

Johannes Wiedemann
Dr. med.

Charakterisierung von T- Lymphozyten durch *in situ* Nachweisverfahren

Geboren am 27.04.1972 in Lübeck
Reifeprüfung am 15.06.1991 in Lübeck
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/2 bis WS 1997/8 in Lübeck und Heidelberg
Physikum am 14.9.1993 an der Medizinischen Universität Lübeck
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktisches Jahr in Heidelberg
Staatsexamen am 19.5.1998 an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin
Doktorvater: Professor Dr. med. Ulrich Keilholz

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines selektiven *in situ* Färbeverfahrens zur Charakterisierung von T-Lymphozyten anhand der mRNA-Sequenz des T-Zellrezeptors. Zwei unterschiedliche Verfahren auf mRNA-Ebene wurden auf ihre diesbezügliche Eignung hin untersucht und miteinander verglichen. Hierbei handelte es sich zum einen um die klassische RNA-RNA *in situ* Hybridisierung in einem zunächst radioaktiven und später nichtradioaktiven Protokoll sowie um die nichtradioaktive reverse-transkriptaseabhängige Primer induzierte *in situ* Transkription (PRINS). Den Ergebnissen wurde die antikörperabhängige Immunhistochemie zum T-Zellrezeptornachweis als alternatives Nachweisverfahren gegenübergestellt. Für den Ablauf der *in situ* Hybridisierung war eine umfangreiche experimentelle Vorbereitung mit einer Reihe molekularbiologischer Techniken erforderlich. Die RNA-Isolation und die reverse Transkription zur cDNA-Synthese gingen der Polymerasekettenreaktion voraus. Nach der Klonierung und Sequenzierung der hypervariablen Region des T-Zellrezeptors konnte die Plasmidisolierung und *in vitro* Transkription der markierten RNA-Sonde erfolgen, an die sich die eigentliche *in situ* Hybridisierung anschloß. Die PRINS bot bei bekannter Sequenz demgegenüber den Vorteil, daß mit einem kommerziell erhältlichen Primer direkt hybridisiert werden konnte.

Zufriedenstellende Ergebnisse an Cytospins von Zellsuspensionen mit der PRINS-Technik konnten an Gewebekryoschnittpräparaten nicht reproduziert werden. Die Etablierung des Verfahrens an Gewebeschnittpräparaten gelang trotz zahlreicher Modifikationen des Versuchsprotokolls nicht. Demgegenüber konnten mit der klassischen *in situ* Hybridisierung an Cytospins von Zellsuspensionen ebenso wie an Kryoschnittpräparaten humanen Tonsillengewebes T-Lymphozyten selektiv und reproduzierbar angefärbt werden. Das Protokoll der nichtradioaktiven *in situ* Hybridisierung wurde nach den Ergebnissen dieser Versuchsreihen für die nachfolgenden Untersuchungen favorisiert.

Die T-Zellcharakterisierung wurde an operativ entferntem Material regredienter Metastasen maligner Melanome von Patienten, die mit einer immunmodulatorischen Kombinationstherapie mit INF- α und IL2 im Rahmen klinischer Studien an der Poliklinik der Universität Heidelberg behandelt worden waren, durchgeführt. In dem Gewebe von beiden mit der ISH untersuchten Patienten, die nach Immuntherapie ein restringiertes T-Zellrepertoire aufgewiesen hatten, konnten in 3 von 6 Metastasen mit der nichtradioaktiven ISH die überexprimierten T-Zellspezifitäten lokal tumorinfiltrierend nachgewiesen werden. Die übrigen Präparate waren nicht auswertbar. Die Ergebnisse unterstreichen die Relevanz der lokalen T-Zellinvasion in den Tumor entsprechend der bisherigen Vorstellung einer

spezifischen Entzündung im Rahmen einer immunitätsvermittelten Tumorabwehr bei Respondern einer Immuntherapie.