

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

Direktor: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

&

dem Institut für Molekulare Immunologie GSF Forschungszentrum für Umwelt
und Gesundheit

Institutsleiterin: Prof. D.J. Schendel, PhD

Häufigkeit Chemokinrezeptor exprimierender $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Natürlicher Killer T-Zellen im Nabelschnurblut und peripheren Blut Erwachsener



Dissertation

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

vorgelegt von
Korinna Nadas
aus München

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. S. Krauss-Etschmann
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. M. Schmetzer
Priv. Doz. Dr. W. Fischer
Promovierter Mitbetreuer: Dr. med. Dominik Hartl
Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung: 08.11.2007

Für meine Familie und Freunde

INHALTSVERZEICHNIS

1	<u>EINLEITUNG</u>	4
1.1	Angeborene und erworbene Immunität.....	4
1.2	Die Natürliche Killer T-Zelle	5
1.3	Chemokine	9
1.4	Chemokinrezeptoren.....	10
1.5	Chemokinrezeptoren auf NKT-Zellen.....	14
2	<u>ZIELSETZUNG</u>	14
3	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	15
3.1	Probanden.....	15
3.2	Methoden.....	16
3.2.1	<i>Isolierung der Lymphozyten aus Vollblut (VB)</i>	16
3.2.2	<i>Antikörperfärbung</i>	17
3.2.3	<i>Durchflusszytometrie</i>	19
3.2.4	<i>Auswertung</i>	22
3.2.5	<i>Statistische Methoden</i>	23
3.3	Material.....	24
3.3.1	<i>Geräte</i>	24
3.3.2	<i>Glas- und Plastikmaterial</i>	24
3.3.3	<i>Chemikalien und Puffer</i>	25
3.3.4	<i>Antikörper</i>	26
4	<u>ERGEBNISSE</u>	27
4.1	Probanden.....	27
4.2	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ NKT-Zellen	28
4.3	Chemokinrezeptorexpression von NKT-Zellen	29
4.3.1	<i>Chemokinrezeptoren auf Vα24⁺Vβ11⁺ NKT-Zellen in Nabelschnurblut und in peripherem Blut Erwachsener</i>	29
5	<u>DISKUSSION</u>	42
5.1	Probanden.....	42
5.2	Durchflusszytometrie	43
5.3	NKT-Zellen in NSB und in peripherem Blut Erwachsener.....	44
5.4	Chemokinrezeptoren auf Vα24 ⁺ Vβ11 ⁺ NKT-Zellen in Nabelschnurblut und Blut Erwachsener.....	45
6	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	49
7	<u>ANHANG</u>	50
7.1	Literaturverzeichnis	50
7.2	Abbildungsverzeichnis	61
7.3	Tabellenverzeichnis	62
7.4	Danksagung	63
7.5	Lebenslauf.....	64

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
CCR, CXCR	Chemokinrezeptor
CD	Cluster of differentiation
CD4 ⁺	CD4 positiv
CD8 ⁺	CD8 positiv
CDR2, 3	Complementarity determining region 2, 3
ELC	Epstein-Barr virus induced molecule-1 ligand chemokine
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FITC	Fluorescein-isothiocyanate
FSC	Forward light scatter
GCP	Granulocyte chemotactic protein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon- γ
IP-10	γ -interferon-inducible protein-10
I-TAC	Interferon inducible T-cell chemoattractant
KO	Kontrollgruppe der Erwachsenen
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MDC	Macrophage-derived chemokine
MHC	Major histocompatibility complex
MIG	Monokine induced by γ -interferon
Min	Minute(n)
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
MPIF	Myeloid progenitor inhibitory factor
μ l	Mikroliter
NK	Natürliche Killerzelle
NKT	Natürliche Killer T-Zelle

NSB	Nabelschnurblut
PBS	Phosphate buffered saline
PC5	Phycoerythrin-Cyanin 5.1
PE	Phycoerythrin
RANTES	Regulated on activation normal T-cell expressed and secreted
SLC	Secondary lymphoid organ chemokine
SSC	Sidescatter
SSW	Schwangerschaftswoche
T _{CM}	Central-memory-T-cell
T _{EM}	Effector-memory-T-cell
TARC	Thymus-and activation-regulated chemokine
TECK	Thymus expressed chemokine
TZR	T-Zell-Rezeptor
VB	Vollblut

1 EINLEITUNG

1.1 Angeborene und erworbene Immunität

Das humane Immunsystem wird einerseits unterteilt in ein zelluläres und ein humorales Abwehrsystem und zum anderen in eine "spezifische" (adaptive) und "unspezifische" (angeborene) Komponente. Zu dem zellulären System zählt man die dem angeborenen Teil zugehörigen Granulozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und Natürlichen Killer-Zellen, sowie die antigenspezifischen B- und T-Lymphozyten der adaptiven Abwehr. Zytokine und das Komplementsystem sowie spezifische Antikörper, die von aktivierten B-Zellen nach Kontakt ausgeschüttet werden, rechnet man zum humoralen Teil.

Das Prinzip einer effektiven Immunabwehr beruht auf dem Erkennen von körperfremden Antigenen im Organismus. Beim spezifischen Abwehrsystem erfolgt dies über Rezeptoren, welche sich aus einem konstanten und einem variablen Teil zusammensetzen. In Gruppen angeordnete Gensegmente codieren die variable Region eines Rezeptors. Durch zufällige Kombination verschiedener Genabschnitte während der Lymphozytenentwicklung entsteht ein Rezeptor mit einmaliger Spezifität. Die folgende klonale Expansion bringt Lymphozyten mit identischer Antigenspezifität hervor (46). Die Rezeptoren des adaptiven Immunsystems zeichnen sich daher durch eine hohe Spezifität und enorme Rezeptorvielfalt aus.

Das angeborene Immunsystem setzt sich aus einem physiko-chemischen Teil in Form von Haut- und Schleimhautbarrieren, löslichen Faktoren wie dem Komplementsystem und einem zellulären Anteil wie Granulozyten, Natürlichen Killerzellen, Dendritischen Zellen und T-Zellen zusammen. Die angeborene Immunität basiert auf keimbahncodierten Rezeptoren, die eine beschränkte Anzahl von konservierten, pathogen-assoziierten Molekülen erkennen. Die breite Spezifität dieser Rezeptoren wird folglich vererbt und es erfolgt, im Gegensatz zur adaptiven Immunität, keine Rekombination mehrerer Gensegmente (46).

1.2 Die Natürliche Killer T-Zelle

Natürliche Killer T (NKT)-Zellen sind eine besondere Population der T-Lymphozyten. Ihre Häufigkeit im Blut liegt bei 0,01 bis 0,2% der Lymphozyten. Erstmals wurden sie 1987 von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen im Mausmodell beschrieben (16;32). NKT-Zellen sind CD3 positiv und können phänotypisch in drei Untergruppen eingeteilt werden: CD4⁺, CD4⁻ CD8⁻ (DN) und CD8⁺ (21;22). Letztere bilden die quantitativ kleinste Gruppierung. Neben dem T-Zellrezeptor (TZR) exprimieren die meisten NKT-Zellen CD161 bzw. das homologe NK 1.1 in der Maus, welches sonst ausschließlich auf Natürlichen Killerzellen vorkommt. Aufgrund dieser strukturellen Gemeinsamkeiten mit T-Zellen und NK-Zellen erfolgte die Namensgebung der NKT-Zellen.

Zusätzlich werden unregelmäßig weitere NK-Oberflächenmarker exprimiert (CD69 und CD122) (81), die ebenfalls am Genlocus der NK-Zellen kodiert sind. Andere klassische NK-Oberflächenmarker wie CD16, CD57 und CD94 sind dagegen nicht auf NKT-Zellen zu finden (2).

NKT-Zellen nehmen offenbar eine Intermediärstellung zwischen angeborener und adaptiver Immunität ein, da sie Eigenschaften beider Systeme vereinen: Ähnlich NK-Zellen werden NKT-Zellen in der Anfangsphase einer Immunreaktion aktiviert und regulieren die Abwehrreaktion durch Zytokinausschüttung und Zytotoxizität. Dies spricht für ihre Zugehörigkeit zur angeborenen Immunität. Jedoch besitzen NKT-Zellen einen TZR, der zur spezifischen Erkennung von Glykolipid-Antigenen dient (94;98). Des Weiteren exprimieren NKT-Zellen Oberflächenmarker aktivierter Gedächtnis-T-Zellen wie CD45RO^{high}, CD45RB^{low}, CD62L^{low} und CD25^{high} und besitzen die Fähigkeit, bei Aktivierung sofort Effektorfunktionen zu leisten (21). Deshalb werden sie auch als spezielle Memory-T-Zell-Population angesehen (81).

Das leukozytenspezifische CD45 wird von einem einzigen Genkomplex auf Chromosom 1 kodiert und besitzt katalytische Funktion als Tyrosinphosphatase. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen, welche als phänotypische Marker Aufschluss über den funktionellen Zustand von T-Zellen geben können. Naive T-Zellen exprimieren in der Regel CD45RA

und weisen erst nach Antigenkontakt und Aktivierung CD45RO – die Isoform aktivierter Gedächtniszellen – auf (46). Erstaunlicherweise tragen selbst NKT-Zellen aus dem Nabelschnurblut bereits CD45RO (20;99), was die Frage aufwirft, ob schon im Mutterleib Antigenkontakt stattgefunden hat oder ein endogener Ligand existiert.

Auf molekularer Ebene sind NKT-Zellen durch ihr stark eingeschränktes TZR-Repertoire gekennzeichnet. Der TZR ist ein Heterodimer, zusammengesetzt aus einer α - und einer β -Kette. Die einzelnen Ketten bestehen jeweils aus einem variablen und einem konstanten Abschnitt. Die α -Kette weist im variablen Teil die Segmenten V und J auf, die β -Kette besitzt zwischen V und J noch ein D-Segment. Durch die zufällige Zusammenlagerung von V-, D- und J-Genen bei konventionellen T-Zellen entsteht eine hohe Rezeptorvielfalt und stellt das Erkennen verschiedenster Antigene sicher. Die Variabilität wird durch zufälligen Einschub von drei bis sieben Nukleotiden zwischen die beiden Gensegmente V und J weiter erhöht. Diese sogenannte N-Region bildet auf Proteinebene die so genannte „third complementary-determining“ (CDR3)-Region, und tritt als Teil des TZR mit dem Antigen in Kontakt (46).

Bei humanen NKT-Zellen rearrangiert die TZR α -Kette ausschließlich AV24 mit AJ18 (Abb. 1) und hat im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen keine N-Nukleotide zwischen den V- und J-Segmenten (22;76). Die molekulare Identifizierung von NKT-Zellen wird durch diese strenge Monoklonalität der α -Kette ermöglicht. Weiterhin paart sich diese α -Kette mit einer polyklonalen β -Kette. Beim Menschen ist diese ausschließlich BV11.

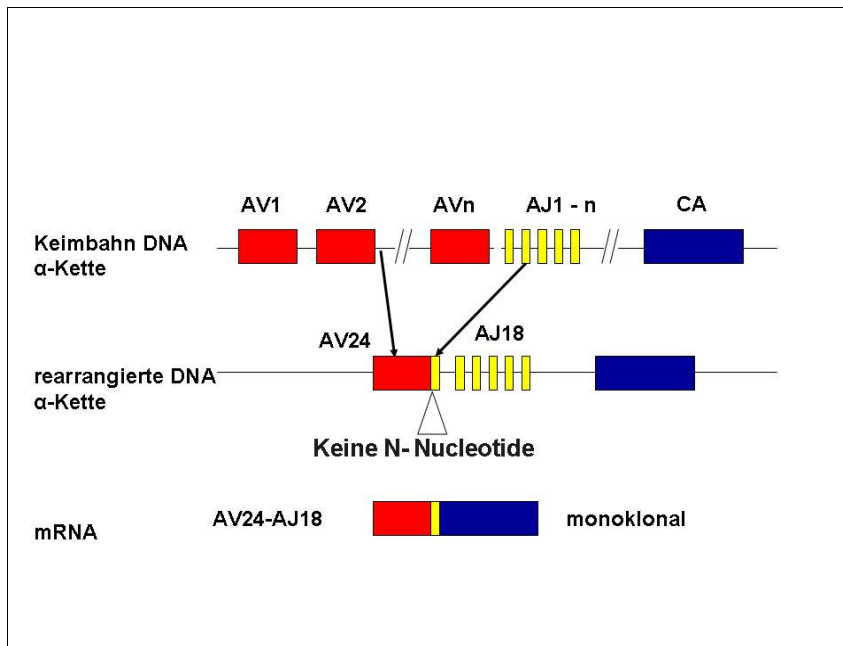


Abb. 1: Rearrangement der monoklonalen α -Kette AV24-AJ18 bei NKT-Zellen. Im Gegensatz zu konventionellen T-Zellen erfolgt kein Einschub von N-Nucleotiden zwischen den Segmenten V und J.

NKT-Zellen weisen aber nicht nur morphologisch, sondern auch funktionell Unterschiede zu konventionellen T-Zellen auf: Während T-Zellrezeptoren ihr jeweiliges MHC-Molekül via CDR1 und CDR2 und das darin gebundene Peptid mit CDR3 erkennen, interagieren NKT-Zellen ausschließlich mit CD1d-präsentierten Antigenen (13;91). CD1a-d sind, im Gegensatz zu den hochpolymorphen MHC-Molekülen, nicht-polymorphe Moleküle mit ähnlicher Zellverteilung wie MHC II. CD1d, welches unter anderem auf intestinalem Epithel und Antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird, stellt eine Ausnahme dar (77). Vor allem Lipide, Glykolipide und stark hydrophobe Peptide werden durch CD1d präsentiert (51;69). Die Frage nach dem natürlichen Ligand von NKT-Zellen ist weiterhin noch nicht ganz geklärt, jedoch wurde kürzlich ein endogenes lysosomales Glykospingolipid, Isoglobotrihexosylceramid (iGb3), als Bindungspartner identifiziert (106). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass auch bakterielle Bestandteile wie Zellwand-Glykospingolipide (GSL-4A und α -GlcUCer) von *Sphingomonas paucimobilis* (95), ein aus Mycobakterien gewonnenes Phosphatidylinositol

Mannosid (31) und ein Diacylglycerol aus *Borrelia burgdorferi* (BbGL-II) (54) NKT-Zellen aktivieren können (Abb. 2). In den meisten Studien wird jedoch α -Galactosyl-Ceramid (α -GalCer), gewonnen aus einem Meeresschwamm (*agelas mauritanicus*), als Modellantigen verwendet.

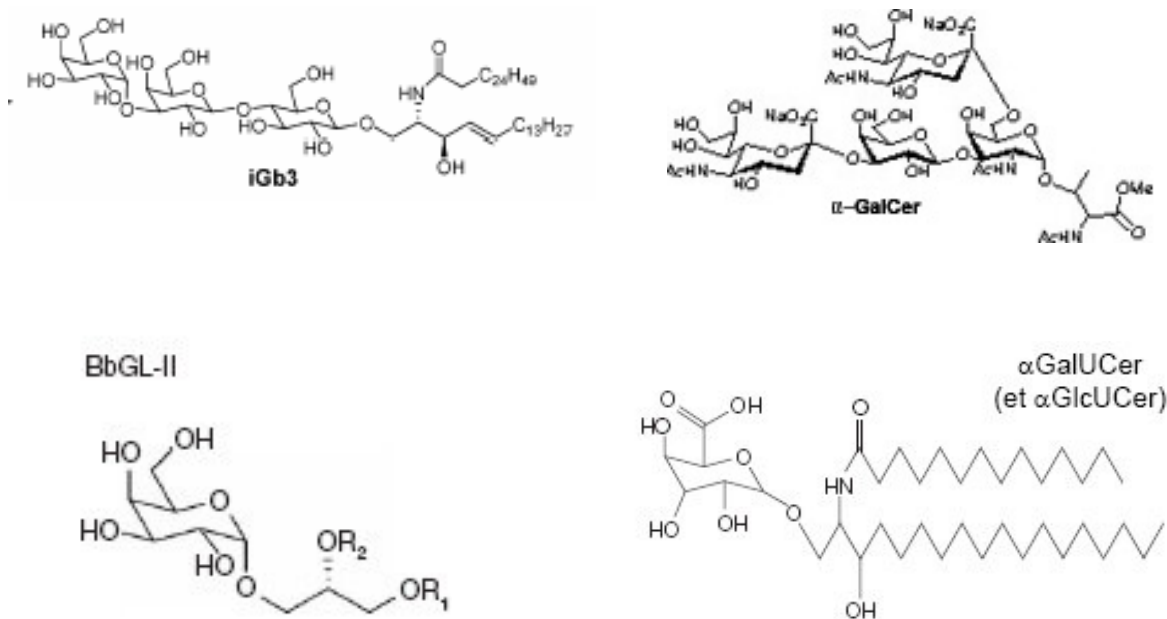


Abb. 2: Strukturformeln der Moleküle Isoglobotrihexosylceramid (iGb3), α -Galactosylceramid (α -GalCer), α -Glucuronosylceramid (α -GlcUCer) und Diacyl- α -Galactosylglycerol (BbGL-II)

Eine weitere Besonderheit von NKT-Zellen ist ihre Fähigkeit, in kurzer Zeit große Mengen an Interferon (IFN)- γ und Interleukin (IL)-4 zu produzieren (105). Dies lässt vermuten, dass NKT-Zellen an der Regulation sekundärer Immunantworten maßgeblich beteiligt sind. So konnte in *ex vivo* Studien bei Menschen eine Verminderung von NKT-Zellen bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I (101;102), rheumatoider Arthritis (61) und systemischem Lupus erythematoses (96) gezeigt werden, wohingegen bei Myasthenia gravis und Lepra ein Anstieg beschrieben wurde (63;82).

Eine Vielzahl von Untersuchungen, meist im Mausmodell, konnte die Rolle der NKT-Zellen bei Tumorrepression (19;92), Immuntoleranz nach Transplantation

(42;75;93) und Bekämpfung von bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen weiter aufklären (11;47). So verhindert der adoptive Transfer von NKT-Zellen im Nonobese diabetic (NOD-) Mausmodell die Entstehung von Diabetes mellitus Typ I in diesen Tieren (3;58). Die Behandlung von Mäusen mit α -GalCer zeigte, dass NKT-Zellen Methylcholanthren-induziertes Tumorwachstum mittels IFN- γ und wahrscheinlich auch direkter Zytotoxizität hemmen können (19;43;50;92). Auch humane NKT-Zellen weisen nach *in vitro* Stimulation hohe zytotoxische Aktivität gegen verschiedene Tumorklinien auf (50;64;68;97). In zahlreichen Transplantationsmodellen stellte sich heraus, dass NKT-Zellen bei der Toleranzentwicklung gegenüber Allo- bzw. Xenograft-Transplantaten eine wichtige Rolle spielen (45;89;93). Erst kürzlich legten Studien dar, dass selbst im Bereich der allergischen Erkrankungen NKT-Zellen eine Schlüsselfunktion besitzen (1;72). Im Mausmodell gelang es durch intravenöse und ebenso durch nasale Applikation von α -GalCer und somit Stimulation der NKT-Zellen, die Symptome beim allergischen Asthma drastisch einzudämmen (39;59). Allerdings konnten andere Arbeitsgruppen diesen Zusammenhang nicht bestätigen (79) und daher werden diese Ergebnisse in der Literatur kontrovers diskutiert.

1.3 Chemokine

Das humane Chemokinsystem umfasst mehr als 50 verschiedene Chemokine und 18 Chemokinrezeptoren (65). Chemokine sind eine Gruppe von Zytokinen mit chemotaktischer Wirkung, bestehend aus 70-125 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 6-14 kDa. Sie lassen sich strukturell in vier Gruppen unterteilen - je nach der Anzahl der Aminosäuren (dargestellt mit X) zwischen den ersten beiden Cysteinen (83):

- C-
- CC-
- CXC-
- CX₃C-Chemokine

In der ersten und letzten Gruppe gibt es jeweils nur einen Vertreter: Lymphotactin als C-Chemokin und Fraktalkin als CX₃C-Chemokin. Die primäre Funktion dieser Botenstoffe besteht darin, die gerichtete Zellwanderung entlang eines Konzentrationsgrades zu ermöglichen (sog. Chemotaxis), wie z.B. bei der Angiogenese und Metastasierung. Eine weitere wichtige Rolle spielen die Chemokine bei der Zellaktivierung und –reifung (Abb. 3).

Die CXC-Chemokine wirken hauptsächlich auf Neutrophile und aktivierte T-Lymphozyten chemotaktisch. Hingegen treten die CC-Chemokine vor allem mit Lymphozyten in Kontakt, jedoch nicht mit Neutrophilen.

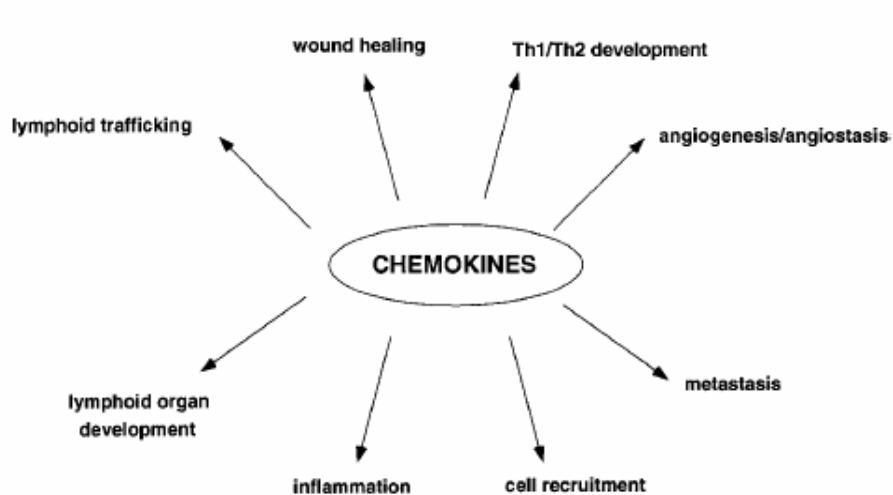


Abb. 3: Biologische Funktionen der Chemokine und deren Rezeptoren (Rossi D. and Zlotnik A., „the biology of chemokines and their receptors“, *Annu. Rev. Immunol.* 2000, 18:217-242)

1.4 Chemokinrezeptoren

Chemokinrezeptoren sind G-Protein gekoppelt, haben sieben transmembrane Domänen und sind 340-370 Aminosäuren lang. Sie werden nach den zugehörigen Chemokinen benannt, z.B. bindet der CCR1-Rezeptor CC-Chemokine. Die meisten Chemokine treten mit mehr als einem Rezeptor in Kontakt, wodurch ein komplexes Netzwerk entsteht.

Nach ihrer physiologischen Funktion werden sie in inflammatorische und homöostatische Rezeptoren gegliedert (Abb. 4).

	Chemokine	Rezeptoren	Funktion
Inflammatorisch	I-TAC, MIG, IP10	CXCR3	Effektor T-Zellen
	CXCL16	CXCR6	Effektor T-Zellen
	RANTES, MIP-1 α , MCP-2, MCP-3	CCR1	Effektor T-Zellen
	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4	CCR2	Effektor T-Zellen
	Eotaxin-1, Eotaxin-2, Eotaxin-3, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MEC	CCR3	Effektor T-Zellen (Th2)
	RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-2	CCR5	Effektor T-Zellen (Th1)
	I309	CCR8	Effektor T-Zellen (Th2)
	Fractalkine	CX ₃ CR1	Effektor T-Zellen
	MDC, TARC	CCR4	Effektor T-Zellen (Th1, Th2), Memory T-Zellen (CLA), Thymozyten
	LARC	CCR6	Effektor T-Zellen, B-Zellen, Memory T-Zellen (CLA, $\alpha_4\beta_7$)
Homöostatisch	CTACK, MEC	CCR10	Memory T-Zellen (CLA)
	SDF-1	CXCR4	Naive, Memory T-Zellen, B-Zellen, Thymozyten
	BCA-1	CXCR5	Follikuläre B-Helfer-T-Zellen, B-Zellen
	SLC, ELC	CCR7	Naive, Central Memory T-Zellen (T _{CM}), B-Zellen, reife medulläre Thymozyten
	TECK	CCR9	Memory-T-Zellen ($\alpha_4\beta_7$), B-Zellen, unreife Thymozyten
	DC-CK1	unbekannt	Naive T-Zellen

Abb. 4: Einteilung der Chemokinrezeptoren und Chemokine in eine inflammatorische und homöostatische Klasse. Die Rezeptoren CCR4 und CCR6 lassen sich in keine der beiden Gruppen einteilen und sind deshalb weiß hinterlegt (modifiziert nach Moser B. et al., 2001, „lymphocyte traffic control by chemokines“, Nature Immunology, 2:123-128)

T-Lymphozyten besitzen nahezu alle Rezeptoren, deren Expression sich dem funktionellen Zustand der Zelle anpasst. Deshalb werden einzelne Rezeptoren als Marker für Aktivität, Reife und Differenzierungsgrad verwendet (65). Alle naiven T-Zellen exprimieren zum Beispiel den Rezeptor CCR7, ein Grossteil weiterhin die Rezeptoren CXCR4 und CCR9. Der Chemokinrezeptor CCR7 ermöglicht es T-Zellen, als Antwort auf die Chemokine SLC und ELC, aus den Gefäßen zu wandern und in T-Zell-Zonen der Lymphknoten und Peyer'schen Plaques einzudringen (52). In diesen sekundär lymphatischen Organen findet der Kontakt mit Antigenpräsentierenden Zellen statt, und ist somit bedeutsam für die Differenzierung und Aktivierung naiver T-Zellen zu Memory- und Effektor-Zellen.

Memory-T-Zellen können zudem anhand ihrer CCR7-Expression in zwei funktionell unterschiedliche Untergruppen eingeteilt werden: Central-Memory (T_{CM}) und Effektor-Memory-Zellen (T_{EM}) (57). Effektor-Memory-Zellen sind CCR7-negativ und exprimieren Chemokinrezeptoren, die für die Migration in entzündetes Gewebe notwendig sind (CCR1, CCR3 und CCR5). Durch Chemokinausschüttung von IL-4, IFN- γ und Perforin führen T_{EM} -Zellen sofortige Effektorfunktion aus (57;85). Central-Memory-Zellen sind dagegen CCR7⁺ und haben dadurch die Fähigkeit in lymphatisches Gewebe einzudringen. Dort weisen sie keine unmittelbare Effektorfunktion auf, sondern stimulieren Dendritische Zellen zur IL-12 Ausschüttung. Nach weiterer Aktivierung können T_{CM} -Zellen jedoch auch zu Effektor-Memory-Zellen differenzieren und direkte Abwehrfunktionen ausführen (57;85).

Anhand ihrer Chemokinrezeptorexpression und Zytokinausschüttung lassen sich T-Zellen weiter in Th1 und Th2-Zellen unterteilen (66). Die Rezeptoren CXCR3 und CCR5 finden sich auf Th1-Zellen, welche die Zytokine IFN- γ und IL-2 ausschütten (siehe Abb. 5). Diese Zytokine aktivieren hauptsächlich Makrophagen und Neutrophile, was zu einer direkten zellvermittelten Immunantwort mit Eradikation intrazellulärer Pathogene führt (66). Ein relatives Überwiegen der Th1-Immunantwort konnte bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Multipler Sklerose, rheumatoider Arthritis und Atherosklerose festgestellt werden (4;78).

Th2-polarisierte Zellen exprimieren hingegen überwiegend CCR3, CCR4, CCR8 und produzieren IL-4, IL-5 und IL-13, welche Mastzellen und Eosinophile stimulieren (siehe Abb. 5) (66). Die Interleukine 4 und 13 sind gemeinsam mit weiteren Faktoren in der Lage, in B-Zellen einen Isotypklassenwechsel zu IgE zu induzieren. Deshalb wird ein Überwiegen der Th2-Immunantwort unter anderem mit allergischen Entzündungsprozessen wie Asthma bronchiale oder allergischer Rhinitis in Verbindung gebracht (52;70).

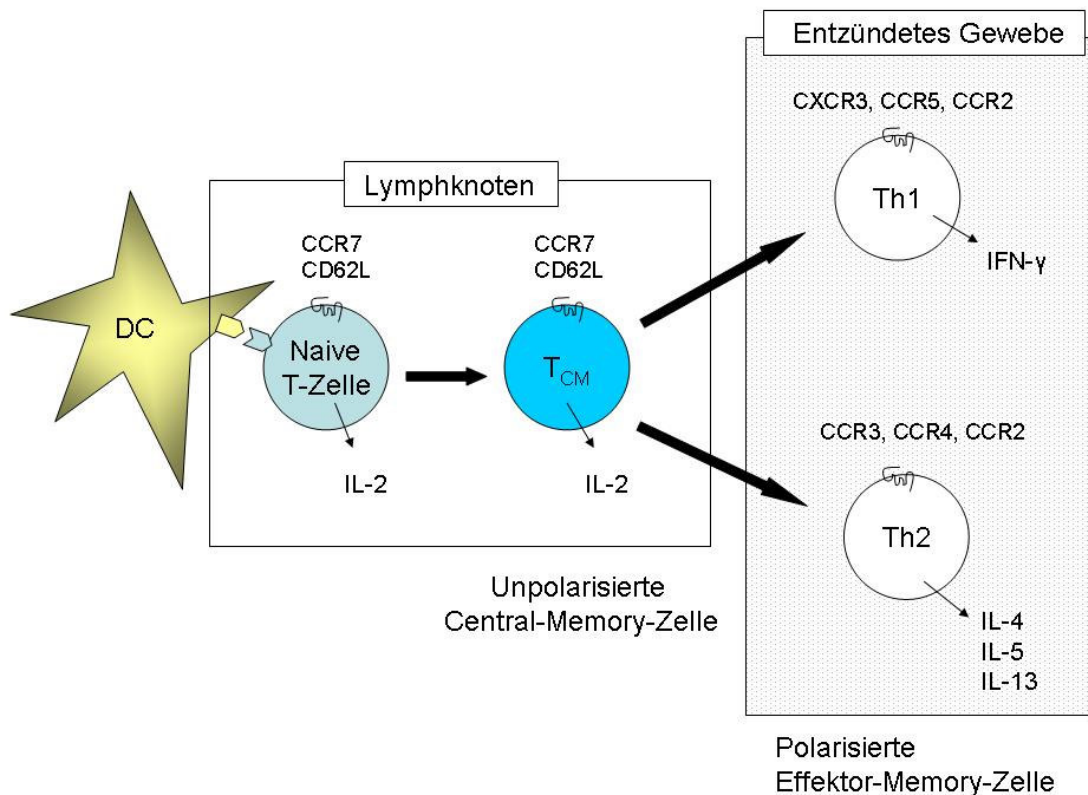


Abb. 5: Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen in Central-Memory-Zellen, Th1 und Th2-Zellen. Die Chemokinrezeptoren CXCR3 und CCR5 dienen als Marker für Th1 polarisierte T-Zellen, die Rezeptoren CCR3 und CCR4 charakterisieren Th2 polarisierte T-Zellen. DC=Dendritische Zelle, T_{CM}=Central-Memory-Zelle (Grafik modifiziert nach Sallusto F. und Lanzavecchia A., in „understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of the chemokine receptor expression“, Immunological Reviews, 2000).

1.5 Chemokinrezeptoren auf NKT-Zellen

Im Gegensatz zu humanen Neugeborenen findet man in der Maus kurz nach der Geburt keine NKT-Zellen. Diese lassen sich erst ab der vierten bis sechsten Lebenswoche nachweisen (5;71). Da es folglich nicht möglich ist, im Mausmodell fetale NKT-Zellen ohne externen Antigenkontakt zu untersuchen, existieren nur vereinzelte Experimente über humane NKT-Zellen aus Nabelschnurblut. Bei NKT-Zellen des Erwachsenen lassen sich die Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR3 und CXCR6 nachweisen (53). Diese Rezeptoren finden sich auch auf konventionellen T-Zellen, welche im nicht-lymphatischen Gewebe zirkulieren und mit Entzündungsprozessen assoziiert sind (73). Der Marker CXCR4 ist häufig auf naiven T-Zellen, B-Zellen und Monozyten zu finden und spielt beim „homing“ in das Knochenmark eine bedeutende Rolle. Dieser Chemokinrezeptor wird in einem hohen Prozentsatz auch auf NKT-Zellen im peripheren Blut Erwachsener exprimiert (53).

2 ZIELSETZUNG

Fetale NKT-Zellen sind eine besondere Zellpopulation, da im Gegensatz zu klassischen T-Zellen Aktivierungs- und Gedächtnismarker bereits *in utero* exprimiert sind. Darüber hinaus ist über den Phänotyp und die Funktion humaner, fetaler NKT-Zellen bisher jedoch wenig bekannt. Analogieschlüsse zum murinen System sind nicht möglich, da NKT-Zellen in der Maus erst nach dem ersten Lebensmonat nachweisbar sind.

Da humane NKT-Zellen im Uterus einer völlig anderen Umgebung als bei Erwachsenen ausgesetzt sind und vermutlich andere Aufgaben zu erfüllen haben, erwarteten wir ein abweichendes Chemokinrezeptorexpressionsmuster im Vergleich zu NKT-Zellen im peripheren Blut Erwachsener zu finden. Die Chemokinrezeptoren wurden als Surrogatmarker für das Migrationsverhalten bestimmt und können Hinweise auf weitere funktionelle Aufgaben der fetalen NKT-Zellen geben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, das Chemokinrezeptor-

expressionsmuster von NKT-Zellen des Nabelschnurblutes zu untersuchen, um so Rückschlüsse auf das Migrationsverhalten ziehen zu können. Wir stellten die Hypothese auf, dass fetale und NKT-Zellen des Erwachsenen unterschiedliche Effektorfunktionen besitzen und daher ein unterschiedliches Chemokinrezeptor-expressionsmuster aufweisen. Im Einzelnen wurden folgende Fragen gestellt:

- ◆ Unterscheidet sich das Verhältnis $CD4^+$ und $CD8^+$ NKT-Zellen im Nabelschnurblut im Vergleich zu peripherem Blut Erwachsener?
- ◆ Welche Chemokinrezeptoren lassen sich auf fetalen NKT-Zellen nachweisen?
- ◆ Gibt es Unterschiede im Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren innerhalb der $CD4^+$ und $CD8^+$ NKT-Zellen im Nabelschnurblut?
- ◆ Unterscheiden sich fetale NKT-Zellen im Chemokinrezeptorexpressionsmuster von NKT-Zellen Erwachsener?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Probanden

Es wurde plazentares, venöses Nabelschnurblut von klinisch gesunden Neugeborenen aus der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht. Als reif galten alle Säuglinge, die ab der vollendeten 37. Schwangerschaftswoche geboren wurden. Frühgeborene wurden primär nicht ausgeschlossen. Ausschlusskriterien waren alle Faktoren mit einem potentiellen Einfluss auf das fetale Chemokinexpressionsmuster. Im Einzelnen waren dies folgende Punkte:

- Hinweise auf Asphyxie während der Geburt (10-Minuten APGAR-Wert ≤ 7 , NSpH $< 7,1$)
- large-for-gestational age und small-for-gestational age
- Infektionszeichen der Mutter sub partu (Fieber $>38,5^\circ\text{C}$, Leukozyten $>15.000/\mu\text{l}$, CRP $>20\text{mg/l}$)

- Infektionszeichen des Neugeborenen (Rekapillarierungszeit >2“, CRP > 40 mg/l, klinischer Eindruck)

Weiterhin wurden retrospektiv alle Probanden ausgeschlossen, deren Blut mit mütterlichem IgA kontaminiert war. Dies wurde mittels ELISA im Routinelabor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München bestimmt.

Für die Kontrollgruppe wurde periphervenöses Blut von gesunden, freiwilligen Erwachsenen verwendet. Eine Allergie oder andere Erkrankungen wurden anamnestisch ausgeschlossen. Um eine Anämie (Hb<13,5g/dl für männliche Probanden, Hb<11,5g/dl für weibliche Probanden) oder Leukozytose (Leukozyten>1,2⁴/μl) zu erkennen, wurde ein maschinelles Differenzialblutbild im Routinelabor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals erstellt. Sowohl Anämie als auch Leukozytose stellten in der beschriebenen Kontrollpopulation ein Ausschlusskriterium dar.

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung der Lymphozyten aus Vollblut (VB)

Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte durch die Dichtezentrifugation nach der Beschreibung von Boyum et al. (1968). Hierfür wurden 8-10 ml Nabelschnurblut (NSB) aus der plazentaren Nabelvene bzw. 80 ml periphervenöses Blut (PVB) bei Erwachsenen mittels einer Spritze mit Natrium-Heparinzusatz entnommen. Das Blut wurde im Verhältnis 1:5 (NSB) bzw. 1:3 (PVB) mit PBS verdünnt und vorsichtig auf eine Ficoll-Schicht im Verhältnis 2:3 geschichtet. Ficoll ist ein ungeladenes Polysaccharid, dessen Dichte so eingestellt ist, dass bei Zentrifugation Erythrozyten und Zelltrümmer die Ficoll-Phase passieren. Während sich

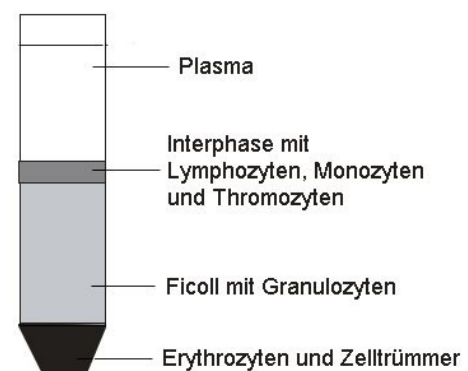


Abb. 6: Auftrennung von Vollblut nach Zentrifugation

Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll ansammeln, dringen Granulozyten in die Ficoll-Schicht ein. Erythrozyten befinden sich unterhalb der Ficollphase (Abb. 6). Nach 20-minütiger Zentrifugation bei 1300 x g wurde dann die Interphase mit den darin enthaltenen Lymphozyten abpipettiert und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Anschließend folgten zwei Waschschrte: Die Lymphozytenfraktion wurde auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und bei 400 x g für zehn Minuten zentrifugiert. So entstand ein aus Lymphozyten bestehendes Zellpellet. Der Überstand wurde abgekippt, das Gefäß mit dem Pellet erneut auf 50 ml mit PBS aufgefüllt, resuspendiert, wie oben beschrieben zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die nun isolierten Zellen wurden in 1,5 ml PBS resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4° C gelagert.

3.2.2 Antikörperfärbung

Um die NKT-Zellen von den restlichen Lymphozyten unterscheiden zu können, wurden sie mit direkt und indirekt fluorochromkonjugierten Antikörpern markiert (Färbeprotokoll siehe Tabelle 1). Bei den direkt konjugierten Antikörpern ist das Farbmolekül unmittelbar an den Antikörper gebunden, wohingegen bei den indirekt markierten Antikörpern zuerst ein mit Biotin konjugierter Antikörper ohne Farbstoff zu den Zellen gegeben wird. In einem Folgeschritt wird ein fluorochromkonjugiertes Protein (Streptavidin) zugegeben, welches daraufhin an den biotinylierten ersten Antikörper bindet. Das ideale Verhältnis von Zellzahl zu Antikörpervolumen wurde vorher durch Titration im Vollblut bestimmt. Zur Untersuchung der Proben stand ein FACS-Gerät mit vier Farbkanälen zur Verfügung. Aufgrund dieser Limitierung mussten zur Bestimmung der Chemokinrezeptorexpression CD4 und CD8 positiver NKT-Zellen zwei Parallelansätze, einer mit dem Marker CD4 und ein zweiter mit CD8 untersucht werden.

Färbeprotokoll

- Verteilung von je 50 µl Zellsuspension auf 30 1ml Reaktionsgefäße

- 10 µl des biotinylierten Vβ11 Antikörpers wurden in die Gefäße pipettiert, gemischt und danach 20 min bei Raumtemperatur (nach Herstellerangaben) inkubiert
- Es folgte ein Waschschrift (1ml PBS, 2000 x g, 5 min)
- Anschließend wurden je 10 µl der vorverdünnten Antikörper bzw. Streptavidin-APC in die jeweiligen Gefäße pipettiert, gemischt und unter Lichtabschluss bei 4° C weitere 35 min inkubiert
- Im Anschluss folgte ein zweiter Waschschrift (1ml PBS, 2000 x g, 5 min)
- Die Zellen wurden dann zur Erythrozytenlyse in 350 µl Ammoniumchlorid-Puffer resuspendiert und sofort durchflusszytometrisch aufgenommen.

Tube	FITC	PE	PC5	APC
1	Vα24	CCR1	CD4	Vβ11bio-SAV
2	Vα24	CCR1	CD8	Vβ11bio-SAV
3	Vα24	CCR2	CD4	Vβ11bio-SAV
4	Vα24	CCR2	CD8	Vβ11bio-SAV
5	Vα24	CCR4	CD4	Vβ11bio-SAV
6	Vα24	CCR4	CD8	Vβ11bio-SAV
7	Vα24	CCR5	CD4	Vβ11bio-SAV
8	Vα24	CCR5	CD8	Vβ11bio-SAV
9	Vα24	CCR6	CD4	Vβ11bio-SAV
10	Vα24	CCR6	CD8	Vβ11bio-SAV
11	Vα24	CCR7	CD4	Vβ11bio-SAV
12	Vα24	CCR7	CD8	Vβ11bio-SAV
13	Vα24	CCR8	CD4	Vβ11bio-SAV
14	Vα24	CCR8	CD8	Vβ11bio-SAV
15	Vα24	CCR9	CD4	Vβ11bio-SAV
16	Vα24	CCR9	CD8	Vβ11bio-SAV

17	V α 24	CXCR3	CD4	V β 11bio-SAV
18	V α 24	CXCR3	CD8	V β 11bio-SAV
19	V α 24	CXCR4	CD4	V β 11bio-SAV
20	V α 24	CXCR4	CD8	V β 11bio-SAV
21	V α 24	CXCR5	CD4	V β 11bio-SAV
22	V α 24	CXCR5	CD8	V β 11bio-SAV
23	V α 24	CXCR6	CD4	V β 11bio-SAV
24	V α 24	CXCR6	CD8	V β 11bio-SAV
25	V α 24	CD45RO	CD4	V β 11bio-SAV
26	V α 24	CD45RO	CD8	V β 11bio-SAV
27	IgG1	IgG2	CD4	SAV
28	IgG1	IgG2	CD8	
29	IgG1	IgG1	CD4	
30	IgG1	IgG1	CD8	

Tab. 1: Färbeprotokoll; APC= Allophycocyanin, FITC= Fluorescein-isothiocyanate, PE=Phycoerythrin, PC5=Phycoerythrin-Cyanin 5.1, SAV=Streptavidin

3.2.3 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer, ein sogenanntes FACS (fluorescence activated cell sorter), arbeitet mit einem optischen Messsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner Partikel in einem Flüssigkeitsstrom analysiert. Das Gerät lässt sich in zwei Einheiten gliedern:

- Flüssigkeitssystem
- Optisches Detektionssystem

Flüssigkeitssystem

Die zu messenden Zellen werden durch einen Überdruck von einer Trägerflüssigkeit erfasst und derart beschleunigt ("hydrodynamische Fokussierung"), dass sie einzeln hintereinander aufgereiht werden. Am Analysepunkt trifft dann ein Argonlaserstrahl mit 488 nm auf jede einzelne Zelle.

Optisches Detektionssystem

Der Detektionsteil besteht aus einem Bereich zur Messung der Streulichtemissionen und einem weiteren Teil zur Erfassung der für jeden einzelnen Farbstoff spezifischen Fluoreszenz. Abhängig von verschiedenen Zellparametern wie Querschnittsfläche, Membranstruktur und Granulationsgrad wird das Licht unterschiedlich stark abgelenkt. Das Streulicht lässt sich untergliedern in Vorwärtsstreulicht, sog. "Forward light scatter" (FSC, 0° - 10°), und Seitwärtsstreulicht, sog. "Sidescatter" (SSC, 90°), wobei Ersteres mit der Zellgröße korreliert. Hingegen liefert das Seitwärtsstreulicht Informationen über die Granularität und Rauigkeit der Zelle. Mittels dieser beiden Parameter lassen sich die wichtigsten Leukozytengruppen wie Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten unterscheiden (Abb. 7 und 8). Sind die Zellen mit fluorochromkonjugierten Antikörpern gefärbt, können weitere Daten über die Oberflächenantigene der Zellpopulation erhoben werden. Die hier verwendeten Fluorochrome sind in Tabelle 2 aufgeführt. Sie werden durch den Argonlaser angeregt und weisen ein detektierbares Emissionsspektrum auf. Es wurde ein vier-Farben-FACS, welches die simultane Messung von vier Farben in einer Probe ermöglicht, verwendet.

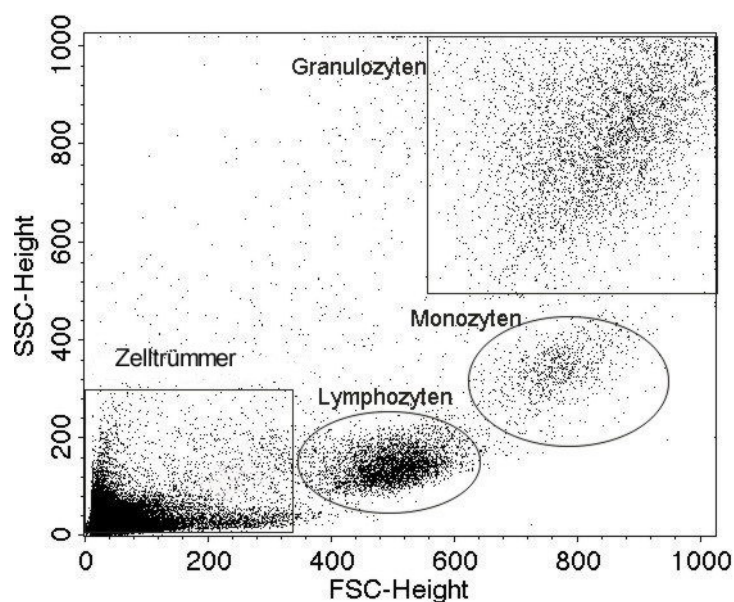


Abb. 7: Darstellung der Leukozytengruppen im Vollblut als Punktdiagramm (Dot Plot) mit dem FACS

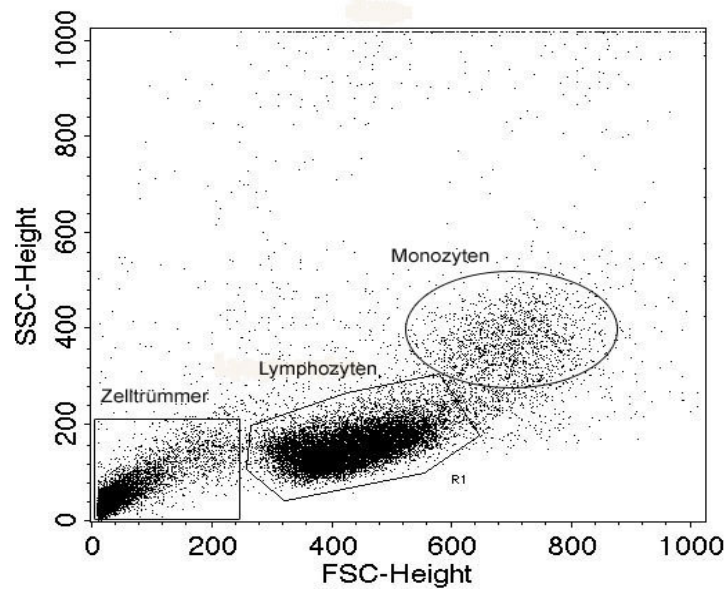


Abb. 8: Darstellung der Leukozytengruppen im ficollierten Blut als Punktdiagramm (Dot Plot) mit dem FACS

Fluorochrom	Max. Anregung	Emission	Farbe
FITC	488 nm	519 nm	Grün
PE	488 nm	578 nm	Gelb
APC	595/ 633 nm	660 nm	Rot
PC5	488 nm	667 nm	Dunkel-rot

Tab. 2: Verwendete Fluorochrome und ihre Eigenschaften; APC= Allophycocyanin, FITC= Fluorescein-isothiocyanate, PE= Phycoerythrin, PC5=Phycoerythrin-Cyanin 5.1

Mittels Photomultiplier und Photodioden werden dann die optischen in elektrische Signale umgewandelt und mittels der entsprechenden Software als Graphik dargestellt. Um die Auswertung zu optimieren wurde eine spezielle Geräteeinstellung ("instrument setting") gesetzt, mit welcher der Grad der Fluoreszenzverstärkung ("amplification") sowie die Kompensationseinstellung ("compensation") geregelt wird. Die Kompensation ist nötig, um spektrale Überlagerungen der Fluoreszenzen zu korrigieren, indem der jeweils in das fremde Spektrum ragende Farbanteil von der primären subtrahiert wird.

3.2.4 Auswertung

Für die hier gezeigten Aufnahmen und Auswertungen der Daten kam das Programm Cell Quest™ Pro, Version 4.0.2, von Becton & Dickinson zur Anwendung.

Im ficollierten Blut lässt sich die Lymphozytenpopulation im FCS/SCC-Plot des Punktehistogramms sehr deutlich von Zelltrümmern und Monozyten abgrenzen. Zunächst wurde ein elektronisches Fenster ("gate") auf die Lymphozytenwolke gelegt (Abb. 9). Da NKT-Zellen weniger als 1% der Lymphozyten ausmachen, wurden mindestens 130.000 Lymphozyten pro Probe aufgenommen um eine aussagekräftige Zellpopulation zu erhalten. Anschließend übertrug man die Lymphozytenwolke in ein neues Analysenfenster und bestimmte den Prozentsatz der $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ doppelpositiven NKT-Zellen innerhalb der Lymphozyten (Abb. 10). In einem weiteren gate wurde dann die Expression der einzelnen Chemokinrezeptoren innerhalb der $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen dargestellt. Durch Legen von Abgrenzlinien zwischen den einzelnen Zellgruppen konnte der prozentuale Anteil in Bezug auf die Gesamtpopulation $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Zellen errechnet werden. Graphisch ist dies nochmals am Beispiel $CCR4^+CD4^+$ NKT-Zellen verdeutlicht (Abb. 11 und 12). Um mögliche unspezifische Bindungen der Antikörper zu berücksichtigen, wurde für jeden Marker eine Isotypkontrolle durchgeführt.

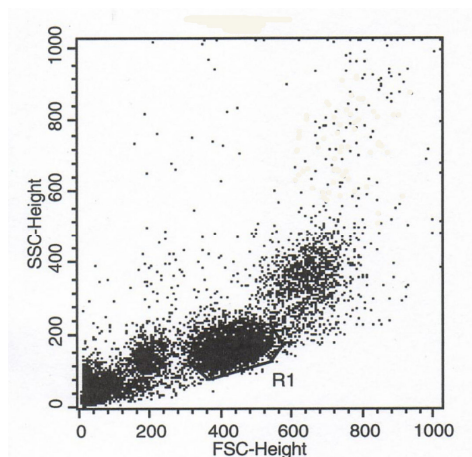


Abb. 9: Lymphozyteneingrenzung (R1) im ficollierten Nabelschnurblut

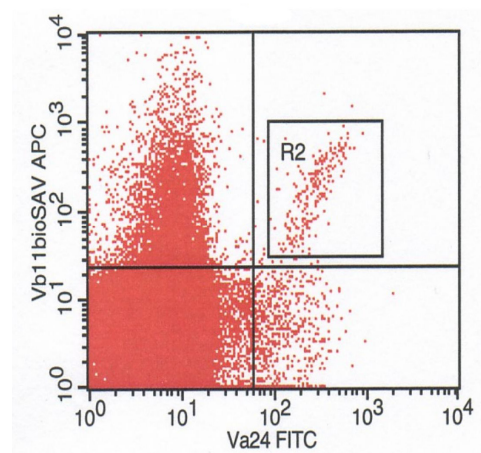


Abb. 10: Darstellung der $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen (R2) innerhalb der Lymphozyten (R1)

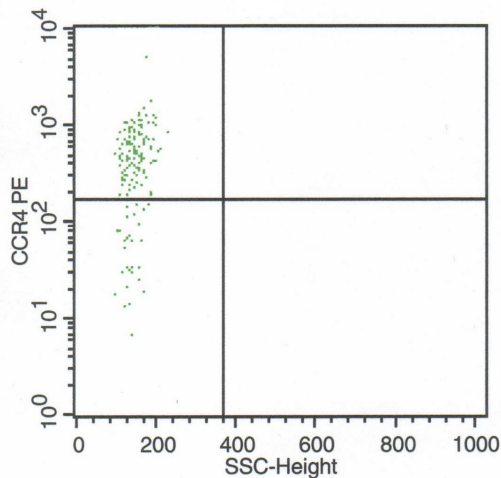


Abb. 11: Abgrenzung der CCR4⁺ NKT-Zellen innerhalb R2 (V α 24⁺V β 11⁺ NKT-Zellen)

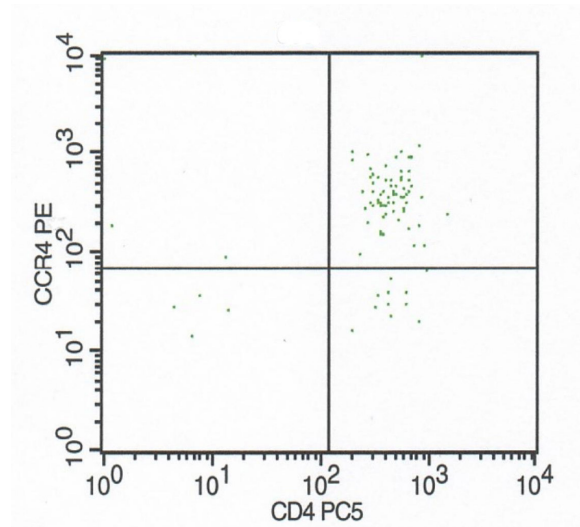


Abb. 12: Abgrenzung der CCR4⁺CCR4⁺ NKT-Zellen innerhalb R2 (V α 24⁺V β 11⁺ NKT-Zellen)

3.2.5 Statistische Methoden

Bei den vorliegenden Patientenzahlen und der Seltenheit von NKT-Zellen kann von keiner Normalverteilung ausgegangen werden. Deshalb wurden Medianwerte und Spannweiten angegeben. Eine Ausnahme stellte die Berechnung der Prozentsätze CD4⁺ und CD8⁺ NKT-Zellen dar. Da hier mehrere Parallelansätze vorhanden waren, und somit eine größere Anzahl an Einzelwerten, wurden abweichend von den restlichen Ergebnissen Mittelwerte angegeben. Zur Berechnung der Unterschiede zwischen den beiden Kollektiven kam bei unverbundenen Stichproben der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde bei $p \leq 0,05$ festgelegt. Das Programm SPSS 12.0 (SPSS Inc.) diente der elektronischen Berechnung. Anhand der Programme Prism 3.0 (Graph Pad Software) und Excel 2000 (Microsoft) wurden die Diagramme erstellt.

3.3 Material

3.3.1 Geräte

- Ultrazentrifuge Varifuge 20 RS Heraeus Sepatech
- Tischzentrifuge 5415C Eppendorff
- Kühlschrank +4 °C Bosch
- Schüttler: Vortex-Genie 2 Scientific Industries
- Mikropipetten Eppendorff
(0,5-10µl; 10-100µl; 100-1000µl)
- EasyPet-Pipettierhilfe Eppendorff
- Durchflusszytometer (FACS) Becton&Dickinson
FACSCalibur
- FACS–Auswertestation Apple
Power Macintosh G4
- FACS–Auswertesoftware Becton&Dickinson
CellQuest™ Pro, Vers. 4.0.2
- PC Siemens Fujitsu
Windows 2000
- SPSS 12.0 SPSS Inc.
- Waage 1265 MP Sartorius AG

3.3.2 Glas- und Plastikmaterial

- Reaktionsgefäße (1,5ml) Eppendorff
- Plastikspitzen für Mikropipetten Eppendorff
- Serologische Pipetten (10 ml) Roth

- Plastikröhrchen (50ml) Greiner bio-one
- Rundbodenröhrchen „Falcon“ (5ml) Becton&Dickinson
- Plastikspritze "Discardit II" (10 ml) Becton&Dickinson
mit Natrium-Heparin

3.3.3 Chemikalien und Puffer

- Phosphate-buffered saline (PBS)
10 x stock solution, 1 Liter
80g NaCl Merck
2g KCl Merck
13.06g Na₂HPO₄ · 2H₂O Merck
2g KH₂PO₄ Merck
pH 7.3
- Ammoniumchlorid-Puffer
500 ml
4,15g NH₄Cl Merck
500mg KHCO₃ Merck
18mg EDTA (Titriplex III) Merck
ad 500 ml aqua destillata
- Ficoll-Paque PLUS Amersham Pharmacia
Biotech

3.3.4 Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Hersteller	Spezies/ Isotyp	Verdünnung
CCR1	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2b	1:2
CCR2	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2b	1:4
CCR4	PE	BD, Heidelberg	Maus IgG1 κ	1:2
CCR5	PE	BD, Heidelberg	Maus IgG2a	1:2
CCR6	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2b	1:2
CCR7	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2a	1:4
CCR8	PE	R&D, Wiesbaden	Rat IgG2b	pur
CCR9	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2a	pur
CXCR3	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG1	1:2
CXCR4	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2a	1:2
CXCR5	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2b	1:2
CXCR6	PE	R&D, Wiesbaden	Maus IgG2b	1:2
CD4	PC5	IQ, Groningen	Maus IgG1	1:40
CD8	PC5	IQ, Groningen	Maus IgG1	1:250
CD45RO	PE	BD, Heidelberg	Maus IgG2a κ	1:2
V α 24	FITC	Immunotech, Krefeld	Maus IgG1	pur
V β 11bio		Immunotech, Krefeld	Maus IgG2a	pur
Streptavidin	APC	BD, Heidelberg		1:2,5
Isotyp- Kontrolle	FITC	Immunotech, Krefeld	IgG1	pur
	PE		IgG1	
Isotyp- Kontrolle	FITC	Immunotech, Krefeld	IgG1	pur
	PE		IgG2	

Tab. 3: verwendete Antikörper mit Angabe von Hersteller, Isotyp und verwendeter Verdünnung. APC= Allophycocyanin, FITC= Fluorescein-isothiocyanate, PE= Phycoerythrin, PC5=Phycoerythrin-Cyanin 5.1, SAV=Streptavidin

4 ERGEBNISSE

4.1 Probanden

Es wurde Nabelschnurblut von zehn gesunden, vaginal entbundenen Neugeborenen untersucht. Darunter waren neun reife Säuglinge in der 37+0 bis 41+6 Schwangerschaftswoche und ein klinisch unauffälliges Frühgeborenes in der 33+6 SSW. Die Mütter wiesen keinerlei klinische Zeichen einer Infektion auf. Der Median des Gestationsalters betrug 39+4 Wochen (33+6 bis 40+3). Um sicherzustellen, dass die Expression der Chemokinrezeptoren nicht durch eine Infektion oder Anämie beeinflusst wurde, erstellten wir von jeder Probe ein automatisiertes Blutbild und bestimmten IgE im Serum. Mittels IgA Nachweis wurde eine Kontamination mit mütterlichem Blut ausgeschlossen. Alle Proben mit IgA-Werten < 5mg/dl galten als kontaminationsfrei (Tab. 4).

Gestationsalter* (Wochen)	Geschlecht (m/w)	Größe* (cm)	Gewicht* (g)	APGAR (10 min)	Blut pH*
39+4 (33+6-40+3)	8/2	51 (47-55)	3110 (2232-3950)	10	7,27 (7,16-7,39)

Leukozyten* (x10 ³ /µl)	Lymphozyten* (%)	Hämoglobin* (g/dl)	IgA (mg/dl)	IgE* (kU/l)
15,8 (6,5-20,4)	33,2 (21,3-51,6)	14,4 (12,7 -17,7)	4,6 (n=1) IgA<4,2 (n=9)	0,67 (0,14-6,2) IgE<0,1 (n=4)

Tab. 4: Charakterisierung der Neugeborenen; *Medianwerte (Spannweite); m=männlich, w=weiblich

In allen Proben ergab die IgA-Messung Werte unterhalb bzw. einer knapp oberhalb der Nachweisgrenze von 4,2 mg/dl. Folglich wurden alle Proben als nicht mit mütterlichem Blut kontaminiert gewertet und in die Auswertung eingeschlossen. Eine Erhöhung des Allergierisikos wurde bei einem IgE Wert >0,9 kU/l angenommen. In einer Probe wurde ein IgE Wert oberhalb des

Grenzwertes von 0,9 kU/l gemessen. Alle untersuchten Prozensätze der Chemokinrezeptorexpression lagen jedoch in der Nähe des Medians.

In die Kontrollgruppe der Erwachsenen wurden zehn gesunde Probanden einbezogen. Eine Allergie oder akute Infektion wurde anamnestisch ausgeschlossen. Zusätzlich wurde ein maschinelles Blutbild erstellt, um eine Leuko- oder Lymphozytose zu erkennen (Normalbereich $4,0 \times 10^3$ - $12 \times 10^3/\mu\text{l}$). Der Altersmedian lag bei 28,5 (25-43) Jahren (Tab. 5).

Alter* (Jahre)	Geschlecht* (m/w)	Leukozyten* ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Lymphozyten* (%)	Hämoglobin* (g/dl)
28,5 (25-43)	5/5	7,3 (4,3-11,4)	29,8 (21,8-51,2)	14,2 (11,9-15,8)

Tab. 5: Charakterisierung der Kontrollgruppe; *Medianwerte (Spannweite); m=männlich, w=weiblich

4.2 CD4⁺ und CD8⁺ NKT-Zellen

Bei allen untersuchten Proben konnten wir Va24⁺Vβ11⁺ NKT-Zellen nachweisen. Die Häufigkeit lag in Nabelschnurblut zwischen 0,02 und 0,12% aller Lymphozyten (Median 0,05), in der Kontrollgruppe der Erwachsenen mit 0,01-0,23% der Lymphozyten (Median 0,07) tendenziell, jedoch nicht signifikant höher.

Auch die klassischen T-Zell-Marker CD4 und CD8 waren auf den NKT-Zellen exprimiert. Der prozentuale Anteil CD4⁺ NKT-Zellen war mit 89,14% (Mittelwert) im Nabelschnurblut signifikant höher ($p < 0,0001$) als bei der Kontrollgruppe mit nur 20,19% (Mittelwert, σ 8,9). Bei den CD8⁺ NKT-Zellen konnte mit 6,19% (Mittelwert, σ 4,3) bei Erwachsenen und 5,31% (Mittelwert) der fetalen NKT-Zellen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

4.3 Chemokinrezeptorexpression von NKT-Zellen

4.3.1 Chemokinrezeptoren auf $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen in Nabelschnurblut und in peripherem Blut Erwachsener

CCR1

Der CC-Chemokinrezeptor CCR1 bindet die Chemokine MIP-1 α (CCL3), MCP-2 (CCL8), MCP-3 (CCL7), HCC-1 (CCL14), HCC-2 (CCL15), MIPF-1 (CCL23) und RANTES (CCL5). Auf Memory-T-Zellen lässt sich der CCR1-Rezeptor nachweisen.

Der Prozentsatz CCR1 exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut und im peripheren Blut Erwachsener unterschied sich nicht signifikant voneinander.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 6 und Abbildung 13 dargestellt.

	NSB	KO
CCR1⁺NKT-Zellen	57,08 (38,78-72,73)	54,58 (37,36-61,97)
p-Wert	0,481	

Tab. 6: Prozentsatz CCR1-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

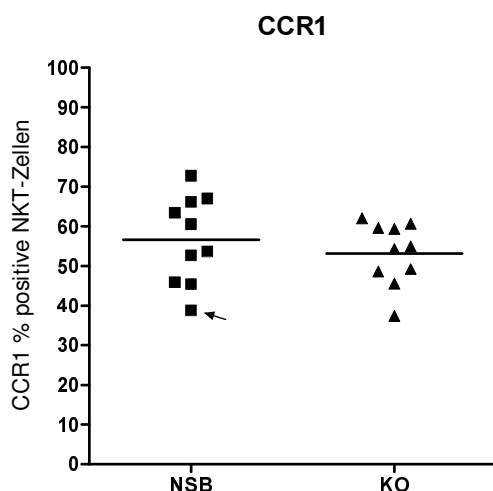


Abb. 13: Prozentsatz CCR1-exprimierender NKT-Zellen in Bezug auf alle NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CCR2

Der CCR2-Rezeptor bindet die CC-Chemokine MCP-1, 2, 3, 4 (CCL2, 7, 8, 13) und wird von Monozyten, Dendritischen Zellen, NK-Zellen, Basophilen, T-Zellen und Granulozyten exprimiert.

Die Untersuchung der Frequenz CCR2⁺ NKT-Zellen innerhalb der Kontrollgruppe und des Nabelschnurblutes ergab keinen signifikanten Unterschied.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 7 und Abbildung 14 dargestellt.

	NSB	KO
CCR2⁺NKT-Zellen	51,38 (32,30-58,73)	48,75 (28,57-63,69)
p-Wert	0,971	

Tab. 7: Prozentsatz CCR2-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

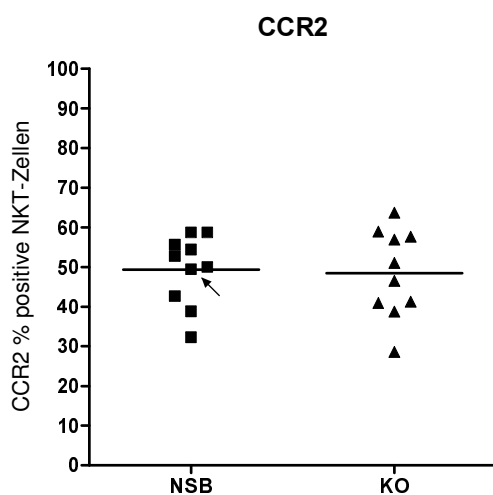


Abb. 14: Prozentsatz CCR2-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CCR4

TARC (CCL17), MDC (CCL22), und RANTES werden von dem Chemokinrezeptor CCR4 gebunden. Dieser wird selektiv von aktivierten Th2-Zellen exprimiert, kommt aber auch auf NK-Zellen und Monozyten vor.

Der Prozentsatz CCR4⁺NKT-Zellen innerhalb aller NKT-Zellen war im Nabelschnurblut höher als im peripheren Erwachsener. Dieser Unterschied war hochsignifikant.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 8 und Abbildung 15 dargestellt.

	NSB	KO
CCR4⁺NKT-Zellen	83,31 (71,79-90,37)	17,57 (7,27-37,64)
p-Wert	<0,000	

Tab. 8: Prozentsatz CCR4-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite)
p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

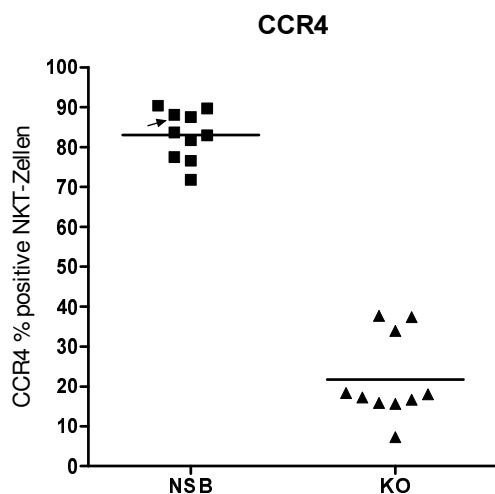


Abb. 15: Prozentsatz CCR4-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CCR5

Die CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und RANTES zeigen hohe Affinität zu dem CCR5-Rezeptor, welcher auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und T-Zellen mit Selektivität für Th1-Zellen zu finden ist.

Die prozentuale Expression des CCR5-Rezeptors war bei NKT-Zellen im Nabelschnurblut signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 9 und Abbildung 16 dargestellt.

	NSB	KO
CCR5⁺NKT-Zellen	47,28 (27,87-56,80)	79,78 (73,53-91,42)
p-Wert	<0,000	

Tab. 9: Prozentsatz CCR5-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

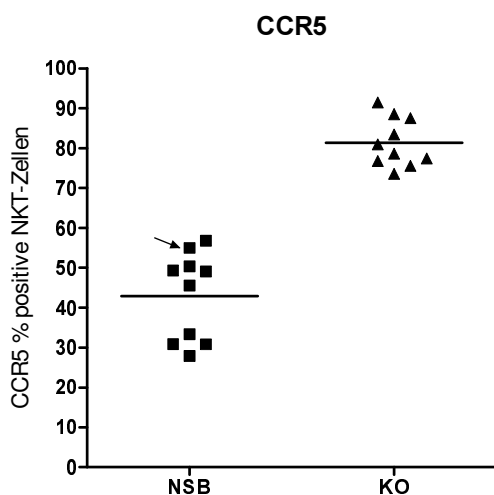


Abb. 16: Prozentsatz CCR5-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CCR6

Der CC-Chemokinrezeptor CCR6 wird von Memory-T-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert. Nur der Ligand LARC ist bisher für diesen Chemokinrezeptor bekannt.

Der Prozentsatz CCR6 exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut und im Blut Erwachsener unterschied sich nicht signifikant voneinander.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 10 und Abbildung 17 dargestellt.

	NSB	KO
CCR6⁺NKT-Zellen	44,96 (41,36-63,21)	43,50 (9,23-55,00)
p-Wert	0,481	

Tab. 10: Prozentsatz CCR6-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite)
p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

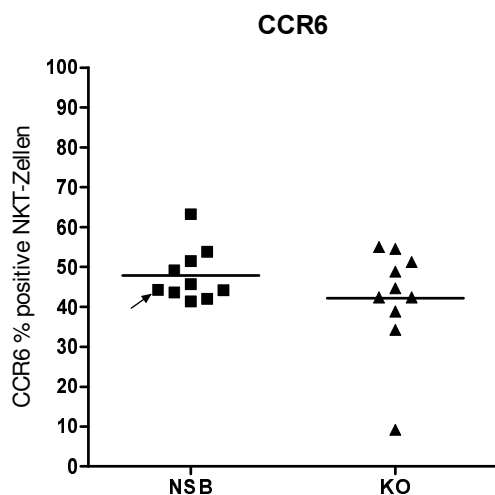


Abb. 17: Prozentsatz CCR6-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO): (→ Frühgeborenes)

CCR7

Für das Chemokin MIP-3 β (CCL19) ist der Rezeptor CCR7 spezifisch und wird von naiven T-Zellen, Central-Memory-Zellen, B-Zellen und Dendritischen Zellen exprimiert.

Auf fetalen NKT-Zellen war der Prozentsatz CCR7⁺Zellen signifikant höher als in der Erwachsenengruppe.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 11 und Abbildung 18 dargestellt.

	NSB	KO
CCR7⁺NKT-Zellen	90,50 (66,67-97-78)	43,67 (31,35-57,63)
p-Wert	<0,000	

Tab. 11: Prozentsatz CCR7-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

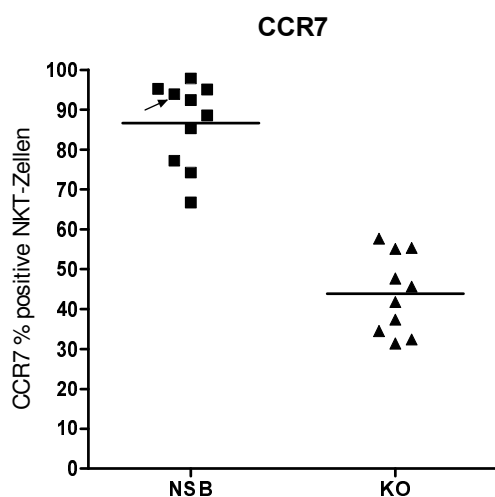


Abb. 18: Prozentsatz CCR7-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CCR8

Der Rezeptor CCR8 hat als einzigen bekannten Liganden I-309 (CCL1) und befindet sich auf Th2-Zellen.

Der Prozentsatz der Expression des CCR8-Rezeptors auf NKT-Zellen war im Nabelschnurblut signifikant höher als im Blut Erwachsener.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 12 und Abbildung 19 dargestellt.

	NSB	KO
CCR8⁺NKT-Zellen	54,05 (32,00-77,78)	35,95 (11,02-55,05)
p-Wert	0,029	

Tab. 12: Prozentsatz CCR8-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

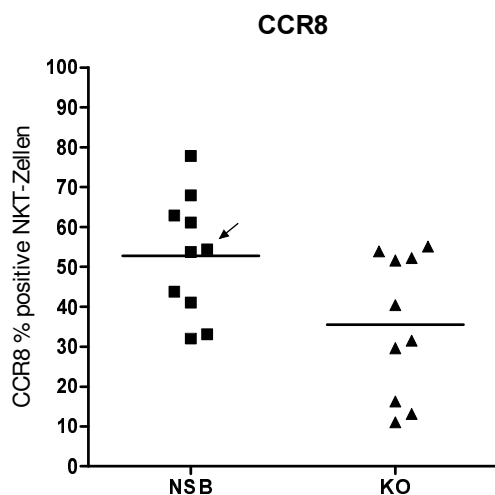


Abb. 19: Prozentsatz CCR8-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CCR9

Als Bindungspartner ist für den CC-Chemokinrezeptor CCR9 nur TECK (CCL25) entdeckt. Exprimiert wird er auf Dendritischen Zellen, Makrophagen und T-Zellen.

NKT-Zellen exprimierten signifikant häufiger den CCR9-Rezeptor im Nabelschnurblut als in der Kontrollgruppe.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 13 und Abbildung 20 dargestellt.

	NSB	KO
CCR9⁺NKT-Zellen	10,68 (4,35-17,19)	4,98 (0,48-12,06)
p-Wert	0,015	

Tab. 13: Prozentsatz CCR9-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

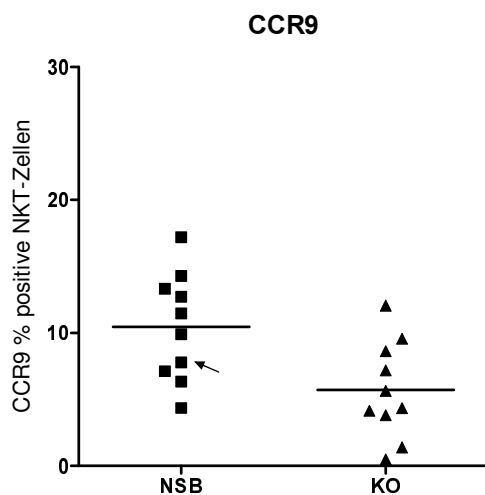


Abb. 20: Prozentsatz CCR9-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes). Beachte: geänderte Skalierung der y-Achse.

CXCR3

MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) und I-TAC (CXCL11) werden von dem Rezeptor CXCR3 gebunden. Neben aktivierten T-Zellen (Th1>Th2) besitzen auch B-Zellen und NK-Zellen diesen Rezeptor.

Der Prozentsatz der CXCR3 exprimierenden NKT-Zellen ergab keinen signifikanten Unterschied bei der fetalen Zellpopulation und der im peripheren venösen Blut Erwachsener.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 14 und Abbildung 21 dargestellt.

	NSB	KO
CXCR3⁺NKT-Zellen	83,09 (69,28-99,17)	94,09 (81,12-96,94)
p-Wert	0,133	

Tab. 14: Prozentsatz CXCR3-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

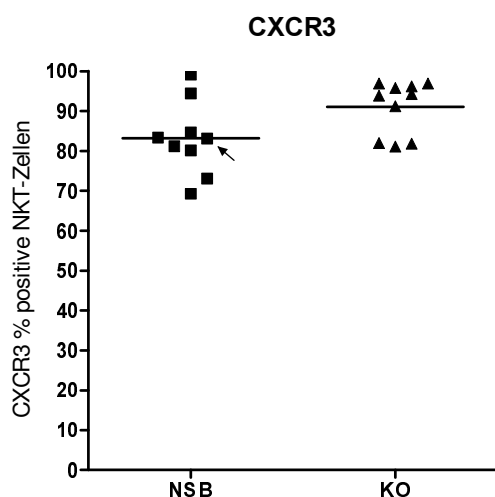


Abb. 21: Prozentsatz CXCR3-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CXCR4

Der Rezeptor CXCR4 kommt auf T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und Dendritischen Zellen vor und hat als Bindungspartner das Chemokin SDF-1 (CXCL12).

Die beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant in der CXCR4-Expression auf NKT-Zellen.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 15 und Abbildung 22 dargestellt.

	NSB	KO
CXCR4⁺NKT-Zellen	86,27 (69,77-99,17)	84,30 (56,00-100,00)
p-Wert	0,604	

Tab. 15: Prozentsatz CXCR4-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

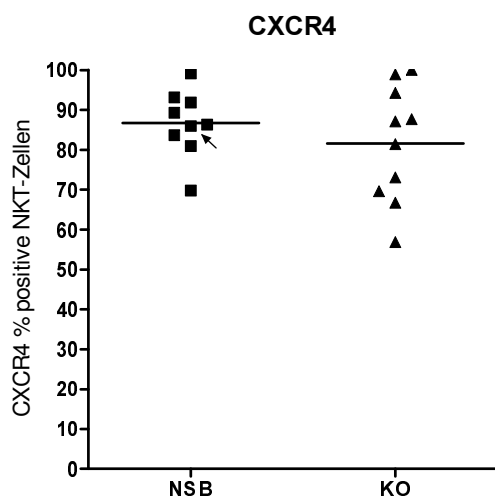


Abb. 22: Prozentsatz CXCR4-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CXCR5

Das CXC-Chemokin BLC (CXCL13) zeigt hohe Affinität zu dem CXCR5-Rezeptor, der auf B-Zellen und Memory-T-Zellen zu finden ist.

Der Prozentsatz der Expression des CXCR5-Rezeptors auf NKT-Zellen war im NSB signifikant höher als im Blut Erwachsener.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 16 und Abbildung 23 dargestellt.

	NSB	KO
CXCR5⁺NKT-Zellen	40,00 (26,22-43,88)	31,48 (23,66-38,87)
p-Wert	0,028	

Tab. 16: Prozentsatz CXCR5-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

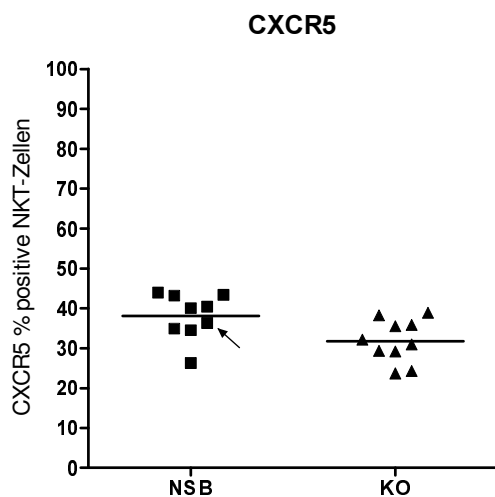


Abb. 23: Prozentsatz CXCR5-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CXCR6

Der Rezeptor CXCR6 wird von Memory-T-Zellen exprimiert und bindet CXCL16.

Der CXCR6-Rezeptor kam auf fetalen NKT-Zellen signifikant häufiger vor als auf reifen NKT-Zellen.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 17 und Abbildung 24 dargestellt.

	NSB	KO
CXCR6⁺NKT-Zellen	54,29 (50,00-66,13)	48,28 (34,47-54,55)
p-Wert	0,002	

Tab. 17: Prozentsatz CXCR6-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite)
p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

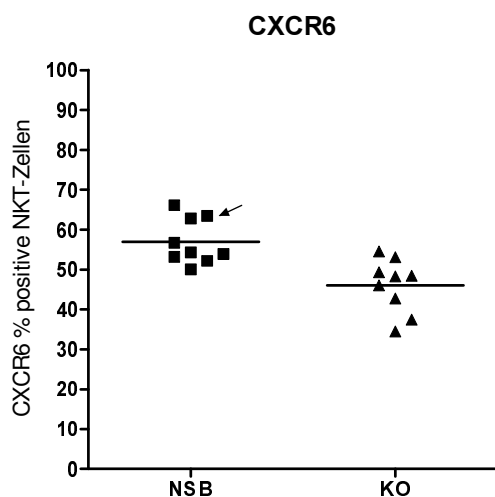


Abb. 24: Prozentsatz CXCR6-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes)

CD45RO

Der Rezeptor CD45RO ist eine Isoform des Leukozyten-Antigens CD45 und findet sich charakteristischerweise auf peripheren Memory-T-Zellen. Die Tyrosinphosphataseaktivität von CD45 ist an der Signaltransduktion von T-Zellen nach Antigenkontakt maßgeblich beteiligt.

Die Untersuchung des Rezeptors CD45RO ergab eine signifikant höhere Expression auf NKT-Zellen Erwachsener gegenüber fetalen NKT-Zellen.

Die einzelnen Ergebnisse sind in Tabelle 18 und Abbildung 25 dargestellt.

	NSB	KO
CD45RO⁺NKT-Zellen	92,86 (88,75-97,20)	98,00 (94,83-100,00)
p-Wert	<0,0001	

Tab. 18: Prozentsatz CD45RO-exprimierender NKT-Zellen; Medianwerte (Spannweite) p-Wert: Nabelschnurblut (NSB) vs Kontrollgruppe der Erwachsenen (KO) (MWU-Test); Signifikanzniveau $p \leq 0,05$

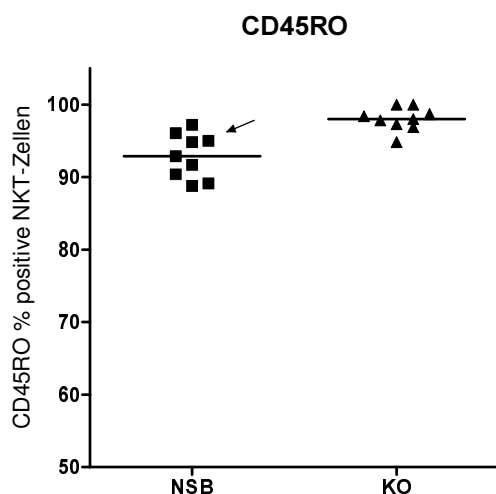


Abb. 25: Prozentsatz CD45RO-exprimierender NKT-Zellen im Nabelschnurblut (NSB) und in der Kontrollgruppe (KO); (→ Frühgeborenes) Beachte: geänderte Skalierung der y-Achse.

Zusammengefasst war die Frequenz der CCR4⁺, CCR7⁺, CCR8⁺, CCR9⁺, CXCR5⁺ und CXCR6⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Der Prozentsatz CCR5⁺ NKT-Zellen war dagegen im Blut Erwachsener höher.

Da im Nabelschnurblut die überwiegende Mehrheit (>89%) der NKT-Zellen CD4⁺ ist, ist die prozentuale Verteilung der Chemokinrezeptorexpression mit der aller NKT-Zellen im NSB analog zu setzen. Eine weitere Auswertung der Chemokinrezeptorexpression innerhalb der CD4⁻ und CD8⁺ NKT-Zellen war aufgrund der geringen Zellzahlen nicht möglich.

5 DISKUSSION

5.1 Probanden

NKT-Zellen nehmen eine Sonderstellung unter den T-Lymphozyten ein, da sie in der Lage sind, in kürzester Zeit sowohl IFN- γ als auch IL-4 zu synthetisieren. Dadurch haben sie immunregulatorische Fähigkeiten und können ein Entzündungsgeschehen in Richtung Th1- oder Th2-Immunantwort verschieben. Das Immunsystem des ungeborenen Kindes ist völlig anderen Bedingungen ausgesetzt als das eines Erwachsenen. Zum Beispiel ist das größte Immunorgan, der Darm, *in utero* noch steril, und die Lunge hat wenig Kontakt zu Fremdartigenen.

Fragestellung der vorliegenden Arbeit war deshalb, ob sich NKT-Zellen aus Nabelschnurblut und peripherenvenösem Blut Erwachsener phänotypisch unterscheiden und dadurch Rückschlüsse auf funktionelle Eigenschaften gezogen werden können. Da NKT-Zellen in der Maus erst sechs bis acht Wochen nach der Geburt nachweisbar sind, ist es nicht möglich, murine fetale NKT-Zellen zu untersuchen. In der Literatur gibt es nur wenige Angaben zu humanen NKT-Zellen des Nabelschnurblutes, meist ohne genaue

Charakterisierung des Untersuchungskollektivs. Hinzu kommt, dass die Definition von NKT-Zellen uneinheitlich ist und somit die Ergebnisse in der Literatur nur schwer vergleichbar sind. So definieren Sandberg et al. alle $V\alpha 24^+CD161^+$ Zellen als NKT-Zellen, während D'Andrea et al. und Kim et al. NKT-Zellen als $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Zellen identifizieren. Für die vorliegende Arbeit wurde in Vorversuchen die Darstellung $V\alpha 24^+CD161^+$ Zellen mit $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Zellen am Durchflusszytometer miteinander verglichen. Im Nabelschnurblut zeigte sich eine deutlich bessere Abgrenzbarkeit der $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Zellpopulation von den restlichen Lymphozyten im Vergleich zur $V\alpha 24^+CD161^+$ Gruppe. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit alle $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Zellen als NKT-Zellen bezeichnet. Da diese beiden Populationen nicht deckungsgleich sind (53), könnten Folgeuntersuchungen an $V\alpha 24^+CD161^+$ Zellen mögliche phänotypische oder funktionelle Unterschiede zu $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ Zellen aufzeigen.

Der Begriff „gesunde“ Probanden wird in keiner publizierten Studie näher definiert. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass Immundefekte oder eine atopische Prädisposition die Chemokinausschüttung oder -rezeptorexpression der NKT-Zellen beeinflusst haben. Bei allen unseren Probanden wurden durch eine Anamnese und objektive Laborparameter wie Blutbild und IgE-Bestimmung mögliche immunmodulierende Faktoren ausgeschlossen. Des Weiteren basieren unsere Ergebnisse auf der Messung einer großen Anzahl von mehr als 1×10^5 Lymphozyten pro Probe. Die Anzahl der aufgenommenen Zellen pro Probe ist aufgrund der Seltenheit von NKT-Zellen ein besonders kritischer Punkt, auf den nur selten in Publikationen eingegangen wird. Da bei geringen Fallzahlen von keiner Normalverteilung ausgegangen werden kann, wandten wir nicht-parametrische Tests für unsere Auswertungen an und berechneten Medianwerte.

5.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wird als etabliertes Analyseverfahren in verschiedensten Bereichen der klinischen Zelldiagnostik eingesetzt (88).

NKT-Zellen sind eine kleine Subpopulation der T-Zellen und machen nur ca. 0,01-0,2% der Lymphozyten aus. Um eine ausreichende Anzahl an NKT-Zellen auf ihre Chemokinrezeptorexpression zu untersuchen, musste eine sehr große Anzahl an Zellen ($>1 \times 10^5$ Lymphozyten) im FACS aufgenommen werden. Trotz maximaler Ausschöpfung der Zellaufnahmekapazität des FACS-Gerätes, war dies, aufgrund des nur in begrenzter Menge zur Verfügung stehenden Nabelschnurblutes, nicht bei allen Proben möglich. Dies führte dazu, dass zwar in allen Proben $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen nachweisbar waren, aber bei acht von zehn Nabelschnurblutproben keine valide Messung der Chemokinrezeptorexpression innerhalb der $CD8^+$ NKT-Zellpopulation möglich war. Des Weiteren stieß die Dauer der Aufnahme einer Probe an zeitliche Grenzen, da das Messen aller Einzelröhrchen einer Probe mehr als neun Stunden in Anspruch nahm. Somit ist nicht auszuschließen, dass in den letzten Probenröhrchen bereits Zellen abstarben. Ebenso war die Kapazität der FACS-Software zum Laden einer Probe für die Auswertung begrenzt.

5.3 NKT-Zellen in NSB und in peripherem Blut Erwachsener

Bei der Untersuchung des Nabelschnurblutes waren 0,05% (Median) der Lymphozyten $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen, in der Kontrollgruppe der Erwachsenen 0,07% (Median). Diese Ergebnisse korrelieren gut mit den Angaben aus der Literatur. D'Andrea et al. (20) fanden bei Lymphozyten im Nabelschnurblut 0,06% $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen und im venösen Blut Erwachsener 0,07%. Ähnliche Häufigkeiten berichten Kadowaki et al. (48) mit 0,03% $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen im NSB und 0,09% bei Erwachsenen. In der Publikation von Kim et al. (53) konnten 0,089% der Lymphozyten im Blut Erwachsener als $V\beta 11^+$ NKT-Zellen identifiziert werden. Sandberg et al. (87) definierten NKT-Zellen als $V\alpha 24^+CD161^+$ Zellen und fanden bei Erwachsenen 0,05%. Vergleichbar mit obigen Literaturangaben fanden auch wir tendenziell mehr NKT-Zellen im Blut der Kontrollgruppe als im NSB. Jedoch ist diese Aussage aufgrund der geringen Fallzahlen nur eingeschränkt zu werten.

Die überwiegende Teil (89,14%) fetaler $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen war $CD4^+$ und

im Vergleich zu 20,19% in der Kontrollgruppe signifikant größer. Einen ähnlich hohen Prozentsatz (>90%) CD4⁺ Vα24⁺Vβ11⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut berichten auch Eger et al. (27). Die Ergebnisse in unserer Kontrollgruppe korrelieren ebenfalls gut mit Berichten aus der Literatur: Kim et al. (53) fanden bei 30% der Vα24⁺Vβ11⁺ NKT-Zellen den Rezeptor CD4 und wiesen zugleich auf eine hohe interindividuelle Variabilität hin (5-65%). Somit konnte auch mittels unserer Untersuchungen dargelegt werden, dass ein großer Anteil der NKT-Zellen im Nabelschnurblut CD4⁺ sind und sich, im Gegensatz zu NKT-Zellen des Erwachsenen, nicht zu vergleichbaren Prozentsätzen in CD4⁺ und CD4⁻-Zellen separieren lassen. Diese Abnahme CD4⁺ NKT-Zellen im peripheren venösen Blut Erwachsener könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich CD4⁺ NKT-Zellen im Laufe des Reifungsprozesses des Immunsystems nach der Geburt zu CD4⁻-Zellen (DN oder CD8⁺) entwickeln.

5.4 Chemokinrezeptoren auf Vα24⁺Vβ11⁺ NKT-Zellen in Nabelschnurblut und Blut Erwachsener

Chemokinrezeptoren spielen eine bedeutende Rolle in der Steuerung der Zellwanderung und werden je nach Differenzierungs- und Aktivierungsgrad der Zelle unterschiedlich exprimiert. Besonders bei der Rekrutierung von T-Zellen aus dem Blutsystem zum Entzündungsort, bei Migration in Lymphknoten oder Haut sind Chemokinrezeptoren richtungsweisend (73).

Das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf NKT-Zellen des Nabelschnurblutes und peripheren venösen Blutes Erwachsener unterschied sich deutlich. Besonders auffallend waren die Diskrepanzen bei den Rezeptoren CCR4, CCR7, CCR8, CCR9, CXCR5 und CXCR6, welche auf NKT-Zellen im Nabelschnurblut signifikant höher exprimiert waren. Der Rezeptor CCR5 war im Gegensatz dazu auf fetalen NKT-Zellen in einem niedrigeren Prozentsatz nachweisbar als in der Kontrollgruppe.

Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist gemeinsam mit CCR7 und CD45RO auf Memory-T-Zellen zu finden. Diese drei Marker waren in einem hohen Prozentsatz auf fetalen NKT-Zellen nachzuweisen. D'Andrea et al. konnten in

ihrer Studie mit fetalen NKT-Zellen darlegen, dass diese bereits im Nabelschnurblut den Phänotyp von aktivierten Memory-T-Zellen besitzen. 79,7% der fetalen NKT-Zellen waren CD45RO⁺CD45RA⁻ und exprimierten den Aktivierungsmarker CD25. Bei unseren Untersuchungen zeigten 92,8% (Median) den Memorymarker CD45RO. Der prozentuale Unterschied lässt sich mit der geringen Fallzahl (sieben Proben bei D'Andrea et al.) der untersuchten Nabelschnurblutproben erklären. Weiterhin gibt es dort keine Angaben zu Geschlecht und möglichen Erkrankungen der Probanden. Übereinstimmend ist jedoch, dass die überwiegende Mehrheit der NKT-Zellen bereits bei Geburt CD45RO⁺ ist und deshalb eine Aktivierung - wahrscheinlich durch endogene Liganden - bereits *in utero* stattgefunden hat.

Weiterhin sind die Chemokinrezeptoren CCR7 und CXCR4, welche auf fetalen NKT-Zellen stark exprimiert waren, charakteristisch für naive T-Zellen und bestimmte Memory-T-Zellen (52). Der Marker CXCR4 spielt beim „homing“ in das Knochenmark eine bedeutende Rolle und ist ein wichtiges Element in der T-Zell-Differenzierung. Der Rezeptor CCR7 ist Voraussetzung für das Eindringen in sekundär lymphatisches Gewebe und in die T-Zell-Zone der Lymphknoten (52). In diesen sekundär lymphatischen Organen findet der Kontakt mit Antigenpräsentierenden Zellen statt und ist somit bedeutsam für die Differenzierung und Aktivierung der naiven T-Zellen zu Memory- und Effektor-Zellen. Memory-T-Zellen lassen sich anhand ihrer CCR7-Expression in zwei funktionell unterschiedliche Untergruppen einteilen: Central-Memory (T_{CM}) und Effektor-Memory-Zellen (T_{EM}) (57). Effektor-Memory-Zellen sind CCR7⁻ und exprimieren Chemokinrezeptoren, die für die Migration in entzündetes Gewebe notwendig sind (CCR1, CCR3 und CCR5). Durch Chemokinausschüttung von IL-4, IFN- γ und Perforin führen T_{EM}-Zellen sofortige Effektorfunktion aus. Central-Memory-Zellen sind dagegen CCR7⁺ und haben dadurch die Fähigkeit in lymphatisches Gewebe einzudringen. Dort weisen sie keine unmittelbare Effektorfunktion auf, sondern stimulieren Dendritische Zellen zur IL-12 Ausschüttung (85). Nach weiterer Aktivierung können T_{CM}-Zellen jedoch auch zu Effektor-Memory-Zellen differenzieren und direkte Abwehrfunktion ausführen (57;85).

Bei unseren Untersuchungen exprimierten nur ca. 43% der NKT-Zellen in der Kontrollgruppe, aber etwa 90% der neonatalen NKT-Zellen den Rezeptor CCR7. Nimmt man an, dass es für NKT-Zellen ein analoges System zu T_{CM} und T_{EM} gibt, wäre die Mehrheit der fetalen NKT-Zellen phänotypisch zu den Central-Memory-Zellen zu rechnen. Dies könnte darauf hinweisen, dass ein Teil der NKT-Zellen im Laufe der Differenzierung die Fähigkeit verliert, in sekundär lymphatische Organe einzudringen und nach weiterer Aktivierung zu T_{EM}-Zellen differenzieren. Um diese Unterteilung in T_{CM} und T_{EM} weiter zu klären, und dadurch neue funktionelle Aspekte von NKT-Zellen aufzudecken, könnten weitere Untersuchungen zur Chemokinausschüttung von CCR7⁺ und CCR7⁻ NKT-Zellen Aufschluss geben.

Die an der Immunantwort beteiligten T-Zellen lassen sich, aufgrund des von ihnen synthetisierten Zytokinmusters, in Th1-, Th2- und Th0-Zellen einteilen. Th1-Lymphozyten produzieren IFN- γ und IL-2 und exprimieren vorwiegend die Rezeptoren CCR5, CXCR3 und CXCR6. Th1-Zellen induzieren vorwiegend eine zellulär vermittelte Immunantwort. Dagegen exprimieren Th2-Zellen die Rezeptoren CCR3, CCR4 und CCR8 und produzieren hauptsächlich IL-4, IL-5 und IL-13 (52;81;86).

Durch diese Interleukine werden Mastzellen aktiviert, eosinophile sowie basophile Granulozyten reifen aus. Gemeinsam mit weiteren kostimulatorischen Faktoren bewirkt IL-4 einen Isotypenwechsel zu IgE in B-Zellen (66). Dieser Eigenschaft wird eine zentrale Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen zugeteilt (49). Th0-Zellen nehmen eine Zwischenstellung ein und produzieren sowohl Th1 als auch Th2 Zytokine. Bousquet et al. (8) wiesen im Neugeborenen ein physiologisches Ungleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen zugunsten von Th2-Zellen nach. Dies wird zum einen auf eine fehlende Ausreifung von Antigenpräsentierenden Zellen und zum anderen als Schutz des mütterlichen Organismus vor plazenta-toxischem IFN- γ interpretiert (8;80). Bei unseren Untersuchungen fetaler NKT-Zellen war der Prozentsatz CCR4⁺ und CCR8⁺NKT-Zellen hoch, wohingegen CCR5 nur von einem geringen Prozentsatz exprimiert wurde. Dies deutet phänotypisch auf ein Überwiegen einer Th2-Immunantwort von NKT-Zellen im Nabelschnurblut hin, wie in der

Literatur bereits für konventionelle fetale T-Zellen beschrieben. Allerdings konnten wir auch bei einem hohen Prozentsatz der fetalen NKT-Zellen den Marker CXCR3 nachweisen, welcher vorwiegend auf Th1-Zellen vorkommt. Kim et al. (52) fanden diesen Marker aber auch in der frühen Differenzierungsphase von Memory-Zellen. Dies könnte die Expression auf fetalen NKT-Zellen, welche erst am Anfang ihrer Differenzierung stehen, erklären. Ob fetale CCR4⁺ NKT-Zellen jedoch auch Th2-Funktionen aufweisen, wie z.B. IL-4 Synthese, kann erst durch weiterführende Untersuchungen erörtert werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass bei NKT-Zellen im Nabelschnurblut, analog zu konventionellen T-Zellen, phänotypisch eine Th2-Polarisierung überwiegt. Das breite Chemokinexpressionsmuster auf NKT-Zellen des Nabelschnurblutes könnte ein Hinweis darauf sein, dass fetale NKT-Zellen im Laufe ihrer weiteren Differenzierung die Möglichkeit zur Migration in verschiedenste Gewebe haben. Anfangs finden sich bei fetalen NKT-Zellen Chemokinrezeptoren, die für ein Eindringen in lymphatische Gewebe (CCR7) und auch der B-Zell-Zone (CXCR5) bedeutend sind. Bei Erwachsenen spricht das Expressionsmuster der Chemokinrezeptoren auf NKT-Zellen für eine stärkere Assoziation mit Entzündungsprozessen (CCR5) und eine Ortsansässigkeit eher im extralymphatischen Gewebe.

Da sich so deutliche Unterschiede bei der Expression der Chemokinrezeptoren auf NKT-Zellen in Nabelschnurblut und periphervenösem Blut Erwachsener gezeigt haben, wäre es in weiteren Studien wichtig auch funktionelle Bedeutungen dieser phänotypischen Unterschiede zu untersuchen. Durch Messung der Zytokinexpression fetaler NKT-Zellen könnten zusätzlich wichtige Erkenntnisse zur Bedeutung der NKT-Zellen als Immunregulatoren bereits im frühen Säuglingsalter gewonnen werden. Ein anderer Aspekt könnte der Transfer bzw. die Stimulation von NKT-Zellen bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen oder Malignomen sein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

NKT-Zellen stellen eine besondere Population der T-Zellen dar. Ihre Häufigkeit liegt bei 0,01-0,2% der Lymphozyten. NKT-Zellen einen phänotypische Marker Natürlicher Killerzellen und konventioneller T-Zellen. Das Besondere der NKT-Zellpopulation ist ihre Fähigkeit schnell und in hoher Menge sowohl IL-4 als auch IFN- γ zu sezernieren. Dies verleiht ihnen ein großes regulatorisches Potenzial bei der Immunantwort, was sich besonders bei Erkrankungen aus dem allergologischen und rheumatoiden Formenkreis, aber auch bei der Immuntoleranz nach Transplantation nachweisen lässt.

Über humane fetale NKT-Zellen ist bisher jedoch wenig bekannt, und daher war es Ziel dieser Arbeit anhand der Chemokinrezeptorexpressionsmuster fetaler NKT-Zellen mögliche Unterschiede zu NKT-Zellen des Erwachsenen aufzuzeigen. Die Chemokinrezeptoren wurden als Surrogatmarker für das Migrationsverhalten bestimmt und können Hinweise auf weitere funktionelle Aufgaben der NKT-Zellen *in utero* geben.

In der vorliegenden Arbeit wurden NKT-Zellen aus Nabelschnurblut von neun reifen, gesunden Neugeborenen, einem Frühgeborenen und zehn gesunden Erwachsenen durchflusszytometrisch auf die Chemokinrezeptorexpression (CCR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und CXCR3, 4, 5, 6) und die Marker CD45RO, CD4 und CD8 untersucht. Um eine Kontamination des Nabelschnurblutes mit mütterlichem Blut auszuschließen wurde IgA mittels ELISA gemessen und nur Proben ohne Verunreinigung verwendet. In der Kontrollgruppe der Erwachsenen wurde weiterhin ein Blutbild erstellt, IgE im Blut gemessen und anamnestisch Allergien oder andere Erkrankungen ausgeschlossen.

Der Prozentsatz CD4⁺ NKT-Zellen im NSB war signifikant höher als in der Kontrollgruppe der Erwachsenen. Im Nabelschnurblut ließ sich der Memory-Marker CD45RO auf fast allen NKT-Zellen nachweisen. Der prozentuale Anteil war jedoch signifikant niedriger als bei NKT-Zellen im Blut Erwachsener.

Bei der Expression der Chemokinrezeptoren konnte zusammengefasst festgestellt werden, dass die Frequenz der CCR4⁺, CCR7⁺, CCR8⁺, CCR9⁺,

CXCR5⁺ und CXCR6⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut signifikant höher war als in der Kontrollgruppe. Der Prozentsatz CCR5⁺ NKT-Zellen war dagegen im Blut Erwachsener höher. Die Expression von CCR7 ermöglicht die Zuordnung von Memory-T-Zellen zu Central-Memory- (CCR7⁺) und Effektor-Memory-Zellen (CCR7⁻). Bei unseren Untersuchungen zeigte sich ein sehr hoher Prozentsatz CCR7⁺ NKT-Zellen im Nabelschnurblut, was phänotypisch für eine Zuordnung zu Central-Memory-Zellen spricht. Der Anteil CCR7⁺ NKT-Zellen im peripheren Blut Erwachsener war dagegen signifikant niedriger und könnte darauf hinweisen, dass ein Teil der NKT-Zellen im Laufe ihrer Reifung zu CCR7⁻-Zellen differenzieren.

Weiterhin exprimierte ein hoher Anteil fetaler NKT-Zellen die Th2-Rezeptoren CCR4 und CCR8, was das bekannte Überwiegen der Th2-Immunantwort *in utero* widerspiegelt.

Durch Messung der Chemokinsekretion könnten in weiteren Untersuchungen auch funktionellen Eigenschaften fetaler NKT-Zellen näher betrachtet und weitere Erkenntnisse zur regulatorischen Funktion im fetalen Immunsystem gewonnen werden.

7 **ANHANG**

7.1 **Literaturverzeichnis**

1. Akbari,O., Faul,J.L., Hoyte,E.G., Berry,G.J., Wahlstrom,J., Kronenberg,M., DeKruyff,R.H., and Umetsu,D.T. 2006. CD4⁺ invariant T-cell-receptor⁺ natural killer T cells in bronchial asthma. *N.Engl.J.Med.* 354:1117-1129.
2. Assarsson,E., Kambayashi,T., Sandberg,J.K., Hong,S., Taniguchi,M., Van Kaer,L., Ljunggren,H.G., and Chambers,B.J. 2000. CD8⁺ T cells rapidly acquire NK1.1 and NK cell-associated molecules upon stimulation *in vitro* and *in vivo*. *J.Immunol.* 165:3673-3679.

3. Baxter,A.G., Kinder,S.J., Hammond,K.J., Scollay,R., and Godfrey,D.I. 1997. Association between alphabetaTCR+CD4-CD8- T-cell deficiency and IDDM in NOD/Lt mice. *Diabetes* 46:572-582.
4. Benaglio,M., Azzurri,A., Ciervo,A., Amedei,A., Tamburini,C., Ferrari,M., Telford,J.L., Baldari,C.T., Romagnani,S., Cassone,A. *et al.* 2003. T helper type 1 lymphocytes drive inflammation in human atherosclerotic lesions. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:6658-6663.
5. Bendelac,A., Killeen,N., Littman,D.R., and Schwartz,R.H. 1994. A subset of CD4+ thymocytes selected by MHC class I molecules. *Science* 263:1774-1778.
6. Biron,C.A. and Brossay,L. 2001. NK cells and NKT cells in innate defense against viral infections. *Curr.Opin.Immunol* 13:458-464.
7. Bix,M. and Locksley,R.M. 1995. Natural T cells. Cells that co-express NKRP-1 and TCR. *J Immunol* 155:1020-1022.
8. Bousquet,J., Yssel,H., and Vignola,A.M. 2000. Is allergic asthma associated with delayed fetal maturation or the persistence of conserved fetal genes? *Allergy* 55:1194-1197.
9. Boyson,J.E., Rybalov,B., Koopman,L.A., Exley,M., Balk,S.P., Racke,F.K., Schatz,F., Masch,R., Wilson,S.B., and Strominger,J.L. 2002. CD1d and invariant NKT cells at the human maternal-fetal interface. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:13741-13746.
10. Brigl,M. and Brenner,M.B. 2004. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu.Rev.Immunol.* 22:817-890.
11. Brigl,M., Bry,L., Kent,S.C., Gumperz,J.E., and Brenner,M.B. 2003. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat.Immunol.* 4:1230-1237.
12. Brooks,E.G., Balk,S.P., Aupeix,K., Colonna,M., Strominger,J.L., and Groh-Spies,V. 1993. Human T-Cell Receptor (TCR) {alpha}/{beta}+ CD4-CD8- T Cells Express Oligoclonal TCRs, Share Junctional Motifs Across TCR V{beta}-Gene Families, and Phenotypically Resemble Memory T Cells. *PNAS* 90:11787-11791.
13. Brossay,L., Chioda,M., Burdin,N., Koezuka,Y., Casorati,G., Dellabona,P., and Kronenberg,M. 1998. CD1d-mediated Recognition of an alpha - Galactosylceramide by Natural Killer T Cells Is Highly Conserved through Mammalian Evolution. *J.Exp.Med.* 188:1521-1528.
14. Brühl,H., Wagner,K., Kellner,H., Schattenkirchner,M., Schl,D., and Mack,M. 2001. Surface expression of CC- and CXC-chemokine

- receptors on leucocyte subsets in inflammatory joint diseases. *Clinical and Experimental Immunology* 126:551-559.
15. Brutkiewicz,R.R. and Sriram,V. 2002. Natural killer T (NKT) cells and their role in antitumor immunity. *Crit Rev.Oncol.Hematol.* 41:287-298.
 16. Budd,R.C., Miescher,G.C., Howe,R.C., Lees,R.K., Bron,C., and MacDonald,H.R. 1987. Developmentally regulated expression of T cell receptor beta chain variable domains in immature thymocytes. *J.Exp.Med.* 166:577-582.
 17. Campbell,J.J., Pan,J., and Butcher,E.C. 1999. Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J.Immunol.* 163:2353-2357.
 18. Chan,W.L., Pejnovic,N., Liew,T.V., Lee,C.A., Groves,R., and Hamilton,H. 2003. NKT cell subsets in infection and inflammation. *Immunology Letters* 85:159-163.
 19. Cui,J., Shin,T., Kawano,T., Sato,H., Kondo,E., Toura,I., Kaneko,Y., Koseki,H., Kanno,M., and Taniguchi,M. 1997. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278:1623-1626.
 20. D'Andrea,A., Goux,D., De-Lalla,C., Koezuka,Y., Montagna,D., Moretta,A., Dellabona,P., Casorati,G., and Abrignani,S. 2000. Neonatal invariant Valpha24+ NKT lymphocytes are activated memory cells. *Eur.J.Immunol.* 30:1544-1550.
 21. Davodeau,F., Peyrat,M.A., Necker,A., Dominici,R., Blanchard,F., Leget,C., Gaschet,J., Costa,P., Jacques,Y., Godard,A. *et al.* 1997. Close phenotypic and functional similarities between human and murine alphabeta T cells expressing invariant TCR alpha-chains. *J Immunol* 158:5603-5611.
 22. Dellabona,P., Padovan,E., Casorati,G., Brockhaus,M., and Lanzavecchia,A. 1994. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8-T cells. *J.Exp.Med.* 180:1171-1176.
 23. Doherty,D.G., Norris,S., Madrigal-Estebas,L., McEntee,G., Traynor,O., Hegarty,J.E., and O'Farrelly,C. 1999. The Human Liver Contains Multiple Populations of NK Cells, T Cells, and CD3+CD56+ Natural T Cells with Distinct Cytotoxic Activities and Th1, Th2, and Th0 Cytokine Secretion Patterns. *J Immunol* 163:2314-2321.
 24. Dunne,J., Lynch,S., O'Farrelly,C., Todryk,S., Hegarty,J.E., Feighery,C., and Doherty,D.G. 2001. Selective expansion and partial activation of

- human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *J Immunol* 167:3129-3138.
25. Eberl,G. and MacDonald,H.R. 2000. Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells. *Eur.J.Immunol.* 30:985-992.
 26. Ebert,L.M. and McColl,S.R. 2002. Up-Regulation of CCR5 and CCR6 on Distinct Subpopulations of Antigen-Activated CD4+ T Lymphocytes. *J Immunol* 168:65-72.
 27. Eger,K.A., Sundrud,M.S., Motsinger,A.A., Tseng,M., Kaer,L.V., and Unutmaz,D. 2006. Human natural killer T cells are heterogeneous in their capacity to reprogram their effector functions. *PLoS.ONE.* 1:e50.
 28. Emoto,M., Emoto,Y., Buchwalow,I.B., and Kaufmann,S.H. 1999. Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin 27. *Eur.J.Immunol.* 29:650-659.
 29. Exley,M., Garcia,J., Balk,S.P., and Porcelli,S. 1997. Requirements for CD1d recognition by human invariant Valpha24+ CD4-CD8- T cells. *J.Exp.Med.* 186:109-120.
 30. Exley,M., Porcelli,S., Furman,M., Garcia,J., and Balk,S. 1998. CD161 (NKR-P1A) costimulation of CD1d-dependent activation of human T cells expressing invariant V alpha 24 J alpha Q T cell receptor alpha chains. *J.Exp.Med.* 188:867-876.
 31. Fischer,K., Scotet,E., Niemeyer,M., Koebernick,H., Zerrahn,J., Maillet,S., Hurwitz,R., Kursar,M., Bonneville,M., Kaufmann,S.H. *et al.* 2004. Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 101:10685-10690.
 32. Fowlkes,B.J., Kruisbeek,A.M., Ton-That,H., Weston,M.A., Coligan,J.E., Schwartz,R.H., and Pardoll,D.M. 1987. A novel population of T-cell receptor alpha beta-bearing thymocytes which predominantly expresses a single V beta gene family. *Nature* 329:251-254.
 33. Fujii,S., Shimizu,K., Steinman,R.M., and Dhodapkar,M.V. 2003. Detection and activation of human Valpha24+ natural killer T cells using alpha-galactosyl ceramide-pulsed dendritic cells. *J Immunol Methods* 272:147-159.
 34. Gansert,J.L., Kiessler,V., Engele,M., Wittke,F., Rollinghoff,M., Krensky,A.M., Porcelli,S.A., Modlin,R.L., and Stenger,S. 2003. Human NKT cells express granulysin and exhibit antimycobacterial activity. *J Immunol* 170:3154-3161.

35. Gansuud,B., Hagihara,M., Yu,Y., Inoue,H., Ueda,Y., Tsuchiya,T., Masui,A., Ando,K., Nakamura,Y., Munkhtuvshin,N. *et al.* 2002. Human umbilical cord blood NK T cells kill tumors by multiple cytotoxic mechanisms. *Hum.Immunol.* 63:164-175.
36. Gapin,L., Matsuda,J.L., Surh,C.D., and Kronenberg,M. 2001. NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d. *Nat.Immunol.* 2:971-978.
37. Godfrey,D.I., Hammond,K.J., Poulton,L.D., Smyth,M.J., and Baxter,A.G. 2000. NKT-Cells: facts, funktions and fallacies. *Immunol.Today* 21:573-583.
38. Gombert,J.M., Tancrede-Bohin,E., Hameg,A., Leite-De-Moraes,M.C., Vicari,A., Bach,J.F., and Herbelin,A. 1996. IL-7 reverses NK1+ T cell-defective IL-4 production in the non-obese diabetic mouse. *Int.Immunol* 8:1751-1758.
39. Hachem,P., Lisbonne,M., Michel,M.L., Diem,S., Roongapinun,S., Lefort,J., Marchal,G., Herbelin,A., Askenase,P.W., Dy,M. *et al.* 2005. Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma. *Eur.J.Immunol.* 35:2793-2802.
40. Hagihara,M., Gansuud,B., Ueda,Y., Tsuchiya,T., Masui,A., Tazume,K., Inoue,H., Kato,S., and Hotta,T. 2002. Killing activity of human umbilical cord blood-derived TCRValpha24(+) NKT cells against normal and malignant hematological cells in vitro: a comparative study with NK cells or OKT3 activated T lymphocytes or with adult peripheral blood NKT cells. *Cancer Immunol.Immunother.* 51:1-8.
41. Hammond,K.J., Poulton,L.D., Palmisano,L.J., Silveira,P.A., Godfrey,D.I., and Baxter,A.G. 1998. alpha/beta-T cell receptor (TCR)+CD4-CD8-(NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J Exp.Med.* 187:1047-1056.
42. Hashimoto,D., Asakura,S., Miyake,S., Yamamura,T., Van Kaer,L., Liu,C., Tanimoto,M., and Teshima,T. 2005. Stimulation of host NKT cells by synthetic glycolipid regulates acute graft-versus-host disease by inducing Th2 polarization of donor T cells. *J.Immunol.* 174:551-556.
43. Hong,S., Scherer,D.C., Singh,N., Mendiratta,S.K., Serizawa,I., Koezuka,Y., and Van Kaer,L. 1999. Lipid antigen presentation in the immune system: lessons learned from CD1d knockout mice. *Immunol.Rev.* 169:31-44.
44. Hong,S. and Van-Kaer,L. 1999. Immune privilege: keeping an eye on

- natural killer T cells. *J.Exp.Med.* 190:1197-1200.
45. Ikehara,Y., Yasunami,Y., Kodama,S., Maki,T., Nakano,M., Nakayama,T., Taniguchi,M., and Ikeda,S. 2000. CD4(+) Valpha14 natural killer T cells are essential for acceptance of rat islet xenografts in mice. *J.Clin.Invest* 105:1761-1767.
 46. Janeway,C.A. 2002. Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
 47. Johnson,T.R., Hong,S., Van Kaer,L., Koezuka,Y., and Graham,B.S. 2002. NK T cells contribute to expansion of CD8(+) T cells and amplification of antiviral immune responses to respiratory syncytial virus. *J.Virol.* 76:4294-4303.
 48. Kadowaki,N., Antonenko,S., Ho,S., Rissoan,M.C., Soumelis,V., Porcelli,S.A., Lanier,L.L., and Liu,Y.J. 2001. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J.Exp.Med.* 193:1221-1226.
 49. Kaplan,A.P. 2001. Chemokines, chemokine receptors and allergy. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 124:423-431.
 50. Kawano,T., Nakayama,T., Kamada,N., Kaneko,Y., Harada,M., Ogura,N., Akutsu,Y., Motohashi,S., Iizasa,T., Endo,H. *et al.* 1999. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V alpha24 NKT cells. *Cancer Res.* 59:5102-5105.
 51. Kawano,T., Tanaka,Y., Shimizu,E., Kaneko,Y., Kamata,N., Sato,H., Osada,H., Sekiya,S., Nakayama,T., and Taniguchi,M. 1999. A novel recognition motif of human NKT antigen receptor for a glycolipid ligand. *Int.Immunol.* 11:881-887.
 52. Kim,C.H. 2004. Chemokine-chemokine receptor network in immune cell trafficking. *Curr.Drug Targets.Immune.Endocr.Metabol.Disord.* 4:343-361.
 53. Kim,C.H., Johnston,B., and Butcher,E.C. 2002. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 100:11-16.
 54. Kinjo,Y., Tupin,E., Wu,D., Fujio,M., Garcia-Navarro,R., Benhnia,M.R., Zajonc,D.M., Ben Menachem,G., Ainge,G.D., Painter,G.F. *et al.* 2006. Natural killer T cells recognize diacylglycerol antigens from pathogenic bacteria. *Nat.Immunol.* 7:978-986.
 55. Kronenberg,M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology:

- progress and paradoxes. *Annu.Rev.Immunol.* 23:877-900.
56. Kronenberg,M. and Gapin,L. 2002. The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat.Rev.Immunol* 2:557-568.
 57. Lanzavecchia,A. and Sallusto,F. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92-97.
 58. Lehuen,A., Lantz,O., Beaudoin,L., Laloux,V., Carnaud,C., Bendelac,A., Bach,J.F., and Monteiro,R.C. 1998. Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes. *J.Exp.Med.* 188:1831-1839.
 59. Lisbonne,M., Diem,S., de Castro,K.A., Lefort,J., Araujo,L.M., Hachem,P., Fourneau,J.M., Sidobre,S., Kronenberg,M., Taniguchi,M. *et al.* 2003. Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model. *J.Immunol.* 171:1637-1641.
 60. Loza,M.J., Metelitsa,L.S., and Perussia,B. 2002. NKT and T cells: coordinate regulation of NK-like phenotype and cytokine production. *Eur.J Immunol* 32:3453-3462.
 61. Maeda,T., Keino,H., Asahara,H., Taniguchi,M., Nishioka,K., and Sumida,T. 1999. Decreased TCR AV24AJ18+ double-negative T cells in rheumatoid synovium. *Rheumatology.(Oxford)* 38:186-188.
 62. Magnan,A., Mely,L., Prato,S., Vervloet,D., Romagne,F., Camilla,C., Necker,A., Casano,B., Montero-Jullian,F., Fert,V. *et al.* 2000. Relationships between natural T cells, atopy, IgE levels, and IL-4 production. *Allergy* 55:286-290.
 63. Mempel,M., Flageul,B., Suarez,F., Ronet,C., Dubertret,L., Kourilsky,P., Gachelin,G., and Musette,P. 2000. Comparison of the T cell patterns in leprous and cutaneous sarcoid granulomas. Presence of Valpha24-invariant natural killer T cells in T-cell-reactive leprosy together with a highly biased T cell receptor Valpha repertoire. *Am.J.Pathol.* 157:509-523.
 64. Metelitsa,L.S., Naidenko,O.V., Kant,A., Wu,H.W., Loza,M.J., Perussia,B., Kronenberg,M., and Seeger,R.C. 2001. Human NKT Cells Mediate Antitumor Cytotoxicity Directly by Recognizing Target Cell CD1d with Bound Ligand or Indirectly by Producing IL-2 to Activate NK Cells. *J Immunol* 167:3114-3122.
 65. Moser,B. and Loetscher,P. 2001. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat.Immunol* 2:123-128.

66. Mosmann,T.R. and Sad,S. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol.Today* 17:138-146.
67. Nakamura,T., Sonoda,K.H., Faunce,D.E., Gumperz,J., Yamamura,T., Miyake,S., and Stein-Streilein,J. 2003. CD4(+) NKT cells, but not conventional CD4(+) T cells, are required to generate efferent CD8(+) T regulatory cells following antigen inoculation in an immune-privileged site. *J Immunol* 171:1266-1271.
68. Nicol,A., Nieda,M., Koezuka,Y., Porcelli,S., Suzuki,K., Tadokoro,K., Durrant,S., and Juji,T. 2000. Human invariant valpha24+ natural killer T cells activated by alpha-galactosylceramide (KRN7000) have cytotoxic anti-tumour activity through mechanisms distinct from T cells and natural killer cells. *Immunology* 99:229-234.
69. Nieda,M., Nicol,A., Koezuka,Y., Kikuchi,A., Takahashi,T., Nakamura,H., Furukawa,H., Yabe,T., Ishikawa,Y., Tadokoro,K. *et al.* 1999. Activation of human Va24NKT Cells by a-Galactocylceramide in a CD1d-Restricted and V a24TCR-Mediated Manner. *Hum.Immunol.* 60:10-19.
70. O'Garra,A., McEvoy,L.M., and Zlotnik,A. 1998. T-cell subsets: chemokine receptors guide the way. *Curr.Biol.* 8:R646-R649.
71. Ohteki,T. and MacDonald,H.R. 1994. Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice. *J.Exp.Med.* 180:699-704.
72. Oishi,Y., Sakamoto,A., Kurasawa,K., Nakajima,H., Nakao,A., Nakagawa,N., Tanabe,E., Saito,Y., and Iwamoto,I. 2000. CD4-CD8- T cells bearing invariant Valpha24JalphaQ TCR alpha-chain are decreased in patients with atopic diseases. *Clin.Exp.Immunol.* 119:404-411.
73. Olson,T.S. and Ley,K. 2002. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am.J Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 283:R7-28.
74. Perussia,B. and Loza,M.J. 2003. Linear '2-0-1' lymphocyte development: hypotheses on cellular bases for immunity. *Trends Immunol* 24:235-241.
75. Pillai,A.B., George,T.I., Dutt,S., Teo,P., and Strober,S. 2007. Host NKT cells can prevent graft-versus-host disease and permit graft antitumor activity after bone marrow transplantation. *J.Immunol.* 178:6242-6251.
76. Porcelli,S., Yockey,C.E., Brenner,M.B., and Balk,S.P. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J.Exp.Med.* 178:1-16.

77. Porcelli,S.A. and Modlin,R.L. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu.Rev.Immunol.* 17:297-329:-329.
78. Prahalad,S. 2000. Atopy, autoimmunity, and the T(H)1/T(H)2 balance. *J.Pediatr.* 137:446-449.
79. Prell,C., Konstantopoulos,N., Heinzemann,B., Frankenberger,B., Reinhardt,D., Schendel,D.J., and Krauss-Etschmann,S. 2003. Frequency of Valpha24+CD161+ natural killer T cells and invariant TCRAV24-AJ18 transcripts in atopic and non-atopic individuals. *Immunobiology* 208:367-380.
80. Prescott,S.L., Macaubas,C., Smallacombe,T., Holt,B.J., Sly,P.D., and Holt,P.G. 1999. Development of allergen-specific T-cell memory in atopic and normal children. *Lancet* 353:196-200.
81. Prussin,C. and Foster,B. 1997. TCR V alpha 24 and V beta 11 coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation. *J Immunol.* 159:5862-5870.
82. Reinhardt,C. and Melms,A. 1999. Elevated frequencies of natural killer T lymphocytes in myasthenia gravis. *Neurology* 52:1485-1487.
83. Rossi,D. and Zlotnik,A. 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 18:217-242.
84. Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. 2000. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol.Rev.* 177:134-140.
85. Sallusto,F., Lenig,D., Forster,R., Lipp,M., and Lanzavecchia,A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
86. Sallusto,F., Mackay,C.R., and Lanzavecchia,A. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu.Rev.Immunol.* 18:593-620.
87. Sandberg,J.K., Bhardwaj,N., and Nixon,D.F. 2003. Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment. *Eur.J Immunol* 33:588-596.
88. Schmitz G. and Rothe G. 1994. Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik. Schattauer Verlag, Stuttgart.
89. Seino,K.i., Fukao,K., Muramoto,K., Yanagisawa,K., Takada,Y.,

- Kakuta,S., Iwakura,Y., Van Kaer,L., Takeda,K., Nakayama,T. *et al.* 2001. Requirement for natural killer T (NKT) cells in the induction of allograft tolerance. *PNAS* 98:2577-2581.
90. Shi,F., Ljunggren,H.G., and Sarvetnick,N. 2001. Innate immunity and autoimmunity: from self-protection to self-destruction. *Trends.Immunol.* 22:97-101.
91. Sieling,P.A., Chatterjee,D., Porcelli,S.A., Prigozy,T.I., Mazzaccaro,R.J., Soriano,T., Bloom,B.R., Brenner,M.B., Kronenberg,M., Brennan,P.J. *et al.* 1995. CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science* 269:227-230.
92. Smyth,M.J., Thia,K.Y., Street,S.E., Cretney,E., Trapani,J.A., Taniguchi,M., Kawano,T., Pelikan,S.B., Crowe,N.Y., and Godfrey,D.I. 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J.Exp.Med.* 191:661-668.
93. Sonoda,K.H., Taniguchi,M., and Stein-Streilein,J. 2002. Long-term survival of corneal allografts is dependent on intact CD1d-reactive NKT cells. *J.Immunol.* 168:2028-2034.
94. Spada,F.M., Koezuka,Y., and Porcelli,S.A. 1998. CD1d-restricted Recognition of Synthetic Glycolipid Antigens by Human Natural Killer T Cells. *J.Exp.Med.* 188:1529-1534.
95. Sriram,V., Du,W., Gervay-Hague,J., and Brutkiewicz,R.R. 2005. Cell wall glycosphingolipids of *Sphingomonas paucimobilis* are CD1d-specific ligands for NKT cells. *Eur.J.Immunol.* 35:1692-1701.
96. Sumida,T., Sakamoto,A., Murata,H., Makino,Y., Takahashi,H., Yoshida,S., Nishioka,K., Iwamoto,I., and Taniguchi,M. 1995. Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis. *J.Exp.Med.* 182:1163-1168.
97. Takahashi,T., Nieda,M., Koezuka,Y., Nicol,A., Porcelli,S.A., Ishikawa,Y., Tadokoro,K., Hirai,H., and Juji,T. 2000. Analysis of human V alpha 24+ CD4+ NKT cells activated by alpha-glycosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J.Immunol.* 164:4458-4464.
98. Taniguchi,M., Seino,K., and Nakayama,T. 2003. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat.Immunol.* 4:1164-1165.
99. van-der-Vliet,H.J., Nishi,N., de-Gruijl,T.D., von-Blomberg,B.M., Van-Den-Eertwegh,A.J., Pinedo,H.M., Giaccone,G., and Scheper,R.J. 2000. Human natural killer T cells acquire a memory-activated phenotype before birth. *Blood* 95:2440-2442.

100. Wilson,S.B. and Byrne,M.C. 2001. Gene expression in NKT cells: defining a functionally distinct CD1d-restricted T cell subset. *Curr.Opin.Immunol* 13:555-561.
101. Wilson,S.B., Kent,S.C., Patton,K.T., Orban,T., Jackson,R.A., Exley,M., Porcelli,S., Schatz,D.A., Atkinson,M.A., Balk,S.P. *et al.* 1998. Extreme Th1 bias of invariant Valpha24JalphaQ T cells in type 1 diabetes. *Nature* 391:177-181.
102. Wilson,S.B., Kent,S.C., Horton,H.F., Hill,A.A., Bollyky,P.L., Hafler,D.A., Strominger,J.L., and Byrne,M.C. 2000. Multiple differences in gene expression in regulatory Valpha 24Jalpha Q T cells from identical twins discordant for type I diabetes. *PNAS* 97:7411-7416.
103. Yang,O.O., Racke,F.K., Nguyen,P.T., Gausling,R., Severino,M.E., Horton,H.F., Byrne,M.C., Strominger,J.L., and Wilson,S.B. 2000. CD1d on Myeloid Dendritic Cells Stimulates Cytokine Secretion from and Cytolytic Activity of V{alpha}24J{alpha}Q T Cells: A Feedback Mechanism for Immune Regulation. *J Immunol* 165:3756-3762.
104. Yao,Q., Song,J., Xia,C., Zhang,W., and Wang,P.G. 2006. Chemoenzymatic syntheses of iGb3 and Gb3. *Org.Lett.* 8:911-914.
105. Yoshimoto,T. and Paul,W.E. 1994. CD4pos, NK1.1pos T cells promptly produce interleukin 4 in response to in vivo challenge with anti-CD3. *J.Exp.Med.* 179:1285-1295.
106. Zhou,D., Mattner,J., Cantu,C., III, Schrantz,N., Yin,N., Gao,Y., Sagiv,Y., Hudspeth,K., Wu,Y.P., Yamashita,T. *et al.* 2004. Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science* 306:1786-1789.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Rearrangement der monoklonalen α -Kette bei NKT-Zellen	7
Abb. 2: Strukturformeln der Moleküle Isoglobotrihexosylceramid, α -Galactosylceramid, α -Glucuronosylceramid und Diacyl- α -Galactosylglycerol.....	8
Abb. 3: Biologische Funktionen der Chemokine und deren Rezeptoren	10
Abb. 4: Einteilung der Chemokinrezeptoren und Chemokine	11
Abb. 5: Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen	13
Abb. 6: Auftrennung von Vollblut nach Zentrifugation.....	16
Abb. 7: Darstellung der Leukozytengruppen im Vollblut.....	20
Abb. 8: Darstellung der Leukozytengruppen im ficollierten Blut	21
Abb. 9: Lymphozyteneingrenzung (R1) im ficollierten Nabelschnurblut.....	22
Abb. 10: Darstellung der $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ NKT-Zellen (R2) innerhalb der Lymphozyten (R1).....	22
Abb. 11: Abgrenzung der $CCR4^+$ NKT-Zellen innerhalb R2	23
Abb. 12: Abgrenzung der $CCR4^+CCR4^+$ NKT-Zellen innerhalb R2.....	23
Abb. 13: Prozentsatz $CCR1$ -exprimierender NKT-Zellen	29
Abb. 14: Prozentsatz $CCR2$ -exprimierender NKT-Zellen	30
Abb. 15: Prozentsatz $CCR4$ -exprimierender NKT-Zellen	31
Abb. 16: Prozentsatz $CCR5$ -exprimierender NKT-Zellen	32
Abb. 17: Prozentsatz $CCR6$ -exprimierender NKT-Zellen	33
Abb. 18: Prozentsatz $CCR7$ -exprimierender NKT-Zellen	34
Abb. 19: Prozentsatz $CCR8$ -exprimierender NKT-Zellen	35
Abb. 20: Prozentsatz $CCR9$ -exprimierender NKT-Zellen	36
Abb. 21: Prozentsatz $CXCR3$ -exprimierender NKT-Zellen	37
Abb. 22: Prozentsatz $CXCR4$ -exprimierender NKT-Zellen	38
Abb. 23: Prozentsatz $CXCR5$ -exprimierender NKT-Zellen	39
Abb. 24: Prozentsatz $CXCR6$ -exprimierender NKT-Zellen	40
Abb. 25: Prozentsatz $CD45RO$ -exprimierender NKT-Zellen.....	41

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: verwendete Antikörper	19
Tab. 2: Färbeprotokoll	21
Tab. 3: Verwendete Fluorochrome nach Becton & Dickinson	26
Tab. 4: Charakterisierung der Neugeborenen	27
Tab. 5: Charakterisierung der Kontrollgruppe.....	28
Tab. 6: Prozentsatz CCR1-exprimierender NKT-Zellen.....	29
Tab. 7: Prozentsatz CCR2-exprimierender NKT-Zellen.....	30
Tab. 8: Prozentsatz CCR4-exprimierender NKT-Zellen.....	31
Tab. 9: Prozentsatz CCR5-exprimierender NKT-Zellen.....	32
Tab. 10: Prozentsatz CCR6-exprimierender NKT-Zellen.....	33
Tab. 11: Prozentsatz CCR7-exprimierender NKT-Zellen.....	34
Tab. 12: Prozentsatz CCR8-exprimierender NKT-Zellen.....	35
Tab. 13: Prozentsatz CCR9-exprimierender NKT-Zellen.....	36
Tab. 14: Prozentsatz CXCR3-exprimierender NKT-Zellen	37
Tab. 15: Prozentsatz CXCR4-exprimierender NKT-Zellen	38
Tab. 16: Prozentsatz CXCR5-exprimierender NKT-Zellen	39
Tab. 17: Prozentsatz CXCR6-exprimierender NKT-Zellen	40
Tab. 18: Prozentsatz CD45RO-exprimierender NKT-Zellen.....	41

7.4 Danksagung

Mein ganz besonders herzlicher Dank gilt Frau PD Dr. med. S. Krauss-Etschmann für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung und Geduld bei der Ausarbeitung und Durchsicht dieser Arbeit.

Bei meinem Mitbetreuer Dr. med. D. Hartl möchte ich mich für seine hilfsbereite und motivierende Art bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. D. Reinhardt möchte ich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit im Labor der AG Pädiatrische Immunologie am Forschungszentrum Kubus des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität München danken.

Mein herzlicher Dank gilt auch den Hebammen der Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München für die zu jeder Tages- und Nachtzeit gewährte Unterstützung bei der Abnahme der Nabelschnurblutproben.

7.5 Lebenslauf

Name: Korinna Sandra Nadas

Geburtsdatum/-ort: 21.09.1977 in München

Schulbildung: Sept. 1984 - Aug. 1988 Grundschule, Eching
 Sept. 1988 - Juni 1997 Dom – Gymnasium, Freising

Studium: April 1998 - März 2000 Humanmedizin an der
 Ludwig-Maximilians-Universität München
 April 2000 - Okt. 2004 Humanmedizin an der
 Technischen Universität München
 März 2000 Physikum
 März 2001 Erstes Staatsexamen
 März 2003 Zweites Staatsexamen
 Okt. 2004 Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr: Okt. 2003 - Aug. 2004
 1. Terial: Orthopädie am Klinikum Rechts der Isar in
 München
 2. Terial: Allgemein Chirurgie im Hospital Virgen
 Macarena, Sevilla, Spanien
 3. Terial: Internistische Intensivstation/
 Gastroenterologische Station am Klinikum
 Rechts der Isar, München

Beruf: seit Mai 2005 Assistenzärztin am Institut für Virologie
 der TU München