die für unsere Studie wichtige Unterteilung in die verschiedenen T-Zell-Subpopulationen vornehmen als mit der Methode der PCR.

2.9 Fragestellung der Studie

Ziel dieser Studie war es, beim Menschen den Einfluss von Alter und HLA-Haplotyp auf die Lymphozyten im Blut und auf das TCR-VB-Repertoire festzustellen. Wie oben bereits erwähnt, sind die HLA Moleküle von entscheidender Bedeutung bei der Selektion der T-Zellen im Thymus. Diese Studie soll die Frage klären, ob der HLA-Haplotyp das TCR-VB-Repertoire beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden die Kontrollpersonen HLA typisiert und das TCR-VB-Repertoire flusszytometrisch untersucht. Dadurch war es möglich, das TCR-VB-Repertoire differentiell auf die Subtypen CD4+, CD8+, naive und memory T-Zellen aufzuschlüsseln und zu untersuchen.

Die zweite zentrale Frage war, ob ein Zusammenhang besteht zwischen dem Alter der Kontrollpersonen und dem TCR-VB-Repertoire in der Peripherie, sowie anderen Lymphozyten Subpopulationen, wie B-Zellen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Auch hier wurden die Veränderungen des TCR-Repertoires bei den Subtypen CD4+, CD8+, naive und memory T-Zellen untersucht.

Das Verständnis der Faktoren Alter und HLA auf das Immunsystem bei Gesunden ist eine wichtige Voraussetzung zum Verständnis immunogener Veränderungen bei Patienten mit entzündlichen Erkrankungen.

3. Material und Methoden

3.1 Auswahl der Probanden

Die Stichprobe bestand aus insgesamt 119 gesunden Probanden ohne persönliche oder familiäre Vorgeschichte für Autoimmunerkrankungen. Aus der Familienanamnese wurden positive Befunde für folgende Erkrankungen erfragt: Multiple Sklerose, entzündliche Muskel- oder Nervenerkrankungen, Hirnhautentzündungen, Borreliose, systemische Autoimmunerkrankungen und andere neurologische Erkrankungen. Probanden mit akuten oder chronischen entzündlichen Erkrankungen oder Autoimmunerkrankungen wurden aufgrund möglicherweise zu erwartender Veränderungen im TCR-Repertoire von der Studie ausgeschlossen. Die Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg genehmigte unseren Antrag zur Durchführung dieser Studie. Alle Probanden stimmten der Teilnahme an der Studie zu. Die Altersverteilung der Probanden war wie folgt:

Alter	**Probanden (n)**
0-19 Jahre	5
20-39 Jahre	40
40-59 Jahre	39
60-84 Jahre	35

3.2 HLA Typisierung

Für die routinemäßige HLA-Typisierung stehen zurzeit serologische und molekularbiologische Testmethoden zur Verfügung. Man benötigt dazu etwa 5 bis 10 ml Blut. Die Typisierung der Probanden wurde im HLA-Labor der Stefan Morsch Stiftung in Birkenfeld durchgeführt.

Für die HLA-A, HLA-B und HLA-C-Typisierung wurde eine serologische Typisierungstechnik, der sog. Mikrolymphozytotoxizitätstest (Fa. Biotest), eingesetzt. Hierbei wird für die Bestimmung von HLA-Antigenen HLA-Antikörper bekannter Spezifität in Gegenwart von Komplement mit einer Lymphozytensuspension des Probanden inkubiert. Nach der Zugabe der Lymphozyten des Probanden auf Lymphotype

HLA kommt es im Falle der Anwesenheit des korrespondierenden Antikörpers und in Gegenwart von Komplement zur Lyse der Lymphozyten. Diese wird mit einem Farbstoff (Eosin) sichtbar gemacht. Die Beurteilung der lysierten und vitalen Lymphozyten erfolgt mit einem inversen Phasenkontrastmikroskop.

HLA-DR und HLA-DQ wurden molekularbiologisch durch SSO-Teste (ELPHA, Fa. Biotest) bestimmt. Zur Differenzierung der polymorphen Sequenzmotive werden sequenz-spezifische Oligonukleotid-(SSO-) Sonden eingesetzt, deren Bindung nach einem vom Protein-ELISA abgeleiteten Prinzip nachgewiesen wird. Das Mikrotestplattenformat erlaubt die Testdurchführung und Auswertung mit Hilfe standardisierter Geräte, die Bearbeitung kann jedoch auch von Hand erfolgen. Aus kernhaltigen Zellen einer Blutprobe wird die DNS gewonnen. Durch PCR mit Biotin-markierten Primern werden polymorphe Regionen amplifiziert. Die PCR-Produkte werden denaturiert und als Einzelstränge über ihre Biotinmarkierung in Streptavidin-beschichteten Kavitäten von Mikrotestplatten gebunden. Beim Auftragen der verdünnten PCR-Produkte auf die Platte werden die in den Kavitäten vorgelegten und getrockneten, antigenmarkierten SSO-Sonden gelöst, so dass gleichzeitig mit der Bindung der PCR-Produkte an die Platte die Hybridisierung mit den SSO-Sonden erfolgt. Für die Spezifität des Verfahrens ist der nachfolgende Stringenz-Waschschritt entscheidend, in dem Sonden mit ungenügender Sequenzhomologie zu den PCR-Produkten entfernt werden. Die gebundenen Sonden werden dann durch antigenspezifische Antikörperfragmente, die mit Meerrettich-Peroxidase (POD) gekoppelt sind (Konjugate), in einer Farbreaktion nachgewiesen. Das Muster der positiven Reaktionen kann in einem ELISA-Reader ermittelt werden.

3.3 Durchflusszytometrische Messungen (FACS®-Analysen)

Die durchflusszytometrischen Analysen mit Hilfe des FACS® dienen der qualitativen und quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen auf Zellen. Dabei ist das Prinzip der Durchflusszytometrie die simultane Messung verschiedener physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen, die hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet, einzeln untersucht werden. Durch eine Färbung der zu untersuchenden Proben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, werden die Oberflä-

chenantigene der Zellen für die Detektoren des Gerätes messbar gemacht. Das Gerät ist in der Lage, verschiedene Zelleigenschaften zu bestimmen. Bei der Lichtstreuung interagiert eine Zelle mit einem einfallenden Lichtstrahl, wodurch das Licht ungleichmäßig in verschiedene Richtungen gestreut wird. Das Vorwärtsstreulicht (0-10°, *forward light scatter, FSC*) macht den größten Anteil aus und ist ein Maß für die Zellgröße. Ein geringerer Anteil des Lichtes streut seitwärts. Dieses Rechtwinkelstreulicht (90°, *side scatter*, SSC) gibt Informationen über die Dichte und die Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzmessungen dienen der Subtypisierung der nach Größe und Granularität geordneten Zellen. Diese Parameter können in einem Koordinatensystem gegeneinander aufgetragen werden. Zur Markierung der Antikörper finden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescin (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Peridin-Chorophyll Proteinkomplex (PerCP) und Allophycocyanin (APC) Verwendung. FITC, PE und PerCP werden mit monochromatischem Licht der Wellenlänge 488 nm angeregt, APC weist eine Exzitation von 650 nm auf. Diese Tatsache erklärt das Vorhandensein eines zweiten Lasers. Neben dem Argon-Laser (Exzitationsbereich von 488 nm) findet ein Helium-Neon-Laser (Exzitationsbereich von 633 nm) Verwendung, der eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse mit den vier Farbstoffen FITC, PE, PerCP und APC ermöglicht.

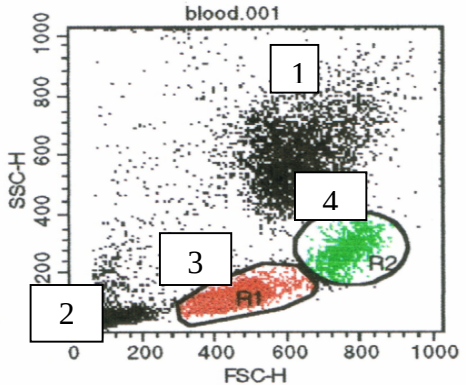
Die Grundvoraussetzung für eine analytische Messung mit einem Durchflusszytometer ist die Aufbereitung der Proben nach den im folgenden Abschnitt beschriebenen Arbeitsschritten, so dass eine Einzelsuspension mit einer Konzentration von 0,5 bis 20 Millionen Zellen pro ml vorliegt.

Die Darstellung der Messergebnisse kann auf verschiedene Weise im Sinne von ein-, zwei- und dreidimensionalen Darstellungen erfolgen. Für diese Studie wurde die Darstellung in Form eines Zweiparameter-Punkthistogramms (*dot plot*) gewählt (Abb. 7). Dabei können alle Parameter miteinander korreliert werden. Jeder Punkt im Zweiparameter-Punkthistogramm steht für eine bestimmte Zelle mit ihren beiden in Relation gesetzten Eigenschaften. Bei der Auswertung der Daten ist es sinnvoll, die für die Studie wichtigen Zellen von Zelltrümmern und anderen Zellarten abzugrenzen. So kann man durch die Parameterkombination Größe gegen Granularität die

vermuteten Populationen der Lymphozyten und Monozyten eingrenzen. Bei folgenden Analysen werden daraufhin nur solche Ergebnisse berücksichtigt, die innerhalb dieses eingegrenzten Bereiches liegen. Dieser Vorgang des Eingrenzens wird als *Gating* bezeichnet.

In der statistischen Auswertung werden Listendateien der korrelierten Zweiparameter-Darstellung angewandt. Für jedes *Gate* werden die Anzahl der Ereignisse, die relativen Prozentanteile, der Mittelwert und der Median der Signalintensität, sowie der Modus der Signalintensität mit Standardabweichung und Variationskoeffizient dargestellt.

Abb. 8: Dot Plot Darstellung
Auf dem Bildschirm werden die einzelnen Zellen als Punkte in einem Koordinatenkreuz dargestellt. Die x-Achse repräsentiert dabei die Zellgröße und die y-Achse die Granularität. Zellen gleicher Größe und Granularität erscheinen jeweils in einem distinkten Bereich. Über eine entsprechende Software kann man jede einzelne Zellpopulation eingrenzen (*gating*) und nur diese für die Analyse berücksichtigen. 1 = Granulozyten, 2 = Erythrozyten und Zelltrümmer, 3 = Lymphozyten, 4 = Monozyten.



3.4 Probenaufbereitung

EDTA-Blut gesunder Kontrollpersonen wurde direkt nach der Blutabnahme in eine 96-Mikrotiternapfplatte à 100 µl pro Napf pipettiert. Das Blut wurde 1:1 mit PBS (Gibco) verdünnt und bei 300 g und 20°/C 4 Minuten zentrifugiert. Nach Abwerfen des Überstandes erfolgt eine Färbung der Proben mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Folgende Färbungen wurden durchgeführt:

1. Farbe PE	Spezifischer Antikörper zur Färbung des variablen Teils der β-Kette des TCR (TCR-VB)
2. Farbe: APC	CD4
3. Farbe: PerCP	CD8
4. Farbe: FITC	CD45RO

Da TCR-VB3 und VB6.7 nur in der Färbung FITC erhältlich waren, wurde mit diesen beiden CD4-APC, CD8-PerCP und CD45RO-PE kombiniert. Folgende Antikörper fanden Verwendung: TCR-VB1-PE (clone BL37.2), VB2-PE (clone E22E7.2), VB5.1-FITC (clone Immu 157), VB5.2-FITC (clone 36213), VB5.3-PE (clone 3D11), TCRBV6.7-FITC (clone OT145), VB7-PE (clone ZOE), VB8-FITC (clone 56C5.2), VB9-PE (clone FIN9), VB11-FITC (clone C21), VB12-FITC (clone VER2.32.1), VB13.1-PE (clone Immu222), VB13.6-PE (clone JU74.3), VB14-PE (clone CAS1.13), VB16-FITC (clone TAMAYA1.2),VB17-FITC (clone E17.5F3), VB18-PE (clone BA62.6), VB20-PE (clone ELL1.4), VB21.3-FITC (clone IG125), VB22-FITC (clone Immu546), VB23-PE (clone AF23) TCR-VB3-FITC (clone CH92), (alle Immunotech, Westbrook, ME).

Die Antikörper wurden in Cluster tubes (Costar, Cambridge, MA) präpariert und aufbewahrt, um die Simultanfärbung mit einer Multikanalpipette (Finnpipette, Labsystems, Helsinki, Finnland) zu ermöglichen. Je 0,5 µl des Antikörpergemisches wurden mit einer Pipette in den entsprechenden Napf pipettiert. Das Antikörper-Blut-Gemisch wurde für 25 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an die Markierung der Proben erfolgte eine zehn minütige Lyse der Erythrozyten bei Raumtemperatur und im Dunkeln mit 200 µl einer Ammoniumchlorid-Lösung (Pharmingen) pro Napf. Nach einer Zentrifugation über 4 Minuten bei 4°C und 300g wurde der Überstand abgeworfen und der Lysevorgang einschließlich der Zentrifugation wiederholt. Dem zweiten Lysevorgang folgte eine Behandlung der Proben mit 200 µl Waschpuffer (FCS/ PBS) und eine Zentrifugation über 4 Minuten bei 4°C und 300 g. Nach erneutem Abwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 150 µl Cellwash (Becton Dickinson) aufgenommen, in Falcon-Röhrchen (Greiner) überführt und am Flusszytometer (FACSCalibur, Becton Dickinson) gemessen.

3.5 Auswertungen der durchflusszytometrischen Analysen

Zur Bestimmung antigenpositiver Zellen musste im Vorfeld die Darstellung einer Negativkontrolle (Isotypkontrolle) erfolgt sein, da jede Zelle im Laserlicht eine gewisse Autofluoreszenz aussendet. Die Autofluoreszenz lässt sich durch das exakte Abgrenzen der Negativkontrollen und das Setzen von Auswertfenstern (*Gates*) am Computer diskriminieren. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe einer dem FACS angeschlossenen Software in Form eines Zellanalyse-Programms (CellQuest©). Bei jeder Analyse des aufbereiteten Patientenblutes wurden insgesamt 10000 Ereignisse innerhalb des Lymphozyten- und Monozytenfensters gemessen und statistisch ausgewertet.

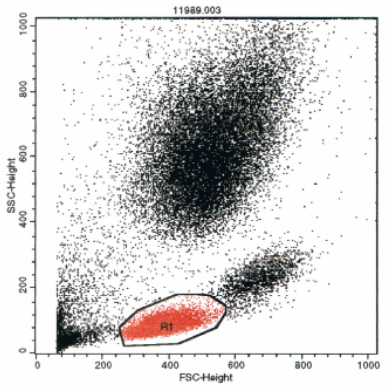
3.6 TCR -VB-Ketten Analyse

Verteilung von VB2+ auf CD45RO+ und CD45RO-

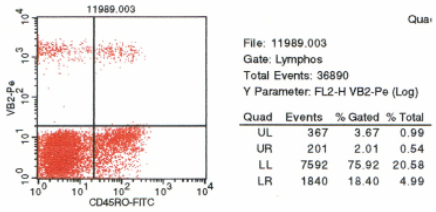
Die TCR-VB-Ketten Analyse wird hier exemplarisch an VB2+ gezeigt.

Abb. 9: Dot Plot Darstellung
Die graphische Auswertung einer VB-Kette aus dem kompletten Panel wird hier exemplarisch anhand der Analyse des TCR-VB2 eines Probanden dargestellt. In **1** sieht man das Gate, ausschließlich in dem Bereich, in dem man die Lymphozyten vermutet. In **2** sieht man die Zwei-Farben-Analyse mit TCR-VB2 PE und CD45RO-FITC. Die einzelnen Populationen werden durch ein Koordinatenkreuz in vier Bereiche geteilt, die der Computer als „Upper Left" **UL**, „Upper Right" **UR**, „Lower Left" **LL** und „Lower Right" **LR** erkennt. In diesen Bereichen werden die Zellen gezählt und die prozentuale Verteilung berechnet. In diesem Fall befinden sich in UL: VB2+CD45RO-, in UR: VB2+CD45RO+, in LL: VB2-CD45RO- und in LR: VB2-CD45RO+ T-Lymphozyten.

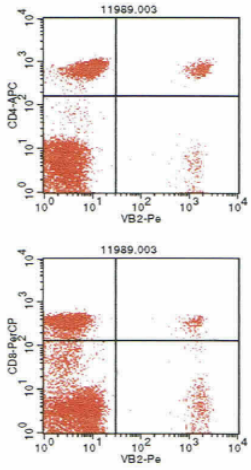
1



2



Verteilung von TCR-VB2+ auf CD4+ und CD8+ T-Zellen

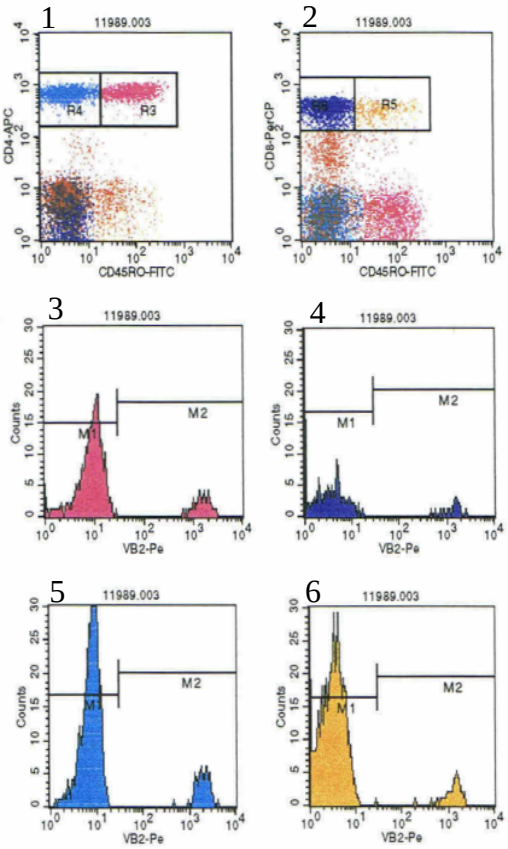


VB2+ CD4+			
Quad	Events	%Gated	%Total
UL	3626	36.26	9,83
UR	358	3,58	0.97

VB2+ CD8+			
Quad	Events	%Gated	%Total
UL	3082	30.82	8,35
UR	168	1.68	0.46

Abb. 10: Verteilung von VB2+ auf CD4+ und CD8+ T-Zellen
Gezeigt ist die Verteilung von TCR-VB2 positiven T-Zellen auf CD4+ und CD8+ T-Zellen. In den ausgewerteten Quadranten sieht man die Zellzahl (Events) und die prozentuale Verteilung der VB-Ketten. Im Quadranten **UL** (Upper Left) werden alle CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen gezählt. Im Quadranten **UR** (Upper Right), alle CD4+VB2+ bzw. CD8+VB2+ T-Zellen.

Verteilung von TCR-VB2+ auf CD45RO+ und CD45RO- T-Zellen



CD4+ CD45RO+	Events	% Gated	%Total
M1	1321	90.29	3.58
M2	142	9.71	0,38

CD4+ CD45RO-	Events	% Gated	%Total
M1	2307	91.40	6.25
M2	217	8.60	0.59

CD8+ CD45RO+	Events	% Gated	%Total
M1	3026	36.26	9,83
M2	358	24	0.97

CD8+ CD45RO-	Events	% Gated	%Total
M1	3026	36.26	9,83
M2	358	24	0.97

Abb. 11: TCR VB2 Verteilung auf CD45RO+ und CD45RO- T-Zellen
Gezeigt ist die Verteilung von TCR VB2 + T-Zellen auf CD4+ und CD8+ T-Zellen auf die Subtypen CD45RO+ und CD45RO-. In **1** sieht man graphisch die Verteilung der CD4+ T-Zellen in CD45RO- T-Zellen (Gate R4) und CD45RO+ T-Zellen (Gate R3). In **2** sieht man graphisch die Verteilung der CD8+ T-Zellen in CD45RO- T-Zellen (Gate R6) und CD45RO+ T-Zellen (Gate R5). In **3** sieht man graphisch die Verteilung der in **Gate R3** befindlichen T-Zellen, also CD4+ CD45RO+ in VB2- (M1) und VB2+ (M2). In **4** sieht man graphisch die Verteilung der in **Gate R5** befindlichen T-Zellen, also CD4+ CD45RO+ in VB2- (M1) und VB2+ (M2). **5** zeigt die Aufteilung der in **Gate R4** befindlichen T-Zellen, also CD8+ CD45RO+ in VB2- (M1) und VB2+ (M2). **6** zeigt die Auswertung für die Zellen der in **Gate R6** befindlichen T-Zellen, also CD8+ CD45RO- in VB2- (M1) und VB2+ (M2). Daneben sieht man die Zahl der „gated Events“ der Gates 3-6.

3.6.1 Statistische Analysen

Die statistische Berechnung für die prozentuale Verteilung der einzelnen VB-Ketten erfolgte nach folgender Formel, die hier exemplarisch für die Verteilung von CD4+VB2+ T-Zellen aufgeführt ist: 100 X CD4+VB2+/(CD4+VB2- + CD4+VB2+). Mit dieser Formel kann man die prozentuale Verteilung aller VB-CD Kombinationen errechnen und graphisch darstellen.

Um die Unterschiede der Expression der TCR-VB-Ketten auf CD4+ und CD8+ T-Zellen und deren Subtypen auf statistische Signifikanz zu überprüfen, führten wir Analysen mittels des „Mann-Whitney Rank Sum“ Test durch. Dieser Test wird durchgeführt, wenn zwei Gruppen miteinander verglichen werden sollen, deren Verteilung nicht einer Normalverteilung entspricht. Bei diesem Test wird für jede Gruppe der Median, die 25% und 75% Perzentile sowie ein P-Wert ermittelt. Diesen Test wendeten wir auch an, um den Einfluss von HLA auf das TCR-Repertoire in der Peripherie zu untersuchen. Hierfür verglichen wir alle Probanden eines HLA-Genotyps mit den Probanden, die nicht diesem Genotyp entsprachen. Bei 22 Tests pro Testreihe zeigt ein P-Wert <0,05/22=0,002 eine statistische Signifikanz an.

In einem zweiten Schritt verglichen wir bei den HLA-Molekülen, bei denen wir eine Assoziation fanden, homozygote mit heterozygoten und nicht Allelträger miteinander. Die Analyse wurde mit dem „Kruskal-Wallis“ Test durchgeführt. Dies ist ein parameterfreier statistischer Test, mit dem im Rahmen einer Varianzanalyse verglichen wird, ob sich verschiedene unabhängige Stichproben hinsichtlich einer ordinalskalierten Variable unterscheiden. Er ähnelt dem „Mann-Whitney Rank Sum“ Test und basiert wie dieser auf Rangplatzsummen, mit dem Unterschied, dass er für den Vergleich von mehr als zwei Gruppen angewendet werden kann.

Um einen Zusammenhang zwischen dem Alter der Kontrollpersonen und dem TCR-VB-Repertoire in der Peripherie, sowie der anderer Lymphozyten Subpopulationen zu untersuchen, führten wir Korrelationsanalysen mittels des „Pearson Product Moment Correlation“ Test durch. Bei diesem Test werden ein Korrelationskoeffizient und ein P-Wert ermittelt. Der Korrelationskoeffizient zeigt bei positivem Vorzeichen eine Steigerung, bei negativem Vorzeichen eine Senkung der Expression im Alter an. Bei 22 Tests pro Testreihe zeigt ein P-Wert <0,05/22=0,002 eine statistische Signifikanz an.

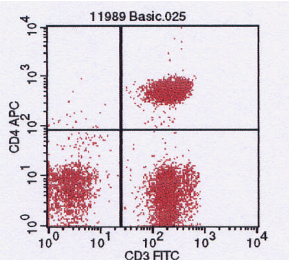
3.6.2 Multiples Testen

Je mehr Tests durchgeführt werden, desto "überhöhter" sind die üblichen Signifikanzangaben. Mit einem einzigen Test und einem Alpha von 0,05 ist die Wahr-

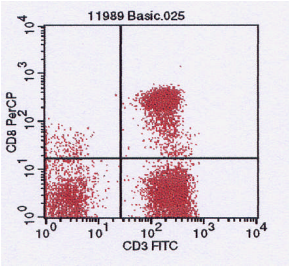
scheinlichkeit, die Null-Hypothese korrekterweise zu akzeptieren (1 - 0,05) = 0,95. Führen wir zwei (unabhängige) Tests durch, so wird diese Wahrscheinlichkeit deutlich reduziert: $0{,}95^2 = 0{,}90$, was eine ebenso deutliche Änderung des entsprechenden Alpha-Werts von 0,05 auf 0,1 bedeutet. Diese Fehlerquelle ist allgemein als „Alpha-Fehler-Kumulierung“ bekannt. Die „Bonferroni – Korrektur“ ist eine Möglichkeit, das multiple Alpha-Niveau anzupassen. Will man für mehrere voneinander unabhängige Testungen ein gemeinsames Alpha-Fehlerniveau einhalten, muss man die gewählte globale Irrtumswahrscheinlichkeit (0,05) durch die Zahl der Tests teilen. Bei zwei Testungen wäre also ein Ergebnis mit einem P-Wert von 0,05/2=0,025 signifikant (85).

3.6.3 Der Subtypen Panel

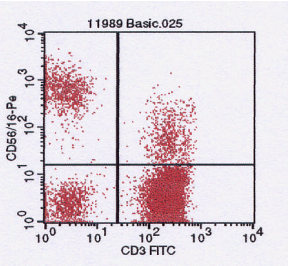
Im Subtypen Panel untersuchten wir die prozentuale Expression folgender Lymphozyten Subtypen:



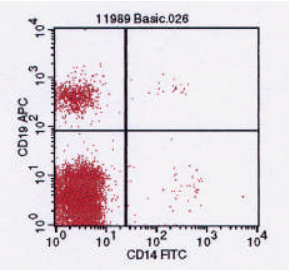
CD4+ T-Helferzellen



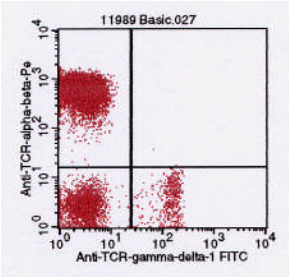
CD8+ T-Killerzellen



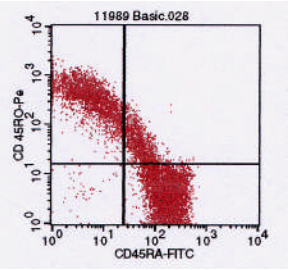
CD16/56+ NK-Zellen



CD19+ B-Zellen



TCR Alpha Beta und Gamma Delta

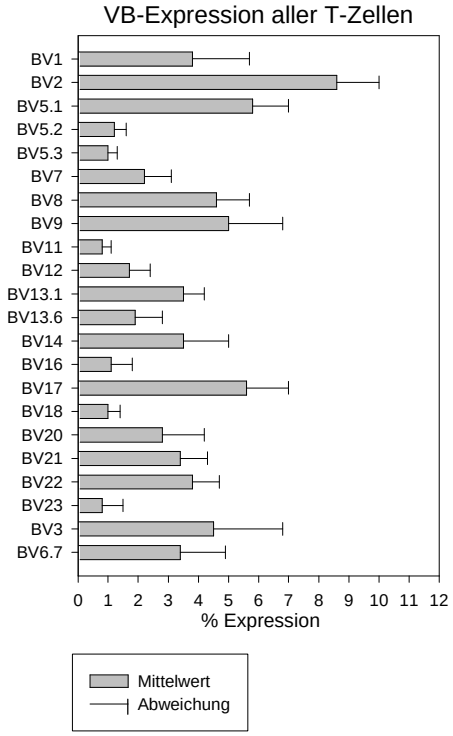


CD45RO und CD45RA

4. Ergebnisse

4.1 TCR-VB-Ketten Expression auf unterschiedlichen T – Zellpopulationen

Von allen 119 Probanden wurde die Expression von 22 TCR-VB-Ketten im Blut prozentual bestimmt. In einem ersten Schritt werteten wir die Expression der Ketten auf allen CD4+ und CD8+ T-Zellen zusammen aus.

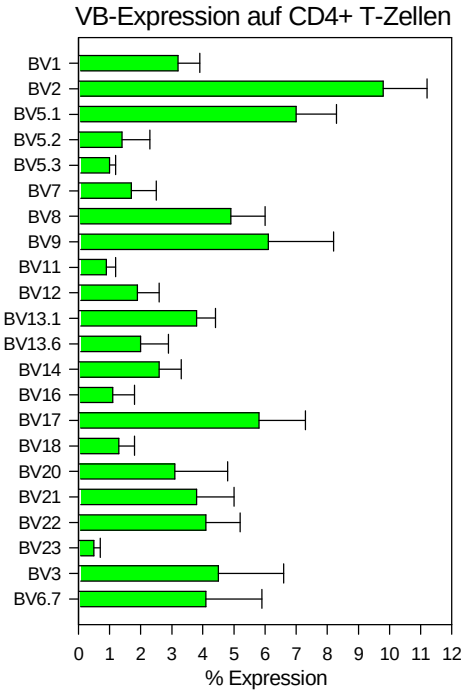


V beta	Mittelwert	Abweichung	max	min	95%
1S1	3,8	1,9	21,2	0,2	0,34
2S1	8,6	1,4	13,9	5,4	0,24
5S1	5,8	1,2	9,2	2,6	0,22
5S2	1,2	0,4	2,4	0,5	0,07
5S3	1,0	0,3	3,0	0,4	0,06
7S1	2,2	0,9	7,2	0,6	0,16
8S1/S2	4,6	1,1	10,0	2,6	0,20
9S1	5,0	1,8	11,2	1,6	0,33
11S1	0,8	0,3	1,7	0,3	0,05
12S2	1,7	0,7	6,9	0,9	0,12
13S1	3,5	0,7	6,1	1,7	0,12
13S6	1,9	0,9	9,5	0,8	0,15
14S1	3,5	1,5	12,6	0,5	0,26
16S1	1,1	0,7	7,0	0,4	0,13
17S1	5,6	1,4	14,2	1,1	0,25
18S1	1,0	0,4	3,5	0,2	0,08
20S1	2,8	1,4	8,0	0,0	0,25
21S3	3,4	0,9	6,8	1,7	0,16
22S1	3,8	0,9	8,3	0,6	0,17
23S1	0,8	0,7	6,6	0,2	0,13
3S1	4,5	2,3	11,6	0,3	0,41
6S7	3,4	1,5	8,0	0,1	0,27
Summe	**70,0**				

Abb.12: TCR-VB Expression auf CD4+ und CD8+ T-Zellen
Rechts gezeigt ist jeweils der Mittelwert, die Standardabweichung, der höchste (max) und der niedrigste (min) Wert der prozentuellen Expression im Kollektiv und das 95% Konfidenzintervall der von uns gefärbten TCR-VB-Ketten. Die VB-Ketten 3.1 und 6.7 stehen unterhalb der anderen VB-Ketten, da diese als einzige nicht mit dem Farbstoff PE, sondern mit dem Farbstoff FITC gefärbt wurden.

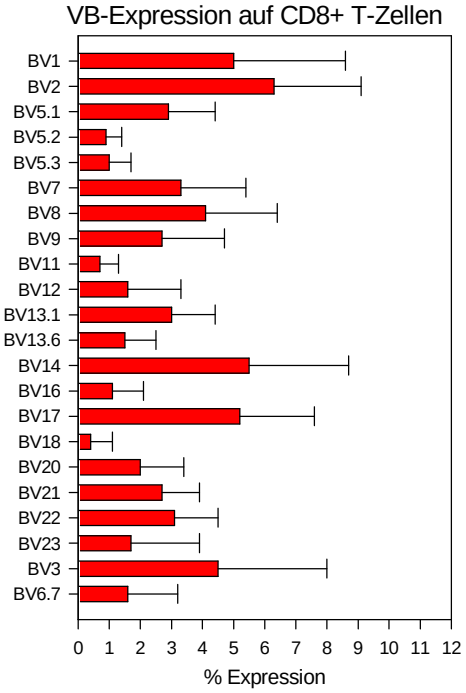
Die Analysen zeigen, dass die Expression der einzelnen TCR-VB-Ketten sehr unterschiedlich ist. Die niedrigste Expression fanden wir bei den Ketten VB11.1 und VB23.1 mit einem Mittelwert von <1%. Besonders hoch war die Expression für die Ketten VB2.1 mit einem Mittelwert von 8,6%, VB5.1 mit 5,8%, VB 9.1 mit 5% und VB17.1 mit 5,6%. Die Standardabweichung ist insgesamt bei den meisten Ketten relativ niedrig. Dies spricht dafür, dass man bei einer gesunden Kontrollperson von einem relativ einheitlichen TCR-VB-Repertoire ausgehen kann. In der Summe erfassen wir insgesamt 70% aller vorhandenen TCR-VB-Ketten.

Als nächstes haben wir die Expression der TCR-VB-Ketten für die T-Zellsubtypen CD4+ T-Zellen und CD8+ T-Zellen differenziert.



V beta	Mittelwert	Abweichung	max	min	95%
1S1	3,2	0,7	5,6	0,2	0,13
2S1	9,8	1,4	14,0	6,9	0,25
5S1	7,0	1,3	11,4	4,5	0,23
5S2	1,4	0,9	9,9	0,5	0,17
5S3	1,0	0,2	1,7	0,4	0,04
7S1	1,7	0,8	7,0	0,5	0,14
8S1/S2	4,9	1,1	12,7	2,7	0,20
9S1	6,1	2,1	11,7	1,3	0,38
11S1	0,9	0,3	2,0	0,3	0,06
12S2	1,9	0,7	8,6	0,9	0,13
13S1	3,8	0,6	5,7	2,2	0,12
13S6	2,0	0,9	10,4	1,1	0,16
14S1	2,6	0,7	5,9	0,6	0,13
16S1	1,1	0,7	6,8	0,4	0,12
17S1	5,8	1,5	16,5	1,4	0,27
18S1	1,3	0,5	3,5	0,5	0,08
20S1	3,1	1,7	10,5	0,0	0,31
21S3	3,8	1,2	9,0	2,0	0,22
22S1	4,1	1,1	12,0	0,4	0,19
23S1	0,5	0,2	1,3	0,1	0,03
3S1	4,5	2,1	8,4	0,5	0,38
6S7	4,1	1,8	9,6	0,1	0,32
Summe	**74,6**				

Abb.13: TCR-VB Expression auf CD4+ T-Zellen
Legende s. Abb.12

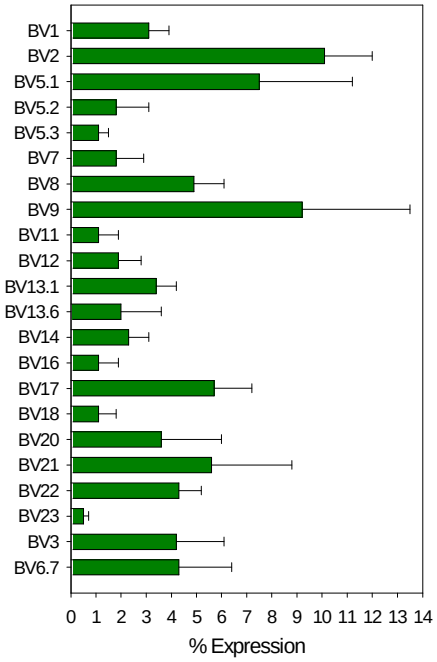


V beta	Mittelwert	Abweichung	max	min	95%
1S1	5,0	3,6	33,6	0,3	0,65
2S1	6,3	2,8	20,3	1,5	0,51
5S1	2,9	1,5	13,0	0,6	0,27
5S2	0,9	0,5	2,4	0,1	0,08
5S3	1,0	0,7	5,8	0,1	0,12
7S1	3,3	2,1	14,6	0,5	0,38
8S1/S2	4,1	2,3	15,3	0,9	0,41
9S1	2,7	2,0	14,7	0,6	0,36
11S1	0,7	0,6	4,0	0,1	0,10
12S2	1,6	1,7	15,7	0,3	0,31
13S1	3,0	1,4	10,3	0,1	0,26
13S6	1,5	1,0	6,3	0,3	0,18
14S1	5,5	3,2	26,1	0,2	0,58
16S1	1,1	1,0	7,5	0,1	0,19
17S1	5,2	2,4	14,9	0,0	0,43
18S1	0,4	0,7	7,2	0,0	0,13
20S1	2,0	1,4	12,1	0,0	0,26
21S3	2,7	1,2	7,9	0,5	0,21
22S1	3,1	1,4	9,6	0,8	0,25
23S1	1,7	2,2	21,7	0,1	0,40
3S1	4,5	3,5	19,6	0,2	0,64
6S7	1,6	1,6	14,6	0,0	0,29
Summe	**60,8**				

Abb.14: TCR-VB Expression auf CD8+ T-Zellen
Legende s. Abb.12

Für die Verteilung der TCR-VB-Ketten bei CD4+CD45RO+ T-Zellen und CD4+CD45RO- T-Zellen ergaben sich folgende Ergebnisse:

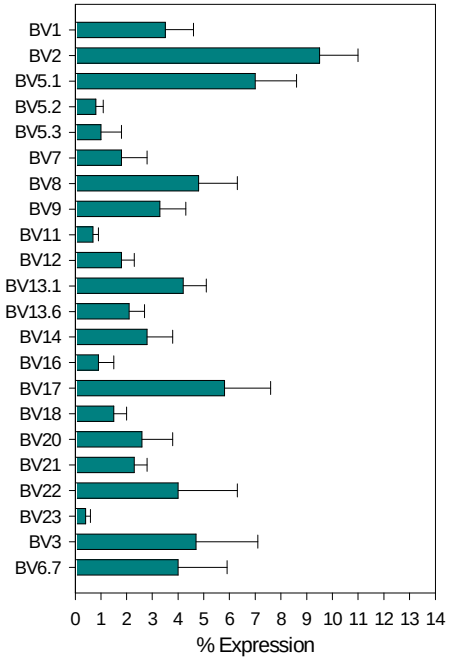
VB-Expression auf CD4+CD45RO+ T-Zellen



V beta	Mittelwert	Abweichung	max	min	95%
1S1	3,1	0,8	4,8	0,2	0,14
2S1	10,1	1,9	17,3	4,7	0,34
5S1	7,5	3,7	43,6	4,0	0,66
5S2	1,8	1,3	11,8	0,5	0,23
5S3	1,1	0,4	2,4	0,0	0,07
7S1	1,8	1,1	8,5	0,8	0,19
8S1/S2	4,9	1,2	10,4	2,1	0,22
9S1	9,2	4,3	21,4	0,3	0,78
11S1	1,1	0,8	6,2	0,6	0,15
12S2	1,9	0,9	10,3	1,6	0,16
13S1	3,4	0,8	6,7	0,0	0,14
13S6	2,0	1,6	18,1	0,8	0,29
14S1	2,3	0,8	83,0	0,0	0,15
16S1	1,1	0,8	6,8	1,0	0,14
17S1	5,7	1,5	13,6	1,0	0,27
18S1	1,1	0,7	6,0	0,0	0,12
20S1	3,6	2,4	14,0	0,0	0,43
21S3	5,6	3,2	30,8	0,0	0,57
22S1	4,3	0,9	6,7	0,6	0,16
23S1	0,5	0,2	1,6	0,0	0,04
3S1	4,2	1,9	8,3	0,4	0,35
6S7	4,3	2,1	16,1	0,0	0,38
Summe	**80,6**				

Abb.15: TCR-VB Expression auf CD4+CD45RO+ T-Zellen
Legende s. Abb.12

VB-Expression auf CD4+CD45RO- T-Zellen

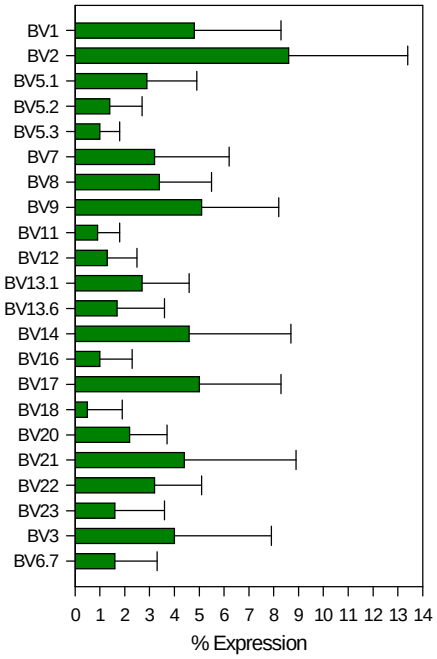


V beta	Mittelwert	Abweichung	max	min	95%
1S1	3,5	1,1	10,4	0,2	0,20
2S1	9,5	1,5	14,9	6,2	0,26
5S1	7,0	1,6	12,6	1,0	0,30
5S2	0,8	0,3	2,4	0,2	0,06
5S3	1,0	0,8	8,7	0,2	0,14
7S1	1,8	1,0	10,7	0,4	0,19
8S1/S2	4,8	1,5	17,2	2,5	0,26
9S1	3,3	1,0	10,4	0,7	0,17
11S1	0,7	0,2	1,3	0,2	0,04
12S2	1,8	0,5	5,1	0,9	0,10
13S1	4,2	0,9	10,1	2,5	0,16
13S6	2,1	0,6	6,3	1,1	0,12
14S1	2,8	1,0	9,5	0,4	0,17
16S1	0,9	0,6	6,8	0,3	0,11
17S1	5,8	1,8	20,5	1,4	0,33
18S1	1,5	0,5	3,6	0,5	0,09
20S1	2,6	1,2	5,7	0,0	0,22
21S3	2,3	0,5	4,0	1,0	0,09
22S1	4,0	2,3	26,3	0,4	0,42
23S1	0,4	0,2	0,9	0,0	0,03
3S1	4,7	2,4	10,1	0,4	0,43
6S7	4,0	1,9	12,8	0,0	0,34
Summe	**69,5**				

Abb.16: TCR-VB Expression auf CD4+CD45RO- T-Zellen
Legende s. Abb.12

Für die weitere TCR-VB-Ketten Unterteilung in CD8+CD45RO+ T-Zellen und CD8+CD45RO- T-Zellen fanden wir folgende Verteilung:

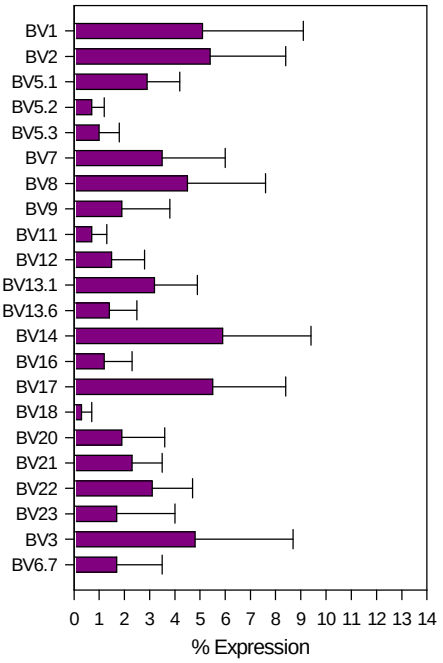
VB-Expression auf CD8+CD45RO+ T-Zellen



V beta	Mittelwert	Abweichung	max	min	95%
1S1	4,8	3,5	20,0	0,0	0,64
2S1	8,6	4,8	27,6	1,0	0,87
5S1	2,9	2,0	16,7	0,0	0,36
5S2	1,4	1,3	6,4	0,0	0,23
5S3	1,0	0,8	4,6	0,0	0,14
7S1	3,2	3,0	25,7	0,2	0,54
8S1/S2	3,4	2,1	14,1	0,2	0,38
9S1	5,1	3,0	16,6	0,6	0,55
11S1	0,9	0,9	5,0	0,0	0,17
12S2	1,3	1,2	7,4	0,0	0,22
13S1	2,7	1,9	11,4	0,2	0,35
13S6	1,7	1,9	13,1	0,0	0,34
14S1	4,6	4,1	39,8	0,0	0,74
16S1	1,0	1,3	10,8	0,0	0,23
17S1	5,0	3,3	23,5	0,0	0,60
18S1	0,5	1,4	12,6	0,0	0,24
20S1	2,2	1,5	8,2	0,0	0,28
21S3	4,4	4,5	44,3	0,0	0,80
22S1	3,2	1,9	10,3	0,0	0,35
23S1	1,6	2,0	15,5	0,0	0,36
3S1	4,0	3,9	30,7	0,0	0,70
6S7	1,6	1,7	11,0	0,0	0,31
Summe	**65,1**				

Abb.17: TCR-VB Expression auf CD8+CD45RO+ T-Zellen
Legende s. Abb.12

VB Expression auf CD 8+CD45RO- T-Zellen



V beta	Mittelwert	Abweichung	max	min	95%
1S1	5,1	4,0	35,3	0,2	0,72
2S1	5,4	3,0	26,6	0,9	0,55
5S1	2,9	1,3	7,6	0,4	0,23
5S2	0,7	0,5	2,5	0,0	0,08
5S3	1,0	0,8	6,7	0,1	0,15
7S1	3,5	2,5	16,9	0,4	0,45
8S1/S2	4,5	3,1	24,3	0,5	0,55
9S1	1,9	1,9	16,2	0,0	0,34
11S1	0,7	0,6	4,3	0,0	0,11
12S2	1,5	1,3	10,1	0,0	0,24
13S1	3,2	1,7	14,1	0,1	0,31
13S6	1,4	1,1	7,1	0,1	0,19
14S1	5,9	3,5	29,3	0,2	0,62
16S1	1,2	1,1	7,7	0,0	0,20
17S1	5,4	2,9	16,9	0,0	0,52
18S1	0,3	0,4	2,8	0,0	0,08
20S1	1,9	1,7	14,0	0,0	0,30
21S3	2,3	1,2	7,1	0,2	0,21
22S1	3,1	1,6	10,2	0,5	0,29
23S1	1,7	2,3	21,8	0,0	0,42
3S1	4,8	3,9	23,9	0,0	0,70
6S7	1,7	1,8	15,7	0,0	0,32
Summe	**60,1**				

Abb.18: TCR-VB Expression auf CD8+CD45RO- T-Zellen
Legende s. Abb.12

Anhand der graphischen Darstellung wird deutlich, dass die Expression der TCR-VB-Ketten auf CD4+ und CD8+ T-Zellen große Unterschiede aufweist. Um diese Unterschiede genauer beschreiben zu können, überprüften wir die Verteilung der VB-Ketten auf statistische Signifikanz. Da die Verteilung nicht einer Normalverteilung entsprach, nutzten wir dafür den „Mann-Whitney Rank Sum“ Test. Hierbei wurde die „Asymptotische Signifikanz“ ermittelt, also ein Wert, der asymptotisch gegen 0 strebt. Dies ist eine Approximation mit einer oberen Grenze von 0.000, dargestellt als <0,001. Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

CD4	median	25%	75%	CD8	median	25%	75%	P-Value
1S1	3,2	2,8	3,8	1S1	4,3	3,3	5,7	<0,001
2S1	9,5	8,9	10,6	2S1	5,6	4,3	7,5	<0,001
5S1	6,8	6,2	7,7	5S1	2,8	2,2	3,4	<0,001
5S2	1,2	1	1,5	5S2	0,8	0,5	1,1	<0,001
5S3	1	0,8	1,1	5S3	0,8	0,6	1,2	0,007
7S1	1,6	1,3	2	7S1	3	2,2	3,7	<0,001
8S1/S2	4,8	4,2	5,4	8S1/S2	3,7	2,6	4,8	<0,001
9S1	5,9	4,6	7,3	9S1	2,4	1,6	3	<0,001
11S1	0,9	0,7	1	11S1	0,6	0,4	0,9	<0,001
12S2	1,8	1,6	2	12S2	1,1	0,8	1,7	<0,001
13S1	3,8	3,3	4,2	13S1	3	2,1	3,5	<0,001
13S6	2	1,7	2,2	13S6	1,3	0,9	1,7	<0,001
14S1	2,5	2,2	2,9	14S1	5,1	3,9	6,6	<0,001
16S1	1	0,8	1,1	16S1	0,9	0,6	1,3	0,098
17S1	5,6	5,2	6,5	17S1	5	3,9	6,6	0,003
18S1	1,2	1	1,6	18S1	0,2	0,1	0,4	<0,001
20S1	3,1	2	3,9	20S1	1,8	1,2	2,4	<0,001
21S3	3,6	2,9	4,3	21S3	2,6	1,9	3,4	<0,001
22S1	4	3,5	4,5	22S1	2,9	2,3	3,7	<0,001
23S1	0,5	0,4	0,5	23S1	1,3	1,1	1,8	<0,001
3S1	4,4	3,5	6	3S1	3,7	2,45	6,1	0,125
6S7	4,1	3	5,5	6S7	1,2	0,8	2,2	<0,001

Tab.1: TCR-VB Expression auf CD4+ und CD8+ T-Zellen
Gezeigt ist jeweils der Median, die 25% und 75% Perzentile der Expression der 22 TCR-VB-Ketten aufgeteilt auf CD4+ und CD8+ T-Zellen. Ein P-Wert <0,002 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied bei der Expression der TCR-VB-Ketten auf CD4+ und CD8+. Statistisch signifikante P-Werte sind gelb unterlegt. Eine höhere Expression auf CD4+ oder CD8+ T-Zellen ist blau unterlegt.

Der Unterschied der Expression der TCR-VB-Ketten zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen ist für alle bis auf vier von uns ausgewerteten Ketten signifikant. Mit Ausnahme der Ketten VB1.1, VB7.1 und VB14.1 sind die Ketten auf CD4+ T-Zellen stärker exprimiert. Die Streubreite der VB-Ketten Expression auf den CD8+ T-Zellen ist deutlich größer als bei den CD4+ T-Zellen.

Die statistische Auswertung der Unterschiede der Expression der TCR-VB-Ketten auf CD4+CD45RO+ und CD4+CD45RO- T-Zellen zeigte folgendes Ergebnis:

CD4+ CD45RO+	median	25%	75%	CD4+ CD45RO-	median	25%	75%	P-Value
1S1	3,2	2,6	3,6	1S1	3,4	2,8	3,9	0,015
2S1	9,7	8,8	11	2S1	9,5	8,6	10,5	0,031
5S1	6,95	6	8	5S1	6,9	6	7,9	0,39
5S2	1,5	1,2	2,2	5S2	0,8	0,6	1	<0,001
5S3	1	0,8	1,3	5S3	0,9	0,7	1,1	0,001
7S1	1,6	1,3	1,9	7S1	1,6	1,3	2	0,937
8S1/S2	4,9	4,3	5,4	8S1/S2	4,8	4,1	5,2	0,172
9S1	8,7	5,7	12	9S1	3,2	2,8	3,7	< 0,001
11S1	0,9	0,6	1,3	11S1	0,7	0,6	0,9	< 0,001
12S2	1,8	1,5	2	12S2	1,8	1,5	2,1	0,913
13S1	3,4	2,8	3,8	13S1	4,2	3,7	4,7	< 0,001
13S6	1,9	1,5	2,1	13S6	2	1,7	2,3	0,021
14S1	2,2	1,9	2,8	14S1	2,7	2,3	3,1	< 0,001
16S1	1	0,8	1,3	16S1	0,9	0,7	1,1	< 0,001
17S1	5,5	4,9	6,4	17S1	5,7	5	6,3	0,349
18S1	0,9	0,7	1,3	18S1	1,4	1,1	1,8	< 0,001
20S1	3,1	2,2	4,1	20S1	2,6	1,8	3,5	0,001
21S3	4,9	3,9	6,6	21S3	2,2	1,9	2,5	< 0,001
22S1	4,2	3,6	4,9	22S1	3,7	3,2	4,4	< 0,001
23S1	0,5	0,3	0,6	23S1	0,4	0,3	0,5	0,113
3S1	4,2	3,4	5,6	3S1	4,6	3,4	6,6	0,091
6S7	4,1	3,1	5,5	6S7	3,9	2,7	5,1	0,232

Tab.2: TCR-VB Expression auf CD4+CD45RO+ und CD4+CD45RO- T-Zellen
Legende siehe Tab.1

Die Ketten VB5.2, VB5.3, VB9.1, VB11.1, VB16.1, VB20.1, VB21.3 und VB22.1 werden signifikant höher auf CD4+CD45RO+ Zellen exprimiert, VB13.1, VB14.1

und VB18.1 werden höher auf CD4+CD45RO- Zellen exprimiert. Sehr deutlich ist dieser Unterschied vor allem für die Kette VB 9.1 auf CD4+CD45RO+ T-Zellen.

Die statistische Auswertung der Unterschiede der Expression der TCR-VB-Ketten auf CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen zeigte folgendes Ergebnis:

CD8+ CD45RO+	median	25%	75%	CD8+ CD45RO-	median	25%	75%	P-Value
1S1	3,7	2,7	5,7	1S1	4,5	3,5	6,2	0,075
2S1	7,5	5,3	10,1	2S1	5,2	3,9	6,7	<0,001
5S1	2,5	1,8	3,5	5S1	2,9	2,1	3,7	0,186
5S2	0,1	0,6	1,7	5S2	0,7	0,4	0,9	<0,001
5S3	0,8	0,3	1,4	5S3	0,8	0,6	1,2	0,488
7S1	2,6	1,6	4	7S1	3,2	2	4,2	0,138
8S1/S2	2,9	2,1	3,9	8S1/S2	4	2,8	5,4	< 0,001
9S1	4,6	2,7	6,4	9S1	1,6	1	2,3	< 0,001
11S1	0,7	0,3	1,3	11S1	0,6	0,3	0,9	0,097
12S2	1	0,5	1,7	12S2	1,2	0,9	1,7	0,03
13S1	2,5	1,3	3,2	13S1	3,3	2,3	4,1	< 0,001
13S6	1,2	0,6	1,8	13S6	1,2	0,9	1,8	0,594
14S1	3,9	2,6	5,5	14S1	5,9	4,1	7,5	< 0,001
16S1	0,7	0,4	1,2	16S1	0,9	0,6	1,3	0,033
17S1	4,1	2,9	6,5	17S1	5,3	3,8	6,8	0,051
18S1	0,2	0	0,5	18S1	0,2	0,1	0,4	0,951
20S1	1,9	1,1	3,1	20S1	1,6	1	2,5	0,054
21S3	3,7	2,5	4,9	21S3	2,3	1,4	3	< 0,001
22S1	2,9	1,8	4,2	22S1	2,9	2,4	3	0,907
23S1	1	0,6	2	23S1	1,4	1,1	2	0,019
3S1	3,2	2	4,7	3S1	4,2	2,2	6,6	0,023
6S7	1,3	0,5	2	6S7	1,2	0,7	2,1	0,158

Tab.3: TCR-VB Expression auf CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen
Legende siehe Tab.1

Die Ketten VB2.1, VB5.2, VB9.1 und VB21.3 werden signifikant höher auf CD8+CD45RO+ T-Zellen exprimiert, VB8.1/2, VB13.1, und VB14.1 werden höher auf CD8+CD45RO- T-Zellen exprimiert. Die Unterschiede in der Expression von CD4+CD45RO+ und CD4+CD45RO- T-Zellen untereinander, sowie zwischen CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen fallen deutlich geringer aus als zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen. Die Streubreite ist bei den CD4+ T-Zellen niedriger als bei den CD8+ T-Zellen.

4.2 Expression der TCR-VB-Ketten in Abhängigkeit vom Alter

Ein Ziel der Studie war es, die Abhängigkeit des TCR-VB-Repertoires vom Alter zu untersuchen. Dabei interessierte uns vor allem, ob die expandierten TCR-VB-Ketten in einer bestimmten Altersgruppe vermehrt oder unabhängig davon zu finden waren. Darüber hinaus wollten wir feststellen, ob bestimmte Ketten signifikant häufiger expandiert und auf welchen Subtypen sie zu finden waren. Um die Expression jeder TCR-VB-Kette in Altersabhängigkeit zu untersuchen, wendeten wir den „Pearson Product Moment Correlation“ Test an. Der Korrelationskoeffizient zeigt bei positivem Vorzeichen eine Steigerung, bei negativem Vorzeichen eine Senkung der Expression im Alter an.

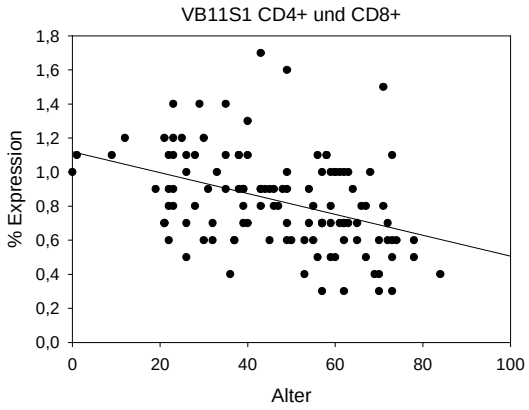
Zuerst überprüften wir, ob die TCR Expression im Alter an sich zurück geht. Zu diesem Zweck berechneten wir die Summe aller TCR-VB-Ketten und korrelierten diese mit dem Alter.

	Corr. Co.	P-Value
TCR-VB insg.	-0,0387	0,676

Abb.19: TCR Expression insgesamt in Abhängigkeit vom Alter
Gezeigt ist der Korrelationskoeffizient und P-Wert der von uns gefärbten TCR-VB-Ketten in Abhängigkeit vom Alter. Der Korrelationskoeffizient zeigt bei positivem Vorzeichen eine Steigerung, bei negativem Vorzeichen eine Senkung der Expression im Alter an. Die X-Achse zeigt das Alter der Probanden, die Y-Achse die Expression der TCR-VB-Ketten in %.

Es zeigte sich, dass die TCR Expression im Allgemeinen nicht altersabhängig ist.

TCR-insgesamt	Corr. Co.	P-Value
1S1	0,191	0,0376
2S1	-0,00412	0,965
5S1	-0,0512	0,582
5S2	-0,215	0,0191
5S3	-0,0524	0,571
7S1	-0,152	0,101
8S1/S2	-0,0214	0,817
9S1	0,0839	0,365
11S1	-0,403	0,00000537
12S2	-0,0199	0,898
13S1	-0,398	0,00000738
13S6	-0,12	0,271
14S1	-0,139	0,133
16S1	-0,0693	0,454
17S1	0,0225	0,808
18S1	-0,154	0,0938
20S1	0,137	0,138
21S3	0,0143	0,877
22S1	0,144	0,119
23S1	-0,0688	0,457
3S1	0,104	0,264
6S7	0,274	0,769



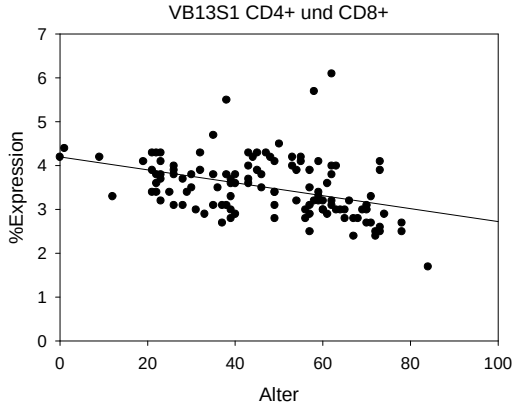


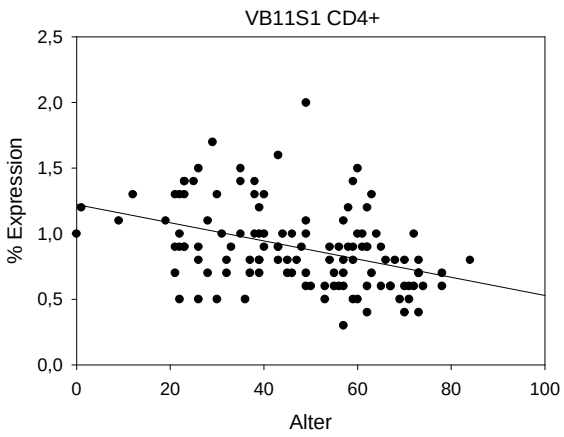
Abb.20: TCR-VB Expression auf CD4+ und CD8+T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter
Gezeigt ist jeweils der Korrelationskoeffizient und den P-Wert der von uns gefärbten TCR-VB-Ketten in Abhängigkeit vom Alter. Ein P-Wert <0,002 zeigt eine statistisch signifikante Korrelation. Der Korrelationskoeffizient zeigt bei positivem Vorzeichen eine Steigerung, bei negativem, einen Senkung der Expression im Alter an. Die TCR-VB-Ketten mit den höchsten signifikanten Änderungen im Alter werden rechts neben der Tabelle gezeigt. Die X-Achse zeigt das Alter der Probanden, die Y-Achse die Expression der TCR-VB-Ketten in %.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression der einzelnen TCR-VB-Ketten in den verschiedenen Altersstufen relativ konstant bleibt. Trotz Expansionen einzelner Ketten bei einigen Probanden findet tendenziell insgesamt eher eine Senkung der Expression im Alter statt. 15 Ketten zeigten eine sinkende Expression, 8 Ketten eine steigende. Hoch signifikant ist diese Tendenz für die Ketten VB11.1 und VB13.1.

Wir wollten feststellen, ob sich diese Korrelationen auch für die einzelnen Subtypen bestätigen ließen und bestimmten als nächstes die Expression der TCR-VB-Ketten in Abhängigkeit von den Subtypen CD4+ und CD8+ und Alter.

CD4	Corr. Co.	P-Value
1S1	0,0143	0,121
2S1	-0,00182	0,984
5S1	-0,0768	0,408
5S2	-0,235	0,0106
5S3	0,107	0,247
7S1	-0,0709	0,46
8S1/S2	0,0377	0,684
9S1	0,0153	0,869
11S1	-0,406	0,00000476
12S2	-0,161	0,0796
13S1	-0,298	0,00102
13S6	-0,00725	0,938
14S1	-0,018	0,846
16S1	-0,0433	0,64
17S1	0,131	0,156
18S1	-0,258	0,00467
20S1	0,128	0,164
21S3	0,105	0,254
22S1	0,149	0,107
23S1	-0,0519	0,575
3S1	0,0389	0,677
6S7	0,0508	0,585

CD8	Corr. Co.	P-Value
1S1	0,125	0,176
2S1	-0,0239	0,789
5S1	-0,0921	0,321
5S2	-0,0258	0,781
5S3	0,0122	0,188
7S1	-0,0624	0,505
8S1/S2	-0,282	0,761
9S1	0,126	0,171
11S1	-0,0686	0,459
12S2	0,0569	0,539
13S1	-0,25	0,00609
13S6	-0,271	0,00285
14S1	-0,0127	0,169
16S1	-0,0864	0,35
17S1	-0,0705	0,446
18S1	-0,0191	0,837
20S1	0,0593	0,524
21S3	-0,163	0,0757
22S1	-0,0343	0,711
23S1	-0,0452	0,626
3S1	0,163	0,0794
6S7	-0,062	0,517



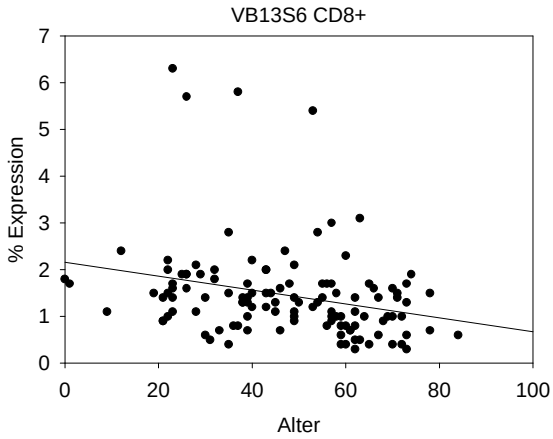
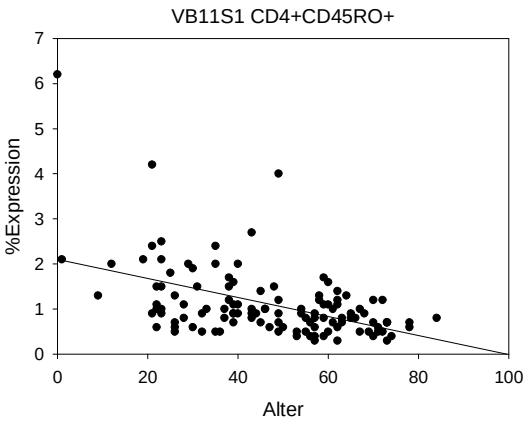


Abb.21: TCR-VB Expression auf CD4+ und CD8+ T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter
Legende s. Abb.20

Aufgeteilt auf die Subtypen bei CD4+ T-Zellen sahen die Expressionen folgendermaßen aus:

CD4CD45RO+	Corr. Co.	P-Value
1S1	-0,0492	0,595
2S1	0,00476	0,959
5S1	-0,159	0,0859
5S2	-0,332	0,000238
5S3	0,0469	0,617
7S1	-0,0463	0,596
8S1/S2	0,0835	0,67
9S1	-0,152	0,099
11S1	-0,48	3,26E-08
12S2	-0,153	0,0966
13S1	-0,126	0,172
13S6	0,00877	0,925
14S1	-0,0352	0,704
16S1	0,0208	0,823
17S1	0,115	0,212
18S1	-0,112	0,224
20S1	0,261	0,00434
21S3	0,0615	0,506
22S1	-0,0102	0,912
23S1	-0,049	0,596
3S1	0,084	0,368
6S7	0,0664	0,475

CD4CD45RO-	Corr. Co.	P-Value
1S1	0,153	0,0972
2S1	-0,0272	0,769
5S1	0,131	0,158
5S2	-0,139	0,134
5S3	0,0619	0,504
7S1	-0,0737	0,428
8S1/S2	0,0252	0,786
9S1	0,0626	0,499
11S1	-0,307	6,80E-04
12S2	-0,21	0,0216
13S1	-0,129	0,163
13S6	0,0104	0,911
14S1	0,0526	0,57
16S1	-0,122	0,188
17S1	0,103	0,263
18S1	-0,141	0,127
20S1	-0,217	0,0183
21S3	-0,171	0,0628
22S1	0,134	0,147
23S1	-0,125	0,174
3S1	-0,0206	0,826
6S7	0,0572	0,538



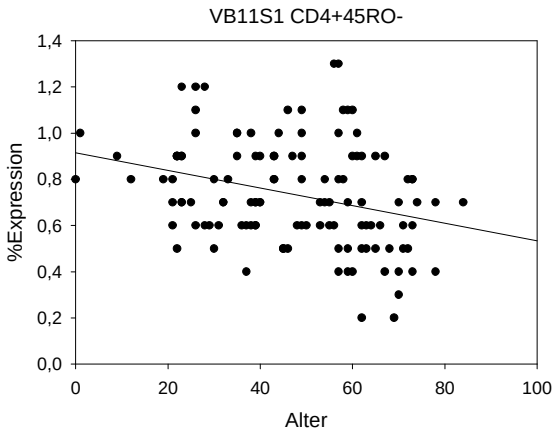
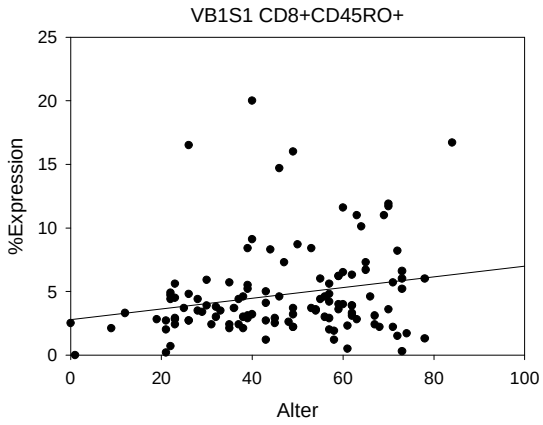


Abb.22: TCR-VB Expression auf CD4CD45RO+ und CD4CD45RO- T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter
Legende s. Abb.20

Aufgeteilt auf die Subtypen bei CD8+ T-Zellen sahen die Expressionen folgendermaßen aus:

CD8CD45RO+	Corr. Co.	P-Value
1S1	0,217	0,0177
2S1	-0,213	0,0199
5S1	-0,0142	0,879
5S2	-0,0914	0,325
5S3	-0,000174	0,999
7S1	-0,0238	0,799
8S1/S2	-0,0148	0,873
9S1	-0,0927	0,316
11S1	-0,0994	0,282
12S2	-0,158	0,0856
13S1	-0,0823	0,374
13S6	-0,0744	0,421
14S1	0,0782	0,388
16S1	-0,03	0,746
17S1	-0,0799	0,388
18S1	0,0273	0,768
20S1	0,133	0,188
21S3	0,0186	0,841
22S1	0,101	0,275
23S1	0,0425	0,647
3S1	0,211	0,0226
6S7	-0,0418	0,653

CD8CD45RO-	Corr. Co.	P-Value
1S1	0,159	0,0835
2S1	0,0203	0,826
5S1	-0,178	0,536
5S2	-0,155	0,215
5S3	-0,0791	0,393
7S1	-0,0565	0,545
8S1/S2	0,027	0,77
9S1	0,0877	0,343
11S1	-0,0648	0,484
12S2	0,147	0,11
13S1	-0,171	0,0635
13S6	-0,306	0,0007
14S1	-0,123	0,182
16S1	-0,0756	0,414
17S1	0,0128	0,89
18S1	-0,158	0,0852
20S1	0,00722	0,938
21S3	-0,251	0,00586
22S1	-0,0287	0,756
23S1	-0,0437	0,637
3S1	0,164	0,0767
6S7	0,0999	0,315



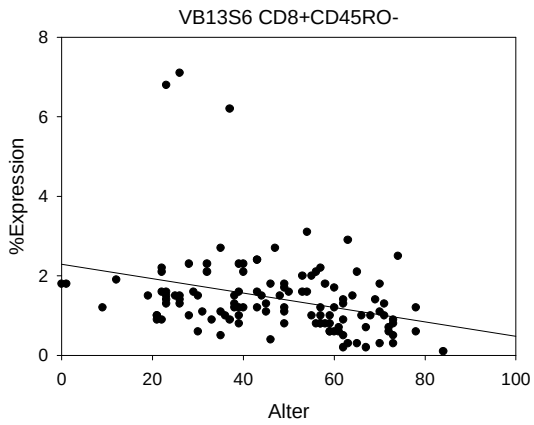


Abb.23: TCR-VB Expression auf CD8CD45RO+ und CD8CD45RO- T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter
Legende s. Abb.20

4.2.1 CD4+ und CD8+ T-Zellen

Die negativen Korrelationen in der Expression der TCR-VB-Ketten VB11.1 und VB13.1 mit dem Alter konnten nur für VB11.1 auch bei der Subpopulation der CD4+ T-Zellen gefunden werden. Die TCR-VB-Ketten VB11.1 und VB13.1 wiesen bei den CD8+ T-Zellen zwar auch noch eine sinkende Expression im Alter auf, waren aber nicht mehr statistisch signifikant. Die negative Korrelation der Gesamtpopulation für VB11.1 und VB13.1 kommen also hauptsächlich durch die Korrelation bei den CD4+ T-Zellen zustande.

4.2.2 CD4+CD45RO+ und CD4+CD45RO- T-Zellen

Man sieht, dass bei CD4+CD45RO+ eine negative Korrelation für TCR VB5.2 zu finden war, nicht aber bei CD4+CD45RO-. Die negative Korrelation für VB11.1 ist sowohl bei CD4+CD45RO+ als auch bei CD4+CD45RO- T-Zellen zu finden, bei CD4+CD45RO+ ist sie jedoch deutlich signifikanter.

4.2.3 CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen

Bei CD8+CD45RO+ T-Zellen zeigte sich keine signifikante Korrelation zwischen TCR-VB-Ketten und Alter. Bei CD8+CD45RO- T-Zellen zeigte sich lediglich bei VB13.6 eine signifikante Korrelation mit dem Alter.

4.3 Abweichung einzelner TCR-VB-Ketten vom Durchschnitt

Wir haben bereits gesehen, dass einzelne VB-Ketten einiger Probanden im Gegensatz zum Durchschnitt sehr hoch exprimiert waren. Wir interessierten uns nun für die Ausprägung der Abweichung. Hierzu wurde die Expression jeder TCR-VB-Kette als X-fache Standardabweichung zur mittleren Expression aller Probanden dargestellt. Dies werteten wir jeweils für die Gesamtpopulation von CD4+, CD8+, und die Subpopulationen von CD4+CD45RO+, CD4+CD45RO-, CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen aus und korrelierten die Werte mit dem Alter.

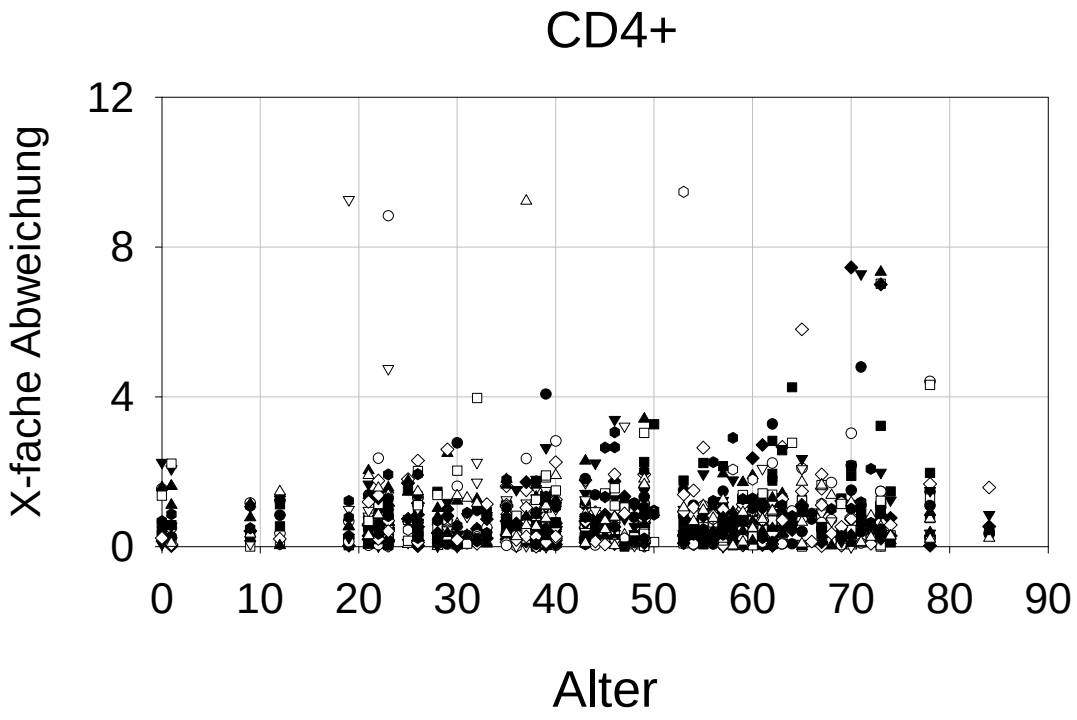


Abb.24: TCR-VB Expression auf CD4+ T-Zellen
Auf der X-Achse ist das Alter der von uns untersuchten Probanden gezeigt. Die Expression jeder TCR-VB-Kette jeder Person wird als X-fache Abweichung oberhalb der Standardabweichung auf der Y-Achse dargestellt.

Insgesamt fanden sich für CD4+ T-Zellen 12 Expansionen, die über der 4-fachen Standardabweichung lagen, wobei neun davon bei Probanden zu finden waren, die älter als 60 Jahre alt waren. Vier Expansionen lagen sogar über der 8-fachen Standardabweichung, dies allerdings altersunabhängig.

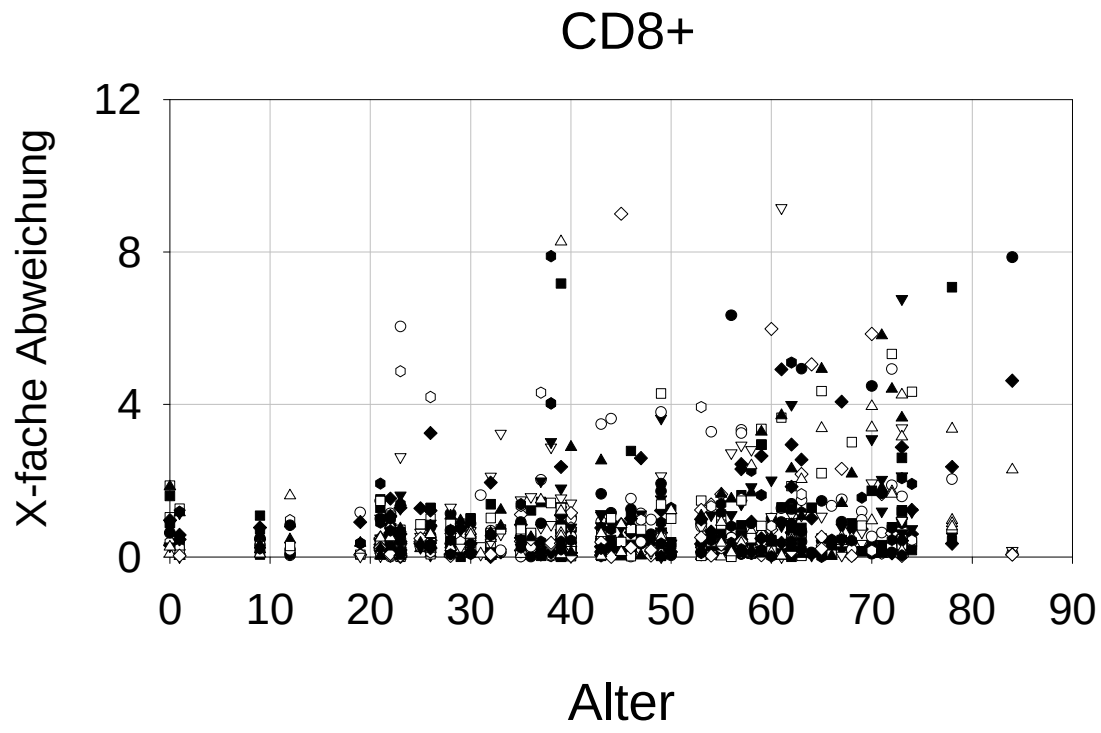


Abb.25: TCR-VB Expression auf CD8+
Legende s. Abb. 24

Für CD8+ T-Zellen fanden wir 30 Expansionen, die über der 4-fachen Standardabweichung lagen. Davon waren 21 bei Probanden zu finden, die älter waren als 60 Jahre. Über der 8-fachen Standardabweichung lagen altersunabhängig 3 TCR-VB-Ketten. Aufgeteilt auf die Subtypen ergaben sich für CD4+CD45RO+ T-Zellen 17 Expansionen über der 4-fachen Standardabweichung und 3 Expansionen über der 8-fachen Standardabweichung. Diese Expansionen waren nicht gehäuft bei älteren Probanden zu finden. Bei CD4+CD45RO- T-Zellen entdeckten wir 11 Expansionen über der 4-fachen Standardabweichung und 5 Expansionen oberhalb der 8-fachen Standardabweichung, jedoch nicht statistische signifikant häufiger bei älteren Probanden.

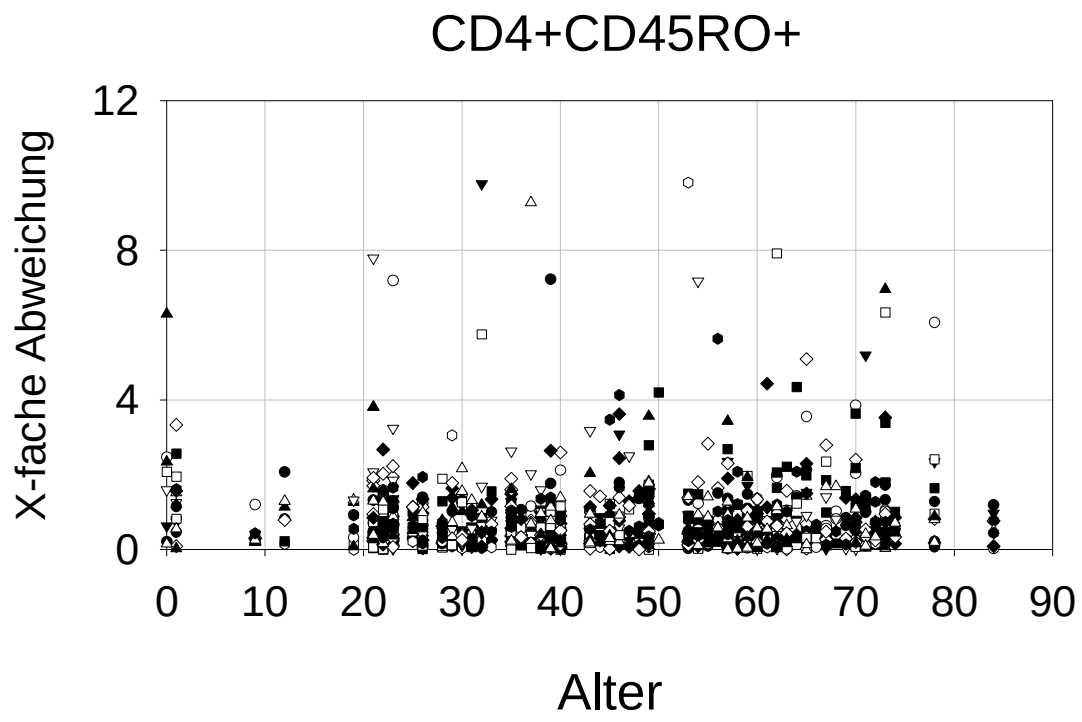


Abb.26: TCR-VB Expression auf CD4+ CD45RO+
Legende s. Abb.24

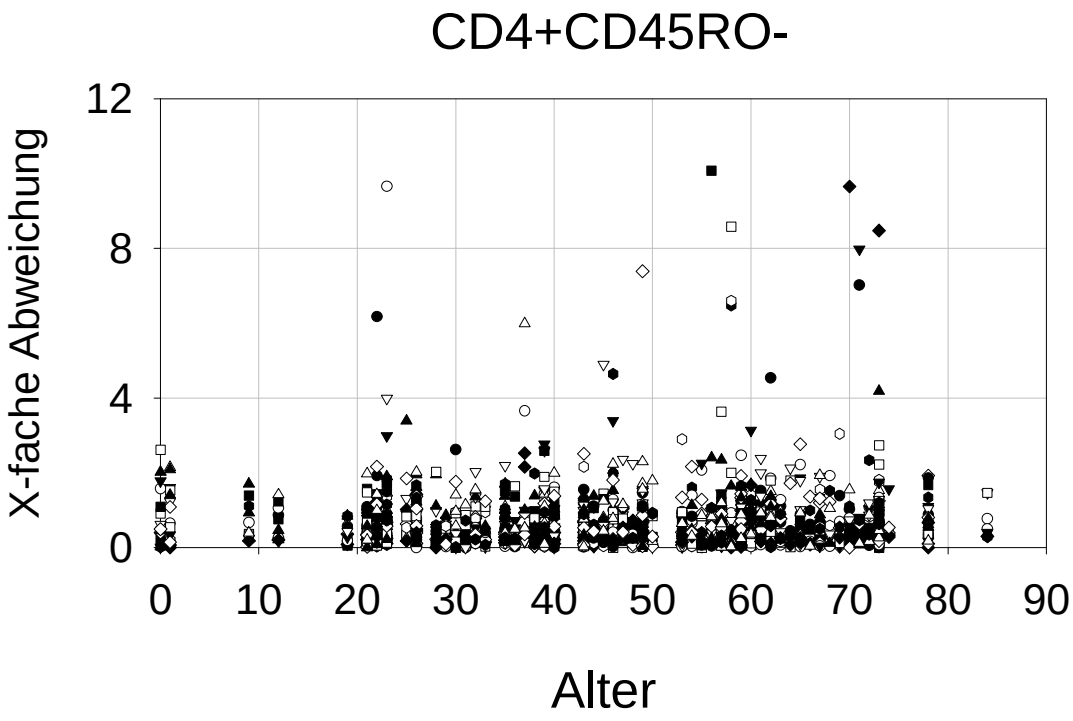


Abb.27: TCR-VB Expression auf CD4+ CD45RO-
Legende s. Abb.24

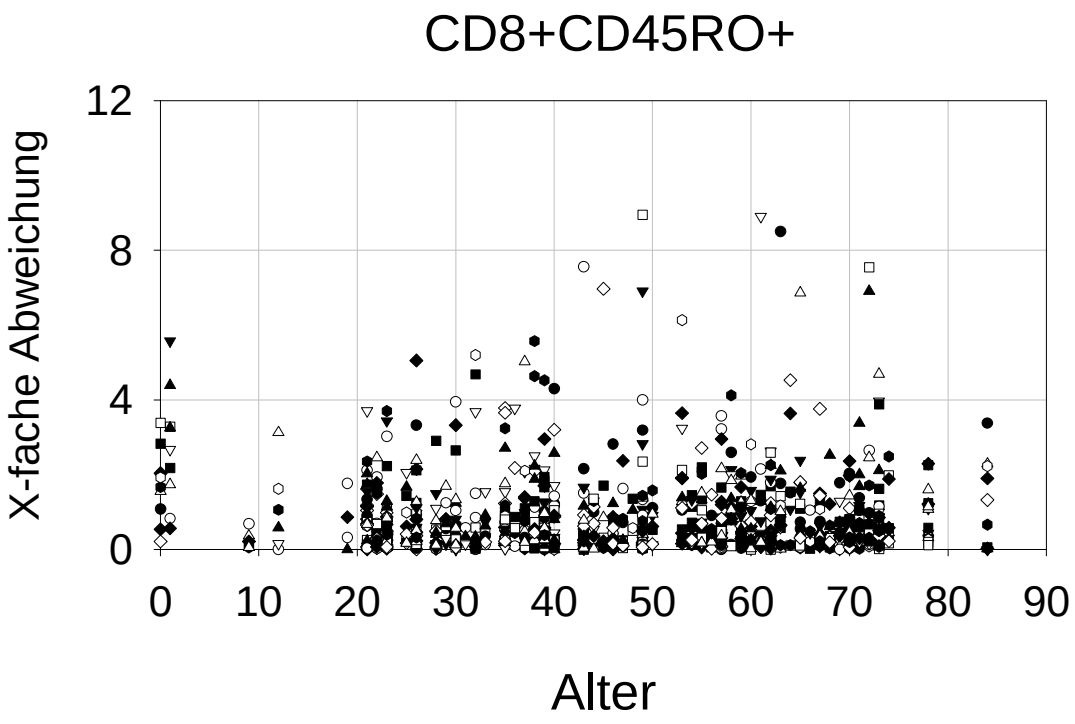


Abb.28: TCR-VB Expression auf CD8+ CD45RO+
Legende s. Abb.24

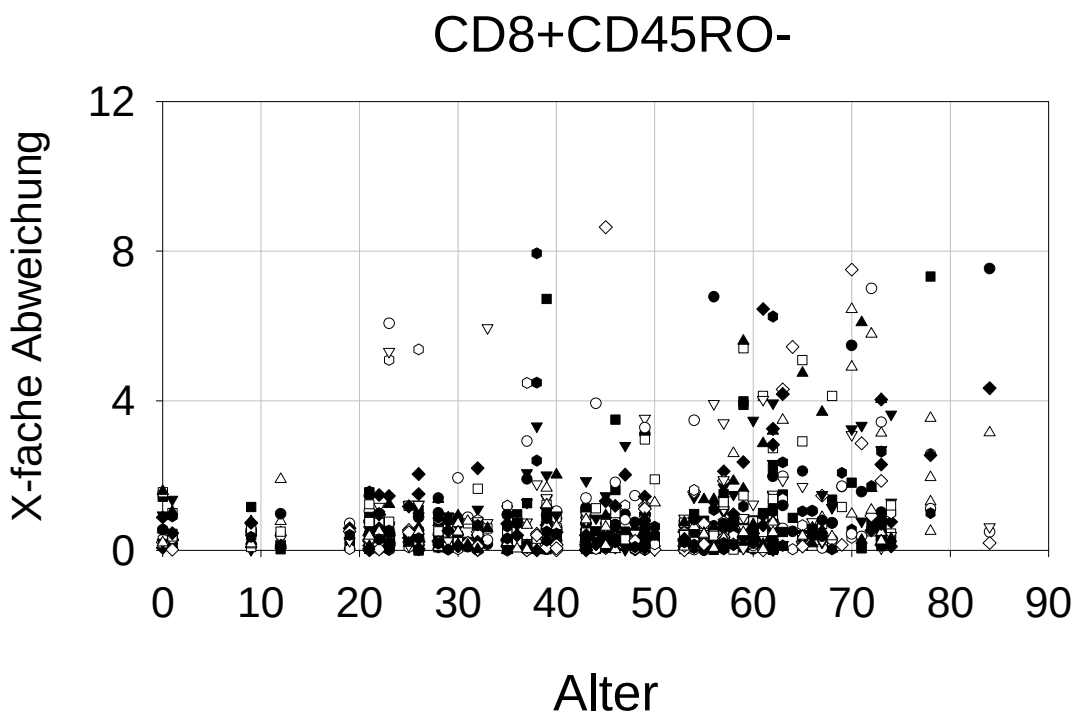


Abb.29: TCR-VB Expression auf CD8+CD45RO-
Legende s. Abb.24

Bei den Subtypen von CD8+ Zellen fanden wir insgesamt deutlich mehr expandierte T-Zellen als bei CD4+ T-Zellen. Die CD8+CD45RO+ T-Zellen zeigten insgesamt 23 Expansionen und die CD8+CD45RO- T-Zellen 35 Expansionen. Bei den CD8+CD45RO- T-Zellen war ein deutlich höheres Vorkommen der Expansionen im Alter zu beobachten, nicht allerdings für CD8+CD45RO+ T-Zellen.

Das Ergebnis der statistischen Korrelationsanaylse mittels des „Pearson Product Moment Correlation“ Test sieht wie folgt aus:

	> 4 fache < 8 Standard-abweichung	**> 8 fache Standard-abweichung**	**Corr. Co.**	**P-Value**
CD4+	12	4	0,157	0,0876
CD8+	30	3	0,314	0,000511
CD4+CD45RO+	17	3	0,0568	0,539
CD4+CD45RO-	11	5	0,137	0,139
CD8+CD45RO+	20	3	-0,0289	0,755
CD8+CD45RO-	34	1	0,283	0,00182

Tab.4: Abhängigkeit der Häufigkeit x-facher Abweichungen von der Standardabweichung und dem Alter des Probanden
In der ersten Spalte sind die Lymphozyten-Subtypen, in der zweiten und dritten Spalte, die Anzahl der VB-Ketten die 4 bzw. 8-fach oberhalb der Standardabweihung exprimiert waren. In der vierten und fünften Spalte sind die Korrelationskoeffizienten und der P-Wert der Korrelatiosnanalyse zwischen Alter und Abweichungen gezeigt. Statistisch signifikante Ergebnisse sind gelb unterlegt.

Insgesamt scheint bei CD4+ T-Zellen und auch bei den CD4+ Subtypen die Häufigkeit von hoch exprimierten TCR-VB-Ketten nicht vom Alter abhängig zu sein. Bei CD8+ T-Zellen zeigt sich dagegen eine Zunahme an hoch exprimierten VB-Ketten mit dem Alter. Aufgeteilt auf die Subtypen lässt sich eine statistische Signifikanz nur noch für CD8+CD45RO- T-Zellen zeigen.

4.4 Einfluss des HLA Haplotyps auf das TCR-VB-Repertoire

Von den 119 Probanden unserer Studie wurde bei 85 Probanden eine HLA Typisierung durchgeführt (für HLA Klasse I von HLA A-B-C und für HLA Klasse II von HLA DR-DQ). Wir untersuchten, ob die HLA Merkmale eines Probanden dessen TCR-VB-Ketten Repertoire beeinflusst. Dafür wurden, mittels des „Mann-Whitney Rank Sum“ Tests alle Probanden einer bestimmten Typisierung mit den Probanden, die nicht diesem Typ entsprachen, verglichen und so für jede einzelne Kette signifikante Unterschiede ermittelt. Diese Analyse führten wir für jene HLA-Allele durch, die sich bei mindestens 20 Probanden fanden. Die HLA-Verteilung der Probanden ist in Tabelle 5 dargestellt:

HLA	Homozygot	Heterozygot	Insgesamt
A1	5	18	23
A2	13	27	40
A3	5	17	22
B44	2	19	21
C3	4	20	24
C7	21	23	44
DQ2	3	23	26
DQ3	6	35	41
DQ5	3	25	28
DQ6	8	31	39
DR4	0	29	29
DR15	2	29	31

Tab.5: Verteilung der HLA Allele in dem untersuchten Kollektiv
In der ersten Spalte ist der HLA-Typ in der Reihenfolge A-B-C-DQ-DR gezeigt, in der zweiten und dritten Spalte, die Anzahl von homozygoten bzw. heterozygoten Trägern des jeweiligen HLA-Typs in unserer Testpopulation und in der vierten Spalte die Gesamtzahl der Merkmalsträger.

Da HLA A-B-C dem HLA Klasse I entspricht, und HLA DR-DQ dem HLA Klasse II, beschränkten wir uns bei der jeweiligen Analyse auf den Einfluss auf CD8+ T-Zellen für HLA A-B-C und den Einfluss auf CD4+ T-Zellen für HLA DR-DQ. Zunächst berechneten wir jeweils die Korrelationen für die Gesamtpopulation von homo- und heterozygoten gegen nicht Allelträger. Für die TCR-VB-Ketten bei denen wir eine statistisch signifikante Korrelation fanden, führten wir zur Kontrolle auch eine Analyse mit dem entsprechenden Subtyp auf CD4+ oder CD8+ T-Zellen durch.

Bei den Kontrollanalysen waren die Ergebnisse sicht statistisch signifikant (Ergebnisse sind nicht gezeigt).

	CD8+ HLA +				CD8+ HLA-				
HLA	V beta	median	25%	75%	V beta	median	25%	75%	P-Value
A2	8S1/S2	4,55	3,55	5,05	8S1/S2	3,2	2,275	4,7	0,002

Tab.6: TCR-VB Expression auf CD8+ T-Zellen in Abhängigkeit von HLA-Klasse I Molekülen
Vergleich aller Probanden eines HLA Genotyps gegen alle Probanden, die nicht diesem Genotyp entsprechen. Gezeigt ist jeweils der Median sowie die 25% und 75% Perzentile der Expression derjenigen TCR-VB-Ketten auf CD8+ T-Zellen, die sich signifikant unterscheiden. Ein P-Wert <0,002 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied bei der Expression der TCR-VB-Ketten auf CD8+ T-Zellen.

	CD4+ HLA+				CD4+ HLA-				
HLA	V beta	median	25%	75%	V beta	median	25%	75%	P-Value
DQ2	5S1	7,55	6,8	8,5	5S1	6,6	6,025	7,2	<0,001
DQ6	7S1	1,4	1,2	1,5	7S1	1,75	1,4	2,2	<0,001
DR15	7S1	1,4	1,1	1,5	7S1	1,7	1,4	2	0,001
	18S1	1,1	0,825	1,375	18S1	1,4	1,2	1,7	<0,001

Tab.7: TCR-VB Expression auf CD4+ T-Zellen in Abhängigkeit vom HLA-Klasse II Molekülen
Legende s. Tab.6.

	CD4+ CD45RO- HLA+				CD4+ CD45RO- HLA-				
HLA	V beta	median	25%	75%	V beta	median	25%	75%	P-Value
DQ2	5S1	7,5	6,9	8,3	5S1	6,3	5,5	7,175	<0,001
	14S1	2,4	2	2,9	14S1	2,7	2,3	3,3	0,0019
	17S1	5,3	4,5	5,9	17S1	5,7	5,2	6,45	0,0019
DQ3	5S1	6,4	5,475	7	5S1	7,3	6,25	8,35	0,001
DQ5	17S1	6,25	5,8	7,1	17S1	5,4	4,8	5,9	<0,001
DR4	13S1	4,6	4,175	4,8	13S1	3,9	3,45	4,35	<0,001
DR15	7S1	1,3	1,1	1,575	7S1	1,7	1,4	2,2	<0,001
	18S1	1,1	0,925	1,575	18S1	1,65	1,4	1,9	<0,001

Tab.8: TCR-VB Expression auf CD4+CD45RO- T-Zellen in Abhängigkeit von HLA-Klasse II Molekülen
Legende s. Tab.6.

Wir überprüften den Einfluss des HLA Haplotyps auf das TCR-VB-Repertoire mit 12 verschiedenen HLA Merkmalen. Sechs Merkmale gehörten zu HLA Klasse I und sechs zu HLA Klasse II. Bei CD8+ T-Zellen fanden wir bei nur einem der sechs untersuchten HLA Merkmale für eine VB-Kette einen signifikanten Unterschied im Gegensatz zu Probanden, die diese Merkmale nicht besaßen. Bei den Subtypen fan-

den wir bei CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen bei keinen der sechs untersuchten HLA Merkmale signifikante Unterschiede in der Expression der TCR-VB-Ketten.

Bei CD4+ T-Zellen fanden wir bei drei der sechs untersuchten HLA Merkmale insgesamt vier mal für drei unterschiedliche VB-Ketten signifikante Unterschiede im Gegensatz zu Probanden, die diese Merkmale nicht besaßen. Bei den Subtypen fanden wir bei CD4+CD45RO+ T-Zellen bei keinen der sechs untersuchten HLA Merkmale einen signifikanten Unterschied. Bei CD4+CD45RO- T-Zellen fanden wir bei fünf der sechs untersuchten HLA Merkmale insgesamt acht mal für sechs unterschiedliche VB-Ketten signifikante Unterschiede.

In einem zweiten Schritt verglichen wir bei den HLA-Molekülen, bei denen wir eine Assoziation fanden, homozygote mit heterozygoten und nicht Allelträger miteinander. Die Analyse wurde mit dem „Kruskal-Wallis-Test“ durchgeführt.

Subtyp	HLA	VB	P-Value
CD8+	A2	8S1/S2	0,01
CD4+	DQ2	5S1	0,001
	DQ6	7S1	0,004
	DR15	7S1	0,002
		18S1	0,002
CD4+CD45RO-	DQ2	5S1	<0,001
		14S1	0,053
		17S1	0,016
	DQ3	5S1	0,004
	DQ5	17S1	0,001
	DR15	7S1	0,001
		18S1	<0,001

Tab.9: Varianzanalyse
Vergleich der TCR-VB-Ketten Expression von Probanden eines HLA Genotyps homozygoter mit Probanden heterozygoter und Probanden mit negativer Ausprägung. Gezeigt ist jeweils der untersuchte Subtyp, das HLA Allel, die VB-Kette und das Ergebnis der Varianzanalyse. Ein P-Wert <0,05 zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied bei der Expression zwischen homozygoten, heterozygoten und nicht Allelträgern.

Mit Ausnahme von VB14.1 auf CD4+CD45RO- T-Zellen war die Ausprägung für alle untersuchten VB-Ketten in der Varianzanalyse zwischen homozygoten, heterozygoten und nicht Allelträgern statistisch signifikant.

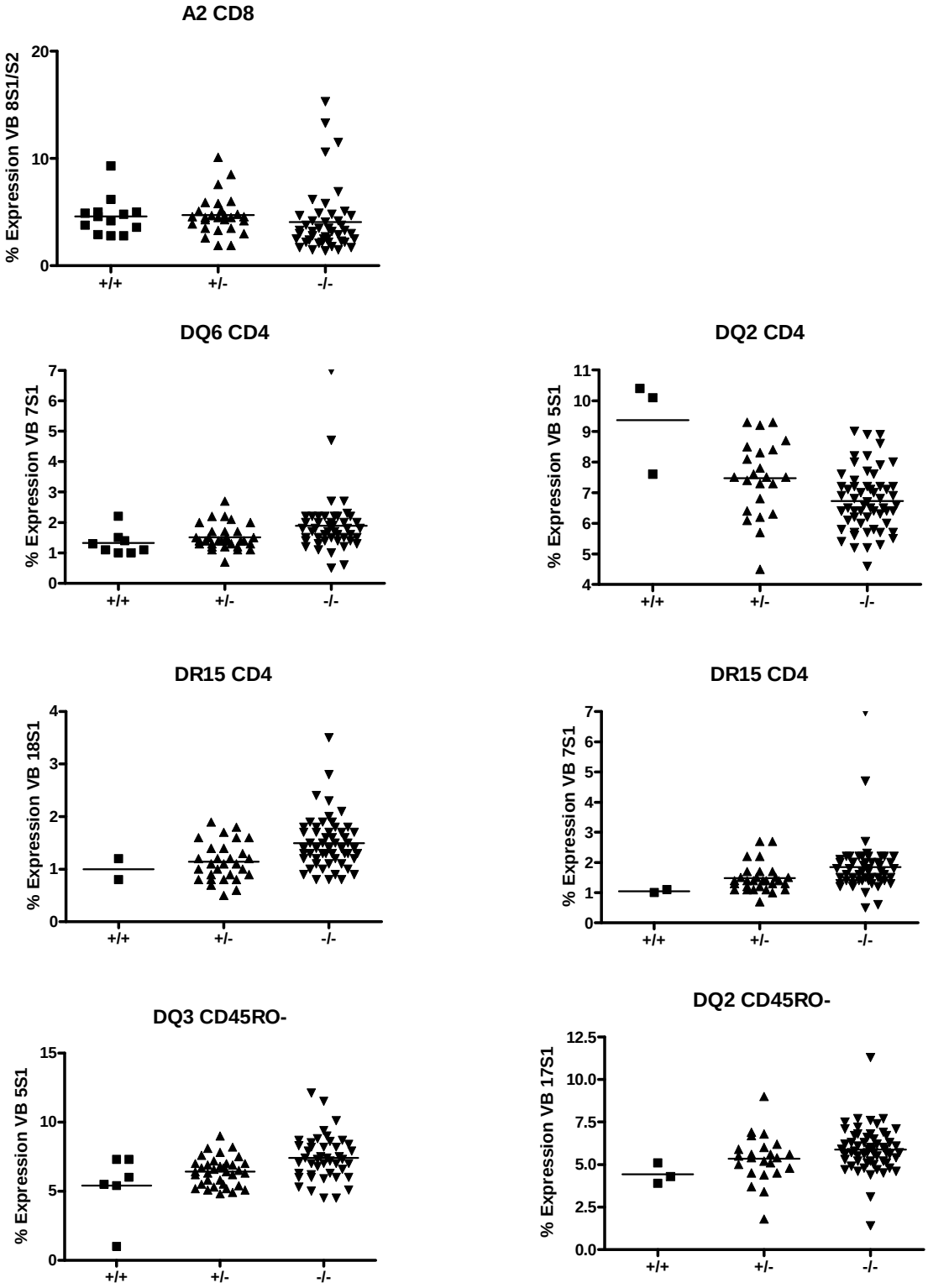


Abb.30: TCR-VB-Ketten Expression bei homozygoten, heterozygoten und nicht Allelträgern
Auf der X-Achse sind TCR-VB-Ketten bei homozygoten (+/+), heterozygoten (+/-) und nicht Allelträgern (-/-) aufgetragen. Auf der Y-Achse sieht man die Expression der TCR-VB-Ketten in Prozent. Gezeigt sind die TCR-VB-Ketten, bei denen die Expression bei homozygoten vs. heterozygoten und nicht Allelträgern eine steigende oder sinkende Expression zeigt.

4.5 Altersabhängigkeit weiterer Lymphozyten Subtypen

Zusätzlich zu den TCR-VB-Ketten haben wir bei den Probanden die Expression folgender Lymphozyten Subtypen untersucht:

Subtyp	Mittelwert	Abweichung	max	min	Corr. Co	P-Wert
CD3+ und CD4+	47,3	8,6	66,7	26,7	0,98	0,314
CD3+ und CD8+	21,8	7,3	47,5	7,1	-0,153	0,115
CD16/56+ und CD3-	11,7	5,2	26,0	3,3	0,52	0,596
CD19	11,3	4,3	32,3	1,8	0,066	0,501
CD3	72,6	7,3	91,9	54,6	-0,109	0,263
αβ	68,2	7,4	88,3	49,5	-0,166	0,85
γδ	3,2	2,5	12,0	0,2	0	0,99
CD45RA- CD45 RO+	29,8	9,8	59,3	7,5	0,571	<0,001
CD45RA+ CD45 RO+	13,7	6,3	39,4	7,0	0,466	<0,001
CD45RA+ CD45 RO-	55,2	12,7	78,1	17,6	-0,686	<0,001

Tab.10: Expression der Lymphozyten Subtypen in Abhängigkeit vom Alter
Gezeigt ist der jeweilige Lymphozyten Subtyp, der Mittelwert, die Abweichung, der höchste (max) und der niedrigste (min) Wert im Kollektiv, der Korrelationskoeffizient und der P-Wert in Abhängigkeit vom Alter. Ein Paar zweier Variablen (Alter + Subtyp) mit einem positiven Korrelationskoeffizient steigen gemeinsam an. Bei einem Paar zweier Variablen mit einem negativen Korrelationskoeffizient steigt eine Variable (Alter) während die andere sinkt (Subtyp).

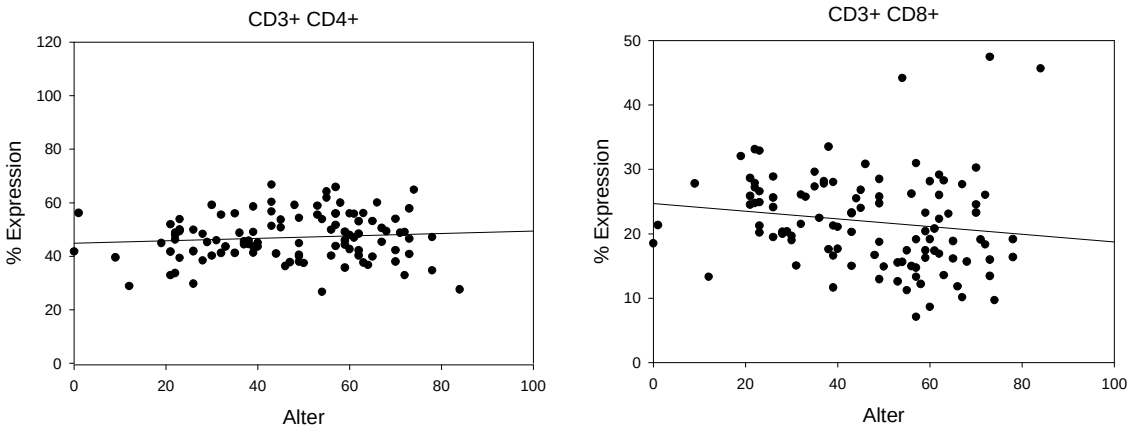


Abb.31: Expression der Lymphozyten Subtypen in Abhängigkeit vom Alter
Die Expression von CD4+ Helferzellen bleibt unabhängig vom Alter stabil, während die Expression von CD8+ Killerzellen sinkt.

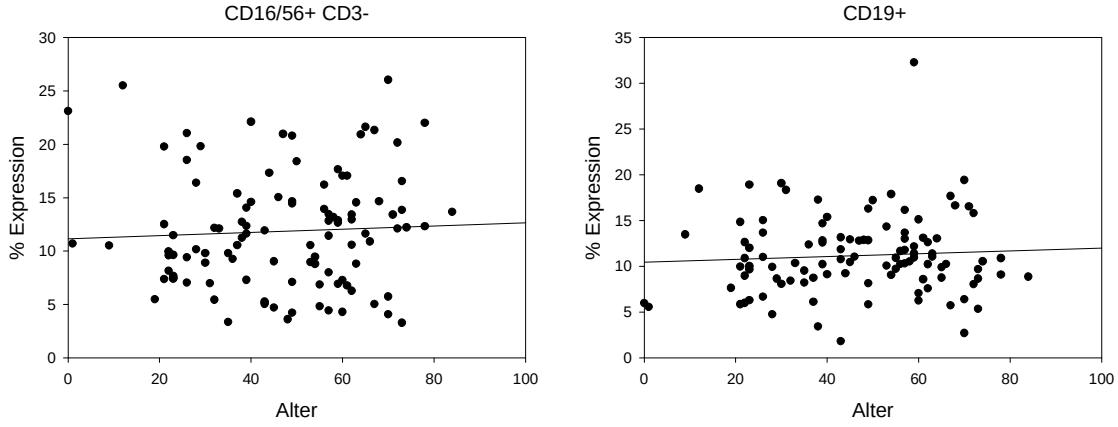


Abb.32: Expression der Lymphozyten Subtypen in Abhängigkeit vom Alter
Die Expression der natürlichen Killerzellen nimmt in Abhängigkeit vom Alter zu. Die Expression von B-Lymphozyten bleibt stabil.

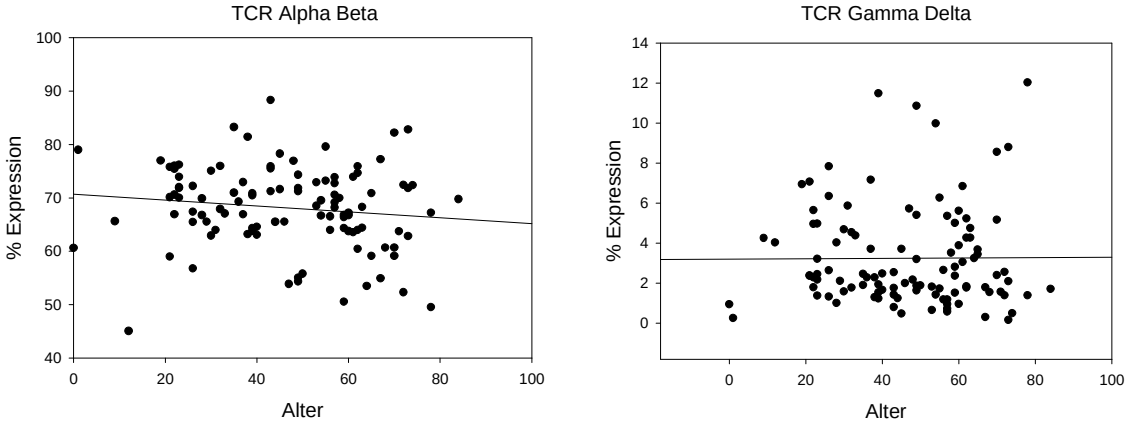


Abb.33: Expression der Lymphozyten Subtypen in Abhängigkeit vom Alter
Die Expression von TCR Alpha Beta nimmt in Abhängigkeit vom Alter etwas ab, die Expression von TCR Gamma Delta bleibt unabhängig vom Alter stabil.

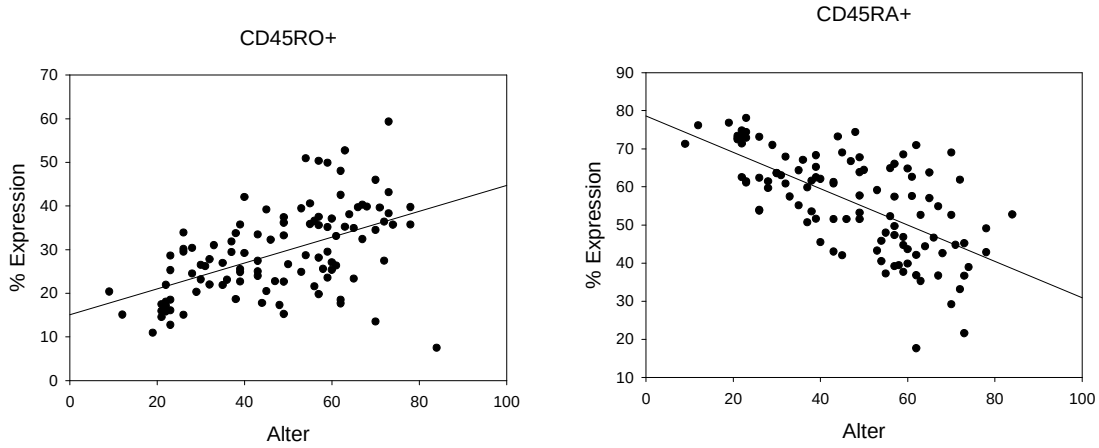


Abb.34: Expression der Lymphozyten Subtypen in Abhängigkeit vom Alter
Die Expression von CD45RO+ memory T-Zellen nimmt in Abhängigkeit vom Alter zu, die Expression von CD45RA+ naiven T-Zellen verringert sich in Abhängigkeit vom Alter.

5. Diskussion

Diese Arbeit befasste sich mit der Lymphozytenverteilung und der TCR-VB-Ketten Expression auf den verschiedenen T-Zell-Subpopulationen bei gesunden Probanden. Wir wollten mit dieser Studie drei Fragen bearbeiten:

1. Wie ist die Normalverteilung des TCR-VB-Repertoires im Blut bei gesunden Kontrollpersonen?

2. Hat das Alter einen signifikanten Einfluss auf die Lymphozytenverteilung und das TCR-VB-Repertoire?

3. Hat der HLA-Haplotyp einen signifikanten Einfluss auf das TCR-VB-Repertoire?

Hierzu wurden vergleichende flusszytometrische Untersuchungen der Immunzellen im peripheren Blut von gesunden Probanden durchgeführt. Viele Studien haben sich mit dem TCR-VB-Repertoire in verschiedenen Krankheitsstadien und bei hoher T-Zellaktivität beschäftigt, wie z.B. bei Autoimmunerkrankungen (24, 37, 60), bei Transplantationen (14, 20, 22) und Immunität gegen mikrobiologische und Tumorantigene (78). Nur wenige Studien beschäftigten sich mit dem TCR-VB-Repertoire bei gesunden Individuen. Die meisten Studien benutzten zur Bestimmung des TCR-Repertoires die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (19, 24, 62, 85, 90). Nur in wenigen Studien wurde die Durchflusszytometrie zur Analyse des TCR-VB Repertoires mit monoklonalen Antikörpern verwendet (5, 27, 30, 80), obwohl diese Methode verschiedene Vorteile bietet. Vor allem kann man durch diese Methode TCR-VB-Ketten mit anderen Markern kombinieren und so die Expression der TCR-VB-Ketten auf verschiedenen T-Zellsubpopulationen untersuchen.

5.1 Normalverteilung des TCR-VB-Repertoires bei gesunden Kontrollpersonen

Um die Veränderungen im TCR-VB-Repertoire bei entzündlichen, Autoimmun-, oder Tumorerkrankungen untersuchen zu können, muss man die Normalverteilung des TCR-VB-Repertoires bei gesunden Probanden kennen. Die Studien, die sich bisher

mit T-Zell-vermittelten Autoimmunreaktionen beschäftigten (16, 24, 60), waren aufgrund fehlender Referenzwerte von gesunden Probanden unvollständig. Nur wenige Studien befassten sich bisher mit der Normalverteilung des TCR-VB-Repertoires bei gesunden Probanden mittels der Methode der Durchflusszytometrie (9, 48, 91). In keiner dieser Studien wurde eine umfassende Analyse des TCR-VB-Repertoires auf CD45RO+ und CD45RO- T-Zellen durchgeführt.

Unsere Analysen zeigen, dass die Expression der einzelnen VB-Ketten sehr unterschiedlich ist. Die niedrigste Expression fanden wir bei den Ketten VB11.1 und VB23.1 mit einem Mittelwert von <1%. Die höchste Expression fanden wir für die Ketten VB2.1 mit einem Mittelwert von 8,6%, VB5.1 mit 5,8%, VB9.1 mit 5% und VB17.1 mit 5,6%. Die Standardabweichung der Durchschnittswerte bei unseren 119 Probanden ist insgesamt bei den meisten Ketten relativ niedrig. Unsere Probanden hatten somit im Vergleich untereinander ein sehr ähnliches TCR-VB-Repertoire. Diese Ähnlichkeit im TCR-VB-Repertoire unter den Probanden und die damit wiederholt vorkommende prozentual hohe bzw. niedrige Expression bestimmter VB-Ketten, deutet daraufhin, dass neben dem Einfluss von Umweltfaktoren, wie z.B. durchgemachte Infektion und genetischen Faktoren wie z.B. der HLA Haplotyp, weitere, noch weitestgehend unbekannte Faktoren bei der Entstehung des TCR-VB-Repertoires eine Rolle spielen müssen. Verschiedene Einflussfaktoren wurden in der Literatur bereits diskutiert, z.B. dass bestimmte VB-Gene beim TCR-Rearrangement im Thymus „verfügbarer“ sind als andere und deswegen die entsprechenden TCR-VB-Ketten in der Peripherie häufiger exprimiert werden (9). Studien an Mäusen (96) und eine kürzlich erschienene Studie am Menschen (50) haben gezeigt, dass die bessere Verfügbarkeit nicht mit der Lage auf dem Chromosom zusammenhängt. Auch die Idee, dass bestimmte β-Ketten leichter eine Paarung mit α-Ketten zum Prä-TCR eingehen können, wurde in einer Studie an Mäusen widerlegt (96). Die RSS (recombination signal sequences) Region auf den VB-Genen scheint dagegen eine Rolle zu spielen. Eine Studie konnte zeigen, dass eine Mutation auf dem V-Gen für VB3 einen signifikanten Einfluss auf die Expression von TCR-VB3 in der Peripherie hat (81).

Die von uns erhobenen Durchschnittswerte entsprechen weitestgehend den bisher in der Literatur veröffentlichten Werten (9, 48, 91) mit Ausnahme von VB9.1 und VB13.1, die in zwei anderen Studien (48, 91) im Durchschnitt über 1% niedriger (VB9.1) bzw. höher (VB13.1) gemessen wurden. Da unsere Fallzahl (n=119) mehr als doppelt so hoch war, als die in der Studie mit der bisher höchsten Fallzahl (n=47) (48) gehen wir davon aus, dass sich die Mittelwerte dieser VB-Ketten bei einer Erhöhung der Fallzahl unseren Werten angeglichen hätten.

Man kann demnach bei gesunden Kontrollperson davon ausgehen, dass ihr TCR-VB-Repertoire den bei uns beschriebenen Werten entspricht und somit die von uns erhobenen Daten als Referenzwerte nutzen, um mögliche Veränderungen bei entzündlichen oder Autoimmunerkrankungen zu untersuchen und weiterhin zur Verlaufskontrolle der T-Zell-Populationen bei Therapien (10, 92).

Beim Vergleich der TCR-VB-Ketten Expression zwischen CD4+ und CD8+ T-Zellen, ergaben sich drei Hauptergebnisse: Bei sämtlichen untersuchten TCR-VB-Ketten gab es einen signifikanten Unterschied, außer bei VB3.1, VB5.3, VB16.1 und VB17.1. Die meisten Ketten sind prozentual stärker auf CD4+ T-Zellen exprimiert. Durch ein höheres Vorkommen von expandierten Ketten ist die Streubreite bei den CD8+ T-Zellen höher als bei den CD4+ T-Zellen. Dies deckt sich mit den in der Literatur bekannten Ergebnissen (9, 48, 91). Eine Studie, die sich mit dem TCR-Repertoire in einer gesunden sardinischen Population befasste (9) fand eine signifikant höhere Expression von VB3.1 auf CD8+ T-Zellen. Dieses Ergebnis zeigte sich aber weder bei uns noch in anderen Studien und hängt wahrscheinlich mit einer klonalen Anreicherung in der untersuchten Stichprobe zusammen, die bei der geringen Stichprobengröße (n=30) stark ins Gewicht fiel.

Die Unterschiede in der Expression einzelner TCR-VB-Ketten bei CD4+ und CD8+ T-Zellen auf den Subtypen CD45R0+ und CD45RO- wurden bisher noch nicht untersucht. Bei 11 der 22 untersuchten Ketten gibt es signifikante Unterschiede zwischen CD4+CD45RO+ und CD4+CD45RO- T-Zellen, wobei 8 VB-Ketten signifikant höher auf den CD45RO+ T-Zellen exprimiert waren. Beim Vergleich der VB-

Ketten bei den Subtypen CD8+CD45RO+ und CD8+CD45RO- T-Zellen finden wir 7 signifikante Unterschiede. 4 Ketten sind höher auf CD8+CD45RO+ Zellen exprimiert. Besonders deutlich ist dieser Unterschied für die Kette VB9.1 mit einem Unterschied von jeweils ca. 5%. Diese Unterschiede in der Verteilung sind am ehesten durch Veränderungen des TCR-Repertoires nach durchgemachten Infektion im Laufe des Lebens zu erklären (s. 4.2).

5.2 Einfluss des Alters auf Lymphozyten und das TCR-VB-Repertoire

Der Einfluss des Alters auf die Expression von Lymphozyten Subtypen wurde bereits in mehreren Studien untersucht (8, 21, 49, 77). Eine Studie befasste sich auch mit dem Einfluss der Rasse auf die Expression von Lymphozyten (15). Dabei war die prozentuale Expression von CD3+, CD4+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen für indische, malaysische und chinesische Probanden signifikant unterschiedlich. Abgesehen von dieser Studie, stimmten die Ergebnisse unserer Studie für die durchschnittliche prozentuale Expression von CD3+ T-Zellen, CD4+ T-Helferzellen, CD8+ T-Killerzellen, CD19+ B-Zellen und CD16/56+ Natürliche Killerzellen mit den Ergebnissen in der Literatur überein (8, 21, 49, 77).

In unserer Studie war die Expression von T-Zellen insgesamt in den verschiedenen Altersstufen relativ stabil. Die Expression der CD3+ T-Zellen sank im Alter etwas, was aber nicht statistisch signifikant war. Die Expression von CD4+ T-Helferzellen war stabil und die der CD8+ T-Killerzellen sank im Alter etwas ab. Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen, in der Literatur bisher bekannten Ergebnissen überein (8, 21, 49). Bisher sind nur wenige Faktoren bekannt, welche zu einer sinkenden Expression von CD8+ T-Zellen führen. In einer Studie, die mit T-Zellen von Mäusen durchgeführt wurde (57), wurde die Rolle von aktivierten CD4+CD25+ T-Zellen in der Inhibition von CD8+CD45RO+ memory T-Zellen durch IL-2 (63, 67, 75, 84, 88) beschrieben. Da wir in unserer Studie keine Differenzierung für den Aktivierungsmarker CD25+ durchführten, konnten wir nicht feststellen, ob CD4+CD25+ und CD8+CD45RO+ Zellen in einem reziproken Verhältnis zueinander stehen und damit evtl. einen Teil der sinkenden Expression erklärt.

Die Expression einzelner TCR-VB-Ketten war in den verschiedenen Alterstufen ebenfalls relativ stabil, wobei die Anzahl der expandierten Ketten bei älteren Probanden zunahm. In den bisher zu diesem Thema durchgeführten Studien wurde bereits auf Besonderheiten im TCR-VB-Repertoire bei älteren Probanden hingewiesen (9, 26, 69, 91). Dabei ist bekannt, dass klonale Anreicherungen von CD8+ T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Personen, vor allem bei Älteren vorkommen. Eine Korrelationsanalyse der TCR-VB-Ketten Expression in Abhängigkeit vom Alter wurde bisher nur bei einer Studie durchgeführt (9), jedoch noch nicht für einzelne T-Zell-Subtypen und auch nicht für einzelne VB-Ketten. Bei der Untersuchung der Assoziationen zwischen dem Alter der Kontrollpersonen und dem TCR-VB-Repertoire fanden wir eine Zunahme in der Häufigkeit von hoch exprimierten VB-Ketten sowohl bei CD4+ als auch bei CD8+ T-Zellen. Statistisch signifikant war das Ergebnis aber nur für die CD8+ T-Zellen. Bei der Subtypenanalyse zeigte sich eine Zunahme im Alter nur noch bei CD8+CD45RO- T-Zellen. Die Anzahl an expandierten Ketten war bei den CD45RO+ Zellen bereits ab dem Alter von 20 Jahren häufig vorhanden. Da unsere Probanden nicht an akuten Infektionen erkrankt waren oder an chronischen Erkrankungen litten, gehen wir davon aus, dass es sich hierbei um klonale Expansion von T-Zellen handelt, die im Laufe des Lebens aufgrund von Infektionen entstanden sind.

Bei den expandierten CD8+CD45RO- T-Zellen bei älteren Probanden handelt es sich höchst wahrscheinlich um Effektor T-Zellen bei denen sich der Subtyp CD45RO zu CD45RA zurückbildet und die Expression von CD28 verloren geht (42). Diese Zellen entstehen vermutlich durch Virusantigene, wie z.B. dem Zytomegalievirus (CMV), die auch nach überstandener Infektion im Körper persistieren (4, 56, 94). Limitierend war es uns leider nicht möglich, die Probanden, bei denen wir expandierte CD8+CD45RO- T-Zellen fanden, serologisch auf das Vorkommen von virusspezifischen Antikörpern zu testen. Weiterhin führten wir keine weitere Differenzierung dieser T-Zellen für CD28 durch.

Insgesamt war die prozentuale Expression von CD45RO+ T-Zellen im Alter statistisch signifikant höher als bei jungen Probanden und die Expression von CD45RA+

T-Zellen im Alter statistisch signifikant niedriger. Auch diese Ergebnisse stimmen mit denen in der Literatur bekannten überein und erklären sich durch die Veränderungen bei der T-Zellaktivierung durch Antigenkontakt bei der Umwandlung von naiven CD4+ und CD8+ T-Zellen in memory T-Zellen (8, 21, 86, 97).

Bei der Korrelationsanalyse der TCR-VB-Ketten Expression in Abhängigkeit vom Alter fanden wir für die globale TCR-VB-Ketten Expression nur eine leichte Senkung in Abhängigkeit vom Alter. Insgesamt bleibt die T-Zell-Rezeptorexpression, passend zu dem Ergebnis der CD3+ Expression, im Laufe des Lebens stabil. Bei der Korrelationsanalyse für jede einzelne der von uns untersuchten 22 VB-Ketten in Abhängigkeit vom Alter fanden wir nur bei VB5.2, VB11.1, VB 13.1 und VB13.6 eine statistisch signifikante niedrigere Expression im Alter. Manche VB-Ketten wurden in Korrelation zum Alter höher exprimiert, jedoch bei keiner Kette in einem statistisch signifikanten Ausmaß.

Die hoch signifikante Korrelation für VB11.1 bei CD4+CD45RO+ konnte durch die starke Expansion einer Kette erklärt werden, die wir im Blut eines Neugeborenen finden konnten und ist somit nicht einer allgemeinen Senkung der Expression im Alter geschuldet. Dennoch ließ sich dieser Verlauf auch für CD4+CD45RO- Zellen finden. Die statistische Signifikanz der negativen Korrelation für CD8+CD45RO-VB13.6 wurde durch das Vorkommen von expandierten Ketten bei drei Probanden verursacht, die jünger als 40 Jahre alt waren.

Die prozentuale Expression von CD19+ B-Zellen war nicht statistisch signifikant mit dem Alter korreliert. Dies deckt sich mit den, in der Literatur bisher beschrieben Ergebnissen, dass zwar die Produktion von B-Zellen im Knochenmark im Alter nachlässt, die Zahl der B-Zellen in der Peripherie aber im Laufe des Lebens konstant bleibt (41, 70, 83, 100). In einer Studie, in die mehrere gesunde über 100 jährige Probanden eingeschlossen wurden, konnte aber ein statisch signifikanter Rückgang der B-Zellen im hohen Alter gezeigt werden (77). Da unsere älteste Probandin „nur“ 84 Jahre alt war, konnte dieser Verlauf in unserer Stichprobe nicht gezeigt werden.

Die Expression CD16/56+ CD3- natürlicher Killerzellen nahm in Abhängigkeit vom Alter zu, war aber nicht statistisch signifikant. Höhere Expressionen ergaben sich vor allem bei Probanden, die über 50 Jahre alt war. Dieses Ergebnis deckt sich mit bereits bekannten Ergebnissen in der Literatur (8, 86). In der bereits genannten Studie, in die mehrere gesunde über 100 jährige Probanden eingeschlossen wurden, war der Anstieg der Expression von NK-Zellen im Alter sogar statistisch signifikant (77). Eventuell ist dieser Anstieg ein Versuch des Immunsystems, die erniedrigte Zahl von B- und T-Lymyphozyten zu kompensieren.

5.3 Einfluss von HLA auf das TCR-VB-Repertoire

Im zweiten Teil dieser Arbeit befassten wir uns mit der Abhängigkeit des TCR-VB-Repertoires vom HLA-Haplotyp von gesunden Probanden. Bei der T-Zellreifung finden im Thymus die positive und negative Selektion von T-Zellen statt, bei der HLA jeweils eine entscheidende Rolle spielt. Bei der positiven Selektion überleben die T-Zellen, die mit ihrem Prä-TCR HLA Klasse I oder HLA Klasse II erkennen. In der negativen Selektion findet eine Auswahl derjenigen T-Zellen statt, die fälschlicherweise körpereigene Antigene erkennen, die am HLA des Menschen gebunden und den T-Zellen präsentiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass der Haplotyp von HLA Klasse I und HLA Klasse II einen wesentlichen Einfluss auf das entstehende T-Zell-Repertoire hat. Es gibt bereits einige Studien, die den Zusammenhang der Anzahl von alloreaktiven T-Zellen bei Gesunden und Transplantierten im Zusammenhang mit dem vorhanden HLA Haplotyp beschreiben (11, 29, 35, 36, 54, 61, 72, 79, 99). Einige Studien untersuchten bereits die quantitative Expression von verschiedenen TCR-VB-Ketten innerhalb von Familien, in denen es Geschwister gab, bei denen bestimmte HLA Merkmale in homozygoter bzw. heterozygoter Ausprägung oder gar nicht vorhanden waren (2, 28, 68). Es wurde gezeigt, dass sich das TCR-VB-Repertoire bei Familienmitgliedern mit homozygoten HLA Merkmalen weniger unterscheidet, als bei Familienmitgliedern mit heterozygoten HLA Merkmalen. In anderen Studien, in denen ebenfalls das TCR-VB-Repertoire von Probanden mit homozygoten, heterozygoten und anderen HLA Merkmalen untersucht wurde, konnten zwar ebenfalls Unterschiede gezeigt werden, die jedoch nicht von statisti-

scher Signifikanz waren (23, 50). In keiner dieser Studien wurde der Einfluss einzelner HLA Merkmale auf einzelne TCR-VB-Ketten herausgearbeitet.

Wir haben bereits beschrieben, dass sich bei unseren Probanden im Vergleich untereinander ein sehr ähnliches TCR-Repertoire zeigte. Dies lässt darauf schließen, dass der Einfluss von HLA auf das entstehende TCR-VB-Repertoire insgesamt geringer ist, als der Einfluss von Faktoren in der Keimbahn, die beim TCR-Rearrangement eine Rolle spielen. Unsere Ergebnisse unterstützen diese Annahme. Dies bedeutet, dass das TCR-VB-Repertoire weitestgehend unabhängig von den HLA Merkmalen eines gesunden Individuums entsteht.

Insgesamt fanden wir für sechs untersuchte HLA-Klasse I Merkmale auf CD8+ T-Zellen nur für HLA A2 auf VB8S1/S2 einen signifikanten Unterschied gegenüber Probanden, die dieses Merkmal nicht besaßen. Dieser Unterschied zeigte sich auch in der Varianzanalyse, bei der wir HLA A2 homozygote, heterozygote und nicht Allelträger miteinander verglichen. Gehen wir davon aus, dass das untersuchte HLA Merkmal für die gefundenen Unterschiede verantwortlich ist, kann man einen sog. „Gen-Dosiseffekt“, also eine aufsteigende oder absteigende Expression der TCR-VB-Kette, von nicht Allelträgern gegenüber heterozygoten zu homozygoten Allelträgern erwarten. Hier zeigte sich in aufsteigender Reihenfolge eine stärkere Expression von VB8S1/S2 von nicht Allelträgern gegenüber heterozygoten zu homozygoten Allelträgern, was auf einen Gen-Dosiseffekt schließen lässt.

Bei sechs untersuchten HLA Klasse II Merkmalen auf CD4+ T-Zellen fanden wir, dass das Vorhandensein von HLA DQ2 zu einem signifikanten Unterschied in der Expression von VB5S1 führt. Weitere Einflüsse wiesen wir für HLA DQ6 bei VB7S1 und DR15 bei VB7S1 und VB18S1 nach. Bei der Subanalyse von CD4+CD45RO- T-Zellen konnten noch zusätzlich signifikante Unterschiede bei HLA DQ2 für VB14S1 und 17S1, Bei HLA DQ3 für VB5S1, bei HLA DQ5 für VB17S1 und bei HLA DR4 für VB13S1. Für alle HLA Merkmale, außer für DQ2 für VB14S1 und DQ5 für VB17S1 konnte in der Varianzanalyse ein Gen-Dosiseffekt gezeigt werden.

Auch wenn bisher in keiner Studie, die versuchte, den Einfluss von HLA auf das TCR-VB-Repertoire zu untersuchen, eine größere Stichprobe (n=85) zur Verfügung stand als in unserer, muss man anmerken, dass wir in der Varianzanalyse in der Gruppe der homozygoten Allelträger nur kleine Gruppen mit wenigstens 2 und höchstens 13 Probanden untersuchten. Es ist nicht auszuschließen, dass manche Ergebnisse bei einer größeren Stichprobe nicht mehr statistisch signifikant wären. Weitere Studien mit größeren Stichproben wären für die Untermauerung dieser Ergebnisse notwendig.

6. Literatur

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J.
   Molecular Biology of the Cell.
   3. Aufl. New York (Garland Publishing) 1994.

2. Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Pergolizzi R, Bigler RD, Silver J.
   Influence Influence of HLA genes on T cell receptor V segment frequencies and expression levels in peripheral blood lymphocytes.
   J Immunol. 1993 Apr 1;150(7):2761-73.

3. Azuma M, Cayabyab M, Buck D, Phillips J H, Lanier LL.
   CD28 interaction with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes.
   J Exp Med. 1992 Feb 1;175(2):353-60.

4. Batliwalla F, Monteiro J, Serano D, Gregersen PK.
   Oligoclonality of CD8+ T cells in health and disease: aging, infection, or immune regulation?
   Hum Immunol. 1996 Jun-Jul;48(1-2):68-76.

5. Bennet JD, Brown WR, Kotzin BL.
   Regional variation in the lamina propria T cell receptor V beta repertoire in normal human colon.
   Clin Immunol. 1999 Jan;90(1):38-46.

6. Bentley GA, Mariuzza RA.
   The structure of the T cell antigen receptor.
   Annu Rev Immunol. 14 1996;14:563-90.

7. Beverly P.
Immunological memory in T Cells.
Curr Opin Immunol. 1991 Jun;3(3):355-60.

8. Bisset LR, Lung TL, Kaelin M, Ludwig E, Dubs RW.
Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland.
Eur J Haematol. 2004 Mar;72(3):203-12.

9. Bonfigli S, Grazia Doro M, Fozza C, Derudas D, Dore F, Longinotti M.
T-cell receptor repertoire in healthy Sardinian subjects.
Hum Immunol. 2003 Jul;64(7):689-95.

10. Brinkman K, Van Dongen JJM, Van Lom K, Groenveld K, Misere JF, Van der Heul C.
Induction of clinical remission in T-large granular lypmhpcyte leukemia with cyclsporin A, monitored by use of immunophenotyping with Vbeta antibodies.
Leukemia. 1998 Feb;12(2):150-4.

11. Bryan DJ, Pinto CE, Fuller TC.
Direct estimation of the frequency of human cytotoxic T lymphocytes and their precursors following in vitro allosensitization.
Hum Immunol. 1983 Jan;6(1):31-44.

12. Byth KF, Conroy LA, Howlett S, Smith AJ, May J, Alexander DR, Holmes N.
CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation.
J Exp Med. 1996;183:1707.

13. Cale CM, Klein NJ, Novelli V, Veys P, Jones AM, Morgan G.
Severe combined immunodeficiency with abnormalities in expression of the common leucocyte antigen, CD45.
Arch Dis Child. 1997 Feb;76(2):163-4.

14. Chen W, Thoburn C, Hess AD.
Characterization of the pathogenic autoreactive T cells in cyclosporine-induced syngenic graft-versus-host disease.
J immunol. 1998 Dec 15;161(12):7040-6.

15. Chng WJ, Tan GB, Kuperan P.
Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies.
Clin Diagn Lab Immunol. 2004 Jan;11(1):168-73.

16. Cossariza A, Barbierl D, Londel M.
T cell repertoire usage in humans, from newborns to centenarians.
Int Rev Immunol. 1995;12(1):41-55.

17. Davis MM, Bjorkmam PJ.
T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.
Nature. 1988 Aug 4;334(6181):395-402.

18. Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday, AC.
T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice.
Immunity. 1994 May;1(2):83-93.

19. Falta M, Magin GK, Allegretta M, Steinman L, Atkinson MA, Brostoff SW, Albertini RJ.
Selection of hprt mutant T cells as surrogats for dividing cells reveals as restricted T cell repertoire in insulin dependent diabetes mellitus.
Clin. Immunol. 1999 Mar;90(3):340-51.

20. Frieman TM, Gilbert M, Briggs C, Korngold R.
Repertoire analysis of CD8+ T cell responses to minor histocompatibility antigenes involved in graft-versus-host disease.
J Immunol. 1998 Jul 1;161(1):41-8.

21. Gabriel H, Schmitt B, Kindermann W.
Age-related increase of CD45RO+ lymphocytes in physically active adults.
Eur J Immunol. 1993 Oct;23(10):2704-6.

22. Gaschet J, Denis C, Milpied N, Hallet MM, Romagne F, Neckar A, et al.
Alterations of T cell repertoire after bone marrow transplantation: characterization of over represented subsets.
Bone marrow Transplant. 1995 Sep;16(3):427-35.

23. Genevée C, Farace F, Chung V, Diu A, Raffoux C, Charron D, Hercend T, Triebel F.
Influence of human leukocyte antigen genes on TCR V gene segment frequencies.
Int Immunol. 1994 Oct;6(10):1497-504.

24. Gold DP.
TCR V gene usage in autoimmunity.
Curr Opin Immunol 1994;6:907-912.

25. Gran B, Gestri D, Sottini A, Quiros Roldan E, Bettinardi A, Signorini S, Primi D, Ballerini C, Taiuti R, Amaducci L, Massacesi L.
Detection of skewed T-cell receptor V-beta gene usage in the peripheral blood of patients with multiple sclerosis.
J Neuroimmunol. 1998 May 1;85(1):22-32.

26. Grunewald J, Jeddi-Tehrani M, Dersimonian H. Andersson R, Wizgell H.
A persistent T cell expansion in the peripheral blood of a normal adult male: a new clinical entity?
Clin Exp Immunol 1992 Aug;89(2):279-84.

27. Grunewald J, Wizgell H.
T-cell expansions in healthy individuals.
Immunologist 1996;4:99-103.

28. Gulwani-Akolkar B, Posnett DN, Janson CH, Grunewald J, Wigzell H, Akolkar P, Gregersen PK, Silver J.
T cell receptor V-segment frequencies in peripheral blood T cells correlate with human leukocyte antigen type.
J Exp Med. 1991 Nov 1;174(5):1139-46.

29. Herzog WR, Zanker B, Irschick E, Huber C, Franz HE, Wagner H, Kabelitz D.
Selective reduction of donor-specific cytotoxic T lymphocyte precursors in patients with a well-functioning kidney allograft.
Transplantation. 1987 Mar;43(3):384-9.

30. Hodges E, Dasmahapatra J, Smith JI, Quin CT, Lanham S, Krishna MT, et al.
T cell receptor (TCR) Vbeta gene usage in bronchoalveolar lavage and peripheral blood T cells from asthmatic and normal subjects.
Clin Exp Immunol. 1998 Jun;112(3):363-74.

31. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J.
A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis.
J Exp Med. 2001 Sep 3;194(5):669-76.

32. Izquierdo M, Cantrell D.
T-cell activation.
Trends Cell Biol. 1992 Sep;2(9):268-71.

33. Jain J, Loh C, Rao A.
Transcriptional regulation of the IL-2 gene.
Curr Opin Immunol. 1995 Jun;7(3):333-42.

34. Janeway CA Jr.
The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation.
Annu Rev Immunol. 1992;10:645-74.

35. Kabelitz D, Herzog WR, Zanker B, Wagner H.
Human cytotoxic T lymphocytes. I. Limiting-dilution analysis of alloreactive cytotoxic T-lymphocyte precursor frequencies.
Scand J Immunol. 1985 Sep;22(3):329-35.

36. Kabelitz D, Zanker B, Zanker C, Heeg K, Wagner H.
Human cytotoxic T lymphocytes. II. Frequency analysis of cyclosporin A-sensitive alloreactive cytotoxic T-lymphocyte precursors.
Immunology. 1987 May;61(1):57-62.

37. Kay RA.
TCR gene polymorphisms and autoimmune disease.
Eur J Immunogenet. 1996 Apr;23(2):161-77.

38. Kishihara K, Penninger J, Wallace VA, Kundig TM, Kawai K, Wakeham A, Timms E, Pfeffer K, Ohashi PS, Thomas ML, et al.
Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon6 protein tyrosine phosphatase-deficient mice.
Cell. 1993 Jul 16;74(1):143-56.

39. Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, Yoo LI, Vuopala K, Poyhonen M, Uhari M, Rogers M, Speck SH, Chatila T, Thomas ML.
Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease.
Nat Med. 2000 Mar;6(3):343-5.

40. Larsen CG, Thomsen MK, Gesser B, Thomse PD, Deleuran BW, Nowak J, Skodt V, Thomsen HK, Deleuran M, Thestrup-Pedersen K, et al.
The delayed-type hypersensitivity reaction is dependent on IL-8. Inhibition of a tuberculin skin reaction by an anti-IL-8 monoclonal antibody.
J Immunol. 1995 Aug 15;155(4):2151-7.

41. Li F, Jin F, Freitas A, Szabo P, Weksler ME.
Impaired regeneration of the peripheral B cell repertoire from bone marrow following lymphopenia in old mice.
Eur J Immunol. 2001 Feb;31(2):500-5.

42. Linsley PS, Bradshaw J, Urnes M, Grosmaire L, Ledbetter JA.
CD28 engagement by B7/BB-1 induces transient down-regulation of CD28 synthesis and prolonged unresponsiveness to CD28 signalling.
J Immunol. 1993 Apr 15;150(8 Pt 1):3161-9.

43. Liu Y, Janeway CA Jr.
Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells.
Proc Natl Acad Sci. U S A. 1992 May 1;89(9):3845-9.

44. MacKay CR.
Immunological Memory.
Adv Immunol. 1993;53:217-65.

45. Maggi E, Romagnani S.
Role of T cells and T-cell-derived cytokines in the pathogenesis of allergic diseases.
Ann N Y Acad Sci. 1994 May 28;725:2-12.

46. Malissen B, Malissen M.
Functions of TCR and pre-TCR subunits: lessons from gene ablation.
Curr Opin Immunol. 1996 Jun;8(3):383-93.

47. Martin R, McFarland HF.
Immunological aspects of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis.
Crit Rev Clin Lab Sci. 1995;32(2): 121-82.

48. McLean-Tooke A, Barge D, Spickett GP, Gennery AR.
T cell receptor Vbeta repertoire of T lymphocytes and T regulatory cells by flow cytometric analysis in healthy children.
Clin Exp Immunol. 2008 Jan;151(1):190-8.

49. McNerlan SE, Alexander HD, Rea IM.
Age-related reference intervals for lymphocyte subsets in whole blood of healthy individuals.
Scand J Clin Lab Invest. 1999 Apr;59(2):89-92.

50. Melenhorst JJ, Lay MD, Price DA, Adams SD, Zeilah J, Sosa E, Hensel NF, Follmann D, Douek DC, Davenport MP, Barrett AJ.
Contribution of TCR-beta locus and HLA to the shape of the mature human Vbeta repertoire.
J Immunol. 2008 May 15;180(10):6484-9.

51. Michie CA, McLean A, Alcock C, Beverly PC.
Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms.
Nature. 1992 Nov 19;360(6401):264-5.

52. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T.
The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes.
Annu Rev Immunol. 1993;11:245-68.

53. Monteiro J, Hingorani R, Peroglizzi R, Apatoff B, Gregersen PK.
Oligoclonality of CD8+ T cells in multiple sclerosis.
Autoimmunity. 1996;23(2):127-38.

54. Moretta A, Pantaleo G, Moretta L, Mingari MC, Cerottini JC.
Quantitative assessment of the pool size and subset distribution of cytolytic T lymphocytes within human resting or alloactivated peripheral blood T cell populations.
Exp Med. 1983 Aug 1;158(2):571-85.

55. Morrison LA, Lukacher AE, Brachiale VL, Fan DP, Braciale TJ.
Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones.
J Exp Med. 1986 Apr 1;163(4):903-21.

56. Mugnani EN, Egeland T, Spurkland A, Brinchmann JE.
The T cell receptor repertoire of CD8+CD28- T lymphocytes is dominated by expanded clones that persist over time.
Clin Exp Immunol. 1999 Aug;117(2):298-303.

57. Murakami M, Sakamoto A, Bender J, Kappler J, Marrack P.
CD25+CD4+ T cells contribute to the control of memory CD8+ T cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Jun 25;99(13):8832-7.

58. Musette P, Bequet D, Delarbre C, Gachelin G, Kourilsky P, Dormont D.
Expansion of a recurrent V beta 5.3+ T-cell population in newly diagnosed and untreated HLA-DR2 multiple sclerosis patients.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Oct 29;93(22):12461-6.

59. Novak TJ, Farber D, Leitenberg D, Hong S, Johnson P, Bottomly K. Isoforms of the transmembrane tyrosine phosphatase CD45 differentially affect T cell recognition.
Immunity. 1 1994 May;1(2):109-19.

60. Olive C.
T cell receptor usage in autoimmune disease.
Immunol Cell Biol. 1995 Aug;73(4):297-307.

61. Orosz CG, Adams PW, Ferguson RM.
Frequency of human alloantigen-reactive T lymphocytes. III. Evidence that cyclosporine has an inhibitory effect on human CTL and CTL precursors, independent of CsA-mediated helper T cell dysfunction.
Transplantation. 1988 Aug;46(2 Suppl):73S-79S.

62. Pannetler C, Even J, Kourilsky P.
T-cell Repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples.
Immunol Today 1995 Apr;16(4):176-81.

63. Papiernik M, de Moraes ML, Pontoux C, Vasseur F, Penit C.
Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency.
Int Immunol. 1998 Apr;10(4):371-8.

64. Picker LJ, Butcher EC.
Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing.
Annu Rev Immunol. 1992;10:561-91.

65. Porter RR.
Structural studies of immunoglobulins.
Scand J Immunol. 1991 Oct;34(4):381-9.

66. Posnett DN, Vissinga CS, Pambuccian C, Wei S, Robinson MA, Kostyu D, Concannon P.
Level of human TCRBV3S1 (V beta 3) expression correlates with allelic polymorphism in the spacer region of the recombination signal sequence.
J Exp Med. 1994 May 1;179(5):1707-11.

67. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F.
CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro.
Eur J Immunol. 1998 Nov;28(11):3435-47.

68. Reed EF, Tugulea SL, Suciu-Foca N.
Influence of HLA class I and class II antigens on the peripheral T-cell receptor repertoire.
Hum Immunol. 1994 Jun;40(2):111-22.

69. Ricalton NS, Roberton C, Norris JM, Rewers M, Hamman RF, Kotzoin BL.
Prevalence of CD8+ T cell expansions in relation to age in healthy individuals.
J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 1998 May;53(3):B196-203.

70. Riley RL, Kruger MG, Elia J.
B cell precursors are decreased in senecent BALB/c mice, but retain normal mitotic activity in vivo and in vitro.
Clin Immunol Immunopathol. 1991 May;59(2):301-13.

71. Rowen L, Koop BF, Hood L.
The complete 685-kilobase DNA sequence of the human beta T cell receptor locus.
Science.1996 Jun21;272(5269):1755-62.

72. Rozans MK, Smith BR, Burakoff SJ, Miller RA.
Long-lasting deficit of functional T cell precursors in human bone marrow transplant recipients revealed by limiting dilution methods.
J Immunol. 1986 Jun 1;136(11):4040-8.

73. Rudd CE.
Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function.
Immunity. 1996 Jun;4(6):527-34. Ryan K J (Hrsg.)

74. Ryan K J (Hrsg.)
Medical Microbiology.
3. Aufl. East Norwalk (Appleton-Lange) 1994.

75. Sakaguchi S, Toda M, Asano M, Itoh M, Morse SS, Sakaguchi N.
T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases.
J Autoimmun. 1996 Apr;9(2):211-20.

76. Salkind N, Abdi H.
The Bonferonni and Sidak Corrections for Multiple Comparisons.
Encyclopedia of Measurement and Statistics 2007.

77. Sansoni P, Cossarizza A, Brianti V, Fagnoni F, Snelli G, Monti D, Marcato A, Passeri G, Ortolani C, Forti E, et al.
Lymphocyte subsets and natural killer cell activity in healthy old people and centenarians.
Blood. 1993 Nov 1;82(9):2601-4.

78. Sensi M, Parmiani G.
Analysis of TCR usage in human tumors: a new tool for assessing tumor specific immune responses.
Immunol Today. 1995 Dec;16(12):588-95.

79. Sharrock CE, Man S, Wanachiwanawin W, Batchelor JR.
Analysis of the alloreactive T cell repertoire in man. I. Differences in precursor frequency for cytotoxic T cell responses against allogeneic MHC molecules in unrelated individuals.
Transplantation. 1987 May;43(5):699-703.

80. Shigematsu M, Nagai S, Mikuniya T, Izumi T, Wizgell H, Eklund AG, Grunewald J.
T cell receptor (TCR) V gene segment use in HLA-typed Japanese healthy subjects.
Clin Exp Immunol. 1996 Jan; 103(1):149-54.

81. Smith H, Sakamoto Y, Kasai K, Tung KS.
Effector and regulatory cells in autoimmune oophoritis elicited by neonatal thymectomy.
J Immunol. 1991 Nov 1;147(9): 2928-33.

82. Sprent J, Webb SR.
Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells.
Curr Opin Immunol. 1995 Apr;7(2):196-205.

83. Stephan RP, Sanders VM, Witte PL.
Stage-specific alterations in murine B lymphopoiesis with age.
Int Immunol. 1996 Apr;8(4):509-18.

84. Stephens LA, Mason D.
CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations.
J Immunol. 2000 Sep 15;165(6):3105-10.

85. Striebich CC, Falta MT, Wang Y, Bill J, Kotzin BL.
Selective accumulation of related CD4+ T cell clones in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis.
J Immunol 1998 Oct 15;161(8):4428-36.

86. Stulnig T, Maczek C, Böck G, Majdic O, Wick G.
Reference intervals for human peripheral blood lymphocyte subpopulations from 'healthy' young and aged subjects.
Int Arch Allergy Immunol. 1995 Nov;108(3):205-10.

87. Sun JB, Olsson T, Wang WZ, Xiao BG, Kostulas V, Fredrikson S, Ekre HP, Link H.
Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls.
Eur J Immunol. 1991 Jun;21(6):1461-8.

88. Suri-Payer E, Amar AZ, Thornton AM, Shevach EM.
CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells.
J Immunol. 1998 Feb 1;160(3):1212-8.

89. Tchilian EZ, Wallace DL, Wells RS, Flower DR, Morgan G, Beverley PC.
A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID.
J Immunol. 2001 Jan 15;166(2):1308-13.

90. Than S, Kharbanda M, Chitnis V, Bakshi S., Gregersen P, Phawa SK.
Clonal dominance patterns of CD8 T cells in relation to disease progression in HIV infected children.
J Immunol. 1999 Mar 15;162(6):3680-6.

91. van der Beemd R, Boor PP, van Lochem EG, Hop WC, Langerak AW, Wolvers-Tettero IL, Hooijkaas H, van Dongen JJ.
Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls.
Cytometry. 2000 Aug 1;40(4):336-45.

92. Van Dongen JJM, Van den Beemd MWM, Schellekens M, Wolvers-Tettero ILM, Langerak AW, Groeneveld K.
Analysis of malignant T cells with Vbeta antibody panel.
Immunologist 1996;4:37-40.

93. Vercelli D, Geha RS.
Regulation of IgE synthesis: from the membrane to the genes.
Springer Semin Immunopathol. 1993;15(1):5-16.

94. Wedderburn LR, Patel A, Varsani H, Woo P.
The developing human immune system: T-cell receptor repertoire of children and young adults shows a wide discrepancy in the frequency of persistent oligoclonal T-cell expansions.
Immunology 2001 Mar;102(3):301-9.

95. Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C.
Animal models.
Ann Neurol. 1994;36 Suppl: S47-53.

96. Wilson A, Maréchal C, MacDonald HR.
Biased V beta usage in immature thymocytes is independent of DJ beta proximity and pT alpha pairing.
J Immunol. 2001 Jan 1;166(1):51-7.

97. Xu X, Beckman I, Ahern M, Bradley J.
A comprehensive analysis of peripheral blood lymphocytes in healthy aged humans by flow cytometry.
Immunol Cell Biol. 1993 Dec;71 (Pt 6):549-57.

98. Zamvil SS, Steinman L.
The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis.
Annu Rev Immunol. 1990;8:579-621.

99. Zanker B, Kabelitz D, Franz HE, Wagner H.
Limiting dilution analysis: a new approach to study allograft acceptance.
Transplant Proc. 1987 Feb;19(1 Pt 2):1559-61.

100. Zharhary D.
Age-related changes in the capability of the bone marrow to generate B cells.
J Immunol. 1988 Sep 15;141(6):1863-9.

101. Zheng B, Xue W, Kelsoe G, Cerny J.
Locus-specific somatic hypermutation in germinal centre T cells.
Nature. 1994 Dec 8;372(6506):556-9.

102. Zinkernagel RM, Callahan GN, Klein J, Dennert G.
Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus.
Nature. 1978 Jan 19;271(5642):251-3.

7. Anhang

7.1 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Vorname und Name	Rami Gaber
Anschrift	Eppendorfer Weg 237, 20251 Hamburg Tel.: 040 78892775 Mobil: 0171 4855762 e-mail: ramigaber@web.de
Geburtsdatum und -ort	14.07.1975 in Bottrop
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Schulbildung	
August ´81 – Juli ´85	Konradschule Bottrop (Grundschule)
August ´85 – Mai ´94	Heinrich-Heine-Gymnasium Bottrop
Juni 1994	Abitur
Hochschulbildung	
Oktober ´95 – November ´02	Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg, Hessen
September ´97	Ärztliche Vorprüfung
September ´98	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März ´01	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
November ´02	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Berufliche Erfahrung	
Oktober ´01 - September ´02	Praktisches Jahr in der Kinder- und Jugendpsychiatrie und Inneren Medizin der Universitätsklinikum Marburg und Chirurgie im Rätischen Kantons- und Regionalspital Chur- Schweiz
Dezember ´02 - Juli 2004	AIP in der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf
seit August 2004	Assistenzarzt in der Kinder- und Jugendpsychiatrie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf

7.2 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:
Prof. Dr. R. Arnold, Prof. Dr. G. Aumüller, PD Dr. P. J. Barth, Prof. Dr. Dr. H. D. Basler, Prof. Dr. E. Baum, PD. Dr. Christiansen, Prof. Dr. Czubayko, Prof. Dr. P. Engel, Prof. Dr. A. Geus, Prof. Dr. P. Griss, Prof. Dr. R. Happle, Prof. Dr. B. Hemmer, Dr. A. Hellinger, PD. Dr. L. Hesse, Prof. Dr. R. Hofmann, Prof. Dr. H. F. Kern, Prof. Dr. J. Koolman, Prof. Dr. R. E. Lang, Prof. Dr. H. Lennartz, Prof. Dr. W. H. Oertel, Prof. Dr. Dr. H. Remschmidt, Prof. Dr. D. O. Schachtschabel, Prof. Dr. J. Seitz, Prof. Dr. K. Voigt und Prof. Dr. E. Weihe

7.3 Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Bernhard Hemmer, Prof. Dr. Wolfgang H. Oertel, meinen Eltern, meinen Geschwistern, Fionna Klasen, Annette Hehenkamp, Michael Happel, Dr. Marc Jacobsen, Dr. Sabine Cepok, Lars Kaufmann und Dr. Steve Hoffmann für ihre Unterstützung.

7.4 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Einfluss von Alter und HLA-Hapltotyp auf das TCR-VB-Repertoire und Lymphozyten Subtypen im peripheren Blut“ in der Klinik für Neurologie unter Leitung von Herrn Prof. Hemmer selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Rami Gaber