

Aus dem Zentrum für Neurologie
Neurologische Klinik und Hertie-Institut für klinische
Hirnforschung
Abteilung Allgemeine Neurologie
Stellv. Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Melms

**Antigenspezifische Toleranzinduktion im Tiermodell der
Multiplen Sklerose: Untersuchung autoreaktiver T-Helferzellen
mit MHC Klasse II-Tetrameren**

**INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen**

**vorgelegt von
CHRISTIAN LANGE
aus Rottweil**

2009

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. A. Melms

2. Berichterstatter:

Professor Dr. P. Brossart

I Inhaltsverzeichnis

I INHALTSVERZEICHNIS II

II ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VI

1. EINLEITUNG..... 1

1.1. DAS IMMUNSYSTEM 1

1.2. ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN, MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX . 2

1.3. KOSTIMULATION 3

1.4. DIE BIOLOGIE DER T-ZELLEN..... 4

1.5. DAS PARADIGMA DER TH1/TH2-DIFFERENZIERUNG 6

1.6. REGULATORISCHE T-ZELLEN 6

1.7. TOLERANZ, AUTOIMMUNITÄT 8

1.8. EXPERIMENTELLE AUTOIMMUNE ENZEPHALOMYELITIS..... 9

1.9. TOLERANZINDUKTION MIT REKOMBINANTEN INVARIANTEN KETTEN..... 10

1.10. MHC KLASSE II-TETRAMERE 11

1.11. ZIELSETZUNG DIESER DOKTORARBEIT 12

2. MATERIAL UND METHODEN..... 13

2.1. MATERIAL 13

2.1.1. *Tabelle der verwendeten Laborgeräte..... 13*

2.1.2. *Tabelle der verwendeten Verbrauchsmaterialien 14*

2.1.3. *Tabelle kommerziell erhältlicher Chemikalien, Medien und Enzyme 15*

2.1.4. *Tabelle der verwendeten Antikörper 19*

2.1.5. *Sequenzen der verwendeten Primer 19*

2.1.6. *Zusammensetzung der verwendeten Puffer 20*

2.1.7. *Peptide..... 24*

2.1.8. *Versuchstiere 25*

2.2. METHODEN..... 25

2.2.1. *Produktion rekombinanter Invarianter Ketten..... 25*

2.2.2. *Reinheitskontrolle..... 27*

2.2.3. *Kultur von T-Zellen zur Titration der Tetramere 28*

2.2.4.	<i>Kultur von Gliomzellen.....</i>	28
2.2.5.	<i>Apoptoseinduktion in Gliomzellen.....</i>	29
2.2.6.	<i>Induktion der EAE</i>	29
2.2.7.	<i>Injektion der Ii-Moleküle</i>	30
2.2.8.	<i>Klassifizierung des Krankheitsgrades</i>	30
2.2.9.	<i>FACS-Analysen mit Antikörpern und Tetrameren.....</i>	30
2.2.10.	<i>Quantitative Bestimmung spezifischer mRNA mit Echtzeit-PCR</i>	34
2.2.11.	<i>Histologie</i>	37
3.	ERGEBNISSE.....	40
3.1.	DOSIS-WIRKUNGS-BEZIEHUNG DER Ii-PLP139-151	40
3.1.1.	<i>Die intravenöse Injektion von Ii-PLP139-151 nach der EAE-Induktion kann den Ausbruch der Krankheit vollständig verhindern.....</i>	40
3.1.2.	<i>In der Proliferationsphase der EAE genügt eine geringere Dosierung der Ii-PLP139-151 zur EAE-Suppression als in der Effektorphase.....</i>	41
3.2.	VERTRÄGLICHKEIT DER THERAPIE MIT Ii-PLP139-151	41
3.3.	DIE TETRAMERFÄRBUNG.....	42
3.3.1.	<i>CD4+-T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor spezifisch für das PLP139-151-Epitop ist, können mit MHC Klasse II-Tetrameren gefärbt werden</i>	42
3.4.	DIE KINETIK AUTOREAKTIVER CD4+-T-ZELLEN WÄHREND DER TOLERANZINDUKTION MIT Ii-PLP139-151-MOLEKÜLEN	44
3.4.1.	<i>Die Kinetik in den DLN</i>	44
3.4.2.	<i>Die Kinetik in der Milz</i>	47
3.4.3.	<i>Die Kinetik im zentralen Nervensystem.....</i>	50
3.5.	APOPTOSEINDUKTION DURCH DIE THERAPIE MIT Ii-PLP139-151	52
3.5.1.	<i>Die Therapie mit Ii-PLP139-151 induziert Apoptose in einem Teil der PLP139-151-spezifischen T-Helferzellen in vivo</i>	52
3.5.2.	<i>In der Milz erhöht sich die Apoptoserate PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen nach Ii-PLP139-151-Injektion nicht</i>	54
3.5.3.	<i>Die Färbung der aktiven Caspase-3 ist spezifisch und sensitiv</i>	54
3.6.	DIE EXPRESSION VON AKTIVIERUNGSMARKERN WÄHREND DER Ii-PLP139-151-THERAPIE	56

3.6.1.	<i>Die Ii-PLP139-151-Injektion führt zur Deletion insbesondere von aktivierten PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen in den DLN.....</i>	56
3.6.2.	<i>In der Milz ändert sich der Anteil an aktivierten Zellen durch die Ii-PLP139-151-Injektion nur wenig</i>	59
3.7.	TH1- UND TH2-ZELLEN WÄHREND DER THERAPIE MIT Ii-PLP139-151	61
3.7.1.	<i>Die Therapie mit Ii-PLP139-151 führt zu einer Verlagerung von der Th1-Zell-Dominanz zur Dominanz der Th2-Zellen.....</i>	61
3.8.	DIE THERAPIE MIT Ii-PLP139-151 INDUZIERT EINEN ANSTIEG DER FREQUENZ CD4+CD25+- REGULATORISCHER T-ZELLEN	65
3.9.	DIE THERAPIE MIT Ii-PLP139-151 ERHÖHT DIE IMMUNOSUPPRESSIVE KAPAZITÄT DER REGULATORISCHEN T-ZELLEN.....	67
3.10.	DIE EXPRESSION KOSTIMULIERENDER MOLEKÜLE WÄHREND DER Ii-PLP139-151-THERAPIE	68
3.11.	DER WILDTYP DER INVARIANTEN KETTE BEEINFLUSST DIE GEMESSENEN PARAMETER NICHT	72
3.12.	AUTOREAKTIVE CD4+-T-ZELLEN IM ZNS.....	73
3.12.1.	<i>Kinetik autoreaktiver CD4+-T-Zellen im ZNS.....</i>	73
3.12.2.	<i>Die Expression von Aktivierungsmarkern autoreaktiver CD4+-T-Zellen im ZNS.....</i>	75
3.12.3.	<i>Apoptose autoreaktiver CD4+-T-Zellen im ZNS.....</i>	77
3.12.4.	<i>Die Expression kostimulierender Moleküle auf autoreaktiven CD4+-T-Zellen im ZNS.....</i>	79
3.12.5.	<i>Die Expression von Chemokinrezeptoren auf autoreaktiven CD4+-T-Zellen im ZNS.....</i>	80
4.	DISKUSSION	82
4.1.	ZUR VERTRÄGLICHKEIT DER Ii-PLP139-151-THERAPIE	82
4.2.	DIE Ii-PLP139-151-THERAPIE VERHINDERT DIE INVASION AUTOREAKTIVER T-ZELLEN INS ZNS	83
4.3.	DIE Ii-PLP139-151-THERAPIE FÜHRT ZUR SELEKTIVEN DELETION AUTOREAKTIVER EFFEKTOR-T-ZELLEN.....	84

4.4.	DIE II-PLP139-151-THERAPIE VERURSACHT NEBEN DER DELETION PATHOGENER TH1-ZELLEN EINE INDUKTION PROTEKTIVER PLP139-151- SPEZIFISCHER TH2-ZELLEN	85
4.5.	DIE II-PLP139-151-THERAPIE BEWIRKT EINE INDUKTION CD4+CD25+ REGULATORISCHER T-ZELLEN	86
4.6.	DIE EXPRESSION KOSTIMULIERENDER MOLEKÜLE WÄHREND DER II-PLP139- 151-THERAPIE	88
4.7.	AUTOREAKTIVE T-ZELLEN IM ZNS	89
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	91
III	LITERATURVERZEICHNIS.....	92
IV	DANK.....	101

II Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
CD	cluster of differentiation
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
CLIP	class II-associated invariant-chain peptide
CTLA-4	cytolytic T lymphocyte-associated Ag
DLN	drainierende Lymphknoten
DMEM	Dulbeccos modified Eagle's medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DZ	dendritische Zelle
EAE	Experimentelle Autoimmune Encephalomyelitis
FCS	forward scatter, Vorwärtsstreuung
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
ICOS	inducible costimulator
i.v.	intravenös
IFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans
IFN	Interferon
Ii	Invariante Kette
Ii-CLIP	Invariante Kette Wildtyp
Ii-PLP139-151	Invariante Kette, deren CLIP-Fragment mit dem PLP-Epitop ersetzt wurde
IL	Interleukin
IMDM	Iscove's modifiziertes DMEM
LPS	Lipopolysaccharid
MBP	Myelin-basisches-Protein
MHC	Major Histocompatibility Complex

Abkürzungsverzeichnis

Mio.	Million(en)
MKG	Mittlerer Krankheitsgrad
MOG	Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein
mRNA	messenger RNA
MS	Multiple Sklerose
n. i.	nach Immunisierung
PBS	phosphat buffered saline
PD-1	programmed death-1
PE	P-Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PLP	Proteolipid-Protein
PTX	Pertussis-Toxin
RPM	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s. c.	subkutan
SEM	standard error of the mean
SSC	sideward scatter, Seitwärtsstreuung
TGF	Transforming Growth Factor
Th	T-Helferzelle
Tim	T cell immunoglobulin domain, mucin domain
TLR	Toll-like-Rezeptoren
Tm	Tetramer
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Tr1-Zelle	Typ-1-regulatorische T-Zelle
ü. N.	über Nacht
ZNS	Zentralnervensystem

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem muss einerseits die beständige Herausforderung der Bekämpfung eindringender pathogener Mikroorganismen bewältigen, andererseits müssen die Toleranz des Immunsystems gegen körpereigene Antigene gewährleistet und übermäßige Schädigungen bei der Entzündungsreaktion vermieden werden. Für eine erfolgreiche Abwehr mikrobieller Infektionen und für die Gewährleistung der Selbsttoleranz sind sowohl das angeborene als auch das adaptive Immunsystem essentiell.

Kennzeichnend für das Wirken des angeborenen Immunsystems sind das Erkennen allgemeiner, repetitiver mikrobieller Strukturen und die damit verbundene Möglichkeit, Pathogene sofort, ohne vorausgegangenen Erregerkontakt, bekämpfen zu können (1-3). Das angeborene Immunsystem besteht unter anderem aus Fresszellen wie den Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, die Radikale bilden und Bakterien phagozytieren und abtöten können; aus Komplement, dessen Komponenten sich auf mikrobiellen Zelloberflächen ablagern und diese zerstören können; und aus zahlreichen Mediatoren, die die Immunreaktion in Gang setzen und die Entzündungsreaktion fördern. Da das angeborene Immunsystem nur allgemeine, übergreifende Merkmale der vielfältigen zu bekämpfenden Noxen erkennen kann, wird ein gezieltes Bekämpfen spezifischer Erreger mit ihren speziellen Eigenschaften nicht möglich. Dadurch ist die Effizienz der Erregerbekämpfung durch die angeborene Immunität oft nicht ausreichend. Deshalb hat sich im Zuge der Evolution in Vertebraten zusätzlich das adaptive (erworbene) Immunsystem entwickelt.

Das adaptive Immunsystem besteht aus einem enormen Repertoire an T- und B-Lymphozyten unterschiedlicher Spezifitäten. Jede dieser Zellen erkennt nur ein ganz bestimmtes Antigen. Charakteristisch für das adaptive Immunsystem ist, dass beim ersten Kontakt mit einem bestimmten Erreger dieser nicht sofort effektiv bekämpft werden kann, sondern die passenden Lymphozyten erst

aktiviert und selektiv vermehrt werden müssen. Dabei entsteht auch ein immunologisches Gedächtnis für das entsprechende Antigen.

1.2. Antigenpräsentierende Zellen, Major Histocompatibility Complex

Antigene können T-Zellen nur dann aktivieren, wenn sie im Komplex mit MHC-Molekülen präsentiert werden. Der Kontakt der T-Zelle mit dem MHC/Antigen-Komplex wird durch die spezialisierten antigenpräsentierenden Zellen (APZ) vermittelt. Diese Zellen nehmen kontinuierlich extrazelluläres Antigen phagozytotisch und pinozytotisch auf, degradieren das Antigen und bringen es im Komplex mit MHC-Molekülen auf die Zelloberfläche (3-5). APZ sind vor allem dendritische Zellen (DZ), Makrophagen und B-Zellen, in geringerem Maße aber auch Hepatozyten und Astrozyten. Naive T-Zellen können wahrscheinlich nur von DZ aktiviert werden, deshalb werden nur diese hier näher vorgestellt (3). DZ exprimieren in hoher Dichte MHC Klasse II- und MHC Klasse I-Moleküle. MHC Klasse II-Moleküle kommen nur auf APZ vor und sind für die Präsentation von Antigenen zuständig, die endozytotisch aufgenommen und lysosomal degradiert wurden. MHC Klasse I-Moleküle kommen auf allen kernhaltigen Zellen vor und präsentieren zelleigene oder virale, im Proteasom prozessierte Peptide. DZ verfügen allerdings über einen noch unverstandenen Mechanismus, um auch endozytotisch gewonnene Antigene auf MHC Klasse I-Molekülen präsentieren zu können (6). Der Kontakt zwischen DZ und T-Zelle kann für die T-Zelle zweierlei Konsequenzen haben, je nach dem ob die DZ sich im reifen oder unreifen Zustand befindet. Eine reife DZ exprimiert neben MHC/Peptid-Komplexen unter anderem große Mengen an kostimulierenden Molekülen und produziert immunstimulierende Zytokine wie IL-12, IFN- α und IL-2. DZ, die diese Eigenschaften, insbesondere die Expression kostimulierender Moleküle, nicht aufweisen, werden als unreif bezeichnet (7-9). Der Kontakt zwischen T-Zelle und reifer DZ führt zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle, der Kontakt zwischen T-Zelle und unreifer DZ zur Anergie der T-Zelle. Für letzteres wird insbesondere die fehlende Kostimulation verantwortlich gemacht, dies wird weiter unten ausführlicher besprochen.

Es ist also von entscheidender Bedeutung, ob eine T-Zelle auf eine reife oder unreife DZ trifft. Ob ein Antigen vom Immunsystem bekämpft oder ignoriert wird, hängt demnach erheblich vom Reifungsgrad der DZ ab. Was aber bringt eine DZ zur Reifung? Im Wesentlichen werden dafür zwei Signalwege verantwortlich gemacht, die der Familie der Toll-like-Rezeptoren (TLR) und die der Rezeptor-Familie der Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF), insbesondere der TNF- α Rezeptor und CD40 (7-9). TLR erkennen allgemeine mikrobielle Strukturen wie das Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien, Proteoglykane grampositiver Bakterien oder dsRNA bestimmter Viren (2). TNF-Rezeptoren empfangen Signale von inflammatorischen Zytokinen oder von Molekülen, die von anderen aktivierten Immunzellen exprimiert werden. Diese Signale gewährleisten, dass DZ physiologischerweise im Zustand mikrobieller Infektion reifen und T-Zellen nur dann aktivieren, wenn eine effektive Immunität gefordert ist. Auf die daraus folgenden weit reichenden Konsequenzen für die Entstehung beziehungsweise Vermeidung von Autoimmunität wird weiter unten ausführlicher eingegangen.

Haupthistokompatibilitätsmoleküle (Major Histocompatibility Complex Antigen, MHC) erhielten ihren Namen, da sie die Immunreaktion gegen transplantiertes Gewebe entscheidend beeinflussen. MHC Klasse II-Moleküle bestehen aus einer α - und einer β -Kette. Sie präsentieren Peptide, die aus bis zu 30 Aminosäuren bestehen. Das MHC Klasse I-Molekül besteht aus einer α -Kette das nicht kovalent mit dem β_2 -Mikroglobulin verbunden ist und präsentiert Peptide von 8-10 Aminosäuren Länge. Der MHC ist polygen und überaus polymorph. Polymorphien in der Peptidbindungstasche führen dabei zur Präsentation unterschiedlicher Peptide von Mensch zu Mensch und zur Selektion individueller T-Zell-Repertoires. Dies ist einer der entscheidenden Gründe für die Transplantatabstoßung.

1.3. Kostimulation

Wie bereits erwähnt, ist das sogenannte kostimulierende Signal Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zelle. Heute sind sehr viele verschiedene

kostimulierende Moleküle bekannt. Der klassische Weg der T-Zell-Aktivierung wird von der Interaktion der B7-Moleküle auf der APZ mit CD28 auf der T-Zelle vermittelt (10-14). Weitere aktivierende kostimulierende Signalwege sind zum Beispiel die Mitglieder der TNF-Rezeptor-Familie CD40-CD40L oder OX40-OX40L.

Neben aktivierenden Signalwegen sind mehrere Kostimulatoren bekannt, die inhibitorische Signale an die T-Zelle geben können. Dazu gehören unter anderem der programmed death-1 (PD-1), das cytolytic T lymphocyte-associated Ag (CTLA-4) und der vor kurzem entdeckte B and T lymphocyte attenuator (BTLA) (12, 13, 15-21). CTLA-4 interagiert wie CD28 mit den B7-Molekülen und gibt ein inhibitorisches Signal an Effektor-T-Zellen (13). Regulatorische T-Zellen werden dagegen durch CTLA-4 aktiviert (13). PD-1 induziert in T-Zellen den programmierten Zelltod. Genetische Defekte der drei genannten inhibitorischen Kostimulatoren können mit Autoimmunerkrankungen einhergehen (12, 13, 15-21).

1.4. Die Biologie der T-Zellen

T-Lymphozyten entstehen im Thymus und werden anhand ihrer Expression unterschiedlicher Korezeptoren, von Randgruppen abgesehen, in CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen unterteilt. CD4⁺-T-Zellen werden als T-Helferzellen bezeichnet und erkennen Antigene, die von MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden. CD8⁺-T-Zellen werden auch zytotoxische T-Zellen genannt. Sie erkennen Antigene, die von MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden und sind darauf spezialisiert, infizierte körpereigene Zellen und Tumorzellen, aber auch transplantierte allogene Zellen zu lysieren. Die Vielfalt der Spezifitäten der T-Zell-Rezeptoren entsteht während der Reifung der T-Zelle im Thymus durch zufälliges Rearrangieren der für den T-Zell-Rezeptor kodierenden DNA (22-25). Dabei entstehen zwangsläufig T-Zellen, deren Rezeptor nicht effektiv mit MHC-Komplexen interagieren kann und Zellen, deren T-Zell-Rezeptor gegen körpereigene Moleküle gerichtet ist. Um diese

nutzlosen beziehungsweise gefährlichen T-Zellen zu eliminieren, existiert der Mechanismus der negativen Selektion. Dabei werden in T-Zellen, die im Thymus exprimierte MHC/Autoantigen-Komplexe nicht oder aber besonders stark binden, Signale ausgelöst, die zur Apoptose der T-Zelle führen (8, 9, 24). T Zellen, die mit diesen MHC/Autoantigen-Komplexen eine schwache bis moderate Bindung eingehen können, erhalten dagegen Überlebenssignale und werden in die Zirkulation entlassen, also positiv selektiert (8, 9, 24).

Die positiv selektierten naiven T-Zellen zirkulieren dann durch den Körper und besiedeln die sekundären lymphatischen Organe. Dort werden ihnen von APZ, unter anderen von DZ, Antigene im Komplex mit MHC-Molekülen angeboten. Um eine effektive Immunität erreichen zu können, muss eine naive T-Zelle, also eine T-Zelle, die noch niemals Antigenkontakt hatte, aktiviert werden. Dazu muss sie von der DZ zwei Signale erhalten, erstens ein antigenspezifisches Signal über die Interaktion des MHC/Peptid-Komplexes mit dem T-Zell-Rezeptor und zweitens ein antigenunspezifisches Signal über kostimulatorische Moleküle (8, 9, 24). Nachdem eine T-Zelle aktiviert wurde, proliferiert sie und beginnt sich zu differenzieren. Unter Differenzierung versteht man die Reifung zur kompetenten T-Zelle, die ohne Kostimulation auskommt, und die damit verbundene Ausbildung eines bestimmten Phänotyps, der mit einer definierten Funktion verbunden ist. Solche Phänotypen werden vor allem anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle, wie zum Beispiel der CD-Moleküle, und anhand der Produktion bestimmter Zytokine definiert (22). Diese differenzierten T-Zellen führen dann als Effektorzellen die Immunreaktion gegen spezifische Antigene. Die meisten dieser T-Zellen werden nach relativ kurzer Zeit eliminiert und sterben in der so genannten Kontraktionsphase der Immunreaktion den programmierten Zelltod (22). Einige der am besten geeigneten T-Zellen entwickeln sich jedoch zu langlebigen Gedächtniszellen weiter und bieten so die Grundlage für eine lebenslange Immunität gegen das schädigende Agens (22).

1.5. Das Paradigma der Th1/Th2-Differenzierung

Die Population der CD4+-T-Zellen ist heterogen. Nach der Aktivierung proliferieren CD4+-T-Zellen und erreichen ein Stadium der unreifen Effektorzelle, die Th0-Zelle genannt wird. Die Th0-Zelle differenziert sich zu spezialisierten T-Zellen weiter, zum Beispiel zu den Th1- und Th2-Zellen. Das Paradigma der Th1/Th2-Differenzierung wurde 1986 von Mosmann und Coffmann begründet und wird seitdem beständig herangezogen. Th1-Zellen produzieren vor allem Interferon- γ , TNF- α und IL-2. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Makrophagen und veranlassen B-Zellen, opsonierende Antikörpertypen zu produzieren, die die Phagozytose erleichtern. So überwiegt bei einer Th1- dominierten Immunreaktion vor allem die zelluläre Immunität. Krankheiten wie die Multiple Sklerose (MS), der Insulinabhängige Diabetes Mellitus (IDDM) und die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) gelten als Th1-dominiert.

Th2-Zellen produzieren vor allem IL-4, IL-5 und teilweise IL-10. Diese Zytokine wirken sehr stark aktivierend auf B-Zellen und fördern deren Produktion von neutralisierenden IgG-Isotypen und IgE, sie stärken aber auch eosinophile Granulozyten. Damit überwiegt bei Th2-Antworten die humorale Immunität, pathologische Th2-Antworten werden zum Beispiel mit Allergien und Asthma assoziiert. Th1- und Th2-Zellen können sich gegenseitig hemmen und so die Immunreaktion unter Kontrolle halten (14, 19, 26-34).

1.6. Regulatorische T-Zellen

Die Funktionsweise des adaptiven Immunsystems birgt die allgegenwärtige Gefahr der inadäquaten Immunreaktion gegen körpereigene, aber auch gegen harmlose fremde Antigene wie zum Beispiel Bestandteile der Nahrung oder inhalede Substanzen. Auch müssen notwendige Immunreaktionen gegen Krankheitserreger in engen Grenzen gehalten werden, um Kollateralschäden der Entzündungsreaktion so gering wie möglich zu halten. Die absolut

notwendige Regulation der Immunität wird zu einem bedeutenden Anteil von regulatorischen T-Zellen geleistet.

Nach Antigenkontakt in der Peripherie können, ausgehend von Th0-Zellen, sogenannte Typ-1-regulatorische T-Zellen (Tr1-Zellen) und Th3-Zellen entstehen. Tr1-Zellen können insbesondere Th1-dominierte Immunantworten sowohl über zellkontaktabhängige Mechanismen als auch über die Produktion von IL-10 hemmen. Die Entstehung von Tr1-Zellen hängt in manchen Modellen von Signalen über das kostimulierende Molekül ICOS ab. Th3-Zellen produzieren vor allem TGF- β und wirken hemmend auf Th1-Antworten und zytotoxische T-Zellen. Ob es sich bei Th3-Zellen wirklich um eine eigenständige Zellklasse handelt, ist noch umstritten (14, 19, 26-34).

Neben diesen von naiven T-Zellen ausgehenden regulatorischen T-Zellen gibt es so genannte natürliche regulatorische T-Zellen, die im Thymus entstehen und CD25, die IL-2R α -Kette, konstitutiv exprimieren. 1995 wurde von Sakaguchi zum ersten Mal gezeigt, dass CD4+CD25+-T-Zellen andere T-Zellen hemmen können (35). Diese CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen werden seitdem intensiv beforscht. Es wurde gezeigt, dass sie im Thymus positiv selektiert werden und ihre suppressive Eigenschaft von weiterem Antigenkontakt in der Peripherie abhängt (36-41). CD4+CD25+-Regulatorische T-Zellen wurden ursprünglich für anerg gehalten (42). Neue Experimente zeigen aber, dass sie in vivo und in vitro proliferieren können und deutlich sensibler auf Antigenkontakt reagieren als Effektor-T-Zellen (43). Welcher Mechanismus ihren immunsuppressiven Eigenschaften zu Grunde liegt, ist nach wie vor unklar. Er scheint allerdings von direktem Zellkontakt abhängig und nicht zytokinvermittelt zu sein. Es gilt mittlerweile als gesichert, dass CD4+CD25+-Regulatorische T-Zellen einen wesentlichen Beitrag zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz leisten und dass ihr Versagen diverse Autoimmunerkrankungen verursachen kann (43-53).

Neben diesen Zelltypen können auch Natürliche Killerzellen, CD8+-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen regulatorische Eigenschaften aufweisen (54).

1.7. Toleranz, Autoimmunität

Toleranz des Immunsystems bezeichnet die Situation, dass gegen ein Antigen keine Immunreaktion erfolgt, das Antigen wird toleriert. Manchmal versagen die Mechanismen der Immuntoleranz. Dann kann es zur Autoimmunität, bei der Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, und eventuell zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen kommen. Die potentielle Gefahr der Autoimmunität hat bereits Paul Ehrlich erkannt und in einer berühmt gewordenen Schrift als „*horror autotoxicus*“ bezeichnet.

Da das enorm große Repertoire an T-Zell-Rezeptoren durch zufälliges Rearrangieren der DNA der T-Zell-Rezeptor-Gene entsteht, bilden sich zwangsläufig T-Zellen, deren Rezeptoren gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind. Wie weiter oben beschrieben, wird ein Teil dieser autoreaktiven T-Zellen im Thymus negativ selektiert, dieser Prozess führt zur so genannten zentralen Toleranz (24). Die zentrale Toleranz ist allerdings keineswegs ausreichend, um Autoimmunität zu verhindern, da etliche körpereigene Antigene, zum Beispiel solche, die nur während der Schwangerschaft im Körper präsent sind, niemals im Thymus exprimiert werden. Auch gibt es zahlreiche harmlose körperfremde Antigene, die nicht zum Ziel einer Immunreaktion werden dürfen, so zum Beispiel die Nahrungsproteine (24). T-Zellen, die für solche Antigene spezifisch sind, entgehen der zentralen Toleranzinduktion. Es muss also notwendigerweise Mechanismen geben, die auch in der Peripherie Toleranz etablieren können (9, 55). Autoreaktive T-Zellen können durch Antigenkontakt in der Peripherie in den Zustand der Anergie gebracht werden, wenn das Antigen ohne kostimulierendes Signal präsentiert wird (9, 55). Anergie ist definiert als fehlende Reaktivität der T-Zelle selbst auf optimale Antigenstimulation. Antigenkontakt ohne Kostimulation kann unter bestimmten Bedingungen auch zur Deletion, also zum Tod durch Apoptose der T Zelle führen (3, 56-58). Unreife DZ spielen eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Anergie oder Apoptose in naiven autoreaktiven T-Zellen. Im nicht mit Erregern infizierten Organismus, ein Zustand, der in der Literatur oft als "steady state" bezeichnet wird, nehmen sie in großem Umfang Antigene und apoptotische

körpereigene Zellen auf und präsentieren von diesem Material gewonnene Peptide (7-9, 24, 59-64). Da sie keine Kostimulatoren exprimieren, bewirken sie Toleranz gegen die präsentierten Peptide und erzeugen so ein T-Zell-Repertoire in der Peripherie, das nicht von körpereigenen Antigenen aktiviert werden kann.

Eine weitere Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung peripherer Toleranz spielen die oben beschriebenen regulatorischen T-Zellen.

Experimentell kann antigenspezifische Toleranz zum Beispiel durch die orale Gabe von Antigen oder durch die Injektion von hohen Antigendosen ohne zusätzlichen Entzündungsreiz erreicht werden. Diese Antigentherapien können zur Stärkung des Kompartiments regulatorischer T-Zellen, zur Anergie und Deletion der Effektorzellen, oder, in Th1-vermittelten Immunreaktionen, zu einer Verschiebung von der Dominanz der Th1-Zellen zur Dominanz der Th2-Zellen führen (34, 65-76).

1.8. Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis

Die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), erstmals 1933 von Thomas Rivers in Affen ausgelöst, kann als Tiermodell der Multiplen Sklerose (MS) betrachtet werden (23, 77-79). Bei der EAE wird durch aktive Immunisierung mit definierten Myelinbestandteilen oder durch intravenöse Injektion von myelinspezifischen T-Zellen eine ZNS-gerichtete Autoimmunreaktion ausgelöst. Zu diesen Myelinbestandteilen gehören unter anderem das Myelin-Proteolipidprotein (PLP), das Myelin-basische-Protein (MBP) oder das Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) (80-85). Die Immunisierung mit diesen Proteinen führt zur Aktivierung von ZNS-spezifischen T-Helferzellen insbesondere vom Th1-Typ, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese der EAE spielen (84). Diese Th1-Zellen aktivieren Makrophagen und veranlassen diese, ins ZNS einzuwandern, wo sie durch freie Radikale und Zytokine die Myelinscheiden zerstören. Auch zytotoxische-T Zellen tragen zur Schädigung der Myelinscheiden bei (86, 87). B-Zellen sind nicht ursächlich an

der EAE beteiligt, Antikörper können die Erkrankung allerdings verschlimmern (88). Die EAE kann in verschiedenen Nagern und Primaten induziert werden und verläuft je nach Tierart, Stamm und verwendetem Peptid unterschiedlich. Die SJL-Maus, die in diesem Projekt verwendet wurde, ist besonders empfänglich für eine PLP-induzierte EAE (23). T-Zellen, die gegen das Epitop PLP139-151 gerichtet sind, kommen in der naiven SJL-Maus in hoher Frequenz vor (81). Ursache dafür ist die Expression einer PLP-Spleißvariante im Thymus der SJL-Maus, die dieses Epitop nicht enthält (23). Die PLP-induzierte EAE in der SJL-Maus verläuft schubförmig.

Histologisch ist die EAE durch entzündliche Infiltrate vor allem im Kleinhirn und Rückenmark gekennzeichnet, die eine Demyelinisierung, kaum aber eine Schädigung von Axonen verursachen und Lähmungen und Blasenstörungen der Mäuse bedingen.

1.9. Toleranzinduktion mit rekombinanten Invarianten Ketten

APZ sind darauf spezialisiert, beständig Moleküle und Zellfragmente aus dem Extrazellularraum aufzunehmen. Diese inkorporierten Moleküle werden lysosomal degradiert und die entstehenden Peptidfragmente im Komplex mit MHC Klasse II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Dort können sie von CD4+-T-Zellen erkannt werden. Die Invariante Kette (Ii) ist ein Protein, das an neu synthetisierte MHC Klasse II-Moleküle bindet und deren Peptidbindungsstelle besetzt. So wird verhindert, dass die MHC-Moleküle mit internen Peptiden fehlbesetzt werden. Der Teil der Ii, der den peptidbindenden Spalt des MHC-Moleküls besetzt, ist das so genannte CLIP-Fragment (class II associated invariant chain derived peptide). Die das CLIP-Fragment flankierenden Sequenzen der Ii binden fest an Teile des MHC-Moleküls, die außerhalb des Peptidbindungsspalt liegen. Dieses CLIP-Fragment wird dann im endoplasmatischen Retikulum, wo MHC II-Moleküle mit den zu präsentierenden Antigenen beladen werden, durch geeignete externe Peptide ersetzt.

Es wurde gezeigt, dass rekombinante Invariante Ketten, deren CLIP-Fragment durch ein bestimmtes Peptid ersetzt wurde, sehr effizient CD4+-T-Zellen, die spezifisch für dieses Peptid sind, stimulieren können. Diese Stimulation ist von der Anwesenheit DZ abhängig (5, 89). Solche rekombinanten Ii wurden experimentell zur Erzeugung effizienter Tumormunität genutzt (5).

In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass rekombinante Ii, deren CLIP-Fragment durch das Peptid PLP139-151 (Ii-PLP139-151) ersetzt wurde, die EAE in SJL-Mäusen, die mit PLP139-151 immunisiert wurden, vollständig unterdrücken können (89). Dazu ist eine einmalige Injektion der Ii-PLP139-151 fünf Tage nach der EAE-Induktion ausreichend.

1.10. MHC Klasse II-Tetramere

Um den Körper vor einer Vielzahl von infektiösen Erregern zu schützen, enthält das Immunsystem eine große Zahl von T-Zellen gegen unterschiedliche antigene Determinanten. Obwohl T-Helferzellen eine zentrale Stellung im Immunsystem einnehmen, war es bislang nicht möglich, T-Zellen, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind, direkt, das heißt ohne antigenspezifische Stimulation, innerhalb dieses heterogenen Repertoires zu untersuchen.

In den letzten Jahren wurde eine neue Technik entwickelt, bei der antigenspezifische T-Zellen direkt mit Hilfe von fluorochrommarkierten Tetrameren aus Peptid/MHC-Komplexen dargestellt werden können. Diese Reagenzien haben den Charakter einer antigenspezifischen Sonde, die nur an die peptidspezifischen T-Zell-Rezeptoren binden. Die Verwendung von MHC Klasse I-Tetrameren, mit denen sich spezifische CD8+-T-Zellen darstellen lassen, hat grundlegende neue Erkenntnisse über diese Zellen erbracht (90, 91). MHC Klasse II-Tetramere zur Darstellung von CD4+-T-Helferzellen sind technisch schwieriger herzustellen, und die Frequenz spezifischer CD4+-T-Zellen ist in den meisten Systemen gering. Trotzdem ist es in den letzten Jahren gelungen auch MHC Klasse II-Tetramere zu entwickeln (50, 91-96).

Für das hier vorgestellte Projekt wurden MHC Klasse II-Tetramere verwendet, die das PLP139-151-Epitop tragen, also das dominante enzephalitogene Epitop der SJL-Maus (97). Mit diesen Tetrameren ist es möglich, PLP-spezifische T-Helferzellen innerhalb eines physiologischen T-Zell-Repertoires direkt ex vivo zu untersuchen. Mit diesen Tetrameren sollen hier grundlegende Fragestellungen zum Wirkmechanismus der rekombinanten Ii, die ebenfalls das PLP139-151-Epitop trägt, untersucht werden.

1.11. Zielsetzung dieser Doktorarbeit

In dieser Arbeit wurde das Verhalten ZNS-spezifischer T-Helferzellen während der Induktion antigenspezifischer Immuntoleranz im EAE-Modell untersucht. Zu diesem Zweck wurden autoreaktive T-Zellen von SJL-Mäusen, in denen mit rekombinanten Invarianten Ketten Immuntoleranz induziert wurde, direkt ex vivo mit MHC Klasse II-Tetrameren untersucht. Die rekombinanten Invarianten Ketten und die MHC Klasse II-Tetramere trugen das selbe Epitop, mit denen die Mäuse immunisiert wurden. Um den Mechanismus der Toleranzinduktion mit der rekombinanten Invarianten Kette (Ii) zu ergründen, wurde insbesondere folgenden Fragen nachgegangen:

- Induziert die Ii-Therapie Apoptose in autoreaktiven T-Helferzellen?
- Induziert die Ii-Therapie Anergie in autoreaktiven T-Helferzellen?
- Welche Rolle spielen kostimulierende Moleküle in der Toleranzinduktion durch die Ii-Therapie?
- Welche Rolle spielen die verschiedenen Klassen regulatorischer T-Zellen in diesem Modell?
- Wie wird die Produktion inflammatorischer Zytokine durch die Ii-Therapie beeinflusst?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Tabelle der verwendeten Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller
-86°C Freezer	Forma Scientific, Inc., Marietta, Ohio, USA
ABI 7700 Sequenz Detektor System	Applied Biosystems, Darmstadt
Auflichtmikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar
Brutschrank	INCO 2 Memmert GmbH & Co.KG, Schwabach
Computer, IBM kompatibel	Fujitsu Siemens Computers, München
Computer, Power Mac	Macintosh, Cupertino, USA
Digitalkamera AxioCam HRc	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Elektrische Pipette pipetus [®] -standard	Hirschmann [®] Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt
Elisa-Reader	Bio Rad, München
Eppendorf-Pipetten (diverse Volumina und Ausführungen)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
FACSCalibur	Becton & Dickinson, Heidelberg
Glasspritzen mit Verbindungsstück Fortuna [®] Optima [®] 2 ml	Walter Graf u. Co. GmbH & Co., Wertheim
HPLC-Gerät L-7400	Merck, Darmstadt
Kühl/Gefrierkombination glassline	Liebherr-Holding GmbH, Biberach an der Riss
Kühlzentrifuge Heraeus Megafuge 1.0 R	Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau
Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotom-Kryostat Cryo-Star HM 560	Microm International GmbH, Walldorf

Material und Methoden

Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Pinzetten	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Schüttel/Mischgerät, wippend, Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
SDS Apparatur	Bio Rad, München
Sterilarbeitsbank BioGARD Hood	the Baker Company, inc., Sanford, Maine, USA
Tischzentrifuge 5414 D	Eppendorf AG, Hamburg
Transferpette [®] Pipetten (diverse Volumina und Ausführungen)	BrandTech Scientific, Inc., Essex, UK
Vortex Genie 2 [™]	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wärmebad Typ 1c	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

2.1.2. Tabelle der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Laborverbrauchsmaterial	Hersteller
15 ml Tube CELLSTAR [®]	Greiner bio-one, Frickenhausen
50 ml Tube CELLSTAR [®]	Greiner bio-one, Frickenhausen
96-well Zellkulturplatten CELLSTAR [®]	Greiner bio-one, Frickenhausen
Combitips 2,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckglas 24x50 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einmal-Pasteurpipette	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Einmalspritze (diverse Volumina)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Eppendorf Cup 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen groß, BD Falcon [®] 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube 352052	Becton Dickinson Labware Europe, Meylan, Frankreich
FACS-Röhrchen klein, Screenmates Poly Tubes 1.4 ml	MATRIX Technologies Corp. LTD, Wilmslow, Cheshire, UK

Material und Methoden

Feather Disposable Scalpel No. 21	Produkte für die Medizin AG, Köln
Glasgut (Bechergläser und ähnliches)	Schott/Duran, Mainz
Kanülen Sterican [®] (diverse Größen)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger Standard 76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger SuperFrost [®] Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen (kristall, gelb, blau)	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht
Sterilfilter Minisart [®] 0,2 µm	Sartorius AG, Goettingen
Stripette [®] 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10ml, 25 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflaschen 200 ml Costar [®]	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellsieb, BD Falcon [®] Cell Strainer 40 µm	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich
Zentrikons Mikrosep 10K Omega	Pall Life Sciences

2.1.3. Tabelle kommerziell erhältlicher Chemikalien, Medien und Enzyme

Artikel	Hersteller
β-Mercaptoethanol	Gibco TM, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
5x RT-Puffer	Promega GmbH, Mannheim
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Alkohol 96 %/Alkohol 100 %	Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen
Ammoniumsulfat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Annexin V-FITC	BD Biosciences Pharmingen, San

Material und Methoden

	Diego, USA
APS	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Aqua dest.	Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen
BCA Protein Assay Kit	Bio Rad, München
BSA Fraktion V, pH 7.0, lyophilisiert	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
CFA	Difco Laboratories, Detroit, USA
CHAPS	SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Deoxyribonuklease I (EC 3.1.21.1)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DEPC	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Diethylether	Merck, Darmstadt
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosin gelblich	Merck, Darmstadt
EUKITT [®] Eindeckmedium	O. Kindler GmbH & Co, Freiburg
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Safe	Becton & Dickinson, Heidelberg
FCS origin: South America	GibcoBRL [®] , Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Glykogen	Carl Roth GmbH & Co. KG,

Material und Methoden

	Karlsruhe
Hämatoxylin kristallin	Merck, Darmstadt
Hepes Buffer Solution 1 M	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
IMDM (1x), with 25 mM HEPES, with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Immersionsöl Micorcopy	Merck, Darmstadt
IPTG	Qiagen, Hilden
KAl(SO ₄) ₂ (Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat, Kalialaun)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kollagenase (Clostridiopeptidase A; EC 4.4.24.3)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Master Mix	Applied Biosystems, Foster City USA
Mycobacterium tuberculosis desiccated H37RA	Difco [®] , Voigt Global Distribution LLC, Kansas City, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
NaIO ₃ (Natriumjodat)	Merck, Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
NH ₄ Cl	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
PBS Dulbeccos`s, w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Sodium bicarbonate	Gibco [™] , Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Material und Methoden

Percoll™ (density 1,131 g/ml)	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Pertussis Toxin (Islet-activating protein)	LIST Biological Laboratories, Inc., Campbell, California, USA
Phenylsepharose	Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Propidiumjodid, 95%	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Proteinleiter P77085	BioLabs, Frankfurt
Random Hexamer	Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, Kalifornien, USA
Reverse Transkriptase	Promega GmbH, Mannheim
Rnasin	Promega GmbH, Mannheim
SDS	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Streptomycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TEMED	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound Einbettmedium	Sakura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, Niederlande
Triton X-114	SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
Trisplex® III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Trizol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Vectashield Mounting Medium for	Vector Laboratories, Inc.,

Fluorescence	Burlingame, USA
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

2.1.4. Tabelle der verwendeten Antikörper

Alle Antikörper wurden von BD Biosciences bezogen.

Antigen	Klon	Fluoreszenz	Konzentration
Caspase-3	Polykl.	PE	
B220	RA3-6B2	PE	0,1 mg
CCR5	C34-3448	PE	0,2 mg
CD 4	GK1.5	FITC	0,5 mg/ml
CD 4	GK1.5	PE	0,2 mg/ml
CD 4	RM4-5	APC	0,2 mg/ml
CD 8a	53-6.7	PE	0,2 mg/ml
CD 16/CD 32	2.4G2	-	0,5 mg/ml
CD 25	7D4	FITC	0,5 mg/ml
CD 44	IM7	FITC	0,5 mg/ml
CD 69	H1.2F3	FITC	0,5 mg/ml
CD 62L	Mel-14	FITC	0,2 mg
CD 152	UC10-4F10-11	PE	0,1 mg/ml
CD 154	MR1	PE	0,2 mg/ml
ICOS	7E.17G9	PE	0,2 mg/ml
IFN- γ	XMG1.2	PE	0,1 mg/ml
IL-4	BVD4-1D11	PE	0,1 mg/ml

2.1.5. Sequenzen der verwendeten Primer

mRNA	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
18sRNA	5'- CGGCTACCACATCCAAGGAA -3'	5'- GCTGGAATTACCGCGGCT -3'
BTLA	5'-ACTTGGCTGCTTTACACCTTGC-3'	5'-AGGCTTCTTTTCTTTCCCTTGG-3'

Foxp3	5'-CAGCTGCCTACAGTGCCCCTAG-3'	5'-CATTGGCCAGCAGTGGGTAG-3'
IL-10	5'-CATCATGTATGCTTCTATGC-3'	5'-TACCTGGTAGAAGTGATGCC-3'
TGF-β	5'-TGACGTCACCTGGAGTTGTACGG-3'	5'-GGTTCATGTCATGGATGGTGC-3'
Tim-1	5'-CATACTGCTTCTCCCAGGCACT-3'	5'-CATGTCGTTGTGATTCCACGAT-3'
Tim-3	5'-GCCGGTGGACCTCAGTTTC-3'	5'-TGGGAGCCAGCACAGATCA-3'

2.1.6. Zusammensetzung der verwendeten Puffer

2.1.6.1. LB-Medium

50g Casein-Pepton
 25g Hefeextrakt
 50g NaCl

Mit H₂O auf 5l auffüllen, pH=7,0 einstellen

2.1.6.2. Lyse-Puffer:

Urea 8,0 M 240.0 g
 1M TrisCl 10 mM 5,0 ml
 1M NaH₂PO₄ 0,1 M 50,0 ml
 1M Imidazol 5,0 mM 2,5 ml

Add H₂O to 500 ml, pH=8,0

2.1.6.3. Wasch-Puffer:

Urea 8,0 M 240.0 g
 1M TrisCl 10 mM 5,0 ml
 1M NaH₂PO₄ 0,1 M 50,0 ml
 1M Imidazol 20,0mM 10,0 ml

Add H₂O to 500 ml, pH=8,0

2.1.6.4. Wasch-Puffer (Triton X-114, Citrat):

Urea	8,0 M	240.0 g
1M TrisCl	10 mM	5,0 ml
1M NaH ₂ PO ₄	0,1 M	50,0 ml
1M Imidazol	20,0mM	10,0 ml
Triton X-114	1,5 %	7,5 ml
Citrat	50mM	5,0 g

Add H₂O to 500 ml, pH=8,0

2.1.6.5. Wasch-Puffer (CHAPS):

Urea	8,0 M	240.0 g
1M TrisCl	10 mM	5,0 ml
1M NaH ₂ PO ₄	0,1 M	50,0 ml
1M Imidazol	20,0mM	10,0 ml
CHAPS	1%	5,0 g

Add H₂O to 500 ml, pH=8,0

2.1.6.6. Elutions-Puffer:

Urea	8,0 M	48.0 g
1M TrisCl	10 mM	1,0 ml
1M NaH ₂ PO ₄	0,1 M	10,0 ml
1M Imidazol	300,0mM	30,0 ml

Add H₂O to 100 ml, pH=7,5

2.1.6.7. Lade-Puffer (SDS-Page)

H ₂ O _d	3,8 ml
-------------------------------	--------

0,5M TrisCl, pH6,8	1,0 ml
Glycerol	0,8 ml
SDS 10%	1,6 ml
2Mercaptoethanol	0,4ml
Bromphenolblau 1%	0,4ml

2.1.6.8. Lauf-Puffer 5-fach konzentriert (SDS-Page)

Trisbase	9,0 g
Glycin	43,2 g
SDS 10%	30 ml

Add 600 ml H₂O, pH=8,5 einstellen

2.1.6.9. HIC-Bindungspuffer

TrisCl	50 mM
Methanol	5% (V/V)
Ammoniumsulfat	1,5 mM

PH=7,5

2.1.6.10. HIC-Elutionspuffer

TrisCl	50 mM
Methanol	5% (V/V)

PH=7,5

2.1.6.11. Erythrozyten-Lyse-Puffer 10-fach konzentriert

45 g	NH ₄ Cl
------	--------------------

5 g KHCO_3

185 mg EDTA

Mit H_2O auf 500ml auffüllen und pH=7,3 einstellen

2.1.6.12. Komplettes IMDM

100 ml IMDM

10 ml FCS, inaktiviert

2 ml Penicillin/Streptomycin (100x, ergibt Endonz. von 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

60 μl β -Mercaptoethanol aus einer 1:100 Verdünnung mit PBS

2.1.6.13. ZNS-Verdau-Lösung

(Mengenangaben für 4 Gehirne)

20 ml IMDM

200 μl DNase I (aus einer 3000 U/ml-Verdünnung, entspr. 30 U/ml)

20 mg Kollagenase (entspr. 1 mg/ml)

2.1.6.14. Percollfraktionen für Dichtegradienten

Percoll[®] Dichte A (1,095 g/ml) für 4 Gehirne:

10 ml Percoll[®]

3,68 ml PBS

Percoll[®] Dichte B (1,030 g/ml) für 4 Gehirne:

3 ml Percoll[®]

10 ml IMDM

2.1.6.15. FACS-Puffer

(Mengenangaben gelten für 200 ml Puffer)

1 g BSA (entspr. 0,5 %)
0,04 g NaN₃ (entspr. 0,02 %)
0,067 g EDTA (entspr. 0,9 mM)

Mit PBS auf 200 ml auffüllen und pH=7,4 einstellen

2.1.6.16. Hämalaun nach Mayer

1g Hämatoxylin kristallin wird vollständig über Nacht in 300 ml Aqua dest. aufgelöst. Nach vollständiger Lösung wird weiter zugegeben:

200 mg NaIO₃
50 g KAl(SO₄)₂
50 g Chloralhydrat
1 g Zitronensäure-Monohydrat

Lösung umrühren und über Nacht stehen lassen. Die Lösung wird über einen Faltenfilter filtriert und anschließend mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.

2.1.6.17. Eosin

0,1g Eosin gelblich wird in 90%-igem Alkohol gelöst und 1 Tropfen Eisessig zugegeben.

2.1.7. Peptide

Folgende Peptide wurden verwendet :

MBP 84-96	VVHFFKNIVTPRTP
PLP 139-151	HCLGKWLGHPDKF

2.1.8. Versuchstiere

Die Mäuse vom Stamm SJL/JHanHsd wurden von Harlan Winkelmann (Borchen) bezogen. Es wurden nur weibliche, 6-10 Wochen alte Mäuse verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Produktion rekombinanter Invarianter Ketten

2.2.1.1. Transformation der Vektoren in E. coli

Die cDNA für die li-Konstrukte wurde in pQE 31-Vektoren (tragen ein Gen für Ampicillin-Resistenz) kloniert. Diese Vektoren wurden mir von Dr. Bischof und Dr. Wienhold, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Für die Transformation wurde 1 µg von diesen Vektoren zu 20 µl kompetenten Zellen des Kanamycin-resistenten Bakterienstammes M15(pREP4) gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend folgte ein Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C, darauf wurden die Zellen wieder für 2 Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden dann für 1 Stunde in 100 µl LB-Medium inkubiert und anschließend auf einer Agarplatte, die Ampicillin und Kanamycin enthielt, ausplattiert und ü. N. bei 37°C vermehrt.

2.2.1.2. Expression und Aufreinigung der Invarianten Ketten

Eine Einzelkolonie der transformierten Bakterien wurde ü. N. in 100 ml LB-Medium, das 200 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Kanamycin enthielt, bei 37°C im Bakterenschüttler (200 rpm) inkubiert. Mit diesen 100 Millilitern wurden am folgenden Tag 5 l LB-Medium (+200µg/ml Amp. und 25µg/ml Kan.) angeimpft und die Bakterien bis zu einer OD600 von 0,5 vermehrt. Dann wurde die Expression der li-Konstrukte mit IPTG (Endkonzentration 2mM) induziert. Nach

weiteren 3 Stunden Wachstum wurde das Protein geerntet. Dazu wurde die Bakteriensuspension 20 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

Die Bakterienpellets wurden darauf in 100 ml Lyse-Puffer resuspendiert und 1 Stunde bei RT mit dem Magnetrührer gerührt. Die Zellsuspension wurde dann auf Eiswasser Ultraschallwellen für 12 x 10 Sekunden mit jeweils 10 Sekunden Pause und einer Pulsdauer von 50% ausgesetzt. Anschließend wurde die aufgeschlossene Zellsuspension 30 Minuten bei 10000 g bei 4°C zentrifugiert und der Überstand zu 6 ml Ni-NTA-Agarose gegeben. Der mit Ni-NTA-Agarose versetzte Überstand wurde dann 1 Stunde bei RT im Taumelschüttler gemischt. Die Ni-NTA-Agarose konnte so die li-Konstrukte binden und wurde in eine Chromatographiesäule mit Drei-Wege-Hahn überführt.

Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose von unspezifisch gebundenem Protein und LPS gereinigt. Dazu wurde mit 50 ml Lyse-Puffer, dann mit 100 ml Wasch-Puffer (Triton X-114 + Citrat), dann mit 100 ml Wasch-Puffer (CHAPS) und schließlich mit 100 ml Wasch-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Invarianten Ketten mit 20 ml Elutions-Puffer eluiert.

Die eluierten Proteine wurden anschließend gegen 1 l PBS, dass 4-mal nach jeweils mindestens 6 Stunden gewechselt wurde, dialysiert und dann mit Zentrifugons bei 2500 rpm aufkonzentriert.

2.2.1.3. Proteinbestimmung

Die Konzentration der li-Konstrukte wurde mit dem BCA Protein Assay Kit gemessen. In jeweils ein Well einer Mikrotiterplatte wurden 10 µl einer Proteinlösung (1:10 mit H₂O verdünnt) vorgelegt und 200 µl der Reaktionslösung (50 Teile Reagenz A und 1 Teil Reagenz B) zugegeben, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 540 nm im Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Es wurde jeweils eine Eichkurve mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0,02 - 2 mg/ml mitgeführt und daraus die Proteinkonzentration berechnet.

2.2.2. Reinheitskontrolle

Die Reinheit der li-Konstrukte wurde mittels SDS-Gelelektrophorese und hydrophober Interaktionschromatographie kontrolliert.

2.2.2.1. SDS-Gelelektrophorese

Die Eluate der Ni-NTA-Agarose-Säule wurden elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt. Es wurden 5%ige Sammel- und 10%ige Trenngel verwendet. Die Proben wurden mit 1/4 Vol. Lade-Puffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und 60 Minuten bei 130 Volt getrennt. Zum Abgleich des Molekulargewichtes wurde eine Proteinleiter verwendet. Die rekombinanten li-Moleküle haben ein Molekulargewicht von etwa 18kDa. Die Gele wurden anschließend für 20 Minuten in Coomassie-Brillant-Blau-Lösung gefärbt und in Entfärbelösung wieder entfärbt.

Acrylamidgele:

	Sammelgel	Trenngel
Aqua dest.	6,1ml	3,35ml
1,5M TrisHCl, pH=8	2,5 ml	2,5 ml
SDS 10%	100 µl	100 µl
Acrylamid 30%	1,33 ml	4 ml
APS 10%	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

2.2.2.2. Hydrophobe Interaktionschromatographie

Bei der HIC werden Proteine nach ihrer Bindungsaffinität an hydrophobe Matrices aufgetrennt. Diese Methode erbrachte bei der Auftrennung der li-Konstrukte, möglicherweise wegen deren hohen isoelektischen Punktes von etwa 8,5, bessere Ergebnisse als Kationen- oder Anionenaustausch-

chromatographie. Es wurde eine Glassäule verwendet, die individuell beladen werden konnte. Als stationäre Phase wurde Phenylsepharose verwendet. Die li-Konstrukte wurden bei einer Laufzeit von 30 Minuten und einem Fluss von 1 ml / Minute getrennt, wobei das Verhältnis des Bindungs- zum Elutionspuffer kontinuierlich gesenkt wurde. Als Bindungspuffer wurde ein Ammoniumsulfat-Puffer eingesetzt.

2.2.3. Kultur von T-Zellen zur Titration der Tetramere

Die Mäuse wurden 10 Tage nach Immunisierung durch CO₂-Inhalation getötet, ihre DLN entnommen und diese in 5 ml PBS mit dem Stempel einer sterilen 2 ml-Spritze in einem Nylonsieb mit einer Maschenweite von 40 µm über einem 50 ml-Röhrchen zerdrückt. Die Lymphozyten wurden mit 5 ml PBS ins Röhrchen gespült und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml IMDM mit 10 % FCS und 10 µg/ml Penicillin/Streptomycin aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Danach wurde die Suspension auf eine Konzentration von 3 Millionen Zellen pro ml gebracht und das PLP139-151-Peptid zugegeben, so dass eine Peptidkonzentration von 10 µg/ml erreicht wurde. Von dieser Lösung wurden je 2 ml in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Nach 4 Tagen wurde IL-2 in einer Konzentration von 20U/ml zugegeben. Nach 2 Wochen wurden die Lymphozyten mit den Zellen einer Milz restimuliert. Dafür wurde die Milz mit 30 Gray bestrahlt. Die APZ der Milz wurden in einem Verhältnis von 5:1 zu den T-Zellen gegeben. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ bei schräggestellter Platte, damit sich die Zellen an einer Stelle sammeln.

Mit diesen T-Zellen wurden die Tetramere zur Optimierung der Färbekonzentration titriert.

2.2.4. Kultur von Gliomzellen

Die Gliomzellen (LN18) wurden in Stocks bei -80°C in einer Lösung bestehend aus 10% DMSO, 20% FCS und 70% DMEM gelagert. Die Gliomzellen wurden

in DMEM-Medium, das 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin enthielt, kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet. Dafür wurden die Zellen mit Medium gewaschen und mit Trypsin inkubiert, bis sie abgelöst waren, und schließlich in frischem Medium auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.5. Apoptoseinduktion in Gliomzellen

Zur Apoptoseinduktion wurden Gliomzellen 2 Stunden mit Fas-Liganden (20U/ml) inkubiert. Die Fas-Liganden wurden mir freundlicherweise von Dr. Wischhusen, Universität Tübingen, überlassen. Teilweise wurden die Gliomzellen simultan mit Fas-Liganden und Caspase-Inhibitoren (1:100, zVAD-fmk) inkubiert, um die Apoptose durch die Caspase-Kaskade zu hemmen und so eine Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose treffen zu können.

2.2.6. Induktion der EAE

Zur Induktion der EAE wurden die Mäuse mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion des PLP139-151-Peptids oder MBP-Peptids in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) immunisiert. CFA wurde aus inkomplettem Freund'schen Adjuvans hergestellt, das mit inaktiviertem Mycobacterium tuberculosis in einer Konzentration von 4 mg / ml versetzt wurde. 1 ml dieses CFA wurde mit 1 ml PBS, in dem 1,54 mg PLP139-151-Peptid gelöst waren, in einer 2 ml Glasspritze zu einer Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde nach sorgfältigem Durchmischen verwendet.

Die Immunisierung wurde an mit Diethylether narkotisierten Mäusen durchgeführt. Jede Maus erhielt in jeden ihrer Hinterläufe 50 µl der Wasser-in-Öl-Emulsion s. c. injiziert. Nachdem die Mäuse aus der Kurznarkose erwachten, wurden sie mit einer Infrarotwärmelampe bestrahlt, damit sich die Venen im Mausschwanz erweiterten. Mit einer feinen Nadel wurde eine Schwanzvene punktiert und 100 µl Pertussistoxinlösung injiziert. Das PTX wurde in PBS

gelöst, die Menge des benötigten PTX durch Vorversuche bestimmt, da jede Charge PTX eine unterschiedliche Potenz zur EAE-Induktion hat.

Bei diesem Immunisierungsschema erhielt jede Maus 77µg Peptid und zwischen 50 und 300 ng PTX.

2.2.7. Injektion der li-Moleküle

Die li-Moleküle wurden in PBS soweit verdünnt, dass die gewünschte Menge in 100 µl PBS gelöst war. Diese Lösung wurde den Tieren dann in die mit Wärmebestrahlung dilatierten Schwanzvenen gespritzt. Wenn im Folgenden nicht anders vermerkt, wurden 20 nmol der li-Konstrukte an Tag 5 nach der EAE-Induktion injiziert.

2.2.8. Klassifizierung des Krankheitsgrades

Folgende Krankheitsgrade wurden bei entsprechenden Symptomen vergeben:

Grad 0	keine Krankheitssymptome
Grad 1	Lähmung des Mausschwanzes oder Parese der Hinterläufe
Grad 2	Lähmung des Mausschwanzes und Parese der Hinterläufe
Grad 3	Plegie der Hinterläufe
Grad 4	Plegie der Hinterläufe, Parese der Vorderläufe
Grad 5	Tod durch EAE

2.2.9. FACS-Analysen mit Antikörpern und Tetrameren

2.2.9.1. Präparation von DLN, Milz und ZNS

Die Mäuse wurden direkt vor der Präparation durch CO₂-Gas-Inhalation getötet. Die Mäuse wurden dann mit dem Rücken nach unten auf ein Korkbrett

gespannt und mit 70% Alkohol besprüht. Die Haut wurde nun so eröffnet, dass Brustkorb, Bauch und Kniekehlen der Maus zugänglich waren. In der Poplitealregion konnten dann die drainierenden Lymphknoten erkannt werden, die mit zwei spitzen Pinzetten stumpf präpariert wurden. Anschließend wurde die Milz nach der Eröffnung der Bauchhöhle entnommen. Um Lymphozyten der Zirkulation aus dem ZNS zu entfernen, wurden die Mäuse vor der Präparation des ZNS blutleer gemacht. Dazu wurde die vordere Thoraxwand mit einer Schere entfernt und der linke Ventrikel des Herzens mit PBS in einer 20 ml Spritze perfundiert. Die Maus wurde nun auf den Bauch gedreht und die Haut über Schädel und Spinalkanal eröffnet. Mit einem Skalpell wurden Schädelkalotte und Spinalkanal geöffnet und das ZNS am Stück stumpf herausgeschält.

2.2.9.2. Isolierung der Lymphozyten aus den DLN und der Milz

DLN und Milz wurden mit dem Stempel einer 2 ml Spritze durch ein Zellsieb mit einer Maschenweite von 40 µm in ein 50 ml-Falcon-Tube gepresst und in PBS resuspendiert. Die Suspension wurde 5 Minuten bei 1200 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen der Lymphknoten wurden dann in komplettem IMDM-Medium resuspendiert und auf Eis gelagert. Die Zellen der Milz wurden zuvor einer Erythrozyten-Lyse unterzogen. Dafür wurden die Zellen für 10 Minuten in 5 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer auf Eis inkubiert, anschließend wieder zentrifugiert und der hämolytische Überstand verworfen. Dann wurden auch die Milzzellen in komplettem IMDM-Medium resuspendiert.

2.2.9.3. Isolierung der Lymphozyten aus dem ZNS

Das intakte ZNS wurde zweimal mit PBS gewaschen, um Blutreste zu entfernen, mit einem Skalpell in einer Glaspetrischale zerkleinert und mit 5 ml Verdauungslösung in einem 50 ml-Falcon-Tube vermischt. Das ZNS wurde dann 60

Minuten bei 37°C im Wasserbad verdaut. Das verdaute ZNS wurde mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb mit 40 µm Maschenweite gepresst. Die Zellsuspension wurde dann zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen einer Erythrozyten-Lyse unterzogen. Die im Pellet verbleibenden Lymphozyten wurden aus den Massen an Hirngewebe mit einer Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dafür wurde die Zellsuspension in 3 ml der Fraktion B (geringere Dichte) gelöst und in ein 15 ml-Falcon-Tube übertragen. Unter diese Fraktion wurden anschließend 3 ml der dichteren Fraktion A unterlegt. Dieser Dichtegradient wurde für 30 Minuten bei 2500 rpm und abgeschalteter Zentrifugenbremse zentrifugiert.

Die Lymphozyten lagern sich während des Zentrifugierens auf der Grenzschicht zwischen den beiden Phasen ab, während das fettreiche Hirngewebe ganz nach oben wandert. Mit einer Einmalpipette wurden die Lymphozyten dann von der Grenzschicht aufgesogen.

Die Zellen wurden anschließend in 5 ml IMDM in einem 15 ml-Tube resuspendiert, abzentrifugiert und nochmals mit 5 ml komplettem IMDM gewaschen, da Percoll zytotoxisch ist. Nach dem Abgießen wurden die Zellen in 350 µl komplettem IMDM resuspendiert. Direkt vor der FACS-Messung wurde zur Abgrenzung von nekrotischen und toten Zellen jeweils 50 ng PI pro FACS-Röhrchen zugegeben.

2.2.9.4. Bestimmung der Lymphozytenzahl

Die absolute Anzahl der aus den jeweiligen Organen isolierten Lymphozyten wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt und damit die Neubauer-Zählkammer befüllt. Es wurden unter dem Auflichtmikroskop 16 große Quadrate auszählt.

Die Konzentration an Zellen pro Milliliter wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c = Z \cdot f \cdot 10000 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

Hierbei steht Z für die Zellzahl in 16 großen Quadraten und f für den Verdünnungsfaktor.

2.2.9.5. Färbung der Lymphozyten mit MHC Klasse II-Tetrameren und Antikörpern

Für jede FACS-Analyse wurden 500.000 Lymphozyten pro Well verwendet. Diese Lymphozyten wurden in Mikrotiterplatten in 20 µl komplettem IMDM resuspendiert und mit der in Vorversuchen an T-Zelllinien titrierten optimalen Menge an PLP- beziehungsweise MBP-Tetrameren gefärbt. Die Mikrotiterplatte wurde dann lichtgeschützt über Nacht bei 4°C im Kühlischihrank inkubiert um eine vollständige Bindung der Tetramere an die T-Zell-Rezeptoren zu erreichen. Am darauf folgenden Tag wurden zunächst die FcγIII- und FcγII-Rezeptoren mit 2 µl eines 1:2500 verdünnten CD16/CD32 (FcγRII / FcγRII) Antikörpers geblockt (10 Minuten Inkubation bei 4°C). Darauf wurden die Antikörper gegen Zelloberflächenstrukturen zugegeben, so dass diese eine Endkonzentration von 1:300 erreichten (Inkubation 20 Minuten bei 4°C). Abschließend wurden die Zellen zweimal mit je 100 µl FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und in 1,4 ml FACS-Röhrchen überführt.

2.2.9.6. Färbung der Lymphozyten mit Tetrameren und Antikörpern gegen intrazelluläre Strukturen

Nach der ü. N.-Färbung mit Tetrameren wurden die Lymphozyten zunächst mit Antikörpern gegen CD4 nach obigem Protokoll gefärbt. Daraufhin wurden die Zellen zur Fixierung in 100 µl Cytifix/Cytoperm® für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 250 µl Wash/Perm® wurden die Lymphozyten mit Antikörpern gegen intrazelluläre Antigene gefärbt. Dafür wurden die Lymphozyten in 20 µl Wash/Perm® resuspendiert und die

Antikörper in einer Konzentration von 1:100 eingesetzt, 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend zweimal mit Färbe-Puffer gewaschen.

2.2.9.7. FACS-Messung und Auswertung der FACS-Daten

Für die anschließende FACS-Messung wurde ein FACS-Calibur-Zytometer verwendet, das vier verschiedene Fluoreszenzen (FITC, PE, PI, APC) messen kann. Einstellungen, Messungen und Datenspeicherung wurden über die Software CellQuest auf einem G3 Macintosh vorgenommen. Über die Vorwärtsstreuung (FSC) und Seitwärtsstreuung (SSC) konnten Aussagen über Größe und Granularität der Zellen und somit über deren Entität und Entwicklungsstufe gemacht werden, über die Fluoreszenzintensität über die Antikörperbindung. Die gewonnenen Daten wurden mit dem Freeware-Programm WinMDI[®] Version 2.8 (Internetadresse: <http://facs.scripps.edu>) und mit Microsoft Excel ausgewertet.

2.2.10. Quantitative Bestimmung spezifischer mRNA mit Echtzeit-PCR

2.2.10.1. Präparation der RNA

Die Gesamt-RNA aus den DLN und der Milz wurde mit der Trizol-Methode isoliert.

Die Organe wurden nach der Entnahme sofort zerkleinert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Verwendete Glasgeräte und Spatel wurden bei 200°C gebacken, alle verwendeten Lösungen steril angesetzt und mit DEPC (0,01%) versetzt. Zum schockgefrorenen Gewebe wurden 1 ml Trizol und 5µl Glykogen gegeben und gemischt. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, geschüttelt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Zentrifugation bei 13.000 rpm über 4 Minuten wurde der wässrige Überstand entnommen und in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Darauf wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben, die Proben gemischt und 10 Minuten

bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13.000 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurde das Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, anschließend luftgetrocknet, in 22,5 µl Wasser (DEPC) resuspendiert und bei 60°C während 10 Minuten gelöst.

2.2.10.2. Konzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der RNA-Proben zu messen, wurden diese adäquat verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt. Mit diesem Verfahren wird auch gleichzeitig die Verunreinigung der Probe mit Proteinen quantifiziert und so die Qualität der RNA-Extraktion überprüft. Einer A_{260} -Einheit entsprechen dabei 40 µg RNA/ml.

2.2.10.3. Reverse-Transkriptase-Reaktion

Die isolierte RNA wurde dann mit reverser Transkriptase (MMLV) in cDNA umgeschrieben.

Es wurden 2,5 µg RNA in 21,5 µl Wasser (DEPC) gegeben. Als Primer wurden 2,0 µl Random-Hexamer zugegeben und für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde folgender Reaktionsansatz zu den Proben gegeben:

Reaktionsansatz:	5xRT-Puffer	10,00µl
	dNTP (10mM)	10,00µl
	Rnasin	0,25µl
	MMLV	1,00µl
	H ₂ O	5,25µl

Die Proben wurden nun 10 Minuten bei RT inkubiert, dann während 50 Minuten bei 42°C in die cDNA umgeschrieben und die Reaktion durch anschließende Inkubation bei 70°C für 15 Minuten inaktiviert.

2.2.10.4. Real-Time-PCR mit SYBR-Green®

Die Real-Time-PCR ermöglicht die Quantifizierung der Menge an mRNA-Transkripten eines bestimmten Gens, nachdem die mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. Im Gegensatz zur konventionellen PCR ist dabei die Messung der Menge des Amplifikationsproduktes während jedes einzelnen Zyklus der PCR möglich. Hier wurde der Nachweis der Amplifikate mit dem SYBR®-Green-Assay durchgeführt. Primer wurden mit dem Programm Primer Express Version® 2.0 von Applied Biosystems konstruiert, die RT-PCR mit dem ABI 7700 Sequenz Detektor System von Applied Biosystems durchgeführt. Da der SYBR-Green®-Farbstoff unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, wurden die sequenzspezifischen Primer wenn möglich so konstruiert, dass sie zwei Exons der kodierenden DNA überlappen. So wurde verhindert, dass kontaminierende amplifizierte DNA das Messergebnis verfälschten. Außerdem wurde jede gemessene Probe anhand der Schmelzkurve auf unspezifische Amplifikationsprodukte überprüft. Die Primer hatten eine Länge von etwa 20 Basenpaaren, die Amplikons eine Länge von etwa 100 bis 120 Basenpaaren. Jede cDNA-Probe wurde doppelt gemessen, um Pipettierfehler zu erkennen. Außerdem wurde für jeden Primer eine Template-freie Probe mitgemessen, und zusätzlich eine Probe, der während des reverse-Transkriptase-Reaktionszyklus kein MMLV-Enzym zugegeben wurde. Mit diesen Kontrollen konnte die Qualität vorangegangener Arbeitsschritte objektiviert und das Ausmaß an Verunreinigung quantifiziert werden. Die relative Menge an mRNA-Transkripten wurde, gemäß den Instruktionen des Herstellers Applied Biosystems, auf die Menge an mRNA-Transkripten der 18sRNA bezogen und dann als relative Differenz bezogen auf einen Kallibrator (Milz einer naiven Maus) ausgedrückt.

Folgender Reaktionsansatz wurde für eine Reaktion der RT-PCR pipettiert:

2x Master Mix	10µl
10µM Vorwärts-Primer	1,2µl
10µM Rückwärts-Primer	1,2µl

H₂O 2,6µl

Zu diesen 15 µl Reaktionsansatz wurden 5 µl cDNA in einer Verdünnung von 1:100 gegeben.

Folgendes Temperaturprofil wurde für die RT-PCR verwendet:

1x 95°C, 10 Minuten

40x 95°C, 15 Sekunden (Denaturierung) dann 60°C, 1 Minute (Annealing)

2.2.11. Histologie

2.2.11.1. Herstellung von Gefrierschnitten

Alle histologischen Untersuchungen wurden an Gefrierschnitten durchgeführt. ZNS und Rückenmark wurden den getöteten Mäusen sorgfältig am Stück entnommen, nachdem die Maus mit 20 ml PBS über den linken Herzventrikel perfundiert worden war. Das ZNS der Maus enthält dann keine Lymphozyten der Zirkulation. Die entnommenen Gewebe wurden sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die tiefgefrorenen Gehirne wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

Insbesondere wurden Rückenmark und Kleinhirn untersucht, da vor allem dort entzündliche Läsionen in unserem EAE-Modell zu finden sind.

Im ersten Schritt wurde das Gewebe entsprechend der gewünschten Schnittrichtung auf einem Metallobjektträger bei -20°C im Kryostat mittels Tissue-Tek[®]-Einbettmedium aufgeblickt. Vor dem Schneiden wurde das Gewebe im Block auf -20°C erwärmt. Der Objektträger wurde in die entsprechende Halterung eingesetzt, über die das Gewebe stets auf einer Temperatur von -13°C gehalten wurde. Als Temperatur des Messers wurde -19°C gewählt. Für HE-Färbungen wurden Schnitte mit einer Dicke von 9 µm angefertigt, für Immunfluoreszenzfärbungen Schnitte von 6 µm Dicke. Diese Schnitte wurden für die HE-Färbung auf einen Standardobjektträger übertragen, für Immunfluoreszenzfärbungen auf SuperFrost[®]-Plus-Objektträger.

2.2.11.2. Durchführung der HE-Färbung

Folgende Färbeschritte wurden für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung durchgeführt:

Hämalaun	5 Minuten
fließendes Leitungswasser	5 Minuten
Eosin	15 Sekunden
Alkohol 96 %	10 Sekunden
Alkohol 96 %	10 Sekunden
Alkohol 100 %	10 Sekunden
Alkohol 100 %	5 Minuten
Xylol 100 %	5 Minuten
Xylol 100 %	5 Minuten
Xylol 100 %	5 Minuten

Anschließend wurden die Objektträger mit Deckgläsern unter Verwendung des Eindeckmediums Eukitt[®] eingedeckelt.

2.2.11.3. Immunfluoreszenzfärbungen

Die Schnitte auf den Objektträger wurden bei -20°C für 10 Minuten mit Aceton fixiert. Nach Fixierung wurden die Schnitte 30 Minuten bei RT luftgetrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit den Antikörpern für 30 Minuten bei RT in einer feuchten Dunkelkammer inkubiert. Dazu wurden 100 μl einer Lösung mit DAPI und den gewünschten Antikörpern auftragen. DAPI, das an DNA bindet, dient zur Darstellung der Zellkerne. DAPI wurde in einer Konzentration von 1:5000 eingesetzt, alle anderen Antikörper in einer Konzentration von 1:50. Als Puffer für diese Antikörperlösung und für alle folgenden Waschschrte wurde PBS mit einem Zusatz von 0,1 % BSA verwendet.

Nach erfolgter Färbung wurden die Schnitte zweimal für 5 Minuten in einem bewegten Bad in oben genanntem Puffer gewaschen und anschließend mit dem Eindeckmedium Vectashield eingedeckelt und mit farblosem Nagellack umrandet.

2.2.11.4. Digitalisierung der Schnitte

Die fertigen Schnitte wurden mit einem Mikroskop des Typs Axioplan 2, welches ebenfalls die Möglichkeit der Fluoreszenzmikroskopie bietet, durchgemustert und mit der am Mikroskop installierte Digitalkamera AxioCam HRc digital fotografiert (Auflösung 1300x1300 Pixel) und über das zum Mikroskop gehörende Steuer- und Bildbearbeitungsprogramm AxioVision (Version 3.1.2.1., Carl Zeiss Vision GmbH) archiviert. Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden dabei mit den Kanälen DAPI, FITC und Cy-3 gemessen.

Die Firma Zeiss liefert als Freeware die vereinfachte Bildbetrachtungssoftware AxioVision Viewer 3.0, mit deren Hilfe die Bilder nachbearbeitet wurden.

2.2.11.5. Statistik

Relevante Ergebnisse wurden mit einem statistischen Testverfahren auf Signifikanz getestet. Dabei wurde teilweise der Student-t-Test für zwei Stichproben unter Annahme gleicher Varianzen gewählt, teilweise bei ungleichen Varianzen der Welch-Test (Fig. 14, 19). Zur Prüfung auf gleiche Varianzen wurde in Fig. 19 der Bartlett-Test angewendet. Die Prozentwerte in Fig. 14 wurden nach einer Logittransformation mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Dosis-Wirkungs-Beziehung der li-PLP139-151

3.1.1. Die intravenöse Injektion von li-PLP139-151 nach der EAE-Induktion kann den Ausbruch der Krankheit vollständig verhindern

SJL-Mäuse, die subkutan mit dem PLP139-151-Peptid im CFA immunisiert werden und zusätzlich Pertussistoxin intravenös injiziert bekommen, entwickeln nach 9 bis 12 Tagen klinische Zeichen der EAE. Nach 12 bis 14 Tagen wird ein Maximum an Symptomen erreicht mit einer vollständigen Paralyse der hinteren Extremitäten und einer deutlichen Parese der vorderen Extremitäten. Etwa 20 Tage nach der Krankheitsinduktion sind die Symptome weitgehend abgeklungen, wobei Residuen verbleiben können. Dieser Krankheitsverlauf ändert sich bei SJL-Mäusen, denen fünf Tage nach Immunisierung der Wildtyp der Invarianten Kette (li-CLIP) intravenös injiziert wird, nicht signifikant. Demgegenüber bleiben SJL-Mäuse, denen fünf Tage nach Immunisierung li-PLP139-151 intravenös gespritzt werden, vollständig frei von den Symptomen der EAE. Fig. 1 demonstriert diesen Krankheitsverlauf gemittelt von jeweils fünf Mäusen pro Gruppe, das entspricht einem von drei repräsentativen Experimenten.

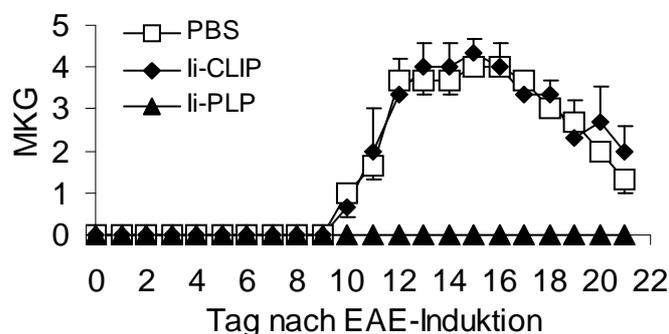


Fig. 1: Verlauf der EAE mit und ohne Toleranzinduktion mit rekombinanten Invarianten Ketten (li-PLP139-151 bzw. li-CLIP). MKG = mittlerer Krankheitsgrad.

3.1.2. In der Proliferationsphase der EAE genügt eine geringere Dosierung der li-PLP139-151 zur EAE-Suppression als in der Effektorphase

Fünf Tage nach der Immunisierung befinden sich die CD4⁺-T-Lymphozyten in der Phase ihrer stärksten Proliferation (siehe unten). Etwa zwischen Tag 7 und 14 nach Immunisierung verläuft die Effektorphase der EAE, in der die Lymphozyten die DLN verlassen und in die entzündeten Gewebe eindringen. Anschließend beginnt die Drosselung der Immunreaktion mit der Eliminierung der Effektorzellen und der Bildung von Gedächtniszellen.

Werden 30 nmol der li-PLP139-151 7 Tage nach Immunisierung appliziert, also in der beginnenden Effektorphase der EAE, kann eine vollständige Suppression der EAE nicht erreicht werden: Erst eine zweite li-PLP-Injektion an Tag 11 nach Immunisierung bewirkt ein Suppression der EAE (Daten nicht gezeigt). Werden, wie oben beschrieben, die li-PLP139-151-Moleküle fünf Tage nach Immunisierung appliziert, reicht dagegen eine einzelne Gabe von nur 20 nmol zur vollständigen Suppression der EAE aus.

3.2. Verträglichkeit der Therapie mit li-PLP139-151

SJL-Mäuse, die fünf Tage nach EAE-Induktion mit li-PLP139-151 behandelt werden, entwickeln etwa 30 Minuten nach der Injektion mäßige Symptome einer zytokinvermittelten systemischen Reaktion wie Piloerektion, Tachypnoe und Tachykardie. Diese Symptome dauern etwa eine Stunde an. Weder naive (nicht immunisierte) Mäuse noch Mäuse, die mit MBP immunisiert werden, entwickeln diese Symptome nach der li-PLP139-151-Injektion. Genauso wenig entwickeln mit PLP139-151 immunisierte Mäuse, die fünf Tage nach Immunisierung eine äquivalente Dosis li-CLIP erhalten, diese Symptome. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass es sich hier um einen antigenspezifischen Effekt der li-PLP139-151 handelt. Leber, Niere, Lunge und Darm der Mäuse wurden histologisch untersucht, dabei konnten keine Hinweise auf bleibende Organschäden gefunden werden.

Die oben genannten Nebenwirkungen der li-PLP139-151 machen eine absolute Reinheit der rekombinanten Proteine erforderlich, da schon sehr geringe Verunreinigungen der Proteine, zum Beispiel mit LPS, toxisch auf die Mäuse wirken und das Modell in seiner Aussagekraft gefährden würden. Auf die Reinigung der Fusionsproteine wurde daher größter Wert gelegt: Wie in Teil 2 beschrieben, wurden die Proteine sowohl mit lipophilen als auch amphiphilen Puffern gewaschen, die Reinheit der Proteine mit HPLC (Abb. 1c) und SDS-Page (Abb. 1d) geprüft und der Grad der LPS-Verunreinigung mit dem LAL-Test kontrolliert.

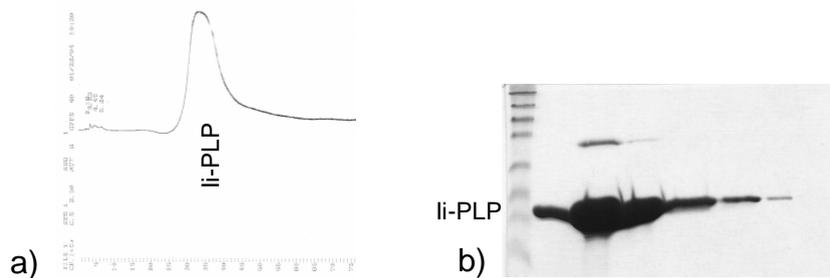


Abb. 1: a) Zeigt den Peak der li-PLP139-151-Moleküle im HIC-Diagramm. b) Zeigt eine SDS-Page der li-PLP139-151 Moleküle mit einer Bande bei etwa 18 kDa.

3.3. Die Tetramerfärbung

3.3.1. CD4⁺-T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor spezifisch für das PLP139-151-Epitop ist, können mit MHC Klasse II-Tetrameren gefärbt werden

Das PLP139-151-Epitop ist das dominante enzephalitogene Epitop in der SJL-Maus. CD4⁺-T-Zellen, deren Rezeptoren spezifisch für dieses Epitop sind, existieren in der Zirkulation gesunder SJL-Mäuse in hoher Frequenz und expandieren in vivo nach Immunisierung mit dem PLP139-151-Peptid. Diese PLP139-151-spezifischen, polyklonalen CD4⁺-T-Zellen können mit PLP139-151-I-As-Tetrameren gefärbt werden. Fig. 2 demonstriert, dass bereits in den Lymphknoten naiver Mäuse 0,16% PLP139-151-spezifische CD4⁺-T-Zellen detektiert werden können. MBP-spezifische CD4⁺-T-Zellen, die mit MBP-I-As-

Tetrameren gefärbt werden, kommen in deutlich geringerer Frequenz vor. Nachdem die Mäuse mit dem PLP139-151-Epitop immunisiert wurden, binden an Tag 8 nach Immunisierung 0,5% der CD4⁺-T-Zellen das PLP139-151-Tetramer, dagegen nur 0,01% das MBP-Tetramer. Diese Befunde bestätigen die Expansion der PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen und belegen damit die Spezifität der Tetramerfärbung. Die Kontrolle der Spezifität mit MBP-Tetrameren wurde bei jeder der in dieser Arbeit gezeigten FACS-Analysen durchgeführt.

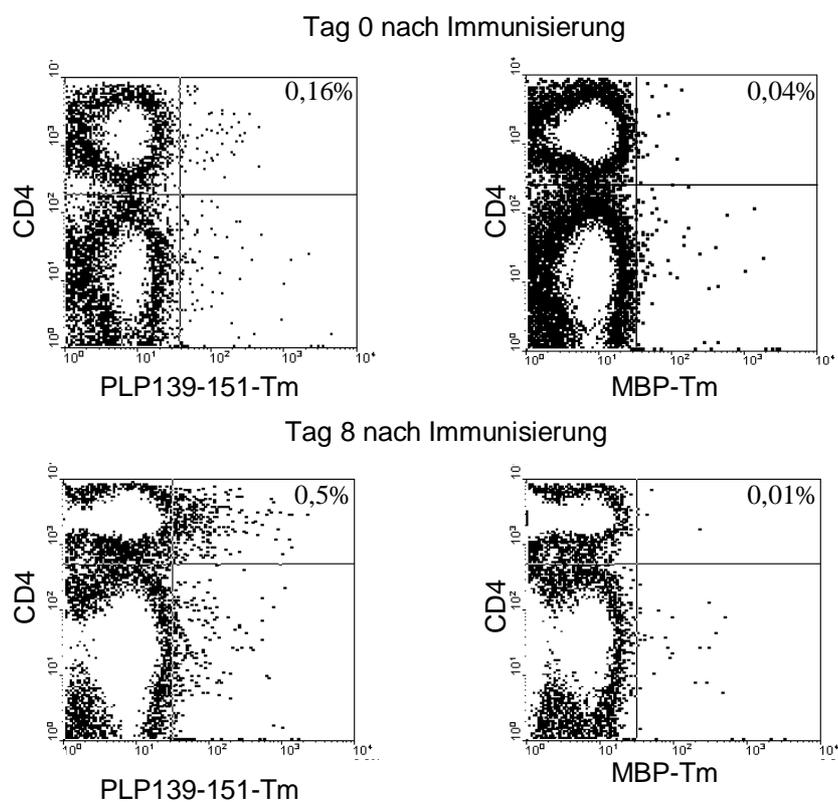


Fig. 2: Färbung der Lymphozyten immunisierter Mäuse mit MHC Klasse II-Tetrameren und Antikörpern gegen CD4. Links Färbung mit dem PLP139-151-Tm, rechts Färbung mit dem MBP-Tm.

3.4. Die Kinetik autoreaktiver CD4+-T-Zellen während der Toleranzinduktion mit li-PLP139-151-Molekülen

Im Folgenden werden die Zellzahlen PLP139-151-spezifischer und anderer Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten, in der Milz und im ZNS während des Krankheitsverlaufes der EAE mit und ohne Toleranzinduktion charakterisiert. Dazu wurden die Lymphozyten an den Tagen 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 und 20 nach der Immunisierung aus den entsprechenden Organen isoliert. Diese Lymphozyten wurden gezählt und mit Tetrameren und Markern für CD4+-T-Zellen, CD8+-T-Zellen und B-Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wurden nur die lebenden Zellen berücksichtigt (PI- bzw. Trypanblau-Ausschluss). Die Absolutzahl der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen wurde aus dem Prozentsatz der PLP139-151-Tm+CD4+-T-Zellen an der Gesamtzahl lebender CD4+-T-Zellen, dem in der Neubauer-Zählkammer bestimmten Zelltitel und dem Volumen errechnet (siehe Teil 2). Jeder gezeigte Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von vier bis sechs Mäusen.

3.4.1. Die Kinetik in den DLN

3.4.1.1. Die Lymphozytenzahl in den DLN wird durch die li-PLP139-151 - Therapie verringert

Die Gesamtzahl aller Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten einer mit dem PLP139-151-Epitop immunisierten Maus steigt kontinuierlich bis etwa Tag 12 nach Immunisierung an und erreicht dann ein Plateau von durchschnittlich etwa 40 Millionen Lymphozyten (Fig. 3). Die Anzahl aller Lymphozyten in Mäusen, die mit li-PLP139-151-Molekülen behandelt werden, sinkt direkt nach der Injektion ab, um an Tag 8 nach Immunisierung, also drei Tage nach der li-PLP139-151-Injektion, ein Minimum von gemittelt 10 Millionen Lymphozyten zu

erreichen (Fig. 3). Das entspricht etwa der halben Zellzahl der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt. Interessanterweise folgt darauf wieder eine Expansion der Lymphozyten, so dass sich die Zellzahlen beider Gruppen an Tag 14 nach Immunisierung auf einem Niveau von 40 Millionen Lymphozyten wieder angleichen. Zu diesem Zeitpunkt sind die Mäuse der Kontrollgruppe schwer krank, die Mäuse der Experimentalgruppe bleiben trotz dieser Zellzahl völlig gesund. Dies ist ein erster Hinweis auf eine veränderte Zusammensetzung der jeweiligen Lymphozytenpopulationen.

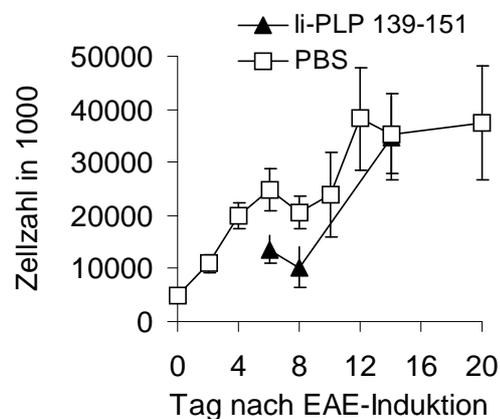


Fig. 3: Gesamtzahl der Lymphozyten in den DLN nach EAE-Induktion mit und ohne Toleranzinduktion mit li-PLP139-151.

Äquivalent zur Gesamtzahl der Lymphozyten ändert sich die Anzahl der nicht PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen. Sie sinkt direkt nach der li-PLP139-151-Gabe ab um sich zu späteren Zeitpunkten wieder an die jeweilige Zellzahl der Kontrollgruppe anzugleichen (Fig. 4a). Der relative Anteil der CD4+-T-Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl ändert sich jedoch nicht (Fig. 4b). Die Gesamtzahl der CD8+-T-Zellen sinkt relativ stärker als die der CD4+-T-Zellen. An Tag 8 nach Immunisierung enthalten die DLN der mit li-CLIP behandelten Mäuse etwa fünf Millionen CD8+-T-Zellen, die der mit li-PLP139-151 behandelten Mäuse nur etwa zwei Millionen Zellen (Fig. 4c). Dem entspricht eine Verringerung ihres relativen Anteils an der Gesamtzellzahl von 23 Prozent

auf 10 Prozent (Fig. 4d). Die Anzahl und der relative Anteil an B-Lymphozyten ändern sich dagegen nach li-PLP139-151-Gabe nicht signifikant (Fig. 4c).

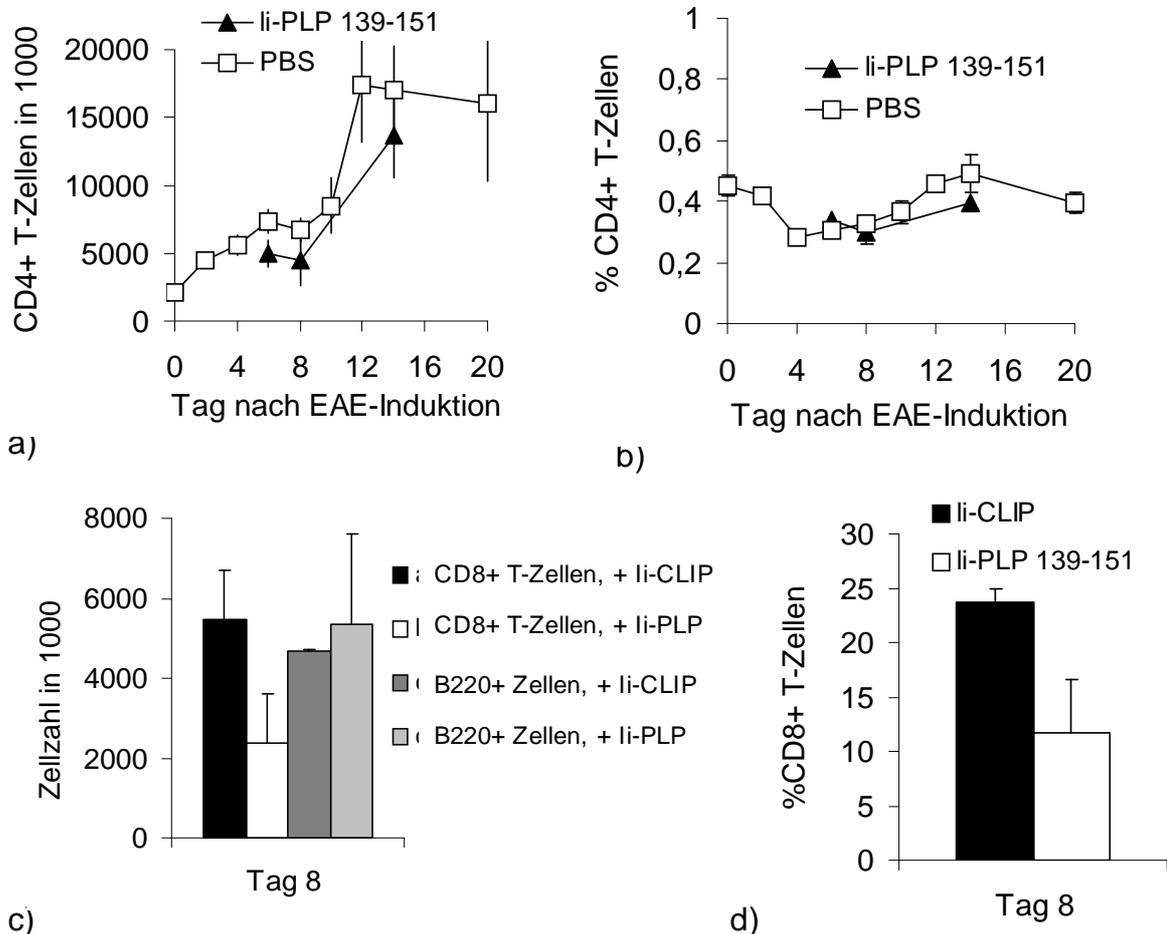


Fig. 4: a) Absolutzahl der CD4+-T-Zellen in den DLN b) Relativer Anteil der CD4+-T-Zellen an allen Lymphozyten in den DLN c) Absolute Zahlen der CD8+-T-Zellen und B-Zellen in den DLN d) Relativer Anteil der CD8+-T-Zellen an allen Lymphozyten in den DLN

3.4.1.2. li-PLP139-151 induziert eine starke Reduktion PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen in den DLN

Im Verlauf der EAE expandieren die PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen in den DLN sehr stark, bis sie an Tag 12 nach Immunisierung ein Maximum von 120.000 Zellen erreicht haben. Anschließend fällt die Anzahl dieser Zellen deutlich ab, sie bleibt allerdings über derjenigen der naiven Maus. Die MBP-

spezifischen CD4+-T-Zellen folgen dieser Expansion nicht, ihr Wert bleibt relativ konstant auf niedrigem Niveau.

Dagegen fällt die Anzahl PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen sofort nach der li-PLP139-151-Injektion und erreicht ein Minimum an Tag 8 nach Immunisierung von nur 6.000 Zellen. Anschließend steigt die Zellzahl wieder an, ohne sich allerdings an die der Kontrollgruppe anzugleichen (Fig. 5a). Der relative Anteil PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen verringert sich, bezogen auf die Kontrolle, um etwa 60 Prozent (Fig. 5b). Diese Daten demonstrieren, dass PLP139-151-spezifische CD4+-T-Zellen deutlich stärker durch die li-PLP-Moleküle beeinflusst werden als die Gesamtheit der CD4+-T-Zellen.

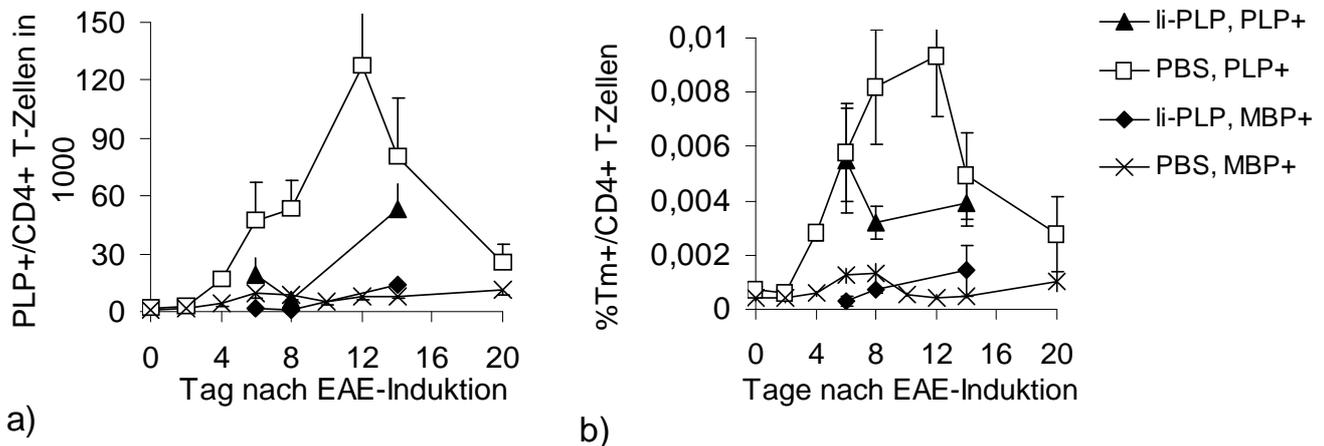


Fig. 5: a) Absolute Anzahl PLP139-151-Tm-positiver CD4+-T-Zellen in den DLN b) Relativer Anteil PLP139-151-Tm-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN

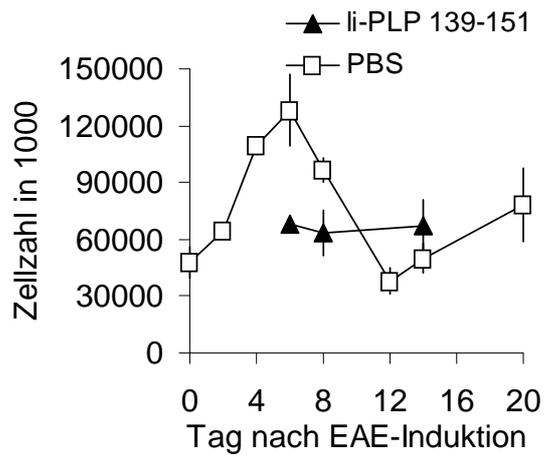
3.4.2. Die Kinetik in der Milz

3.4.2.1. Die Zahlen PLP139-151 spezifischer T-Zellen und anderer Lymphozyten bleiben in der Milz nach der li-PLP139-151 -Injektion auf konstantem Niveau

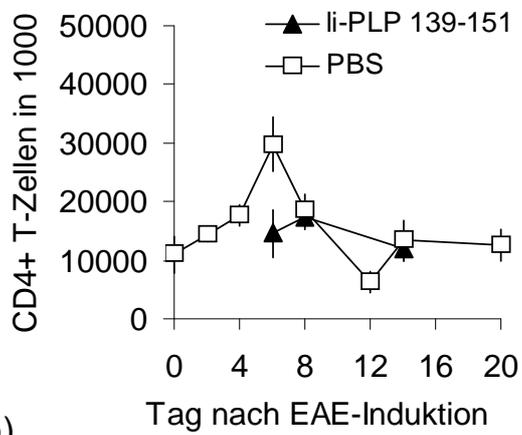
Die Gesamtzahl aller Lymphozyten und die Anzahl an CD4+-T-Zellen in der Milz steigt nach EAE-Induktion in der Kontrollgruppe kontinuierlich an und erreicht nach 8 Tagen ein Maximum. Anschließend fällt sie, synchron mit dem

Krankheitsausbruch, dramatisch ab, um wieder anzusteigen, während die Maus gesundet. Demgegenüber bleiben die entsprechenden Zellzahlen nach li-PLP139-151-Gabe auf konstantem Niveau, sie ändern sich vom Moment der li-PLP139-151-Injektion an nicht mehr und folgen den Schwankungen der Zellzahlen der Milz der erkrankten Maus nicht (Fig. 6).

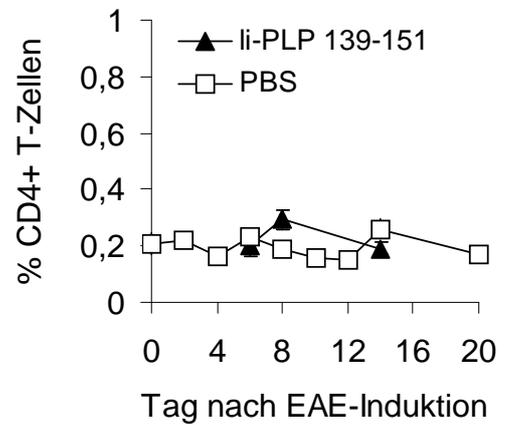
Die Reduktion der Zellzahl in der Milz der Kontrollgruppe um Tag 12 nach Immunisierung korreliert streng mit der Ausbildung von EAE-Symptomen. Bei Mäusen, die, zum Beispiel wegen defekten Pertussistoxins, nicht erkrankten, bleibt die Zellzahl auf dem maximalen Niveau von 120 Millionen Lymphozyten bestehen (Daten nicht gezeigt). Auch die Anzahl PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen in der Milz wird durch die li-PLP139-151 Therapie nur wenig beeinflusst, eine Verringerung der Zahl spezifischer T-Zellen wie in den DLN kann hier nicht beobachtet werden (Fig. 7).



a)



b)



c)

Fig. 6: a) Gesamtzahl aller Lymphozyten in der Milz b) Absolute Anzahl der CD4+-T-Zellen in der Milz c) Relativer Anteil der CD4+-T-Zellen an allen Lymphozyten in der Milz

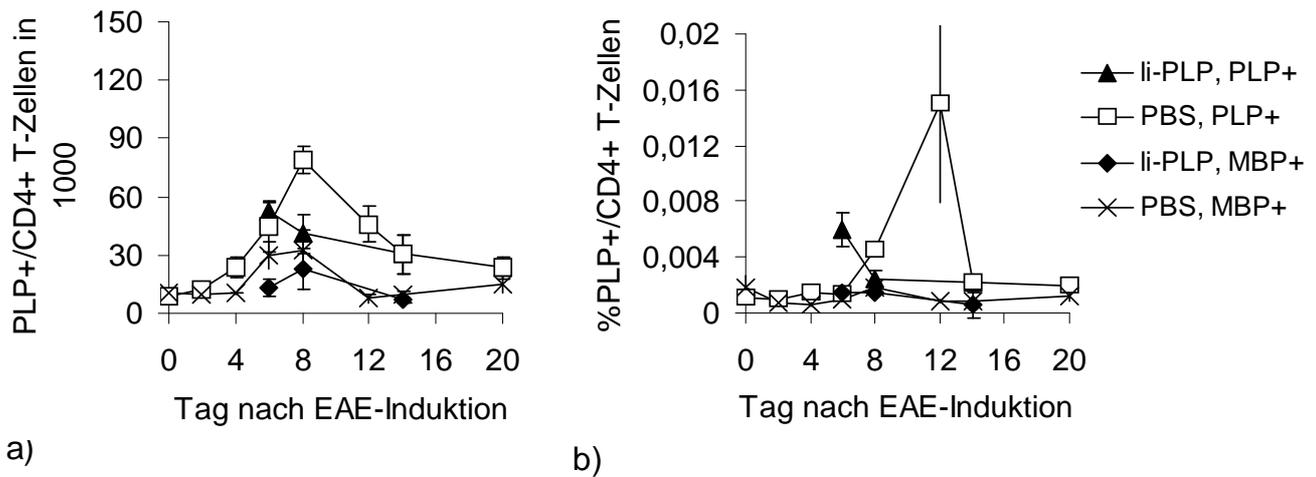


Fig. 7: a) Absolute Anzahl PLP139-151-Tm-positiver CD4+-T-Zellen in der Milz b) Relative Anzahl PLP139-151-Tm-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in der Milz

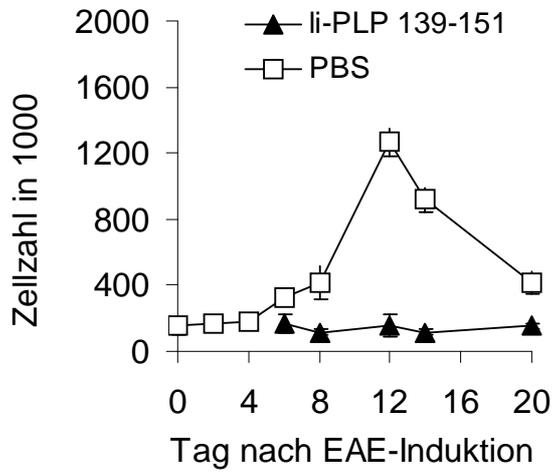
3.4.3. Die Kinetik im zentralen Nervensystem

3.4.3.1. Die Therapie mit li-PLP139-151 verhindert die Invasion autoreaktiver CD4+-T-Zellen in das zentrale Nervensystem vollständig

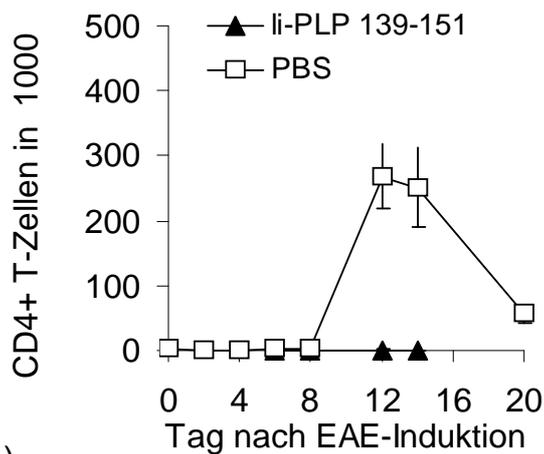
Unmittelbar vor Krankheitsausbruch beginnen Lymphozyten in das ZNS immunisierter Mäuse einzuwandern. 12 Tage nach Immunisierung erreicht die Lymphozytenzahl im ZNS ein Maximum von 1,2 Millionen. Darin sind 300.000 CD4+-T-Zellen enthalten. Bemerkenswerterweise sind von diesen CD4+-T-Zellen nur 8 tausend Zellen spezifisch für das PLP139-151-Epitop (Fig. 8). Auf diesen Befund wird weiter unten in Teil B ausführlicher eingegangen.

In das ZNS von Mäusen, die mit li-PLP139-151 behandelt wurden, findet dagegen keine Lymphozyteninvasion statt. Die Gesamtzahl aller Lymphozyten bleibt mit etwa 100.000 Zellen auf dem Niveau einer naiven Maus, die Anzahl PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen ist in diesen Mäusen zu gering, um mit Tetrameren bestimmt werden zu können (Fig. 8). Diesen FACS-Analysen entsprechend können histologisch keinerlei entzündliche Infiltrate im ZNS li-PLP139-151-behandelter Mäuse nachgewiesen werden. Abbildung 2 zeigt links eine typische entzündliche Läsion im Kleinhirn einer mit li-CLIP behandelten

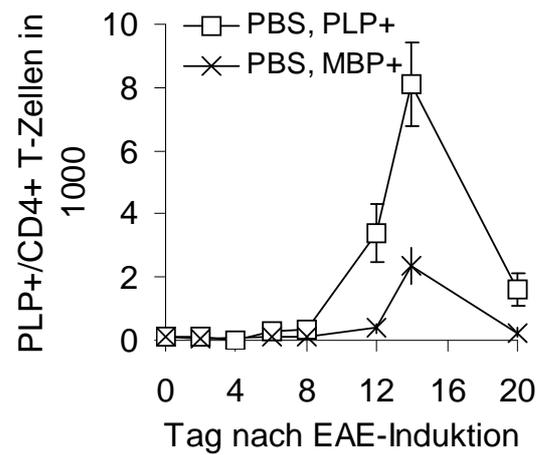
Maus, rechts einen repräsentativen Schnitt eines Kleinhirns einer mit li-PLP139-151 behandelten Maus.



a)



b)



c)

Fig. 8: a) Gesamtzahl der infiltrierenden Lymphozyten im ZNS b) Gesamtzahl der infiltrierenden CD4+-T-Zellen im ZNS c) Gesamtzahl der PLP139-151-Tm-positiven CD4+-T-Zellen im ZNS

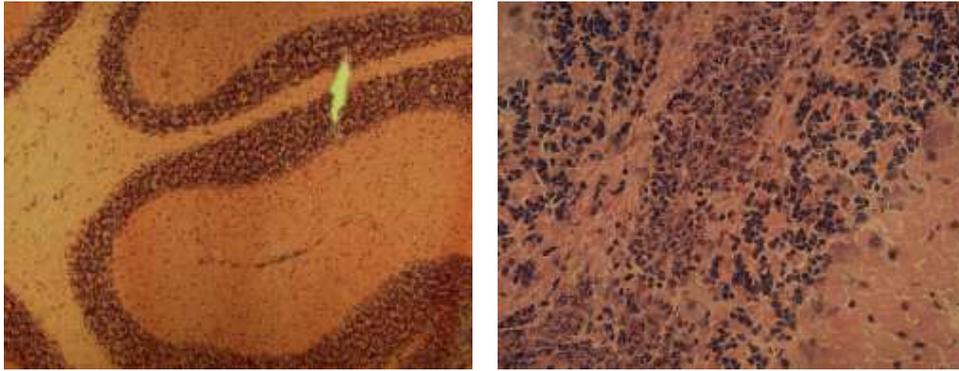


Abb. 2: Kleinhirn Tag 14 nach EAE-Induktion. Links von einer Maus, die mit li-PLP139-151 behandelt wurde, rechts von einer Maus, die mit li-CLIP behandelt wurde.

3.5. Apoptoseinduktion durch die Therapie mit li-PLP139-151

3.5.1. Die Therapie mit li-PLP139-151 induziert Apoptose in einem Teil der PLP139-151-spezifischen T-Helferzellen in vivo

Die Caspase-3 ist eine Effektor-Caspase, die, nach Aktivierung durch Initiator-Capsasen, die biochemischen Veränderungen der Apoptose weiter vermittelt. Abgesehen von wenigen Lymphom-Zelllinien sterben Lymphozyten, die die aktive Form der Caspase-3 exprimieren, den programmierten Zelltod. Diese aktive Form der Caspase-3 wurde hier mit spezifischen Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch bestimmt.

Direkt nach Immunisierung befinden sich bereits CD4⁺-T-Zellen in den DLN, die die aktive Form der Caspase-3 exprimieren. In der Proliferationsphase befinden sich etwa 20 Prozent PLP139-151-spezifischer CD4⁺-T-Zellen in Apoptose, in der Kontraktionsphase bis zu 40 Prozent (Fig. 9). Dies ist normaler Bestandteil jeder Immunreaktion und dient der Selektion geeigneter T-Zellen beziehungsweise dem kontrollierten Beenden der Immunreaktion.

Nach der Injektion von li-PLP139-151-Molekülen erhöht sich die Apoptoserate in PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen schlagartig. Bereits sechs Stunden nach der Injektion exprimieren 40 Prozent der PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen die aktive Caspase-3 (Fig. 9). Demgegenüber exprimieren nur 20

Ergebnisse

Prozent dieser Zellen der mit li-CLIP behandelten Mäuse die aktive Caspase-3. Die nicht PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen sind hiervon nicht betroffen, in beiden Gruppen exprimieren weniger als 10 Prozent die aktive Caspase-3. Ähnliche Verhältnisse finden sich auch noch einen und drei Tage nach Injektion der li-PLP139-151. Später gleichen sich dann die Apoptoseraten beider Gruppen wieder aneinander an.

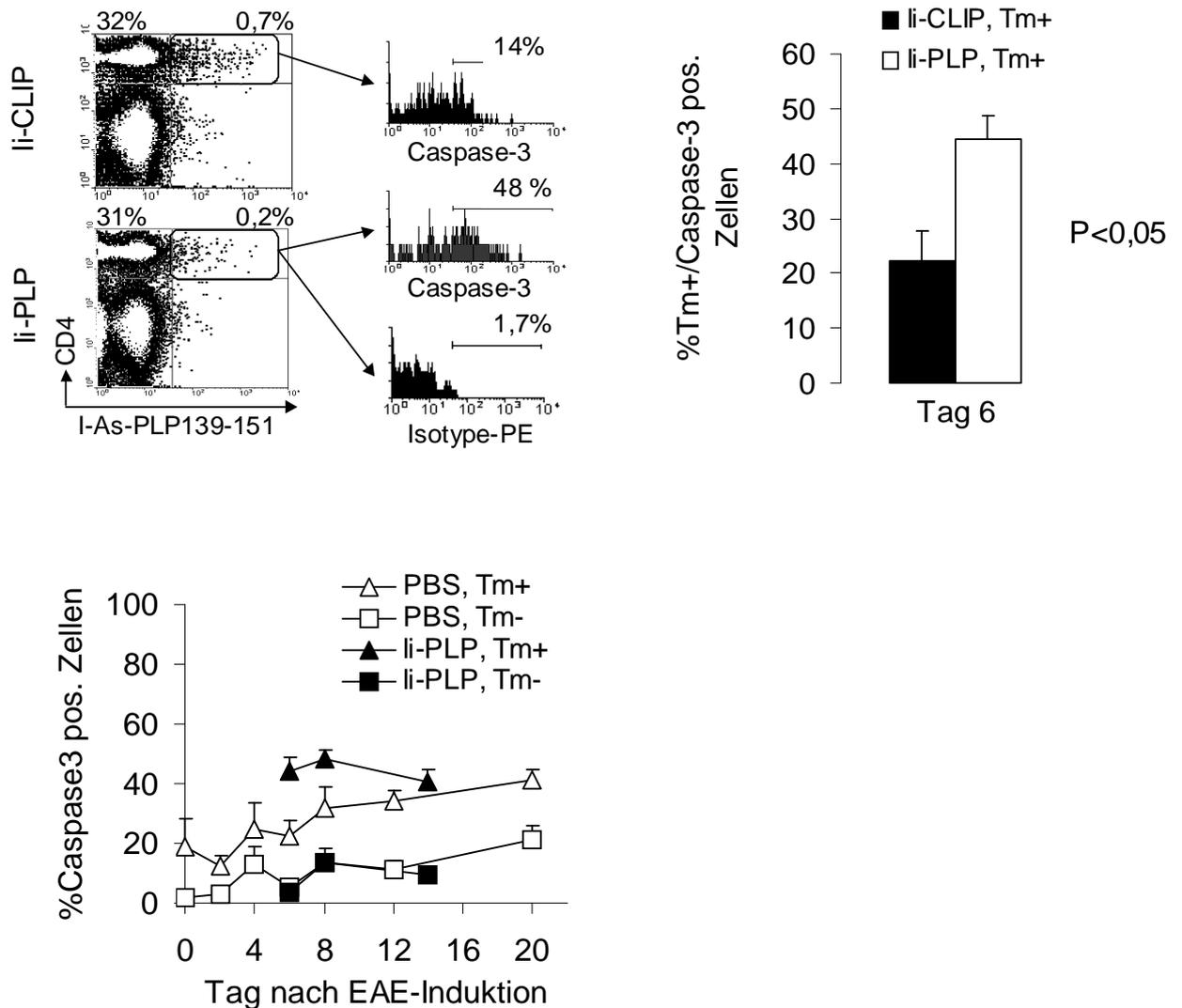


Fig. 9: Relativer Anteil der aktive Caspase-3 exprimierenden CD4⁺-T-Zellen an allen CD4⁺-T-Zellen in den DLN, oben an Tag 6 nach Immunisierung, unten im Verlauf.

3.5.2. In der Milz erhöht sich die Apoptoserate PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen nach li-PLP139-151-Injektion nicht

Nach Immunisierung exprimieren in der Milz konstant zwischen 40 und 60 Prozent der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen die aktive Caspase-3, dagegen nur 20-40 Prozent der nicht PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen (Fig. 10). An dieser Apoptoserate ändert sich in den ersten Tagen nach der li-PLP139-151-Injektion zunächst nichts. Interessanterweise liegt die Apoptoserate der CD4+-T-Zellen an Tag 14 nach Immunisierung in den mit li-PLP139-151 behandelten Mäusen deutlich unter derjenigen der Kontrolle. Diese geringere Apoptoserate fällt zeitlich mit den weiter oben demonstrierten hohen Zellzahlen der Milz der behandelten Maus zusammen.

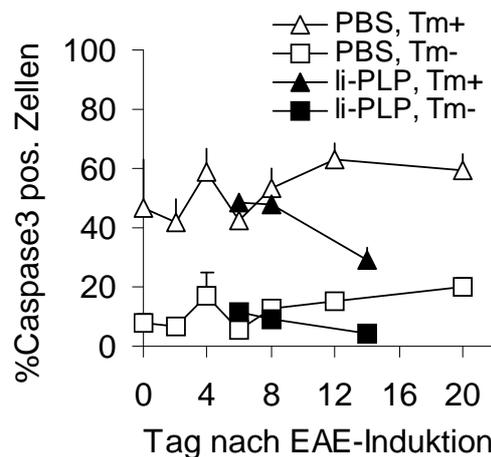


Fig. 10: Relativer Anteil der aktive Caspase-3 exprimierenden CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in der Milz

3.5.3. Die Färbung der aktiven Caspase-3 ist spezifisch und sensitiv

Da die Apoptoseinduktion durch li-PLP139-151-Therapie einen Kernbefund dieses Projekts bedeutet, wurden für den verwendeten Antikörper Spezifitäts- und Sensitivitäts-Kontrollen angefertigt. Dafür wurden Gliomzellen, die mit Fas-Liganden zuverlässig in Apoptose gebracht werden können, verwendet. Gliomzellen, die zwei Stunden mit Fas-Liganden inkubiert werden, können mit

dem Antikörper gegen die aktive Caspase-3 angefärbt werden. Der Anteil der so gefärbten Zellen entspricht etwa dem Anteil der Gliomzellen, die im FSC/SSC-Diagramm links liegen und damit dem typischen Phänotyp apoptotischer Zellen entsprechen. Dieser Befund spricht für eine hohe Sensitivität des verwendeten Antikörpers. Mit Rabbit-Isotypen-Kontrollserum können dagegen praktisch keine Gliomzellen gefärbt werden. Genauso wenig binden Gliomzellen die Caspase-3-Antikörper, die mit Fas-Liganden und zusätzlich mit einem Caspase-Inhibitor inkubiert werden. Diese Zellen liegen im FSC/SSC-Diagramm größtenteils rechts oben und sind damit nicht apoptotisch. Die letzten beiden Befunde beweisen, dass der verwendete Antikörper spezifisch ist.

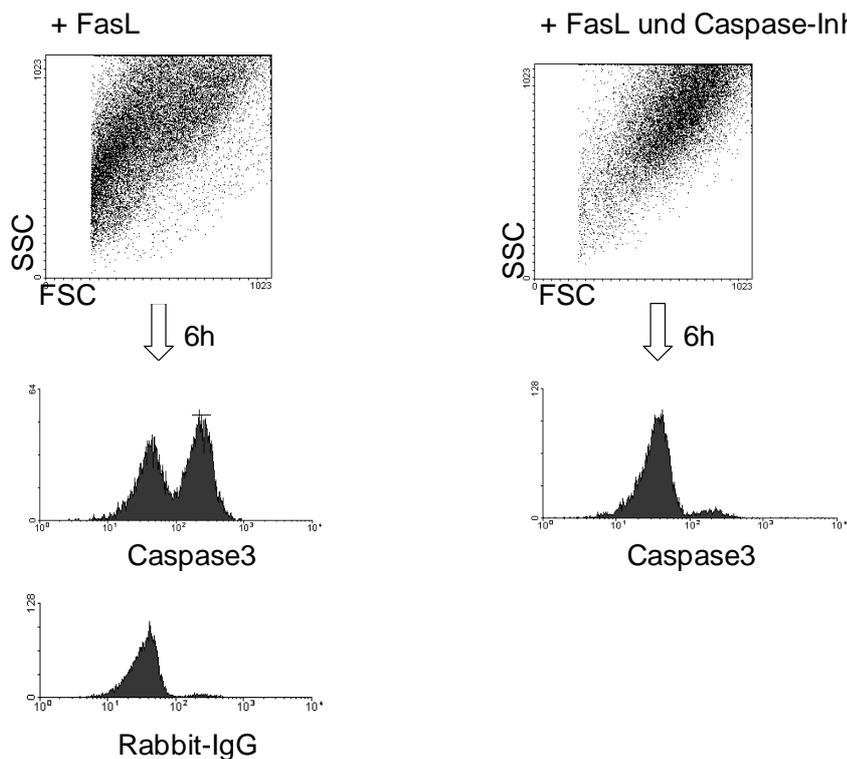


Fig. 11: Spezifitäts- und Sensitivitätskontrollen des Antikörpers gegen die aktive Caspase-3: Links Gliomzellen, die mit FasL zur Apoptose gebracht wurden, rechts Gliomzellen, die mit FasL und Caspase-Inhibitor behandelt wurden und nicht apoptotisch sind.

3.6. Die Expression von Aktivierungsmarkern während der li-PLP139-151-Therapie

Werden T-Zellen aktiviert, beginnt sich die Gen-Expression an die Erfordernisse der Proliferation und Differenzierung anzupassen. Im Zuge der Differenzierung werden also manche Proteine verstärkt und andere verringert exprimiert. Diejenigen dieser Proteine, die an der Zelloberfläche erscheinen, können als Marker für den Aktivierungsstatus der T-Zelle durchflusszytometrisch bestimmt werden. Dazu zählt CD44, ein Zelladhäsionsmolekül, das zum Beispiel an Hyaluronat bindet. Außerdem ist CD44 Rezeptor für Osteopontin, ein Zytokin, welches die Th1-Differenzierung fördert. CD44 wird nach der T-Zellaktivierung verstärkt exprimiert und verbleibt lange auf der Oberfläche der Effektorzellen und Gedächtniszellen. CD69 ist ein Lektin unklarer Funktion, das schon wenige Stunden nach der T-Zellaktivierung auf der Zelloberfläche erscheint. CD62L ist ebenfalls ein Zelladhäsionsmolekül das aber, anders als CD44, nach der T-Zellaktivierung herunterreguliert wird.

Wie oben gezeigt wurde, werden ein großer Teil der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen nach li-PLP139-151-Gabe apoptotisch. Um zu erkennen, ob bestimmte Populationen dieser Zellen stärker oder schwächer von der Apoptose betroffen sind, wird im Folgenden die Expression der beschriebenen Aktivierungsmarker auf CD4+-T-Zellen mit und ohne li-PLP139-151-Injektion dargestellt.

3.6.1. Die li-PLP139-151-Injektion führt zur Deletion insbesondere von aktivierten PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen in den DLN

Die PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen der unbehandelten Kontrollgruppe exprimieren bald nach der Immunisierung CD44, und zwar mit einem Maximum von über 80% der Zellen (Fig. 12a). Dieser Anteil liegt deutlich über dem der nicht PLP139-151-spezifischen CD44+CD4+-T-Zellen. Einen Tag nach der li-PLP139-151-Injektion exprimieren demgegenüber nur noch 40% der

PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen CD44, ihr relativer Anteil hat sich halbiert (Fig. 12a). Innerhalb von zwei Tagen, also bis Tag 8 nach Immunisierung, steigt der Anteil CD44+-T-Zellen wieder auf das hohe Niveau von etwa 70% der Kontrollgruppe an. Dieser Befund spricht dafür, dass nach der li-PLP139-151-Injektion zunächst in erster Linie aktivierte T-Helferzellen eliminiert werden, nicht aktivierte T-Helferzellen jedoch in den DLN verbleiben. Auf die Elimination aktivierter Zellen folgt dann eine Reaktivierung der verbleibenden PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen, welche mit der weiter oben gezeigten Proliferation dieser Zellen einhergeht.

Die Expression des frühen Aktivierungsmarkers CD69 folgt prinzipiell dieser Entwicklung, der Befund der frühen Eliminierung CD69-positiver Zellen und der anschließenden Hochregulation dieses Markers ist allerdings weniger deutlich ausgeprägt (Fig. 12b).

Die Expression von CD62L auf PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen sinkt nach Immunisierung, ausgehend von einem Wert von etwa 80%, auf ein Minimum von etwa 20% 8 Tage nach Immunisierung und zeigt damit die Phase der Immunreaktion an, in der differenzierte Effektorzellen die DLN verlassen. Daraufhin folgt wieder ein Anstieg der CD62L-Expression parallel zur Eindämmung der Immunreaktion (Fig. 12c). Die nach der li-PLP139-151-Injektion in den DLN verbliebenen PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen exprimieren zu einem deutlich höheren Prozentsatz CD62L als die Zellen der Kontrollgruppe (Fig. 12c). Anschließend regulieren sie CD62L herunter. Auch dieser Befund spricht dafür, dass aktivierte PLP139-151-spezifische CD4+-T-Zellen nach der li-PLP139-151-Injektion eliminiert, die verbleibenden PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen jedoch aktiviert werden.

Ergebnisse

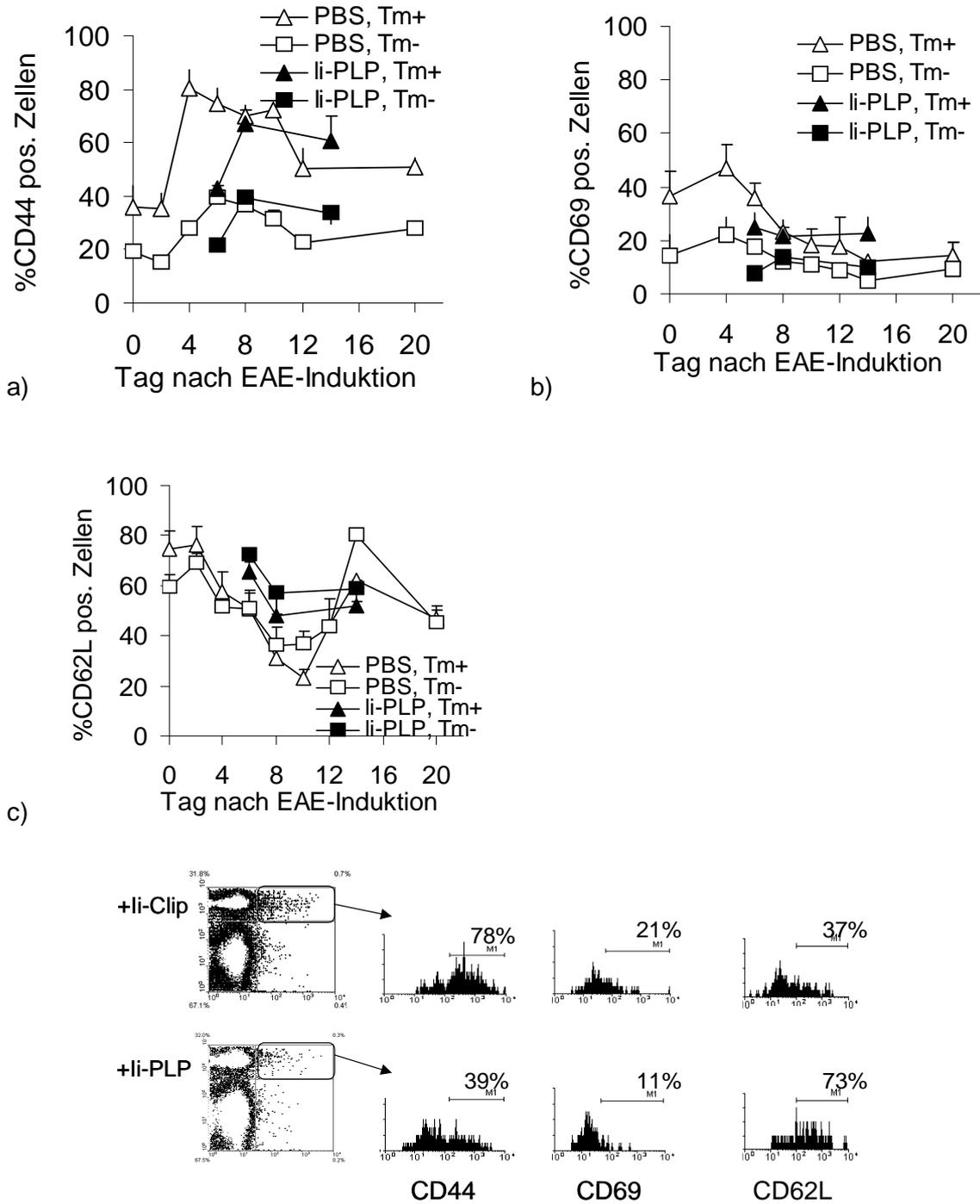


Fig. 12: a) Relativer Anteil CD44-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN b) Relativer Anteil CD69-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN c) Relativer Anteil CD62L-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN. Unten: Primärdaten der Expression der Aktivierungsmarker an Tag 8 nach Immunisierung.

3.6.2. In der Milz ändert sich der Anteil an aktivierten Zellen durch die li-PLP139-151-Injektion nur wenig

Die Expression von CD25, CD44, CD62L und CD69 zeigt, dass die aus der Milz isolierten CD4+-T-Zellen generell zu einem höheren Anteil aktiviert sind als die CD4+-T-Zellen der DLN (Fig. 13). Die Aktivierung der CD4+-T-Zellen folgt außerdem nur wenig der im DLN verfolgbaren Kinetik der Immunreaktion. Auch ist der Unterschied an Aktivierung zwischen PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen und anderen CD4+-T-Zellen in der Milz nur gering ausgeprägt. CD25 wird von etwa 20-40%, CD44 von etwa 80%, CD62L von etwa 30% und CD69 von 20-40% der Zellen exprimiert (Fig. 13).

Die Injektion der li-PLP139-151 ändert an diesem Expressionsmuster in der Milz nur wenig. Lediglich ein geringer Abfall der CD44-exprimierenden CD4+-T-Zellen an Tag 8 nach Immunisierung fällt auf (Fig. 13). Da dieser Abfall sowohl PLP139-151-spezifische als auch andere CD4+-T-Zellen betrifft, scheint er von geringer Signifikanz zu sein.

Ergebnisse

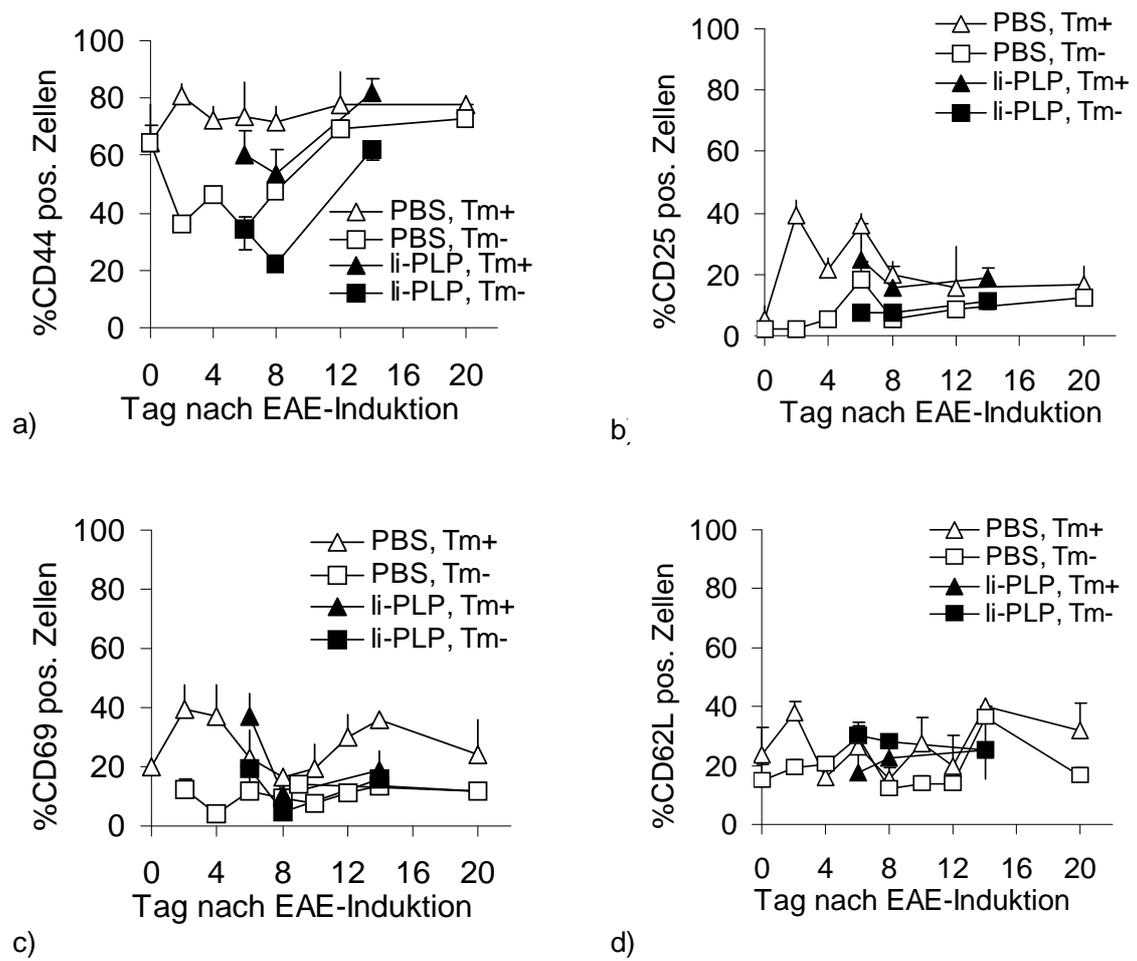


Fig. 13: a) Relativer Anteil CD44-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in der Milz b) Relativer Anteil CD25-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in der Milz c) Relativer Anteil CD69-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in der Milz d) Relativer Anteil CD62L-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in der Milz

3.7. Th1- und Th2-Zellen während der Therapie mit li-PLP139-151

3.7.1. Die Therapie mit li-PLP139-151 führt zu einer Verlagerung von der Th1-Zell-Dominanz zur Dominanz der Th2-Zellen

Th1-Zellen spielen in der komplexen Pathogenese der EAE eine zentrale Rolle. Um beurteilen zu können, ob sich das Verhältnis von Th1- zu Th2-Zellen durch die Therapie mit li-PLP139-151 ändert, wurden FACS-Analysen mit Antikörpern gegen intrazelluläre Zytokine durchgeführt. IFN- γ ist das klassische Th1-Zell-definierende Zytokin, IL-4 eines der typischerweise von Th2-Zellen produzierten Zytokine.

An Tag 8 nach Immunisierung produzieren in den DLN der Kontrollgruppe knapp 30% der PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen IFN- γ , dagegen nur 10% IL-4 (Fig. 14). Die T-Zell-Antwort in diesem EAE-Modell ist somit Th1-Zell-dominiert. In den DLN der Mäuse, die li-PLP139-151 erhalten haben, produzieren an Tag 8 nach Immunisierung dagegen nur noch 10% der verbliebenen PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen IFN- γ ($P=0,0615$), dafür aber 30% IL-4 ($P<0,0001$) (Fig. 14). Diese Befunde demonstrieren eine Verschiebung von der Dominanz der Th1-Zellen zur Dominanz von Th2-Zellen durch die Therapie mit li-PLP139-151. Dieses Phänomen beschränkt sich für IFN- γ auf die PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen. Der Effekt auf die IL-4-Produktion betrifft die T_m⁺ und T_m⁻ CD4⁺-T-Zellen in gleicher Weise. Der Odds Ratio durch die Behandlung ist für beide Gruppen gleich und beträgt knapp 3,5 mit einem 95%-Vertrauensintervall von 2.1 bis 5.7. In der Milz wird das Th1- / Th2-Verhältnis nach li-PLP139-151-Injektion nicht wesentlich verändert (Daten nicht gezeigt).

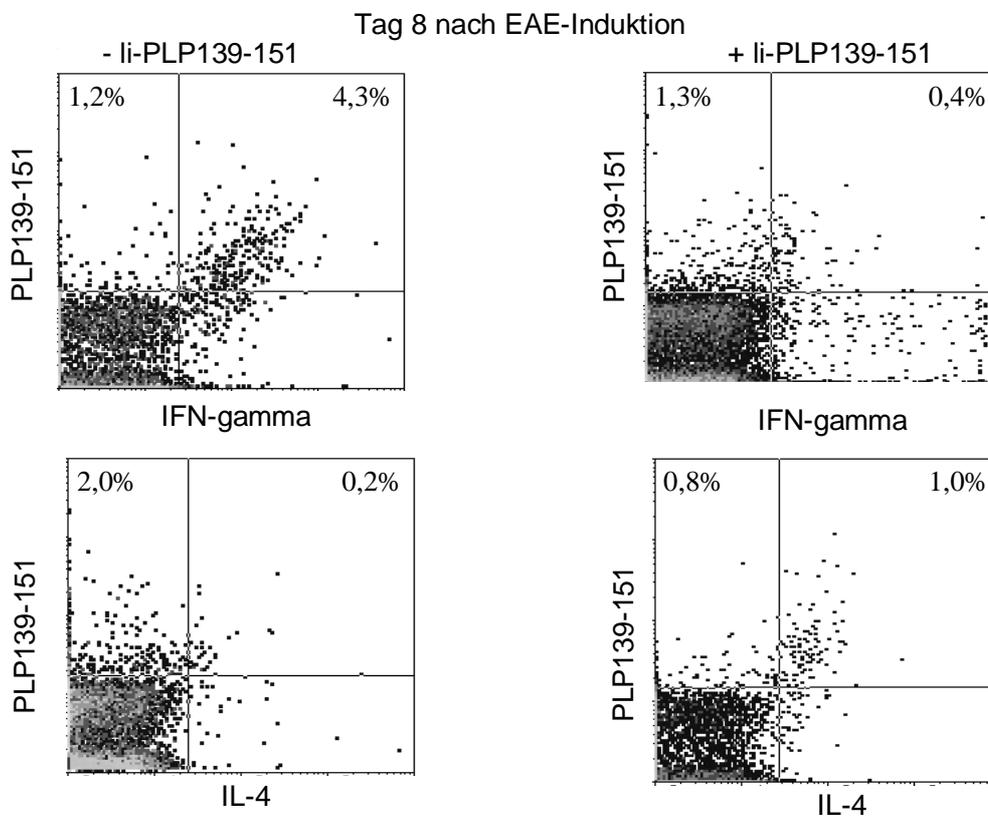
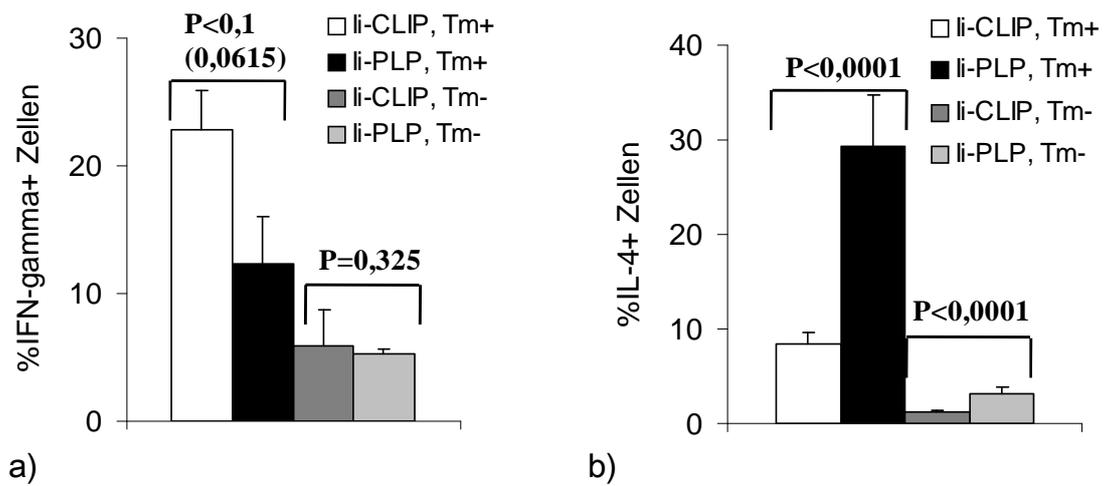


Fig. 14: : Relativer Anteil INF- γ (a) und IL-4 (b) produzierender CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen mit und ohne Toleranzinduktion an Tag 8 nach EAE-Induktion. Unten: Primärdaten einer Färbung von CD4+-T-Zellen mit Tetrameren und Antikörpern gegen INF- γ bzw. IL-4.

Um den wichtigen Befund der Verschiebung der Th1- zur Th2-Zell-Dominanz mit weiteren Untersuchungen zu untermauern, wurde die Expression von CCR5 auf den Zellen der DLN untersucht. CCR5 ist ein spezifischer Marker für aktivierte Th1-Zellen. Dementsprechend wird CCR5 auf PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen nach der Immunisierung hochreguliert und verbleibt während der Effektorphase der EAE auf der Oberfläche etwa der Hälfte dieser Zellen (Fig. 15 a, b). Anschließend fällt die CCR5-Expression wieder ab. Übereinstimmend mit den Zytokinmessungen verschwinden nach der li-PLP139-151-Injektion die meisten der CCR5-exprimierenden PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen aus den DLN. Dieser Befund bestätigt also die Elimination der aktiven Th1-Zellen. Tim-1 ist ein spezifischer Marker für Th2-Zellen. Der relative Tim-1-mRNA-Gehalt der Lymphozyten in den DLN ist an Tag 8 nach Immunisierung in der mit li-PLP139-151 behandelten Gruppe etwa verdreifacht (Fig. 15c).

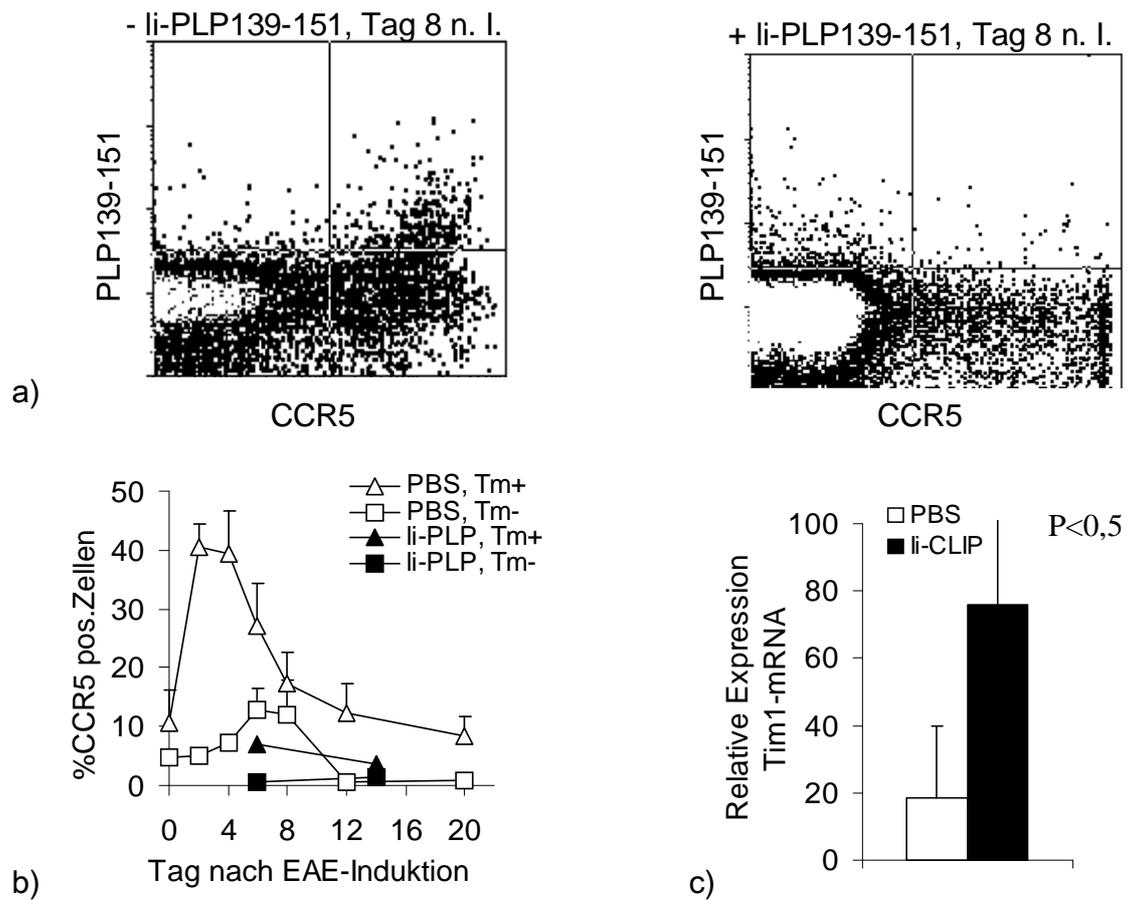


Fig. 15: a) Relativer Anteil CCR5-exprimierender CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN an Tag 8 n. l. b) Relativer Anteil CCR5-exprimierender CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN im Verlauf der EAE c) Relativer Anteil Tim1-exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in den DLN an Tag 8 n. l.

3.8. Die Therapie mit li-PLP139-151 induziert einen Anstieg der Frequenz CD4+CD25+- Regulatorischer T-Zellen

Die oben gezeigten Ergebnisse konzentrieren sich im Wesentlichen auf den Einfluss der Therapie mit li-PLP139-151 auf die autoreaktiven Effektor-T-Zellen. Dabei haben wir gesehen, dass insbesondere die pathogenen autoreaktiven Th1-Zellen nach der li-PLP139-151-Injektion eliminiert werden, die im EAE-Modell protektiven Th2-Zellen jedoch zur dominanten Effektorzellpopulation werden. Neben der Gruppe der Effektor-T-Zellen haben jedoch Regulatorische T-Zellen eine fundamentale Bedeutung für den Verlauf jeder Immunreaktion. Im Folgenden soll deshalb das Verhalten der Regulatorischen T-Zellen während der li-PLP139-151-Therapie herausgearbeitet werden. Dafür wurden FACS-Analysen mit Antikörpern gegen CD25, der IL-2R α -Kette, durchgeführt. CD25 wird von den T-Zellen nach Aktivierung verstärkt exprimiert und verbleibt lange auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz zu naiven CD4+-T-Zellen exprimieren CD4+CD25+ Regulatorische T-Zellen dieses Molekül konstitutiv. Fig. 16a zeigt, dass drei Tage nach li-PLP139-151-Injektion knapp 40% der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen CD25-positiv sind, jedoch nur etwa 20% der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen in der Kontrollgruppe. Demgegenüber ist der Anteil der Tetramer-positiven T-Helferzellen mit einem aktivierten Phänotyp zu diesem Zeitpunkt reduziert (s. o.), der Anstieg der CD25+-Zellen lässt sich also nicht primär auf eine Aktivierung der Zellen zurückführen. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Frequenz antigenspezifischer CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen durch die li-PLP139-151-Therapie erhöht wird.

Um die Induktion dieser Regulatorischen T-Zellen weiter zu bestätigen, wurde die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 bestimmt. Foxp3 ist ein Transkriptionsfaktor, der nur in CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen vorkommt und der für deren Entwicklung essentiell ist. Er wird als spezifischer Marker für diesen Zelltyp verwandt, da CD25, wie oben beschrieben, auch auf aktivierten Effektorzellen vorkommt. Da zum Zeitpunkt der Durchführung der Arbeit kein kommerzieller Antikörper gegen das murine Foxp3-Molekül erhältlich war, wurde die Menge an Foxp3-mRNA-Transkripten in den DLN mit

RT-PCR bestimmt. Fig. 16b zeigt, dass die DLN der mit li-PLP139-151 behandelten Mäuse an Tag 8 nach Immunisierung doppelt so viel Foxp3-mRNA in Relation zum gesamten mRNA-Gehalt des DLN enthalten als die DLN der Kontrolle. Auch dieser Befund spricht also für eine Induktion CD4+CD25+ Regulatorischer T-Zellen.

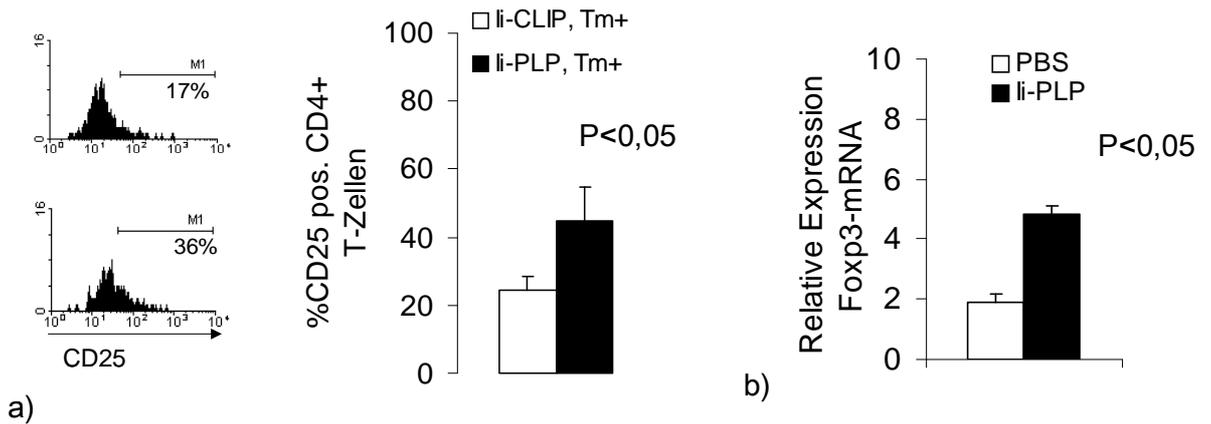


Fig. 16: a) Relativer Anteil CD25-exprimierender PLP139-151+/CD4+-T-Zellen an allen PLP139-151+/CD4+-T-Zellen in den DLN an Tag 8 n. I. b) Relativer Anteil Foxp3-exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in den DLN an Tag 8 n. I.

3.9. Die Therapie mit li-PLP139-151 erhöht die immunosuppressive Kapazität der Regulatorischen T-Zellen

Wie in der Einleitung ausführlich beschrieben wurde, sind die exakten Mechanismen der Immunregulation durch CD4⁺CD25⁺-Regulatorische T-Zellen noch nicht aufgeklärt. Es gilt aber als gesichert, dass ihr immunosuppressiver Effekt teilweise durch die Zytokine IL-10 und TGF- β vermittelt wird. Außerdem spielt ICOS, der induzierbare Kostimulator, eine wichtige Rolle in der Funktion Regulatorischer T-Zellen. Um zu differenzieren, ob die Therapie mit li-PLP139-151 neben einer Induktion der CD4⁺CD25⁺-Regulatorischen T-Zellen auch eine Verstärkung ihrer immunosuppressiven Eigenschaften bewirkt, wird im Folgenden die Expression dieser Moleküle untersucht.

ICOS wird an Tag 14 nach Immunisierung von etwa 20% der PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen der Kontrollgruppe exprimiert. Dagegen exprimieren etwa 40% der PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen der mit li-PLP139-151 behandelten Mäuse ICOS (Fig. 17a).

Das negativ kostimulierende Molekül CTLA-4 wird ebenfalls mit der Funktion Regulatorischer T-Zellen in Verbindung gebracht. Im Gegensatz zu ICOS unterscheidet sich die Expression von CTLA-4 zwischen den beiden Experimentalgruppen nicht (Fig. 17b).

Die Expression der Zytokine IL-10 und TGF- β wurde auf mRNA-Ebene untersucht. Der relative Anteil an IL-10-Transkripten in den DLN der behandelten Mäuse ist gegenüber der Kontrolle stark erhöht (Fig. 17c). Ebenfalls erhöht sich der relative mRNA-Gehalt von TGF- β nach der li-PLP139-151-Injektion in den DLN deutlich (Fig. 17d).

Zusammengenommen implizieren diese Befunde eine Verstärkung der immunosuppressiven Kapazität der CD4⁺CD25⁺-Regulatorischen T-Zellen durch die li-PLP139-151-Therapie und könnten damit eine wichtige Rolle in der Wirkungsweise der rekombinanten Invarianten Ketten spielen.

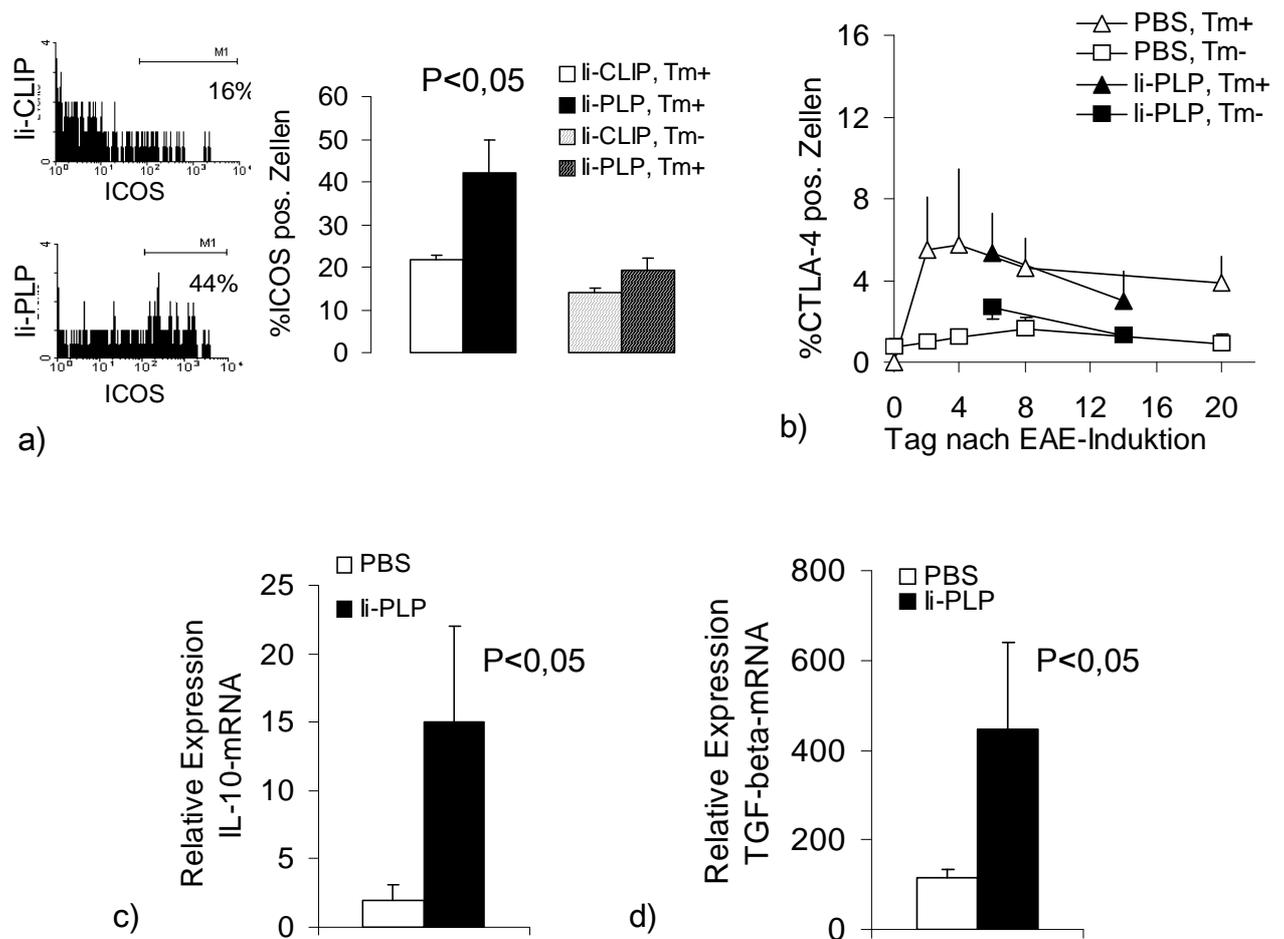


Fig. 17: a) Relativer Anteil ICOS-exprimierender CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN an Tag 14 n. I. b) Relativer Anteil CTLA-4-exprimierender CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN im Verlauf der EAE c) Relativer Anteil IL-10-exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in den DLN an Tag 8 n. I. d) Relativer Anteil TGF- β -exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in den DLN an Tag 8 n. I.

3.10. Die Expression kostimulierender Moleküle während der li-PLP139-151-Therapie

Im Folgenden wird die Expression einiger kostimulierender Moleküle charakterisiert, denen eine Beteiligung an der Immuntoleranz zugeschrieben wird, die aber nicht in direktem Zusammenhang mit der Funktion Regulatorischer T-Zellen stehen.

CD40L wird auf aktivierten CD4+-T-Zellen exprimiert. Es interagiert mit CD40 auf DZ und fördert so deren Reifung und die Reifung der T-Zellen selbst.

Weiterhin spielt es eine bedeutende Rolle bei der Differenzierung der B-Zellen und deren Antikörperproduktion. Kostimulation über CD40L kann unter bestimmten Bedingungen die Differenzierung in IL-10-produzierende CD4⁺-T-Zellen triggern und so Th1-Antworten hemmen, im Allgemeinen wird aber vor allem die Blockade der CD40-CD40L-Interaktion zur Etablierung von Toleranz genutzt.

In den DLN exprimieren etwa 10% der PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen nach Immunisierung CD40L. Dieser Anteil bleibt während des gesamten Verlaufes der EAE relativ konstant. Nach der li-PLP139-151-Injektion nimmt der Anteil der CD40L-exprimierenden PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen kontinuierlich zu, an Tag 14 nach Immunisierung beträgt er 20% (Fig. 18a). Das entspricht einer Verdoppelung dieses Verhältnisses und bestätigt die bereits gewonnene Erkenntnis, dass die li-PLP139-151-Injektion zu einer Reaktivierung der PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen führt.

Die neu entdeckten kostimulierenden Moleküle Tim-3 und BTLA wurden auf der Transkriptionsebene mittels RT-PCR untersucht. Beiden Molekülen wird ein hemmender Einfluss auf die T-Zellantwort zugeschrieben. Drei Tage nach li-PLP139-151-Injektion ist der relative Anteil an Tim-3-Transkripten in den DLN der behandelten Mäuse deutlich höher als in den DLN der Kontrollgruppe (Fig. 18b). Der relative Anteil an BTLA-Transkripten drei Tage nach li-PLP139-151-Injektion in den DLN der behandelten Mäuse ist ebenfalls deutlich höher als in den DLN der Kontrollgruppe (Fig. 18c).

Die Expression von CD40L in der Milz war sehr variabel und wird deshalb nicht gezeigt. Die Expression von BTLA und Tim-3 in der Milz ändert sich durch die li-Therapie nicht signifikant ($P=0,155$ bzw. $0,4034$) (Fig. 19).

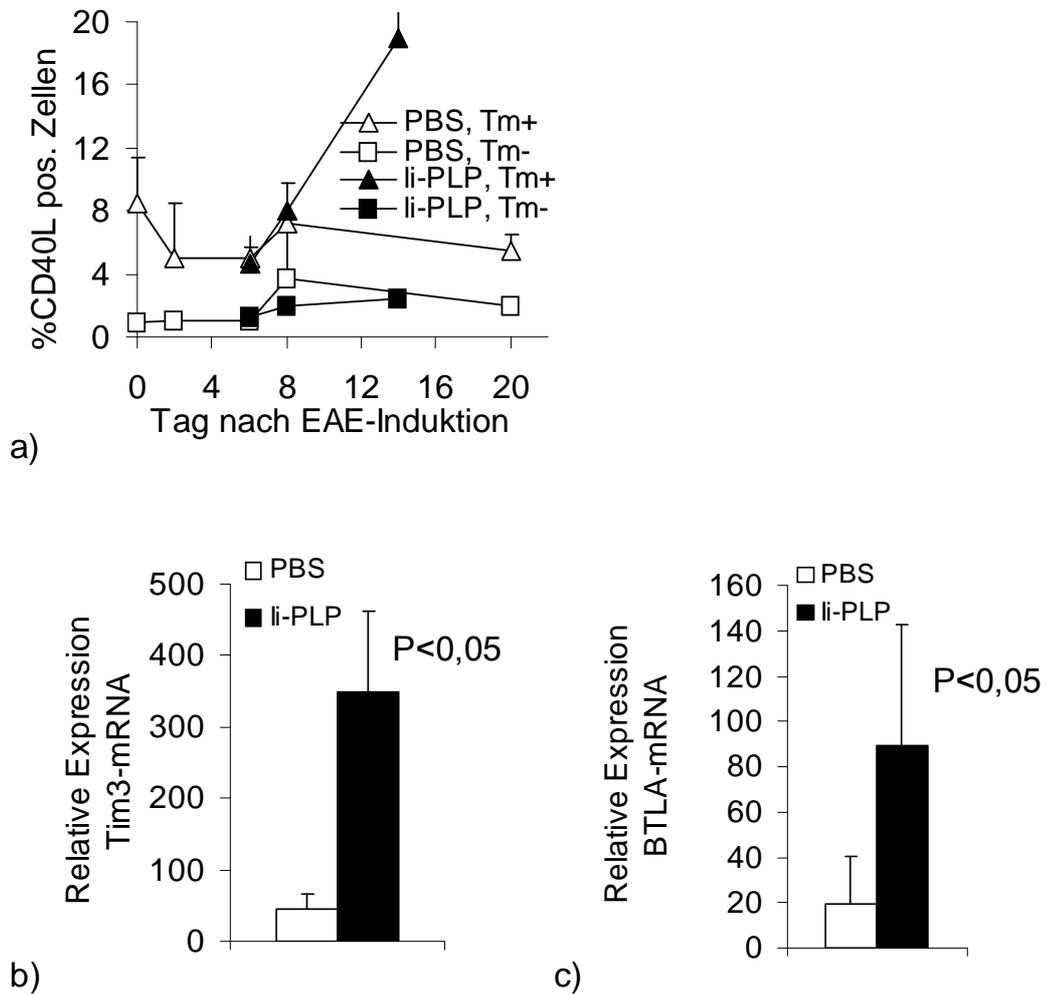


Fig. 18: a) Relativer Anteil CD40L-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen in den DLN
 b) Relativer Anteil Tim3-exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in den DLN an Tag 8 n. I. c) Relativer Anteil BTLA-exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in den DLN an Tag 8 n. I.

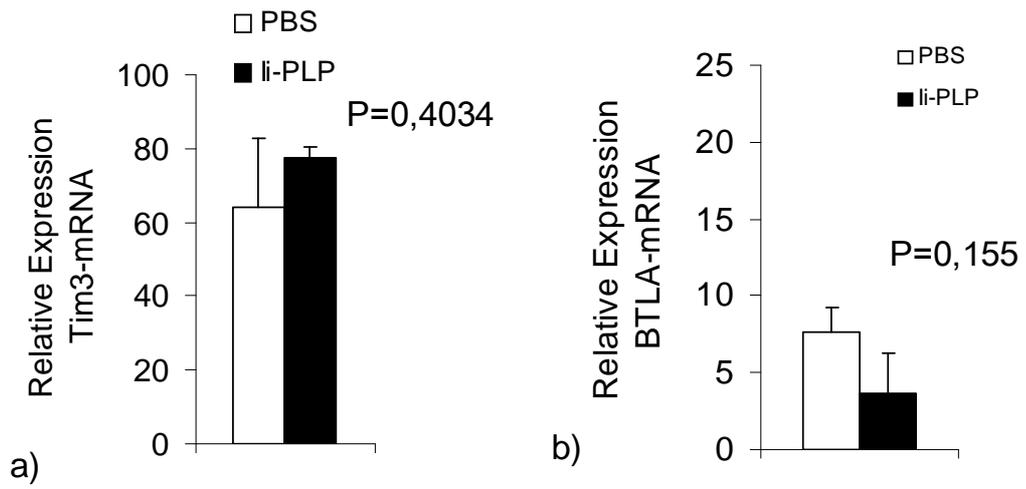


Fig. 19: a) Relativer Anteil Tim3-exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in der Milz an Tag 8 n. I. b) Relativer Anteil BTLA-exprimierender Lymphozyten an allen Lymphozyten in der Milz an Tag 8 n. I.

3.11. Der Wildtyp der Invarianten Kette beeinflusst die gemessenen Parameter nicht

Um zu zeigen, dass die Injektion des Wildtyps der Invarianten Kette (li-CLIP) keinen Einfluss auf die in dieser Arbeit gemessenen Parameter hat und die gemessenen Effekte der li-PLP139-151-Injektion somit spezifisch für dieses Molekül sind, wird im Folgenden eine Gegenüberstellung der Parameter von immunisierten Mäusen, die fünf Tage nach der EAE-Induktion entweder 20 nmol li-CLIP oder 100 µl PBS i. v. erhielten, gezeigt. Die Parameter wurden am besonders aussagekräftigen Tag 8 nach EAE-Induktion gemessen. Es wurden jeweils vier Mäuse pro Gruppe verwendet, zwischen beiden Gruppen gab es keine signifikanten Unterschiede.

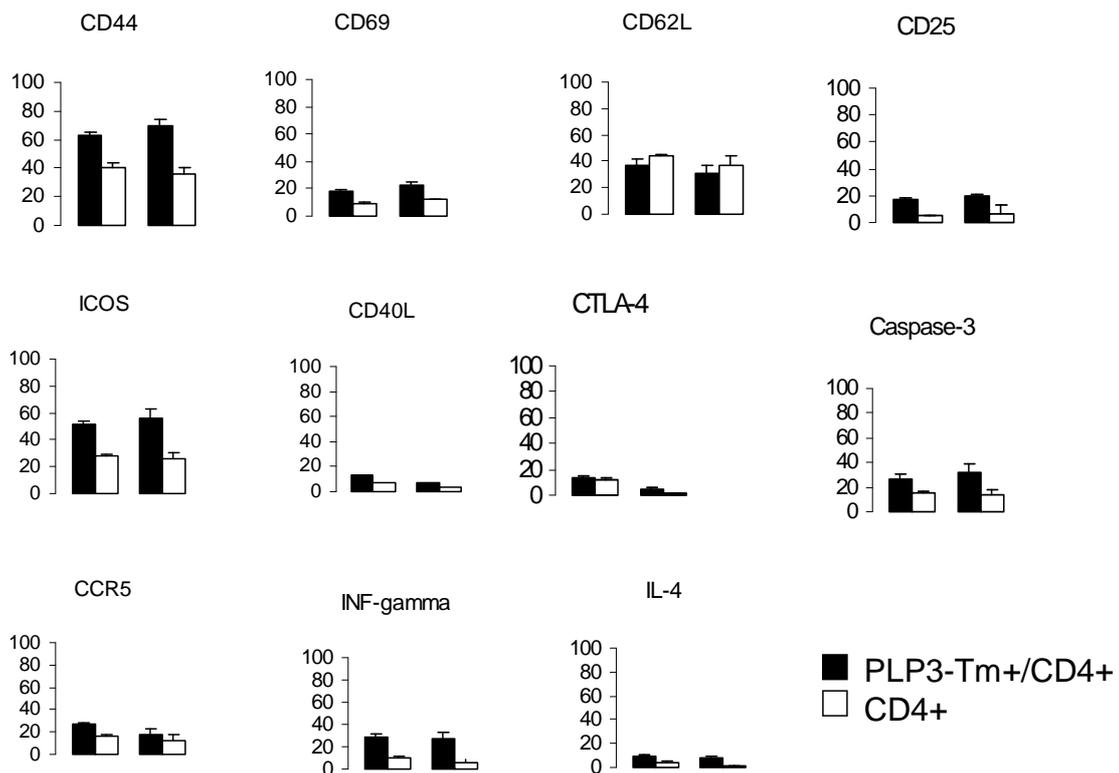


Fig. 20: Molekülexpression auf CD4+-T-Zellen in den DLN an Tag 8 nach EAE-Induktion dargestellt in Prozent. Links jeweils CD4+-T-Zellen von Mäusen, die mit li-CLIP behandelt wurden. Rechts jeweils von Mäusen, die mit PBS behandelt wurden.

Ergebnisse

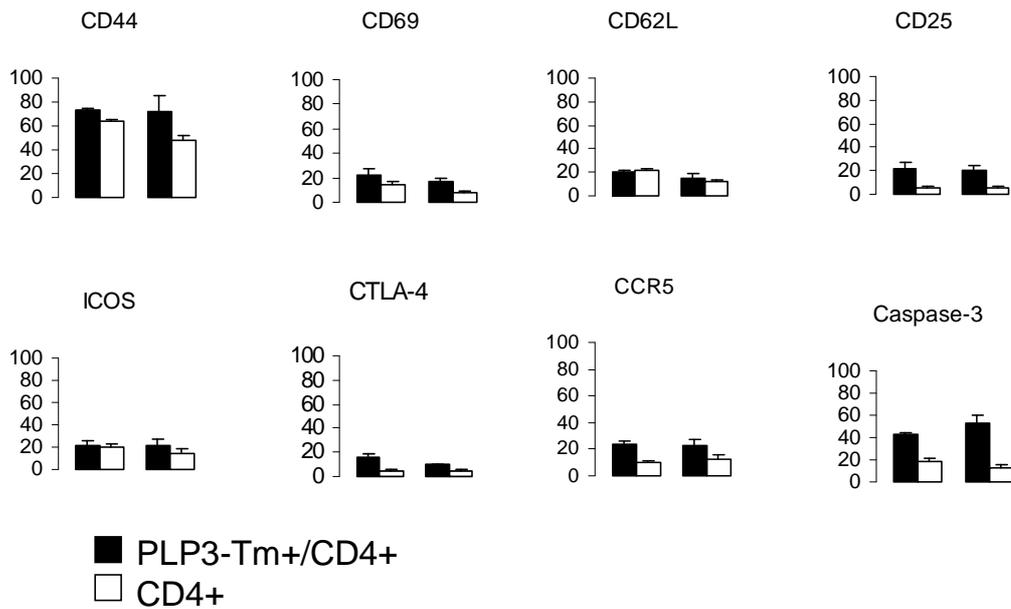


Fig. 21: Molekülexpression auf CD4+-T-Zellen in der Milz an Tag 8 nach EAE-Induktion dargestellt in Prozent. Links jeweils CD4+-T-Zellen von Mäusen, die mit li-CLIP behandelt wurden. Rechts jeweils von Mäusen, die mit PBS behandelt wurden.

3.12. Autoreaktive CD4+-T-Zellen im ZNS

3.12.1. Kinetik autoreaktiver CD4+-T-Zellen im ZNS

Unmittelbar vor Krankheitsausbruch beginnen Lymphozyten in das ZNS immunisierter Mäuse einzuwandern. 12 Tage nach Immunisierung erreicht die Lymphozytenzahl im ZNS ein Maximum von 1,2 Millionen (Fig. 22a). Darin sind 300.000 CD4+-T-Zellen enthalten (Fig. 22b). Bemerkenswerterweise sind von diesen CD4+-T-Zellen nur 8.000 Zellen spezifisch für das PLP139-151-Epitop (Fig. 22c). Diese auffällig geringe Anzahl der PLP139-151+CD4+-T-Zellen kann zumindest teilweise durch die weiter unten gezeigte sehr hohe Apoptoserate dieser Zellen erklärt werden. Trotzdem spricht dieser Befund dafür, dass nur ein kleiner Teil der in den sekundären lymphatischen Organen expandierenden PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen in das ZNS eindringt.

Ergebnisse

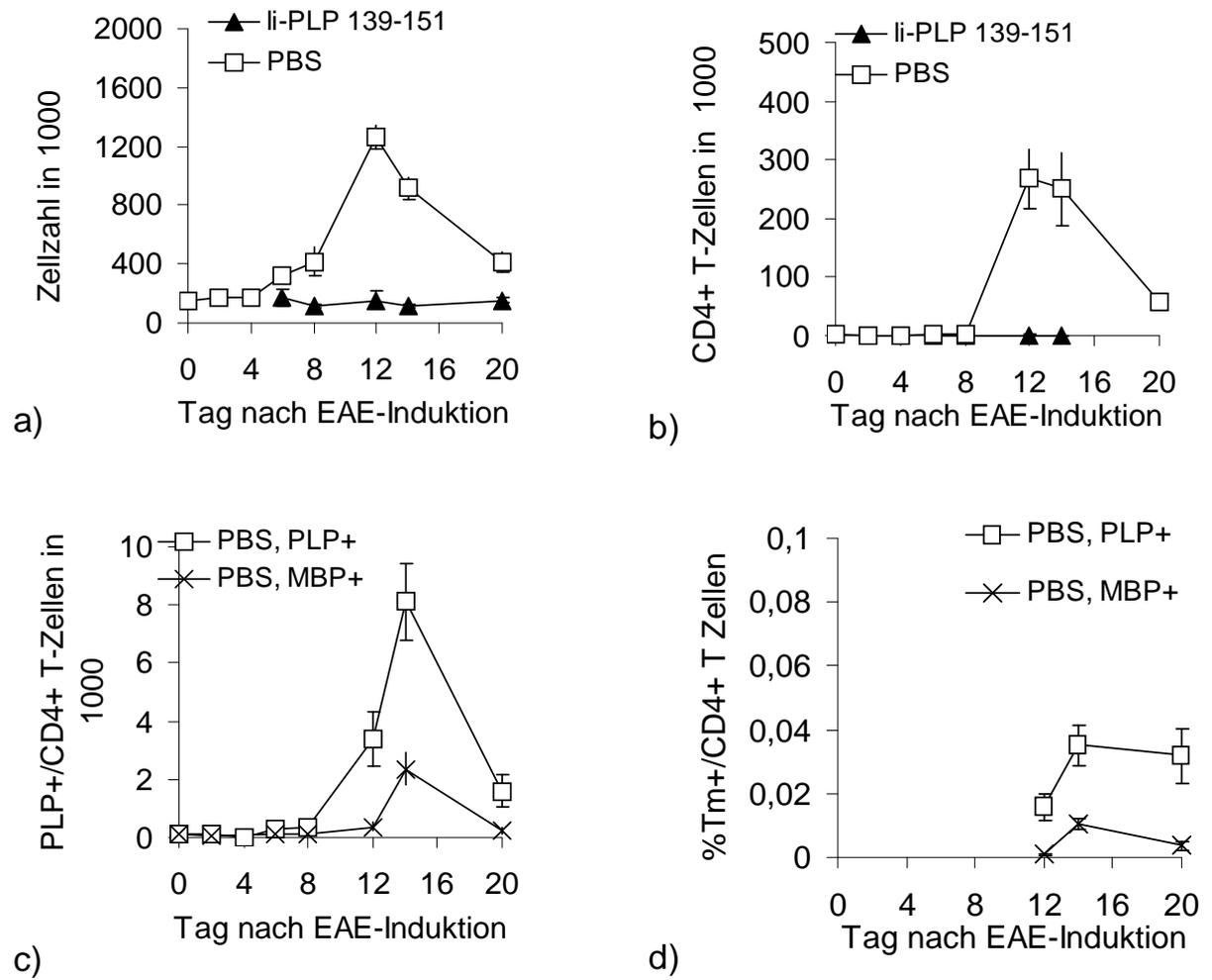


Fig. 22: a) Gesamtzahl der infiltrierenden Lymphozyten im ZNS b) Gesamtzahl der infiltrierenden CD4+-T-Zellen im ZNS c) Gesamtzahl der PLP139-151-Tm-positiven CD4+-T-Zellen im ZNS d) Relativer Anteil PLP139-151-Tm-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS

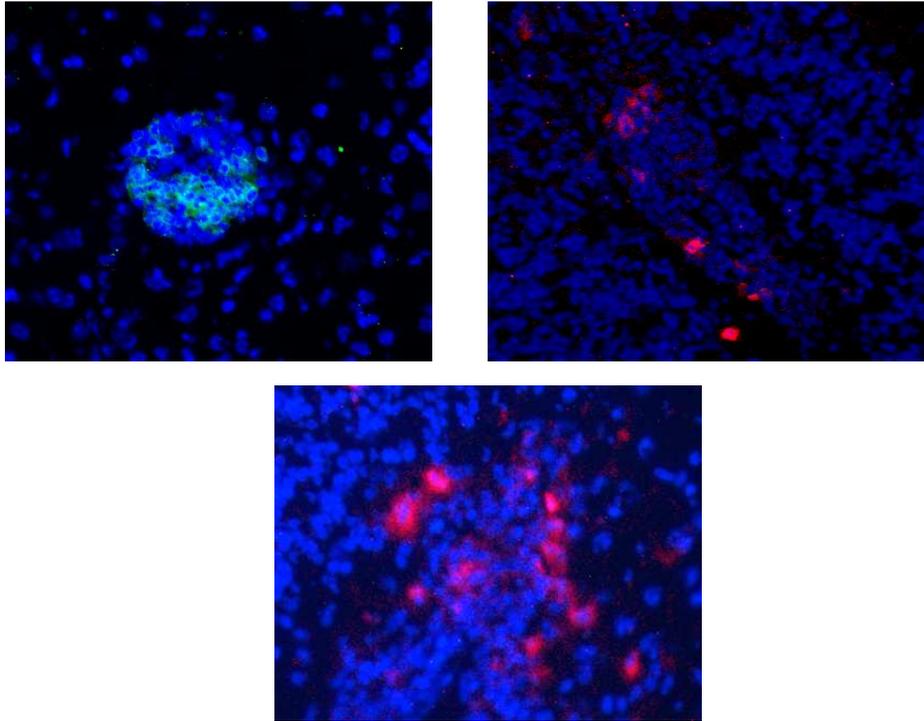


Abb. 3: Expression von CD4 (links oben), B220 (rechts oben) und CD8 (unten) in entzündlichen Läsionen eines Kleinhirns an Tag 14 nach der EAE-Induktion

3.12.2. Die Expression von Aktivierungsmarkern autoreaktiver CD4+-T-Zellen im ZNS

Im ZNS wird CD44 von 90% bis 100%, CD69 von 60% bis 80%, CD25 von 40% bis 70% und CD62L von etwa 30% der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen exprimiert (Fig. 23). Diese Befunde könnten als Hinweis gewertet werden, dass nur Zellen in das ZNS eindringen können, die diese Moleküle exprimieren. Allerdings exprimieren deutlich weniger der nicht PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen diese Aktivierungsmarker. Eine Ausnahme davon macht die Expression von CD44, das auch etwa 90% dieser anderen CD4+-T-Zellen auf ihrer Oberfläche tragen. Es ist bekannt, dass das Integrin CD44 eine wichtige Rolle bei der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke spielt. Die hier gezeigten Daten stützen diese These. Der Unterschied der Expression von CD69, CD25 und CD62L von PLP139-151-spezifischen zu anderen Zellen deutet dagegen darauf hin, dass die PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen im ZNS reaktiviert werden.

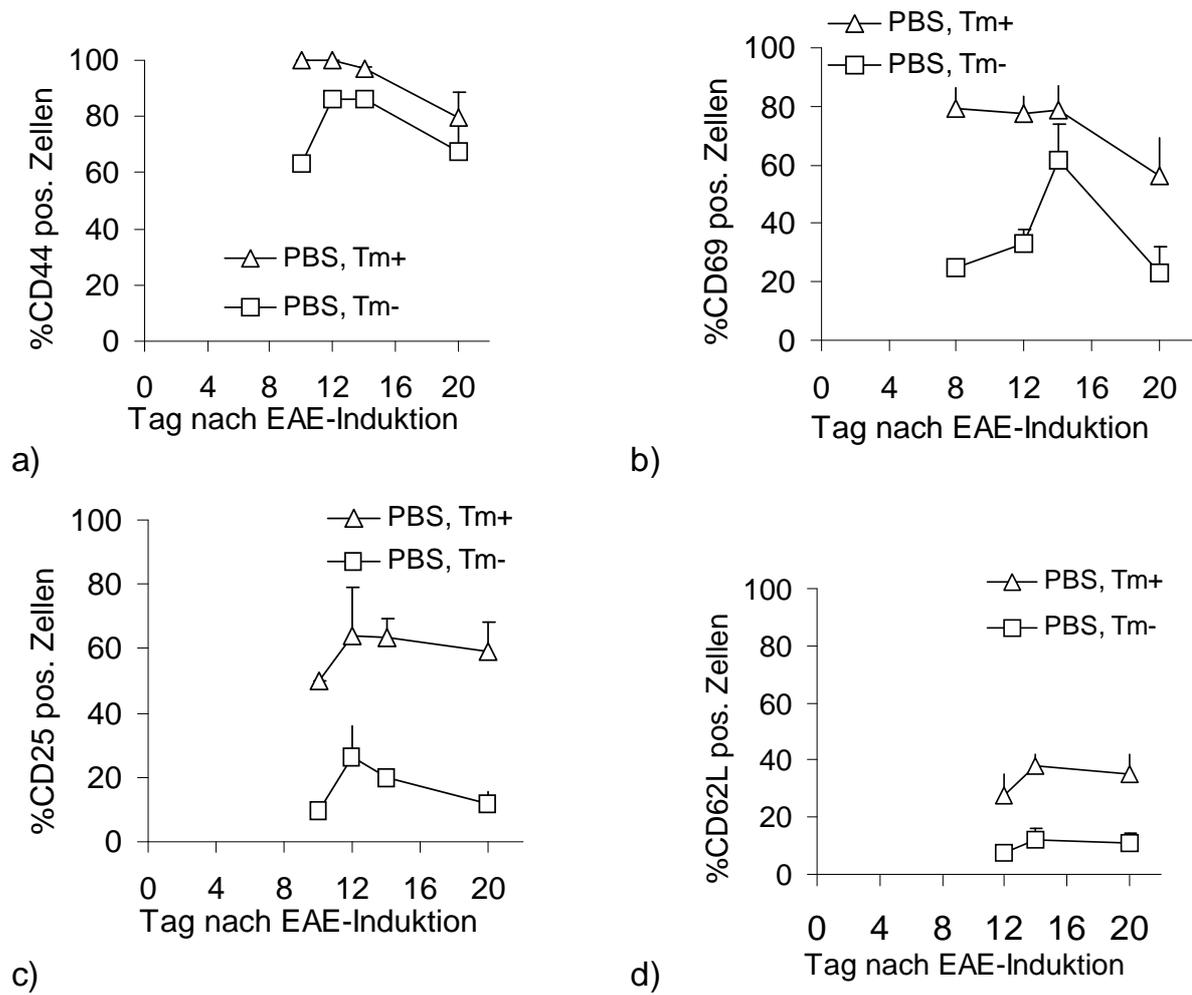


Fig. 23: a) Relativer Anteil CD44-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS b) Relativer Anteil CD69-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS c) Relativer Anteil CD25-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS d) Relativer Anteil CD62L-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS

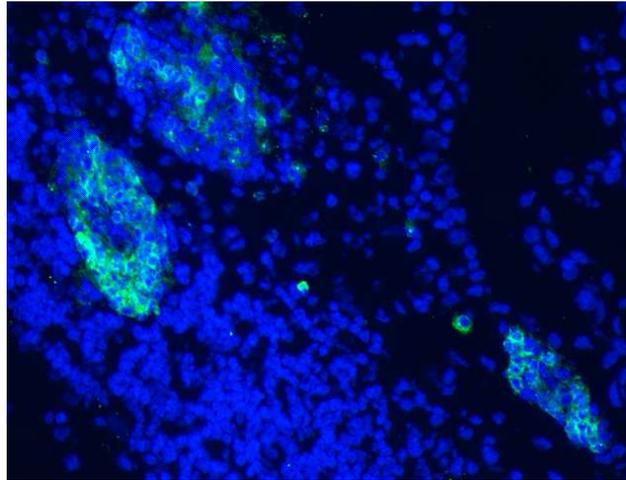


Abb. 4: Expression von CD69 in entzündlichen Läsionen eines Kleinhirns an Tag 14 nach der EAE-Induktion

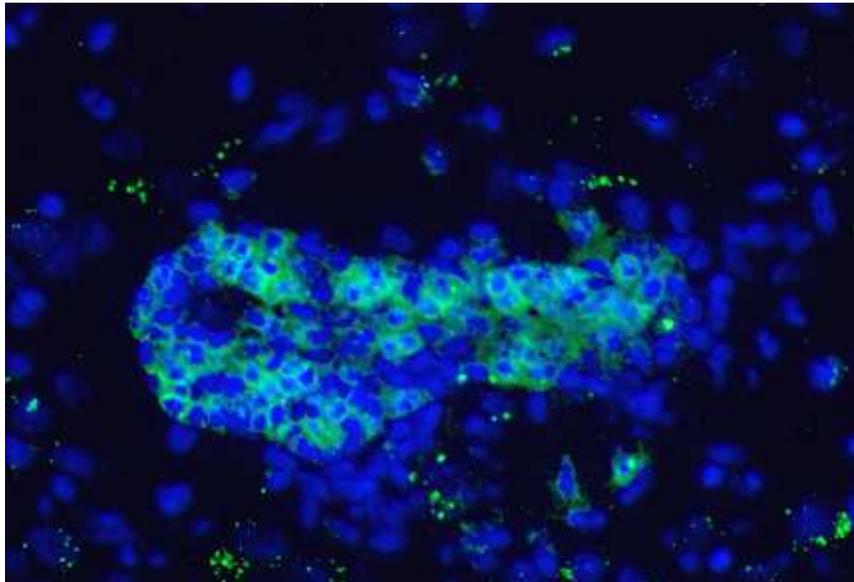


Abb. 5: Expression von CD44 in entzündlichen Läsionen eines Kleinhirns an Tag 14 nach der EAE-Induktion

3.12.3. Apoptose autoreaktiver CD4+-T-Zellen im ZNS

Gleich nach der Invasion in das ZNS exprimieren fast 90% der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen die aktive Caspase-3. Anschließend fällt die

Expression der aktiven Caspase-3 auf etwa 60% der Zellen an Tag 20 nach Immunisierung ab. Dagegen exprimieren nur 20% bis 40% der nicht PLP139-151-spezifischen Zellen die aktive Caspase-3 (Fig. 24). Diese Beobachtungen stimmen überein mit Untersuchungen, die zeigen, dass der Antigenkontakt der T-Zellen im ZNS deren Apoptose initiiert. Bild 6 zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung der aktiven Caspase-3 in einem Kleinhirn einer schwer kranken Maus. Es wird deutlich, dass die Caspase-3 in den Läsionen lokalisiert ist, also an der Stelle, an der der Antigenkontakt stattfindet.

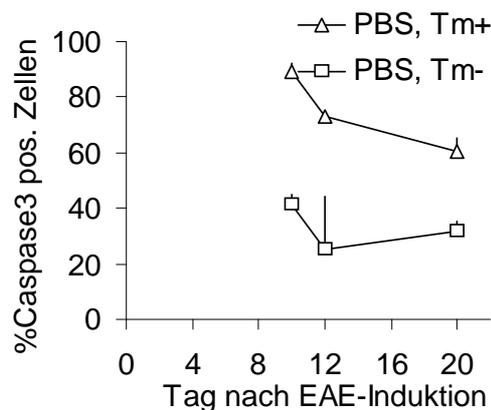


Fig. 24: Relativer Anteil der aktive Caspase-3 exprimierenden CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS

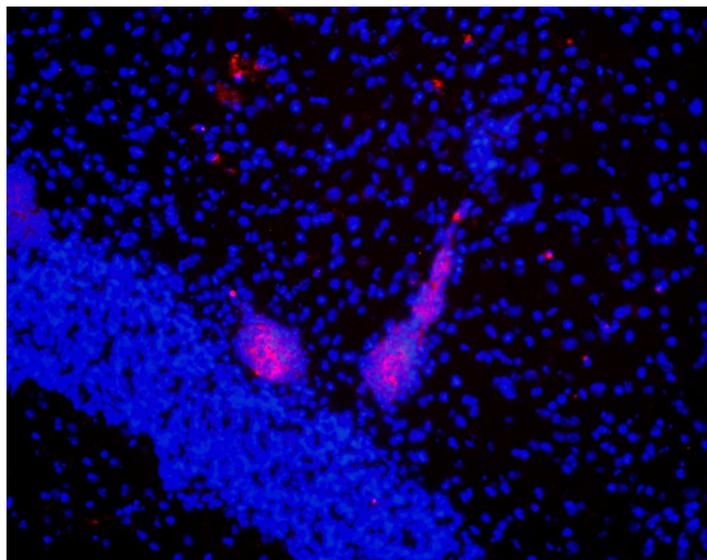


Abb. 6: Expression der aktiven Caspase-3 in entzündlichen Läsionen eines Kleinhirns an Tag 14 nach der EAE-Induktion

3.12.4. Die Expression kostimulierender Moleküle auf autoreaktiven CD4+-T-Zellen im ZNS

Im ZNS exprimieren kontinuierlich zwischen 60% und 80% der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen ICOS. Es besteht darin kein wesentlicher Unterschied zu anderen CD4+-T-Zellen, die zwischen 40% und 60% ICOS exprimieren (Fig. 25a).

CD40L wird an Tag 12 nach Immunisierung, also kurz nach der Zellinvasion, von etwa 20% von PLP139-151-spezifischen und anderen CD4+-T-Zellen exprimiert. Im weiteren Verlauf exprimieren diese Zellen kontinuierlich mehr CD40L, bis an Tag 20 nach Immunisierung ein Maximum von 60% erreicht wird (Fig. 25b). Nahezu identisch wird CTLA-4 kontinuierlich stärker exprimiert. Auch dieses Molekül wird zu Beginn der Zellinvasion von etwa 20% der Zellen exprimiert, an Tag 20 nach Immunisierung von etwa 60% (Fig. 25c).

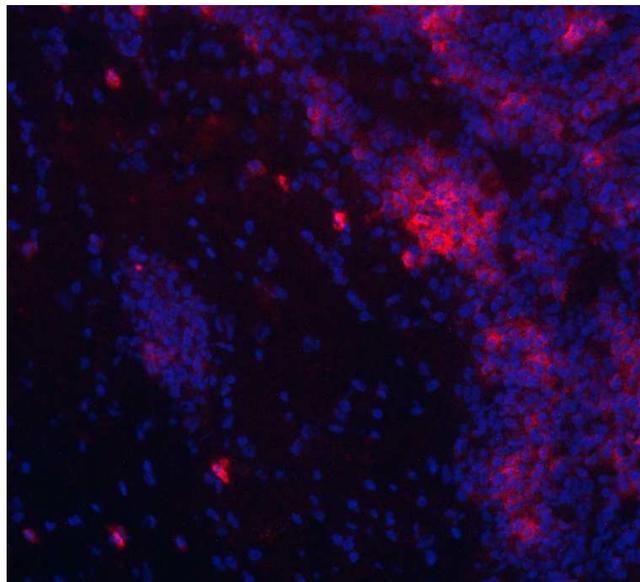


Abb. 7: Expression von ICOS in entzündlichen Läsionen eines Kleinhirns an Tag 14 nach der EAE-Induktion

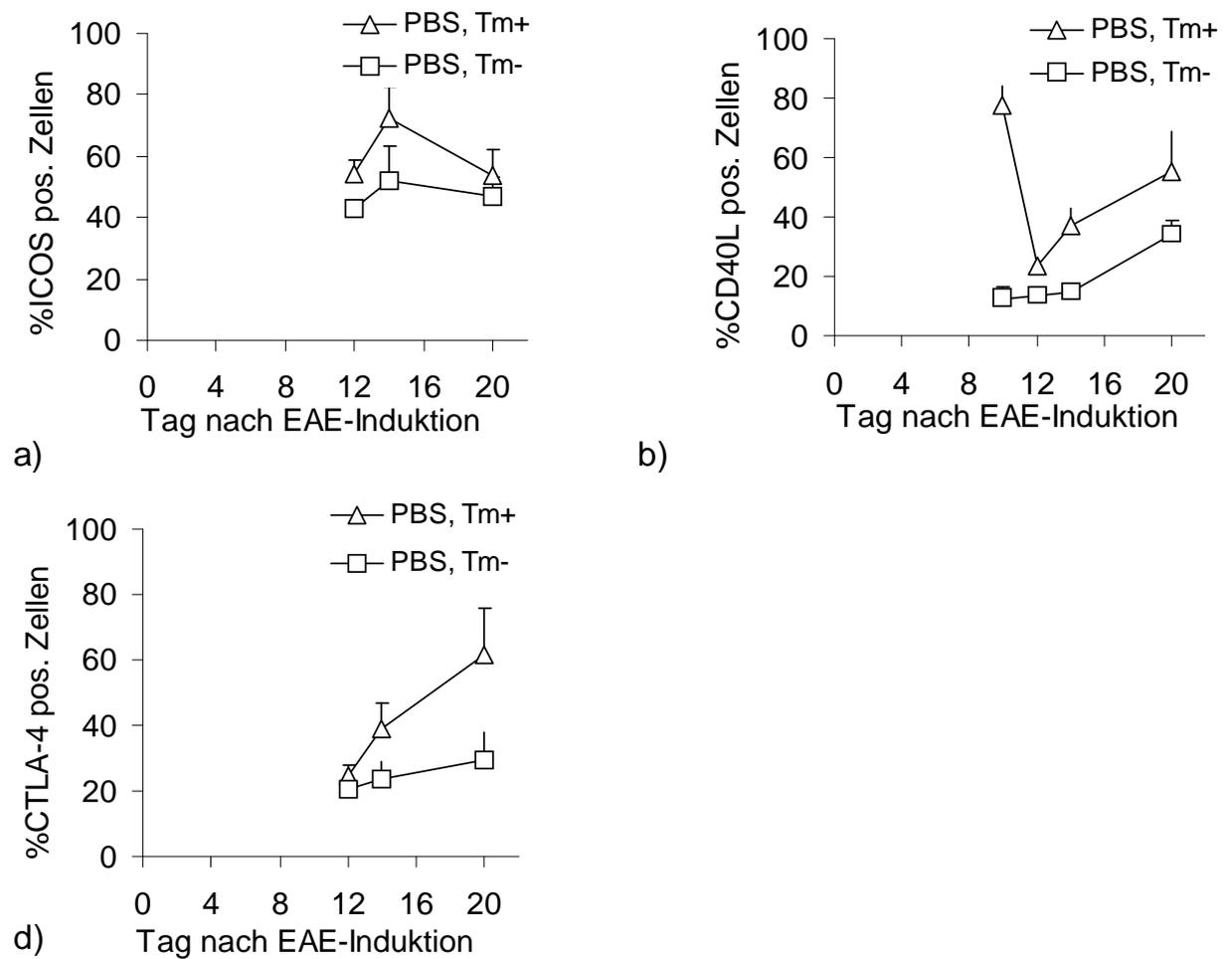


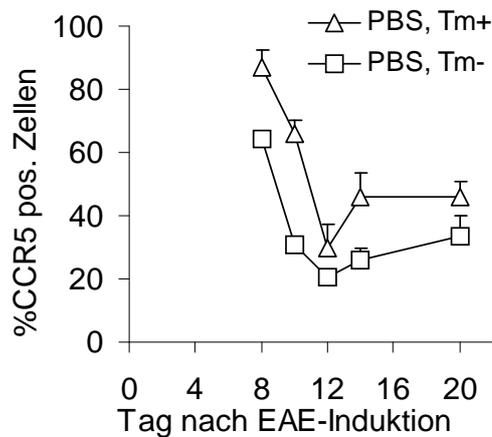
Fig. 25: a) Relativer Anteil ICOS-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS b) Relativer Anteil CD40L-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS c) Relativer Anteil CTLA-4-positiver CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS

3.12.5. Die Expression von Chemokinrezeptoren auf autoreaktiven CD4+-T-Zellen im ZNS

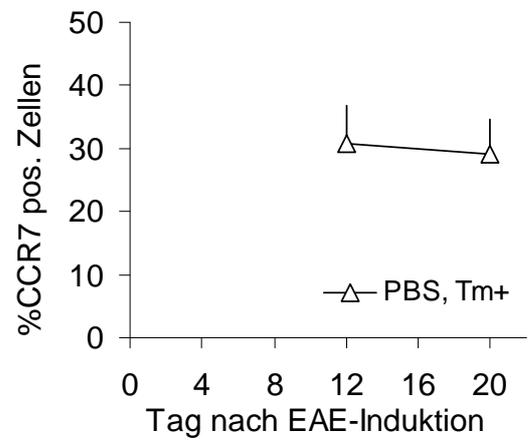
CCR5, ein spezifischer Marker für aktivierte Th1-Zellen und Chemokinrezeptor, der mit der Pathogenese der Multiplen Sklerose assoziiert wurde, wird direkt nach Krankheitsausbruch von 60% bis 90% der PLP139-151+CD4+-T-Zellen exprimiert (Fig. 26a). Anschließend verringert sich der Anteil CCR5-exprimierenden PLP139-151+CD4+-T-Zellen auf etwa 40%, ein Hinweis darauf,

dass die aktivierten Th1-Effektorzellen früh nach ihrer Invasion ins ZNS eliminiert werden.

CCR7 ist ein Chemokinrezeptor, der für das Homing in die Lymphknoten benötigt wird. Es wird angenommen, dass er auf denjenigen Effektorzellen exprimiert wird, die als Gedächtniszellen in die Lymphknoten zurückkehren sollen. In unserem Modell wird CCR7 im ZNS von etwa 30% der PLP139-151+CD4+-T-Zellen exprimiert (Fig. 26b).



a)



b)

Fig. 26: a) Relativer Anteil CCR5-exprimierender CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS b) Relativer Anteil CCR7-exprimierender CD4+-T-Zellen an allen CD4+-T-Zellen im ZNS

4. Diskussion

4.1. Zur Verträglichkeit der li-PLP139-151-Therapie

Die Injektion mit li-PLP139-151, nicht aber eine äquivalente Injektion mit dem li-Wildtyp, verursacht bei Mäusen, die mit dem PLP139-151-Epitop immunisiert wurden, vorübergehende Nebenwirkungen in Form von Tachykardie, Piloerektion und Hyperpnoe. Diese Symptome sind nicht antikörpervermittelt, da sie bereits fünf Tage nach Immunisierung eintreten. Es handelt sich nicht um eine IgE-vermittelte anaphylaktische Reaktion auf ein Autoantigen, wie sie häufig bei Antigentherapien im Tiermodell, aber auch bei klinischen Studien am Menschen beobachtet worden ist (71, 98-101). Wahrscheinlich liegt diesen Symptomen der Einfluss der li-PLP139-151-Moleküle auf antigen-präsentierende Zellen (APZ) und T-Zellen zu Grunde, welche sich zum Zeitpunkt der Injektion, also fünf Tage nach Immunisierung, bereits in einem aktivierten Zustand befinden. Auch solche durch APZ und T-Zellen vermittelte Reaktionen auf therapeutisch eingesetzte Autoantigene wurden schon früher beschrieben. Sie sind möglicherweise im Sinne eines so genannten "cytokine release syndrome" zu verstehen (75, 76). Dabei verursacht insbesondere die Ausschüttung großer Mengen TNF- α einen SIRS-ähnlichen Zustand, der in Tiermodellen für intravenöse Antigentherapien teilweise tödlich verlaufende Leberzellnekrosen verursachte (75, 76) (SIRS = systemic inflammatory response syndrome). Tatsächlich war vermehrt TNF- α -mRNA in den DLN nach li-PLP139-151-Injektion nachweisbar (nicht gezeigt). Da LPS ähnliche Symptome verursacht, wurde die Aufreinigung der li hinsichtlich größtmöglicher Sorgfalt, LPS zu entfernen, optimiert.

4.2. Die li-PLP139-151-Therapie verhindert die Invasion autoreaktiver T-Zellen ins ZNS

Während der li-PLP139-151-Therapie fand keine Invasion autoreaktiver oder anderer Lymphozyten in das ZNS statt. Dieser Befund erklärt die völlige Symptombefreiheit der behandelten Mäuse, ist jedoch keine Voraussetzung hierfür. Prinzipiell ist es möglich, dass eine Autoimmunerkrankung vollständig unterdrückt wird, obwohl eine Invasion von T-Zellen in das Zielorgan stattgefunden hat. Bei der Induktion immunologischer Toleranz im EAE-Modell durch orale Applikation von Antigen enthält das ZNS der behandelten Mäuse zwar Lymphozyteninfiltrate, diese bestehen aber teilweise aus T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften, welche die Ausbildung eines schädigenden Entzündungsherdes unterbinden (33, 74). Ähnliche Ergebnisse liefern Experimente mit Glatiramerazetat im EAE-Modell, nach dessen Applikation schützende Th2-Zellen im Gehirn nachgewiesen wurden (33, 67, 73, 74, 102-105). Weiterhin wurde beobachtet, dass die intravenöse Injektion hoher Antigendosen nach der EAE-Induktion zur Apoptose autoreaktiver T-Zellen im Gehirn führen kann (75, 76). Dass eine Autoimmunreaktion auch dann unterdrückt werden kann, wenn Lymphozyteninfiltrate im Zielorgan vorhanden sind, wurde auch im Tiermodell für den Typ-1 Diabetes gezeigt. Dabei schützte zum Beispiel die immunosuppressiv wirkende Applikation von Antikörpern gegen Tim3 (T cell immunoglobulin domain, mucin domain) vor Typ-1 Diabetes, aber nicht zur Verringerung der Anzahl infiltrierender T-Zellen im Pankreas (20). In diesen Experimenten erfolgte die Suppression der Effektorzellen also zumindest teilweise im Zielorgan. In diesem Punkt unterscheidet sich die li-PLP139-151-Therapie grundlegend, da sie ihre Wirkung außerhalb des Zielorgans entfaltet.

4.3. Die li-PLP139-151-Therapie führt zur selektiven Deletion autoreaktiver Effektor-T-Zellen

Bereits wenige Stunden nach der Injektion von li-PLP139-151 ist eine dramatische Reduktion der Anzahl PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen, aber nur eine geringe Reduktion der Anzahl anderer CD4+-T-Zellen in den DLN nachweisbar. In der Milz indessen ändert sich die Anzahl der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen nach der li-PLP139-151-Injektion nicht signifikant. Zeitgleich zur Reduktion der Anzahl autoreaktiver T-Helferzellen in den DLN kommt es zu einem Anstieg der Expression der aktiven Caspase-3 in dieser Zellpopulation. Die li-PLP139-151-Injektion führt also in einem großen Teil der autoreaktiven T-Helferzellen zur Apoptose. Simultan mit dem Anstieg der Expression der Caspase-3 in Tetramer-positiven Zellen sinkt der Anteil autoreaktiver T-Helferzellen mit einem aktivierten Phänotyp. Während der li-PLP139-151-Therapie kommt es also zu einer selektiven Deletion aktivierter PLP139-151-spezifischer CD4+-T-Zellen in den DLN. Damit wird als primäres Ereignis der li-PLP139-151-Therapie folglich die ZNS-spezifische T-Helferzellpopulation aus den DLN eliminiert. Da diese Befunde die Population der PLP139-151-spezifischen CD4+-T-Zellen betreffen, muss an dieser Stelle auf die Bedeutung der Tetramer-Technik eingegangen werden. Ohne die Möglichkeit der FACS-Analyse antigenspezifischer T-Helferzellen hätten diese Phänomene nicht charakterisiert werden können. Die in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Tetramer-Technik zur Detektion antigenspezifischer, MHC II-restringierter CD4+ T-Zellen war hierfür essentiell.

Interessanterweise fand die Eliminierung der autoreaktiven Lymphozyten ausschließlich in den drainierenden Lymphknoten statt, also am Ort der Initiierung der Immunreaktion. Auf Lymphozyten der Milz und des zentralen Nervensystems konnte kein direkter Einfluss der li-PLP139-151-Therapie gefunden werden.

Die ebenfalls, aber in weit geringerem Ausmaß abfallenden Zahlen anderer CD4+-Zellen könnten über eine *bystander-suppression* vermittelt sein. Als *bystander-suppression* wird die Suppression von Lymphozyten verstanden, die

nicht über den Antigen-Rezeptor vermittelt ist, sondern durch lösliche Faktoren und kontaktvermittelte, antigenunspezifische Faktoren. Für eine solche *bystander-suppression* spricht auch, dass die Anzahl der CD8+-T-Zellen stärker als die der unspezifischen CD4+-T-Zellen sinkt. CD8+-T-Zellen sind in dieser frühen Phase der Immunreaktion besonders sensibel für die Apoptoseinduktion durch Zytokine, außerdem ist ihre Expansion von der Hilfe der CD4+-T-Zellen abhängig (6, 22, 56, 57). Die Eliminierung eines Teils der CD8+-T-Zellen deutet daher auf Mechanismen der *bystander-suppression* durch die li-PLP139-151-Therapie hin. *Bystander-suppression* wird bei der Toleranzinduktion durch regulatorische T-Zellen beobachtet, da die Induktion regulatorischer T-Zellen zwar ein antigenspezifischer Prozess ist, ihre Wirkung auf andere Immunzellen aber nicht antigenspezifisch vermittelt wird (29, 34, 55, 58, 106-109). Die li-PLP139-151-Wirkung ist daher nicht auf die Deletion pathogener Effektorzellen beschränkt.

4.4. Die li-PLP139-151-Therapie verursacht neben der Deletion pathogener Th1-Zellen eine Induktion protektiver PLP139-151-spezifischer Th2-Zellen

Neben der Deletion autoreaktiver T-Zellen führt die li-PLP139-151-Therapie zu einer Verschiebung von der Th1- zur Th2-Zell-Dominanz. Diese Verschiebung resultiert im Wesentlichen aus der Deletion aktivierter IFN- γ -produzierender Effektor-T-Zellen. Auf die selektive Deletion dieser Zellpopulation kann indirekt dadurch geschlossen werden, dass gleichzeitig mit der Aktivierung der Caspase-3 und dem Verschwinden der autoreaktiven Zellen aus den DLN dort der relative Anteil an Tetramer-positiven/IFN- γ -produzierenden T-Zellen sinkt. Die IL-4-produzierenden autoreaktiven CD4+-T-Zellen verbleiben in den DLN. Diese Th2-Zellen sind den Th1-Zellen nach der Injektion zahlenmäßig deutlich überlegen. Sowohl Antigentherapien als auch Therapien mit Glatiramerazetat führen zu einer Verschiebung von der Th1- zur Th2-Dominanz (67, 70, 73, 75, 76, 102-105, 110). Im Tiermodell der Myasthenia gravis, einer

antikörpervermittelten Autoimmunerkrankung, kann die orale Antigengabe Th1-Zellen generieren und so die Th2-vermittelte Antikörperproduktion hemmen (69). In diesen Experimenten scheint die veränderte Th1-/Th2-Balance ein selektiver Mechanismus der Toleranzinduktion zu sein. Im Gegensatz zu diesen Experimenten ermöglicht die Deletion autoreaktiver pathogener Effektorzellen während der Therapie mit li-PLP139-151 möglicherweise erst eine veränderte Balance der Th1-/Th2-Zellen.

4.5. Die li-PLP139-151-Therapie bewirkt eine Induktion CD4+CD25+ Regulatorischer T-Zellen

CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Kontrolle protektiver Immunreaktionen und bei der Etablierung von Immuntoleranz (43-53). Störungen in der Funktion dieses Zelltyps können zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen und Allergien führen (43-53). Über das Verhalten autoantigenspezifischer CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen im Rahmen antigenspezifischer Immuntherapien ist mangels geeigneter Messmethoden nur wenig bekannt. Diesbezüglich konnten in dieser Arbeit mit Hilfe der Tetramer-Technik einige interessante Aspekte etabliert werden, die im Folgenden erörtert werden sollen.

Die li-PLP139-151-Therapie führt zu einer Deletion aktivierter autoreaktiver T-Helferzellen, erkenntlich am Anstieg der Caspase-3-Expression mit gleichzeitigem Abfall der Expression der Aktivierungsmarker CD44, CD69 und CD62L. Der Aktivierungsmarker CD25 wird im Gegensatz hierzu nach der li-PLP139-151-Injektion hochreguliert. Bei gleichzeitigem Anstieg der Menge an Foxp3-mRNA in den DLN der behandelten Mäuse spricht dies für eine relative Zunahme der Anzahl der CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen durch die li-PLP139-151-Injektion. Da sich die absolute Anzahl der CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen jedoch nicht erhöht, ist die Änderung dieses Verhältnisses nicht durch eine Proliferation dieser Zellen erklärbar, sondern durch eine erhöhte Resistenz gegen die li-PLP139-151-induzierte Apoptose.

Effektor-T-Zellen haben also einen deutlich niedrigeren Schwellenwert für die antigengetriggerte Apoptose als CD4+CD25+-Regulatorische T-Zellen. Dies könnte ein grundlegender Unterschied zwischen beiden Zelltypen sein.

Mit der selektiven Deletion pathogener Effektor-T-Zellen und gleichzeitiger Stärkung des Kompartiments CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen kommt es in den DLN zu einer grundlegenden Änderung des Netzwerkes und der Balance krankheitsfördernder und krankheitshemmender Zellpopulationen. Diese Befunde beschränken sich wiederum ausschließlich auf Tetramer-positive, also selbstspezifische Zellen.

Die Bedeutung dieser Ergebnisse wird untermauert, wenn man sich die Beobachtungen einer anderen über MHC Klasse II-Tetramere verfügenden Arbeitsgruppe vergegenwärtigt: Reddy et al. konnten zeigen, dass der entscheidende Unterschied zweier Mausstämme, von denen nur einer für die EAE-Induktion (SJL) empfänglich ist, in der Frequenz PLP139-151-spezifischer CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen liegt: Der EAE-resistente Mausstamm (B10.S) hat eine deutlich höhere Frequenz dieser Zellen gegenüber der SJL-Maus (50). In der für die EAE-Induktion empfänglichen SJL-Maus herrscht also ein gestörtes Gleichgewicht zwischen autoreaktiven Effektor-T-Zellen und selbstspezifischen CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen.

Um zu prüfen, ob sich der Einfluss der li-PLP139-151-Therapie auf eine Änderung des zahlenmäßigen Verhältnisses der regulatorischen und pathogenen T-Zellen beschränkt oder ob sich während der Therapie die immunsuppressive Kapazität der CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen erhöht, wurde die Expression der Zytokine IL-10 und TGF- β sowie der kostimulierenden Moleküle ICOS und CTLA-4 bestimmt. Diesen Molekülen wird eine wichtige Rolle bei der Funktion CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen beigemessen (111-114). Nach der Injektion von li-PLP139-151 steigt die Expression von IL-10, TGF- β und ICOS in den DLN stark an, während die Expression von CTLA-4 unverändert bleibt. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass es unter der li-PLP139-151-Therapie nicht lediglich zu einer rein zahlenmäßigen Änderung verschiedener Zellpopulationen kommt, sondern dass protektive Zellpopulationen in ihrer regulativen Kapazität noch gestärkt

werden. Von besonderer Bedeutung hierbei ist, dass CD4+CD25+-Regulatorische T-Zellen in unserem Modell auf antigenspezifische Stimulation in den peripheren Immunorganen reagieren. Bisher ist in der Literatur vor allem die Meinung vertreten worden, dass CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen im Thymus generiert werden und dann nicht mehr sensibel für Antigenstimulation sind – eine Sichtweise, die erst durch neueste Erkenntnisse relativiert wird (36-41).

Aus den hier aufgeführten Erkenntnissen ergeben sich interessante Aspekte für zukünftige Therapieansätze (53). Autoimmunerkrankungen könnten möglicherweise nicht primär immunsuppressiv behandelt werden, sondern über eine Restaurierung des gestörten Gleichgewichtes pathogener und regulatorischer T-Zellen, wie sie unter der li-PLP139-151-Therapie stattfindet.

4.6. Die Expression kostimulierender Moleküle während der li-PLP139-151-Therapie

Auch die Expression kostimulierender Moleküle verdeutlicht eine Stärkung der T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften während der li-PLP139-151-Therapie. Tim-3 und BTLA sind vor kurzem entdeckte Moleküle, die inhibitorische Signale an T-Zellen geben (19, 21). Tim-3 soll die immunsuppressive Kapazität CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen stärken (20, 115). Über die genauen Effekte des BTLA-Signalweges ist noch wenig bekannt. Interessanterweise werden beide vor allem von Subpopulationen der Th1-Zellen exprimiert (20, 115). Dass diese Moleküle trotz der Deletion eines großen Teils der Th-1-Zellen verstärkt exprimiert werden, kann nur so gedeutet werden, dass eher diejenigen Th1-Zellen die li-PLP139-151-Injektion überleben, die diese Moleküle exprimieren können und somit zu einer Population gehören, die inhibitorische Eigenschaften aufweist. Dies ist also wiederum ein Hinweis auf die unterschiedliche Sensitivität pathogener beziehungsweise inhibierender Zellpopulationen für die antigengetriggerte Deletion.

4.7. Autoreaktive T-Zellen im ZNS

Erst durch die Entwicklung der Tetramer-Technologie ist es möglich geworden, autoreaktive T-Zellen im entzündeten ZNS direkt ex vivo zu untersuchen. Im Folgenden werden die phänotypischen Veränderungen dieser Zellen speziell im Hinblick auf antigenspezifische Aspekte der Immunregulation im ZNS der an EAE erkrankten Mäuse diskutiert.

Zunächst ist auffällig, dass im ZNS der erkrankten Mäuse nur sehr wenige autoreaktive CD4⁺-T-Zellen (etwa 8000 / Hirn) gefunden werden und andere CD4⁺-T-Zellen mit über 30-facher Anzahl deutlich überwiegen. Dieser Befund stimmt überein mit älteren Beobachtungen, die zeigen, dass sehr wenige autoreaktive T-Helferzellen die Kapazität besitzen, die Invasion eines ausgedehnten Repertoires an unspezifischen Entzündungszellen zu steuern (97, 116, 117). T-Helferzellen vermitteln ihre Wirkung über Makrophagen und CD8⁺-T-Zellen, die die Hirnzellen dann direkt schädigen. T-Helferzellen spielen somit keine quantitativ bedeutende Rolle an der Zerstörung des Hirngewebes im Rahmen der Entzündung, sie fungieren vielmehr als Initiatoren und Regulatoren der Entzündungsreaktion und können auf diese Weise schon in sehr geringer Anzahl massive Effekte in Gang setzen.

Die Expression der Aktivierungsmarker auf autoreaktiven T-Zellen im ZNS zeigt, dass praktisch alle ZNS-spezifischen T-Helferzellen im ZNS aktiviert sind. Dieser Befund kann einerseits darauf hinweisen, dass nicht-aktivierte T-Helferzellen nicht in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden (118, 119). Andererseits zeigt die Expression von CD69, welches zum Zeitpunkt der ZNS-Invasion auf den T-Helferzellen in der Peripherie nicht mehr nachgewiesen werden kann, dass die PLP139-151-spezifischen CD4⁺-T-Zellen im ZNS reaktiviert werden. Dies ist wahrscheinlich auf den Kontakt mit dem dort vorkommenden Autoantigen zurückzuführen. Für eine antigenspezifische Aktivierung der infiltrierenden Zellen spricht auch, dass CD4⁺-T-Zellen anderer Spezifitäten zu deutlich geringerem Anteil aktiviert sind.

Direkt nach der Invasion in das ZNS exprimieren die meisten autoreaktiven T-Zellen aktive Caspase-3. Der Anteil der Caspase-3+ Zellen sinkt anschließend kontinuierlich ab, parallel mit dem Verschwinden der Mehrzahl autoreaktiver T-Zellen und der Rückbildung der klinischen Symptome. Gleichzeitig steigt der Anteil der autoreaktiven T-Zellen, die die kostimulierenden Moleküle CTLA-4 und CD40L exprimieren. Ebenfalls wird ICOS, ein kostimulierendes Molekül, das die immunsuppressive Funktion regulatorischer T-Zellen teilweise vermittelt, sehr lange auf den autoreaktiven T-Helferzellen im ZNS exprimiert. Es ist bekannt, dass Lymphozyten im Gehirn dazu neigen, rasch den programmierten Zelltod zu sterben (56, 120, 121). Da in unserem Modell der Apoptose dieser Zellen eine Reaktivierung im Gehirn vorausgeht, könnte dieser Befund durch die Induktion eines so genannten „activation-induced cell death“ erklärt werden. Die Apoptoseinduktion scheint hierbei vor allem Zellen mit einem pathogenen Phänotyp zu betreffen, wohingegen das Expressionsmuster von CTLA-4 und ICOS darauf hindeutet, dass Zellen mit einem protektiven Phänotyp länger im ZNS verbleiben. Auch in entzündlichen ZNS-Läsionen der an EAE erkrankten Mäuse scheinen somit die pathogenen Effektor-T-Zellen deutlich sensibler für die Apoptoseinduktion zu sein als regulatorische T-Zellen mit protektivem Phänotyp. Das Phänomen unterschiedlicher Apoptoseanfälligkeit regulatorischer und pathogener T-Zellen ist im Hinblick auf die immer notwendige Drosselung einer Entzündungsreaktion sehr sinnvoll, trotzdem ist hierüber relativ wenig bekannt.

5. Zusammenfassung

Vor kurzem wurde in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass die EAE, ein Tiermodell der MS, mit rekombinanten Invariante Ketten, deren CLIP-Fragment durch das Myelin-Epitop PLP139-151 ersetzt wurde, vollständig unterdrückt werden kann. In dieser Arbeit wurden die zellulären Mechanismen antigenspezifischer Toleranzinduktion durch intravenöse Injektion der li-PLP139-151 untersucht. Dabei wurde der Einfluss der li-PLP139-151 auf autoreaktive T-Helferzellen und CD4+CD25+-Regulatorische T-Zellen charakterisiert. Mit Hilfe von MHC Klasse II-Tetrameren wurde gezeigt, dass die Injektion der li-PLP139-151 zur antigenspezifischen Deletion pathogener Th1-Zellen führt, während die im EAE-Modell protektiven Th2-Zellen in antigenspezifischer Weise aktiviert werden und das Zytokin IL-4 sezernieren. Interessanterweise entgehen selbstspezifische CD4+CD25+-Regulatorische T-Zellen dem durch die li-PLP139-151 induzierten programmierten Zelltod. Effektor-T-Zellen und CD4+CD25+-Regulatorische T-Zellen unterscheiden sich folglich grundlegend hinsichtlich ihres Schwellenwertes für die Apoptoseinduktion. Dies hat zur Konsequenz, dass die Frequenz der CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten durch die li-PLP139-151-Injektion ansteigt. Darüber hinaus wird die immunsuppressive Kapazität der CD4+CD25+-Regulatorischen T-Zellen während dieser Toleranzinduktion gestärkt, was durch eine gesteigerte Expression der Zytokine IL-10 und TGF- β sowie der kostimulierenden Moleküle ICOS, BTLA und Tim3 deutlich wird. Somit kommt es während der Toleranzinduktion mit li-PLP139-151 zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes Selbst-Antigen-spezifischer Effektor-T-Zellen und CD4+CD25+-Regulatorischer T-Zellen gleicher Spezifität. Diese Befunde liefern grundsätzliche neue Erkenntnisse über die Physiologie autoreaktiver T Lymphozyten. Sie sind von Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieansätze, die darauf abzielen, das Gleichgewicht zwischen Effektor T Zellen und regulatorischen T Zellen zu beeinflussen um spezifische Immunantworten abzuschwächen oder zu verstärken. Dies spielt eine Rolle für die Behandlung von Infektionen, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen wie die MS.

III Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R., and C.A. Janeway, Jr. 2002. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.
2. Janeway, C.A., Jr., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20:197-216.
3. Guermonprez, P., J. Valladeau, L. Zitvogel, C. Thery, and S. Amigorena. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20:621-667.
4. Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M.C. Nussenzweig, and R.M. Steinman. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196:1627-1638.
5. Bonehill, A., C. Heirman, S. Tuyaerts, A. Michiels, Y. Zhang, P. van der Bruggen, and K. Thielemans. 2003. Efficient presentation of known HLA class II-restricted MAGE-A3 epitopes by dendritic cells electroporated with messenger RNA encoding an invariant chain with genetic exchange of class II-associated invariant chain peptide. *Cancer Res* 63:5587-5594.
6. Dhodapkar, M.V., J. Krasovsky, R.M. Steinman, and N. Bhardwaj. 2000. Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest* 105:R9-R14.
7. Scheinecker, C., R. McHugh, E.M. Shevach, and R.N. Germain. 2002. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med* 196:1079-1090.
8. Steinman, R.M., D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Lyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba, and M. Nussenzweig. 2003. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 987:15-25.
9. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711.
10. Benson, J.M., K.A. Campbell, Z. Guan, I.E. Gienapp, S.S. Stuckman, T. Forsthuber, and C.C. Whitacre. 2000. T-cell activation and receptor downmodulation precede deletion induced by mucosally administered antigen. *J Clin Invest* 106:1031-1038.
11. Chang, T.T., C. Jabs, R.A. Sobel, V.K. Kuchroo, and A.H. Sharpe. 1999. Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 190:733-740.
12. Kanamaru, F., P. Youngnak, M. Hashiguchi, T. Nishioka, T. Takahashi, S. Sakaguchi, I. Ishikawa, and M. Azuma. 2004. Costimulation via glucocorticoid-induced TNF receptor in both conventional and CD25+ regulatory CD4+ T cells. *J Immunol* 172:7306-7314.
13. Salomon, B., and J.A. Bluestone. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 19:225-252.
14. Yu, X.Z., M.H. Albert, P.J. Martin, and C. Anasetti. 2004. CD28 ligation induces transplantation tolerance by IFN-gamma-dependent depletion of T cells that recognize alloantigens. *J Clin Invest* 113:1624-1630.

15. Bour-Jordan, H., B.L. Salomon, H.L. Thompson, G.L. Szot, M.R. Bernhard, and J.A. Bluestone. 2004. Costimulation controls diabetes by altering the balance of pathogenic and regulatory T cells. *J Clin Invest* 114:979-987.
16. Khademi, M., Z. Illes, A.W. Gielen, M. Marta, N. Takazawa, C. Baecher-Allan, L. Brundin, J. Hannerz, C. Martin, R.A. Harris, D.A. Hafler, V.K. Kuchroo, T. Olsson, F. Piehl, and E. Wallstrom. 2004. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172:7169-7176.
17. Kumanogoh, A., X. Wang, I. Lee, C. Watanabe, M. Kamanaka, W. Shi, K. Yoshida, T. Sato, S. Habu, M. Itoh, N. Sakaguchi, S. Sakaguchi, and H. Kikutani. 2001. Increased T cell autoreactivity in the absence of CD40-CD40 ligand interactions: a role of CD40 in regulatory T cell development. *J Immunol* 166:353-360.
18. Latchman, Y.E., S.C. Liang, Y. Wu, T. Chernova, R.A. Sobel, M. Klemm, V.K. Kuchroo, G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2004. PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10691-10696.
19. Monney, L., C.A. Sabatos, J.L. Gaglia, A. Ryu, H. Waldner, T. Chernova, S. Manning, E.A. Greenfield, A.J. Coyle, R.A. Sobel, G.J. Freeman, and V.K. Kuchroo. 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415:536-541.
20. Sanchez-Fueyo, A., J. Tian, D. Picarella, C. Domenig, X.X. Zheng, C.A. Sabatos, N. Manlongat, O. Bender, T. Kamradt, V.K. Kuchroo, J.C. Gutierrez-Ramos, A.J. Coyle, and T.B. Strom. 2003. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol* 4:1093-1101.
21. Watanabe, N., M. Gavrieli, J.R. Sedy, J. Yang, F. Fallarino, S.K. Loftin, M.A. Hurchla, N. Zimmerman, J. Sim, X. Zang, T.L. Murphy, J.H. Russell, J.P. Allison, and K.M. Murphy. 2003. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol* 4:670-679.
22. Lanzavecchia, A., and F. Sallusto. 2000. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* 290:92-97.
23. Kuchroo, V.K., A.C. Anderson, H. Waldner, M. Munder, E. Bettelli, and L.B. Nicholson. 2002. T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20:101-123.
24. Steinman, R.M., and M.C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:351-358.
25. Steinman, R.M., and I. Mellman. 2004. Immunotherapy: bewitched, bothered, and bewildered no more. *Science* 305:197-200.
26. Confino-Cohen, R., A. Goldberg, D. Aharoni, L. Naiman, A. Buchs, M. Weiss, J. Weissgarten, and M.J. Rapoport. 2004. Low stimulated IL-4 secretion in PBMC from patients with chronic idiopathic urticaria. *Cytokine* 27:74-80.
27. Dong, C., A.E. Juedes, U.A. Temann, S. Shresta, J.P. Allison, N.H. Ruddle, and R.A. Flavell. 2001. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature* 409:97-101.

28. Loetscher, P., M. Uguccioni, L. Bordoli, M. Baggiolini, B. Moser, C. Chizzolini, and J.M. Dayer. 1998. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 391:344-345.
29. Roncarolo, M.G., R. Bacchetta, C. Bordignon, S. Narula, and M.K. Levings. 2001. Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182:68-79.
30. Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
31. Sallusto, F., C.R. Mackay, and A. Lanzavecchia. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18:593-620.
32. Soos, J.M., O. Stuve, S. Youssef, M. Bravo, H.M. Johnson, H.L. Weiner, and S.S. Zamvil. 2002. Cutting edge: oral type I IFN-tau promotes a Th2 bias and enhances suppression of autoimmune encephalomyelitis by oral glatiramer acetate. *J Immunol* 169:2231-2235.
33. Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 182:207-214.
34. Zhang, X., D.N. Koldzic, L. Izikson, J. Reddy, R.F. Nazareno, S. Sakaguchi, V.K. Kuchroo, and H.L. Weiner. 2004. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:249-256.
35. Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-1164.
36. Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400.
37. Shevach, E.M., C.A. Piccirillo, A.M. Thornton, and R.S. McHugh. 2003. Control of T cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Novartis Found Symp* 252:24-36; discussion 36-44, 106-114.
38. Sakaguchi, S. 2003. Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite. *Nat Immunol* 4:10-11.
39. Sakaguchi, S. 2003. Control of immune responses by naturally arising CD4+ regulatory T cells that express toll-like receptors. *J Exp Med* 197:397-401.
40. Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-562.
41. Sakaguchi, S., S. Hori, Y. Fukui, T. Sasazuki, N. Sakaguchi, and T. Takahashi. 2003. Thymic generation and selection of CD25+CD4+ regulatory T cells: implications of their broad repertoire and high self-reactivity for the maintenance of immunological self-tolerance. *Novartis Found Symp* 252:6-16; discussion 16-23, 106-114.
42. Sakaguchi, S., T. Takahashi, S. Yamazaki, Y. Kuniyasu, M. Itoh, N. Sakaguchi, and J. Shimizu. 2001. Immunologic self tolerance maintained by T-cell-mediated control of self-reactive T cells: implications for autoimmunity and tumor immunity. *Microbes Infect* 3:911-918.
43. Tarbell, K.V., S. Yamazaki, K. Olson, P. Toy, and R.M. Steinman. 2004. CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1467-1477.

44. Arif, S., T.I. Tree, T.P. Astill, J.M. Tremble, A.J. Bishop, C.M. Dayan, B.O. Roep, and M. Peakman. 2004. Autoreactive T cell responses show proinflammatory polarization in diabetes but a regulatory phenotype in health. *J Clin Invest* 113:451-463.
45. Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. *Nature* 420:502-507.
46. Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 198:1875-1886.
47. Fehervari, Z., and S. Sakaguchi. 2004. Control of Foxp3+ CD25+CD4+ regulatory cell activation and function by dendritic cells. *Int Immunol* 16:1769-1780.
48. Fehervari, Z., and S. Sakaguchi. 2004. Development and function of CD25+CD4+ regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* 16:203-208.
49. Fehervari, Z., and S. Sakaguchi. 2004. A paragon of self-tolerance: CD25+CD4+ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther* 6:19-25.
50. Reddy, J., Z. Illes, X. Zhang, J. Encinas, J. Pyrdol, L. Nicholson, R.A. Sobel, K.W. Wucherpfennig, and V.K. Kuchroo. 2004. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15434-15439.
51. Takahashi, T., and S. Sakaguchi. 2003. The role of regulatory T cells in controlling immunologic self-tolerance. *Int Rev Cytol* 225:1-32.
52. Takahashi, T., and S. Sakaguchi. 2003. Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease. *Curr Mol Med* 3:693-706.
53. Tang, Q., K.J. Henriksen, M. Bi, E.B. Finger, G. Szot, J. Ye, E.L. Masteller, H. McDevitt, M. Bonyhadi, and J.A. Bluestone. 2004. In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 199:1455-1465.
54. Takahashi, K., T. Aranami, M. Endoh, S. Miyake, and T. Yamamura. 2004. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain* 127:1917-1927.
55. Schwartz, R.H. 2003. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 21:305-334.
56. Green, D.R., N. Droin, and M. Pinkoski. 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193:70-81.
57. Lenardo, M., K.M. Chan, F. Hornung, H. McFarland, R. Siegel, J. Wang, and L. Zheng. 1999. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* 17:221-253.
58. O'Garra, A., and P. Vieira. 2004. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10:801-805.
59. Bonifaz, L.C., D.P. Bonnyay, A. Charalambous, D.I. Darguste, S. Fujii, H. Soares, M.K. Brimnes, B. Moltedo, T.M. Moran, and R.M. Steinman. 2004. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199:815-824.

60. Dhodapkar, M.V., R.M. Steinman, J. Krasovsky, C. Munz, and N. Bhardwaj. 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 193:233-238.
61. Fisson, S., G. Darrasse-Jeze, E. Litvinova, F. Septier, D. Klatzmann, R. Liblau, and B.L. Salomon. 2003. Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med* 198:737-746.
62. Gallucci, S., M. Lolkema, and P. Matzinger. 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5:1249-1255.
63. Hawiger, D., K. Inaba, Y. Dorsett, M. Guo, K. Mahnke, M. Rivera, J.V. Ravetch, R.M. Steinman, and M.C. Nussenzweig. 2001. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194:769-779.
64. Hawiger, D., R.F. Masilamani, E. Bettelli, V.K. Kuchroo, and M.C. Nussenzweig. 2004. Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20:695-705.
65. Aharoni, R., P.G. Schlegel, D. Teitelbaum, O. Roikhel-Karpov, Y. Chen, R. Arnon, M. Sela, and N.J. Chao. 1997. Studies on the mechanism and specificity of the effect of the synthetic random copolymer GLAT on graft-versus-host disease. *Immunol Lett* 58:79-87.
66. Aharoni, R., D. Teitelbaum, M. Sela, and R. Arnon. 1997. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10821-10826.
67. Aharoni, R., A. Meshorer, M. Sela, and R. Arnon. 2002. Oral treatment of mice with copolymer 1 (glatiramer acetate) results in the accumulation of specific Th2 cells in the central nervous system. *J Neuroimmunol* 126:58-68.
68. Anderton, S.M., C.G. Radu, P.A. Lowrey, E.S. Ward, and D.C. Wraith. 2001. Negative selection during the peripheral immune response to antigen. *J Exp Med* 193:1-11.
69. Baggi, F., F. Andreetta, E. Caspani, M. Milani, R. Longhi, R. Mantegazza, F. Cornelio, and C. Antozzi. 1999. Oral administration of an immunodominant T-cell epitope downregulates Th1/Th2 cytokines and prevents experimental myasthenia gravis. *J Clin Invest* 104:1287-1295.
70. Marusic, S., and S. Tonegawa. 1997. Tolerance induction and autoimmune encephalomyelitis amelioration after administration of myelin basic protein-derived peptide. *J Exp Med* 186:507-515.
71. McDevitt, H. 2004. Specific antigen vaccination to treat autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14627-14630.
72. Nishimura, E., T. Sakihama, R. Setoguchi, K. Tanaka, and S. Sakaguchi. 2004. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 16:1189-1201.
73. Teitelbaum, D., R. Arnon, and M. Sela. 1999. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3842-3847.
74. Weiner, H.L. 1997. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 48:341-351.
75. Weishaupt, A., R. Gold, S. Gaupp, G. Giegerich, H.P. Hartung, and K.V. Toyka. 1997. Antigen therapy eliminates T cell inflammation by apoptosis:

- effective treatment of experimental autoimmune neuritis with recombinant myelin protein P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1338-1343.
76. Weishaupt, A., S. Jander, W. Bruck, T. Kuhlmann, M. Stienekemeier, T. Hartung, K.V. Toyka, G. Stoll, and R. Gold. 2000. Molecular mechanisms of high-dose antigen therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis: rapid induction of Th1-type cytokines and inducible nitric oxide synthase. *J Immunol* 165:7157-7163.
 77. Wekerle, H. 2002. Tackling multiple sclerosis. *Nature* 420:39-40.
 78. Steinman, L. 2001. Multiple sclerosis: a two-stage disease. *Nat Immunol* 2:762-764.
 79. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry. 1933. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *J Exp Med* 58:39-56.
 80. Amor, S., N. Groome, C. Linington, M.M. Morris, K. Dornmair, M.V. Gardinier, J.M. Matthieu, and D. Baker. 1994. Identification of epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein for the induction of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and Biozzi AB/H mice. *J Immunol* 153:4349-4356.
 81. Anderson, A.C., L.B. Nicholson, K.L. Legge, V. Turchin, H. Zaghouani, and V.K. Kuchroo. 2000. High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire. *J Exp Med* 191:761-770.
 82. Greer, J.M., V.K. Kuchroo, R.A. Sobel, and M.B. Lees. 1992. Identification and characterization of a second encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein (residues 178-191) for SJL mice. *J Immunol* 149:783-788.
 83. Greer, J.M., R.A. Sobel, A. Sette, S. Southwood, M.B. Lees, and V.K. Kuchroo. 1996. Immunogenic and encephalitogenic epitope clusters of myelin proteolipid protein. *J Immunol* 156:371-379.
 84. Owens, T., H. Wekerle, and J. Antel. 2001. Genetic models for CNS inflammation. *Nat Med* 7:161-166.
 85. Wekerle, H. 1999. Remembering MOG: autoantibody mediated demyelination in multiple sclerosis? *Nat Med* 5:153-154.
 86. Sun, D., J.N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle, and C.S. Raine. 2001. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 166:7579-7587.
 87. Huseby, E.S., D. Liggitt, T. Brabb, B. Schnabel, C. Ohlen, and J. Goverman. 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 194:669-676.
 88. Genain, C.P., B. Cannella, S.L. Hauser, and C.S. Raine. 1999. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat Med* 5:170-175.
 89. Bischof, F., W. Wienhold, C. Wirblich, G. Malcherek, O. Zevering, A.M. Kruisbeek, and A. Melms. 2001. Specific treatment of autoimmunity with recombinant invariant chains in which CLIP is replaced by self-epitopes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12168-12173.
 90. Champagne, P., G.S. Ogg, A.S. King, C. Knabenhans, K. Ellefsen, M. Nobile, V. Appay, G.P. Rizzardi, S. Fleury, M. Lipp, R. Forster, S. Rowland-Jones, R.P. Sekaly, A.J. McMichael, and G. Pantaleo. 2001. Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes. *Nature* 410:106-111.
 91. Klenerman, P., V. Cerundolo, and P.R. Dunbar. 2002. Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. *Nat Rev Immunol* 2:263-272.

92. Amyes, E., C. Hatton, D. Montamat-Sicotte, N. Gudgeon, A.B. Rickinson, A.J. McMichael, and M.F. Callan. 2003. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J Exp Med* 198:903-911.
93. Cameron, T.O., J.R. Cochran, B. Yassine-Diab, R.P. Sekaly, and L.J. Stern. 2001. Cutting edge: detection of antigen-specific CD4+ T cells by HLA-DR1 oligomers is dependent on the T cell activation state. *J Immunol* 166:741-745.
94. Liu, C.P., K. Jiang, C.H. Wu, W.H. Lee, and W.J. Lin. 2000. Detection of glutamic acid decarboxylase-activated T cells with I-Ag7 tetramers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:14596-14601.
95. Novak, E.J., A.W. Liu, G.T. Nepom, and W.W. Kwok. 1999. MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen. *J Clin Invest* 104:R63-67.
96. Reijonen, H., E.J. Novak, S. Kochik, A. Heninger, A.W. Liu, W.W. Kwok, and G.T. Nepom. 2002. Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at-risk subjects. *Diabetes* 51:1375-1382.
97. Bischof, F., M. Hofmann, T.N. Schumacher, F.A. Vyth-Dreese, R. Weissert, H. Schild, A.M. Kruisbeek, and A. Melms. 2004. Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary and secondary challenge using MHC class II tetramers. *J Immunol* 172:2878-2884.
98. Hohlfeld, R., and H. Wekerle. 2004. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14599-14606.
99. Steinman, L. 2004. Immune therapy for autoimmune diseases. *Science* 305:212-216.
100. Pedotti, R., D. Mitchell, J. Wedemeyer, M. Karpuj, D. Chabas, E.M. Hattab, M. Tsai, S.J. Galli, and L. Steinman. 2001. An unexpected version of horror autotoxicus: anaphylactic shock to a self-peptide. *Nat Immunol* 2:216-222.
101. Pedotti, R., M. Sanna, M. Tsai, J. DeVoss, L. Steinman, H. McDevitt, and S.J. Galli. 2003. Severe anaphylactic reactions to glutamic acid decarboxylase (GAD) self peptides in NOD mice that spontaneously develop autoimmune type 1 diabetes mellitus. *BMC Immunol* 4:2.
102. Pedotti, R., J.J. De Voss, L. Steinman, and S.J. Galli. 2003. Involvement of both 'allergic' and 'autoimmune' mechanisms in EAE, MS and other autoimmune diseases. *Trends Immunol* 24:479-484.
103. Pedotti, R., J.J. DeVoss, S. Youssef, D. Mitchell, J. Wedemeyer, R. Madanat, H. Garren, P. Fontoura, M. Tsai, S.J. Galli, R.A. Sobel, and L. Steinman. 2003. Multiple elements of the allergic arm of the immune response modulate autoimmune demyelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1867-1872.
104. Teitelbaum, D., T. Brenner, O. Abramsky, R. Aharoni, M. Sela, and R. Arnon. 2003. Antibodies to glatiramer acetate do not interfere with its biological functions and therapeutic efficacy. *Mult Scler* 9:592-599.
105. Aharoni, R., B. Kayhan, R. Eilam, M. Sela, and R. Arnon. 2003. Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:14157-14162.
106. Aharoni, R., D. Teitelbaum, R. Arnon, and M. Sela. 2001. Copolymer 1 inhibits manifestations of graft rejection. *Transplantation* 72:598-605.
107. Aharoni, R., D. Teitelbaum, O. Leitner, A. Meshorer, M. Sela, and R. Arnon. 2000. Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice

- protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:11472-11477.
108. Anderson, A.C., J. Reddy, R. Nazareno, R.A. Sobel, L.B. Nicholson, and V.K. Kuchroo. 2004. IL-10 plays an important role in the homeostatic regulation of the autoreactive repertoire in naive mice. *J Immunol* 173:828-834.
 109. Jooss, K., B. Gjata, O. Danos, H. von Boehmer, and A. Sarukhan. 2001. Regulatory function of in vivo anergized CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:8738-8743.
 110. Pasare, C., and R. Medzhitov. 2003. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033-1036.
 111. You, S., G. Slehoffer, S. Barriot, J.F. Bach, and L. Chatenoud. 2004. Unique role of CD4+CD62L+ regulatory T cells in the control of autoimmune diabetes in T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14580-14585.
 112. Wekerle, T., J. Kurtz, S. Bigenzahn, Y. Takeuchi, and M. Sykes. 2002. Mechanisms of transplant tolerance induction using costimulatory blockade. *Curr Opin Immunol* 14:592-600.
 113. Stern, J.N., Z. Illes, J. Reddy, D.B. Keskin, E. Sheu, M. Fridkis-Hareli, H. Nishimura, C.F. Brosnan, L. Santambrogio, V.K. Kuchroo, and J.L. Strominger. 2004. Amelioration of proteolipid protein 139-151-induced encephalomyelitis in SJL mice by modified amino acid copolymers and their mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:11743-11748.
 114. Stienekemeier, M., K. Falk, O. Rotzschke, A. Weishaupt, C. Schneider, K.V. Toyka, R. Gold, and J.L. Strominger. 2001. Vaccination, prevention, and treatment of experimental autoimmune neuritis (EAN) by an oligomerized T cell epitope. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:13872-13877.
 115. Aharoni, R., D. Teitelbaum, R. Arnon, and M. Sela. 1999. Copolymer 1 acts against the immunodominant epitope 82-100 of myelin basic protein by T cell receptor antagonism in addition to major histocompatibility complex blocking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:634-639.
 116. Arnon, R., and R. Aharoni. 2004. Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 Suppl 2:14593-14598.
 117. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4:330-336.
 118. Sabatos, C.A., S. Chakravarti, E. Cha, A. Schubart, A. Sanchez-Fueyo, X.X. Zheng, A.J. Coyle, T.B. Strom, G.J. Freeman, and V.K. Kuchroo. 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol* 4:1102-1110.
 119. Dong, C., and R.I. Nurieva. 2003. Regulation of immune and autoimmune responses by ICOS. *J Autoimmun* 21:255-260.
 120. Grimbacher, B., A. Hutloff, M. Schlesier, E. Glocker, K. Warnatz, R. Drager, H. Eibel, B. Fischer, A.A. Schaffer, H.W. Mages, R.A. Kroczeck, and H.H. Peter. 2003. Homozygous loss of ICOS is associated with adult-onset common variable immunodeficiency. *Nat Immunol* 4:261-268.
 121. Grimbacher, B., K. Warnatz, and H.H. Peter. 2003. The immunological synapse for B-cell memory: the role of the ICOS and its ligand for the longevity of humoral immunity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 3:409-419.

122. Herman, A.E., G.J. Freeman, D. Mathis, and C. Benoist. 2004. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 199:1479-1489.
123. Steinman, L. 1996. A few autoreactive cells in an autoimmune infiltrate control a vast population of nonspecific cells: a tale of smart bombs and the infantry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:2253-2256.
124. Steinman, L. 2004. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. *Nat Immunol* 5:575-581.
125. Brennan, F.R., J.K. O'Neill, S.J. Allen, C. Butter, G. Nuki, and D. Baker. 1999. CD44 is involved in selective leucocyte extravasation during inflammatory central nervous system disease. *Immunology* 98:427-435.
126. Brocke, S., C. Piercy, L. Steinman, I.L. Weissman, and T. Veromaa. 1999. Antibodies to CD44 and integrin alpha4, but not L-selectin, prevent central nervous system inflammation and experimental encephalomyelitis by blocking secondary leukocyte recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6896-6901.
127. Pender, M.P., and M.J. Rist. 2001. Apoptosis of inflammatory cells in immune control of the nervous system: role of glia. *Glia* 36:137-144.
128. Bauer, J., M. Bradl, W.F. Hickey, S. Forss-Petter, H. Breitschopf, C. Linington, H. Wekerle, and H. Lassmann. 1998. T-cell apoptosis in inflammatory brain lesions: destruction of T cells does not depend on antigen recognition. *Am J Pathol* 153:715-724.

IV Dank

Die vorliegende Arbeit wurde an der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen unter Leitung von Prof. Dr. med. Arthur Melms und Dr. med. Felix Bischof angefertigt.

Prof. Dr. med. Melms danke ich sehr herzlich für seine ausgezeichnete Betreuung, für zahlreiche gewinnbringende Gespräche und für die viele Zeit, die er sehr großzügig für mein Projekt aufzubringen bereit war. Von dem Wissen, das er mir vermittelt hat, werde ich lange profitieren.

Dr. med. Bischof danke ich ebenfalls sehr herzlich für seine Betreuung, für die Etablierung dieses interessanten Projektes und vor allem dafür, dass er mir wissenschaftliches Arbeiten auf eine Weise nahe gebracht hat, von der ich noch lange profitieren werde.

Herrn Prof. Dr. Dietz danke ich sehr herzlich für seine exzellente, wegweisende und sehr großzügige Hilfestellung bei der statistischen Auswertung der Arbeit.

Dr. med. Bastian Amend danke ich für seine beständige Hilfe, ohne die ich die Anfangsschwierigkeiten im Labor nur schwer gemeistert hätte, außerdem für viele interessante Diskussionen.

Frau Evelyn Dubois danke ich sehr herzlich für die Produktion der Tetramere und für ihre Hilfsbereitschaft im Labor.

Frau Dr. rer. nat. Eva Tolosa und Dr. med. Robert Weissert verdanke ich zahlreiche wegweisende Ratschläge und lehrreiche Diskussionen.

Der Boehringer-Ingelheim-Stiftung danke ich für ihre finanzielle Unterstützung.

Und schließlich gebührt meiner Familie ganz besonderer Dank für ihre Unterstützung und den Rückhalt auch in schwierigen Phasen dieser Doktorarbeit.