

---

**Molekularbiologische Charakterisierung des humanen Rezeptor  
Repertoires intestinaler  $\gamma/\delta$  T-Zellen sowie IgA und IgM  
exprimierender B-Lymphozyten**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der *Johann Wolfgang Goethe*-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Andreas Volker Hennemann  
aus Frankfurt/Main

Frankfurt am Main, im Oktober 2000

(D F 1)

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der *Johann Wolfgang Goethe* - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:	Prof. Dr. J. Engels
Erster Gutachter:	Prof. Dr. Dr. H. Fasold (FB 14)
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. F. Caspary (FB 16)
Datum der Disputation:	29.03.2001

## Vorwort

### Die funktionelle Teilung des Immunsystems

Aufgrund der bestehenden thermodynamischen und chemoenergetischen Gesetzmäßigkeiten ist jedes lebende System zur Aufrechterhaltung seiner physiologischen Funktionen auf eine permanente Wechselwirkung mit der Umgebung angewiesen. Zum Schutz des Individuums vor Pathogenen oder anderen destabilisierenden Umweltfaktoren haben sich im Verlauf der Evolution zahlreiche Abwehrstrategien herausgebildet, die in den hochkomplexen Immunsystemen heutiger Lebensformen gipfeln. Prinzipiell beruht die Funktion solcher Schutzsysteme auf der Diskriminierung exogener, „körperfremder“ Moleküle von „körpereigenen“ Molekülen, wobei sich die Immunabwehr aller Vertebraten in ein *unspezifisches* sowie ein *spezifisches*, erlerntes Teilsystem untergliedern läßt:

#### Komponenten des angeborenen, unspezifischen Immunsystems

##### mechanische Barrieren:

Haut  
Mucus  
Sekretion  
Zilien

##### physikalische Barrieren:

Körpertemperatur  
Säuger: 37°C, Vögel: 41°C  
p<sub>H</sub>-Wert (Magen !)

##### biochemische/zelluläre Komponenten:

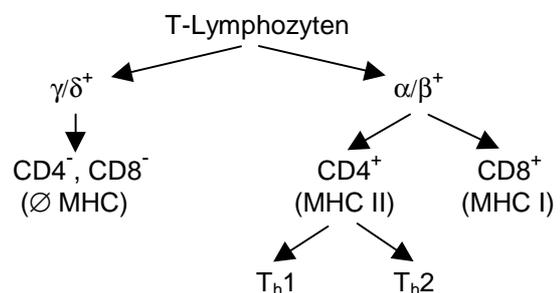
Lysozym, Piperazin  
Komplementsystem  
Akute-Phase-Proteine (z.B. CRP)  
Phagozytierende Zellen:  
Makrophagen, Monozyten  
ferner K- und NK-Zellen

#### Bestandteile des erworbenen, spezifischen Immunsystems

##### humorale Immunabwehr:

B-Lymphozyten und die von ihnen exprimierten Immunglobuline der Isotypen IgG, IgA, IgM, IgD, IgE

##### zelluläre Immunabwehr:



Die *unspezifische* Abwehr zeichnet sich dadurch aus, daß sie *ohne* vorausgegangene Konfrontation mit dem betreffenden Antigen Wirksamkeit zeigt, welche sich allerdings *nicht* durch wiederholte Kontakte steigern läßt. Offensichtlich handelt es sich

hierbei um einen Komplex konservierter, phylogenetisch weit zurückreichender Mechanismen, die ungeachtet ihrer vergleichsweise primitiv erscheinenden Funktionsweisen dennoch einen bedeutenden Anteil an der Immunabwehr ausmachen. Dies wird insbesondere anhand zahlreicher primitiver Lebensformen deutlich, welche trotz der Tatsache, daß sie über kein spezifisches Immunsystem verfügen, teilweise hunderte von Millionen Jahren überdauert haben.

Demgegenüber weist das von B- und T-Lymphozyten gebildete, *erworbene* Immunsystem eine nahezu unlimitierte Dynamik und Flexibilität auf, welche theoretisch die Spezialisierung auf Milliarden verschiedenster Antigenstrukturen erlaubt. Neben ihrer extremen Spezifität besitzt die *adaptive* Abwehr ein *immunologisches Gedächtnis*, wodurch die *Sekundärreaktion* auf ein bekanntes Antigen wesentlich schneller und stärker als die jeweilige *Primärantwort* ausfällt. Weder B- noch T-Lymphozyten wären für sich allein genommen in der Lage, den vielfältigen Anforderungen eines umfassenden immunologischen Schutzes zu genügen. Vielmehr basiert die Effizienz des spezifischen Immunsystems auf ausgeklügelten positiven und negativen Rückkopplungsmechanismen:

Die von T-Lymphozyten gebildete, „zelluläre“ Immunantwort umfaßt sowohl direkte *zytotoxische* als auch *regulatorische*, Lymphokin- bzw. Rezeptor/Ligand vermittelte Interaktionen, wobei mehrere T-Zellsubpopulationen voneinander unterschieden werden: Während *inflammatorische*  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten durch Sekretion von Zytokinen unter anderem Makrophagen aktivieren, besitzen  $CD4^+$  T-Helferzellen die Fähigkeit, die terminale Differenzierung von B-Lymphozyten sowie deren Immunglobulinsynthese über eine Ausschüttung der Lymphokine Interleukin-2, IL-4, IL-5, IL-6 sowie Interferon- $\gamma$  zu induzieren. Zytotoxische T-Zellen tragen den Korezeptor CD8 und sind über eine zielgerichtete Freisetzung spezieller Mediatoren wie z.B. *Perforin* oder *Granzym B* zur Abtötung neoplastisch entdifferenzierter oder solcher körpereigener Zellen befähigt, die von intrazellulär replizierenden Pathogenen infiziert wurden. Ein kompletter Verlust CD8-positiver  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten besäße aufgrund der fehlenden zytotoxischen T-Zellen unmittelbaren Einfluß auf die Eliminierung z.B. infizierter oder neoplastisch entdifferenzierter, körpereigener Zellen. Demgegenüber beeinträchtigt der Verlust CD4-positiver T-Lymphozyten die Effizienz des humoralen Immunsystems auf indirektem Wege.

Im Gegensatz zu B-Lymphozyten sind weder die regulatorischen noch die zytotoxischen ( $\alpha/\beta$ ) T-Zellen zur unmittelbaren Antigenerkennung befähigt. Vielmehr können relevante *Epitope* von ihnen ausschließlich nach vorangegangener intrazellulärer Prozessierung und im Kontext mit zellulären Oberflächenrezeptoren der MHC I- (Mensch: HLA I) bzw. der MHC II-Klasse erkannt werden, weshalb in diesem Zusammenhang von *MHC-Restriktion* die Rede ist (1). Da neben *dendritischen Zellen* und Makrophagen auch B-Lymphozyten die Funktion einer *antigenpräsentierenden Zelle* (APC) ausüben können, ermöglichen diese vielfach die Erkennung *antigener Determinanten* durch T-Lymphozyten sowie deren darauffolgende Aktivierung.

Im zugrundeliegenden Bestreben, den Organismus mit einem optimal strukturierten Verteidigungsmechanismus auszustatten, bestehen auch zwischen unspezifischem und adaptivem Immunsystem - ungeachtet ihrer divergierenden Abwehrstrategien - zahlreiche funktionelle Synergismen. So besitzen *Immunglobuline* einerseits die Aufgabe, frei im Blut zirkulierende Antigenstrukturen im Rahmen der *humoralen* Abwehr zu erkennen und durch spezifische Bindung zu neutralisieren. Andererseits sind sie aufgrund ihrer klassenspezifischen Funktionen in der Lage, Antigene quasi zu „markieren“: Beispielsweise erleichtern die an entsprechende Epitope gebundenen IgG-Moleküle über ihre *Fc*-Anteile den Makrophagen und NK-Zellen die *Phagozytose* entsprechend *opsonierter* Zielzellen. Somit wird deutlich, daß die formale Zweiteilung des Immunsystems allenfalls in entwicklungsgeschichtlicher Hinsicht, jedoch nicht auf physiologischer Ebene besteht. Unter dem starken Druck der Evolution, sich den ständig wechselnden Anforderungen der mikrobiellen Umgebung anpassen zu müssen, werden sämtliche Innovationen in die bereits bestehenden Abwehrstrategien integriert, was bei der Beurteilung experimenteller Befunde stets zu berücksichtigen ist. Da insbesondere der *Intestinaltrakt* und die *Haut* große Grenzflächen zur „Außenwelt“ darstellen und als solche kontinuierlich mit invasiven Pathogenen konfrontiert werden, bzw. Infektionen des Organismus' vorwiegend über diese Organsysteme erfolgen, haben wir uns in der vorliegenden Arbeit mit Feinstrukturanalysen des Rezeptor Repertoires intestinaler sowie intradermaler B- und T-Lymphozyten befaßt. Hierbei bildeten die anhand gesunder Personen gewonnenen Resultate eine Grundlage für weitere Studien, die zur Aufklärung der Beteiligung von Lymphozyten an der Pathogenese *chronisch entzündlicher Darmerkrankungen* (CED) durchgeführt wurden.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b>		<b>iii</b>
	Die funktionelle Teilung des Immunsystems	
<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>16</b>
2.1.1	Das mukosale Immunsystem	16
2.1.2	Immunzellen der <i>Lamina propria</i> (LPL)	18
2.1.3	Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)	19
2.1.4	$\gamma/\delta$ T-Lymphozyten	22
2.1.5	Die Struktur des humanen $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptors	23
2.1.6	Genetische Organisation des humanen $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptors: Die TCR $\gamma$ Genfamilie ( <i>TCRG</i> )	25
2.1.7	Die TCR $\delta$ Genfamilie ( <i>TCRD</i> )	26
2.1.8	Rekombinationsereignisse, die zur Entstehung von $\delta$ TCR führen	28
2.1.9	Kompartimentierung von $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten und differentielle Expression ihrer Rezeptoruntereinheiten	29
2.1.10	Antigenerkennung durch $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten	33
2.1.11	Interaktionen zwischen $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten und intestinalen Epithelzellen	34
2.1.12	Die Bedeutung intraepithelialer $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten im Rahmen der „oralen Toleranz“	35
2.1.13	Die Rolle intraepithelialer $\gamma/\delta$ T-Zellen im Rahmen der Entstehung <i>chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED)</i>	36
2.2	Die humorale Komponente des mukosalen Immunsystems: B-Lymphozyten	39
2.2.1	Organisation des intestinalen humoralen Immunsystems	39
2.2.2	Antikörper der Isotypklasse A	40
2.2.3	IgM exprimierende B-Zellen	43

---

2.2.4	Organisation humaner Antikörper-Untereinheiten kodierender Gensegmente: Immunglobulin-Schwerketten (Ig <sub>H</sub> )	45
2.2.5	Immunglobulin-Leichtketten (κ und λ)	47
2.2.6	Somatische Mutationen bei B-Zell Rezeptoren	48
2.2.7	IgA- und IgM-Schwerkettenrepertoires im humanen Intestinum und im peripheren Blut	49
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>50</b>
3.1	Gewinnung von Untersuchungsmaterial	50
3.1.1	Gewebeaufschluß	52
3.1.2	Dichtegradienten-Zentrifugation zur <i>in vitro</i> -Separation von PBMC aus Vollblut	52
3.2	Positive Selektion von B-Lymphozyten mittels CD19-spezifischer Antikörperkonjugate	53
3.2.1	Quantifizierung von B- und T-Lymphozyten	54
3.2.2	Bestimmung der in RT-Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzten Zellzahlen	55
3.3	Isolierung zellulärer Gesamt-RNA	56
3.4	Extraktion genomischer DNA	57
3.5	Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)	58
3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR <sup>®</sup> )	59
3.6.1	Automatisierter „Hot-Start“ mittels <i>AmpliTaq Gold<sup>™</sup></i> DNA Polymerase	61
3.6.2	Agarose-Flachbettgelelektrophorese zur analytischen Auftrennung von PCR-Produkten	62
3.7	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	63
3.7.1	Dokumentation der PAGE	65
3.8	Subklonierung von Rezeptortranskripten	66
3.8.1	Isolierung und Reamplifikation definierter DNA-Fragmente	66

---

3.8.2	Subklonierung von Rezeptortranskripten definierter CDR3-Länge	66
3.8.3	Das <i>pBluescript</i> <sup>®</sup> II Phagemid-Vektorsystem ( <i>STRATAGENE</i> )	67
3.8.4	DNA-Restriktionsverdau	68
3.8.5	Das „T-Vektor“-Klonierungssystem ( <i>INVITROGEN</i> )	68
3.8.6	Generierung rekombinanter Plasmide durch Ligation	69
3.8.7	Transformation chemokompetenter <i>E.coli</i> Rezipientenstämme	71
3.9	Sequenzanalyse von $\delta$ TCR- und Ig <sub>H</sub> -Transkripten	72
3.9.1	Präparation von Sequenziermatrizen mittels DNA-modifizierender Enzyme ( <i>AMERSHAM</i> )	72
3.9.2	Präparation von Sequenziermatrizen mit dem „ <i>QIAquick</i> <sup>™</sup> PCR Purification Kit“ ( <i>QIAGEN</i> )	72
3.9.3	DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren unter Einsatz farbstoffmarkierter 2',3'-Dideoxynukleotide ( <i>PE/ABI</i> )	73
3.9.4	Generierung von Nukleotid-Sequenzdaten	74
3.10	EDV-gestützte Prozessierung von DNA-Sequenzen und Datenbankabgleiche	75
3.11	CDR3-Längenanalysen	76
<b>4.</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>77</b>
4.1	Untersuchung des intestinalen $\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires	77
4.2	Untersuchung des kutanen $\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires	78
4.3	Die Rolle von $\gamma/\delta$ T-Zellen bei <i>chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i> ( <i>CED</i> )	79
4.4	Charakterisierung humaner intestinaler und peripherer IgV <sub>H</sub> -Repertoires humaner IgA- und IgM- B-Lymphozyten	80

---

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>81</b>
5.1	Die Analyse des humanen $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires	81
5.1.1	Molekularbiologische Feinstrukturanalyse definierter $\delta$ TCR-Transkripte mittels „CDR3-Spectratyping“	81
5.2	Altersabhängige Veränderungen humaner intestinaler $\delta$ TCR-Repertoires	84
5.2.1	Die CDR3-Längenanalysen intestinaler $\delta$ TCR-Transkripte zeigen grundlegende Unterschiede zwischen fetalen und neonatalen sowie den $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires erwachsener Individuen auf	84
5.2.2	Charakteristika des fetalen $\delta$ TCR-Repertoires	86
5.2.3	Charakteristika des humanen $\delta$ TCR-Repertoires während der neonatalen Entwicklungsphase	92
5.2.4	Entwicklungsabhängige Einschränkung der Diversität humaner $\delta$ TCR-Repertoires	96
5.3	Das $\delta$ Rezeptor Repertoire kutaner $\gamma/\delta^+$ T-Lymphozyten gesunder Personen	97
5.3.1	In der Haut gesunder Erwachsener finden sich weitreichende klonale Expansionen spezieller $\gamma/\delta$ T-Zellpopulationen	98
5.3.2	Kutane und periphere $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten weisen signifikant voneinander verschiedene Rezeptor Repertoires auf und stellen distinkte Zellpopulationen dar	100
5.3.3	Die oligoklonalen Rezeptor Repertoires kutaner $\gamma/\delta^+$ T-Zellen beruhen nicht auf gesteigerten Genexpressionsraten aktivierter T-Lymphozyten	101
5.3.4	DNA-Sequenzanalysen dominanter $\delta$ TCR-Transkripte kutaner $\gamma/\delta$ T-Zellklone	102
5.4	Die Rolle von $\gamma/\delta$ T-Zellen bei <i>chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)</i>	104
5.4.1	Ausgangssituation	104
5.4.2	Patientenkollektiv <i>CED</i>	105
5.4.3	CDR3-Längenanalysen intestinaler und peripherer $\delta$ TCR-Transkripte gesunder Kontrollpersonen	107

---

5.4.4	Das $\delta$ TCR-Repertoire innerhalb entzündeter Areale unterscheidet sich nicht von demjenigen benachbarter, makroskopisch unauffälliger Darmabschnitte	109
5.4.5	Vermutlich verfügen <i>M.Crohn</i> -Patienten über ein polyklonales <i>TCRDV1</i> -Repertoire	111
5.4.6	CDR3-Längenanalyse der <i>TCRDV</i> -Transkripte zweier von aktiver <i>Colitis ulcerosa</i> betroffenen Patienten	112
5.4.7	Die intestinalen CDR3-Profile von <i>Divertikulitis</i> -Patienten lassen keine Unterschiede zwischen läsionalen und <i>nicht</i> involvierten Mukosaarealen erkennen	112
5.4.8	Charakteristika der TCR $\delta$ -Transkripte	114
5.5	Analyse intestinaler und peripherer $V_H$ -Repertoires humaner IgA und IgM exprimierender B-Lymphozyten	116
5.5.1	Subgruppen des intestinalen IgA-Schwerkettenrepertoires zeigen klonale Expansionen	116
5.5.2	Klonal expandierte IgA B-Lymphozyten sind innerhalb des <i>Kolons</i> weit verbreitet	119
5.5.3	Das IgA $V_H$ -Repertoire des peripheren Blutes ist ebenfalls oligoklonal, jedoch von dem des <i>Kolons</i> verschieden	120
5.5.4	Der ermittelte Klonalitätsgrad von $V_H$ -Repertoires hängt innerhalb weiter Grenzen nicht von der Gesamtzahl analysierter B-Zellen ab	120
5.5.5	Das Rezeptor Repertoire IgM exprimierender B-Zellen ist innerhalb des <i>Kolons</i> eingeschränkt, im Fall peripherer B-Lymphozyten hingegen polyklonal	122
5.5.6	Innerhalb des <i>Kolons</i> lassen sich vereinzelt B-Lymphozyten nachweisen, die einen Klassenwechsel vollzogen haben	126
5.5.7	Klonal expandierte B-Zellpopulationen beschränken sich nicht auf kleine $V_H$ -Familien	128
5.5.8	Ein hoher Prozentsatz aller somatischen Basensubstitutionen stellt stille Mutationen dar oder führt zum Ersatz durch Aminosäuren, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften besitzen	130
5.5.9	Intestinale und periphere IgM B-Lymphozyten weisen ähnliche Präferenzen bei der Verwendung von $J_H$ -Segmenten auf, unterscheiden sich in dieser Hinsicht jedoch signifikant von den korrespondierenden IgA-Repertoires	132

---

<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>134</b>
6.1	Das $\delta$ TCR-Repertoire gesunder Personen	134
6.1.1	Entwicklungsabhängige Veränderungen humaner intestinaler $\delta$ -Ketten Repertoires	134
6.1.2	Die Limitierung des fetalen $\delta$ TCR-Repertoires beruht auf der fehlenden TdT-Expression sowie homologieabhängigen Rekombinationsereignissen	135
6.1.3	Ist das fetale $\delta$ TCR-Repertoire vorprogrammiert oder unterliegt es einer antigenvermittelten Selektion ?	136
6.1.4	Die Bedeutung des polyklonalen $\delta$ TCR-Repertoires während der neonatalen Phase	137
6.1.5	Das genetische Potential zur Generierung von Rezeptorspezifitäten ist zum Zeitpunkt der Geburt ausgeschöpft	137
6.1.6	Die Bedeutung der zunehmenden Einschränkung des $\delta$ TCR-Repertoires während der postnatalen Entwicklungsphase	138
6.1.7	Die homogene Verteilung des $\delta$ TCR-Repertoires weist auf eine Rezirkulation dominanter T-Zellklone hin	139
6.1.8	Analyse des $\delta$ TCR-Repertoires hinsichtlich konservierter Sequenzmotive	140
6.1.9	Fetale und neonatale $\delta$ -Kettentranskripte unterscheiden sich vom adulten $\gamma/\delta$ TCR-Repertoire bezüglich der Verwendung von <i>DJ</i> -Gensegmenten	141
6.1.10	Möglichkeit einer Selektion gegen bisher unbekannte (Eigen-) Antigene	141
6.2	Das Rezeptor Repertoire kutaner $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten	142
6.3	Die Rolle von $\gamma/\delta$ T-Zellen bei <i>chronisch entzündlichen Darmerkrankungen</i>	145
6.4	Das Immunglobulin-Schwerketten Repertoire gesunder Personen	148
6.4.1	Die intestinalen Rezeptor Repertoires gesunder Erwachsener weisen umfangreiche Expansionen einzelner $V_H$ -Transkripte auf	148
6.4.2	Dominante $V_H$ -Familien verfügen über klonale Expansionen einzelner Schwerekettentranskripte	150

---

6.4.3	Stellen $V_{H5}$ - $V_{H7}$ Transkripte Residuen des fetalen $Ig_H$ - Repertoires dar ?	151
6.4.4	Untersuchung der Frequenz von Isotypwechselln bei intestinalen B-Zellen	153
6.4.5	Das Schwereketten Repertoire peripherer, $IgA$ exprimierender B-Lymphozyten	154
6.4.6	Das Schwereketten Repertoire peripherer, $IgM$ exprimierender B-Lymphozyten	156
6.5	Hypothese Die Bedeutung eingeschränkter B- und T-Zell Rezeptor Repertoires	157
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>161</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang</b>	<b>179</b>
8.1	Danksagung	179
8.2	Wissenschaftliche Publikationen	181
8.3	Abkürzungsverzeichnis	183
8.4	Eidesstattliche Erklärung	187
8.5	Lebenslauf	189

## 1. Zusammenfassung

$\gamma/\delta$  T-Lymphozyten stellen beim Menschen ca. 15% der intestinalen *intraepithelialen Lymphozyten*. Die physiologische Funktion der  $\gamma/\delta$  T-Zellpopulation ist ungeklärt. Aufgrund ihrer Akkumulation in mukosalen Oberflächen scheinen sie eine Komponente der „ersten Verteidigungslinie“ zu bilden. Das  $\delta$  T-Zell Rezeptor (TCR) Repertoire gesunder Erwachsener ist oligoklonal, streng individuenspezifisch und zeitlich stabil. Zudem besteht eine charakteristische Kompartimentierung, d.h. im Intestinum liegt ein anderes  $\delta$  TCR-Repertoire vor als im peripheren Blut. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das intestinale  $\delta$  TCR-Repertoire einer entwicklungsabhängigen Dynamik unterliegt. Hierzu wurde die Diversität der antigenbindenden (CDR3-) Domäne intestinaler  $\delta$ -Kettentranskripte von Feten, Neugeborenen, Kindern und Erwachsenen mittels denaturierender PAGE und DNA-Sequenzierung molekularbiologisch analysiert.

Unsere Studien dokumentieren, daß im Verlauf der Reifung vom Fetus zum adulten Individuum gravierende Veränderungen stattfinden. Das fetale  $\delta$  TCR-Repertoire ist stark eingeschränkt und zeichnet sich durch niedrige Komplexität der  $\delta$ -Kettentranskripte aus was darauf beruht, daß innerhalb der CDR3-Domänen kaum matrizenunabhängige „N“-Nukleotide existieren und zudem homologieabhängige Rekombinationsereignisse stattfinden. Die Tatsache, daß verschiedene Feten teilweise identische  $\delta$ -Kettentranskripte exprimieren kann jedoch nicht allein auf obige Mechanismen zurückgeführt werden. Somit bleibt unklar, ob das fetale  $\delta$  TCR-Repertoire vorprogrammiert ist oder Selektionsprozessen unterliegt. Im Gegensatz zu Feten ist das  $\delta$  TCR-Repertoire Neugeborener polyklonal. Wie bei Erwachsenen weisen die CDR3-Domänen ihrer  $\delta$ -Kettentranskripte zahlreiche „N“-Nukleotide auf. Da das  $\delta$  TCR-Repertoire bereits im Alter von 14 - 17 Jahren starke Einschränkungen seiner Diversität zeigt und mit demjenigen siebzigjähriger Personen vergleichbar ist wird angenommen, daß die klonalen Expansionen eine Folge kontinuierlicher Selektionsprozesse darstellen, die z.B. durch HSP verwandte Eigenantigene vermittelt werden. Vergleichbar dem Intestinaltrakt bildet auch die Haut eine bedeutende Grenzfläche des Organismus' zu seiner Umgebung. Möglicherweise spielen kutane  $\gamma/\delta$  T-Zellen ebenfalls eine Rolle im Rahmen einer „ersten Verteidigungslinie“. Wir wiesen anhand

gesunder Erwachsener nach, daß das kutane  $\delta$  TCR-Repertoire - analog zum Intestinum - oligoklonal ist und sich signifikant vom peripheren  $\delta$  TCR-Repertoire unterscheidet. Da in multiplen Hautbiopsien identische  $\delta$ -Kettentranskripte gefunden werden, sind dominante  $\gamma/\delta$  T-Zellklone offenbar weiträumig in der Haut verteilt.

Weiterhin wurde untersucht, ob spezifisch aktivierte  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten an der Pathogenese *chronisch entzündlicher Darmerkrankungen* beteiligt sind. Im Fall der angenommenen antigenvermittelten Aktivierung müßten klonale Expansionen einzelner  $\gamma/\delta$  T-Zellpopulationen zu charakteristischen Verschiebungen des  $\delta$  TCR-Repertoires innerhalb entzündlich veränderter Darmareale führen. Vergleichende Analysen der läsionalen und *nicht*läsionalen Darmabschnitte von *M.Crohn*-Patienten lassen jedoch keine krankheitsassoziierten Repertoireverschiebungen erkennen. Vielmehr weisen entzündliche und *nicht*entzündliche Areale nahezu identische  $\delta$  TCR-Repertoires auf. Da dies auch im Fall der bakteriell verursachten *Divertikulitis* gilt, werden  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten vermutlich generell indirekt oder über TCR-unabhängige Mechanismen (z.B. Zytokine) aktiviert. Alternativ wird eine Erkennung streßinduzierbarer Eigenantigene durch intestinale  $\gamma/\delta$  T-Zellen diskutiert. Beide Vorgänge würden zu keiner Beeinflussung des  $\delta$  TCR-Repertoires führen und in Einklang mit den nachgewiesenen Expansionen einzelner weniger Rezeptorspezifitäten stehen.

Da vermutlich auch die B-Lymphozyten der intestinalen *Lamina propria* an der „ersten Verteidigungslinie“ beteiligt sind nahmen wir an, daß die Ig<sub>H</sub>-Transkripte IgA bzw. IgM exprimierender B-Zellen ebenfalls Einschränkungen ihres Rezeptor Repertoires aufweisen. Wir fanden, daß die kleinen V<sub>H</sub>5-, V<sub>H</sub>6- und V<sub>H</sub>7-Familien intestinaler B-Zellen oligoklonale Expansionen zeigen, während das Repertoire der dominierenden V<sub>H</sub>-Familien deutlich diverser ausfällt. Durch Subklonierung lassen sich jedoch bei sämtlichen V<sub>H</sub>-Familien klonal verwandte IgA-Transkripte in weit voneinander entfernten Darmabschnitten identifizieren. Zudem stellen ~ 75% aller Basensubstitutionen stille Mutationen dar oder führen zum Ersatz durch Aminosäuren vergleichbarer Eigenschaften, was auf einen starken Selektionsdruck schließen läßt. Da kaum Hinweise auf Isotypwechsel vorliegen, stellen intestinale IgM- und IgA-Immunozyten vermutlich divergente Zelllinien dar. Das V<sub>H</sub>-Repertoire peripherer B-Zellen ist stark limitiert, wobei kaum Überlappungen mit intestinalen IgV<sub>H</sub>-Repertoires bestehen.

Aufgrund der partiellen Einschränkung des  $V_H$ -Repertoires ist anzunehmen, daß Teile der humoralen Immunabwehr konservierte Antigene erkennen, wobei es sich - im Gegensatz zu T-Zellen - wahrscheinlich *nicht* um Eigenantigene, sondern um Oberflächenstrukturen symbiontischer Mikroorganismen handelt.

Unsere Resultate zeigen, daß die Begrenzung des Rezeptor Repertoires ein Charakteristikum von B- und T-Lymphozyten darstellt. Übereinstimmend hiermit wurden von anderen Arbeitsgruppen klonale Expansionen auch bei  $\alpha/\beta$  T-Zellen nachgewiesen. Vermutlich wird die Expansion einzelner Zellklone durch permanente Wechselwirkungen mit „Schlüsselantigenen“ induziert, wobei es sich um invariante Fremdantigene oder konservierte Eigenantigene handeln dürfte.

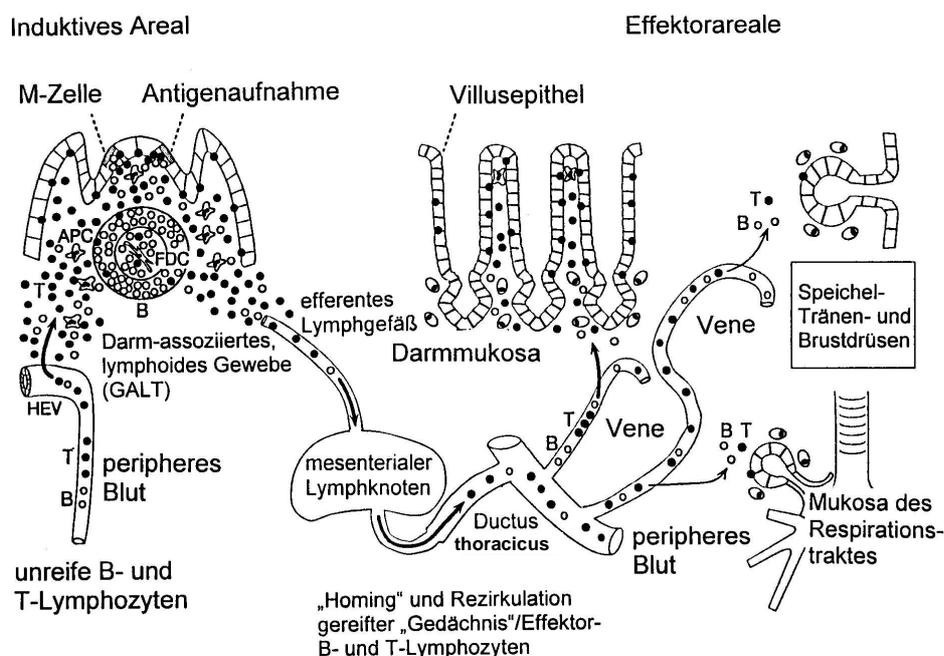
## 2. Einleitung

### 2.1.1 Das mukosale Immunsystem

Mit einer Gesamtoberfläche von annähernd 300 m<sup>2</sup> (2; 3) bildet der humane Gastrointestinaltrakt eine riesige Kontaktfläche zur Außenwelt, welche permanent mit einer bedeutenden qualitativen und quantitativen Antigenvielfalt konfrontiert wird. Somit kommt dem Intestinaltrakt eine Schlüsselrolle bezüglich des immunologischen Schutzes zu, woraus sich vermutlich auch die spezielle räumliche und arbeitsteilige Organisation seiner immunkompetenten Zellen ergibt. Prinzipiell sind intestinale Lymphozyten innerhalb dreier voneinander abgrenzbarer Kompartimente lokalisiert:

- das organisierte, Darm-assoziierte lymphoide Gewebe (GALT)
- die *Lamina propria* (LP)
- das Oberflächenepithel mit *intraepithelialen Lymphozyten* (IEL)

**Abb.1:** Schematische Darstellung des integrierten humanen mukosalen Immunsystems



[aus P. Brandtzaeg, I.N. Farstadt, L. Helgeland: *Phenotypes of T Cells in the Gut* (4).]

Das gegenwärtig akzeptierte Modell des mukosalen Immunsystems postuliert, daß sowohl die Antigen-induzierte Aktivierung, die Proliferation als auch die partielle Differenzierung unreifer intestinaler T- und B-Lymphozyten (vgl. 2.2 f.f.) lokal innerhalb des Gastrointestinaltraktes erfolgt. Man geht davon aus, daß primäre mukosale Immunreaktionen innerhalb *organisierter lymphoepithelialer Strukturen* stattfinden (2), die große Zahlen *unreifer* T-Lymphozyten akkumulieren und ihnen Antigene präsentieren, die von der mukosalen Oberfläche stammen.

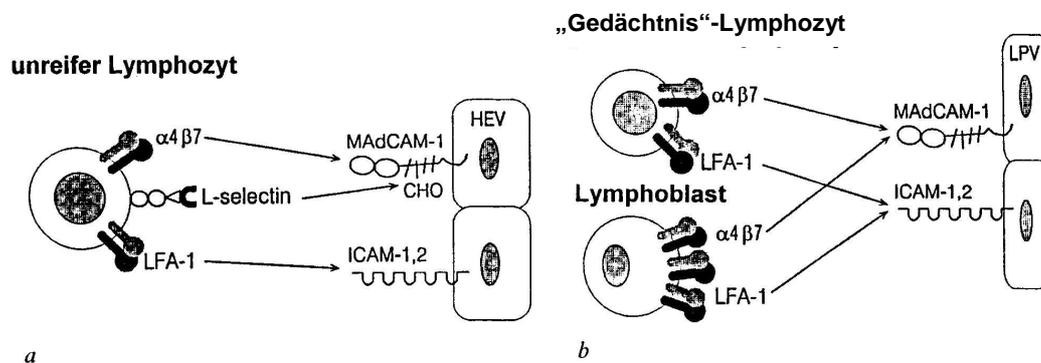
Bei der zur Zeit am detailliertesten analysierten *induktiven* Einheit des humanen *GALT* handelt es sich um die *Peyer'schen Plaques (PP)*, die vorwiegend innerhalb des *Ileums* lokalisiert sind. Hiervon abgesehen, zählen auch der *Appendix* sowie  $\sim 3 \times 10^4$  *lymphoide Follikel*, welche dispers innerhalb des *Kolons* lokalisiert sind, zum Darm-assoziierten lymphoiden Gewebe. Sämtliche Strukturen des *GALT* zeichnen sich durch die Existenz charakteristischer, Epithel-assoziiierter Mikrokompartimente aus, die zahlreiche, phänotypisch und funktionell divergente B- und T-Lymphozyten sowie Populationen *akzessorischer Zellen* enthalten (2; 5; 6).

Aufgrund der Expression spezieller Adhäsionsmoleküle (L-Selectin) sind *nichtaktivierte*,  $CD45RA^+$  Lymphozyten dazu befähigt, an die Endothelzellen spezialisierter, *postkapillärer Venolen* („high endothelial venules“, *HEV*) zu adsorbieren und in die *parafollikuläre T-Zellzone* der *Peyer'schen Plaques* einzudringen, innerhalb derer sich aktivierte *B-Zell-Follikel* in enger räumlicher Nähe zu Antigen-präsentierenden, *follikulären dendritischen Zellen (FDC)* befinden. Die Aufnahme mukosaler Antigene in die Keimzentren („germinal centers“, *GC*) findet dabei über spezialisierte „*M*“-Zellen statt, welche in das *Domepithel* der *PP* integriert sind (vgl. Abb.1). Abgesehen von den T-Lymphozyten erfahren auch B-Zellen innerhalb der Keimzentren sekundärer lymphoider Organe eine sog. *Affinitätsreifung*, wobei deren antigenbindende Rezeptordomäne - im Gegensatz zur CDR3-Domäne der T-Lymphozyten - sukzessive *somatische Mutationen* akkumuliert.

Nach der Antigen-induzierten Reifung verlassen die intestinalen *Gedächtniszellen* ( $CD45RO^+$ ) das *GALT* und wandern in die *mesenterialen Lymphknoten (MLN)* ein, innerhalb derer sie weitere Reifungsschritte durchlaufen und von wo aus sie über den *Ductus thoracicus* in den peripheren Blutstrom gelangen. Aufgrund des mem-

branständigen Adhäsionsmoleküls  $\alpha 4 \beta 7$  können zirkulierende Gedächtnis und Effektorzellen intestinalen Ursprunges über die Passage gewöhnlicher *Venolen* (diese exprimieren u.a. das Adressin MAdCAM-1) innerhalb der *Effektorareale* des Gastrointestinaltraktes, nämlich der *Lamina propria* sowie dem *Epithel*, ansässig werden („homing“, vgl. Abb.2). Vermutlich unterliegen lymphoide Zellen einer kontinuierlichen Rezirkulation, welche die Wahrscheinlichkeit, in Kontakt mit der adäquaten Antigenstruktur zu geraten, gegenüber einer stationären Immunzelle beträchtlich steigert (4).

**Abb.2:** Schematische Darstellung der Adhäsionsmoleküle, die an der initialen Kontaktaufnahme zwischen lymphoiden und epithelialen Zellen des GALT beteiligt sind



[aus P. Brandtzaeg, I.N. Farstadt, L. Helgeland: *Phenotypes of T Cells in the Gut* (4).]

Im folgenden wird zunächst auf die charakteristische Verteilung einzelner T-Zellpopulationen innerhalb der *Lamina propria* sowie des epithelialen Kompartimentes eingegangen.

### 2.1.2 Immunzellen der *Lamina propria* (LPL)

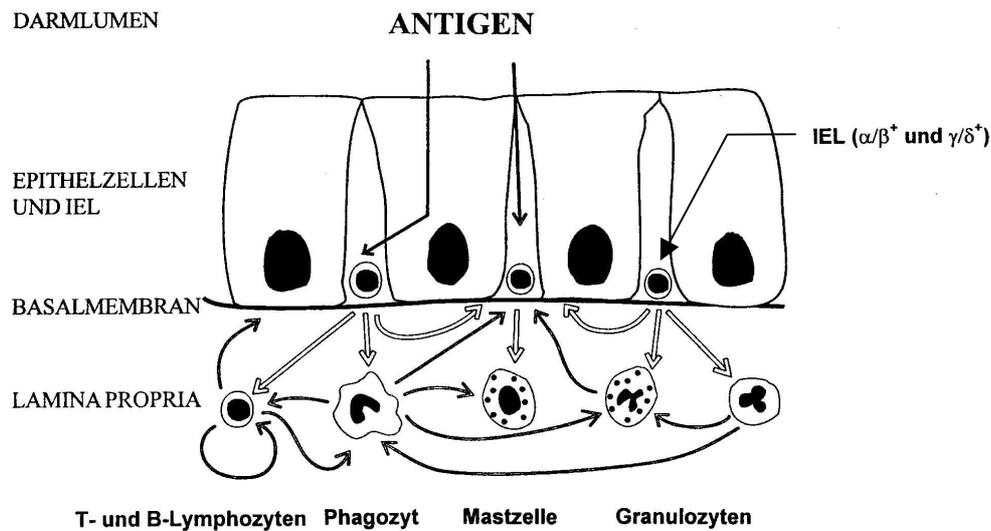
Die *Lamina propria* stellt eine gefäßreiche, lose Bindegewebsmatrix dar, welche zwischen muskulärer *Mukosa* sowie dem *Epithel* lokalisiert ist und z.B. die äußere Form der Darmvilli bestimmt. Ihre *Stromazellen* interagieren funktionell mit zahlreichen Immunzellen wie „memory“ B-Lymphozyten, IgA bzw. IgM sezernierenden *Plasmazellen* (vgl. 2.2.1), Antigen-präsentierenden *dendritischen Zellen* und *Makrophagen* sowie *eosinophilen* und *neutrophilen Granulozyten*. Eosinophile Granulozyten besitzen neben ihrer antiinflammatorischen Eigenschaft eine wichtige Funktion bei der Abwehr parasitärer Helminthen, welche primär auf der Freisetzung toxischer Proteine („major basic protein“, *MBP*) beruht und T-Zell-abhängig ist. Demgegenüber besteht

die Aufgabe der neutrophilen Granulozyten vorwiegend in der Phagozytose opsonierter Pathogene und deren intrazellulärer Desintegration mittels *Myeloperoxidase*, *Muraminidase* und *Lactoferrin* (7).

Bei gesunden erwachsenen Personen sind CD3-positive LPL zu > 95%  $\alpha/\beta^+$  (8; 9); dagegen finden sich nur vereinzelt  $\gamma/\delta^+$  LPL (10). Im Gegensatz zu  $\alpha/\beta^+$  IEL tragen  $\alpha/\beta^+$  LPL vorwiegend den Korezeptor CD4 und weisen zu ~ 80% den „Gedächtnismarker“ CD45RO auf (8; 11). In geringem Maße finden sich auch stimulierte, CD8-positive  $\alpha/\beta$  LPL, die hohe Expressionsraten des Enterozyten-spezifischen Integrins  $\alpha E\beta 7$  zeigen (12) weshalb unklar ist, ob diese Population stationär in der *Lamina propria* verbleibt oder einem Migrationsprozess in Richtung auf das Epithel unterliegt. Im Gegensatz zu peripheren T-Lymphozyten und IEL zeichnen sich 80% ( $CD4^+$ ) bzw. 90% ( $CD8^+$ ) aller  $\alpha/\beta^+$  LPL sowie sämtliche  $\gamma/\delta^+$  LPL durch die Existenz des Oberflächenantigens CD69 aus, welches auf einen *aktivierten Status* hinweist (13).

### 2.1.3 Intraepitheliale Lymphozyten (IEL)

Das Darmepithel wird durch die *Basalmembran* von der darunter liegenden *Lamina propria* separiert. In den *parazellulären* Räumen der Enterozyten befinden sich *intraepitheliale Lymphozyten*, die in unmittelbarem Kontakt mit der Basalmembran stehen und deren physiologische Bedeutung bislang weitgehend ungeklärt ist. Da sie aufgrund ihrer exponierten Lokalisation innerhalb der Mukosa diejenigen Immunzellen darstellen, welche zuerst mit pathogenen Agenzien wie invasiven Mikroorganismen in Kontakt treten ist davon auszugehen, daß sie im Sinne von „Wächtern des Epithels“ tätig sind (14 - 17). Man vermutet, daß IEL durch die Interaktion zwischen Antigen und ihrem T-Zell Rezeptor (TCR) aktiviert werden (18) und über eine Sekretion zahlreicher Botenstoffe mit den Immunzellen der *Lamina propria* kommunizieren (19)  $\Rightarrow$  vgl. Abb.3:

**Abb.3:** Schematische Darstellung der mukosalen Immunantwort

[modifiziert nach **W. Holtmeier**: *Intraepitheliale Lymphozyten: Die erste Garde einer Immunabwehr?* (20).]

Mit Hilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen lassen sich IEL bei humanen Feten bereits ab der 11. SSW. identifizieren (21), wobei ihre Anzahl im Verlauf der Embryogenese beträchtlich zunimmt (22). Obwohl die bei Feten und erwachsenen Personen nachgewiesene Akkumulation von IEL im Villusepithel offensichtlich auf der Expression des Adhäsionsmoleküls  $\alpha E\beta 7$  beruht (23), weisen *keimfrei* aufgezogene Tiere nur geringe Titer intraepithelialer Lymphozyten auf (24). Indessen führt die mikrobielle Besiedelung solcher Tiere rasch zu einer beträchtlichen Zunahme  $\alpha/\beta$ -positiver IEL (24; 25). Demgegenüber scheint die Anzahl der  $\gamma/\delta^+$  IEL unabhängig von der Anwesenheit mikrobieller Antigene zu sein (26 - 28). Ungeachtet dieses Befundes verfügen IEL - anders als LPL - jedoch *nicht* über Oberflächenantigene, die auf einen aktivierten Zustand hindeuten (CD25, CD69) (29; 30). Dennoch handelt es sich bei IEL allem Anschein nach vorwiegend um Gedächtniszellen, da diese vielfach das Oberflächenantigen CD45RO aufweisen (31), was speziell für die  $\alpha/\beta$ -Subgruppe gilt (32).

Allein aufgrund der kompartimentspezifischen Verteilung intestinaler T-Zellpopulationen lässt sich eine funktionelle Zweiteilung des mukosalen Immunsystems annehmen. Im Gegensatz zu den vielfältigen Immunzellen der *Lamina propria* handelt es sich bei humanen IEL fast ausschließlich um T-Lymphozyten, welche zu 80 - 90%  $\alpha/\beta^+$  und zu 10 - 20%  $\gamma/\delta^+$  sind (12; 33; 34). Eine Besonderheit intestinaler  $\gamma/\delta$  T-

Lymphozyten besteht darin, daß sich ihr Vorkommen nahezu vollständig auf die Epithelschicht beschränkt (vgl. Tab.1) und sie kaum innerhalb der *Lamina propria* nachgewiesen werden können (8; 9; 35). Generell lassen sich  $\gamma/\delta^+$  IEL in zwei Subpopulationen unterteilen, die entweder das  $CD8\alpha\beta$  Heterodimer exprimieren oder aber *doppelt negativ* ( $CD4^-/CD8^-$ ) sind (36). Außerdem finden sich im *Jejunum* erwachsener Personen 5 - 20% IEL, die das  $CD8\alpha\alpha$  Homodimer exprimieren (36) und nicht über CD2, CD5 sowie CD28 verfügen (37; 38) woraus geschlossen wird, daß sie *extrathymischer* Herkunft sein könnten (39; 40).

Die für IEL postulierte Funktion einer ersten Verteidigungslinie (14 - 16) beinhaltet neben der Erfordernis, zwischen einer Vielzahl divergenter immunogener Substanzen differenzieren zu können vor allem die Fähigkeit, im Bedarfsfall eine rasche und quantitativ hinreichende Immunantwort initiieren zu können. Da auf 6 - 10 Enterozyten lediglich *ein* IEL entfällt, erscheint die Realisierung dieser Aufgabe äußerst schwierig; zudem konnte gezeigt werden, daß intraepitheliale Lymphozyten weitgehend immobil sind (41) und *in situ* niedrige Proliferationsraten aufweisen (42). Da entzündliche Prozesse im Intestinaltrakt gewöhnlich eng begrenzt bleiben und es nicht zur Beteiligung der *systemischen Immunantwort* kommt, müssen innerhalb der Mukosa effiziente Mechanismen existieren, die eine rechtzeitige Erkennung pathogener Mikroorganismen erlauben und deren Ausbreitung verhindern.

Somit stellt sich die Frage, auf welche Weise eine relativ geringe Anzahl von Lymphozyten, die jeweils nur über eine singuläre Rezeptorspezifität verfügen, zur Erkennung und Differenzierung verschiedenartigster luminaler Antigene befähigt werden kann. Die Annahme, daß IEL an einer immunologischen Erstabwehr beteiligt sind wird durch neuere Befunde gestützt, wonach zumindest  $V\delta 1^+$  IEL offensichtlich durch wenige streßinduzierbare, *HSP* verwandte Eigenantigene oder die nichtklassischen, MHC I verwandten Oberflächenrezeptoren *MICA* bzw. *MICB* aktiviert werden (43 - 45). Auch Studien, welche oligoklonale Rezeptor Repertoires  $\gamma/\delta^+$  und  $\alpha/\beta^+$  IEL bei gesunden erwachsenen Personen erkennen ließen (46 - 50) stehen in Einklang mit der Hypothese, wonach sich intraepitheliale T-Lymphozyten auf die Erkennung einer limitierten Anzahl charakteristischer Strukturen beschränken, welche sowohl Fremd- als auch Eigenantigene darstellen können.

**Tab.1 (a):** Subpopulationen humaner *intraepithelialer* T-Lymphozyten (IEL)

IEL	prozentualer Anteil	bekannte Subtypen	prozentualer Anteil
$\alpha/\beta^+$	80 – 90%	CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup>	85 – 98%
		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup>	2 – 15%
$\gamma/\delta^+$	10 – 20%	CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup>	50%
		CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup>	50%

**(b):** Verteilung humaner *Lamina propria* T-Lymphozyten (LPL)

LPL	prozentualer Anteil	bekannte Subtypen	prozentualer Anteil
$\alpha/\beta^+$	95 – 99%	CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup>	~ 24%
		CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>-</sup>	~ 50%
$\gamma/\delta^+$	~2%	CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup>	?
		CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>+</sup>	?

#### 2.1.4 $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten

Im Gegensatz zu  $\alpha/\beta^+$  T-Lymphozyten, deren Anteil im peripheren Blut gesunder Personen > 95% beträgt, bilden  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten je nach ihrer Lokalisation lediglich 1 - 10% aller CD3-positiven Zellen. Generell handelt es sich bei ihnen um die erste von Säugetieren exprimierte T-Zellfamilie, die zunächst extrathymisch innerhalb der fetalen Leber sowie des primitiven Gastrointestinaltraktes gebildet wird (51 - 53). Beim Menschen finden sich in der fetalen Leber bis zur 11. SSW ausschließlich  $\gamma/\delta^+$  T-Zellen, welche dort auch nach der Generierung von  $\alpha/\beta^+$  T-Zellen noch zwischen 10% und 60% aller T-Lymphozyten ausmachen.

Anders als bei den quantitativ dominierenden  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten sind die physiologischen Aufgaben der  $\gamma/\delta$  T-Zellen bislang weitgehend ungeklärt. Jedoch bildet ihr vermehrtes Auftreten innerhalb epithelreicher Organe eines der Hauptargumente dafür, daß sie eine Komponente der „ersten Verteidigungslinie“ bilden könnten (14 - 16) und daß sich deren Funktionen vermutlich grundlegend von denen der  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten unterscheiden. Die für  $\gamma/\delta$  T-Zellen angenommene, wichtige Bedeutung

wird zudem dadurch gestützt, daß diese bei nahezu allen Vertebraten in wechselnden Mengenverhältnissen konserviert sind, wobei ihr Anteil bei Rindern oder Vögeln - bezogen auf CD3<sup>+</sup> IEL - bis zu 50% betragen kann (14 - 16; 39; 54).

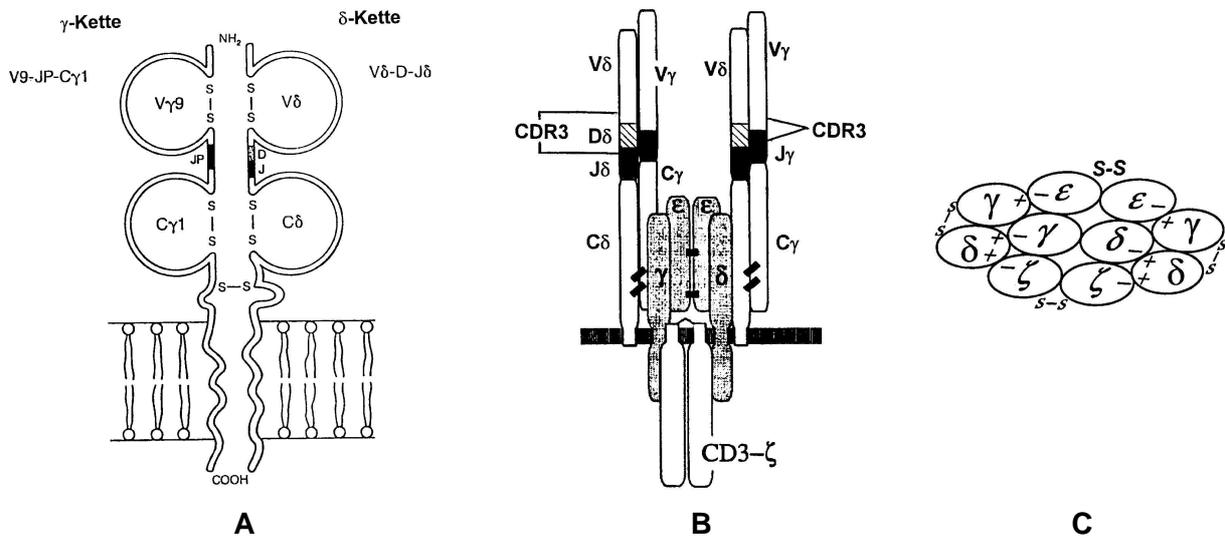
Prinzipiell ist ungeklärt, *warum* die Immunsysteme hochentwickelter Lebensformen zwei divergente T-Zellpopulationen über entwicklungsgeschichtlich bedeutende Zeiträume hinweg aufrechterhalten haben. Die von uns anhand gesunder Personen durchgeführten Studien tragen einerseits zum besseren Verständnis der physiologischen Funktionen von  $\gamma/\delta$  T-Zellen bei. Darüber hinaus bilden unsere experimentellen Befunde eine wichtige Voraussetzung dafür, die angenommene Beteiligung von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten an der Pathogenese immunologisch assoziierter Erkrankungen überprüfen zu können.

### 2.1.5 Die Struktur des humanen $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptors

Analog zu  $\alpha/\beta^+$  T-Lymphozyten tragen  $\gamma/\delta$  T-Zellen einen heterodimeren Rezeptor auf ihrer Zelloberfläche, der sich aus einer  $\gamma$ - sowie einer  $\delta$ -Untereinheit zusammensetzt. Der funktionelle, 300 kD große TCR-Komplex besteht aus *sechs* verschiedenen Polypeptidketten, darunter dem hochvariablen  $\gamma/\delta$ -Heterodimer sowie den niedermolekularen, invarianten Membranproteinen CD3- $\gamma$ , - $\delta$ , - $\epsilon$  und - $\zeta$ , deren gemeinsamer Genort auf Chromosom 11q23 kartiert wurde (55). Während die  $\gamma/\delta$ -Ketten mit antigenen Determinanten immunogener Strukturen interagieren, sind die übrigen, kovalent miteinander verbundenen Komponenten des CD3-Komplexes maßgeblich an dessen Stabilisierung sowie der Signaltransduktionskaskade beteiligt (vgl. Abb.4).

Die TCR  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten stellen membranständige Glykoproteine dar, welche sich - abgesehen vom Signalpeptid - in einen extrazellulären N-Terminus, eine  $\alpha$ -helikal strukturierte Transmembran- sowie eine carboxyterminale, zytoplasmatische Domäne unterteilen. Derjenige Rezeptorabschnitt, welcher in direkten Kontakt mit den antigenen Determinanten tritt und von daher die Spezifität des TCR bestimmt (56), wird als *CDR3-Domäne* („*third complementarity determining region*“) oder „*junctional region*“ bezeichnet; er umfaßt die Übergänge zwischen der „*variablen*“ (V $\delta$ ), der „*diversen*“ (D $\delta$ ) sowie der „*joining*“-Region (J $\delta$ ).

**Abb.4:** Schematisches Modell des divalenten  $\gamma/\delta$  TCR (A), des funktionellen TCR-CD3 Komplexes (B) und der Interaktionen zwischen den Transmembranregionen (C)



[(A) modifiziert nach **M.P. Lefranc, T.H. Rabbitts:** *The human T-cell receptor gamma (TRG) genes* (57). (B) und (C) modifiziert nach **C. Terhorst et al.:** *Plasticity of the TCR-CD3 complex* (58).]

Es konnte gezeigt werden, daß die durchschnittliche Längenverteilung der CDR3-Region von  $\delta$ -Ketten den Schwerekettentranskripten von Immunglobulinen (Ig<sub>H</sub>) ähnelt, während die der  $\gamma$ -Kette analog zur Ig $\kappa$ -Kette ist (59). Demgegenüber bestehen gravierende Unterschiede zwischen der CDR3-Domäne von  $\gamma/\delta$  und  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren (60). Röntgenkristallographische Untersuchungen (Auflösung: 1,9 Å) erbrachten topologische Ähnlichkeiten zwischen den antigenbindenden Domänen der Ig<sub>H</sub>-Ketten von B-Zell Rezeptoren sowie den CDR3-Regionen der  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten (61). Da die TCR von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten zudem freies Antigen binden (vgl. 2.1.10) wird argumentiert, daß  $\gamma/\delta$  T-Zellen den B-Lymphozyten näher stehen als den  $\alpha/\beta$  T-Zellen, was möglicherweise Einfluß auf das Ligandenspektrum besitzt. Darüber hinaus lassen die genannten Gemeinsamkeiten ähnliche Mechanismen der Antigenerkennung vermuten.

### 2.1.6 Genetische Organisation des humanen $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptors: Die TCR $\gamma$ Genfamilie (*TCRG*)<sup>1</sup>

Alle Mitglieder der Genfamilie, welche die  $\gamma$ -Kette des heterodimeren T-Zell Rezeptors kodieren, sind auf Chromosom 7 lokalisiert, wobei der äquivalente Bereich zwischen p14 - p15 annähernd 160 kb umfaßt (62 - 65).

Der *TCRG*-Lokus enthält zwei für *konstante Domänen* kodierende Gene, die mit *TRGC1* bzw. *TRGC2* bezeichnet werden, wobei sich das entsprechende Genprodukt in beiden Fällen aus einer extrazellulären sowie einer Transmembrandomäne zusammensetzt, welche über ein konnektives Peptid verknüpft sind (66). *TRGC1* und *TRGC2* variieren insofern, als daß Exon 2 von *TRGC1* einen Cysteinrest kodiert, der die Ausbildung der für Typ1-Rezeptoren charakteristischen Disulfidbindung zwischen  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette ermöglicht. Demgegenüber determiniert Exon 2 des *TRGC2*-Gens keinen Cysteinrest, weshalb zwischen den Untereinheiten der Typ2-Rezeptoren *keine* kovalenten Wechselwirkungen bestehen (57; 66). In Abhängigkeit vom jeweiligen Segment kann Exon 2 von *TRGC2* in *doppelter* oder *dreifacher* Kopienzahl vorliegen (67 - 71) und somit zur Expression biochemisch distinkter  $\gamma/\delta$  Rezeptoren beitragen (72).

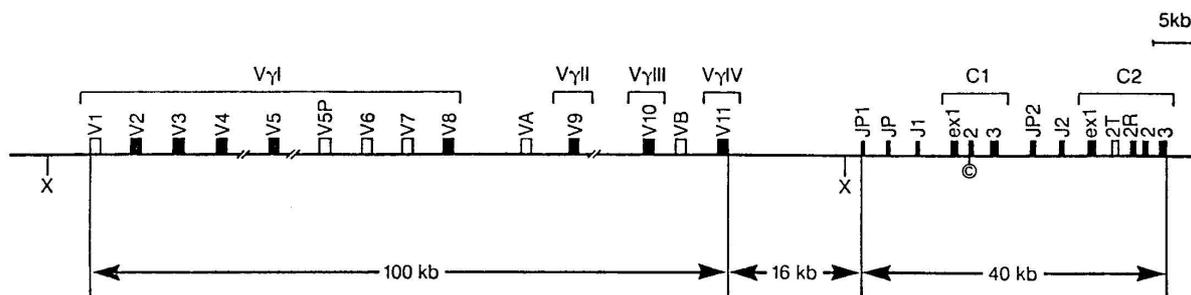
Der *TCRG*-Lokus umfaßt insgesamt 19 *TRGV*-Gene, die aufgrund bestehender Sequenzhomologien in vier Subgruppen (I - IV) eingeteilt werden (73 - 76) (vgl. Abb.5). Die *TRGV*-I Gruppe beinhaltet fünf verschiedene V-Gensegmente (*TRGV2*, *TRGV3*, *TRGV4*, *TRGV5* und *TRGV8*) sowie vier *Pseudogene* (*TRGV1*, *TRGV5P*, *TRGV6* und *TRGV7*). Demgegenüber weisen die übrigen drei Subgruppen II - IV jeweils *einen* Vertreter V-Gruppen-kodierender Gene auf (*TRGV9*, *TRGV10* bzw. *TRGV11*). Während *TRGV9* für einen funktionellen Rezeptor kodiert, führen defekte Signalsequenzen bei den Segmenten *TRGV10* und *TRGV11* zur Entstehung *nicht-funktioneller*  $\gamma$  Transkripte (77). Zwei weitere, mit *VA* und *VB* bezeichnete Pseudogene ( $\Psi$ ), die in 5'-Orientierung von *TRGV9* bzw. *TRGV11* lokalisiert sind können keiner der genannten Gruppen zugeordnet werden. Somit werden von den 19

<sup>1</sup> Die verwendete Nomenklatur entspricht vorwiegend den Empfehlungen des WHO-IUIS Komitees für T-Zell Rezeptoren (TCR). Allerdings werden aus Gründen der Praktikabilität auch Abkürzungen benutzt, welche auf der **ImMunoGeneTics** Datenbank basieren (IMGT, Internet: <http://imgt.cnusc.fr:8104>).

existierenden *TRGV*-Genen lediglich sechs Vertreter, nämlich  $V\gamma_2$ ,  $V\gamma_3$ ,  $V\gamma_4$ ,  $V\gamma_5$ ,  $V\gamma_8$  sowie  $V\gamma_9$  funktionell exprimiert.

Es konnten insgesamt fünf *GJ*-Segmente identifiziert werden, wobei *TRGJP1*, *TRGJP* und *TRGJ1* „stromaufwärts“, *TRGJP2* und *TRGJ2* dagegen „stromabwärts“ von *TRGC1* lokalisiert sind (78; 79).

**Abb.5:** Schematische Darstellung des humanen  $\gamma$  Genlokus'



[aus M.P. Lefranc, T.H. Rabbitts: *The human T-cell receptor gamma (TRG) genes* (57).]

Im Gegensatz zu den Segmenten der  $\delta$ -Kette unterliegt die  $\gamma$ -Kette keiner *allelen Exklusion* und wird daher auch von  $\alpha/\beta^+$  T-Zellen in mRNA transkribiert, jedoch nicht funktionell exprimiert (80). Somit ist durch molekularbiologische Untersuchungen isolierter Zellpopulationen wie z.B. PBMC oder Darmbiopsien nicht zu klären, ob die analysierten  $\gamma$ -Kettentranskripte von  $\alpha/\beta^+$  oder  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten stammen. Da  $\delta$  TCR-Transkripte aufgrund der Existenz von bis zu 3 D-Regionen zudem weitaus vielfältiger als  $\gamma$ -Ketten Rearrangements ausfallen, beschränkten sich unsere Untersuchungen auf das  $\delta$  TCR-Repertoire.

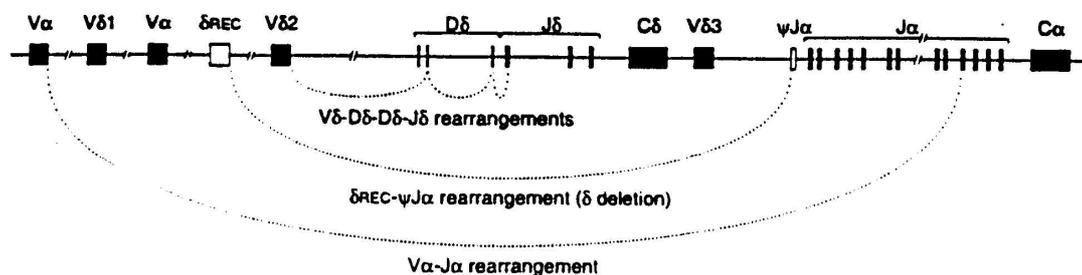
### 2.1.7 Die TCR $\delta$ Genfamilie (*TCRD*)

Während die Gene, welche für humane TCR  $\gamma$ - und TCR  $\delta$ -Ketten kodieren physikalisch weit voneinander entfernt liegen, befinden sich  $\delta$  TCR und  $\alpha$  TCR kodierende Segmente innerhalb desselben Genorts auf Chromosom 14q11.2 (81). Die genetische Organisation des TCR  $\delta$ -Lokus' ist dadurch gekennzeichnet, daß die entsprechenden TCR  $\delta$ -Gensegmente ausnahmslos *innerhalb* des *TCRA*-Genorts liegen (vgl. Abb.6). Bei der Differenzierung von  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten wird im Rahmen des

Rearrangements der TCR  $\alpha$ -Kette der  $\delta$ -Genkomplex komplett deletiert und kann demzufolge nicht mehr transkribiert bzw. exprimiert werden. Somit stammen die in molekularbiologischen Ansätzen analysierten  $\delta$ -Kettentranskripte - im Gegensatz zu  $\gamma$  TCR-Transkripten - von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten.

Analysen der Regulationsmechanismen, welche die Eliminierung des *TCRD*-Elementes beeinflussen zeigten, daß *DREC1*, *TRDV1* und *TRDV2* nach vorangegangener Deletion des *TCRD*-Lokus' auch zum Rearrangement mit *AJ*-Segmenten (einschließlich des Allels *AJ61P*) befähigt sind. Im Gegensatz zum nichtfunktionellen Rearrangement *DREC1.AJ61P* ( $\delta$ REC- $\Psi$ J $\alpha$ ) können Fusionsprodukte zwischen *TRDV1*-, *DV2*- bzw. *DV3*-Genen und den stromabwärts von *AJ61P* gelegenen *AJ*-Allelen durchaus funktionell sein und zur Bereicherung des  $\alpha$ -Kettenrepertoires beitragen (82 - 85).

**Abb.6:** Schematische Darstellung des humanen  $\alpha/\delta$ -Lokus'



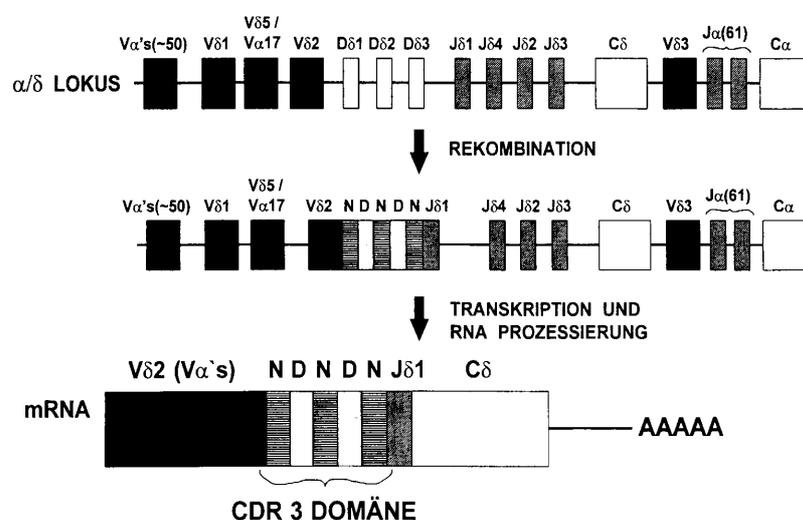
[nach F. Hochstenbach, M.B. Brenner: *Newly identified gamma/delta and beta/delta T-cell receptors* (86).]

Von den „variablen“ Gensegmenten innerhalb des  $\alpha/\delta$ -Lokus' zählen lediglich *TRDV1*, *TRDV2* und *TRDV3* zur *Delta*-Familie (87); das *TRDV3*-Segment zeichnet sich insofern aus, als daß es 2 bis 3 kb in 3'-Richtung vom „konstanten“ Gensegment lokalisiert und außerdem *invers* zu diesem orientiert ist (88; 89). Innerhalb des *TCRD*-Genorts wurden vier *DJ*-Segmente (*TRDJ1* - *TRDJ4*) (90; 91), drei *DD*-Segmente (*TRDD1* - *TRDD3*) (92) sowie eine konstante Domäne (*TRDC*) (93) kartiert.

### 2.1.8 Rekombinationsereignisse, die zur Entstehung von $\delta$ TCR führen

Im Gegensatz zu  $\alpha/\beta$  T-Zellen ist das keimbahnkodierte Repertoire von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten relativ begrenzt. Während zur Generierung des  $\alpha/\beta$  Heterodimers ca. 42  $V\alpha$ - und 47 funktionelle  $V\beta$ -Gensegmente (87) zur Verfügung stehen, existieren für die Synthese von  $\gamma/\delta$  TCR lediglich 4 bis 6 funktionelle  $V\gamma$ - (62; 94) sowie 3  $V\delta$ -Segmente. Dennoch übersteigt die theoretisch mögliche Anzahl von  $\gamma/\delta$  TCR diejenige der  $\alpha/\beta$  T-Zell Rezeptoren um mehrere Größenordnungen. Die spezielle Konfiguration des  $\alpha/\delta$ -Lokus (vgl. Abb. 6) erlaubt nämlich Rearrangements zwischen  $TRAV$ -,  $TRDD$ - sowie  $TRDJ$ -Gensegmenten, was die Generierung vielfältiger CDR3-Domänen von  $\delta$ -Ketten erlaubt, die variable Segmente der  $\alpha$ -Kette aufweisen (89; 95; 96), wobei das Ausmaß dieser Rekombinationen noch unbekannt ist.

**Abb.7:** Rearrangement des humanen  $\delta$  T-Zell Rezeptors



[aus **W. Holtmeier:** *Intraepitheliale Lymphozyten: Die erste Garde einer Immunabwehr ?* (20).]

Weiterhin beruht die Vielfalt der CDR3-Domänen humaner  $\delta$ -Ketten auf der gleichzeitigen Verwendung aller 3 verfügbaren  $D\delta$ -Segmente, die sich zudem in allen drei Leserastern funktionell translatieren lassen sowie 4  $J\delta$ -Genen. Darüber hinaus ergibt sich die Diversität der  $TRDV/DD/DJ$ -Übergänge aus extensiven Modifikationen im Bereich der 3'- und 5'-Segmenttermini, welche exonukleolytische Prozesse, TdT-

katalysierte Insertionen matrizenunabhängiger „N“-Nukleotide sowie Additionen palindromischer Mono- oder Dinukleotide („P“-Nukleotide) umfassen. Es wurde berechnet, daß theoretisch die Möglichkeit zur Generierung von über  $10^{13}$  verschiedenen  $\gamma/\delta$  T-Zell Rezeptoren besteht (18), was die Anzahl der im menschlichen Organismus existierenden T-Lymphozyten bei weitem übertrifft.

### **2.1.9 Kompartimentierung von $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten und differentielle Expression ihrer Rezeptoruntereinheiten**

Obwohl  $\gamma/\delta$  T-Zellen zahlreiche Oberflächenantigene und Effektorspezifitäten wie z.B. die Zytotoxizität mit speziellen Subpopulationen von  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten teilen (38), bestehen bezüglich der räumlichen Verteilung innerhalb des Organismus' gravierende Unterschiede zwischen beiden Zelllinien (14 - 16). Während  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten im peripheren Blut lediglich 3 - 9% der gesamten T-Zellpopulation ausmachen (97), liegt ihr Anteil innerhalb epithelialer Oberflächen - insbesondere bei speziellen entzündlichen Erkrankungen - mit bis zu 40% signifikant höher (14 - 16; 33; 39; 54). Außerdem korreliert die weitreichende Kompartimentierung der  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten charakteristischerweise mit einer präferentiellen Expression bestimmter V $\delta$ -Gensegmente (16; 38).

Im humanen *Gastrointestinaltrakt* finden sich > 70% V $\delta 1^+$  T-Lymphozyten (V $\gamma 8$ /V $\delta 1$ -Rezeptoren) (12; 33); weitere 17% weisen einen TRDV3-kodierten Rezeptor auf (84). Vor dem Hintergrund der Tatsache, daß humane  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten theoretisch über  $10^{13}$  verschiedene Antigen-spezifitäten exprimieren können (18) ist fraglich, inwieweit  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten ihr genetisches Potential *in vivo* zur Vielfältigkeit ihrer Rezeptor Repertoires ausnutzen. Entsprechende Arbeiten (HOLTMEIER *et al.*) zeigten, daß das intestinale  $\delta$  TCR-Repertoire gesunder erwachsener Personen unabhängig von der exprimierten V $\delta$ -Familie oligoklonal ist und eine homogene Verteilung entlang des *Kolons* sowie des *Duodenums* aufweist (46; 47). Vor Beginn der genannten Untersuchungen lagen keine Erkenntnisse darüber vor, inwieweit zwischen räumlich separierten bzw. funktionell unterschiedlichen Darmarealen Abweichungen bezüglich des exprimierten  $\delta$  Rezeptor Repertoires bestehen. Detaillierte Analysen multipler Biopsien der Darmmukosa, welche nahezu die komplette Länge des *Duodenums*

sowie des *Kolons* umfaßten, ließen ein *oligoklonales* Repertoire erkennen, wobei dominante  $\gamma/\delta$  T-Zellklone wiederholt an verschiedenen Stellen des *Kolons* anzutreffen waren. Diese repräsentierten offensichtlich umfangreiche Expansionen identischer *DV1*-Transkripte, wobei zwischen dem  $\delta$  Rezeptor Repertoire des Intestinums und des peripheren Blutes gravierende Unterschiede bestanden (46). Außerdem wurden signifikante Differenzen zwischen dem  $\delta$  TCR-Repertoire des *Kolons* und des *Duodenum*s beobachtet. Anhand gesunder Probanden ließ sich zeigen, daß deren  $V\delta 1$ -,  $V\delta 2$ - und  $V\delta 3$ -Repertoires des *Kolons* über mindestens 16 Monate stabil blieben und sich innerhalb dieses Zeitraumes keine signifikanten Änderungen des CDR3-Profiles ergaben (46). Um zu überprüfen, inwieweit umfangreiche Expansionen einzelner Rezeptortranskripte auch bei intestinalen  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten bestehen, die anderen  $V\delta$ -Familien als  $V\delta 1$  angehören, ermittelten *HOLTMEIER et al.* zunächst die relativen Frequenzen der entsprechenden Subpopulationen innerhalb des *Kolons* gesunder Kontrollpersonen mittels *inverser* PCR (47; 98). Obwohl *TCRDV1* und - in geringerem Ausmaß - das *TCRDV2*-Gensegment quantitativ im *Kolon* dominierten, fanden sich auch solche  $\delta$  TCR-Transkripte, die das *TCRDV3*- sowie *TCRAV*- ( $V\alpha$ ) Gensegmente aufwiesen und in Kombination mit  $D\delta$ - bzw.  $J\delta$ -Segmenten zur Bereicherung des funktionellen intestinalen  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoires beitrugen (95; 96). Diese Resultate entsprechen im wesentlichen den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die das  $V\delta$  Repertoire von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten mittels immunhistochemischer sowie durchflußzytometrischer Methoden untersuchten (12; 33; 36).

*Periphere*  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten zeichnen sich mehrheitlich durch die Expression von  $V\gamma 9/V\delta 2$ -Heterodimeren aus (38; 99 - 104), wobei diese zwischen 50 und 98% *TRDV2-DJ1-DC*- beziehungsweise *TRGV9-GJP-GC1*-Segmente koexprimieren (102; 105 - 108). Demgegenüber stellen *TRDV1*-kodierte  $\delta$ -Ketten in der Zirkulation eine Minderheit dar.  $V\delta 3$ -positive Zellen repräsentieren zwischen 3% und 9% aller peripheren  $\gamma/\delta$  T-Zellen, wobei *TRDV3*-kodierte Rezeptorketten häufig mit *TRGV2*-, *GV3*- und *GV4*-Subgruppen, jedoch nur ausnahmsweise mit dem *TRGV9*-Segment vergesellschaftet sind (84). Weiterhin deutet die Existenz des Oberflächenantigens  $CD45RO^+$  auf einen *aktivierten Status* peripherer  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten hin (109). Analog zu intestinalen  $\delta$  TCR-Transkripten ist das periphere  $\delta$ -Kettenrepertoire unabhängig von der exprimierten  $V\delta$ -Familie oligoklonal. Wie bereits im Fall von

*DV1*-Transkripten beschrieben (110), zeigt sich auch bei peripheren  $V\delta 2$ - und  $V\delta 3$ -Familien über den Zeitraum von 10 bis 16 Monaten hinweg eine weitgehende Konstanz des jeweiligen CDR3-Profiles. Das periphere  $\delta$  TCR-Repertoire ist verschieden von dem des Intestinums, wobei sich nur ausnahmsweise partielle Überlappungen nachweisen lassen. Molekularbiologische Untersuchungen (46; 47) ergaben, daß der Umfang peripherer *DV2*-Repertoires beträchtlich zwischen einzelnen Individuen variiert, wobei zuvor getroffene Aussagen (111) bestätigt wurden, daß die entsprechenden Transkripte generell hochkomplexe Gensegment-Übergangsbereiche aufweisen. Die Existenz oligoklonaler Rezeptor Repertoires stellt kein exklusives Charakteristikum zirkulierender T-Lymphozyten dar, welche der  $\gamma\delta$ -Linie angehören. Vielmehr weisen die  $\beta$  TCR-Repertoires CD8-positiver, zirkulierender T-Lymphozyten bei gesunden Kontrollpersonen ebenfalls bedeutende Einschränkungen ihrer Rezeptordiversität auf (112; 113). Obwohl die homogenen Verteilungen intestinaler  $\gamma\delta^+$  IEL vermutlich auf einer permanenten Rezirkulation selektierter Klone beruhen, lassen sich kaum Überlappungen zwischen intestinalen und peripheren  $\delta$  Rezeptor Repertoires nachweisen. Dies läßt darauf schließen, daß in beiden Kompartimenten verschiedene Antigenstrukturen erkannt werden.

Neben dem Intestinaltrakt bildet die *Haut* eine weitere bedeutende Grenzfläche des Organismus' zu seiner Umgebung, weshalb sich anatomische Ähnlichkeiten ergeben und vergleichbare immunologische Abwehrstrategien anzunehmen sind. Bei Mäusen läßt sich zeigen, daß kutane  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten einen bedeutenden Anteil aller CD3-positiven Zellen darstellen können. Diese werden als *dendritische epidermale T-Zellen (DETC)* bezeichnet und zeichnen sich durch extrem limitierte Rezeptor Repertoires sowie eine nahezu exklusive Expression einzelner  $V\gamma$ - und  $V\delta$ -Gene aus. Darüber hinaus weisen die Übergangsbereiche zwischen den Gensegmenten zahlreiche kanonische Repetitionen auf, welche kaum matrizenunabhängige „N“-Nukleotide enthalten (114; 115). Aufgrund ihrer eingeschränkten Rezeptor Repertoires wird spekuliert, daß sich intradermale  $\gamma\delta$  T-Zellen bei Mäusen auf die Erkennung spezifischer Eigenantigene beschränken, die in Streßsituationen von speziellen Keratinozytenpopulationen verstärkt exprimiert werden. Somit käme den *DETCs* vermutlich eher eine Bedeutung bei der Eliminierung irreversibel geschädigter Körperzellen als im Rahmen der Erkennung von Fremdanigenen zu (116).

Beim Menschen sind kutane  $\gamma/\delta^+$  T-Zellen sowohl *intraepidermal* als auch innerhalb der *Dermis* lokalisiert; im Gegensatz zu Mäusen gehören jedoch nur 1 - 8% aller intradermalen  $CD3^+$  T-Lymphozyten der  $\gamma/\delta$  Fraktion an (97; 117; 118). Somit stellen kutane  $\gamma/\delta^+$  T-Zellen beim Menschen im Normalzustand eine Minorität dar, deren prozentualer Anteil demjenigen zirkulierender  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten (1 - 15%) vergleichbar ist. Weiterhin unterscheiden sich die TCR humaner kutaner  $\gamma/\delta$  T-Zellen insofern von den Transkripten muriner *DETC*, als daß die Übergangsregionen zwischen humanen Gensegmenten hochkomplex strukturiert sind und eine Vielzahl von „N“-Nukleotiden aufweisen. Von daher kann angenommen werden, daß der Mensch über *keine* T-Zelllinie verfügt, die den bei Mäusen beschriebenen *DETC* unmittelbar äquivalent ist. Generell bestehen bezüglich der Funktion humaner kutaner  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten bislang Unklarheiten. Es wurde die Vermutung geäußert, daß sie eine entscheidende Rolle bei granulomatösen Erkrankungen wie der *amerikanischen kutanen Leishmaniose (LCL)* oder der *Lepra* (Infektion mit *Mycobacterium leprae*) spielen, da hier die  $\gamma/\delta^+$  T-Zellen in den läsionalen Hautarealen vermehrt sind und ein limitiertes TCR-Repertoire exprimieren (119 - 121). Gegenwärtig existieren nur vereinzelt Daten, die Aufschlüsse über das  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoire in der Haut gesunder Personen geben. Analog zur Situation bei Mäusen exprimieren kutane  $\gamma/\delta$  T-Zellen des Menschen nur eine begrenzte Vielfältigkeit der Rearrangements zwischen *DV*- und *DJ*-Region kodierenden Gensegmenten. So koexprimieren sie vorwiegend eine aus dem *TCR DV2*- sowie dem *TCRDJ1*-Segment bestehende Kombination, welche auch bei peripheren  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten dominiert (120; 122 - 124). Bislang wurde davon ausgegangen, daß kutane humane  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten - im Gegensatz zu  $\gamma/\delta^+$  IEL - *polyklonale* Rezeptor Repertoires aufweisen, da Analysen chromosomaler  $\delta$ -Kettenarrangements, welche anhand weniger Zellklone durchgeführt wurden vermuten ließen, daß kutane  $\gamma/\delta$  T-Zellen diverse Rezeptor Repertoires exprimieren (120; 123). Allerdings konnte im Rahmen dieser Studien vielfach keine klare Abgrenzung vom peripheren  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoire vorgenommen werden (124).

Derzeit ist nicht geklärt, inwieweit die variablen Regionen des  $\gamma/\delta$  T-Zell Rezeptors unterschiedliche Funktionen besitzen bzw. warum  $V\delta 1^+$  T-Lymphozyten innerhalb des Gastrointestinaltraktes,  $V\delta 2^+$  T-Zellen hingegen im peripheren Blut sowie in der Haut dominieren.

### 2.1.10 Antigenerkennung durch $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten

Bei  $\alpha/\beta$  T-Zellen kommt die antigenspezifische Bindung primär durch Wechselwirkungen zwischen dem MHC/Peptidkomplex sowie der CDR3-Domäne des T-Zell Rezeptors unter Beteiligung des Korezeptors CD4 bzw. CD8 zustande. Da die CDR1- sowie die CDR2-Domäne des  $\alpha/\beta$  TCR gleichermaßen mit MHC I- und MHC II-Strukturen interagieren, wird die Affinität des betreffenden T-Lymphozyten zu einer der beiden Haupthistokompatibilitätskomplexe durch den Korezeptor festgelegt, welcher vermutlich auch an der initialen Antigenbindung sowie der Signaltransduktionskaskade beteiligt ist.

Im Vergleich hierzu sind die Mechanismen, derer sich  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten im Rahmen der Antigenerkennung bedienen, grundlegend verschieden. Wie bereits im Abschnitt 2.1.5 angesprochen wurde liegen mehrere Hinweise darauf vor, daß die CDR3-Domäne des  $\gamma/\delta$  TCR strukturelle Gemeinsamkeiten mit den antigenbindenden Rezeptoruntereinheiten von Immunglobulinen aufweist. In Übereinstimmung hiermit sprechen zahlreiche Befunde dafür, daß die Antigenerkennung durch bestimmte  $\gamma/\delta$  Populationen *nicht* obligat an Interaktionen mit antigenpräsentierenden Zellen gebunden ist (60; 125). So zeichnet sich die Keratinozytenlinie *PAM.2.12*, welche zur *in vitro*-Stimulation von  $\gamma/\delta^+$  DEC dient, unter anderem durch die Abwesenheit des MHC Klasse I-Komplexes aus, weshalb zumindest die Aktivierung *kutaner*  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten offensichtlich *nicht* auf dem Wege einer „klassischen“ MHC-Restriktion erfolgt (116).

Viele der potentiell zur Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T-Zellen in Frage kommenden Strukturen existieren gleichermaßen innerhalb eukaryontischer und prokaryontischer Zellen oder stellen - wie *CD1* oder *hsp63* - teilweise phylogenetisch konservierte, primitive Stimuli dar (60). Die peripheren  $V\gamma 9/V\delta 2^+$  T-Lymphozyten gesunder Personen und von Patienten, die Infektionen mit *Mycobacterium leprae* aufweisen sind dazu in der Lage, frei im Blut zirkulierende, nichtpeptidische Agenzien wie Isopentenyl-ppi sowie verwandte Prenyl-ppi Derivate zu binden und von diesen aktiviert zu werden (126; 127). Von intestinalen  $V\delta 1^+$  Subpopulationen ist bekannt, daß sie die für Enterozyten typischen MHC I-Klasse verwandten Oberflächenantigene *MICA* und *MICB* erkennen, deren Expression unter *HSP70*-Promotorkontrolle steht und in Streß-

situationen wie bakteriellen Infektionen oder entzündlichen Prozessen hochreguliert wird (43). Weil *MICA* bzw. *MICB* weder mit  $\beta$ 2-Mikroglobulin assoziiert sind noch über eine CD8-spezifische Bindungsstelle verfügen, dienen diese Oberflächenantigene den  $\gamma/\delta$  T-Zellen wahrscheinlich *nicht* als antigenpräsentierende Strukturen, sondern werden von ihnen *per se* als körpereigene Streßantigene erkannt und führen deshalb unmittelbar zu deren Aktivierung (43). Da die Erkennung streßinduzierter Oberflächenstrukturen keine antigenprozessierenden Aktivitäten der Epithelzellen voraussetzt, könnten  $\gamma/\delta^+$  IEL entscheidend an der Eliminierung von Enterozyten beteiligt sein, die infolge entzündlicher Prozesse irreversibel geschädigt sind oder aufgrund neoplastischer Entdifferenzierungen eine Gefährdung des Organismus darstellen (45). Außerdem bietet die Erkennung einer geringen Anzahl autologer Streßantigene (128) eine Möglichkeit um Gefahren, die sich aus Infektionen mit unbekanntem Erregern ergeben, unabhängig von ihrer Ursache mittels weniger antigenspezifischer Rezeptoren zwar indirekt, aber rasch zu erkennen. Der im Rahmen der Vorarbeiten (46; 47) erhaltene Befund, wonach intestinale und periphere  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten gesunder Erwachsener über oligoklonale Rezeptor Repertoires verfügen, steht mit dieser Überlegung in Einklang.

### 2.1.11 Interaktionen zwischen $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten und intestinalen Epithelzellen

Die für  $\gamma/\delta^+$  IEL vermutete Funktion als „Wächter des Epithels“ wird durch Befunde gestützt, wonach sie zur *Eliminierung* geschädigter Epithelzellen beitragen könnten (129). So zeigten Untersuchungen an kultivierten  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten, daß diese sowohl indirekte, regulatorische Aufgaben wie B-Zell-Hilfe als auch direkte Effektorfunktionen besitzen, welche wahrscheinlich auf CD95/FasL vermittelten Wechselbeziehungen beruhen (130). Isolierte  $\gamma/\delta^+$  IEL besitzen *in vitro* nachweisbar zytolytisches Potential (131; 132), was durch die Existenz distinkter morphologischer Strukturen wie elektronendichter Granula sowie *Granzym A* bzw. *Perforin* enthaltender Vesikel bestätigt wird (133). Außerdem ließ sich zeigen, daß bestimmte  $\gamma/\delta$  T-Zellklone *in vitro* zur Sezernierung von IL-2, IL-4, GM-CSF, IFN- $\gamma$  sowie TNF $\alpha$  befähigt sind und demzufolge sowohl inflammatorische T<sub>h</sub>1- als auch funktionell antagonistische Lymphokine des T<sub>h</sub>2-Typs exprimieren (38; 134).

Andererseits bestehen Hinweise darauf, daß aktivierte  $\gamma/\delta^+$  IEL über die Ausschüttung spezieller *Mitogene* wie dem „*Keratinocyten-Wachstumsfaktor*“ (*KGF*) Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung der Epithelzellen nehmen, weshalb ihnen vermutlich eine grundlegende Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der mukosalen Integrität zukommt (135). Der mögliche Einfluß von  $\gamma/\delta^+$  IEL auf die Regenerationsfähigkeit des intestinalen Epithels wird auch durch Studien an  $\gamma/\delta$ -defizienten Mäusen gestützt, welche gegenüber Wildtypstämmen mildere Verlaufsformen Allotransplantat (*GvHR*)-induzierter Enteropathien zeigen (136), andererseits durch deutlich gestörte Proliferationsraten der Enterozyten gekennzeichnet sind (137; 138). Offensichtlich sind  $\gamma/\delta$  IEL und intestinale Epithelzellen zum Erhalt ihrer physiologischen Aufgaben auf wechselseitige Kooperation angewiesen.

#### **2.1.12 Die Bedeutung intraepithelialer $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten im Rahmen der „oralen Toleranz“**

Neben der schnellen und effizienten Eliminierung pathogener Mikroorganismen ist die Etablierung einer *oralen Toleranz* durch die Komponenten des mukosalen Immunsystems von vitaler Bedeutung. Ein partieller Verlust der oralen Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen oder der Darmflora könnte die Entstehung von Kreuzreaktivitäten begünstigen und eventuell auch der auslösende Faktor für die Entstehung *chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED)* sein (139; 140).

Es wurde nachgewiesen, daß  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten zur Inhibition antigenspezifischer Reaktionen auf oral verabreichte Substanzen in der Lage sind, die von CD8-positiven, zytotoxischen oder CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen bzw. Immunglobulin-sekretierenden B-Lymphozyten vermittelt werden (141), wobei eine parenterale Gabe *anti- $\delta$*  TCR-spezifischer Antikörper den immunsuppressiven Effekt aufhebt. *Vice versa* ließ sich an Mäusen zeigen, daß intestinale  $\gamma/\delta$  T-Zellen in der Peripherie zur Verstärkung spezifischer IgA-Antworten auf bestimmte Nahrungsantigene beitragen und somit möglicherweise zum Verlust einer entsprechenden oralen Toleranz führen (142; 143). Ferner konnte durch Experimente, welche zur Untersuchung der Induzierbarkeit mukosaler Toleranz am Respirationstrakt von Ratten durchgeführt wurden gezeigt werden, daß  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten offensichtlich eine von  $\alpha/\beta^+$  T-Helferzellen vermittelte IgE-Produktion blockieren (144). Da sich die systemische Immunantwort

durch experimentelle Manipulationen des mukosalen Immunsystems entscheidend beeinflussen läßt, werden die Möglichkeiten einer oralen Toleranzinduktion zur Therapie verschiedener Autoimmunerkrankungen mit besonderem Interesse untersucht (145).

### **2.1.13 Die Rolle intraepithelialer $\gamma/\delta$ T-Zellen im Rahmen der Entstehung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (CED)**

Neben ihrer Beteiligung an der mukosalen Immunantwort wird diskutiert, ob  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten bei der Pathogenese von Autoimmunkrankheiten wie der *Rheumatoïden Arthritis (RA)* oder der *Multiplen Sklerose (MS)* eine Rolle spielen könnten (146 - 148). Auch im Fall der *chronisch entzündlichen Darmerkrankungen* wie dem *Morbus Crohn (MC)* oder der *Colitis ulcerosa (CU)* (149) läßt sich eine Beteiligung von  $\gamma/\delta$  T-Zellen vermuten. Obwohl die initialen Vorgänge, welche auf zellulärer Ebene stattfinden bislang unbekannt sind, wird eine *Dysregulation* des mukosalen Immunsystems als auslösender Faktor für die Ätiopathogenese der *CED* postuliert (149; 150). Die Annahme eines derartigen Zusammenhanges steht mit der Tatsache in Einklang, daß sowohl die Symptomatik des *M.Crohn* als auch der *C.ulcerosa* durch eine immunsuppressive Therapie deutlich abgemildert wird. Zudem existieren zahlreiche Publikationen, die einen grundlegenden Zusammenhang zwischen T-Zell vermittelten Mechanismen und der Pathogenese von *CED* nahelegen (151). Eventuell ist die Toleranz dieser T-Lymphozyten gegenüber luminalen Antigenen im Vergleich zum physiologischen Normalzustand erniedrigt: Während gesunde Personen keine signifikante T-Zell vermittelte Immunreaktion gegenüber der mikrobiellen Darmflora ausbilden wurde gezeigt, daß das intestinale Immunsystem von *M.Crohn*-Patienten dazu sehr wohl in der Lage ist (140). Die bedeutende Rolle von T-Lymphozyten an der Entstehung von *CED* wird außerdem durch zahlreiche Tiermodelle gestützt, bei denen Entzündungen des Darmtraktes durch T-Zellen induziert (151; 152) und sogar transferiert werden konnten (153 - 155). Darüber hinaus lassen sämtliche Tiermodelle erkennen, daß ein enger Zusammenhang zwischen der Entstehung von *CED* und der Existenz der normalen intestinalen Mikroflora besteht (152; 156).

Der *M.Crohn* tritt bevorzugt im Bereich des *terminalen Ileums* sowie des *Kolons* auf; im Gegensatz zur *C.ulcerosa* kann er jedoch sämtliche Abschnitte des Gastrointes-

tinaltraktes vom *Ösophagus* bis zum *Anus* betreffen. Histologisch ist die Erkrankung dadurch gekennzeichnet, daß sich transmurale *aphtoide Ulzerationen* finden, wobei ein diskontinuierlicher Befall der Darmwand zur Entstehung räumlich begrenzter Läsionen führt, die von makroskopisch unauffälliger Mukosa umgeben sind (157). Ein weiteres Charakteristikum besteht darin, daß innerhalb der entzündlichen Areale epitheloidzellige *Granulome* existieren, an deren Peripherie deutlich erhöhte Titer aktivierter LPL nachgewiesen werden können (158; 159). Der Befund, wonach auch innerhalb der T-Zellareale lymphoider Follikel von *M.Crohn*-Patienten vermehrt  $\gamma/\delta$  T-Zellen existieren (160) stimmt mit der vermuteten Beteiligung dieser Lymphozyten an der Entstehung des *M.Crohn* überein (161). Möglicherweise repräsentieren diejenigen T-Lymphozyten, welche sich spezifisch innerhalb läsionaler Mukosaareale anreichern eine primäre oligoklonale T-Zellantwort, welche ursächlich für die weitere Krankheitsentstehung verantwortlich ist. So lassen sich sowohl bei *M.Crohn*- als auch bei *C.ulcerosa*-Patienten klonale Expansionen spezifischer  $\alpha/\beta$ -positiver T-Lymphozyten innerhalb läsionaler Darmareale (162 - 168) sowie des peripheren Blutes (165; 166) nachweisen. Demgegenüber existieren diese *nicht* innerhalb der phänotypisch gesunden Mukosa, was darauf schließen läßt, daß spezifische Antigenstrukturen für die Krankheitsentstehung verantwortlich sind.

Während zahlreiche Studien die Möglichkeit einer Beteiligung von  $\alpha/\beta^+$  T-Zellen an der Pathogenese von *CED* nahelegen, wurden analoge Untersuchungen an  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten in weit geringerem Umfang durchgeführt. Allerdings konnte gezeigt werden, daß sie im Fall von Infektionen mit intrazellulär replizierenden Mikroorganismen entscheidenden Einfluß auf die Granulombildung besitzen (121; 169). Von zahlreichen  $\gamma/\delta$  T-Zellklonen ist bekannt, daß sie als Reaktion auf Konfrontationen mit mikrobiellen Phosphoantigenen große Mengen proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{INF-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$  ausschütten (170; 171). Bei homozygot deletierten,  $\gamma/\delta$  „knockout“ Mäusen führen Infektionen mit dem intrazellulär replizierenden Erreger *Listeria monocytogenes* zur Entstehung hepatischer Abszesse, die *keine* Granulome enthalten (172; 173). Dagegen lassen die Untersuchungen bakteriell induzierter Granulome bei Wildtyp-Stämmen klonal expandierte  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten erkennen (119; 120) womit die Vermutung naheliegt, daß  $\gamma/\delta$  T-Zellen zur Erkennung spezifischer bakterieller Antigenstrukturen befähigt und tatsächlich an der Granulombildung beteiligt sind. Folglich könnten die Granulome innerhalb der läsionalen Darmareale von

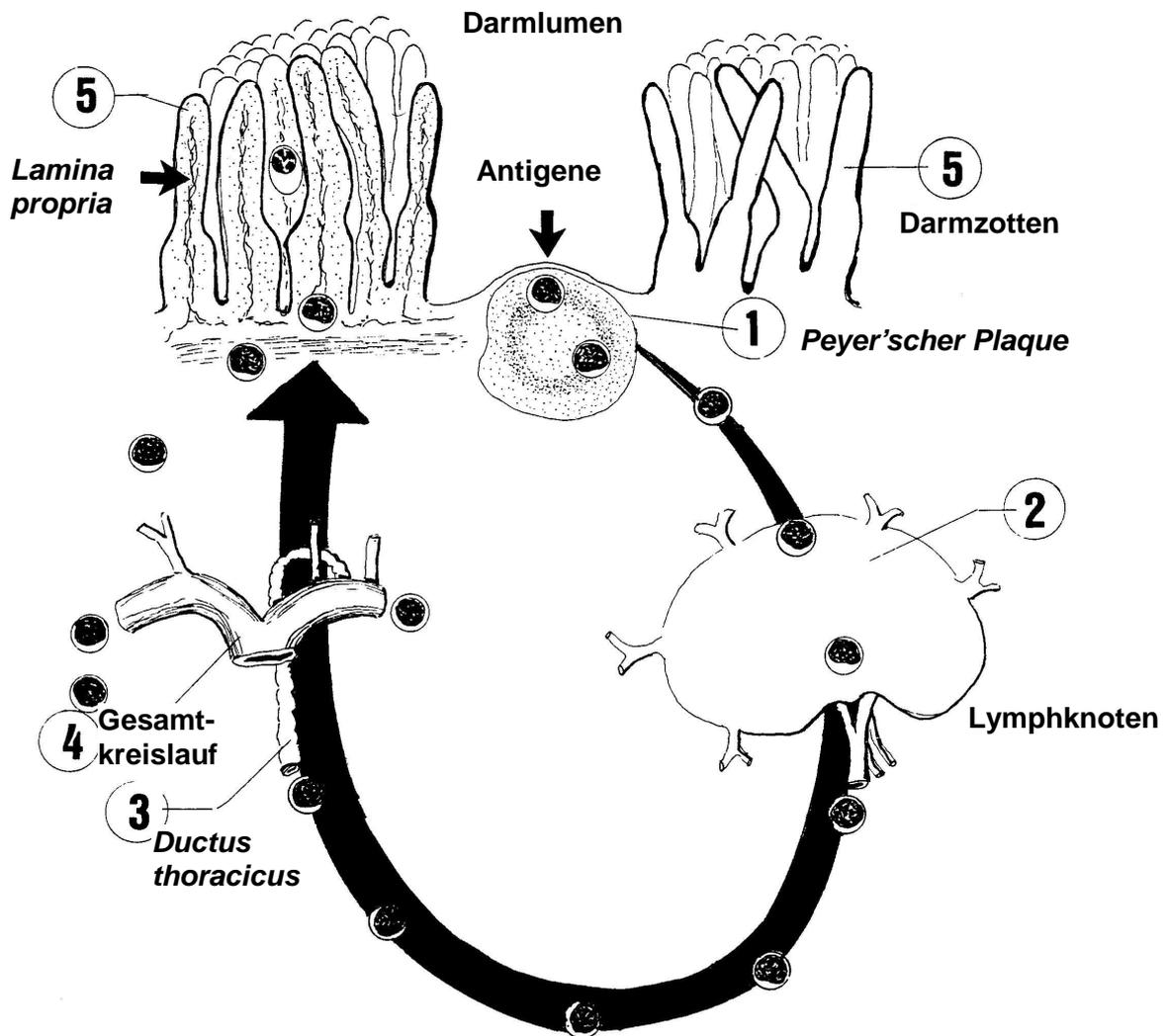
*M.Crohn*-Patienten in direktem Zusammenhang mit  $\gamma/\delta^+$  IEL stehen, welche durch ein bislang unbekanntes Antigen aktiviert wurden. Außerdem wird eine systemische Beteiligung von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten an der Pathogenese diskutiert, da die Anzahl peripherer  $\gamma/\delta$  T-Zellen während akuter Phasen der Erkrankung ebenfalls deutlich erhöht ist (174). Bislang existieren nur vereinzelt Daten die darüber Aufschluß geben könnten, inwieweit  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten tatsächlich eine Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des *Morbus Crohn* spielen. Deshalb bestand ein Ziel unseres Forschungsvorhabens in der Klärung der Frage, ob diejenigen  $\gamma/\delta$  T-Zellen, welche vermehrt in den Randbereichen aphtoider Ulzerationen lokalisiert sind mit spezifischen Antigenstrukturen interagieren bzw. welche Subfamilien hiervon betroffen sind. Da die vermuteten Wechselwirkungen Einfluß auf das Rezeptor Repertoire der betreffenden Lymphozytenpopulationen besitzen könnten, führten wir Analysen der intestinalen und peripheren  $\delta$  TCR-Repertoires bei Patienten durch, die nachgewiesenermaßen an *M.Crohn* und *C.ulcerosa* erkrankt waren.

## 2.2 Die humorale Komponente des mukosalen Immunsystems: B-Lymphozyten

### 2.2.1 Organisation des intestinalen humoralen Immunsystems

Als größtes zusammenhängendes lymphoendotheliales System verfügt der Intestinaltrakt über zahlreiche antigenprozessierende und -präsentierende Zellen, unterschiedlichste Typen von T- und B-Lymphozyten sowie antikörpersezernierende Plasmazellen (Immunozyten). Neben der kompartimentspezifischen Verteilung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen stellt die quantitativ bedeutende Produktion sekretorischer Immunglobuline durch B-Lymphozyten, die innerhalb der *Lamina propria* lokalisiert sind ein wesentliches Charakteristikum des mukosalen Immunsystems dar (175). Bei erwachsenen Personen sind > 80% aller Immunglobulin produzierenden B-Lymphozyten in der *Lamina propria* angesiedelt (17), womit den organisierten Strukturen des GALT entscheidende Bedeutung im Rahmen der spezifischen Immunabwehr zukommt (2). Man nimmt an, daß die *Stimulierung* bzw. die *Affinitätsreifung* von B-Lymphozyten innerhalb der *Peyer'schen Plaques* erfolgt, wogegen die *Lamina propria* das kritische *Effektorkompartiment* der ausgereiften Immunozyten darstellt.

Sowohl sekretorisches (s)IgA als auch sIgM exprimierende LPL weisen umfangreiche somatische Mutationen innerhalb ihrer V<sub>H</sub>-Regionen auf (176). Außerdem ließen sich aus den Keimzentren der *Lamina propria* (177; 178) sowie der *Peyer'schen Plaques* (179) klonal verwandte B-Lymphozyten isolieren. Es wird diskutiert, daß IgA-Lymphoblasten nach ihrer Antigen vermittelten Aktivierung aus den *Peyer'schen Plaques* auswandern und sich innerhalb der *mesenterialen Lymphknoten* ansiedeln, von wo sie über den *Ductus thoracicus* in den zirkulierenden Blutstrom gelangen (vgl. Abb.1 bzw. Abb.8). In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß periphere B-Lymphozyten intestinalen Ursprunges - analog zu T-Zellen - histospezifische Adressine ( $\alpha 4\beta 7$ ) exprimieren die es ihnen erlauben, wieder innerhalb ihres ursprünglichen Kompartimentes ansässig zu werden (180 - 184) und zu rezirkulieren. Dennoch war bislang unklar, ob lokal expandierte B-Lymphozyten auch innerhalb räumlich weit voneinander entfernter Darmabschnitte angetroffen werden können.

**Abb.8:** Kreislauf der IgA sezernierenden B-Lymphozyten

[aus J. Centner und A.L. de Weck: *Atlas der Immuno-Allergologie* (185).]

### 2.2.2 Antikörper der Isotypklasse A

Von den intestinalen Plasmazellen wird mehr Immunglobulin synthetisiert als von allen übrigen lymphoiden Organen' zusammengenommen. In quantitativer Hinsicht dominiert hierbei das sekretorische Immunglobulin A, welches in einer Größenordnung von 3 - 5 g pro Tag an den Oberflächen des humanen Intestinaltraktes sezerniert wird (186). IgA stellt eine von drei großen Immunglobulinklassen dar, welche nicht nur innerhalb des Gastrointestinaltraktes oder des Serums (6% bis 15% der  $\gamma$ -Globulinfraction) auftritt, sondern auch Bestandteil vieler exokriner Sekrete wie der *Saliva*, der Tränenflüssigkeit oder dem *Kolostrum* bildet.

Analog zu der für  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten beschriebenen Situation lässt sich auch für IgA eine kompartimentspezifische Verteilung divergenter Subklassen nachweisen: Während 95% des sekretierten IgAs in der *polymeren* Modifikation vorliegen, besteht plasmatisches IgA zu 88% aus *Monomeren* (mlgA). Weiterhin existieren zwei divergente IgA-Subklassen, welche sich innerhalb des Organismus' heterogen zwischen peripherem und mukosalem Immunsystem verteilen. So stellt IgA<sub>1</sub> beim Menschen bis zu 85% der plasmatischen IgA-Moleküle (186; 187), deren physiologische Halbwertszeit mit 3 - 6 Tagen beträchtlich kürzer liegt als diejenige von IgG (21 Tage). Demgegenüber bestehen mehr als 60% des intestinalen IgAs aus IgA<sub>2</sub>, welches sich auf die allelen Varianten A2m[1] und A2m[2] verteilt. In physikochemischer Hinsicht unterscheiden sich IgA<sub>1</sub> und IgA<sub>2</sub> in 22 Aminosäureresten; IgA<sub>2</sub> weist eine Deletion von 13 AS innerhalb seiner „Gelenk-Region“ auf, was die gegenüber IgA<sub>1</sub> reduzierte sterische Flexibilität bedingt.

**Tab.2:** Vergleich der molekularen Formen und der Verteilung humaner IgA-Subklassen

<b>Immunhistochemisch identifizierbare Plasmazellen</b>	<b>mlgA</b>	<b>plgA</b>	<b>IgA<sub>1</sub></b>	<b>IgA<sub>2</sub></b>
innerhalb des Knochenmarks	89%	11%	88%	12%
innerhalb der <i>Lamina propria</i>	11%	89%	65%	35%

<b><i>In vitro</i> sezerniertes Immunglobulin A</b>	<b>mlgA</b>	<b>plgA</b>	<b>IgA<sub>1</sub></b>	<b>IgA<sub>2</sub></b>
von Plasmazellen des Knochenmarks	87%	13%	89%	-
von Plasmazellen der <i>Lamina propria</i>	39%	61%	61%	-

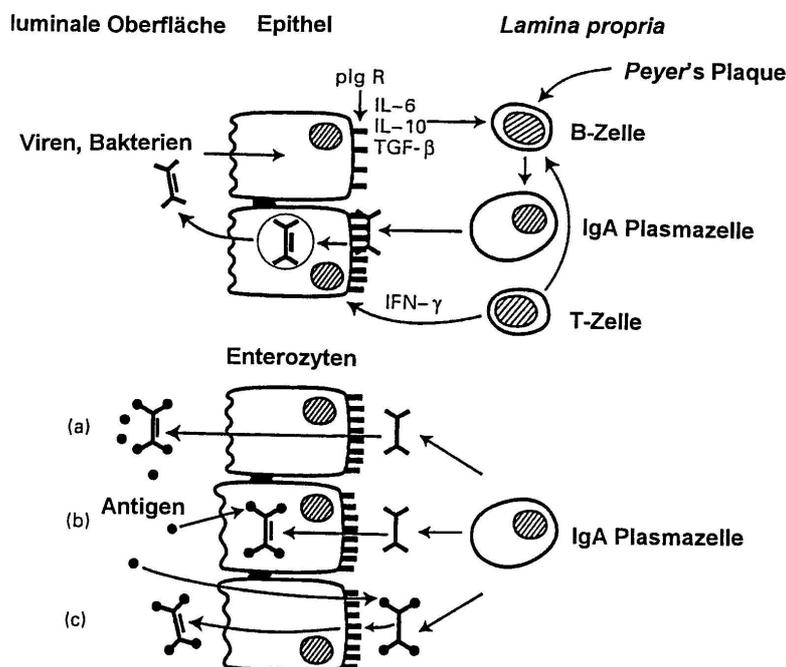
[aus **W.H. Kutteh** *et al.* (188), **S.S. Crago** *et al.* (189), **J. Radl** *et al.* (190) sowie **P. Brandtzaeg** *et al.* (191).]

Prinzipiell umfaßt die Funktion des intestinalen IgAs *drei* Aufgaben:

- a) **Adsorbtion** luminaler Antigene („klassische“ Funktion)
- b) **Neutralisation** intrazellulär und subepithelial lokalisierter, viraler und nichtreplizierender Antigene sowie Ausschleusung komplexierter Antigenstrukturen ins Darmlumen
- c) IgA-spezifische **Effektorfunktionen**, z.B. Inhibition der Komplementkaskade

Der protektive Effekt des intestinalen IgAs beruht darauf, daß es luminal Antigenen durch Bildung von Immunkomplexen immobilisiert und somit Interaktionen zwischen den relevanten Pathogenen sowie den Epithelzellen auf dem Wege der Neutralisation unterbindet. Weiterhin läßt sich *in vitro* zeigen, daß antivirale IgA-Moleküle über den basolateral lokalisierten pIgA-Rezeptor der Enterozyten aufgenommen werden können und dadurch effektiv zur Inaktivierung intrazellulär replizierender Viren beitragen, welche die Epithelzellen über ihre apikale Oberfläche infizieren (192). Auch wurde eine Eliminierung nichtinfektiöser Partikel durch Bildung entsprechender IgA-Komplexe sowie deren transzelluläre Passage vermittelt des pIgA-Rezeptors nachgewiesen (193; 194). Darüber hinaus wird die Vermutung, daß IgA eine antiinflammatorische Komponente des Immunsystems darstellt durch Befunde gestützt, wonach antigenkomplexierte humane IgA-Moleküle *nicht* zur Komplementaktivierung befähigt sind (195) sondern vielmehr entsprechende, IgG- und IgM-induzierte Aktivierungsmechanismen inhibieren (196; 197).

**Abb.9:** Funktionen des intestinalen IgAs im Rahmen der mukosalen Immunantwort

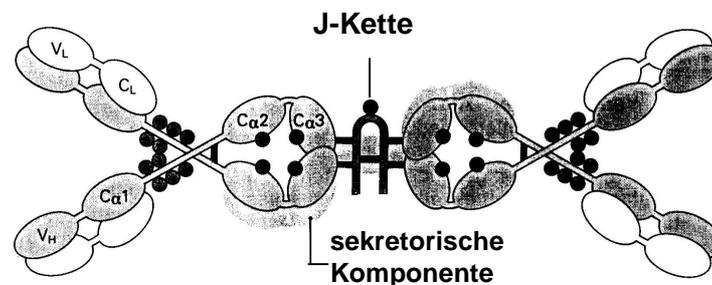


[aus J. Mestecky *et al.*: *Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface* (198).]

Die antiinflammatorische Eigenschaft des IgAs dürfte für die Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität sehr bedeutend sein, da lokale entzündliche Immunreaktionen

vielfach weitreichende Gewebeläsionen umfassen und teilweise sogar die unmittelbar vom Pathogen verursachten Schädigungen zusätzlich verstärken.

**Abb.10:** Struktur des humanen sekretorischen IgA1 (slgA1)



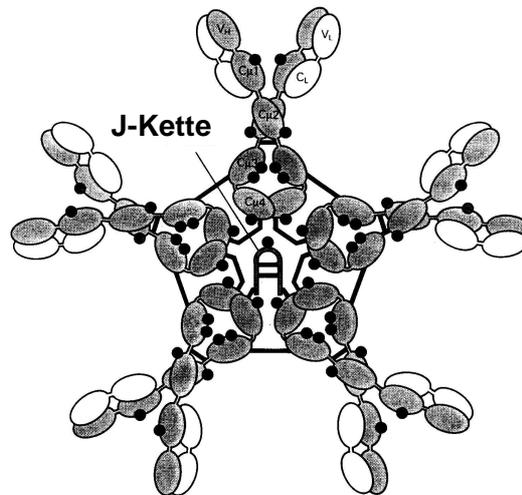
[nach M. Turner: *Moleküle, die Antigene erkennen* (199).]

### 2.2.3 IgM exprimierende B-Zellen

Neben slgA bildet sekretorisches IgM, das von ca. 10% aller intestinalen Plasmazellen produziert wird (2) einen weiteren bedeutenden humoralen Mediator des mukosalen Immunsystems (17). Vermutlich handelt es sich bei IgM um den phylogenetisch ältesten Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie, was mit der Tatsache in Einklang steht, daß monomeres (m)IgM die erste Antikörperklasse darstellt, welche in frühen Stadien der B-Zellreifung exprimiert wird und auch für deren weitere Differenzierung essentiell ist. IgM bildet nicht nur die zuerst von Neugeborenen produzierte Immunglobulinklasse; auch die *primäre* Immunantwort gegenüber unbekanntem Antigen wird ausschließlich durch IgM vermittelt. Neueren Erkenntnissen zufolge (176) können intestinale IgM B-Lymphozyten ebenfalls einer antigenvermittelten Affinitätsreifung unterliegen und an *sekundären* Immunreaktionen beteiligt sein.

Bei dem von Plasmazellen sezernierten, *pentameren* IgM handelt es sich um ein *Makroglobulin* (MW = 970 kD), das sich aus jeweils 10 Schwer- bzw. Leichtketten sowie einer J-Kette zusammensetzt, wobei zwischen den monomeren Untereinheiten kovalente Wechselwirkungen bestehen. Aufgrund seiner hohen Multiplizität ist pentamer bzw. *polymeres* IgM (pIgM) sehr effizient in Bezug auf die Antigenagglutination, wobei aus sterischen Gründen maximal fünf komplexe Antigenstrukturen gebunden werden können.

**Abb.11:** Die pentamere Struktur der Polypeptidkette des humanen IgMs



[nach **M. Turner:** *Moleküle, die Antigene erkennen* (199).]

Es wurde postuliert, daß *polyreaktive*, „natürliche“ Antikörper, die hauptsächlich der Isotypklasse M angehören im Fall einer Invasion durch pathogene Mikroorganismen eine „erste Verteidigungslinie“ ausbilden. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese erbringen die Analysen der  $V_H$ -Repertoires verschiedener Spezies Hinweise auf klonale Expansionen definierter IgM-Lymphozytenpopulationen: So weist das *Peritoneum* gesunder erwachsener Mäuse hohe Titer von „B-1“ Zellen auf, welche gegen das Hapten *Phosphatidylcholin* gerichtete IgM-Antikörper produzieren (200) und deren Rezeptoren - analog zu IgA exprimierenden B-1 Populationen - sehr limitierte, Fetus-ähnliche Repertoires aufweisen, die durch wenige „N“-Nukleotide sowie das Fehlen somatischer Mutationen gekennzeichnet sind. Jüngste Daten dokumentieren, daß diese B-1 Lymphozyten von luminalen Antigenen und zudem T-Zell unabhängig aktiviert werden (201). Da im Fall des Menschen nur vereinzelt Daten vorliegen, wird die Existenz einer humanen B-1 Population bislang kontrovers diskutiert.

Hiervon abgesehen, macht sich mit fortschreitendem Lebensalter eine zunehmende Einschränkung der  $Ig_H$ -Rezeptordiversität bemerkbar. Ungefähr 20% der Seren 95 jähriger Personen weisen monoklonale IgM-Repertoires (M-IgM) auf (202); darüber hinaus zeigen an Mäusen durchgeführte Studien Korrelationen zwischen steigendem Lebensalter und einer prozentualen Zunahme von M-IgM, welche unabhängig vom untersuchten Stamm ist (203). Ferner verfügen mehr als 85% der alten Tiere über stabile klonale B-Zellpopulationen, welche oftmals innerhalb unterschiedlicher

lymphoider Kompartimente ein- und desselben Individuums nachgewiesen werden können.

IgA und IgM besitzen im Rahmen der spezifischen Immunantwort vermutlich ähnliche Aufgaben, da sie innerhalb des Gastrointestinaltraktes weitestgehend austauschbar sind. So weisen Patienten mit bestehendem IgA-Mangel nahezu keine Immundefekte auf, was möglicherweise darauf beruht, daß die Konzentration IgM exprimierender B-Lymphozyten im Darm kompensatorisch erhöht ist (2). Wie bereits angedeutet wurde, sezernieren B-Zellen im Rahmen der Primärantwort ausschließlich IgM, wogegen alle übrigen Antikörperklassen durch *Isotypwechsel* entstehen. Dieser Prozeß findet vermutlich in den Keimzentren sekundärer lymphatischer Organe statt, wobei die konstante Region  $C_{\mu}$  durch somatische Rekombination deletiert und durch Allele anderer Antikörperklassen ( $C_{\alpha}$ ,  $C_{\gamma}$ , bzw.  $C_{\epsilon}$ ) substituiert wird. Da die antigenbindende CDR3-Domäne von diesem Ereignis unbeeinflusst bleibt, lassen sich durch vergleichende molekulargenetische Analysen Rückschlüsse auf verwandtschaftliche Beziehungen zwischen definierten B-Lymphozytenklonen ziehen (vgl. Abschnitt 4.4).

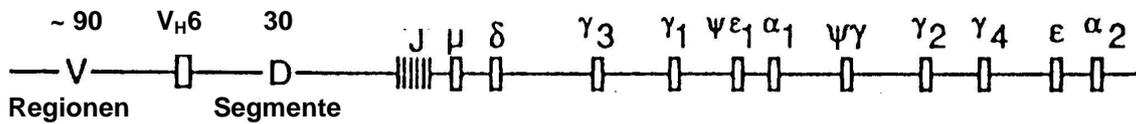
#### **2.2.4 Organisation humaner Antikörper-Untereinheiten kodierender Gen-segmente: Immunglobulin-Schwerketten (Ig<sub>H</sub>)**

Im humanen Genom finden sich *drei* genetische Komplexe, welche auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind und für Immunglobulinschwerketten bzw. für die leichten  $\kappa$ - und  $\lambda$ -Ketten kodieren (204). Während der erste Locus Gruppen von zwei ( $V_L$ - $J_L$ ) oder drei ( $V_H$ - $D_H$ - $J_H$ ) Segmenten aufweist, beinhaltet der zweite solche Allele, die für konstante Domänen kodieren. Der Genort für Immunglobulinschwerketten kartiert auf Chromosom 14q32, wobei die  $V_H$ - und  $C_H$ -Segmente in der Reihenfolge 5'  $V_H$ - $D_H$ - $J_H$ - $C_H$  3' orientiert sind. Selbst im kleinsten untersuchten Haplotyp setzt sich der  $V_H$ -Locus aus mindestens 81 verschiedenen  $V_H$ -Elementen sowie weiteren 10 polymorphen Segmenten zusammen (205), wobei er etwa 50 funktionelle Allele beinhaltet (204; 206). Basierend auf den bestehenden Nukleotidsequenzhomologien<sup>2</sup> erfolgt die Klassifizierung aller bisher analysierten  $V_H$ -Gene in 7 verschiedene Familien. Während die aus 22 funktionellen Allelen bestehende  $V_H3$ -Familie quantitativ

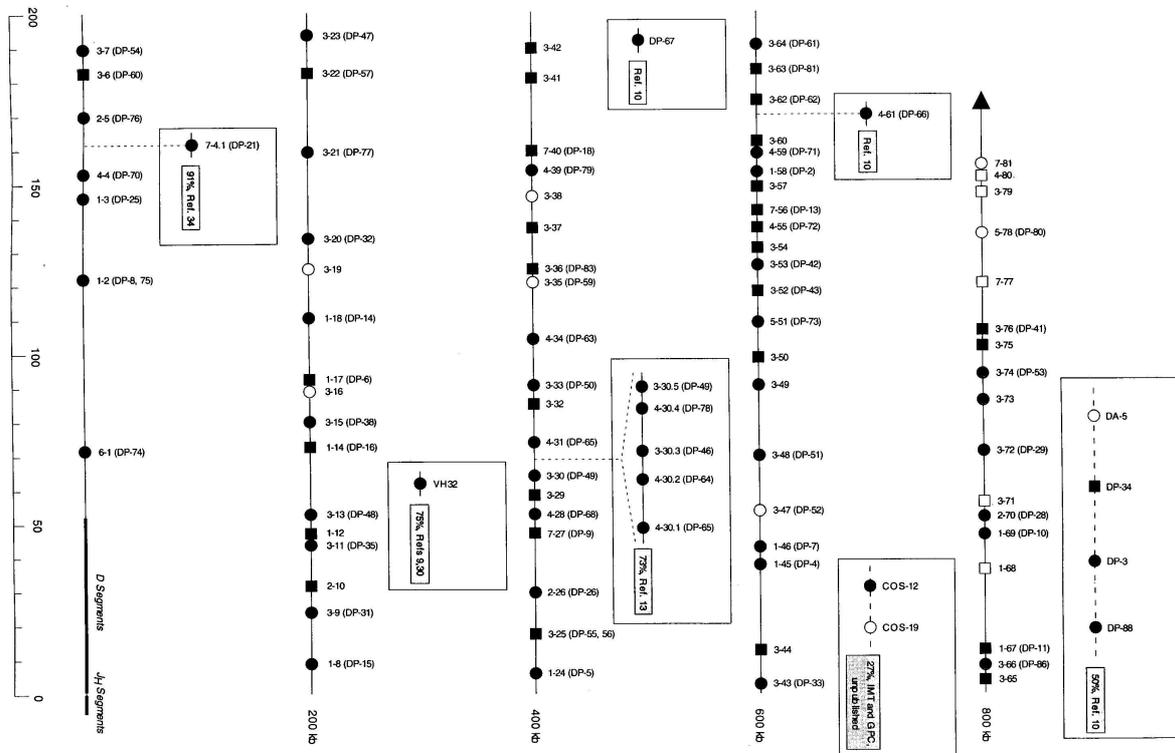
<sup>2</sup> >80% Identität

dominiert, verfügen die  $V_H1$ - und die  $V_H4$ -Genfamilie jeweils über zirka ein Dutzend funktioneller Allele, wogegen die  $V_H2$ -,  $V_H5$ -,  $V_H6$ - sowie die  $V_H7$ -Familie 3, 2, 1 bzw. 1 funktionelles Gensegment aufweisen (204; 206). Nach dem derzeitigen Wissensstand beinhaltet das humane Genom 30 funktionelle  $D_H$ -Segmente (207); diese werden in 6 Familien eingeteilt, welche in 4 „Tandem-Clustern“ organisiert sind. In unmittelbarer Nachbarschaft zum  $C_\mu$  Genort sind *neun*  $J_H$ -Allele lokalisiert, worunter sich drei *Pseudogene* ( $\psi$ ) befinden. Demzufolge strukturiert sich die humane  $C_H$ -Genfamilie wie folgt:

**Abb.12:** Schematische Darstellung des humanen  $V_H$ -Genlokus'



5' -  $J_H$  (8 kb) -  $C_\mu$  (5 kb) -  $C_\delta$  (60 kb) -  $C_{\gamma3}$  (26 kb) -  $C_{\gamma1}$  (19 kb) -  $\psi C_\epsilon$  (13 kb) -  $C_{\alpha1}$  (35 kb) -  $\psi C_\gamma$  (40 kb) -  $C_{\gamma2}$  (18 kb) -  $C_{\gamma4}$  (23 kb) -  $C_\epsilon$  (10 kb) -  $C_{\alpha2}$  - 3'



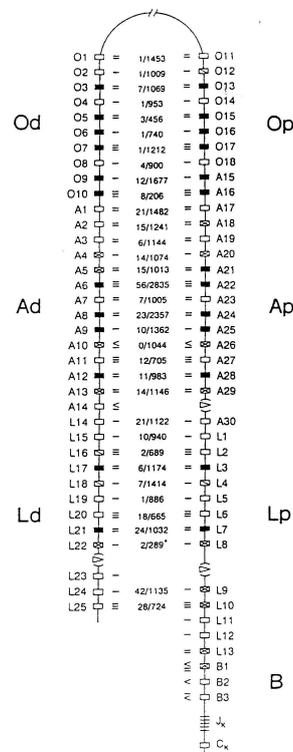
[G.P. Cook et al.: The human immunoglobulin VH repertoire (206).]

Im Gegensatz zu den übrigen Konstant-Genen, welche aus *drei* Exons zusammengesetzt sind, beinhalten  $C_{\mu}$  und  $C_{\epsilon}$  jeweils *vier* Exons.

## 2.2.5 Immunglobulin-Leichtketten ( $\kappa$ und $\lambda$ )

Der Genort für humane Leichtketten des  $\kappa$ -Typs befindet sich auf Chromosom 2p11-12, umfaßt näherungsweise 1,8 Mb und beinhaltet ein  $C_{\kappa}$ -, fünf  $J_{\kappa}$ - sowie zwei „contigs“ von  $C_{\kappa}$ -Genen, welche invers zueinander orientiert sind (208).

**Abb.13:** Schematische Darstellung des humanen  $IgV_{\kappa}$  Lokus'



[aus H.G. Zachau et al.: *The immunoglobulin kappa locus - or - what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome* (208).]

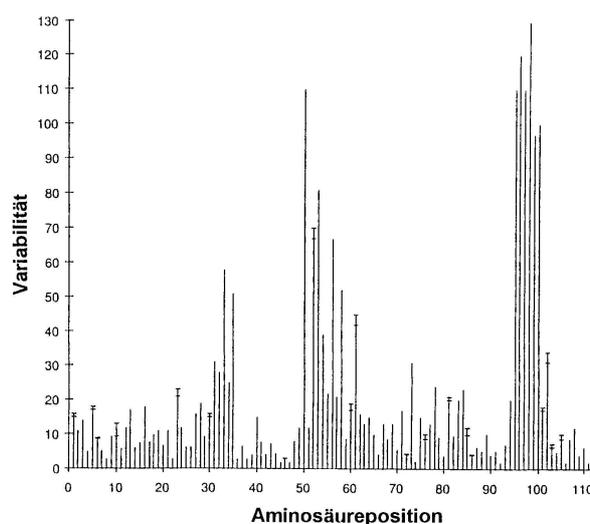
Insgesamt ließen sich 32 funktionelle  $V_{\kappa}$ -Segmente identifizieren, wobei 16 Allele leichte Defekte aufweisen und weitere 25 vermutlich Pseudogene darstellen. Darüber hinaus befinden sich auf den Autosomen 1 und 22 sowie anderer Chromosomen weitere  $V_{\kappa}$ -Elemente, von denen insgesamt 24 ihrer Nukleotidsequenz nach bekannt sind. Die humanen  $\lambda$ -Leichtketten werden von einem 0,8 Mb großen Abschnitt auf Chromosom 22q11.2 determiniert, der *eine*  $V_{\lambda}$ -Region sowie *sieben* ( $J_{\lambda}$ - $C_{\lambda}$ )-Blöcke umfaßt. Über 10  $V_{\lambda}$ -Familien, welche 70 entsprechende Gensegmente aufweisen

sind 14 kb in 5'-Richtung von den genannten Blöcken lokalisiert und beherbergen 7  $J_\lambda$  bzw.  $C_\lambda$  kodierende Allele. Im Gegensatz zur mosaikartigen Struktur humaner  $V_H$ - und  $V_\kappa$ -Elemente sind die insgesamt *drei* verschiedenen Familien zugehörigen  $V_\lambda$ -Gene innerhalb *dreier* distinkter „Cluster“ organisiert, wobei alle vorzugsweise exprimierten  $V_\lambda$ -Allele den ( $J_\lambda$ - $C_\lambda$ )-Blöcken benachbart sind. Es ließen sich signifikante Präferenzen bezüglich der Expression bestimmter  $V_\lambda$ -Allele nachweisen: Beispielsweise stellen 10% der insgesamt 30 verfügbaren  $V_\lambda$ -Gene etwa die Hälfte aller  $V_\lambda$ -Domänen.

## 2.2.6 Somatische Mutationen bei B-Zell Rezeptoren

Analysen der Peptidsequenzen antigenbindender Domänen humaner Immunglobulinleicht- und Schwereketten durch *KABAT* und *WU* zeigten, daß sich deren *idiotypische Variabilität* primär auf *drei* hypervariable Regionen beschränkt, die von relativ konstanten Gerüststrukturen („framework“) separiert werden (209). In jedem Fall weist die antigenbindende CDR3-Domäne der  $Ig_H$ -Kette welche (wie bei TCR) vom  $D_H$ -Segment, dem 3'-Terminus eines gegebenen  $V_H$ -Allels sowie dem 5'-Ende des jeweiligen  $J_H$ -Segmentes gebildet wird, die absolut höchste Variabilität auf (210).

**Abb.14:** Aminosäurevariabilität innerhalb der variablen Regionen humaner  $Ig_H$ -Ketten



[aus R. Nezlin: *General characteristics of immunoglobulin molecules* (211).]

Darüber hinaus besitzt jeder B-Zellklon eine weitere Möglichkeit zur Diversifikation, bei der die Affinität des Rezeptors durch antigeninduzierte somatische Mutationen optimiert wird, wobei die Nukleotidsubstitutionen bevorzugt innerhalb räumlich definierter Loci („hot spots“) auftreten. Durch diese sog. *Hypermutationen* läßt sich die Affinität eines Antikörpers nochmals bis zu  $10^2$ -fach steigern (212; 213). Während konstante Regionen sowie nichtexprimierte V-Allele kaum von derartigen Modifikationen betroffen sind, liegt das Zentrum der somatischen Hypermutationen in den Randbereichen rearrangierter V-Allele, deren hypervariable Regionen bis zu 24 Aminosäuresubstitutionen aufweisen können. Da singuläre Nukleotidtransitionen (A versus T und G versus C) weitaus häufiger als entsprechende Transversionen zu beobachten sind, erfolgen die Mutationsvorgänge mit Sicherheit nicht zufällig. Demgegenüber finden sich Baseninsertionen und -Deletionen, die Einfluß auf das Leseraster besitzen würden nur vergleichsweise selten, was auf der positiven Selektion funktionaler Rezeptoren beruhen dürfte.

### **2.2.7 IgA- und IgM-Schwerkettenrepertoires im humanen Intestinum und im peripheren Blut**

Trotz des gewaltigen Potentials zur Generierung verschiedenster Antigenspezifitäten ist die Diversität von Immunglobulin Rezeptoren während der Ontogenese sowie bei adulten Individuen keinesfalls zufällig. Die ersten, während des fetalen Entwicklungsstadiums exprimierten Antikörpermoleküle werden durch  $V_H$ -Gensegmente determiniert, welche noch in der Keimbahnkonfiguration vorliegen; für diese Rezeptoren ist das Fehlen von „N“-Nukleotiden sowie somatischer Mutationen charakteristisch (214). Während des fetalen bis neonatalen Entwicklungsstadiums werden vorwiegend Allele der  $V_H5$ -,  $V_H6$ - und der  $V_H7$ -Genfamilie exprimiert (215 - 217). Ebenso lassen sich Präferenzen bezüglich des  $V_H$ -Repertoires im Blut gesunder Erwachsener beobachten. Hier werden insbesondere Vertreter der diversen  $V_H3$ - ( $V3$ -23,  $V3$ -30) sowie der  $V_H4$ -Genfamilie ( $V4$ -34,  $V4$ -59) mit erhöhter Frequenz exprimiert (218; 219); auch die Verwendung von  $D_H$ - sowie  $J_H$ -Regionen erfolgt keinesfalls zufällig (207).

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Gewinnung von Untersuchungsmaterial

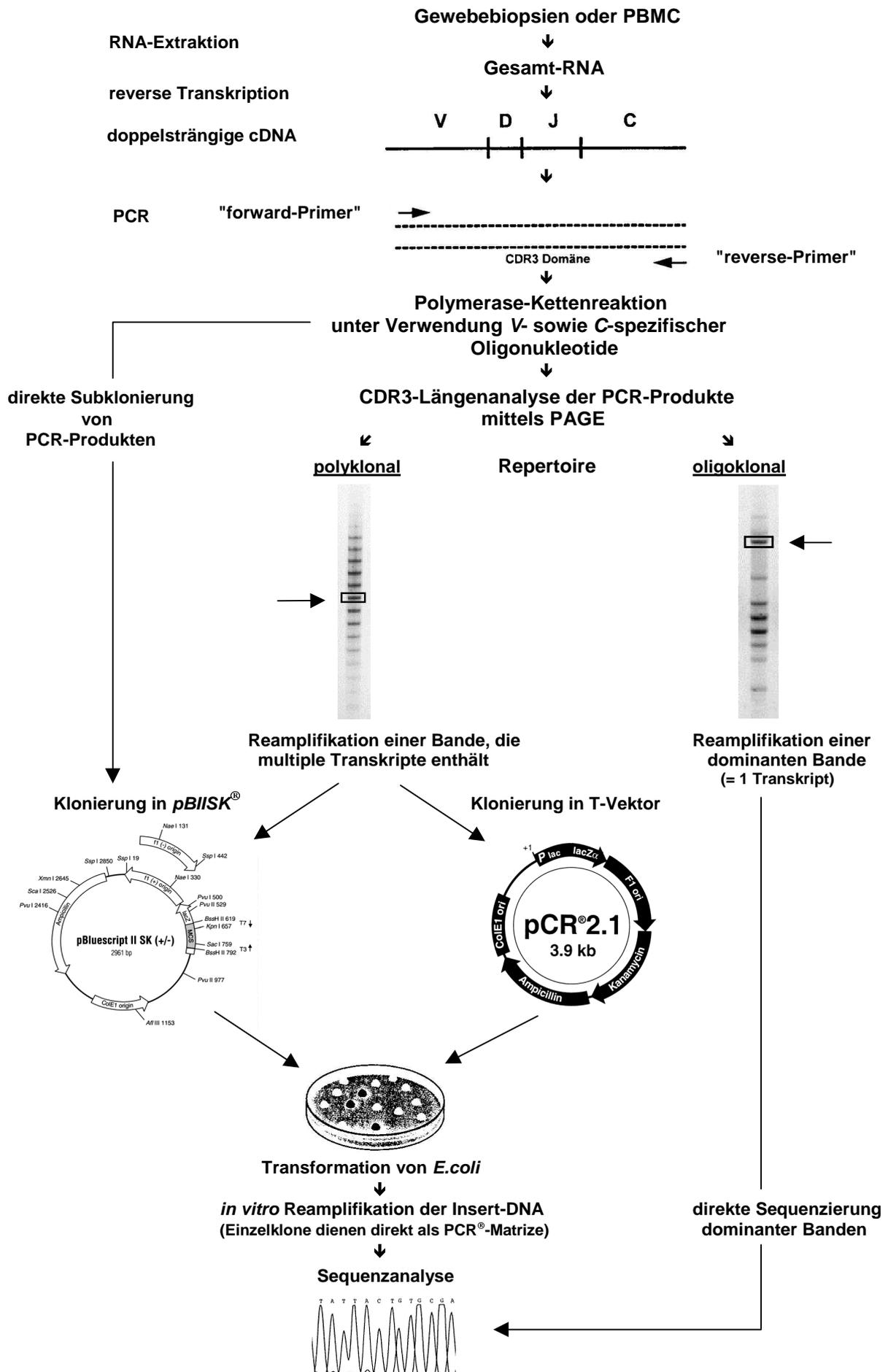
Das Patientenkollektiv bestand aus Personen, welche in der Gastroenterologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II (ZIM) und dem Zentrum für Dermatologie und Venerologie (ZDV) der *Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik* Frankfurt am Main betreut wurden. Weiterhin bestanden Kooperationen mit dem Klinikum der *Johannes Gutenberg-Universität* Mainz, der *Medizinischen Hochschule Hannover* (MHH) sowie der *University of California, San Diego* (UCSD).

Für alle molekularbiologisch charakterisierten CED-Patienten lagen uns detaillierte Anamnesen vor, welche die Existenz chronischer Erkrankungen des *Kolons* bzw. des terminalen *Ileums* zweifelsfrei dokumentierten. Bezüglich der *M.Crohn*-Patienten bestand das entscheidende Einschlußkriterium nicht im klinischen Bild oder dem Aktivitätsindex der Erkrankung, sondern der Existenz klar umschriebener Läsionen, aufgrund derer eine klare Differenzierung zwischen gesunden und pathologisch veränderten Arealen möglich war.

Ausgangsmaterial der Studien bildeten wenige mm<sup>3</sup> messende Biopsien der Darmmukosa, die den CED-Patienten sowie den gesunden Kontrollpersonen im Verlauf endoskopischer Routineuntersuchungen entnommen wurden. Alternativ hierzu standen Gewebeproben chirurgisch gewonnener Resektate des *Kolons* bzw. des terminalen *Ileums* für molekularbiologische Analysen zur Verfügung. Die untersuchten Hautproben (Probeexzisionen, PE) entstammten entweder Personen, welche sich kosmetischen Operationen unterzogen oder Resektaten, die im Verlauf chirurgischer Eingriffe im Rahmen von Tumoroperationen anfielen.

Alle durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission des Klinikums der *JWG-Universität* Frankfurt am Main genehmigt (Geschäfts-Nr. 145/95). Detaillierte Informationen zu den untersuchten Patienten sind den entsprechenden Abschnitten des Ergebnisteils zu entnehmen.

**Abb.15:** Fließschema der experimentellen Strategie zur Analyse von  $\delta$  TCR- und Ig<sub>H</sub>-Rearrangements

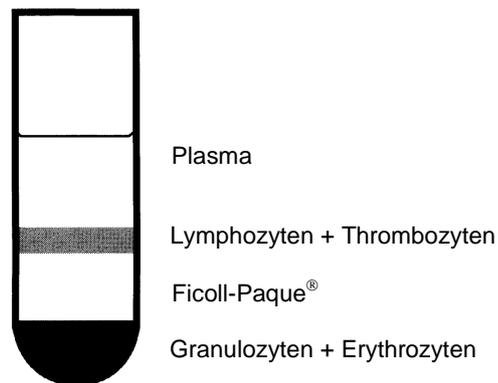


### 3.1.1 Gewebeaufschluß

Um eine Degradierung der RNA weitgehend auszuschließen, wurden die Biopsien unmittelbar nach ihrer Entnahme in spezielle Kryoröhrchen (*NUNC GmbH*, Wiesbaden) überführt und nach Inkubation in flüssigem Stickstoff bis zur weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (*Colora E80*, *HERAEUS INSTRUMENTS*, Hanau) gelagert. Der mechanische Aufschluß des tiefgefrorenen Materials erfolgte unter kontinuierlicher Kühlung mittels elektrisch betriebener Glas/PTFE-Homogenisatoren (*BRAUN*, Melsungen) sowie 1 bis 2 ml einer sauren, Guanidinisothiocyanat enthaltenden Phenollösung (*TRIZOL<sup>®</sup>* Reagenz, *LIFE TECHNOLOGIES<sup>™</sup>*, Karlsruhe), wobei die Gewebeproben in disperse Mischphasen überführt wurden. Die aus Vollblut isolierten mononukleären Zellen (PBMC) wurden nach ihrer Anreicherung über einen *Ficoll-Paque<sup>®</sup>*-Gradienten (vgl. 3.1.2) in jeweils 1 ml *TRIZOL<sup>®</sup>* Reagenz resuspendiert und analog zu den übrigen Zellsaten bis zur Nukleinsäureextraktion bei minus  $80^{\circ}\text{C}$  gelagert (*Colora E80*).

### 3.1.2 Dichtegradienten-Zentrifugation zur *in vitro*-Separation von PBMC aus Vollblut

Parallel zu den Gewebeproben wurde allen Probanden 2 x 10 ml venöses Blut (*S-Monovette<sup>®</sup>*/NH<sub>4</sub>-Heparin, *SARSTEDT*, Nümbrecht) entnommen. Hieraus ließen sich die peripheren Lymphozyten (PBL) mittels *Ficoll-Paque<sup>®</sup>* (*AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH*, Freiburg) sowie einer mit niedriger RCF bei RT durchgeführten Dichtegradientenzentrifugation (*HETTICH ROTANA/TRC*, Nierstein) mit ~ 50%iger Ausbeute anreichern. Das Verfahren beruht darauf, daß die Dichte der Lymphozyten niedriger als diejenige von Granulo- und Erythrozyten liegt. Nach Überschichten von 5 ml *Ficoll-Paque<sup>®</sup>* mit 10 ml eines Vollblut/PBS-Gemisches (50 : 50) in einem 15 ml *Falcon<sup>®</sup>*-Röhrchen (*BECTON-DICKENSON GmbH*, Heidelberg) und 30minütiger Zentrifugation bei 400 x g konnten die Lymphozyten aus der zwischen Blutplasma und geformtem Gradienten lokalisierten Phasengrenzschicht isoliert werden (vgl. Abb.16).

**Abb.16:** Schema der Lymphozytenseparation aus heparinisiertem Vollblut

Ein nachfolgender Waschschrift mit 15 ml 1 x PBS *DULBECCO'S* (*LIFE TECHNOLOGIES*<sup>TM</sup>) oder *RPMI-1640* (*GIBCO BRL*, Karlsruhe) diente der Entfernung verbliebener Thrombozyten. Die Methode erbrachte reproduzierbare Ausbeuten von ca.  $2 \times 10^7$  mononukleären Zellen pro 10 ml venösem  $\text{NH}_4$ -Heparin-Vollblut (vgl. 3.2.1).

### 3.2 Positive Selektion von B-Lymphozyten mittels CD19-spezifischer Antikörperkonjugate

Das zur Zellseparation verwendete MiniMACS-System (*MILTENYI BIOTECH GmbH*, Bergisch Gladbach) gestattete die positive Selektion von  $10^3$  -  $10^7$  B-Lymphozyten mittels CD19-spezifischer, monoklonaler Antikörper (Isotyp: Maus-IgG<sub>1</sub>), die kovalent an paramagnetische „*MicroBeads*“<sup>3</sup> gekoppelt waren. Nach Passage durch sterile 30  $\mu\text{m}$ -Nylonsiebe (*NUNC*) konnten PBMC-Fractionen, welche maximal  $2 \times 10^8$  Einzelzellen enthielten zur direkten Markierung von B-Lymphozyten eingesetzt werden, wobei pro  $10^7$  Gesamtzellen je 20  $\mu\text{l}$  der „*MicroBead*“-Suspension benötigt wurden. Die markierten CD19<sup>+</sup> Zellen ließen sich unter Verwendung spezieller MS<sup>+</sup> Säulen sowie eines Separators, der im wesentlichen aus einem Magneten hoher Feldstärke bestand, vorübergehend an der Säulenmatrix fixieren, wogegen alle unmarkierten Zellen bei Flußraten von  $450 \mu\text{l} \times \text{min}^{-1}$  eliminiert wurden. Nach Entfernung des magnetischen Separators konnten die CD19-positiven B-Lymphozyten mittels 4 ml eines geeigneten Puffers (1 x PBS,  $\text{pH} = 7,2$  + 2 mM EDTA + 0,5% FCS, *LIFE TECHNOLOGIES*<sup>TM</sup>) von der Säule eluiert und nachfolgend quantifiziert werden.

<sup>3</sup> aus Eisenoxid und Polysacchariden bestehende Kügelchen von ca. 50 nm  $\varnothing$

### 3.2.1 Quantifizierung von B- und T-Lymphozyten

Der in der Literatur dokumentierte *klinische Normalwert* beträgt für CD45-positive Lymphozyten 0,9 - 5,2 Zellen  $\times \text{nl}^{-1}$  ( $\text{O}^7$ ), was im arithmetischen Mittel  $3 \times 10^9$  Zellen pro Liter Vollblut entspricht.

Mittels *Ficoll-Paque*<sup>®</sup> (vgl. 3.1.2) angereicherte PBMC bzw. die unter Verwendung des MiniMACS-Systems separierten CD19<sup>+</sup> Lymphozyten wurden zunächst in angemessenen Volumina 1  $\times$  PBS-Puffer (+ 2% FCS) resuspendiert. Den Suspensionen wurden Testaliquots von 10  $\mu\text{l}$  entnommen, diese im Verhältnis von 1 : 10 mit 4%iger Trypanblaulösung (*LIFE TECHNOLOGIES*<sup>™</sup>) versetzt und die Zellzahl mit Hilfe einer *Neubauer*-Kammer (*SUPERIOR*, Marienfeld) mikroskopisch ermittelt (*Axiovert 135*, *CARL ZEISS*, Jena). Der erhaltene Wert wurde durch die Anzahl der Quadranten (= 4) dividiert, mit den Faktoren  $10^4$  und  $10^1$  (= Verdünnung infolge Färbung) sowie 50 bzw. 4 (entsprechend dem jeweiligen Puffervolumen) multipliziert. Die zur Anreicherung von PBL durchgeführten Dichtegradientenzentrifugationen erbrachten reproduzierbare Ausbeuten von  $2 \times 10^7$  PBMC pro 10 ml Vollblut ( $\text{NH}_4$ -Heparin), wobei der Anteil von CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten < 3% lag.

Die folgenden Werte entsprechen den Resultaten von Untersuchungen, welche an zwei gesunden Kontrollpersonen (K1 bzw. K2) unter Verwendung von jeweils 6  $\times$  8 ml venösem ( $\text{NH}_4$ -Heparin) Blut vorgenommen wurden:

**Tab.3:** Quantifizierung von PBMC und CD19-positiven Lymphozyten anhand gesunder Probanden\*

Person	Geburtsdatum	Geschlecht	PBMC in 4 Quadranten	PBMC gesamt	CD19 <sup>+</sup> PBMC in 4 Quadranten	CD19 <sup>+</sup> PBMC gesamt
K1	1964	m	77	$9,6 \times 10^7$ (= 100%)	27	$2,7 \times 10^6$ (= 2,8%)
K2	1969	w	76	$9,5 \times 10^7$ (= 100%)	26	$2,6 \times 10^6$ (= 2,7%)

\* Bei den genannten Zellzahlen handelt es sich um Durchschnittswerte experimentell ermittelter Daten, die prinzipiell einer gewissen Schwankungsbreite unterliegen, da niemals sämtliche B-Lymphozyten markiert werden. Außerdem sind die im Rahmen der Anreicherung auftretenden Verluste zu berücksichtigen.

### 3.2.2 Bestimmung der in RT-Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzten Zellzahlen

Insbesondere bei Rezeptoranalysen quantitativ unterrepräsentierter humaner Immunglobulinfamilien (z.B. V<sub>H6</sub>) mußte ausgeschlossen werden, daß der durch die PAGE (vgl. 3.7) befundete Klonalitätsgrad des Repertoires von der absoluten Menge an Matrizen-DNA abhing. Um den Sättigungsbereich von Polymerase-Kettenreaktionen bezüglich der DNA-„Template“-mengen einzugrenzen, wurden Kontrollexperimente unter Verwendung definierter Zellzahlen durchgeführt. Die quantitative Beziehung zwischen dem in Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzten Volumen an cDNA und der hiermit korrelierenden Anzahl von B- oder T-Lymphozyten ließ sich analog zum folgenden Beispiel ableiten:

Unter Einsatz des MiniMACS-Systems wurden im Fall der Kontrollperson K2 zirka  $2,6 \times 10^6$  CD19-positive Lymphozyten aus 48 ml Vollblut gewonnen (vgl. 3.2.1). Die hieraus extrahierte Gesamt-RNA wurde in 25 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen. Demzufolge war 1 µl der entsprechenden Nukleinsäurepräparation äquivalent zur RNA-Menge aus

$$2,6 \times 10^6 : 25 = 1,0 \times 10^5 \text{ Zellen.}$$

Im Zuge der Reversen Transkription wurden 8 µl dieser RNA-Präparation verwendet, wobei das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 20 µl betrug. Deshalb entsprach 1 µl der synthetisierten cDNA

$$1,0 \times 10^5 \times 8 = 8,3 \times 10^5$$
$$8,3 \times 10^5 : 20 = 4,2 \times 10^4 \text{ Zellen.}$$

Für IgV<sub>H2</sub>- und IgV<sub>H3</sub>-spezifische Polymerase-Kettenreaktionen wurden jeweils 2 µl der cDNA-Matrize eingesetzt. Diese repräsentierten demzufolge das Resultat aus

$$4,2 \times 10^4 \times 2 = 8,3 \times 10^4 \text{ Zellen.}$$

Im Falle IgV<sub>H6</sub>-spezifischer PCRs wurden dagegen 5 µl der entsprechenden cDNA-Präparation verwendet. Folglich korrelierten diese mit dem Einsatz von

$$4,2 \times 10^4 \times 5 = 2,1 \times 10^5 \text{ Zellen.}$$

### 3.3 Isolierung zellulärer Gesamt-RNA

Die Extraktion von Gesamt-RNA bildete eine grundlegende Voraussetzung zur molekularbiologischen Charakterisierung von  $\delta$ -Ketten- und Ig<sub>H</sub>-Transkripten, wobei die Technik prinzipiell auf der von *CHOMCZYNSKI* und *SACCHI* etablierten Methode basierte (220):

Zunächst wurden die in je 1 ml *TRIZOL*<sup>®</sup> resuspendierten Zellhomogenate (Biopsien oder PBMC) zur Auflösung der Nukleoproteinkomplexe 5 min bei RT inkubiert, anschließend 200  $\mu$ l Chloroform (*SIGMA*, Deisenhofen) zugesetzt und beide Phasen durch kräftiges Schütteln (15 s) vollständig homogenisiert. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 10.700 x g (+4°C, *HETTICH Micro 22R*) ließ sich die wäßrige Oberphase abtrennen und die in ihr befindliche Gesamt-RNA durch Zugabe von 500  $\mu$ l 2-Propanol (*SIGMA*) präzipitieren. Die organische Unterphase, welche neben denaturierten Proteinen die gesamte zelluläre DNA enthielt wurde für nachfolgende Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt. Das RNA-Präzipitat wurde durch 10minütige Zentrifugation bei 10.700 x g (+4°C) sedimentiert und nach Entfernung anorganischer Salze mittels 1,3 ml 70%igem Ethanol (*MERCK*, Darmstadt) getrocknet.

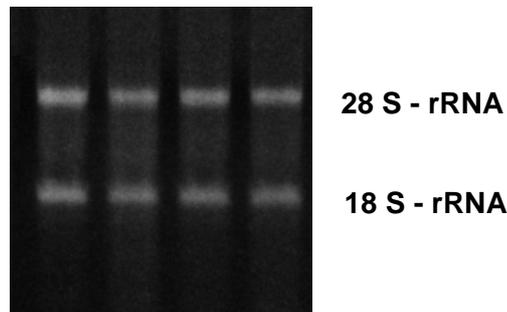
Entsprechend der jeweiligen Nukleinsäureausbeute bzw. der Menge aufgeschlossenen Gewebes wurden die RNA-Präzipitate in 25 - 50  $\mu$ l RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O (*CARL ROTH GmbH*, Karlsruhe) aufgenommen und 10 Minuten bei 55 - 60°C inkubiert (*Thermomixer 5436 EPPENDORF*, Hamburg). Photometrische Vermessungen der wässrigen RNA-Lösungen erbrachten  $A_{260}/A_{280}$ -Quotienten zwischen 1,6 und 1,8 (*HITACHI U-2000 Spectrophotometer*, Eschborn). RNA-Präparationen wurden grundsätzlich bei -80°C aufbewahrt (*Colora E80*).

Die Nukleinsäurekonzentrationen der RNA-Extraktionen ließen sich alternativ unter Verwendung entsprechender Standards (*GIBCO BRL*) auf elektrophoretischem Wege bestimmen, was gleichzeitig eine Qualitätssicherung der Präparationen ermöglichte. Die hierzu eingesetzten 1%igen Agarosegele enthielten neben 4 - 12% (v/v) einer 37%igen Methanallösung (*MERCK*) zusätzlich 25 ppm EtBr (*APPLICHEM*, Darmstadt).

0,5 - 1  $\mu$ l-Aliquots der RNA-Präparationen wurden in 10  $\mu$ l RNase-freiem DEPC-H<sub>2</sub>O (CARL ROTH) aufgenommen, 3  $\mu$ l Probenpuffer (11,5 mM Tris/HCl, p<sub>H</sub> = 8,0 + 62,5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA + 0,05% Bromphenolblau/Xylencyanol, 50% v/v 1-, 2-, 3-Propantriol) zugesetzt und bei einer Spannung von 100 V (PHARMACIA BIOTECH) in 0,5 x TBE-Puffer (45 mM Tris, p<sub>H</sub> = 8,3 + 45 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 1 mM EDTA, alle SIGMA) aufgetrennt. Um einer autokatalytischen Hydrolyse zu begegnen, betrug die Auftrennungsdauer für RNA maximal 30 Minuten.

Durch Anregung der in die Nukleinsäure interkalierten EtBr-Moleküle mit UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 312$  nm (Fluo.Link TFL-20M, BIOMETRA, Göttingen) ließ sich das Resultat der Auftrennung photographisch dokumentieren (POLAROID FOTODYNE®/POLAROID 667). Üblicherweise lag die aus einer Mukosabiopsie isolierte RNA-Menge im Bereich von 10 - 20  $\mu$ g. Neben der Konzentrationsbestimmung ließ die elektrophoretische Auftrennung auch Rückschlüsse auf die Qualität der Nukleinsäurepräparation zu, da intakte Gesamt-RNA typischerweise Fraktionierungen im Größenbereich von ~ 5 kb sowie 2 kb, entsprechend der 28 S bzw. der 18 S rRNA aufweist:

**Abb.17:** Größenfraktionierung zellulärer Gesamt-RNA in der elektrophoretischen Auftrennung



### 3.4 Extraktion genomischer DNA

Nach Isolierung der Gesamt-RNA ließ sich die innerhalb der organischen Phase befindliche genomische DNA durch Zugabe von 300  $\mu$ l 100%igem Ethanol (SIGMA) pro ml eingesetztem *TRIZOL*® präzipitieren und mittels anschließender 5minütiger Zentrifugation bei maximal 2.000 x g (+4°C, HETTICH Micro 22R) sedimentieren. Zur Eliminierung anorganischer Salze wurde das DNA-„Pellet“ nachfolgend 2 x mit 1 ml 100 mM *tri*-Natriumzitat (in 10% EtOH) gewaschen, wobei die Inkubationszeit jeweils 30

Minuten betrug. Die sedimentierte, getrocknete DNA konnte zwecks weiterer Verwendung in DEPC-H<sub>2</sub>O (alternativ 8 mM NaOH) gelöst werden, wobei die Konzentrationsbestimmung entweder photometrisch<sup>4</sup> oder auf elektrophoretischem Wege erfolgte.

### 3.5 Reverse Transkription von RNA (cDNA-Synthese)

Mittels rekombinanter *MMLV*-reverser Transkriptase (*SuperScript™ II*, LIFE TECHNOLOGIES™) sowie kurzer pd (T)<sub>12-18</sub>-Oligonukleotide (*AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH*) konnte der polyadenylierte mRNA-Anteil *in vitro* in korrespondierende cDNA umgeschrieben werden, welche in allen nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktionen (vgl. 3.6) als Matrizenmolekül fungierte. Generell fand die Reverse Transkription unter Einsatz von 1 - 2 µg Gesamt-RNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl statt. Nach thermischer Denaturierung der RNA wurde jedem RT-Ansatz 8 µl eines speziellen „Master-Mix“ hinzugefügt, welcher alle erforderlichen Reaktionskomponenten inklusive des Enzyms enthielt. Die cDNA-Synthese erfolgte während eines 60minütigen Inkubationsintervalls bei 40°C unter Einsatz eines Thermal„cyklers“ (*Cetus 480™*, PE APPLIED BIOSYSTEMS, Weiterstadt), wobei sich alle Reaktionsparameter bezüglich Nukleotidkonzentration sowie eingesetzter Aktivität an den Empfehlungen des Enzymherstellers orientierten:

#### chemische Parameter

Gesamt-RNA	1 - 5 µg	
<i>SuperScript™ II</i>	200 U <sup>5</sup>	
5'-pd (T) <sub>12-18</sub> -3'	100 ng	
dNTP	50 µM	(pro Nukleotid)
DTT	10 mM	
KCl	75 mM	
MgCl <sub>2</sub>	3 mM	
Tris-/HCl p <sub>H</sub> = 8,3 (20°C)	50 mM	

#### physikalische Parameter

65° C	10' ⇨	Denaturierung der RNA
0° C	10' ⇨	Zugabe von <i>MMLV</i> -RT
40° C	60' ⇨	cDNA-Synthesephase
75° C	15' ⇨	Enzyminaktivierung
4° C	∞	

Die Effizienz der reversen Transkription von RNA, welche in *doppelsträngigen* DNA-Molekülen resultierte, ließ sich aufgrund von Test-Polymerase-Kettenreaktionen unter Verwendung interner Standards, d.h. cDNA-Matrizenpräparationen bekannter Eigenschaften beurteilen.

<sup>4</sup> eine A<sub>260</sub>-Einheit entspricht 50 µg dsDNA x ml<sup>-1</sup>

<sup>5</sup> Ein Unit (U) definiert diejenige RT-Aktivität, welche 1 nmol dNTP innerhalb von 10 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 37°C unter Verwendung von oligo-(dT)<sub>25</sub> in TCA-präzipitierbare DNA überführt.

### 3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR®)

Symmetrische Polymerase-Kettenreaktionen unter Einsatz von 100 ng doppelsträngiger cDNA oder chromosomaler Gesamt-DNA als Matrize bildeten einen zentralen experimentellen Ansatz der molekularbiologischen Analyse von  $\delta$  TCR- und IgV<sub>H</sub>-Repertoires. Üblicherweise wurden Standard-Polymerase-Kettenreaktionen mit 35 bis 39 Zyklen gefahren. Den kritischsten Reaktionsparameter bildete die Wahl der Hybridisierungstemperatur, da diese unmittelbaren Einfluß auf die Stringenz der Reaktion bzw. die Spezifität der PCR-Produkte besaß. Polymerase-Kettenreaktionen wurden generell in einem Reaktionsvolumen von 100  $\mu$ l unter Verwendung der Thermalcykler *Cetus 480*<sup>TM</sup>, *GeneAmp*<sup>®</sup> *PCR Systeme 2400, 9600* bzw. *9700*, (alle *PE APPLIED BIOSYSTEMS*, Weiterstadt) durchgeführt.

Zur *in vitro* Amplifikation humaner  $\delta$ -**Kettentranskripte** von  $\gamma/\delta$  TCR kamen folgende Oligonukleotide (*EUROGENTEC GERMANY*, Darmstadt) zum Einsatz:

$\delta$  TCR PCR - „Primer“  $\Leftrightarrow$  Matrize = RNA (cDNA)

TCRDV1	5' CAG CCT TAC AGC TAG AAG ATT CAG C	3'	$T_m = 74^\circ\text{C}^6$
TCRDV2	5' GCA CCA TCA GAG AGA GAT GAA GGG	3'	$T_m = 74^\circ\text{C}$
TCRDV3	5' TCA CTT GGT GAT CTC TCC AGT AAG G	3'	$T_m = 74^\circ\text{C}$
TCRDC1	5' AAA CGG ATG GTT TGG TAT GAG GC	3'	$T_m = 68^\circ\text{C}$

$\delta$  TCR Klonierungs - „Primer“ (enthalten Erkennungssequenzen für *SalI* bzw. *NotI*)

DV1-CLONE	5' ATA <u>AGT CGA CCT</u> GTA TGA AAC AAG TTG GTG G	3'
	<i>SalI</i>	
DV2-CLONE	5' ATA <u>AGT CGA CCA</u> CCC TCA GGT GCT CCA TGA A	3'
	<i>SalI</i>	
DV3-CLONE	5' ATA <u>AGT CGA CTG</u> GTA CTG CTC TGC ACT TAC G	3'
	<i>SalI</i>	
TCRDC2	5' TTA TGA ATG <u>CGG CCG CTC</u> TGT TAT CTT CTT GGA TGA CAC G	3'
	<i>NotI</i>	

<sup>6</sup> entsprechend der  $2^\circ\text{C}$  (A/T) +  $4^\circ\text{C}$  (G/C) - Regel

**δ TCR Intron - „Primer“** ⇨ Matrize = chromosomale DNA

JD1-DNA 5' CCT TAG ATG GAG GAT GCC TTA ACC 3'  $T_m = 72^\circ\text{C}$

JD3-DNA 5' CAG TGC CAG GAC TCA AAT TAT CCC 3'  $T_m = 72^\circ\text{C}$

**δ TCR Sequenzierungs - „Primer“**

TCR-Seq 5' AAC GGA TGG TTT GGT ATG 3'  $T_m = 52^\circ\text{C}$

Zur Analyse der CDR3-Domänen humaner **Immunglobulin-Schwerkettentranskripte** fanden folgende Oligonukleotide (*MWG AG BIOTECH*, Ebersberg) Verwendung:

**Ig<sub>H</sub> PCR - „Primer“** ⇨ Matrize = RNA (cDNA)

V<sub>H</sub>1-SHORT 5' ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TC 3'  $T_m = 72^\circ\text{C}$

V<sub>H</sub>2-SHORT 5' ATG ACC AAC ATG GAC CCT GTG G 3'  $T_m = 68^\circ\text{C}$

V<sub>H</sub>3-SHORT 5' TGT ATC TGC AAA TGA ACA GCC TG 3'  $T_m = 66^\circ\text{C}$

V<sub>H</sub>4-SHORT 5' AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG C 3'  $T_m = 66^\circ\text{C}$

V<sub>H</sub>5-SHORT 5' TGG AGC AGC CTG AAG GCC TCG 3'  $T_m = 70^\circ\text{C}$

V<sub>H</sub>6-SHORT 5' AAG TCG AAT AAC CAT CAA CCC AG 3'  $T_m = 66^\circ\text{C}$

V<sub>H</sub>7-SHORT 5' TTG GAC ACC TCT GTC AGC ACG G 3'  $T_m = 70^\circ\text{C}$

C<sub>α</sub> 5' CTC AGC GGG AAG ACC TTG GG 3'  $T_m = 66^\circ\text{C}$

C<sub>μ</sub> 5' ACG AGG GGG AAA AGG GTT GGG G 3'  $T_m = 72^\circ\text{C}$

**IgV<sub>H</sub> Klonierungs - „Primer“** (variable Region; sie enthalten die Erkennungssequenz für *SalI*)

V<sub>H</sub>1-CLONE 5' ATA AGT CGA CAT GGA GCT GAG CAG CCT GAG ATC 3'  
*SalI*

V<sub>H</sub>2-CLONE 5' ATA AGT CGA CAT GAC CAA CAT GGA CCC TGT GG 3'  
*SalI*

V<sub>H</sub>3-CLONE 5' ATA AGT CGA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG 3'  
*SalI*

V<sub>H</sub>4-CLONE 5' ATA AGT CGA CAA GAA CCA GTT CTC CCT GAA GC 3'  
*SalI*

V<sub>H</sub>5-CLONE 5' ATA AGT CGA CTG GAG CAG CCT GAA GGC CTC G 3'  
*SalI*

V<sub>H</sub>6-CLONE 5' ATA AGT CGA CAA GTC GAA TAA CCA TCA ACC CAG 3'  
*SalI*

**Ig<sub>H</sub> Klonierungs - „Primer“** (konstante Region; sie enthalten die Erkennungssequenz für *NotI*)

C $\alpha$ -CLONE 5' TTA TGA ATG CGG CCG CCT CAG CGG GAA GAC CTT GGG 3'  
*NotI*

C $\mu$ -CLONE 5' TTA TGA ATG CGG CCG CAC GAG GGG GAA AAG GGT TGG GG 3'  
*NotI*

**Ig<sub>H</sub> Sequenzierungs - „Primer“** (konstante Region)

C $\alpha$ -Seq 5' TCA GCG GGA AGA CCT TG 3' T<sub>m</sub> = 54°C

Alle aufgeführten IgV<sub>H</sub>-spezifischen Oligonukleotide wurden anhand von DNA-„Alignments“ abgeleitet und erlaubten die Vervielfältigung der meisten Mitglieder einer Genfamilie. Prinzipiell konnten mittels dieses Ansatzes nicht sämtliche Transkripte großer V<sub>H</sub>-Familien simultan amplifiziert werden, da somatische Hypermutationen innerhalb des 3'-Terminus' der V<sub>H</sub>-Domänen potentiell mit der Hybridisierung derartiger Konsensus-„Primer“ interferieren. Bezüglich der IgA-Transkripte befand sich der 3'-terminale Konstant-„Primer“ innerhalb eines konservierten DNA-Bereiches, welcher sowohl in der C $\alpha$ 1- als auch der C $\alpha$ 2-Region vorliegt (221). Demzufolge resultierten IgA-spezifische Polymerase-Kettenreaktionen gleichermaßen in der Vervielfältigung von IgA<sub>1</sub>- sowie IgA<sub>2</sub>-Transkripten. Die C $\alpha$ - und C $\mu$ -„Primer“ wurden so „konstruiert“, daß die Distanz zwischen ihren 3'-Termini und dem Carboxy-Terminus der J<sub>H</sub>-Region konstant war.

**3.6.1 Automatisierter „Hot-Start“ mittels *AmpliTaQ Gold*<sup>™</sup> DNA Polymerase**

Um die Stringenz der Polymerase-Kettenreaktionen zu optimieren, wurde die rekombinante *Taq* DNA Polymerase (= DNA Desoxynukleotidyltransferase, EC 2.7.7.7 aus *Thermus aquaticus*, BOEHRINGER, Mannheim) nach erfolgter thermischer Denaturierung der Matrize bei einer Temperatur, die > 10°C über den T<sub>m</sub>-Werten der jeweiligen Oligonukleotide lag, manuell zugesetzt. Dieses Verfahren erwies sich bezüglich des Ausschlusses unspezifischer PCR-Produkte als effizient, barg jedoch die Gefahr von Kreuzkontaminationen.

Bei der später ausschließlich verwendeten *AmpliTaQ Gold*<sup>™</sup> DNA Polymerase (*PE APPLIED BIOSYSTEMS*) handelte es sich um eine chemisch modifizierte Form des thermostabilen Enzyms aus *Thermus aquaticus*, die bei RT keine enzymatische Aktivität aufwies. Ihre Aktivierung erfolgte erst während der initialen 10minütigen Matrizen-

denaturierung, d.h. bei Temperaturen  $> 90^{\circ}\text{C}$ . Aufgrund dieser Eigenschaft konnte die genannte DNA Polymerase unmittelbar dem Mastermix zugesetzt werden, der somit - abgesehen von der Matrizen-DNA - sämtliche für Polymerase-Kettenreaktionen benötigten Komponenten enthielt, was die Kreuzkontaminationsgefahr drastisch reduzierte. Die mittels *AmpliTaQ Gold*<sup>™</sup> Polymerase erhaltenen Resultate entsprachen in qualitativer und quantitativer Hinsicht denjenigen, welche bei Einsatz des „konventionellen“ Enzyms erzielt wurden. Standard-PCR Ansätze entsprachen den Vorgaben der jeweiligen Enzymhersteller und wiesen folgende Parameter auf:

<u>chemische Parameter</u>		<u>physikalische Parameter</u>	
Matrizen-DNA	100 ng	95° C	10' $\Rightarrow$ initiale Denaturierung
Taq DNA-Polymerase	2,5 U <sup>7</sup>		
„forward“-Primer	25 pmol	95° C	40'' $\Rightarrow$ Denaturierung der DNA
„reverse“-Primer	25 pmol	61° C	50'' $\Rightarrow$ Primer-Hybridisierung
dNTP	150 $\mu\text{M}$ (pro Nukleotid)	72° C	60'' $\Rightarrow$ DNA-Synthesephase
KCl	50 mM		
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	72° C	10' $\Rightarrow$ terminale DNA-Synthese
Tris-/HCl $p_{\text{H}} = 8,3$ (20°C)	10 mM	4° C	$\infty$

Üblicherweise lag die Synthesefehlerrate der Taq DNA Polymerase - bezogen auf die durchschnittliche Mutationsfrequenz pro Base und durchlaufenem Reaktionszyklus - in der Größenordnung von  $8 \times 10^{-6}$  (Herstellerangabe).

### 3.6.2 Agarose-Flachbettgelelektrophorese zur analytischen Auftrennung von PCR-Produkten

Erste Analysen der 0,15 - 0,25 kb großen PCR-Produkte wurden durch elektrophoretische Auftrennung unter Einsatz von Agarosegelen vorgenommen, welche 2 g des komplexen Polysaccharids (*BIOZYM*, Hess. Oldendorf) in 100 ml 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris,  $p_{\text{H}} = 8,3$  + 89 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 2 mM EDTA, alle *SIGMA*) sowie 2,5 ppm EtBr (*APPLICHEM*) enthielten. Die aus 15  $\mu\text{l}$  PCR-Probe und 5  $\mu\text{l}$  Probenpuffer (11,5 mM Tris-/HCl,  $p_{\text{H}} = 8,0$  + 62,5 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  + 0,05% Bromphenolblau/Xylencyanol, 50% v/v Glycerin) bestehenden Testansätze wurden mit Feldstärken von 5 - 8  $\text{V} \times \text{cm}^{-1}$  (*Consort E443/E835*, *FRÖBEL LABORTECHNIK*, Wasserburg) aufgetrennt. Bei einer angelegten Spannung von 120 V benötigte die Fragmentmigration über die 15 cm lange Trennstrecke durchschnittlich 85 min.

<sup>7</sup> Ein Unit (U) definiert diejenige DNA Polymeraseaktivität, welche 10 nmol dNTP innerhalb von 30 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 74°C in TCA-präzipitierbare DNA überführt.

Zur Detektion der in die DNA interkalierten EtBr-Moleküle wurde die Gelmatrix anschließend auf einem Transilluminator (*Fluo.Link TFL-20M, BIOMETRA*) mit hochenergetischem<sup>8</sup> UV-Licht der Wellenlänge  $\lambda = 312$  nm bestrahlt. Mit Hilfe einer speziellen photographischen Einrichtung (*POLAROID FOTODYNE®/POLAROID 667*) konnten die im sichtbaren Spektralbereich ( $E_{\text{max.}} = 590$  nm) emittierten Signale dokumentiert werden, wobei die Nachweisgrenze des Systems im Bereich von 25 ng DNA pro Auftrennungsspur lag. Als Größenstandard diente 1  $\mu\text{g}$  einer synthetischen 100 bp DNA-„Leiter“ (*LIFE TECHNOLOGIES™*), welche 15 Klassen von „blunt-end“ DNA-Fragmenten im Längenbereich zwischen 0,1 und 1,5 kb enthielt.

### 3.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Im Vergleich zur Agarose-Gelelektrophorese erlaubten Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter Verwendung 6%iger, denaturierender DNA-Sequenziergele deutlich exaktere Längenaufftrennungen multipler PCR-Produkte. Das extreme Auflösungsvermögen der PAGE gestattete Separierungen von DNA-Fragmenten, deren Längen lediglich um ein Nukleotid voneinander differierten. Zudem lag die Sensitivität dieses Systems mit  $\sim 1$  ng DNA pro Auftrennungsspur gegenüber EtBr-gefärbten Agarosegelen annähernd um den Faktor 30 höher.

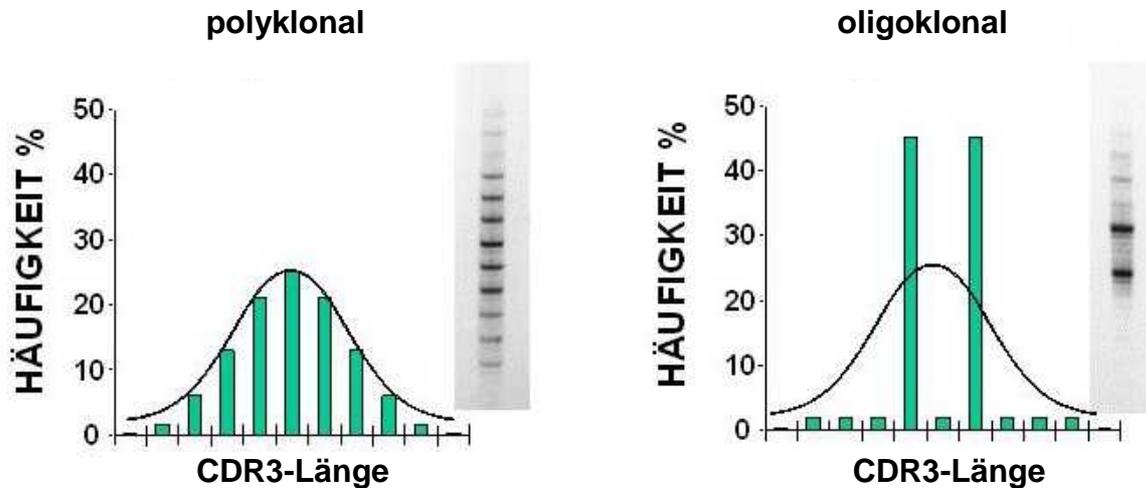
Das vertikale *BaseAce™*-Sequenziergerät (*STRATAGENE*) erforderte eine manuelle Herstellung der Polyacrylamidgele. Ein Liter gebrauchsfertiger 6%iger Polyacrylamidlösung enthielt neben 150 ml 40%iger (19 : 1) Acrylamid-/Bisacrylamidlösung (*Rotiphorese Gel 40,® ROTH*) 7 mol Kohlendiamid (*APPLICHEM*) in 350 ml HPLC-H<sub>2</sub>O (*MALLINCKRODT BAKER, Griesheim*) sowie 100 ml 10 x TBE-Stammlösung (890 mM Tris,  $\text{pH} = 8,3$  + 890 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> + 10 mM EDTA). Zur Herstellung einer denaturierenden Trennmatrix wurden 80 ml der 6%igen Polyacrylamidlösung mit 800  $\mu\text{l}$  10%iger APS-Lösung (*APPLICHEM*) sowie 14  $\mu\text{l}$  TEMED (*FLUKA*) versetzt und in eine aus zwei Glasplatten unterschiedlicher Länge bestehende, 30 x 40 cm messende „Sandwich“-Konstruktion (*STRATAGENE*) gefüllt. Nach 3minütiger thermischer Denaturierung bei 97°C wurden 2,5 - 4  $\mu\text{l}$ -Aliquots der aus je 7  $\mu\text{l}$  PCR-Probe sowie 5  $\mu\text{l}$  Puffer (80% Formamid + 10 mM NaOH + 0,05% Bromphenolblau/Xylencyanol, alle *SIGMA*) bestehenden Testansätze in die 64 Rechteckkammern pipettiert.

<sup>8</sup> 500 mW x cm<sup>-2</sup>

Polyacrylamid-Gelelektrophoresen erforderten Spannungen zwischen 1,6 und 1,8 kV (*Power Pac 3000*, *BIO-RAD* München), wobei die Fragmentmigration über eine effektive Trennstrecke von 30 cm in Abhängigkeit von der Umgebungstemperatur zwischen 120 und 180 Minuten benötigte. Sobald sich die Xylencyanol-Lauffront dem anodischen Gelende auf eine Distanz von 8 - 10 cm näherte, wurde die Stromzufuhr unterbrochen und die DNA-Fragmente durch Silberfärbung gemäß Vorschrift des *Silver Sequence™ DNA Sequencing Systems* (*PROMEGA DEUTSCHLAND*, Mannheim) sichtbar gemacht. Im Gegensatz zu radioaktiven Verfahren unter Verwendung <sup>32</sup>P- bzw. <sup>35</sup>S-markierter Oligonukleotide gestatteten Silberfärbungen direkte Isolierungen von Einzelbanden unter Sichtkontrolle; zudem war deren Darstellung überaus präzise, da keine Signalstreuung stattfand.

Sequenzanalysen zeigten, daß sich die Längen intestinaler  $\delta$ -Transkripte exakt um 3 Basenpaare voneinander unterschieden was darauf beruhte, daß die Mehrzahl aller Transkripte im korrekten Leseraster vorlag und somit potentiell in funktionelle Rezeptoren translatiert werden konnte. Die Intensität einzelner Banden korrelierte mit den Expressionsstärken der entsprechenden Transkripte, was eine Identifizierung dominanter Rezeptoren erlaubte. *Polyklonale* Rezeptor Repertoires waren im „CDR3-Spectratyping“ dadurch gekennzeichnet, daß die relative Häufigkeit eines Transkriptes gegebener Länge einer *Normalverteilungskurve* folgte, wobei Banden mittlerer Länge quantitativ dominierten. Demgegenüber zeichneten sich *oligoklonale* Repertoires, welche auf Expansionen bestimmter Rezeptoren beruhten dadurch aus, daß keine Gauß'sche Korrelation zwischen Länge und relativer Häufigkeit eines Transkriptes bestand (vgl. Abb.18).

Das „CDR3-Spectratyping“ ermöglichte nicht nur qualitative Beurteilungen von Expressionsmustern; vielmehr ließen sich interessierende Fragmente aus der Gelmatrix isolieren und deren Nukleotidabfolgen nach direkter Sequenzierung oder Subklonierung (vgl. 3.8 f.f.) miteinander vergleichen.

**Abb.18:** Poly- und oligoklonale CDR3-Profile in der denaturierenden PAGE

### 3.7.1 Dokumentation der PAGE

Nach dem Trocknen der Gelmatrix konnten die silbergefärbten DNA-Banden unter Verwendung eines speziellen APC<sup>9</sup>-Positivfilms (*Typopaque TR-Do 18*, *TYPON GRAPHIC SYSTEMS AG*, Burgdorf, CH) sowie einer hierauf abgestimmten Belichtungseinheit (*prolite5000*, *KAISER FOTOTECHNIK*, Buchen) permanent dokumentiert werden. In Abhängigkeit vom jeweiligen Hintergrund sowie der Bandenintensität variierten die Expositionszeiten zwischen 16 und 25 Sekunden, wobei sich Belichtungsintervalle von 2 Sekunden als optimal erwiesen. Die Entwicklung der photographischen Emulsion erfolgte innerhalb von 90 s mittels eines vollautomatischen Prozessorsystems (*Cronex T5A*, *DUPONT DE NEMOURS*, Neu-Isenburg).

Für Publikationszwecke wurden die photographischen Abbildungen digitalisiert (*Snap Scan600/Foto Look*,<sup>®</sup> *AGFA-GEVAERT*, Mortsel, NL) und die entsprechenden TIFF-Dateien nach Import in die PC-Programme *MICROSOFT*<sup>®</sup> *Photoeditor*<sup>®</sup> 3.0 sowie *MS PowerPoint*<sup>®</sup> 97 den jeweiligen Erfordernissen angeglichen.

<sup>9</sup> automatic processor compatible

### 3.8 Subklonierung von Rezeptortranskripten

#### 3.8.1 Isolierung und Reamplifikation definierter DNA-Fragmente

Nach photographischer Dokumentation der PAGE wurden ausgewählte dominante DNA-Banden, deren Nukleotidsequenzen bestimmt werden sollten aus der Gelmatrix isoliert und das Material in jeweils 50 µl HPLC-H<sub>2</sub>O (*MALLINCKRODT BAKER*) überführt. Reamplifikationen der eluierten Banden, welche unter Einsatz von je 2 µl Fragmentpräparation als PCR-Matrize stattfanden, wurden nachfolgend mittels Agarosegelelektrophorese validiert. Die direkte Sequenzierung singulärer Banden erbrachte in ca. 50% aller Fälle *keine* lesbare Nukleotidsequenz was ursächlich darauf beruhte, daß innerhalb einer isolierten Bande multiple Transkripte identischer Länge, jedoch divergenter Basenabfolgen vorlagen. In diesem Fall mußten die DNA-Banden vor ihrer Sequenzierung zunächst subkloniert werden.

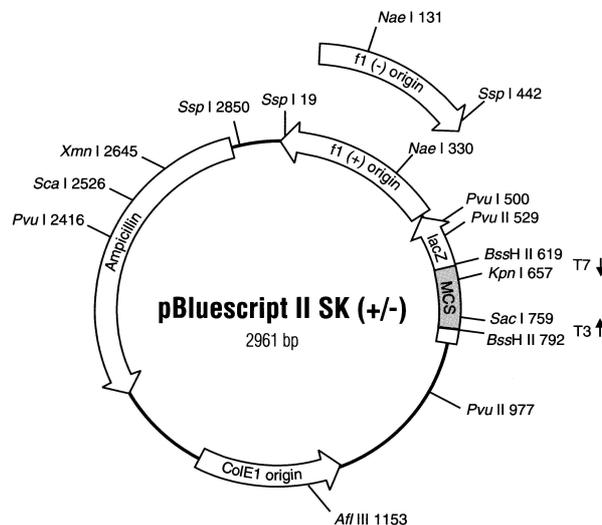
#### 3.8.2 Subklonierung von Rezeptortranskripten definierter CDR3-Länge

Wie unter Punkt 3.8.1 angedeutet, waren die Nukleotidsequenzen einzelner Banden im Falle polyklonaler Expressionsmuster oftmals nicht direkt bestimmbar.

Um innerhalb einer Bande vorliegende multiple Rezeptortranskripte voneinander zu separieren, bot sich deren Subklonierung unter Verwendung spezieller Vektorsysteme (*pBIISK*<sup>®</sup> oder *pCR*<sup>®</sup> 2.1) an. Nach der Ligation modifizierter PCR-Produkte (vgl. 3.8.6) mit linearisierten Klonierungsvektoren ließen sich die rekombinanten Produkte in äquivalente prokaryontische Rezipienten einschleusen und positive Transformanten mittels geeigneter Detektionssysteme identifizieren. Einzelkolonien transformierter *E.coli*-Klone konnten anschließend unmittelbar als Matrize für Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt werden, die zur weiteren Vervielfältigung der „Insert“-DNA dienten. Die Basenabfolgen derart erhaltener PCR-Produkte wurden wie unter Abschnitt 3.9 f.f. beschrieben bestimmt.

### 3.8.3 Das *pBluescript*<sup>®</sup> II Phagemid-Vektorsystem

**Abb.19:** Karte des Klonierungsvektors *pBluescript*<sup>®</sup> II SK (+/-) (STRATAGENE)



Bei dem Vektor *pBluescript*<sup>®</sup> II SK (+/-) (STRATAGENE, GenBank<sup>®</sup> # X52382) handelt es sich um ein 2,96 kb großes pUC19-Derivat, das aufgrund seines artifiziellen „Polylinkers“ (mcs) *in vitro*-Rekombinationen mit entsprechend restringierten Insertmolekülen erlaubt (vgl. Abb.19). Unter Nutzung dieses Klonierungssystems bietet sich die Verwendung des hierauf abgestimmten *E.coli*-Stammes Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue (STRATAGENE) an, welcher folgenden Genotyp aufweist:

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>lacZΔM15 Tn10* (Tet<sup>r</sup>)]

XL1-Blue verfügt unter anderem über ein F'-Episom, welches für eine N-terminal deletierte (AS 11 - 41), enzymatisch *inaktive*  $\beta$ -Galaktosidase kodiert (*lacZΔM15*). Transformationen mit pUC19-Derivaten führen infolge der Koexpression von wirtskodiertem C-Terminus sowie plasmidkodiertem N-Terminus zur *trans*-Aktivierung des Enzyms ( $\alpha$ -Komplementation), was eine blau/weiß-Selektion rekombinanter Organismen in Anwesenheit synthetischer Substrate (X-Gal) ermöglicht. Gegenüber dem T-Vektorsystem (vgl. 3.8.5) weisen Klonierungen unter Verwendung des *pBluescript*<sup>®</sup> II Phagemids (STRATAGENE) den Vorzug definierter Insertorientierungen auf, erfordern jedoch den Einsatz speziell konstruierter Klonierungs-„Primer“ bzw. entsprechend restringierter PCR-Produkte (vgl. 3.8.4). Neben dem methodisch höheren Aufwand impliziert die Verwendung von Klonierungs-„Primern“ zudem potentiell

Interferenzen zwischen den artifiziellen Schnittstellen und der Matrizen-DNA, wobei der Einfluß beeinträchtigter Bindungscharakteristiken auf die Untersuchungsergebnisse insbesondere im Fall von Ig<sub>H</sub>-Transkripten kaum einschätzbar ist.

### 3.8.4 DNA-Restriktionsverdau

Die für Klonierungen in *pBlISK*<sup>®</sup> verwendeten PCR-„Primer“ (vgl. 3.6) wiesen artifizielle palindromische Erkennungssequenzen für die Typ II-Restriktionsendonukleasen *NotI* (aus *Nocardia otitidis cavarum*) bzw. *SaI* (aus *Streptomyces albus G*, beide *NEW ENGLAND BIOLABS*<sup>®</sup> Inc., Schwalbach) auf. Aufgrund bestehender Kompatibilität beider benötigter Puffersysteme wurden sowohl die PCR-Produkte als auch der Vektor Doppelverdau unterzogen, wobei die Restriktionsansätze Gesamtvolumina von 100 µl besaßen und folgende Komponenten enthielten:

<u>Insert-DNA</u>		<u>Vektor-DNA</u>	
PCR-Produkt	1 - 2 µg	<i>pBluescript</i> <sup>®</sup> II SK (+)	1 µg
<i>NotI</i>	2 U <sup>10</sup>	dto.	
<i>SaI</i>	4 U		
BSA	10 µg		
DTT	1 mM		
MgCl <sub>2</sub>	10 mM		
NaCl	150 mM		
Tris-/HCl p <sub>H</sub> = 7,9 (25°C)	10 mM		

Alle Restriktionsansätze wurden 16 h im Zellkulturschrank (*BB 6220, HERAEUS INSTRUMENTS*) bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

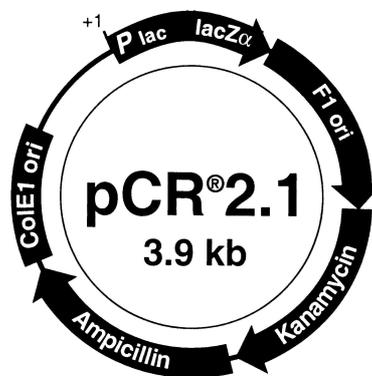
### 3.8.5 Das „T-Vektor“-Klonierungssystem

Unter Verwendung des „*Original TA Cloning*<sup>®</sup> Kits“ (*INVITROGEN*<sup>®</sup> BV, CH Groningen, NL) ließen sich auch mittels Standard„primern“ synthetisierte PCR-Produkte ohne weitere Vorbereitung direkt subklonieren. Dieses System basiert auf der intrinsischen TdT-Aktivität der *Taq* DNA Polymerase, die zur Synthese doppelsträngiger DNA-Amplikons führt, welche 3'-terminale (d)A-Additionen aufweisen (vgl. 3.6.1). Der in linearisierter Form vorliegende, 3,9 kb große Vektor *pCR*<sup>®</sup> 2.1 (*INVITROGEN*<sup>®</sup>) verfügt seinerseits über singuläre, 3'-terminal lokalisierte (d)T-Überhänge. Prinzipiell ermöglicht

<sup>10</sup> Ein Unit (U) definiert diejenige Restriktionsendonuklease-Aktivität, welche 1 µg Substrat-DNA innerhalb von 60 Minuten unter den jeweils erforderlichen Inkubationsbedingungen in einem Reaktionsvolumen von 50 µl vollständig hydrolysiert.

diese Klonierungsstrategie - vergleichbar der „blunt-end“ Ligation - inverse Orientierungen des Inserts, wobei die Rekombinationseffizienz derjenigen von „sticky-end“ Ligationen entspricht. Analog zum *pBlISK*<sup>®</sup>-System ist der Vektor *pCR*<sup>®</sup>2.1 zur  $\alpha$ -Komplementation einer N-terminal deletierten  $\beta$ -Galaktosidase befähigt, was die blau/weiß-Selektion positiver Transformantenklone ermöglicht. Neben der  $\beta$ -Laktamase (Ampicillin/Carbenicillin-Resistenz) kodiert *pCR*<sup>®</sup>2.1 für eine Aminoglykosid-Phosphotransferase-Aktivität,<sup>11</sup> welche Kanamycinresistenz verleiht:

**Abb.20:** Schematische Darstellung des „T-Vektors“ *pCR*<sup>®</sup>2.1 (*INVITROGEN*)



Das *TA*-Klonierungssystem sieht die Verwendung des *E.coli*-Rezipientenstammes *One shot*<sup>™</sup> *INV* $\alpha$ F' vor, der folgenden Genotyp aufweist:

F' *endA1 recA1 hsdR17* (*r<sub>k</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>k</sub><sup>+</sup>*) *supE44 thi-1 gyrA96 relA1*  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ **M15**  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169  $\lambda$ <sup>-</sup>

Im Gegensatz zum oben beschriebenen Stamm XL1-Blue (*STATAGENE*) besitzt *INV* $\alpha$ F' keinen *lac* Repressor, weshalb die entsprechenden Strukturgene konstitutiv exprimiert werden und der synthetische Induktor IPTG keinen Effekt zeigt.

### 3.8.6 Generierung rekombinanter Plasmide durch Ligation

Im Gegensatz zum ursprünglich für Ligationen verwendeten *KLENOW*-Fragment der DNA Polymerase I (aus *E.coli*) erstreckt sich die Substratspezifität der aus dem Bakteriophagen T<sub>4</sub> stammenden DNA Ligase (*NEB*<sup>®</sup>) auch auf DNA-Moleküle, welche „glatte“ Enden aufweisen, wobei die Ligationseffizienz gegenüber DNA-Fragmenten

<sup>11</sup> *TN5*-Element

kohäsiver Termini deutlich reduziert ist und ca. 50-fach höhere Aktivitäten erfordert. Während das bakterielle Enzym NAD<sup>+</sup> als Kofaktor benötigt, ist die katalytische Funktion der T<sub>4</sub>-DNA Ligase strikt an die Verfügbarkeit von 1 mM (d)ATP gebunden.

Nach Präzipitation und Aufarbeitung der restringierten DNA wurde der linearisierte Vektor *pBluescript*<sup>®</sup> II SK (+) mittels HPLC-H<sub>2</sub>O (BAKER) auf 100 ng x µl<sup>-1</sup> verdünnt. Gemäß einer von WILLIAMS und BLATTNER abgeleiteten Gleichung errechneten sich optimale Insert-Konzentrationen für die Reaktion 2. Ordnung wie folgt:

$$c \text{ Insert-DNA } (\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1}) = \frac{\text{MW Insert-DNA}}{\text{MW Vektor-DNA}} \cdot c \text{ Vektor-DNA } (\mu\text{g} \times \mu\text{l}^{-1})$$

$$[0,1] \cdot \frac{(0,2 \text{ kb} \times 660^{12})}{(2,96 \text{ kb} \times 660)} = 6,7 \text{ ng} \times \mu\text{l}^{-1}$$

Um den prozentualen Anteil intramolekularer Reaktionen zu minimieren, empfahl sich in der Praxis eine - bezogen auf den Vektor - mindestens 2fach höhere Menge an Insert-DNA, wobei das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes 10 µl betrug:

#### chemische Parameter

Insert ( <i>Nod/SalI</i> )	1 µg
<i>pBluescript</i> <sup>®</sup> II SK ( <i>NodI/SalI</i> )	100 ng
T <sub>4</sub> -DNA Ligase	4 Weiss U
dATP	1 mM
BSA	250 ng
DTT	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
Tris-/HCl pH = 7,5 (25°C)	50 mM

#### physikalische Parameter

15°C    10 h

Ligationen zwischen kohäsiven DNA-Fragmentenden erfolgten vorzugsweise bei Temperaturen von 14 - 15°C unter Nutzung eines Thermalcyklers (*GeneAmp*<sup>®</sup> PCR System 2400, PE APPLIED BIOSYSTEMS), wobei die Inkubationsdauer zwischen 4 h und 16 h variierte. Die Inaktivierung des Enzyms konnte alternativ durch Zugabe von 2 µl 500 mM EDTA (SIGMA) oder 10 minütige Inkubation des Reaktionsansatzes bei 75°C erreicht werden.

<sup>12</sup> Die eingesetzte relative Molekularmasse entspricht dem arithmetischen Mittelwert für A/T- bzw. G/C-Paare unter Annahme äquimolarer Verhältnisse.

Bei Verwendung des *TA Cloning*<sup>®</sup> Kits enthielten die Ligationsansätze annähernd äquimolare Verhältnisse von Insert- und Vektor-DNA (je 30 - 60 ng), wobei Aktivitäten von 4 Weiss Units<sup>13</sup> T<sub>4</sub>-DNA Ligase benötigt wurden. Um den Autoligationsanteil des Klonierungsvektors *pCR*<sup>®</sup> 2.1 abschätzen zu können, wurden Kontrollversuche durchgeführt, welche 50 ng linearisierte Plasmid-DNA, jedoch keine Insert-DNA enthielten. Die Plattierung von 50 µl Zellsuspension (⇒ 2,5 pg DNA) auf X-Gal haltigem *LB*-Medium resultierte in 5 - 20 ampicillinresistenten Kolonien, von denen > 95% eine Blaufärbung aufwiesen, was auf der Existenz superspiralisierter Plasmide sowie geringer Anteile rezirkularisierter Vektoren beruhte, welche Rasterschubmutationen innerhalb des *lacZ*-Gens aufwiesen.

### 3.8.7 Transformation chemokompetenter *E.coli* Rezipientenstämme

Alle nachfolgend beschriebenen gentechnischen Arbeiten wurden im S<sub>1</sub>-Bereich<sup>14</sup> des Gastroenterologischen Funktionslabors der *Johann Wolfgang Goethe*-Universität Frankfurt am Main durchgeführt (Mr46-53o06.05.02 A-UniF 05/97).

Unabhängig vom jeweils genutzten Klonierungssystem entsprach die Transformation der gebrauchsfertig bezogenen chemokompetenten *E.coli* Rezipientenzellen dem von *MANDEL* etablierten Verfahren (222). Zur Selektion rekombinanter Transformanten wurden je 50 µl der Zellsuspensionen auf *LB*-Medium (*LIFE TECHNOLOGIES*<sup>™</sup>) ausplattiert, welches neben 60 ppm Carbenicillin ( $\alpha$ -Carboxypenicillin) 40 ppm X-Gal sowie 20 ppm IPTG (alle *SERVA*, Heidelberg) enthielt und über Nacht bei 37°C inkubiert (*BB 6220*, *HERAEUS INSTRUMENTS*). Die Transformationseffizienzen wurden anhand von Testansätzen unter Verwendung von 1 µg des Vektors *pBluescript*<sup>®</sup> II SK + (0,51 pmol, entsprechend  $3,1 \times 10^{11}$  Molekülen) bzw. 10 pg des Kontrollplasmids *pUC18* ( $5,6 \times 10^{-18}$  mol, entsprechend  $3,4 \times 10^6$  Molekülen) ermittelt, wobei jeweils 50 µl (5% des Gesamtvolumens ⇒ Verdünnungsfaktor = 20) ausplattiert wurden. Üblicherweise wiesen die Kontrollplatten 75 - 100 Klone auf, was Transformationseffizienzen von  $1,5 - 2,0 \times 10^8 \times \mu\text{g}^{-1}$  DNA entsprach.

<sup>13</sup> In Gegenwart kompatibler DNA-Einzelstrangüberhänge sowie 1 mM (d)ATP entspricht eine „cohesive end unit“ der Ligaseaktivität von  $1,7 \times 10^2$  Weiss-Einheiten.

<sup>14</sup> Die eingesetzten Vektoren für die Klonierung von PCR-Produkten einschließlich der verwendeten Empfängerorganismen stellen im Sinne der ZKBS-Liste gut charakterisierte Systeme dar und waren als biologische Sicherheitsmaßnahmen anerkannt (B1). Zudem wurden ausschließlich subgenomische, nicht-funktionelle sowie durch die Auswahl der PCR-Primer klar definierte Abschnitte humaner B- und T-Zellrezeptoren kloniert, welche ihrer DNA-Sequenz nach eindeutig charakterisiert waren. Aus den genannten Gründen erfolgte die Einteilung der Arbeiten in die Sicherheitsstufe S1.

Zufällig ausgewählte Kolonien positiver *E.coli* Transformantenklone wurden direkt als Matrize in Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt, in denen sich die Insert-DNA unter Einsatz sequenzspezifischer Oligonukleotide amplifizieren ließ (vgl. Abb.15).

### 3.9 Sequenzanalyse von $\delta$ TCR- und Ig<sub>H</sub>-Transkripten

#### 3.9.1 Präparation von Sequenziermatrizen mittels DNA-modifizierender Enzyme

Unter Verwendung des *Sequenase<sup>TM</sup> PCR Product Sequencing Kits* (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH) ließen sich PCR-generierte Amplikons definierter Rezeptor-transkripte derart modifizieren, daß sie als Matrizenmoleküle in Sequenzierreaktionen eingesetzt werden konnten. Dies galt sowohl für die Reamplifikate der klonierten PCR-Produkte als auch der nicht-klonierten, dominanten DNA-Banden, die direkt aus der PAGE isoliert wurden. Überschüssige Oligonukleotide sowie die im Verlauf der Polymerase-Kettenreaktion gebildeten Einzelstrangüberhänge, welche Sequenzierreaktionen potentiell negativ beeinflussen, ließen sich durch die 5'  $\Rightarrow$  3' Aktivität der im Kit enthaltenen Exonuklease I eliminieren. Parallel hierzu wurden die in den PCR-Ansätzen verbliebenen Desoxynukleotide unter dem katalytischen Einfluß der SAP (= *Shrimp Alkaline Phosphatase*) hydrolysiert. Die aus je 7  $\mu$ l PCR-Probe sowie 2  $\mu$ l eines 1 : 1-Gemisches von Exonuklease I ( $10 \text{ U}^{15} \times \mu\text{l}^{-1}$ ) und SAP ( $2 \text{ U}^{16} \times \mu\text{l}^{-1}$ ) bestehenden Ansätze wurden unter Verwendung eines Thermalcyklers (*Cetus 480<sup>TM</sup>*, PE APPLIED BIOSYSTEMS) 15 Minuten bei 37°C inkubiert worauf sich eine 15minütige thermische Inaktivierung beider Enzyme bei 80°C anschloß.

#### 3.9.2 Präparation von Sequenziermatrizen mit dem „*QIAquick<sup>TM</sup> PCR Purification Kit*“

Alternativ zum oben beschriebenen Verfahren konnte der für Sequenzierungen benötigte Reinheitsgrad von PCR-Produkten unter Einsatz kommerziell erhältlicher 800  $\mu$ l *QIAquick<sup>TM</sup>*-Säulen (*QIAGEN GmbH*, Hilden) erreicht werden. Das auf der Ionenaus-

<sup>15</sup> Ein Unit (U) definiert diejenige Exo I-Aktivität, welche 10 nmol dNTP innerhalb von 30 Minuten unter Standardbedingungen bei 37°C freisetzt.

<sup>16</sup> Ein Unit (U) definiert diejenige SAP-Aktivität, welche 1  $\mu$ mol p-Nitrophenylphosphat pro Minute bei  $p_H = 10,7$  sowie einer Inkubationstemperatur von 37°C hydrolysiert.

tauschchromatographie beruhende Verfahren gestattete eine rasche und praktikable Reinigung von PCR-Produkten im Größenbereich von 0,1 - 10 kb, wobei die maximale DNA-Bindungskapazität des Systems etwa bei 10 µg lag. In Gegenwart chaotroper Salze (NaJ) sowie  $p_H$ -Werten  $\leq 7,5$  besitzen höhermolekulare Nukleinsäuren eine starke Affinität zu makroporösen Silikagelmatrices, wogegen Oligonukleotide  $< 40$  bp *nicht* an das Säulenmaterial adsorbieren. Nach Eliminierung der Kontaminanten ließ sich die DNA durch Zugabe von 30 - 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris,  $p_H = 8,0 + 1$  mM EDTA) unter Verwendung einer Mikrozentrifuge (*EPPENDORF 5417*) bei 20.800 x g von der Säule eluieren, wobei die Ausbeute - bezogen auf die Ausgangsmenge - in der Größenordnung von 90 - 95% lag.

### 3.9.3 DNA-Sequenzierung nach dem Kettenabbruchverfahren unter Einsatz farbstoffmarkierter 2',3'-Didesoxynukleotide

Prinzipiell basiert die angewendete Technik auf der von *SANGER et al.* (223) etablierten Methode einer „geprimten“ *de novo* Synthese von DNA, welche komplementär zum jeweils vorliegenden Matrizenstrang ist. Ausgehend von kurzen, spezifisch hybridisierenden Start-Oligonukleotiden resultiert der mit statistischer Wahrscheinlichkeit erfolgende Einbau Fluoreszenzfarbstoff<sup>17</sup>-markierter 2',3'-Didesoxynukleotide im Abbruch der durch eine modifizierte<sup>18</sup> *Taq* Polymerase katalysierten DNA-Synthese. Simultan zur Markierung geht eine der Polymerase-Kettenreaktion verwandte, *lineare* Amplifikation der DNA-Moleküle einher. Die Farbstoff-Terminatoren-Sequenzierung der *dsDNA* erfolgte unter Verwendung des *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzers* (*PE APPLIED BIOSYSTEMS*). Da die eingesetzten *ddNTPs* an unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt waren besaß diese Technik den Vorzug, daß keine separaten, basenspezifischen Reaktionen durchgeführt werden mußten. Zudem ermöglichte sie die simultane Analyse aller endständigen Didesoxynukleotide mittels einer einzigen Trennkapillare („one-lane-sequencing“). Mit Ausnahme der sequenzspezifischen Oligonukleotide (vgl. 3.6) stellten sämtliche benötigten Reagenzien Bestandteile des gebrauchsfertig bezogenen *ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits* dar. Alle Markierungsansätze enthielten pro 20 µl Volumen 3,8 µl *ABI-*

<sup>17</sup> 6-FAM, HEX, NIS, TET

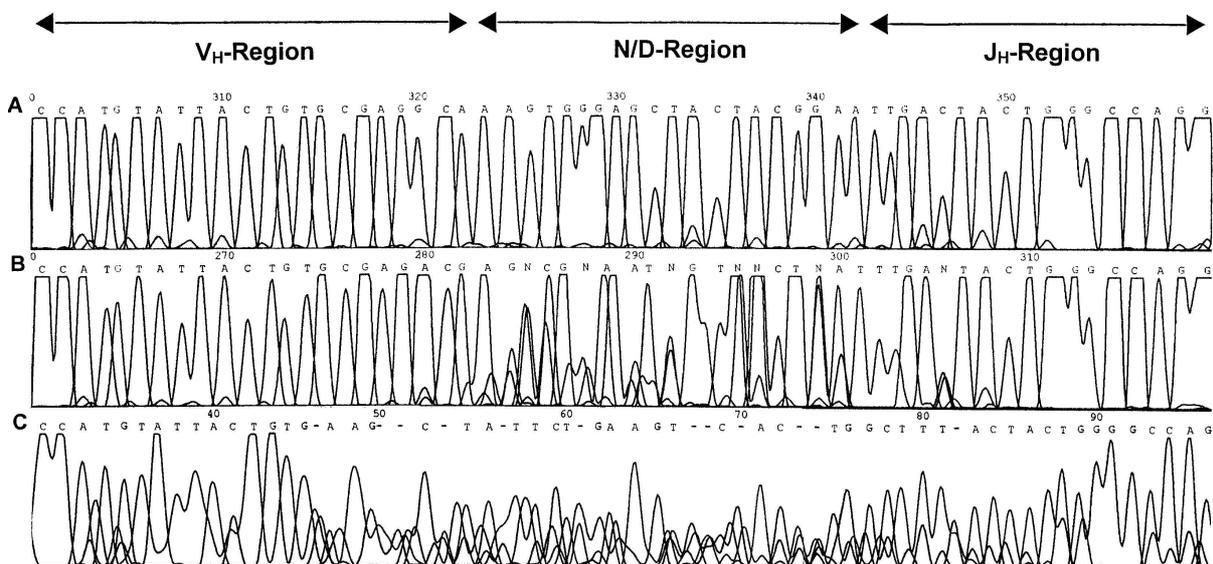
<sup>18</sup> *AmpliTaQ® FS*, (*PE APPLIED BIOSYSTEMS*)

*Ready Reaction Mix FS™* sowie 3,8 pmol des jeweils benötigten Oligonukleotids und 1 µl der jeweiligen DNA-Matrizenpräparation.

### 3.9.4 Generierung von Nukleotid-Sequenzdaten

Der *ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer* erlaubte die Durchführung vollautomatisierter DNA-Sequenzanalysen. Hierbei wurden die markierten DNA-Moleküle mit elektrischen Feldstärken von 160 - 200 V x cm<sup>-1</sup> sowie Stromstärken von 7 - 10 µA kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und die von den endständigen Fluoreszenzfarbstoffen nach Anregung mittels eines Argon-Lasers ( $\lambda = 488$  bzw. 514 nm) emittierten Signale nach Durchlaufen eines Spektrographen von einem „high performance“ CCD-Detektionssystem registriert. Derart generierte *ABI-Primärdaten* ließen sich nach Import in einen PC mittels spezieller Software (*Chromas™ 1.51, TECHNELYSIUM Pty Ltd., GB*; Internet: <http://www.technelysium.com.au/>) analysieren und in Form farbiger Chromatogramme ausdrucken (*HP Deskjet 690 C, HEWLETT-PACKARD, Böblingen*).

**Abb.21:** Vergleich der Chromatogramme, die bei der *direkten* Sequenzierung von CDR3-Banden erhalten werden



- A] dominante Bande, welche ein singuläres Transkript enthält
- B] dominante Bande, welche 3 - 4 verschiedene Transkripte enthält
- C] Bande aus einem polyklonalen Repertoire, die multiple Transkripte übereinstimmender CDR3-Länge enthält

### 3.10 EDV-gestützte Prozessierung von DNA-Sequenzen und Datenbankabgleiche

Nach vergleichender Durchsicht der Chromatogrammausdrucke konnte anhand publizierter „Keimbahn“ DNA-Sequenzen zunächst eine manuelle Abgrenzung der die V-, (D-) und J-Regionen kodierenden Gensegmente vorgenommen werden. Bei der Differenzierung von Mitgliedern großer Immunglobulin  $V_H$ -Familien bestand die prinzipielle Schwierigkeit exakter Analysen darin, daß die PCR-Konsensus„primer“ (vgl. 3.6) lediglich eine Amplifizierung kurzer, carboxyterminaler Segmentregionen ermöglichen. Demzufolge ließ sich bei folgenden  $V_H$ -Gruppen *keine* genaue Unterscheidung ihrer Subtypen vornehmen:

$$V_{H1-02} = V_{H1-18} / V_{H1-46} = V_{H1-69} = V_{H1-e}$$

$$V_{H3-07} = V_{H3-21} = V_{H3-33} / V_{H3-11} = V_{H3-53} / V_{H3-30} = V_{H3-30.5} / V_{H3-30.3} = V_{H3-66}$$

$$V_{H4-59} = V_{H4-61}.$$

Im Fall der CDR3-Regionen von Ig $V_H$ -Transkripten war die Identifizierung der zahlreichen  $D_H$ -Regionen aufgrund somatischer Mutationen sowie extensiver Basendeletionen im Bereich der 5'- und 3'-Segmenttermini erschwert. Daher ließen sich entsprechende Zuordnungen ausschließlich mittels automatisierter Sequenzabgleiche unter Nutzung der *VBASE*-Datenbank (*MRC Centre for Protein Engineering*, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, U.K.; Internet: <http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) sowie des *PC/GENE*<sup>®</sup>-Programmes (*INTELLIGENTICS, INC.*, U.S.A.) treffen. Innerhalb der CDR3-Domäne lokalisierte Sequenzmotive wurden einer definierten  $D_H$ -Region zugerechnet, wenn sie 100%ige Identität über mindestens 7 bp oder 90%ige Homologie über eine Distanz von 10 bp zu dieser besaßen.

*Funktionelle* Rezeptoren von B- und T-Lymphozyten konnten dadurch identifiziert werden, daß die DNA-Sequenzen der Transkripte mit Hilfe des *Omiga*<sup>™</sup>-Programmes<sup>19</sup> (*OXFORD MOLECULAR LTD.*, Cambridge, U.K; Internet: <http://www.oxmol.co.uk/>) zunächst in die korrespondierenden Polypeptide translatiert wurden. Da die Aminosäuresequenzen sowie die Leseraster funktioneller Rezeptordomänen bekannt waren (*VBASE* für Immunglobuline beziehungsweise die *IMGT*-Database im Fall der  $\delta$

<sup>19</sup> Version 1.1.3

TCR-Transkripte; Internet: <http://imgt.cnusc.fr:8104>) ließen sich die für individuelle Domänen äquivalenten Leseraster rasch identifizieren sowie auf Sequenzierfehlern beruhende Rasterschübe („frame shifts“) exakt lokalisieren. Da sich die Richtigkeit der für hochvariable CDR3-Regionen ermittelten Nukleotidsequenzen prinzipiell nicht anhand von Datenbankabgleichen überprüfen ließ, stellten die auf EDV-Ebene durchgeführten Translationen eine indirekte Verifizierungsstrategie dar. In denjenigen Fällen, wo sich Interpretationschwierigkeiten ergaben, erwies sich die Nutzung der *BLAST 2.0* Datenbank (Internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) als hilfreich.

### 3.11 CDR3-Längenanalysen

Weil die Grenzen der antigenbindenden Region nicht exakt definiert waren, erfolgte die Längenzuordnung translatierter CDR3-Domänen von Immunglobulin-Schwerketten sowie  $\delta$  TCR-Transkripten gemäß entsprechender Konventionen (59). Hiernach berechneten sich die CDR3-Längen aus der Distanz zwischen dem konservierten Cysteinrest innerhalb des 3'-Terminus' der variablen Region und dem konservierten, im Aminoterminus des J-Segmentes lokalisierten „GXG“-Tripletts, wobei von dem erhaltenen Wert jeweils 8 Aminosäuren subtrahiert wurden. Demzufolge besaß das innerhalb der Immunglobulin  $V_{H1}$ -Familie identifizierte 19er-Peptid

CARDIRWRTFLSVDYWGQQ

definitionsgemäß eine CDR3-Länge von 11 Aminosäuren (19 - 8).

## 4. Aufgabenstellung

### Molekularbiologische Analyse der Rezeptorrepertoires humaner $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten und B-Zellen

#### 4.1 Untersuchung des intestinalen $\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires

Nach den für intestinale  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten unter der Annahme einer „ersten Verteidigungslinie“ diskutierten Aufgaben stellt sich die Frage, in welchem Ausmaß bereits Neugeborene oder Kleinkinder über ein oligoklonales  $\delta$  TCR-Repertoire verfügen und inwieweit sich das pränatale vom postnatalen  $\delta$ -Kettenrepertoire unterscheidet.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Expressionsmuster des  $\delta$  TCR-Repertoires nicht statisch sind, sondern einer entwicklungsabhängigen Dynamik unterliegen, welche durch kontinuierliche Wechselwirkungen mit ihren Liganden geprägt sein dürfte. Um die vermutete Entwicklungsabhängigkeit des humanen  $\delta$  TCR-Repertoires zu untersuchen, wurden molekularbiologische Feinstrukturanalysen intestinaler und peripherer  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten anhand gesunder Kontrollpersonen verschiedener Altersstufen sowie humaner Feten unter den folgenden Fragestellungen durchgeführt:

- a) Expressionsmuster des fetalen (20. SSW) intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires
- b) Vergleich zwischen pränatalem (20. SSW) und neonatalem (6 Wochen)  $\delta$  TCR-Repertoire des Intestinums
- c) Postnatale Entwicklung des intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires vom 1. Tag bis zur 8. Lebensdekade.

## 4.2 Untersuchung des kutanen $\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires

Neben dem Gastrointestinaltrakt stellt die Haut eine weitere bedeutende Grenzfläche des Organismus' zu seiner Umgebung dar, weshalb ihr ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Abwehr pathogener Mikroorganismen zukommt. Da sich aufgrund der genannten Voraussetzungen Ähnlichkeiten der immunologischen Abwehrstrategien annehmen lassen, bestand einer der Schwerpunkte unserer Studien in der Charakterisierung des Rezeptor Repertoires kutaner  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten. Die Resultate dieser Experimente bildeten die Grundlage für weitere Untersuchungen, welche sich mit der angenommenen Beteiligung von  $\gamma/\delta$  T-Zellen an der Pathogenese immunologisch assoziierter Erkrankungen befaßten. Der genannte Themenkomplex untergliederte sich in folgende Teilaspekte:

- a) Charakterisierung des kutanen  $\delta$  TCR-Repertoires anhand multipler, einander benachbarter Hautbiopsien, welche im Verlauf kosmetischer OP's gewonnen wurden
- b) Vergleich zwischen intradermalelem und peripherem  $\delta$  TCR-Repertoire
- c) Vergleichende molekularbiologische Analyse des kutanen  $\delta$  TCR-Repertoires auf genomischer sowie auf transkriptioneller Ebene.

### 4.3 Die Rolle von $\gamma/\delta$ T-Zellen bei **chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)**

Ein weiterer Aspekt, unter dem die Analyse des  $\delta$  TCR-Repertoires durchgeführt wurde, bestand in der Überprüfung einer möglichen Beteiligung von  $\gamma/\delta$  T-Zellen an der Pathogenese von CED, welche eventuell durch Kreuzreaktionen zytotoxischer  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten mit bakteriellen Strukturen oder Autoantigenen ausgelöst werden.

Unsere Arbeitshypothese besagte, daß sich innerhalb der läsionalen Areale spezifische  $\delta$  TCR-Transkripte befinden, welche *nicht* innerhalb gesunder Darmabschnitte nachzuweisen sind. Somit bestand die Zielsetzung der Untersuchungen in einer Identifizierung signifikanter Unterschiede zwischen den  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoires *nicht*-entzündlicher sowie entzündlicher Mukosaareale, welche für eine Beteiligung der  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten im Rahmen der Pathogenese von CED sprechen würden. Sollten sich krankheitsassoziierte Unterschiede des Rezeptor Repertoires bei  $\gamma/\delta^+$  IEL nachweisen lassen, so ließe dies auf eine Aktivierung von  $\gamma/\delta$  T-Zellen durch spezifische (Eigen-) Antigene schließen.

Da auch eine Beteiligung systemischer T-Lymphozyten an der Pathogenese von CED diskutiert wird, untersuchten wir parallel zum intestinalen das periphere  $\delta$  TCR-Repertoire von *M.Crohn*- und *C.ulcerosa*-Patienten. Im Zusammenhang mit CED fanden die Analysen des humanen  $\delta$ -Kettenrepertoires unter folgenden Gesichtspunkten statt:

- a) Charakterisierung des  $\delta$  TCR-Repertoires innerhalb pathologisch veränderter *Kolon*abschnitte sowie Vergleich mit dem Repertoire benachbarter, morphologisch unauffälliger Mukosaareale
- b) Parallele Analyse der peripheren  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten von CED-Patienten
- c) Analysen des intestinalen  $\delta$ -Kettenrepertoires von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen, die *nicht* immunologisch assoziiert sind (z.B. *Divertikulitis*).

#### 4.4 Charakterisierung humaner intestinaler und peripherer IgV<sub>H</sub>-Repertoires humaner IgA- und IgM- B-Lymphozyten

Da neben IEL auch intestinale B-Zellen Bestandteile der „ersten Verteidigungslinie“ des mukosalen Immunsystems darstellen, untersuchten wir in Analogie zur  $\delta$ -Kette von  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten das Rezeptor Repertoire humaner IgV<sub>H</sub>-Transkripte. Weil das Darmlumen eine überaus große Anzahl verschiedenster Antigenstrukturen beherbergt wäre zu erwarten, daß intestinale V<sub>H</sub>-Repertoires prinzipiell *polyklonal* sind.

Ferner sollten sich durch vergleichende Feinstrukturanalysen der V<sub>H</sub>-Repertoires IgM und IgA exprimierender B-Zellen auch Rückschlüsse auf verwandtschaftliche Beziehungen zwischen definierten Lymphozytenklonen ziehen lassen. Die an gesunden Kontrollpersonen durchgeführten Strukturanalysen intestinaler und peripherer B-Lymphozyten fanden unter den folgenden Fragestellungen statt:

- a) Charakterisierung intestinaler IgV<sub>H</sub>-Repertoires IgA und IgM exprimierender B-Lymphozyten  $\Rightarrow$  Vergleich, Unterschiede ?
- b) Vergleich der CDR3-Domänen definierter IgA- und IgM- B-Zellklone hinsichtlich eines durchlaufenen Klassenwechsels
- c) Organspezifische Kompartimentierung von V<sub>H</sub>-Repertoires intestinaler sowie peripherer IgA- bzw. IgM- B-Lymphozyten  $\Rightarrow$  Klonalitätsgrad, Differenzen ?

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Die Analyse des humanen $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires

#### 5.1.1 Molekularbiologische Feinstrukturanalyse definierter $\delta$ TCR-Transkripte mittels „CDR3-Spectratyping“

Aufgrund der genannten Vorarbeiten (46; 47) war bekannt, daß das humane  $\delta$  TCR-Repertoire streng individualspezifisch ist, bedeutende Einschränkungen seiner Vielfältigkeit aufweist und sich zudem durch eine weitgehende Kompartimentierung auszeichnet. Demgegenüber lagen jedoch nur wenige Daten vor, welche detaillierte Einblicke in die topographische Architektur des mukosalen  $\delta$  TCR-Repertoires über größere räumliche Distanzen des *Duodenums* bzw. des *Kolons* hinweg erlaubten. So bestand weitgehende Unklarheit darüber, ob die im Rahmen der Vorarbeiten beobachtete Dominanz einzelner  $\delta$  TCR-Transkripte auf ubiquitären Verteilungen oder lokalen Expansionen beruhten. Da die Aufklärung dieser Fragestellung Einblicke in die Migration und Zirkulation von  $\gamma/\delta$  IEL versprach, bestand der initiale Ansatz unserer Untersuchungen darin, das Ausmaß identischer  $\delta$ -Kettentranskripte innerhalb räumlich getrennter Darmareale zu ermitteln.

Das „CDR3-Spectratyping“ ermöglichte eine repräsentative Bestimmung der Diversität von T-Zell Rezeptor Repertoires und ließ Untersuchungen hinsichtlich Überlappungen des  $\delta$  TCR-Repertoires zwischen verschiedenen funktionellen Darmabschnitten zu. Im Gegensatz zur ursprünglich angewandten Methode (46; 47) bei der die PCR-Produkte *in toto* subkloniert und sequenziert wurden, gestattete das „CDR3-Spectratyping“ eine unmittelbare Beurteilung des jeweils vorliegenden  $\delta$  TCR-Repertoires. Hierzu wurden die TCR  $\delta$ -Transkripte aus Darmbiopsien oder Geweberesektaten mittels PCR amplifiziert und die Produkte durch denaturierende PAGE ihrer Länge nach separiert. Diese gelelektrophoretischen Längenanalysen erbrachten mehrheitlich charakteristische Verteilungsmuster („band patterns“), welche die Diversität des jeweiligen  $\delta$  TCR-Repertoires repräsentierten.

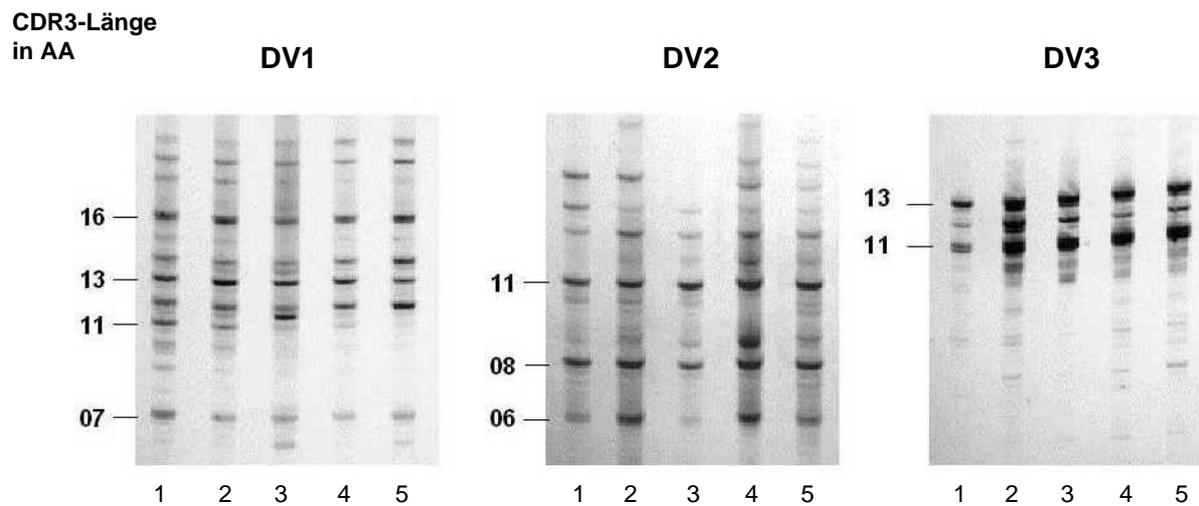
**Abb.22:** CDR3-Längenanalyse von  $\delta$ -Kettentranskripten aus dem humanen *Kolon* (G7)

Abbildung 22 zeigt die CDR3-Profile der *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte, welche innerhalb der *hepatischen Flexur* [1], dem *Kolon transversum* [2], der *Milzflexur* [3], dem *Kolon descendens* [4] sowie dem *sigmoidalen Kolon* [5] des Patienten G7, eines gesunden 73jährigen Probanden, identifiziert wurden. Es ist deutlich erkennbar, daß in jeder *DV*-Familie annähernd identische Bandenmuster existierten, obwohl die Biopsien über eine räumliche Distanz von zirka 1 m entnommen wurden. Um unsere Annahme zu überprüfen, wonach korrespondierende dominante Banden verschiedener Darmbiopsien identische  $\delta$  Rezeptoren darstellen, wurden einzelne Banden, welche *DV1*-, *DV2*- bzw. *DV3*-Transkripte enthielten aus der Gelmatrix isoliert, reamplifiziert und direkt sequenziert. Die vergleichenden DNA-Sequenzanalysen dominanter *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte aus parallel entnommenen *Kolon*-biopsien führten in jedem Fall zur Identifizierung identischer TCR  $\delta$ -Transkripte (vgl. hierzu die CDR3-Längenangaben am linken Rand der Teilabbildungen). Die entsprechenden Sequenzdaten sind unter den accession numbers U90959 - U90966 über die Datenbanken EMBL/GenBank/DDBJ einzusehen.

Auch im Fall der vier gesunden Probanden G6 bzw. G8 - G10 [vgl. Tab.12 (a), S. 106] fanden sich analoge Resultate, wobei jeder Patient im „CDR3-Spectratyping“ ein charakteristisches, individuenspezifisches Verteilungsmuster seiner  $\delta$  TCR-Transkripte aufwies. Ferner zeigten Analysen von Biopsien, die aus verschiedenen Arealen des proximalen Dünndarmes erwachsener Personen stammten, daß sich die Verteilungsmuster der *DV1*-, *DV2*- und *DV3*-Repertoires korrespondierender Gewebeproben jeweils weitgehend entsprachen.

Weiterhin ermöglichte das „CDR3-Spectratyping“, die Stabilität von  $\delta$  TCR-Repertoires über zeitliche Intervalle von 1 - 2 Jahren hinweg auf molekularbiologischer Ebene zu überprüfen.

**Abb.23:** Zeitliche Konstanz der CDR3-Profile intestinaler  $\delta$ -Kettentranskripte (G9)

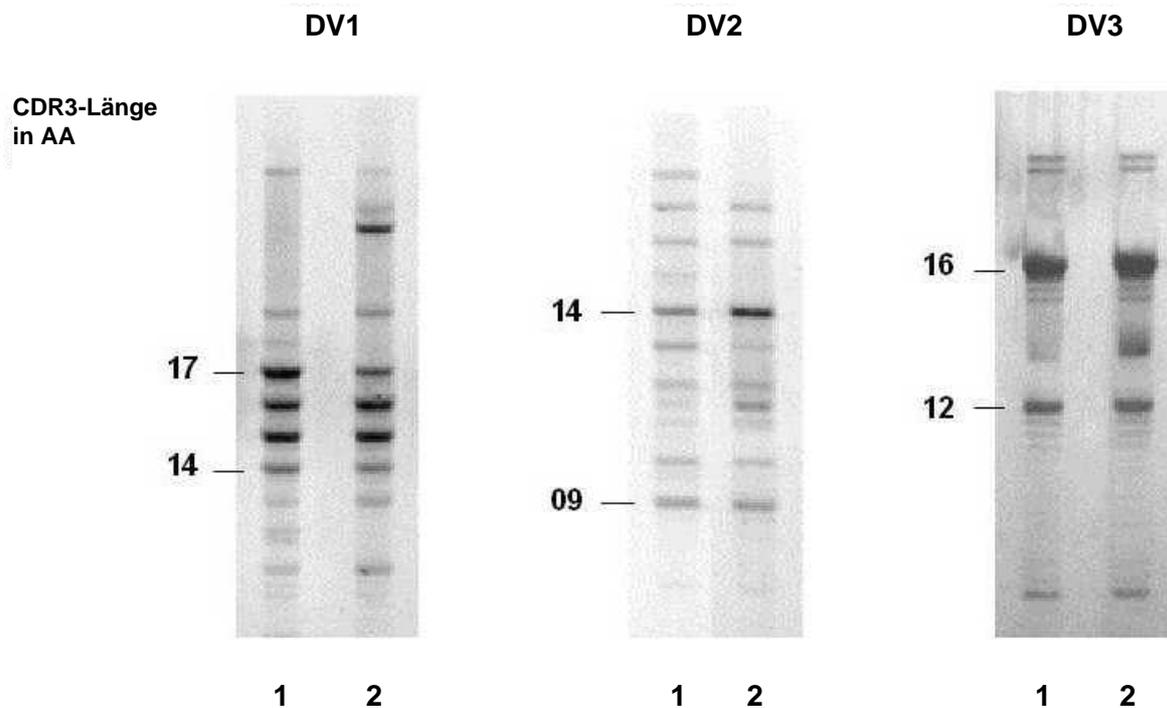


Abb.23 dokumentiert, daß die TCR  $\delta$ -Transkripte in den *Kolon*biopsien des Patienten G9 über einen Zeitraum von 16 Monaten hinweg (1 vs. 2) ein nahezu konstantes Verteilungsmuster aufwies. Mittels der DNA-Sequenzanalyse gelang uns der Nachweis identischer dominanter *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte in den jeweiligen Biopsien (vgl. hierzu die Angabe der jeweiligen CDR3-Länge). Diese Daten tragen fortlaufende Numerierungen von U90967 - U90972 und können über EMBL/GenBank/DDBJ eingesehen werden. Darüber hinaus ließen sich im Dünndarm eines weiteren analysierten Patienten (G10) annähernd identische CDR3-Profile von *DV1*-Transkripten identifizieren, wobei der zeitliche Abstand zwischen den endoskopischen Eingriffen 1 Jahr betrug (accession numbers U90973 - U90975).

## 5.2 Altersabhängige Veränderungen humaner intestinaler $\delta$ TCR-Repertoires

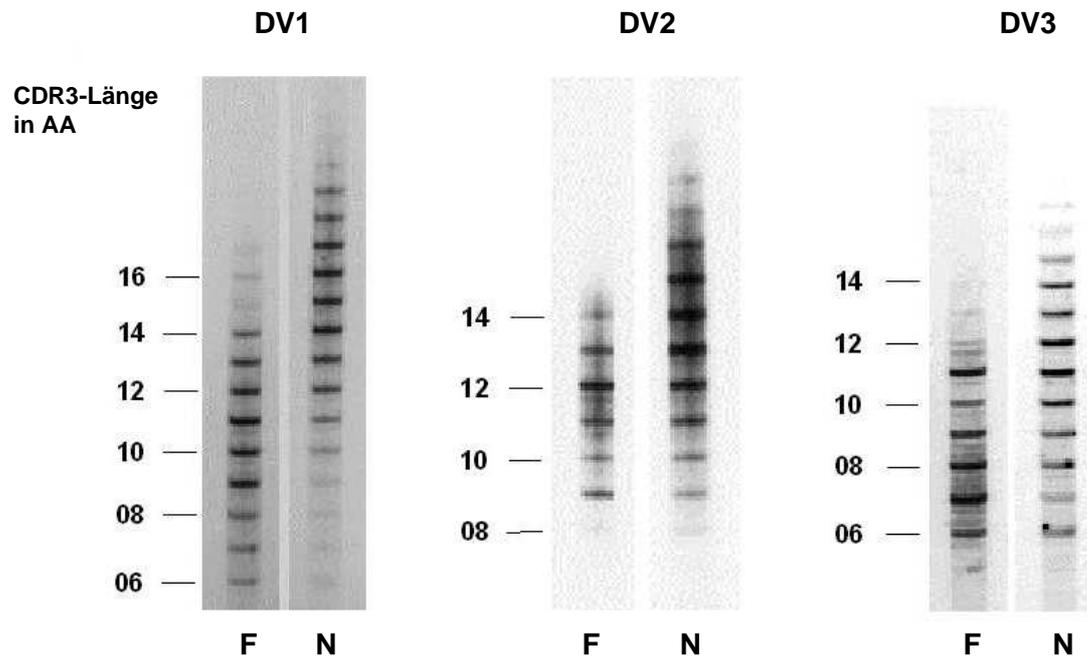
Ein weiterer Teilaspekt unserer Untersuchungen bestand in der Verifizierung der Hypothese, wonach intestinale  $\delta$  TCR-Repertoires nicht statisch sind, sondern einer entwicklungsabhängigen Dynamik unterliegen. Im Rahmen dieser Studien wurden endoskopisch gewonnene Mukosabiopsien sowie chirurgische Resektate aus dem Dünndarm und dem *Kolon* von insgesamt 16 Personen im Alter zwischen 1,5 und 73 Jahren molekularbiologisch charakterisiert und miteinander verglichen.

Bei den Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen handelte es sich um gesunde Patienten der Altersstufen von 1.5, 3, 3.5, 6.5, 14, 17, 17.5 und 26 Jahren, die sich aufgrund unklarer abdominaler Beschwerden bzw. zwecks Ausschluß einer vermuteten *Refluxösophagitis* endoskopieren ließen. Die Patienten G7 - G10 (in der Altersgruppe von 62 - 73 Jahren) wiesen ebenfalls keine entzündlichen intestinalen Erkrankungen auf, was anhand der morphologisch unauffälligen Mukosabiopsien nachgewiesen werden konnte. Außerdem stand uns chirurgisches Resektionsmaterial zur Verfügung, welches von einem Neugeborenen sowie einem 6 Wochen alten Säugling stammte. Aufgrund einer Kooperation mit Prof. S. WINTER von der pädiatrischen Abteilung der *Boston University School of Medicine* konnten auch  $\delta$  TCR-Transkripte aus dem *Duodenum* und *Kolon* von drei 20 Wochen alten Feten analysiert werden. Sämtliche von uns analysierten Gewebeproben enthielten sowohl Anteile des Oberflächenepithels als auch der *Lamina propria*.

### 5.2.1 Die CDR3-Längenanalysen intestinaler $\delta$ TCR-Transkripte zeigen grundlegende Unterschiede zwischen fetalen und neonatalen sowie den $\gamma/\delta$ T-Zell Rezeptor Repertoires erwachsener Individuen auf

Um die vermuteten entwicklungsabhängigen Veränderungen des humanen  $\delta$ -Ketten-Repertoires nachzuweisen, verglichen wir zunächst die CDR3-Profile von  $\delta$  TCR-Transkripten aus dem Intestinum eines 20 Wochen alten Fetus' mit dem  $\delta$  TCR-Repertoire eines Neugeborenen (vgl. Abb.24):

**Abb.24:** CDR3-Längenprofile intestinaler  $\delta$ -Kettentranskripte eines Fetus' der 20. SSW (F) und eines Neugeborenen (N)



Unsere CDR3-Längenanalysen intestinaler  $\delta$ -Kettentranskripte eines Fetus' sowie des Neugeborenen ließen signifikante Unterschiede erkennen: So wiesen die fetalen *DV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte mit 6 - 16 Aminosäuren sowohl geringere durchschnittliche als auch maximale CDR3-Längen auf als die des Neugeborenen, welche sich im Bereich von 6 - 21 AS bewegten. Da quantitativ dominierende DNA-Banden generell mittlere Transkriptlängen besaßen und sämtliche Transkripte, deren Längen vom Mittelmaß abwichen ihrer Frequenz nach entsprechend unterrepräsentiert waren, erbrachten die CDR3-Längenanalysen der  $\delta$  Repertoires des Fetus' sowie des Neugeborenen jeweils Gaus' sche Normalverteilungen. Auch die Analyse der *Kolon*-biopsien zweier weiterer Feten erbrachte hiermit übereinstimmende Befunde (Daten nicht gezeigt). Somit unterschieden sich die intestinalen CDR3-Profile der Feten bzw. des Neugeborenen signifikant von den oligoklonalen Verteilungsmustern, welche bei Analysen der  $\delta$  TCR-Repertoires erwachsener Personen gefunden wurden (vgl. hierzu die Abbildungen 22/23 und 24).

Aufgrund der analysierten CDR3-Längenprofile lag die Vermutung nahe, daß Feten und Neugeborene diversere  $\delta$  Rezeptor Repertoires als Erwachsene exprimieren. Übereinstimmend mit dieser Hypothese konnte durch direkte Sequenzierung individueller DNA-Banden oftmals keine lesbare, singuläre Nukleotidsequenz erhalten

werden, was auf die Existenz multipler Transkripte innerhalb einer Bande schließen ließ. Die Sequenzanalyse klonierter  $\delta$  TCR-Transkripte zeigte jedoch, daß Feten über limitierte Repertoires verfügen, wogegen Neugeborene extrem diverse  $\delta$  TCR-Repertoires aufweisen.

### 5.2.2 Charakteristika des fetalen $\delta$ TCR-Repertoires

Um fetale  $\delta$  Repertoires detailliert zu charakterisieren, wurden  $\delta$ -Transkripte aus dem Dünndarm sowie dem *Kolon* dreier Feten *in vitro* amplifiziert, subkloniert und nachfolgend sequenziert. Tab.4 [A] - [C] (S. 87) faßt die Nukleotidsequenzen der CDR3-Regionen von *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripten zusammen, welche in Dünndarmbiopsien eines ca. 20 Wochen alten Fetus<sup>1</sup> analysiert wurden und repräsentativ für die Daten sind, die aufgrund entsprechender Feinstrukturanalysen in *Kolon*- bzw. Dünndarmbiopsien der beiden übrigen Feten gefunden wurden. Wie aus der Tabelle 4 hervorgeht, konnten wir mittels der DNA-Sequenzanalyse nachweisen, daß die Diversität des fetalen  $\delta$  TCR-Repertoires stark eingeschränkt war. Die genomische (Keimbahn-) Sequenz ist jeweils durch **fette** Buchstaben gekennzeichnet. Palindromische „P“-Nukleotide sowie die hierzu komplementären Basen sind unterstrichen. Die Ziffern im rechten Teil der Tabelle bezeichnen den Anteil der Transkripte, welche die entsprechende CDR3-Domäne in einer der beiden parallel analysierten Gewebeproben (I bzw. II) aufwiesen. Transkripte, welche nicht im korrekten Leseraster vorlagen und demzufolge nicht in funktionelle  $\delta$ -Ketten translatiert werden konnten, sind mit „\*“ bezeichnet. Die *DV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte sind gesondert innerhalb der Abschnitte [A], [B] und [C] aufgeführt. Alle abgebildeten Nukleotidsequenzen sind über die Datenbanken EMBL/GenBank/DDBJ unter den accession numbers U90976 bis U91125 einzusehen.

Die CDR3-Domänen der fetalen *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte waren insofern limitiert, als daß sie nur wenige „N“-Nukleotide enthielten, bzw. daß Additionen matrizenunabhängiger Basen im Vergleich zu Neugeborenen oder adulten Personen durchschnittlich kürzer ausfielen.



Dieses Phänomen beruhte vermutlich auf einer eingeschränkten Aktivität der *terminalen Nukleotidyltransferase* (TdT) und war insbesondere bei den *TCRDV2*-Transkripten stark ausgeprägt (vgl. Tab.4 [B]). Hiervon abgesehen, basierte die im Vergleich zu *DV1*- und *DV3*-Transkripten reduzierte CDR3-Länge der *DV2*-Transkripte auch darauf, daß diese nicht das *DD2*-Gensegment exprimierten. Wir konnten zeigen, daß die CDR3-Domänen fetaler intestinaler  $\delta$ -Kettentranskripte palindromische „P“-Nukleotide sowie getrimmte 5' und 3'-Gensegmenttermini aufwiesen. Es bleibt zu klären, *warum* die CDR3-Domänen der intestinalen *DV1*- und *DV3*-Transkripte bei allen drei Feten längere „N“-Nukleotidadditionen aufwiesen und insgesamt etwas diverser als die *DV2*-Transkripte strukturiert waren.

Tabelle 5 dokumentiert, daß unsere DNA-Sequenzanalysen zahlreiche Überlappungen zwischen den intestinalen  $\delta$ -Kettentranskripten der drei untersuchten Feten erkennen ließen. Dieser Befund steht in deutlichem Kontrast zum  $\delta$  TCR-Repertoire erwachsener Personen, welches durch eine strenge Individuenspezifität gekennzeichnet ist (46; 47). Sämtliche Überlappungen zwischen den CDR3-Domänen fetaler *DV2*-Transkripte sind mit „x“ gekennzeichnet und aus dem linken Teil der Tab.5 ersichtlich. Einige der analysierten *TCRDV2*-Sequenzen entsprachen den Nukleotidabfolgen, welche von anderen Arbeitsgruppen (111; 224; 225) innerhalb der präthymischen Leber sowie des fetalen Thymus' identifiziert wurden; die jeweiligen Literaturstellen sind aus der Kolumne „Ref.“ zu ersehen. *TCRDV2*-Transkripte, welche von jeweils zwei Feten exprimiert wurden und darüber hinaus in den Mukosabiopsien des 6 Wochen alten Säuglings vorlagen, die im Rahmen dieser Studie analysiert wurden, sind mit „a“ bezeichnet. Das mit „b“ versehene *DV2*-Transkript stellt eine Nukleotidsequenz dar, welche durch die Analyse von Mukosabiopsien des Neugeborenen identifiziert wurde (Klon 1459, vgl. Tab.8 [B]). Im Gegensatz zu den *DV2*-Transkripten konnte für intestinale *DV1*-Ketten nur in *einem einzigen Fall* eine Überlappung zwischen zwei Feten nachgewiesen werden; hierbei handelte es sich um den Klon 1219 (CDR3-Länge 9, vgl. Tab.4 [A]). Unter den *TCRDV3*-Transkripten ließen sich dagegen *keinerlei* Überlappungen zwischen verschiedenen Individuen nachweisen.



Weiterhin ließen unsere Feinstrukturanalysen fetaler intestinaler  $\delta$  TCR-Transkripte keine statistischen Verteilungen innerhalb der Gensegmentübergänge erkennen sondern zeigten, daß manche CDR3-Regionen häufiger als erwartet anzutreffen waren. Offensichtlich erfolgten die Rekombinationsereignisse zwischen den beteiligten Gensegmenten bevorzugt im Bereich kurzer DNA-Abschnitte, welche partielle Sequenzhomologien aufwiesen. Dieses als „Homologie vermittelte Rekombination“ bezeichnete Phänomen war zuvor für die kanonischen Nukleotidsequenzen bei Mäusefeten (226; 227) bzw. den Segmentübergangsbereichen der  $\delta$  TCR- (228; 229) sowie der  $Ig_H$ -Transkripte (230) von Mäusen beschrieben worden. Insgesamt waren bei den drei Feten 52% der *DV1/DD3*- sowie 37% der *DV2/DD3*-Segmentübergänge mit den Mechanismen einer homologieabhängigen Rekombination zu vereinbaren. Indessen ließen sich nicht alle Überlappungen fetaler  $\delta$  TCR-Transkripte durch die Existenz kurzer, homologer Sequenzbereiche bzw. entsprechender Rekombinationsereignisse erklären.

Schließlich ist zu erwähnen, daß einige der fetalen *TCRDV2*-Transkripte, welche sich ihrer Nukleotidsequenz nach unterschieden, aufgrund der Degeneration des genetischen Kodes identische Peptidsequenzen determinierten. Dieses Resultat wurde dadurch gesichert, daß wir die *DV/DD3*- und *DD3/DJ*-Segmentübergänge unabhängig voneinander analysierten. Tabelle 6 veranschaulicht den genannten Befund anhand des *DV2/DD3*-Überganges:

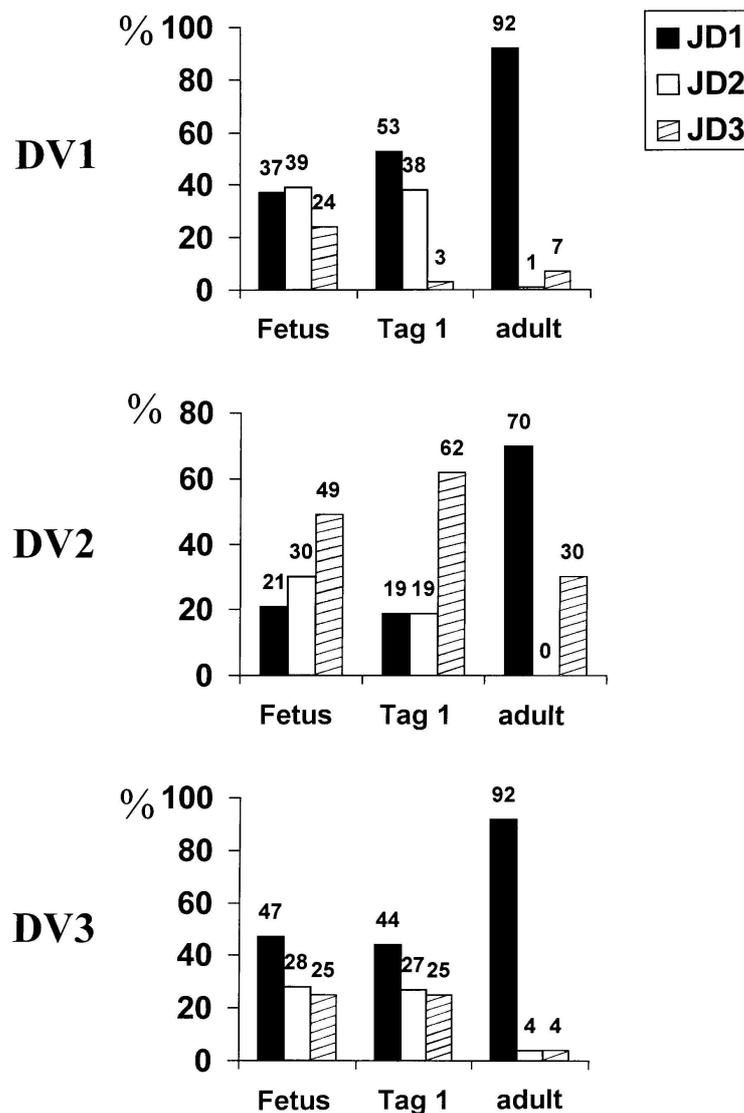
**Tab.6:** *DV2/DD3*-Segmentübergänge fetaler intestinaler  $\delta$  TCR-Transkripte

DV2 GCCTGTGACACC	<u>P</u>	DD3 ACTGGG...	AA-Sequenz	Anteil
GCCTGTGACAC		TGGG...	ACDTG	11/53
GCCTGTGACACC		GGG...	ACDTG	5/53
GCCTGTGA	<u>T</u>	<u>A</u> CTGGG...	ACDTG	2/53

Unter den insgesamt 53 singulären  $\delta$ -Kettentranskripten der drei Feten, welche keine „N“-Nukleotidadditionen aufwiesen ließen sich 18 *DV2/DD3*-Segmentübergänge identifizieren, die für identische Peptidsequenzen kodierten. Darüber hinaus erbrachten unsere Analysen der *DV1/DD3*-, *DV3/DD3*- sowie der *DD3/DJ*-Übergänge ähnliche Resultate (diese Daten werden hier nicht gezeigt).

Ferner führten unsere Untersuchungen zu der Erkenntnis, daß fetale und neo- bzw. postnatale  $\delta$ -Kettentranskripte insofern von adulten T-Zell Rezeptoren differierten, als daß sie bestimmte *DJ*-Segmente mit unterschiedlichen Raten exprimierten:

**Abb.25:** Differentielle Expression von *DJ*-Segmenten bei fetalen, neonatalen sowie den  $\delta$ -Kettentranskripten adulter Individuen



Das Diagramm 25 stellt die prozentualen Anteile exprimierter *DV*-Segmente separat für die *DV1*-, *DV2*- und die *DV3*-Familie dar und faßt alle Resultate zusammen, welche anhand der molekularbiologischen Untersuchungen dreier Feten, eines Neugeborenen sowie eines 6 Wochen alten Säuglings gewonnen wurden. Darüber hinaus werden die Resultate vorangegangener Untersuchungen (46; 47) berücksichtigt, welche an erwachsenen Personen durchgeführt wurden. Unsere Berechnungen basierten auf folgenden Zahlen analysierter  $\delta$ -Kettentranskripte (vgl. Tab.7):

**Tab.7:** Anzahl der  $\delta$  TCR-Transkripte, welche in die Berechnungen zur Analyse der Altersabhängigkeit des humanen  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoires einbezogen wurden

Entwicklungsstadium	Alter	Gesamtanzahl der analysierten $\delta$ -Transkripte	DV1	DV2	DV3
fetal	20. SSW	154	46	76	32
neonatal	1 Tag	98	34	32	32
postnatal	6 Wochen	80	30	30	20
adult	62 - 73 Jahre	139	71	43	25

Statistische Auswertungen ergaben, daß intestinale DV1-, DV2- und DV3-Transkripte adulter Personen präferentiell das DJ1-Segment exprimierten, wogegen das DJ3-Segment lediglich innerhalb der DV2-Familie einen quantitativ bedeutenden Anteil aller DJ-Segmente darstellte und DJ2 bei sämtlichen DV-Familien quantitativ unterrepräsentiert war. Im Gegensatz hierzu wurde das DJ2- bzw. das DJ3-Segment bei fetalen sowie neonatalen  $\delta$ -Kettentranskripten unabhängig von der DV-Familie sehr viel häufiger exprimiert. Im Fall des 6 Wochen alten Säuglings entsprach die Verwendung der DJ-Regionen bei DV1- und DV3-Transkripten weitgehend dem adulten Repertoire; hingegen bestanden innerhalb der DV2-Familie größere Ähnlichkeiten zum fetalen und neonatalen  $\delta$  TCR-Repertoire. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Entwicklung des  $\delta$ -Kettenrepertoires Erwachsener eine präferentielle Expression des DJ1-Segmentes bei gleichzeitiger Abnahme der Frequenz DJ2- und DJ3- kodierender Allele beinhaltet.

### 5.2.3 Charakteristika des humanen $\delta$ TCR-Repertoires während der neonatalen Entwicklungsphase

Um die Diversität des  $\delta$ -Kettenrepertoires während des neonatalen Entwicklungsstadiums zu bestimmen, wurden *in vitro* reamplifizierte TCRDV1-, DV2- und DV3-Transkripte aus dem Dünndarm eines Neugeborenen (Tab.8, S. 93) sowie dem Kolon eines 6 Wochen alten Säuglings (Tab.9, S. 95) kloniert. Aus diesen Genbibliotheken wurden statistisch ausgewählte Einzelklone direkt in DNA-Sequenzierreaktionen eingesetzt. Die Untersuchungen ergaben, daß das humane intestinale  $\delta$  TCR-Repertoire während des neonatalen Entwicklungsstadiums *polyklonal* ist.

**Tab.8:** Nukleotidsequenzen der CDR3-Domänen von  $\delta$ -Kettentranskripten aus dem Intestinum eines Neugeborenen

**A**

CDR3 length	CLONE	DV1 CACTTGGGAACT	N/P	DD2 CCTTCTAC	N/P	DD3 ACTGGGGATAG	N/P	DJ1: ACACCGATAAACTC DJ2: CPTTACAGCACAA DJ3: CTCTGGGACACCC DJ4: CCAGACCTTGATC	I	II
10	1306	CTCTTGGGAACT	A	TCC		ACTGGGGAT		ATAAACTC	1/19	
10	1300	CTCT	CGCT	TTCTAC	A	GGA	GT	ACACCGATAAACTC	1/19	
10	1414	CTCTGG	ACCAGA	CTTCT			GT	ACACCGATAAACTC	1/19	1/15
*	1299	CTCTGGG	CTTACTGC	CCTTCC	CCCGC			AAACTC	1/19	
11	1298	CTCTTGGGAAAC	CATCA			TGGGG	TAAA	ACCGATAAACTC	1/19	
12	1291	CTCTTG	CA	TTC	TCAA	TGGGGAT	CCGGAG	ACCGATAAACTC	1/19	
12	1405	CTCTTGGGAAAC	CCGCTCGG			GGGGAT		ACACCGATAAACTC	1/15	
13	1402	CTCTGG	ATA	CTTAC	AGGAGT	CTGGGGAT		ACACCGATAAACTC	1/15	
14	1416	CTCTT	CG	TCC	CCTTCTACGA	GGGGAT	ATGG	ACACCGATAAACTC	1/15	
14	1404	CTCTTGGGAA	CC	CCTAC	TCCA	GGGGAT		GGAGT	1/15	1/15
15	1295	CTCTTGGG	CCTACCG	CTTCTA	ATC	GGGG		CCCT	1/19	
15	1293	CTCTTGGGAA	GGAATAC	CCTT		ACTGGGGATA		TGGG	1/19	
15	1564	CTCTTGGGAA	ACT	CTA		GGGGAT	CGGCTTCCCGGGGATAGT	TAAACTC	1/15	1/15
*	1297	CTCTTGGGAA	GTCCGG	CCTTC	TCCT	ACTGGGG	CCACGG	CCGATAAACTC	1/19	
17	1415	CTCTTGGGAA	GG	CCTTCC	CC	GGG	CTGTGGTACTCGTAGG	ACACCGATAAACTC	1/15	1/15
17	1407	CTCTTGGGAACT	AGTTTATGTCTG	TTCTTAC	TGA	GGGATACG		ACCGATAAACTC	1/15	
18	1412	CTCTTGGGAA	TGGTTAT	TAC		TGGGGATAC		CGATAAACTC	1/15	1/15
19	1406	CTCTTGGGAAAC	CCC	CCTAC	CTACGAAC	ACTGGGGATAG	TCCTGGTCCGATAG	ACCGATAAACTC	1/15	1/15
09	1561	CTCTTGGGAAAC	C			GGGGATACG	AA	CCAA	1/15	
10	1411	CTCTTGGGAA	ACTC	CCTT			AATGAGG	GCACAA	1/15	
*	1304	CTCTTGGG	TACGG	TCC	G	TGG	ATT	ACAGCACAA	1/19	
10	1303	CTCTTGGG	GG	CTA		GGG	TACC	GACAGCACAA	1/19	
11	1554	CTCTTGGG		TCC	GCC	CTGG	CCATA	TGACAGCACAA	1/19	
13	1301	CTCTTGGGAA		TTCC	CTAC	CTGGGGAT	CGGG	CAGCACAA	1/19	
13	1302	CTCTTGGG	GA	CCTTCT		GGGGATA	G	CTTTGACAGCACAA	1/19	
13	1553	CTCTTGGGAAAC	GTGGTCTC		T	ACTGGG		CTTTGACAGCACAA	1/19	
14	1563	CTCTTGGGAA	TGGATTATGTG			ACTGGGGATACG		CTTTGACAGCACAA	1/19	1/15
15	1410	CTCTTGGGAAAC	GA	CTTCT	CCTGT	ACTGGGGATAC	TC	CAGCACAA	1/15	1/15
16	1290	CTCTTGGGAAAC	C	CCTTCTA	AGGT	ACTGGGGAT	CCCTGGAT	GCACAA	1/19	
*	1292	CTCTTGGGAACT	AACCGACC			GGGG	CCCACTACAC	CTTTGACAGCACAA	1/19	
17	1294	CTCTTGGGAA	G	TTCTTAC	GTCCCTTGT	ACTGGGGATA	GACGGT	CAGCACAA	1/19	
15	1556	CTCTTGGGAA		T		ACTGGGGATA	GAGGAAA	CTGGGACACCC	1/19	
10	1296	CTCTTGGGAACT				ACTGGGGATAC	CC	GACCCCTGATC	1/19	1/15
19	1403	CTCTTGG	CGCTCC	CCTTCTA	GCCCGAAAGT	ACTGGGGATACG	GATGGATTCCG	CCCTGATC	1/15	

**B**

CDR3 length	CLONE	DV2 CCTGTGACACC	N/P	DD2 CCTTCTAC	N/P	DD3 ACTGGGGATAG	N/P	DJ1: ACACCGATAAACTC DJ2: CPTTACAGCACAA DJ3: CTCTGGGACACCC	I	II
06	1626	CCTGT					AAC	ACACCGATAAACTC	1/16	1/16
09	1260	CCTGTGACAC				TGGGGATAC	C	CCGATAAACTC	1/16	
09	1452	CCTGTGAC	C		T	ACTGGGGGA		CACCGATAAACTC	1/16	1/16
11	1622	CCTGTGACAC	GGG			GGGGATACG	CC	CACCGATAAACTC	1/16	1/16
13	1270	CCTGTGACACC	GTGGCC			GGGGATACG	CGATCCTCAGTAT	CTC	1/16	1/16
14	1264	CCTGTGACACC	AG	TCC	GT	ACTTGGGGGA	AAAAAT	ACACCGATAAACTC	1/16	1/16
09	1451	CCTGTGACA	A			GGGG	TAC	TTGACAGCACAA	1/16	1/16
09	1461	CCGTG	T	CTAC		GGGGA	CCCCGGCA	ACAA	1/16	1/16
11	1617	CCTGTGACAC	GG			TGGGGATA	TGATCAG	GCACAA	1/16	
11	1460	CCTGTGACAC	AG			CTGGGGAT	TAGA	ACAGCACAA	1/16	1/16
11	1449	CCTGTGACACC				TGGGGGA	C	CTTTGACAGCACAA	2/16	1/16
14	1265	CCTGTGA		TTC	TG	CTGGGGGA	CACCGAGGGG	TTTACAGCACAA	1/16	1/16
11	1262	CCTGT	CAA		T	ACTGGGGATA		TGGGACACCC	1/16	1/16
12	1459	CCTGTGACACC				GGGGATA		CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
12	1457	CCTGTGACACC	T			CTGGGGATAC	T	TGGGACACCC	1/16	1/16
12	1635	CCTGTGACACC				TGGGGATA	AG	CTGGGACACCC	1/16	1/16
13	1627	CCGTGACAC	TC			CTGGGG	AG	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
13	1458	CCGTGGA	TTA			TGGGGAT	CCT	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
14	1261	CCTGTGACACC	G	TTC	A	GGGG	CTCCCC	CTGGGACACCC	1/16	1/16
14	1463	CCTGTGAC	CG	CCTTC	A	GGGG	CCGC	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
14	1620	CCTGTGACACC	G		T	ACTGGGG	CCGCA	TCTGGGACACCC	1/16	1/16
14	1616	CCTGTGACAC				ACTGGGG	CAACCA	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
14	1625	CCTGTGAC	GG		GT	ACTGGGGATACG		CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
*	1623	CCTGTGACACC	GTCC			GGGGATAC		CTCTGAGACACCC	1/16	1/16
15	1263	CCGTGACAC				GGGGA	CCCTCGGCTTT	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
15	1271	CCGTGAC	GAACCGCAA			GGGGATAC	CAG	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
16	1614	CCTGTGACACC	GTTT		T	ACTGGGG	CCGTGG	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
16	1267	CCTGTGACACC	C		GT	ACTGGGGATACG	CGG	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
17	1456	CCTGTGACACC	GTAGA	TCCTAC		GGGGAT	CTCTA	CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
17	1268	CCTGTGACAC	GGAT	CCTTCTAC	GG	GGATACG	NGC	CTGGGACACCC	1/16	1/16
18	1455	CCTGTGACACC	GAAGTATCT	CCTC	AG	GGGGATACG	AA	CTGGGACACCC	1/16	1/16

**C**

CDR3 length	CLONE	DV3 TACTGTGCCCTT	N/P	DD2 CCTTCTAC	N/P	DD3 ACTGGGGATAG	N/P	DJ1: ACACCGATAAACTC DJ2: CPTTACAGCACAA DJ3: CTCTGGGACACCC	I	II
05	1354	TACTGTGCCCTT	C			CTGGGG		ACACCGATAAACTC	1/22	
07	1364	TACTGTGC	AAGACACAGG			GGGGATA	CAGG	CTC	1/22	
10	1355	TACTGTGCCCTT		TAC		GGGGATAC	TGAATTG	CACCGATAAACTC	1/22	1/22
10	1361	TACTGTGCCCTT	CGCC			CTGGGG	CGGAG	CGATAAACTC	1/22	
10	1580	TACTGTGCCCTT	CC			CTGGGG	TCCTCT	ACACCGATAAACTC	1/16	
10	1567	TACTGTGCCCTT	TTAGGCT			GGGATACG	GATCTCGG	TAAACTC	1/16	
12	1356	TACTGTGCCCTT	ACCGTGG			ACTGGGG	TTGGTGT	ACACCGATAAACTC	1/22	
12	1353	TACTGTGCCCTT	GGG	TCC	G	TGGG	ATACTGCGT	ACACCGATAAACTC	1/22	
14	1579	TACTGTGCCCTT	AAAGGG	CCTTCTAC	CCCTCT	ACTGGGG	ACCTGGGG	TAAACTC	1/16	
14	1566	TACTGTGCCCTT	GTGAAATCTG	CTAC	C	CTGGGGAT	CCGATGGGGGCG	AAACTC	1/16	
14	1357	TACTGTGCC	GTAAAGG	CCTTC	TCCAGT	ACTGGGG	TCCTAT	ACACCGATAAACTC	1/22	
15	1362	TACTGTGCCCTT	CGCCCC	CCTTCTAC	CTTAT	ACTGGG	ACCCCT	CACCGATAAACTC	1/22	1/22
16	1565	TACTGTGCCCTT	T			ACTGGGGATA	TATGAGGCGG	ACACCGATAAACTC	2/16	1/16
*	1574	TACTGTGCCCTT	TCAAGGTCGTCATGCGA			TGGGG	GCCTTACGGTGGTGGCTCTGG	ACACCGATAAACTC	1/16	1/16
08	1578	TACTGTGCCCTT	AGATTTT			CTGGGGAT	CCG	AA	1/16	
09	1351	TACTGTGCCCTT	AG			ACTGGGGATA		CTTTGACAGCACAA	1/22	1/22
11	1366	TACTGTGCCCTT	CA			ACTGGGGAT	TCCAG	CTTTGACAGCACAA	1/22	1/22
11	1572	TACTGTGCCCTT				ACTGGGG	ATCCCTCCCCA	ACAGCACAA	2/16	1/16
11	1570	TACTGTGCCCTT	ACCGG	CCT	CT	ACTGGGGAT	TTTA	TGACAGCACAA	1/16	1/16
*	1569	TACTGTGCCCTT	T	TTCC	CT	TGGGGATACG	C	GACAGCACAA	1/16	1/16
13	1363	TACTGTGC	GTCCGG	CCTT	ACTGG	TGGG	GGATG	CTTTGACAGCACAA	1/22	1/22
14	1575	TACTGTGCCCTT	TTACATGACCG	TAC	T	ACTGGGGATAC	AGAAAG	GCACAA	1/16	1/16
14	1359	TACTGTGCCCTT	CCACA	TCTT		CTGGGGATAC	TGCCAT	CTTTGACAGCACAA	1/22	1/22
15	1368	TACTGTGCCCTT	GGGCCCCCCCA	CTT	TT	ACTGGGGAT	GSTCGG	GACAGCACAA	1/22	1/22
07	1352	TACTGTGCC	G				G	CTCTGGGACACCC	1/22	1/22
10	1347	TACTGTGCCCTT	TCT			GGGGATA		CTGGGACACCC	2/22	
*	1577	TACTGTGCC	CTCGT			ACTGG	TATCGCCCC	ACACCC	1/16	1/16
*	1571	TACTGTGC		TCC	CGGCGG	TGG	CACCCCTGG	TGGGACACCC	1/16	1/16
12	1568	TACTGTGCCCTT				ACTGGGGATACG		CTCTGGGACACCC	1/16	1/16
13	1360	TACTGTGCCCTT	AG			CTGGGGATACG	GGAG	CTCTGGGACACCC	2/22	1/16
13	1348	TACTGTGCCCTT	A	TCC	GT	TGGGGATA	AG	CTCTGGGACACCC	3/22	1/16
*	1350	TACTGTGCCCTT	CTGCT			ACTGGGGGA	CGCTAG	CTCTGGGACACCC	1/22	1/22

Tabelle 8 [A] - [C] faßt die Nukleotidsequenzen der CDR3-Regionen von *DV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripten zusammen, welche wir in Dünndarmbiopsien eines Neugeborenen analysierten, wobei die Darstellung der Resultate analog zur Tab.4 [A] - [C] ist. Sowohl die abgebildeten *DV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte des Neugeborenen als auch die Sequenzdaten des 6 Wochen alten Säuglings sind über die Datenbanken EMBL/GenBank/DDBJ unter den accession numbers U91126 - U91222 beziehungsweise U91223 - U91302 einzusehen. Generell wiesen die intestinalen *DV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte des Neugeborenen komplexe Gensegmentübergänge auf, die zahlreiche Additionen von „N“-Nukleotiden enthielten. Im Gegensatz zum limitierten  $\delta$  TCR-Repertoire Erwachsener (46; 47) war das neonatale  $\delta$  TCR-Repertoire hochdivers, wobei sich innerhalb korrespondierender Mukosabiopsien keine Überlappungen identischer  $\delta$ -Kettentranskripte nachweisen ließen (vgl. hierzu den rechten Teil der Tab.8). In Analogie zu adulten Individuen (47) waren die Gensegmentübergänge der *DV2*-Transkripte weniger komplex als diejenigen der *DV1*-Transkripte, was zumindest teilweise auf der reduzierten Expressionsrate des *DD2*-Segmentes beruhte. Die *DV1*-, *DV2*- und *DV3*-Repertoires des 6 Wochen alten Säuglings (vgl. Tab.9) ähnelten insofern denen des Neugeborenen, als daß deren CDR3-Regionen ebenfalls sehr komplex waren und sich innerhalb korrespondierender Gewebeproben *keine* identischen  $\delta$ -Transkripte nachweisen ließen. Sowohl das Neugeborene als auch der Säugling verfügten über einige wenige *TCRDV2*-Transkripte, welche keine „N“-Regionen enthielten und vollkommene Identität zu fetalen  $\delta$  TCR-Sequenzen aufwiesen weshalb spekuliert wurde, daß es sich hierbei um ein Relikt der pränatalen Entwicklungsphase handeln könnte. Bezüglich der Expression von *DJ*-Segmenten ähnelte das  $\delta$  TCR-Repertoire des Neugeborenen dem fetalen Rezeptor Repertoire (vgl. Abb.25). Demgegenüber war die Verwendung des *DJ1*-Segmentes bei *DV1*- und *DV3*-Transkripten des 6 Wochen alten Säuglings mit den Expressionsraten Erwachsener vergleichbar.

**Tab.9:** Nukleotidsequenzen der CDR3-Domänen von *TCRDV1-* (A), *DV2-* (B) und *DV3-*Transkripten (C) aus dem Intestinum eines 6 Wochen alten Säuglings

**A**

CDR3- Länge	Klon	DV1 GCTCTTGGGGA	N/E	DD2 CCTTCTAC	N/E	DD3 ACTGGGGATACG	N/E	DJ1: DJ2:	ACACCGATAAACTC CTTTGACGACAA	I	II
09	D1_1_9	GCTCTTGGGGA		TTCTT				TGAGCC	COGATAAACTC	1/22	
11	D1_1_1	GCTCTTGGG	ATGGCCCCC	CCTAC	ACTTAGAGG				GATAAACTC	1/22	
11	D1_1_18	GCTCTTGGGGA	CGCG			CTGGGGATACG		AAG	GATAAACTC	1/22	
11	D1_2_10	GCTCTTGGGGA	TGCCG			CTGGGG		TATCGCT	COGATAAACTC	1/22	1/8
12	D1_1_7	GCTCTTGGGGA	CGCG			TCTGGGGGATA		AACGGC	COGATAAACTC	1/22	
12	D1_2_7	GCTCTTGG	CGGGCC			GTCTGGGGGATACG		GG	ACACCGATAAACTC	1/8	1/8
12	D1_1_4	GCTCTTGGGGA	AGA			TGGGGG		CTACCGAAG	CACCGATAAACTC	1/22	
12	D1_1_13	GCTCTTGGG	AACCAACCG	TTC	GGT	TCTGGGGGATACG		G	AAACTC	1/22	
13*	D1_2_9	GCTCTTGGGGA	TCCCCATCA		TAC			CGGTTTT	CACCGATAAACTC	1/22	1/8
13	D1_1_10	GCTCTTGGG	AACCC	CCTTC	GATTG	GGGGATACG		GGG	COGATAAACTC	1/22	
13	D1_1_24	GCTCTTGGGGA	AAA	TTCC	GGC	ACTGGG		TAT	CACCGATAAACTC	1/22	
13	D1_1_27	GCTCTTGGGGA	C	CCT	GGTAA	TGGGGG		GAGTCT	CACCGATAAACTC	1/22	
14	D1_1_26	GCTCTTGGGGA	AGAGGGGA			CGTCTGGG			ACACCGATAAACTC	1/22	
15*	D1_1_22	GCTCT	GGCTTC	GCTTC		TTCCAGTCTGGGG		GATACGT	ACACCGATAAACTC	1/22	
15	D1_1_8	GCTCTTGGGGA	FACCC	CCT		ACTGGGGATACG		GATGTT	CACCGATAAACTC	1/22	
15	D1_1_5	GCTCTTGGGGA	CATTTTG	CCT		ACTGGGG		CCTT	ACACCGATAAACTC	1/22	
15	D1_2_6	GCTCTTGGGGA	TCAAGGGCA	CCT	GC	ACTGGGGGA		AA	ACACCGATAAACTC	1/8	1/8
17	D1_2_12	GCTCTTGGGG	CCCCAGAAATGGCCATAGG	CTT	GAGGTGG	TGGGGAT		TC	ATAAACTC	1/8	1/8
17	D1_1_25	GCTCTTGGGGA	ACCT	CCTC	GCAT	TCTGGGGAT		GTATTTACT	CGATAAACTC	1/22	
17*	D1_2_8	GCTCTTGGGGA	GATGTATACNNAACAGGGAGGA			GGGG		CC	ACACCGATAAACTC	1/22	1/8
18	D1_1_12	GCTCTTGGGG	CGTT	TTCTTAC	CTTACTACT	TCTGGGGATA		TATTC	COGATAAACTC	1/22	
18	D1_1_20	GCTCTTGGG	AGACCCCC	CCTTCT	CAT	ACTGGGGATAC		TGTGGGGC	CACCGATAAACTC	1/22	
19	D1_1_6	GCTCTTGGGGA	ACCGCG	CTAC	GTACTCGGG	ACTGGGGGA		GCAAGT	ACACCGATAAACTC	1/22	
20	D1_1_14	GCTCTTGGG	TCGAATTTAGGAGAT	CTT	TG	TCTGGGGATACG		GCCGTGT	ACACCGATAAACTC	1/22	
20	D1_1_16	GCTCTTGGGGA	CGCGAGCCCT	TTCTTAC	CCGTT	TCTGGGGAT		GGCTAACCGCT	ACACCGATAAACTC	1/22	
14	D1_2_5	GCTCTTGGGGA	CCA	CTT	GGTA	TCTGGGG		AGCCC	ACACGACAA	1/8	1/8
15	D1_1_15	GCTCTTGGGGA	CCATCTGGTAT			ACTGGGGGA		GC	TTGACGACAA	1/22	
15*	D1_2_1	GCTCTTGGGGA	TCCCA	CCT	CTGGTA	TCTGGGGGA		GC	TTGACGACAA	1/8	1/8
19	D1_1_11	GCTCTTGGGGA	A	TTC	GGG	CTGGG		CTTCTACTGCTACTGTGCTTTA	CTTTGACGACAA	1/22	
20	D1_1_19	GCTCTTGGGGA	CGGTGGCCCTTACCGG	CTTCTC	GATAGGA	GGGAT		TTTTTC	GACGACAA	1/22	

**B**

CDR3- Länge	Klon	DV2 GCCTGTGAC	N/E	DD2 CCTTCTAC	N/E	DD3 ACTGGGGATACG	N/E	DJ1: DJ2: DJ3:	ACACCGATAAACTC CTTTGACGACAA CTCCTGGGACACC	I	II
08	D2_2_14	GCCTGTGAC	GCGA		TAC				DJ1 ACACCGATAAACTC	1/24	
09	D2_1_3	GCCTGTGACA				TCTGGGGGAT			ACCATAAACTC	1/6	
09	D2_2_9	GCCTGTG	TC			GTCTGGGGG		T	CACCGATAAACTC	1/24	
10	D2_2_17	GCCTGT	AA			TGGGGGATA		TCGACAGG	COGATAAACTC	1/24	
12	D2_2_22	GCCTG	GAAATTG			CTGGGGGGAC		CTTGT	ACACCGATAAACTC	1/24	
08	D2_2_8	GCCTGTGAC				TGGGG			GACAGCACAA	1/24	
09	D2_2_19	GCCTGTGAC	G			TGGGG		CT	ACAGCACAA	1/24	
11*	D2_2_7	GCCTGTGAC				GTCTGGG		TCAAG	GACAGCACAA	1/24	
11	D2_2_20	GCCTGTGAC	GCCT			TCTGGGGGA			TTTGACAGCACAA	1/24	
11	D2_2_5	GCCTGTGAC				GTCTGGGGGATA			CTTTGACAGCACAA	1/24	
08	D2_2_10	GCCTGTGAC							DJ3 TCCTGGGACACC	1/24	
11	D2_2_13	GCCTGTGAC	CTGAGCC						CCTGGGACACC	1/24	
12	D2_2_21	GCCTGTGAC				TGGGGGATA			CTCCTGGGACACC	1/24	
12	D2_2_24	GCCTGTGAC				GTCTGGGGGA		A	TGGGACACC	1/24	
12	D2_1_2	GCCTGTGAC	G			CTGGGGGA			TCCTGGGACACC	1/6	
12	D2_1_11	GCCTGTGAC				TCTGGGGGATA		N	TGGGACACC	1/6	
13*	D2_1_10	GCCTGTGAC	CG			ACTGGGG		CCGGC	CCTGGGACACC	1/6	
13	D2_1_13	GCCTGTGAC	CTCA			TCTGGGGAT		GTT	TGGGACACC	1/6	
13	D2_2_18	GCCTGTGAC				TGGGGATAC		AG	CTCCTGGGACACC	1/24	
13	D2_2_15	GCCTGTGAC	GGC			GGGGATACG		ACC	GGGACACC	1/24	
13	D2_2_16	GCCTGTGAC	G			CTGGGGATA			CTCCTGGGACACC	1/24	
13	D2_2_1	GCCTGTGAC	GGG			ACTGGGGGA		AC	CTCCTGGGACACC	1/24	
13	D2_1_9	GCCTGTGAC				GGGGATACG	CG		TCCTGGGACACC	1/6	
13	D2_2_12	GCCTGTGAC				TGGGGATAC		CGA	TCCTGGGACACC	1/24	
13	D2_2_6	GCCTGTGAC	GG			CTGGGGGA		G	CTCCTGGGACACC	1/24	
13	D2_2_4	GCCTGTGAC				GTCTGGGGGA		GG	CTCCTGGGACACC	1/24	
14	D2_2_4	GCCTGTGAC	GGG			TCTGGGGGA			CTCCTGGGACACC	1/24	
14	D2_2_3	GCCTGTGAC	GGG		TTC			GGTACCG	CTCCTGGGACACC	1/24	
14	D2_2_11	GCCTGTGAC	GTG			GTCTGGGGGATA		G	CTCCTGGGACACC	1/24	
15	D2_2_23	GCCTGTGAC				TGGGGATACG			CTCCTGGGACACC	1/24	
						TCTGGGGAT		CCTTAG	CTCCTGGGACACC	1/24	

**C**

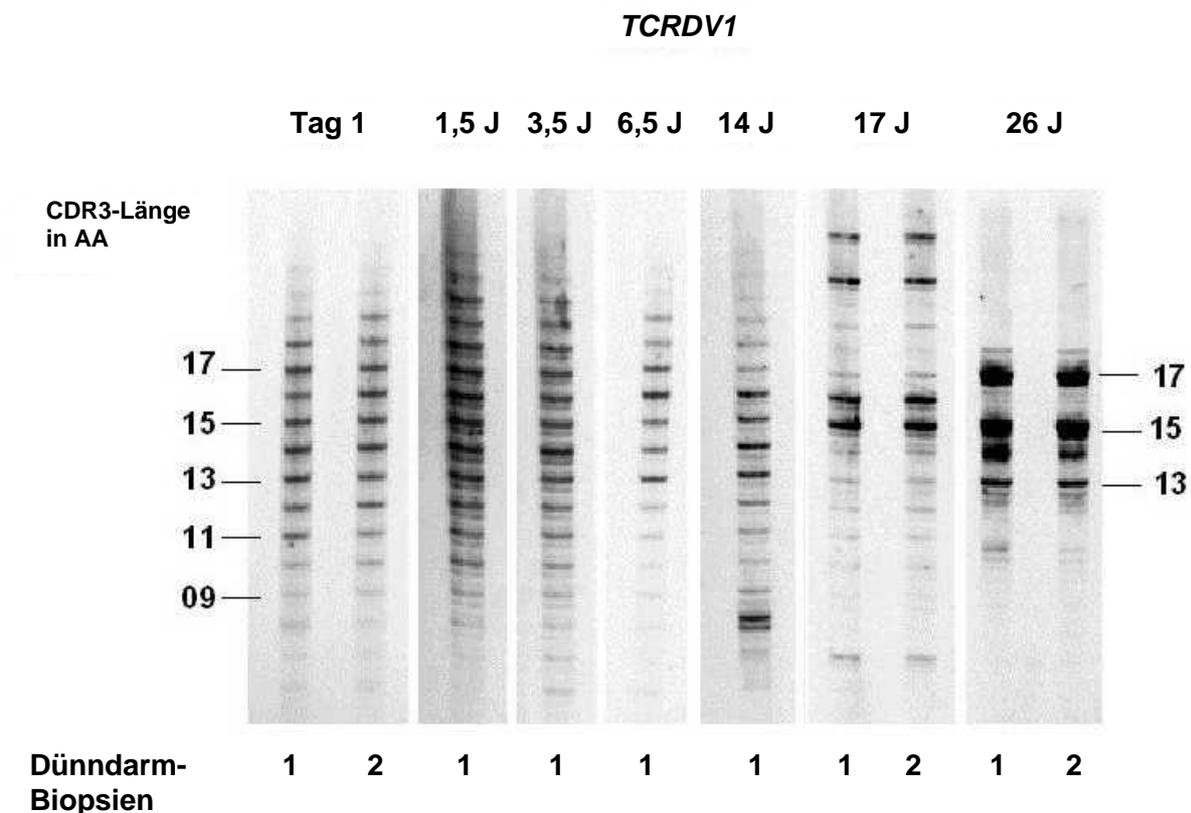
CDR3- Länge	Klon	DV3 TACTGTGCCTTT	N/E	DD2 CCTTCTAC	N/E	DD3 ACTGGGGATACG	N/E	DJ1: DJ2:	ACACCGATAAACTC CTTTGACGACAA	I	II
06	D3_1_9	TACTGTGCCTT	AGT			ACTG		CCTT	COGATAAACTC	1/15	
07	D3_2_9	TACTGTGCCTT	G			TGGGG		ATTG	ACCGATAAACTC	2/12	
07	D3_2_6	TACTGTG	GCC			GAT		TCCT	ACACCGATAAACTC	1/12	
09	D3_1_7	TACTGTGCCTT	CTCGTTACGGATT			GTCTGGG		C	AAACTC	6/15	
09	D3_2_10	TACTGTGCC	CTCG			CTGGGGGAT		CGT	ACACCGATAAACTC	1/12	1/12
10	D3_1_6	TACTGTGCCTTT	ATCGCCC			GGGG		CGCATGTC	COGATAAACTC	1/15	
10	D3_1_1	TACTGTGCCTTT	CTTA	CCTTCC				ACTTGT	ACACCGATAAACTC	1/15	
10	D3_2_7	TACTGTGCCTTT	AAATC			GGGGATACG		GAG	CACCGATAAACTC	1/12	
11	D3_2_11	TACTGTGCCTT	G	TTC		GGGG		TCTTTCT	ACACCGATAAACTC	1/12	
11	D3_1_8	TACTGTGCCTTT	ATGTCCC			GGGG		CCGACTAAT	ACCGATAAACTC	2/15	
11	D3_1_10	TACTGTGCCTTT	AAA	TCC	GTGCGCGCC	GGGG		CG	ACCGATAAACTC	1/15	
12	D3_1_12	TACTGTGCC	CCCA	CTT	GCC	CTGGGGGATACG		GT	ACACCGATAAACTC	1/15	
12	D3_2_1	TACTGTGCCTTT	GATTCTTGCTGTA	CCTT	TCT			T	ACACCGATAAACTC	1/12	
13	D3_2_3	TACTGTGCCTTT	TCCCGCC	CCTT	TC	GGGGAT		CCGCT	ACACCGATAAACTC	1/12	
14*	D3_1_2	TACTGTGCCTTT	CACGG		TCCTA			TGTTTTTACTTGGCTCTCT	ACACCGATAAACTC	1/15	
14	D3_2_2	TACTGTGCCGT	CCC	CCTTCTAC				GGGSCCTGG	CGATAAACTC	1/12	
14	D3_2_8	TACTGTGCCTT	ACCA	TTCTT	TG	CTGGGGAT		CTTGT	ACACCGATAAACTC	1/12	
14	D3_2_12	TACTGTGCCT	ACACTAGG			GAC	ACTGGGGATAC		ACACCGATAAACTC	1/12	
19	D3_1_18	TACTGTGCCTTT	AAAGTTTGGCATATAAAG	TCCTAC		ATT	TGGG	CAGGTGTG	ACACCGATAAACTC	1/12	
								TGGCGTGGTGATT	GATAAACTC	1/15	
12	D3_2_4	TACTGTGCCTTT	AGGC			CTGGGG		GCCGCAATG	TTTGACGACAA	1/12	

**5.2.4 Entwicklungsabhängige Einschränkung der Diversität humaner  $\delta$  TCR-Repertoires**

Da sich die oligoklonalen CDR3-Profile Erwachsener (46; 47) grundlegend von den polyklonalen Verteilungsmustern bei Feten und Neugeborenen unterschieden nah-

men wir an, daß das humane  $\delta$  TCR-Repertoire des Intestinaltraktes einer sukzessiven Einschränkung seiner Rezeptorvielfalt unterliegt. Um den Zeitpunkt der einsetzenden Limitierung exakter zu bestimmen, führten wir CDR3-Längenanalysen der  $\delta$  TCR-Transkripte aus dem Dünndarm eines Neugeborenen, mehrerer Kinder und Jugendlicher sowie eines jungen Erwachsenen durch, der ein Lebensalter von 26 Jahren erreicht hatte.

**Abb.26:** Entwicklungsabhängige Veränderungen des intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires



Die Abbildung 26 dokumentiert anhand von CDR3-Längenanalysen der *TCRDV1*-Transkripte von 7 Patienten, daß klonale Expansionen des intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires bereits im Alter von 14 - 17 Jahren deutlich ausgeprägt waren, was durch DNA-Sequenzanalysen bestätigt werden konnte. Im Vergleich hierzu erwiesen sich die  $\delta$  TCR-Repertoires der Individuen im Alter von 1.5, 3.5 sowie 6.5 Jahren als hochdivers und ähnelten der CDR3-Längenverteilung des Neugeborenen (vgl. Abb. 24). Im Fall des 17- bzw. des 26jährigen Patienten betrug die Distanz zwischen den parallel entnommenen Biopsien zirka 10 cm. Entsprechende Untersuchungen der intestinalen *TCRDV2*- und *DV3*-Transkripte erbrachten analoge Resultate (Daten nicht gezeigt).

### 5.3 Das $\delta$ Rezeptor Repertoire kutaner $\gamma/\delta^+$ T-Lymphozyten gesunder Personen

Abgesehen von Ähnlichkeiten ihrer anatomischen Struktur verfügt die Haut - analog zum Darmtrakt - über eine große Oberfläche, weshalb sie gleichermaßen eine potentielle Eintrittspforte für pathogene Mikroorganismen darstellt. Da die Immunsysteme beider Organsysteme vor ähnliche Anforderungen gestellt werden und sich deshalb vermutlich vergleichbarer Abwehrstrategien bedienen, bildeten Analysen kutaner  $\gamma/\delta^+$  T-Zellen einen weiteren Teilaspekt unserer molekularbiologischen Untersuchungen.

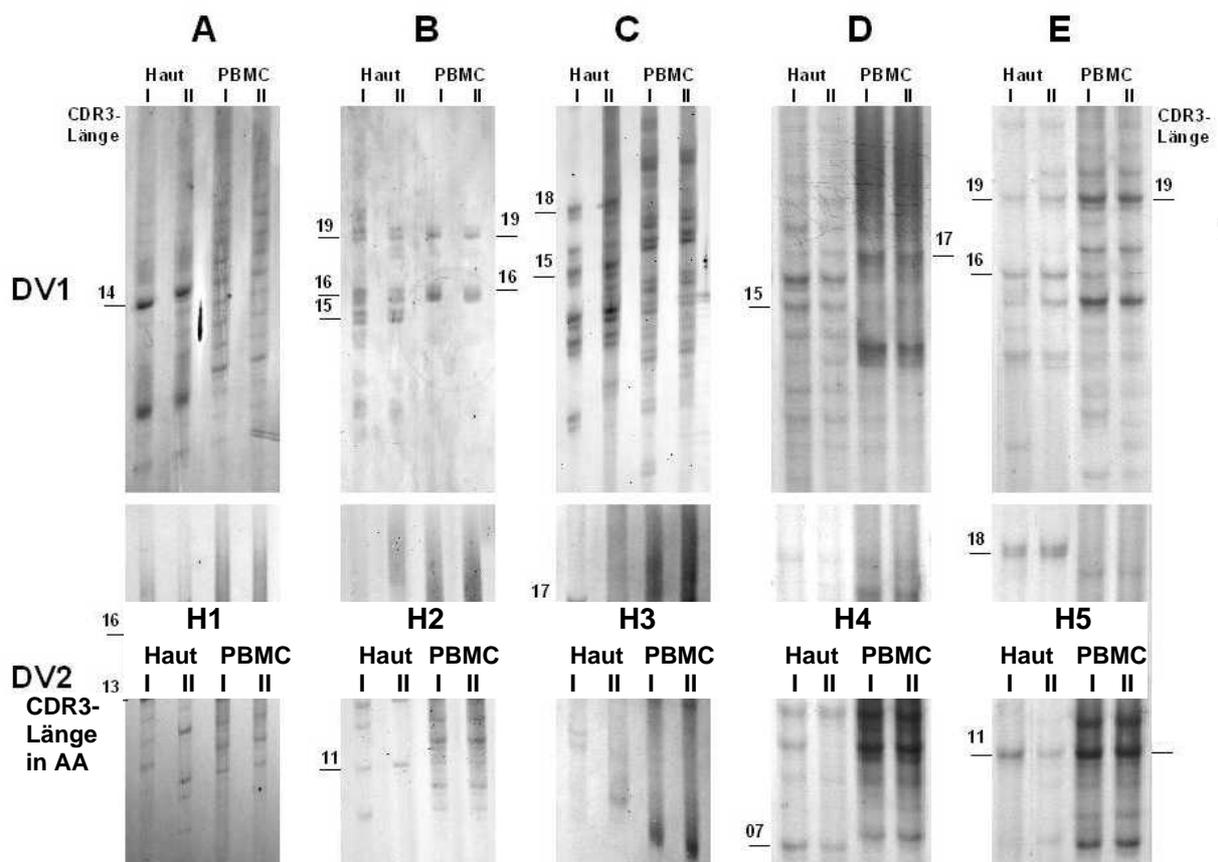
Zu Beginn unserer Studien existierten nur wenige experimentelle Daten, die detaillierte Einblicke in das Rezeptor Repertoire kutaner  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten gestatteten. Aufgrund von DNA-Sequenzanalysen, welche unter Verwendung weniger  $\gamma/\delta$  T-Zellklone durchgeführt worden waren wurde vermutet, daß kutane  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten diverse Rezeptor Repertoires aufweisen (120; 123). Allerdings konnte im Rahmen dieser Untersuchungen keine klare Abgrenzung vom peripheren  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoire vorgenommen werden (124). Somit bestand der initiale Ansatzpunkt unserer Experimente in einer differenzierenden Charakterisierung des kutanen  $\delta$ -Kettenrepertoires gesunder Kontrollpersonen. Konkret wurde die Diversität kutaner  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten anhand von Gewebestanzungen aus der *Epidermis* sowie der *Dermis* mittels „CDR3-Spectratyping“ analysiert und mit dem peripheren  $\delta$  Rezeptor Repertoire der entsprechenden Probanden verglichen. Dieser experimentelle Ansatz ermöglichte eine klare Unterscheidung zwischen dem Rezeptor Repertoire der seltenen kutanen  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten und demjenigen der peripheren  $\gamma/\delta$  T-Zellen, welche mit intradermalen Kapillargefäßen assoziiert sind. Um sicher zu stellen, daß der befundene Klonalitätsgrad keine Folge einzelner aktivierter T-Lymphozyten darstellte, welche definierte Rezeptortranskripte mit hoher Rate exprimieren, wurde auch die chromosomale DNA analysiert.

**Tab.10:** Patientenkollektiv „gesunde Haut“ (H1 - H7)

Patient	Geburtsdatum	Geschlecht	Diagnose	UICC-Stadium	Entfernung der PE vom Tumorrand	Lokalisation der PE Haut
H1	1958	w	SSM, LIII, Ø = 1,1 mm	Ib/pT2	5,5 cm	re. Flanke + 2 x PBL

H2	1925	m	SSM, LIV, Ø = 0,85 mm	Ib/pT2	4,5 cm	Abdomen + 2 x PBL
H3	1936	w	SSM, LIII, Ø = 0,86 mm	Ib/pT2	5,0 cm	rechter Unterschenkel + 2 x PBL
H4	1961	w	-	-	-	li. Schulter + 2 x PBL
H5	1937	m	-	-	-	li. Hand + 2 x PBL
H6	1970	w	malignes Melanom klein, keine Metastasen	Ib/pT2	5,0 cm	re. Oberarm + 2 x PBL
H7	1944	w	Basaliom 4 x 7 cm	-	4,0 cm	re. Oberarm + 2 x PBL

Die an sieben Kontrollpatienten im Alter zwischen 37 und 73 Jahren vorgenommenen chirurgischen Eingriffe erfolgten entweder aus kosmetischen Gründen (Diagnose „-“) oder wurden zwecks Exzision *nichtmetastasierender*, maligner Melanome durchgeführt, deren Gewebepenetration < 1,1 mm betrug (Stadium Ib/pT2). Da die Hautbiopsien im Abstand von ~ 5 cm zum Neoplasma entnommen wurden und die betreffenden Patienten selbst nach 2jährigem, postoperativem Intervall keine Tumorneubildungen zeigten, konnten krankheitsbedingte Beeinflussungen des kutanen  $\delta$  TCR-Repertoires weitgehend ausgeschlossen werden. Um der potentiell bestehenden Gefahr PCR-generierter Artefakte zu begegnen, wurden sämtliche Untersuchungen in Doppelbestimmung vorgenommen, was auch für die Analyse peripherer mononukleärer Zellen galt.



Die *TCRDV1*- und *TCRDV2*-Transkripte kutaner sowie peripherer  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten der fünf Patienten H1 - H5 wurden parallel auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es ist deutlich erkennbar, daß die CDR3-Profile oligoklonale Verteilungsmuster aufwiesen und darüber hinaus streng kompartimentspezifisch waren. Definierte Banden, die  $\delta$ -Kettentranskripte enthielten, wurden aus der Gelmatrix isoliert, reamplifiziert und nachfolgend direkt sequenziert (vgl. die jeweils ermittelten CDR3-Längen). Demgegenüber erbrachten *in vitro* Amplifikationen kutaner *TCRDV3*-Transkripte überwiegend sehr niedrige PCR-Produktausbeuten bzw. kein Amplifikat (Daten nicht gezeigt). Hieraus kann geschlossen werden, daß *TCRDV3* exprimierende T-Lymphozyten in der Haut gesunder Personen extrem unterrepräsentiert sind. Da korrespondierende Hautproben, welche im Abstand von 2 - 10 cm voneinander isoliert wurden sehr ähnliche CDR3-Profile sowie identische dominante Banden aufwiesen lag nahe, daß kutane  $\gamma/\delta^+$  T-Zellen nicht nur lokal expandieren, sondern weitreichende Hautareale umfassen können. Diese Annahme ließ sich durch DNA-Sequenzanalysen dominanter Banden bestätigen, die zur Identifizierung zahlreicher identischer  $\delta$ -Kettenrearrangements innerhalb parallel entnommener Hautbiopsien führten (vgl. Tab.11, S.103).

### **5.3.2 Kutane und periphere $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten weisen signifikant voneinander verschiedene Rezeptor Repertoires auf und stellen distinkte Zellpopulationen dar**

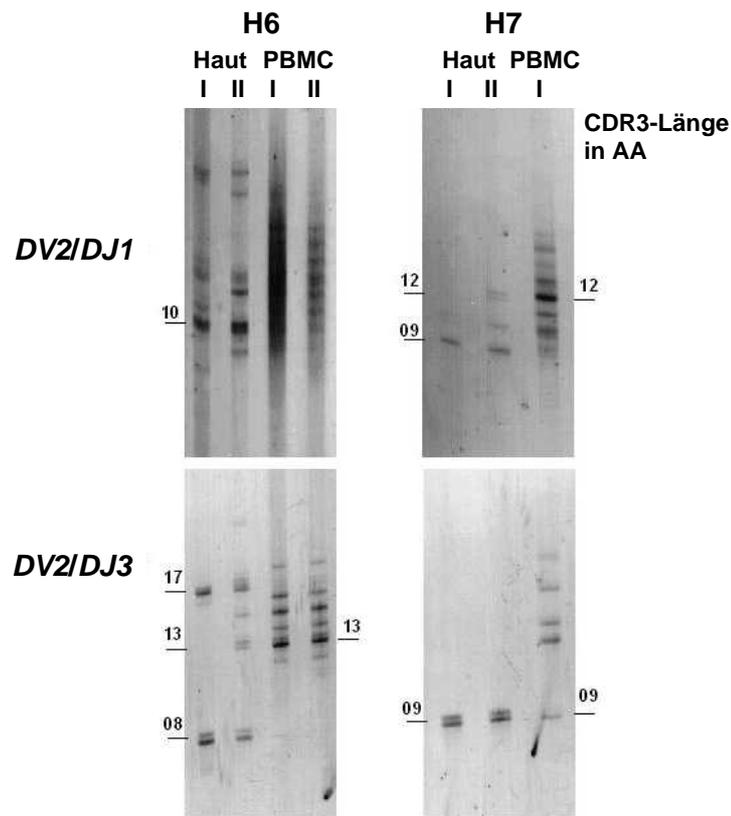
Unser experimenteller Ansatz ermöglichte eine Differenzierung zwischen dem  $\delta$  TCR-Repertoire lokaler, kutaner T-Zellen und demjenigen peripherer  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten, welche innerhalb der Kapillargefäße der Haut lokalisiert waren. Da  $\gamma/\delta$  T-Zellen beim Menschen lediglich 1 - 8% der intradermalen, CD3-positiven Lymphozyten ausmachen (117) bestand prinzipiell die Möglichkeit, daß die analysierten  $\delta$  TCR-Repertoires auch  $\delta$  TCR peripherer T-Lymphozyten repräsentierten, welche mit den Mikrogefäßen der Haut assoziiert sind und ebenfalls über ein oligoklonales  $\delta$  TCR-Repertoire verfügen (47; 110; 231; 232). Um der Gefahr von Fehlinterpretationen zu begegnen, analysierten wir analog zu den Repertoires kutaner  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten jeweils auch das  $\delta$  TCR-Repertoire von Blutproben, welche den Probanden zeitgleich

mit den kutanen Probeexzisionen entnommen wurden. Wie aus Abb.27 hervorgeht, waren die CDR3-Längenprofile peripherer  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten ihrer Diversität nach in den meisten Fällen ebenfalls limitiert, unterschieden sich jedoch signifikant vom jeweiligen kutanen  $\delta$  TCR-Repertoire. Unter der Annahme, daß sich die dominanten  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten der Haut vom peripheren Zellpool herleiten, sollte man innerhalb beider Populationen jedoch identische klonale Expansionen erwarten. In einigen Ausnahmefällen fanden sich tatsächlich Belege für derartige, kompartmentübergreifende Expansionen: So zeigten die *TCRDV1*-Transkripte des Patienten H2 ein CDR3-Profil, welches sowohl in der Haut als auch bei PBMC nachgewiesen werden konnte (Abb.27, *DV1*, CDR3-Längen 19 und 16), wobei DNA-Sequenzanalysen die Existenz identischer  $\delta$  TCR-Rearrangements innerhalb beider Kompartimente bestätigten (vgl. Tab.11). Darüber hinaus wies das kutane  $\delta$  TCR-Repertoire jedoch auch dominante Banden auf (Abb.27, Patient H2, *DV1*, CDR3-Länge 15), welche *nicht* in den entsprechenden CDR3-Profilen peripherer  $\gamma/\delta^+$  PBMC identifiziert werden konnten und von daher vermuten ließen, daß sie Rezeptoren von T-Zellen darstellten, welche ausschließlich in der Haut lokalisiert waren.

### **5.3.3 Die oligoklonalen Rezeptor Repertoires kutaner $\gamma/\delta^+$ T-Zellen beruhen nicht auf gesteigerten Genexpressionsraten aktivierter T-Lymphozyten**

Der größte systematische Fehler, mit dem CDR3-Längenanalysen prinzipiell behaftet sein können besteht im Vorhandensein aktivierter Lymphozytenklone, welche bestimmte Transkripte mit hoher Rate exprimieren und hierdurch eine Verschiebung des tatsächlichen Rezeptor Repertoires verursachen können. Um auszuschließen, daß der ermittelte Klonalitätsgrad des  $\delta$  TCR-Repertoires auf erhöhten Transkriptionsraten aktivierter T-Zellklone beruhte, untersuchten wir parallel zur cDNA die DNA aus Hautproben sowie PBMC zweier weiterer gesunder Patientinnen (H6 bzw. H7). Hierbei wurden die *DV2*-Arrangements  $\delta$  Ketten kodierender Gensegmente auf chromosomaler Ebene analysiert, wobei *TCRDV2*- sowie intronspezifische „antisense“-Oligonukleotide für *TCRDJ1* bzw. *TCRDJ3* in den Polymerase-Kettenreaktionen zum Einsatz kamen:

**Abb.28:** CDR3-Längenanalysen kutaner und peripherer  $\delta$ -Kettenrearrangements, die *in vitro* unter Verwendung chromosomaler Matrizen-DNA amplifiziert wurden



Da die *DJ*-Intronsequenz im Rahmen des posttranskriptionellen „Splicings“ eliminiert wird, schließt die Verwendung intronspezifischer *DJ*-„Primer“ eine simultane Amplifikation von  $\delta$  TCR-Transkripten aus. Die *DV2*-Region wurde deshalb als Zielsequenz ausgewählt, weil sie von humanen kutanen  $\gamma/\delta$  T-Zellen weitaus am häufigsten exprimiert wird (120; 123; 124). Wie bereits für *TCRDV2*-Transkripte beschrieben (vgl. Abb.27), ließen auch die Amplifikationen chromosomaler *TCRDV2*-Rearrangements oligoklonale CDR3-Profile erkennen, wobei korrespondierende Hautbiopsien nahezu identische klonale Expansionen aufwiesen und sich signifikant vom peripheren  $\delta$  Rezeptor Repertoire unterschieden, was zudem durch die DNA-Sequenzanalyse von  $\delta$  TCR-Banden bestätigt werden konnte (vgl. Tab.11). Somit erbrachten die Untersuchungen, bei denen cDNA und chromosomale DNA als alternative Matrizen für Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt wurden im „CDR3-Spectratyping“ übereinstimmende Resultate.

#### 5.3.4 DNA-Sequenzanalysen dominanter $\delta$ TCR-Transkripte kutaner $\gamma/\delta$ T-Zellklone

Um definitiv sicherzustellen, daß korrespondierende dominante Banden in zeitgleich entnommenen Hautbiopsien (vgl. Abb.27 bzw. 28) tatsächlich identische  $\delta$ -Transkripte repräsentierten, wurden diese nach vorangegangener Isolierung sowie *in vitro* Reamplifikation direkt sequenziert. Insgesamt konnten wir mittels der DNA-Sequenzanalyse 23 Paare identischer dominanter *TCRDV1*- bzw. *TCRDV2*-Rearrangements innerhalb korrespondierender Hautbiopsien identifizieren. Tabelle 11 zeigt, daß die  $\delta$  TCR-Transkripte (A) und die chromosomalen  $\delta$ -Kettenrearrangements (B) parallel gewonnener Hautbiopsien identische Nukleotidsequenzen aufwiesen was darauf hindeutete, daß kutane  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten nicht nur lokal expandieren, sondern homogene Verteilungen klonal expandierter Zellpopulationen aufweisen. In denjenigen Fällen, wo sich Sequenzüberlappungen zwischen kutanen und peripheren  $\delta$ -Kettentranskripten nachweisen ließen bestand die Möglichkeit, daß dies auf peripheren  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten beruhte, die mit kutanen Mikrogefäßen assoziiert waren. Lediglich in einem einzigen Fall (Patient H2, *TCRDV2*, CDR3-Länge 11) erbrachte die Feinstrukturanalyse korrespondierender DNA-Banden divergente  $\delta$  TCR-Transkripte.

**Tab.11:** Nukleotidsequenzen der Gensegment-Übergangsregionen kutaner und peripherer  $\delta$ -Kettentranskripte

N	P	DD3	ACTGGGGATACG	P	N	P	TCRDJ	Haut		P BMC
								I	II	
ITA	ACTG							X	X	
ACACTT	CTGGGGGATACG	CG		AAATG			GACAGCACAA	X	X	
	TGGGGGATACG			GCGGAG			CCGATAAACTC	X	X	
FACT	ACTGGGGGATACG			TCACGCTAT			ACACCCGATAAACTC	X	X	
FGA	TGGGGGATACG	C		GACT		TGT	CACCGATAAACTC	X	X	
CTCA	CTGGGGGATACG			CT			ACACCCGATAAACTC	X	X	
	TGGGGGATACG			ACGCTGAGC		T	CCGATAAACTC	X	X	
	GGGGGA			CAITCGTAA			ACACCCGATAAACTC	X	X	
C	TGGGGGATACG			TTTGACC		T	CCTGGGACACC	X	X	
CGACCTC	ACTGGGGG			TTTC		TGT	ACACCCGATAAACTC	X	X	
	CTGGG			C			ACACCCGATAAACTC	X	X	
FCCT	TGGGGGATACG	C		AA			CGATAAACTC	X	X	
	ACTGGGGGATAC			GGGGGAT			CTGGGACACC	X	X	
	GGGGGAT			GGGGAGGGACCA		T	ACACCCGATAAACTC	X	X	
	ACTGGGGGATA			ATAGGGC			ACTC	X	X	
	GGGGGAT			GGACC		GT	ACACCCGATAAACTC	X	X	
CGAGGC	ACTGGGGGA			ATCCCCTAGTAAACGAG		GT	ACACCCGATAAACTC	X	X	
	GGGGGA			GA		GT	ACACCCGATAAACTC	X	X	
	TGGGGGAT			GTTAC		GT	ACACCCGATAAACTC	X	X	
	TGGGG			AAATAGGAT			TGGGACACC	X	X	
	TGGGGGA						AACTC	X	X	
	ACTGGGGGATACG	C		CAT		AG	CTCCTGGGACACC	X	X	
	TGGGGGATAC			TCCATCAGG			ACCGATAAACTC	X	X	
	ACTGGGGGAT			GC		GT	ACACCCGATAAACTC	X	X	

N	P	DD3	ACTGGGGATACG	P	N	P	TCRDJ	Haut		P BMC
								I	II	
								X	X	
	TGGGGATAC			CGGG			TCRDJ1	X	X	
	CTGGGGGATA			AAGGACC			TAAACTC	X	X	
	GGGGGATACG			A			ACCGATAAACTC	X	X	
							CGATAAACTC	X	X	
	GGG			CCGGA			TCRDJ3	X	X	
	GGG						CCTGGGACACC	X	X	
	GGGG			CIT		G	CTCCTGGGACACC	X	X	
	TGG			A			CTCCTGGGACACC	X	X	
	GGGG			TC			GACACC	X	X	

Der Vergleich dominanter Banden kutaner und peripherer  $\delta$  TCR-Transkripte übereinstimmender CDR3-Länge ließ in 4 Fällen gleichartige  $\delta$ -Kettenarrangements, in weiteren 3 Fällen hingegen abweichende Nukleotidsequenzen erkennen. Die CDR3-Regionen kutaner und peripherer  $\delta$ -Rezeptoruntereinheiten waren in jedem Fall komplex strukturiert. Ferner ließen sich niemals Überlappungen zwischen den  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoires verschiedener Personen nachweisen.

#### **5.4 Die Rolle von $\gamma/\delta$ T-Zellen bei *chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen (CED)***

##### **5.4.1 Ausgangssituation**

Obwohl zahlreiche Hinweise darauf vorliegen, daß  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese *chronisch entzündlicher Darmerkrankungen* spielen (vgl. 2.1.13) erbrachten die immunhistochemischen Untersuchungen der mukosalen  $\gamma/\delta$  T-Zellen von *CED*-Patienten widersprüchliche Resultate. So ließen einige Stu-

dien erkennen, daß sowohl die Verteilung als auch die absolute Anzahl der  $\gamma/\delta$  T-Zellen innerhalb läsionaler Darmareale derjenigen phänotypisch unauffälliger Mukosaabschnitte gleicht (233 - 236). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Untersuchungen, die erhöhte Titer  $\gamma/\delta^+$  T-Zellen in entzündlichen Darmarealen dokumentierten (161). Mittels durchflußzytometrischer Methoden sowie PCR (161) ließ sich zeigen, daß bei intestinalen  $\gamma/\delta$  T-Zellen in jedem Fall *DV1/DJ1*-Arrangements dominieren wobei es offensichtlich keine Rolle spielt, ob die betreffenden T-Lymphozyten von *M.Crohn*-, *C.ulcerosa*- oder *Divertikulitis*-Patienten stammen. Innerhalb der T-Zellareale lymphoider Follikel sowie in der Peripherie der Granulome von *M.Crohn*-Patienten konnten erhöhte  $\gamma/\delta$  T-Zelltiter nachgewiesen werden (160).  $\gamma/\delta$  T-Zellen stellen bekanntermaßen eine bedeutende Quelle des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  dar, womit ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung an der Granulomentstehung bei *M.Crohn*-Patienten gegeben ist. Analysen des *TCRDV1*- sowie des *TCRDV3*-Repertoires von T-Lymphozyten, die aus der entzündeten Mukosa von *M.Crohn*-Patienten stammten, ließen klonale Expansionen sowie eine erhöhte Expressionsrate des *DJ3*-Gensegmentes erkennen (237). Demgegenüber war unbekannt, ob derartige Expansionen auch in *nicht*involvierten Mukosaarealen existieren. Im Vergleich zu gesunden Personen, welche innerhalb des peripheren Blutes vorwiegend  $V\delta 2$ -positive T-Zellen aufweisen (101), konnte im Blut von *M.Crohn*-Patienten ein erhöhter Prozentsatz  $V\delta 1$ -positiver T-Lymphozyten ermittelt werden (103; 174; 233), was auf eine Beteiligung systemischer  $\gamma/\delta$  T-Zellen an der Pathogenese des *M.Crohn* schließen läßt.

Aus dem derzeitigen Erkenntnisstand kann abgeleitet werden, daß antigenspezifische  $\gamma/\delta$  T-Zellen in der intestinalen Mukosa akkumulieren und dort vermutlich inflammatorische Prozesse induzieren. Vor dem Hintergrund, daß oligoklonale Expansionen für intestinale  $\gamma/\delta$  T-Zellen erwachsener Personen charakteristisch sind (46 - 48) war für uns von Interesse, inwieweit die innerhalb läsionaler Mukosaareale vermehrten  $\gamma/\delta^+$  IEL mit spezifischen, möglicherweise bakteriellen Antigenen interagieren und durch diese aktiviert werden. Da solche Wechselwirkungen prinzipiell zu krankheitsassoziierten Verschiebungen des  $\delta$  Rezeptor Repertoires führen können, analysierten und verglichen wir die CDR3-Längenprofile der  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten aus läsionalen sowie benachbarten, phänotypisch unauffälligen Darmarealen von *Morbus Crohn*-

*Colitis ulcerosa*- sowie *Divertikulitis*-Patienten. Um die Möglichkeit einer Beeinflussung systemischer  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten durch die jeweilige Erkrankung zu untersuchen, bestimmten wir darüber hinaus das periphere  $\delta$  TCR-Repertoire der betreffenden Probanden.

#### 5.4.2 Patientenkollektiv CED

Das Patientenkollektiv bestand aus *M.Crohn*-Patienten [MC1 - MC8, vgl. Tab.12 (c), S. 107], die in der Gastroenterologischen Ambulanz der Medizinischen Klinik II im Zentrum der Inneren Medizin (ZIM) der *JWG-Universität* Frankfurt am Main betreut wurden. Darüber hinaus bestand eine Kooperation mit Herrn Prof. R. DUCHMANN von der *Johannes Gutenberg-Universität* Mainz (derzeit *Universität des Saarlandes*, Homburg/Saar). Im Rahmen dieser Zusammenarbeit konnten Mukosabiopsien bzw. chirurgisches Resektionsmaterial in die Studie einbezogen werden, das von *Colitis ulcerosa*- [CU1 und CU2, Tab.12 (b)] sowie *Divertikulitis*-Patienten stammte. Im Fall der *Divertikulitis*-Patienten waren keine näheren Angaben zur Person erhältlich; die entsprechenden Biopsien aus dem *Sigmoid* tragen die Bezeichnungen „D1“ bzw. „D2“.

**Tab.12 (a):** Kontrollkollektiv „gesundes Kolon“ (G1 - G10)

Patient	Geburtsdatum	Geschlecht	Diagnose	Biopsien
G1	1924	m	Durchfälle unklarer Genese	<i>Kolon I = Caecum</i> <i>Kolon II = K. transversum</i> (Distanz = 1 m) + 2 x 10 ml venöses Blut (Heparin)
G2	1916	w	Zustand nach <i>Zervix-CA</i> , NPL-Ausschluß	<i>Kolon I = K. transversum</i> <i>Kolon II = Sigmoid</i> (Distanz = 1 m) + 3 x 10 ml venöses Blut
G3	1939	w	chronische Obstipation	<i>Kolon I = K. transversum</i> <i>Kolon II = Sigmoid</i> (Distanz = 1 m) + 2 x 10 ml venöses Blut
G4	1950	w	Blutungsausschluß	<i>Kolon I = Rektum</i> <i>Kolon II = Rektum</i> (Distanz = 0,1 m) + 2 x 10 ml venöses Blut
G5	1952	m	chronische Obstipation	<i>Kolon I = Rektum</i> <i>Kolon II = Caecum</i> + 2 x 10 ml venöses Blut
G6	1959	w	abdominale Beschwerden	<i>Kolon I = K. ascendens</i> <i>Kolon II = K. descendens</i> <i>Kolon III = K. transversum</i> + 2 x 10 ml venöses Blut

G7	1923	m	chronische Obstipation	<i>Kolon I = K. transversum</i> <i>Kolon II = Sigmoid</i> + 2 x 10 ml venöses Blut
G8	1934	m	chronische Obstipation	<i>Kolon I = Rektum</i> <i>Kolon II = Rektum</i> + 2 x 10 ml venöses Blut
G9	1930	m	chronische Obstipation	<i>Kolon I = K. descendens</i> <i>Kolon II = K. transversum</i> + 2 x 10 ml venöses Blut
G10	1938	m	abdominale Beschwerden unklarer Genese	<i>Kolon I = Rektum</i> <i>Kolon II = Rektum</i> + 2 x 10 ml venöses Blut

**Tab.12 (b):** *Colitis ulcerosa* - Patienten (CU1 + CU2)

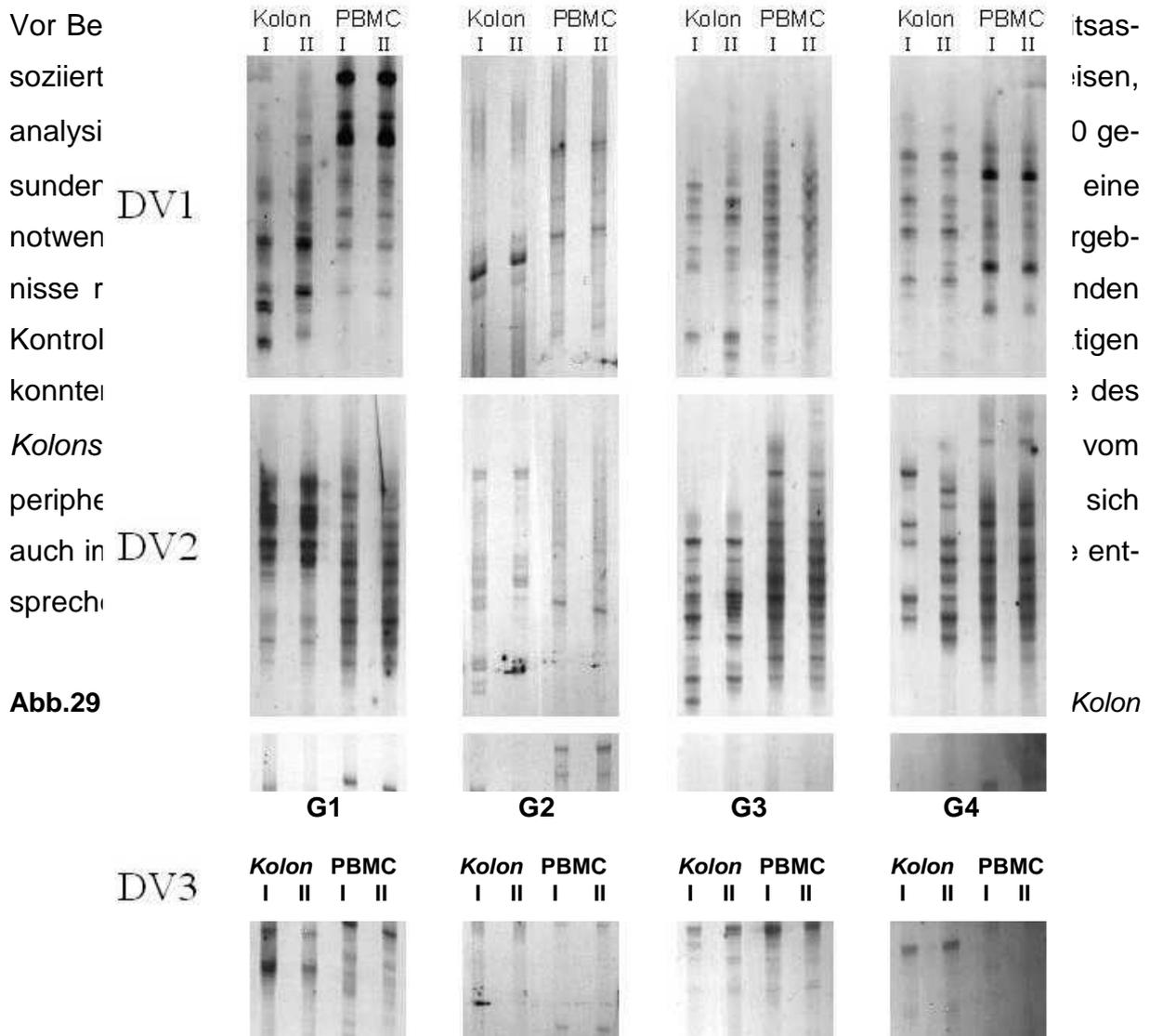
Patient	Geburtsdatum	Geschlecht	Diagnose	Biopsien
CU1	1952	w	<i>Colitis ulcerosa</i> ED: 1979	<i>Rektum:</i> entzündetes Areal (+)  <i>Rektum:</i> nichtentzündliches Areal (-) (Distanz ~ 10 cm)
CU2	1972	m	<i>Colitis ulcerosa</i> ED: 1992	<i>Sigmoid (20 cm):</i> hochfloride (+)  <i>Sigmoid (35 cm):</i> mäßig floride (+/-)  <i>Sigmoid (40 cm):</i> nicht floride (-)

**Tab.12 (c):** *Morbus Crohn* - Patienten (MC1 - MC8)

Patient	Geburtsdatum	Geschlecht	Diagnose	Biopsien
MC1	1962	m	ausgeprägt floride chron. Ileocolitis ED: 1990 <i>Morbus Bechterew</i> ED: 1989	Ileocaecalklappe ( <i>kolonseitig</i> ): floride Entzündung (+)  <i>Kolon transversum:</i> nicht entzündet (-)
MC2	1966	w	apht. Ileitis, Anastomose, gering floride Ileocolitis ED: 1994 Anastomositis ED: 1993	<i>Kolon:</i> diskret floride Entzündung (+)  <i>Kolon transversum:</i> nicht entzündet (-)
MC3	1965	m	geringe Entzündung an Ileocaecalklappe und <i>Kolon</i> , gering florider <i>M.Crohn</i> ED: 1992	<i>Kolon (nahe Ileocaecalklappe):</i> gering floride (+)  <i>Kolon transversum:</i> nicht entzündet (-)
MC4	1979	m	ulceröse Colitis und perianale Fistelung floride Colitis, aktiver <i>M.Crohn</i> ED: 1997	<i>Sigma:</i> hochfloride (+)  <i>Sigma:</i> nicht/gering (?) entzündet (-)

MC5	1960	m	Ileocolitis, aktiver <i>M.Crohn</i> ED: 1988	<i>Sigmoid:</i> entzündet (+)  <i>Sigmoid:</i> nicht entzündet (-)
MC6-1	1956	w	kein Anhalt für Rezidiv im <i>Kolon</i> (01/1997)	<i>Kolon:</i> nicht entzündet, Remission (-)
MC6-2			aktiver <i>M.Crohn</i> , kleine Ulcera im <i>Sigma</i> (06/197)	<i>Kolon:</i> entzündet (+)
MC7	1972	w	florider <i>Morbus Crohn</i> ED: 1994 EM: 1992	<i>Sigmoid</i> (15 cm-Resektat): 6 Biopsien im Abstand von 5 cm, patholog. veränd. Bereich (+)  <i>Ileum:</i> 2 Biopsien im Abstand von 3 cm, ~ 1 cm vom Resektionsrand (-)
MC8	1951	w	aktiver <i>M.Crohn</i> ED: 1974	<i>Caecum:</i> entzündet (+)  <i>Kolon ascendens:</i> nicht entzündet (-)

### 5.4.3 CDR3-Längenanalysen intestinaler und peripherer $\delta$ TCR-Transkripte gesunder Kontrollpersonen



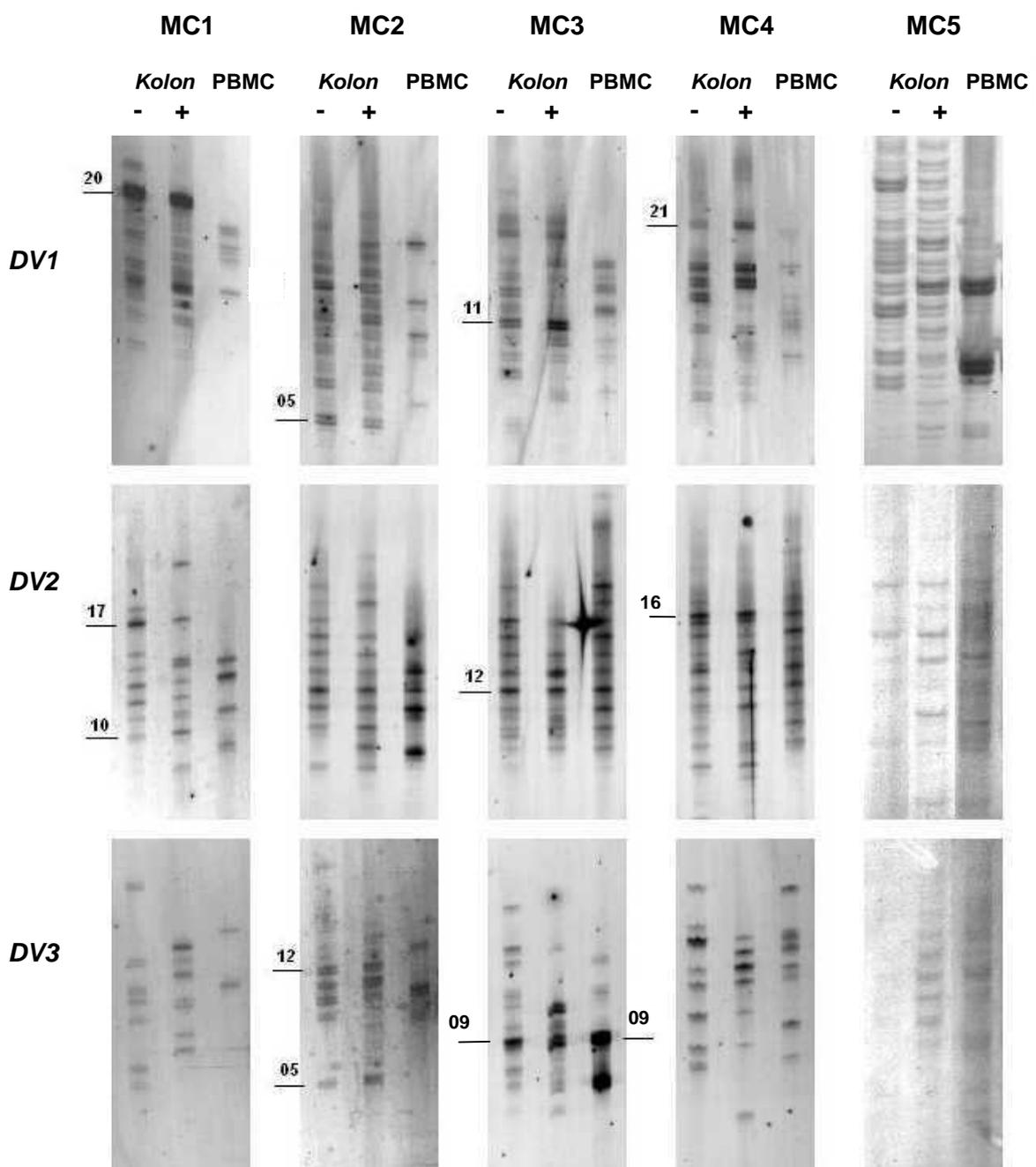
In vereinzelt Fällen ließen sich bei den Kontrollpatienten klonal expandierte T-Zellklone erkennen, welche *nicht* in der korrespondierenden *Kolon*biopsie nachgewiesen werden konnten. Somit wies das *Kolon* unter physiologischen Normalbedingungen eine gewisse Variationsbreite seines CDR3-Profiles innerhalb verschiedener Abschnitte auf. Unsere jüngsten Resultate stellten insofern eine Erweiterung der bislang publizierten Daten (46 - 48) dar, als daß in den früheren Studien vergleichsweise wenige Personen eingeschlossen wurden. Möglicherweise hätten die anhand kleinerer Kollektive erhaltenen Ergebnisse jedoch nicht ausgereicht, um subtile Abweichungen des  $\delta$  TCR-Repertoires bei *CED*-Patienten identifizieren zu können. Zudem wurde das Repertoire von  $\gamma/\delta$  T-Zellen im Rahmen der früheren Untersuchungen zumeist nur mittels *in toto* Klonierung sowie darauffolgender Sequenzierung der PCR-Produkte untersucht. Demgegenüber gestattete das „CDR3-Spectratyping“ wesentlich detailliertere Aussagen bezüglich des jeweils exprimierten Rezeptor-Repertoires. Darüber hinaus schlossen unsere neueren Untersuchungen generell Analysen des peripheren  $\delta$  TCR-Repertoires ein.

#### **5.4.4 Das $\delta$ TCR-Repertoire innerhalb entzündeter Areale unterscheidet sich nicht von demjenigen benachbarter, makroskopisch unauffälliger Darmabschnitte**

Abbildung 30 stellt die CDR3-Längenprofile der *TCRDV1*- *DV2*- und *DV3*-Transkripte aus entzündeten (+) und nicht entzündeten (-) Mukosaarealen sowie PBMC der 5 *M.Crohn*-Patienten MC1 - MC5 einander gegenüber. Unsere Daten lassen klar erkennen, daß *kein signifikanter Unterschied* zwischen den CDR3-Profilen der involvierten sowie der *nicht*involvierten Darmabschnitte bestand; vielmehr bewegten sich die beobachteten Abweichungen im Rahmen der zuvor an gesunden Patienten dokumentierten Schwankungsbreite (vgl. Abb.29 und 30). Außerdem blieb die anhand gesunder Personen dokumentierte Kompartiment- und Individuenspezifität des  $\delta$  TCR-Repertoires in jedem Fall bestehen. Wie aus Tabelle 13 (S. 115) hervorgeht, erbrachten unsere Feinstrukturanalysen korrespondierender dominanter CDR3-Banden aus entzündlichen und nichtentzündlichen Biopsien identische Nukleotidsequenzen. Lediglich bei den Patienten MC1 und MC4 zeigten die aus läSIONalen und *nicht*involvierten Arealen isolierten Gewebeproben Abweichungen ihrer *TCR DV3*-Profile. Da die *DV3*-spezifischen Polymerase-Kettenreaktionen jedoch in beiden

Fällen sehr niedrige Produktausbeuten erbrachten und sich die in der PAGE eingesetzten DNA-Mengen im Bereich der unteren Nachweisgrenze bewegten, könnten die Verschiebung der CDR3-Längenprofile auf einer Limitierung des „CDR3-Spectratypings“ beruhen. Analog zu den gesunden Kontrollpersonen wiesen die  $\delta$  TCR-Transkripte der PBMC von *M.Crohn*-Patienten ebenfalls eingeschränkte CDR3-Profile auf, welche sich signifikant vom intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoire unterschieden.

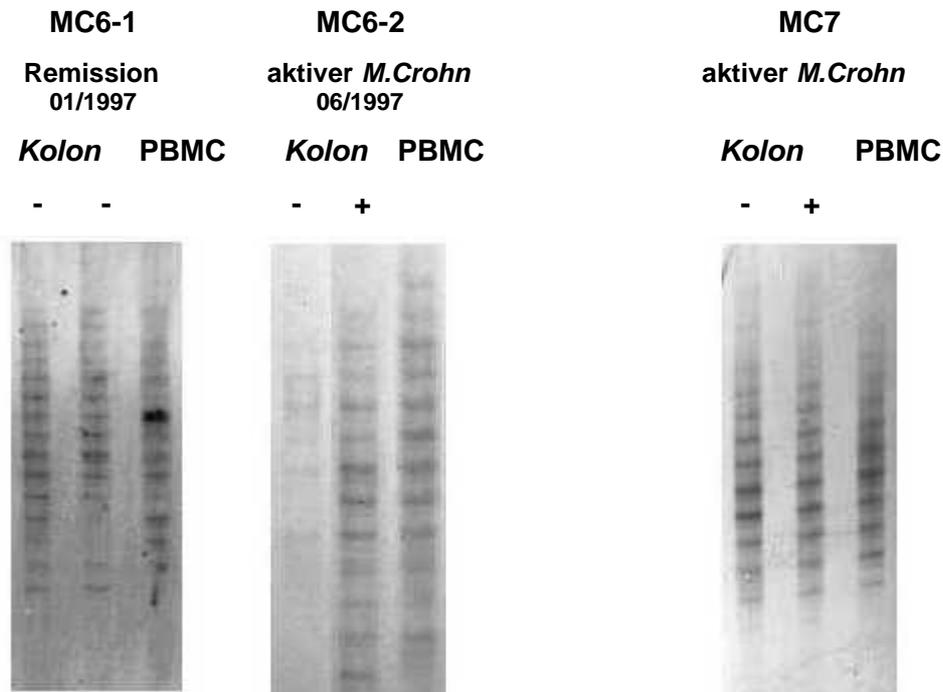
**Abb.30:** CDR3-Längenanalysen der *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte von *M.Crohn*-Patienten



### 5.4.5 Vermutlich verfügen *M.Crohn*-Patienten über ein polyklonales *TCRDV1*-Repertoire

Abbildung 31 dokumentiert, daß zwei der von uns untersuchten *M.Crohn*-Patienten *polyklonale* Verteilungsmuster ihrer mukosalen *TCRDV1*-Transkripte aufwiesen. Bei der Patientin MC6 konnten wir Gewebebiopsien aus dem *Kolon* sowie PBMC während einer Remissionsphase der Erkrankung (MC6-1) sowie zu Beginn eines akuten Schubes (MC6-2) isolieren. Dennoch ergaben sich keine signifikanten Differenzen zwischen den während der jeweiligen Erkrankungsstadien exprimierten CDR3-Profilen. Vielmehr blieb das  $\delta$  TCR-Repertoire über den betreffenden Zeitraum von 5 Monaten hinweg stabil. Da der Patient MC7 ebenfalls über ein polyklonales CDR3-Profil verfügte lag ein Hinweis darauf vor, daß das intestinale *DV1*-Repertoire von *M.Crohn*-Patienten in Ausnahmefällen hochdivers ist.

**Abb.31:** Polyklonale CDR3-Profile bei *M.Crohn*-Patienten



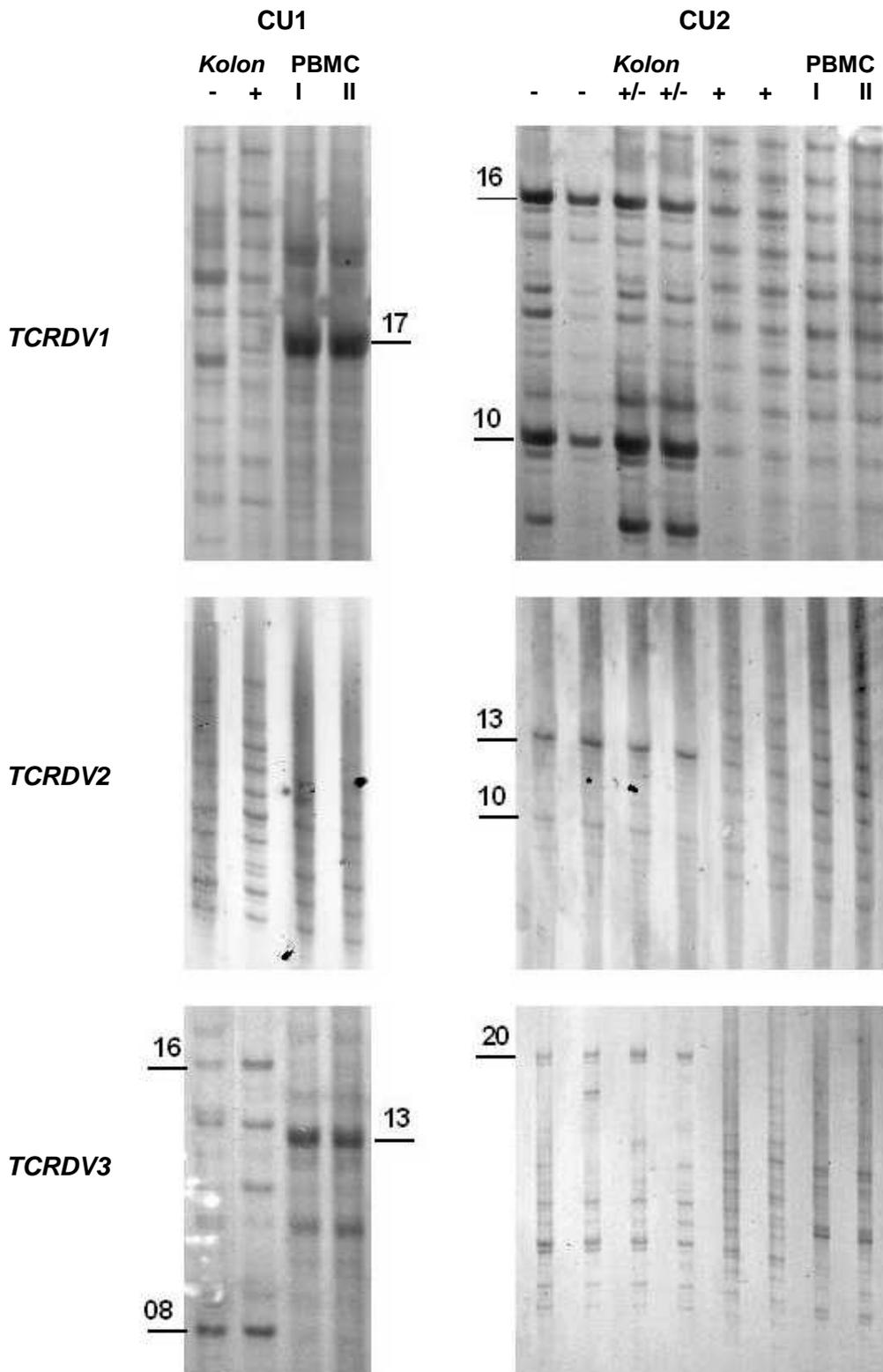
#### **5.4.6 CDR3-Längenanalyse der *TCRDV*-Transkripte zweier von aktiver *Colitis ulcerosa* betroffenen Patienten**

Bei einem der untersuchten *C.ulcerosa*-Patienten (CU1) konnten wir keine Unterschiede zwischen den CDR3-Profilen der entzündeten sowie der nicht entzündeten Mukosa nachweisen. Wie aus der Abbildung 32 (S. 113) zu ersehen ist, zeigte sich bei den *TCRDV1*- und *DV2*-Transkripten ein polyklonales, im Fall der *TCRDV3*-Transkripte hingegen ein oligoklonales CDR3-Profil. Beim zweiten *Colitis ulcerosa*-Patienten (CU2) ließen sich hingegen beträchtliche Differenzen zwischen involvierten und *nicht*involvierten Darmabschnitten nachweisen: Während die CDR3-Profile der aus entzündlichen Arealen isolierten Biopsien polyklonal waren, wiesen die  $\delta$  TCR-Repertoires der nicht oder nur leicht entzündeten Gewebeproben übereinstimmende, oligoklonale Expressionsmuster auf. Somit war ein Hinweis darauf gegeben, daß entzündliche Prozesse möglicherweise eine Diversifizierung des  $\delta$  TCR-Repertoires induzieren. Die CDR3-Profile der periphereren *TCRDV1*- und *DV2*-Transkripte waren polyklonal und gaben Anlaß zu Spekulationen, wonach zirkulierende  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten in die entzündliche Mukosa einwandern und dort Verschiebungen des  $\delta$  TCR-Repertoires verursachen könnten. Allerdings zeigte das periphere *TCRDV3*-Repertoire ein oligoklonales Verteilungsmuster, welches sich sowohl vom polyklonalen CDR3-Profil der stark entzündlichen als auch vom oligoklonalen Repertoire der leicht entzündeten Darmabschnitte unterschied. Dieser Befund sprach eindeutig gegen die vermutete Infiltration peripherer  $\gamma/\delta$  T-Zellen, da man in diesem Fall die Existenz identischer klonaler Expansionen wie in den entzündeten Arealen annehmen sollte.

#### **5.4.7 Die intestinalen CDR3-Profile von *Divertikulitis*-Patienten lassen keine Unterschiede zwischen läsionalen und *nicht*involvierten Mukosaarealen erkennen**

Analog zu den genannten *CED*-Patienten untersuchten wir die *TCRDV1*-Profile von Personen, welche *Divertikulitis* aufwiesen. Da es sich hierbei um eine entzündliche Darmerkrankung handelt, welche im Gegensatz zum *M.Crohn* oder der *Colitis ulcerosa* nicht immunologisch assoziiert ist, dienten uns diese Patienten quasi als „inflammatorisches Kontrollkollektiv“.

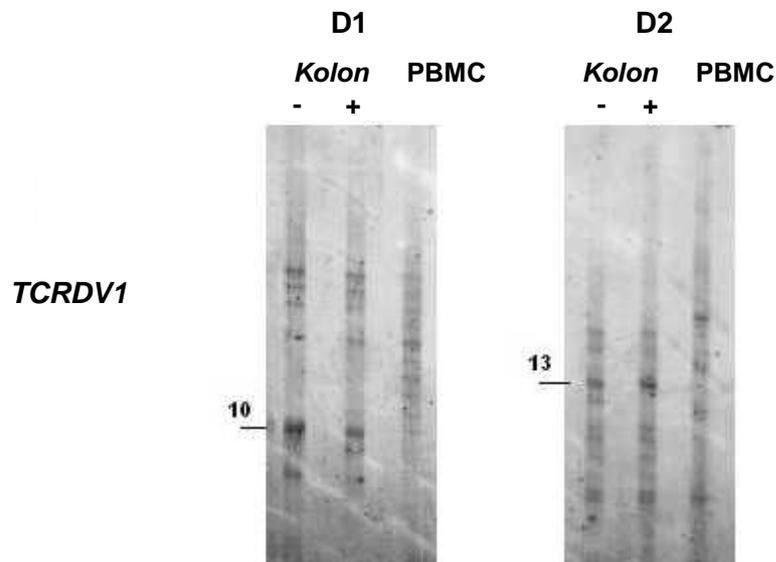
**Abb.32:** CDR3-Längenanalysen der *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte von *Colitis ulcerosa*-Patienten



Vergleichbar der für *M.Crohn* beschriebenen Situation ließen sich jedoch auch bei den *Divertikulitis*-Patienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den CDR3-Profilen erkennen, welche aus involvierten und *nicht*involvierten Darmarealen

stammten. Weiterhin existierten deutliche Unterschiede zwischen dem peripheren sowie dem intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoire:

**Abb.33:** CDR3-Längenanalysen der *TCRDV1*-Transkripte von *Divertikulitis*-Patienten



#### 5.4.8 Charakteristika der TCR $\delta$ -Transkripte

Mittels der CDR3-Längenanalyse konnten keine krankheitsassoziierten Expansionen definierter  $\gamma/\delta$  T-Zellklone innerhalb läsionaler Darmareale identifiziert werden. Vielmehr zeigte sich, daß das Ausmaß der Oligoklonalität bei *M.Crohn*-Patienten dem der Kontrollpersonen vergleichbar war, wobei weder der Aktivitätsindex noch die Dauer der Erkrankung einen maßgeblichen Einfluß auf die Ausprägung des intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires besaß. Um zu überprüfen, ob die für den jeweiligen Patienten typischen CDR3-Längenprofile tatsächlich identische  $\delta$  TCR-Transkripte enthielten, wurden korrespondierende dominante DNA-Banden aus läsionalen sowie *nicht*-läsionalen Mukosaarealen isoliert und nach Reamplifikation direkt sequenziert (vgl. Tab.13). Die DNA-Sequenzanalysen belegten, daß die aus entzündlichen und morphologisch unauffälligen Arealen stammenden  $\delta$  TCR-Transkripte nicht nur übereinstimmende CDR3-Längen aufwiesen, sondern daß sie tatsächlich identische T-Zell Rezeptoren determinierten. Somit ließen sich krankheitsspezifische  $\gamma/\delta$  T-Zellen im Fall von *CED* nicht anhand ihrer antigenspezifischen Rezeptordomäne identifizieren.

**Tab.13:** Nukleotidsequenzen der *TCRDV1*-, *DV2*- und *DV3*-Transkripte von *M.Crohn*-, *C.ulcerosa*- und *Divertikulitis*-Patienten

Per- son	CDR3- Länge	Sequenz	TCRDV	P	N	P	DD2	CCTTCCTAC	P	N	P	DD3	ACTGGGGATACG	P	N	P	TCRDJ	Kolon	PBMC	
																				-
<b>Morbus Crohn</b>																				
<b>TCRDV1</b>																				
MC1	20	K5153	CTCTTGGGGA	ACT	CGAG	TCC	TGGGGGATA	AGCGGGGAGGAA	TTC	ACA	GT	ACACCGGATAAACTCAT	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC2	05	L5158	CTCTTGGG	AGAGT	CGAG	TTC	TGGGGGATA	AGCGGGGAGGAA	TTC	ACA	GT	ACACCGGATAAACTCAT	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC3	11	M5160	CTCTTGG	ACCGAAGGC	CGAG	TTC	CTGGGGG	TTTTT	CGAATAAACTCAT	A	GT	ACACCGGATAAACTCAT	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC4	21	N5164	CTCTTGGGAAC	CAGGGATCG	CGAG	TTC	ACTGGGGGATACG	GTCCGATTAAAA	CGAATAAACTCAT	A	GT	ACACCGGATAAACTCAT	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
<b>TCRDV2</b>																				
MC1	17	K5182	GCCTGTG	GTAGGAACAT	CA	CTTCC	ACTGGGGGAT	GCCACT	GTAGGAACAT	CA	CTTCC	ACTGGGGGAT	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC1	10	K5181	GCCTGTGA	GGAGT	CA	CTTCC	TGGG	TGGAGT	GGAGT	CA	CTTCC	TGGG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC3	12	M5192	GCCTGTG	TG	CA	CTTCC	CTGGGGG	TAGGA	TG	CA	CTTCC	CTGGGGG	DJ3	X	X	X	X	X	X	X
MC4	16	N5194	GCCTGTGACACC	CTAAGGCCCGTGC	TTCC	CTTCC	CTGGGGG	ACG	CTAAGGCCCGTGC	TTCC	CTTCC	CTGGGGG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
<b>TCRDV3</b>																				
MC2	12	L5176	TACTGTGCCT	GT	GTG	CTTCC	TGGGGGAT	GAGACA	GT	GTG	CTTCC	TGGGGGAT	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC2	05	L5177	TACTGTGCCTTT	A	GTG	CTTCC	TGGGGGAT	GAGACA	A	GTG	CTTCC	TGGGGGAT	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC3	09	M5199	TACTGTGCCTTT	CTT	CGG	CTTCC	CTGGGG	CTGGGG	CTT	CGG	CTTCC	CTGGGG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
MC3	09	M5200	TACTGTGCCT	CCT	CGG	CTTCC	GGGGG	TAT	CCT	CGG	CTTCC	GGGGG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
<b>Colitis ulcerosa</b>																				
<b>TCRDV1</b>																				
CU1	17	R07	CTCTTGGGAACT	AG	CCCCGGG	CTTCC	TGGGGGATAC	ACCATGCTTTGACAGCAC	AG	CCCCGGG	CTTCC	TGGGGGATAC	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
CU2	16	S37	CTCTTGGG	GGACCCAATTTAGTCTGG	CTAC	CTTCC	GGGGATACG	ACGAC	GGACCCAATTTAGTCTGG	CTAC	CTTCC	GGGGATACG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
CU2	10	S38	CTCTTGGGAACT	A	A	CTTCC	GGA	G	A	A	CTTCC	GGA	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
<b>TCRDV2</b>																				
CU2	13	S268	GCCTGTGACACC	CTC	CTC	CTTCC	ACTGG	NGGAGCGGATTNAT	CTC	CTC	CTTCC	ACTGG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
CU2	10	S269	GCCTGTGACACC	TCCTC	TCCTC	CTTCC	GGGGGA	CTCGG	TCCTC	TCCTC	CTTCC	GGGGGA	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
<b>TCRDV3</b>																				
CU1	13	R502	TACTGTGCCT	GACAACGAC	CTC	CTTCC	GGGGATACG	ATCATTTGAT	GACAACGAC	CTC	CTTCC	GGGGATACG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
CU1	16	R504	TACTGTGCC	A	A	CTTCC	ACTGGGGGATA	AACCA	A	A	CTTCC	ACTGGGGGATA	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
CU1	08	R505	TACTGTGCCTTT	A	GA	CTTCC	TGGGGGATAC	TGTCA	A	GA	CTTCC	TGGGGGATAC	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
CU2	20	S581	TACTGTGCCTTT	A	GCCTATNGCCTGTGTTAAGGA	CTTCC	ACTGGGGGATA	TTG	A	GCCTATNGCCTGTGTTAAGGA	CTTCC	ACTGGGGGATA	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
<b>Divertikulitis</b>																				
<b>TCRDV1</b>																				
D1	10	T5252	CTCTTGGGGAAC	A	CGGA	TCC	GGGG	CGGA	A	CGGA	TCC	GGGG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X
D2	13	U5255n	CTCTTGGGGA	CAA	CCCT	CTTCC	CTGGG	CCCT	CAA	CCCT	CTTCC	CTGGG	DJ1	X	X	X	X	X	X	X

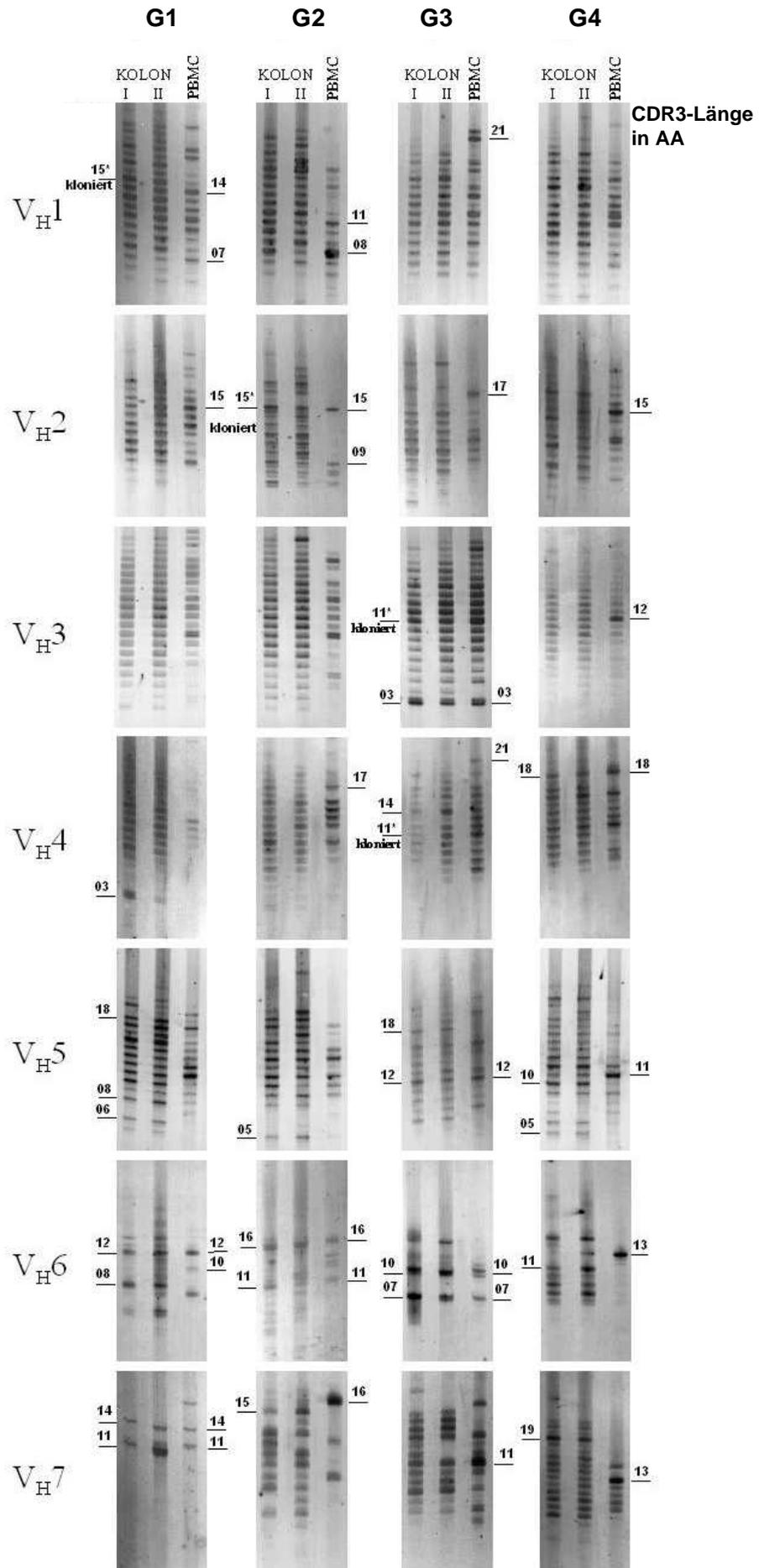
## 5.5 Analyse intestinaler und peripherer V<sub>H</sub>-Repertoires humaner IgA und IgM exprimierender B-Lymphozyten

Da Immunglobulin sezernierende LPL - ähnlich wie IEL - eine erste Verteidigungslinie der Darmmukosa bilden stellte sich die Frage, ob die zuvor für intestinale  $\gamma/\delta$  T-Zellen beschriebene Einschränkung der Rezeptordiversität eventuell auch ein Charakteristikum der Repertoires intestinaler IgA- und IgM- B-Lymphozyten darstellen könnte. Zu diesem Zweck analysierten wir 2 - 3 mm im  $\varnothing$  messende Biopsien aus der *Kolonmukosa* sowie die peripheren mononukleären Zellen der vier gesunden Kontrollpatienten G1 - G4 im Alter zwischen 46 und 80 Jahren [vgl. hierzu Tab.12 (a), S. 106].

### 5.5.1 Subgruppen des intestinalen IgA-Schwerkettenrepertoires zeigen klonale Expansionen

Abb.34 (S. 117) verdeutlicht, daß unsere CDR3-Längenanalysen von V<sub>H</sub>6- und V<sub>H</sub>7-Rearrangements intestinaler IgA-Transkripte die Existenz von Expansionen einzelner B-Zellklone nahelegen. So fanden sich innerhalb korrespondierender *Kolonbiopsien*, deren Abstand voneinander bis zu 1 Meter betrug sehr ähnliche oligoklonale CDR3-Längenprofile sowie identische dominante Schwerkettentranskripte. In dieser Hinsicht bestanden deutliche Parallelen zu den *TCRDV1*-Repertoires der entsprechenden Patienten (vgl. Abb.29). Im Gegensatz hierzu fielen die Rezeptor Repertoires der V<sub>H</sub>1 - V<sub>H</sub>5-Familien IgA exprimierender B-Lymphozyten des *Kolons* deutlich diverser aus (vgl. Abb.34). Dieses Phänomen war besonders im Fall der großen, 22 Mitglieder (204; 206) umfassenden V<sub>H</sub>3-Subgruppe ausgeprägt, welche sowohl innerhalb des Intestinums als auch im peripheren Blut die dominierende V<sub>H</sub>-Familie darstellt (176; 219; 238). Die CDR3-Profile der V<sub>H</sub>1-, V<sub>H</sub>2-, V<sub>H</sub>4- sowie der V<sub>H</sub>5-Familie wiesen zwar ebenfalls klonale Expansionen auf; diese wurden jedoch zumeist vom polyklonalen Hintergrund überlagert und ließen sich oft erst nach vorangegangener Klonierung der V<sub>H</sub>-Transkripte identifizieren.

**Abb.34:** „CDR3-Spectratyping“ intestinaler und peripherer V<sub>H</sub>1 - V<sub>H</sub>7-Transkripte IgA exprimierender B-Lymphozyten gesunder Kontrollpatienten



Per-son	CDR3-Länge	VH Sequenz	V <sub>H</sub> -Region			N/D <sub>H</sub> -Region			J <sub>H</sub> -Region			Kolom PBL		
			VH	N/D <sub>H</sub>	JH	N/D <sub>H</sub>	JH	JH	DH	I	II	I	II	
V <sub>H1</sub>	G1	14	A5119	TCTGAGACAGCGCGT	TATTACTGTCGAGAG	GACTCCCTGGAAAT	TATGGAAAT	TACTACTACGG	ATGGACCTGGGCAAGG	J6 <sub>b</sub>			x	
"	"	7	A5120	TCTGAAGACAGCGCAT	TATTACTGTCGAGAG	CGGACCTACTC		CCTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>			x	
G2	"	11	A5115	TCTGAGACAGCGCGT	TATTACTGTCGAGAG	GGATATGACGACAT	FATAAAACCC	CCTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>			x	
"	"	8	A5116	TCTGAGACAGCGCGT	TATTACTGTCGAGAG	TAGCAGTCCCAAGCCCT		TTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>	D6-19		x	
G3	"	21	A5469	TCTGAAGACAGCGCGT	TATTACTGTCGAGAG	TGATAATCCCGCCGAGTAGAT	GGTAGGCTATGGTTCGGGAGTAGG	ACTAC	ATATGGACCTGGGCAAGG	J6 <sub>b</sub>	D3-10		x	
V <sub>H2</sub>	G1	15	A5024	GTGGACAGCCACAT	TACTGTCGACGAC	ACCGGTTTTGGAT	TAATTTGACTCAGTCCCCCTT	TTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>	D3-03		x	
G2	"	15	A5026	GTGGACAGCCACAT	TACTGTCGACGAC	ACTGACTACTCCGGGACT	TCTATTACTCTTAC	GGTATGGACGT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>a</sub>	D1-07		x	
"	"	9	A5025	GTGGACAGCCACAT	TACTGTCGACGAC	GACCTCTCTCTCC		TGCTTTGATGT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>a</sub>			x	
G3	"	17	A5449	GTGGACAGCCACAT	TACTGTCGACAC	TCGGCCTTTTGGGTCACAGCT	GCCGCC	CTACTACTACAT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>a</sub>			x	
G4	"	15	A5019	GTGGACAGCCACAT	TACTGTCGACAC	AGAGGTTACACAT	ATGTCGGGGTACGGTACGCCCGG	TTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>	D5-18		x	
V <sub>H3</sub>	G3	3	A5077	ACCGAGACACAGCGGT	TACTGTT	TCTAAGTAC		TTTGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>		x		
"	"	3	A5074	ACCGAGACACAGCGGT	TACTGTT	CTTGG		TGCTTTGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>		x		
G4	"	12	A5417	GCTGAGACAGCGGT	TACTGTT	TATGACTACT	TCTCTCTAGGAGG	ACTTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D1-26		x	
V <sub>H4</sub>	G1	3	A5505	GCCGGACAGCGCGT	TACTGTCGAGAG	ACCAGGCC		CTGGGCGCAAGG	J5 <sub>a</sub>			x		
"	"	3	A5503	GCTGGACAGCGGC	TATTACTGCGGAG	GACAGTCC		ACTGGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>			x		
G2	"	17	A5140	GCCGGACAGCGCGT	TACTGTCGAGAG	TCCGAGGTACAC	TTCTGGAATCCTCTCTGG	CTACTACTACAT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>a</sub>	D5-24		x	
G3	"	21	A5496	GCTGGACAGCGCGT	TACTGTCGAGAG	TAGACCGACTACT	ATGGGACTTAAAGTCTTCCCAATAAGTGG	ACTTCGATCT	GGGCGCAAGG	J2	D3-10		x	
"	"	14	A5498	GCCGGACAGCGGC	TATTACTGTCGAGAG	CACCCGTGATCT	CCAGTTTCTATGCTCT	ATGCTTTGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>			x	
G4	"	18	A5135	GCTGGACAGCGCGT	TACTGTCGAGAG	AGTCCATGATACAT	AGCTACTGACTGCAATAGAGAAATCGCGCTA	TGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>	D2-21		x	
"	"	18	A5131	GCCGGACAGCGCGT	TACTGTCGAGAG	GAGGGTACCGG	TATTTGACTACTTATCCGCACTGCTGAGGAGG	TATGGACGT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>b</sub>			x	
V <sub>H5</sub>	G1	18	A5411	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GACTCAGTGT	TGATGATACCTTCTTAGTCCCACTCTTACTT	CTTTGAC	GGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>			x	
"	"	8	A5415	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GGGTGGAGCC		ATGCTTTGAT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>			x	
"	"	6	A5413	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	CCTCCGGGACCGCTT		CTACTGGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>			x		
G2	"	5	A5407	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GATYGGAGGTC		CTACTGGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>			x		
G3	"	18	A5486	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GACTTATCTGTTGAC	TACATATAGTATGTCATCA	CTACTTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>a</sub>			x	
"	"	12	A5487	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	AGATPCTCCCGCTGGTATGATATC		TTTGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>	D3-16		x	
"	"	11	A5481	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	CTACTGCTACT	TATTTATGATTC	CTTTGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>	D4-17		x	
G4	"	11	A5058	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GCAGGAGGACT	AGGCAATCAGGC	TATGGACGT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>b</sub>			x	
"	"	10	A5403	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GTTTATGATATGATCCGATCCA		TGACTTTGGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D3-16		x		
"	"	10	A5401	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GTTTATGATATGATCCGATCCA		TGACTTTGGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D3-16		x		
"	"	5	A5404	GCTCGACACCGCCAT	TATTACTGTCGAGAG	GGGCTGG		GCTTTGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>			x	
V <sub>H6</sub>	G1	12	A5439	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TCCCTATGTT	TACAGGAGTACTATGT	CFTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D3-10		x	
"	"	12	A5436	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TCTGCGCGTAT	TGTGAGACTATGGT	TTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D5-05		x	
"	"	10	A5434	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GATAGTGTGGCT	CTTTCTAT	GGTATGGACGT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>b</sub>	D3-22		x	
G2	"	8	A5440	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GGGTGTGGACTG		TTTGATATCT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>b</sub>	D5-24		x	
"	"	16	A5632	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	CCCGATTTGATGAT	GGTACGATATCAGGACTTAGG	CTACTTTGAC	ACTGGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D5-12		x	
"	"	11	A5631	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TCCGATATA	CAAGTCTGGTCCGATATCAGGACTTAGG	ACTGGTTCGAC	CCCTGGGCGCAAGG	J5 <sub>b</sub>	D6-13		x	
"	"	11	A5630	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TCCCAATGAGT	GGTCTGGTGGG	CFTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D6-19		x	
G3	"	10	A5016	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TCCCGCCGGGAT	TAGAGTACC	TCGATCT	GGGCGCAAGG	J2			x	
"	"	7	A5017	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GTAATTAACC		ATGCTTTGATGT	GGGCGCAAGG	J3 <sub>a</sub>			x	
"	"	7	A5013	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TCGGGCGGG		GATATGGACGT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>a</sub>			x	
G4	"	13	A5422	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TGAGTGTGG	CCCATCATCCGAA	ACAACCTGGTTCGACT	CCCTGGGCGCAAGG	J5 <sub>b</sub>			x	
"	"	13	A5419	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GATAGTGGT	TATTAATTAAGGTTG	TGGTTCGAC	CTGGGCGCAAGG	J5 <sub>b</sub>	D3-22		x	
"	"	11	A5006	CCCGAGACAGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	AGTTCACAC	CAAGTCTGGTAT	TTTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D6-19		x	
V <sub>H7</sub>	G1	14	A5518	CTGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	AGGGAGGCGT	TGACCGGCTACTACCCAGGGCA	TTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D4-17		x	
"	"	14	A5515	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	CGCTGCTCT	TCCGGTAGGCTGG	GCTGAATACT	CCACTGGGCGCAAGG	J1			x	
"	"	11	A5112	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GACTCAGTGGT	CAAGCTGCTACCCC	TTGACTACT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D2-02		x	
"	"	11	A5116	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	CCCATATGATGAT	TAGTGTCCCGCCCGCCCG	GGTATGGACGT	GGGCGCAAGG	J4 <sub>b</sub>	D3-22		x	
G2	"	15	A5107	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TAGTGTTCCT	TACTAGTACTGACTGCTGG	GGTATGGACGT	GGGCGCAAGG	J6 <sub>a</sub>	D2-02		x	
"	"	16	A5110	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	TTGTACCT	TCTGGCCACAGATGGTAGGCA	ACTGGTTCGACT	GGGCGCAAGG	J5 <sub>a</sub>			x	
G3	"	14	A5104	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GCTGAGT	CACTCATCTGATCCCC	GTTTCGAC	CTGGGCGCAAGG	J5 <sub>a</sub>			x	
G4	"	19	A5447	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GGGGAGTGGT	TGGAAATTCACAG	CGGT	TGGACGTCTGGGCGCAAGG	J6 <sub>b</sub>			x	
"	"	13	A5446	GCTGAGACACTGCGGT	TATTACTGTCGAGAG	GAGAGAT	TGGACGTCTGGGCGCAAGG	TACGTTGGACGT	CTGGGCGCAAGG	J6 <sub>b</sub>	D6-19		x	

Tab.14: IgA-Schwerketentranskripte im Kolon und im peripheren Blut der gesunden Patienten G1 - G4 (vgl. Abb.34)

### 5.5.2 Klonal expandierte IgA B-Lymphozyten sind innerhalb des *Kolons* weit verbreitet

Alle in der Abbildung 34 mit Nummern bezeichneten DNA-Banden wurden aus der Gelmatrix isoliert, *in vitro* reamplifiziert und direkt sequenziert. Da dieser Ansatz im Fall der  $V_{H4}$  -  $V_{H7}$ -Familien lesbare Nukleotidsequenzen erbrachte, wurde unsere Vermutung bestätigt, wonach innerhalb räumlich weit voneinander entfernter Mukosaareale identische IgA  $V_H$ -Rearrangements existieren. Demgegenüber fanden sich nur in wenigen Fällen voneinander abweichende Resultate (Patient G1,  $V_{H4}$ , CDR3-Länge = 3; vgl. Tabelle 14). Da die direkte Sequenzierung diskreter CDR3-Banden bei den diversen  $V_H$ -Familien in den wenigsten Fällen lesbare Nukleotidsequenzen erbrachte, wurden die Amplifikate der mit „\*“ gekennzeichneten  $V_{H1}$ -,  $V_{H2}$ -,  $V_{H3}$ - und  $V_{H4}$ -Transkripte aus den *Kolon*biopsien I bzw. II vor ihrer Sequenzierung zunächst kloniert. Wie im folgenden dargestellt wird, ließen sich mittels dieses Ansatzes auch bei diversen  $V_H$ -Familien zahlreiche identische sowie klonal verwandte Rezeptorrearangements in verschiedenen Darmabschnitten nachweisen. Die Sequenzanalysen erbrachten zudem, daß

- a) intestinale Schwerekettentranskripte in hohem Maße somatischen Mutationen unterlagen
- b) die Übergangsbereiche der Untereinheiten-kodierenden Gensegmente komplex strukturiert waren und ausnahmslos „N“-Nukleotidadditionen aufwiesen.

Tabelle 14 faßt die Daten zusammen, welche wir durch Sequenzierung der in Abb.34 markierten dominanten Transkripte des intestinalen und peripheren IgA-Schwerketten Repertoires erhielten. Identische CDR3-Rearrangements in korrespondierenden *Kolon*biopsien oder PBMC-Fraktionen sind dadurch gekennzeichnet, daß *beide* Spalten im rechten Teil der Tabelle ein „x“ aufweisen. Klonal verwandte Nukleotidsequenzen tragen ein „\*“. Es ließen sich keine Transkripte identifizieren, die nicht im korrekten Leseraster vorlagen. Sämtliche IgA-Sequenzdaten sind über EMBL/GenBank/ DDBJ unter den accession numbers AF267756 - AF267808 einzusehen.

### 5.5.3 Das IgA V<sub>H</sub>-Repertoire des peripheren Blutes ist ebenfalls oligoklonal, jedoch von dem des *Kolons* verschieden

Unsere CDR3-Längenanalysen peripherer IgA-Transkripte ließen unabhängig von der untersuchten V<sub>H</sub>-Familie bei nahezu sämtlichen untersuchten Blutproben zahlreiche klonale Expansionen erkennen (vgl. Abb.34). Darüber hinaus erbrachten die anhand korrespondierender Proben in Doppelbestimmung durchgeführten Analysen jeweils sehr ähnliche CDR3-Profile beziehungsweise identische Schwerkettenrearrangements peripherer, IgA exprimierender B-Lymphozyten (vgl. Tab.14: PBL I bzw. II). Indessen unterschieden sich die CDR3-Profile peripherer IgA B-Lymphozyten in den meisten Fällen grundlegend von denen des *Kolons*. Die vereinzelte Existenz dominanter Banden identischer CDR3-Länge innerhalb des *Kolons* und der Peripherie ließ vermuten, daß zumindest partiell Überlappungen der Rezeptor Repertoires beider Kompartimente bzw. identische V<sub>H</sub>-Rearrangements bestehen könnten. Allerdings erbrachten DNA-Sequenzanalysen korrespondierender dominanter Transkripte unterschiedlicher Kompartimente den Beweis dafür, daß dies nur vereinzelt der Fall war (vgl. Tab.14/15):

**Tab.15:** IgA-Transkripte, welche sowohl innerhalb des *Kolons* als auch im peripheren Blut nachgewiesen werden konnten

Patient	V <sub>H</sub> -Familie	CDR3-Länge	Sequenz
G2	V <sub>H</sub> 6	11	IgA5630
G3	V <sub>H</sub> 6	10	IgA5016

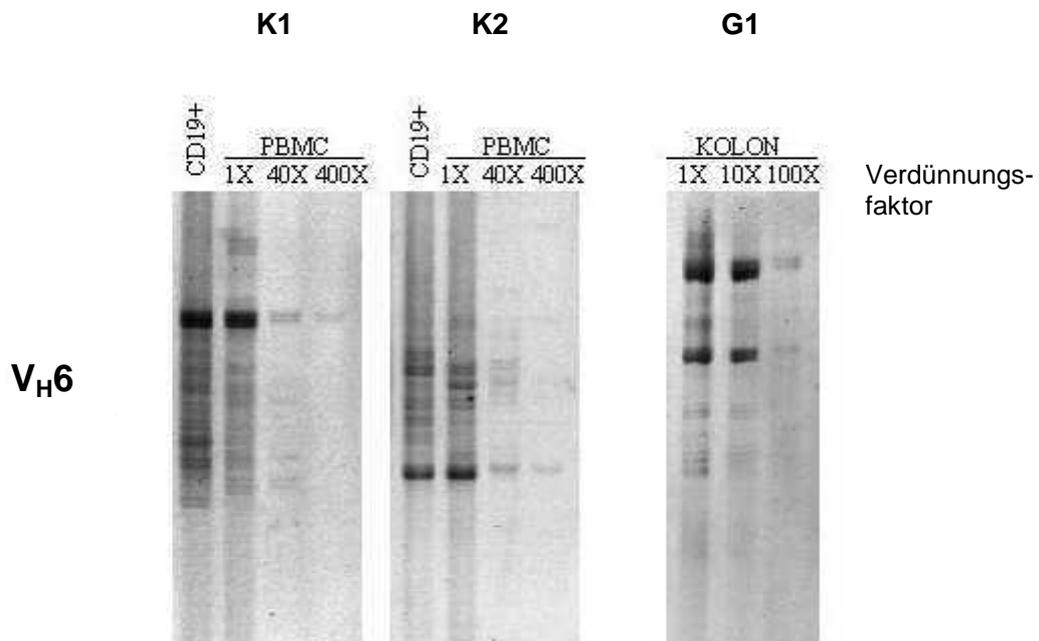
### 5.5.4 Der ermittelte Klonalitätsgrad von V<sub>H</sub>-Repertoires hängt innerhalb weiter Grenzen nicht von der Gesamtzahl analysierter B-Zellen ab

Lediglich 2 - 7% der zirkulierenden B-Lymphozyten exprimieren Oberflächenrezeptoren des Isotyps IgA (239). In Anbetracht dieser Tatsache mußte ausgeschlossen werden, daß durch die Analyse zu kleiner, d.h. nicht repräsentativer Zellzahlen Resultate generiert wurden, welche fälschlicherweise auf eine Existenz eingeschränkter V<sub>H</sub>-Repertoires schließen ließen. Um den Einfluß dieser möglichen systematischen Fehlerquelle zu quantifizieren, wurden zunächst B-Lymphozyten aus dem Blut zweier weiterer gesunder Kontrollpersonen (K1 und K2, vgl. 3.2.1.) selektiv angereichert. Da

der Differenzierungs„marker“ CD19 für prä- B-Zellen, gereifte aktivierte sowie „Gedächtnis“ B-Lymphozyten charakteristisch ist, ließen sich diese Subtypen unter Einsatz entsprechender Antikörperkonjugate rasch und zudem hochspezifisch (99,9%) von CD45-positiven T-Lymphozyten separieren (vgl. unter 3.2, S. 53 f.f.). Aus der angereicherten B-Zellfraktion wurde Gesamt-RNA isoliert und diese in semiquantitativen RT-Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzt, wobei die aus Gesamt-PBMC gewonnene cDNA als Referenz diente. Die quantitative Beziehung zwischen den in Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzten Volumina an cDNA und der hiermit korrelierenden Anzahl von B- bzw. T-Lymphozyten ist im Abschnitt 3.2.2 erläutert.

Wie Abb.35 dokumentiert, erbrachten die aus PBMC sowie der CD19-Fraktion synthetisierten cDNA-Präparationen in  $V_H6$ -spezifischen Polymerase-Kettenreaktionen identische CDR3-Profile, obwohl die CD19-Fractionen der Personen K1 und K2 etwa 10-fach höhere Konzentrationen an B-Lymphozyten ( $\sim 3,3 \times 10^5$ ) aufwiesen als die entsprechenden PBMC-Fractionen. Durch serielle Verdünnung der cDNA-Matrizen aus PBMC von K1 und K2 ließ sich zeigen, daß die CDR3-Profile über einen sehr großen Konzentrationsbereich hinweg stabil blieben und sich keine qualitativen Veränderungen des jeweiligen  $V_H6$ -Repertoires zeigten. Diese Konzentrationsunabhängigkeit konnte ferner durch Amplifikation der  $V_H2$ -Transkripte peripherer B-Lymphozyten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Im Falle der Patienten G1, G2, G3 und G4 lagen die in RT-Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzten B-Zellzahlen etwa um den Faktor  $10^2$  niedriger als in den CD19-Fractionen der Kontrollpersonen K1 bzw. K2. Da die analysierten *Kolon*biopsien außerordentlich geringe Dimensionen aufwiesen, war eine unmittelbare Quantifizierung der in ihnen enthaltenen B-Lymphozyten nicht möglich. Jedoch erbrachten  $V_H6$ -spezifische Kontrollreaktionen, bei denen die cDNA aus dem *Kolon* des Patienten G1 stufenweise bis zu  $10^2$ -fach verdünnt wurde im „CDR3-Spectratyping“ ebenfalls identische  $V_H$ -Profile (vgl. Abb.35).

**Abb.35:** Der Klonalitätsgrad des IgA-Schwerkettenrepertoires ist nicht abhängig von der Anzahl untersuchter B-Lymphozyten



V<sub>H</sub>6-spezifische PCR-Produkte der Kontrollpersonen K1 und K2 sind im linken Teil der Abbildung 35 dargestellt, wobei die Fraktionen CD19-positiver Zellen zirka 10-fach höhere B-Zelltitel als die entsprechenden PBMC-Fraktionen (= 1x) enthielten. Die stufenweise Verdünnung (40- bzw. 400-fach) der aus PBMC isolierten und in Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzten Matrizen-cDNA erbrachte in der denaturierenden PAGE identische CDR3-Profile. Auch im Fall der cDNA, welche aus dem *Kolon* des Patienten G1 synthetisiert wurde, ließ sich durch 100-fache Verdünnung der PCR-Matrize keine qualitative Verschiebung des V<sub>H</sub>6 CDR3-Profils erzielen.

### 5.5.5 Das Rezeptor Repertoire IgM exprimierender B-Zellen ist innerhalb des *Kolons* eingeschränkt, im Fall peripherer B-Lymphozyten hingegen polyklonal

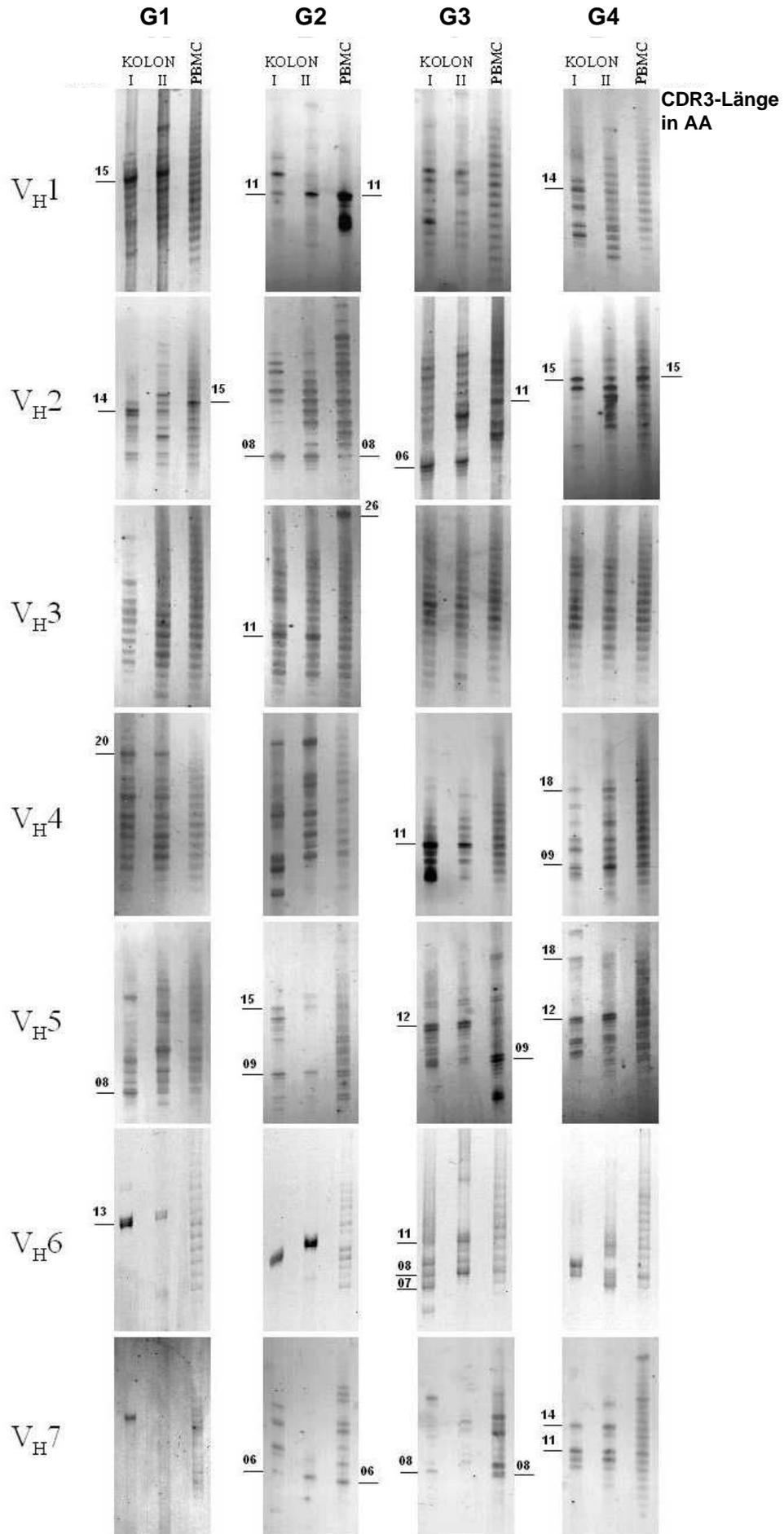
Unsere CDR3-Längenanalysen erbrachten, daß die Schwerkettenrepertoires IgM exprimierender B-Lymphozyten innerhalb des *Kolons* in ähnlichem Maße eingeschränkt waren, wie dies für intestinale IgA B-Zellen gezeigt wurde. Analog hierzu wiesen die Vertreter der V<sub>H</sub>3-Familie auch bei den IgM exprimierenden B-Lymphozyten das größte Ausmaß an Diversität auf (vgl. Abb.36, S. 124). Im Gegensatz zu peripheren IgA B-Zellen waren die V<sub>H</sub>-Profile zirkulierender IgM B-Lymphozyten polyklonal, so

daß die CDR3-Längenanalysen zumeist typische Normalverteilungskurven erbrachten. Dennoch fanden sich Ausnahmen von der Regel:

- a) Die Analyse peripherer IgM  $V_{H1}$ -Transkripte des Patienten G2 ließ ein annähernd monoklonales CDR3-Profil erkennen (CDR3-Länge 11).
- b) Das IgM  $V_{H7}$ -Repertoire peripherer B-Lymphozyten war häufig limitiert.

Darüber hinaus zeigte sich, daß die CDR3-Profile peripherer und intestinaler IgM  $V_{H7}$ -Transkripte einer Person vielfach nicht übereinstimmten. Da  $V_{H7}$ -spezifische Polymerase-Kettenreaktionen zumeist sehr niedrige Produktausbeuten erbrachten wurde vermutet, daß diese  $V_{H}$ -Familie nur mit geringer Rate exprimiert wird. Analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise wurden alle in Abbildung 36 mit Nummern bezeichneten dominanten DNA-Banden des intestinalen und peripheren IgM Schwerkettenrepertoires aus der Gelmatrix isoliert und direkt sequenziert. Vergleichbar mit IgA B-Zellen ließen sich innerhalb von *Kolon*biopsien, welche aus räumlich weit voneinander entfernten Mukosaarealen stammten zumeist übereinstimmende CDR3-Profile identifizieren. Durch direkte Sequenzierung dominanter Banden nahezu sämtlicher  $V_{H}$ -Familien gelang der Nachweis, daß in korrespondierenden Gewebeproben identische sowie klonal verwandte Transkripte rearrangierter, IgM  $V_{H}$ -Ketten kodierender Gensegmente existierten, welche zumeist extensive somatische Mutationen aufwiesen. Analog zur Tab.14 sind identische CDR3-Rearrangements korrespondierender *Kolon*biopsien oder PBMC-Fraktionen in Tab.16 dadurch gekennzeichnet, daß *beide* Spalten im rechten Teil der Tabelle ein „x“ aufweisen. Sämtliche IgM-Sequenzdaten sind über EMBL/GenBank/DDBJ unter den accession numbers AF267809 - AF267847 erhältlich.

**Abb.36:** „CDR3-Spectratyping“ intestinaler und peripherer V<sub>H</sub>1 - V<sub>H</sub>7-Transkripte IgM exprimierender B-Lymphozyten der gesunden Kontrollpatienten G1 - G4

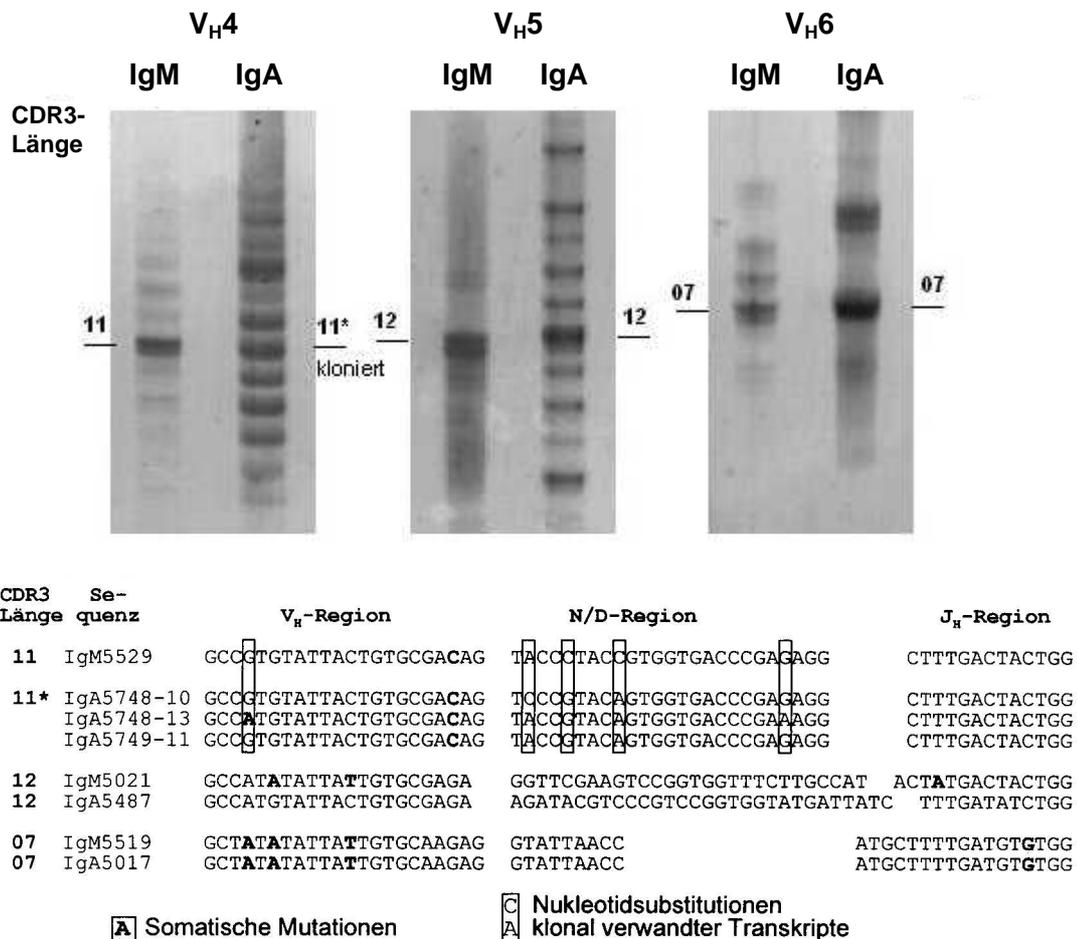




### 5.5.6 Innerhalb des *Kolons* lassen sich vereinzelt B-Lymphozyten nachweisen, die einen Klassenwechsel vollzogen haben

Die CDR3-Längenprofile intestinaler IgA- und IgM-Repertoires unterschieden sich signifikant voneinander, wobei dominante IgM-Banden mehrheitlich andere CDR3-Längen aufwiesen als dominante IgA  $V_H$ -Transkripte (vgl. Abb.34/36). Abbildung 37 demonstriert anhand einer *Kolon*biopsie des Patienten G3, daß sich innerhalb der  $V_{H4}$ -,  $V_{H5}$ - und  $V_{H6}$ -Familie dennoch vereinzelt dominante IgA- und IgM-Banden identifizieren ließen, welche identische CDR3-Längen besaßen:

**Abb.37:** Intestinale IgM B-Lymphozyten, die einen Isotypwechsel vollzogen haben, können mittels „CDR3-Spectratyping“ identifiziert werden



Im oberen Teil der Abbildung 37 sind die CDR3-Profile intestinaler IgM- und IgA-Transkripte aus den  $V_{H4}$  -  $V_{H7}$ -Familien des Patienten G3 dargestellt, die wir parallel mittels denaturierender PAGE analysierten. Dominante DNA-Banden übereinstimmender Länge, welche potentiell identische CDR3-Domänen repräsentierten, wurden aus der Gelmatrix isoliert und direkt oder - wie im Fall von IgA  $V_{H4}$  („11\*“) - nach vorangegangener Klonierung sequenziert. Unsere DNA-Sequenzanalysen korrespondierender dominanter IgM-/IgA-Banden übereinstimmender CDR3-Länge (untere Teilabbildung) führten zur Identifizierung *zweier identischer*  $V_{H6}$ - sowie eines Paares *klonal verwandter*  $V_{H4}$ -Transkripte. Da sich innerhalb ihrer CDR3-Domänen Übereinstimmungen bezüglich zahlreicher Nukleotidsubstitutionen nachweisen ließen war anzunehmen, daß die entsprechenden IgA-Transkripte durch Klassenwechsel eines IgM exprimierenden B-Zellklons entstanden, der zuvor im Rahmen einer antigenvermittelten Affinitätsreifung somatische Mutationen akkumuliert hatte. Dieser Befund besaß jedoch eindeutig Ausnahmecharakter, da sich bei keinem weiteren diesbezüglich untersuchten Patienten vergleichbare Überlappungen der Gensegmentübergangsbereiche nachweisen ließen. So erbrachte z.B. die Sequenzanalyse der korrespondierenden  $V_{H5}$ -Transkripte IgM5021 und IgA5487 abweichende CDR3-Domänen (vgl. Tab.17). Im Fall des Patienten G1 wurde eine singuläre DNA-Bande des polyklonalen IgA  $V_{H1}$ -Repertoires subkloniert (CDR3-Länge 15, *Kolon I + II*, vgl. Abb.34). Von den innerhalb dieser Bande identifizierten 9 verschiedenen  $V_{H1}$ -Transkripten (vgl. Tab.19, S. 129) stimmte indessen *keine einzige* mit den dominierenden IgM-Transkripten der äquivalenten CDR3-Länge überein.

**Tab.17:** Vergleich der CDR3-Domänen korrespondierender dominanter IgM-/IgA-Transkripte im Hinblick auf einen durchlaufenen Isotypwechsel

Patient	$V_H$ -Familie	CDR3-Länge	IgM-/IgA-Transkripte	Vergleich der Nukleotidsequenzen
G1	$V_{H5}$	08	IgM5611 / IgA5415	<i>divergente</i> Transkripte
G2	$V_{H4}$	11	IgM5529 / IgA5748-10*, IgA5748-13*, IgA5749-11*	<b><i>klonal verwandte</i></b> Transkripte
“	$V_{H5}$	12	IgM5021 / IgA5487	<i>divergente</i> Transkripte
“	$V_{H6}$	07	IgM5519 / IgA5019	<b><i>identische</i></b> Transkripte
G3	$V_{H5}$	12	IgM5021 / IgA5487	<i>divergente</i> Transkripte
G4	$V_{H4}$	18	IgM5523 / IgA5135	<i>divergente</i> Transkripte

### 5.5.7 Klonal expandierte B-Zellpopulationen beschränken sich nicht auf kleine V<sub>H</sub>-Familien

Im Gegensatz zu kleinen V<sub>H</sub>-Familien war bei den diversen IgV<sub>H</sub>-Familien eine direkte Sequenzierung dominanter DNA-Banden oftmals nicht möglich. In zirka 50% aller Fälle wurde aufgrund der Tatsache, daß innerhalb einer dominanten DNA-Bande zahlreiche Transkripte konstanter CDR3-Länge, aber divergenter Zusammensetzung vorlagen keine eindeutige Nukleotidsequenz erhalten. Um Schwierigkeiten bei der Bestimmung von Basenabfolgen zu umgehen, die aus Überlagerungen multipler Transkripte resultierten, wurden acht individuelle CDR3-Banden der V<sub>H</sub>1 - V<sub>H</sub>4-Familien aus je 2 *Kolon*biopsien, die in Abb.34 mit „\*“ gekennzeichnet sind aus der Gelmatrix isoliert und die PCR-generierten Amplikons nach vorangegangener Subklonierung sequenziert. Tabelle 19 faßt die Resultate dieser Versuchsreihe zusammen. Potentielle D<sub>H</sub>-Segmente wurden unterstrichen, somatische Mutationen innerhalb der V<sub>H</sub>- sowie der J<sub>H</sub>-Regionen **grau** unterlegt. Divergente Nukleotide in klonal verwandten Sequenzen sind eingerahmt. Die Ziffern im rechten Teil der Tab.19 beziehen sich auf den Anteil der jeweiligen Sequenz an der Gesamtpopulation. Es zeigte sich, daß identische oder klonal verwandte V<sub>H</sub>1-, V<sub>H</sub>2-, V<sub>H</sub>3- und V<sub>H</sub>4-Transkripte in parallel entnommenen Mukosabiopsien mit hohen Frequenzen auftraten. Insgesamt führten die Sequenzanalysen klonierter V<sub>H</sub>3-Transkripte der CDR3-Länge 11 aus dem *Kolon* des Patienten G3 zur Identifizierung von 36 Nukleotidsequenzen, von denen 14 (39%) entweder repetitiv oder klonal verwandt waren. Darüber hinaus konnten mittels dieser Technik auch klonal verwandte IgA-Transkripte innerhalb dominanter Banden der V<sub>H</sub>1-, der V<sub>H</sub>2- sowie der V<sub>H</sub>4-Familie nachgewiesen werden. Nur in wenigen Fällen erbrachten die Analysen dominanter Banden übereinstimmender CDR3-Länge abweichende V<sub>H</sub>-Rearrangements:

**Tab.18:** Abweichende IgV<sub>H</sub>-Transkripte innerhalb korrespondierender CDR3-Banden

Patient	Transkript	V <sub>H</sub> -Familie	CDR3-Länge	abweichende Sequenzen
G1	IgA	V <sub>H</sub> 4	03	IgA5505 IgA5503
G2	IgM	V <sub>H</sub> 3	11	IgM5570 IgM5569
“	“	V <sub>H</sub> 5	09	IgM5599 IgM5598

Per- son	CDR3- Länge	VH	Sequenz	VH-Region			N/D-Region			JH-Region			Kolon	
				VH-Region	N/D-Region	JH-Region	DH frame	I	II					
<b>G1</b>	V1-46	IgA5728-1	TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGC	CCTCAGGCCGTAATACGATTTTGGAGTGGATAA	ACTACATAATGAGGAGCTGGGGCCAGGG	J6	D3-03	+	2/5					1/4
	V1-46	IgA5728-2	TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	AGGGATTTTGAAGAATAGTATCTGTACTCGGGGGAC	TTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4	D2-15	+	1/5					1/4
	V1-46	IgA5729-2	TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCCGACCAATTTCTGCTGCTGATGCTTTCTGCGCCTC	TTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4	D2-21	+	1/4					1/4
	V1-46	IgA5729-6	TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCCGACCAATTTCTGCTGCTGATGCTTTCTGCGCCTC	TTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4	D2-21	+	1/4					1/4
	V1-02	IgA5728-3	TCTGACACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TTCCGGAAGATACACAGTGTGGTACAAATTT	CGGATATGACACTGGGGCCAGGG	J6	D6-19	+	1/5					1/5
	V1-03	IgA5728-6	TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGTCCGACAACTCGGGGGA	ACTACTACTACGCTGGGGCCAGGG	J6	D6-19	+	1/5					1/4
V1-03	IgA5729-3	TCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TGATTTGGGACCACTATCTTTACGGGGGTAATTTGGGTC	CCTTGTACTACTGGGGCCAGGGA	J4			+						
<b>G2</b>	V2-05	IgA5456-c	GTGGACACACGCACATATTACTGTGCACACAG	ACTGTTTCTACGGTCCCTTAAAGCAG	ACTGCTATTCGATCTCTGAGGGCCCTGC	J2	D4-17	+	2/3					1/3
	V2-05	IgA5456-b	GTGGACACACGCACATATTACTGTGCACACAG	ACTGTTTCTACGGTCCCTTAAAGCAG	ACTGCTATTCGATCTCTGAGGGCCCTGC	J2	D4-17	+	1/3					1/3
	V2-05	IgA5456-d	GTGGACACACGCACATATTACTGTGCACACAG	ACTGTTTCTACGGTCCCTTAAAGCAG	ACTGCTATTCGATCTCTGAGGGCCCTGC	J2	D4-17	+	1/3					1/3
	V2-05	IgA5457-b	GTGGACACACGCACATATTACTGTGCACACAG	GGGGAATAATTAATGATGATAAATGATGCTTATGGGG	ACTTTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4	D3-22	+	1/3					
	V3-30.3	IgA5741-5	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GTGGGATGCTGCAACTTGGC	CTTCGGTATGGAATGCTGGGGCCAGGG	J6			+	3/18				
	V3-23	IgA5740-13	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCCTAACGGGCACTACTCTGAGGGC	CTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4	D4-17	+	1/18					
<b>G3</b>	V3-23	IgA5741-1	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCCTAACGGGCACTACTCTGAGGGC	CTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4	D4-17	+	1/18					1/18
	V3-23	IgA5741-26	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCCTAACGGGCACTACTCTGAGGGC	CTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4	D4-17	+	1/18					1/18
	V3-30.3	IgA5740-5	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCTGACTGGGAGTGGTATCTCTCACAGGGTGGTTTC	GATACTGGGGCCAGGG	J3	D3-03	+	1/18					1/18
	V3-73	IgA5740-25	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGATTAATGCTGGCGCTCT	ATGCTTTGATATCTGGGGCCAGGG	J3	D5-12	+	1/18					1/18
	V3-23	IgA5740-28	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCCCCAGGTTATACGTGGAGC	CTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4	D3-22	+	1/18					1/18
	V3-23	IgA5741-28	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCCCCAGGTTATACGTGGAGC	CTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4	D3-22	+	1/18					1/18
<b>VH1</b>	V3-30	IgA5740-16	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGAAAGCCCTATGATGATG	AACCTTTGCGGACTCTGGGGCCAGGG	J5	D6-19	+	1/18					1/18
	V3-30	IgA5741-24	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGAAAGCCCTATGATGATG	AACCTTTGCGGACTCTGGGGCCAGGG	J5	D6-19	+	1/18					1/18
	V3-30.3	IgA5740-7	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TTGGGGGATCCTAGGGTGGGGTTA	TTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
	V3-11	IgA5740-8	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TGGCGTGGGGCTACTCCAAATCTTCCCGC	ACTGCTTTGATATCTGGGGCCAGGG	J4	D2-15	+	1/18					1/18
	V3-23	IgA5740-11	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCCTTTCTGGGCTATTATAGG	ACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
	V3-11	IgA5740-3	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCCTAGGGCCCTCATATCATGCT	TTTGAATCTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
<b>VH2</b>	V3-07	IgA5740-14	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGCAGGGCCCTCAGTACTCTGGGGGTC	TGACTACTGGGGCCAGGGA	J4	D4-04	+	1/18					1/18
	V3-23	IgA5740-22	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGGCGCCCCAAGTCCAAAC	GATGCTTTGATGCTGGGGCCAGGG	J3			1/18					1/18
	V3-07	IgA5740-26	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGACTATTTGACGGGGCCCAAGGAG	TTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
	V3-23	IgA5740-27	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TATTCGCTGATGACTGCTATCCCGG	CTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4	D2-21	+	1/18					1/18
	V3-07	IgA5740-29	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	ACGGGAAAGACTGGGTTTCAAT	TTTGAATCTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
	V3-23	IgA5740-30	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CAGCTGCATAGCACTGCCCTCATTTGG	GACTACTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
<b>VH3</b>	V3-23	IgA5741-25	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCCAACGGTACACTAGTGGGGCT	TTTGTACTGGGGCCAGGGA	J4	D4-17	+	1/18					1/18
	V3-30	IgA5741-3	CTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGGAGTCCGTATAGCACTGGTACTGGGAGC	CTGGGGCCAGGGA	J4	D6-13	+	1/18					1/18
	V3-07	IgA5741-4	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	ATGTGGTGTACTACATTTTCTCCGAAATGGCC	ACTGGGGCCAGGGA	J4	D4-17	+	1/18					1/18
	V3-07	IgA5741-8	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TATGAGGATTTGTTCCCGTGG	CTTTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
	V3-07	IgA5741-11	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCTGAGTGAATTTGATAGTACCAG	TTGACTCTGGGGCCAGGGA	J4	D2-02	+	1/18					1/18
	V3-15	IgA5741-23	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GGAGTGACATTTGGAGCC	GATGCTTTGATGCTGGGGCCAGGG	J3	D3-03	+	1/18					1/18
<b>VH4</b>	V3-07	IgA5741-27	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCAGTTGCTTGGGAGTTCCTGCTAT	TTTGAATCTGGGGCCAGGGA	J4	D3-10	+	1/18					1/18
	V3-49	IgA5741-29	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GTCCCTTGTGTTGGGAGAT	TTTGAATCTGGGGCCAGGGA	J4	D3-10	+	1/18					1/18
	V3-23	IgA5741-30	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TACTCTGACCGGGAGCCAGGGCT	TTTGAATCTGGGGCCAGGGA	J4			1/18					1/18
	V3-23	IgA5740-21	GCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GTGGGGATTTAAACACAGTGCATATCT	TTTGAATCTGGGGCCAGGGA	J3			1/18					1/18
	V3-73	IgA5740-23	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TGGCAGCGGAGGACCAACCCCGA	ATGCTTTGATGCTGGGGCCAGGG	J3			1/18					1/18
	V3-72	IgA5740-24	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TGGCAGCGGAGGACCAACCCCGA	ATGCTTTGATGCTGGGGCCAGGG	J3			1/18					1/18
<b>G3</b>	V4-04	IgA5748-10	GCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCCCGTACAGTGGTACCCTGAGG	CTTTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4			1/4					1/4
	V4-04	IgA5748-13	GCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCCCGTACAGTGGTACCCTGAGG	CTTTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4			1/4					1/4
	V4-04	IgA5749-11	GCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	TCCCGTACAGTGGTACCCTGAGG	CTTTGACTACTGGGGCCAGGGA	J4			1/4					1/4
	V4-34	IgA5748-9	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GCCCGTGGTCCCTATTTATTTATTAATAAAT	GTCTGGGGCCAGGG	J6	D3-10	+	1/4					1/4
	V4-30.4	IgA5748-12	ACCAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GCCCGTGGTCCCTATTTATTTATTAATAAAT	GTCTGGGGCCAGGG	J6	D3-10	+	1/4					1/4
	V4-34	IgA5749-9	GCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	GCCGACCTACGGTGGCTGG	TGACTACTGGGGCCAGGGA	J4	D1-26	+	1/4					1/4
V4-04	IgA5749-10	GCCGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGGAGA	CCGCCAATTAAGGGGAGCCATGCTGGCCCTATGGGAT	GATGCTTTTGTATCTGGGGCCAGGG	J3	D4-17	+	1/3					1/3	

Tab.19: Nukleotidsequenzen klonierter IgA VH-Transkripte definierter CDR3-Länge der gesunden Patienten G1 - G4 (vgl. Abb.34)

Abgesehen von den in Tab.18 dargestellten Ausnahmen ließen die DNA-Sequenzanalysen korrespondierender dominanter  $V_H$ -Transkripte erkennen, daß klonal verwandte  $V_H$ -Rearrangements in nahezu sämtlichen parallel entnommenen *Kolonbiopsien* eines gegebenen Individuums existierten. Auch die DNA-Sequenzanalysen dominanter IgA-Transkripte zeitgleich isolierter PBMC erbrachten identische CDR3-Sequenzen; jedoch ließen sich kaum Hinweise auf klonale Beziehungen zu intestinalen IgA-Repertoires finden. Alle abgebildeten Nukleotidsequenzen sind über EMBL/Gen Bank/DDBJ unter den accession numbers AF267068 - AF267114 sowie AF280061 - AF280064 (IgA- $V_H2$ ) erhältlich.

### 5.5.8 Ein hoher Prozentsatz aller somatischen Basensubstitutionen stellt stille Mutationen dar oder führt zum Ersatz durch Aminosäuren, die vergleichbare physikochemische Eigenschaften besitzen

Durch direkte Sequenzierung sowie Subklonierung definierter CDR3-Längen aus korrespondierenden *Kolonbiopsien* ließen sich insgesamt 12 Gruppen intestinaler IgA- bzw. IgM-Transkripte unterscheiden, deren Mitglieder untereinander klonal verwandt waren. EDV-gestützte Translationen der identifizierten Nukleotidsequenzen ergaben, daß 51% aller Basensubstitutionen ( $n = 76$ ) stille Mutationen darstellten, während weitere 20% zum Ersatz durch Aminosäuren führten, die gemäß einer entsprechenden Konvention (29) über ähnliche physikochemische Eigenschaften verfügen:

**Tab.20:** Physikochemische Klassifizierung der Aminosäuren

	hydrophob	polar	sauer	basisch
AS	L, I, F, M, V, A	Q, N, T, S, C	D, E	R, K, H

Y und H weisen vergleichbare hydrophobe Eigenschaften auf. Q besitzt funktionelle Ähnlichkeiten mit E bzw. K und R; diese sind einander ambivalent (87). Hingegen zeigen W, C und F hydrophoben Charakter.

**Tab.21:** Peptidsequenzen, die anhand der Nukleotidsequenzen klonal verwandter IgA- bzw. IgM-Transkripte aus parallel entnommenen Biopsien abgeleitet wurden

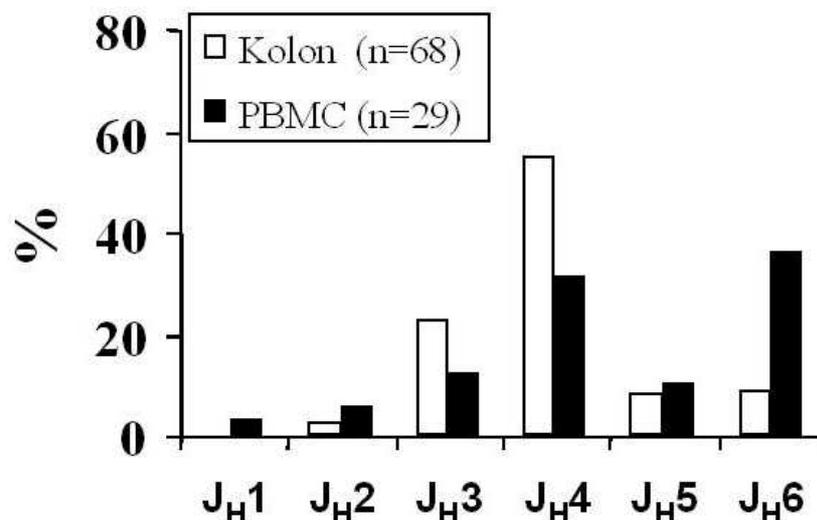
Per- son	CDR3- Länge	V <sub>H</sub>	Sequenz	V <sub>H</sub> -Region			N/D-Region			J <sub>H</sub> -Region		Kolon	
				V <sub>H</sub>	V <sub>H</sub>	V <sub>H</sub>	N/D-Region	N/D-Region	N/D-Region	J <sub>H</sub>	J <sub>H</sub>	I	II
IgA	G1	15	V1-46	IgA5729-2 IgA5729-6	SEDTA <b>V</b> Y <b>C</b> AR SEDTA <b>V</b> Y <b>C</b> AR	PQAYCGAEC <b>F</b> MRPL PQAYCGAEC <b>F</b> KRPL				E <b>Y</b> WGQ <b>G</b> J4 <sub>b</sub> E <b>Y</b> WGQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>	
	G2	15	V2-05	IgA5456-1 IgA5456-2 IgA5456-3 IgA5456-4	PVD <b>T</b> GT <b>T</b> Y <b>C</b> AHR PVD <b>T</b> AT <b>T</b> Y <b>C</b> AHR PVD <b>T</b> GT <b>T</b> Y <b>C</b> AHR PVD <b>T</b> GT <b>T</b> Y <b>C</b> AHR	TVSYG <b>P</b> Y <b>K</b> A TVSYG <b>P</b> Y <b>K</b> A TVSYG <b>P</b> Y <b>K</b> A TVSYG <b>P</b> Y <b>K</b> A			D <b>W</b> YFD <b>L</b> W <b>G</b> RG J2 D <b>W</b> YFD <b>L</b> W <b>G</b> RG J2 D <b>W</b> YFD <b>L</b> W <b>G</b> RG J2 D <b>W</b> YFD <b>L</b> W <b>G</b> RG J2		<b>x</b> <b>x</b> <b>x</b> <b>x</b>		
	G3	11	V3-23	IgA5740-1 IgA5741-1 IgA5741-2	AEDTA <b>T</b> Y <b>C</b> AKD AEDTA <b>V</b> Y <b>C</b> AKD AEDTA <b>V</b> Y <b>C</b> AKD	PNGDY <b>L</b> GA PNGDY <b>L</b> GA PNGDY <b>L</b> GA			F <b>D</b> SWGQ <b>G</b> J4 <sub>b</sub> F <b>D</b> SWGQ <b>G</b> F <b>D</b> SWGQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b> <b>x</b>		
	G3	11	V3-73	IgA5740-25 IgA5741-7	AEDTA <b>V</b> Y <b>C</b> TR AEDTA <b>V</b> Y <b>H</b> CTR	GYSGA <b>A</b> LY GYSGRA <b>A</b> Y			A <b>F</b> DIWGQ <b>G</b> J3 <sub>b</sub> A <b>F</b> DIWGQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>		
	G3	11	V3-09	IgA5740-28 IgA5741-28	VDDTALY <b>C</b> AKD VDDTALY <b>C</b> AKD	PHGY <b>Y</b> VGA PHGY <b>Y</b> VGA			F <b>D</b> CWG <b>P</b> G J4 <sub>b</sub> F <b>D</b> CWG <b>P</b> G		<b>x</b> <b>x</b>		
	G3	11	V3-30	IgA5740-16 IgA5741-24	VEDTA <b>V</b> Y <b>C</b> V <b>C</b> VEDTA <b>V</b> Y <b>C</b> V <b>K</b>	EGSP <b>Y</b> SS EGSP <b>Y</b> SS			N <b>F</b> YGAWGQ <b>G</b> J5 <sub>b</sub> N <b>F</b> YGAWGQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>		
	G3	11	V4-04	IgA5748-10 IgA5748-13 IgA5749-11	AADTA <b>V</b> Y <b>C</b> AT AADTA <b>M</b> Y <b>C</b> AT AADTA <b>V</b> Y <b>C</b> AT	VPYSGD <b>P</b> RG VPYSGD <b>P</b> RG VPYSGD <b>P</b> RG			F <b>D</b> YWQ <b>G</b> J4 <sub>b</sub> F <b>D</b> YWQ <b>G</b> F <b>D</b> YWQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b> <b>x</b>		
	G4	10	V5-51	IgA5403-1 IgA5403-2	ASDTATY <b>C</b> AR ASDTATY <b>C</b> AR	R <b>S</b> MS <b>I</b> SP <b>I</b> H R <b>S</b> MS <b>I</b> SP <b>I</b> H			DLWGQ <b>G</b> J4 <sub>b</sub> DLWGQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>		
	IgM	G1	20	V4-59	IgM5621-1 IgM5621-2	AADTA <b>V</b> Y <b>C</b> ARD AADTA <b>V</b> Y <b>S</b> ARD	AGIRD <b>T</b> AM <b>I</b> NG <b>I</b> K AGIRD <b>T</b> AM <b>I</b> NG <b>I</b> O			YYGMD <b>V</b> WGQ <b>G</b> J6 <sub>b</sub> YYGMD <b>V</b> WGQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>	
		G2	8	V2-05	IgM5128-1 IgM5128-2	PVD <b>T</b> AT <b>T</b> Y <b>C</b> AHR PVD <b>T</b> AT <b>T</b> Y <b>C</b> AHR	RG <b>S</b> GW RG <b>S</b> GW			L <b>D</b> YWQ <b>G</b> J4 <sub>b</sub> F <b>D</b> YWQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>	
G4		9	V4-04	IgM5528-1 IgM5528-2	AADTA <b>A</b> Y <b>F</b> CAR AADTA <b>A</b> Y <b>F</b> CAR	K <b>D</b> G <b>G</b> E <b>G</b> F K <b>D</b> G <b>G</b> E <b>G</b> F			F <b>D</b> YWQ <b>G</b> J4 <sub>b</sub> F <b>D</b> YWQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>		
G4		18	V5-51	IgM5587-1 IgM5587-2	ASDSA <b>I</b> Y <b>S</b> AR ASDSA <b>I</b> Y <b>C</b> AR	HEI <b>H</b> G <b>C</b> S <b>I</b> CR <b>V</b> GS HEI <b>H</b> G <b>C</b> S <b>I</b> CR <b>V</b> GS			WFDPWQ <b>G</b> J5 <sub>b</sub> WFDPWQ <b>G</b>		<b>x</b> <b>x</b>		
<p><b>C</b> Aminosäurereste, die auf <b>stillen</b> <b>D</b> Substitution durch Aminosäuren <b>K</b> Substitution durch Aminosäuren <b>divergierender</b>  <b>C</b> Basensubstitutionen basieren <b>E</b> ähnlicher Eigenschaften <b>T</b> physikochemischer Eigenschaften</p>													

Tabelle 21 stellt die Peptidsequenzen klonal verwandter, intestinaler IgA- und IgM-Transkripte zusammen, welche aus den Tabellen 14 und 19 (IgA) bzw. 16 (IgM) zu ersehen sind. Anhand des Patienten G3 ließ sich zeigen, daß die 3 klonal verwandten  $V_{H3}$ -Transkripte A5740-13, A5741-1 und A5741-26, welche sich in 10 Basen voneinander unterschieden (vgl. Tab.19) auf Peptidebene lediglich Differenzen bezüglich zweier Aminosäurereste aufwiesen, welche zudem vergleichbare Eigenschaften besaßen. Insgesamt waren somit 5 von 11 identifizierten *nicht* konservierten Substitutionen funktionell konserviert.

### 5.5.9 Intestinale und periphere IgM B-Lymphozyten weisen ähnliche Präferenzen bei der Verwendung von $J_H$ -Segmenten auf, unterscheiden sich in dieser Hinsicht jedoch signifikant von den korrespondierenden IgA-Repertoires

Die Mehrzahl der von uns analysierten intestinalen IgA-Schwerkettentranskripte wies entweder das  $J_{H4}$ - (57%) oder das  $J_{H3}$ -Segment (23%) auf. Hingegen dominierte bei den peripheren IgA-Transkripten in 36% aller Fälle das Allel  $J_{H6}$ , wobei die Berechnungen auf den in den Tabellen 14 bzw. 19 dargestellten Nukleotidsequenzen basierten.

**Abb.38:** Expression einzelner  $J_H$ -Regionen bei intestinalen und peripheren IgA-Transkripten



Demgegenüber fand sich das J<sub>H</sub>6-Segment nur bei 9% der intestinalen IgA V<sub>H</sub>-Transkripte. Innerhalb des fetalen sowie des Nabelschnurblutes kann dieses Allel sogar bis zu 30% vertreten sein (240). Bei intestinalen IgM-Schwerkettentranskripten stellte J<sub>H</sub>4 mit einem Anteil von 57% die bevorzugt exprimierte „Joining“-Region dar; J<sub>H</sub>6 wurde in 18% aller Fälle nachgewiesen. Die von uns für die Verwendung von J<sub>H</sub>-Regionen ermittelten Prozentsätze stehen in Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen [50% J<sub>H</sub>4 bzw. 20% J<sub>H</sub>6 im Fall peripherer IgM V<sub>H</sub> Transkripte, (241)]. Zwischen intestinalen und zirkulierenden B-Lymphozyten konnten *keine* signifikanten Differenzen bezüglich der Expression einzelner J<sub>H</sub>-Regionen festgestellt werden.



## 6. Diskussion

### 6.1 Das $\delta$ TCR-Repertoire gesunder Personen

Die vorliegende Arbeit basiert auf vorangegangenen Studien (46; 47) in denen gezeigt wurde, daß  $\gamma/\delta$  T-Zellen im Intestinum erwachsener Individuen ein oligoklonales  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoire exprimieren. Dieses Phänomen ließ sich sowohl anhand identischer dominierender als auch weniger prominenter  $\delta$ -Kettentranskripte nachweisen, die über das gesamte *Kolon* hinweg jeweils uniforme, homogene Verteilungen zeigten, wobei zwischen den  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoires einzelner Personen gravierende Unterschiede bestanden. Darüber hinaus konnte mit Hilfe der *inversen* PCR gezeigt werden, daß neben  $V\delta 1$  und  $V\delta 2$ , welche die dominanten  $V\delta$ -Familien im Darm darstellen, auch  $V\delta 3$  sowie  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten existieren, die  $V\alpha$ -Gensegmente exprimieren. Analysen des intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires (46; 47), welche Differenzen zwischen dem CDR3-Profil des *Kolons* sowie des *Duodenums* aufzeigten, ließen auf die Existenz charakteristischer, autologer oder exogener Antigene schließen, die offenbar innerhalb beider Darmabschnitte unterschiedlich sind. Zudem lieferte die zeitliche Konstanz intestinaler  $\delta$  TCR-Repertoires einen Hinweis auf die Stabilität der äquivalenten Liganden. Auch für  $\gamma/\delta$ -positive PBMC konnte unabhängig von der untersuchten *DV*-Familie ein individuen- und kompartimentspezifisches oligoklonales  $\delta$ -Ketten Repertoire nachgewiesen werden, welches über mindestens 15 Monate hinweg keine Veränderungen des jeweiligen CDR3-Profiles erkennen ließ.

#### 6.1.1 Entwicklungsabhängige Veränderungen humaner intestinaler $\delta$ -Ketten Repertoires

Von dem genannten Kenntnisstand ausgehend untersuchten wir die Frage, ob das humane  $\delta$  TCR-Repertoire bereits von Geburt an oligoklonale Expansionen einzelner Rezeptorspezifitäten aufweist oder ob es entwicklungsabhängigen Veränderungen unterliegt. Unsere experimentellen Daten belegen, daß sich im Verlauf der Entwicklung vom Fetus zum erwachsenen Individuum fundamentale Änderungen des intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires ergeben. Wir konnten zeigen, daß Individuen während der frühen postnatalen Phase über ein polyklonales  $\delta$  TCR-Repertoire verfügen, welches

sich im Verlauf der ersten beiden Lebensdekaden beträchtlich einschränkt. Somit unterstützen unsere Resultate ein Modell welches postuliert, daß  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten eingeschränkte Antigenenspektren erkennen. Als adäquate Liganden kommen neben invarianten körpereigenen Antigenen auch konservierte Oberflächenstrukturen symbiontischer Mikroorganismen in Frage. Es ließ sich nachweisen, daß die intestinale Bakterienflora sehr individuenpezifisch ist und normalerweise über längere zeitliche Intervalle hinweg keinen Veränderungen unterliegt (242; 243). Bislang ist allerdings ungeklärt, ob klonale Expansionen einzelner Rezeptorspezifitäten über längere Zeiträume als das von uns beobachtete eineinhalbjährige Intervall stabil bleiben.

### **6.1.2 Die Limitierung des fetalen $\delta$ TCR-Repertoires beruht auf der fehlenden TdT-Expression sowie homologieabhängigen Rekombinationsereignissen**

Die Längenanalysen der intestinalen  $\delta$ -Kettentranskripte 20 Wochen alter Feten erbrachten CDR3-Profile, welche zunächst auf die Existenz polyklonaler Rezeptor Repertoires schließen ließen. Allerdings konnten wir mit Hilfe der DNA-Sequenzanalyse zeigen, daß die CDR3-Domänen fetaler  $\delta$  TCR-Transkripte beträchtliche Limitierungen ihrer Vielfältigkeit aufweisen. Diese Tatsache beruht teilweise darauf, daß die Gensegmentübergänge der *DV2*-Transkripte über sehr wenige „N“-Nukleotide verfügen. Dieser Befund steht mit Studien in Einklang, denen zufolge die Terminale Nukleotidyltransferase (TdT), welche die Insertion matrizenunabhängiger Basen katalysiert, im humanen Thymus nicht vor Vollendung der 20. SSW exprimiert wird (244; 245). Andererseits ließen sich bei fetalen  $\delta$  TCR-Transkripten sowohl Additionen matrizenabhängiger „P“-Nukleotide als auch modifizierte Gensegmenttermini nachweisen. Weiterhin beruht die Einschränkung des fetalen  $\delta$ -Ketten Repertoires darauf, daß im Bereich der Gensegmentübergänge keine statistische Verteilung von *VDJ*-Rearrangements vorliegt, sondern einige  $\delta$ -Transkripte quantitativ überrepräsentiert sind, wobei kurze, partiell homologe DNA-Abschnitte offensichtlich entscheidenden Einfluß auf die Rekombination zwischen *DV*-, *DD*- und *DJ*-Segmenten besitzen. Derartige Mechanismen einer homologievermittelten Rekombination sind bereits im Fall der *Ig<sub>H</sub>*- sowie der  $\gamma/\delta$  TCR-Transkripte von Mäusen gezeigt worden (228 - 230), wobei das entsprechende Modell vorsieht, daß Rearrangements zwischen den Exons der Rezeptor-Untereinheiten kodierenden Gensegmente

bevorzugt innerhalb partieller DNA-Sequenzüberlappungen stattfinden (228 - 230; 246). Diese „einfachen“ CDR3-Regionen sind vermutlich dafür verantwortlich, daß wir Überlappungen zwischen den  $\delta$  TCR-Repertoires verschiedener Feten nachweisen konnten und daß solche Fetus-typischen *DV2*-Rezeptoren noch bis mindestens 6 Wochen nach der Geburt exprimiert werden können. Vergleiche zwischen unseren (48) und den von anderen Arbeitsgruppen publizierten DNA-Sequenzdaten (111; 225) erbrachten teilweise Überlappungen der CDR3-Domänen intestinaler  $\delta$ -Ketten sowie der  $\delta$  TCR-Transkripte, welche innerhalb der fetalen Leber (224) sowie des fetalen Thymus' identifiziert wurden. Somit scheint das fetale  $\delta$  TCR-Repertoire *nicht* kompartimentiert zu sein. Dieser Befund steht in deutlichem Kontrast zu den anhand adulter *DV2*-Transkripte gewonnenen Resultaten, welche generell streng individuen-spezifisch sind und über zahlreiche „N“-Nukleotidadditionen verfügen (47). Die Existenz identischer, individuen- und kompartimentübergreifender  $\delta$  TCR-Transkripte ist in der Vergangenheit bereits bei Mäusen beschrieben worden (226; 227; 247). Während sich das fetale  $\delta$  TCR-Repertoire bei Mäusen jedoch vorwiegend aus wenigen dominierenden kanonischen Transkripten konstituiert, sind entsprechende Dominanzen im Fall des Menschen nicht nachzuweisen.

### **6.1.3 Ist das fetale $\delta$ TCR-Repertoire vorprogrammiert oder unterliegt es einer antigenvermittelten Selektion ?**

Gegenwärtig ist ungeklärt, in welchem Ausmaß gerichtete Rekombinationsereignisse sowie intrauterine Selektionsprozesse Einfluß auf den Umfang des fetalen  $\delta$  TCR-Repertoires besitzen. So können nicht sämtliche Sequenzüberlappungen zwischen verschiedenen Feten auf das Fehlen der TdT-Aktivität bzw. homologieabhängige Rekombinationsereignisse zurückgeführt werden. Sowohl unsere als auch die Resultate anderer Arbeitsgruppen, welche  $\delta$  TCR-Transkripte innerhalb der fetalen Leber analysierten (248) dokumentieren die Existenz hochkonservierter *DV2/DJ1*-Segmentübergänge, welche jeweils hydrophobe, nicht durch die Keimbahn kodierte Aminosäuren determinieren. Somit liegt ein Hinweis darauf vor, daß selektive Prozesse eventuell bereits während der fetalen Entwicklungsphase Einfluß auf die Ausprägung des  $\delta$  TCR-Repertoires besitzen. Möglicherweise handelt es sich hierbei um körpereigene Antigene (vgl. hierzu 6.1.10).

#### **6.1.4 Die Bedeutung des polyklonalen $\delta$ TCR-Repertoires während der neonatalen Phase**

Im Gegensatz zu den oligoklonalen  $\delta$  TCR-Repertoires Erwachsener (46; 47) erweisen sich die CDR3-Profile Neugeborener durchweg als polykonal; dieses Charakteristikum bleibt über die ersten Lebensjahre hinweg bestehen. Darüber hinaus besitzen die intestinalen  $\delta$ -Kettentranskripte Neugeborener einen hohen Komplexitätsgrad, welcher in etwa demjenigen erwachsener Personen entspricht (46; 47). In dieser Hinsicht unterscheiden sich die intestinalen  $\gamma/\delta$  T-Zell Rezeptoren Neugeborener signifikant von denjenigen postnataler Mäuse, bei welchen die Übergangsbereiche zwischen einzelnen  $\delta$ -Gensegmenten zum Zeitpunkt der Geburt einen niedrigen Komplexitätsgrad aufweisen. So finden sich innerhalb der CDR3-Domänen neugeborener Mäuse beispielsweise keine „N“-Nukleotidadditionen; diese treten erst ab dem 3. bis 5. postnatalen Lebenstag auf, wobei eine Korrelation mit der zeitgleich einsetzenden TdT-Expression besteht (249).

#### **6.1.5 Das genetische Potential zur Generierung von Rezeptorspezifitäten ist zum Zeitpunkt der Geburt ausgeschöpft**

Bis zum Zeitpunkt der Geburt ist das intestinale Immunsystem vermutlich weitgehend von prägenden Einflüssen körperfremder Antigenstrukturen abgeschirmt. Die Tatsache, daß neonatale  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten ihr genetisches Potential zur Generierung von Rezeptorspezifitäten in starkem Maße ausschöpfen, ermöglicht Selektionsprozesse auf die unterschiedlichsten Antigene. Allerdings muß in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß unsere Daten keinerlei Aufschluß darüber geben, ob die polyklonalen  $\delta$  TCR-Repertoires Neugeborener nicht ursächlich auf  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten zurückzuführen sind, welche sich primär innerhalb des Thymus' oder der fetalen Leber (224) differenzieren und sekundär in den neonatalen Intestinaltrakt einwandern. Im Gegensatz zur fetalen Leber besteht nämlich noch weitgehende Unklarheit darüber, ob auch der Darm einen Ort der extrathymischen T-Zellentwicklung darstellt (250).

### 6.1.6 Die Bedeutung der zunehmenden Einschränkung des $\delta$ TCR-Repertoires während der postnatalen Entwicklungsphase

Bei den von uns untersuchten 14 bis 17jährigen Kontrollpersonen waren oligoklonale  $\delta$  TCR-Repertoires weit verbreitet; darüber hinaus fanden sich auch bei einigen der jüngeren Individuen Hinweise auf beginnende Einschränkungen des intestinalen  $\delta$  TCR-Repertoires. Diese Befunde korrelieren mit den Resultaten der genannten Vorarbeiten (46; 47) sowie Studien anderer Arbeitsgruppen (110; 231), denen zufolge das Rezeptor Repertoire zirkulierender  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten gesunder Personen ebenfalls oligoklonal ist, wobei entsprechende Einschränkungen teilweise schon im Alter von 3 Jahren nachweisbar sind (110; 231). Analog hierzu läßt auch das Rezeptor Repertoire peripherer, CD8<sup>+</sup>  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten gesunder Personen zwischen dem 10. und 14. Lebensjahr klonale Expansionen erkennen (251). Somit findet die Einschränkung des humanen  $\delta$  TCR-Repertoires bereits vor Beginn der Thymusinvolution statt wobei ungeklärt ist, inwieweit dieses primäre lymphoide Organ über das 3. Lebensjahr hinaus zur Generation bzw. zum Export von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten befähigt ist.

Bei Mäusen sind dominante  $\gamma/\delta$  T-Zellklone innerhalb der Haut, den mukosalen Oberflächen des Reproduktionstraktes sowie des Zungenepithels nachweisbar (114; 115; 252). Die  $\delta$ -Kettentranskripte dieser Lymphozytenpopulationen zeichnen sich dadurch aus, daß die Übergangsregionen zwischen den Gensegmenten unmodifizierte, in Keimbahnkonfiguration vorliegende Exons enthalten und nur minimale Insertionen matrizenunabhängiger „N“-Nukleotide aufweisen (114; 115; 228; 252; 253). Deshalb nimmt man an, daß die beobachteten Einschränkungen des Rezeptor Repertoires auf festgelegten, bzw. vorprogrammierten Rekombinationsereignissen zwischen den beteiligten Gensegmenten beruhen, welche möglicherweise innerhalb des Thymus stattfinden (228; 253). Im Gegensatz hierzu weist der im Rahmen unserer Arbeiten (46; 47; 48) ermittelte hohe Komplexitätsgrad intestinaler  $\delta$ -Kettentranskripte bei Neugeborenen und Erwachsenen darauf hin, daß vorprogrammierte Rekombinationsereignisse bei der Entwicklung humaner Rezeptor Repertoires nur untergeordnete oder gar keine Rolle spielen.

### 6.1.7 Die homogene Verteilung des $\delta$ TCR-Repertoires weist auf eine Rezirkulation dominanter T-Zellklone hin

Unsere experimentellen Daten unterstützen die Hypothese, wonach homogene Verteilungen einiger weniger Rezeptorspezifitäten das Resultat populationsdynamischer Ereignisse darstellen. Es ist anzunehmen, daß definierte  $\gamma/\delta$  T-Zellklone, die aufgrund permanenter Rezeptor/Ligand-Wechselwirkungen selektiert und zur Proliferation angeregt wurden permanent rezirkulieren und schließlich umfangreiche Areale eines funktionellen Darmabschnittes besiedeln. In Anbetracht des hohen Komplexitätsgrades der CDR3-Domänen Erwachsener ist die Möglichkeit, daß die sukzessive Limitierung der Repertoiregröße auf kontinuierlichen, *in situ* erfolgenden Rekombinationsprozessen zwischen *DV*-, *DD*- und *DJ*- Gensegmenten beruhen könnte, aus statistischen Gründen sehr unwahrscheinlich. In diesen Fall wären aufgrund des riesigen genetischen Potentials zur Generierung von Rezeptorspezifitäten prinzipiell polyklonale Verteilungsmuster zu erwarten. Außerdem läßt die über bedeutende räumliche Distanzen sowie mittelfristige zeitliche Intervalle hinweg bestehende Konstanz des humanen  $\delta$  TCR-Repertoires vermuten, daß diejenigen  $\gamma/\delta$  T-Zellklone, welche im Intestinum vorherrschen, bereits zu Beginn ihrer räumlichen Expansion positiven Selektionsprozessen unterlagen. Vermutlich existieren in jedem funktionellen Kompartiment des Organismus' definierte immunogene Strukturen, welche mit den antigenbindenden Rezeptordomänen ortsansässiger  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten interagieren und somit letztendlich deren Topologie prägen. Auch die individuellen dominanten  $\delta$  TCR-Transkripte peripherer  $\gamma/\delta$  T-Zellen, deren Existenz bereits in der Vergangenheit von anderen Arbeitsgruppen bestätigt werden konnte (110), legen dies nahe. Die homogene Verteilung intestinaler CDR3-Längenprofile liefert einen wichtigen Hinweis darauf, daß die Rezirkulation antigenselektierter Klone bedeutenden Einfluß auf die Ausprägung adulter  $\delta$  TCR-Repertoires besitzt. Würden aktivierte  $\gamma/\delta$  T-Zellen lediglich lokal expandieren und nicht rezirkulieren, so sollte man in räumlich weit voneinander entfernten Arealen eines funktionellen Kompartimentes divergente T-Zellpopulationen erwarten.

### 6.1.8 Analyse des $\delta$ TCR-Repertoires hinsichtlich konservierter Sequenzmotive

Aufgrund der signifikanten Einschränkungen humaner  $\delta$  TCR-Repertoires analysierten wir unsere Datensätze peripherer und mukosaler  $\delta$ -Kettentranskripte nach vorangegangener EDV-gestützter Translation hinsichtlich der Frage, ob möglicherweise auf Peptidebene konservierte Motive existieren. Entsprechende Studien anderer Arbeitsgruppen zeigten, daß das erste Basentriplett innerhalb der CDR3-Domäne bei über 90% aller analysierten peripheren *DV1/DJ1*-Transkripte für hydrophobe Aminosäurereste wie V, L oder I kodiert (254; 255). Da die genannten Aminosäurereste vorwiegend von matrizenunabhängigen „N“-Nukleotiden und nicht von Gensegmenten in Keimbahnkonfiguration determiniert werden, nimmt man eine ligandenvermittelte positive Selektion von T-Zellen an. Daß solche antigenabhängigen Selektionsmechanismen großen Einfluß auf die Ausprägung von TCR-Repertoires nehmen können, wurde bereits anhand der  $\beta$ -Kettentranskripte von Mäusen gezeigt, welche zuvor mit Zytochrom C immunisiert worden waren (256). Obwohl unsere Resultate nicht im Widerspruch zu diesen Befunden standen, ließen sich mittels der EDV-gestützten Vergleiche zwischen den translatierten Nukleotidsequenzen humaner  $\delta$ -Kettentranskripte keine weiteren konservierten Aminosäuremotive nachweisen.

Weiterhin wurden die Längen und die Variabilität der translatierten CDR3-Domänen von  $\delta$  TCR-Transkripten miteinander verglichen, welche unterschiedlichen *DV*-Subfamilien angehörten. Im Rahmen dieser Untersuchungen ließ sich zeigen, daß die antigenbindende Domäne von *DV2/DJ1*-Arrangements beträchtlich kürzer als diejenige der *DV1/DJ1*-Transkripte ausfällt (47). Da die beobachteten Differenzen jedoch unabhängig davon sind, ob die analysierten T-Lymphozyten aus mukosalen Oberflächen oder dem peripheren Blut stammen, repräsentieren sie vermutlich die Tatsache, daß sich das *TCRDD2*-Segment nur mit niedriger Frequenz unter  $V\delta 2/J\delta 1$ -Rezeptoren findet. Da die beobachteten Längenunterschiede zudem unabhängig davon sind, ob funktionelle oder *nichtfunktionelle* T-Zell Rezeptoren analysiert werden, beruhen sie mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht auf selektiven Einflüssen. Darüber hinaus wurde deutlich, daß intestinale und periphere  $\delta$  TCR-Transkripte über *keine* bevorzugte CDR3-Länge verfügen.

### 6.1.9 Fetale und neonatale $\delta$ -Kettentranskripte unterscheiden sich vom adulten $\gamma/\delta$ TCR-Repertoire bezüglich der Verwendung von *DJ*-Gensegmenten

Sowohl die  $\delta$  TCR-Transkripte von Feten als auch neugeborener Individuen exprimieren das *DJ2*- sowie das *DJ3*-Segment mit deutlich höherer Frequenz als die  $\gamma/\delta$  Rezeptoren erwachsener Personen (46; 47). Da das *DJ2*- bzw. das *DJ3*-Segment zwischen ein bis drei Aminosäuren mehr als das *DJ1*-Segment kodiert (91), ermöglicht die Verwendung unterschiedlich langer *DJ*-Segmente theoretisch auch in Abwesenheit von „N“-Nukleotiden eine hohe Variabilität der CDR3-Region. Eventuell ist die Länge der CDR3-Region während der fetalen Entwicklungsphase von entscheidender Bedeutung; in diesem Fall ließe sich die erhöhte Expressionsrate des *DJ3*-Segmentes als kompensatorischer Effekt interpretieren.

### 6.1.10 Möglichkeit einer Selektion gegen bisher unbekannte (Eigen-) Antigene

Da sich bereits im Alter von 14 - 17 Jahren weitreichende Einschränkungen des intestinalen CDR3-Profiles zeigen und kaum qualitative Unterschiede zu den Repertoires 70 - 80jähriger Personen bestehen ist anzunehmen, daß die zugrundeliegenden Faktoren primär während der ersten beiden Lebensdekaden wirksam werden. Bislang ist jedoch nicht bekannt, welches Ligandenspektrum von  $\gamma/\delta$  T-Zellen *in vivo* während der fetalen oder der adulten Lebensphase erkannt wird und für die beobachteten Repertoireeinschränkungen verantwortlich sein könnte. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, daß die umfangreichen Veränderungen des humanen  $\delta$  TCR-Repertoires entwicklungsabhängige strukturelle Änderungen körpereigener Liganden repräsentieren. Als potentielle Eigenantigene für V $\delta$ 1-positive intestinale T-Lymphozyten werden derzeit die MHC Ib-Klasse verwandten Oberflächenantigene *MICA* und *MICB* diskutiert (43; 45), deren Expression unter der Kontrolle *HSP70* ähnlicher Promotoren steht (44) und in Streßsituationen wie bakteriellen Infektionen oder entzündlichen Prozessen hochreguliert wird (44). Vermutlich selektiert jedes Individuum aus dem ihm zur Verfügung stehenden Repertoire diejenigen Rezeptoren, welche die höchste Affinität zum gegebenen Epitop besitzen. Aufgrund der gewaltigen Rekombinationsmöglichkeiten von  $\gamma/\delta$  T-Zellen, welche die gesamte Zahl

aller T-Lymphozyten bei weitem überschreiten ist denkbar, daß verschiedene Individuen die gleichen antigenen Determinanten mittels ihrer dominanten  $\gamma/\delta$  TCR „sehen“, hierfür jedoch unterschiedliche Rezeptoren verwenden.

Sowohl die absolute Länge als auch die Variabilität innerhalb der CDR3-Domäne von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten übersteigt diejenige von  $\alpha/\beta$  T-Zellen beträchtlich und zeigt darüber hinaus große strukturelle Ähnlichkeiten zu den antigenbindenden Rezeptoruntereinheiten von Immunglobulin-Schwerkettentranskripten (Ig<sub>H</sub>). Deshalb wird diskutiert, daß  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten über ähnliche Mechanismen der Antigenerkennung verfügen wie Immunglobuline; möglicherweise erstrecken sich die Gemeinsamkeiten sogar auf die chemische Substanzklasse der erkennbaren Strukturen (59).

## 6.2 Das Rezeptor Repertoire kutaner $\gamma/\delta$ T-Lymphozyten

Da sowohl der Intestinaltrakt als auch die Haut quantitativ bedeutende Grenzflächen des Organismus' darstellen, welche kontinuierlich mit einer gewaltigen Anzahl verschiedenartigster Antigene konfrontiert werden, kommt den immunologischen Abwehrmechanismen beider Organsysteme eine besondere Bedeutung zu (257). Im Rahmen unserer Studien ließ sich zeigen, daß intradermal lokalisierte  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten bei gesunden erwachsenen Personen ein oligoklonales, stark limitiertes  $\delta$  TCR-Repertoire aufweisen. Die beobachtete Einschränkung der Repertoiregröße ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß sich die intradermalen  $\gamma/\delta$  Lymphozyten ebenfalls auf die Erkennung charakteristischer, möglicherweise streßinduzierbarer Eigenantigene spezialisiert haben. In diesem Fall müßten sie theoretisch dazu in der Lage sein zwar indirekt, aber rasch und effizient auf große Spektren pathogener Faktoren zu reagieren, ohne daß hierzu die Expression vielfältiger Rezeptorspezifitäten nötig wäre. Diese Annahme steht mit neueren Publikationen in Einklang, wonach humane intestinale DV1-positive T-Lymphozyten nicht durch exogene Strukturen, sondern von körpereigenen, MHC I-Klasse ähnlichen Oberflächenantigenen aktiviert werden (43; 45). Von daher implizieren oligoklonale  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoires nicht notwendigerweise die Existenz maligner Transformationen oder infektiöser Prozesse, sondern repräsentieren den physiologischen Normalzustand. Die Resultate unserer Untersuchungen stehen im Widerspruch zu Studien anderer Arbeitsgruppen, welche polyklonale Repertoires kutaner  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten im Fall gesunder Personen

beschrieben und Akkumulationen klonal expandierter  $\gamma/\delta$  T-Zellen bei Patienten dokumentierten, welche granulomatöse Erkrankungen der Haut aufwiesen (119 - 121). Allerdings wurden im Rahmen der genannten Untersuchungen entweder nur wenige (120) oder überhaupt keine (119) gesunden Personen als Referenz (Kontrollgruppe) in die Studien einbezogen. Die von uns bevorzugte Methodik der CDR3-Längenanalyse liefert prinzipiell ein umfassendes Bild des jeweils exprimierten ( $\delta$ ) TCR-Repertoires (vgl. 5.1.1). Demgegenüber birgt die von anderen Arbeitsgruppen verfolgte, alternative Strategie einer mehr oder weniger statistischen Auswahl begrenzter Zahlen von Rezeptortranskripten zu Analysezwecken die mögliche Gefahr nichtrepräsentativer Probenkollektive.

Die von uns analysierten  $\delta$ -Kettenrepertoires humaner kutaner  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten unterscheiden sich signifikant von entsprechenden  $\delta$  TCR-Transkripten bei Mäusen, welche annähernd monospezifisch sind, zahlreiche Sequenzrepetitionen aufweisen und zudem keine Additionen von „N“-Nukleotiden erkennen lassen (114; 115). Solche, anhand transgener Mäuse gewonnenen Resultate lassen den Schluß zu, daß deren *dendritische, epidermale T-Zellen (DETC)* möglicherweise über vorprogrammierte T-Zell Rezeptoren verfügen, was den zahlreichen kanonischen Repetitionen entspräche (253; 258). Ferner konnte an transgenen Mäusen gezeigt werden, daß sich *DETC* unabhängig vom jeweils exprimierten  $\gamma/\delta$  T-Zell Rezeptor innerhalb der Haut ansiedeln (253; 258). Demgegenüber stellen die oligoklonalen  $\delta$  TCR-Repertoires der humanen, intradermalen  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten vermutlich das Resultat längerfristiger Selektions- und Expansionsprozesse dar. Indessen schließen diese Befunde nicht aus, daß kutane  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten bei Menschen und Mäusen vergleichbare Aufgaben erfüllen bzw. der Erhalt dieser Zellpopulation von ähnlichen oder gar identischen Strukturen abhängt.

Da sowohl intradermale als auch periphere  $\gamma/\delta$  T-Zellen bevorzugt das *TCRDV2*-Gensegment exprimieren wurde angenommen, daß die humanen kutanen  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten möglicherweise keine diskrete Subpopulation darstellen, sondern sich vom zirkulierenden T-Zellpool herleiten. Hiervon abgesehen, führten an beiden T-Zellpopulationen durchgeführte Untersuchungen zur Identifizierung identischer konservierter Aminosäurereste innerhalb der antigenbindenden CDR3-Domäne (101; 120; 123; 124). Unsere Feinstrukturanalysen intradermaler und peripherer  $\delta$  TCR-Repertoires

ließen indessen distinkte Genarrangements erkennen, deren Vorkommen sich ausschließlich auf kutane  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten beschränkte. Dennoch ist wahrscheinlich, daß die Haut und das Blut geringe Anteile identischer, klonal expandierter T-Lymphozyten beherbergen, da einige der zirkulierenden PBMC mittels entsprechender histospezifischer Adressine innerhalb kutaner Mikrogefäße ansässig werden (257). Weil die Anzahl kutaner  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten generell sehr niedrig liegt, ist zudem eine Beeinflussung der Resultate durch  $\gamma/\delta^+$  PBMC möglich, die in den kutanen Gefäßen zirkulieren. Aufgrund der Tatsache, daß einige der dominanten CDR3-Banden exklusiv in Hautbiopsien, hingegen *nicht* bei der PBMC-Fraktion vorlagen kann als gesichert gelten, daß die Haut unter physiologischen Normalbedingungen ebenfalls über eine kompartimentspezifische Subpopulation  $\gamma/\delta$ -positiver T-Lymphozyten verfügt.

Es besteht die Möglichkeit, daß kutane  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten Gedächtniszellen repräsentieren, wobei die Frage nach den relevanten Antigenen, die ihre Expansion induzierten, offen bleibt. In diesem Zusammenhang werden sowohl ubiquitäre exogene, histotypische, d.h. auf das kutane Kompartiment begrenzte sowie die oben genannten, HSP verwandten Strukturen (43) diskutiert. So induziert die irreversible Schädigung von Keratinozyten, die im Verlauf entzündlicher Prozesse oder neoplastischer Entdifferenzierungen stattfindet möglicherweise die Expression typischer Streßantigene, welche eine Aktivierung intradermal angesiedelter  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten auslöst. Demzufolge könnte die signifikante Zunahme von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten, welche für einige entzündliche Hauterkrankungen charakteristisch ist (119 - 121) nicht auf der Rekrutierung peripherer, sondern einer klonalen Expansion lokaler T-Zellen beruhen. Da mittels Subklonierungen sowie PCR-gestützter Analysen nur wenige Überlappungen zwischen dominanten  $\delta$  Rezeptoren peripherer und kutaner T-Lymphozyten gefunden wurden, kann die Kompartimentierung des humanen  $\gamma/\delta$  TCR-Repertoires als gesichert gelten.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sämtliche von uns untersuchten Kompartimente (d.h. der Intestinaltrakt, das periphere Blut sowie die Haut) gesunder erwachsener Personen über individuelle  $\gamma/\delta$  T-Zellpopulationen verfügten, welche bedeutende Einschränkungen ihrer Rezeptorvielfalt aufwiesen. Es kann davon ausgegangen werden, daß das beobachtete Phänomen auch im Fall anderer Organsys-

teme zutrifft. Diese Aussage wird zudem dadurch gestützt, daß unsere derzeitigen durchgeführten Untersuchungen von  $\delta$  TCR-Repertoires des Hausschweins (*Sus scrofa*) ebenfalls kompartimentspezifische Verteilungsmuster respektive oligoklonale Expansionen innerhalb der Lunge sowie des Intestinums erkennen lassen.

### 6.3 Die Rolle von $\gamma/\delta$ T-Zellen bei *chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED)*

Basierend auf der Tatsache, daß sich im Fall der  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten signifikante Repertoireverschiebungen zwischen entzündlichen sowie *nichtentzündlichen* Darmarealen von *M.Crohn*-Patienten nachweisen ließen (162; 163) bestand ein angestrebtes Ziel unserer Experimente darin, über möglicherweise existierende Verschiebungen von  $\delta$  TCR-Repertoires Rückschlüsse auf die fragliche Beteiligung von  $\gamma/\delta$  T-Zellen am Krankheitsgeschehen, vielleicht sogar auf die krankheitsauslösenden Faktoren selbst ziehen zu können.

Indessen belegen unsere Daten, daß sich das  $\delta$  TCR-Repertoire von *CED*-Patienten in der Mehrzahl nicht signifikant gegenüber dem Normalzustand unterscheidet. Auch im Fall der nicht immunologisch assoziierten *Divertikulitis* ließen sich keine signifikanten Veränderungen des CDR3-Profiles diagnostizieren. Von daher verursachen entzündliche Prozesse vermutlich generell keine grundlegende Beeinflussung des mukosalen  $\delta$  TCR-Repertoires. Darüber hinaus zeigen unsere Resultate, daß sich das CDR3-Profil  $\gamma/\delta^+$  PBMC deutlich von dem der entzündlichen Mukosa unterscheidet und die ursprünglich anhand gesunder Personen entdeckte Kompartimentierung des  $\delta$  TCR-Repertoires unabhängig von der Erkrankung bestehen bleibt. Dennoch kann aus den erhaltenen Resultaten nicht abgeleitet werden, daß  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten generell nicht an der Pathogenese *chronisch entzündlicher Darmerkrankungen* beteiligt sind bzw. keine destruktiven Aktivitäten zeigen. Da mehrere Arbeitsgruppen unabhängig voneinander einen signifikanten Anstieg V $\delta$ 1-positiver T-Lymphozyten im peripheren Blut von *CED*-Patienten nachweisen konnten wird angenommen, daß sich diese aus dem Darmtrakt herleiten (103; 174), zumal intestinale  $\gamma/\delta$  T-Zellen bevorzugt das *TCRDV1*-Gensegment exprimieren (33; 84).

Es existieren mehrere Erklärungsansätze dafür, weshalb Aktivierungen und Expansionen *TCRDV1* exprimierender  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten (160; 161) stattfinden können, ohne daß dies einen nachweisbaren Einfluß auf das jeweilige CDR3-Profil besitzen muß:

Zunächst besteht die Möglichkeit, daß lokale mukosale *DV1*<sup>+</sup> T-Zellpopulationen, welche den Darmtrakt bereits unter physiologischen Normalbedingungen dominieren (33; 47; 84) von körpereigenen, streßinduzierbaren Eigenantigenen aktiviert und zur Proliferation angeregt werden. Beispielsweise konnte anhand intestinaler *DV1*<sup>+</sup> T-Lymphozyten *gesunder* Personen gezeigt werden, daß sich diese spezifisch von den *nichtklassischen*, MHC I-Klasse verwandten Oberflächenantigene *MICA* und *MICB* aktivieren lassen, welche von gestressten oder geschädigten Epithelzellen exprimiert werden. Weiterhin könnten  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten im Rahmen einer „bystander-Funktion“ unspezifisch an der Entstehung und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse beteiligt sein, wobei ihre Aktivierung möglicherweise über CD3-unabhängige Mechanismen induziert wird oder über inflammatorische Chemokine erfolgt, die von anderen immunkompetenten Zellen, beispielsweise  $\alpha/\beta$  T-Lymphozyten, sezerniert werden. Ferner ist denkbar, daß innerhalb der entzündeten Mukosaareale nur wenige krankheitsspezifische  $\gamma/\delta$  T-Zellen existieren, welche sich zwar quantitativ in der Minorität befinden, jedoch dazu befähigt sind, benachbarte  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten unspezifisch zu aktivieren. So ließ sich zeigen, daß wenige autoreaktive Zellen innerhalb eines autoimmunen Infiltrates die Kontrolle über die Mehrheit der unspezifischen Zellen ausüben können (259). Vermutlich sind derart kleine Populationen spezifischer T-Lymphozyten jedoch mittels unseres experimentellen Ansatzes nicht nachweisbar. Außerdem läßt sich die Bedeutung von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten im Rahmen der Induktion einer oralen Toleranz nachweisen (260) welche auf der Hyporeaktivität mukosaler T-Zellen gegenüber ubiquitären Antigenstrukturen basiert (142; 261). Von daher dürften  $\gamma/\delta$  T-Zellen sekundär durch entzündliche Prozesse aktiviert werden und eventuell sogar einen positiven Einfluß auf die Pathogenese von *CED* bzw. den Heilungsprozeß ausüben. Diese Hypothese wird durch zahlreiche Studien bestätigt in denen gezeigt wurde, daß  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten Zytokine sezernieren, welche die Proliferation sowie die Differenzierung von Epithelzellen unterstützen (135; 262).

Schließlich ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß das gesamte Intestinum der *CED*-Patienten von homogenen Verteilungen aktivierter  $\gamma/\delta$  T-Zellklone dominiert wird, welche sich sowohl innerhalb läsionaler als auch morphologisch unauffälliger Darmareale befinden und von daher die Identifizierung krankheitsassoziierter Expansionen ausschließen. Wie unsere Untersuchungen von *CED*-Patienten zeigten, ist prinzipiell die Möglichkeit gegeben, daß Entzündungen des Gastrointestinaltraktes zu Veränderungen des  $\delta$  TCR-Repertoires führen. So konnten wir im Fall eines *C.ulcerosa*-Patienten dokumentieren, das sich dessen  $\delta$  TCR-Repertoire, welches in der *nicht*involvierten Mukosa oligoklonal war, innerhalb der entzündlichen Areale zu einem polyklonalen CDR3-Profil wandelte. In einigen Fällen ließ sich die beobachtete Verschiebung durch mögliche Akkumulationen peripherer  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten innerhalb des entzündeten Gewebes erklären, da diese ebenfalls ein oligoklonales  $\delta$  TCR-Repertoire aufwiesen. Möglicherweise repräsentierten diese Patienten jedoch eine Subgruppe, welche eine spezielle Pathophysiologie der Erkrankung zeigte. Es existiert die Auffassung, wonach *M.Crohn* und *C.ulcerosa* nicht nur distinkte Erkrankungen darstellen, sondern daß es sich hierbei jeweils um einen Komplex mehrerer verschiedener pathologischer Erscheinungsformen handelt, welche letztendlich alle zur Entzündung des Gastrointestinaltraktes beitragen (152). Diese Annahme wird durch entsprechende Tiermodelle gestützt, bei denen verschiedenartigste Beeinflussungen des Immunsystems zu sehr ähnlichen Ausprägungen entzündlicher Darmerkrankungen führten. Übereinstimmend hiermit wurde die Existenz krankheitsspezifischer Expansionen von  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten innerhalb der entzündeten Mukosa von *Morbus Crohn*-Patienten postuliert und zudem eine vermehrte Verwendung des *DJ3*-Segmentes beschrieben (237). Doch obwohl die Mehrzahl aller von uns analysierten *M.Crohn*-Patienten über oligoklonale  $\delta$  TCR-Repertoires verfügte, konnten wir keine gegenüber gesunden Personen gesteigerte Expressionsrate des *DJ3*-Segmentes nachweisen.

## 6.4 Das Immunglobulin-Schwerketten Repertoire gesunder Personen

### 6.4.1 Die intestinalen Rezeptor Repertoires gesunder Erwachsener weisen umfangreiche Expansionen einzelner V<sub>H</sub>-Transkripte auf

Intestinale Plasmazellen und intraepitheliale T-Lymphozyten stellen vermutlich synergistisch interagierende Komponenten einer „ersten Verteidigungslinie“ dar, welche darauf ausgerichtet ist, die riesige resorptive Oberfläche des Darmlumens vor invasiven, pathogenen Mikroorganismen zu schützen (17). Sowohl die Funktionen der *Lamina propria* Plasmazellen als auch diejenigen der IEL sind untrennbar mit ihrer Lokalisation innerhalb der Mukosa verknüpft (263), weshalb beide Zellpopulationen denselben umgebungsabhängigen Einflüssen unterliegen dürften. Da sich  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten wahrscheinlich auf die Erkennung spezieller Eigenantigene spezialisiert haben (43; 264) und sekretorische Immunglobuline vorwiegend mit luminalen Antigenen interagieren (265) wird die terminale Reifung beider Lymphozytenpopulationen vermutlich durch divergente Strukturen geprägt. Dennoch ist vorstellbar, daß sich die humoralen und zellulären Komponenten der mukosalen Immunabwehr vergleichbarer mechanistischer Abwehrstrategien bedienen, zumal die Antigenerkennung durch  $\gamma/\delta$  T-Lymphozyten derjenigen von Immunglobulinen vergleichbar ist (59).

Unsere Repertoireanalysen humaner Ig<sub>H</sub>-Transkripte bauten auf vorangegangenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen auf, welche chromosomale DNA aus Mikrobiopsien der *Lamina propria* oder den *Peyer'schen Plaques* analysierten (178; 266). Im Rahmen dieser Experimente ließen sich vereinzelt klonal verwandte IgV<sub>H</sub>4.21-(V4-34), V<sub>H</sub>5- und V<sub>H</sub>6- B-Zellen im Intestinum eines Individuums sowie den Keimzentren der *Lamina propria* identifizieren (178; 179; 266; 267). Da PCR-gestützte Untersuchungen chromosomaler Allelenkonfigurationen generell die Verwendung von Oligonukleotiden ausschließen, welche mit konstanten Gensegmenten hybridisieren, konnte zunächst keine Korrelation zwischen den analysierten V<sub>H</sub>/D<sub>H</sub>/J<sub>H</sub>-Arrangements und den hiermit assoziierten konstanten Domänen hergestellt werden. Andererseits war dieser experimentelle Ansatz weitgehend insensitiv gegenüber Einflüssen aktivierter B-Lymphozyten, welche bestimmte Rezeptorarrangements mit hoher Rate transkribieren und hierdurch fälschlicherweise die Existenz oligoklonaler Rezeptor Repertoires vortäuschen können. Aufgrund ihres vereinzelt Auftretens

blieb zunächst unklar, ob es sich bei den verwandten  $V_H$ -Transkripten um Abkömmlinge lokaler, aktivierter Lymphozyten oder aber um Mitglieder eines weiträumig expandierten B-Zellklons handelte. Diese Problematik wird insbesondere anhand der von *DUNN-WALTERS et al.* durchgeführten Studien deutlich (266), bei denen initial Polymerase-Kettenreaktionen unter Verwendung eines  $V_H5$ -spezifischen „Primers“ sowie eines  $J_H$ -Region-spezifischen Oligonukleotids durchgeführt wurden. Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte führte zur Identifizierung klonaler Expansionen zweier definierter  $V_H$ -Transkripte innerhalb eines Darmabschnittes. Um das Ausmaß dieser Expansionen detaillierter zu analysieren, wurden Polymerase-Kettenreaktionen durchgeführt, in denen neben dem  $V_H5$ -spezifischen „Primer“ Oligonukleotide zum Einsatz kamen, welche gegen die CDR3-Domänen der beiden expandierten  $Ig_H$ -Transkripte gerichtet waren. Die Untersuchung von 8 Biopsien aus dem *Duodenum* sowie dem *Kolon* des betreffenden Patienten führten jedoch nur bei 2 Biopsien zum Nachweis des ersten expandierten Transkriptes. Entsprechende Analysen von 11 weiteren Biopsien bezüglich der Existenz des zweiten expandierten Transkriptes erbrachten lediglich bei 4 Biopsien positive Resultate. Generell ließen die Analysen chromosomaler Rearrangements innerhalb der  $V_H4$ -,  $V_H5$ - und  $V_H6$ -Familien nur ein geringes Ausmaß sowie heterogene Verteilungen expandierter Klone entlang des *Kolons* bzw. des *Duodenums* erkennen (266). Möglicherweise beruhte dieser Befund jedoch auf Mutationen innerhalb der CDR3-Domäne, welche dazu führten, daß die zu Analyse Zwecken eingesetzten Oligonukleotide nicht mehr mit der Zielsequenz hybridisierten.

Demgegenüber belegen unsere Studien, die wir anhand der Transkripte sämtlicher  $V_H$ -Untergruppen durchführten, daß räumlich expandierte B-Lymphozytenklone offensichtlich wesentlich weiter verbreitet sind, als bislang angenommen wurde. Allerdings muß in Betracht gezogen werden, daß die beobachteten Differenzen lediglich eine Folge der unterschiedlichen experimentellen Strategien darstellen könnten. Da die antigenbindende Rezeptordomäne zahlreichen somatischen Mutationen unterliegt besteht prinzipiell die Möglichkeit, daß die Verwendung eines Oligonukleotids, welches gegen eine definierte CDR3-Domäne gerichtet ist, nicht zur Identifizierung sämtlicher verwandter  $V_H$ -Sequenzen führt. Diese Annahme läßt sich aus den Resultaten unserer Untersuchungen ableiten, welche innerhalb der CDR3-Regionen klonal verwandter  $V_H$ -Transkripte bis zu 8 Basensubstitutionen erkennen ließen. Eine weite-

re Studie, in deren Rahmen singuläre, IgA oder IgM sekretierende Plasmazellen aus Mikroresektaten des Dünndarmes isoliert und analysiert wurden, erbrachte sogar keinerlei Hinweise auf klonal expandierte B-Lymphozyten (176). Auch in diesem Fall beruhten die Abweichungen gegenüber den Ergebnissen unserer Untersuchungen eventuell auf den unterschiedlichen experimentellen Strategien. Im Gegensatz zu der von uns favorisierten CDR3-Längenanalyse, welche prinzipiell ein umfassendes Bild des vorliegenden  $V_H$ -Repertoires liefert, erlaubt die Analyse einer begrenzten Zellzahl nämlich keine Aussagen bezüglich der Verteilung spezieller Klone innerhalb der Gesamtpopulation.

#### **6.4.2 Dominante $V_H$ -Familien verfügen über klonale Expansionen einzelner Schwerekettentranskripte**

Die CDR3-Längenanalysen intestinaler IgA- und IgM-Schwerekettentranskripte ließen erkennen, daß das Ausmaß der Rezeptordiversität beträchtlich zwischen einzelnen  $V_H$ -Familien variiert. So wiesen die CDR3-Profile der großen, 22 Mitglieder umfassenden  $V_H3$ -Familie, welche vorwiegend von intestinalen B-Lymphozyten exprimiert wird (176; 238) generell eine größere Diversität auf als die der bedeutend kleineren  $V_H5$ -,  $V_H6$ - und  $V_H7$ -Familien. Indessen konnten wir durch Subklonierung einzelner IgA  $V_H1$ -,  $V_H3$ - und  $V_H4$ -Transkripte definierter CDR3-Länge zeigen, daß multiple DNA-Sequenzen, die in räumlich weit voneinander entfernt isolierten Mukosabiopsien gefunden wurden entweder Repetitionen darstellten oder klonal verwandt waren. Folglich beschränkt sich die Existenz klonal expandierter B-Lymphozyten nicht auf solche B-Zellpopulationen, welche kleineren, anteilmäßig unterrepräsentierten  $V_H$ -Familien angehören.

Um auszuschließen, daß es sich bei den beobachteten Redundanzen um Klonierungs- oder PCR-generierte Artefakte handelte, wurden sämtliche Untersuchungen in Doppelbestimmung durchgeführt. Außerdem ist in diesem Zusammenhang die Tatsache von Bedeutung, daß niemals Sequenzüberlappungen zwischen verschiedenen Individuen identifiziert werden konnten. Die Diskrepanzen zwischen den Resultaten der CDR3-Längenanalysen und den nach Subklonierung diskreter Banden erhaltenen DNA-Sequenzdaten beruhten vermutlich auf einer methodischen Limitierung bzw. dem begrenzten Auflösungsvermögen des „CDR3-Spectratyping“. Da prinzipiell

alle 22 existierenden  $V_{H3}$ -Allele in einer einzigen Polymerase-Kettenreaktion als Matrize dienen konnten bestand die Möglichkeit, daß sämtliche klonalen Expansionen innerhalb der  $V_{H3}$ -Familie simultan vervielfältigt wurden und die CDR3-Längenanalyse infolge der Überlagerung multipler Transkripte notwendigerweise pseudopolyklonale Verteilungsmuster erbringen mußte. Im geschilderten Fall waren klonale Expansionen definierter Rezeptortranskripte ausschließlich mittels der Sequenzanalyse identifizierbar.

Unsere Befunde, wonach auch innerhalb dominierender  $V_H$ -Familien umfangreiche Einschränkungen des Rezeptor Repertoires auf DNA-Ebene existieren, ließen sich zudem durch weitergehende Untersuchungen auf Peptidebene bestätigen. EDV-gestützte Translationen der DNA-Sequenzen klonal verwandter  $V_H$ -Transkripte zeigten, daß annähernd drei Viertel (72%) aller Nukleotidsubstitutionen entweder stille Mutationen darstellten oder zum Ersatz durch Aminosäuren führten, welche vergleichbare physikochemische Eigenschaften besaßen. Auch andere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, daß innerhalb der  $V_H$ -Rearrangements, die aus der Mukosa des humanen *Duodenums* isoliert wurden eine Dominanz stiller Basensubstitutionen existiert (268). Dies indiziert, daß das  $Ig_H$ -Repertoire intestinaler B-Lymphozyten offensichtlich einem starken antigenvermittelten Selektionsdruck unterliegt, welcher das CDR3-Profil sämtlicher  $V_H$ -Familien unabhängig vom jeweils exprimierten Isotyp maßgeblich beeinflusst.

#### **6.4.3 Stellen $V_{H5}$ - $V_{H7}$ Transkripte Residuen des fetalen $Ig_H$ -Repertoires dar ?**

Da die  $V_{H5}$ -,  $V_{H6}$ - und  $V_{H7}$ -Gensegmente entwicklungsgeschichtlich konserviert sind und bevorzugt von humanen Feten exprimiert werden besitzen sie möglicherweise entscheidende, auf das präimmune Repertoire begrenzte Funktionen (215 - 217). Aufgrund der von uns ermittelten oligoklonalen Verteilungsmuster intestinaler  $V_{H5}$ -,  $V_{H6}$ - und  $V_{H7}$ -Repertoires  $IgA$  und  $IgM$  exprimierender B-Lymphozyten besteht ein Hinweis darauf, daß solche Fetus ähnlichen Rearrangements (fehlende „N“-Regionen) bis ins Erwachsenenalter hinein bestehen bleiben. In Übereinstimmung mit dieser Annahme konnten bei adulten Mäusen oligoklonale B-1 Lymphozyten identifiziert werden, deren Ursprungsort innerhalb des *Peritonealraumes* liegt.

B-1 Lymphozyten bilden bei Mäusen einen bedeutenden Prozentsatz aller *Lamina propria* B-Zellen; diese produzieren niederspezifische, möglicherweise polyreaktive Antikörper, welche sowohl zum Erhalt der normalen intestinalen Flora (269) als auch einer „ersten Verteidigungslinie“ gegen gewöhnliche bakterielle Antigene beitragen könnten (201; 270). Die Rezeptoren der B-1 Linie verfügen über sehr eingeschränkte, Fetus ähnliche Repertoires, die umfangreiche Redundanzen aufweisen und sich zudem durch die Abwesenheit matrizenunabhängiger „N“-Nukleotide auszeichnen (200). Es wurde postuliert, daß Mäuse möglicherweise über ein dualistisch aufgebautes Immunsystem verfügen, welches sowohl oligoklonale B-1 Zellen als auch divers strukturierte „B-2“ Lymphozyten beinhaltet (200). Demzufolge aktivieren invasive, pathogene Mikroorganismen, welche die Darmmukosa über M-Zellen der *Peyer'schen Plaques* infizieren (271) „konventionelle“ B-2 Lymphozyten, die hierauf zu Plasmazellen heranreifen und große Mengen hochaffiner Immunglobuline sezernieren.

Im humanen Intestinum exprimieren ungefähr 50% aller *Lamina propria* B-Lymphozyten den Oberflächenrezeptor CD5, weshalb sie formal der B-1 Population von Mäusen homolog sein könnten (272). Allerdings lassen unsere DNA-Sequenzanalysen dominanter IgA- und IgM-Transkripte der  $V_H5$ -,  $V_H6$ - und  $V_H7$ -Familie keinerlei Ähnlichkeiten mit fetalen Rezeptorarrangements oder den B-1 Zellen von Mäusen (200; 269) erkennen. Da die Gensegment-Übergangsregionen sämtlicher untersuchter Patienten infolge zahlreicher „N“-Nukleotidadditionen sowie somatischer Mutationen überaus komplex strukturiert waren, konnte die Existenz einer der B-1 Population homologen Zelllinie bzw. einer entsprechenden funktionellen Zweiteilung des sekretorischen IgAs auf molekularer Ebene nicht bestätigt werden. Indessen bietet das Vorkommen der IgA<sub>1</sub>- sowie der IgA<sub>2</sub>-Subklasse, die strukturelle und funktionelle Besonderheiten aufweisen durchaus Anlaß zu entsprechenden Spekulationen. So bestehen kontroverse Ansichten darüber, inwieweit die proteaseunempfindlichen IgA<sub>2</sub>-Antikörper, welche vorwiegend innerhalb des dichtbesiedelten distalen Intestinaltraktes produziert werden und Spezifitäten für ubiquitäre bakterielle Antigene wie Lipo- und Polysaccharide aufweisen, den Produkten der murinen B-1 Zellpopulation analog sind (198; 273; 274). Auch der Speichel sowie das *Kolostrum* gesunder Menschen enthält polyreaktive IgA-Antikörper, die eine Vielzahl autologer und bakterieller Antigene erkennen (275). Obwohl diese vergleichsweise niedrige Affinitäten

aufweisen dürften, besitzen sie aufgrund ihrer Multivalenz dennoch hohe funktionelle Avidität. Schließlich bleibt anzumerken, daß auch von anderen Arbeitsgruppen klonal expandierte IgA-Transkripte der V<sub>H</sub>6-Subfamilie aus der humanen Milz isoliert werden konnten (276).

#### 6.4.4 Untersuchung der Frequenz von Isotypwechselln bei intestinalen B-Zellen

Unseren Untersuchungen zufolge sind die IgM- und IgA-Schwerkettenrepertoires des *Kolons* in vergleichbarem Maße eingeschränkt und weisen ähnlich hohe Anteile somatisch substituierter Nukleotide auf. Dieser Befund entspricht neueren Erkenntnissen, wonach auch IgM sezernierende Plasmazellen - analog zu IgA oder IgG exprimierenden B-Lymphozyten - direkt zu Gedächtniszellen ausdifferenzieren und mit zunehmendem Alter sukzessive somatische Mutationen anreichern können (277). Innerhalb räumlich getrennter *Kolon*abschnitte gelang uns die Identifizierung zweier korrespondierender, klonal verwandter IgA- und IgM-Transkripte der V<sub>H</sub>4- bzw. der V<sub>H</sub>6-Familie, welche jeweils über identische CDR3-Domänen verfügten. Auch andere Arbeitsgruppen konnten innerhalb des *Duodenums* die Existenz von V<sub>H</sub>5-Transkripten nachweisen, die übereinstimmende Basensubstitutionen aufwiesen (268). Von daher kann als gesichert gelten, daß die intestinale Mukosa IgM und IgA exprimierende Plasmazellen beherbergt, welche dieselbe Antigenpezifität besitzen. Aufgrund vieler übereinstimmender Basensubstitutionen liegt die Vermutung nahe, daß die entsprechenden IgA-Plasmazellen durch den Klassenwechsel eines IgM exprimierenden B-Zellklons entstanden, der bereits das Stadium einer Gedächtniszelle erreicht und infolge der antigenabhängigen Affinitätsreifung zahlreiche somatische Mutationen akkumuliert hatte.

Indessen zeigte die Mehrzahl aller IgA V<sub>H</sub>-Repertoires signifikante Unterschiede gegenüber den IgM V<sub>H</sub>-Repertoires; dieser Befund wurde zudem durch unsere Feinstrukturanalysen bestätigt, die stark voneinander abweichende Rearrangements innerhalb der antigenbindenden Domänen erkennen ließen. Von daher kann angenommen werden, daß sich die meisten klonal expandierten intestinalen IgM- und IgA-Plasmazellen aus divergenten Zelllinien differenzieren. Möglicherweise sind die beobachteten Differenzen darauf zurückzuführen, daß die Schwerketten Repertoires

der IgM- und IgA-Gedächtniszellen von unterschiedlichen Antigenstrukturen geprägt werden. Unsere Studien lassen *nicht* erkennen, innerhalb welcher funktioneller Einheiten der Prozeß des Isotypwechsels sowie die antigenspezifische Affinitätsreifung der B-Zell Rezeptoren stattfindet. Somit bleibt fraglich, inwieweit IgA- und IgM-B-Lymphozyten unterschiedliche Antigentypen erkennen und ob der Prozeß des Klassenwechsels lokal, d.h. innerhalb des Intestinaltraktes erfolgen kann. Da die Keimzentren der *Peyer'schen Plaques* zwischen 75% und 80% IgA exprimierende B-Zellen enthalten besteht ein Anhaltspunkt dafür, daß diese Mikroumgebung eine direkte Induktion und Selektion von Isotypwechseln ermöglicht (278). Weiterhin favorisiert die homogene Verteilung klonal verwandter B-Lymphozyten ein Modell, wonach expandierte Gedächtnis B-Zellen - ähnlich wie  $\gamma\delta$  T-Lymphozyten - im Rahmen einer kontinuierlichen Rezirkulation wiederholt die Keimzentren sekundärer lymphoider Strukturen durchlaufen und nach entsprechender Affinitätsreifung entlang der intestinalen *Lamina propria* ansässig werden.

#### **6.4.5 Das Schwerketten Repertoire peripherer, IgA exprimierender B-Lymphozyten**

Im menschlichen Organismus bildet das plasmatische IgA mit 6 - 15% einen signifikanten Bestandteil des Serumglobulins, welches eine - gegenüber IgG - vergleichsweise kurze biologische Halbwertszeit von 4 bis 6 Tagen besitzt (187). Als Quelle des monomeren Serum-IgAs werden *Plasmozyten* angenommen, welche im Knochenmark lokalisiert sind (188). Innerhalb des peripheren Blutes machen IgA exprimierende B-Lymphozyten nur ~ 2% aller B-Zellen aus (239), deren physiologische Funktion weitgehend unbekannt ist.

Gegenwärtig sind kaum experimentelle Daten von Untersuchungen verfügbar, welche sich mit der Diversität des peripheren humanen IgA B-Zell Rezeptor Repertoires befassen. Bisher durchgeführte Studien weisen jedoch darauf hin, daß das Schwerketten Repertoire peripherer IgA B-Lymphozyten eine limitierte Diversität aufweist. In Übereinstimmung hiermit belegen die Resultate unserer Untersuchungen, daß das Rezeptor Repertoire peripherer IgA B-Lymphozyten im Gegensatz zum polyklonalen CDR3-Profil IgM exprimierender B-Zellen durch klonale Expansionen einzelner  $V_H$ -Transkripte gekennzeichnet ist. Darüber hinaus zeigte sich, daß das  $V_H$ -Repertoire

zirkulierender IgA B-Lymphozyten im Vergleich zum intestinalen IgA-Repertoire noch wesentlich stärkeren Einschränkungen unterliegt. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß wir mit Hilfe aussagekräftiger Kontrollexperimente nachweisen konnten, daß die erhaltenen Resultate keine PCR-generierten Artefakte darstellten, welche aus einer zu niedrigen Anzahl eingesetzter B-Lymphozyten resultierten. Möglicherweise erkennen periphere IgA B-Lymphozyten nur eine sehr begrenzte Zahl von Antigenen, welche sich qualitativ von denen unterscheiden, die mit intestinalen B-Zellen interagieren. Da wir anstelle des IgA-Serumproteins die  $V_H$ -Transkripte peripherer B-Lymphozyten analysierten bleibt fraglich, inwieweit unsere Daten mit dem tatsächlich auf Proteinebene bestehenden Rezeptor Repertoire übereinstimmen. Der *in vitro* Nachweis von mRNA bzw. der äquivalenten cDNA mittels PCR stellt nämlich keinen absoluten Beweis dafür dar, daß das entsprechende Protein *in vivo* tatsächlich exprimiert wird.

Insgesamt fanden sich nur sehr wenige Überlappungen zwischen dem peripheren und dem intestinalen IgA  $V_H$ -Repertoire, was unter anderem dadurch zum Ausdruck kam, daß die  $J_H6$ -Region häufiger von zirkulierenden als von mukosalen B-Lymphozyten exprimiert wurde. Die Annahme zweier divergenter Lymphozytenpopulationen wird auch dadurch gestützt, daß 90% des plasmatischen IgAs aus IgA<sub>1</sub> bestehen, während die IgA<sub>2</sub>-Modifikation mit einem Anteil von 60% innerhalb des Intestinaltraktes dominiert (2; 189). Da Vergleiche zwischen einzelnen intestinalen und peripheren IgA B-Lymphozyten prinzipiell als problematisch anzusehen sind, lassen sich die Differenzen zwischen den entsprechenden  $V_H$ -Repertoires am schlüssigsten durch die individuellen Zusammensetzungen beider Zellpopulationen erklären. Innerhalb des peripheren Blutes existieren vorwiegend IgA exprimierende Gedächtnis B-Lymphozyten sowie kleinere Populationen stimulierter Immunozyten, welche teilweise einen Isotypwechsel vollzogen haben und sich auf der Passage in bestimmte Organsysteme befinden. Demgegenüber dominieren im humanen *Kolon* terminal differenzierte, Immunglobulin sezernierende Plasmazellen. Die signifikanten Unterschiede zwischen intestinalen und peripheren IgA  $V_H$ -Repertoires deuten zudem darauf hin, daß sich zirkulierende IgA B-Lymphozyten nur ausnahmsweise im Intestinaltrakt ansiedeln. Vermutlich befinden sich im Blut eines jeden Individuums ständig einige IgA<sub>2</sub> B-Lymphozyten intestinalen Ursprunges, welche jedoch aufgrund ihrer niedrigen Frequenz bzw. Überlagerungen nicht mittels der CDR3-Längenanalyse detektiert

werden können. Zudem hybridisierte der von uns in Polymerase-Kettenreaktionen eingesetzte C $\alpha$ -„Konsensusprimer“ sowohl innerhalb der C $\alpha$ 1- als auch der C $\alpha$ 2-Region (221), weshalb unter den resultierenden PCR-Produkten keine Unterscheidung zwischen IgA<sub>1</sub>- und IgA<sub>2</sub>-Transkripten getroffen werden konnte.

#### 6.4.6 Das Schwerketten Repertoire peripherer, IgM exprimierender B-Lymphozyten

Im Vergleich zum peripheren IgA Rezeptor Repertoire erwies sich das V<sub>H</sub>-Repertoire plasmatischer, IgM exprimierender B-Lymphozyten als wesentlich vielfältiger. Unsere Beobachtungen stimmen mit denen anderer Arbeitsgruppen überein, welche polyklonale IgM-Schwerketten Repertoires sowohl im Blut gesunder junger als auch alter Personen beschrieben (241). Diese Befunde stehen mit der Annahme in Einklang, wonach es sich bei der überwiegenden Mehrheit aller zirkulierenden IgM<sup>+</sup> B-Zellen um *unreife* Lymphozyten handelt. Dennoch fanden wir einige klonale Expansionen in verschiedenen V<sub>H</sub>-Familien, welche eventuell auf aktuellen oder kurz zuvor erfolgten Aktivierungen des Immunsystems beruhten. Außerdem besteht die Möglichkeit, daß einige der beobachteten starken Repertoireeinschränkungen Symptome einer bestehenden *monoklonalen Gammopathie* darstellten. Hierbei handelt es sich um ein Phänomen, das bereits vor über 35 Jahren anhand gesunder Personen beschrieben wurde (202). Prinzipiell kommen hierfür jedoch auch klonal expandierte, langlebige Gedächtnis B-Zellen, die durch Fremd- oder Eigenantigene selektiert wurden als Erklärung in Betracht.

In Übereinstimmung mit der Annahme positiver Selektionsprozesse von B-Lymphozyten ähneln die von uns nachgewiesenen Expansionen des humanen Schwerketten Repertoires innerhalb einzelner V<sub>H</sub>-Familien dem Ausmaß an Klonalität, welches zuvor für  $\alpha/\beta^+$  und  $\gamma/\delta^+$  T-Lymphozyten gezeigt wurde (46 - 50). Unsere experimentellen Daten unterstützen ein hypothetisches Modell, wonach die humorale Immunantwort der Darmmukosa durch zahlreiche klonal expandierte, IgA und IgM sezernierende *Lamina propria* B-Zellen vermittelt wird, welche weiträumig innerhalb des *Kolons* verbreitet sind. Die Existenz hochgradig verwandter, fingerabdruckähnlicher CDR3-Profile sowie identischer oder klonal verwandter Immunglobulinschwerketten innerhalb verschiedener mukosaler Loci läßt sich am schlüssigsten unter der

Annahme antigenabhängiger Selektionsprozesse erklären. Die signifikanten Einschränkungen von Rezeptor Repertoires beruhen vermutlich auf permanenten Wechselwirkungen zwischen den CDR3-Domänen und invarianten Liganden, welche bestimmte Rezeptorspezifitäten begünstigen. Wahrscheinlich passieren Gedächtnis B-Lymphozyten, welche im Verlauf der Zeit selektiert wurden kontinuierlich die Keimzentren lymphoider Follikel oder der ilealen *Peyer'schen Plaques*, wo sie durch relevante Antigene restimuliert werden. Als adäquate Antigene kommen primär die immunogenen Oberflächenstrukturen symbiontischer Mikroorganismen in Betracht, welche große Areale des humanen Intestinaltraktes besiedeln. So legten Studien an keimfrei aufgezogenen Mäusen, die einen Mangel an *Lamina propria* Immunozyten aufwiesen nahe, daß die natürliche mikrobielle Flora des Intestinums den Hauptstimulus für die Proliferation der Plasmazellen liefert (265).

## 6.5 Hypothese

### Die Bedeutung eingeschränkter B- und T-Zell Rezeptor Repertoires

Nach dem derzeit anerkannten Dogma beruht die Effizienz der Immunsysteme höherer Vertebraten primär auf deren Fähigkeit, mittels somatischer Rekombinationen zwischen multiplen genetischen Elementen Milliarden verschiedenster Rezeptorspezifitäten auszubilden. Tatsächlich gestattet die CDR3-Domäne der  $\delta$ -Rezeptoruntereinheit humaner  $\gamma/\delta$  TCR theoretisch die Ausbildung einer nahezu uneingeschränkten molekularen Diversität (279), was prinzipiell die Möglichkeit eröffnet, für jede erdenkliche immunogene Struktur einen hierzu komplementären, absolut spezifischen Rezeptor zu generieren. Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage nach dem *biologischen Sinn* der von uns bei  $\gamma/\delta^+$  IEL (46 - 48) und  $Ig_H$ -Transkripten sowie anderen Arbeitsgruppen (49; 50; 280; 281) anhand von  $\alpha/\beta^+$  IEL beobachteten Repertoireeinschränkungen.

Trotz aller Vorteile, die sich vordergründig aus der Fähigkeit zur Synthese einer unbegrenzten Rezeptorvielfalt ableiten lassen stieß die Strategie einer konsequenten, auf perfekte Antigenpezifität hin ausgerichteten Immunabwehr aus mehreren Gründen bald an limitierende Grenzen: Wie entsprechende Berechnungen zeigen, wären ideal polyklonal aufgebaute Rezeptor Repertoires allein aufgrund der begrenzten Zahl immunkompetenter Zellen vermutlich gar nicht funktionell (282; 283). Da bereits

die Anzahl der Rekombinationsmöglichkeiten zwischen  $\delta$  TCR kodierenden Gensegmenten diejenige der gesamten T-Zellpopulation eines Individuums um mehrere Größenordnungen übersteigt, läßt sich das gewaltige systemimmanente Potential auf zellulärer Ebene nicht annähernd realisieren. Abgesehen von dem erheblichen instruktiven Aufwand, den hochgradig diverse, polyklonale Rezeptor Repertoires erfordern besteht das prinzipielle Problem für größenlimitierte Systeme primär darin, daß die absolute Zahl von Lymphozyten einer gegebenen Spezifität der jeweiligen Reperoiregröße reziprok ist. Da biologische Systeme notwendigerweise begrenzte Zellzahlen aufweisen bedeutet dies, daß ideal polyklonale Rezeptor Repertoires alsbald Größenordnungen erreichen würden, für welche die statistische Wahrscheinlichkeit, einen Lymphozyten definierter Spezifität innerhalb der Gesamtpopulation anzutreffen,  $< 1$  läge. Doch selbst Immunsysteme, welche über jeweils *einen* Lymphozyten der benötigten Antigenpezifität verfügen laufen Gefahr, daß dessen Aktivierung und klonale Expansion im Bedarfsfall nicht rasch genug erfolgt, um den Organismus wirksam vor Infektionen mit schnell replizierenden prokaryontischen Pathogenen schützen zu können, da zumindest die Effizienz der humoralen Immunabwehr entscheidend vom Serumspiegel des antigenbindenden Moleküls abhängt. Die angesprochene Problematik wird in der Praxis dadurch abgemildert, daß die Effektormoleküle immunkompetenter Zellen ihr äquivalentes Antigen nicht *in toto* erkennen, sondern mit räumlich begrenzten Arealen seiner Oberflächenstrukturen interagieren. Im Fall der Immunglobuline umfassen die *antigenen Determinanten* lediglich 10 - 12 Aminosäurereste, was eine erhebliche Reduzierung der benötigten Rezeptordiversität bzw. der hieraus resultierenden Reperoiregrößen erlaubt. Die Beschränkung auf eine Erkennung kleiner, definierter topologischer Einheiten bedingt zudem ein gewisses Maß an Kreuzreaktivität, welche die Effizienz der Immunglobulin vermittelten Agglutination von Antigenen beträchtlich steigert. Allerdings läßt sich die Größe solcher Epitope nicht beliebig verkleinern, da unterhalb bestimmter Dimensionen keine Unterscheidung mehr zwischen endo- und exogenen Strukturen getroffen werden kann, was jedoch eines der vorrangigsten Kriterien der Antigenerkennung darstellt (285). Neben den offenkundigen Vorteilen, die sich aus kontinuierlichen Rekombinationsereignissen zwischen Rezeptor-Untereinheiten kodierenden Gensegmenten ergeben, erfordert dieses Prinzip die Existenz wirksamer Kontrollmechanismen, um die quantitative Produktion autoreaktiver Immunzellen auf dem Wege einer stringenten negativen Selektion zu inhibieren. Andernfalls würden die statistisch erfolgenden

Genarrangements bereits nach kurzer Zeit zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen. Die Eliminierung sämtlicher Lymphozyten, welche gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind bedingt notwendigerweise eine Limitierung der Rezeptorvielfalt und liefert eine weitere Erklärung dafür, warum die Existenz uneingeschränkter Rezeptor Repertoires *in vivo* prinzipiell ausgeschlossen ist.

Offenbar beruht die Effizienz des Immunsystems gar nicht auf der absoluten Anzahl verfügbarer Lymphozyten und der hiermit verbundenen Kapazität zur Ausbildung einer entsprechenden Zahl von Rezeptorspezifitäten. Andernfalls sollten die Immunsysteme kleiner Individuen wie z.B. Mäusen denjenigen bedeutend größerer Spezies (Mensch, Elefant) qualitativ unterlegen sein. Indessen lehrt die Erfahrung, daß dies keineswegs der Fall ist ! Von der genannten Voraussetzung ausgehend postulierte der Immunologe *MELVIN COHN*, daß die Rezeptor Repertoires immunkompetenter Zellen notwendigerweise Repetitionen, d.h. Einschränkungen aufweisen und daß jedes Individuum über diskrete funktionelle Einheiten (sog. „Protectons“) verfügen müsse, von denen jede einzelne umfassenden immunologischen Schutz gewährleistet (284). Demzufolge ermöglicht die organisatorische Zweiteilung des Immunsystems eine bedeutende Reduzierung der Repertoiregröße unter Aufrechterhaltung einer umfassenden immunologischen Kompetenz. Die „Protecton“-Theorie basiert im wesentlichen auf der Annahme, daß innerhalb der hypothetischen funktionellen Einheiten Kooperationen zwischen kleinen „LCN“-Populationen (low copy number:  $\sim 10^5$  Spezifitäten in singulärer Kopie) hoher Spezifität sowie vergleichsweise großen „HCN“-Lymphozytenfamilien (high copy number:  $\sim 10^4$  Spezifitäten in  $10^2$ -facher Kopienzahl) bestehen, welche breitere Antigenspektren erkennen (282; 284; 285). Die Lymphozyten der HCN-Subpopulation müßten über eingeschränkte Rezeptor Repertoires verfügen und sich auf die Erkennung weniger, eventuell körpereigener Schlüsselantigene spezialisiert haben, welche Gefahrensituationen unabhängig von ihrer Ursache signalisieren. Im Gegensatz zu den Vertretern des polyklonalen LCN-„Pools“ sollten diese simultan aktivierbar sein und somit eine rasche und quantitativ hinreichende Primärantwort ermöglichen. Auch andere Autoren stellten die Hypothese auf, wonach die Gesamtheit des Rezeptor Repertoires von Immunzellen insofern zweigeteilt sein müsse, als daß diverse und restringierte Unterfamilien koexistieren (200; 286).

Da für mukosale IEL und intrainestinal lokalisierte B-Lymphozyten eine Beteiligung an primären Immunreaktionen angenommen wird, stellen deren antigenbindende Rezeptordomänen prädestinierte Untersuchungsobjekte dar, um die „Protecton“-Theorie mittels „CDR3-Spectratyping“ zu verifizieren. Aufgrund der Tatsache, daß sowohl  $\alpha/\beta^+$  (49; 50; 280; 281) als auch  $\gamma/\delta^+$  IEL (46; 47) ihr genetisches Potential *in vivo* nicht annähernd ausschöpfen und beträchtliche Limitierungen ihrer Rezeptordiversität aufweisen ist ein entscheidender Hinweis darauf gegeben, daß die postulierte Abwehrstrategie tatsächlich verfolgt wird. Im Falle IgA exprimierender B-Lymphozyten ist anzunehmen, daß große Anteile der Population aus klonal expandierten Plasmazellen bestehen, welche konservierte Antigene erkennen und eine Adsorption luminaler Pathogene verhindern, während der polyklonale B-Zell„pool“ vermutlich die Fähigkeit zur primären Immunantwort gegenüber unbekanntem immunogenen Strukturen aufrechterhält. Die Hypothese, wonach die Begrenzung von Repertoiregrößen ein allgemeines, weitverbreitetes Charakteristikum der Lymphozyten darstellt wird zudem durch jüngste Feinstrukturanalysen unserer Arbeitsgruppe gestützt, die bedeutende Einschränkungen des  $\delta$  TCR-Repertoires beim Hausschwein (*Sus scrofa*) innerhalb verschiedener mukosaler Oberflächen erkennen lassen. Somit stehen unsere experimentellen Daten humaner  $\delta$ -Kettentranskripte sowie der  $Ig_H$ -Repertoires intestinaler IgA- und IgM- B-Lymphozyten prinzipiell mit der „Protecton“-Theorie in Einklang. Dabei dürfte sowohl die Kompartimentierung als auch die beobachteten Einschränkungen des B- und T-Zell Rezeptor Repertoires die Spezialisierungen repräsentieren, die sich aus den individuellen, lokalen Anforderungen der jeweiligen Organe ergeben.

## 7. Literatur

1. **Zinkernagel, R.M. and P.C. Doherty.** 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 251:547.
2. **Brandtzaeg, P., T.S. Halstensen, K. Kett, P. Krajci, D. Kvale, T.O. Rognum, H. Scott, and L.M. Sollid.** 1989. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology* 97:1562.
3. **Brandtzaeg, P., D.E. Nilssen, T.O. Rognum, and P.S. Thrane.** 1991. Ontogeny of the mucosal immune system and IgA deficiency [published erratum appears in *Gastroenterol Clin North Am* 1992 Jun;21(2):following table of contents]. [Review] [283 refs]. *Gastroenterology Clinics of North America* 20:397.
4. **Brandtzaeg, P., I.N. Farstad, and L. Helgeland.** 1998. Phenotypes of T Cells in the Gut. In *Mucosal T Cells*. 1st. ed. T.T. MacDonald, ed. Karger, Basel, p. 1.
5. **Davis, I.C. and R.L. Owen.** 1997. The immunopathology of M cells. *Springer Semin. Immunopathol.* 18:421.
6. **Savidge, T.C.** 1996. The life and times of an intestinal M cell. *Trends.Microbiol.* 4:301.
7. **Male, D. and I.M. Roitt.** 1991. Zellen der Immunantwort. In *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. 2. Auflage ed. I.M. Roitt, J. Brostoff and D.K. Male, eds. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 11.
8. **Brandtzaeg, P., V. Bosnes, T.S. Halstensen, H. Scott, L.M. Sollid, and K.N. Valnes.** 1989. T lymphocytes in human gut epithelium preferentially express the alpha/beta antigen receptor and are often CD45/UCHL1-positive [published erratum appears in *Scand J Immunol* 1989 Nov;30(5):653]. *Scand.J.Immunol.* 30:123.
9. **Halstensen, T.S., H. Scott, and P. Brandtzaeg.** 1989. Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand.J.Immunol.* 30:665.
10. **Farstad, I.N., T.S. Halstensen, B. Lien, P.J. Kilshaw, A.I. Lazarovits, P. Brandtzaeg, and A.I.c.t.L.A.I. Lazarovitz.** 1996. Distribution of beta 7 integrins in human intestinal mucosa and organized gut-associated lymphoid tissue [published erratum appears in *Immunology* 1997 Jun;91(2):322]. *Immunology* 89:227.
11. **Janossy, G., N. Tidman, W.S. Selby, J.A. Thomas, S. Granger, P.C. Kung, and G. Goldstein.** 1980. Human T lymphocytes of inducer and suppressor type occupy different microenvironments. *Nature* 288:81.
12. **Spencer, J., P.G. Isaacson, T.C. Diss, and T.T. MacDonald.** 1989. Expression of disulfide-linked and non-disulfide-linked forms of the T cell receptor gamma/delta heterodimer in human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 19:1335.
13. **De Maria, R., S. Fais, M. Silvestri, L. Frati, F. Pallone, A. Santoni, and R. Testi.** 1993. Continuous in vivo activation and transient hyporesponsiveness to TcR/CD3 triggering of human gut lamina propria lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 23:3104.
14. **Kaufmann, S.H.E.** 1996. Gamma/Delta and other unconventional T Lymphocytes - What do they see and what do they do. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:2272.
15. **Klein, J.R.** 1996. Whence the intestinal intraepithelial lymphocyte? [comment]. *J.Exp.Med.* 184:1203.
16. **Mowat, A.M. and J.L. Viney.** 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol.Rev.* 156:145.

17. **Lamm, M.E.** 1998. Current concepts in mucosal immunity. IV. How epithelial transport of IgA antibodies relates to host defense. *Am.J.Physiol.* 274:G614.
18. **Davis, M.M. and P.J. Bjorkman.** 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition [published erratum appears in *Nature* 1988 Oct 20;335(6192):744]. *Nature* 334:395.
19. **Sartor, R.B.** 1996. Cytokines in Intestinal Inflammation: Pathophysiological and Clinical Considerations. *Gastroenterology* 106:533.
20. **Holtmeier, W.** 1996. Intraepitheliale Lymphozyten: Die erste Garde einer Immunabwehr? In *Ökosystem Darm VII.* M. Kist, W.F. Caspary and M.J. Lentze, eds. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, p. 187.
21. **Orlic, D. and R. Lev.** 1977. An electron microscopic study of intraepithelial lymphocytes in human fetal small intestine. *Lab.Invest.* 37:554.
22. **Spencer, J., S.B. Dillon, P.G. Isaacson, and T.T. MacDonald.** 1986. T cell subclasses in fetal human ileum. *Clin.Exp.Immunol.* 65:553.
23. **Cepek, K.L., S.K. Shaw, C.M. Parker, G.J. Russell, J.S. Morrow, D.L. Rimm, and M.B. Brenner.** 1994. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the alpha E beta 7 integrin. *Nature* 372 :190.
24. **Umesaki, Y., Y. Okada, S. Matsumoto, A. Imaoka, and H. Setoyama.** 1995. Segmented filamentous bacteria are indigenous intestinal bacteria that activate intraepithelial lymphocytes and induce MHC class II molecules and fucosyl asialo GM1 glycolipids on the small intestinal epithelial cells in the ex-germ-free mouse. *Microbiol.Immunol.* 39:555.
25. **Helgeland, L., J.T. Vaage, B. Rolstad, T. Midtvedt, and P. Brandtzaeg.** 1996. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 89:494.
26. **Bandeira, A., T. Mota-Santos, S. Itohara, S. Degermann, C. Heusser, S. Tonegawa, and A. Coutinho.** 1990. Localization of gamma/delta T cells to the intestinal epithelium is independent of normal microbial colonization. *J.Exp.Med.* 172:239.
27. **Imaoka, A., S. Matsumoto, H. Setoyama, Y. Okada, and Y. Umesaki.** 1996. Proliferative recruitment of intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization of germ-free mice. *Eur.J.Immunol.* 26:945.
28. **Helgeland, L., J.T. Vaage, B. Rolstad, T.S. Halstensen, T. Midtvedt, and P. Brandtzaeg.** 1997. Regional phenotypic specialization of intraepithelial lymphocytes in the rat intestine does not depend on microbial colonization. *Scand.J.Immunol.* 46:349.
29. **Moss, P.A. and J.I. Bell.** 1995. Sequence analysis of the human alpha beta T-cell receptor CDR3 region. *Immunogenetics* 42:10.
30. **Abuzakouk, M., D. Kelleher, C. Feighery, and C. O'Farrelly.** 1996. Increased HLA-DR and decreased CD3 on human intestinal intraepithelial lymphocytes: evidence of activation? *Gut* 39:396.
31. **Halstensen, T.S., H. Scott, and P. Brandtzaeg.** 1990. Human CD8+ intraepithelial T lymphocytes are mainly CD45RA-RB+ and show increased co-expression of CD45RO in celiac disease. *Eur.J.Immunol.* 20:1825.
32. **Halstensen, T.S., I.N. Farstad, H. Scott, O. Fausa, and P. Brandtzaeg.** 1990. Intraepithelial TcR alpha/beta+ lymphocytes express CD45RO more often than the TcR gamma/delta+ counterparts in coeliac disease. *Immunology* 71:460.

33. **Deusch, K., F. Luling, K. Reich, M. Classen, H. Wagner, and K. Pfeffer.** 1991. A major fraction of human intraepithelial lymphocytes simultaneously expresses the gamma/delta T cell receptor, the CD8 accessory molecule and preferentially uses the V delta 1 gene segment. *Eur.J.Immunol.* 21:1053.
34. **Viney, J., T.T. MacDonald, and J. Spencer.** 1990. Gamma/delta T cells in the gut epithelium. *Gut* 31:841.
35. **Ullrich, R., H.L. Schieferdecker, K. Ziegler, E.O. Riecken, and M. Zeitz.** 1990. gamma delta T cells in the human intestine express surface markers of activation and are preferentially located in the epithelium. *Cell Immunol.* 128:619.
36. **Jarry, A., N. Cerf-Bensussan, N. Brousse, F. Selz, and D. Guy-Grand.** 1990. Subsets of CD3+ (T cell receptor alpha/beta or gamma/delta) and CD3- lymphocytes isolated from normal human gut epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur.J.Immunol.* 20:1097.
37. **Van Houten, N., P.F. Mixer, J. Wolfe, and R.C. Budd.** 1993. CD2 expression on murine intestinal intraepithelial lymphocytes is bimodal and defines proliferative capacity. *Int.Immunol.* 5:665.
38. **Haas, W., P. Pereira, and S. Tonegawa.** 1993. Gamma/delta cells. *Annu.Rev.Immunol.* 11:637.
39. **Lefrancois, L. and L. Puddington.** 1995. Extrathymic intestinal T-cell development: virtual reality? *Immunol.Today* 16:16.
40. **Rocha, B., D. Guy-Grand, and P. Vassalli.** 1995. Extrathymic T cell differentiation. *Curr.Opin.Immunol.* 7:235.
41. **Cerf-Bensussan, N. and D. Guy-Grand.** 1991. Intestinal intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 20:549.
42. **Halstensen, T.S. and P. Brandtzaeg.** 1993. Activated T lymphocytes in the celiac lesion: non-proliferative activation (CD25) of CD4+ alpha/beta cells in the lamina propria but proliferation (Ki-67) of alpha/beta and gamma/delta cells in the epithelium. *Eur.J.Immunol.* 23:505.
43. **Groh, V., A. Steinle, S. Bauer, and T. Spies.** 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279:1737.
44. **Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies.** 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:12445.
45. **Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K.H. Grabstein, and T. Spies.** 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor- derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96:6879.
46. **Chowers, Y., W. Holtmeier, J. Harwood, E. Morzycka-Wroblewska, and M.F. Kagnoff.** 1994. The V delta 1 T cell receptor repertoire in human small intestine and colon. *J.Exp.Med.* 180:183.
47. **Holtmeier, W., Y. Chowers, A. Lumeng, E. Morzycka-Wroblewska, and M.F. Kagnoff.** 1995. The delta T cell receptor repertoire in human colon and peripheral blood is oligoclonal irrespective of V region usage. *J.Clin.Invest.* 96:1108.
48. **Holtmeier, W., T. Witthöft, A. Hennemann, H.S. Winter, and M.F. Kagnoff.** 1997. The TCR-delta Repertoire in Human Intestine Undergoes Characteristic Changes During Fetal to Adult Development. *J.Immunol.* 158:5632.

49. **Gross, G.G., V.L. Schwartz, C. Stevens, E.C. Ebert, R.S. Blumberg, and S.P. Balk.** 1994. Distribution of dominant T cell receptor beta chains in human intestinal mucosa. *J.Exp.Med.* 180:1337.
50. **Blumberg, R.S., C.E. Yockey, G.G. Gross, E.C. Ebert, and S.P. Balk.** 1993. Human intestinal intraepithelial lymphocytes are derived from a limited number of T cell clones that utilize multiple V beta T cell receptor genes. *J.Immunol.* 150:5144.
51. **Sanchez, M.J., J.C. Gutierrez-Ramos, E. Fernandez, E. Leonardo, J. Lozano, C. Martinez, and M.L. Toribio.** 1993. Putative prethymic T cell precursors within the early human embryonic liver: a molecular and functional analysis. *J.Exp.Med.* 177:19.
52. **Poggi, A., M. Sargiacomo, R. Biassoni, N. Pella, S. Sivori, V. Revello, P. Costa, M. Valtieri, G. Russo, and M.C. Mingari.** 1993. Extrathymic differentiation of T lymphocytes and natural killer cells from human embryonic liver precursors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:4465.
53. **Gale, R.P.** 1987. Development of the immune system in human fetal liver. *Thymus* 10:45.
54. **Poussier, P. and M. Julius.** 1994. Intestinal intraepithelial lymphocytes: the plot thickens. *J.Exp.Med.* 180:1185.
55. **Clevers, H., B. Alarcon, T. Wileman, and C. Terhorst.** 1988. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annu.Rev.Immunol.* 6:629.
56. **Rellahan, B.L., J.A. Bluestone, B.A. Houlden, M.M. Cotterman, and L.A. Matis.** 1991. Junctional sequences influence the specificity of gamma/delta T cell receptors. *J.Exp.Med.* 173:503.
57. **Lefranc, M.P. and T.H. Rabbitts.** 1989. The human T-cell receptor gamma (TRG) genes. *Trends.Biochem.Sci.* 14:214.
58. **Terhorst, C., S. Simpson, B. Wang, J. She, C. Hall, M. Huang, T. Wileman, K. Eichmann, G.A. Hollander, and C. Levelt.** 1995. Plasticity of the TCR-CD3 complex. In *T Cell Receptors*. ED 1995 ed. J.I. Bell, M.J. Owen and E. Simpson, eds. Oxford University Press, Oxford, p. 369.
59. **Rock, E.P., P.R. Sibbald, M.M. Davis, and Y.H. Chien.** 1994. CDR3 length in antigen-specific immune receptors. *J.Exp.Med.* 179:323.
60. **Chien, Y.H., R. Jores, and M.P. Crowley.** 1996. Recognition by gamma/delta T cells. *Annu.Rev.Immunol.* 14:511.
61. **Li, H., M.I. Lebedeva, A.S. Llera, B.A. Fields, M.B. Brenner, and R.A. Mariuzza.** 1998. Structure of the Vdelta domain of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 391:502.
62. **Lefranc, M.P., P. Chuchana, P. Dariavach, C. Nguyen, S. Huck, F. Brockly, B. Jordan, and G. Lefranc.** 1989. Molecular mapping of the human T cell receptor gamma (TRG) genes and linkage of the variable and constant regions. *Eur.J.Immunol.* 19:989.
63. **Rabbitts, T.H., M.P. Lefranc, M.A. Stinson, J.E. Sims, J. Schroder, M. Steinmetz, N.L. Spurr, E. Solomon, and P.N. Goodfellow.** 1985. The chromosomal location of T-cell receptor genes and a T cell rearranging gene: possible correlation with specific translocations in human T cell leukaemia. *EMBO J.* 4:1461.
64. **Murre, C., R.A. Waldmann, C.C. Morton, K.F. Bongiovanni, T.A. Waldmann, T.B. Shows, and J.G. Seidman.** 1985. Human gamma-chain genes are rearranged in leukaemic T cells and map to the short arm of chromosome 7. *Nature* 316:549.
65. **Bensmana, M., M.G. Mattei, and M.P. Lefranc.** 1991. Localization of the human T-cell receptor gamma locus (TCRG) to 7p14 - p15 by in situ hybridization. *Cytogenet.Cell Genet.* 56:31.

66. **Lefranc, M.P., A. Forster, and T.H. Rabbitts.** 1986. Genetic polymorphism and exon changes of the constant regions of the human T-cell rearranging gene gamma. *Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A.* 83:9596.
67. **Krangel, M.S., H. Band, S. Hata, J. McLean, and M.B. Brenner.** 1987. Structurally divergent human T cell receptor gamma proteins encoded by distinct C gamma genes. *Science* 237:64.
68. **Hochstenbach, F., C. Parker, J. McLean, V. Gieselmann, H. Band, I. Bank, L. Chess, H. Spits, J.L. Strominger, and J.G. Seidman.** 1988. Characterization of a third form of the human T cell receptor gamma/delta. *J.Exp.Med.* 168:761.
69. **Littman, D.R., M. Newton, D. Crommie, S.L. Ang, J.G. Seidman, S.N. Gettner, and A. Weiss.** 1987. Characterization of an expressed CD3-associated Ti gamma-chain reveals C gamma domain polymorphism. *Nature* 326:85.
70. **Pelicci, P.G., M. Subar, A. Weiss, R. Dalla-Favera, and D.R. Littman.** 1987. Molecular diversity of the human T-gamma constant region genes. *Science* 237:1051.
71. **Buresi, C., N. Ghanem, S. Huck, G. Lefranc, and M.P. Lefranc.** 1989. Exon duplication and triplication in the human T-cell receptor gamma constant region genes and RFLP in French, Lebanese, Tunisian, and black African populations [published erratum appears in *Immunogenetics* 1989;30(2):148]. *Immunogenetics* 29:161.
72. **Band, H., F. Hochstenbach, C.M. Parker, J. McLean, M.S. Krangel, and M.B. Brenner.** 1989. Expression of human T cell receptor-gamma delta structural forms. *J.Immunol.* 142:3627.
73. **Lefranc, M.P., A. Forster, R. Baer, M.A. Stinson, and T.H. Rabbitts.** 1986. Diversity and rearrangement of the human T cell rearranging gamma genes: nine germ-line variable genes belonging to two subgroups. *Cell* 45:237.
74. **Strauss, W.M., T. Quertermous, and J.G. Seidman.** 1987. Measuring the human T cell receptor gamma-chain locus. *Science* 237:1217.
75. **Forster, A., S. Huck, N. Ghanem, M.P. Lefranc, and T.H. Rabbitts.** 1987. New subgroups in the human T cell rearranging V gamma gene locus. *EMBO J.* 6:1945.
76. **Huck, S., P. Dariavach, and M.P. Lefranc.** 1988. Variable region genes in the human T-cell rearranging gamma (TRG) locus: V-J junction and homology with the mouse genes. *EMBO J.* 7:719.
77. **Zhang, X.M., C. Tonnelle, M.P. Lefranc, and S. Huck.** 1994. T cell receptor gamma cDNA in human fetal liver and thymus: variable regions of gamma chains are restricted to V gamma I or V9, due to the absence of splicing of the V10 and V11 leader intron. *Eur.J.Immunol.* 24:571.
78. **Huck, S. and M.P. Lefranc.** 1987. Rearrangements to the JP1, JP and JP2 segments in the human T- cell rearranging gamma gene (TRG gamma) locus. *FEBS Lett.* 224:291.
79. **Quertermous, T., W.M. Strauss, J.J. van Dongen, and J.G. Seidman.** 1987. Human T cell gamma chain joining regions and T cell development. *J.Immunol.* 138:2687.
80. **Haas, W. and S. Tonegawa.** 1992. Development and selection of gamma delta T cells. *Curr.Opin.Immunol.* 4:147.
81. **Chien, Y.H., M. Iwashima, K.B. Kaplan, J.F. Elliott, and M.M. Davis.** 1987. A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. *Nature* 327:677.
82. **Giachino, C., M.P. Rocci, M. Bottaro, G. Matullo, G. De Libero, and N. Migone.** 1994. T cell receptor V delta 2-C alpha transcripts are present in the thymus but virtually absent in the periphery. *J.Immunol.* 153:1637.

83. **Sottini, A., L. Imberti, G. Fiordalisi, and D. Primi.** 1991. Use of variable human V delta genes to create functional T cell receptor alpha chain transcripts. *Eur.J.Immunol.* 21:2455.
84. **Peyrat, M.A., F. Davodeau, I. Houde, F. Romagne, A. Necker, C. Leget, J.P. Cervoni, N. Cerf-Bensussan, H. Vie, and M. Bonneville.** 1995. Repertoire analysis of human peripheral blood lymphocytes using a human V delta 3 region-specific monoclonal antibody. Characterization of dual T cell receptor (TCR) delta-chain expressors and alpha beta T cells expressing V delta 3J alpha C alpha-encoded TCR chains. *J.Immunol.* 155:3060.
85. **Moss, P.A., W.M. Rosenberg, E. Zintzaras, and J.I. Bell.** 1993. Characterization of the human T cell receptor alpha-chain repertoire and demonstration of a genetic influence on V alpha usage. *Eur.J.Immunol.* 23:1153.
86. **Hochstenbach, F. and M.B. Brenner.** 1990. Newly identified gamma/delta and  $\beta$ /delta T-cell receptors. *J.Clin.Immunol.* 10:1.
87. **Arden, B., S.P. Clark, D. Kabelitz, and T.W. Mak.** 1995. Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42:455.
88. **Hata, S., M. Clabby, P. Devlin, H. Spits, J.E. de Vries, and M.S. Krangel.** 1989. Diversity and organization of human T cell receptor delta variable gene segments. *J.Exp.Med.* 169:41.
89. **Takahara, Y., J. Reimann, E. Michalopoulos, E. Ciccone, L. Moretta, and T.W. Mak.** 1989. Diversity and structure of human T cell receptor delta chain genes in peripheral blood gamma/delta bearing T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 169:393.
90. **Takahara, Y., D. Tkachuk, E. Michalopoulos, E. Champagne, J. Reimann, M. Minden, and T.W. Mak.** 1988. Sequence and organization of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell delta-chain locus. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:6097.
91. **Davodeau, F., M.A. Peyrat, M.M. Hallet, H. Vie, and M. Bonneville.** 1994. Characterization of a new functional TCR J delta segment in humans. Evidence for a marked conservation of J delta sequences between humans, mice, and sheep. *J.Immunol.* 153:137.
92. **Loh, E.Y., S. Cwirla, A.T. Serafini, J.H. Phillips, and L.L. Lanier.** 1988. Human T-cell-receptor delta chain: Genomic organization, diversity, and expression in populations of cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:9714.
93. **Yoshikai, Y., S.P. Clark, S. Taylor, U. Sohn, B.I. Wilson, M.D. Minden, and T.W. Mak.** 1985. Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T-cell receptor alpha-chain. *Nature* 316:837.
94. **Lefranc, M.P., V. Giudicelli, C. Ginestoux, J. Bodmer, W. Muller, R. Bontrop, M. Lemaître, A. Malik, V. Barbie, and D. Chaume.** 1999. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic.Acids.Res.* 27:209.
95. **Guglielmi, P., F. Davi, L. D'Auriol, J.-C. Bories, J. Dausset, and A. Bensussan.** 1988. Use of a variable  $\alpha$  region to create a functional T-cell receptor delta chain. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5634.
96. **Genevee, C., V. Chung, A. Diu, T. Hercend, and F. Triebel.** 1994. TCR gene segments from at least one third of V alpha subfamilies rearrange at the delta locus. *Mol.Immunol.* 31:109.
97. **Groh, V., S. Porcelli, M. Fabbi, L.L. Lanier, L.J. Picker, T. Anderson, R.A. Warnke, A.K. Bhan, J.L. Strominger, and M.B. Brenner.** 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J.Exp.Med.* 169:1277.
98. **Chowers, Y., W. Holtmeier, E. Morzycka-Wroblewska, and M.F. Kagnoff.** 1995. Inverse PCR amplification of rare T cell receptor delta messages from mucosal biopsy specimens. *J.Immunol.Methods* 179:261.

99. **Kabelitz, D., T. Ackermann, T. Hinz, F. Davodeau, H. Band, M. Bonneville, O. Janssen, B. Arden, and S. Schondelmaier.** 1994. New monoclonal antibody (23D12) recognizing three different V gamma elements of the human gamma delta T cell receptor. 23D12+ cells comprise a major subpopulation of gamma delta T cells in postnatal thymus. *J.Immunol.* 152:3128.
100. **Schondelmaier, S., D. Wesch, K. Pechhold, and D. Kabelitz.** 1993. V gamma gene usage in peripheral blood gamma delta T cells. *Immunol.Lett.* 38:121.
101. **Borst, J., A. Wicherink, J.J. van Dongen, E. de Vries, W.M. Comans-Bitter, F. Wassenaar, and P. Van den Elsen .** 1989. Non-random expression of T cell receptor gamma and delta variable gene segments in functional T lymphocyte clones from human peripheral blood. *Eur.J.Immunol.* 19:1559.
102. **Casorati, G., G. De Libero, A. Lanzavecchia, and N. Migone.** 1989. Molecular analysis of human gamma/delta+ clones from thymus and peripheral blood. *J.Exp.Med.* 170:1521.
103. **Soderstrom, K., A. Bucht, E. Halapi, A. Gronberg, I. Magnusson, and R. Kiessling.** 1996. Increased frequency of abnormal gamma delta T cells in blood of patients with inflammatory bowel diseases. *J.Immunol.* 156:2331.
104. **Triebel, F. and T. Hercend.** 1989. Subpopulations of human peripheral T gamma delta lymphocytes [see comments]. *Immunol.Today* 10:186.
105. **Triebel, F., F. Faure, F. Mami-Chouaib, S. Jitsukawa, A. Griscelli, C. Genevee, S. Roman-Roman, and T. Hercend.** 1988. A novel human V delta gene expressed predominantly in the Ti gamma A fraction of gamma/delta+ peripheral lymphocytes. *Eur.J.Immunol.* 18:2021.
106. **Triebel, F., F. Faure, M. Graziani, S. Jitsukawa, M.P. Lefranc, and T. Hercend.** 1988. A unique V-J-C-rearranged gene encodes a gamma protein expressed on the majority of CD3+ T cell receptor-alpha/beta- circulating lymphocytes. *J.Exp.Med.* 167:694.
107. **Bottino, C., G. Tambussi, S. Ferrini, E. Ciccone, P. Varese, M.C. Mingari, L. Moretta, and A. Moretta.** 1988. Two subsets of human T lymphocytes expressing gamma/delta antigen receptor are identifiable by monoclonal antibodies directed to two distinct molecular forms of the receptor. *J.Exp.Med.* 168:491.
108. **Parker, C.M., V. Groh, H. Band, S.A. Porcelli, C. Morita, M. Fabbi, D. Glass, J.L. Strominger, and M.B. Brenner.** 1990. Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J.Exp.Med.* 171 :1597.
109. **Miyawaki, T., Y. Kasahara, K. Taga, A. Yachie, and N. Taniguchi.** 1990. Differential expression of CD45RO (UCHL1) and its functional relevance in two subpopulations of circulating TCR-gamma/delta+ lymphocytes. *J.Exp.Med.* 171:1833.
110. **Beldjord, K., C. Beldjord, E. Macintyre, P. Even, and F. Sigaux.** 1993. Peripheral selection of V delta 1+ cells with restricted T cell receptor delta gene junctional repertoire in the peripheral blood of healthy donors. *J.Exp.Med.* 178:121.
111. **Krangel, M.S., H. Yssel, C. Brocklehurst, and H. Spits.** 1990. A distinct wave of human T cell receptor gamma/delta lymphocytes in the early fetal thymus: evidence for controlled gene rearrangement and cytokine production. *J.Exp.Med.* 172:847.
112. **Hingorani, R., I.H. Choi, P. Akolkar, B. Gulwani-Akolkar, R. Pergolizzi, J. Silver, and P.K. Gregersen.** 1993. Clonal predominance of T cell receptors within the CD8+ CD45RO+ subset in normal human subjects. *J.Immunol.* 151:5762.
113. **Posnett, D.N., R. Sinha, S. Kabak, and C. Russo.** 1994. Clonal populations of T cells in normal elderly humans: the T cell equivalent to "benign monoclonal gammopathy" [published erratum appears in J Exp Med 1994 Mar 1;179(3):1077]. *J.Exp.Med.* 179:609.

114. **Asarnow, D.M., W.A. Kuziel, M. Bonyhadi, R.E. Tigelaar, P.W. Tucker, and J.P. Allison.** 1988. Limited diversity of gamma delta antigen receptor genes of Thy- 1+ dendritic epidermal cells. *Cell* 55:837.
115. **Asarnow, D.M., T. Goodman, L. Lefrancois, and J.P. Allison.** 1989. Distinct antigen receptor repertoires of two classes of murine epithelium-associated T cells. *Nature* 341:60.
116. **Havran, W.L., Y.H. Chien, and J.P. Allison.** 1991. Recognition of self antigens by skin-derived T cells with invariant gamma delta antigen receptors. *Science* 252:1430.
117. **Alaibac, M., J. Morris, R. Yu, and A.C. Chu.** 1992. T lymphocytes bearing the gamma delta T-cell receptor: a study in normal human skin and pathological skin conditions. *Br.J.Dermatol.* 127:458.
118. **Bos, J.D., M.B. Teunissen, I. Cairo, S.R. Krieg, M.L. Kapsenberg, P.K. Das, and J. Borst.** 1990. T-cell receptor gamma delta bearing cells in normal human skin. *J.Invest.Dermatol.* 94:37.
119. **Uyemura, K., J. Klotz, C. Pirmez, J. Ohmen, X.H. Wang, C. Ho, W.L. Hoffman, and R.L. Modlin.** 1992. Microanatomic clonality of gamma delta T cells in human leishmaniasis lesions. *J.Immunol.* 148:1205.
120. **Uyemura, K., R.J. Deans, H. Band, J. Ohmen, G. Panchamoorthy, C.T. Morita, T.H. Rea, and R.L. Modlin.** 1991. Evidence for clonal selection of gamma/delta T cells in response to a human pathogen. *J.Exp.Med.* 174:683.
121. **Modlin, R.L., C. Pirmez, F.M. Hofman, V. Torigian, K. Uyemura, T.H. Rea, B.R. Bloom, and M.B. Brenner.** 1989. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 339:544.
122. **Alaibac, M., J. Morris, and A.C. Chu.** 1997. Gamma delta T-cells in human cutaneous immunology. *Int.J.Clin.Lab.Res.* 27:158.
123. **Alaibac, M., A. Daga, G. Harms, J. Morris, R.C. Yu, K. Zwingerberger, and A.C. Chu.** 1993. Molecular analysis of the gamma delta T-cell receptor repertoire in normal human skin and in Oriental cutaneous leishmaniasis. *Exp.Dermatol.* 2:106.
124. **Alaibac, M. and A.C. Chu.** 1996. High incidence of a T nucleotide at the second position of codon 97 in Vdelta2-(D)-Jdelta1 junctional sequences of human normal skin gamma delta T-cells. *Mol.Immunol.* 33:1035.
125. **Schild, H., N. Mavaddat, C. Litzengerger, E.W. Ehrich, M.M. Davis, J.A. Bluestone, L. Matis, R.K. Draper, and Y.H. Chien.** 1994. The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell* 76:29.
126. **Constant, P., F. Davodeau, M.A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, and J.J. Fournie.** 1994. Stimulation of human gamma delta T cells by nonpeptidic mycobacterial ligands. *Science* 264:267.
127. **Tanaka, Y., S. Sano, E. Nieves, G. De Libero, D. Rosa, R.L. Modlin, M.B. Brenner, B.R. Bloom, and C.T. Morita .** 1994. Nonpeptide ligands for human gamma delta T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91:8175.
128. **Janeway, C.A., B. Jones, and A. Hayday.** 1988. Specificity and function of T cells bearing gamma/delta receptors. *Immunol.Today* 9:73.
129. **Porcelli, S., M.B. Brenner, and H. Band.** 1991. Biology of the human gamma delta T-cell receptor. *Immunol.Rev.* 120:137.

130. **Vincent, M.S., K. Roessner, D. Lynch, D. Wilson, S.M. Cooper, J. Tschopp, L.H. Sigal, and R.C. Budd.** 1996. Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J.Exp.Med.* 184:2109.
131. **Lefrancois, L. and T. Goodman** . 1989. In vivo modulation of cytolytic activity and Thy-1 expression in TCR-gamma delta+ intraepithelial lymphocytes. *Science* 243:1716.
132. **Kawaguchi, M., M. Nanno, Y. Umesaki, S. Matsumoto, Y. Okada, Z. Cai, T. Shimamura, Y. Matsuoka, M. Ohwaki, and H. Ishikawa.** 1993. Cytolytic activity of intestinal intraepithelial lymphocytes in germ-free mice is strain dependent and determined by T cells expressing gamma delta T-cell antigen receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:8591.
133. **Lundqvist, C., V. Baranov, S. Hammarstrom, L. Athlin, and M.L. Hammarstrom.** 1995. Intra-epithelial lymphocytes. Evidence for regional specialization and extrathymic T cell maturation in the human gut epithelium. *International Immunology* 7:1473.
134. **Born, W., K.A. Kelly, and R.L. O'Brien.** 1990. Gamma delta T cells. In *Handbook of B and T Lymphocytes*. Snow C, ed. San Diego Academic Press, p. 179.
135. **Boismenu, R. and W.L. Havran.** 1994. Modulation of epithelial cell growth by intraepithelial gamma delta T cells. *Science* 266:1253.
136. **Sakai, T., K. Ohara-Inagaki, T. Tsuzuki, and Y. Yoshikai.** 1995. Host intestinal intraepithelial gamma delta T lymphocytes present during acute graft-versus-host disease in mice may contribute to the development of enteropathy. *Eur.J.Immunol.* 25:87.
137. **Komano, H., Y. Fujiura, M. Kawaguchi, S. Matsumoto, Y. Hashimoto, S. Obana, P. Mombaerts, S. Tonegawa, H. Yamamoto, and S. Itohara.** 1995. Homeostatic regulation of intestinal epithelia by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92:6147.
138. **Roberts, S.J., A.L. Smith, A.B. West, L. Wen, R.C. Findly, M.J. Owen, and A.C. Hayday.** 1996. T-cell alpha beta + and gamma delta + deficient mice display abnormal but distinct phenotypes toward a natural, widespread infection of the intestinal epithelium. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:11774.
139. **Duchmann, R., E. Schmitt, P. Knolle, K.H. Meyer zum Buschenfelde, and M. Neurath.** 1996. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin-12. *Eur.J.Immunol.* 26:934.
140. **Duchmann, R., I. Kaiser, E. Hermann, W. Mayet, K. Ewe, and K.H. Meyer zum Buschenfelde.** 1995. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD) [see comments]. *Clin.Exp.Immunol.* 102:448.
141. **Ke, Y., K. Pearce, J.P. Lake, H.K. Ziegler, and J.A. Kapp.** 1997. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J.Immunol.* 158:3610.
142. **Fujihashi, K., T. Taguchi, W.K. Aicher, J.R. McGhee, J.A. Bluestone, J.H. Eldridge, and H. Kiyono.** 1992. Immunoregulatory functions for murine intraepithelial lymphocytes: gamma/delta T cell receptor-positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance, while alpha/beta TCR+ T cells provide B cell help. *J.Exp.Med.* 175:695.
143. **Takahashi, I., I. Nakagawa, H. Kiyono, J.R. McGhee, J.D. Clements, and S. Hamada.** 1995. Mucosal T cells induce systemic anergy for oral tolerance. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 206:414.
144. **McMenamin, C., M. McKersey, P. Kuhnlein, T. Hunig, and P.G. Holt.** 1995. Gamma delta T cells down-regulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J.Immunol.* 154:4390.

145. **Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner.** 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265:1237.
146. **Wen, L., M. Peakman, G. Mieli-Vergani, and D. Vergani.** 1992. Elevation of activated gamma delta T cell receptor bearing T lymphocytes in patients with autoimmune chronic liver disease. *Clin.Exp.Immunol.* 89:78.
147. **Shen, Y., S. Li, A.J. Quayle, O.J. Mellbye, J.B. Natvig, and O. Forre.** 1992. TCR gamma/delta+ cell subsets in the synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and juvenile rheumatoid arthritis. *Scand.J.Immunol.* 36:533.
148. **Smith, M.D., B. Broker, L. Moretta, E. Ciccone, C.E. Grossi, J.C. Edwards, F. Yuksel, B. Colaco, C. Worman, and L. MacKenzie.** 1990. T gamma delta cells and their subsets in blood and synovial tissue from rheumatoid arthritis patients. *Scand.J.Immunol.* 32:585.
149. **Braegger, C.P. and T.T. MacDonald.** 1994. Immune mechanisms in chronic inflammatory bowel disease. *Ann.Allergy* 72:135.
150. **Schreiber, S., A. Raedler, W.F. Stenson, and R.P. MacDermott.** 1992. The role of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 21:451.
151. **Powrie, F.** 1995. T cells in inflammatory bowel disease: protective and pathogenic roles. [Review] [35 refs]. *Immunity* 3:171.
152. **Elson, C.O., R.B. Sartor, G.S. Tennyson, and R.H. Riddell.** 1995. Experimental models of inflammatory bowel disease. [Review] [97 refs]. *Gastroenterology* 109:1344.
153. **Powrie, F., M.W. Leach, S. Mauze, S. Menon, L.B. Caddle, and R.L. Coffman.** 1994. Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity.* 1:553.
154. **Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, S. Tonegawa, and A.K. Bhan.** 1996. Alteration of a polyclonal to an oligoclonal immune response to cecal aerobic bacterial antigens in TCR alpha mutant mice with inflammatory bowel disease. *International Immunology* 8:1387.
155. **Matsuda, J.L., L. Gapin, B.C. Sydora, F. Byrne, S. Binder, M. Kronenberg, and R. Aranda.** 2000. Systemic activation and antigen-driven oligoclonal expansion of T cells in a mouse model of colitis. *J.Immunol.*2000.Mar.1;164(5):2797-806. 164:2797.
156. **Taurog, J.D., J.A. Richardson, J.T. Croft, W.A. Simmons, M. Zhou, J.L. Fernandez-Sueiro, E. Balish, and R.E. Hammer.** 1994. The germfree state prevents development of gut and joint inflammatory disease in HLA-B27 transgenic rats. *J.Exp.Med.* 180:2359.
157. **Adler, G.** 1993. *Morbus Crohn/Colitis Ulcerosa.* Springer Verlag, Berlin,
158. **Choy, M.Y., J.A. Walker-Smith, C.B. Williams, and T.T. MacDonald.** 1990. Differential expression of CD25 (interleukin-2 receptor) on lamina propria T cells and macrophages in the intestinal lesions in Crohn's disease and ulcerative colitis [see comments]. *Gut* 31:1365.
159. **Burgio, V.L., S. Fais, M. Boirivant, A. Perrone, and F. Pallone.** 1995. Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease. *Gastroenterology* 109:1029.
160. **Fukushima, K., T. Masuda, H. Ohtani, I. Sasaki, Y. Funayama, S. Matsuno, and H. Nagura.** 1991. Immunohistochemical characterization, distribution, and ultrastructure of lymphocytes bearing T-cell receptor gamma/delta in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 101:670.
161. **McVay, L.D., B. Li, R. Biancaniello, M.A. Creighton, D. Bachwich, G. Lichtenstein, J.L. Rombeau, and S.R. Carding.** 1997. Changes in human mucosal gamma delta T cell repertoire and function associated with the disease process in inflammatory bowel disease. *Mol.Med.* 3:183.

162. **Shalon, L., B. Gulwani-Akolkar, S.E. Fisher, P.N. Akolkar, A. Panja, L. Mayer, and J. Silver.** 1994. Evidence for an altered T-cell receptor repertoire in Crohn's disease. *Autoimmunity*. 17:301.
163. **Posnett, D.N., I. Schmelkin, D.A. Burton, A. August, H. McGrath, and L.F. Mayer.** 1990. T cell antigen receptor V gene usage. Increases in V beta 8+ T cells in Crohn's disease. *J.Clin.Invest.* 85:1770.
164. **Chott, A., C.S. Probert, G.G. Gross, R.S. Blumberg, and S.P. Balk.** 1996. A common TCR beta-chain expressed by CD8+ intestinal mucosa T cells in ulcerative colitis. *J.Immunol.* 156:3024.
165. **Nakajima, A., T. Kodama, Y. Yazaki, M. Takazoe, N. Saito, R. Suzuki, Nishino, H, K. Yamamoto, J. Silver, and N. Matsuhashi.** 1996. Specific clonal T cell accumulation in intestinal lesions of Crohn's disease. *J.Immunol.* 157:5683.
166. **Gulwani-Akolkar, B., P.N. Akolkar, A. Minassian, R. Pergolizzi, M.X.M.G. McKinley, S. Fisher, and J. Silver.** 1996. Selective expansion of specific T cell receptors in the inflamed colon of Crohn's disease. *J.Clin.Invest.* 98:1344.
167. **Watanabe, M., A. Hayashi, Y. Hosoda, M. Ohara, Y. Iwao, H. Ishii, H.X.N.M. Ishikawa, and T. Hibi.** 1996. Preferential activation of CD4+V beta 5.2/5.3+ intestinal intraepithelial lymphocytes in the inflamed lesions of Crohn's disease. *Clinical Immunology & Immunopathology* 78:130.
168. **Saubermann, L.J., C.S. Probert, A.D. Christ, A. Chott, J.R. Turner, A.C. Stevens, S.P. Balk, and R.S. Blumberg.** 1999. Evidence of T cell receptor beta-chain patterns in inflammatory and noninflammatory bowel disease states. *Am.J.Physiol.* 276:G613.
169. **Kaufmann, S.H.E.** 1993. Immunity to intracellular bacteria. *Annu.Rev.Immunol.* 11:129.
170. **Boullier, S., G. Dadaglio, A. Lafeuillade, T. Debord, and M.L. Gougeon.** 1997. V delta 1 T cells expanded in the blood throughout HIV infection display a cytotoxic activity and are primed for TNF-alpha and IFN- gamma production but are not selected in lymph nodes. *J.Immunol.* 159:3629.
171. **Lundqvist, C., V. Baranov, S. Teglund, S. Hammarstrom, and M.L. Hammarstrom.** 1994. Cytokine profile and ultrastructure of intraepithelial gamma delta T cells in chronically inflamed human gingiva suggest a cytotoxic effector function. *J.Immunol.* 153:2302.
172. **Mombaerts, P., J. Arnoldi, F. Russ, S. Tonegawa, and S.H. Kaufmann.** 1993. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 365:53.
173. **Fu, Y.X., C.E. Roark, K. Kelly, D. Drevets, P. Campbell, R. O'Brien, and W. Born.** 1994. Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. *J.Immunol.* 153:3101.
174. **Giacomelli, R., I. Parzanese, G. Frieri, A. Passacantando, F. Pizzuto, T. Pimpo, P. Cipriani, A. Viscido, R. Caprilli, and G. Tonietti.** 1994. Increase of circulating gamma/delta T lymphocytes in the peripheral blood of patients affected by active inflammatory bowel disease. *Clin.Exp.Immunol.* 98:83.
175. **McGhee, J.R., J. Mestecky, M.T. Dertzbaugh, J.H. Eldridge, M. Hirasawa, and H. Kiyono.** 1992. The mucosal immune system: from fundamental concepts to vaccine development. *Vaccine* 10:75.
176. **Fischer, M. and R. Kuppers.** 1998. Human IgA- and IgM-secreting intestinal plasma cells carry heavily mutated VH region genes. *Eur.J.Immunol.* 28:2971.

177. **Leyendeckers, H., M. Odendahl, A. Lohndorf, J. Irsch, M. Spangfort, S. Miltenyi, N. Hunzelmann, M. Assenmacher, A. Radbruch, and J. Schmitz.** 1999. Correlation analysis between frequencies of circulating antigen-specific IgG-bearing memory B cells and serum titers of antigen-specific IgG. *Eur.J.Immunol.* 29:1406.
178. **Dunn-Walters, D.K., P.G. Isaacson, and J. Spencer.** 1997. Sequence analysis of human IgVH genes indicates that ileal lamina propria plasma cells are derived from Peyer's patches. *Eur.J.Immunol.* 27:463.
179. **Dunn-Walters, D.K., P.G. Isaacson, and J. Spencer.** 1996. Sequence analysis of rearranged IgVH genes from microdissected human Peyer's patch marginal zone B cells. *Immunology* 88:618.
180. **Kantele, A.M., R. Takanen, and H. Arvilommi.** 1988. Immune response to acute diarrhea seen as circulating antibody-secreting cells. *Journal of Infectious Diseases* 158:1011.
181. **Kantele, J.M., H. Arvilommi, S. Kontiainen, M. Salmi, Jalkanen, S, E. Savilahti, M. Westerholm, and A. Kantele.** 1996. Mucosally activated circulating human B cells in diarrhea express homing receptors directing them back to the gut. *Gastroenterology* 110:1061.
182. **Kantele, A., J.M. Kantele, E. Savilahti, M. Westerholm, H.X.L.A. Arvilommi, E.C. Butcher, and P.H. Makela.** 1997. Homing potentials of circulating lymphocytes in humans depend on the site of activation: oral, but not parenteral, typhoid vaccination induces circulating antibody-secreting cells that all bear homing receptors directing them to the gut. *J.Immunol.* 158:574.
183. **Forrest, B.D.** 1988. Identification of an intestinal immune response using peripheral blood lymphocytes. *Lancet* 1:81.
184. **Salmi, M. and S. Jalkanen.** 1991. Regulation of lymphocyte traffic to mucosa-associated lymphatic tissues. *Gastroenterol.Clin.North Am.* 20:495.
185. **Centner, J. and A.L. de Weck.** 1995. Lymphatische Organe. In *Atlas der Immuno-Allergologie*. 3rd. ed. J. Centner and A.L. de Weck, eds. Hogrefe & Huber Publishers, Seattle, Toronto, Bern, Göttingen, p. 17.
186. **Conley, M.E. and D.L. Delacroix.** 1987. Intravascular and mucosal immunoglobulin A: two separate but related systems of immune defense? *Ann.Intern.Med.* 106:892.
187. **Delacroix, D.L., C. Dive, J.C. Rambaud, and J.P. Vaerman.** 1982. IgA subclasses in various secretions and in serum. *Immunology* 47:383.
188. **Kutteh, W.H., S.J. Prince, and J. Mestecky.** 1982. Tissue origins of human polymeric and monomeric IgA. *J.Immunol.* 128:990.
189. **Crago, S.S., W.H. Kutteh, I. Moro, M.R. Allansmith, J. Radl, J.J. Haaijman, and J. Mestecky.** 1984. Distribution of IgA1-, IgA2-, and J chain-containing cells in human tissues. *J.Immunol.* 132:16.
190. **Radl, J., H.R. Schuit, J. Mestecky, and W. Hijmans.** 1974. The origin of monomeric and polymeric forms of IgA in man. *Adv.Exp.Med.Biol.* 45:57.
191. **Brandtzaeg, P.** 1973. Two types of IgA immunocytes in man. *Nat.New Biol.* 243:142.
192. **Burns, J.W., M. Siadat-Pajouh, A.A. Krishnaney, and H.B. Greenberg.** 1996. Protective effect of rotavirus VP6-specific IgA monoclonal antibodies that lack neutralizing activity [see comments]. *Science* 272:104.
193. **Kaetzel, C.S., J.K. Robinson, K.R. Chintalacharuvu, J.P. Vaerman, and M.E. Lamm.** 1991. The polymeric immunoglobulin receptor (secretory component) mediates transport of immune complexes across epithelial cells: a local defense function for IgA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88:8796.

194. **Mazanec, M.B., J.G. Nedrud, C.S. Kaetzel, and M.E. Lamm.** 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. [Review] [35 refs]. *Immunol.Today* 14:430.
195. **Russell, M.W. and B. Mansa.** 1989. Complement-fixing properties of human IgA antibodies. Alternative pathway complement activation by plastic-bound, but not specific antigen-bound, IgA. *Scand.J.Immunol.* 30:175.
196. **Russell, M.W., J. Reinholdt, and M. Kilian.** 1989. Anti-inflammatory activity of human IgA antibodies and their Fab alpha fragments: inhibition of IgG-mediated complement activation. *Eur.J.Immunol.* 19:2243.
197. **Griffiss, J.M. and G.A. Jarvis.** 1987. Interaction of serum IgA with complement components: the molecular basis of IgA blockade. *Adv.Exp.Med.Biol.* 216B:1303.
198. **Mestecky, J., M.W. Russell, and C.O. Elson.** 1999. Intestinal IgA: novel views on its function in the defence of the largest mucosal surface. *Gut* 44:2.
199. **Turner, M.** 1991. Moleküle, die Antigene erkennen. In *Kurzes Lehrbuch der Immunologie.* 2. Auflage ed. I.M. Roitt, J. Brostoff and D.K. Male, eds. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, p. 54.
200. **Kantor, A.B. and L.A. Herzenberg.** 1993. Origin of murine B cell lineages. *Annu.Rev.Immunol.* 11:501.
201. **Macpherson, A.J., D. Gatto, E. Sainsbury, G.R. Harriman, H. Hengartner, and R.M. Zinkernagel.** 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000.Jun.23;288(5474):2222-6. 288:2222.
202. **Hallen, J.** 1963. Frequency of abnormal serum globulin (M-components) in the aged. *Acta Med.Scand.* 173:737.
203. **Gueret, R., A. Grandien, J. Andersson, A. Coutinho, J. Radl, and M.E. Weksler.** 1993. Evidence for selective pressure in the appearance of monoclonal immunoglobulins during aging: studies in M54 mu-transgenic mice. *Eur.J.Immunol.* 23:1735.
204. **Cook, G.P., I.M. Tomlinson, G. Walter, H. Riethman, N.P. Carter, L. Buluwela, G. Winter, and T.H. Rabbitts.** 1994. A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nat.Genet.* 7:162.
205. **Matsuda, F. and T. Honjo.** 1996. Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Adv.Immunol.* 62:1.
206. **Cook, G.P. and I.M. Tomlinson .** 1995. The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol.Today* 16:237.
207. **Corbett, S.J., I.M. Tomlinson, E.L.L. Sonnhammer, D. Buck, and G. Winter.** 1997. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J.Mol.Biol.* 270:587.
208. **Zachau, H.G.** 1993. The immunoglobulin kappa locus-or-what has been learned from looking closely at one-tenth of a percent of the human genome. *Gene* 135:167.
209. **Kabat, E.A. and T.T. Wu.** 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity- determining regions to binding of antibody-combining sites. *J.Immunol.* 147:1709.
210. **Wu, T.T., G. Johnson, and E.A. Kabat.** 1993. Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16:1.

211. **Nezlin, R.** 1998. General Characteristics of Immunoglobulin Molecules. In *The Immunoglobulins*. 1st. ed. R. Nezlin, ed. Academic Press, San Diego, p. 3.
212. **Milstein, C. and M.S. Neuberger.** 1996. Maturation of the immune response. *Adv. Protein Chem.* 49:451.
213. **Wagner, S.D. and M.S. Neuberger.** 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu. Rev. Immunol.* 14:441.
214. **Feeney, A.J.** 1992. Comparison of junctional diversity in the neonatal and adult immunoglobulin repertoires. *Int. Rev. Immunol.* 8:113.
215. **Berman, J.E., K.G. Nickerson, R.R. Pollock, J.E. Barth, R.K. Schuurman, D.M. Knowles, L. Chess, and F.W. Alt.** 1991. VH gene usage in humans: biased usage of the VH6 gene in immature B lymphoid cells. *Eur. J. Immunol.* 21:1311.
216. **Mortari, F., J.A. Newton, J.Y. Wang, and H.W.J. Schroeder.** 1992. The human cord blood antibody repertoire. Frequent usage of the VH7 gene family. *Eur. J. Immunol.* 22:241.
217. **Cuisinier, A.M., V. Guigou, L. Boubli, M. Fougereau, and C. Tonnelie.** 1989. Preferential expression of VH5 and VH6 immunoglobulin genes in early human B-cell ontogeny. *Scand. J. Immunol.* 30:493.
218. **Kraj, P., D.F. Friedman, F. Stevenson, and L.E. Silberstein.** 1995. Evidence for the overexpression of the VH4-34 (VH4.21) Ig gene segment in the normal adult human peripheral blood B cell repertoire. *J. Immunol.* 154:6406.
219. **Kraj, P., S.P. Rao, A.M. Glas, R.R. Hardy, E.C. Milner, and L.E. Silberstein.** 1997. The human heavy chain Ig V region gene repertoire is biased at all stages of B cell ontogeny, including early pre-B cells. *J. Immunol.* 158:5824.
220. **Chomczynski, P. and N. Sacchi .** 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156.
221. **Flanagan, J.G., M.P. Lefranc and T.H. Rabbitts.** 1984. Mechanisms of divergence and convergence of the human immunoglobulin  $\alpha$ 1 and  $\alpha$ 2 constant region gene sequences. *Cell* 36:681-688.
222. **Mandel, M. and A. Higa.** 1970. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53:159.
223. **Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463.
224. **McVay, L.D. and S.R. Carding.** 1996. Extrathymic origin of human gamma delta T cells during fetal development. *J. Immunol.* 157:2873.
225. **Wucherpfennig, K.W., Y.J. Liao, M. Prendergast, J. Prendergast, D.A. Hafler, and J.L. Strominger.** 1993. Human fetal liver gamma/delta T cells predominantly use unusual rearrangements of the T cell receptor delta and gamma loci expressed on both CD4+CD8- and CD4-CD8- gamma/delta T cells. *J. Exp. Med.* 177:425.
226. **Kyes, S., W. Pao, and A. Hayday.** 1991. Influence of site of expression on the fetal gamma delta T-cell receptor repertoire. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:7830.
227. **Itohara, S. and S. Tonegawa.** 1990. Selection of gamma delta T cells with canonical T-cell antigen receptors in fetal thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:7935.

228. **Itohara, S., P. Mombaerts, J. Lafaille, J. Iacomini, A. Nelson, A.R. Clarke, M.L. Hooper, A. Farr, and S. Tonegawa.** 1993. T cell receptor delta gene mutant mice: independent generation of alpha beta T cells and programmed rearrangements of gamma delta TCR genes. *Cell* 72:337.
229. **Feeney, A.J.** 1993. Junctional diversity in the absence of N regions. Neonatal T cell receptor beta chain junctional sequences are more heterogeneous than neonatal T cell receptor gamma delta or IgH junctions. *J.Immunol.* 151:3094.
230. **Gu, H., I. Forster, and K. Rajewsky.** 1990. Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Ly1 B cell and B-CLL progenitor generation. *EMBO J.* 9:2133.
231. **Giachino, C., L. Granziero, V. Modena, V. Maiocco, C. Lomater, F. Fantini, A. Lanzavecchia, and N. Migone.** 1994. Clonal expansions of V delta 1+ and V delta 2+ cells increase with age and limit the repertoire of human gamma delta T cells. *Eur.J.Immunol.* 24:1914.
232. **Shen, J., D.M. Andrews, F. Pandolfi, L.A. Boyle, C.M. Kersten, R.N. Blatman, and J.T. Kurnick.** 1998. Oligoclonality of Vdelta1 and Vdelta2 cells in human peripheral blood mononuclear cells: TCR selection is not altered by stimulation with gram-negative bacteria. *J.Immunol.* 160:3048.
233. **Bucht, A., K. Soderstrom, S. Esin, J. Grunewald, S. Hagelberg, I. Magnusson, H. Wigzell, A. Gronberg, and R. Kiessling.** 1995. Analysis of gamma delta V region usage in normal and diseased human intestinal biopsies and peripheral blood by polymerase chain reaction (PCR) and flow cytometry. *Clin.Exp.Immunol.* 99:57.
234. **Lee, H.B., J.H. Kim, C.Y. Yim, D.G. Kim, and D.S. Ahn.** 1997. Differences in immunophenotyping of mucosal lymphocytes between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Korean.J.Intern.Med.* 12:7.
235. **Cuvelier, C.A., N. De Wever, H. Mielants, M. De Vos, E.M. Veys, and H. Roels.** 1992. Expression of T cell receptors alpha beta and gamma delta in the ileal mucosa of patients with Crohn's disease and with spondylarthropathy. *Clin.Exp.Immunol.* 90:275.
236. **Trejdosiewicz, L.K., A. Calabrese, C.J. Smart, D.J. Oakes, P.D. Howdle, J.E. Crabtree, M.S. Losowsky, F. Lancaster, and A.W. Boylston.** 1991. Gamma delta T cell receptor-positive cells of the human gastrointestinal mucosa: occurrence and V region gene expression in Heliobacter pylori-associated gastritis, coeliac disease and inflammatory bowel disease. *Clin.Exp.Immunol.* 84:440.
237. **Landau, S.B., C.S. Probert, C.A. Stevens, S.P. Balk, and R.S. Blumberg.** 1996. Overutilization of the J delta 3 gene-segment in Crohn's disease. *J.Clin.Lab.Immunol.* 48:33.
238. **McCabe, R.P., W.L. Carroll, M. Egan, S.M. Cohn, and M. Peters.** 1994. Immunoglobulin variable region usage in human intestinal B lymphocytes. *Clinical Immunology & Immunopathology* 71:240.
239. **Wedgwood, J.F., B.I. Weinberger, L. Hatam, and R. Palmer.** 1997. Umbilical cord blood lacks circulating B lymphocytes expressing surface IgG or IgA. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 84:276.
240. **Mortari, F., J.Y. Wang, and H.W.J. Schroeder.** 1993. Human cord blood antibody repertoire. Mixed population of VH gene segments and CDR3 distribution in the expressed C alpha and C gamma repertoires. *J.Immunol.* 150:1348.
241. **Xue, W., S. Luo, W.H. Adler, D.H. Schulze, and J.E. Berman.** 1997. Immunoglobulin heavy chain junctional diversity in young and aged humans [In Process Citation]. *Hum.Immunol.* 57:80.

242. **Simon, G.L. and S.L. Gorbach.** 1984. Intestinal flora in health and disease. [Review] [281 refs]. *Gastroenterology* 86:174.
243. **Gorbach, S.L., L. Nahas, P.I. Lerner, and L. Weinstein.** 1967. Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man. *Gastroenterology* 53:845.
244. **Bonati, A., P. Zanelli, S. Ferrari, A. Plebani, B. Starcich, M. Savi, and T.M. Neri.** 1992. T-cell receptor beta-chain gene rearrangement and expression during human thymic ontogenesis. *Blood* 79:1472.
245. **George, J.F.J. and H.W.J. Schroeder.** 1992. Developmental regulation of D beta reading frame and junctional diversity in T cell receptor-beta transcripts from human thymus. *J.Immunol.* 148:1230.
246. **Feeney, A.J., K.D. Victor, K. Vu, B. Nadel, and R.U. Chukwuocha.** 1994. Influence of the V(D)J recombination mechanism on the formation of the primary T and B cell repertoires. *Semin.Immunol.* 6:155.
247. **Lafaille, J.J., A. DeCloux, M. Bonneville, Y. Takagaki, and S. Tonegawa.** 1989. Junctional sequences of T cell receptor gamma delta genes: implications for gamma delta T cell lineages and for a novel intermediate of V-(D)-J joining. *Cell* 59:859.
248. **McVay, L.D., S.R. Carding, K. Bottomly, and A.C. Hayday.** 1991. Regulated expression and structure of T cell receptor gamma/delta transcripts in human thymic ontogeny. *EMBO J.* 10:83.
249. **Bogue, M., S. Gilfillan, C. Benoist, and D. Mathis.** 1992. Regulation of N-region diversity in antigen receptors through thymocyte differentiation and thymus ontogeny. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89:11011.
250. **Lefrancois, L. and L. Puddington.** 1996. The role of the thymus in intestinal intraepithelial T-cell development. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 778 :36.
251. **Fitzgerald, J.E., N.S. Ricalton, A.C. Meyer, S.G. West, H. Kaplan, C. Behrendt, and B.L. Kotzin.** 1995. Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. *J.Immunol.* 154:3538.
252. **Itohara, S., A.G. Farr, J.J. Lafaille, M. Bonneville, Y. Takagaki, W. Haas, and S. Tonegawa.** 1990. Homing of a gamma delta thymocyte subset with homogeneous T-cell receptors to mucosal epithelia. *Nature* 343:754.
253. **Asarnow, D.M., D. Cado, and D.H. Raulet.** 1993. Selection is not required to produce invariant T-cell receptor gamma-gene junctional sequences. *Nature* 362:158.
254. **Davodeau, F., M.A. Peyrat, M.M. Hallet, I. Houde, H. Vie, and M. Bonneville.** 1993. Peripheral selection of antigen receptor junctional features in a major human gamma delta subset. *Eur.J.Immunol.* 23:804.
255. **Breit, T.M., I.L. Wolvers-Tettero, and J.J. van Dongen.** 1994. Unique selection determinant in polyclonal V delta 2-J delta 1 junctional regions of human peripheral gamma delta T lymphocytes. *J.Immunol.* 152:2860.
256. **Hedrick, S.M., I. Engel, D.L. McElligott, P.J. Fink, M.L. Hsu, D. Hansburg, and L.A. Matis.** 1988. Selection of amino acid sequences in the beta chain of the T cell antigen receptor. *Science* 239:1541.
257. **Robert, C. and T.S. Kupper.** 1999. Review Articles: Mechanisms of Disease: Inflammatory Skin Diseases, T Cells, and Immune Surveillance. *N.Engl.J.Med.* 341:1817.

258. **Bonneville, M., S. Itohara, E.G. Krecko, P. Mombaerts, I. Ishida, M. Katsuki, A. Berns, A.G. Farr, C.A.J. Janeway, and S. Tonegawa.** 1990. Transgenic mice demonstrate that epithelial homing of gamma/delta T cells is determined by cell lineages independent of T cell receptor specificity. *J.Exp.Med.* 171:1015.
259. **Steinman, L.** 1996. A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93:2253.
260. **Hayday, A. and L. Geng.** 1997. Gamma delta cells regulate autoimmunity. *Curr.Opin.Immunol.* 9:884.
261. **Barrett, T.A., Y. Tatsumi, and J.A. Bluestone.** 1993. Tolerance of T cell receptor gamma/delta cells in the intestine. *J.Exp.Med.* 177:1755.
262. **Finch, P.W., V. Pricolo, A. Wu, and S.D. Finkelstein.** 1996. Increased expression of keratinocyte growth factor messenger RNA associated with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 110:441.
263. **Fujihashi, K., M.N. Kweon, H. Kiyono, J.L. VanCott, F.W. van Ginkel, and M.X.M.JR. Yamamoto.** 1997. A T cell/B cell/epithelial cell internet for mucosal inflammation and immunity. [Review] [113 refs]. *Springer Seminars in Immunopathology* 18:477.
264. **Mak, T.W. and D.A. Ferrick.** 1998. The gammadelta T-cell bridge: linking innate and acquired immunity [news] [In Process Citation]. *Nat.Med.* 4:764.
265. **Crabbe, P.A., H. Bazin, H. Eyssen, and J.F. Heremans.** 1968. The normal microbial flora as a major stimulus for proliferation of plasma cells synthesizing IgA in the gut. The germ-free intestinal tract. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 34:362.
266. **Dunn-Walters, D.K., L. Boursier, and J. Spencer.** 1997. Hypermutation, diversity and dissemination of human intestinal lamina propria plasma cells. *Eur.J.Immunol.* 27:2959.
267. **Spencer, J., M. Dunn, and D.K. Dunn-Walters.** 1999. Characteristics of sequences around individual nucleotide substitutions in IgVH genes suggest different GC and AT mutators. *J.Immunol.* 162:6596.
268. **Boursier, L., D.K. Dunn-Walters, and J. Spencer.** 1999. Characteristics of IgVH genes used by human intestinal plasma cells from childhood. *Immunology* 97:558.
269. **Kroese, F.G., R. de Waard, and N.A. Bos.** 1996. B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. *Semin.Immunol.* 8:11.
270. **Kroese, F.G., R. de Waard, and N.A. Bos.** 1996. B-1 cells and their reactivity with the murine intestinal microflora. [Review] [52 refs]. *Seminars in Immunology* 8:11.
271. **Owen, R.L.** 1999. Uptake and transport of intestinal macromolecules and microorganisms by M cells in Peyer's patches - a personal and historical perspective. *Semin.Immunol.* 11:157.
272. **Peters, M.G., H. Secrist, K.R. Anders, G.S. Nash, S.R. Rich, and R.P. MacDermott.** 1989. Normal human intestinal B lymphocytes. Increased activation compared with peripheral blood. *J.Clin.Invest.* 83:1827.
273. **Kroese, F.G., E.C. Butcher, A.M. Stall, P.A. Lalor, S. Adams, and L.A. Herzenberg.** 1989. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int.Immunol.* 1:75.
274. **Kroese, F.G., W.A. Ammerlaan, and A.B. Kantor.** 1993. Evidence that intestinal IgA plasma cells in mu, kappa transgenic mice are derived from B-1 (Ly-1 B) cells. *Int.Immunol.* 5:1317.

275. **Quan, C.P., A. Berneman, R. Pires, S. Avrameas, and J.P. Bouvet.** 1997. Natural polyreactive secretory immunoglobulin A autoantibodies as a possible barrier to infection in humans. *Infect.Immun.* 65:3997.
276. **Varade, W.S. and R.A. Insel.** 1993. Isolation of germinal centerlike events from human spleen RNA. Somatic hypermutation of a clonally related VH6DJH rearrangement expressed with IgM, IgG, and IgA. *J.Clin.Invest.* 91:1838.
277. **van Es, J.H., F.H. Meyling, and T. Logtenberg.** 1992. High frequency of somatically mutated IgM molecules in the human adult blood B cell repertoire. *Eur.J.Immunol.* 22:2761.
278. **Weinstein, P.D. and J.J. Cebra.** 1991. The preference for switching to IgA expression by Peyer's patch germinal center B cells is likely due to the intrinsic influence of their microenvironment. *J.Immunol.* 147:4126.
279. **Hata, S., K. Satyanarayana, P. Devlin, H. Band, J. McLean, J.L. Strominger, M.B. Brenner, and M.S. Krangel.** 1988. Extensive junctional diversity of rearranged human T cell receptor delta genes. *Science* 240:1541.
280. **Balk, S.P., E.C. Ebert, R.L. Blumenthal, F.V. McDermott, K.W. Wucherpfennig, S.B. Landau, and R.S. Blumberg.** 1991. Oligoclonal expansion and CD1 recognition by human intestinal intraepithelial lymphocytes. *Science* 253:1411.
281. **Van Kerckhove, C., G.J. Russell, K. Deusch, K. Reich, A.K. Bhan, H. DerSimonian, and M.B. Brenner.** 1992. Oligoclonality of human intestinal intraepithelial T cells. *J.Exp.Med.* 175:57.
282. **Cohn, M.** 1994. The wisdom of hindsight. *Annu.Rev.Immunol.* 12:1.
283. **Mason, D.Y.** 1998. A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor. *Immunol.Today* 19:395.
284. **Cohn, M. and R.E. Langman.** 1990. The protection: the unit of humoral immunity selected by evolution. *Immunol.Rev.* 115:11.
285. **Cohn, M.** 1997. A new concept of immune specificity emerges from a consideration of the self-nonsel discrimination. *Cell Immunol.* 181:103.
286. **Nobrega, A., A. Grandien, M. Haury, L. Hecker, E. Malanchere, and A. Coutinho.** 1998. Functional diversity and clonal frequencies of reactivity in the available antibody repertoire. *Eur.J.Immunol.* 28:1204.

## 8. Anhang

### 8.1 Danksagung

Zunächst einmal möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dr. *H. FASOLD* sowie dem früheren Dekan des Fachbereichs 14 der *Johann Wolfgang Goethe-Universität*, Herrn Prof. Dr. *B. LUDWIG*, für die Übernahme in den Fachbereich *Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften* bedanken, was eine essentielle Voraussetzung für die Anfertigung der vorliegenden Dissertationsschrift bildete.

Herrn Prof. Dr. Dr. *H. FASOLD* danke ich vielmals für seine spontane und unkonventionelle Hilfe im Juli des Jahres 1996 sowie seine Bereitschaft, meine Promotion extern zu betreuen.

Außerordentlichen Dank schulde ich auch dem Direktor der Medizinischen Klinik II der *JWG-Universität*, Herrn Prof. Dr. med. *W. F. CASPARY*, für seine freundliche Aufnahme in das Zentrum der Inneren Medizin (*ZIM*) sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes innerhalb des Gastroenterologischen Funktionslabors, ohne den die praktische Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin gilt meinem Betreuer Herrn Dr. med. *WOLFGANG HOLTMEIER* spezieller Dank für die Überlassung des Themas sowie seine tatkräftige Unterstützung. Außerdem danke ich unseren medizinischen Doktorandinnen und Doktoranden *JUDITH KÄLLER*, *WIEBKE GEISEL* und *MICHAEL PFÄNDER* sowie unserer Technischen Angestellten *SUNITA BAHNIK*, die mir bei der Lösung fachlicher Fragestellungen und der Bewältigung alltäglicher Probleme stets hilfsbereit und freundschaftlich zur Seite standen.

An dieser Stelle möchte ich mich besonders herzlich bei der leitenden Technischen Angestellten des Gastrolabors, Frau „Ubi“ *URSULA BIENIEK* bedanken, welche im Verlauf der letzten 4 Jahre zahllose kritische Situationen des Laboralltags nicht nur mit bewundernswerter Geduld sondern zugleich mit süffisantem Humor meisterte und sich deshalb allzuoft als „Retterin in der Not“ erwies !

Im Rahmen bestehender Kooperationen mit anderen medizinischen Forschungseinrichtungen wendet sich mein Dank insbesondere an Herrn Prof. Dr. R. PABST sowie Herrn Priv.-Doz. Dr. H. J. ROTHKÖTTER von der Abteilung für angewandte und funktionelle Anatomie der *Medizinischen Hochschule Hannover (MHH)*, Herrn Prof. Dr. R. DUCHMANN und Dr. EKKEHARD MAY von der *Universität des Saarlandes* bzw. der *Johannes Gutenberg-Universität* zu Mainz sowie an Dr. med. THOMAS ZOLLNER vom Zentrum für Dermatologie und Venerologie (ZDV) der *Johann Wolfgang Goethe-Universitätsklinik* Frankfurt am Main.

Außerdem danke ich meinem langjährigen Studienfreund Dr. phil. nat. STEPHAN WEBER für seine außerordentliche Unterstützung bei der Ergebnisniederschrift sowie allen Mitgliedern des Transplantationsimmunologischen Labors der *JWG-Universitätsklinik*, die mir vor allem im Zusammenhang mit der selektiven Anreicherung spezieller Lymphozytensubpopulationen sehr behilflich waren.

Ferner möchte ich mich bei folgenden Kolleginnen und Kollegen der Medizinischen Klinik II und des Gastrolabors für ihre Kooperations- und Hilfsbereitschaft bedanken:

Dr. Bora Akoglu, Dr. Ruth Bauske, Dr. Barbara Braden, Dr. Angela Brieger, Katharina Bruch, Marjan Dadnia, Regina Deiß, Dr. Dr. Robert Elez, Dr. Dominik Faust, Frau Angela Fiacré, Katja Ganz, Tanja Gaschott, Tanja Hardt, Bianca Ihoglin, Karen Immel, Angela Jordan, Dorothea Kreuz, Dr. Bernd Kronenberger, Dr. Jung-Hung Lee, Dr. Vladan Milovic, Lydia Murzynski, Manuela Padberg, Sandra Paßmann, Dr. Dr. Albrecht Piieler, Agathe Pirsohn, Dr. Joachim Rädle, Katrin Raschke, Frau Petra Robinson, Manuel Rodriguez, Karin Ruhöfer, Dr. Brigitte Rüter, Raluca Saplacon, Dr. Oliver Schröder, Inga Teller, Dr. Jörg Trojan, Dr. Ludmila Turchanova, Astrid Wächtershäuser, Nicole Weber, Frau Regine Weber, Iris Weinand, Freya Wolter, Se-Jong Yow und Maren Zores.

Schließlich gehört mein ganz herzlicher und persönlicher Dank meinen Eltern sowie meiner Freundin SONJA ANTONIA THALER für ihre moralische Unterstützung, die konstruktive Kritik und nicht zuletzt für die Geduld, welche sie mir während der Abfassung dieser Dissertationsschrift entgegenbrachten.

## 8.2 Wissenschaftliche Publikationen

- 1] Galibert F, Alexandraki D, Baur A, Boles E, Chalwatzis N, Chuat JC, Coster F, Cziepluch C, De Haan M, Domdey H, Durand P, Entian KD, Gatus M, Goffeau A, Grivell LA, Hennemann A, Herbert CJ, Heumann K, Hilger F, Hollenberg CP, Huang ME, Jacq C, Jauniaux JC, Katsoulou C, Karpfinger-Hartl L, et al. Complete nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome X. *EMBO Journal*, Vol. 15 (9): 2031-49, 1996.
- 2] Holtmeier W, Witthoeft T, Hennemann A, Winter HS, Kagnoff MF. The TCR- $\delta$  repertoire in human intestine undergoes characteristic changes during fetal to adult development. *J.Immunol.*, Vol. 158: 5632-5641, 1997.
- 3] Holtmeier W, Hennemann A, Caspary WF. IgA and IgM V<sub>H</sub> repertoires in human colon: Evidence for clonally expanded B cells which are widely disseminated. *Gastroenterology*, Vol. 119 (5): 1253-66, 2000.
- 4] Holtmeier W, Pfaender M, Hennemann A, Zollner TM, Kaufmann R, Caspary WF. The TCR  $\delta$  repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR  $\delta$  repertoire in the peripheral blood. *J. Invest. Dermatology*, Vol. 116: 275-280, 2001.
- 5] Holtmeier W, Hennemann A, May E, Duchmann R, Caspary WF. TCR  $\delta$  repertoire in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* (resubmitted 2001).
- 6] May E, Lambert C, Holtmeier W, Hennemann A, Zeitz M, Duchmann R. Topographic characteristics and diversity of the  $\alpha\beta$  T cell repertoire in the colon of healthy individuals and patients with Crohn's disease. *Gut* (submitted 8/00).

### Abstracts

- 1] May E, Lambert C, Holtmeier W, Hennemann A, Meyer zum Bueschenfelde KH, Duchmann R. Ubiquitous and local TCRAB+ T cell expansions form complex networks in normal colonic mucosa. *Gut* 41:117, 1997.
- 2] Holtmeier W, Hennemann A, May E, Carding SR, McVay LD, Duchmann R, Caspary WF. The T cell receptor delta repertoire in normal and inflamed human intestine. *AGA, New Orleans, U.S.A., 1998.*
- 3] May E, Holtmeier W, Hennemann A, Meyer zum Bueschenfelde KH, Duchmann R. T cells expanded *in vitro* by antigens from the intestinal flora are present in involved Crohn's disease mucosa. *AGA, New Orleans, U.S.A., 1998.*

- 4] Holtmeier W, Hennemann A, Caspary WF. Molecular analysis of the junctional diversity of IgA heavy chains in human intestine and peripheral blood: Evidence for oligoclonal IgA B cell expansions in healthy subjects. *AGA, New Orleans, U.S.A., 1998.*
- 5] Holtmeier W, Hennemann A, May E, Carding SR, McVay L, Duchmann R, Caspary WF.  $\delta$  T cell receptor repertoire in the skin of normal adults and in patients with *dermatitis herpetiformis*. *AGA, Orlando, U.S.A, 1999.*
- 6] Holtmeier W, Kaeller J, Hennemann A, Rothkoetter HJ, Pabst R, Caspary WF. Compartmentalization of the porcine TCR  $\gamma\delta$  repertoire at mucosal sites. *Jahrestagung der DGI, Hannover, 1999.*

## 8.3 Abkürzungsverzeichnis

### A

$\alpha 4\beta 7$	mukosales Adressin, Ligand von MAdCAM-1
$\alpha E\beta 7$	mukosales Adressin (HML-1), Ligand von E-Cadherin
AA	<b>amino acid</b>
Amp	<b>Ampicillin</b> (D- $\alpha$ -Aminobenzylpenicillin)
APC	<b>antigen presenting cell</b>
APS	<b>Ammoniumpersulfat</b>
ATP	<b>Adenosintriphosphat</b>

### B

$\beta$ -Gal	$\beta$ - <b>Galaktosidase</b>
bp	<b>base pair</b>
BSA	<b>bovine serum albumin</b> (Rinderserumalbumin)

### C

CD	<b>cluster of differentiation</b>
CD1	MHC I-Klasse ähnliches, Enterozyten spezifisches Antigen
CD19	B-Zell spezifisches Oberflächenantigen
CD2	<i>pan</i> T-Zell „marker“ (LFA-2); bindet spezifisch an SRBC
CD25	$\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors (spezifisch für aktivierte T-Lymphozyten)
CD28	Rezeptor des kostimulatorischen Liganden B7
CD3	<i>pan</i> T-Zell Oberflächenantigen
CD4	Korezeptor $\alpha\beta^+$ T-Helferzellen (Th)
CD45RA	Oberflächenantigen, welches spezifisch für unstimulierte T-Zellen ist
CD45RO	Oberflächenantigen, das von „Gedächtnis“ T-Zellen exprimiert wird
CD5	<i>pan</i> T-Zell-Oberflächenantigen
CD69	Oberflächenantigen, welches aktivierte T-Zellen auszeichnet
CD8	Korezeptor zytotoxischer oder „Suppressor“ $\alpha\beta^+$ T-Zellen (Ts)
CD95	<i>fas</i> (Apoptose induzierender Rezeptor)
cDNA	<b>complementary DNA</b>
CDR3	<b>third complementarity determining region</b> (antigenbindende Rezeptordomäne)
CED	<b>chronisch entzündliche Darmerkrankungen</b> ( <i>M.Crohn</i> , <i>C.ulcerosa</i> )
CFU	<b>colony forming units</b> (koloniebildende Einheiten)

### D

DC	<b>dendritic cells</b>
<i>dd</i> NTP	2',3'- <b>Didesoxynukleosid-Triphosphat</b>
DEPC	<b>Diethylpyrocarbonat</b>
DETC	<b>dendritic epidermal T-cells</b>
DHD	<b><i>Dermatitis Herpetiformis Duhring</i></b>
DNA	<b>Desoxyribonucleic acid</b>
DNase	<b>Desoxyribonuklease</b>
dNTP	3'- <b>Desoxynukleosid-Triphosphat</b>
<i>ds</i> DNA	<b>double stranded DNA</b> (doppelsträngige DNA)
DTT	<b>Dithiothreitol</b>

**E**

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	enzyme commission
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-Natriumsalz (= <i>Titriplex® III</i> )
EM	Erstmanifestation (einer Erkrankung)
EtBr	Ethidiumbromid

**F**

FasL	<i>fas</i> -Ligand (CD95 spezifisches 40 kD-Homotrimer)
FCS	fetal calf serum (fetales Kälberserum)
FDC	follicular dendritic cells (follikuläre dendritische Zellen)

**G**

g	gravity (relative Erdbeschleunigung)
GALT	gut-associated lymphoid tissue
GM-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor
GvHR	graft-versus-host reaction (Allotransplantat-Reaktion gegen Empfänger)

**H**

Hepes	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HEV	high endothelial venules (postkapilläre Venolen lymphoider Organe)
HLA	human lymphocyte associated antigen
HPLC	high performance liquid chromatography
HSP	Hitzeschockprotein(e)

**I**

IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN- $\gamma$	Gamma-Interferon (Typ II-Interferon)
IL-2	Interleukin-2
IL-4	Interleukin-4
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -(D)-Thiogalaktopyranosid

**K**

kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
KGF	keratinocyte growth factor (Keratinozyten-Wachstumsfaktor)

**L**

LB	<i>Luria-Bertani</i> Agar
LCL	latent cutaneous leishmaniosis ( <i>amerikanische kutane Leishmaniose</i> )
LP	<i>Lamina propria</i>
LPL	<i>Lamina propria</i> Lymphozyten

**M**

MAdCAM-1	<b>m</b> ucosal <b>a</b> dressin <b>c</b> ell <b>a</b> dhesion <b>m</b> olecule 1 (mukosales Adressin)
MBP	<b>m</b> ajor <b>b</b> asic <b>p</b> rotein
mcs	<b>m</b> ultiple <b>c</b> loning <b>s</b> ite (multiple Klonierungsregion)
MHC	<b>m</b> ajor <b>h</b> istokompatibility <b>c</b> omplex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MLN	<b>m</b> esenterial lymph <b>n</b> odes (mesenteriale Lymphknoten)
MMLV	<b>m</b> urine- <b>m</b> oloney leukemia virus
MOPS	<b>M</b> orpholinopropansulfonsäure
mRNA	<b>m</b> essenger- <b>r</b> ibonucleic <b>a</b> cid (Boten-Ribonukleinsäure)
MS	<b>M</b> ultiple <b>S</b> clerose
MW	<b>m</b> olecular <b>w</b> eight

**N**

NAD <sup>+</sup>	<b>N</b> ikotinamidadeninukleotid (oxidiert)
NBT	<b>N</b> itroblau-Tetrazoliumchlorid
ng	<b>N</b> anogramm (1 ng = 10 <sup>-3</sup> µg)
nm	<b>N</b> anometer (10 <sup>-9</sup> m)
dNTP	<b>d</b> esoxy- <b>N</b> ukleosid- <b>T</b> riphosphat

**O**

OD <sub>260</sub>	<b>O</b> ptische <b>D</b> ichte bei der Wellenlänge λ = 260 nm
-------------------	--

**P**

PBL	<b>p</b> eripheral <b>b</b> lood lymphocytes (zirkulierende Lymphozyten)
PBMC	<b>p</b> eripheral <b>b</b> lood <b>m</b> ononuclear <b>c</b> ells (periphere mononukleäre Zellen)
PBS	<b>p</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline (phosphatgepufferte Saline, p <sub>H</sub> = 7,2)
PCR	<b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	<b>P</b> robeexzision
PEG	<b>P</b> olyethylenglykol
P <sub>i</sub>	<b>p</b> hosphat <b>i</b> norganic (anorganisches Phosphat)
PP	<b>P</b> eyer'sche <b>P</b> laques
ppi	<b>P</b> yrophosphat
ppm	<b>p</b> arts <b>p</b> er <b>m</b> illion
PTFE	<b>P</b> oly- <b>T</b> etrafluorethylen ( <i>Teflon</i> ®)
pUC	<b>p</b> lasmid from <b>U</b> niversity of <b>C</b> alifornia

**R**

RA	<b>R</b> heumatoide <b>A</b> rthritis
RCF	<b>r</b> elative <b>c</b> entrifugal <b>f</b> orce [RCF = 1,12 r <sub>max</sub> x (rpm/1000) <sup>2</sup> ]
RNA	<b>r</b> ibo <b>n</b> ucleic <b>a</b> cid (Ribonukleinsäure)
RNase	<b>R</b> ibonuklease
rpm	<b>r</b> ounds <b>p</b> er <b>m</b> inute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI-1640®	Zellkulturmedium ( <i>GIBCO BRL</i> )
RT	<b>R</b> aumtemperatur

**S**

SAP	<b>sh</b> rimp <b>alkaline phosphatase</b> (Alkalische Phosphatase)
SDS	<b>sodium dodecyl sulfate</b> (Natriumlaurylsulfat)
SRBC	<b>sheep red blood cells</b> (Schafserythrozyten)
ssDNA	<b>single stranded DNA</b>
SSW	<b>Schwangerschaftswoche</b>

**T**

TBE	<b>Tris/Borat/EDTA</b> (Elektrophoresepuffer, $p_H = 8,3$ )
TCR	<b>T-cell receptor</b>
TdT	<b>terminale Desoxynukleotidyl-Transferase</b>
TEMED	<b>N,N,N,'N'</b> - <b>Tetramethyl-Ethylendiamin</b>
Th1	<b>T-Helfer</b> Lymphokinprofil (1): IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha/\beta$ $\Rightarrow$ DTH-Antwort
Th2	Lymphokinprofil (2): IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 $\Rightarrow$ allergische Reaktion
TIFF	<b>tagged image file format</b> (Bilddateiformat für PC)
$T_m$ -Wert	Temperatur bei 50%iger „Primer“bindung an die Matrizen-DNA
TNF- $\alpha$	<b>Tumor-Nekrose-Faktor alpha</b> (sekretorische Form = 17,5 kDa)
Tris	<b>Tris</b> (hydroxymethyl-) aminomethan

**X**

X-Gal	5-Brom-, 4-chlor-, 3-indolyl- $\beta$ -(D)- <b>Galaktopyranosid</b>
-------	---

## 8.4

**ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit, daß ich mich bisher keiner Doktorprüfung unterzogen habe.

Frankfurt am Main, den 31. 10. 2000 .....



.....  
(Andreas Hennemann)

**Eidesstattliche Versicherung**

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, daß ich die im Fachbereich 14 der *JWG-Universität* in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. *H. FASOLD* entstandene und zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Molekularbiologische Charakterisierung des humanen Rezeptor Repertoires intestinaler  $\gamma/\delta$  T-Zellen sowie IgA und IgM exprimierender B-Lymphozyten**

selbständig angefertigt und mich anderer Hilfsmittel als der in ihr angegebenen nicht bedient habe, insbesondere, daß aus Schriften Entlehnungen, soweit sie in der Dissertation nicht ausdrücklich als solche mit Angabe der betreffenden Schrift bezeichnet sind, nicht stattgefunden haben.

Frankfurt am Main, den 31. 10. 2000 .....



.....  
Andreas Hennemann

Die praktische Durchführung der Experimente erfolgte extern innerhalb der Medizinischen Klinik II im Zentrum der Inneren Medizin (ZIM) der *Johann Wolfgang Goethe-Universität* Frankfurt/Main unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. *W. F. CASPARY*.

Teilinhalte dieser Dissertation wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

- 1] Holtmeier W, Witthoeft T, Hennemann A, Winter HS, Kagnoff MF. The TCR- $\delta$  repertoire in human intestine undergoes characteristic changes during fetal to adult development. *J.Immunol.*, Vol. 158: 5632-5641, 1997.
- 2] Holtmeier W, Hennemann A, Caspary WF. IgA and IgM V<sub>H</sub> repertoires in human colon: Evidence for clonally expanded B cells which are widely disseminated. *Gastroenterology*, Vol. 119 (5): 1253-66, 2000.
- 3] Holtmeier W, Pfaender M, Hennemann A, Zollner TM, Kaufmann R, Caspary WF. The TCR  $\delta$  repertoire in normal human skin is restricted and distinct from the TCR  $\delta$  repertoire in the peripheral blood. *J. Invest. Dermatology*, Vol. 116: 275-280, 2001.
- 4] Holtmeier W, Hennemann A, May E, Duchmann R, Caspary WF. TCR  $\delta$  repertoire in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* (resubmitted 2001).

## 8.5 Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name	<b>Hennemann</b>
Vorname	<b>Andreas</b> Volker
Geburtsort	Frankfurt am Main
Geburtsdatum	03.08.1964
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

### Eltern

Klaus Karl Hennemann	Dipl. Ing.
Rosemarie Hennemann	Krankenschwester, seit 1992 Personalratsvorsitzende der Städtischen Kliniken Frankfurt am Main Höchst

### Schulbildung

Grundschule	Aug. 1971 - Jun. 1975 <i>Heiligstockschule, Hofheim am Taunus</i>
Integrierte Förderstufe	Aug. 1975 - Jun. 1978 <i>Brühlwiesenschule, Hofheim am Taunus</i>
Gymnasium	Aug. 1978 - Jun. 1986 <i>Wöhlerschule, Frankfurt am Main</i>
Schulabschluß <b>Abitur</b>	Jun. 1986 (Abschlußnote: 1,5)

### Berufsausbildung

Studium	Okt. 1986 - Jun. 1994 <i>J.W. Goethe-Universität, Frankfurt/M.</i>
Hauptfach Nebenfächer	Mikrobiologie Biochemie, Botanik
Diplomarbeit im FB 15 (Biologie und Informatik)	
<u>Titel:</u>	„Sequenz- und Funktionsanalyse von Genen der Chromosomen II und X von <i>S. cerevisiae</i> .“
Studienabschluß <b>Diplom</b>	Jun. 1994 (Abschlußnote: „sehr gut“)

Beteiligung an BMBF- Verbundprojekten	Jul. 1994 - Jul. 1996  Molekularbiologische Funktionsanalysen an der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .  „Untersuchungen des vakuolären Stoff- wechsels und der Osmosensitivität in Genzerstörungsmutanten der Hefe <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> sowie Herstellung konditional letal Mutanten.“  (BMBF-Geschäftszeichen AZ 1510 427 75 1634 384)  Institut für Mikrobiologie der <i>JWG-Universi- tät</i> Ffm. (Prof. <i>K.D. Entian</i> )
Promotion im FB 14 (Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften)	Aug. 1996 - Mär. 2001
<u>Titel:</u>	„Molekularbiologische Charakterisierung des humanen Rezeptor Repertoires intes- tinaler $\gamma/\delta$ T-Zellen sowie IgA und IgM exprimierender B-Lymphozyten.“  (DFG-Geschäftszeichen: Ho 1521/2-1, Ho 1521/2-2)  Medizinische Klinik II der <i>JWG-Universitat</i> Ffm. (Prof. <i>H. Fasold/Prof. W.F. Caspary</i> ) (Abschluß mit: „magna cum laude“)

### Zusatzqualifikationen

EDV-Kenntnisse	MS Office 97, Clone 4.1, PC/GENE, Omega 1.3
----------------	--

### Studienbegleitende Beschäftigungen

Praktikum	Apr. 1990 - Jun. 1990 „Methoden der Molekularbiologie und Virologie.“  Institut für Virusforschung, Frankfurt/Main
Städtische Kliniken Frankfurt am Main Höchst	Patiententransport 1986 - 1992

### Besonderheiten

Hobby	Klavier
-------	---------