T-Zellavidität
und
Autoimmunität

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2002

vorgelegt von

Matthias Hofmann

Tag der mündlichen Prüfung:	13. September 2002
Dekan:	Prof. Dr. Hansgeorg Probst
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee
2. Berichterstatter	PD Dr. Hansjörg Schild

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung ... 5
1.1. Das Immunsystem ... 5
1.2. Hauptgewebeverträglichkeitskomplex ... 5
1.3. Naive T-Zellen ... 6
1.3.1. Entstehung und Reifung von naiven T-Zellen ... 7
1.3.2. Phänotyp und Funktion ... 8
1.4. Anergie ... 8
1.5. Professionell Antigen präsentierende Zellen (APC) ... 9
1.6. Effektor-T-Zellen ... 9
1.6.1. $CD4^+$ Effektorzellen ... 10
1.6.1.1. T_H1-Antwort ... 11
1.6.1.2. T_H2-Antwort ... 11
1.6.2. $CD8^+$ Effektorzellen ... 12
1.7. Gedächtnis-T-Zellen ... 13
1.7.1. Funktion ... 13
1.7.2. Lineare Differenzierung ... 15
1.7.3. Bystander ... 17
1.7.4. Abnehmendes Potential ... 17
1.7.5. Das Nachzügler-Modell ... 19
1.8. TCR-transgene T-Zellen ... 19
1.9. Affinität, Avidität und das St40/St42-Modell ... 20
1.10. Autoimmunität ... 22
1.11. Regulatorische T-Zellen ... 22
1.12. Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis ... 22

2. Material und Methoden ... 25
2.1. Lösungen ... 25
2.1.1. Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogenkarbonat-Lösung (ACK) zur Erythrozytenlyse ... 25
2.1.2. FACS-Puffer (FP) ... 25
2.1.3. Mouse Tail Juice (MTJ) ... 25
2.1.4. Tris-EDTA-Puffer (TE) ... 25

2.1.5. DNA-Ladepuffer ... 26
2.1.6. Tris-Essigsäure-EDTA-Laufpuffer 50X (TAE) ... 26
2.2. Zentrifugation (ZF) von Zellen ... 26
2.3. Schwanzbiopsie und Blutentnahme bei Mäusen ... 26
2.4. PCR auf den RAG2-Genotyp ... 27
2.5. PCR auf den transgenen St40/St42-TCR-Genotyp ... 28
2.6. FACS-Färbung mit Antikörpern, Choleratoxin B und SGP-Tm ... 29
2.7. CFSE-Markierung ... 30
2.8. Titration der PLP3-Tm ... 31
2.9. FACS-Färbung mit Ak und PLP3-Tm ... 31
2.10. Bestimmung der Zellzahl ... 32
2.11. Kultur von St40/St42-Milzzellen ... 32
2.12. Kultur von St40RAG2$^{-/-}$ und St42RAG2$^{-/-}$-Zellen ... 32
2.13. Kultur von Tumorzellinien ... 33
2.14. Zytotoxizitätstest ... 33
2.15. Adoptiver Transfer ... 34
2.16. Immunisierung mit Adenovirus ... 34
2.17. Vorimmunisierung von Mäusen für die Zweitantwort bei EAE-Induktion (Priming) ... 35
2.18. Induktion von EAE ... 35
2.19. Feststellung des Krankheitsgrades ... 35
2.20. Isolierung von T-Zellen aus Lymphknoten, Milz und zentralem Nervensystem ... 36
2.21. Liste der Hersteller von Geräten und Reagenzien ... 37

3. Ergebnisse ... 39
A Charakterisierung von T-Zellen die einen TCR mit gleicher Affinität exprimieren, aber unterschiedliche Avidität aufweisen ... 39
3.1. Genotypisierung der St40-, St42- und RAG2$^{-/-}$-Mäuse mit PCR sowie Phänotypisierung der Ly5 und Thy1-Antigene dieser Mäuse ... 39
3.2. St40- und St42-Mäuse unterscheiden sich in der TCR-Expression ... 40
3.3. Die T-Zellen der St40- und St42-Mäuse sind funktionell ... 42
3.4. St42-T-Zellen haben mehr Lipid Rafts auf ihrer Oberfläche als St40-T-Zellen ... 43

3.5. St42-T-Zellen teilen sich schneller bei Peptidstimulation 44
3.6. Zellgröße und Aktivierungsmarker verhalten sich nach Peptidstimulation von T-Zellen aus St40- und St42-Mäusen gleich..... 45
3.7. Wanderungsmarker verhalten sich nach Peptidstimulation von T-Zellen aus St40- und St42-Mäusen gleich..... 47
3.8. Die anfängliche Aktivierung von St40- und St42-Zellen ist die gleiche, jedoch werden mehr St42-T-Zellen aktiviert 48
3.9. St40-T-Zellen haben anfangs eine verringerte Blastenbildung und zeigen eine gehemmte CD25-Hochregulierung 50
3.10. Die T-Zellzahlen und die TCR-Expressionshöhe sind altersabhängig 51
3.11. Adoptiv transferierte Zellen werden nicht abgestoßen 52
3.12. Sowohl St40 als auch St42-T-Zellen übernehmen die akute Immunantwort 54
3.13. Bei Kotransfer übernehmen die St42-T-Zellen die akute Immunantwort 55
3.14. Ein Argument gegen die Nachzügler-Hypothese..... 57

B Die Kinetik antigenspezifischer T-Zellen bei Induktion von EAE..... 58
3.15. Die Primärantwort im EAE-Modell führt gegenüber einer Sekundärantwort zu einem späteren Krankheitsausbruch und zu schnellerer Erholung..... 58
3.16. PLP3-spezifische Zellen können mit MHC II-Tetrameren gefärbt werden..... 59
3.17. Dem Krankheitsausbruch geht die Expansion spezifischer T-Zellen in den DLN voraus 60
3.18. Die relativen spezifischen Zellzahlen im DLN erreichen ihr Maximum vor oder zusammen mit den absoluten spezifischen Zellzahlen 61
3.19. Der Krankheitsausbruch verläuft parallel mit der Einwanderung spezifischer T-Zellen ins ZNS 62
3.20. In der Milz treten keine großen Änderungen der spezifischen Zellzahlen ein ... 64
3.21. Kinetik der Aktivierungsmarker im DLN 65
3.21.1. CD11b 66
3.21.2. CD25 67
3.21.3. CD43 67
3.21.4. CD44 68
3.21.5. CD69 69
3.22. Kinetik der Aktivierungsmarker in der Milz..... 70
3.22.1. CD11b 70

3.22.2. CD25 ... 71
3.22.3. CD43 ... 72
3.22.4. CD44 ... 73
3.22.5. CD69 ... 74
3.23. Kinetik der Aktivierungsmarker im ZNS ... 75
3.23.1. CD11b ... 75
3.23.2. CD25 ... 76
3.23.3. CD43 ... 76
3.23.4. CD44 ... 77
3.23.5. CD69 ... 78
3.24. Zusammenfassung der Kinetik der Aktivierungsmarker ... 79

4. Diskussion ... 81
4.1. Phänotyp und Funktionalität der St40- und St42-Zellen ... 81
4.2. Peptidstimulation der St40- und St42-Milzzellen *in vitro* ... 83
4.3. Zunahme der T-Zellzahlen mit dem Alter in St40/St42RAG2$^{-/-}$-Mäusen ... 85
4.4. Altersabhängigkeit der TCR-Expression bei St42-Mäusen ... 85
4.5. Immunantwort der St40- und St42-Zellen nach adoptivem Transfer ... 86
4.6. Avidität und T-Zellgedächtnis ... 88
4.7. Nachzügler ... 88
4.8. Krankheitsverlauf bei EAE-Induktion in „naiven“ und „geprimten“ Mäusen ... 89
4.9. Kinetik der spezifischen T-Zellen in DLN, Milz und ZNS ... 90
4.10. Expressionskinetik der Aktivierungsmarker ... 92

5. Zusammenfassung ... 95

6. Literatur ... 97

7. Abkürzungen ... 107
8. Dank ... 109
9. Verzeichnis der akademischen Lehrer ... 109
10. Lebenslauf ... 110

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Zur Verteidigung gegen das Eindringen schädlicher, körperfremder Organismen in den Körper und deren Parasitieren hat sich in Vertebraten zusätzlich zum natürlichen das sogenannte adaptive Immunsystem entwickelt. Insbesondere sind deshalb Zellen entstanden, die Gefahren für den Körper (z.B. infizierte Zellen, Pathogene, Verletzungen) erkennen und daraufhin entsprechende antigenspezifische Zellen aktivieren können. Um z.B. infizierte Zellen, die der Ursprung für weitere Pathogene sind, eliminieren zu können, gibt es auf der Oberfläche aller Zellen Proteine, die MHC-Moleküle*, die die Abbauprodukte des kompletten zellulären Proteinkatabolismus in Form von Peptiden präsentieren.
Die Zellen, die von Gefahrensignalen aktiviert werden, heißen professionell antigen-präsentierende Zellen (APC). Sie präsentieren gleichzeitig mit einem Kostimulus Peptide, die von im Thymus gereiften $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ naiven T-Zellen, die keine im Thymus vorkommenden – d.h. normalerweise körpereigene – Peptide mehr erkennen können, erkannt werden. Diese T-Zellen werden dadurch aktiviert und differenzieren sich sodann in $CD4^+$ T-Helferzellen bzw. $CD8^+$ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL). T-Helferzellen modulieren die Immunantwort durch Ausschüttung von Zytokinen und CTL töten Zellen, die Peptide, die zu ihrer Aktivierung geführt haben, präsentieren, durch Einleitung von Apoptose.

1.2. Hauptgewebeverträglichkeitskomplex

Proteine des Hauptgewebeverträglichkeitskomplexes (major histocompatibility complex, MHC) kommen außer auf Erythrozyten in verschiedenen Ausprägungen auf den Oberflächen von Zellen aller Gewebe vor, insbesondere Proteine des klassischen MHC I. Beim Menschen heißt der MHC auch HLA, bei Mäusen H2. Ein MHC I-Molekül besteht aus einer α-Kette mit einer Transmembrandomäne und drei Immunglobulindomänen sowie einer nicht kovalent assoziierten ß-Kette, dem $ß_2$-Mikroglobulin ($ß_2$m). In die Furche zwischen den beiden membrandistalen Immunglobulindomänen der α-Kette können Peptide von acht bis zehn Aminosäuren Länge binden. Da der MHC sowohl polygenisch als auch überaus polymorph ist

* Abkürzungen siehe 7.

gibt es in einer Population viele verschiedene Peptidbindungstaschen, in denen jeweils unterschiedliche Peptide bevorzugt gebunden werden. Dabei hängt die Affinität eines Peptids zur Bindungstasche von seinen Aminosäureseitenketten ab, v.a. von denen, die an bestimmten Ankerpositionen mit entsprechenden Ankergruben wechselwirken.
Die gebundenen und an der Oberfläche präsentierten Peptide stammen hauptsächlich aus dem zytosolischen Proteinabbau und spiegeln so das Geschehen in der Zelle auf der Oberfläche wider, z.B. auch eine Virusinfektion durch Präsentation viraler Peptide. Der Proteinabbau im Zytosol wird großteils vom Proteasom durchgeführt. Die entstehenden Peptide gelangen möglicherweise unter Schutz von Hitzeschockproteinen durch den mit der Antigenprozessierung assozierten Transporter (TAP) ins endoplasmatische Retikulum (ER), wo an Chaperone gebundene "leere" MHC I-Moleküle für die Beladung mit den entsprechenden Peptiden bereit stehen.
Moleküle des ebenfalls klassischen, also polymorphen und peptidbindenden MHC II kommen nur auf der Oberfläche von speziellen APCs vor, d.h. auf dendritischen Zellen (DC), Makrophagen (MΦ) und B-Zellen (BC). Sie bestehen aus je einer α- und ß-Kette, die jeweils aus einer Transmembrandomäne und zwei Immunglobulindomänen aufgebaut sind. In der Furche zwischen den beiden membrandistalen Immunglobulindomänen werden bis zu über 20 Aminosäuren lange Peptide aus endosomalem Abbau präsentiert.
Neben den beiden klassischen MHC-Molekülen kommen noch nicht-klassische, wenig bis nicht polymorphe, nicht peptidpräsentierende MHC-Moleküle vor, die nicht unbedingt mit der adaptiven Immunantwort assoziiert sind, wie z.B. HLA-H (HFE), das die Eisenaufnahme reguliert.

1.3. Naive T-Zellen

T-Zellen sind nach ihrer Ausbildung im Thymus für die Erkennung von körperfremden Peptiden geschult und werden dann als naive bzw. reife T-Zellen bezeichnet. Sie erkennen mit ihrem T-Zellrezeptor (TCR) ein bestimmtes MHC-Molekül und reagieren nicht auf darauf präsentierte, körpereigene Peptide. Körperfremde Peptide jedoch führen bei entsprechender Kostimulation zu einer Aktivierung einzelner T-Zellen, die dann im Allgemeinen für die Eliminierung des Pathogens sorgen.

1.3.1. Entstehung und Reifung von naiven T-Zellen

T-Zellvorläufer wandern früh in der Entwicklung vom Knochenmark in den Thymus ein, wo sie nun Thymozyten genannt werden. Sie exprimieren noch keinen TCR, jedoch bald eine Rekombinase (RAG), die aus verschiedenen Segmenten (V, D, J), die in linearer Abfolge in bis zu 50 Varianten im Genom vorliegen, jeweils eines auswählt und so somatisch rekombiniert, daß eine funktionsfähige TCR ß-Kette entsteht. Während dieser Rekombination werden mit Hilfe anderer Enzyme weitere Nukleotide zwischen die Segmente einfügt, was eine immense Vielfalt an verschiedenen ß-Ketten ermöglicht. Erfolgreich transkribierte und translatierte ß-Ketten paaren mit einer sogenannten prä-T-α-Kette (pTα) zum prä-T-Zellrezeptor, dessen erfolgreiche Expression nun die ß-Kettenrekombination beendet, Zellteilung auslöst und danach die Rekombination der TCR α-Kette aus V und J-Segmenten ermöglicht. Der nun exprimierte TCR ermöglicht einer Thymozyte das Überleben, wenn er an ein MHC-Molekül bindet (positive Selektion), andernfalls stirbt die Zelle, falls es ihr binnen drei bis vier Tagen nicht gelingt, einen anderen T-Zellrezeptor zu exprimieren.
In dieser Phase haben die Thymozyten ihre Korezeptoren CD4 und CD8 exprimiert. Am Ende dieser Entwicklung exprimieren Thymozyten, deren TCR an ein MHC I-Molekül bindet, schließlich nur noch CD8, während Thymozyten, deren TCR an ein MHC II-Molekül bindet, nur noch CD4 exprimieren. Der Mechanismus ist jedoch noch unklar: Entweder die Bindung an ein MHC-Molekül ist entscheidend und der nicht bindende Korezeptor wird herunterreguliert [1], die Herunterregulation eines Korezeptors ist stochastisch oder die Bindungsdauer der T-Zellen an Thymusepithelzellen über die TCR-Peptid-MHC-Komplex-Wechselwirkung kontrolliert die Herunterregulation eines Korezeptors [2]. Allerdings darf – teleologisch gesprochen - die Bindung des TCR an MHC-Peptid-Komplexe nicht zu stark sein, da die dann entstehenden T-Zellen sonst autoreaktiv wären. Zu hoch affine T-Zellen sterben daher durch sogenannte negative Selektion ab.
Die nun den Thymus verlassenden naiven T-Zellen binden ohne aktiviert zu werden körpereigene MHC-Peptid-Komplexe mit geringer Affinität, sind aber fähig von MHC-Peptid-Komplexen, die ihnen bisher unbekannte Peptide, die zu höherer Affinität des Peptid-MHC-Komplexes führen, präsentieren, aktiviert zu werden, wenn dies im entsprechenden Kontext einer APC geschieht.

1.3.2. Phänotyp und Funktion

Naive T-Zellen zirkulieren im Körper durch das Blut und wandern in besonderen, in Lymphknoten vorkommenden Venolen (high endothelial venules, HEV) in die Lymphknoten aus, wo sie in Kontakt mit APCs kommen. Über die Lymphe gelangen sie wieder zurück in den Blutkreislauf. Die Dauer einer kompletten Zirkulation wird auf 12 bis 18 h geschätzt [3]. Naive T-Zellen sind klein (zirka 10 nm Durchmesser) und an verschiedenen Oberflächenmarkern erkennbar, die u.a. für das sogenannte Lymphknoten-Homing verantwortlich sind. Z.B. exprimieren sie L-Selektin (CD62L) [4], dessen Ligand PNAd auf den HEVs vorkommt [5], und den CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR7), der die Chemokine CCL19 und CCL21 bindet [6]. Weiterhin zeigen sie keinerlei Aktivierungsmarker wie z.B. CD69 (very early activation antigen), CD25 (IL2Rα) und CD95L (Fas-Ligand) oder Wanderungsmarker wie z.B. CD44 (ein Zelladhäsionsmolekül), CD11b (bildet mit CD18 Mac-1, ein Integrin) [7] [8] und CD43h (schwere glykosylierte Isoform eines Adhäsionsmoleküls) [9] [10]. Ebenso exprimieren sie CD28, das für die Kostimulation bei Aktivierung durch APCs notwendig ist.
Naive T-Zellen haben eine verhältnismäßig lange Lebenzeit, die aber von ständiger Ligation des TCR zu selbst-Peptid-MHC-Komplexen [11] [12] [13] des restringierenden MHC-Moleküls [14] und IL7-Bindung [15] [16] abhängt.

1.4. Anergie

Naive T-Zellen, die die negative Selektion im Thymus überlebt haben, können immer noch stark an manche selbst-Peptid-MHC-Komplexe binden. Und zwar ist das dann möglich, wenn diese Peptide nicht im Thymus gezeigt wurden, also von Proteinen stammen, die nicht im Thymus exprimiert sind. Daß dadurch autoreaktive T-Zellen entstehen, wird verhindert, indem zur T-Zellaktivierung immer noch ein Kostimulus vorhanden sein muß, der nur von einer APC kommen kann. Starke TCR-Bindung ohne Kostimulus führt zur Anergie von T-Zellen, d.h. die T-Zellen werden inaktiviert. Dabei teilen sich die selbst-spezifischen T-Zellen zwar, zeigen aber eine gegenüber Effektor-T-Zellen veränderte Oberflächenmarkerexpression ($CD69^+CD44^+CD25^-$), produzieren kein IFNγ, sind nicht zytolytisch und verschwinden schließlich [17].

1.5. Professionell Antigen präsentierende Zellen (APC)

MΦ und BC können als APC dienen, jedoch der weitaus größte Teil dieser Aufgabe wird von DCs übernommen [18], die zwischen 10 und 100 Mal mehr MHC-Moleküle als MΦ und BC auf ihrer Oberfläche haben können [19]. Unreife DCs, die aufgrund ihres Aussehens diesen Namen erhalten haben, kommen in den Epithelien aller Gewebe vor (z.B. als Langerhans´sche Zellen in der Haut oder als Kupffersche Sternzellen in der Leber), wo sie ihre Umgebung durch Makropinozytose, Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose überwachen. Rezeptoren, die Endozytose auslösen können, sind u.a. Fc-Rezeptoren, der Mannoserezeptor und der bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) erkennende CD14. Bei Ligation dieser oder weiterer Rezeptoren, die nicht zur Endozytose führen, wie z.B. die Toll-verwandten Rezeptoren (toll-like receptors, TLRs), bzw. nach Aufnahme von nekrotischen oder apoptotischen Zellbruchstücken wird die DC durch dieses Gefahrensignal [127] aktiviert und reift. Diese Reifung verändert die Morphologie der DC: Die Dendriten verschwinden und die Zelle wandert zum drainierenden Lymphknoten, wobei sie gleichzeitig sämtliche Endozytose stoppt und eine ganze Palette kostimulatorischer Moleküle exprimiert. Dazu gehören als wichtigste CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die an CD28 auf T-Zellen binden können. Die simultane Bindung von Peptid-MHC-Komplex an den TCR einer T-Zelle und von B7 an CD28 löst die Aktivierung einer naiven T-Zelle aus, die in die Differenzierung zu einer Effektor-T-Zelle mündet.

1.6. Effektor-T-Zellen

Das Zusammentreffen einer naiven T-Zelle mit einer APC über den MHC-Peptid-TCR-Komplex und den B7-CD28-Kontakt ist bereits nach kurzer Zeit ausreichend, um die Proliferation und die Programmierung zu einer Effektorzelle auszulösen. Dabei ist bemerkenswert, daß zumindest die erste Signaltransduktion vor der Bildung der eigentlichen, sogenannten immunologischen Synapse, einem TCRs und kostimulatorische Moleküle umschließenden Ring aus Adhäsionsmolekülen, abläuft [20]. Unmittelbar im Anschluß an die TCR-Ligation wird die TCR-Oberflächendichte reduziert, indem mehr TCR intrazellulär zurückgehalten wird [21]. Nun produziert die Zelle IL-2, das autokrin wirkend zwei bis drei Zellteilungen pro Tag über eine Dauer von mehreren Tagen auslöst und CD27-abhängig ist [22]. Das Signal läuft dabei über die ebenfalls neu exprimierte IL-2Rα-Kette, die mit den

konstitutiv exprimierten, jedoch für IL-2 nieder affinen ß- und γ-Ketten paart und so einen hoch affinen IL-2R bildet. Die Zellteilungen sind besonders wichtig auf dem Weg zu einer Effektorzelle, denn ohne Teilungen werden keine Effektormoleküle produziert, sondern die T-Zellen werden anergisch [23] [24]. Vier bis fünf Tage nach Aktivierung differenzieren sich die Nachkommen der aktivierten Zelle zu Effektorzellen und ändern dabei auch das Expressionsmuster ihrer Oberflächenmoleküle. Sie zeigen nun CTLA-4 (CTL activation associated protein 4), das B7 mit zwanzigfacher Affinität im Vergleich zu CD28 bindet, kein weiteres kostimulatorisches Signal ins Zytosol weiterleitet und somit die Aktivierung begrenzt. Weiterhin werden viele Zelladhäsionsmoleküle hochreguliert, wie z.B. CD2, CD11a (LFA-1), CD44 sowie CD49d (VLA-4) und die Glykosylierung vieler Oberflächenproteine ändert sich [25] [26] [27]. Während der Expansionsphase exprimieren die Effektorzellen Telomerase, um ihrer Alterung durch Telomerverlust entgegenzuwirken [28]. Nun haben die Effektorzellen, die jetzt bei Antigenkontakt keinen Kostimulus mehr brauchen, verglichen mit naiven T-Zellen einen wesentlich geringeren Schwellenwert bezüglich der Antigendichte und -menge die ausreicht, die Zelle zu aktivieren.

1.6.1. $CD4^+$ Effektorzellen

Damit $CD4^+$ T-Zellen zu Effektorzellen werden, brauchen sie – verglichen mit $CD8^+$ T-Zellen – einen verhältnismäßig langen Kontakt von 20-24 Stunden mit einer APC [29] [30]. Aktivierte Helferzellen können, durch die von ihnen sekretierten Zytokine, entweder eine zellvermittelte (T_H1) oder eine humorale (T_H2) Immunantwort einleiten. Dies wiederum ist abhängig vom Zytokinprofil, das zum Zeitpunkt der Aktivierung vorhanden ist. Die von den Helferzellsubtypen sekretierten Zytokine hemmen zusätzlich die Differenzierung von T-Zellen in den jeweils anderen Subtyp. Bei bestimmten Virusinfektionen (z.B. LCMV) können aber auch beide Subtypen nebeneinander auftreten [31]. Wenn eine T_H-Zelle aktiviert ist, befindet sie sich in einem bis zu sechs Tage dauernden, aktivierungsinduzierten Refraktärzustand, in dem sie und ihre Nachkommen nicht mehr auf Stimuli reagieren [32].

1.6.1.1.T_H1-Antwort

Von MΦ und DCs produziertes IL-12 sowie von natürlichen Killerzellen (NK) und CTL produziertes Interferon (IFNγ) führen zu einer T_H1-Antwort, bei der die Helferzellen IL-2, IFNγ und Tumornekrosefaktor ß (TNFß) sekretieren. T_H1-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Aktivierung von MΦ: Zunächst werden die MΦ sowohl durch die T_H1-Zytokine als auch durch die T_H1-Zytokin-abhängig veränderte Oberflächenmarkerexpression der Epithelzellen am Entzündungsherd zu selbigem geführt. Durch sekretiertes IFNγ sowie durch Bindung von CD40 durch den nun exprimierten CD40L werden Antigen präsentierende MΦ aktiviert, die daraufhin Radikale sekretieren, ihren lysosomalen Abbau verstärken und Tumornekrosefaktor α (TNFα) ausschütten, was zum verstärkten Abtöten von Mikroben führt. Allerdings kann die T_H1-Antwort auch schädlich sein, nämlich wenn autoreaktive T_H1-Zellen ins zentrale Nervensystem (ZNS) eindringen und die aktivierten MΦ die Myelinscheide zerstören, was zu multipler Sklerose (MS) bzw. experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis (EAE) führt. Mittlerweile mehren sich die Hinweise, daß das Zytokin Eta-1 (Osteopontin), dessen Rezeptor CD44 ist, sich als Schlüsselspieler bezüglich der Induktion der T_H1-Antwort erweist [33]. Z.B. sind Eta-$1^{-/-}$-Mäuse resistent gegen progressive EAE [34] [35].

1.6.1.2.T_H2-Antwort

Wenn bei der Aktivierung von $CD4^+$ T-Zellen IL-4, evtl. unterstützt von IL-6, vorhanden ist, entsteht eine T_H2-Antwort, bei der die Helferzellen IL-4, IL-13 und IL-5 produzieren. Die Quelle des IL-4 ist unklar, es könnte aber von einem Subtyp von $CD4^+$ T-Zellen, den NK-T-Zellen (NKT), die einen fast invarianten, den nicht klassischen MHC CD1 erkennenden TCR und den NK-Marker NK1.1 exprimieren, stammen. Weiterhin können auch schwach an den TCR bindende MHC-Peptid-Komplexe eine T_H2-Antwort auslösen. Eine T_H2-Antwort bewirkt hauptsächlich die Aktivierung von Antigen präsentierenden B-Zellen über CD40L-CD40-Wechselwirkung und die damit verbundene Antikörpersekretion.

1.6.2. $CD8^+$ Effektorzellen

Um eine naive $CD8^+$ T-Zelle zur Proliferation anzuregen und als Effektorzelle zu programmieren sind 2 h Antigenkontakt in Form von Peptid-MHC-Komplex auf einer APC ausreichend [36]. Wenn die Antigendichte auf der APC zu gering ist, um eine naive $CD8^+$ T-Zelle zu aktivieren, können T_H1-Zellen, die Antigen auf der gleichen APC erkennen, diese über CD40-CD40L-Wechselwirkung zu höherer kostimulatorischer Aktivität anregen und so die CTL-Antwort unterstützen. Desweiteren scheint es sogar einen Mechanismus zu geben, der bei niedriger TCR-Affinität dafür sorgt, daß die Avidität der T-Zelle durch erhöhte CD8-Expression gesteigert wird [37]. Ebenso erhöht sich die Avidität durch eine Reorganisation der Membranstruktur, d.h. der Bildung von sogenannten Lipidflößen (Lipid Rafts), nach Aktivierung [38]. Die Lipid Rafts enthalten Cholesterin und Sphingolipide [39], die mit fluorochrommarkiertem Choleratoxin B (CTB) gefärbt werden können.

Die $CD8^+$ T-Zelle teilt sich nach der Aktivierung mindestens fünf bis neun Mal und synthetisiert dabei Perforin und Granzyme, zytotoxische Proteine, die intrazellulär gespeichert werden, wobei T-Zellen bereits nach einer Teilung zytolytisch wirken können [23]. Hierbei scheint die Expansion der Zellen von Perforin kontrolliert zu sein [40].

Bei Bindung an eine Antigen präsentierende Zelle, d.h. beispielsweise an eine virusinfizierte Zelle, schüttet die Effektorzelle nun nach Reorganisation des Zytoskeletts zielgerichtet diese Proteine aus. Die Perforine bilden in einer Kaskadenreaktion Löcher in der Membran der Zielzelle, wodurch die Granzyme ins Zytoplasma gelangen und Apoptose auslösen können. Zusätzlich kann die CTL über einen zweiten Mechanismus z.B. virusinfizierte Zellen töten: Sie exprimiert als Effektorzelle CD95L (FasL), der bei Bindung an CD95 auf z.B. virusinfizierten Zellen deren Apoptose auslöst. Interessanterweise gehen Rechnungen davon aus, daß bereits ein spezifischer Peptid-MHC-Komplex ausreicht, um eine zytotoxische T-Zellantwort auszulösen [41], zumal es Beobachtungen gibt, die die Wichtigkeit der relativ niederaffinen Bindung zwischen TCR und Peptid-MHC-Komplex in den Vordergrund stellen, weil nur so ein einziger Peptid-MHC-Komplex in der Lage ist, bis zu 200 TCRs nacheinander zu binden [42].

1.7. Gedächtnis-T-Zellen

Wenn das Pathogen eliminiert ist, bei einer Virusinfektion typischerweise nach 7 – 10 Tagen, sterben zirka 95 % der spezifischen T-Zellen in einem Prozess, der AICD (aktivierungsinduzierter Zelltod) genannt wird. Der Zellabbau findet dabei größtenteils in der Leber und auch in der Milz statt [43] [44]. Der Mechanismus des AICD ist noch unklar, scheint aber nicht mit der Expression von CTLA-4, Fas, TNFR, Bcl-2 oder Bcl-X_L zusammenzuhängen, sondern es gibt Hinweise, daß IFNγ beteiligt ist [45] [40].
Der überlebende Teil der spezifischen Zellen zirkuliert nun v.a. durch die peripheren Organe, d.h. Leber, Lunge, Nieren und Darm, aber auch Thymus und Knochenmark, wo er das sogenannte T-Zellgedächtnis bildet. Dennoch ist auch weiterhin ein kleiner Teil der spezifischen Zellen in den lymphatischen Organen zu finden.
Nach abgeklungener Infektion bleiben die $CD8^+$ Gedächtnis-T-Zellzahlen recht konstant [46], wohingegen die $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellzahlen ständig leicht abnehmen [47].
Dabei wird immer noch sehr kontrovers diskutiert, ob im Körper Spuren von Antigen vorhanden sein müssen [48] oder nicht [49], damit Gedächtnis-T-Zellen überleben können.

1.7.1. Funktion

Gedächtnis-T-Zellen vermitteln bei erneuter Infektion eine wesentlich schnellere T-Zellantwort. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen sind sie sofort nach Antigenkontakt ohne Kostimulation fähig, Effektormoleküle zu sekretieren. Dabei haben naive, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen den gleichen Aktivierungsschwellenwert, jedoch die Kinetik ist unterschiedlich [50] [51]. Gedächtnis-T-Zellen regulieren bei erneutem Antigenkontakt ihren TCR schneller und in höherem Maße nach unten, werden größer und teilen sich schneller als naive T-Zellen [52] [53] [54]. Zusätzlich unterscheiden sie sich in einer ganzen Reihe von Oberflächenmarkern von naiven T-Zellen, haben aber viele Oberflächenmarker mit Effektor-T-Zellen gemeinsam, können daher phänotypisch nur durch die von ihnen exprimierte Markerkombination zugeordnet werden (Tabelle 1.7.1.). Oft werden jedoch, wenn keine unmittelbare Infektion vorliegt, T-Zellen, die $CD44^{hi}$ sind, als Gedächtnis-T-Zellen bezeichnet oder sogar definiert [49] [13].

Name	Funktion	Expression in verschiedenen T-Zellstadien			Literatur
		naiv	Effektor	Gedächtnis	
CD11b	Integrin α_M-Kette	niedrig	erhöht	niedrig	[55] [8]
CD25	IL-2R α-Kette	niedrig	erhöht	niedrig	[51]
CD43	Leukosialin; Adhäsion an ICAM-1	niedrig	erhöht	niedrig	[26]
CD44	Adhäsion (z.B. an Kollagen, Fibronektin)	niedrig, steigt mit der Lebensdauer	erhöht	hoch	[55]
CD45RB	alt. Spleißvariante einer Rezeptorty-rosinphosphatase	hoch	leicht erniedrigt	hoch	[55]
CD49d	Integrin α_4-Kette	mittel	erhöht	mittel bis erhöht	[55]
CD62L	L-Selektin; Adhä-sion an GlyCAM, MAdCAM	hoch	nieder	z.T. wieder erhöht	[55] [23]
CD69	Lektin, Very Early Activation Antigen	niedrig	erhöht	niedrig	[51]
TCR	Antigen-erkennung	hoch	leicht erniedrigt		[21]

Tabelle 1.7.1.: Oberflächenmarker von naiven, Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen.

Es gibt zwei Arten von Gedächtnis-T-Zellen: Eine Art scheint relativ kurzlebig und antigenabhängig in der Peripherie vorzukommen, die andere antigenunabhängig und langlebig in den sekundären lymphatischen Organen [56] [48]. Eine andere Gruppe kommt zu einem ähnlichen Ergebnis: Allerdings wird der erste Subtyp als “Effektorgedächtnis” (T_{EM}), der zweite als “zentrales Gedächtnis” (T_{CM}) bezeichnet, und beide scheinen langlebig und antigenunabhängig zu sein [57]. Dabei unterscheiden sich beide in der Expression von Homing-Markern, nämlich CCR7 und CD62L, die sowohl auf naiven als auch auf T_{CM}-Zellen

exprimiert werden, nicht aber auf Effektorzellen und T_{EM}-Zellen [57]. T_{CM} produzieren vor allem IL-2 aber kein IFNγ ($CD4^+$) bzw. zeigen keine lytische Funktion ($CD8^+$), dagegen sezernieren T_{EM} IFNγ aber kein IL-2 ($CD4^+$) bzw. zeigen lytische Funktion ($CD8^+$) [58] bzw. [59]. Schließlich wird sogar der T-Zellsubtyp sowohl bei $CD4^+$ als auch bei $CD8^+$ T-Zellen bei der Gedächtnisbildung beibehalten [60] [31] bzw. [61].
Zum Überleben brauchen Gedächtnis-T-Zellen weder, wie naive T-Zellen [13], Kontakt zum restringierenden MHC-Molekül [62] [63] [64], obwohl zumindest bei $CD4^+$ Gedächtnis-T-Zellen DCs beteiligt sein sollen [65]. Sie brauchen auch keine gegenseitige Hilfe [66], wie ja in ähnlicher Weise T_H-Zellen für die Entstehung von CTL vonnöten sein können. Trotzdem ist Kontakt zu MHC-Molekülen notwendig, weil die Zellen sonst nicht mehr funktionsfähig sind [67]. Im Vergleich zu naiven T-Zellen sind Gedächtnis-T-Zellen unmittelbar nach Antigenstimulation resistenter gegen Fas-induzierten AICD [68]. Kommt es schließlich nacheinander zu mehreren Infektionen mit nicht verwandten Pathogenen, so gibt es um so weniger T-Zellen gegen ein Pathogen, je weiter dessen Infektion zurückliegt. Dabei ist die Reihenfolge der Infektionen für die quantitative und qualitative Änderung im Gedächtnis-T-Zellkompartiment verantwortlich und wird als „Attrition“ (Verschleiß) bezeichnet [69]. Dieser Verschleiß ist aber wohl nur auf das CD8-Gedächtnis, nicht jedoch auf das CD4-Gedächtnis, beschränkt [70].

1.7.2. Lineare Differenzierung

Welche T-Zelle irgendwann eine Gedächtnis-T-Zelle wird ist unklar. Daß aber Gedächtnis- und Effektor-T-Zellen unterschiedliche Vorläuferzellen haben scheint eher unwahrscheinlich. Viele gehen mittlerweile davon aus, daß aus spezifischen, naiven T-Zellen, die nach der Aktivierung Effektorfunktionen erworben und sich mehrmals geteilt haben, Gedächtnis-T-Zellen hervorgehen [71] [72] [73] [74]. Dabei soll die Entscheidung darüber, ob eine Effektorzelle stirbt oder aus ihr eine Gedächtniszelle entsteht (Fig. 1.7.1.), stochastisch fallen, was an der Gleichverteilung der T-Zellaviditäten und der V-beta-Nutzung bei den T-Zellrezeptoren bei Effektor- und Gedächtnis-T-Zellen zu sehen ist [75] [76]. Andererseits gibt es Beobachtungen, daß nur hochaffine T-Zellen bei Antigenkontakt expandieren, um so die frühe Detektion von infizierten Zellen zu ermöglichen [77] [78] [79]. Dies wird durch Ergebnisse aus einem weiteren Versuch untermauert, in dem gezeigt wird, daß hoch affine T-Zellen Peptid-MHC-Komplexe von der Membran der APCs reißen und so die Aktivierung

von nieder affinen T-Zellen verhindern [80]. Im Gegensatz dazu behaupten Levitsky et al., daß es keine Kompetition um Antigen zur Entstehung von T-Zellgedächtnis gibt, sondern die Entscheidung darüber schon durch die Natur des ersten Antigen-Kontakts fällt [81]. Es könnte z.B. an der Zytokinumgebung liegen: Bei *in vitro* Aktivierung von $CD8^+$ T-Zellen führt IL-4, nicht aber IL-2 oder IL-12 zur Bildung von *in vivo* T-Zellgedächtnis [82]. Ein weiterer Grund könnte die Avidität der T-Zelle sein: Entweder könnten hochavide T-Zellen das Gedächtnis bilden, weil sie durch den Antigenkontakt eine starke Stimulation erfahren haben, während die niederaviden T-Zellen durch AICD sterben würden, oder das umgekehrte könnte der Fall sein: Die stark stimulierten, hochaviden T-Zellen könnten nach der Immunantwort erschöpft und auf AICD programmiert sein, während die niederaviden das Gedächtnis bilden. Darauf sollte mit dem in dieser Arbeit vorgestellten System eine Antwort zu finden sein.

Dieses Modell der linearen Differenzierung vertritt also die Auffassung, daß Gedächtnis-T-Zellen direkte Nachkommen von Effektor-T-Zellen sind, wenn auch noch nicht sicher gesagt werden kann, welche Zelle eine Gedächtniszelle wird und welche durch AICD stirbt.

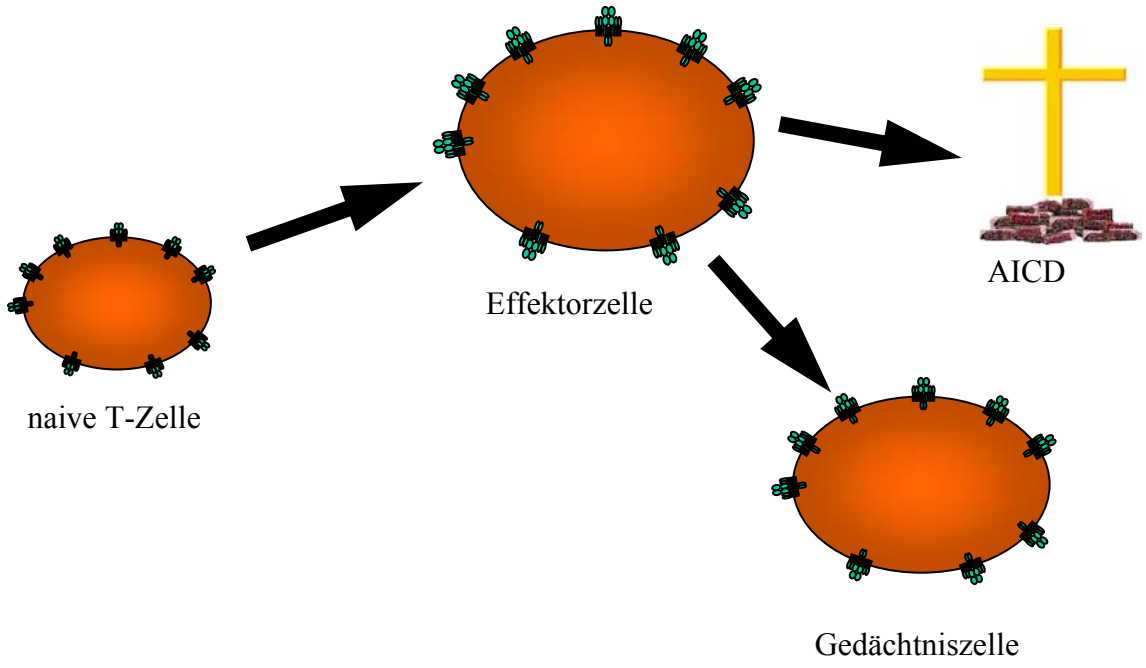


Fig. 1.7.1.: Modell der linearen Differenzierung

1.7.3. Bystander

Eine Variation der linearen Differenzierung formuliert das kontrovers diskutierte Bystander-Modell: Effektor-T-Zellen können durch Zytokine, die bei irrelevanten Infektionen ausgeschüttet werden, oder durch kreuzreaktive Peptide immer wieder leicht stimuliert werden, sodaß sie überleben bzw. sich sogar ab und zu teilen [9] [83] [84]. Dies führt jedoch zu keiner vermehrten Gedächtnis-T-Zellbildung, denn dafür ist auf jeden Fall Antigen notwendig [85], obwohl Gedächtnis-T-Zellen bei Infektionen mit nicht-verwandten Pathogenen für deren schnellere Eliminierung sorgen können [83].
Folgende Beobachtung liegt diesem Bystander-Modell zugrunde: In lymphopenischen Mäusen teilen sich naive T-Zellen um den "immunologischen Freiraum" füllen zu können. Alleine dadurch können sie zu lytischen Gedächtnis-T-Zellen werden [86] [87]. Dieser in einem TCR-transgenen Mausmodell aufgestellten Hypothese wird durch die Beobachtungen anderer Gruppen widersprochen, bei deren Experimenten die Zellen nur vorübergehend einen Gedächtnis-T-Zellphänotyp annehmen, jedoch keine lytische Aktivität zeigen [88] [37] [89] [13].
Die Zytokine, die die Bystander-Teilung auslösen sollen, sind entweder Typ I-Interferone [90], IL-15 [91], IFNγ, IL-12 oder IL-18 [92], die z.T. von NKT-Zellen ausgeschüttet werden [93]. Gedächtniszellen dürfen sich jedoch nicht unkontrolliert vermehren, denn sonst wäre ja "kein Platz" mehr für neu aus dem Thymus entlassene, naive T-Zellen; die Homöostase muß also erhalten bleiben. Die beiden Gegenspieler, die dieses Gleichgewicht aufrecht erhalten, sind IL-15 und IL-2 (wirkt teilungshemmend), die beide sogar über einen teilweise gleichen Rezeptor, die IL-2Rß-Kette, wirken [94] [128]. Weiterhin scheint IL-7 bei der Homöostase der Gedächtnis-T-Zellen eine Rolle zu spielen; es hat aber hauptsächlich Einfluß auf die Homöostase der naiven T-Zellen sowie auf die Bildung von T-Zellgedächtnis [15]. Einen wichtigen Anteil bei der Homöostase hat auch die Apoptose reifer T-Zellen [95].
Schließlich gibt es sogar Gruppen, die ihren Beobachtungen zufolge jeglichen Bystander-Effekt in Abrede stellen [96] [129].

1.7.4. Abnehmendes Potential

Im Gegensatz zum Modell der linearen Differenzierung steht das Modell des abnehmenden Potentials, in dem die Gedächtniszellen nicht Nachkommen von Effektorzellen darstellen,

sondern Vorstufen. Zwar gibt es schon seit längerem Hinweise auf unterschiedliche Gedächtniszellsubtypen [50] [97] [23], aber erst kürzlich konnte dies auch gezeigt werden: Naive humane T-Zellen sind $CD45RA^+CCR7^+CD62L^+$, aber es gibt noch einen weiteren T-Zellsubtyp in den sekundären lymphatischen Organen, der sowohl phänotypisch Effektoreigenschaften hat ($CD45RA^-$) als auch – im Gegensatz zu naiven T-Zellen – DCs stimulieren kann. Trotzdem weisen diese T-Zellen weiterhin auch Marker von naiven T-Zellen auf, d.h. sie sind $CCR7^+CD62L^+$. Sie werden zentrale Gedächtniszellen T_{CM} genannt. Antigenspezifische T-Zellen, die in der Peripherie zu finden sind, haben alle den gleichen Phänotyp: $CD45RA^-CCR7^-CD62L^-$ und zeigen *ex vivo* sofort Effektorfunktionen. Bei fehlender Infektion kann es sich aber nicht um Effektorzellen handeln und daher werden diese Zellen als Effektorgedächtnis T_{EM} bezeichnet [57]. Inzwischen konnte dies sowohl für $CD4^+$ als auch für $CD8^+$ T-Zellen in der Maus gezeigt werden [98] [99]. Weninger et al. konnten mittlerweile sogar beide Subtypen *in vitro* entweder durch Gabe von IL-15 (T_{CM}) oder IL2 (T_{EM} bzw. Effektorzellen) herstellen. Sie verhielten sich *in vivo* bezüglich ihres Wanderungsverhaltens genauso wie ihre *in vivo* entstandenen Pendants [100]. Somit hat jede Stufe auf dem Weg zur Effektorzelle weniger Möglichkeiten eine bestimmte Funktion wahrzunehmen, die Entwicklung verläuft sozusagen mit abnehmendem Potential. Alle T-Zellen sterben schließlich, nachdem sie Effektorzellen waren, durch AICD (Fig 1.7.2.).

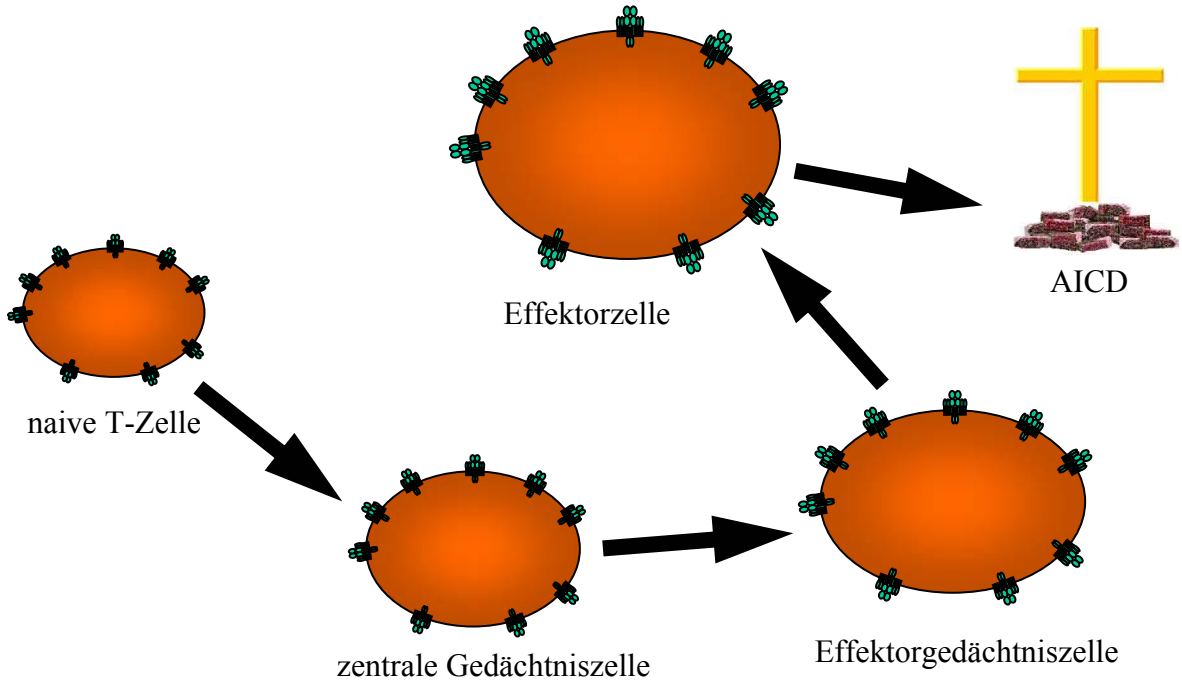


Fig. 1.7.2.: Das Modell des abnehmenden Potentials

1.7.5. Das Nachzügler-Modell

Eine weitere Hypothese zur Entstehung von T-Zellgedächtnis orientiert sich an der B-Zellentwicklung, die dichotom verläuft: Eine Vorläuferzelle wird bei frühem, häufigem und intensivem Antigenkontakt zur Effektorzelle, bei spätem, kurzem Antigenkontakt zur Gedächtniszelle, d.h. die Nachzügler werden zu Gedächtnis-T-Zellen [101] [102] (Fig 1.7.3.). Beweise gibt es dafür jedoch noch keine.

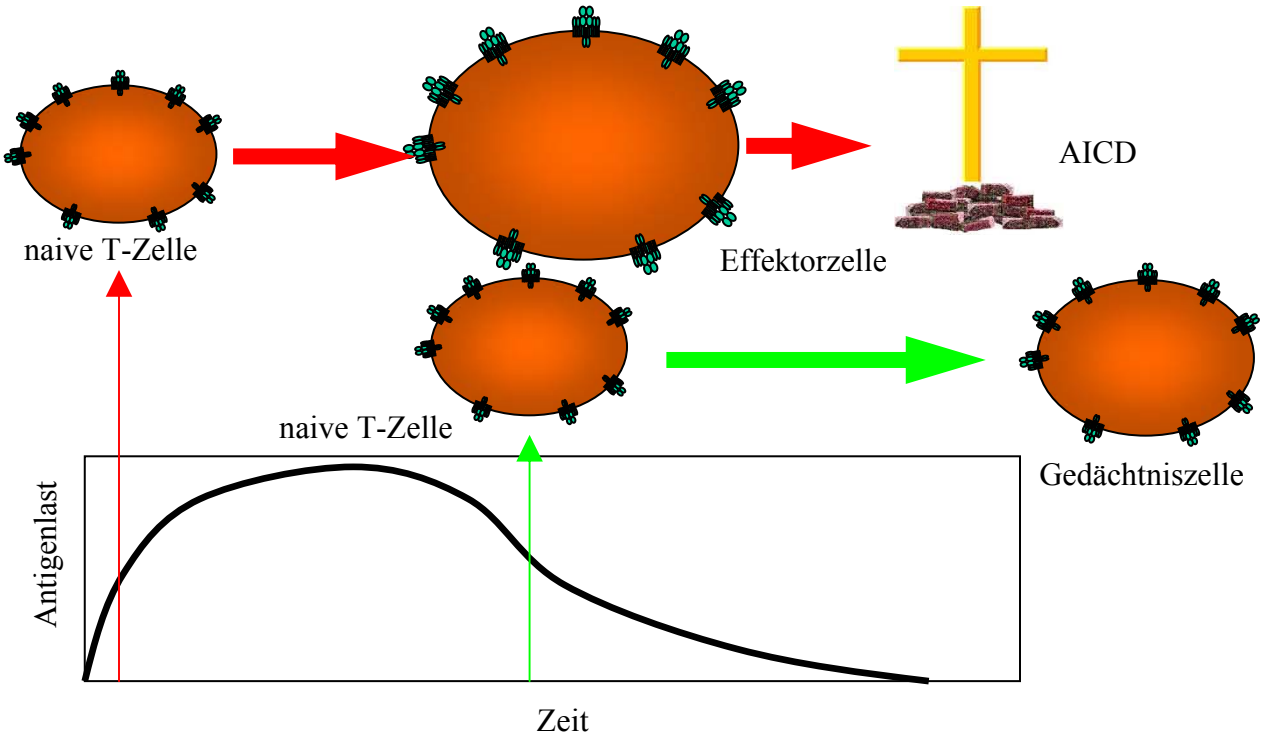


Fig 1.7.3.: Das Nachzügler-Modell

1.8. TCR-transgene T-Zellen

Bei TCR-transgenen Mäuse sollte es theoretisch nur eine Art T-Zellen, nämlich die mit der transgenen α- und ß-Kette geben. Allerdings wird vor der positiven Selektion im Thymus RAG nicht ausgeschaltet, wodurch andere α-Ketten erfolgreich rekombiniert und exprimiert werden können. TCR-transgene Mäuse haben daher zwar mehrheitlich transgene T-Zellen, aber auch noch andere $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen. Erst wenn RAG abgeschaltet ist, z.B. in $RAG^{-/-}$ Mäusen, hat eine Maus nur eine einzige Art T-Zellen, wie z.B. in dieser Arbeit den

TCR Vα16Vß1, der das Peptid SGPSNTPPEI aus dem E1a-Protein des Adenovirus (Ad5ts125 E1a) auf H2-D^b (MHC I) erkennt.

1.9. Affinität, Avidität und das St40/St42-Modell

Die Affinität ist das Maß für die Stärke einer Bindung zwischen zwei Bindungspartnern, etwa dem TCR und dem Peptid-MHC-Komplex. Da aber auf der Oberfläche von T-Zellen mehrere TCRs und auf anderen Zellen mehrere MHCs exprimiert werden, reicht diese Maß nicht aus, um die Bindung zweier Zellen über diese Wechselwirkung zu beschreiben. Daher wurde die Avidität eingeführt, die als Affinität multipliziert mit der Anzahl der Bindungsstellen definiert ist. In dieser Arbeit geht es darum, wie sich T-Zellen, die den gleichen TCR exprimieren, aber unterschiedliche Avidität aufweisen, unterscheiden und ob es eine Präferenz gibt, welche von diesen Zellen das T-Zellgedächtnis bilden. Dann wäre es evtl. möglich bessere Impfstoffe zu finden, die genau diese Zellen ansprechen würden.
Dazu werden in Zusammenarbeit mit Dr. Rene Toes, Leiden, NL, zwei Mausstämme verwendet, die transgen für den oben erwähnten TCR Vα16Vß1 sind [130], ihn aber in niedriger (St40) oder hoher (St42) Dichte auf der Oberfläche exprimieren (Fig. 1.9.1.).

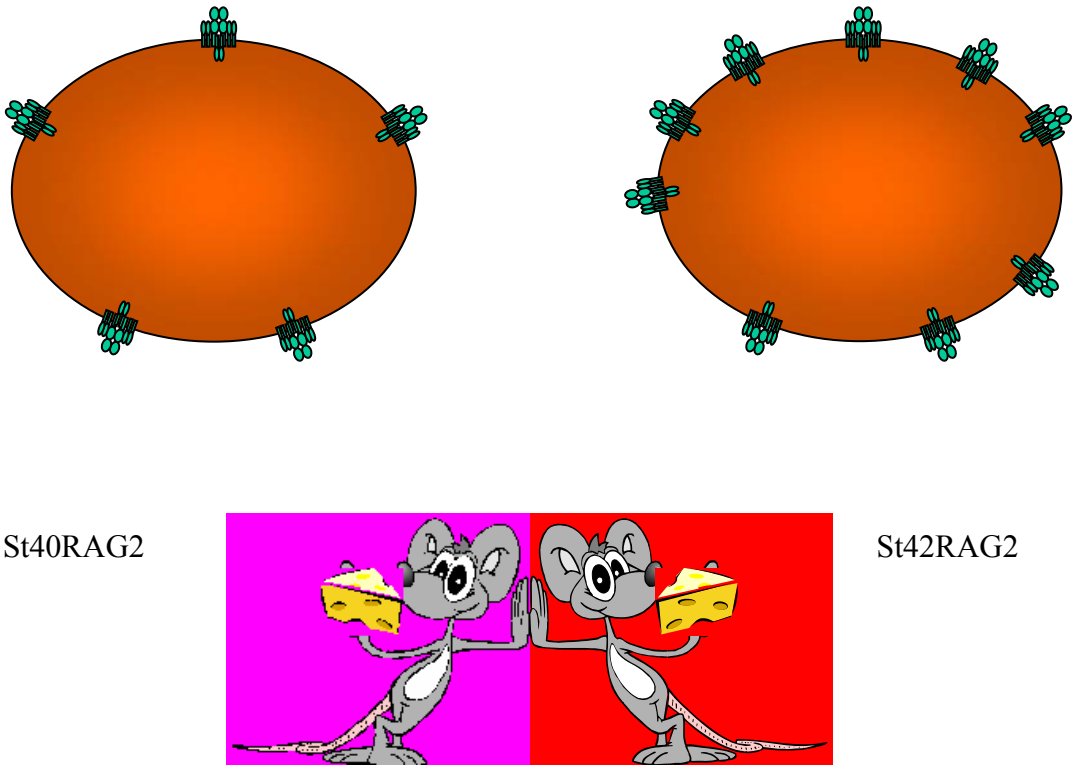


Fig. 1.9.1.: Das St40/St42-System

Um das Schicksal der St40- bzw. St42-T-Zellen auch gemeinsam *in vivo* in möglichst wirklichkeitsgetreuer Umgebung verfolgen zu können, müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein: Beide müssen dazu in eine immunkompetente Empfängermaus transferiert werden und sich dabei sowohl voneinander als auch von den endogenen T-Zellen der Empfängermaus unterscheiden lassen. Da jedoch unklar ist, ob sich die TCR-Expression im Laufe einer Infektion oder der Zeit verändert, müssen die Zellen anhand eines anderen Markers unterschieden werden. Hier hat sich angeboten, die Empfängermaus von den Spendermäusen anhand zweier verschiedener Allele des T-Zellmarkers CD90 (Thy1), nämlich Thy1.1 und Thy1.2, sowie die beiden Spendermäuse anhand des Lymphozytenmarkers CD45 (Ly5), nämlich Ly5.1 und Ly5.2, zu unterscheiden. Dies läßt sich anhand einer FACS-Analyse bewerkstelligen, denn es sind Antikörper (Ak) verfügbar, die jeweils spezifisch für ein Allel sind.

Da aber alle und nicht nur die transgenen T-Zellen der Spendermäuse die entsprechenden Allele tragen, dürfen beide Mäuse nur die jeweiligen transgenen T-Zellen haben, was sich durch einkreuzen in den $RAG2^{-/-}$-Hintergrund machen läßt. Um schließlich die Immunantwort während einer Infektion verfolgen zu können, wird die Empfängermaus mit Adenovirus immunisiert. Aus diesen Erwägungen ergibt sich z.B. die in Fig. 1.9.2. dargestellte Konfiguration. Die Zucht der hier dargestellten Stämme, sowie die Zucht von zusätzlich $Thy1.1^{+}$ Spendermäusen, die den adoptiven Transfer in jede beliebige C57BL/6-Maus, z.B. bestimmte Knockouts, ermöglicht, ist ebenfalls Ziel dieser Arbeit.

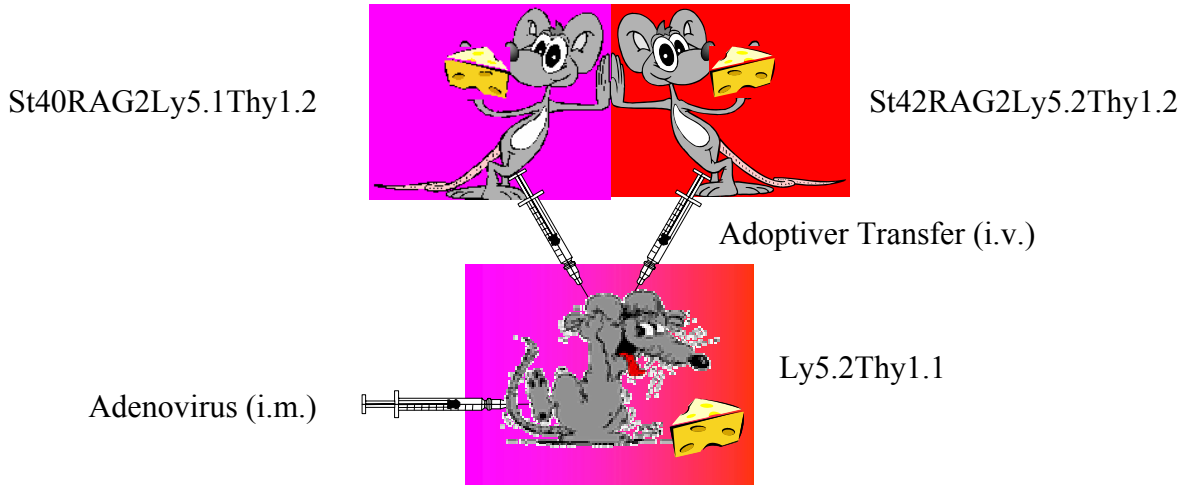


Fig. 1.9.2.: Adoptiver Transfer im St40/St42-System

1.10. Autoimmunität

Im zweiten Teil dieser Arbeit, der einen weiteren Aspekt der Interaktion von T-Zellen mit ihrer Umgebung zum Inhalt hat, geht es um Autoimmunität: Wenn T-Zellen körpereigene Strukturen für gefährlich halten, kann es neben Anergie auch zu Autoimmunität kommen [127]. Dabei sind jene Mechanismen außer Kraft gesetzt, die normalerweise zu Anergie führen, d.h. die T-Zellen bekommen zusätzlich zur Bindung an einen – weil peripher exprimierten – unbekannten, aber körpereigenen Peptid-MHC-Komplex einen Kostimulus. Desweiteren kann Autoimmunität auch durch Peptide aus Pathogenen, die körpereigenen, peripher exprimierten Peptiden ähneln, ausgelöst werden, weil die entstehenden Effektorzellen nicht genau zwischen körpereigen und -fremd unterscheiden können. In beiden Fällen führt dies zur Zerstörung von körpereigenem, gesundem Gewebe und daraus folgen Krankheiten, wie z.B. Diabetes mellitus, die zur Zerstörung der Langerhans'schen Inseln des Pankreas führt.

1.11. Regulatorische T-Zellen

Autoimmunität könnte durch sogenannte regulatorische T-Zellen verhindert werden. Zum einen kann es sich dabei um $CD45RB^{-}CD4^{+}$ T-Zellen handeln [103] [104], momentan wird aber ein anderer Subtyp der regulatorischen T-Zellen favorisiert: Er ist $CD4^{+}CD25^{+}$ und die Spezifität der TCRs ist noch unbekannt. Die regulatorische Aktivität wird dabei durch auf der Oberfläche gebundenes TGFß vermittelt [105] und verhindert die Teilung von $CD4^{+}CD25^{-}$ T-Zellen [105] sowie die Aktivierung von $CD8^{+}$ T-Zellen [106] .

1.12. Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Multiple Sklerose (MS) ist eine Form der Autoimmunität, bei der die Myelinscheide des ZNS zerstört wird, was zu Defekten in der Reizleitung und damit über Tremor bis hin zur Lähmung führen kann. MS wurde Anfang des letzten Jahrhunderts häufiger nach Tollwutimpfungen festgestellt, bis schließlich Jahrzehnte später bekannt wurde, daß das Impfserum Spuren von Kanninchenrückenmark enthielt. Diese autoimmune Enzephalomyelitis konnte auch im Tierversuch experimentell induziert werden und erhielt so die Bezeichnung EAE.

Sie wird hauptsächlich von $CD4^+$ T-Zellen des T_H1-Typs ausgelöst. Weder γδ-T-Zellen [107] noch B-Zellen [108] sind an der Krankheitsinduktion beteiligt, wenn auch Ak für stärkere Symptome verantwortlich sein können [109] oder B-Zellen regulierend über eine Abweichung in Richtung einer T_H2-Antwort wirken können [108]. In $CD8^{-/-}$ Mäusen verläuft die Krankheit milder [110] [111], in $\alpha TCR^{-/-}$ Mäusen kann keine EAE induziert werden [112] und in $CD4^{-/-}$ Mäusen sind MHC II-restringierte $CD4^-CD8^-$ T-Zellen für die schwer auszulösende Krankheit verantwortlich [113]. NK- und NKT-Zellen scheinen eher regulatorisch einzugreifen [110]. MΦ sind mit den von ihnen sekretierten Effektormolekülen und Radikalen für die Schädigung der Myelinscheide verantwortlich, müssen jedoch CD62L exprimieren, um ins ZNS gelangen zu können [114]. Jedoch lösen MΦ, die in vitro mit Thioglykolat aktiviert wurden und dadurch ins ZNS wandern können, alleine noch keine EAE aus. MΦ werden v.a. durch T_H1-Zytokine aktiviert und genau diese Zytokine sind auch in der akuten Phase zu finden, während T_H2-Zytokine eher in der Erholungsphase nach einem Krankheitsschub gemessen werden können [115]. Andere Beobachtungen deuten darauf hin, daß es darauf ankommt, wie der Kostimulus bei Krankheitsinduktion aussieht, denn B7.1 fördert die Krankheit, während B7.2 vor Symptomen schützt [116].

Wieviele spezifische T-Zellen ins ZNS einwandern müssen, um EAE auszulösen, ist noch sehr umstritten: Manche sprechen von mehr als 90 % [117], andere von weniger als 20 % [118] der insgesamt in hoher Zahl vorkommenden spezifischen T-Zellen. Ein zweiter Schub von EAE verläuft zumindest bei Ratten milder mit einem veränderten Muster an neurologischen Zeichen und ist von gesteigerter Apoptose inflammatorischer T-Zellen im ZNS begleitet [119]. Bei Mäusen scheint diese Regulation auf $CD8^+$ regulatorische T-Zellen zurückgehen [120].

Bei verschiedenen Mausstämmen kann EAE unterschiedlich leicht induziert werden und führt zu verschieden schweren Symptomen und unterschiedlichen Ausprägungen [121]. In dieser Arbeit werden SJL-Mäuse verwendet, da die Krankheit leicht zu induzieren ist und recht schnell ausbricht. Das hier benutzte kritische Selbstpeptid (PLP3) ist eines von drei EAE-auslösenden Peptiden aus dem Proteolipidprotein mit der Sequenz HCLGKWLGHPDKF (PLP139-151). Es wird s.c. in komplettem Freundschen Adjuvans (CFA) bei gleichzeitiger i.v. Injektion von Pertussistoxin (PTX) injiziert. Dabei ist der Wirkmechanismus von PTX noch unbekannt [122], aber ohne PTX kann die Krankheit nur schlecht ausgelöst werden. Ziel dieser Arbeit ist es, das Verhalten der PLP3-spezifischen T-Zellen über den gesamten Krankheitsverlauf bei einer Erst- bzw. Zweitantwort zu verfolgen, wozu PLP3-Tm zur Verfügung stehen (Dr. Bischof, Tübingen), mit denen die spezifischen T-Zellen sichtbar

gemacht werden können (Fig. 1.12.1.). Falls sich bestimmte Veränderungen an den spezifischen T-Zellen vor Ausbruch der Krankheit zeigten, könnte dies ein Ansatz sein, wie bei MS bevorstehende Krankheitsschübe erkannt und evtl. dagegen vorgebeugt werden kann.

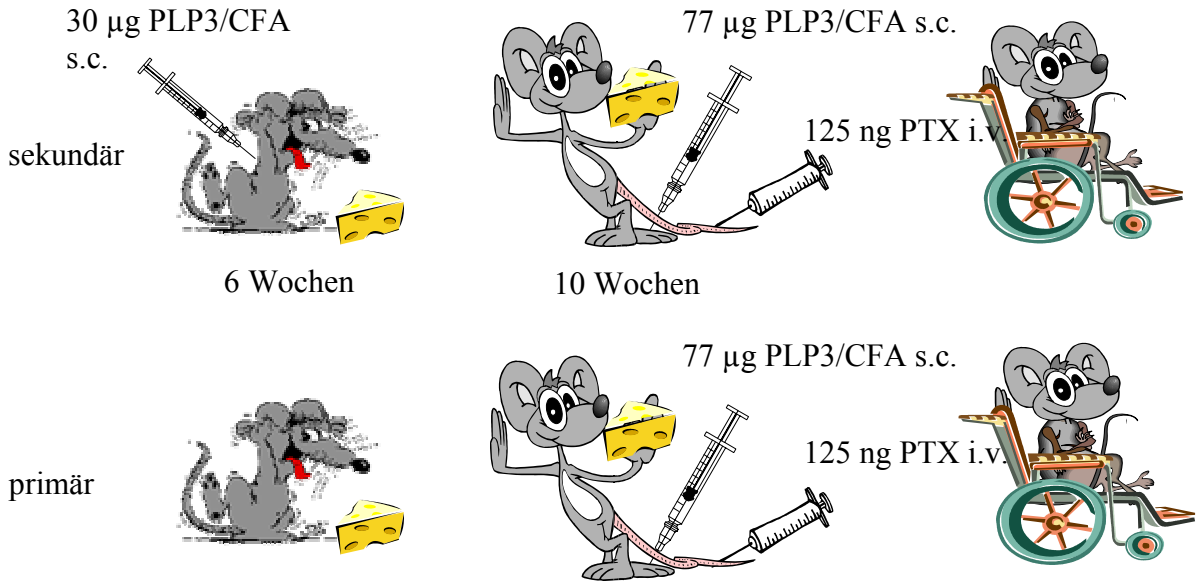


Fig. 1.12.1.: Die Induktion der Primär- und Sekundärantworten im EAE-Modell

2. Material und Methoden

2.1. Lösungen

2.1.1. Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogenkarbonat-Lösung (ACK) zur Erythrozytenlyse

- 8,3 g NH_4Cl (Roth) (Endkonzentration 150 mM)
- 1,0 g $KHCO_3$ (Sigma-Aldrich) (1 mM)
- 200 µl EDTA (Sigma-Aldrich) 0.5 M (0.1 mM)
- pH 7,3 einstellen und mit H_2Od auf 1 l auffüllen

2.1.2. FACS-Puffer (FP)

- 500 ml PBS (Biowhittaker)
- 10 ml FCS (PAN Biotech) (2 %)
- 2 ml EDTA (Sigma-Aldrich) 500 mM (2 mM)
- 500 µl NaN_3 (Merck) 10 % (0.01 %)

2.1.3. Mouse Tail Juice (MTJ)

- 25 ml NaCl (Merck) 2 M (100 mM)
- 25 ml Tris (Sigma-Aldrich) 1 M, pH 8 (50 mM)
- 100 ml EDTA (Sigma-Aldrich) 0,5 M (100 mM)
- 50 ml SDS (Roth) 10 % (1 %)
- mit H_2Od auf 500 ml auffüllen

2.1.4. Tris-EDTA-Puffer (TE)

- 5 ml Tris (Sigma-Aldrich) 1M, pH 8 (10 mM)
- 1 ml EDTA (Sigma-Aldrich) 0,5 M (1 mM)
- mit H_2Od auf 500 ml auffüllen und pH 8,0 einstellen

2.1.5. DNA-Ladepuffer

- 25 mg Bromphenolblau (Sigma-Aldrich) (0,25 % w/v)
- 25 mg Xylencyanol (Sigma-Aldrich) (0,25 % w/v)
- 3 ml Glycerin (Roth) (30 %)
- 7 ml H_2Od

2.1.6. Tris-Essigsäure-EDTA-Laufpuffer 50X (TAE)

- 242 g Tris (Sigma-Aldrich) (2 M)
- 57,1 ml Eisessig (Merck) (1 M)
- 14,6 g EDTA (Sigma-Aldrich) (50 mM)
- mit H_2Od auf 1000 ml auffüllen und vor Benutzung auf 1X verdünnen

2.2. Zentrifugation (ZF) von Zellen

Wenn nicht anders angegeben werden die Zellen mit 600 g für 2 min zentrifugiert. Waschen von Zellen bedeutet immer ZF und anschließendes Wegschütten des Überstandes.

2.3. Schwanzbiopsie und Blutentnahme bei Mäusen

Für die Typisierung der Mäuse aus der Zucht zwischen den Stämmen C57BL/6.St40 (St40) bzw. C57BL6/.St42 (St42) (Geschenk von Dr. Toes, ULMC Leiden, NL), B6.SJL-ptprc^a/BoCrTac-[KO]Rag2 N10 (RAG2$^{-/-}$Ly5.1) (Taconic) und C57BL/6J.IGH^{a}Thy1^{a}GPI1^a (Thy1.1) (Jackson) werden diese mit Diethylether (Merck) in einem 2 l-Becherglas betäubt, und zirka 100 µl Blut retrobulbär mit einer heparinisierten Kapillare (Heiland) in ein mit Lithium-Heparin beschichtetes Plastikröhrchen (Sarstedt) entnommen. Danach werden ungefähr 0,5 cm des Schwanzes abgeschnitten und die Maus durch Ohrlochung numeriert.
Das Blut wird in 5 ml ACK aufgenommen und 8 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach ZF wird der Überstand weggeschüttet. Falls das Pellet noch rot ist, wird nochmals 5 min mit 5 ml ACK inkubiert und es folgt eine weitere ZF. Danach werden die Zellen einmal mit 5

ml PBS gewaschen, in 200 µl FP aufgenommen und in jeweils zwei Wells einer 96 Well-Mikrotiterplatte (Costar #3799) überführt, in der sie nochmals mit 150 µl FP gewaschen werden. Nun folgt die Färbung wie in 2.6. beschrieben.
Die Schwanzbiopsien werden vorübergehend entweder bei –20 °C eingefroren oder direkt mit 20 µl Proteinase K (Roche) (20 mg/ml in MTJ; Endkonzentration 0,5 mg/ml)) in 750 µl MTJ bei 56 °C für 6 bis 20 h verdaut. Nach Schütteln werden 250 µl gesättigte Kochsalzlösung zum Ausfällen von Proteinen dazugegeben. Es wird abermals geschüttelt und für 10 min bei 12000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. 750 µl des Überstands werden in ein 500 µl Isopropanol (Merck) enthaltendes Eppendorfgefäß überführt, dieses zum Ausfällen der DNA geschüttelt und wiederum für 10 min bei 12000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wird mit 800 µl Ethanol (Merck), 70 %, gewaschen, für 5 min bei 12000 g in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Trocknen an der Luft wird das Pellet über Nacht in 150 µl TE bei 4 °C aufgenommen.

2.4. PCR auf den RAG2-Genotyp

Für die RAG2-PCR werden die Primer ragA GGGAGGACACTCACTTGCCAGTA, ragB AGTCAGGAGTCTCCATCTCACTGA und neoA CGGCCGGAGAACCTGCGTGCAA (MWG Biotech) verwendet [123]. Je nach verwendetem Gerät ergeben sich die in Tabelle 2.4.1. dargestellten Volumina.

Reagenz	Volumen (µl)	
PCR-Gerät	PTC-100 (Biozym)	GeneAmp 9700 (Perkin Elmer)
Wasser (Merck: LiChrosolv)	81,8	32,7
10X Puffer (Promega)	10	4
$MgCl_2$ (25mM) (Promega)	4	1,6
dNTPs (25mM) (PeqLab)	0,2	0,08
Primer ragA	0,5	0,2
Primer ragB	1	0,4
Primer neoA	0,5	0,2
Taq-Polymerase (Promega)	1	0,4
(DNA)	1	0,4
Summe	**100**	**40**

Tabelle 2.4.1.: Pipettierplan für die RAG2-PCR

Nach 5 min bei 95 °C zur DNA-Denaturierung folgen 35 Zyklen mit je 10 s bei 95 °C, 10 s bei 62 °C und 15 s bei 72 °C. Danach bleibt die Temperatur für 7 min bei 72 °C, bevor auf 4 °C gekühlt wird.
Zur Analyse werden 10 µl PCR-Lösung mit 1 µl Ladepuffer vermischt, auf ein 2 %iges NuSieve 3:1 Agarosegel (Biowhittaker) mit 0,005 % Ethidiumbromid (Roth) in DNA-Laufpuffer aufgetragen und eine Gelelektrophorese bei 12 V/cm durchgeführt. Die Banden werden durch UV-Bestrahlung (TFX-20M, Vilber Lourmat), die das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz anregt, sichtbar gemacht und photographiert (VM902E, Hitachi & P90E, Mitsubishi).

2.5. PCR auf den transgenen St40/St42-TCR-Genotyp

Für die St40/St42-PCR werden die Primer 102 TCCACCATGAGCTGCAGGCTTCTCCTCT AT, 103 CGGCTTCTCAGCGCTCTGTTTATACCAGTAC und 104 TGTAATGAGAGGCA

CGTGGTTAAGCTCTCGG (MWG Biotech) verwendet. Je nach verwendetem Gerät ergeben sich die in Tabelle 2.5.1. dargestellten Volumina. Die PCR und die Analyse werden wie in 2.4. beschrieben durchgeführt.

Reagenz	Volumen (µl)	
PCR-Gerät	PTC-100 (Biozym)	GeneAmp 9700 (Perkin Elmer)
Wasser (Merck: LiChrosolv)	81,8	32,7
10X Puffer (Promega)	10	4
$MgCl_2$ (25mM) (Promega)	4	1,6
dNTPs (25mM) (PeqLab)	0,2	0,08
Primer 102	0,5	0,2
Primer 103	1	0,4
Primer 104	0,5	0,2
Taq-Polymerase (Promega)	1	0,4
(DNA)	1	0,4
Summe	**100**	**40**

Tabelle 2.5.1.: Pipettierplan für die St40/St42-PCR

2.6. FACS-Färbung mit Antikörpern, Choleratoxin B und SGP-Tm

1-5 x 10^5 Zellen werden in einem Well einer 96 Well-Platte (Rundboden, Costar) gefärbt. Dazu werden die Zellen einmal mit 150 µl FP gewaschen und in 50 µl der Färbelösung aufgenommen. Bei höheren Zellzahlen werden 5 ml-Röhrchen (Becton Dickinson #352052) verwendet und die Zellen mit 1 ml FP gewaschen, um schließlich in 100 µl Färbelösung aufgenommen zu werden. In der Färbelösung befinden sich die Ak in den in Tabelle 2.6. angegebenen Verdünnungen. Die Ausgangskonzentrationen betragen bei FITC-markierten Ak 0,5 mg/ml, bei Ak mit anderen Fluorochrommarkierungen (PE, PerCP, APC) 0,2 mg/ml.

Antigen	Klon / nähere Bezeichnung	Firma	Verdünnungs-faktor
CD3	17A2	Becton Dickinson	1000
CD4	RM4-5		1000
CD8α	53-6.7		200
CD11b	M1/70		200
CD25	PC61		200
CD43	1B11		200
CD44	IM7		500
CD45RB	16A		2000
CD49d	R1-2		200
CD62L	Mel-14		2000
CD69	H1.2F3		200
CD70	FR70		200
CD95L	MFL3		200
Ly5.1	A20		500
Ly5.2	104		500
SGP-Tm	Geschenk von Dr. Toes, ULMC Leiden, NL		je nach Charge
Sphingolipid	Choleratoxin B	Sigma-Aldrich	1000
TCRß	H57-597	Becton Dickinson	1000
Thy1.1	OX-7		200
Thy1.2	53-2.1		2000

Tabelle. 2.6.1.: Konzentrationen der Antikörper und Färbereagenzien in der Färbelösung.

2.7. CFSE-Markierung

Die CFSE-Markierung von Zellen erfolgt nach Modifikation eines Protokolls von Marzo et al. [124]. Die zu markierenden Zellen werden einmal mit PBS gewaschen, gezählt und zu 10^7 Z/ml in PBS aufgenommen. Pro ml Zellen wird eine vorher austitriertes Volumen von CFSE (Molecular Probes) (500 µM in DMF, wasserfrei) zugeben, sodaß sich meist eine Endkonzentration von 200 – 500 nM CFSE ergibt. Nach sofortigem Mischen und exakt 3 min

Inkubation bei RT wird das 4 – 10-fache Volumen an RPMI mit 10 % FCS, 2 mM Glutamin und 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin (RPMI-10) zugegeben, zentrifugiert und die Zellen nochmals mit viel RPMI-10 gewaschen.

2.8. Titration der PLP3-Tm

Neue Chargen von PLP3-Tm (Geschenk von Dr. Felix Bischof, Tübingen) werden über Nacht bei 4 °C in folgenden Verdünnungen mit 2 x 10^5 Zellen aus den DLN einer immunisierten Maus in 20 µl IMDM (Biowhittaker) mit 10 % FCS (IMDM-10) in einer 96 Well-Platte (Rundboden, Costar) inkubiert: 1:8, 1:20, 1:70, 1:300, 1:800, 1:7000 und Kontrolle ohne Tm. Nach dem FACS (2.9.) und der Analyse wird für die weiteren Experimente die Tm-Konzentration zur Färbung benutzt, bei der das Verhältnis von spezifisch positiven ($CD4^+$) zu unspezifisch positiven ($CD4^-$) Ereignissen am günstigsten ist.

2.9. FACS-Färbung mit Ak und PLP3-Tm

Da pro Versuchstag bis zu über 100 Proben anfallen, sollte zwecks der Vergleichbarkeit die Konzentration der in mehreren Proben verwendeten Ak überall gleich sein. Daher wird zuerst eine Mischung von anti-CD4-FITC-Ak und PLP3-Tm-APC in IMDM-10 angesetzt, davon entsprechende Volumina an Mischungen mit den Ak gegen die zu untersuchenden Oberflächenantigene hergestellt und schließlich 20 µl Färbelösung zu 2 x 10^5 Zellen aus den Organen (2.21.) einer Maus in einer 96 Well-Platte (Rundboden, Costar) gegeben. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C werden die Zellen zweimal mit 150 µl FP gewaschen und in 50 µl aufgenommen. Unmittelbar bevor die Probe am FACS-Calibur (Becton Dickinson) gemessen wird, werden noch 0,5 µl Propidiumiodid (Becton Dickinson) (PI) zum Ausschluß von toten Zellen, die von PI angefärbt werden, zugegeben. Die Analyse erfolgt mit der Software CellQuestPro (Becton Dickinson) und Excel (Microsoft). Dabei wird der Anteil an spezifischen T-Zellen, die einen bestimmten Oberflächenmarker tragen, nur ausgerechnet, wenn mindestens fünf Ereignisse als Tm^+ gewertet wurden, was eigentlich nur an den frühen Meßpunkten im ZNS schwierig ist.

2.10. Bestimmung der Zellzahl

10 µl Trypanblau (Merck), 0.4 % w/v in PBS, werden mit 10 µl der zu untersuchenden Zellsuspension gemischt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellkonzentration errechnet sich dann wie folgt:
Zellzahl [Zellen / ml] = gezählte Zellen x Verdünnungsfaktor x 10^4.

2.11. Kultur von St40/St42-Milzzellen

Die Mäuse werden durch Genickbruch getötet, deren Milz entnommen und diese in 5 ml PBS mit dem Stempel einer sterilen 5 ml-Spritze (Becton Dickinson) in einem 40 µm-Nylonsieb (Becton Dickinson) über einem 50 ml-Röhrchen zerdrückt. Die Milzzellen werden mit 5 ml PBS ins Röhrchen gespült und zentrifugiert. Das Pellet wird, falls im weiteren Verlauf FACS-Experimente geplant sind, in 5 ml ACK aufgenommen, um die Erythrozyten zu lysieren, und nach 8 min wird abermals zentrifugiert. Nun kann evtl. die CFSE-Markierung (2.7.) durchgeführt werden. Das Pellet wird in 10 ml αMEM (Sigma-Aldrich) mit 10 % FCS (PAN Biotech), 2 mM Glutamin (Biowhittaker) und 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Biowhittaker) (αMEM-10) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (2.10.). Danach wird die Suspension auf eine Konzentration von $2{,}5 \cdot 10^6$ Zellen/ml gebracht und das E1a-Peptid SGPSNTPPEI (Dr. Stevanovic, Tübingen) in entsprechender Konzentration, wenn nicht anders angegeben 10 nM, dazugegeben. Davon werden je 2 ml in ein Well einer 24-Well-Platte (Costar) gegeben. Die Kultur erfolgt bei 37 °C und 5 % CO_2 bei schräggestellter Platte, damit sich die Zellen an einer Stelle sammeln.

2.12. Kultur von St40RAG2$^{-/-}$ und St42RAG2$^{-/-}$-Zellen

Da diese Mäuse nur SGPSNTPPEI-D^b-spezifische T-Zellen haben, müssen deren Milzzellen mit peptidgeladenen Stimulatorzellen einer anderen Maus inkubiert werden. Daher werden, wie in 2.11. beschrieben, die Milzzellen einer C57BL/6-Maus präpariert, zu 5 x 10^6 Zellen/ml aufgenommen und das Peptid SGPSNTPPEI in entsprechender Konzentration dazugegeben. Nach 45 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 wird zentrifugiert und zweimal mit 10 ml

αMEM-10 gewaschen, bevor die Zellen wiederum zu $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und je 1 ml in ein Well einer 24 Well-Platte (Costar) verteilt werden.
Während der 45 min Inkubationszeit der Stimulatorzellen werden die St40RAG2$^{-/-}$ und St42RAG2$^{-/-}$-Zellen analog vorbereitet, zu $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml aufgenommen und je 1 ml in die Wells mit den Stimulatorzellen pipettiert. Die Kultur erfolgt wie in 2.11. beschrieben.

2.13. Kultur von Tumorzellinien

Die Tumorzellinien RMA und EL-4, die den H2^b-Haplotyp haben, werden in RPMI-10 in Verdünnungsreihen 1:2 in 12-Well-Platten kultiviert. Die Passage erfolgt spätestens am siebten Kulturtag.

2.14. Zytotoxizitätstest

10^6 Zielzellen werden durch ZF pelletiert, der Überstand verworfen, evtl. 10 µl Peptid (1 µM) zugegeben und ohne zu Resuspendieren 45 min bei 37 °C mit 10 µl [^{51}Cr]-Natriumchromat (ungefähr 100 µCi) markiert. Währenddessen werden die Effektorzellen zentrifugiert und in 150 µl RPMI-10 pro Probe aufgenommen. Auf einer 96 Well-Platte (Rundboden, Costar) werden die Effektorzellen dreimal 1:3 titriert, so daß in vier Wells je 100 µl Effektorzellen in verschiedenen Verdünnungen vorhanden sind. Ebenso werden zur Bestimmung der Minimalfreisetzung des reduzierten Chroms je zwei Wells pro Probe mit 100 µl Medium gefüllt, sowie zwei weitere Wells pro Probe für die Maximalfreisetzung reserviert. Danach wird die Effektorzellkonzentration bestimmt.
Die markierten Zielzellen werden zweimal mit je 2 ml RPMI-10 gewaschen. Dann werden abermals 2 ml RPMI zugegeben und, um unspezifisch gebundenes [^{51}Cr]-Natriumchromat wieder in Lösung zu bekommen, für 30 min bei 37°C inkubiert, um eine niedrige Spontanfreisetzung zu erreichen. Danach werden sie zu einer Konzentration von 10^5 Zellen/ml mit RPMI-10 aufgenommen (d.h. in 10 ml) und je 100 µl in die vorbereiteten Wells der 96 Well-Platte gegeben. In die Wells für die Maximalfreisetzung kommen noch 100 µl Triton X-100 (Roth), 2 % in PBS. Anschließend werden die Zellen 4 bis 5 h bei 37 °C, 5 % CO_2 inkubiert.

50 µl des Überstandes werden auf eine 96 Well-Festphasenscintillationsplatte (Lumaplate, Packard) übertragen, über Nacht bei RT oder 1 h bei 58 °C getrocknet und im Scintillationszähler (1450 Microbeta Plus, Wallac) ausgezählt. Die prozentuale spezifische Lyse wird über folgende Formel berechnet:

$$spezifischeLyse = \frac{(cpm(Experimentalfreisetzung) - cpm(Minimalfreisetzung))}{(cpm(Maximalfreisetzung) - cpm(Minimalfreisetung))} \cdot 100\%$$

2.15. Adoptiver Transfer

Beim adoptiven Transfer (Genehmigungsnummer IM2/99 des Regierungspräsidiums Tübingen) werden die Milzzellen und evtl. die Zellen aus den poplitealen, inguinalen, axialen und mesenterialen Lymphknoten – wie in 2.11. beschrieben – isoliert, und die Zellen entweder ohne Erythrozytenlyse, oder – wenn gleiche Zahlen an St40RAG2$^{-/-}$ und St42RAG2$^{-/-}$-Zellen transferiert werden sollen – mit Erythrozytenlyse (siehe 2.11.) und anschließender Titerbestimmung für den Transfer vorbereitet. Entweder werden dann die Zellen einer Spendermaus in eine Empfängermaus transferiert (bei mehreren Spendern werden die Zellen gemischt und auf gleich viele Empfänger verteilt) oder eben eine bestimmte Zellzahl injiziert. Dabei wird die Empfängermaus erst am Ohr markiert, dann in eine Halterung (Kent Scientific) gespannt, der Schwanz zur Weitung der Venen für 30 s in sehr warmes, aber nicht heißes Wasser gehalten und zwischen 200 und 500 µl Spenderzellen in PBS i.v. mit einer 1 ml-Spritze (Braun) und einer Gr.20-Nadel (Braun) in die Schwanzvene injiziert.

2.16. Immunisierung mit Adenovirus

Zur Immunisierung mit bei 37 °C replikationsdefizientem, humanem Adenovirus (Ad5ts125) [125] (Genehmigungsnummer IM2/99 des Regierungspräsidiums Tübingen) werden die Mäuse mit Diethylether (Merck) betäubt und 10^8 pfu des Viruses in 50 µl PBS i.m. in den vorderen Unterschenkelmuskel (musculus tibialis anterior) injiziert.

2.17. Vorimmunisierung von Mäusen für die Zweitantwort bei EAE-Induktion (Priming)

Um Gedächtnis-T Zellen gegen das später die Krankheit auslösende Peptid PLP3 (HCLGKWLGHPSKF) (Dr. Stevanovic, Tübingen) aus dem Proteolipidprotein (PLP) zu erzeugen (Priming), werden weibliche Mäuse, Stamm SJL/JHanHsd (Harlan Winkelmann), im Alter von sechs Wochen immunisiert (Genehmigungsnummer Ne2/00 des Regierungspräsidiums Tübingen). Dazu wird das Peptid PLP3 in PBS zu 600 µg/ml aufgenommen und mit dem gleichen Volumen kompletten Freud´schen Adjuvans (CFA) mit 1 mg/ml *Mycobacterium tubercolosis* (Difco, lyophilisiert) zwischen zwei mit einem Adapter verbundenen Spritzen emulgiert (zuerst wird die wässrige in die ölige Flüssigkeit gedrückt). Danach wird jede Maus mit Diethylether (Merck) betäubt und insgesamt 100 µl der Emulsion (30 µg PLP3) s.c. in den Rücken injiziert.

2.18. Induktion von EAE

Um die EAE auszulösen, werden die Tiere nochmals immunisiert, indem 1,54 mg/ml PLP3 in PBS gelöst und mit dem gleichen Volumen CFA (4 mg/ml *Mycobacterium tubercolosis*) emulgiert werden. Die Injektion von insgesamt 100 µl Emulsion pro Maus erfolgt s.c. in beide Fußrücken unter Betäubung der Maus. Anschließend werden 125 ng Pertussistoxin (PTX, List) in 100 µl oder 125 µl PBS i.v. in die Schwanzvene gespritzt.

2.19. Feststellung des Krankheitsgrades

Die Schwere der Krankheitsausprägung wird in folgende Schweregrade eingeteilt:

0 keine Symptome
1 schlapper Schwanz
2 teilweise Lähmung der Hinterläufe
3 vollständige Lähmung der Hinterläufe
4 vollständige Lähmung der Hinterläufe und teilweise Lähmung der Vorderläufe
5 tot

2.20. Isolierung von T-Zellen aus Lymphknoten, Milz und zentralem Nervensystem

Eine Maus wird durch Kohlendioxid erstickt und mit den Fußflächen nach oben an allen Vieren mit dem Rücken nach unten auf einer Unterlage festgesteckt. Nach medianem Schnitt vom Bauch aus erfolgt je ein Schnitt vom Bauch über das Knie zum Schienbein. Das Fell wird festgesteckt und die poplitealen, drainierenden Lymphknoten entnommen. Der Bauchraum wird eröffnet und die Milz entnommen. Sowohl die Lymphknoten als auch die Milz werden mit je 5 ml PBS und dem Stempel einer 5 ml-Spritze (Becton Dickinson) durch ein Nylonnetz (Becton Dickinson) gedrückt und nochmals mit 5 ml PBS gespült, um Einzelzellsuspensionen zu erhalten. Die Milzzellen werden zentrifugiert und zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml ACK aufgenommen, nochmals zentrifugiert und in 10 ml IMDM (Biowhittaker) aufgenommen.
Die Lymphknotenzellen werden ebenfalls zentrifugiert und je nach Pelletgröße in 1 bis 5 ml IMDM resuspendiert.
Nun wird der Brustraum eröffnet und 30 ml PBS mit einer 30 ml-Spritze (Becton Dickinson) und einer Gr.2-Nadel (Braun) zunächst vorsichtig, dann mit größtmöglichem Druck in die linke Herzkammer gedrückt. Die nun annähernd blutleere Maus wird auf den Bauch gedreht, festgesteckt und die Wirbelsäule und der Schädel von Fell befreit. Mit einem Skalpell (Braun) werden jetzt alle die Wirbelsäule und den Schädel bedeckenden Gewebe entfernt, bis die Knochen blank liegen. Weiterhin eröffnet man nun den Schädel, indem eine feine Pinzette ins Hinterhauptsloch gedrückt und der Schädel dann seitlich und median aufgeschnitten wird. Nach Abnahme der Schädeldecke werden die Rückenwirbel von kranial nach kaudal erbrochen, bis das Rückenmark frei liegt. Nun kann das gesamte Zentralnervensystem entnommen und mit dem Skalpell in einer Petrischale (Greiner) klein geschnitten werden. Das Bindegewebe wird danach mit 1 mg/ml Collagenase IV (Roche) und 30 U/ml DNase IV (Sigma-Aldrich) in IMDM für 1 h bei 37 °C unter Schütteln verdaut, mit dem Stempel einer 5 ml-Spritze durch ein Nylonnetz gedrückt und nochmals mit 5 ml PBS gespült, um eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Das nach Zentrifugation für 5 min für 1800 rpm erhaltene Pellet wird in 3 ml einer IMDM/Percoll (Amersham Pharmacia) Mischung der Dichte 1,030 g/ml aufgenommen, vorsichtig in einem 15 ml-Plastikröhrchen (Becton Dickinson) über eine Mischung aus PBS/Percoll der Dichte 1,095 g/ml geschichtet und für 30 min bei 2500 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Das Fett schwimmt jetzt oben und die Lymphozyten befinden sich in der Zwischenphase. Diese wird vorsichtig in ein 15 ml-Plastikröhrchen entnommen, mit IMDM aufgefüllt, gut gemischt, 3 min bei 1800 rpm zentrifugiert und danach in 300 µl

IMDM resuspendiert. Das Volumen wird festgestellt und die Zellzahl in allen drei Zellsuspensionen bestimmt. Die Färbung mit Ak und Tm und Messung erfolgen wie in 2.9. beschrieben.

2.21. Liste der Hersteller von Geräten und Reagenzien

Amersham Pharmacia Biotech, 75184 Uppsala, Schweden
Becton Dickinson, 69126 Heidelberg, Deutschland
Biowhittaker, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Biozym Diagnostik GmbH, 31833 Hessisch Oldendorf, Deutschland
Costar Corning Inc., Corning NY14831, USA
Difco, Detroit, MI, USA
Greiner Labortechnik GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
Harlan Winkelmann, 33178 Borchen, Deutschland
Heiland Vet GmbH, 22041 Hamburg, Deutschland
Jackson, Bar Harbour, ME04609, USA
Kent Scientific, Torrington, CT06790, USA
List Biologicals, Niederlande
Merck, 64271 Darmstadt, Deutschland
Mitsubishi, 40880 Ratingen, Deutschland
Molecular Probes, Eugene, OR, USA
MWG Biotech AG, 85560 Ebersberg, Deutschland
NEN, Boston, MA, USA
Packard, Groningen, Niederlande
PAN-Biotech, 94301 Aidenbach, Deutschland
PeqLab, 91052 Erlangen, Deutschland
Perkin Elmer, Norwalk CT06859, USA
Promega, 68199 Mannheim, Deutschland
Roche Diagnostics, 68305 Mannheim, Deutschland
Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
Sarstedt AG, 51588 Nümbrecht, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
Taconic, Germantown, NY12526, USA

Vilber Lourmat, 77202 Marne la Valle, Frankreich

Wallac, Turku, Finnland

3. Ergebnisse

A Charakterisierung von T-Zellen die einen TCR mit gleicher Affinität exprimieren, aber unterschiedliche Avidität aufweisen

3.1. Genotypisierung der St40-, St42- und RAG2$^{-/-}$-Mäuse mit PCR sowie Phänotypisierung der Ly5 und Thy1-Antigene dieser Mäuse

Die Mäuse aus der St40/St42 RAG2$^{-/-}$ Ly5 Thy1-Zucht werden mit PCR auf das TCR-Transgen und auf den RAG2-Genotyp untersucht. Dazu wird eine Schwanzbiopsie wie in 2.3. angegeben verarbeitet und die PCR nach 2.5. durchgeführt. Bei transgenem TCR tritt eine Doppelbande zutage, wohingegen der Wildtyp nur eine einfache Bande aufweist (Fig. 3.1.1.). Es kann allerdings keine Aussage darüber getroffen werden, ob das Transgen homo- oder heterozygot vorliegt.

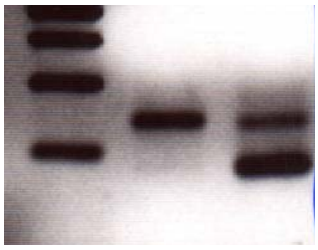


Fig. 3.1.1.: PCR auf transgenen TCR. links: Marker (unterste Banden mit 200 und 400 bp); mittig: kein transgener TCR; rechts: transgener TCR

Die RAG2-PCR nach 2.4. zeigt im Wildtyp eine Bande bei 250 bp, im Knockout bei 380 bp und heterozygot sind beide Banden zu sehen (Fig. 3.1.2.).

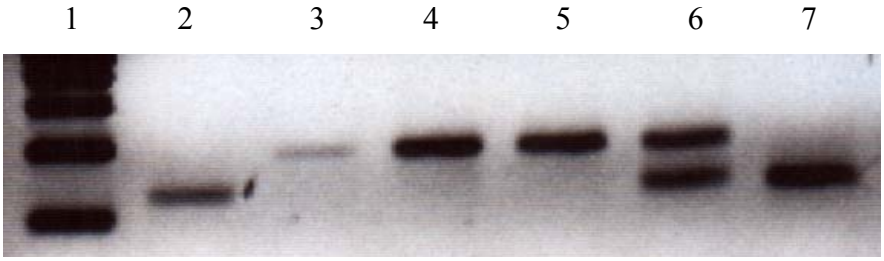


Fig. 3.1.2.: PCR auf das RAG2-Gen. Bahn 1: Marker (unterste Banden mit 200 und 400 bp); Bahnen 2 und 7: RAG2$^{+/+}$; Bahnen 3-5: RAG2$^{-/-}$; Bahn 6: RAG2$^{+/-}$.

Eine Aussage über den Ly5- bzw. Thy1-Genotyp läßt sich noch am Tag der Biopsie anhand der FACS-Analyse der Blutlymphozyten treffen (Fig. 3.1.3.).

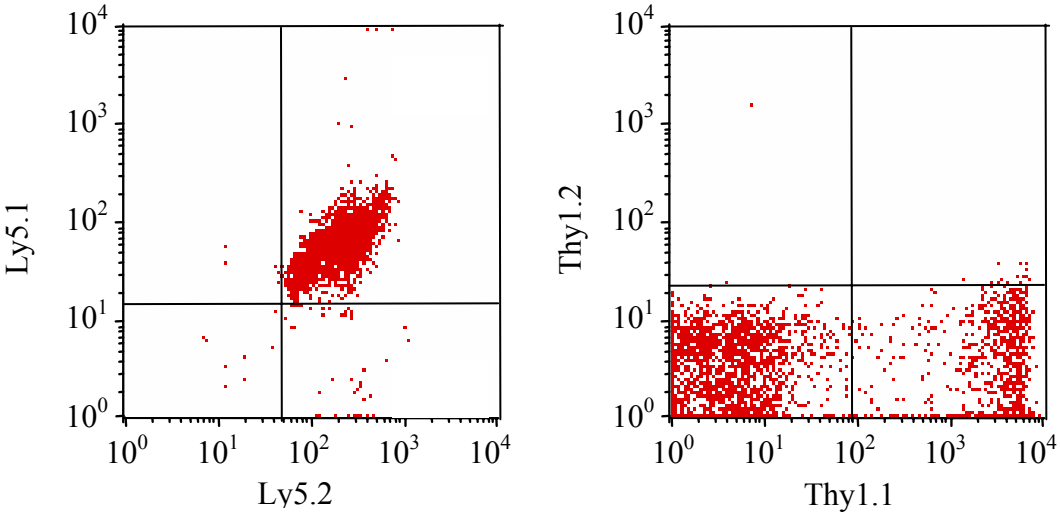


Fig. 3.1.3.: Genotypisierung anhand des Phänotyps der Ly5- und Thy1-Antigene. Beispiel einer FACS-Färbung aus dem Blut einer Ly5.1/2-heterozygoten Thy1.1$^+$-homozygoten Maus.

3.2. St40- und St42-Mäuse unterscheiden sich in der TCR-Expression

Die Expression des TCR auf der Zelloberfläche läßt sich im FACS nachweisen. Dazu werden Lymphozyten mit SGPSNTPPEI-H2-D^b-Tm oder mit anti-TCRß-Ak gefärbt. Obwohl St40RAG$^{-/-}$ Mäuse CD8$^+$ Zellen aufweisen, ist ihr TCR weder mit Tm noch mit anti-TCRß-Ak so anzufärben, daß er im FACS wirklich ein erkennbares Signal liefert. Im Gegensatz dazu lassen sich St42RAG$^{-/-}$ T-Zellen gut anfärben (Fig. 3.2.1.).

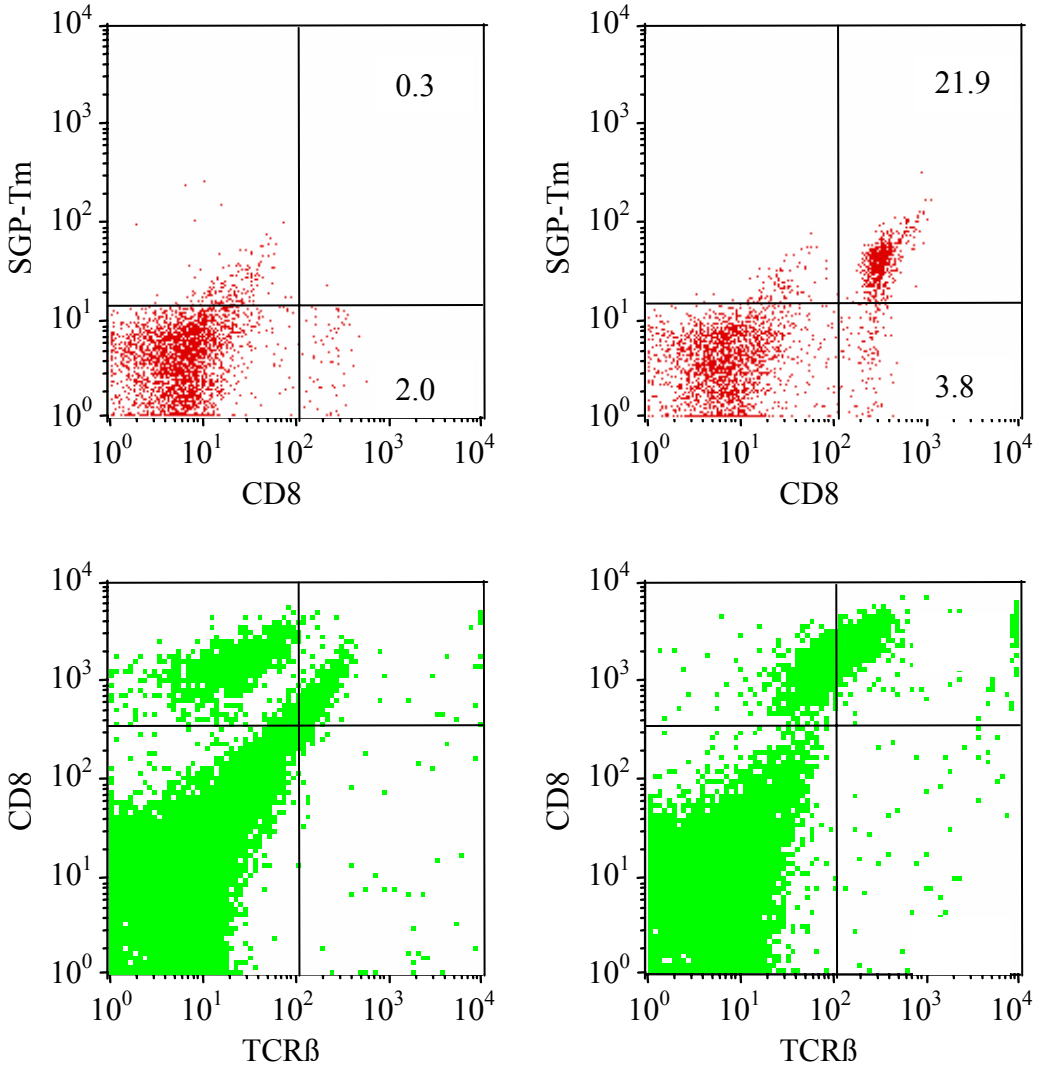


Fig. 3.2.1.: Expression von transgenem TCR in St40RAG2$^{-/-}$ (links) und St42RAG2$^{-/-}$ Mäusen (rechts) anhand der Färbung mit Tm (oben) und anti-TCRß-Ak (unten).

Die TCR-Expression der St42-Zellen ist niedriger als die der Wildtyp-T-Zellen (Fig 3.2.2.) Daher ist es bereits aus der Blutbiopsie möglich, über die Färbung mit anti-CD4-, anti-CD8- und anti-TCRß-Ak eine erste Einschätzung über den RAG2-Phänotyp (An- oder Abwesenheit von CD8$^+$ und CD4$^+$ Zellen) und bei St42 über den transgenen TCR-Phänotyp zu geben. In Fig. 3.2.2. ist dies für eine St42-Maus zu sehen, die nicht RAG2$^{-/-}$, aber TCR transgen ist. Beim St40-Stamm ist keine solche Aussage möglich, weil die bei der Typisierung noch recht jungen Mäuse oft sehr wenig transgene T-Zellen haben (vergleiche auch 3.10.).

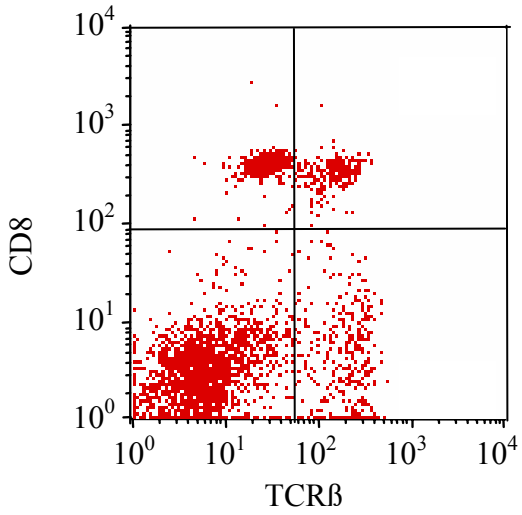


Fig. 3.2.2.: TCRß / CD8-FACS von Blutlymphozyten einer nicht RAG2$^{-/-}$, aber St42-transgenen Maus. Die transgenen T-Zellen mit der gegenüber der normalen TCR-Expression erniedrigten TCR-Expression sind im oberen linken Quadranten zu sehen, endogene CD8$^+$ Zellen oben rechts und endogene CD4$^+$ Zellen unten rechts.

3.3. Die T-Zellen der St40- und St42-Mäuse sind funktionell

Obwohl die St40-T-Zellen keine detektierbare Expression von TCR aufweisen, erreichen sie nach 5 Tagen Kultur mit spezifischem Peptid eine Zytotoxizität, die nur wenig unter der liegt, die bei St42-Zellen beobachtet wird, und sogar über der, die bei den Milzzellen einer mit Adenovirus (AV) immunisierten C57BL/6-Maus zu sehen ist (Fig. 3.3.1).

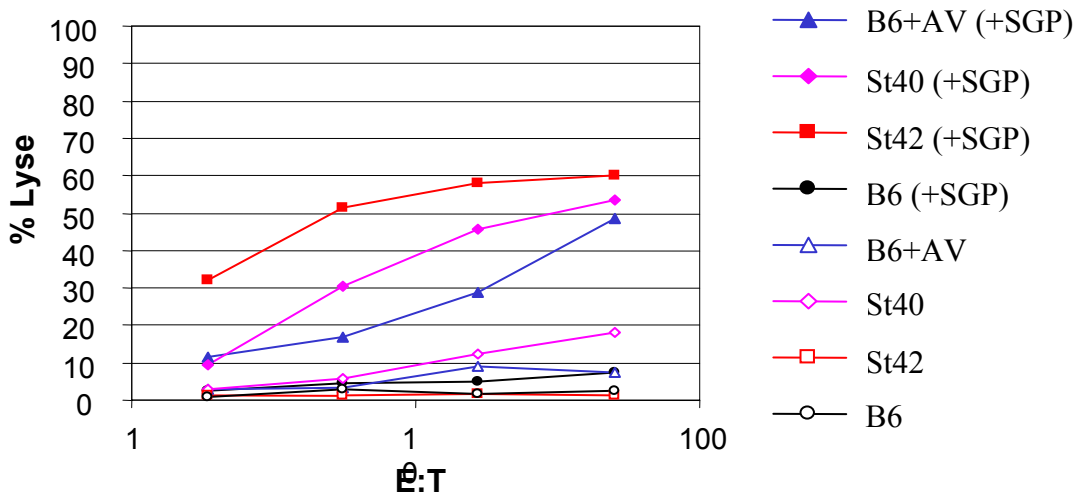


Fig. 3.3.1.: Zytotoxizitätstest mit Milzzellen von St40-, St42-, Adenovirus immunisierten (AV) und nicht immunisierten C57BL/6-Mäusen (B6) nach 5 Tagen Restimulation mit 10 nM SGPSNTPPEI. Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten, in denen St40- direkt mit St42-Zellen verglichen wurden.

3.4. St42-T-Zellen haben mehr Lipid Rafts auf ihrer Oberfläche als St40-T-Zellen

Da die TCR-Dichte auf St40-T-Zellen so gering ist, die Funktionalität aber trotzdem erhalten bleibt, könnte man vermuten, daß im Vergleich zu St42-T-Zellen die Signalweiterleitung verbessert ist, evtl. durch eine erhöhte Expression von Lipidflößen (Lipid Rafts), die die Plattform für die Signaltransduktion bilden. Jedoch ist genau das Umgekehrte der Fall: St40RAG2$^{-/-}$ T-Zellen haben weniger Lipid Rafts auf der Oberfläche. Dabei liegt die Menge an Rafts auf den transgenen Zellen weit unter der normalen Expression der CD8^{+} -Zellen einer C57BL/6-Maus (Fig. 3.4.1.).

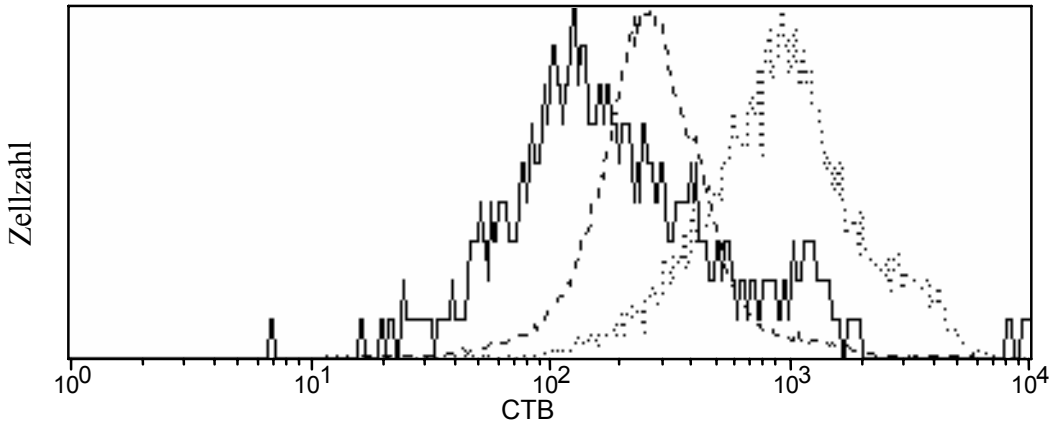


Fig. 3.4.1.: Lipid Rafts auf St40RAG2$^{-/-}$ CD8$^+$ (durchgehende Linie), St42RAG2$^{-/-}$ CD8$^+$ (gestrichelte Linie) und C57BL/6 CD8$^+$ T-Zellen (gepunktete Linie).

3.5. St42-T-Zellen teilen sich schneller bei Peptidstimulation

Nach Peptidstimulation sind sowohl St40- als auch St42-T-Zellen funktionell. Trotzdem gibt es Unterschiede in der Aktivierung. Zellteilung läßt sich im FACS mit dem Farbstoff Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE), der kovalent an Oberflächenproteine bindet, messen. Bei jeder Teilung halbiert sich die Fluoreszenz der markierten Zellen, was ein charakteristisches Muster im Histogramm ergibt.

Nach drei Tagen Stimulation mit spezifischem Peptid haben sich die St40-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ohne Peptid noch nicht geteilt, wohingegen die St42-Zellen bereits drei bis vier Teilungen durchlaufen haben (Fig. 3.5.1.). Nach sechs Tagen hat sich das jedoch wieder ausgeglichen (Fig. 3.5.2.) und beide haben sich sechs bis sieben Mal geteilt. Dabei ist zu bemerken, daß sich bei der St40-Maus weniger Zellen geteilt haben, was aber auf die geringere Vorläuferzahl in der Milz zurückzuführen ist.

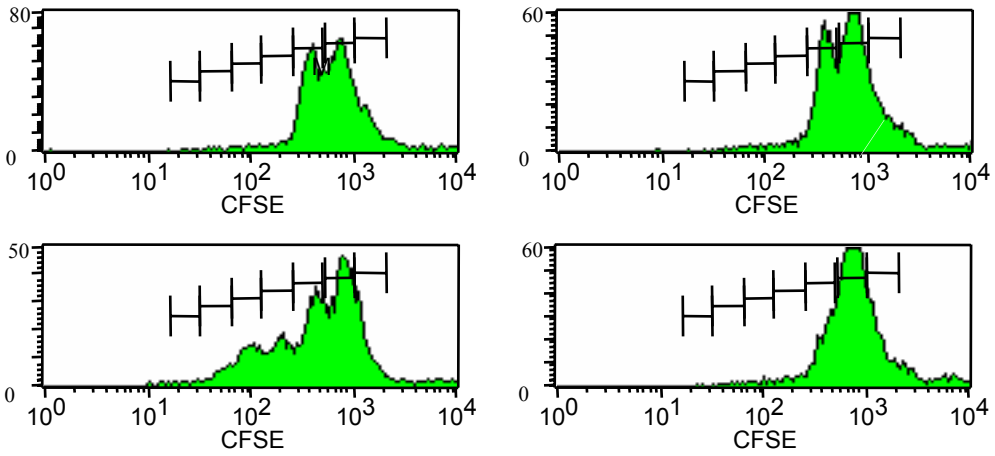


Fig. 3.5.1.: Zellteilung nach drei Tagen Stimulation mit 10 nM SGPSNTPPEI (links) bzw. ohne Peptid (rechts) von St40 (oben) und St42 Milzzellen (unten).

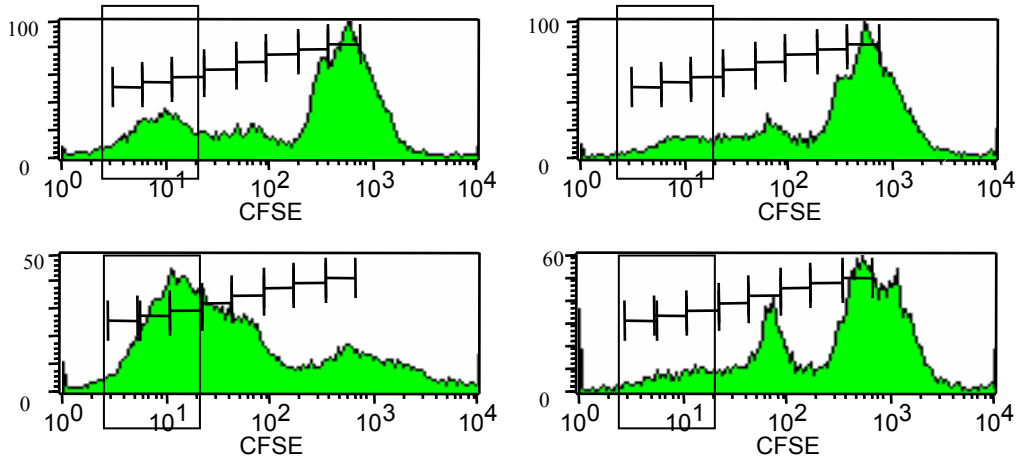


Fig. 3.5.2.: Zellteilung nach sechs Tagen Stimulation mit 10 nM SGPSNTPPEI (links) bzw. ohne Peptid (rechts) von St40 (oben) und St42 Milzzellen (unten).

3.6. Zellgröße und Aktivierungsmarker verhalten sich nach Peptidstimulation von T-Zellen aus St40- und St42-Mäusen gleich

Der Grund für die Teilungshemmung der St40-T-Zellen könnte eine suboptimale Stimulation durch eine zu niedrige Peptidkonzentration sein. Daher sollten die Blastenbildung und die Expression von Aktivierungsmarkern nach drei Tagen Kultur mit – unter verschiedenen

Peptidkonzentrationen geladenen – Stimulatorzellen überprüft werden. Sie unterscheidet sich jedoch nicht und erreicht bei 1 nM Peptid ihr Maximum (Fig. 3.6.1.). Zu bemerken ist allerdings, daß bei Peptidkonzentrationen über 1 nM die Zahl der großen Zellen, sowie die gesteigerte Expression von CD69 bei St40-Zellen wieder weniger wird. Eine Aussage darüber, ob CD69 bereits wieder von der Zelloberfläche vieler Zellen verschwindet oder er auf weniger Zellen exprimiert wird als bei der Optimalkonzentration, kann nicht getroffen werden. Bei CD70 liegt das Maximum erst bei einer Konzentration von 10 nM.

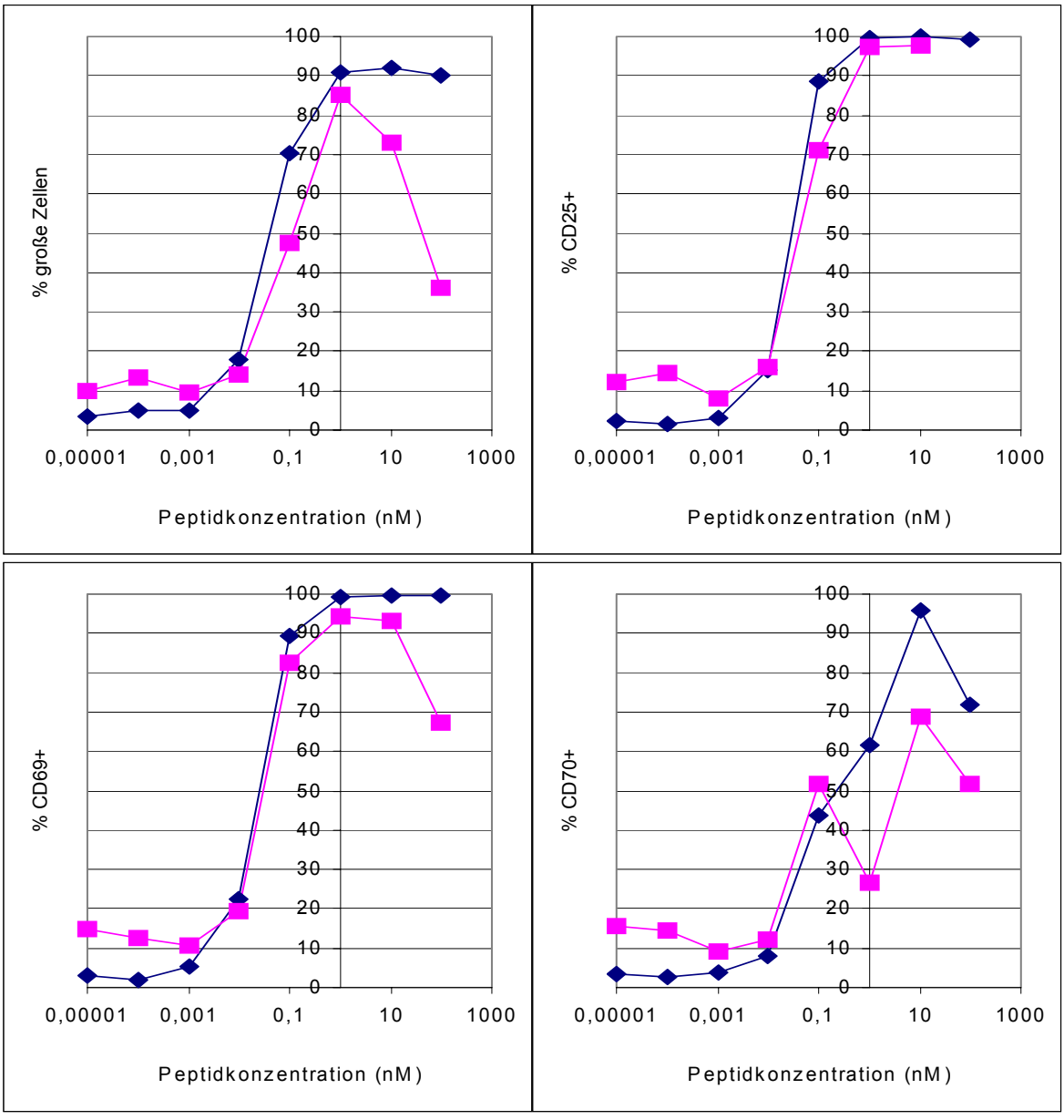


Fig. 3.6.1.: Zellgröße und Aktivierungsmarker bei Peptidstimulation (St40: ■ ; St42: ◆). Gezeigt sind nur $CD8^{+}Thy1.2^{+}$ Zellen; Stimulatorzellen sind $Thy1.1^{+}$.

3.7. Wanderungsmarker verhalten sich nach Peptidstimulation von T-Zellen aus St40- und St42-Mäusen gleich

Die Zelladhäsionsproteine, die bei Aktivierung von T-Zellen differenziell exprimiert werden, um der T-Zelle die Wanderung zum Infektionsherd zu ermöglichen, werden – wie die Aktivierungsmarker – bei St40 und St42-T-Zellen gleich reguliert (Fig. 3.7.1.).

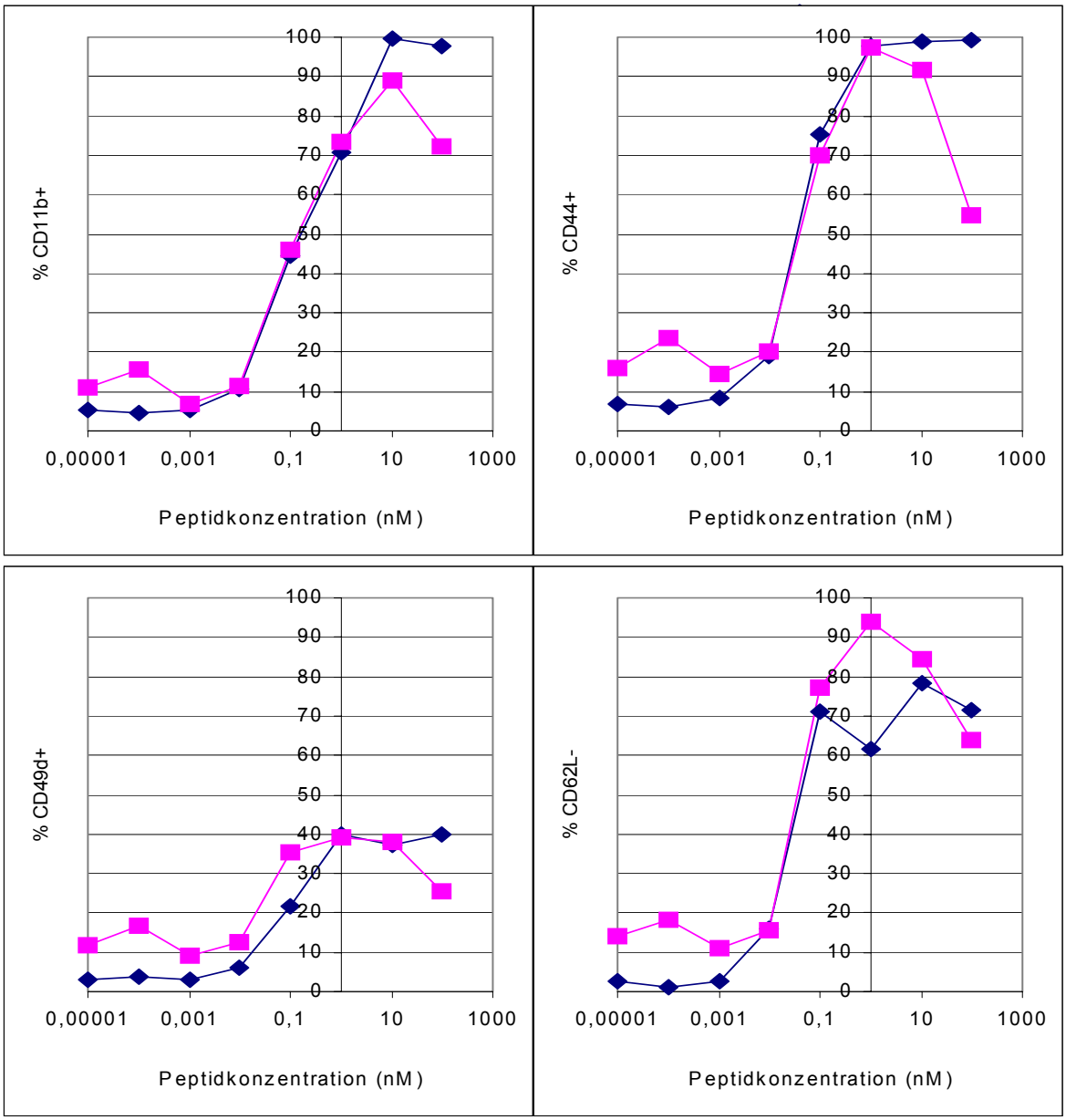


Fig. 3.7.1.: Wanderungsmarker bei Peptidstimulation (St40: ■ ; St42: ◆). Gezeigt sind nur $CD8^+Thy1.2^+$ Zellen; Stimulatorzellen sind $Thy1.1^+$.

Auch hier ist bei CD44, CD49d und CD62L das Maximum an Aktivierung bei 1 nM Peptid erreicht, bei CD11b liegt es wie bei CD70 erst bei 10 nM. Zudem haben bei weiter steigenden Peptidkonzentrationen weniger St40-Zellen die Wanderungsmarker exprimiert. Bei St42-Zellen tritt dieser Effekt nicht auf. Bemerkenswert ist auch, daß bei CD49d als einzigem Aktivierungsmarker das Maximum nicht gegen 100 % geht, sondern ihn nur 40 % der spezifischen T-Zellen auf der Oberfläche tragen.

3.8. Die anfängliche Aktivierung von St40- und St42-Zellen ist die gleiche, jedoch werden mehr St42-T-Zellen aktiviert

Nachdem bei Aktivierung mit Stimulatorzellen, die mit 1 nM Peptid beladen waren, das Maximum der Aktivierung nach drei Tagen bei T-Zellen von beiden Mausstämmen erreicht ist, fällt als nächstes der Blick auf den Aktivierungsbeginn. Die Hochregulierung von CD69 und CD25, die als Originaldaten für St42RAG2$^{-/-}$ in Fig 3.8.1. zu sehen ist, verläuft gleich für T-Zellen beider Stämme, allerdings sind bei den St42RAG2$^{-/-}$-Zellen in den ersten sechs Stunden mehr Zellen aktiviert (Fig. 3.8.2. links), was sowohl am Anteil der CD25^{+}, wie auch der CD69 exprimierenden Zellen abgelesen werden kann. Bei beiden Stämmen werden jedoch die Zellen, die anfangs aktiviert sind, d.h. CD69 exprimieren, mit gleicher Kinetik aktiviert (Fig. 3.8.2. rechts), denn wenn man den Anteil der CD25 exprimierenden Zellen an den CD69^{+} T-Zellen betrachtet, erkennt man zwischen St40- und St42-Zellen keinen Unterschied.

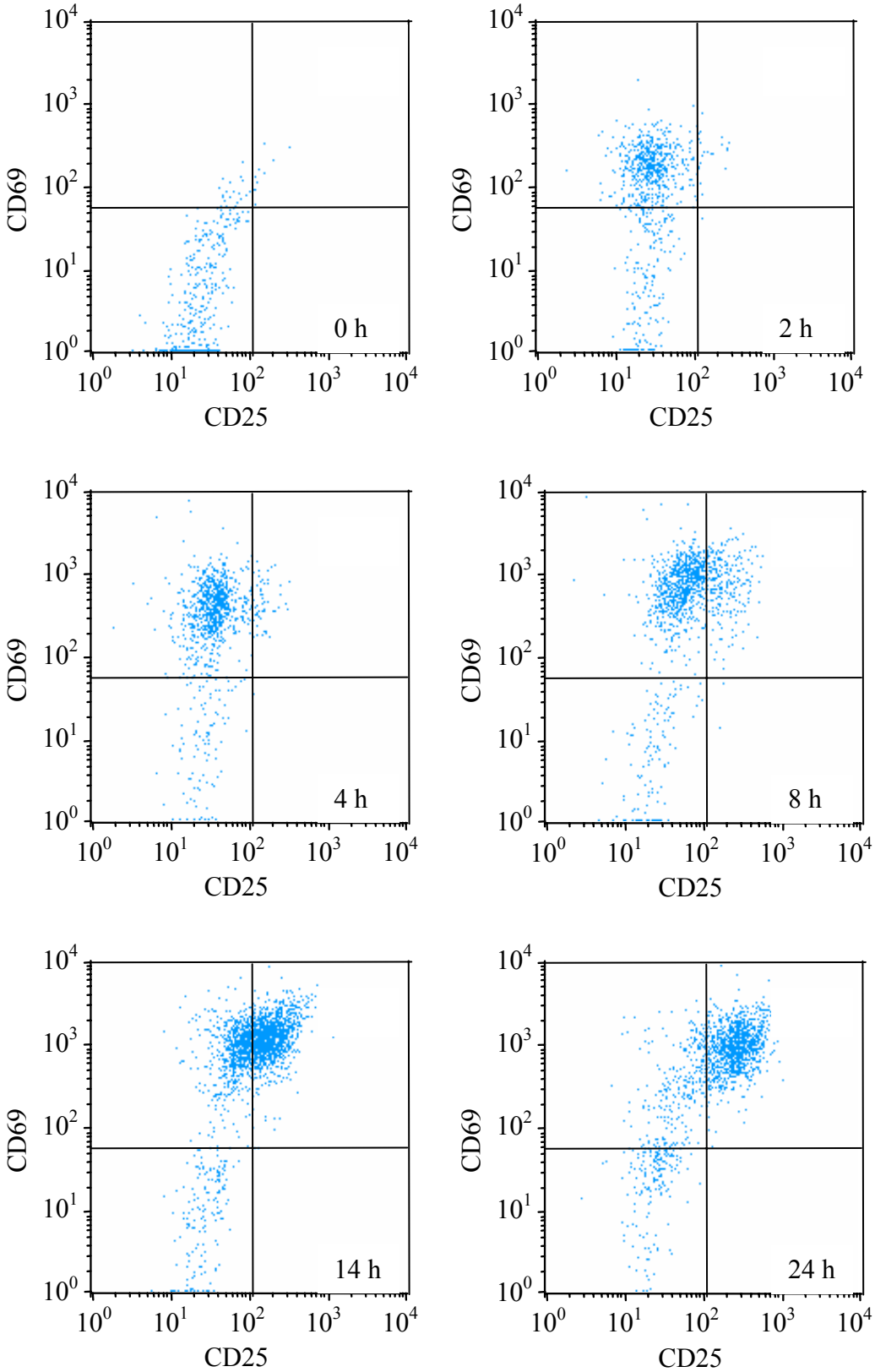


Fig. 3.8.1.: Aktivierungskinetik von CD69 und CD25 auf St42RAG2$^{-/-}$ T-Zellen. Gezeigt sind nur CD8$^+$Thy1.2$^+$ Zellen; Stimulatorzellen sind Thy1.1$^+$. Im unteren rechten Quadranten ist die Dauer der Aktivierung angegeben.

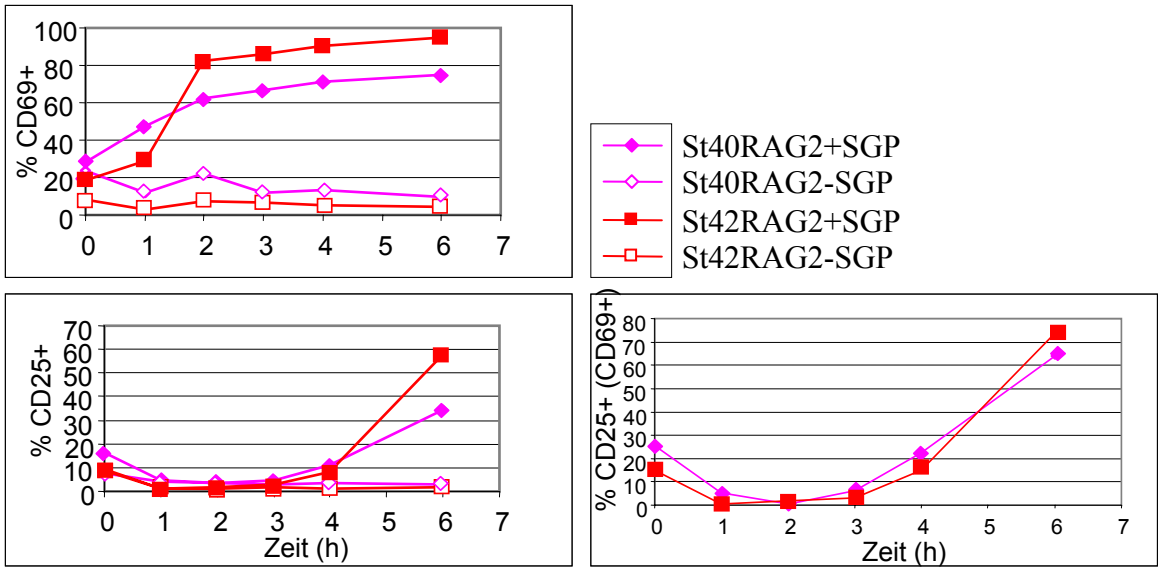


Fig. 3.8.2.: Bei Peptidstimulation *in vitro* werden weniger $CD8^+$ St40 als St42 Zellen aktiviert (links). Die Aktivierungskinetik für die wirklich aktivierten Zellen ($CD69^+$) beider Stämme ist allerdings gleich (rechts). Gezeigt sind nur $CD8^+Thy1.2^+$ Zellen; Stimulatorzellen sind $Thy1.1^+$.

3.9. St40-T-Zellen haben anfangs eine verringerte Blastenbildung und zeigen eine gehemmte CD25-Hochregulierung

Nach 24 h Peptidstimulation wird der Unterschied zwischen St40 und St42-T-Zellen deutlich: Obwohl in beiden Populationen innerhalb von vier Stunden fast alle Zellen CD69 (Fig. 3.9.1. links oben) exprimieren, bleibt ab acht Stunden nur ein bestimmter Prozentsatz der St40-T-Zellen $CD25^+$, während immer noch mehr St42-T-Zellen CD25 hochregulieren (Fig 3.9.1. oben rechts). Gleichzeitig bleibt das Expressionsniveau von CD25 auf den aktivierten, also $CD69^+$, St40-T-Zellen konstant, während es bei den St42-T-Zellen immer weiter steigt (Fig. 3.9.1. unten links). Überdies ist auch eine Verzögerung in der Blastenbildung bei den St40-T-Zellen festzustellen (Fig. 3.9.1. unten rechts).

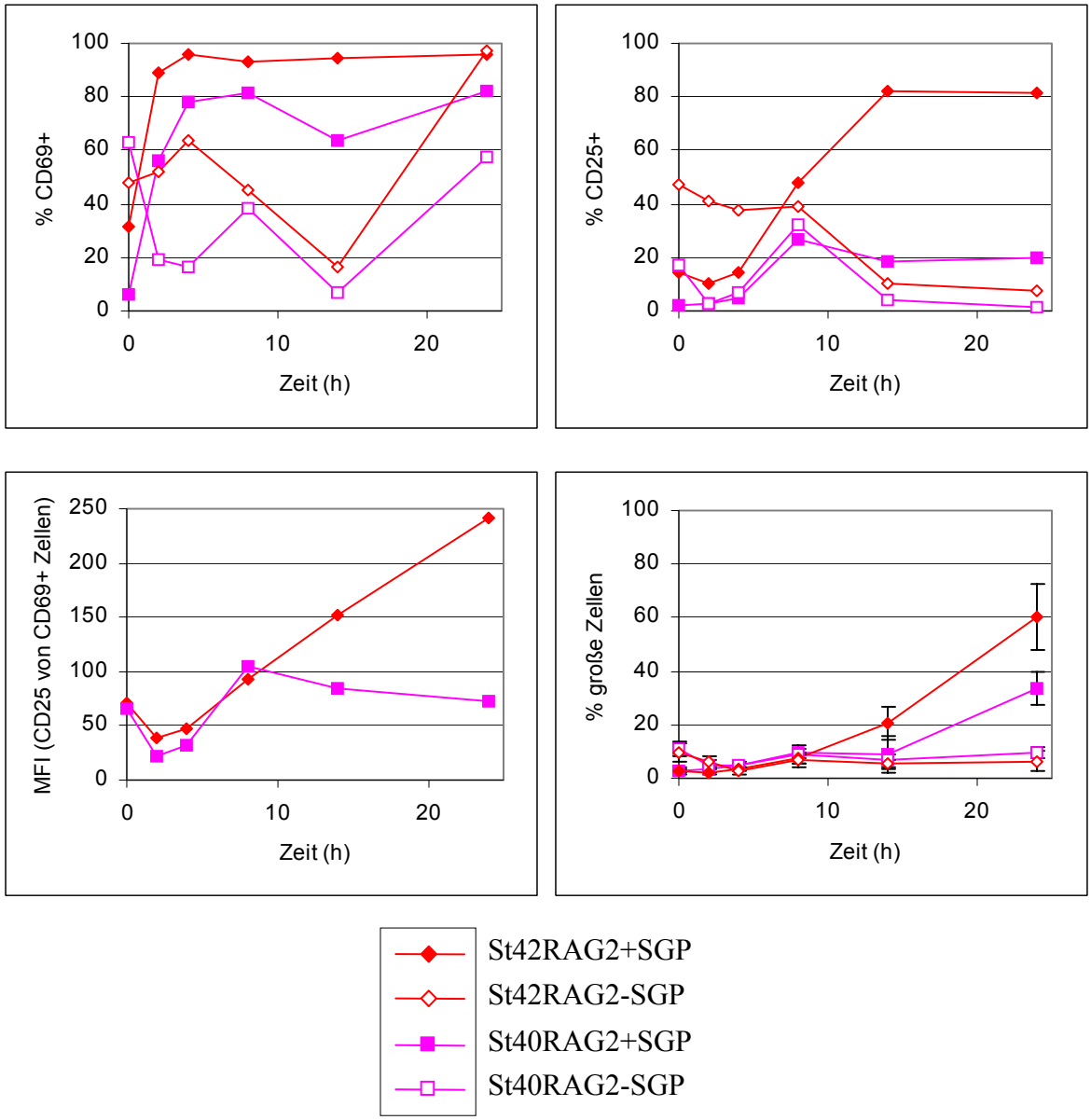


Fig. 3.9.1.: Unterschiede bei der Aktivierung von St40 und St42 T-Zellen in den ersten 24 h. Gezeigt sind nur $CD8^{+}Thy1.2^{+}$ Zellen; Stimulatorzellen sind $Thy1.1^{+}$.

3.10. Die T-Zellzahlen und die TCR-Expressionshöhe sind altersabhängig

Wenn man durch FACS-Analysen aus Blut von $St40RAG2^{-/-}$ und $St42RAG2^{-/-}$ Mäusen die Altersabhängigkeit der T-Zellzahlen untersucht, ist zu sehen, daß diese bei zunehmendem Alter der $St40RAG2^{-/-}$ Mäuse ansteigen, während sich die TCR-Expression nicht ändert (Fig. 3.10.1. oben). Auch bei den $St42RAG2^{-/-}$ Mäusen entsteht der Eindruck, daß die Zellzahlen

mit dem Alter zunehmen, gleichzeitig aber die Expression des TCR verringert wird (Fig. 3.10.1. unten). Dies scheint vor allem durch immer mehr kaum noch TCR exprimierende T-Zellen zustande zu kommen, denn es gibt immer noch sehr viele T-Zellen mit der ursprünglichen TCR-Expressionshöhe.

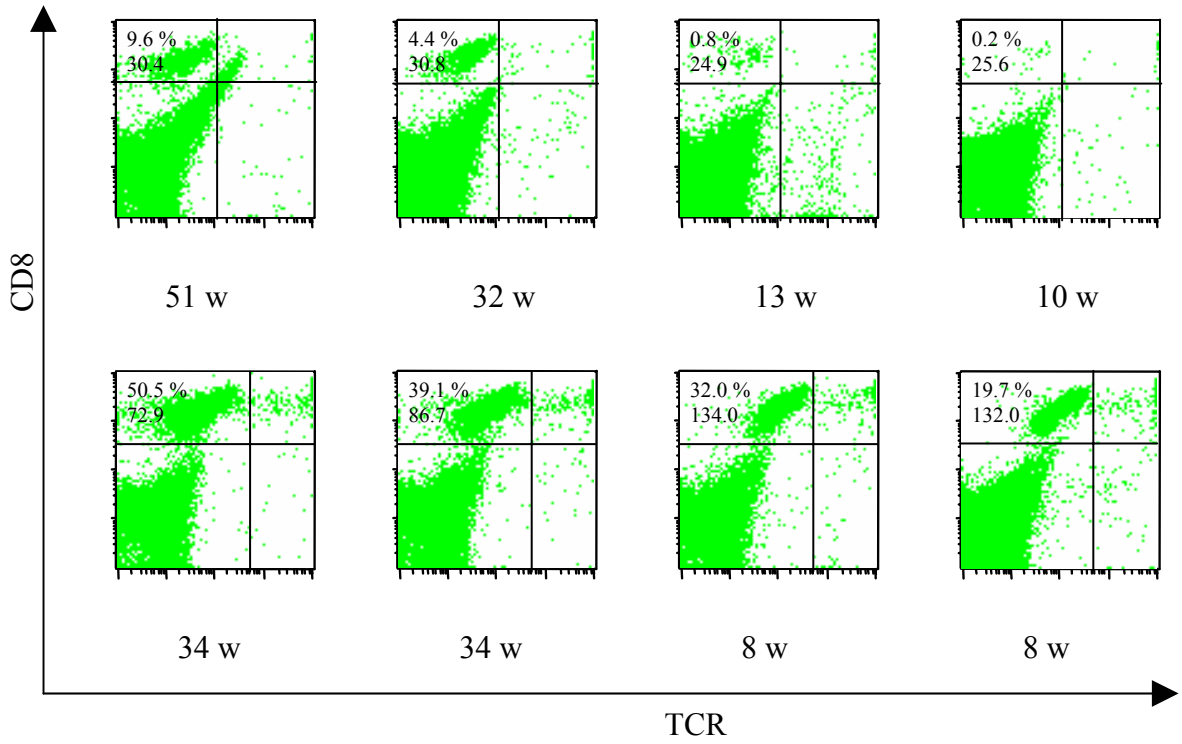


Fig. 3.10.1.: Altersabhängigkeit der transgenen T-Zellzahlen bei St40RAG2$^{-/-}$ (oben) und bei St42RAG2$^{-/-}$ (unten). Legende pro Dot-Plot: Unterschrift: Alter der Maus in Wochen (w); obere Zahl: Anteil an CD8^{+} Zellen an der Lymphozytenpopulation; untere Zahl: MFI der TCR-Färbung der CD8^{+} Zellen. Die Änderung der TCR-Expression bei St42RAG2$^{-/-}$ ist an den mit dem Alter abnehmenden MFI-Werten abzulesen.

3.11. Adoptiv transferierte Zellen werden nicht abgestoßen

Um sicherzugehen, daß die adoptiv in Ly5.2^{+}Thy1.1^{+} Empfänger transferierten Zellen nicht durch eine Minor H-Antwort abgestoßen werden, wurden Spenderzellen mit verschiedenen St42-, Ly5- und Thy1-Kombinationen auf ihrer Oberfläche transferiert und ihr Anteil an den CD8^{+} Blutlymphozyten über mehrere Wochen verfolgt. Als Kontrolle diente eine BALB/c-Maus, die einen nicht passenden MHC-Haplotyp (H2^{d}) hat. Im Vergleich zu den durch eine Alloreaktion binnen sechs Tagen abgestoßenen Spenderzellen in der BALB/c-Maus sind diese

Zellen auch nach über 80 Tagen noch zu finden (Fig. 3.11.1.). Dabei hat sich auch das Verhältnis der Spenderzellen untereinander kaum verändert, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß keines der getesteten Antigene für eine Abstoßung sorgt.

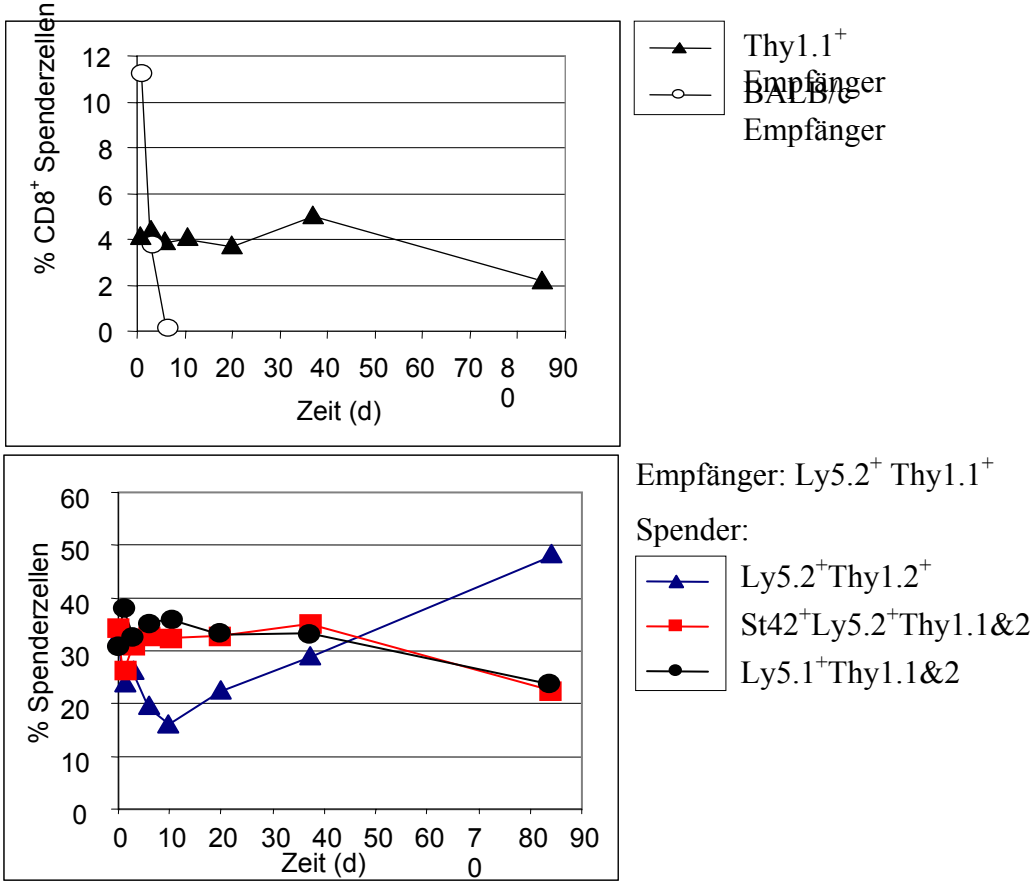


Fig. 3.11.1.: Weder unterschiedliche Allele von Ly5 bzw. Thy1 noch der St42-TCR führen zu einer Abstoßung der adoptiv transferierten Zellen.

Auch RAG2$^{+/+}$ (wildtyp) und RAG2$^{+/-}$ Zellen, die sich durch den viralen Vektor unterscheiden, mit dem das RAG2-Gen ausgeschaltet wurde, werden nicht abgestoßen (Fig. 3.11.2.), obwohl es einen Bericht über den Vektor, mit dem der RAG2$^{-/-}$ hergestellt wurde, gibt, in dem ein kryptisches Minor H-Peptid auf H2-D^{b} gefunden wurde [126].

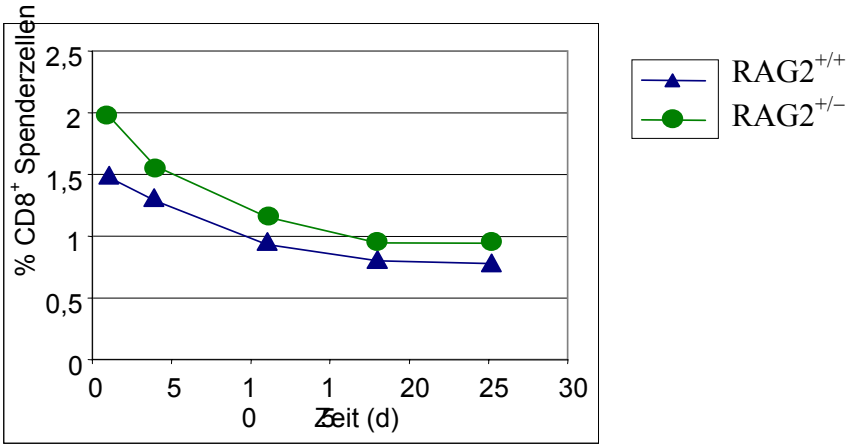


Fig. 3.11.2.: RAG2$^{+/-}$ werden nicht abgestoßen.

3.12. Sowohl St40 als auch St42-T-Zellen übernehmen die akute Immunantwort

Die *in vitro* gezeigte Funktionalität der St40- und der St42-T-Zellen sollte auch *in vivo* gezeigt werden können. Dazu werden St40RAG2$^{-/-}$ oder St42RAG2$^{-/-}$ Milzzellen i.v. in Empfängermäuse injiziert, der adoptive Transfer am Tag danach durch FACS-Analyse der Blutlymphozyten verifiziert und anschließend ein Teil der Mäuse mit Adenovirus i.m. immunisiert. Sowohl die St40RAG2$^{-/-}$ als auch die St42RAG2$^{-/-}$ Zellen expandieren nach Immunisierung in den Empfängermäusen im Vergleich zu nicht immunisierten Kontrollmäusen (Fig. 3.12.1. und Fig. 3.12.2.). Dabei expandieren beide Zellpopulationen bis zu einem Faktor von 2,5, St42-Zellen manchmal aber auch stärker. Allerdings hält die Expansion bei den St42RAG2$^{-/-}$-T-Zellen für längere Zeit als bei den St40RAG2$^{-/-}$-T-Zellen an, was aber auch daran liegen kann, daß beim gezeigten St40-Experiment versehentlich männliche Spenderzellen in weibliche Empfängermäuse gespritzt wurden und dies zu einer H-Y-Abstoßung führen dürfte. In weiteren, auf das Geschlecht abgestimmten Experimenten jedoch verhalten sich die St40-Zellen genauso: Erst erfolgt eine Expansion bis Tag 4, danach tritt ein Rückgang der Zellen ein, der bei den St42-Zellen erst ab Tag 15 zu bemerken ist. Wenn – wie in Figs. 3.12. gezeigt – die Spenderzellen verschwinden, dann können sie weder in Milz, Lymphknoten, Thymus, Leber, Lunge, Darm oder Niere gefunden werden, sind also wirklich eliminiert worden (Daten nicht gezeigt).

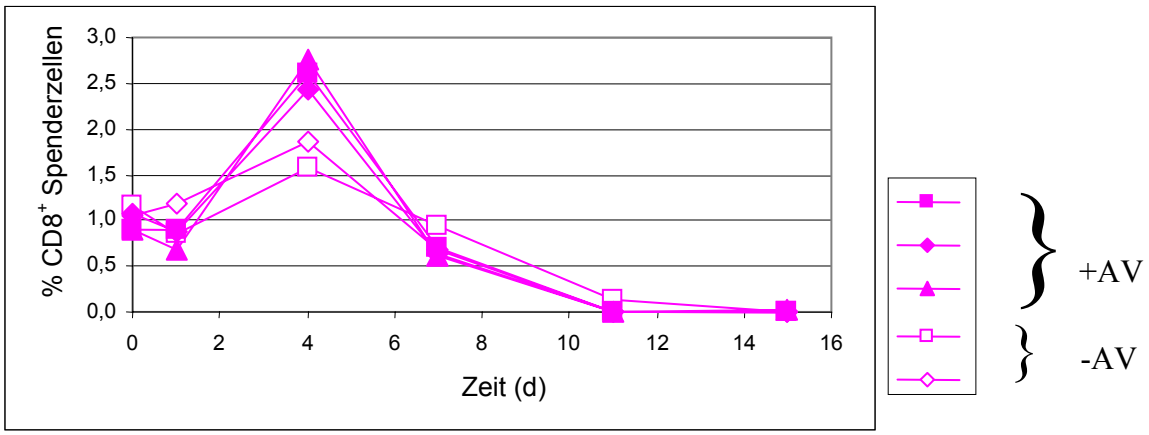


Fig. 3.12.1.: Adoptiv transferierte St40RAG2$^{-/-}$-Zellen expandieren nach Adenovirusinfektion an Tag 0 und erreichen an Tag 4 ihre Maximalzahl. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit drei immunisierten Mäusen von drei Experimenten mit insgesamt sieben immunisierten Mäusen.

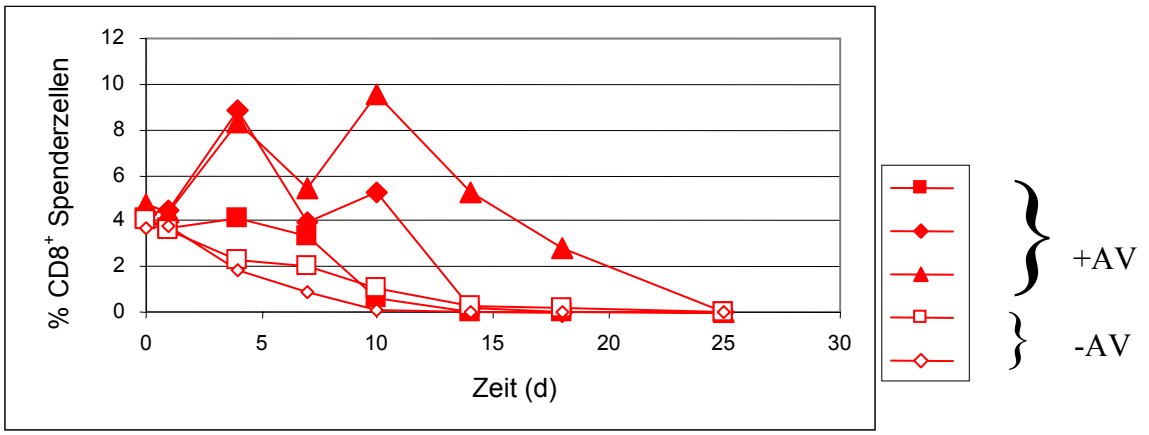
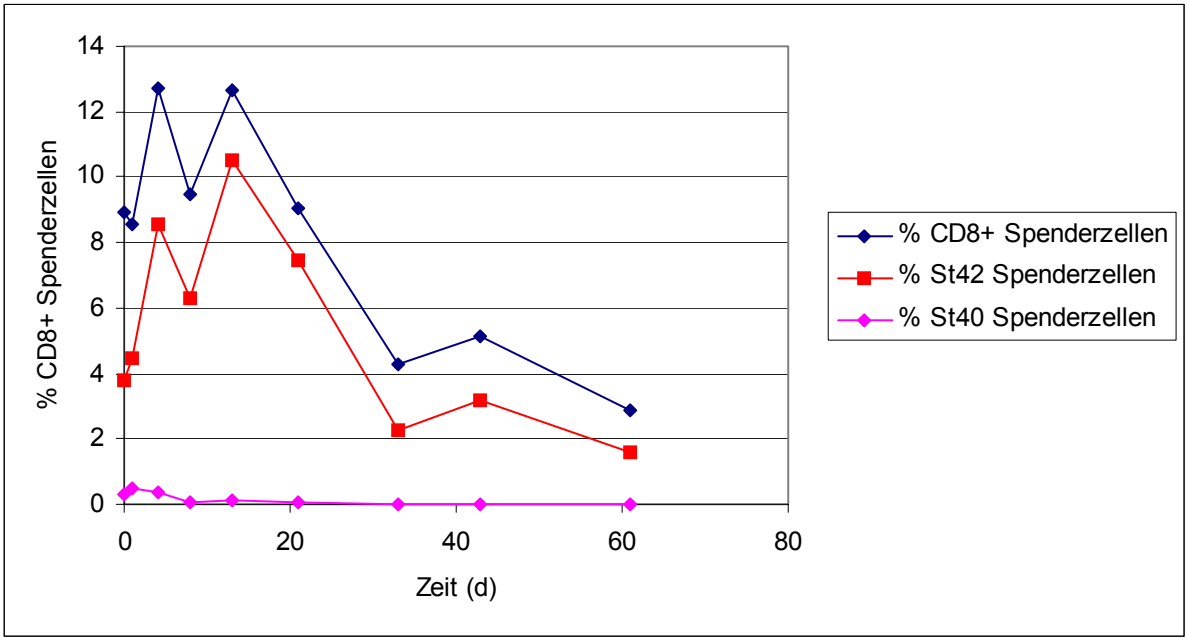


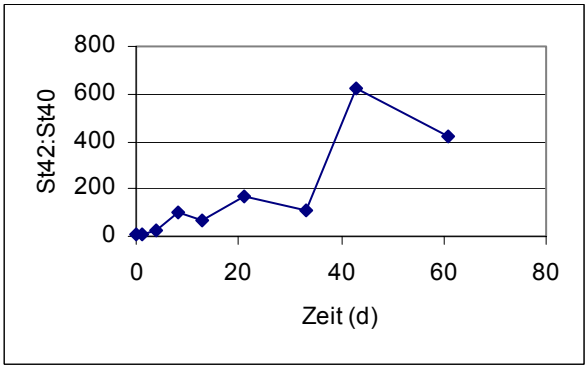
Fig. 3.12.2.: Adoptiv transferierte St42RAG2$^{-/-}$-Zellen expandieren nach Adenovirusinfektion an Tag 0 und erreichen zwischen Tag 4 und 15 ihre Maximalzahl. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment mit drei immunisierten Mäusen von drei Experimenten mit insgesamt sieben immunisierten Mäusen.

3.13. Bei Kotransfer übernehmen die St42-T-Zellen die akute Immunantwort

Bei Kotransfer beider T-Zellen, d.h. hier St40RAG2$^{-/-}$- und St42-Milzzellen, in eine Empfängermaus zeichnet sich das gleiche Bild ab wie bei den nicht gemischten adoptiven

Transfers: Die St40RAG2$^{-/-}$-Zellen expandieren leicht und sind bis Tag 10 nach der Infektion praktisch wieder verschwunden, wohingegen die spezifischen St42 Zellen für längere Zeit um einen ähnlichen Faktor wie in den Einzeltransfers expandieren (Fig. 3.13.1. oben). Da sich die transgenen St42-T-Zellen von den nicht transgenen CD8^{+} Zellen der Spendermaus im FACS durch die TCR-Expression unterscheiden lassen, kann man auch gut sehen, daß ausschließlich die transgenen T-Zellen expandieren, denn im Zenit der Immunantwort stellen die TCR-transgenen St42-Spenderzellen mehr als 80 % aller Spenderzellen (Fig. 3.13.1. unten rechts). Weiterhin ist ersichtlich, daß die St40-T-Zellen keine Rolle in der Immunantwort spielen, denn schon recht bald stellen die St42-Zellen die Mehrheit der spezifischen Zellen, am Ende sogar mit einem 400 bis 600-fachen Überschuß (Fig. 3.13.1. unten links).





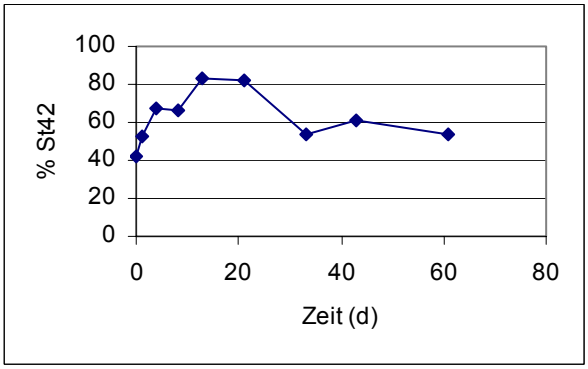


Fig. 3.13.1.: Nach Infektion an Tag 0 expandieren die St40-Zellen zunächst leicht, verschwinden dann aber schnell, während die St42-Zellen die Immunantwort übernehmen. Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten mit insgesamt fünf Mäusen.

3.14. Ein Argument gegen die Nachzügler-Hypothese

Die Nachzügler-Hypothese (vgl. 1.7.5.) läßt sich mit Hilfe der in der Zucht anfallenden, viele verschiedene Kombinationen der Ly5- und Thy1-Antigene aufweisenden Mäuse leicht nachprüfen. Wenn man die Adenovirusinfektion an Tag 0 als Bezugspunkt nimmt, dann sollten St42-Zellen, die vorher (Tag -1) transferiert werden, also das Antigen früh sehen, zu Effektorzellen werden, die nach abgeschlossener Immunantwort sterben, während St42-Zellen, die nach der Infektion transferiert werden (Tag 2 bzw. Tag 7) mit weniger Antigen in Kontakt kommen sollten. Diese Zellen müßten nach der Nachzügler-Hypothese zu Gedächtniszellen werden, die eine Zweitantwort vermitteln sollten. Dies ist jedoch nicht der Fall: Die zuerst aktivierten T-Zellen überleben und übernehmen größtenteils auch die zweite Immunantwort gegen das Adenovirus (Fig. 3.14.1.).

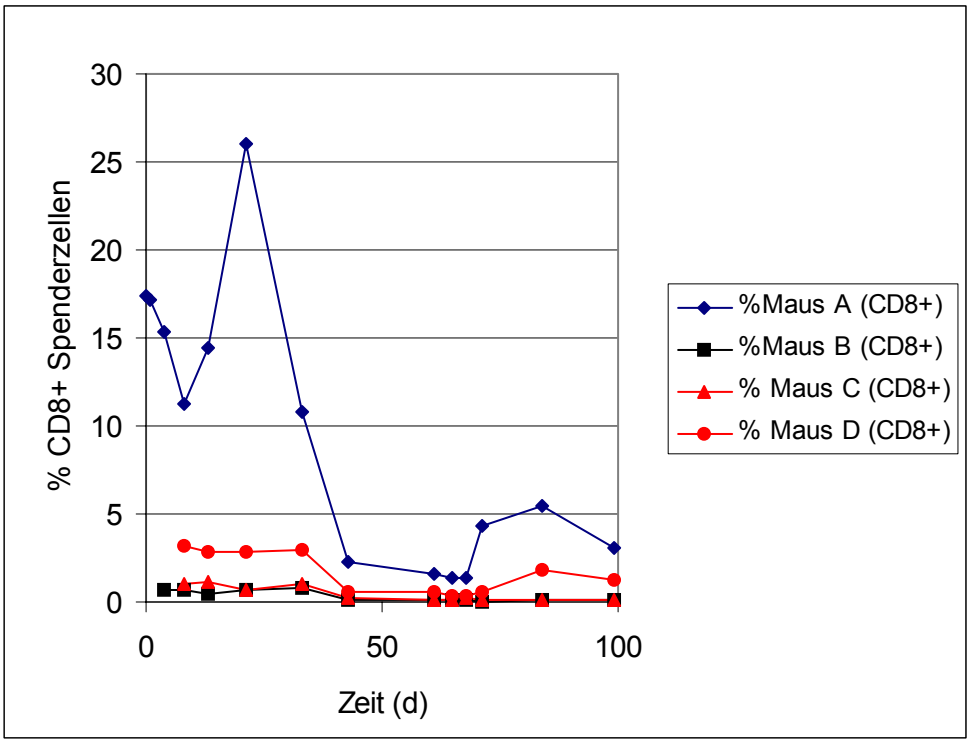


Fig. 3.14.1.: Früh mit dem Antigen in Kontakt gekommene T-Zellen vermitteln – im Gegensatz zu später mit dem Antigen in Kontakt gekommenen T-Zellen – die Zweitanwort, was gegen die Nachzügler-Hypothese spricht. Gezeigt ist eines von zwei Experimenten mit gleichem Ausgang.

B Die Kinetik antigenspezifischer T-Zellen bei Induktion von EAE

3.15. Die Primärantwort im EAE-Modell führt gegenüber einer Sekundärantwort zu einem späteren Krankheitsausbruch und zu schnellerer Erholung

Nach Induktion von EAE durch s.c. Injektion von PLP3-Peptid in CFA in den Fußrücken und gleichzeitiger i.v. Injektion von PTX werden die Mäuse, bei denen eine Erstanwort ausgelöst wird (die “naiven” Mäuse), zwischen Tag 8 und 13 krank, die Mäuse, bei denen eine Zweitantwort ausgelöst wird (die “geprimten” Mäuse), schon zwischen Tag 6 und 10. Der Zeitpunkt des Krankheitsausbruchs unterscheidet sich zwischen den Versuchen, aber die “geprimten” Mäuse werden immer 2-3 Tage vor den “naiven” Mäusen krank. Die Mäuse einer Gruppe werden innerhalb von 2 Tagen krank, in seltenen Fällen kann eine Maus aber auch einmal keine Symptome zeigen. Fig. 3.15.1. zeigt den Krankheitsverlauf der Mäuse eines repräsentativen aus 4 Versuchen. Zu beachten ist weiterhin, daß die Symptome der “geprimten” Mäuse sehr plötzlich und sehr stark auftreten, während der Krankheitsausbruch bei den “naiven” Mäusen langsamer vonstatten geht. Dafür erholen sich die “naiven” Mäuse früher, d.h. nach kürzerer Krankheitsdauer, als die “geprimten” Mäuse. Dagegen ist die Schwere der Symptome sowie der Anteil der Mäuse, die die Krankheit nicht überleben (nicht gezeigt) bei beiden Gruppen ungefähr gleich.

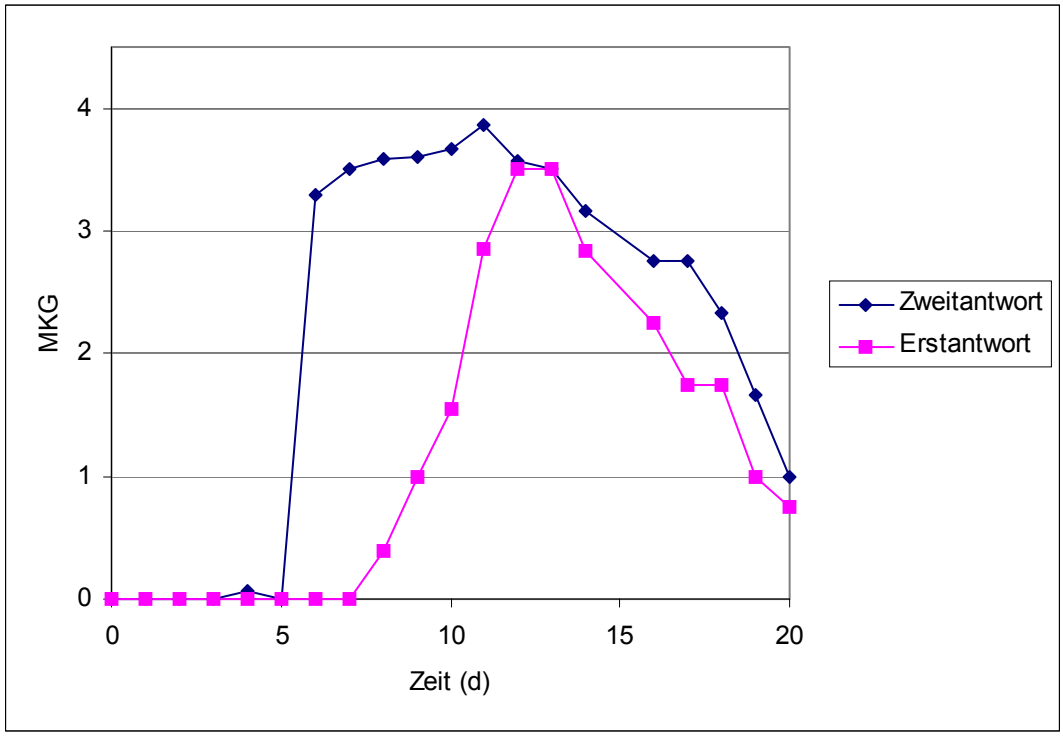


Fig. 3.15.1.: Krankheitsverlauf bei EAE-Induktion als Erst- und Zweitanwort ("naive" und "geprimte" Mäuse). MKG (mittlerer Krankheitsgrad): Durchschnitt aus dem Krankheitsgrad aller an diesem Tag noch lebender Mäuse bzw. unmittelbar an diesem Tag gestorbener Mäuse des Versuchs. 0: keine Symptome; 1: schlaffer Schwanz; 2: Schwäche der Hinterläufe; 3: Lähmung der Hinterläufe; 4: Lähmung der Hinterläufe und Schwäche der Vorderläufe; 5: tot.

3.16. PLP3-spezifische Zellen können mit MHC II-Tetrameren gefärbt werden

Die T-Zellen aus Mäusen, die aufgrund der Immunisierung mit PLP3-Peptid expandieren, können mit spezifischen PLP3-H2-A^s-Tm gefärbt werden. Vorher wird jedoch jede Tm-Charge titriert (siehe 2.8.), damit in der FACS-Analyse nur spezifische Bindung sichtbar wird. In Fig. 3.16.1. ist die spezifische Bindung des PLP3-Tm im Vergleich zu einem ein unspezifisches Peptid enthaltendes Kontrolltetramer MBP-H2-A^s-Tm, zu sehen. Sowohl bei Lymphozyten aus den DLN an Tag 4 (oben) als auch aus dem ZNS an Tag 10 ist die deutlich erhöhte Zahl von Tetramer-positiven $CD4^+$ Zellen bei Färbung mit dem PLP3-Tm im Vergleich zur Färbung mit dem MBP-Tm zu sehen. Mit PLP3-Tm läßt sich nur in mit PLP3-Peptid immunisierten Mäusen eine positive Population nachweisen (Daten nicht gezeigt). Dabei ist die Färbung mit diesen Tetrameren bei weitem nicht so stark wie die mit den SGPSNTPPEI-H2-D^b-Tm (vergleiche Fig. 3.2.1.), sondern die positiven Zellen stellen nur eine um den Faktor 10 stärker gefärbte Teilpopulation der ungefärbten Zellen dar.

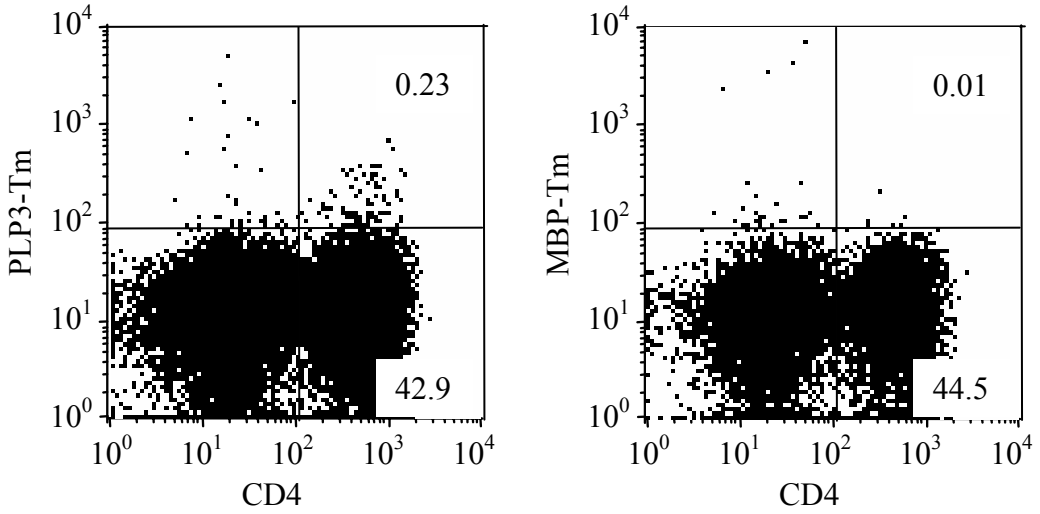


Fig. 3.16.1.: Mit PLP3-Tm lassen sich PLP3-spezifische T-Zellen aus immunisierten Mäusen darstellen. Lymphozyten aus dem ZNS (Tag 10 nach Immunisierung); Links: Färbung mit dem spezifischen PLP3-Tm; Rechts: Färbung mit einem Kontrolltetramer (MBP-Tm).

3.17. Dem Krankheitsausbruch geht die Expansion spezifischer T-Zellen in den DLN voraus

Die Zahl der spezifischen T-Zellen in den einzelnen Organen soll nun im Verlauf der Krankheit verfolgt werden. Dazu werden an Tag 0, 2, 4, 6, 8, 10, 14 und 20 je zwei Mäuse pro Gruppe getötet und die Absolutzahl der spezifischen T-Zellen aus dem Prozentsatz PLP3-Tm$^+$ Zellen an der Gesamtzahl lebender (PI-Ausschluß im FACS) CD4$^+$ Zellen, dem in der Neubauerzählkammer bestimmten Zelltiter und dem Volumen errechnet (siehe 2.10.). Der Verlauf der EAE wird bereits deutlich, wenn man sich die PLP3-spezifischen T-Zellzahlen in den poplitealen DLN betrachtet: Ihre Zahl nimmt stetig zu, bis sie nach einem Maximum wieder abnimmt. Dabei ist das Maximum bei "naiven" Mäusen an den Tagen 6 bis 8, bei den "geprimten" Mäusen an Tag 4 zu beobachten, was jeweils etwa zwei Tage vor Krankheitsausbruch liegt (Fig. 3.17.1). Dieser Verlauf ist repräsentativ für drei weitere Experimente, wenn man berücksichtigt, daß bei späterem Krankheitsausbruch auch die Maxima der spezifischen Zellzahlen verzögert auftreten, aber auf jeden Fall diese immer dem Krankheitsausbruch vorausgehen. Weiterhin liegen, wie in zwei weiteren Experimenten, in denen die Mäuse aufgrund zu geringer PTX-Gabe nicht krank wurden, die Maxima der "geprimten" Mäuse immer vor denen der "naiven" Mäuse (Tabelle 3.19.1.).

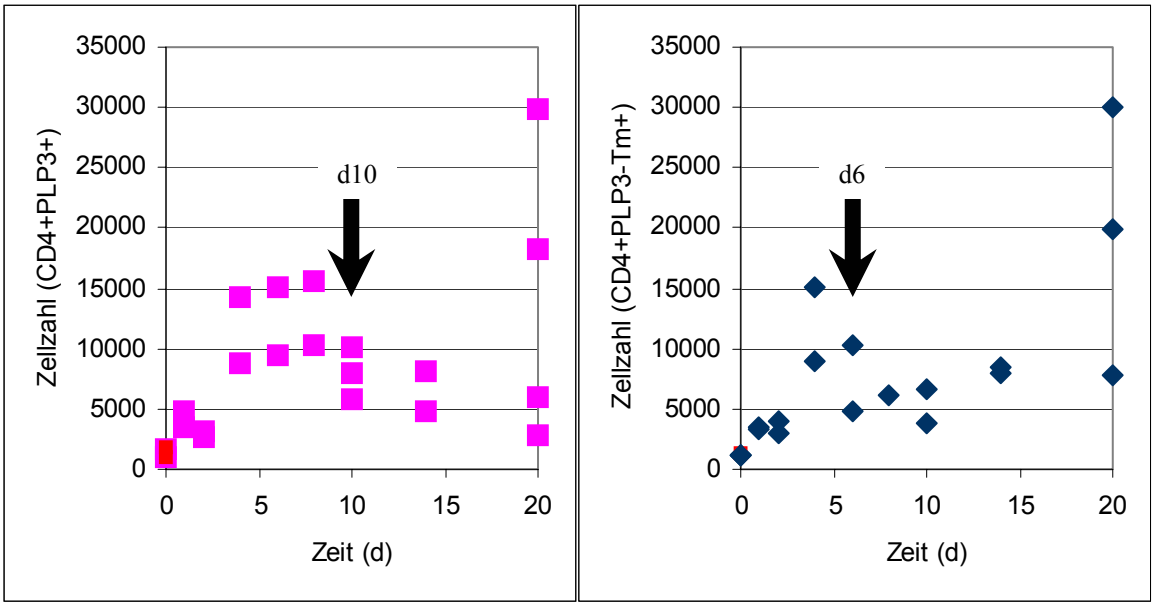


Fig. 3.17.1.: Die Expansion der spezifischen T-Zellen in den DLN vor dem Ausbruch der Krankheit (Pfeil). Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

3.18. Die relativen spezifischen Zellzahlen im DLN erreichen ihr Maximum vor oder zusammen mit den absoluten spezifischen Zellzahlen

Neben den absoluten PLP3-spezifischen T-Zellzahlen weisen auch die relativen PLP3-spezifischen T-Zellzahlen, d.h. der prozentuale Anteil der PLP3-Tm$^+$ T-Zellen an den CD4$^+$ T-Zellen, einen erst ansteigenden und nach einem Maximum wieder abfallenden Verlauf auf. Dabei liegt das Maximum der relativen Zellzahlen bei allen drei durchgeführten Versuchen immer entweder vor oder zusammen mit dem der absoluten Zellzahlen (Fig. 3.18.1. und Tabelle 3.19.1.).

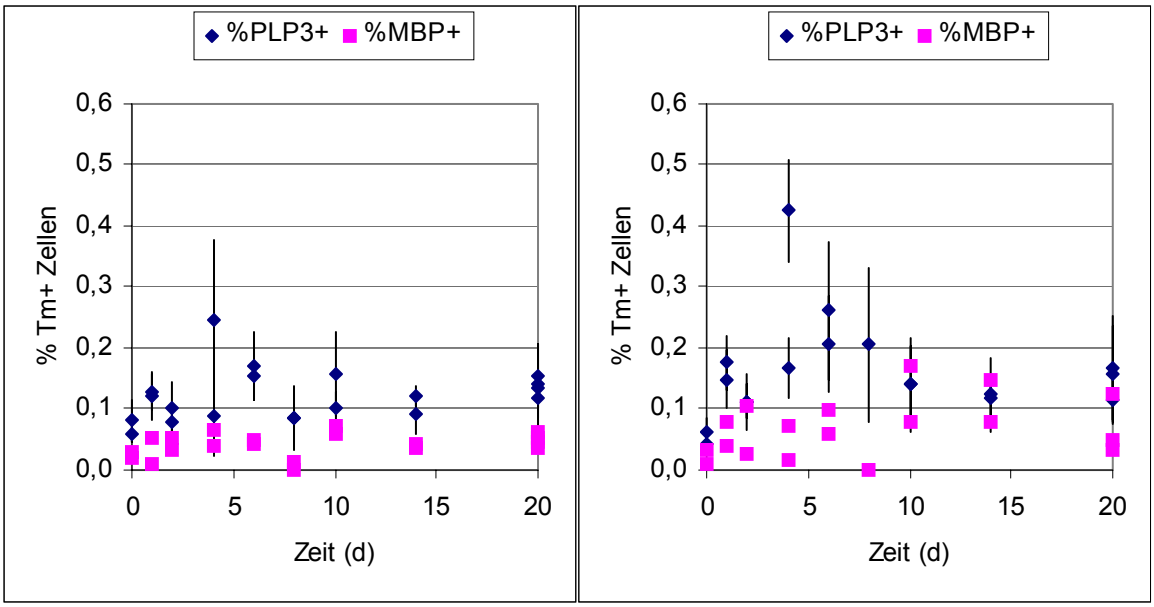


Fig. 3.18.1.: Der Verlauf der relativen spezifischen T-Zellzahlen in den DLN. Gezeigt ist eines von drei repräsentativen Experimenten.

3.19. Der Krankheitsausbruch verläuft parallel mit der Einwanderung spezifischer T-Zellen ins ZNS

Betrachtet man den Verlauf der spezifischen T-Zellzahlen im betroffenen Organ, dem ZNS, so stellt man fest, daß bei den “naiven” Mäusen zu Beginn der EAE-Induktion keine T-Zellen (Fig. 3.19.1.) und damit auch keine spezifischen T-Zellen vorhanden sind. Dagegen gibt es im ZNS der “geprimten” Mäuse bereits in der symptomfreien Zeit zu Beginn der Induktion viele T-Zellen und auch spezifische T-Zellen (Fig. 3.19.1.).

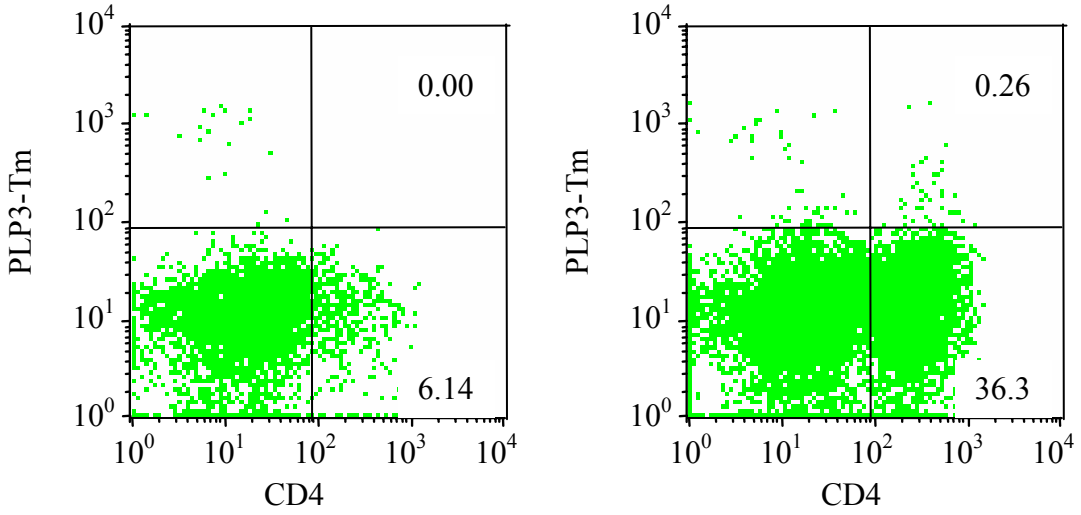


Fig. 3.19.1.: CD4$^+$ T-Zellen im ZNS von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen unmittelbar vor Krankheitsinduktion.

Wenn schließlich die ersten Symptome beobachtet werden können, sind parallel dazu die ersten T-Zellen im ZNS zu finden (Fig. 3.19.2. und Tabelle 3.19.1.).

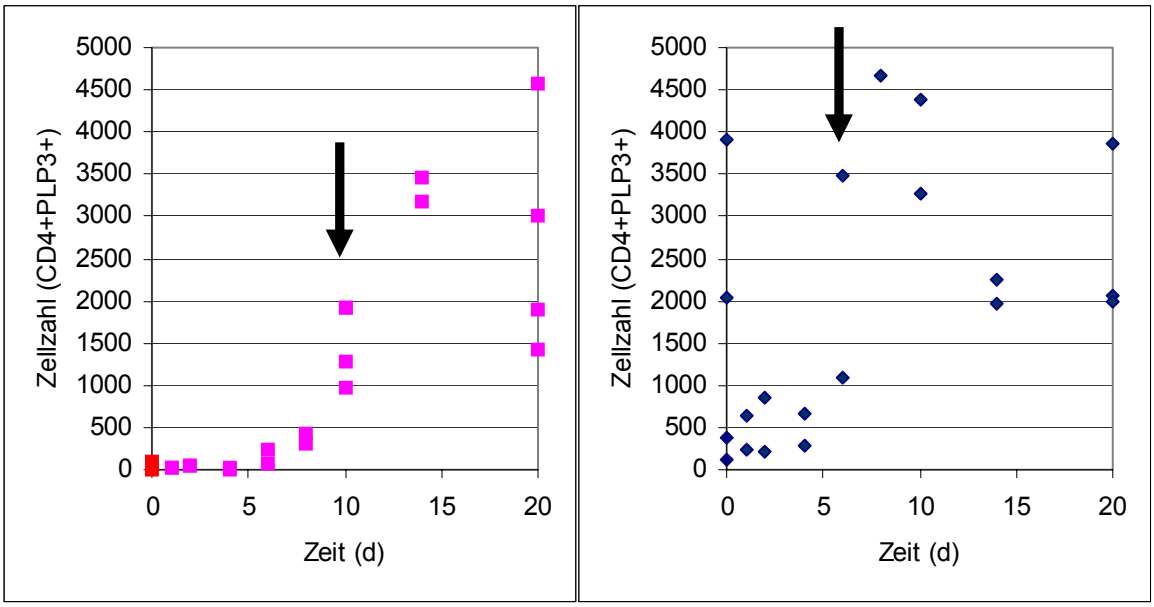


Fig. 3.19.2.: Anstieg der spezifischen T-Zellzahlen im ZNS von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen. Der Anstieg findet zeitgleich mit dem Auftreten der ersten Symptome statt (Pfeil). Gezeigt ist ein repräsentatives von drei Experimenten.

Versuch	Ausbruch der Krankheit	DLN: abs. Max. Tm^+-Zellen	DLN: rel. Max. Tm^+-Zellen	ZNS: Anstieg d. Tm^+-Zellen
A (Erstantwort)	Tag 12-14	Tag 6-8	Tag 6	Tag 10
A (Zweitantwort)	Tag 9-10	Tag 4-6	Tag 4	Tag 10
B (Erstantwort)	Tag 10-12	Tag 6-8	Tag 4-6	Tag 14
B (Zweitantwort)	Tag 8-9	Tag 4-6	Tag 4	Tag 10
C (Erstantwort)	Tag 9-10	Tag 6-8	Tag 4-6	Tag 10
C (Zweitantwort)	Tag 6	Tag 4	Tag 4	Tag 6

Tabelle 3.19.1.: Krankheitsausbruch bei “naiven” und “geprimten” Mäusen sowie Maxima der spezifischen T-Zellzahlen in deren DLN und ZNS.

3.20. In der Milz treten keine großen Änderungen der spezifischen Zellzahlen ein

Wenn die aktivierten T-Zellen die DLN verlassen um schließlich ins ZNS zu gelangen, sollten sie über das Blut auch in die Milz gelangen. Allerdings ist es nicht möglich, reproduzierbare T-Zellkinetiken in der Milz zu finden. In Fig. 3.20.1 ist zwar ein schönes Beispiel dargestellt, das die schnelle Anwesenheit von spezifischen T-Zellen in der Milz von “geprimten” Mäusen (ab Tag 2) und die verzögerte Kinetik bei “naiven” Mäusen (ab Tag 6) illustrieren könnte, leider konnte dies jedoch in mehreren Anläufen nicht zuverlässig reproduziert werden.

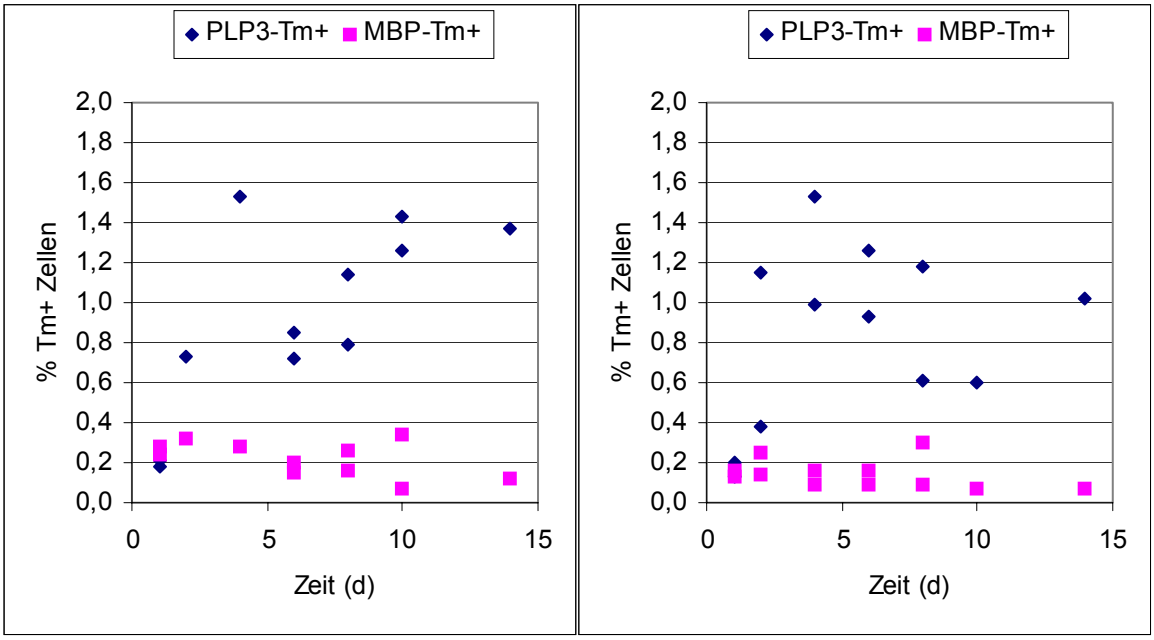


Fig. 3.20.1.: Verlauf der spezifischen T-Zellzahlen in der Milz von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen.

3.21. Kinetik der Aktivierungsmarker im DLN

Die T-Zellaktivierung kann nicht nur über die Expansion der T-Zellen, sondern auch an der Expression verschiedener Oberflächenmarker auf ihnen verfolgt werden. Dabei sollte ein Unterschied zwischen den spezifischen und den unspezifischen T-Zellen sichtbar werden. Bei manchen Oberflächenmarkern sind entweder in bestimmten Organen keine Unterschiede zwischen spezifischen und unspezifischen Zellen zu finden, oder im Verlauf der EAE-Induktion gibt es keine differentielle Expression auf den spezifischen T-Zellen. Daher sind die Messungen von CD62L, CD49d und CD45RB nach zwei bis drei Experimenten eingestellt worden (Daten nicht gezeigt). Weiterhin konnte kein einheitliches Bild von der Expressionskinetik von CD70 gefunden werden, weshalb auch diese Daten nicht gezeigt sind.
Die in den Abschnitten 3.21. bis 3.23. gezeigten Daten sind repräsentativ für mehrere durchgeführte Experimente, die natürlich dem Krankheitsverlauf zeitlich entsprechende, leicht veränderte Markerkinetiken aufweisen. Dabei unterscheidet sich die Zahl der Experimente, bei denen bestimmte Oberflächenmarker verfolgt wurden. Außerdem konnten v.a. im ZNS nicht immer genügend Tm^+ Ereignisse gefunden werden, um den Anteil der einen bestimmten Oberflächenmarker exprimierenden Zellen zu bestimmen.

3.21.1. CD11b

Die zusammen mit CD18 als Mac-1 an CD54 (ICAM-1) bindende Integrin α_M-Kette wird früh auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Das Maximum der spezifischen Zellen, die CD11b exprimieren, an Tag 4-6 (“naiv”) bzw. an Tag 2-4 (“geprimt”) fällt mit dem relativen Maximum der Zellzahl zusammen. Dabei ist der Anteil an $CD11b^+$ Zellen in beiden Gruppen bis maximal 40 % gleich. Unspezifische T-Zellen verändern die Expression von CD11b kaum (Fig. 3.21.1).

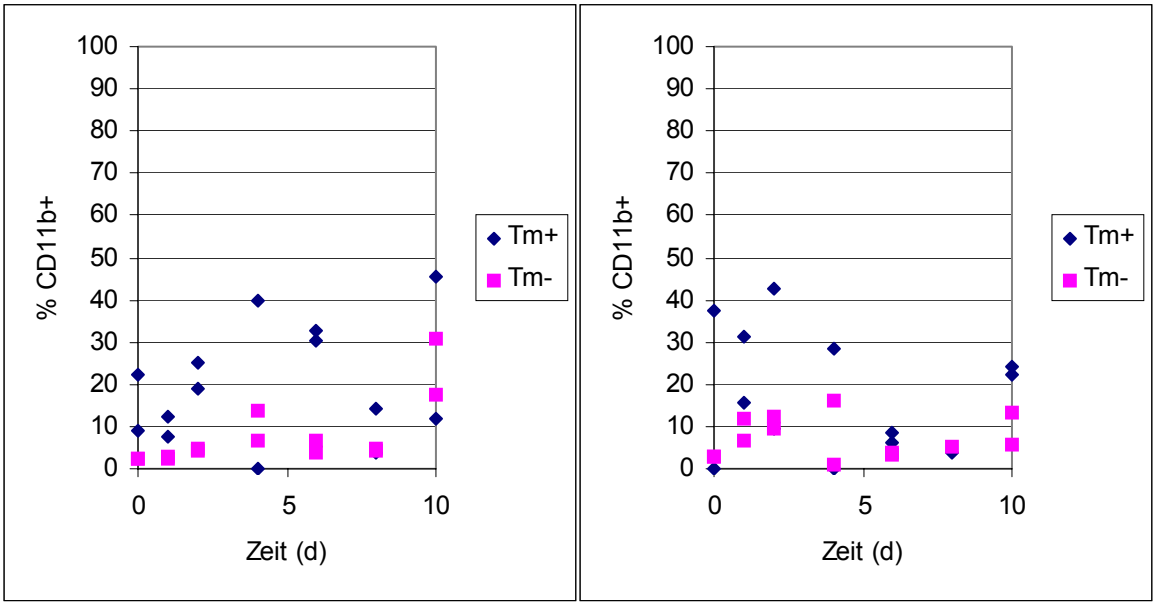


Fig. 3.21.1. Expressionskinetik von CD11b auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus den DLN von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Zusätzlich zu drei Experimenten, bei denen die Mäuse krank wurden, ist dieser Verlauf auch charakteristisch für ein Experiment, bei denen die Mäuse nicht krank wurden.

3.21.2. CD25

Die IL-2Rα-Kette (CD25) wird nach EAE-Induktion ähnlich wie CD11b reguliert. Das Maximum der spezifischen, CD25 exprimierenden Zellen an Tag 4 bei der Sekundärantwort und etwas später bei der Primärantwort fällt ebenfalls mit dem relativen Maximum der Zellzahl zusammen. Danach gehen die $CD25^+$ Zellzahlen nur langsam zurück. Der Anteil der $CD25^+$ Zellen liegt in beiden Gruppen bei maximal zwischen 70 und 85 %. Unspezifische T-Zellen verändern die Expression von CD25 deutlicher als die von CD11b und weisen an Tag 4 ebenfalls ein Maximum auf. Jedoch ist ihr Anteil immer geringer als der bei den spezifischen T-Zellen (Fig. 3.21.2.).

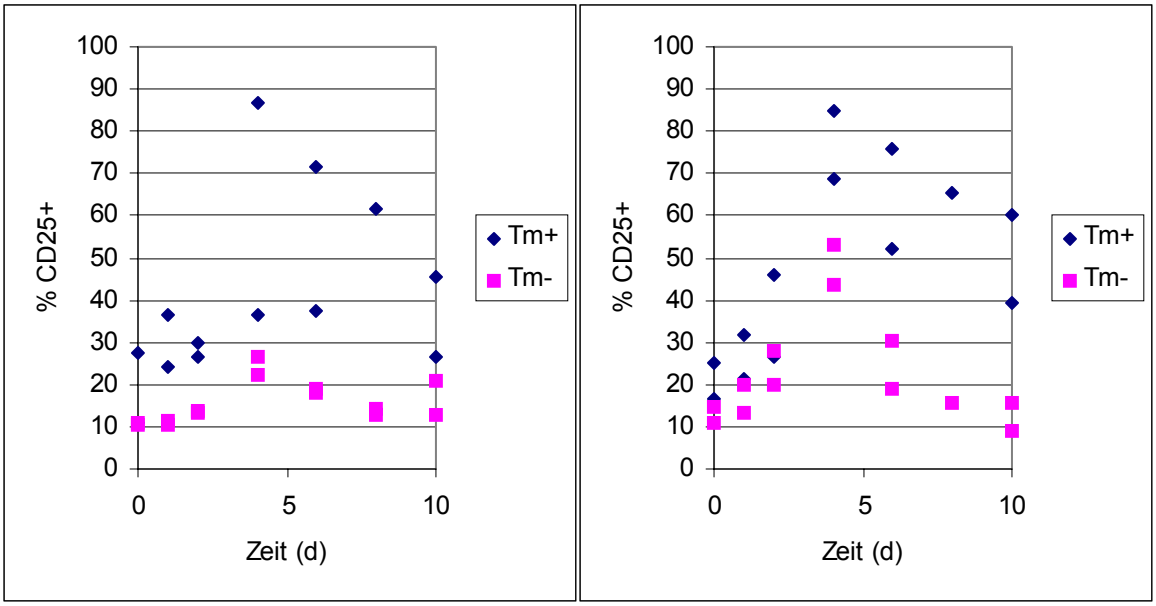


Fig. 3.21.2. Expressionskinetik von CD25 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus den DLN von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Zusätzlich zu drei Experimenten, bei denen die Mäuse krank wurden, ist dieser Verlauf auch charakteristisch für zwei Experimente, bei denen die Mäuse nicht krank wurden.

3.21.3. CD43

Der Antikörper 1B11 erkennt eine Glykosylierung auf der schweren Isoform von CD43, die auch auf CD45 (Ly5) vorkommt. Sie tritt bei aktivierten T-Zellen auf und ist auch auf den spezifischen T-Zellen bei EAE-Induktion zu sehen. Das Maximum ist hier vor allem bei den

“naiven” Mäusen schwieriger festzulegen, dürfte aber in beiden Gruppen wie bei CD25 an Tag 4 liegen. Auch bei CD43 unterscheidet sich der Maximalanteil an positiven spezifischen Zellen nicht zwischen beiden Gruppen und liegt bei 65 %. Die unspezifischen Zellen weisen keine deutliche Expressionsveränderung auf und ihr Anteil bei den $CD43^+$ Zellen liegt nie über 25 % (Fig. 3.21.3).

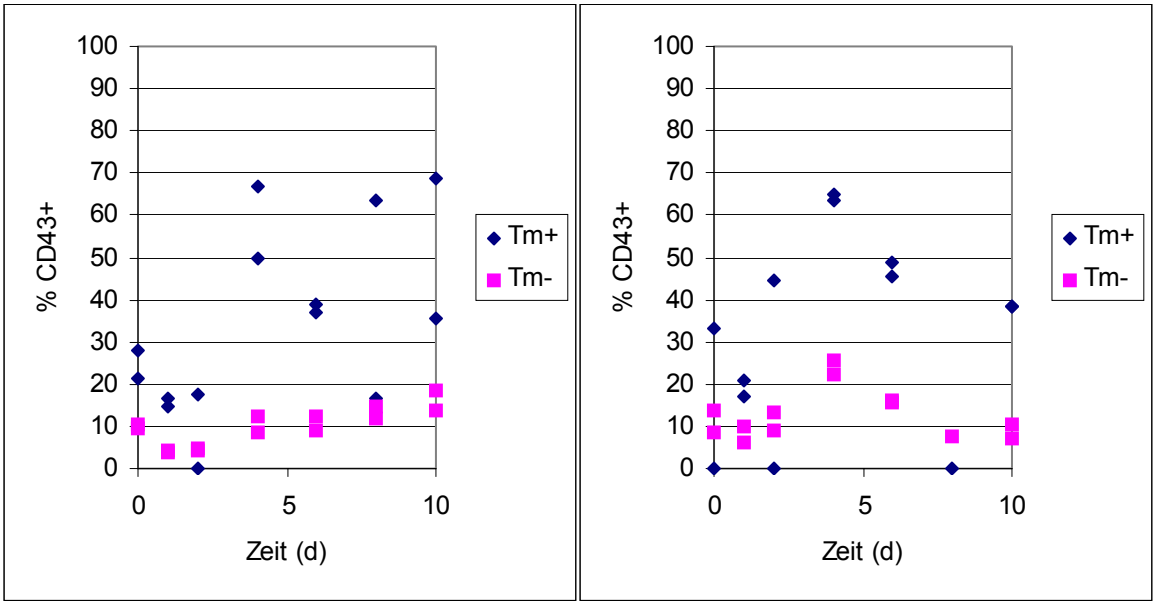


Fig. 3.21.3. Expressionskinetik von CD43 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus den DLN von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

3.21.4. CD44

CD44 ist ein Zelladhäsionsmolekül, das an viele extrazelluläre Matrixproteine, wie z.B. Fibronektin, Kollagen und Hyalorunat, bindet, aber auch Rezeptor für das T_H1-auslösende Zytokin Osteopontin (Eta-1) ist. Es wird auf allen aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen hoch exprimiert. Nach EAE-Induktion fällt vor allem die schnelle Expression auf vielen spezifischen Zellen aus “geprimten” Mäusen auf, die – wie in “naiven” Mäusen – ihr Maximum mit über 80 % an Tag 4 erreicht. Die unspezifischen Zellen weisen, bis auf einen Ausreißer an Tag 4 bei den “geprimten” Mäusen, kaum eine Modulation der Expression auf (Fig. 3.21.4.).

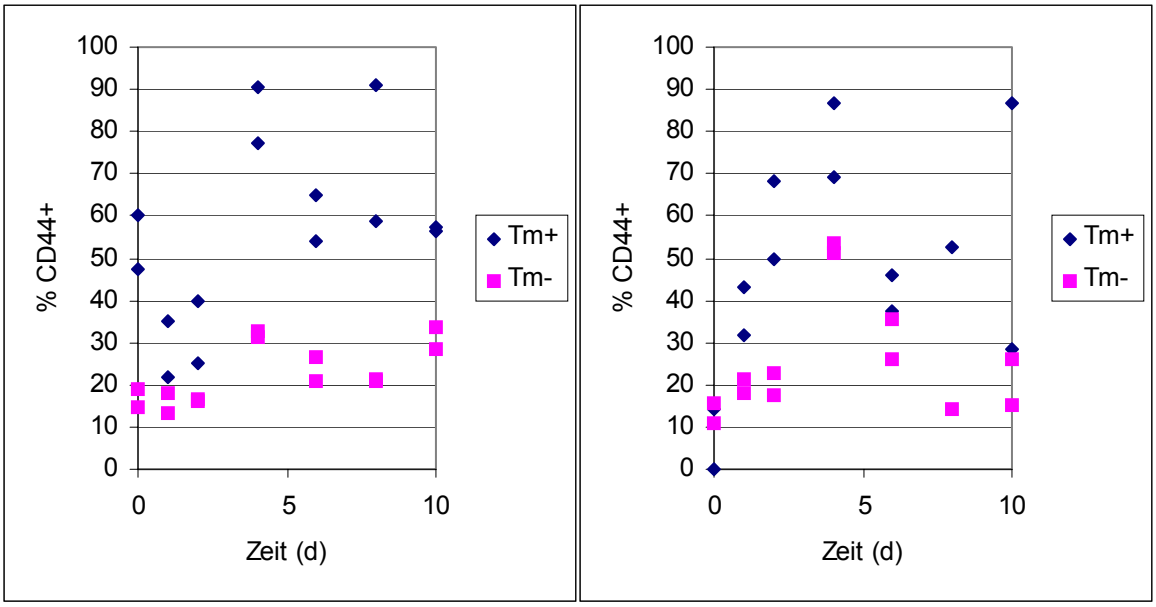


Fig. 3.21.4. Expressionskinetik von CD44 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus den DLN von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Zusätzlich zu drei Experimenten, bei denen die Mäuse krank wurden, ist dieser Verlauf auch charakteristisch für zwei Experimente, bei denen die Mäuse nicht krank wurden.

3.21.5. CD69

Der frühe Aktivierungsmarker CD69 wird, wie in 3.8. gezeigt, bereits innerhalb von wenigen Stunden nach Antigenkontakt von den spezifischen T-Zellen exprimiert. Besonders deutlich ist das hier auch bei den "geprimten" Mäusen zu erkennen, wo das Maximum mit bis zu 75 % $CD69^+$ Zellen bereits an Tag 1-2 erreicht wird. Der Maximalwert bei den spezifischen Zellen der "naiven" Mäuse liegt in einem ähnlichen Bereich, allerdings ist dieser bei ihnen erst an Tag 4 erreicht, was wiederum mit dem Maximum der relativen spezifischen Zellzahl in den DLN zusammenfällt. Auch bei CD69 ist kaum eine Änderung der Expression bei den unspezifischen T-Zellen zu erkennen (Fig. 3.21.5.).

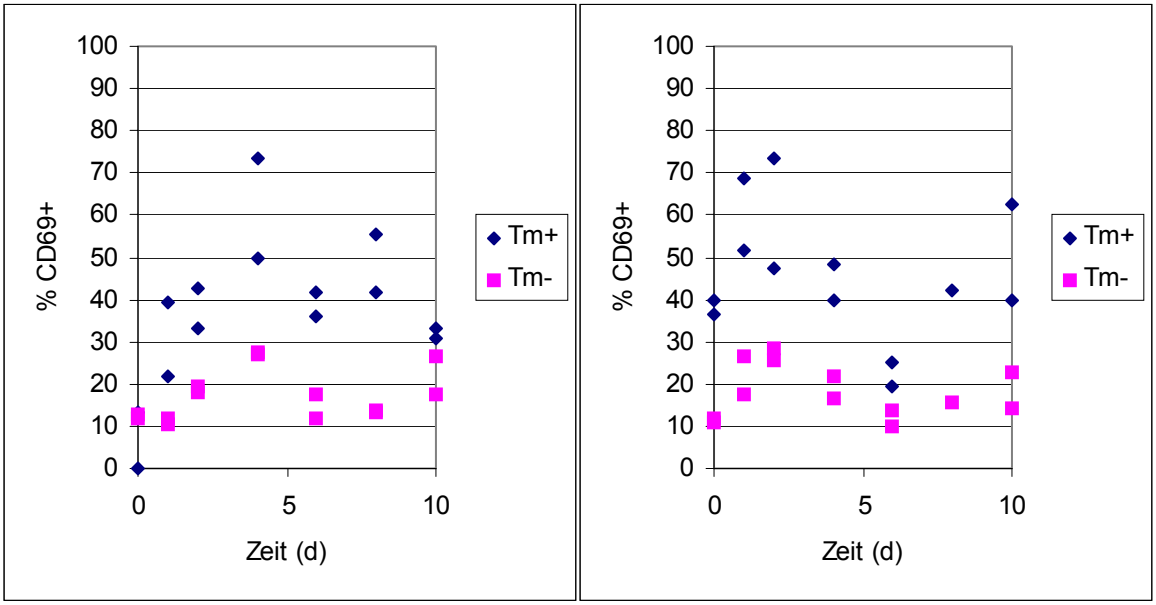


Fig. 3.21.5. Expressionskinetik von CD69 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus den DLN von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

3.22. Kinetik der Aktivierungsmarker in der Milz

Die ohne besonderen Trend verlaufenden spezifischen T-Zellzahlen in der Milz spiegeln sich auch in der Expression ihrer Oberflächenmarker wider. In der Milz sind danach kaum aktivierte Zellen zu finden.

3.22.1. CD11b

Bei CD11b ist zwar eine erhöhte Expression bei den spezifischen T-Zellen sichtbar, jedoch ist im Verlauf der Immunantwort weder bei den "naiven" noch bei den "geprimten" Mäusen eine Modulation erkennbar (Fig. 3.22.1.), die mit der in den DLN oder dem ZNS vergleichbar wäre.

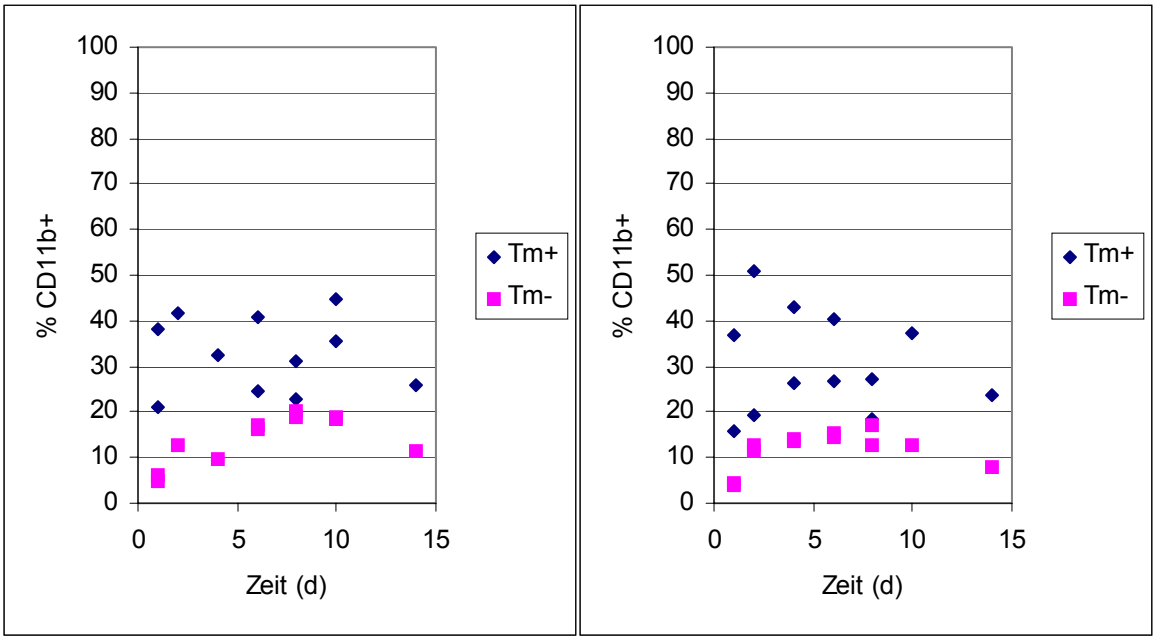


Fig. 3.22.1.: Expressionskinetik von CD69 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente, sowie für ein weiteres, bei dem die Mäuse nicht krank wurden.

3.22.2. CD25

Bei CD25 wird bei genauerem Hinsehen deutlich, daß es bei den "naiven" Mäusen eine Expressionssteigerung auf zirka 50 % bei den spezifischen Zellen innerhalb von 6 Tagen gibt, während die gleiche Steigerung bei den "geprimten" Mäusen bereits an Tag 2 vollzogen ist. Die unspezifischen T-Zellen sind davon nicht betroffen (Fig. 3.22.2.).

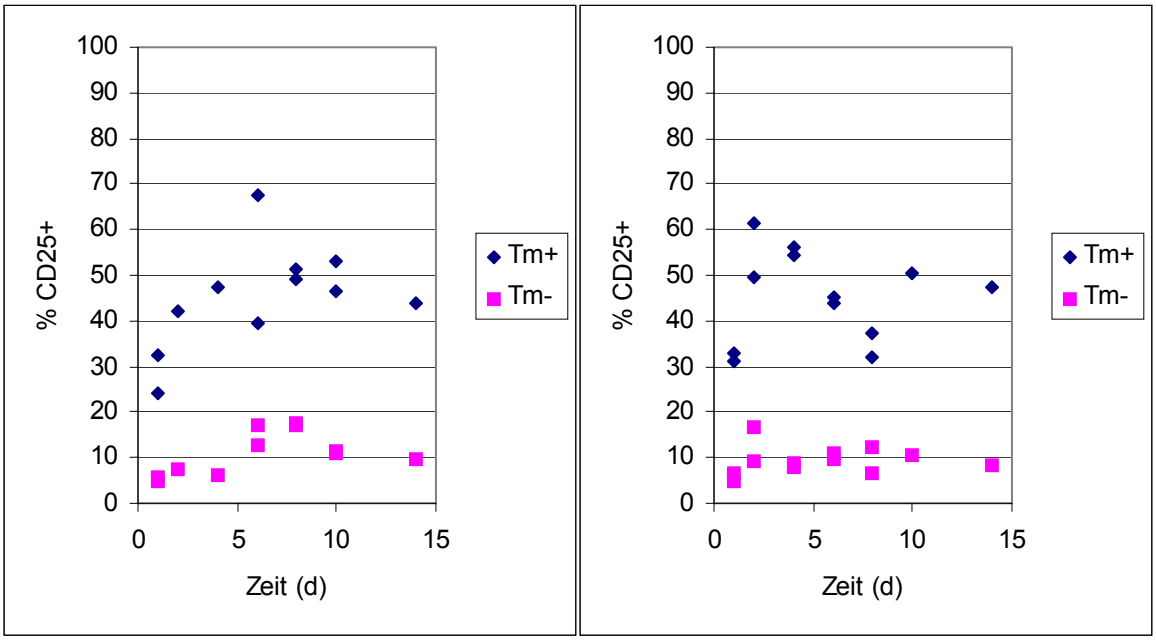


Fig. 3.22.2.: Expressionskinetik von CD25 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente, sowie für zwei weitere, bei denen die Mäuse nicht krank wurden.

3.22.3. CD43

Der Verlauf der $CD43^+$ T-Zellen weist für beide Gruppen sowohl bei den spezifischen als auch bei den unspezifischen Zellen einen Anstieg bis an Tag 8-10 auf, der aber mit keiner Phase der Krankheit korreliert werden kann. Dabei haben immer mehr spezifische als unspezifische Zellen CD43 exprimiert (Fig. 3.22.3.).

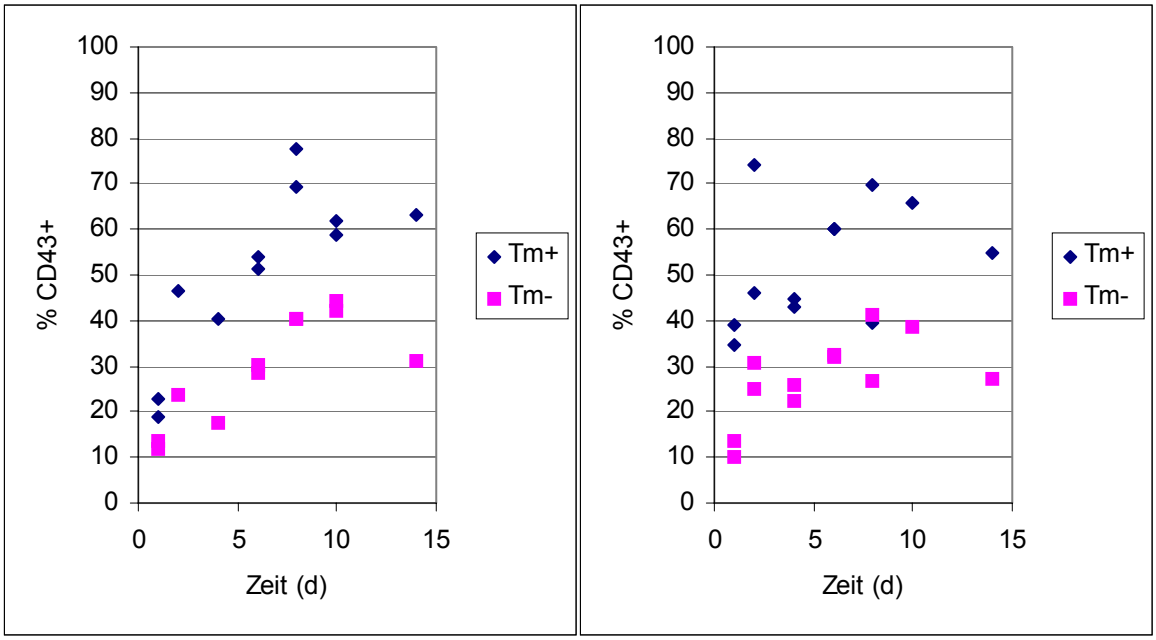


Fig. 3.22.3.: Expressionskinetik von CD43 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente.

3.22.4. CD44

CD44 wird in beiden Gruppen zu allen Zeitpunkten von fast allen spezifischen Zellen exprimiert. Bei den unspezifischen Zellen steigt die Expressionshäufigkeit im Laufe der Krankheit an (Fig. 3.22.4.).

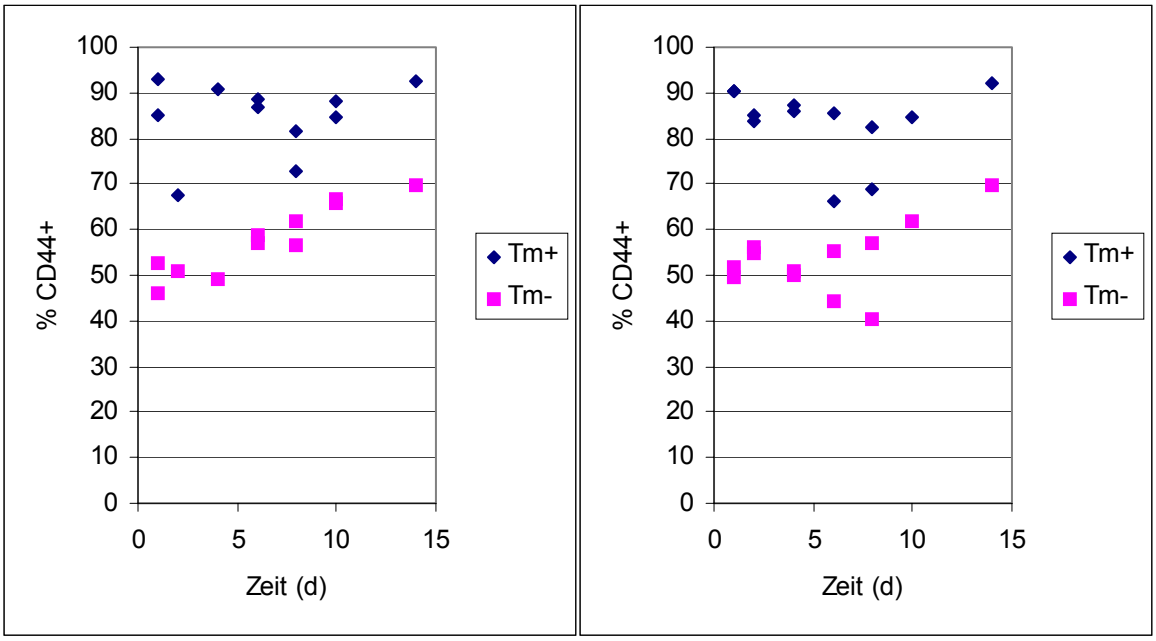


Fig. 3.22.4.: Expressionskinetik von CD44 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente, sowie für zwei, bei denen die Mäuse nicht krank wurden.

3.22.5. CD69

Der Anteil an CD69 exprimierenden Zellen in der Milz ist – verglichen mit den beiden anderen Organen – relativ gering und steigt in beiden Gruppen bei den spezifischen Zellen auch nur leicht an. Die unspezifischen Zellen verändern die Expression von CD69 hingegen kaum (Fig. 3.22.5.).

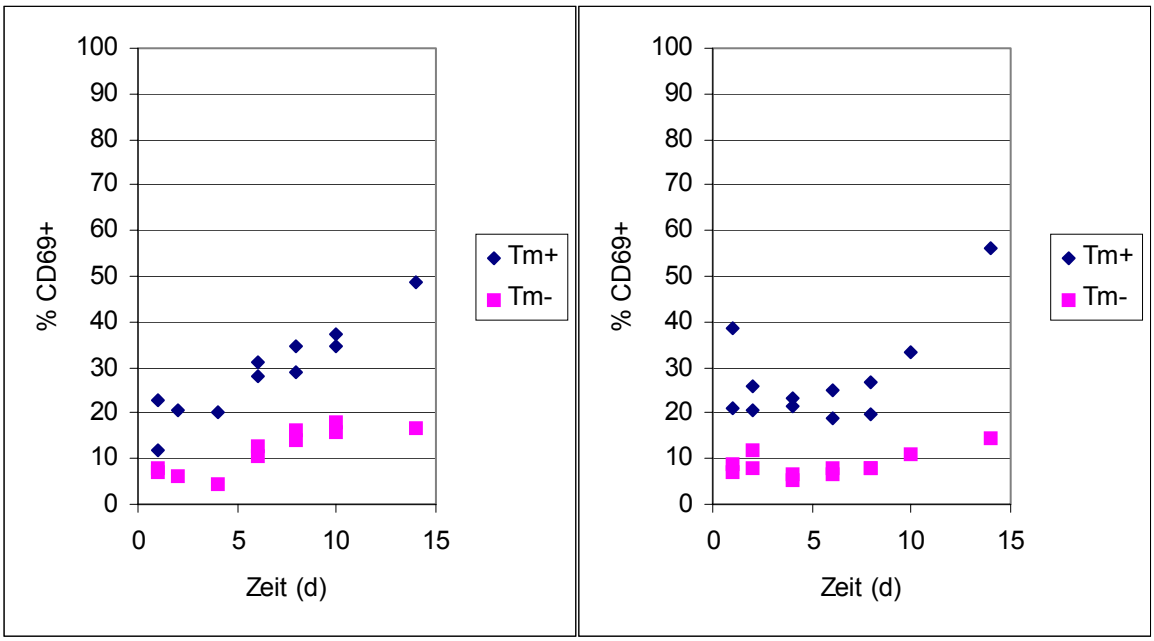


Fig. 3.22.5.: Expressionskinetik von CD69 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus der Milz von „naiven" (links) und „geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für zwei durchgeführte Experimente, sowie für zwei weitere Experimente, bei denen die Mäuse nicht krank wurden.

3.23. Kinetik der Aktivierungsmarker im ZNS

Wenn im ZNS spezifische Zellen gefunden werden, d.h. bei „naiven" Mäusen parallel zum Auftreten von Symptomen bzw. bei „geprimten" Mäusen von Beginn an, dann sind sie auch aktiviert. Verglichen mit Zellen aus den anderen Organen zeigt ein höherer Teil der unspezifischen Zellen ebenfalls Aktivierungsmarker.

3.23.1. CD11b

Die Expression von CD11b im ZNS ist sehr uneinheitlich. Dabei ist es unwesentlich, welcher Gruppe die Mäuse angehören und ob es sich um spezifische oder unspezifische T-Zellen handelt. Zweimal wurde ein Abfallen des Anteils an $CD11b^+$ Zellen nach anfänglich mehrheitlicher Expression von CD11b bei beiden Gruppen beobachtet, einmal genau das umgekehrte. Daher sind keine Daten gezeigt.

3.23.2. CD25

Praktisch alle spezifischen T-Zellen im ZNS tragen CD25 auf ihrer Oberfläche. Von den unspezifischen T-Zellen sind dies mit zirka 50 % auch mehr als in den anderen Organen.

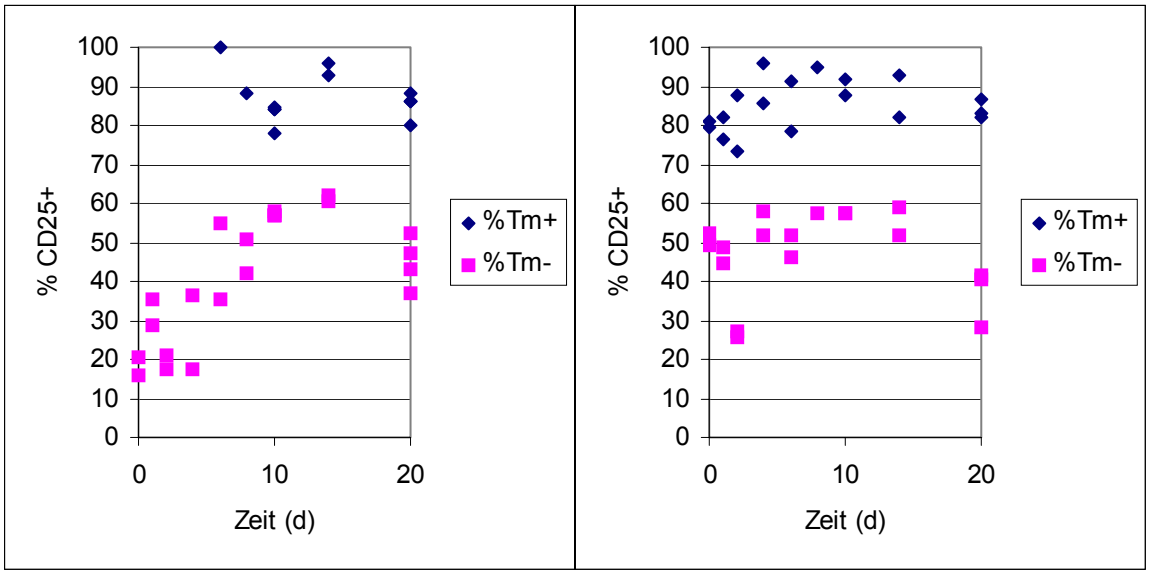


Fig. 3.23.2.: Expressionskinetik von CD25 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus dem ZNS von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

3.23.3. CD43

Ebenso tragen fast alle spezifischen T-Zellen im ZNS CD43 auf ihrer Oberfläche. Dabei scheint aber der Anteil der $CD43^+$ Zellen mit der Zeit kleiner zu werden. Von den unspezifischen T-Zellen haben ungefähr 50 % CD43 exprimiert, abgesehen von einer Induktionsphase bei den „naiven“ Mäusen (Fig. 3.23.3.).

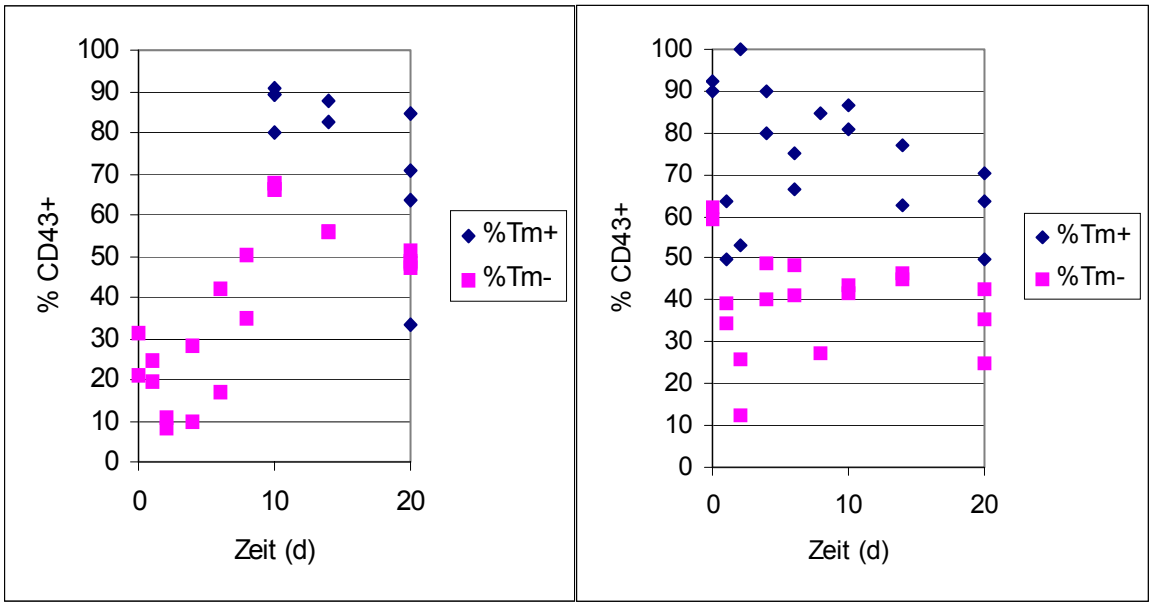


Fig. 3.23.3.: Expressionskinetik von CD43 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus dem ZNS von "naiven" (links) und "geprimten" (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

3.23.4. CD44

CD44 ist im ZNS auf fast allen T-Zellen zu finden. Lediglich am Anfang gibt es bei den „naiven" Mäusen mehrheitlich unspezifische T-Zellen, die kein CD44 auf ihrer Oberfläche tragen (Fig. 3.23.4.).

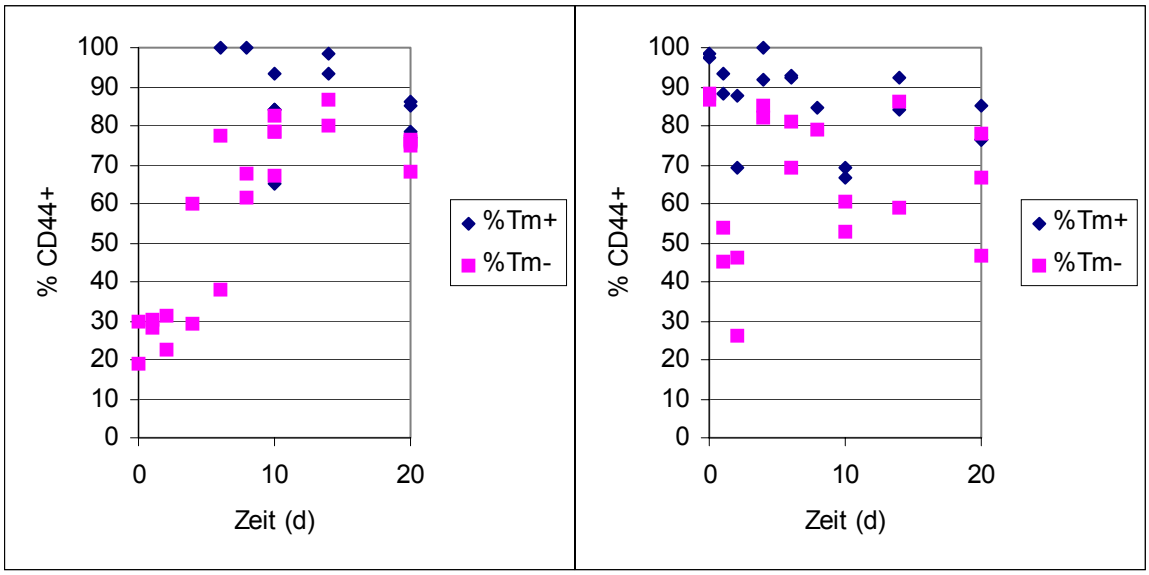


Fig. 3.23.4.: Expressionskinetik von CD44 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus dem ZNS von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

3.23.5. CD69

Wie CD44 ist CD69 im ZNS auf fast allen T-Zellen zu finden. Lediglich am Anfang gibt es ebenfalls bei den „naiven“ Mäusen unspezifische T-Zellen, die kein CD69 auf ihrer Oberfläche tragen (Fig. 3.23.5.).

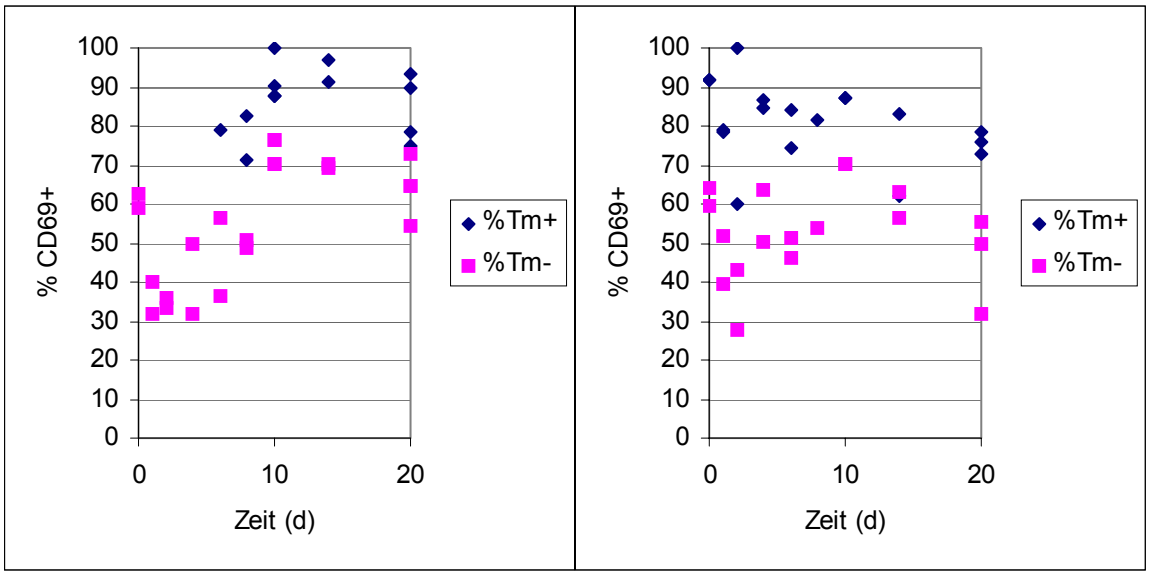


Fig. 3.23.5.: Expressionskinetik von CD69 auf spezifischen und unspezifischen lebenden $CD4^+$ T-Zellen aus dem ZNS von “naiven” (links) und “geprimten” (rechts) Mäusen nach EAE-Induktion an Tag 0. Dieser Verlauf ist repräsentativ für drei durchgeführte Experimente.

3.24. Zusammenfassung der Kinetik der Aktivierungsmarker

Um einen Überblick über die gemessenen Kinetiken zu behalten sind deren Eckpunkte noch einmal getrennt für DLN und ZNS in tabellarischer Form aufgeführt (Tabelle 3.24.1. und Tabelle 3.24.2.).

Marker	Maximum bei der Erstantwort Tag (Anteil an Tm^+ Zellen)	Maximum bei der Zweitantwort Tag (Anteil an Tm^+ Zellen)
CD11b	5-6 (30-40 %)	1-3 (30-40 %)
CD25	5-7 (60-80 %)	4 (50-80 %)
CD43	6-8 (60-90 %)	4-5 (60-90 %)
CD44	6-8 (80-90 %)	4-6 (90-100 %)
CD69	5-8 (60-70 %)	1-2 (40-70 %)

Tabelle 3.24.1.: Aktivierungsmarker der lebenden $CD4^+$ $PLP3^+$ Zellen in den DLN.

Marker	Maximum bei der Erstantwort Tag (Anteil an Tm^+ Zellen)	Maximum bei der Zweitantwort Tag (Anteil an Tm^+ Zellen)
CD25	immer über 70 %	immer über 70 %
CD43	immer über 70 %	immer über 60 %
CD44	immer über 80 %	immer über 70 %
CD69	immer über 70 %	immer über 70 %

Tabelle 3.24.2.: Aktivierungsmarker der lebenden $CD4^+$ $PLP3^+$ Zellen im ZNS.

4. Diskussion

4.1. Phänotyp und Funktionalität der St40- und St42-Zellen

Auch wenn transgene T-Zellen, wie die St40- und die St42-Zellen [130], keine normal entstandenen T-Zellen sind, so sind sie doch im Thymus gereift und haben dabei positive und negative Selektion überstanden. Um so überraschender ist es daher, daß sie dies schaffen, obwohl ihre TCR-Expression ungefähr 7-fach (St42) bzw. 30-fach (St40) unter der normalen Expressionshöhe liegt (Fig. 3.2.1. und Fig. 3.2.2.). Dadurch ist es bei den St40-Zellen auch nicht möglich, die TCR-Expression mit SGPSNTPPEI-H2-D^b-Tm, die ja schon durch ihre vier Bindungsstellen die Affinität des Peptid-MHC-Komplexes zum TCR erhöhen, im FACS zu detektieren, obwohl dies ja bei St42-Zellen möglich ist (Fig. 3.2.1.). Aufgrund dieser Daten könnte man annehmen, daß St40-Zellen extrem schlecht zu aktivieren sind, und vielleicht gar nicht zytolytisch wirken können. Doch im Zytotoxizitätstest nach fünf Tagen Peptidstimulation vermitteln sie sogar eine minimal bessere Effektorfunktion als die Milzzellen einer Adenovirus-immunisierten C57BL/6-Maus. Dazu unterscheiden sich die beiden Populationen in ihrer Zytotoxizität wenig von den St42-Zellen (Fig. 3.3.1.). Somit ist gezeigt, daß St40- und St42-Zellen trotz unterschiedlicher TCR-Expression die gleiche Funktionalität aufweisen.

Bei TCR-Ligation durch einen Peptid-MHC-Komplex auf einer Antigen präsentierenden Zelle, erfolgt eine Reorganisation der Membran: Viele kleine Lipid Rafts, cholesterin- und sphingolipidhaltige Mikrodomänen der Zellmembran, die vorher über die gesamte Oberfläche verteilt waren, lagern sich mit den assoziierten TCRs und Korezeptormolekülen zusammen, um, umschlossen von einem Ring aus Zelladhäsionsmolekülen, die immunologische Synapse zu formen [39], die für die weitere Signaltransduktion ins Zellinnere verantwortlich ist. Da die Lipid Rafts zunächst nichts mit dem TCR zu tun haben, sollte man erwarten, daß es keinen Unterschied in der Häufigkeit auf der Zelloberfläche von St40-, St42- und C57BL/6-Zellen gibt. Da aber andererseits trotz geringerer TCR-Expression die Funktionalität der St40-, der St42- und der nach Immunisierung spezifischen C57BL/6-Zellen ähnlich ist, könnte dies auf eine umso höhere Expression von Lipid Rafts zurückzuführen sein desto weniger TCR vorhanden ist. Dadurch könnte das vermutlich schwächere Signal auf T-Zellen mit niedriger TCR-Expression effizienter ins Zellinnere weitergeleitet werden. Doch genau das umgekehrte ist der Fall: St40-Zellen enthalten weniger Lipid Rafts in ihrer Membran als St42-Zellen, und diese wiederum weniger als C57BL/6-Zellen (Fig. 3.4.1.). Eine Folgerung

aus dieser Beobachtung könnte in Analogie zu der Rechnung verlaufen, daß bereits ein spezifischer Peptid-MHC-Komplex ausreicht, um eine zytotoxische T-Zellreaktion auszulösen [41]. Dann wäre es nämlich genauso möglich, mit der Ligation von nur wenigen TCRs eine T-Zelle komplett zu aktivieren. Anderen Berechnungen zufolge kann ein einziger Peptid-MHC-Komplex aufgrund seiner geringen Affinität bis zu 200 TCRs seriell ligieren [42]. Umgekehrt könnte also ein TCR bei genügend hoher Konzentration an spezifischen Peptid-MHC-Komplexen so oft gebunden werden, daß dieses Signal-Dauerfeuer ausreicht, die T-Zelle zu aktivieren. Dann sollte ab einer bestimmten Konzentration an spezifischen Peptid-MHC-Komplexen ein Aktivierungsmaximum vorhanden sein, was aber nicht der Fall ist: Es gibt für beide, St40- und St42-Zellen, eine Optimalkonzentration an spezifischem Peptid in der T-Zellkultur, die bei 1 nM liegt und die nach fünf Tagen zu einer optimalen Zytotoxizität führt. Höhere und niedrigere Peptidkonzentrationen führen zu geringerer Zytotoxizität (Beobachtungen von K. Wiemann, Tübingen). Eventuell haben aber die mit noch höherer Peptidkonzentration stimulierten Zellen bereits AICD eingeleitet und hätten bereits nach drei bis vier Tagen maximale Zytotoxizität gezeigt. Unter Umständen kann der oben beschriebene Mechanismus zutreffen; er müßte aber durch die angesprochenen Experimente bestätigt werden.

Abschließend läßt sich sagen, daß sich trotz niedriger TCR- und Lipid Raft-Expression eine für die Induktion der Funktionalität ausreichend aktive immunologische Synapse bilden kann. Trotzdem gibt es Unterschiede zwischen den St40- und den St42-T-Zellen, wie z.B. die Verzögerungsphase bei der Zellteilung nach der Aktivierung, die nur bei den St40-T-Zellen auftritt (Fig. 3.5.1. und Fig. 3.5.2.): Nach drei Tagen Kultur mit Peptid haben sich die St42-Milzzellen bis zu vier Mal geteilt, während sich die stimulierten St40-Milzzellen noch nicht von den unstimulierten unterscheiden. Daher kann das Aktivierungssignal doch nicht vollständig gewesen sein, sondern es muß eine Komponente fehlen. Diese scheint aber im Laufe der Zeit überkompensiert zu werden, denn nach fünf Tagen haben sich die stimulierten T-Zellen beider Mäuse fast gleich oft, nach sechs Tagen schließlich gleich häufig geteilt. Man könnte aber auch vermuten, daß die Teilungsrate der St42-T-Zellen nach drei Tagen nachläßt, evtl. weil die Stimulatorzellen bereits alle getötet sind, und die St40-Zellen durch den andauernden Stimulus doch noch ihre Teilungshemmung überwinden können. Daher wäre es interessant zu sehen, ob auch die zytolytischen Eigenschaften bei beiden Zellen schon nach drei Tagen vorhanden sind, denn an sich sollte dies dann nur bei den geteilten Zellen, also den St42-Zellen, der Fall sein [23].

4.2. Peptidstimulation der St40- und St42-Milzzellen *in vitro*

Der fehlende Unterschied in der Zytotoxizität bei den *in vitro* stimulierten T-Zellen beider Stämme spiegelt sich in der spezifischen Peptidkonzentration zur Beladung der Stimulatorzellen wider, ab der die maximale Aktivierung erreicht ist. Sie liegt bei beiden Stämmen meist bei 1 nM: Nach drei Tagen erreichen damit die Blastenbildung, sowie die Anteile an $CD25^+$, $CD69^+$, $CD44^+$, $CD49d^+$ und $CD62L^-$ Zellen ihr Maximum, das – von CD49d mit 40 % abgesehen – immer über 80 % und sogar oft bei 100 % liegt. Lediglich die Anteile der $CD11b^+$ und $CD70^+$ Zellen erreichen erst jeweils bei 10 nM Peptid ihr Maximum (Fig. 3.6.1. und Fig. 3.7.1.). Überraschend dabei ist wiederum, daß es sich bei den St40-Zellen um eine Optimalkonzentration handelt, d.h. bei höheren Peptidkonzentrationen zeigen weniger spezifische Zellen Aktivierungs- und Wanderungsmarker, was aber genau zur Beobachtung mit der Optimalkonzentration für die Erlangung der Funktionalität passt. Da aber auch dieses Experiment eine Momentaufnahme nach drei Tagen ist, kann die beobachtete Optimalkonzentration auch darauf hindeuten, daß die mit höheren Peptidkonzentrationen stimulierten Zellen bereits wieder dabei sind, ihre Oberflächenmarkerexpression zu verringern. Gleiches könnte auch für CD11b und CD70 gelten, oder genau das umgekehrte, nämlich, daß beide langsamer hochreguliert werden als die anderen untersuchten Moleküle.
Trotzdem ist auch hier kein Hinweis darauf zu finden, warum sich die St40-T-Zellen langsamer teilen als die St42-T-Zellen. Eine Aussage darüber könnte die Kinetik der Modulation der Oberflächenmarker bringen, die am Beispiel von CD69 und CD25 bei St42-T-Zellen sehr schön illustriert ist (Fig. 3.8.1.). Gezeigt sind hier alle, über die Größe und Granularität definierten, lebenden Lymphozyten, egal ob schon im Blastenstadium oder nicht. Man kann gut erkennen, daß zunächst CD69 innerhalb von zwei Stunden und dann erst CD25 hochreguliert wird. Diese Aussage ist wichtig, denn wenn man nur einen Marker verfolgen würde, könnte man nicht ausschließen, daß es zwei Populationen gibt, von denen die eine zuerst CD69, die andere zuerst CD25 exprimiert. Als Beispiel hierfür kann Fig. 3.8.2. dienen, wo bei den Einzelbetrachtungen (links) deutlich wird, daß CD69 auf vielen Zellen beider Stämme schnell induziert wird, und zwar sogar auf mehr St42- als St40-Zellen. Gleiches gilt für CD25 ab sechs Stunden. Daraus sollte man folgern, daß die Aktivierung bei den St40-Zellen schlechter verläuft, als bei den St42-Zellen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Bei Betrachtung der $CD69^+$ Zellen stellt man nämlich fest, daß CD25 auf dem gleichen Prozentsatz dieser Zellen bei beiden Stämmen exprimiert wird, d.h. wenn die Zellen aktiviert sind, dann durchlaufen sie die gleiche Kinetik der CD25-Induktion.

Ideal wäre somit, alle Marker gleichzeitig zu färben, denn dann könnte man genau die Abfolge der Hochregulation bei der Aktivierung verfolgen, wenn man diese dann sehr komplexen Daten in den Griff bekommen kann. Leider stehen für die Beobachtung nur vier Fluoreszenzparameter zur Verfügung, von denen zwei benötigt werden, um die Stimulatorzellen (Thy1.1) von den Effektorzellen (Thy1.2) zu unterscheiden, sowie diese eindeutig als $CD8^+$ T-Zellen festzulegen. Damit bleiben nur zwei Parameter für die Aktivierungsmarker übrig. Mit dieser Limitation sind die erlangten Ergebnisse zu diskutieren. Weiterhin ist es wichtig, sich zu vergegenwärtigen, daß es sich bei den Datenpunkten um den Anteil der Zellen handelt, die positiv oder negativ für einen Parameter sind. Es wäre somit falsch zu behaupten, CD69 würde schneller exprimiert als CD25, sondern es muß heißen, CD69 wird auf den meisten Zellen früher exprimiert als CD25. Man kann damit auch keine „langsame“ Hochregulation eines Oberflächenmarkers sichtbar machen, sondern nur, daß er auf immer mehr Zellen induziert wird. Eine Aussage über die Expressionshöhe liefert nur die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI), die aber auch schwierig zu beurteilen ist, denn sie kann den gleichen Wert annehmen, wenn wenige Zellen einen Marker stark exprimieren, oder alle Zellen diesen recht schwach. Sie muß daher auf einmal als positiv oder negativ definierte Populationen angewendet werden.

Wenn man die Aktivierungskinetik über die ersten 24 Stunden verfolgt, so sieht man, daß bei optimaler Peptidkonzentration CD69 innerhalb von vier Stunden auf einem konstant bleibenden Teil der Zellen beider Stämme exprimiert ist, nämlich auf 80 % der St40- und auf 95 % der St42-Zellen. Der Anteil der $CD25^+$ Zellen ist in den ersten acht Stunden bei beiden Stämmen ebenfalls vergleichbar, allerdings bleibt dann der Anteil bei den St40-Zellen bei 20 %, während er bei den St42-Zellen auf über 80 % steigt (Fig. 3.9.1.). Aber nicht nur dort gibt es einen Unterschied, sondern auch bei den $CD25^+$ Zellen selbst: Die CD25-Expression nimmt bei den $CD69^+$St42-Zellen weiter zu, wohingegen sie bei den $CD69^+$St40-Zellen stagniert bis zurückgeht. Somit scheint der Grund für die verzögerte Zellteilung der St40-Zellen einerseits daran zu liegen, daß nicht alle Zellen aktiviert werden, und andererseits, daß die aktivierten Zellen nicht fähig sind, CD25 richtig hochzuregulieren. CD25 ist jedoch die IL-2Rα-Kette, die mit den niederaffinen ß- und γ-Ketten zusammen den hochaffinen Rezeptor für IL-2 bildet, das nach TCR-Ligation ausgeschüttet wird, und autokrin wirkend die Aktivierung verstärkt. Die dann bei den St40-Zellen doch noch auftretende Zellteilung ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, daß sich das von den $CD69^+$ Zellen evtl. noch in geringerem Ausmaß ausgeschüttete IL-2 im Medium anreichert, schließlich in so hoher Konzentration vorhanden ist, daß es auch über den niederaffinen IL-2R wirken kann, und so

Zellteilung und CD25-Hochregulation, die ja an Tag 3 zweifelsfrei vorhanden ist, auslösen kann.
Die weiteren Beobachtungen, wie z.B. die verlangsamte Blastenbildung und CD11b-Expression bei den St40-Zellen sind wahrscheinlich nur Folgeeffekte der wahrscheinlich nicht normal verlaufenden IL-2-Sekretion. Zur weiteren Klärung würde eine Kinetik des ins Medium sekretierten IL-2 beitragen, was am schnellsten durch einen entsprechenden ELISA zu bewerkstelligen wäre.

4.3. Zunahme der T-Zellzahlen mit dem Alter in St40/St42RAG2$^{-/-}$-Mäusen

Sowohl bei St40RAG2$^{-/-}$- als auch bei St42RAG2$^{-/-}$-Mäusen nehmen die Zahlen der spezifischen T-Zellen im Blut mit dem Alter zu. Dafür kann es im wesentlichen zwei Gründe geben: Entweder verlassen ständig neue T-Zellen den Thymus, wobei die sich in der Peripherie befindlichen T-Zellen nicht sterben, oder die peripheren T-Zellen teilen sich homöostatisch [86] [87], um den immunologischen „Platz“ zu füllen. Auch eine Kombination beider Gründe wäre denkbar. Der wahrscheinlich richtige Ansatz zur Erklärung dieser Tatsache wäre folgender Versuch: Milzzellen einer St42RAG2$^{-/-}$-Maus werden mit CFSE markiert und in eine weitere St42RAG2$^{-/-}$-Maus adoptiv transferiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten könnte man einerseits aus Blutproben sehen, ob sich die Spenderzellen geteilt hätten, und andererseits am Verhältnis zwischen Spender- und Empfänger-St42-Zellen unter Berücksichtigung eventueller Teilungen der Spenderzellen feststellen, ob weitere Zellen aus dem Thymus gekommen sind. Den adoptiven Transfer sollte man in unterschiedlich alte Empfängermäuse durchführen, um auch gleich noch einen Alterseffekt ableiten zu können.

4.4. Altersabhängigkeit der TCR-Expression bei St42-Mäusen

Die mittlere TCR-Expression auf den St42-Zellen der St42RAG2$^{-/-}$-Mäuse nimmt mit zunehmendem Alter ab, d.h. sie halbiert sich praktisch bei 34 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu 8 Wochen alten Tieren (Fig. 3.10.1.). Bei genauerer Betrachtung nimmt aber nicht die TCR-Expression aller transgenen T-Zellen ab, sondern nur ein Teil reguliert den TCR herunter. Dadurch verbreitert sich die Fluoreszenz im den TCR detektierenden Kanal,

denn es sind noch viele T-Zellen vorhanden, die die ursprüngliche TCR-Expressionshöhe aufweisen.

Da dies keine Beobachtung aus einer normal immunkompetenten Maus ist, sondern aus einem sehr artifiziellen System, nämlich einem lymphopenischen Organismus, kann es mehrere Gründe für die verringerte TCR-Expression geben: Es kann möglicherweise daran liegen, daß die alternden naiven T-Zellen nicht nach ihrer üblichen Lebensdauer absterben, sondern weiter überleben und dabei langsam die TCR-Expression verlieren. Ein zusätzlicher Grund könnte die in 4.3. angesprochene homöostatische Teilungsaktivität der T-Zellen sein, die so hoch liegen könnte, daß eben durch Alterungseffekte die TCR-Expression zurückgeht. Weiterhin kann es auch eine den sowieso weniger als normal TCR exprimierenden T-Zellen innewohnende Eigenart sein, die bei steigendem Alter noch weniger TCR exprimieren, weil sie während ihres Lebens zwar genug Signale zum Überleben [62] [63] [64], aber zu wenig Signale zur Aufrechterhaltung der TCR-Expression bekommen haben. Schließlich kann es auch am Thymus liegen, der im Alter wenig TCR exprimierende T-Zellen entlassen könnte, die in einem immunkompetenten Organismus jedoch nicht auffielen, da es viel zu wenige wären, aber hier eben doch einen beträchtlichen Anteil der T-Zellen stellen könnten. Eventuell können zumindest einige Möglichkeiten durch das in 4.3. vorgeschlagene Experiment ausgeschlossen werden.

4.5. Immunantwort der St40- und St42-Zellen nach adoptivem Transfer

Vor diesem Teil der Diskussion ist wissenswert, daß bei allen Versuchen die Zahl der St40RAG2$^{-/-}$-Mäuse limitierend war. Dieser Stamm züchtet schlecht, die weiblichen Mäuse werfen oft nur einmal und sterben früh. Weiterhin ist ihre geringe transgene T-Zellzahl ein Problem: Oft bekommt man aus der Milz einer St40RAG$^{-/-}$-Maus nur 2 x 10^6 Zellen (C57BL/6: 80 x 10^6), von denen aber nicht alle T-Zellen sind. Auch der Versuch St40-Mäuse homozygot zu züchten scheiterte: Von zwölf TCR-transgenen Nachkommen aus St40-Zuchten, in denen beide Eltern TCR-transgen waren, gab es nach Rückkreuzung mit Wildtyp-Mäusen keinen Wurf, in dem keine Wildtyp-Maus dabei war, was bedeutet, daß alle zwölf getesteten Mäuse heterozygot für das TCR-Transgen waren (Daten nicht gezeigt). Nach Mendel hätten vier der zwölf Mäuse homozygot sein müssen. Dies und die weiteren oben geschilderten Probleme weisen darauf hin, daß beim St40-Stamm das TCR-Transgen in ein

essentielles Gen integriert hat, wodurch die Vergleichbarkeit der T-Zellen aus St40RAG2$^{-/-}$- und St42RAG2$^{-/-}$-Mäusen nicht unbedingt gegeben ist.

Um gleiche Zahlen an St40RAG2$^{-/-}$- und St42RAG2$^{-/-}$-Zellen zu transferieren, reicht es nicht aus, die Zellen vor dem Transfer zu zählen, sondern sie müßten zusätzlich mit Ak gefärbt und im FACS analysiert werden, um den Anteil an CD8^{+} T-Zellen zu ermitteln. Diese Prozeduren würden zusammengenommen mindestens zwei Stunden dauern, in denen die zu transferierenden Zellen bei 4 °C lagern müßten, was sich aber beim Optimieren des Systems fatal auf deren Viabilität ausgewirkt hat (Daten nicht gezeigt). Daher wurde auf diese Analyse verzichtet, die Zellen meist sogar ohne Erythrozytenlyse transferiert und erst hinterher die Anzahl der transferierten spezifischen T-Zellen bestimmt.

Sowohl adoptiv transferierte T-Zellen aus St40RAG2$^{-/-}$- als auch aus St42RAG2$^{-/-}$-Mäusen expandieren nach Infektion mit Adenovirus im Empfänger (Fig. 3.12.1. und Fig. 3.12.2.). Die Expansion ist allerdings bei St40RAG2$^{-/-}$-Zellen bereits nach vier Tagen abgeschlossen, während der Zenit der Expansion bei St42RAG2$^{-/-}$-Zellen meistens um Tag 10 bis Tag 15 liegt. Dabei kommt es nicht darauf an, wieviele T-Zellen adoptiv transferiert werden, denn diese Kinetik ist bei St40RAG2$^{-/-}$-Zellen bei einem Anteil an CD8^{+} Zellen des Empfängers von 0,1 bis 1 % zu sehen, sowie bei St42RAG2$^{-/-}$-Zellen bei einem Anteil zwischen 0,1 und 4 %. Bei den St42RAG2$^{-/-}$-Zellen scheint es plausibel, daß sie die Immunantwort gegen das Adenovirus übernommen haben, denn die lange Expansionsphase, die schließlich in einen starken Rückgang der Zellzahl mündet, ist typisch für eine antivirale Immunantwort. Bei den St40RAG2$^{-/-}$-Zellen fehlt diese übliche Kinetik. Die extrem kurze Expansionsphase mit genauso schnellem Verschwinden der Zellen aus dem Empfänger deutet eher darauf hin, daß die Zellen durch AICD eliminiert werden, da sie schließlich auch in keinem peripheren Organ mehr gefunden werden können. Andererseits besteht kein Grund die ja bereits aktivierten, weil expandierenden, St40-T-Zellen durch AICD zu eliminieren, auch wenn erst kürzlich aktivierte T-Zellen besonders empfindlich gegen Apoptosesignale sind. Und vielleicht reicht ja auch die gehemmte Signalkaskade des IL-2 aus, um die T-Zellen apoptotisch werden zu lassen. Daher wäre es interessant, die zwischen Tag 4 und Tag 8 zu findenden Zellen auf Apoptose oder eventuell fehlende Aktivierungsmarker zu untersuchen, wenn dies auch aufgrund der geringen Zellzahl schwierig sein dürfte.

4.6. Avidität und T-Zellgedächtnis

Nach den Ergebnissen aus den Experimenten, in denen die St40RAG2$^{-/-}$- und die St42RAG2$^{-/-}$-Zellen getrennt adoptiv transferiert wurden, ist es auch nicht verwunderlich, daß sich die Kinetik der jeweiligen Zellen bei Kotransfer auch nicht anders verhält (Fig. 3.13.1.). Es war trotzdem wichtig, dieses Experiment durchzuführen, da sich die Zellen ja evtl. gegenseitig hätten beeinflussen können. Allerdings haben die durchgeführten Kotransfers den Makel, daß nicht gleich viele spezifische T-Zellen beider Stämme transferiert wurden. In zukünftigen Versuchen, bei denen gleiche Zahlen von St40RAG2$^{-/-}$- und St42RAG2$^{-/-}$-Zellen transferiert werden sollen, könnte man zuerst Blut von den Spendertieren nehmen, daraus den Anteil der spezifischen T-Zellen bestimmen, nach der Präparation der zu transferierenden Zellen diese zählen und dann versuchen, gleich viele T-Zellen adoptiv zu transferieren.
Somit kann vorläufig nur die Aussage bezüglich Avidität und T-Zellgedächtnis gemacht werden, daß nur vollständig aktivierte T-Zellen zu Effektorzellen werden können, von denen wiederum manche über viele Wochen stabil in der Empfängermaus detektierbar sind. Aufgrund ihrer zu niedrigen Avidität nicht vollständig aktivierte T-Zellen werden nicht zu Effektorzellen, können schon bald nach der Immunisierung nicht mehr gefunden werden und somit auch kein T-Zellgedächtnis bilden. Damit sollte man meinen, daß nur hochavide T-Zellen zu Gedächtnis-T-Zellen werden. Diese Frage kann jedoch noch nicht abschließend geklärt werden, da beide hier verwendeten T-Zellen eine niedrigere Avidität aufweisen als endogene T-Zellen. Anstrengungen, Mäuse mit höher exprimiertem Vα16Vß1-TCR zu generieren, waren bisher leider nicht von Erfolg gekrönt, obwohl aus den Bemühungen von Dr. Vintersten, Heidelberg, fünf transgene Gründertiere hervorgegangen sind, die aber alle keine höhere TCR-Expression als die St42-T-Zellen aufwiesen, abgesehen von einer weiteren Maus mit normalem TCR Expressionsniveau, die aber leider aus einer fälschlicherweise verwendeten, MHC-unpassenden Eizelle hervorging und so nicht für adoptiven Transfer verwendet werden konnte.

4.7. Nachzügler

Vor der Adenovirus-Infektion adoptiv transferierte St42-T-Zellen übernehmen sowohl die initiale Immunantwort gegen das Virus als auch nach abgeklungener Infektion eine Zweitantwort. Hingegen ist dies nicht der Fall bei später transferierten St42-T-Zellen, die aber

so früh (nach zwei und sieben Tagen) injiziert wurden, daß sie auf jeden Fall noch Antigen hätten sehen können. Sie sind weder an der Erst- noch an der Zweitantwort beteiligt. Sicherlich besteht noch die Möglichkeit, daß ein Teil der früh transferierten Zellen das Antigen erst spät in der Immunantwort gesehen hat, aber dann müßten nach der Nachzügler-Hypothese trotzdem sowohl früh als auch spät transferierte Zellen die Zweitantwort übernehmen. Sie ist jedoch von den früh transferierten Zellen dominiert. Daher ist die Nachzüglerhypothese [101] [102] widerlegt. Der Mechanismus der Gedächtnisbildung bei T-Zellen muß ein anderer sein.

Aus den vorliegenden Ergebnissen läßt sich schließen, daß eine höhere T-Zellavidität ein entscheidender Selektionsvorteil für die Aktivierung und das Überleben von T-Zellen ist, sowie erst ausreichend intensiver und genügend langer Kontakt mit Antigen zur Bildung von funktionellem T-Zellgedächtnis führt.

4.8. Krankheitsverlauf bei EAE-Induktion in „naiven“ und „geprimten“ Mäusen

Das von Dr. Felix Bischof in Amsterdam etablierte MS-Modell konnte hier nach entsprechender Anpassung ebenfalls erfolgreich eingeführt werden.
Die wesentliche Differenz zwischen „naiven“ und „geprimten“ Mäusen ist der Unterschied von zwei bis drei Tagen beim Krankheitsausbruch. Allerdings war dies zu erwarten, denn es ist bekannt, daß eine Zweitantwort schneller verläuft als eine Erstantwort. Warum aber die Symptome bei der Zweitantwort länger anhalten ist nicht offensichtlich, denn schließlich handelt es sich beim Ziel der spezifischen T-Zellen nicht um ein sich vermehrendes Pathogen, sondern um ein Autoantigen, das nur in einer bestimmten Menge vorhanden ist. Eventuell sind jedoch die bereits vorliegenden Gedächtnis-T-Zellen schwieriger unter Kontrolle zu bekommen oder die Zellen, die für die Induktion der regulatorischen Antwort verantwortlich sind, bilden kein Gedächtnis aus, wodurch sich die Symptome zum gleichen Zeitpunkt nach der EAE-Induktion bessern.

4.9. Kinetik der spezifischen T-Zellen in DLN, Milz und ZNS

Mit dem PLP3-H2-A^s-Tm steht nun zum ersten Mal ein Werkzeug zur Verfügung, mit dem T-Zellen, die eine Autoimmunreaktion auslösen, *ex vivo* dargestellt werden können (Fig. 3.16.1.). Dadurch ist es zunächst möglich in den DLN die Kinetik dieser Zellen zu verfolgen. Die spezifischen T-Zellen expandieren nach EAE-Induktion und die relativen T-Zellzahlen erreichen knapp vor den absoluten T-Zellzahlen ihr Maximum (Fig. 3.17.1. und Fig. 3.18.1.), bevor es wieder weniger werden, die Gesamtzellzahl in den DLN jedoch weiter sehr hoch bleibt. Dabei liegen die jeweiligen Maxima der absoluten bzw. relativen T-Zellzahlen bei der Zweitantwort zwei Tage vor denen der Erstantwort (z.B. Zweitantwort Tag 6 bzw. 4, Erstantwort Tag 8 bzw. 6). Der Grund für diese Kinetik könnte ein beginnendes Auswandern der spezifischen Effektor-T-Zellen sein, während sich noch weitere spezifische T-Zellen teilen. Zeitgleich strebt die – durch eine im CFA vorhandene Vielzahl von Antigenen ausgelöste – Immunantwort erst einem späteren Maximum zu, wodurch sich die weiter steigende Absolutzahl bei sinkendem Anteil spezifischer T-Zellen erklären läßt.

Wenn sich dann deutlich ein Rückgang der spezifischen T-Zellen in den DLN einstellt, könnte man vermuten, daß diese Zellen zunächst im Blut und damit in der Milz wiederzufinden sind. Jedoch lassen sich die dort gefundenen Anteile spezifischer T-Zellen nicht zuverlässig mit dieser Idee korrelieren.

Bei der Erstantwort findet man zu dem Zeitpunkt, an dem die spezifischen T-Zellen die DLN verlassen, aber einen Anstieg der Gesamt-T-Zellzahl, wie auch der spezifischen T-Zellzahl, im ZNS. Dabei bleibt der Anteil der spezifischen-T-Zellen zumindest im Mittel über die drei Experimente unverändert. Gleiches gilt für die Zweitantwort, allerdings mit dem Unterschied, daß hier bereits vor EAE-Induktion viele T-Zellen im ZNS vorhanden sind, die jedoch keine Symptome verursachen. Die Krankheit bricht erst aus, wenn spezifische T-Zellen aus den DLN auswandern und ins ZNS einwandern. Dann befinden sich z.T. bis zu über eine Million $CD4^+$ T-Zellen im ZNS, von denen aber nur 5000 spezifisch für das PLP3-Antigen sind. Mindestens 100.000 bis 200.000 weitere spezifische T-Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt immer noch in der Milz (Daten nicht gezeigt) und sind nicht direkt an der Zerstörung der Myelinscheide beteiligt. Daß nur 5000 spezifische T-Zellen ausreichen, um solche schweren Symptome bis hin zum Tod auszulösen, ist schon sehr bemerkenswert und steht in krassem Gegensatz zu der Beobachtung von Flügel und Kollegen [117], die über 90 % der spezifischen T-Zellen im ZNS finden. Hier sind nur ungefähr 2-4 % im ZNS zu finden, eine Zahl, die auch von anderen als realistisch eingestuft wird [118].

Da aber so wenige spezifische T-Zellen die Symptome auslösen können, stellt sich die Frage, was denn die anderen T-Zellen im ZNS machen. Warum bei Besserung der Symptome die T-Zellzahl im ZNS stabil bleibt ist unklar, ebenso wie die Frage, warum sich dort schon vor einer Zweitantwort viele T-Zellen aufhalten. Dazu kommt, daß sich durch Gabe von PTX keine Zweitantwort auslösen läßt, es aber trotzdem unerlässlich für die EAE-Induktion ist. Durch alleinige Gabe vermag es bei einer „geprimten" Maus die bereits im ZNS befindlichen Zellen nicht zu aktivieren, führt also zu keinen Symptomen (Daten nicht gezeigt). Man kann evtl. daraus ableiten, daß das PTX nicht die im ZNS befindlichen Zellen erreicht, sondern es seine Wirkung irgendwo außerhalb vollbringt. In der Literatur taucht immer wieder die Meinung auf, daß das PTX die Blut-Hirn-Schranke öffnet, sodaß T-Zellen ins ZNS gelangen können, aber das ist noch nicht bewiesen. Der Mechanismus der PTX-Wirkung beruht darauf, daß es inhibitorische $G_{\alpha i}$-Proteine ADP-ribosyliert, was die Interaktion dieser G-Proteine mit den entsprechenden Rezeptoren verhindert. Dadurch wird die Adenylatcyclase nicht gehemmt und ein Signalweg kann nicht abgeschaltet werden. $G_{\alpha i}$-Proteine spielen z.B. bei der Signaltransduktion über Chemokinrezeptoren eine Rolle, die ja auch bei der Migration von T-Zellen mit von der Partie sind. Vielleicht reicht der Effekt von PTX so weit, daß die Hemmung der T-Zellen, trotz Zytokinsignal die Blut-Hirn-Schranke nicht zu überwinden, aufgehoben wird, und sie so ins ZNS gelangen können. Somit wäre der nicht besonders auffällig modulierte Anteil der spezifischen T-Zellen an den T-Zellen, die ins ZNS einwandern, zu erklären, denn es könnten alle PTX-beeinflußten T-Zellen ins ZNS eindringen. Erst dort würden dann die spezifischen T-Zellen auf ihr Antigen treffen und ihr Werk vollbringen. In anderen Worten: Die außerhalb des ZNS aktivierten T-Zellen wandern nicht gerichtet ins ZNS ein, stoßen dort aber zufällig auf ihr Antigen. Dies würde auch erklären, warum die Zahl der spezifischen T-Zellen im ZNS erst ansteigt, nachdem sie aus den DLN ausgewandert sind, sowie, daß auch bei einer Zweitantwort PTX-Injektion alleine nicht ausreicht, EAE zu induzieren.

Daher ist in diesem System auch kein „Epitope-Spreading" festzustellen, denn dieses müßte man an einem Anstieg der MBP-spezifischen T-Zellen sehen können. Da also die T-Zellen außerhalb des ZNS mit Peptid aktiviert werden, sind jeweils nur die wenigen PLP3-spezifischen T-Zellen für die Symptome verantwortlich.

4.10. Expressionskinetik der Aktivierungsmarker

Die Kinetik der spezifischen T-Zellen ist begleitet von einer Expressionssteigerung der Aktivierungsmarker, die bei der Erstanwort im Vergleich zur Zweitantwort wiederum um zirka zwei Tage verspätet eintritt. Auffällig ist vor allem die frühe Expression von CD69 an Tag 1-2 auf bis zu 70 % der spezifischen Zellen in der Zweitantwort. Hier liegt das Maximum der Erstantwort erst an den Tagen 5-8, also direkt am Maximum der spezifischen Zellzahlen in den DLN, während es bei den Gedächtnis-T-Zellen der Zweitantwort schon vorher eintritt. Analog, wenn auch bei der Zweitantwort um bis zu einen Tag nach hinten verschoben, verhält sich die Kinetik von CD11b. Diese beiden Marker lassen somit die Aktivierung der Gedächtnis-T-Zellen zum frühestmöglichen Zeitpunkt erkennen. Dabei ist die Rolle von CD69 klar, denn er war schon immer als früher Aktivierungsmarker bekannt. CD11b, das zusammen mit CD18 das Integrin Mac-1 bildet und damit an ICAM-1 (CD54) und Fibronektin, das z.B. auf aktiviertem Endothel vorkommt, binden kann, scheint dagegen nur im Lymphknoten eine Rolle zu spielen. Erstens haben es maximal 30-40 % der spezifischen T-Zellen exprimiert und zweitens läßt sich auf den meisten T-Zellen im ZNS kein CD11b detektieren. Das läßt darauf schließen, daß es für die Aktivierung im DLN eine Rolle spielt, für das Eindringen ins ZNS jedoch nicht.

CD25, die IL-2Rα-Kette, wird, wie CD44 und CD43, praktisch zeitgleich mit der Auswanderung der spezifischen T-Zellen aus dem Lymphknoten exprimiert. Auch wenn es sich hier um $CD4^+$ Zellen handelt, ist CD25 wohl als Aktivierungsmarker anzusehen und nicht als Kennzeichen für regulatorische T-Zellen. Alle drei Marker sowie CD69 sind auf der großen Mehrheit der spezifischen T-Zellen im ZNS exprimiert, auf unspezifischen kommen sie nicht so oft vor. Diese hohe Expression ist ein Kennzeichen für Effektor-T-Zellen (Tabelle 1.7.1.) und an sich zu erwarten gewesen. Trotzdem ist schön zu sehen, wieviel mehr spezifische als unspezifische T-Zellen diese Marker tragen.

Warum die Symptome im Laufe der Zeit wieder schwächer werden, ist an den T-Zellen oder deren Zahlen nicht zu erkennen. Die TCR-Spezifität eventuell involvierter regulatorischer T-Zellen ist bisher noch nicht bekannt. Doch mit den hier beobachteten, im ZNS nicht modulierten PLP3-spezifischen $CD25^+$ T-Zellzahlen läßt sich jetzt ausschließen, daß, falls regulatorische T-Zellen im Spiel sind, diese einen antigenspezifischen TCR tragen, denn sonst hätte man einen Anstieg dieser $CD25^+$ T-Zellen beobachten müssen. Zu sehen ist aber z.B. in der Zweitanwort nur, daß praktisch alle spezifischen T-Zellen, die sich vor und nach dem Auftreten der Symptome im ZNS befinden, positiv für CD25 sind. Wenn sich allerdings die

spezifischen $CD25^+$ T-Zellen von aktivierten in regulatorische T-Zellen umwandeln sollten, würde man das in diesem System nicht sehen. Man müßte dann mit einem anti-TGFß-Antikörper in einer weiteren Fluoreszenz auf membrangebundenes TGFß (291 Nakamura) testen und könnte so feststellen, ob regulatorische T-Zellen im ZNS vorliegen. Dazu wäre aber ein FACS-Gerät mit fünf Fluoreszenzkanälen vonnöten.
Der langsame Anstieg der Aktivierungsmarker tragenden Zellen im ZNS bei der Erstantwort könnte als ein Artefakt zu erklären sein. Die Zellzahlen im ZNS sind nämlich so niedrig, daß in dieser Phase noch kontaminierende Zellen aus dem Blut, die bei der Perfusion nicht gänzlich entfernt werden konnten, eine beträchtlichen Anteil der gemessenen Zellen stellen können. Ihr Anteil nähme bei zunehmender Einwanderung von T-Zellen ins ZNS ab, wodurch die steigende Zahl Aktivierungsmarker exprimierender $CD4^+$ T-Zellen zu erklären wäre.
Die Marker, die wirklich früh vor den Symptomen auf den spezifischen T-Zellen auftreten, sind CD69 und CD11b. Doch für die Detektion eines bevorstehenden Schubs von MS sind nach momentanem Stand der Technik weder sie noch andere Marker geeignet, denn diese aktivierten Zellen sind in der Milz, also auch im Blut, kaum zu finden.

Die beobachtete Wanderung und die Aktivierungskinetik der autoreaktiven T-Zellen bestätigt den Ansatz mehrerer Gruppen, MS durch Toleranzinduktion der spezifischen T-Zellen in den Griff zu bekommen [131-134].
Schließlich erlaubt der hier zum ersten Mal *in situ* gezeigte Weg der spezifischen T-Zellen ins ZNS sowie die Expressionskinetik ihrer Aktivierungsmarker Rückschlüsse auf den Krankheitsverlauf. Somit könnte es mit zukünfig zur Verfügung stehenden Techniken, wie z.B. hochauflösender Kernspinresonanz, doch möglich werden, bevorstehende Krankheitsschübe vorherzusagen. Eventuell ließe sich damit sogar der ideale Zeitpunkt für die Applikation eines toleranzinduzierenden Wirkstoffes herausfinden.

5. Zusammenfassung

Der phänotypische Unterschied zwischen hochaviden und niederaviden TCR-transgenen $CD8^+$ T-Zellen konnte durch Färbung mit spezifischen MHC I-Tetrameren und anti-TCRß-Antikörpern dargestellt werden. Dabei zeigen die niederaviden T-Zellen keine detektierbare TCR-Expression, die hochaviden eine, die immer noch unter der endogenen TCR-Expression auf normalen T-Zellen liegt. Trotzdem sind sowohl beide T-Zellen als auch T-Zellen aus einer immunisierten Maus im Zytotoxizitätstest annähernd gleich effektiv in der Lyse von Zielzellen. Allerdings weisen die niederaviden T-Zellen anfangs eine Teilungshemmung auf, die sich aber nach sechs Tagen Zellkultur wieder ausgleicht. Obwohl sich beide T-Zellen bezüglich der Expressionssteigerung von CD69 nach Aktivierung *in vitro* nicht unterscheiden, so fällt doch die gehemmte Steigerung bei der CD25 Expression auf den niederaviden Zellen auf. Sie ist wahrscheinlich der Grund für die beobachtete anfängliche Teilungshemmung, denn ohne CD25 kann der autokrine Stimulationsmechanismus über IL-2 nicht funktionieren.
In vivo zeichnet sich ein ähnliches Bild ab: Die hochaviden T-Zellen übernehmen in einem neu etablierten adoptiven Transfersystem die Immunantwort nach Immunisierung, was an ihrer bis über zwei Wochen dauernden Expansion verfolgt werden kann. Die niederaviden Zellen hingegen verschwinden nach minimaler Expansion schnell aus dem Empfänger. Daher können auch nur die hochaviden T-Zellen Gedächtnis bilden. Diese Ergebnisse zeigen, daß in vivo nur hochavide T-Zellen eine Immunantwort übernehmen und zu Gedächtnis-T-Zellen werden können.
Mit einem neu zur Verfügung stehenden MHC II-Tetramer konnte erstmals die Autoimmunantwort bei Induktion von experimenteller autoimmuner Enzephalomyelitis verfolgt werden. Sie zeigt nach Immunisierung mit Peptid eine Expansion der spezifischen $CD4^+$ T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten unter gleichzeitiger Expression von verschiedenen Aktivierungsmarkern. Wenn schließlich die spezifischen T-Zellzahlen in den drainierenden Lymphknoten wieder abnehmen, kann man eine Einwanderung vieler $CD4^+$ T-Zellen, darunter spezifische T-Zellen, ins zentrale Nervensystem beobachten, während in der Milz keine Veränderung der T-Zellzahlen festzustellen ist. Vor allem die ins ZNS eingedrungenen spezifischen T-Zellen weisen alle Oberflächenmarker auf, die auf Effektor-T-Zellen zu erwarten sind. Zum Zeitpunkt ihrer Einwanderung treten auch die ersten Symptome auf. Dieser Zeitpunkt liegt bei bereits vorimmunisierten Mäusen, bei denen eine Zweitantwort stattfindet, zirka zwei bis vier Tage vor dem bei Mäusen, bei denen eine Erstantwort ausgelöst wird. Die Besserung der Symptome tritt jedoch bei gleichem Verlauf zum gleichen Zeitpunkt

ein, was darauf hindeutet, daß sich kein regulatorisches Gedächtnis gebildet hat. Damit besteht die Hoffnung, daß mit zukünftig zur Verfügung stehenden Techniken bevorstehende Schübe von MS rechtzeitig anhand der Expression von Aktivierungsmarkern erkannt und behandelt werden können.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten werden zur Zeit für die Publikation vorbereitet: “T cell avidity determines T cell expansion but not effector function.” und “Expansion and phenotypic changes of autoreactive T cells in EAE after a primary and a secondary antigenic challenge.”

6. Literatur

1. TEH HS, KISIELOW P, SCOTT B et al.: **Thymic major histocompatibility complex antigens and the alpha beta T- cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells.** *Nature*(1988) **335**(6187): 229-233.

2. YASUTOMO K, DOYLE C, MIELE L, GERMAIN RN: **The duration of antigen receptor signalling determines CD4+ versus CD8+ T-cell lineage fate.** *Nature*(2000) **404**(6777): 506-510.

3. SPRENT J: **Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties.** *Cell Immunol.*(1973) **7**(1): 10-39.

4. AHMADZADEH M, HUSSAIN SF, FARBER DL: **Heterogeneity of the Memory CD4 T Cell Response: Persisting Effectors and Resting Memory T Cells.** *J Immunol*(2001) **166**(2): 926-935.

5. BERG EL, ROBINSON MK, WARNOCK RA, BUTCHER EC: **The human peripheral lymph node vascular addressin is a ligand for LECAM-1, the peripheral lymph node homing receptor.** *J. Cell Biol.*(1991) **114**(2): 343-349.

6. GUNN MD, TANGEMANN K, TAM C et al.: **A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*(1998) **95**(1): 258-263.

7. ZHANG L: **The fate of adoptively transferred antigen-specific T cells in vivo.** *Eur J Immunol*(1996) **26**(9): 2208-2214.

8. CHRISTENSEN JE, ANDREASEN SO, CHRISTENSEN JP, THOMSEN AR: **CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells.** *Int. Immunol.*(2001) **13**(4): 593-600.

9. GRAY D: **Viral immunity: interferons jog old T-cell memories.** *Curr Biol*(1996) **6**(10): 1254-1255.

10. BROWN MG, DRISCOLL J, MONACO JJ: **Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes.** *Nature*(1991) **353**(6342): 355-357.

11. ERNST B, LEE DS, CHANG JM, SPRENT J, SURH CD: **The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery.** *Immunity*(1999) **11**(2): 173-181.

12. BROCKER T: **Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells.** *J Exp Med*(1997) **186**(8): 1223-1232.

13. KIEPER WC and JAMESON SC: **Homeostatic expansion and phenotypic conversion of naive T cells in response to self peptide/MHC ligands.** *Proc Natl Acad Sci U S A*(1999) **96**(23): 13306-13311.

14. KIRBERG J, BERNS A, VON BOEHMER H: **Peripheral T cell survival requires continual ligation of the T cell receptor to major histocompatibility complex-encoded molecules.** *J Exp Med*(1997) **186**(8): 1269-1275.

15. SCHLUNS KS, KIEPER WC, JAMESON SC, LEFRANCOIS L: **Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo.** *Nat. Immunol.*(2000) **1**(5): 426-432.

16. TAN JT, DUDL E, LEROY E et al.: **IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*(2001) **98**(15): 8732-8737.

17. HERNANDEZ J, AUNG S, REDMOND WL, SHERMAN LA: **Phenotypic and functional analysis of CD8(+) T cells undergoing peripheral deletion in response to cross-presentation of self-antigen.** *J. Exp. Med.*(2001) **194**(6): 707-717.

18. BANCHEREAU J, BRIERE F, CAUX C et al.: **Immunobiology of dendritic cells.** *Annu. Rev. Immunol.*(2000) **18**: 767-811.

19. INABA K, TURLEY S, YAMAIDE F et al.: **Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells.** *J. Exp. Med.*(1998) **188**(11): 2163-2173.

20. LEE KH, HOLDORF AD, DUSTIN ML et al.: **T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation.** *Science*(2002) **295**(5559): 1539-1542.

21. LIU H, RHODES M, WIEST DL, VIGNALI DA: **On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation.** *Immunity.*(2000) **13** (5): 665-675.

22. HENDRIKS J, GRAVESTEIN LA, TESSELAAR K et al.: **CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity.** *Nat. Immunol.*(2000) **1**(5): 433-440.

23. OEHEN S and BRDUSCHA-RIEM K: **Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division.** *J Immunol*(1998) **161**(10): 5338-5346.

24. WELLS AD, WALSH MC, SANKARAN D, TURKA LA: **T cell effector function and anergy avoidance are quantitatively linked to cell division.** *J Immunol*(2000) **165**(5): 2432-2443.

25. GALVAN M, MURALI-KRISHNA K, MING LL, BAUM L, AHMED R: **Alterations in cell surface carbohydrates on T cells from virally infected mice can distinguish effector/memory CD8+ T cells from naive cells.** *J Immunol*(1998) **161**(2): 641-648.

26. HARRINGTON LE, GALVAN M, BAUM LG, ALTMAN JD, AHMED R: **Differentiating between memory and effector CD8 T cells by altered expression of cell surface O-glycans.** *J Exp Med*(2000) **191**(7): 1241-1246.

27. PRIATEL JJ, CHUI D, HIRAOKA N et al.: **The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis.** *Immunity*(2000) **12**(3): 273-283.

28. PLUNKETT FJ, SOARES MV, ANNELS N et al.: **The flow cytometric analysis of telomere length in antigen-specific CD8+ T cells during acute Epstein-Barr virus infection.** *Blood*(2001) **97**(3): 700-707.

29. JELLEY-GIBBS DM, LEPAK NM, YEN M, SWAIN SL: **Two distinct stages in the transition from naive CD4 T cells to effectors, early antigen-dependent and late cytokine-driven expansion and differentiation.** *J. Immunol.*(2000) **165**(9): 5017-5026.

30. IEZZI G, KARJALAINEN K, LANZAVECCHIA A: **The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells.** *Immunity.*(1998) **8**(1): 89-95.

31. WHITMIRE JK, ASANO MS, MURALI-KRISHNA K, SURESH M, AHMED R: **Long-term CD4 Th1 and Th2 memory following acute lymphocytic choriomeningitis virus infection.** *J Virol*(1998) **72**(10): 8281-8288.

32. DE MATTIA F, CHOMEZ S, VAN LAETHEM F et al.: **Antigen-experienced T cells undergo a transient phase of unresponsiveness following optimal stimulation.** *J Immunol*(1999) **163**(11): 5929-5936.

33. ASHKAR S, WEBER GF, PANOUTSAKOPOULOU V et al.: **Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity.** *Science*(2000) **287**(5454): 860-864.

34. CHABAS D, BARANZINI SE, MITCHELL D et al.: **The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease.** *Science*(2001) **294**(5547): 1731-1735.

35. JANSSON M, PANOUTSAKOPOULOU V, BAKER J, KLEIN L, CANTOR H: **Cutting edge: Attenuated experimental autoimmune encephalomyelitis in eta-1/osteopontin-deficient mice.** *J. Immunol.*(2002) **168**(5): 2096-2099.

36. VAN STIPDONK MJ, LEMMENS EE, SCHOENBERGER SP: **Naive CTLs require a single brief period of antigenic stimulation for clonal expansion and differentiation.** *Nat. Immunol.*(2001) **2**(5): 423-429.

37. COUEDEL C, BODINIER M, PEYRAT MA et al.: **Selection and long-term persistence of reactive CTL clones during an EBV chronic response are determined by avidity, CD8 variable contribution compensating for differences in TCR affinities.** *J Immunol*(1999) **162**(11): 6351-6358.

38. FAHMY TM, BIELER JG, EDIDIN M, SCHNECK JP: **Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen.** *Immunity.*(2001) **14**(2): 135-143.

39. ALONSO MA and MILLAN J: **The role of lipid rafts in signalling and membrane trafficking in T lymphocytes.** *J. Cell Sci.*(2001) **114**(Pt 22): 3957-3965.

40. BADOVINAC VP, TVINNEREIM AR, HARTY JT: **Regulation of antigen-specific CD8(+) T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma.** *Science*(2000) **290**(5495): 1354-1358.

41. SYKULEV Y, JOO M, VTURINA I, TSOMIDES TJ, EISEN HN: **Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response.** *Immunity.*(1996) **4**(6): 565-571.

42. VALITUTTI S, MULLER S, CELLA M, PADOVAN E, LANZAVECCHIA A: **Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes.** *Nature*(1995) **375**(6527): 148-151.

43. HUANG L, SOLDEVILA G, LEEKER M, FLAVELL R, CRISPE IN: **The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo.** *Immunity.*(1994) **1**(9): 741-749.

44. SPRENT J: **Fate of H2-activated T lymphocytes in syngeneic hosts. I. Fate in lymphoid tissues and intestines traced with 3H-thymidine, 125I- deoxyuridine and 51chromium.** *Cell Immunol.*(1976) **21**(2): 278-302.

45. SPRENT J and SURH CD: **T cell memory.** *Annu. Rev. Immunol.*(2002) **20**: 551-579.

46. MURALI-KRISHNA K, ALTMAN JD, SURESH M et al.: **Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection.** *Immunity*(1998) **8**(2): 177-187.

47. HOMANN D, TEYTON L, OLDSTONE MB: **Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory.** *Nat. Med.*(2001) **7**(8): 913-919.

48. KUNDIG TM, BACHMANN MF, OEHEN S et al.: **On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory.** *Proc Natl Acad Sci U S A*(1996) **93**(18): 9716-9723.

49. LAU LL, JAMIESON BD, SOMASUNDARAM T, AHMED R: **Cytotoxic T-cell memory without antigen.** *Nature*(1994) **369**(6482): 648-652.

50. BACHMANN MF, BARNER M, VIOLA A, KOPF M: **Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection.** *Eur J Immunol*(1999) **29**(1): 291-299.

51. ZIMMERMANN C, PREVOST-BLONDEL A, BLASER C, PIRCHER H: **Kinetics of the response of naive and memory CD8 T cells to antigen: similarities and differences.** *Eur. J. Immunol.*(1999) **29**(1): 284-290.

52. CHO BK, WANG C, SUGAWA S, EISEN HN, CHEN J: **Functional differences between memory and naive CD8 T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*(1999) **96**(6): 2976-2981.

53. ROGERS PR, DUBEY C, SWAIN SL: **Qualitative changes accompany memory T cell generation: faster, more effective responses at lower doses of antigen.** *J Immunol*(2000) **164**(5): 2338-2346.

54. VEIGA-FERNANDES H, WALTER U, BOURGEOIS C, MCLEAN A, ROCHA B: **Response of naive and memory CD8+ T cells to antigen stimulation in vivo.** *Nat. Immunol.*(2000) **1**(1): 47-53.

55. ZIMMERMAN C, BRDUSCHA-RIEM K, BLASER C, ZINKERNAGEL RM, PIRCHER H: **Visualization, characterization, and turnover of CD8+ memory T cells in virus-infected hosts.** *J Exp Med*(1996) **183**(4): 1367-1375.

56. BACHMANN MF, KUNDIG TM, HENGARTNER H, ZINKERNAGEL RM: **Protection against immunopathological consequences of a viral infection by activated but not resting cytotoxic T cells: T cell memory without "memory T cells"?** *Proc Natl Acad Sci U S A*(1997) **94**(2): 640-645.

57. KUHOBER A, PUDOLLEK HP, REIFENBERG K et al.: **DNA immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice.** *J Immunol*(1996) **156**(10): 3687-3695.

58. REINHARDT RL, KHORUTS A, MERICA R, ZELL T, JENKINS MK: **Visualizing the generation of memory CD4 T cells in the whole body.** *Nature*(2001) **410**(6824): 101-105.

59. MASOPUST D, VEZYS V, MARZO AL, LEFRANCOIS L: **Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue.** *Science*(2001) **291**(5512): 2413-2417.

60. PANUS JF, MCHEYZER-WILLIAMS LJ, MCHEYZER-WILLIAMS MG: **Antigen-specific T helper cell function. Differential cytokine expression in primary and memory responses.** *J Exp Med*(2000) **192**(9): 1301-1316.

61. CERWENKA A, CARTER LL, REOME JB, SWAIN SL, DUTTON RW: **In vivo persistence of CD8 polarized T cell subsets producing type 1 or type 2 cytokines.** *J Immunol*(1998) **161**(1): 97-105.

62. SWAIN SL, HU H, HUSTON G: **Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors.** *Science*(1999) **286**(5443): 1381-1383.

63. MURALI-KRISHNA K, LAU LL, SAMBHARA S et al.: **Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice.** *Science*(1999) **286**(5443): 1377-1381.

64. TANCHOT C, LEMONNIER FA, PERARNAU B, FREITAS AA, ROCHA B: **Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells.** *Science*(1997) **276**(5321): 2057-2062.

65. VAN ESSEN D, DULLFORCE P, BROCKER T, GRAY D: **Cellular interactions involved in Th cell memory.** *J Immunol*(2000) **165**(7): 3640-3646.

66. DI ROSA F and MATZINGER P: **Long-lasting CD8 T cell memory in the absence of CD4 T cells or B cells.** *J Exp Med*(1996) **183**(5): 2153-2163.

67. KASSIOTIS G, GARCIA S, SIMPSON E, STOCKINGER B: **Impairment of immunological memory in the absence of MHC despite survival of memory T cells.** *Nat. Immunol.*(2002) **3**(3): 244-250.

68. INABA M, KURASAWA K, MAMURA M et al.: **Primed T cells are more resistant to Fas-mediated activation-induced cell death than naive T cells.** *J Immunol*(1999) **163**(3): 1315-1320.

69. SELIN LK, LIN MY, KRAEMER KA et al.: **Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses.** *Immunity*(1999) **11**(6): 733-742.

70. VARGA SM, SELIN LK, WELSH RM: **Independent regulation of lymphocytic choriomeningitis virus-specific T cell memory pools: relative stability of CD4 memory under conditions of CD8 memory T cell loss.** *J. Immunol.*(2001) **166**(3): 1554-1561.

71. OPFERMAN JT, OBER BT, ASHTON-RICKARDT PG: **Linear differentiation of cytotoxic effectors into memory T lymphocytes.** *Science*(1999) **283**(5408): 1745-1748.

72. HU H, HUSTON G, DUSO D et al.: **CD4(+) T cell effectors can become memory cells with high efficiency and without further division.** *Nat. Immunol.*(2001) **2**(8): 705-710.

73. LAUVAU G, VIJH S, KONG P et al.: **Priming of memory but not effector CD8 T cells by a killed bacterial vaccine.** *Science*(2001) **294**(5547): 1735-1739.

74. AICHELE P, BRDUSCHA-RIEM K, OEHEN S et al.: **Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen- specific tolerance versus immunopathology.** *Immunity*(1997) **6**(5): 519-529.

75. BLATTMAN JN, SOURDIVE DJ, MURALI-KRISHNA K, AHMED R, ALTMAN JD: **Evolution of the T cell repertoire during primary, memory, and recall responses to viral infection.** *J Immunol*(2000) **165**(11): 6081-6090.

76. SOURDIVE DJ, MURALI-KRISHNA K, ALTMAN JD et al.: **Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection.** *J Exp Med*(1998) **188**(1): 71-82.

77. BUSCH DH and PAMER EG: **T cell affinity maturation by selective expansion during infection.** *J Exp Med*(1999) **189**(4): 701-710.

78. FASSO M, ANANDASABAPATHY N, CRAWFORD F et al.: **T cell receptor (TCR)-mediated repertoire selection and loss of TCR vbeta diversity during the initiation of a CD4(+) T cell response in vivo.** *J. Exp. Med.*(2000) **192** (12): 1719-1730.

79. SAVAGE PA, BONIFACE JJ, DAVIS MM: **A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response.** *Immunity*(1999) **10**(4): 485-492.

80. KEDL RM, SCHAEFER BC, KAPPLER JW, MARRACK P: **T cells down-modulate peptide-MHC complexes on APCs in vivo.** *Nat. Immunol.*(2002) **3**(1): 27-32.

81. LEVITSKY V, DE CAMPOS-LIMA PO, FRISAN T, MASUCCI MG: **The clonal composition of a peptide-specific oligoclonal CTL repertoire selected in response to persistent EBV infection is stable over time.** *J Immunol*(1998) **161**(2): 594-601.

82. HUANG LR, CHEN FL, CHEN YT, LIN YM, KUNG JT: **Potent induction of long-term CD8+ T cell memory by short-term IL-4 exposure during T cell receptor stimulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*(2000) **97**(7): 3406-3411.

83. CHEN HD, FRAIRE AE, JORIS I et al.: **Memory CD8+ T cells in heterologous antiviral immunity and immunopathology in the lung.** *Nat. Immunol.*(2001) **2**(11): 1067-1076.

84. REALI E, GUERRINI R, MARASTONI M et al.: **A single specific amino acid residue in peptide antigens is sufficient to activate memory CTL: potential role of cross-reactive peptides in memory T cell maintenance.** *J Immunol*(1999) **162**(1): 106-113.

85. BUSCH DH, KERKSIEK KM, PAMER EG: **Differing roles of inflammation and antigen in T cell proliferation and memory generation.** *J Immunol*(2000) **164**(8): 4063-4070.

86. CHO BK, RAO VP, GE Q, EISEN HN, CHEN J: **Homeostasis-stimulated Proliferation Drives Naive T Cells to Differentiate Directly into Memory T Cells.** *J Exp Med*(2000) **192**(4): 549-556.

87. OEHEN S and BRDUSCHA-RIEM K: **Naive cytotoxic T lymphocytes spontaneously acquire effector function in lymphocytopenic recipients: A pitfall for T cell memory studies?** *Eur J Immunol*(1999) **29**(2): 608-614.

88. EHL S, HOMBACH J, AICHELE P, HENGARTNER H, ZINKERNAGEL RM: **Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model.** *J Exp Med*(1997) **185**(7): 1241-1251.

89. HAMANN D, BAARS PA, REP MH et al.: **Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells.** *J Exp Med*(1997) **186**(9): 1407-1418.

90. TOUGH DF, BORROW P, SPRENT J: **Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo.** *Science*(1996) **272**(5270): 1947-1950.

91. SPRENT J, ZHANG X, SUN S, TOUGH D: **T-cell proliferation in vivo and the role of cytokines.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*(2000) **355**(1395): 317-322.

92. TOUGH DF, ZHANG X, SPRENT J: **An IFN-gamma-dependent pathway controls stimulation of memory phenotype CD8+ T cell turnover in vivo by IL-12, IL-18, and IFN-gamma.** *J. Immunol.*(2001) **166**(10): 6007-6011.

93. EBERL G, BRAWAND P, MACDONALD HR: **Selective bystander proliferation of memory CD4(+) and CD8(+) T cells upon NK T or T cell activation.** *J Immunol*(2000) **165**(8): 4305-4311.

94. KU CC, MURAKAMI M, SAKAMOTO A, KAPPLER J, MARRACK P: **Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines.** *Science*(2000) **288**(5466): 675-678.

95. LENARDO M, CHAN KM, HORNUNG F et al.: **Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment.** *Annu Rev Immunol*(1999) **17**: 221-253.

96. BUTZ EA and BEVAN MJ: **Massive expansion of antigen-specific CD8+ T cells during an acute virus infection.** *Immunity*(1998) **8**(2): 167-175.

97. SCHOENBERGER SP, JONGES LE, MOOIJAART RJ et al.: **Efficient direct priming of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte in vivo by an engineered APC.** *Cancer Res*(1998) **58**(14): 3094-3100.

98. LUCKEY CJ, KING GM, MARTO JA et al.: **Proteasomes can either generate or destroy MHC class I epitopes: evidence for nonproteasomal epitope generation in the cytosol.** *J Immunol*(1998) **161**(1): 112-121.

99. TAMURA N, LOTTSPEICH F, BAUMEISTER W, TAMURA T: **The role of tricorn protease and its aminopeptidase-interacting factors in cellular protein degradation.** *Cell*(1998) **95**(5): 637-648.

100. WENINGER W, CROWLEY MA, MANJUNATH N, VON ANDRIAN UH: **Migratory properties of naive, effector, and memory CD8(+) T cells.** *J. Exp. Med.*(2001) **194**(7): 953-966.

101. SPRENT J: **T and B memory cells.** *Cell*(1994) **76**(2): 315-322.

102. SPRENT J and TOUGH DF: **T cell death and memory.** *Science*(2001) **293**(5528): 245-248.

103. POWRIE F, LEACH MW, MAUZE S, CADDLE LB, COFFMAN RL: **Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C. B-17 scid mice.** *Int. Immunol.*(1993) **5**(11): 1461-1471.

104. GROUX H, O'GARRA A, BIGLER M et al.: **A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.** *Nature*(1997) **389**(6652): 737-742.

105. NAKAMURA K, KITANI A, STROBER W: **Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.** *J. Exp. Med.*(2001) **194**(5): 629-644.

106. PICCIRILLO CA and SHEVACH EM: **Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells.** *J. Immunol.*(2001) **167**(3): 1137-1140.

107. CLARK RB and LINGENHELD EG: **Adoptively transferred EAE in gamma delta T cell-knockout mice.** *J. Autoimmun.*(1998) **11**(1): 105-110.

108. WOLF SD, DITTEL BN, HARDARDOTTIR F, JANEWAY CA, Jr.: **Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice.** *J. Exp. Med.*(1996) **184**(6): 2271-2278.

109. LITZENBURGER T, FASSLER R, BAUER J et al.: **B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice.** *J. Exp. Med.*(1998) **188**(1): 169-180.

110. ZHANG B, YAMAMURA T, KONDO T, FUJIWARA M, TABIRA T: **Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by natural killer (NK) cells.** *J. Exp. Med.*(1997) **186**(10): 1677-1687.

111. KOH DR, FUNG-LEUNG WP, HO A et al.: **Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8-/- mice.** *Science*(1992) **256**(5060): 1210-1213.

112. ELLIOTT JI, DOUEK DC, ALTMANN DM: **Mice lacking alpha beta + T cells are resistant to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J. Neuroimmunol.*(1996) **70**(2): 139-144.

113. KOH DR, HO A, RAHEMTULLA A, PENNINGER J, MAK TW: **Experimental allergic encephalomyelitis (EAE) in mice lacking CD4+ T cells.** *Eur. J. Immunol.*(1994) **24**(9): 2250-2253.

114. GREWAL IS, FOELLMER HG, GREWAL KD et al.: **CD62L is required on effector cells for local interactions in the CNS to cause myelin damage in experimental allergic encephalomyelitis.** *Immunity.*(2001) **14**(3): 291-302.

115. FAZEKAS G and TABIRA T: **What transgenic and knockout mouse models teach us about experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Rev. Immunogenet.*(2000) **2**(1): 115-132.

116. KUCHROO VK, DAS MP, BROWN JA et al.: **B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy.** *Cell*(1995) **80**(5): 707-718.

117. FLUGEL A, BERKOWICZ T, RITTER T et al.: **Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Immunity.*(2001) **14**(5): 547-560.

118. TARGONI OS, BAUS J, HOFSTETTER HH et al.: **Frequencies of neuroantigen-specific T cells in the central nervous system versus the immune periphery during the course of experimental allergic encephalomyelitis.** *J. Immunol.*(2001) **166**(7): 4757-4764.

119. GORDON FL, NGUYEN KB, WHITE CA, PENDER MP: **Rapid entry and downregulation of T cells in the central nervous system during the reinduction of experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J. Neuroimmunol.*(2001) **112**(1-2): 15-27.

120. JIANG H, BRAUNSTEIN NS, YU B, WINCHESTER R, CHESS L: **CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2001) **98**(11): 6301-6306.

121. LINDSEY JW: **Characteristics of initial and reinduced experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Immunogenetics*(1996) **44**(4): 292-297.

122. BLANKENHORN EP, BUTTERFIELD RJ, RIGBY R et al.: **Genetic analysis of the influence of pertussis toxin on experimental allergic encephalomyelitis susceptibility: an environmental agent can override genetic checkpoints.** *J. Immunol.*(2000) **164**(6): 3420-3425.

123. HORTON RM, KARACHUNSKIPI, CONTI-FINE BM: **PCR screening of transgenic RAG-2 "knockout" immunodeficient mice.** *Biotechniques*(1995) 19(5): 690-691

124. MARZO AL, LAKE RA, LO D et al.: **Tumor antigens are constitutively presented in the draining lymph nodes.** *J. Immunol.*(1999) 162(10): 5838-5845

125. ENSINGER MJ, GINSBERG HS: **Selection and preliminary characterization of temperature-sensitive mutants of type 5 adenovirus.** *J. Virol.*(1972) 10(3): 328-339

126. VAN HALL T, VAN DE RHEE NE SCHOENBERGER SP: **Cryptic open reading frames in plasmid vector backbone sequences can provide highly immunogenic cytotoxic T-lymphocyte epitopes.** *Cancer Res.*(1998) 58(14): 3087-3093

127. MATZINGER P: **The danger model: a renewed sense of self.** *Science*(2002) **296**(5566): 301-305.

128. MASOPUST D, VEZYS V, MARZO AL, LEFRANCOIS L: **Preferential localization of effector memory cells in nonlymphoid tissue.** *Science*(2001) **291**(5512): 2413-2417.

129. SAVAGE PA, BONIFACE JJ, DAVIS MM: **A kinetic basis for T cell receptor repertoire selection during an immune response.** *Immunity*(1999) **10**(4): 485-492.

130. TOES RE, OFFRINGA R, BLOM RJ, MELIEF CJ, KAST WM: **Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction.** *Proc Natl Acad Sci U S A*(1996) **93**(15): 7855-7860.

131. LINK H, HUANG YM, MASTERMAN T, XIAO BG: **Vaccination with autologous dendritic cells: from experimental autoimmune encephalomyelitis to multiple sclerosis.** *J. Neuroimmunol.*(2001) **114**(1-2): 1-7.

132. MCFARLAND HI, LOBITO AA, JOHNSON MM et al.: **Effective antigen-specific immunotherapy in the marmoset model of multiple sclerosis.** *J. Immunol.*(2001) **166**(3): 2116-2121.

133. MIYAMOTO K, MIYAKE S, YAMAMURA T: **A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells.** *Nature*(2001) **413**(6855): 531-534.

134. BIELEKOVA B, GOODWIN B, RICHERT N et al.: **Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand.** *Nat. Med.*(2000) **6**(10): 1167-1175.

7. Abkürzungen

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogenkarbonat-Lösung
AICD	activation induced cell death (aktivierungsinduzierter Zelltod)
Ak	Antikörper
APC	professional antigen presenting cell (professionell Antigen präsentierende Zelle)
AV	Adenovirus (Ad5ts125)
B6	C57BL/6
BC	B-cell (B-Zelle)
CD[#]	cluster of differentiation [#] (Differenzierungsgruppe [Nummer])
CFA	complete Freunds adjuvans (komplettes Freundsches Adjuvans)
CFSE	Carboxyfluoreszeinsuccinimidylester
CTL	cytotoxic T lymphcyte (zytotoxische T Lymphozyte)
DC	dendritic cell (dendritische Zelle)
DLN	draining lymphnode (drainierender Lymphknoten)
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluorescence activated cell signalling (Fluoreszenz-aktivierte Zellsignaldetektion)
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FP	FACS-Puffer
H2	histocompatibility 2 (Gewebeverträglichkeit 2)
HLA	human leukocyte antigen (humanes Leukozytenantigen)
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
IFNγ	Interferon γ
IL-[#]	Interleukin-[Nummer]
IL-2Rα	Interleukin-2-rezeptor α-Kette
LCMV	Lymphozytenchoriomeningitisvirus
LPS	Lipopolysaccharid
MΦ	Makrophage
MBP	myelin basic protein (basisches Myelinprotein)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	major histocompatibility complex (Hauptgewebeverträglichkeitskomplex)
MKG	mittlerer Krankheitsgrad

MS	multiple Sklerose
MTJ	Mouse Tail Juice
NK	natürliche Killerzellen
NKT	NK-T-Zelle
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
PE	R-Phycoerythrin
PerCP	Perinidinchlorophyll-Protein
PI	Propidiumiodid
PLP	Proteolipidprotein
pTα	prä-T-α-Kette
PTX	Pertussistoxin
RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutane (subkutan)
ß$_2$m	ß$_2$-microglobulin (ß$_2$-Mikroglobulin)
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer
TAP	transporter associated with antigen presentation (antigenprozessierungsassoziierter Transporter)
T_{CM}	central memory T cell (zentrale Gedächtnis-T-Zelle)
TCR	T cell receptor (T-Zellrezeptor)
TE	Tris-EDTA-Puffer
T_{EM}	effector memory T cell (Effektorgedächtnis-T-Zelle)
TLR	toll-like receptor (toll-ähnlicher Rezeptor)
Tm	MHC-Tetramer
TNF	Tumornekrosefaktor
ZF	Zentrifugation
ZNS	zentrales Nervensystem

8. Dank

Hier bietet sich die Gelegenheit mich bei allen zu bedanken, die mir bei meiner Promotion geholfen haben:
An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee bedanken, der mit großem Interesse an meinen Projekten dabei war und immer wieder durch andere Blickwinkel neue Möglichkeiten der Weiterführung aufzeigte.
Dank sagen möchte ich auch PD Dr. Hansjörg Schild, der der "Vater" des Aviditätsprojekts ist und viele innovative Ideen zum Projekt hatte, die leider nur zu oft an den wenigen zur Verfügung stehenden Mäusen scheiterten. Daher mußte aus dem "Hau rein" oft ein Filtern der erfolgsversprechendsten Vorschläge werden.
Dr. René Toes war bei allen St40/St42-Fragen immer ansprechbar und gab dann entsprechende neue Impulse. Außerdem stellte er, zusammen mit Annemieke den Boer und Marieke Fransen, die Adenoviren und die SGP-Tm zur Verfügung. Vielen Dank an alle drei.
Ein weiteres Dankeschön geht an Dr. Felix Bischof, durch dessen Vorarbeit es möglich war, in relativ kurzer Zeit viele Daten im EAE-Projekt zu sammeln. Dazu hat auch Evelyn Dubois beigetragen, die die PLP3-Tm hergestellt hat.
Dr. Lars Stoltze möchte ich ebenso für seine unermüdliche Fragerei danken, die zu mancher interessanten wissenschaftlichen Diskussion geführt und oft mit neuen Einsichten geendet hat.
Ein besonderer Dank geht an die fleißigen Tierpfleger Matthias Baur und Nadine Ilse, sowie an meine HiWis Ursula Bien-Gräter und Marc Günder, die mir viel Arbeit in der Mauszucht abgenommen haben, sowie natürlich an die gesamte Laborbesatzung, die ein entspanntes und produktives Arbeiten ermöglicht hat.
Ein ganz herzliches Dankeschön geht an meine Eltern, Erika und Richard Hofmann, die es mir möglich gemacht haben zu studieren und mich überall wo nur möglich unterstützt haben.
An letzter und wichtigster Stelle bedanke ich mich bei meiner Frau, Susanne Hofmann, die mir gerade in den ersten beiden Jahren, in denen ich im Labor ziemlich viel Frust zu verkraften hatte, immer den Rücken gestärkt und mitüberlegt hat und die sich so schön mit mir über erfolgreiche Experimente freuen konnte.

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Privatdozenten:
Bisswanger, Bock, Bohley, Braun, Breyer-Pfaff, Eisele, Geckeler, Gauglitz, Gönnenwein, Gottlieb, Grabmayr, Gregor, Grotemeyer, Günzl, Häfelinger, Hagenmeier, Hamprecht, Hanack, Hanse, Jäger, Jung, Kaiser, Kodadek, Kitto, Krug, Lauer, Lindner, Mayer, Mecke, Meier, Nakel, Oberhammer, Overath, Pfaff, Pfeiffer, Pommer, Poralla, Probst, Rammensee, Reuter, Reinecke, Rios, Schild, Schöffl, Sietmann, Stegmann, Stoeva, Strähle, Voelter, Wegmann, Werner, Weser, Wieber, Wiesinger, Wiesmüller, Werringloer, Wohlleben

10. Lebenslauf

Matthias Hermann Hofmann

Geburtstag: 18.07.73

Geburtsort: Creglingen

Familienstand: verheiratet

8/99 bis 9/02:	Promotion bei Prof. Dr. H.-G. Rammensee an der Universität Tübingen, Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie.
2/99 bis 7/99:	Diplomarbeit bei Prof. Dr. H.-G. Rammensee
4/94 bis 7/99:	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen
8/96 bis 5/97:	Studium an der „University of Texas at Austin“ in Austin, Texas, USA, dabei Praktikum bei Prof. Dr. B.-G. Kitto
4/93 bis 3/94:	Wehrdienst
10/92 bis 3/93:	Studium der Chemie an der Universität Würzburg
6/92 bis 9/92:	Aushilfstätigkeit bei der Firma “eibe” (Schreinerei, Röttingen)
8/83 bis 5/92:	Gymnasium Weikersheim
9/79 bis 7/83:	Grundschule Röttingen