

**Der Einfluss von Immunoproteasomen und Toll-Like
Rezeptoren auf Repertoire und Aktivierung
von T-Zellen**

DISSERTATION

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

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2006

vorgelegt von

Philipp Osterloh

Tag der mündlichen Prüfung: 19. September 2006

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer
1. Berichterstatter: Prof. Hans-Georg Rammensee
2. Berichterstatter: Prof. Hansjörg Schild

1	EINLEITUNG	- 7 -
1.1	<i>Das Immunsystem: Funktion und Bedeutung</i>	- 7 -
1.2	<i>Die angeborene Immunität</i>	- 7 -
1.3	<i>Die erworbene Immunität</i>	- 9 -
1.4	<i>Aufbau und Funktion der Histokompatibilitäts-Moleküle (MHC)</i>	- 11 -
1.5	<i>Antigenerkennung durch T-Lymphozyten</i>	- 13 -
1.6	<i>Antigenprozessierung und –präsentation für MHC-Klasse I</i>	- 14 -
1.7	<i>Das 20S Proteasom und der Einfluss von IFN-γ</i>	- 14 -
1.8	<i>Der Proteasom Aktivator PA28 und der 19S Regulator</i>	- 16 -
1.9	<i>Der TAP Transporter</i>	- 17 -
1.10	<i>Beladung der MHC-Klasse I Moleküle</i>	- 18 -
1.11	<i>Antigenprozessierung und –präsentation für MHC-Klasse II</i>	- 19 -
1.12	<i>Aktivierung naiver T-Zellen</i>	- 20 -
1.13	<i>Regulatorische T-Zellen</i>	- 22 -
1.14	<i>Positive und Negative Selektion im Thymus</i>	- 24 -
1.15	<i>Reifung und Aktivierung von Dendritischen Zellen</i>	- 26 -
1.16	<i>Toll-Like Rezeptoren</i>	- 28 -
1.17	<i>Zielsetzung</i>	- 30 -
2	MATERIAL & METHODEN	- 33 -
2.1	<i>Material</i>	- 33 -
2.1.1	Verwendete Mausstämme	- 33 -
2.1.2	Grundmedien	- 33 -
2.1.2.1	<i>DC-Medium (BMDC Differenzierungsmedium)</i>	- 33 -
2.1.2.2	<i>Testmedium</i>	- 33 -
2.1.2.3	<i>T-Zell-Medium</i>	- 34 -
2.1.2.4	<i>Einfriermedium</i>	- 34 -
2.1.3	Primäre Antikörper	- 34 -
2.1.3.1	<i>FITC-konjugiert</i>	- 34 -
2.1.3.2	<i>PE-konjugiert</i>	- 34 -
2.1.3.3	<i>PerCp-konjugiert</i>	- 34 -
2.1.3.4	<i>PerCp-Cy5.5-konjugiert</i>	- 35 -

2.1.3.5	<i>PE-Cy7-konjugiert</i>	- 35 -
2.1.3.6	<i>APC-konjugiert</i>	- 35 -
2.1.3.7	<i>APC-Cy7-konjugiert</i>	- 35 -
2.1.3.8	<i>Anti-mouse Isotyp Antikörper</i>	- 35 -
2.1.3.9	<i>Sekundäre Antikörper</i>	- 35 -
2.1.4	ELISA-Standards und ELISA-Kits	- 36 -
2.1.5	Standard Chemikalien	- 36 -
2.1.6	Weitere Materialien:	- 36 -
2.1.7	Verwendete Puffer	- 37 -
2.1.8	Verwendete Geräte und andere Hilfsmittel	- 37 -
2.1.9	Plastik und Glaswaren	- 37 -
2.2	Methoden	- 38 -
2.2.1	Zellkultur	- 38 -
2.2.1.1	<i>Zelllinien</i>	- 38 -
2.2.1.2	<i>Bestimmung der Lebendzellzahl</i>	- 38 -
2.2.1.3	<i>Kryokonservierung und Auftauen von Zellen</i>	- 39 -
2.2.1.4	<i>Präparation und Aktivierung von BMDCs</i>	- 39 -
2.2.1.5	<i>Primärzellen</i>	- 41 -
2.2.2	Typisierung der verwendeten Mausstämme	- 42 -
2.2.3	Blutentnahme bei Versuchstieren	- 43 -
2.2.4	Immunisierung von Mäusen	- 44 -
2.2.4.1	<i>Subkutane Immunisierung (s.c.)</i>	- 44 -
2.2.4.2	<i>Intraperitoneale Immunisierung (i.p.) mit aktivierten, Peptid-beladenen Dendritischen Zellen</i>	- 44 -
2.2.4.3	<i>Transkutane Immunisierung über die Haut (TCI)</i>	- 45 -
2.2.5	Ansetzen einer klassischen CTL-Kultur	- 45 -
2.2.6	Restimulation von T-Zellen	- 46 -
2.2.7	Magnetically Assisted Cell Sorting (MACS)	- 46 -
2.2.7.1	<i>Anreicherung naiver CD4⁺ T-Zellen</i>	- 47 -
2.2.7.2	<i>Anreicherung von Regulatorischen T-Zellen</i>	- 47 -
2.2.7.3	<i>Anreicherung naiver CD8⁺ T-Zellen</i>	- 48 -
2.2.7.4	<i>Depletion von CD8⁺ T-Zellen aus dem Knochenmark</i>	- 48 -
2.2.8	T Zell Proliferations Assay	- 49 -
2.2.9	Suppressions-Ansatz mit Regulatorischen T-Zellen (T _{regs})	- 50 -
2.2.10	⁵¹ Cr-Freisetzungs-Assay	- 51 -
2.2.11	In vivo Zytotoxizitäts-Assay	- 52 -
2.2.12	FACS-Färbung (Durchflusszytometrie)	- 54 -
2.2.13	Intrazelluläre Zytokin-Färbung	- 54 -
2.2.14	Knochenmarkstransfer	- 55 -

2.2.15	Listerieninfektion _____	- 56 -
2.2.16	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) _____	- 56 -
2.2.17	Aufreinigung von c20S und i20S _____	- 57 -
2.2.18	In vitro Verdau von Peptiden _____	- 58 -
3	ERGEBNISSE TEIL I _____	- 60 -
3.1	<i>Erste Anhaltspunkte für eine Beeinflussung des T-Zell-Repertoires durch Immunoproteasomen</i> _____	- 60 -
3.2	<i>Abhängigkeit der Cp1α-Prozessierung von Immunoproteasomen</i> _____	- 62 -
3.3	<i>Veränderte T-Zell-Selektion des OT-1 T-Zell-Rezeptors auf LMP7 Hintergrund</i> _____	- 66 -
3.4	<i>Charakterisierung der LMP7 Knock-Out/ OT-1 und LMP7 WT/ OT-1 T-Zellen</i> _____	- 71 -
3.4.1	Proliferation _____	- 72 -
3.4.2	Spezifische Lyse von Zielzellen _____	- 73 -
3.4.3	Intrazelluläre IFN- γ Produktion _____	- 75 -
3.5	<i>OT-1 Knochenmark-Transfer in bestrahlte LMP7 Knock-Out Mäuse</i> _____	- 77 -
3.6	<i>Intravenös injiziertes Cp1α kann die positive Selektion des OT-1 TCR wiederherstellen</i> _____	- 80 -
3.7	<i>Cp1α hat keinen Einfluss auf die periphere Proliferation von OT-1 T-Zellen</i> _____	- 83 -
3.8	<i>Infektion mit OVA-transgenen Listerien</i> _____	- 85 -
3.9	<i>T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Anomalie in LMP7 Knock-Out Mäusen</i> _____	- 89 -
4	DISKUSSION TEIL I _____	- 92 -
5	ERGEBNISSE TEIL II _____	- 97 -
5.1	<i>Überlegene immun-stimulatorische Charakteristika von BMDCs nach kombinierter Stimulation mit TLR3 und TLR7 Agonisten</i> _____	- 98 -
5.2	<i>Raschere Kinetik der IL-6 und RANTES Produktion nach „Superstimulation“ von BMDCs</i> _____	- 100 -
5.3	<i>Stimulus-Removal</i> _____	- 102 -
5.4	<i>„Superstimulierte“ BMDCs aktivieren transgene T-Zellen in vitro besser als einzeln TLR stimulierte BMDCs</i> _____	- 103 -

5.5	<i>„Superstimulierte“ BMDCs aktivieren transgene T-Zellen nach adoptivem Transfer in vivo besser als einzeln TLR stimulierte BMDCs</i>	- 105 -
5.6	<i>Überlegenes in vivo Priming von Wild-Typ CD8⁺ T-Zellen durch „superstimulierte“ BMDCs</i>	- 107 -
5.7	<i>„Superstimulierte“ BMDCs und ihr Einfluss auf T_{reg}-vermittelte Suppression von T-Zell-Proliferation und -Aktivierung</i>	- 111 -
5.8	<i>Ein löslicher Faktor, sezerniert von „superstimulierten“ BMDCs, ist für die Durchbrechung der T_{reg}-vermittelten Suppression verantwortlich</i>	- 117 -
6	DISKUSSION	- 121 -
7	ZUSAMMENFASSUNG	- 127 -
8	ABKÜRZUNGEN	- 130 -
9	REFERENZEN	- 132 -
10	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS	- 146 -
11	DANKSAGUNG	- 147 -
12	AKADEMISCHE LEHRER	- 149 -
13	TABELLARI SCHER LEBENSLAUF	- 150 -

1 Einleitung

1.1 *Das Immunsystem: Funktion und Bedeutung*

Das Immunsystem setzt sich aus vielen Komponenten zusammen, die äusserst komplex und wohl reguliert miteinander (inter)agieren und kommunizieren. Das koordinierte Zusammenspiel der molekularen und zellulären Bestandteile bezeichnet man als Immunantwort, die dem Schutz des Organismus vor Befall durch körperfremde Partikel, Viren, Prokaryoten, Eukaryoten, Pilze oder Würmer dient. Zudem sollte es im „Normalfall“ zu keiner Reaktion gegen körpereigene Strukturen kommen, ein Phänomen, das man als „Immunologische Toleranz“ beschreibt. Die Fähigkeit des Immunsystems, zwischen eigenen („Selbst“) und fremden („Fremd“) Strukturen zu unterscheiden stellt somit die zentrale Basis für ein solches Schutzsystem dar und dient der Erhaltung der individuellen Integrität. Die Komplexität eines Immunsystems nimmt mit der phylogenetische Entwicklungsstufe eines Bioorganismus zu: Je komplexer die zu schützende Struktur, desto vielschichtiger das Immunsystem. Bei den höher entwickelten Lebewesen bilden Haut und Schleimhäute den ersten, physikalischen Abwehrwall gegen Pathogene, der durch chemische Komponenten oder antimikrobielle Substanzen in Speichel, Mukus, Schweiß, Verdauungssäften oder anderen Sekreten ergänzt wird. Überwinden Pathogene diese ersten epithelialen Barrieren, kommen die eigentlichen Waffen des Immunsystems zum Zuge, die als „angeborene“ und „erworbene“ Immunantworten bezeichnet werden. Diese beiden Eckpfeiler bilden den aktiven Teil des Immunsystems.

1.2 *Die angeborene Immunität*

Die angeborene Immunantwort umfasst alle diejenigen Abwehrmassnahmen und -mechanismen, die dem Organismus bereits vor dem ersten Kontakt mit dem Pathogen zur Verfügung stehen und meist nicht speziell gegen einen Erreger gerichtet sind. Neben den bereits beschriebenen physikalischen und chemischen Barrieren spricht man in diesem Zusammenhang vor allem von der Erkennung von

pathogenen Mustern (PAMPs, „Pathogen-Associated Molecular Patterns“), auf die sofort reagiert werden kann. Da diese Reaktion jedoch auch bei wiederholtem Kontakt mit demselben Pathogen nicht moduliert oder optimiert wird, bezeichnet man diese Immunantwort als angeborene Immunität. Sie dient in der Hauptsache der Kontrolle der eingedrungenen Pathogene und leitet durch mannigfaltige Botenstoffe, wie Chemokine, Zytokine oder andere reaktive Moleküle (Sauerstoffradikale, Peroxide, NO, Prostaglandine, Leukotriene) das koordinierte Anlaufen der spezifischen, adaptiven Immunantwort ein, die durch die Art und Weise der angeborenen Immunantwort maßgeblich instruiert und gesteuert wird. Auf zellulärer Ebene spielen bei der angeborenen Immunität besonders phagozytierende Leukozyten, vor allem Makrophagen und Neutrophile Granulozyten eine wichtige Rolle. Makrophagen sind in der Lage, fremde Partikel zu phagozytieren und sezernieren nach ihrer Aktivierung entzündungsvermittelnde, lösliche Mediatoren, die weitere Helferzellen anlocken und/ oder deren Proliferation durch Wachstumsstimulation anregen. Neutrophile Granulozyten reagieren mit Hilfe ihrer Fc-Rezeptoren auf opsonisierte Partikel, d.h. auf Pathogene, die mit Antikörpern gegen als „Fremd“ erkannte Oberflächenstrukturen bedeckt und damit als „Eindringling“ markiert sind. Weitere Mitspieler im Konzert der angeborenen zellulären Immunantwort sind die Eosinophilen und Basophilen Granulozyten, die vor allem auf IgE-komplexiertes Antigen bzw. freies IgE reagieren. Zudem rechnet man der zellulären angeborenen Immunantwort die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), $\gamma\delta$ -T-Zellen und NKT-Zellen zu. Die Erkennung von pathogenen Strukturen oder Mustern erfolgt durch diverse Rezeptoren auf den beschriebenen Zellen und führt in vielen Fällen neben der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren zur vermehrten Expression von kostimulatorischen Molekülen, womit die Zellen den Charakter von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (pAPCs) annehmen. Die Interaktion von angeborener und erworbener Immunantwort ist besonders in den letzten Jahren in den Fokus der immunologischen Forschung gerückt und lässt sich anschaulich am Beispiel der Toll-Like Rezeptoren (TLRs) verdeutlichen. Diese Rezeptoren erkennen pathogen-spezifische Moleküle oder Muster wie Endotoxin (LPS), Flagellin, Zymosan, einzel- oder doppel-strängige RNA (ssRNA, dsRNA) oder unmethylierte CpG-DNA. Auf die Kaskade von Ereignissen, die eine Toll-Like Rezeptor-Ligand Bindung auslöst wird letzten Kapitel der Einleitung detailliert eingegangen.

1.3 Die erworbene Immunität

Im Gegensatz zu der angeborenen Immunität zeichnen sich die reifen Lymphozyten der adaptiven Immunantwort durch einen einzigen Antigenrezeptor aus, der klonalen Ursprungs ist und mit hoher Spezifität für die Erkennung eines Antigens verantwortlich ist. Die Entstehung solcher klonalen Antigenrezeptoren verdankt die erworbene Immunität dem genetische Phänomen der somatischen Rekombination, die Millionen von Lymphozyten mit einer unermesslichen Anzahl von unterschiedlichen Spezifitäten hervorbringt, die ruhend nebeneinander koexistieren. Erst die Erkennung eines Antigens durch den jeweiligen Antigenrezeptor führt zu einer selektiven klonalen Expansion eines solchen Lymphozyten, der sich, wenn parallel kostimulatorische Signale vermittelt werden, aktiv an einer spezifischen Immunantwort beteiligen kann. Die Zellen der spezifischen Immunität lassen sich in B-Zellen, T-Helfer- und inflammatorische T-Zellen sowie zytotoxische T-Zellen unterteilen, die jedoch alle miteinander eint, dass sie die Charakteristika der Spezifität und Diversität aufweisen und sich zudem durch Gedächtnisbildung, Selbstbeschränkung und „Selbst-Fremd“-Erkennung auszeichnen.

B-Lymphozyten reifen im Knochenmark und verlassen dieses als naive B-Zellen. Sie sind als Vermittler der humoralen Immunantwort für die Produktion von spezifischen Antigenrezeptoren verantwortlich, die zunächst membranständig sind, im Verlauf einer adaptiven Immunantwort jedoch als spezifische Immunglobuline sezerniert werden. Die Pathogen-spezifischen Antikörper erkennen z.B. Strukturen auf der Oberfläche der Erreger und „opsonisieren“ diese, d.h. hüllen die Eindringlinge in einen Mantel aus Antikörpern. Die so als „Fremd“ markierte Struktur kann nun auf mindestens zwei Arten attackiert werden: Erstens können die auf der Oberfläche gebundenen Antikörper zur Aktivierung der Komplementkaskade führen, die in ihrem Verlauf als Ziel die Lyse des Erregers hat. Zweitens kann die Opsonisierung zu einer phagozytotischen Attacke von Fresszellen (Granulozytne, Makrophagen, Monozyten) führen, die ebenfalls die Elimination der fremden Struktur zur Folge hat. Damit B-Zellen nach Antigenerkennung ihren Ruhestatus verlassen und voll aktiviert spezifische Antikörper produzieren und somit ihre Effektorfunktion ausüben können, sind sie auf unterstützende Stimulation von T-Helfer-Lymphozyten angewiesen (s. MHC-Klasse II Prozessierung). Diese „Helfer“ Funktion wird von den T_{H1} - und T_{H2} -Zellen durch direkten Zell-Zell-Kontakt vermittelt und durch die Ausschüttung von

Zytokinen unterstützt. Wird eine B-Zellen durch die beiden Signale aktiviert, wandelt sie sich in eine Antikörper-sezernierende Plasmazelle um, die ihre Spezifität beibehält, so dass jede Plasmazellen nur Antikörper einer Spezifität produziert. Durch das „Class-Switching“ kann die B-Zelle ausserdem unterschiedliche Subtypen von Immunglobulinen produzieren. Die B-Zell-vermittelte Immunantwort spielt besonders bei der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen eine Rolle.

T-Lymphozyten hingegen sind die Hauptdarsteller in der Zell-vermittelten spezifischen Immunantwort und üben ihre „Selbst - Fremd“ Kontrollfunktion über direkten Zell-Zell-Kontakt aus. Auch sie entstehen aus hämatopoetischen Zellen im Knochenmark, reifen aber erst nach Einwanderung in den Thymus vollständig zu naiven T-Zellen heran. Neben den bereits beschriebenen T-Helfer-Zellen (T_{H1} oder T_{H2}) sind es besonders die zytotoxischen T-Zellen (CTLs), die den Organismus ständig auf und ab patrouillieren, um potentiell bedrohliche Veränderungen zu entdecken. Mit Hilfe des T-Zell-Rezeptors (TCR) scannen T-Zellen die MHC-Moleküle von allen ihnen zugänglichen Zellen auf ihre Peptid-Beladung ab, um Peptide pathogenen Ursprungs oder krankhafter Veränderung sofort zu erkennen. Eine Antigenerkennung führt auch hier zu einer sofortigen klonalen Expansion der entsprechenden T-Zelle, die durch Ausschüttung von Granzym B und/ oder Perforin oder Fas/ Fas-Ligand vermittelter Interaktion die Lyse der Zielzellen bzw. das Apoptoseprogramm der Wirtszelle einleiten kann. Wie bei B-Zellen sind auch bei T-Zellen zwei Signale zwingend notwendig, um zu einer vollständigen Aktivierung zu führen: Einerseits die Erkennung von Antigen mit dem spezifischen Antigenrezeptor im Kontext des jeweiligen MHC-Typs und andererseits die parallele Stimulation der T-Zelle durch ein kostimulatorisches Signal, welches nur durch eine professionell-antigenpräsentierenden Zelle (pAPC) vermittelt werden kann. Diese Rolle wird besonders effektiv von Dendritischen Zellen übernommen. Die T-Zell-vermittelte Immunität spielt besonders bei intrazellulären Pathogenen wie Viren und intrazellulär-lebenden Bakterien eine Rolle, die sich aufgrund ihres bevorzugten Aufenthaltsortes der Antikörper-vermittelten Abwehr entziehen.

Beide aufgeführten Pfeiler der adaptiven Immunantwort sind neben ihren Effektoreigenschaften in der Lage, ein so genanntes immunologisches Gedächtnis auszubilden, welches bei Konfrontation des Organismus mit demselben Pathogen eine sehr viel schnellere und effektivere Reaktion ermöglicht. So gibt es sowohl Gedächtnis B-Zellen als auch Gedächtnis T-Zellen, die viele Jahre nach dem Ende

einer spezifischen Immunantwort im Körper verbleiben und den Organismus so über einen langen Zeitraum hinweg schützen können.

1.4 Aufbau und Funktion der Histokompatibilitäts-Moleküle (MHC)

Die Konversion von exogenen und endogenen Proteinen in immunogene Peptide, die von T-Lymphozyten erkannt werden können, beinhaltet eine Serie von proteolytischen und anderen enzymatischen Schritten, an deren Ende die Präsentation der antigenen Peptidfragmente auf membranständigen Glycoproteinen steht. Da die Funktion dieser für die adaptive Immunantwort unerlässlichen Zelloberflächenproteine in ihren Anfängen durch Beobachtungen bei Gewebetransplantationen im Tiermodell Maus geklärt werden konnte, werden sie historisch als „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) Moleküle bezeichnet. Die experimentelle Beobachtung, dass der Ausgang von Tumorgewebe-Transplantationen im Sinne von Akzeptanz oder Abstossung ganz entscheidend an die genetischen Hintergründe von Spender und Empfänger gekoppelt ist (Little 1914, Gorer 1937), markierte den Beginn der Suche nach den molekularen Grundlagen dieser Zusammenhänge. Mit Inzuchtstämmen und kongenen Mäusen konnte der genetische Locus schliesslich eingegrenzt werden und offenbarte im humanen MHC-System HLA („Human Leukocyte Antigens“) einen erstaunlichen allelischen Polymorphismus, der bis heute alle anderen untersuchten Genloci an Diversität übertrifft. Die humanen HLA-Loci liegen dabei auf Chromosom 6, während sich die H-2 Loci der Maus auf Chromosom 17 befinden. Der endgültige experimentelle Befund der Notwendigkeit der MHC-Region für die Erkennung von (Virus)-infizierten Zellen durch zytotoxische T-Zellen und vor allem der Restriktion der zytotoxischen T-Zellen durch die MHC-Genprodukte erbrachten Zinkernagel und Doherty (Zinkernagel and Doherty 1974), die für ihre bahnbrechenden Studien 1996 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden.

Bei dem MHC-Komplex handelt es sich um eine DNA-Sequenz, die ca. $5 - 8 \cdot 10^6$ Basenpaare umfasst und im humanen System ca. 200 Gene beinhaltet. Viele dieser „Immune-Response“ Gene kodieren Proteine, die für eine konstruktive Immunantwort unerlässlich sind. So liegen in diesem Genbereich beispielsweise die genetischen Bauanleitungen für die α -Ketten der MHC-Klasse I Moleküle, die Gene der α - und β -Ketten der MHC-Klasse II Moleküle, die TAP-1 und -2 Gene, die LMP2 und -7 Gene,

um nur die prominentesten unter den vielen wichtigen zu nennen. Die MHC-Moleküle sind durch Disulfidbrücken verbundene, membranständige, glykosylierte Heterodimere, wobei sich Klasse I und II Moleküle im Aufbau leicht unterscheiden. MHC-Klasse I Moleküle bestehen aus einer die Membran durchquerenden α -Kette (43 kDa), deren drei Domänen umfassender extrazellulärer Teil mit dem ausschliesslich extrazellulären β_2 -Mikroglobulin (β_2 M, 12 kDa) nichtkovalent assoziiert ist. Sie sind auf allen kernhaltigen Zellen zu finden und werden von CD8 positiven T-Zellen erkannt. Im Gegensatz hierzu bestehen Klasse II Moleküle aus je einer die Membran durchquerenden α - und β -Kette (34 kDa und 29 kDa), die beide zwei extrazelluläre Domänen aufweisen und ebenfalls nichtkovalent verknüpft sind. Sie sind nur im Thymusstroma und auf antigenpräsentierenden Zellen nachzuweisen und werden von CD4 positiven T-Zellen erkannt. Das entscheidende Charakteristikum beider MHC-Moleküle ist jedoch die räumliche Gestaltung der extrazellulären Domänen, die in beiden Fällen eine Bindung von antigenen Peptiden ermöglicht, sich aber wiederum im Detail unterscheidet. MHC-Klasse I Moleküle bilden mit der α_1 und α_2 Domäne eine plastische Struktur, die im Aufblick als eine von zwei α -Helices seitlich begrenzte und auf einem antiparallelen β -Faltblatt liegende Grube erscheint, die seitlich begrenzt ist. Diese Struktur stellt die Bindungsfurche für die Peptidantigene dar, die in gestreckter Konformation mit einer durchschnittlichen Länge von 8 - 10 Aminosäuren über MHC-Allel-spezifische Ankerpositionen gebunden werden können (Falk et al. 1991;Madden et al. 1992). Ähnlich ist die Struktur der Klasse II Bindungstasche, die jedoch aus den Domänen α_1 und β_1 aufgebaut ist. Der Hauptunterschied zwischen beiden Molekülen besteht darin, dass die zwar seitlich ebenso begrenzte Furche der Klasse II Moleküle an den Seiten offen ist und so viel längere Peptidfragmente aufnehmen kann (12 – 25 Aminosäurereste) (Brown et al. 1993;Stern et al. 1994). Die Amino- und Carboxytermini und Seitenketten der Peptide beider MHC-Moleküle binden über bestimmte Ankerpositionen oder Bindungsmotive die von taschenartigen Ausbuchtungen der Grube bestimmt werden (und im übrigen für Klasse I Moleküle viel feiner definiert sind), via Wasserstoffbrückenbindung und hydrophobe Wechselwirkungen an Aminosäurereste der Grube. Die verschiedenen MHC-Allel Produkte bestimmen somit das von ihnen gebundene Spektrum an Peptiden (Falk et al. 1991;Rotzschke et al. 1991); ein Phänomen, was mittlerweile sogar für die biotechnologisch-immunologische Forschung in der Krebsbekämpfung ausgenützt

wird (www.immatics.de). Der erwähnte allelische Polymorphismus der MHC Moleküle spiegelt sich dabei im Wesentlichen in der räumlichen Struktur der Peptidgrube wieder, da hier der Austausch lediglich einer Aminosäure die Oberflächen- und Taschenstruktur und somit die Natur der akzeptierten Peptidliganden stark beeinflussen kann. Durchschnittlich exprimiert ein Mensch 6 verschiedene MHC-Klasse I und 8 verschiedene MHC-Klasse II Moleküle.

1.5 Antigenerkennung durch T-Lymphozyten

Die bereits erwähnten T-Zell-Patrouillen detektieren die MHC-Klasse I oder II/ Peptid-Komplexe mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR), wobei die T-Lymphozyten sich in der Expression ihrer CD4 oder CD8 Korezeptoren unterscheiden und CD8 positive T-Zellen Peptide auf MHC-Klasse I und CD4 positive T-Zellen Peptide auf MHC-Klasse II Molekülen erkennen. Die TCR sind membranständige, glycosylierte Heterodimere, die aus α - und β -Ketten aufgebaut sind (auf die Ausnahme der $\gamma\delta$ -T-Zellen soll hier nicht weiter eingegangen werden). Sie haben strukturelle Ähnlichkeit mit den Immunglobulinen, da der den MHC-Peptid-Komplex erkennende aminoternale Teil des TCR ebenfalls durch somatische Rekombination mehrerer genetischer Elemente (V-, D- und J-Regionen) variiert wird. Hochgerechnet liegt die Zahl der potentiell möglichen unterschiedlichen TCR-Spezifitäten bei etwa 10^{14} , wobei wie bei den Immunglobulinen auch pro T-Zelle nur ein einzigartiger, spezifischer TCR vorliegt. Die hohe Sequenzvariabilität während der T-Zell-Reifung betrifft lediglich die „Complementary Determining Regions“ oder CD-Regionen 1, 2 und 3, welche in den membrandistalen Bereichen der α - und β -Ketten räumlich beieinander liegen und für die Bindung des TCR an die MHC-Peptid-Komplexe verantwortlich sind. Die Bindung von TCR and MHC-Moleküle erfordert daneben noch die Ko-Rezeptormoleküle CD4 auf T-Helferzellen und CD8 auf zytotoxischen T-Zellen: CD4 bindet hierbei an nichtvariable Abschnitte des MHC-Klasse II Moleküls, während CD8 an konservierte MHC-Klasse I Motive bindet; beide Korezeptoren erhöhen die Sensitivität der Antigenerkennung im Kontext mit MHC um das den Faktor 100.

1.6 Antigenprozessierung und –präsentation für MHC-Klasse I

Die auf MHC-Klasse I Molekülen präsentierten Peptide sind hauptsächlich zytosolischen Ursprungs und stammen von intrazellulären Proteinen. Ohne Rücksicht auf ihre Herkunft (endogen, mutiert, viral) werden intrazelluläre Proteine durch zytosolische Proteasen kontinuierlich degradiert, wobei das Proteasom als dominanteste Endopeptidase im Zytosol den grössten Anteil an der Proteolyse und somit den grössten Einfluss auf sie hat (Kloetzel 2004). Als Substrate kommen nicht mehr benötigte oder bereits direkt nach der Synthese falsch gefaltete Proteine („Defective Ribosomal Products“, DRiP´s) in Frage, die durch Polyubiquitinylierung durch das Ubiquitinsystem für den Abbau quasi markiert werden (Schubert et al. 2000; Yewdell 2002; Yewdell et al. 2001). Wurde das Auftreten der „DRiP´s“ zunächst nur phänomenologisch beschrieben aber immunologisch nur unzureichend begründet, konnten Herter et. al (Herter et al. 2005) mit der Untersuchung von DALIS („Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures“) (Lelouard et al. 2002; Lelouard et al. 2004) in Dendritischen Zellen einen konkreten Hinweis für den Funktion dieser Strukturen liefern. Sie können in professionellen APCs anscheinend die Prozessierung und Präsentation von Antigen solange zurückhalten, bis die für eine effektive T Zell Aktivierung nötigen kostimulatorischen Signale ebenfalls voll ausgeprägt sind. Ist die Maschinerie der Kostimulation angelaufen, werden die Polyubiquitinsubstrate der DALIS durch das 20S Proteasom abgebaut und die Fragmente auf der Zelloberfläche präsentiert.

1.7 Das 20S Proteasom und der Einfluss von IFN- γ

Das 20S Proteasom als proteolytische Hauptaktivität im Zytosol setzt sich aus vier Ringen à sieben Untereinheiten zusammen . Die vier Ringe liegen übereinander und bilden eine fassförmige Struktur mit α - β - β - α Ringabfolge aus (Groll et al. 1997). Nur drei der β -Untereinheiten (β_1 , β_2 , β_5 , um nur eine Nomenklatur zu verwenden) weisen, nach innen liegend, proteolytische Aktivität auf, so dass im 20S Proteasom insgesamt 2 x 3 aktive Zentren vorliegen, die als Chymotrypsin-ähnlich (Schnitt C-terminal nach grossen, hydrophoben Aminosäuren), Trypsin-ähnlich (Schnitt C-terminal nach basischen Aminosäuren) und Kaspase-ähnlich (Schnitt C-terminal nach sauren Aminosäuren) beschrieben werden. Die Anzahl der verfügbaren β -

Untereinheiten wird jedoch durch die Interferon- γ induzierbaren Untereinheiten LMP2 (Glynne et al. 1991), LMP7 (Kelly et al. 1991) und MECL-1 (Nandi et al. 1996) ergänzt, welche β_1 , β_2 und β_5 ersetzen können und ebenfalls innerhalb des MHC-Genlokus kodiert werden. Alle proteolytisch aktiven Untereinheiten entstehen in der Biosynthese zunächst als inaktive Propeptide, deren N-terminalen Prosequenzen im Laufe der Proteasom-Synthese abgespalten werden (Chen and Hochstrasser 1996). Im Gegensatz zum konstitutiv vorliegenden „Standardproteasom“ bei wird das Proteasom nach dem durch IFN- γ induzierbaren Austausch der konstitutiven Untereinheiten und Ersatz durch LMP2, LMP7 und MECL-1 als „Immunoproteasom“ bezeichnet (Boes et al. 1994; Monaco and McDevitt 1986). Der Einbau der „Immuno“-Untereinheiten erfolgt dabei hierarchisch: MECL-1 kann nur eingebaut werden, wenn LMP2 ebenfalls in die Biosynthese einbezogen wird; LMP2 wiederum ist vom Vorhandensein von LMP7 abhängig. Die entsprechenden Knock-Out Tiere (Fehling et al. 1994; Van Kaer et al. 1994) liefern aber zumindest keinen eindeutigen Phänotyp und zeigen eher Epitop-spezifische Abweichungen von der Wild-Typ Kontrollen (s.u., Schnittpräferenz). Mit Modellpeptiden und –proteinen, die mit chromatografisch aus Zelllinien aufgereinigten konstitutiven- und Immuno-Proteasomen in vitro verdaut wurden, konnte nach Analyse und Vergleich der Abbauprodukte ein klarer Unterschied bezüglich der Schnittspezifität beider Proteasomen-Spezies festgestellt werden (Morel et al. 2000b; Toes et al. 2001b). Das Immunoproteasom scheint bevorzugt Peptide mit hydrophoben und basischen C-Termini zu produzieren (Tenzer et al. 2004b), welche tendenziell eine höhere Affinität für die meisten MHC-Klasse I Moleküle besitzen (Niedermann et al. 1997) und auch von TAP bevorzugt ins ER transportiert werden. Schnitte nach sauren Aminosäuren werden durch das Immunoproteasom anscheinend vermindert gesetzt. Es gibt aber zudem zahlreiche Publikationen, die je nach untersuchtem Antigen auf eine absolute Notwendigkeit der jeweils einen oder anderen Proteasomen-Spezies für die Generation des korrekten C-Terminus eines bestimmten Peptid-Epitops hindeuten, bzw. die die eine oder andere Proteasomen-Spezies gar für die Zerstörung eines Epitops verantwortlich machen (Cerundolo et al. 1995; Morel et al. 2000a; Sibille et al. 1995; Van den Eynde and Morel 2001; van Hall et al. 2000). Es lässt zum jetzigen Zeitpunkt also nicht dogmatisch oder abschliessend feststellen, dass Immunoproteasomen im Vergleich zu konstitutiven Proteasomen generell die „besseren“ Peptide herstellen („besser“ im Sinne von besser geeignet, um auf Klasse I Molekülen präsentiert zu werden). Nur

kurz erwähnt sei, dass es neben dem Proteasom noch zahlreiche weitere intrazelluläre Proteasen gibt, die eventuelle Epitopvorläufer, deren korrekten C-Terminus das Proteasom produziert hat, dann N-terminal weiter prozessieren. Besonders hervorzuheben ist hier die Tripeptidylpeptidase II (TPPII) (Levy et al. 2002;Reits et al. 2004;Seifert et al. 2003), die mit der Herstellung einiger Peptid-Antigene in Verbindung gebracht wird. Neben TPPII gibt es noch die Bleomycin-Hydrolase (BH) (Stoltze et al. 2000), die Leucin-Aminopeptidase (LAP) (Beninga et al. 1998) oder die Puromycin-sensitive Aminopeptidase (PSA) (Stoltze et al. 2000). Auch im ER können verlängerte Peptid-Liganden weiter getrimmt werden (Saric et al. 2002;York et al. 2002).

1.8 Der Proteasom Aktivator PA28 und der 19S Regulator

Neben dem Austausch der proteolytischen Zentren im Kern des 20S Proteasoms wird dessen Aktivität zudem noch durch Interaktionspartner des Proteasoms beeinflusst. Der Regulator PA28 ist ein ATP-unabhängiger Aktivator des 20S Proteasoms, der sich aus je drei α - und β -Untereinheiten heterohexamersch zusammensetzt und ebenfalls eine ringähnliche Struktur ausbildet (Dubiel et al. 1992;Kuehn and Dahlmann 1996). Die Expression der α - und β -Untereinheiten ist ebenfalls durch Interferon- γ induzierbar und suggeriert durch diese Abhängigkeit zumindest die Einflussnahme bei der Generierung von T-Zell-Epitopen. Experimentelle Daten hierzu liegen jedoch nicht in aussagekräftiger Menge vor. Publiziert jedoch ist die Beobachtung, dass die Proteolyserate von flourogenen Modellsubstraten durch die Bindung des PA28 Regulators and das 20S Proteasoms erhöht wird und die dann generierten Fragmente durch koordinierte Doppelspaltung entstehen können (Dick et al. 1996). Die Knock-Out Maus liefert auch hier keine eindeutigen Befunde und lässt je nach untersuchtem Peptid auf eine förderliche oder hinderliche Rolle schliessen. Ein weiterer Interaktionspartner des 20S Proteasoms ist die so genannte „19S cap“, der an ein oder beide Ende(n) des Kern-Partikels binden kann und dann zur Bezeichnung „26S“ Proteasom führt (Glickman et al. 1998). Dieser auch „Regulatorischer Partikel“ genannte Interaktionspartner ist im Komplex mit dem 20S Proteasom für die Erkennung von Polyubiquitin-Strukturen (Hershko and Ciechanover 1998) und im Folgenden für die ATP-abhängige Entfaltung der Substrate (Jentsch and Schlenker 1995), deren Deubiquitylierung und Einspeisung

in den proteolytischen Zylinder zuständig (Chu-Ping et al. 1994; Hoffman et al. 1992; Udvardy 1993). Die herausragende Stellung des Proteasoms in der Antigenprozessierung und –präsentation konnte vor allem auch durch Inhibitorstudien mit Lactacystein manifestiert werden (Craiu et al. 1997; Rock et al. 1994), die eine eindeutige Korrelation zwischen proteasomaler Aktivität und somit Peptidgeneration und der Expression von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche, die ohne Peptidliganden äusserst instabil sind, aufzeigten.

1.9 Der TAP-Transporter

Nach der proteolytischen Zersetzung der Proteine durch das Proteasom müssen die Peptidfragmente, um erstens der vollständigen Zerstörung zu entgehen und zweitens überhaupt auf MHC-Klasse I Moleküle beladen werden zu können, mit dem Heterodimer „Transporter Associated with Antigenprocessing“ (Click et al. 1992), kurz TAP (TAP1/ TAP2) ATP-abhängig (Neefjes et al. 1993) in das Endoplasmatische Retikulum geschleust werden. Der Transport vom Proteasom zu den ER-Membran-ständigen TAP-Molekülen erfolgt wahrscheinlich mit Hilfe von Shuttle-Molekülen, „Chaperonen“ (Suto and Srivastava 1995), da die Peptidfragmente im Zytosol permanent der Gefahr von Exopeptidase-Aktivität ausgesetzt sind. In das ER transportiert erfolgt hier das eventuell notwendige finale Trimmung des N-Terminus durch endoplasmatische Aminopeptidasen (ERAP-1, ERAP-2) (Saric et al. 2002; Saveanu et al. 2005; York et al. 2002) und dann die Beladung der Klasse I Moleküle. TAP, welches ebenfalls im MHC-Lokus codiert vorliegt, translociert ATP-abhängig präferentiell Peptide mit einer Länge von 8-13 Aminosäuren in das ER (Momburg et al. 1994), ist jedoch auch in der Lage, längere Polypeptide mit bis zu 40 Aminosäureresten (Koopmann et al. 1996) zu transportieren. TAP zeigt wie die MHC-Moleküle eine Vorliebe für hydrophobe oder basische C-Termini, die N-terminalen drei Aminosäuren haben jedoch ebenfalls einen Einfluss.

1.10 Beladung der MHC-Klasse I Moleküle

Nach proteasomalem Abbau, ggf. Prozessierung durch Aminopeptidasen im Zytosol, erfolgreichem Transport in das ER und eventuellem Trimming durch ERAP-1 und ERAP-2 erfolgt dann die Beladung der MHC-Klasse I Moleküle. Wie bereits erwähnt sind MHC-Moleküle ohne gebundenes Peptid sehr instabil, weshalb die komplette Biosynthese von MHC-Molekülen von Chaperonen unterstützt wird. Ist die Erbinformation für den Aufbau eines MHC-Klasse I Moleküls translatiert, wird es in das ER geschleust und assoziiert dort zunächst mit Calnexin. Nach Bindung von β_2M wird Calnexin durch Calreticulin ausgetauscht und ein weiteres Hilfsmolekül, Tapasin, ebenfalls im MHC-Lokus kodiert, bringt das noch leere und somit instabile MHC-Molekül in die Nähe des TAP-Transporters, wahrscheinlich um eine schnellere oder effizientere Beladung mit Peptiden zu gewährleisten. Eine weitere Funktion von Tapasin scheint die Qualitätskontrolle der Peptidbeladung zu sein, da es schwach gebundene Peptide gegen höher affine Peptidliganden katalytisch austauschen kann und somit die Stabilität und Lebensdauer der MHC-Klasse I Moleküle erhöht bzw. verbessert. Das Protein ERp57 (Dick et al. 2002) ist in diesem Prozess anscheinend für die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken innerhalb der Klasse I α -Kette zuständig und interagiert zu diesem Ziel mit sowohl Calreticulin als auch Tapasin. Hat ein Peptid an ein leeres MHC-Klasse I Molekül gebunden, dissoziiert der MHC-Klasse I / Peptid-Komplex vom Beladungskomplex ab und verlässt das ER in Richtung Golgi-Apparat, von wo er auf die Zelloberfläche transportiert wird (Pamer and Cresswell 1998). Gesunde Zellen „präsentieren“ den patrouillierenden zytotoxischen T-Zellen also ausschliesslich „Selbst-Peptide“, gegen die immunologische Toleranz vorliegen sollte. Ist die Zelle jedoch infiziert oder mutiert, werden z.B. auch viral Proteine oder stark überexprimierte Proteine von entarteten Zellen den Weg in die MHC-Klasse I Beladungsmaschinerie finden und schliesslich auf der Zelloberfläche präsentiert. Dieser Kontrollmechanismus erlaubt dem Immunsystem eine konstante Überwachung des ganzen Organismus und sorgt dafür, dass Pathogene schnell entdeckt und Gegenmassnahmen gestartet werden können. Dass der gesamte Prozess der Antigenpräsentation ein insgesamt sehr ineffektiver Vorgang ist zeigt die zumindest theoretisch durchgerechnete durchschnittliche Anzahl von 10000 Kopien eines Proteins, die für die Präsentation eines MHC-Klasse I/ Peptid-Komplexes nötig ist (Chen et al. 2001a; Yewdell 2001).

Neben dem beschriebenen klassischen Weg der MHC-Klasse I Präsentation spielt ein weiterer Mechanismus eine grosse Rolle, über den auch exogene Antigene in den Klasse I Weg eingespeist werden können. Professionelle APCs wie Makrophagen und DCs können Antigen phagozytieren oder Fc-Rezeptor-vermittelt aufnehmen, prozessieren und über TAP ins ER bringen. Man nennt diesen Prozess „Cross-Priming“ (Bevan 1976; Bevan 2006; Groothuis and Neefjes 2005; Heath and Carbone 2001) und obwohl in der Literatur immer noch kein endgültiger Konsens über das tatsächliche Auftreten von „Cross-Priming“ in vivo zustande gekommen ist, wird diese Phänomen intensiv erforscht, um eventuell einen klinischen Nutzen aus den Ergebnissen ziehen zu können.

1.11 Antigenprozessierung und –präsentation für MHC-Klasse II

Die auf MHC-Klasse II Molekülen präsentierten Peptide sind im Gegensatz zur Klasse I Präsentation hauptsächlich exogenen Ursprungs und stammen von extrazellulären Antigenen. Sie werden in der Regel endozytotisch aus dem extrazellulären Raum aufgenommen und in den endosomal-lysosomalen Abbauweg eingeschleust oder befinden sich bereits in intrazellulären Vesikeln, die ebenfalls mit Lysosomen verschmelzen können. Durch zunehmende Ansäuerung der Endosomen bzw. Verschmelzung der Phagosomen mit Lysosomen werden saure Proteasen, die Cathepsine, aktiviert und können die Proteine in Peptide zerlegen (Chapman 2006). Die wichtigsten Vertreter dieser Proteasen sind die Cathepsine S und L. Damit die Peptidfragmente nun mit der Bindungsfurche von MHC-Klasse II Moleküle in Kontakt kommen können, müssen die Epitope noch in physische Nähe der leeren, neu-synthetisierten Klasse II Moleküle gebracht werden. Ähnlich den MHC-Klasse I Molekülen werden auch die Klasse II Heterodimere nach ihrer Translation in das ER translociert, damit dort post-translationalen Modifikationen erfolgen können. Da die leeren Klasse II Moleküle im ER nicht einen der vielen Klasse I Liganden binden sollen, ist die Peptidgrube des MHC-Klasse II Moleküls durch die als Trimer vorliegende so genannte invariante Kette ausgefüllt. Auch hier unterstützt Calnexin den Faltungsprozess und verlässt den Komplex erst, wenn das Klasse II Molekül das ER wieder verlässt. Die invariante Kette dirigiert das MHC-Klasse II Molekül zu den Lysosomen bzw. Endosomen mit niedrigem pH-Wert. Nach Verschmelzung des Vesikels, das Klasse II mit der invarianten Kette enthält und den endosomal/

lysosomalen Vesikeln wird die invariante Kette von Cathepsin S bis auf ein lediglich die Peptidgrube ausfüllendes CLIP Fragment („Class II associated invariant chain Peptid“) abgebaut. Um nun den Austausch von CLIP durch Peptide der proteolytisch verdauten extrazellulären Antigene zu gewährleisten, kommt ein weiteres Chaperon-Molekül, im humanen System HLA-DM genannt, zum Einsatz (Watts 2004). Es sorgt einerseits für die Dissoziation des CLIP Fragments und stabilisiert andererseits die leeren Klasse II Moleküle so lange bis sie ein Klasse II Peptid erfolgreich und stabil gebunden haben (Pieters 1997). Die fertigen MHC-Klasse II / Peptid-Komplexe werden an die Zelloberfläche gebracht und können dort T-Helfer Zellen über den Immunstatus der Zelle Auskunft geben. Dieser klassische Weg der Klasse II Antigen Prozessierung wird ergänzt durch das kürzlich publizierte Phänomen der Autophagie. Bei diesem Prozess gelangen intrazelluläre Proteine durch Vesikelbildung in den endosomal/ lysosomalen Abbauweg und können auf diese Weise das auf Klasse II präsentierte Spektrum von Peptiden stark erweitern (Dengjel et al. 2005). Da Autophagie hauptsächlich bei Nährstoffmangel auftritt, wäre es möglich, dass das vermehrte Einschleusen von intrazellulären Proteinen in den Klasse-II-Präsentationsweg eine verbesserte Kontrolle im Stressfall auch durch CD4 positive T- Zellen ermöglicht.

1.12 Aktivierung naiver T-Zellen

Da die TCR α - und β -Ketten lediglich in der Membran verankert sind, aber nicht über zytoplasmatische Domänen zur Signaltransduktion ins Zellinnere verfügen, stehen dem TCR zusätzlich CD3-Komplexe zur Seite, die diese Aufgabe übernehmen. Kommt es zu einer Antigenerkennung durch den TCR/ CD4- oder TCR/ CD8-Korezeptor-Komplex ist es von entscheidender Bedeutung für die Signaltransduktion und Aktivierung der T-Zelle (das „Priming“), dass gleichzeitig ein zweites, kostimulatorisches Signal an die T-Zelle gegeben wird, welches im allgemeinen von der professionellen APC kommt. CD28 auf der T-Zell-Oberfläche ligiert hierbei z.B. die kostimulatorischen Proteine CD80 und CD86 auf der Oberfläche von APCs. Ohne erfolgreiche Kostimulation fehlt der T-Zelle das notwendige zweite Signal nach der Antigenerkennung und sie wird anergisch, d.h. ist nicht in der Lage, ihre Effektorfunktionen auszuüben. Ist die T-Zelle jedoch mit beiden Signalen versorgt, kann ein Proliferations- und Differenzierungsprogramm gestartet werden, welches mit

der autokrinen Produktion und Sekretion des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin-2 und der Expression des hochaffinen IL-2-Rezeptors CD25 beginnt (Minami et al. 1993). Gleichzeitige Ligandierung des hochregulierten CD40L-Moleküls auf der T-Zelloberfläche mit CD40 auf der APC führt über die Stabilisierung der IL-2 mRNA in der T-Zelle zu einer weiteren Verstärkung der positiven Rückkopplung (Linsley et al. 1991; Linsley and Ledbetter 1993). Im Verlauf der rasch voranschreitenden klonalen Expansion ändert sich zudem die Expression weiterer Oberflächenmoleküle auf der T-Zelle. CD28 interagiert mit den kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86, z.B. auf Dendritischen Zellen, parallel werden Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle wie CD44 hoch reguliert und komplettieren die Aktivierungsphase der T-Zellen. Andererseits wird das „CTL-activation-associated-protein 4“, kurz CTLA-4, ebenfalls verstärkt exprimiert und kann aufgrund seiner höheren Affinität als CD28 zu CD80 und CD86 die Aktivierung der T-Zelle regulieren bzw. bremsen.

Während zytotoxische CD8 positive T-Zellen nach ihrer Aktivierung gezielt porenbildende Mediatoren wie Granzym B oder Perforin freisetzen (Peters et al. 1991) und über Fas-Ligand – Fas-Interaktion die Zielzelle in die Apoptose (Apasov et al. 1993) drängen und dadurch virusinfizierte oder entartete Zellen abtöten können (daher „zytotoxische“ CD8 positive T-Zellen), unterteilt man die CD4 positiven T-Zellen in die zwei Untergruppen T_{H1} und T_{H2} , die jeweils unterschiedliche Funktionen haben. Die Hauptaufgabe der „inflammatorischen“ T_{H1} -Zellen ist die Aktivierung von Makrophagen und CTLs indem sie CD40L hoch-regulieren und $TNF-\alpha$ und das stark „Immune-Response-Gene“ aktivierende Interferon- γ sezernieren. Die eigentlichen „T-Helferzellen“ sind die T_{H2} -Zellen, die ebenfalls CD40L hoch-regulieren und B-Zellen über deren CD40 Moleküle aktivieren können. Dies geschieht, wenn sie Antigen aus demselben Pathogen erkennen, gegen das die B-Zelle Antikörper bildet („linked recognition“). T_{H2} -Zellen sezernieren dann vor allem $TGF-\beta$, IL-4, IL-6 oder IL-10. Diese Mediatoren hemmen eine T_{H1} -polarisierte Antwort und regen (im Fall von IL-4) nach extensiver B-Zell-Proliferation den Antikörper-Klassenwechsel von IgM nach IgG und IgA/ IgE an. Beiden T-Zell-Typen gemein ist die Produktion einer grossen Bandbreite verschiedenster anderer Zytokine, deren Auswirkungen systemischer Natur sind und die Aktivierung von weiteren Zellen des Immunsystems vorantreiben und fördern.

1.13 Regulatorische T-Zellen

Neben den erwähnten „klassischen“ CD4-positiven T-Helferzellen kennt man seit langem CD4-positive T-Zellen, die konstitutiv die α -Kette des IL-2 Rezeptors exprimieren. Diese T-Zellen werden als regulatorische T-Zellen (T_{regs}) bezeichnet und können Immunantworten bremsen, beenden oder gar nicht erst zulassen. Die Hauptfunktion dieses T-Zell-Typs liegt vermutlich in der Erhaltung der Selbst-Toleranz, da die Diversität der Antigenrezeptoren, die sich das Immunsystem „leistet“, immer auch einen Angriff gegen „Selbst“ und damit Autoimmunität zur Folge haben kann. Die Vermutung, dass ein wohl kontrolliertes Regulationssystem bestehen muss, um Autoimmunität zu verhindern und so etwas wie Toleranz zu gewährleisten, hatte bereits Paul Ehrlich vor fast 100 Jahren erkannt und postuliert (Ehrlich 1910). Die Idee von einer spezialisierten Zellpopulation von „Suppressor-T-Zellen“, die sowohl normale Immunreaktionen beenden als auch Autoimmunität verhindern kann wurde dann 1971 von Gershon vorgeschlagen (Gershon and Kondo 1971). Ende der 80´er stellten sich jedoch frühe Schlüsselexperimente als nicht akkurat durchgeführt heraus (Moller 1988) und das Feld der Suppressor-T-Zell-Biologie wurde lange Zeit diskreditiert. Die Veröffentlichungen von Sakaguchi 1995 und im folgenden auch von Shevach (Sakaguchi et al. 1995;Thornton and Shevach 1998) hauchten dem totgesagten Forschungsgebiet schliesslich wieder neues Leben ein und so wurden konstitutiv CD25-exprimierende CD4-positive T-Zellen als diejenige Zellpopulation identifiziert, die dominante Toleranz vermitteln kann. Die Identifikation von CD25 als ein Oberflächenmarker, der für die magnetische Anreicherung verwendbar ist sowie die Etablierung von in vitro Suppressions-Versuchen (Read et al. 1998;Takahashi et al. 1998) erlaubte eine genauere Charakterisierung der T-Zell-vermittelten Toleranz, auch wenn CD25 als primärer Marker der Zellanreicherung natürlich nicht ideal ist, da es ja auch auf allen frisch aktivierten T-Zellen exprimiert wird. Nach TCR Ligation in vitro sind regulatorische T-Zellen nicht in der Lage, zu proliferieren oder IL-2 zu produzieren. Sie sind dann aber sehr wohl in der Lage, die Proliferation von T-Zellen und die Zytokin-Produktion von Effektor T-Zellen zu hemmen. In vivo verhalten sich die regulatorischen T-Zellen jedoch nicht ganz so dogmatisch anergisch und zeigen nach adoptivem Transfer die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, da schon kleinste Mengen transferierter Zellen ausreichen, um lang anhaltende Autoimmunität zu sichern. Die Bezeichnung

„anergisch“ ist daher irreführend, weil sie nicht das gesamte, also auch in vivo Verhalten dieser T-Zell-Population beschreibt (Fontenot and Rudensky 2005). Obwohl auf diesem Gebiet in den letzten Jahren sehr viel geforscht und veröffentlicht wurde, ist der genaue Mechanismus, mit der regulatorische T-Zellen die Suppression ausüben, nicht bekannt (von Boehmer 2005). Die in vitro Hemmung ist zwar Kontakt-abhängig aber unabhängig von der Blockierung von TGF- β oder IL-10, obwohl beide Moleküle in verschiedenen in vivo Modellen als notwendig beschrieben worden sind. CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen 4) wurde ebenfalls in die Diskussion gebracht, schied aber ebenso wie die bereits genannten Moleküle aus, da isolierte CD4+CD25+ T-Zellen aus CTLA-4 Knock-Out Mäusen, wie auch aus TGF- β - und IL-10- Knock-Out Mäusen in vitro noch immer supprimierende Eigenschaften aufweisen (Asseman et al. 1999; Green et al. 2003; Piccirillo et al. 2002; Shevach 2002; Tang et al. 2004). Ausserdem wurde von verschiedenen Gruppen publiziert, dass die regulatorischen T-Zellen den T-Zell-Wachstumsfaktor IL-2 „aufsaugen“ und somit den T-Zellen, die es für ihre Proliferation benötigen, entziehen (Klein et al. 2003). Daher war es nicht verwunderlich, dass grosse Mengen an exogen bereitgestelltem IL-2 den Effekt der Suppression durch regulatorische T-Zellen wieder umkehren konnten. Neuere Studien diesbezüglich stellten wiederum fest, dass regulatorische T-Zellen die IL-2 mRNA Induktion in Zielzellen selbst dann noch hemmen können, wenn grosse Mengen an IL-2 zur Verfügung stehen (Thornton et al. 2004). Wahrscheinlich ist also, dass in der Tat eine Vielzahl von Mechanismen für eine Suppression verantwortlich ist und diese von Modell zu Modell variieren können. Was sind aber auf der anderen Seite die Mechanismen, die mit einer Suppression durch regulatorische T-Zellen interferieren können? Diese Frage wurde sehr elegant in einer Studie von Pasare und Medzhitov angegangen, die 2003 in Science publiziert worden ist (Pasare and Medzhitov 2003). Sie konnten zeigen, dass TLR-stimulierte APCs (via CpG oder LPS), die zu in vitro Suppressionskulturen gegeben werden, die Suppression durch regulatorische T-Zellen praktisch aufheben können. Weiterhin waren sogar Überstände der TLR-stimulierten APCs in der Lage, diesen Effekt zu bewirken, was eindeutig auf einen löslichen Bestandteil hinweist, den die APC sezernieren kann, wenn sie über TLRs stimuliert wird. Als essentieller aber nicht einziger Mediator des mit der Suppression-interferierenden APC-Überstandes konnte IL-6 identifiziert werden, das wahrscheinlich mit einem noch unbekanntem Faktor synergistisch einer Suppression entgegenwirkt. Die Tatsache,

dass einige Immunreaktionen in IL-6 Knock-Out Mäusen anscheinend schwächer ausfallen als in Wild-Typ Kontrolltieren unterstreicht die mögliche Rolle von IL-6 in diesem Zusammenhang. Mit diversen Knock-Out Mäusen bzw. neutralisierenden Antikörpern konnte in derselben Veröffentlichung eine Reihe von potentiell in Frage kommenden Kandidaten ausgeschlossen werden: So ist der Faktor „X“ weder IL-2, IL-12, IL-15, TNF- α , IL-7, GITR, noch IL-1 oder IL-18. Auch sämtliche Chemokine wurden durch die Verwendung von Pertussis Toxin ausgeschlossen, da es die benefiziellen Eigenschaften von LPS-stimulierten DC Überstand nicht beeinträchtigt hat und alle Chemokin-Rezeptoren ihre Signale über G-Proteine in das Zellinnere leiten, die wiederum von Pertussis Toxin gehemmt werden.

1.14 Positive und Negative Selektion im Thymus

Um die Aktivierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen und somit schädliche Autoimmunität zu verhindern, hat das Immunsystem mindestens drei verschiedene Mechanismen entwickelt, um die Selbst-Toleranz zu gewährleisten. Die zwei in der Peripherie auftretenden Mechanismen der strikten Kopplung der T-Zell-Aktivierung an Kostimulation bzw. der Regulierung von Immunantworten durch regulatorische T-Zellen sind in den vorherigen Abschnitten bereits kurz benannt worden. Der wichtigste Mechanismus jedoch wird als „Zentrale Toleranz“ bezeichnet und gewährleistet, dass sich entwickelnde Lymphozyten, die mit hoher Affinität Selbst-Antigene erkennen, in den zentralen lymphoiden Organen klonal deletiert werden. Im Knochenmark und in der Milz werden unreife B-Zellen, die an membrangebundenen Selbst-Antigene binden, entfernt. Diejenigen, die mit löslichem Selbst-Antigen in Kontakt kommen und daran binden, werden anergisch, bleiben von den Follikeln in Milz und Lymphknoten ausgeschlossen und werden ebenfalls in den apoptotischen Zelltod gedrängt.

T-Zellen stammen von hematopoetischen Vorläufern ab, die für ihre Entwicklung zu naiven T-Zellen Signale von verschiedenen, nicht-hämatopoetischen Thymus-Epithelien („TEC´s“, Thymic Epithelial Cells) und mesenchymalen Fibroblasten benötigen. Da diese Zellen innerhalb des Thymus anatomisch getrennt vorliegen, erfordert dies eine kontinuierliche Wanderung der T-Vorläuferzellen zwischen diesen Mikro-Umgebungen, um alle Differenzierungssignale empfangen zu können. Die Differenzierung beinhaltet die zeitlich koordinierte Expression von membranständigen

Oberflächenproteinen (CD4, CD8, CD44 und CD25, um die wichtigsten zu nennen) auf den jungen Thymozyten. Nach dem Eintritt in den Thymus über die Cortico-Medulläre Grenzregion sind die Vorläufer doppelt-negativ für sowohl das CD4 als auch das CD8 Molekül („DN“, double-negative). Nacheinander werden dann die Stadien „DN1“ (CD44⁺/ CD25⁻) und „DN2“ (CD44⁺/ CD25⁺) und „DN3“ (CD44⁻/ CD25⁺) durchlaufen. An diesem Punkt findet die Umlagerung der TCR γ -, δ -, und β - Ketten statt. Die unterschiedlichen γ/δ und α/β T-Zell-Linien trennen sich wahrscheinlich an diesem Punkt. Obwohl die genauen Erfordernisse für das jeweilige „lineage-commitment“ nicht bekannt sind, besteht weitestgehend Klarheit darüber, dass die Signaltransduktion nach konstruktiver Umlagerung für das Überleben und die weitere Entwicklung benötigt wird. Im Fall der α/β T-Zellen ist hierfür ein Komplex aus CD3, dem TCR β und der invarianten pre-TCR α -Kette erforderlich. Liegt dieser Komplex vor, führt dies zu einer Expansion, anschließender Expression der CD4- und CD8⁻ Ko-Rezeptoren und im Folgenden zur Umlagerung des TCR α -Lokus. In diesem Stadium wandern die nun doppelt-positiven („DP“, double-positive) Thymozyten wieder in den Kortex und es ist die Spezifität des konstruktiv umgelagerten α/β TCR, die über das weitere Schicksal der T-Zellen entscheidet. Im Kortex werden CD4⁺ CD8⁺ doppelt-positive T-Zellen („DP“) zunächst daraufhin selektioniert, dass sie nach produktiver somatischer Rekombination ihres TCRs die Organismus-eigenen MHC-Moleküle erkennen. Dieser Prozess wird als positive Selektion bezeichnet. Erkennen T-Zellen die eigenen MHC-Moleküle nicht, sterben sie durch „Vernachlässigung“ („Death by Neglect“). In einem zweiten Auswahlprozess, der in der kortiko-medullären Grenzregion stattfindet (vermittelt durch das Medulla-Epithelium), werden dann all diejenigen T-Zellen durch Apoptose-Signale deletiert, die zu stark an Selbst-MHC/ Selbst-Peptid-Komplexe binden und somit potentiell autoreaktiv sind. Man spricht hier von negativer Selektion. Wahrscheinlich kontrolliert der Transkriptionsfaktor AIRE (Anderson et al. 2005; Derbinski et al. 2005) die ektopische Expression von Genen im Thymus, die normalerweise nur in der Peripherie exprimiert werden und dort spezifische Funktionen haben. Auf diese Art und Weise scheint gewährleistet, dass die T-Zell-Vorläufer noch während ihres Selektionsprozesses mit möglichst vielen Selbst-Peptiden in Kontakt treten können, auf die sie auch in der Peripherie stossen werden. Die wenigen T-Zellen, die positiv selektioniert wurden und die negative Selektion überstanden haben (etwa 5 %), regulieren die Expression eines ihrer

Korezeptoren herunter, verlassen den Thymus und wandern als naive, CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen in die Peripherie aus. Die meisten bzw. aussagekräftigsten Untersuchungen zur Entwicklung von T-Zellen liefern Mausmodelle, in denen über genetische Manipulationen die Entwicklung nur eines TCRs möglich ist. Man bezeichnet diese Tiere als „TCR-transgen“. Es gibt in der Literatur viele Theorien, welche Eigenschaften ein Selbst-Peptid aufweisen muss, um positiv selektionierend zu wirken: stimulierende Peptide in sehr niedriger Konzentration wurden vorgeschlagen aber wieder verworfen (Ashton-Rickardt et al. 1994; Cook et al. 1997; Kraj et al. 2001); Peptide, die reife T-Zellen antagonisieren wurden von einigen Gruppen in „FTOCs“ (Fetal Thymic Organ Cultures) als positiv selektionierend beschrieben (Hogquist et al. 1994a; Jameson et al. 1994; Smyth et al. 1998), während andere diese Befunde in ihren Systemen nicht nachweisen konnten (Basu et al. 1998; Williams et al. 1996); so genannte „Altered Peptide Ligands“, APLs, wurden diskutiert (und auch über den Einsatz solch modifizierter Peptid-Liganden für die in vivo Modulation des TCR Repertoires spekuliert) (Fridkis-Hareli and Reinherz 2004); einige wenige Publikationen beschrieben MHC-Peptid-Komplexe, die mit dem antigenen Peptid keinerlei Sequenz- oder Struktur-Ähnlichkeiten hatten (Ignatowicz et al. 1997; Nakano et al. 1997; Pawlowski et al. 1996). Wahrscheinlich aber ist, dass die Selbst-Peptide zumindest an den Positionen, an denen sie mit dem TCR interagieren, gewisse Motiv-Konservierungen, z.B. bezüglich der Ladung der jeweiligen Aminosäure, aufweisen (Santori et al. 2002). Das grosse Problem all dieser Studien ist jedoch, dass sie mehrheitlich in vitro durchgeführt wurden und somit die reale Situation in vivo wohlmöglich nicht widerspiegeln. Welche Selbst-Peptide für welchen TCR in vivo tatsächlich positiv selektionierend wirken, ist daher lediglich für einige wenige sehr gut untersuchte T-Zell-transgene Mäuse publiziert (Hogquist et al. 1997; Santori et al. 2002; Sasada et al. 2001).

1.15 Reifung und Aktivierung von Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen sind gewissermassen die „crème de la crème“ der professionellen APCs und bilden das Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Ihren Namen verdanken sie ihren charakteristischen Zellfortsätzen, die an Verästelungen von Bäumen erinnern („dendron“, griech. für Baum) und sowohl der effizienten Antigenaufnahme als auch der Interaktion mit T-

Zellen dienen. Sie wurden zuerst von Steinman und Cohn 1973 in den Milzen von Mäusen beschrieben (Steinman and Cohn 1973). Man unterscheidet die drei grossen Populationen der myeloiden und der plasmazytoiden Dendritischen Zellen sowie der Langerhanszellen, die aber alle wiederum, abhängig von weiteren Oberflächenmarkern, in Subpopulationen unterteilt werden können. Die Vorläufer von dendritischen Zellen entstammen dem Knochenmark, wo sie aus pluripotenten CD34 positiven hämatopoetischen Stammzellen hervorgehen und, noch unreif, über die Blutbahn in fast alle Gewebe gelangen. Unreife DCs sind durch ihre Zellmorphologie hervorragend für das Endozytieren und anschliessende Prozessieren von Antigenen geeignet. Erkennen sie während der Antigenaufnahme Pathogen-assoziierte Muster über ihre „Pattern-Recognition-Rezeptores“ (PRRs) führt das automatisch zum Reifen der DC. Die Antigenaufnahme wird gestoppt (Banchereau et al. 2000), kostimulatorische Signalmoleküle werden hoch-reguliert (Benvenuti et al. 2004) und die Zellen wandern als reife, aktivierte DCs in die lymphatischen Organe, um dort mit den T-Zellen zu interagieren. Die Hochregulation der immunrelevanten Proteine betrifft besonders die MHC-Moleküle, die kostimulatorische Oberflächenmoleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) und die Chemokin-Rezeptoren für CXCR4 und CCR7 (Sallusto and Lanzavecchia 2000), mit deren Hilfe die DCs entlang der Chemokin-Gradienten (Gunn et al. 1998) ihren Weg in die T-Zell-Bereiche der Lymphknoten finden. Zudem produzieren aktivierte DC je nach Aktivierung einen Cocktail aus unterschiedlichsten inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (TNF- α , IL-6, IL-10, RANTES, usw.), um ihrerseits andere DCs anzulocken oder die adaptive T-Zell-Antwort zu instruieren. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass es während des Reifungsprozesses in den Dendritischen Zellen zur Ausbildung von aggregierten Strukturen innerhalb des Cytosols kommt, die grosse Mengen an mono- und poly-ubiquitinylierten Proteinen enthalten. Diese als „DALIS“ (Dendritic-Cell-Aggresome-Like-Strukturen) bezeichneten Aggregate sind von kontinuierlicher Proteinbiosynthese abhängig, treten bereits vier Stunden nach Aktivierung auf und erreichen ihre maximale Grösse nach 8 - 12 Stunden (Lelouard et al. 2002). Nach 24 - 36 Stunden sind sie nicht mehr nachweisbar. Der Abbau der poly-ubiquitinylierten Aggregate, dessen genaue Zusammensetzung momentan noch nicht geklärt ist, erfolgt erwartungsgemäss durch das Proteasom. Die Analyse der ubiquitin-markierten Proteine ergab, dass es sich beim überwiegenden Teil um fehlgefaltete und somit nicht-funktionelle Proteine handelt, die als DRiPs bezeichnet werden und

ein Drittel bis drei Viertel des Prozentsatzes der Proteinneosynthese ausmachen (Yewdell 2001). In den DALIS sind die DRiPs vor proteasomalem Abbau geschützt, wodurch sich ihre Halbwertszeit von zehn Minuten in Fibroblasten auf etwa vier Stunden in DCs verlängert (Lelouard et al. 2004). Diese Daten sowie experimentelle Befunde von Herter et. al (Herter et al. 2005) legen den Schluss nahe, dass die DALIS in DCs auftreten, um der Dendritischen Zelle nach einer Virusinfektion oder anderweitiger Antigenaufnahme Zeit zu geben, die Maschinerie der kostimulatorischen Signale zu starten, ohne die die DCs T-Zellen nicht effizient „primen“ könnte. Erst wenn auch die Kostimuli hoch-reguliert worden sind, werden die DALIS-Proteine durch das Proteasom abgebaut und das Immunsystem über den Zellstatus informiert.

1.16 Toll-Like Rezeptoren

Die Aktivierung von Dendritischen Zellen kann auf mannigfaltige Art und Weise erfolgen. Es gibt verschiedenste „Pattern-Recognition-Receptors“ oder PRRs auf Dendritischen Zellen, die distinkte Funktionen, wie beispielsweise die Aktivierung der Komplement-Kaskade oder die Phagozytose, innehaben. Eine erst vor einigen Jahren entdeckte Klasse von PRRs umfasst die der Toll-Like Rezeptoren (TLRs) (Rock et al. 1998), die allesamt Pathogenstrukturen erkennen oder Moleküle detektieren können, die nur auf der Oberfläche von Pathogenen vorkommen (Takeda et al. 2003). Der Name stammt aus der Entwicklungsbiologie, wo man bereits vor Jahren in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ein Protein entdeckte, was innerhalb der dieses Organismus für die Erkennung von Pilzinfektionen verantwortlich ist (Lemaitre et al. 1996). Da die in Säugern gefundenen PRRs eine gewisse Homologie zu dem Drosophila-Protein „Toll“ aufweisen, lag der Name des „Toll-Like Rezeptors“ nahe. Die TLRs sind mittlerweile die wohl am besten charakterisierten PRRs in Säugetieren. Die Ligation der Pathogen-assoziierten molekularen Muster mit dem entsprechenden Rezeptor führt unweigerlich zur Aktivierung einer Signalkaskade innerhalb der DCs und damit zur Aktivierung der professionellen APC. Bis heute sind 11 verschiedene TLRs identifiziert worden, die allesamt molekulare Muster erkennen, die mit verschiedenen Pathogenen in Verbindung gebracht werden können. Die TLRs 1 - 9 sind im humanen und murinen System konserviert, während TLR10 anscheinend nur bei Menschen vorkommt und

TLR11 nur in der Maus (Takeda et al. 2003). Die Bandbreite der erkannten Strukturen umfasst Lipopolysaccharid gramnegativer Bakterien (LPS), das von TLR4 detektiert wird, bakterielle Lipoproteine, die von TLR2 in Heterodimeren mit TLR1 oder TLR6 erkannt werden, Flagellin (TLR5), unmethylierte CpG DNA von Bakterien und Viren (TLR9), doppel-strängige RNA wie poly I:C (TLR3), einzel-strängige RNA oder synthetische RNA-Analoga wie Imidazoquinoline (TLR7), um die prominenten Vertreter der unzähligen Liganden und Rezeptoren zu nennen. Ausserdem können TLRs vermutlich auch LPS oder Pam3Cys erkennen, welches an Hitzeschockproteine („HSPs“) gebunden sein kann, was immunologisch deshalb interessant ist, da diese mit immunogenen Peptiden von lysierten Pathogenen oder Tumorzellen beladen sein können. HSPs wie Gp96 scheinen dabei in der Lage zu sein, Endotoxine anzureichern und durch Bindung an sich die Sensitivität die Endotoxin-Detektion um mehrere Zehnerpotenzen zu senken (Warger, Manuskript in Druck, persönliche Mitteilung). In diesem Zusammenhang ist das Phänomen der „Cross-Presentation“ bereits kurz erwähnt worden. Allgemein betrachtet scheinen sich die TLRs 1, 2, 4, 5 und 6 in der Hauptsache auf die Detektion von bakteriellen Produkten spezialisiert zu haben, die im Organismus ansonsten nicht vorkommen und somit eine klare Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ ermöglichen. TLR 3, 7, 8 und 9 hingegen erkennen die Nukleinsäure-Strukturen viraler Eindringlinge, die aber nicht allein in diesen Pathogenen vorkommen, sondern auch im Zellkern des eigenen Organismus. In diesem Fall ist die „Selbst“-„Fremd“ Unterscheidung dadurch gewährleistet, dass die TLR innerhalb der Zelle in Vesikeln exprimiert werden und endosomale Reifung benötigen. Da die Nukleinsäuren des Säugerorganismus unter normalen Umständen im Zytosol nicht auftauchen, ist hier also die Lokalisierung der TLRs entscheidend. Unter bestimmten Umständen, beispielsweise der unvollständigen Beseitigung von apoptotischen Zellen, kann es jedoch zu einer unerwünschten Aktivierung der TLRs durch eigene DNA/ RNA-Protein-Aggregate kommen, was durch den Bruch der immunologischen Toleranz zu Autoimmunität führen kann. Ausser in der Ligandenspezifität unterscheiden sich die TLRs noch in ihren Expressionsmustern innerhalb der verschiedenen Zellen des Organismus und vor allem in den Signaltransduktionswegen, die sie nach Ligation aktivieren. Die Stimulation durch Dimerisierung der TLRs bewirkt jedoch immer eine Rekrutierung von Adaptermolekülen, die über ihre Toll-IL-1 Rezeptor-Domäne („TIR-Domäne“) intrazellulär an die TIR-Domänen der TLRs binden. Es konnten bisher vier

verschiedene Adaptoren identifiziert werden (Myd88, TIRAP, TRIF und TRAM) (Fitzgerald et al. 2003; Horng et al. 2001b; Medzhitov et al. 1998b; Yamamoto et al. 2003), die allerdings teilweise mit denselben TLRs interagieren. Man unterscheidet jedoch grob die MyD88 abhängigen von den MyD88 unabhängigen TLRs. Über die unterschiedlichen Transduktionskaskaden gelangen die Signale schliesslich in den Zellkern und führen dort über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und IRF-3 (Fitzgerald et al. 2003; Kawai et al. 2001) zur Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 (unterstützt die IL-2 Produktion), IL-6 (wirkt T- und B-Zell-aktivierend), IL-12 (ein Proliferations-Kofaktor) oder TNF- α (s. IL-12, ausserdem ein Phagozytose Mediator) und der wichtigen kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 oder beispielsweise GM-CSF (Differenzierungsfaktor für Makrophagen). Die IRF-3 Phosphorylierung mündet schliesslich in der Synthese von Interferonen des α - und β -Typs, die ihrerseits weitere Transkriptionsfaktoren (STATs) aktivieren, denen die Transkription weiterer immunmodulatorischer Gene untergeordnet ist (Decker et al. 2002). Abschliessend soll angemerkt werden, dass obwohl z.T. die gleichen Signalmoleküle von *Drosophila* „Toll“ und Säugetier-TLRs verwendet werden, die letztendliche Erkennung pathogener Muster in beiden Spezies völlig unterschiedlich abläuft. Im Besonderen sei darauf hingewiesen, dass in *Drosophila melanogaster* lediglich ein „Toll“ an der angeborenen Immunantwort beteiligt ist. Die Tatsache, dass alle anderen Mitglieder der *Drosophila* „Toll“-Familie („18-Wheeler“, „Toll-2“ bis „Toll-9“) keinerlei immunologische Funktion haben, deutet darauf hin, dass die ursprüngliche Rolle der „Toll“-Familie in *Drosophila melanogaster* wahrscheinlich nicht in der Vermittlung einer Immunantwort liegt. Im Gegensatz dazu sind die TLRs in Säugern hochspezialisiert auf die Erkennung spezifischer Pathogenmuster. Dies weist auf die Abstammung von einem gemeinsamen Ursprungsmolekül hin, das von Anfang an dieser Funktion diene. Somit haben sich die Systeme, mit denen Insekten und Wirbeltiere Pathogene erkennen, vermutlich doch separat von einander aber strukturell eben sehr ähnlich entwickelt.

1.17 Zielsetzung

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Einfluss von Immunoproteasomen auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire. Aufgrund von vorab generierten experimentellen

Daten wurde nach einem in vivo System gesucht, welches eine Fehlfunktion des Immunoproteasoms mit einem sehr gut charakterisierten transgenen T-Zell-Rezeptor vereint, für den zusätzlich ein positiv selektionierendes Peptid bekannt sein sollte. Obwohl sich die immunologische Forschung Mäuse mit transgenen T-Zell-Rezeptoren immer mehr zu eigen macht, um dringende Fragen zur Entwicklung der T-Zell-Entwicklung und -Antwort zu klären, ist besonders bezüglich der positiven selektionierenden Peptide für die transgenen TCRs leider immer noch sehr wenig bekannt. Nur für einige ausgewählte und sehr gut studierte T-Zell-transgene Mausmodelle sind solche Daten veröffentlicht. Nach aufwendigen Studien und den sich daran anschließenden hochrangigen Veröffentlichungen des Labors von Kristin Hogquist in den Jahren 1997 und 2002 (Hogquist et al. 1997; Santori et al. 2002) waren diejenigen Selbst-Peptide bekannt, die den OT-1 TCR in vivo selektionieren können. Es lag für diese Arbeit daher auf der Hand, LMP7 defiziente Mäuse (B6 Hintergrund), die keine funktionellen Immunoproteasomen besitzen mit OT-1 Mäusen (B6 Hintergrund) zu kreuzen, welche einen transgenen T-Zell-Rezeptor für das Epitop SIINFEKL aus dem Modellantigen Ovalbumin (kurz OVA) besitzen. Mit Peptid-Immunisierungen von Wild-Typ und LMP7 defizienten Mäusen, Untersuchungen der gekreuzten OT-1 x LMP7 Knock-Out Mäuse, Studien von OT-1 Knochenmark-rekonstituierten LMP7 defizienten Mäusen, sowie der experimentellen Infektionen der LMP7 Knock-Out Mäuse mit OVA-transgenen Listerien sollten diese Untersuchungen zum TCR-Repertoire von vielen Punkten aus bearbeitet werden.

Der zweite Teil der Arbeit untersucht den synergistischen Einfluss der gleichzeitigen Ligation von zwei verschiedenen Toll-Like Rezeptoren auf die Induktion einer T-Zell - Antwort und dabei vor allem den Einfluss, den doppelt stimulierte Dendritische Zellen auf die Funktion von regulatorischen T-Zellen haben. Die Toll-Like Rezeptor-vermittelte Aktivierung der adaptiven Immunantwort sowie die besondere Rolle der Dendritischen Zellen in diesem Zusammenhang ist in der Einleitung bereits mehrfach erwähnt worden. Da die unterschiedlichen TLR sowohl MyD88/ TRIF-abhängige als auch –unabhängige Signalwege beschreiten können, stellte sich die Frage nach einem eventuellen Synergismus bei simultaner Auslösung beider Signaltransduktionswege in Bezug auf die DC Aktivierung. Nach initialen in vitro Studien, die Tobias Warger am Institut für Immunologie in Mainz diesbezüglich durchführte, wurde schnell evident, dass bestimmte TLR Kombinationen in der Tat

synergistische und sehr vielversprechende Effekte auf DC Ebene lieferten. TLR3 und TLR7 doppelt stimulierte DCs riefen eine schnellere, bessere und länger anhaltende DC-Aktivierung hervor, was durch Messung von Aktivierungsmarkern (CD40, CD70, CD86) und Analyse von sekretierten pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-6, RANTES) gezeigt werden konnte. Um die in vivo Relevanz dieser Beobachtungen zu untersuchen, sollte zunächst in adoptiv-transferierten und später auch in Wild-Typ Mäusen untersucht werden, ob sich die überlegene DC-Aktivierung in die Induktion einer effizienteren T-Zell-Antwort übertragen lässt. Die Arbeiten bezüglich des in vivo T-Zell-Primings wurden in Kooperation mit Tobias Warger durchgeführt. Weiterhin sollten sich besondere Anstrengungen darauf konzentrieren, ob diese „superstimulierten“ Dendritischen Zellen die Funktion der natürlich vorkommenden regulatorischen T-Zellen beeinflussen und modulieren können.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Mausstämme

B6	C57BL/6
LMP7 KO	Knock-Out der proteasomalen Untereinheit LMP7, B6-Hintergrund
129/ola	129/ola Wild-Typ
129/ola LMP7 KO	s. LMP7 KO, auf 129/ola-Hintergrund
OT-I	transgener TCR für MHC-I K ^b -präsentiertes SIINFEKL (B6)
OT-II	transgener TCR für MHC-II I ^a -präsentiertes ISQAVHAAH AEINEAGR (B6)
ST-42	transgener TCR für MHC-I D ^b -präsentiertes SGPSNTPPEI (B6)

2.1.2 Grundmedien

2.1.2.1 DC-Medium (BMDC Differenzierungsmedium, „DCM“)

Iscove's Medium (IMDM, Invitromex), 1 % Penicillin/ Streptomycin (Serva, 10 mg/ml), 1 % Natrium-Pyruvat (Seromed), 1 % GM-CSF (wird im Institut für Immunologie, Mainz; aus Kulturüberständen hergestellt), 1 % L-Glutamin (Roth), 5 % FCS (Vitromex),

2.1.2.2 Testmedium („TM“)

Iscove's Medium, 1 % Pen/ Strep, 1 % Na-Pyruvat, 1 % L-Glutamin, 5 % FCS

2.1.2.3 T-Zell-Medium (“TZM”)

α -MEM (Minimal Essential Medium, GIBCO, Ribonucleinsäurefrei), 1 % Pen/ Strep, 1 % Na-Pyruvat, 1 % L-Glutamin, 50 μ M β -Mercaptoethanol, 10 % FCS

2.1.2.4 Einfriermedium

90 % FCS, 10 % DMSO (Sigma)

2.1.3 Primäre Antikörper

(bezogen von: BD Biosciences „BD“, e-Biosciences „eBio“, Immunotools „I-T“)

2.1.3.1 FITC-konjugiert:

Anti-mouse CD4 (I-T 221500-43), anti-mouse CD8 (I-T 221500-83), anti-mouse CD44 (I-T 22150443), anti-mouse CD40 (BD 553790), anti-mouse CD80 (BD 553768), anti-mouse CD86 (BD 553691), anti-mouse V β -2, -3, -4, -5.1/.2, -6, -7, -8.1/.2, -8.3, -9, -10b, -11, -12, -13, -14, -17a (panel, BD 557004).

2.1.3.2 PE-konjugiert:

Anti-mouse CD4 (BD 553652), anti-mouse CD8 (eBio 12-0081-82), anti-mouse Va2 (eBio 12-5812-82), anti-mouse CD62L (I-T 22159624), anti-mouse IL-2 (eBio 12-7021-81), anti-mouse IL-4 (eBio 12-7041-82), anti-mouse Ox40L (eBio 12-5905-81), anti-mouse CD70 (BD 555286), anti-mouse CD86 (BD 553692).

2.1.3.3 PerCp-konjugiert:

Anti-mouse CD8 (BD 553036), anti-mouse CD90.1 (BD 557266)

2.1.3.4 PerCp-Cy5.5-konjugiert:

Anti-mouse CD25 (BD 551071)

2.1.3.5 PE-Cy7-konjugiert:

Anti-mouse CD4 (BD 552775), anti-mouse CD25 (BD 552880)

2.1.3.6 APC-konjugiert:

Anti-mouse CD4 (BD 553051), anti-mouse CD8 (BD 553035), anti-mouse CD11c (eBio 17-0114-81), anti-mouse CD44 (BD 559250), anti-mouse CD62L (BD 553152), anti-mouse CD90.2 (BD 553007), anti-mouse IFN-g (BD 557654)

2.1.3.7 APC-Cy7-konjugiert:

Anti-mouse CD4 (eBio 10-0042-81), anti-mouse CD8 (BD 557654)

2.1.3.8 Anti-mouse Isotyp Antikörper:

Rat anti-mouse IgG1 (BD 553447)

Anti-mouse CD4-bio (Klon H.129.19, Bezugsquelle: Institut für Immunologie, Mainz), anti-mouse CD25 (BD 553070), anti-mouse CD8-beads (Miltenyi 130-049-401),

2.1.3.9 Sekundäre Antikörper:

PE-anti-mouse IgG1 (BD 550083)

2.1.4 ELISA-Standards und ELISA-Kits

IFN- γ („hauseigener capture“ Klon R46A2, 0,1 mg/ml, „hauseigener detection“ Klon AN18.1724, 0,5 mg/ml, Standard: Eigenproduktion, 200 U/ μ l)

IL-2, (BD „capture“ 554424, BD „detection“ 554426, Standard: BD 556069)

Streptavidin-HRP (BD 554066)

2.1.5 Standard Chemikalien

(i.d.R. von Fluka, Merck, Roth und Sigma):

β -Mercaptoethanol, DMSO, EDTA, Ethanol, Formaldehyd, Glycerol, H₂SO₄, IGEPAL (Nonident-40), KHCO₃, Natriumazid, NaCl, Na₂HPO₄, NH₄Cl, Saponin, Tris, Tween-20)

2.1.6 Weitere Materialien:

BSA	Roth
FCS	diverse Hersteller
Cytofix/ Cytoperm	BD Bioscience (BD 557422)
TMB	Sigma
Trypanblau 0,05 % (w/v)	Gibco
PI	Sigma
DimerX-K ^b	BD Biosciences (BD 550750)
Proteinase K	Sigma
Penicillin/ Streptomycin	Sigma
Glutamin	PAA
Natriumpyruvat	Sigma
α -Methylmannosid	Sigma
Concanavalin A	Sigma
Szintillationslösung	Roth
³ H-Thymidin	MP Biomedicals

2.1.7 Verwendete Puffer

ACK	150 mM NH ₄ Cl, 1 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA
ELISA-Binding	0,1 mM in Na ₂ HPO ₄ in ddH ₂ O
ELISA-Blocking	0,05 % Tween-20, 1 % BSA in PBS
ELISA-Washing	0,05 % Tween-20 in PBS
GM-Puffer	0,5 % BSA, 5 mM EDTA, 0,01 % Natriumazid in PBS
FACS-Puffer	1 % BSA, 0,02 % Natriumazid in PBS
Saponin-Puffer	1 % BSA, 0,02 % Natriumazid, 0,1 % Saponin in PBS
“Blut”-Puffer	30 mM EDTA, 0,1 % Natriumazid in PBS
Ohrbiopsie-Puffer	300 mM NaCl, 25 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8, 0,2 % SDS, 0,5 mg/ml Proteinase K (immer frisch zugegeben)

2.1.8 Verwendete Geräte und andere Hilfsmittel

SpectraFlourPlus (Tecan), TopCount NXT Microplate Counter (Packard), FACSCanto mit FACSDiva-Software (BD Bioscience), LKB 1295-001 Cell-Harvester (Wallac), LKB 1205 Beta-Plate Liquid Scintillation Counter (Wallac), Gammacell 2000, ¹³⁷Cs - Quelle (Molsgaard Medical, Dänemark) zum Bestrahlen von Zellmaterial und ¹³⁷Cs - Quelle (Buchler) zum Bestrahlen von Versuchstieren, ferner Magnetrührer, Mouse-Restrainer (für i.v. Injektionen), pH-Meter, Pipetten, Pipettierhilfe („Pipettboy“), Präzisionswaagen, Sterilbank, Vortexer, Wasserbad, Zell-Inkubator (Heraeus), Tisch- und andere Zentrifugen (Heraeus), Thermocycler, Elektrophoresekammer für Agarose-Gelelektrophorese

2.1.9 Plastik und Glaswaren

ELISA-Platten	Nunc
FACS-Röhrchen	Greiner
Petrischalen	Greiner
Reaktionsgefäße	Eppendorf
14 ml und 50 ml Röhrchen	Falcon (Greiner)

6-Well, 24-Well und 96-Well Platten Greiner

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

Arbeiten mit Zelllinien werden sämtlich unter einer Sterilbank durchgeführt und alle in die Sterilbank eingebrachten Gegenstände vorher gründlich mit Ethanol desinfiziert. Die Kultur aller Zellen erfolgt bei 37 °C, 5 % CO₂ und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre in entsprechenden Brutschränken. EL-4 Zellen (Maus-Thymom-Zelllinie) werden in 6-Well Platten in supplementiertem IMDM kultiviert, wobei die Zellen in den sechs Wells titriert werden, um zu jeder Zeit optimal vitale Zellen vorzufinden. Ca. ein bis zwei Mal pro Woche wird das bestaussehende Well geerntet und in frischem Medium auf eine neue 6-Well Platte verteilt.

2.2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl dient der Abschätzung der Vitalität von Zellen und in vielen Fällen der Angleichung von Zellzahlen in Versuchen mit mehreren Gruppen. Hierzu werden die Zellen in einem geeigneten Volumen Medium oder PBS aufgenommen, gut resuspendiert und schliesslich wird eine Faktor-basierte Verdünnung der nun homogenen Zelllösung mit Trypanblau hergestellt. Trypanblau kann nur durch die Membran toter Zellen in das Zellinnere gelangen und dort Proteine kräftig blau anfärben, wodurch diese tiefblau im Mikroskop von den noch lebenden, hellen Zellen unterscheidbar sind. Die absolute Zellzahl wird mit einer Neugebauer-Kammer bestimmt, indem 16 Grossquadrate ausgezählt werden, der Mittelwert gebildet und mit $1 \cdot 10^4$, dem Verdünnungsfaktor und der Anzahl der ml multipliziert wird.

2.2.1.3 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Für das Einfrieren von Zellen wird eine möglichst grosse Anzahl (mind. $5 \cdot 10^6$ besser $1 \cdot 10^7$) an Zellen abzentrifugiert, in einem ml Einfriermedium aufgenommen (90 % FCS, 10% DMSO) und in beschriftete Kryogefässe (Merck) überführt. Die einzufrierenden Röhrchen werden zunächst in ein auf 4 °C vortemperiertes isopropanolgepuffertes Einfriergefäss (Nalgene) gestellt, welches dann bei -80 °C für 2 bis 3 Tage gelagert wird, bevor die Zellen endgültig in flüssigen Stickstoff überführt werden.

Das Auftauen von Zellen sollte nach Entnahme aus dem Stickstofftank zügig erfolgen, um die Zellen schnell in DMSO-freies Medium zu überführen. Die Kryoröhrchen werden hierzu im 37 °C Wasserbad aufgetaut, der eine ml Zellen in mindestens 9 ml oder mehr (beliebig) Medium aufgenommen und sofort abzentrifugiert. Die aufgetauten Zellen werden erneut in Medium gewaschen und abzentrifugiert, bevor sie in gewünschten Platten kultiviert werden. Generell ist es leicht möglich, Zelllinien einzufrieren; einige Primärzellen, z.B. BMDCs können jedoch ebenfalls kryokonserviert werden.

2.2.1.4 Präparation und Aktivierung von BMDCs

Aufgrund des mehrtägigen *in vitro* Reifungsprozesses der BMDCs erfolgt die Präparation des murinen Knochenmarks zwingend unter sterilen Bedingungen. Die Versuchstiere werden mit CO₂ getötet und gründlich mit Ethanol eingesprüht. Die Hinterbeine werden durch Schnitte und gezieltes Reißen vom Rumpf abgetrennt und die Ober- und Unterschenkelknochen frei-präpariert. Die Knochen werden an der Ober- und Unterseite aufgeschnitten und das Knochenmark mit einer Spritze und passender Kanüle (BBraun, 100 Sterican Grösse 18) in ein vorbereitetes 50 ml Gefäss gespült. Die Zellen werden abzentrifugiert (1500 rpm, drei Minuten), in BMDC Medium aufgenommen und sorgfältig resuspendiert (Wichtig! Das teilweise sehr fest verklumpte Knochenmark muss auf jeden Fall sehr gut resuspendiert werden!). Nach erneutem Zentrifugieren wird das Zellpellet nun in BMDC-Differenzierungs Medium aufgenommen und die Lebendzahl bestimmt. Es werden $3 - 4 \cdot 10^6$ Zellen pro 6-Well ausgesät und das Medium auf vier ml eingestellt. Die Ausbeute variiert

sehr stark und kann zwischen zwei und vier 6-Well Platten pro Maus betragen. Die Differenzierung der Zellen erfolgte in sechs bis sieben Tagen Kultur mit Mediumwechsel an den Tagen 2 und 4. An Tag 2 („Füttern“) werden die vier ml eines Wells herauspipettiert und das Well sehr vorsichtig durch Spülen am Rand entlang einmal gewaschen. Die nicht-adhärenenten Zellen werden auf diese Weise aus der Kultur entfernt. Die Wells sollten hierbei nicht trocken liegen, um die Zellen keiner Art von Stress auszusetzen. Die gespülten drei bis vier ml werden verworfen und durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt. An Tag 4 („Füttern“) werden die drei bis vier ml ohne Spülen ersetzt, da sich nun bereits semi-adhärenente Zellen in der Kultur befinden, die man nicht durch Spülen verlieren möchte. Nach sechs Tagen liegen ausdifferenzierte, unreife CD11c positive Dendritische Zellen (DCs) vor, die variierend zwischen 60 bis 85 % der Kultur ausmachen und in der Regel einen nichtaktivierten Phänotyp aufweisen, d.h. negativ oder niedrig für die Oberflächenmarker CD40, OX40L, CD70, CD80 und CD86 sind. Um die im zweiten Teil dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu verschiedenen Aktivierungsstimuli exakt bewerten zu können, ist es Voraussetzung, dass die Zellen an Tag 6 in der Tat einen naiven, d.h. nicht-aktivierten Phänotyp aufweisen. Zu diesem Ziel ist es dringend notwendig, die Zellen während des Differenzierungsprozesses keinem unnötigen Stress auszusetzen, d.h. die Medien vorzuwärmen, die Zentrifugationen kurz zu halten und die gesamte Präparation zügig durchzuführen. Tag 6 BMDCs werden durch vorsichtiges Spülen aus den 6-Well Platten geerntet und gezählt. Jeweils $3 \cdot 10^6$ Tag 6 BMDCs werden pro Well einer 6-Well Platte pipettiert und das Volumen mit BMDC Medium auf drei ml eingestellt. Nun können die unterschiedlichen Stimuli, in diesem Fall ausschliesslich TLR-Liganden, auf die Zellen pipettiert werden. Folgende TLR-Agonisten wurden einzeln oder in Kombination in den angegebenen Konzentrationen eingesetzt:

TLR 3 Ligand Poly I:C	50 μ gr/ml
TLR 4 Ligand LPS	100 ngr/ml
TLR 7 Ligand R-848	1 μ gr/ml
TLR 1 Ligand Pam3Cys-SKKK	1 μ gr/ml

Die Dauer der Stimulation variiert zwischen 6 („kurzer Stimulus“) und 20 Stunden („langer Stimulus“); für bestimmte Fragestellungen wurde das Medium nach 20

Stunden durch TLR-Agonist-freies, frisches Medium ausgetauscht, um so genannte „Stimulus-Removal“-Experimente durchführen zu können. Nach den 6 oder 20 Stunden Stimulus werden die Zellen zwei Mal in BMDC Medium gewaschen, um sämtliche TLR-Liganden zu entfernen und anschliessend werden die DCs mit Peptid in unterschiedlicher Konzentration beladen, in dem das Peptid auf die Zellen pipettiert und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert wird. Danach werden die DCs ausgiebig gewaschen, um freies Peptid zu entfernen.

2.2.1.5 Primärzellen

Es wurden folgende Organe von Versuchstieren entnommen und für die durchzuführenden Experimente zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet: Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark. Hierzu werden die für den Versuch verwendeten Mäuse mit CO₂ getötet und, falls Sterilität gewünscht ist, unter einer Sterilbank aseptisch geöffnet. Organe, die für Kurzzeitkulturen von nur einigen Stunden (s. Intrazelluläre Zytokinfärbung) benötigt werden, können auch unsteril entnommen werden. Die Mäuse werden mit Ethanol besprüht und das Fell durch einen kleinen Dreiecksschnitt geöffnet. Nun kann das Fell einfach durch Ziehen grossflächig entfernt und die Bauchhöhle freigelegt werden. Um die relevanten intestinalen Organe präparieren zu können (Milz, inguinale Lymphknoten), wird die Bauchdecke geöffnet und das gewünschte Organ entnommen. Für eine Thymusentnahme werden die Rippen des Brustkorbs vom Zwerchfell in Richtung Kopf rechts und links aufgetrennt und der Brustkorb wie ein Deckel in Richtung Kopf aufgeklappt. Der weissliche Thymus liegt nun klar erkennbar über dem Herzen und zwischen den Lungenflügeln. Idealerweise wird der Thymus ohne Verletzung der herznahen Blutgefässe entnommen, um eine Verunreinigung der Probe mit Erythrozyten zu vermeiden. Poplietale Lymphknoten liegen in den Kniebeugen und werden durch gezielte Schnitte und Freipräparieren unter Zuhilfenahme einer Pinzette freigelegt. Knochenmark wird wie oben beschrieben (s. BMDCs) präpariert und wurde in den Versuchen immer CD8⁺ T-Zell-depletiert (s. Magnetische Zell-an- bzw. in diesem Fall -abreicherung). Alle entnommenen Organe werden in sterilem PBS aufgenommen und mit einem Spitzenstempel durch ein Molekularsieb („Cell-Strainer“, 70 µm, BD Falcon) gepresst. Die Zellen werden bei 1700 bis 1800 rpm für drei Minuten pelletiert und im folgenden mit fünf ml ACK Puffer versetzt, falls die

Probe grosse Mengen an Erythrozyten enthält (ist lediglich bei Milz der Fall; Lymphknoten und Thymus sind bei sauberer Präparation nicht wesentlich durchsetzt mit roten Blutkörperchen). Der ACK Puffer kann als hypotone Pufferlösung lysierend besonders auf die Erythrozyten wirken, die nicht über ausreichende Membrantransportproteine verfügen, um dem osmotischen Druck standhalten zu können. Nach fünf Minuten wird die Lyse durch Zugabe von 10 ml PBS gestoppt, um eine Schädigung der Lymphozyten zu vermeiden. Durch zweimaliges Waschen werden alle Reste des ACK Puffers entfernt, die Zellen in TZM aufgenommen und gezählt. Die so erhaltenen Primärzellen aus Milz und Lymphknoten wurden nun vor allem in T-Zell-Assays eingesetzt, die im Folgenden beschrieben werden. Thymi wurden lediglich für eine sofortige FACS-Färbung verwendet und nicht kultiviert; Knochenmark wurde ausser für BMDCs nur für Rekonstitutionen nach letaler Bestrahlung von Versuchstieren verwendet und ebenfalls nicht für Kulturzwecke eingesetzt.

2.2.2 Typisierung der verwendeten Mausstämme

Typisiert werden sporadisch die LMP7 Knock-Out Mäuse mittels PCR und routinemässig die Zuchten LMP7 Knock-Out/ OT-1 bzw. LMP7 Wild-Typ/ OT-1 mittels PCR- bzw. mittels FACS-Analyse. Die PCR für die Amplifikation der Neomycin-Resistenz Geninformation in LMP7 Knock-Out Mäusen erfolgt nach Ohrbiopsie und Proteinase K Über-Nacht-Verdau der Gewebeprobe. Für die (50 µl) PCR werden standardmässig 5 µl der Ohrbiopsie eingesetzt und dann folgendem PCR-Protokoll unterzogen:

5 Minuten	95 °C (Aufspaltung der DNA-Matrize)
30 Sekunden	95 °C (Aufschmelzen der DNA-Stränge)
30 Sekunden	58 °C (Hybridisieren der Primer an die Einzelstränge)
60 Sekunden	72 °C (Verlängerung der Primer durch die Polymerase)
10 Minuten	72 °C (Beenden der Kettenreaktion)

Die Zyklen zwei bis vier werden 35 x wiederholt und die relevante DNA-Information auf diese Weise amplifiziert. Nach der PCR werden die Ansätze mit DNA-Ladepuffer versetzt, in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Produkte mittels eines DNA-Markers auf ihre Länge überprüft. Die sequenzspezifischen Primer (Sequenzen: Neo-A 5'-CTTGGGTGGAGAGGCTATTC, Neo-B 5'-AGGTGAGATGACAGGAGATC, LMP7-A 5'-TCTATGGTGGCATCACTATGTT und LMP7-B 5'-TGGTACTGTGGGCGATTGAG) amplifizieren einen ca. 300 bp langen Abschnitt im Gen für die Neomycin-Resistenz in den LMP7 Knock-Out Mäusen. Zusätzlich werden die Mäuse mit LMP7 spezifischen Primern auf die Präsenz des LMP7 Gens getestet. Wild-Typ Mäuse sollten daher in der „WT“-PCR eine Bande zeigen (ca. 550 bp), nicht aber in der „Neo“-PCR, LMP7-heterozygote Tiere sollten in beiden PCR-Ansätzen spezifische Banden zeigen, da sie ja die genetischen Informationen für sowohl LMP7 als auch die Neomycin-Resistenz tragen. LMP7 Knock-Out Mäuse ergeben in den beiden Ansätzen lediglich eine Bande bei der „Neo“-PCR.

Die Transgenität bezüglich des OT-1 T-Zell-Rezeptors wird mit Hilfe der Durchflusszytometrie nach Antikörperbindung an CD8 und $V\alpha 2 / V\beta 5.1$ überprüft. OT-1 transgene $CD8^+$ T-Zellen verwenden für ihren T-Zell-Rezeptor die Ketten $V\alpha 2$ und $V\beta 5.1$ und sind über diese Marker leicht nachweisbar

2.2.3 Blutentnahme bei Versuchstieren

Für bestimmte Fragestellungen ist es notwendig, den Immunstatus der im Versuch befindlichen Tiere zu überprüfen, ohne die Tiere zu töten, damit sie weiterhin im Experiment verbleiben können. Zu diesem Zweck werden die Mäuse in einen Maus-„Restraint“ gezogen, in dem die Tiere zwar immobilisiert sind, der Schwanz für den Experimentator jedoch für Manipulationen zugänglich ist. Der Schwanz wird durch Rotlichtbestrahlung erwärmt, um die Blutgefäße zu erweitern. Durch einen gezielten Schnitt mit einem Skalpell wird eine Schwanzvene verletzt und das Blut in ca. 500 μ l eines gerinnungshemmenden „Blut-Puffers“ aufgefangen. Für Typisierungen reichen in der Regel ein bis zwei Tropfen Blut, falls mehr Blut benötigt wird, können bis zu zehn Tropfen entnommen werden. Die Weiterverarbeitung erfolgt wie im Prinzip wie bei der Prozessierung der Organe, d.h. das Blut-Puffer Gemisch wird in 5 ml ACK

Puffer pipettiert, um die Erythrozyten fünf Minuten zu lysieren und alle folgenden Schritte entsprechen den bereits oben beschriebenen. Auf eine Zählung der Zellen wird jedoch verzichtet, da diese sofort für FACS-Färbungen eingesetzt werden.

2.2.4 Immunisierung von Mäusen

Um Peptid-spezifische CD8⁺ aber auch CD4⁺ T-Zellen in den Versuchstieren zu induzieren, kommen verschiedenste Immunisierungsrouten zum Einsatz, die hier kurz erläutert werden sollen.

2.2.4.1 Subkutane Immunisierung (s.c.)

Mit einem 1:1 Gemisch aus Peptid und komplettem Freund'schen Adjuvants. Es werden ca. 100 bis 150 µg Peptid in einem geringen Volumen (200 µl) mit demselben Volumen an komplettem Freund'schen Adjuvants vermengt und für zehn Minuten gut ge-vortext, um eine homogene Fett-Peptid-Emulsion herzustellen. Die nun weisslich-cremige Masse wird den Versuchstieren unter die Haut im Nackenbereich oder in die Fusssohlen injiziert. Nach sieben Tagen werden die Tiere mit CO₂ getötet und die gewünschten Organe entnommen. Bei Immunisierung im Nacken ist das in der Regel die Milz, bei Immunisierung über die „footpads“ sind es meist die poplietalen Lymphknoten und auch die Milz.

2.2.4.2 Intraperitoneale Immunisierung (i.p.) mit aktivierten, Peptid-beladenen Dendritischen Zellen

BMDCs werden wie beschrieben präpariert und differenziert. An Tag 6 werden sie über Nacht (20 Stunden) wie beschrieben mit LPS oder Poly I:C aktiviert, am folgenden Tag geerntet und für eine Stunde mit Peptid beladen. Die Beladung erfolgt nicht in jedem Fall gleich und variiert von Versuch zu Versuch. Für eine Standard-Immunisierung von Wildtyp-Mäusen werden die aktivierten DCs mit 100 nM Peptid in BMDC-Medium beladen und vor der Injektion mit PBS gewaschen und dann in PBS

in den Bauchraum injiziert. Die Menge der injizierten DCs ist ebenfalls sehr unterschiedlich und ist im Einzelfall den Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

2.2.4.3 Transkutane Immunisierung über die Haut (TCI)

Den Mäusen wird einen Tag vor Beginn der Immunisierung unter Narkose (Ketamin/Rompun) der Rücken mit einem handelsüblichen Langhaarschneider geschoren und mit einem mit einem Elektrorasierer der Rücken glatt rasiert (Tag -1). Am nächsten Tag werden die Mäuse ebenfalls unter Narkose mit ca. 50 mg Aldara-Salbe eingecremt, in die zuvor gründlich 100 µg Peptid (10 mg/ ml stock in DMSO) gemischt wurde. Die bereits für die humane Anwendung zugelassene Aldara-Creme enthält den R-848 ähnlichen Wirkstoff Imiquimod, der über Toll-Like Rezeptor 7 vermittelt in der Lage ist, die Dendritischen Zellen (der Haut) zu aktivieren. Durch die Beimischung von Antigen in Form von Peptid wird so aus der Creme ein Vehikel für die Antigen-spezifische Induktion einer CTL-Antwort. Das Cremen wird an den Tagen 0 und +1 durchgeführt. Um CD4-Hilfe in diesem Modell zu simulieren, wird an den Tagen 0, +1 und +2 zusätzlich pro Maus 100 µg anti-CD40 Antikörper pro Maus i.v. injiziert. Die Mäuse werden in der Regel an Tag 6 an der Schwanzvene geblutet, um die Induktion der Immunantwort mittels „DimerX“- oder Tetramerfärbung und Oberflächenfärbung zu überprüfen. An Tag 7 werden die Versuchstiere wie beschrieben getötet und die gewünschten Organe präpariert und zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet.

2.2.5 Ansetzen einer klassischen CTL-Kultur

Die Milzen der im Versuch befindlichen Tiere werden an Tag 7 entnommen, verarbeitet, gezählt und die Zellzahlen angeglichen. Etwa $5 \cdot 10^6$ Milzzellen werden pro Well einer 24-Well Platte ausgesät und jedes Well wird mit ca. 100nM Peptid versetzt. Das Peptid bindet an alle Zellen der Milz, die über MHC-Klasse I Moleküle verfügen und die so mit Peptid beladenen Milzzellen können als APCs fungieren. Da sich in der Milz ca. 50 % B-Zellen befinden, ist diese Methode durchaus angebracht, um die Antigenpräsentation für die CTLs zu gewährleisten, jedoch sind die B-Zellen nicht die optimalen APCs.

Aus diesem Grund wurden die weitaus meisten T-Zell-Kulturen in dieser Arbeit mit aktivierten und Peptid-beladenen DCs als APCs durchgeführt, weil diese viel besser in der Lage sind, neben der Antigenpräsentation die für eine optimale T-Zell-Aktivierung ebenfalls erforderlichen kostimulatorischen Signale zu vermitteln. Zu diesem Zweck werden die etwa 5mio ausgesäten Milzzellen pro Well einer 24-Well Platte mit ca. $2,5 - 5 * 10^5$ von Tag 6 auf Tag 7 aktivierten (LPS, Poly I:C, 20 Stunden), mit Peptid-beladenen DCs versetzt. Nach fünf Tagen können bei erfolgreicher Immunisierung und Restimulation in vitro die CTLs für Effektorassays wie Peptid-spezifische ^{51}Cr -Freisetzung (s.u.) oder eine Peptid-spezifische intrazelluläre Zytokinfärbung (z.B. $\text{IFN-}\gamma$, s.u.) eingesetzt werden.

2.2.6 Restimulation von T-Zellen

An Tag 7 nach Ansetzen einer klassischen CTL-Kultur können die CTLs in vitro restimuliert werden. Diese Restimulation erfolgt auf gleiche Weise wie das Ansetzen einer CTL-Kultur. Bei zu grosser Vereinzelnung innerhalb der Wells einer 24-Well Platte werden die CTLs geerntet, abzentrifugiert, gezählt und etwa $2 - 3 * 10^6$ Zellen pro 24-Well wieder ausgesät, wobei diese Zahl stark von dem Anteil der T-Zellen abhängt, den der Experimentator durch Erfahrung beurteilen muss. Wieder werden aktivierte, Peptid-beladene DCs als APCs („feeder“) eingesetzt, die das gewünschte Antigen präsentieren können. Im Prinzip können diese Restimulationen unbegrenzt fortgesetzt werden, wodurch T-Zelllinien entstehen, die nach einigen Runden der Restimulation bis zu 80 bis 90 % der Kultur ausmachen können. In der Praxis gelingt die Generierung von T-Zelllinien jedoch nur selten, weil es schwer ist, ein ausreichend gutes T-Zell-„Priming“ zu erreichen und die T-Zellen mit der Zeit in der Kultur absterben.

2.2.7 Magnetically Assisted Cell Sorting (MACS)

Für viele Fragestellungen und Experimente, in vitro wie in vivo, ist es notwendig, die im Versuch benötigten CD4^+ , CD8^+ , oder regulatorischen T-Zellen vorher anzureichern. Die Milzen der Tiere, aus denen die Zellen isoliert werden sollen

werden entnommen und prozessiert. Folgende Protokolle kommen für die Anreicherung der oben genannten T-Zell-Populationen zum Einsatz:

2.2.7.1 Anreicherung naiver CD4⁺ T-Zellen

Die Milzen der Versuchstiere, aus denen die CD4⁺ T-Zellen aufgereinigt werden sollen werden entnommen und prozessiert. Sie werden in GM-Puffer in einer Konzentration von $1 \cdot 10^8$ aufgenommen und mit einem biotinylierten anti-CD4⁺ Antikörper für 20 bis 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert (Klon H.129.19bio; Verdünnung: 1/400, Quelle: Institut für Immunologie, Mainz). Die Zellen werden anschliessend zwei Mal in GM-Puffer gewaschen und dann mit Streptavidin-Beads (Miltenyi Bioscience, #130-048-101; Verdünnung 1/40) für weitere 30 Minuten versetzt. Im Anschluss werden die Zellen gewaschen, über ein Molekularsieb filtriert („Cell-Strainer“, BD Falcon) und dann über Säulen von Miltenyi Bioscience gegeben, die in einem Magnetischen Feld nach Anleitung des Herstellers aufgehängt sind. Das Prinzip hierbei ist, dass die über die Antikörper an die magnetischen Beads gebundenen Zellen im magnetischen Feld in der Säule zurückgehalten werden, während alle anderen Zellen die Säule ungehindert passieren und als Durchfluss austreten. Nach einem Waschschrift wird die Säule aus dem magnetischen Feld genommen und die angereicherten Zellen werden mit Hilfe eines Spritzenstempels aus der Säule gedrückt. Die Reinheit beträgt in der Regel > 85 % und ist für die Versuche absolut ausreichend. Sind reinere Fraktionen erwünscht, wird das erste Eluat ein zweites Mal auf die Säule gegeben und nach ausgiebigem Waschen erneut eluiert.

2.2.7.2 Anreicherung von Regulatorischen T-Zellen

Erfolgt vom Prinzip her gleich wie bei der Anreicherung der naiven CD4⁺ T-Zellen, es kommen lediglich andere Antikörper zum Einsatz. Zuerst werden die Zellen mit einem biotinylierten anti-CD25 Antikörper (Klon 7D4-bio, BD 553070) inkubiert, gefolgt von Streptavidin-Beads (Miltenyi Bioscience, 130-048-101). Die Zellen werden wie oben beschrieben zwei Mal über MACS-Säulen aufgereinigt. Danach erfolgt jedoch zusätzlich eine Inkubation mit anti-B220-(DYNAL, 114.01), anti-CD8⁺-

(DYNAL, 114.07) und anti-MAC-Beads (ADCC Antikörper-Klon M1/70.15.11.5, Kopplung an Beads im Institut für Immunologie), die ebenfalls magnetisch sind. Nach der halbstündigen Inkubation mit den Dynal-Beads wird das Volumen mit GM-Puffer auf 10 ml erhöht und das 50 ml Tube in einen speziellen Magnetstand gestellt. In diesem werden die Zellen, die die magnetischen Dynal-Beads gebunden haben durch den starken Magneten an die Wand des Gefäßes gezogen und der Überstand kann bequem abgenommen werden. Diese Prozedur wird ein zweites Mal wiederholt, so dass die letztendlich vorliegenden regulatorischen T-Zellen zu 90 % und höher rein vorliegen. Werden voraktivierte regulatorische T-Zellen für den Versuch benötigt, gibt man jeweils $1 \cdot 10^6$ T_{regs} pro Well einer 24-Well Platte, an die zuvor anti-CD3 (3 µg/ ml) und anti-CD28 (10 µg/ ml) gebunden wurde. Nach zwei Tagen liegen vor-aktivierte, d.h. so genannte „pre-T_{regs}“ vor, deren inhibitorischen Eigenschaften die von frisch isolierten T_{regs} noch deutlich übertreffen.

2.2.7.3 Anreicherung naiver CD8⁺ T-Zellen

s. Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen; es kommen hier allerdings Beads zum Einsatz, an die der CD8-Antikörper direkt gekoppelt ist, so dass der zweite Schritt mit den Streptavidin-gekoppelten magnetischen Partikeln entfällt. Nach Inkubation mit den Beads können die Zellen direkt über eine MACS-Säule aufgereinigt werden und liegen üblicherweise zu > 90 % rein vor.

2.2.7.4 Depletion von CD8⁺ T-Zellen aus dem Knochenmark

Für die durchgeführten Knochenmarkstransfers ist es sehr wichtig, dass nicht kontaminierende CD8⁺ T-Zellen in die bestrahlten Tiere gegeben werden, die dann das Ergebnis verfälschen könnten. Aus diesem Grund wird das Knochenmark vor der Rekonstitution der bestrahlten Tiere über Dynal-Beads von CD8⁺ T-Zellen befreit. Es wird davon ausgegangen, dass etwa 10 % des isolierten Knochenmarks CD8⁺ T-Zell-Verunreinigungen darstellen könnten, wobei dieser Wert sicherlich sehr hoch angesetzt ist. Es wird die 2,5 fache Menge an anti-CD8⁺ Dynal-Beads zu der Knochenmarkslösung hinzugegeben und für 30 Minuten inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird das kleine Volumen (~ 1 ml) mit GM-Puffer auf 10 ml aufgefüllt

und in den DYNAL-Magneten gestellt. Nach 2 Minuten wird der Überstand abgenommen, während die verunreinigenden CD8⁺ T-Zellen aufgrund der Bindung an die magnetischen Beads im Magnetfeld im 50 ml Falcon verbleiben. Das CD8⁺ T-Zell-depletierte Knochenmark wird mit einer FACS-Analyse auf die Effektivität der Depletion überprüft und dann intravenös in die Rezipiententiere injiziert.

2.2.8 T-Zell Proliferations-Assay

Für den klassischen Proliferations-Assay werden meist magnetisch-aufgereinigte CD8⁺ oder CD4⁺ T-Zellen mit Peptid-beladenen APCs in Triplikaten in einer 96-Well Platte inkubiert und drei bis fünf Tage später entweder die Inkorporation von ³H-Thymidin in die T-Zellen oder die CFSE-Verdünnung der vorher CFSE-markierten T-Zellen bestimmt. Beide Read-Out Methoden kommen zum Einsatz, wobei oftmals die CFSE-Methode die elegantere ist, weil tatsächlich NUR die relevanten Zellen und ihre Aktivierung betrachtet und analysiert werden können. Standardmässig werden ca. $2 \cdot 10^4$ T-Zellen mit $2 \cdot 10^3$ (via TLR aktivierten) Tag 6 Dendritischen Zellen oder anderen APCs zusammengegeben, die mit variabler Peptidmenge gepulst wurden. Kommen nicht aufgereinigte Milzzellen als APCs zum Einsatz, werden diese nach der einstündiger Peptid-Inkubation und vor dem Pipettieren in die T-Zell Kulturen mit 3 Gray bestrahlt, um eventuell kontaminierende Proliferation innerhalb der APCs zu vermeiden. Je nach Versuchsansatz und -frage können die T-Zellen, DCs, APCs oder das Antigen titriert werden bzw. das Experiment durch Zusatz von (vor-aktivierten) Regulatorischen T-Zellen ergänzt werden. Das Gesamt- bzw. Endvolumen in den Wells einer 96-Well-Platte beträgt üblicherweise 200 µl und der Read-Out erfolgt meist an den Tagen 3, 4 oder 5. Um die Proliferation der T-Zellen zu verfolgen, werden jeweils 0,5 µCi ³H-Thymidin an den Tagen 2, 3 oder 4 (abends) pro Well pipettiert. Nach 16 - 20 Stunden werden die Platten „geerntet“, d.h. die Zellen und ihre (meist in DNA) inkorporierte Radioaktivität über eine Absaugvorrichtung auf spezielle Glasfaserfilter aufgebracht und mit einer Szintillationsflüssigkeit in messbare Lichtsignale transformiert. Diese werden mit einem so genannten „β-Counter“ ausgelesen. Durch das Pipettieren von Triplikaten lassen sich bequem die Mittelwerte mit den Standardabweichungen bilden. Der Vorteil dieser ³H-Inkorporation liegt in der einfachen Quantifizierung der Proliferation

über Stimulations-Indices und somit in der guten Vergleichbarkeit von verschiedenen manipulierten Proliferations-Ansätzen. Der Nachteil liegt darin, dass nie eindeutig geschlossen werden kann, welche Zellen wirklich proliferiert haben, da alle sich teilenden Zellen das ^3H -Thymidin inkorporieren. Um dieses Problem zu „umgehen“ kann man die zu untersuchenden T-Zellen mit CFSE (meist 2,5 μM , Protokoll: wie „In Vivo Zytotoxizitäts-Assay“, s.u.) markieren und an den jeweiligen Tagen die (CFSE-positiven) T-Zell Kulturen mittels Durchflusszytometrie auslesen. Der Nachteil liegt hier höchstens in der etwas aufwendigeren Verarbeitung der zu färbenden Proben, die zusätzlich meist noch mit Antikörpern gegen Aktivierungsmarker (z.B. CD25, CD44, CD62L) oder intrazelluläre Zytokine (z.B. IFN- γ , IL-2, IL-4) gefärbt werden. Der Nachteil ist aber lediglich ein zeitlicher, da die durch die Antikörper-Färbung zusätzlich gewonnenen Informationen bezüglich der T-Zellen ein Vielfaches der Aussagen zulässt, die ein ^3H -Thymidin Proliferation Assay bereitstellt. So können beispielsweise über die Verwendung von kongenen Markern (CD90.1 oder CD90.2 bzw. CD45.1 oder CD45.2) zwei verschiedene CFSE-markierte T-Zell-Populationen (z.B. CD8 $^+$ T-Zellen und Regulatorische T-Zellen) gleichzeitig untersucht werden, die CFSE-Verdünnung (= Proliferation) mit den Aktivierungsmarker oder intrazellulären Zytokinen in Verbindung gebracht werden. Somit erlauben CFSE-basierte Proliferation Assays eine eher qualitative Aussage der T-Zell-Proliferation im Vergleich zu der standardmässigen ^3H -Thymidin-Inkorporation. Gerade in transgenen Systemen muss man jedoch in CFSE Proliferation Assays mit einiger Optimierungszeit für die Assay Entwicklung rechnen, da man Proliferationsunterschiede aufgrund von APC (DC) Unterschieden meist nur schwer und nur unter Bereitstellung von suboptimalen Bedingungen detektieren kann.

2.2.9 Suppressions-Ansatz mit Regulatorischen T-Zellen (T_{regs})

Die regulatorischen T-Zellen werden wie oben beschrieben aufgereinigt und falls erforderlich 2 Tage mit platten-gebundenem anti-CD3 / anti-CD28 voraktiviert (voraktivierte T_{regs} oder „pre- T_{regs} “). Die naiven oder voraktivierten CD4 $^+$ CD25 $^+$ regulatorischen T-Zellen werden in titrierten Verhältnissen zu den Proliferations-Ansätzen (s. T Zell Proliferation Assay) hinzupipettiert und die Kultur durch Zugabe von ^3H -Thymidin über Nacht von Tag 2 auf Tag 3 oder einen Tag später ausgelesen.

2.2.10 ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay

Der klassische ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay dient der Abschätzung und Quantifizierung einer wichtigen Effektorfunktion von CTLs, der peptid-spezifischen Lyse von Zielzellen. Grundlage für diese Methode ist die Tatsache, dass lebende Zellen Na₂⁵¹CrO₄ aufnehmen können und das ⁵¹Cr⁶⁺ Kation zum ⁵¹Cr³⁺ Kation reduzieren. Dieses kann durch Salzbrückenbildung an zelluläre Anionen wie DNA (Phosphorrückrat) und freie, dissoziierte Carboxylgruppen von Proteinen und Kohlenhydraten binden. Da diese Moleküle die Zellmembran lebender Zellen unter normalen Umständen nicht passieren, ist die unspezifische Freisetzung von ⁵¹Cr³⁺ recht gering, zudem kann einmal freigesetztes ⁵¹Cr³⁺ nicht wieder aufgenommen werden. Die antigen-spezifische Lyse der Zielzellen, vermittelt durch peptid-spezifische CTLs, setzt, abhängig von der Effektivität der CD8⁺ T-Zellen, mehr oder weniger Radioaktivität frei, deren γ -Strahlung man quantifizieren kann. Technisch wird dabei wie folgt vorgegangen: Geeignete Zielzellen (Vorraussetzung 1: Vorhandensein von MHC-Klasse I, Vorraussetzung 2: Vorhandensein des korrekten MHC-Klasse I Allels zur Bindung des relevanten Peptid-Antigens) werden für eine Stunde mit ⁵¹Cr inkubiert. Für eine 96-Well Platte benötigt man z.B. ca. $2 \cdot 10^6$ EL-4 Zielzellen, die man in 2 Portionen à $1 \cdot 10^6$ aufteilt. Der einen Fraktion setzt man das Peptid zu, gegen das die T-Zellen gerichtet sind. Der anderen Fraktion setzt man ein irrelevantes Peptid zu. Beide Ansätze werden anschliessend mit 10 bis 20 μ l einer Na-Chromatlösung versetzt (Aktivität: 10 μ Ci/ml) und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach einer Stunde werden die Zielzellen zwei Mal mit Medium gewaschen und erneut eine halbe Stunde bei 37°C inkubiert, um eventuell bereits jetzt sterbende und ⁵¹Cr-freisetzende Zellen zu entfernen. Nach erneutem Waschen werden beide Populationen so in Medium aufgenommen, dass ihre Konzentration $1 \cdot 10^5$ pro ml beträgt. 100 μ l (entsprechen $1 \cdot 10^4$) werden dann pro Well einer 96-Well Rundbodenplatte pipettiert. Die T-Zellen werden vor dieser Prozedur in fünf Wells untereinander titriert, um eine quantitative Aussage über die Lyse machen zu können. Hierzu wurden vorher die zu untersuchenden T-Zellen in 300 μ l aufgenommen und je 150 μ l in das 3. Well von oben (Reihe „C“) einer 96-Well Platte pipettiert. Alle Wells darunter werden mit 100 μ l Medium befüllt. Mit einer Multikanalpipette werden nun insgesamt vier 1/3 Verdünnungen in die darunterliegenden Wells hergestellt. Als Positivkontrolle kommen in das erste Well

(Reihe „A“) 100 µl Triton-X-100, die die Zielzellen komplett lysieren und somit den Wert für die maximal freisetzbare Radioaktivität liefern. Die Reihe „B“ wird zur Sicherheit freigelassen, damit es nicht zu einer Kontamination der folgenden Wells mit dem Detergenz kommen kann. Die Reihen „C“ bis „G“ enthalten die T-Zell Verdünnungen und die Reihe „H“ liefert den Wert der spontanen Lyse, d.h. es werden hier nur die Zielzellen zugegeben. Ist die 96-Well Platte auf diese Weise präpariert, werden überall die $1 \cdot 10^4$ Zielzellen in 100 µl hinzupipettiert und der Assay für 4 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 4 Stunden werden mit einer Mehrkanalpipette 50 µl Überstand vorsichtig entnommen und auf eine 96-Well Festphasen-Szintillationsplatte überführt (Perkin-Elmer). In der Szintillationsplatte wird die im Überstand befindliche Radioaktivität in Lichtsignale umgewandelt, die mit einem Szintillationszähler (Wallac, Deutschland) messbar sind. Während die Peptid-beladenen Zielzellen in Abhängigkeit des Effektor- zu Zielzell-Verhältnisses lysiert werden, sollten die mit einem irrelevanten Peptid-inkubierten Zellen intakt bleiben und nur Hintergrundstrahlung freigesetzt haben, die als „Spontanlyse“ verbucht wird. Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgt nach der Formel: $[\text{Cpm}_{(\text{gemessen})} - \text{Cpm}_{(\text{spontan})}] / [(\text{Cpm}_{(\text{Triton-X-100})} - \text{Cpm}_{(\text{spontan})})] \times 100 \%$.

2.2.11 In vivo Zytotoxizitäts-Assay

Eine zweite, sehr elegante und vor allem nicht-radioaktive Methode, T-Zellen bezüglich ihrer lytischen Effektoreigenschaften zu untersuchen stellt der in vivo Zytotoxizität-Assay dar. Hierbei erfolgt die Quantifizierung der T-Zell-vermittelten Lyse direkt in vivo, also ohne vorherige Restimulation in Kultur. Diese Methode ist mittlerweile für viele Anwendungen und Fragestellungen eine hervorragende Alternative zum radioaktiven ^{51}Cr -Freisetzungssassay. Die Zielzellen sind in diesem Fall nicht Peptid-beladene EL-4 Thymomzellen, sondern Milzzellen einer syngenen Donormaus, die das relevante MHC-Allel exprimiert. Nachdem in den Versuchstieren eine Immunantwort induziert wurde (s. Immunisierung von Mäusen), wird der in vivo Zytotoxizitäts-Assay in der Regel an Tag 7 durchgeführt, Abweichungen sind in den betreffenden Versuch aufgeführt. Die Faustregel für die Anzahl an Donormäusen, die man für die Aufreinigung von Zielzellen benötigt, besagt, dass man pro Versuchstier ca. $\frac{1}{2}$ Milz einer syngenen Donormaus für die Zielzellen benötigt. Die Donormilzen

werden entnommen und zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Nach der Erythrozytenlyse und dem Zählen wird der Ansatz in zwei gleich grosse Fraktionen à $2 \cdot 10^7$ Milzzellen pro ml in PBS aufgeteilt. Nun wird die eine Population mit $4 \mu\text{M}$ CFSE, die andere mit $0,4 \mu\text{M}$ CFSE markiert. Die CFSE Markierung erfolgt weitgehend nach dem Protokoll des Herstellers und soll hier nur kurz ausgeführt werden. Es werden zwei CFSE Markierungslösungen gleichen Volumens wie die zu markierenden Zellen hergestellt, die allerdings mit 8 und $0,8 \mu\text{M}$ CFSE doppelt konzentriert sind. Diese beiden Lösungen werden mit den beiden Zellansätzen vereint, schnell gemischt und für fünf Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. In dieser Zeit dringt das CFSE in die Zellen ein und bindet irreversibel an zelluläre Proteine. Die Reaktion wird durch Zugabe von FCS bis mindestens 20 Volumenprozent gestoppt und abzentrifugiert. Die Pellets lassen durch ihre starke und etwas schwächere Gelbfärbung bereits eindeutig zwischen den beiden Ansätzen unterscheiden und werden erneut in 5 bis 10 ml FCS gewaschen. Die Zellen werden dann in Medium aufgenommen und eine der beiden Populationen (meist die $0,4 \mu\text{M}$ CFSE markierten Zellen, „CFSE^{lo}“) mit $1 \mu\text{M}$ antigenem Peptid inkubiert, während die andere Population kein oder ein irrelevantes Peptid bekommt. Auf diese Art und Weise hat man zwei über die CFSE Intensität im FACS-unterscheidbare Zielpopulationen generiert, von denen die eine, Peptid-beladene Population genau den Peptid-beladenen EL-4 Zielzellen entspricht. Die beiden Ansätze werden ausgezählt und eine möglichst exakte 1:1 Mischung der Zellen hergestellt. Von dieser Mischung werden den Versuchsmäusen ca. $2 \cdot 10^7$ Zellen, d.h. $1 \cdot 10^7$ jeder CFSE Intensität, intravenös in die Schwanzvene injiziert. Am nächsten Tag werden die Tiere mit CO_2 getötet und die Milzen entnommen. Ohne weitere Färbung werden die Milzzellsuspensionen dann im FACSCanto analysiert. Durch die unterschiedliche CFSE Markierung sind die beiden Populationen gut getrennt über ihre CFSE Fluoreszenz zu analysieren. Als Negativ-Kontrolle dient hierbei eine naive Maus, d.h. eine, die nicht immunisiert worden ist und ergo keine aktivierten peptid-spezifischen T-Zellen in relevanter Menge aufweisen sollte. In dieser Maus liegen die Zielzellen in ihrem Verhältnis unverändert 1:1 vor, bzw. in dem Verhältnis, das der Experimentator durch Auszählen und Mischen am Tag zuvor injiziert hat. In allen anderen Versuchsmäusen wird sich das Verhältnis von Peptid-beladenen „CFSE^{lo}“ zu Kontroll-„CFSE^{hi}“ Zielzellen entsprechend der vorhandenen Immunantwort gegen das untersuchte Peptid verändert haben. Man misst eine festgelegte, konstante (z.B.

$1 \cdot 10^4$), Anzahl von „CFSE^{hi}“ Zellen und kann anhand der im selben Zeitraum gemessenen „CFSE^{lo}“ Zielzellen den Grad der Lyse bestimmen. Die exakte Berechnung der Prozent Lyse erfolgt dabei nach der Formel: $100 - [(Zellzahl\ CFSE^{lo} \text{ pro konstante Anzahl CFSE}^{hi} \text{ Zellen in naiver Maus}) / (Zellzahl\ CFSE^{lo} \text{ pro konstante Anzahl CFSE}^{hi} \text{ Zellen im Versuchstier})]$ in Prozent [%].

2.2.12 FACS-Färbung (Durchflusszytometrie)

Die Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie ist die bei weitem wichtigste Methode, Lymphozyten zu charakterisieren. Sie beruht auf Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern, die gegen spezifische Oberflächenstrukturen von Lymphozyten gerichtet sind. Die zu analysierenden Zellen (Primärzellen, Zellen aus einer in vitro Kultur, usw.) werden nach zweimaligem Waschen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und mit den Antikörpern, entsprechend den titrierten Verdünnungen, versetzt. Die Inkubation erfolgt in der Regel in 96-Well „V“-Boden Platten. Nach 30 bis 60 Minuten Inkubation werden die Zellen abzentrifugiert und erneut zwei Mal in FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen werden nun in kleine FACS-Röhrchen (Greiner) überführt und können sofort im FACSCanto analysiert werden. Im FACS-Gerät passieren die Zellen einzeln zwei nacheinander geschaltete Laserstrahlen. Das entstehende Streulicht gibt Auskunft sowohl über die Grösse („FCS“: Forward Scatter) als auch Granularität („SSC“: Side Scatter) der untersuchten Zellen. Durch die zwei Laser werden ausserdem die Fluorochrome der verwendeten Antikörper angeregt und das emittierte Licht durch entsprechende Filter detektiert. Die Antigenmenge ist dann proportional zur gemessenen Lichtintensität. Mit der FACS-Analyse können Subpopulationen von Zellen durch die Verwendung von Antikörpern gegen verschiedenen Oberflächenmarker sehr gut analysiert werden, was die enorme Bedeutung dieser Methode erklärt.

2.2.13 Intrazelluläre Zytokin-Färbung

Eine weitere in vitro Methode, um eine wichtige Effektoreigenschaft von aktivierten T-Zellen zu überprüfen, nämlich die Synthese von immun-modulierenden Zytokinen, wie z.B. IL-2, IFN- γ oder IL-4, ist die intrazelluläre Färbung mit Fluoreszenz-

markierten Antikörpern. Weil intrazelluläre Zytokine für eine Detektion selbst in aktivierten T-Zellen *ex vivo* und ohne vorherige Manipulation nicht in ausreichender Menge vorliegen, werden die Zellen (Primärzellen, Zellen aus einer *in vitro* Kultur, usw.) zunächst für mehrere Stunden mit dem antigenen Stimulus und Brefeldin A (2 µg/ml) inkubiert. Brefeldin A wird auch als „Golgi-Stop“ bezeichnet und verhindert die Sezernierung von intrazellulären Proteinen aus dem Golgi-Apparat. In der mehrstündigen Inkubation reichern sich also all diejenigen Proteine an, die eigentlich von der Zelle für die Sezernierung synthetisiert worden sind. Nach vier bis sechs Stunden sind die Zytokine derart angereichert, dass sie nach Färbung mit spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch nachweisbar sind. Bei der Färbung wird zunächst wie bei der normalen FACS-Färbung verfahren, d.h. die Oberflächenantigene werden wie oben beschrieben angefärbt. Nach halbstündiger Inkubation und zweimaligem Waschen werden die Zellen für 30 Minuten mit 100 µl Cytofix/ Cytoperm Reagenz (BD 554722) pro Färbeansatz behandelt, um die Zellen erstens zu fixieren und zweitens die Zellmembran zu permeabilisieren. Die Zellen werden im Anschluss in Saponin-Puffer gewaschen, welcher die Poren, die durch das Cytoperm Reagenz in der Zellmembran entstanden sind, stabilisiert und offen hält. Um die intrazellulär angereicherten Zytokine anzufärben werden die Antikörper in 100 µl Saponin-Puffer verdünnt zu den Zellen gegeben und inkubiert. Nach weiteren 30 Minuten werden die Zellen gewaschen, in Saponin- oder FACS-Puffer aufgenommen und im FACS-Gerät analysiert.

2.2.14 Knochenmarkstransfer

Die Versuchstiere werden drei bis vier Stunden vor der Rekonstitution mit fremdem Knochenmark mit 8,5 Gray letal bestrahlt. In der Zwischenzeit wird das Knochenmark der Donormäuse wie oben beschrieben aufgearbeitet und CD8⁺ T-Zell-depletiert. Pro Rezipienten-Maus werden $1 - 1,5 \cdot 10^7$ Knochenmarkszellen intravenös injiziert. Für die Rekonstitution werden pauschal vier Wochen berechnet, in denen die Tiere ruhen und nicht manipuliert werden.

2.2.15 Listerieninfektion

Listeria monocytogenes (*L.m. OVA*) ist ein Gram-positives Bakterium und wird sowohl für Studien der angeborenen und erworbenen Immunität verwendet, weil man die Infektion sehr gut verfolgen kann. Die erworbene Immunantwort gegen Listerien ist durch eine starke CTL-Antwort charakterisiert und hat ihren Höhepunkt an Tag 7 oder 8 nach Infektion. Da für Versuchsmäuse auf H2-^b Hintergrund leider keine Epitope bekannt sind, wurden für die Versuche in dieser Arbeit Listerien verwendet, in die transgen das Ovalbumin-Gen eingeführt wurde (*L.m. OVA*). Neben dem aus Ovalbumin-Protein stammenden SIINFEKL CD8 Epitop ist auf dem H2-^b Hintergrund noch ein subdominantes MHC-Klasse II Epitop aus einem Listerien-Protein bekannt, LLO₁₈₈₋₂₀₁. LLO spielt eine wichtige Rolle für das Austreten der Bakterien nach der Phagozytose und zudem für das Verbreiten der Bakterien in Nachbarzellen. Die Bakterien-Titer erreichen drei Tage nach subletaler Infektion (ca. 10 % der LD₅₀ Menge) ihren Höhepunkt, sind aber nach 7 Tagen quasi nicht mehr nachweisbar. Sowohl α/β als auch γ/δ T-Zellen sind an der Bekämpfung der bakteriellen Pathogene beteiligt, wobei die klassischen α/β T-Zellen den Hauptteil der Antwort ausmachen. Da sehr effizient Memory-T-Zellen induziert werden, kommt es nach einer Re-Infektion („Recall“) zu einer sehr viel schnelleren Immunantwort, selbst wenn die 10-fache LD₅₀ Menge an Bakterien inokuliert wird. Die Memory-Antwort hat ihren Höhepunkt an Tag 5 und immunkompetente Tiere haben die Bakterieninfektion nach zwei Tagen effizient unter Kontrolle. Die Bakterien werden in 6 ml BHI Medium inokuliert und geschüttelt, bis sie eine OD₆₀₀ von 0,05 – 0,1 erreicht haben. Die Bakterienanzahl pro ml wird dabei wie folgt berechnet: *L.m. OVA*: OD₆₀₀ 0,1 = $8,0 \cdot 10^7$ Bakterien/ml. Für eine Primärinfektion werden die Mäuse intravenös mit $2 \cdot 10^3$ Bakterien in 200 μ l inokuliert während für eine „Recall“-Infektion eine hundertfach höhere Dosis verwendet wird.

2.2.16 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Mittels eines ELISA können in *in vitro* Kulturen in den Überstand sezernierte Zytokine mit einer hohen Sensitivität nachgewiesen und quantifiziert werden. Definierte Zellmengen werden in Wells einer 96-Well Platte gegeben und mit antigenem (z.B.

Peptiden bei T-Zellen) oder anderweitig aktivierenden Stimuli (z.B. bei BMDCs) versetzt. Nach 24 oder 48 Stunden wird der Überstand vorsichtig abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Für den eigentlichen ELISA wird der entsprechende Detektions-Antikörper („capture“) gegen das gewünschte Antigen über Nacht bei 4 °C in speziellen 96-Well Platten (Maxisorb) in 50 µl „ELISA-Binding“ Puffer gebunden. Am nächsten Tag wird mit „ELISA-Wash“ Puffer gewaschen und die Platte anschliessend mit „ELISA-Block“ Puffer gegen unspezifische Bindung blockiert. Nach erneutem Waschen werden die Proben, unverdünnt oder verdünnt, in Triplikaten auf die 96-Well Platte pipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proben werden dann abzentrifugiert und die Platte vier Mal ausgiebig gewaschen. Es folgt eine einstündige Inkubation mit dem zweiten Detektionsantikörper, der erneut gegen das Zytokin gerichtet ist (daher der verbreitete Name „Sandwich-ELISA“). Die Platten werden nochmals ausgiebig gewaschen und für 60 Minuten mit dem biotinylierten Sekundärantikörper, der gegen den zweiten Detektions-Antikörper gerichtet ist, inkubiert. Der letzte Schritt besteht nach mehrfachem Waschen in der Zugabe von Streptavidin-gekoppelter Peroxidase („horse-radish-peroxidase“ HRP), die in der Lage ist, das Substrat TMB farbig umzusetzen. Die Farbreaktion wird nach Ermessen des Experimentators durch Zugabe von 2 M H₂SO₄ gestoppt und in einem ELISA-Reader ausgelesen.

2.2.17 Aufreinigung von c20S und i20S

s. Dissertation Dr. Stefan Tenzer; die Isolation und Aufreinigung von humanen c20S und i20S aus den Zelllinien LCL721 und LCL721.174 wurden von Dr. Stefan Tenzer in Kooperation durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten pro Präparation 30 ml Zellpellet der jeweiligen Zelllinie. Das Pellet wird in Triton-X-100 haltigem Lysepuffer lysiert, im Dounce-Homogenisator behandelt und nach zweimaliger sequentieller Passage durch Spritzenkanülen der Grösse 25G abzentrifugiert. Danach wird das Lysat mit 5 M NaCl auf 300 mM NaCl gebracht, auf einem DEAE-Anionenaustauscher (prä-aktiviert mit 500 mM NaCl) separiert und 50 ml Eluat-Fractionen durch Eluierung mit 300 mM NaCl aufgefangen. Die proteasomale Aktivität enthaltenen Fractionen werden vereint. Es folgt eine Ammoniumsulfat-Fällung und eine Anionenaustausch HPLC, dann die Glyceroldichte-

Ultrazentrifugation und am Ende die Aufkonzentrierung sowie die abschliessende Reinheitsbestimmung im Western Blot.

2.2.18 In vitro Verdau von Peptiden

s. Dissertation Dr. Stefan Tenzer; der in vitro Verdau des Cp1 α Vorläufers mit den beiden Proteasomspezies c20S und i20S wurde von Dr. Stefan Tenzer durchgeführt. Jeweils 10 nmol des in DMSO oder 50 % ddH₂O/ 50 % DMSO gelösten Peptides wurden zusammen mit 0,5 μ g aufgereinigtem 20S Proteasom in Verdaupuffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7,6; 2 mM MgCl) inkubiert. Nach 3, 6 und 18 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von TFA zu einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) gestoppt und die Proben bis zur chromatographischen Auftrennung und weiteren Analyse mittels Reversed-Phase HPLC bei -20°C gelagert. Um mögliche Präzipitate zu entfernen, wurde die Probe anschliessend für 30 Minuten bei 15.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Für die Separation über die HPLC wurde eine Flussrate von 150 μ l pro Minute eingestellt; als Puffer „A“ wurde ddH₂O, 0,1 % TFA, als Puffer „B“ 80 % Acetonitril, 0,081 % TFA verwendet. Die verwendete μ RPC PC 2.1/10 Säule wurde mit 100 % „B“ und danach 100 % „A“ gewaschen und voräquilibriert. Die zu separierende Probe wurde über eine 500 μ l Probenschleife mit einer Flussrate von 150 μ l pro Minute auf die Säule appliziert. Die Elution erfolgte schrittweise über die Programmierung eines Gradienten: in 5 Minuten von 0 % auf 10 % „B“, dann in 60 Minuten auf 50 % „B“ und in 20 Minuten auf 100 % „B“. Abschliessend wurde die Säule für 15 Minuten mit 100 % „B“ gewaschen. Während des Elutionsvorganges werden durch automatische Peakfraktionierung Fraktionen von maximal 500 μ l gesammelt. Diese werden bei RT in einer Speed-Vac getrocknet, in 50 % Methanol/ 1 % Ameisensäure gelöst und bei -80°C bis zur weiteren Analyse eingefroren. Anschliessend erfolgt die Analyse der Fraktionen mit MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Diese Technik beruht auf der Kokristallisation des Analyten mit der niedermolekularen, UV-Licht absorbierenden Matrix, die in der Lage ist, Laserenergie zu absorbieren und diese auf den Analyten zu übertragen. Durch die besonders schonende Ionisierungstechnik können auch empfindliche Biomoleküle ionisiert und unfragmentierte Spektren der meist einfach geladenen Analytionen generiert werden. Parallel zur MALDI-TOF Massenspektrometrie erfolgt die Analyse

der HPLC-fraktionierten Verdauungsprodukte mittels Edman-Abbau. Dieser mittlerweile automatisierte Prozess erlaubt die Sequenzierung von Peptiden von N-Terminus aus, in dem die drei Schritte Kupplung, Spaltung und Konvertierung zyklisch wiederholt werden. Die jeweils derivatisierte N-terminale Aminosäure wird mit TFA abgespalten, ohne dass andere Peptidbindungen hydrolysiert werden. Die abgespaltene N-terminale Aminosäure kann nun chromatographisch über einen Vergleich mit den Retentionszeiten einer Referenzprobe identifiziert und genau quantifiziert werden. Auf eine detailliertere Beschreibung der beiden letztgenannten Techniken soll hier verzichtet, bzw. auf die Dissertation von Dr. Stefan Tenzer verwiesen werden.

3 Ergebnisse Teil I

3.1 Erste Anhaltspunkte für eine Beeinflussung des T-Zell Repertoires durch Immunoproteasomen

Erste Hinweise, dass Immunoproteasomen in der Tat Einfluss auf das T-Zell Rezeptor Repertoire haben können, erbrachten neben der Veröffentlichung von Chen (Chen et al. 2001b) initiale Arbeiten von Dr. Matthias Hofmann im Labor von Hans-Georg Rammensee. Er infizierte C57BL/6 Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Mäuse mit Adenovirus und setzte nach sieben Tagen mit den entnommenen Milzen klassische CTL-Kulturen an. Dabei wurde eine Milz jeweils in zwei Ansätze aufgeteilt und die eine Kultur mit dem Peptid SGPSNTPPEI aus dem adenoviralen Protein E1a zur in vitro Restimulation versetzt und der verbliebene Teil mit dem aus dem adenoviralen Protein E1b stammenden Peptid VNIRNCCYI (s. M&M, „Klassische T-Zell Kultur“). Nach fünf Tagen wurde mit den aktivierten und in vitro restimulierten T-Zell Kulturen ein ⁵¹Cr-Freisetzungssassay durchgeführt. Syngene EL-4 Zielzellen wurden mit ⁵¹Natrium-Chromat markiert und zur Hälfte mit E1a oder nicht mit Peptid beladen (Negativkontrolle). Wie aus Abbildung 1 A) zu entnehmen, waren sowohl die Wild-Typ als auch die LMP7 Knock-Out T-Zellen in der Lage, mit E1a beladene Zielzellen (EL-4) spezifisch zu lysieren, die peptid-unbeladenen Zielzellen (Negativkontrolle) wurden wie erwartet nicht lysiert. Eine V β -Analyse der zwei Mal restimulierten T-Zell-Kultur ergab, dass die E1a-spezifischen T-Zellen aus beiden Mäusen ausschliesslich V β 6 für ihren T-Zell-Rezeptor verwenden. Im Gegensatz dazu ergab die ⁵¹Cr-Freisetzung der mit E1b-stimulierten T-Zellen ein anderes Ergebnis: Während die T-Zell-Kulturen der Wild-Typ Mäuse wieder spezifisch die E1b-beladenen EL-4 Zielzellen lysieren konnten, waren die T-Zellen der LMP7 Knock-Out Kulturen nur sehr schwach in der Lage, eine spezifische Lyse der Zielzellen zu vermitteln (Abbildung 1 B)). Diese lag zwar eindeutig über dem Wert der Negativ-Kontrolle (keine Peptid-Beladung) aber auch erheblich unter dem Wert der Wild-Typ Mäuse. Da sich diese Beobachtung reproduzieren liess, war auf jeden Fall klar, dass E1b von Immunoproteasomen wahrscheinlich schlechter generiert wird und es dadurch in vivo zu deutlich schlechterem Priming gegen E1b kommt. Damit reiht sich diese Epitop in die lange Liste von MHC-Liganden ein, deren Generation

entweder abhängig oder unabhängig von Immunoproteasomen ist (Chapiro et al. 2006; Morel et al. 2000a; Schwarz et al. 2000; Sijts et al. 2000a; Sijts et al. 2000b; Van den Eynde and Morel 2001).

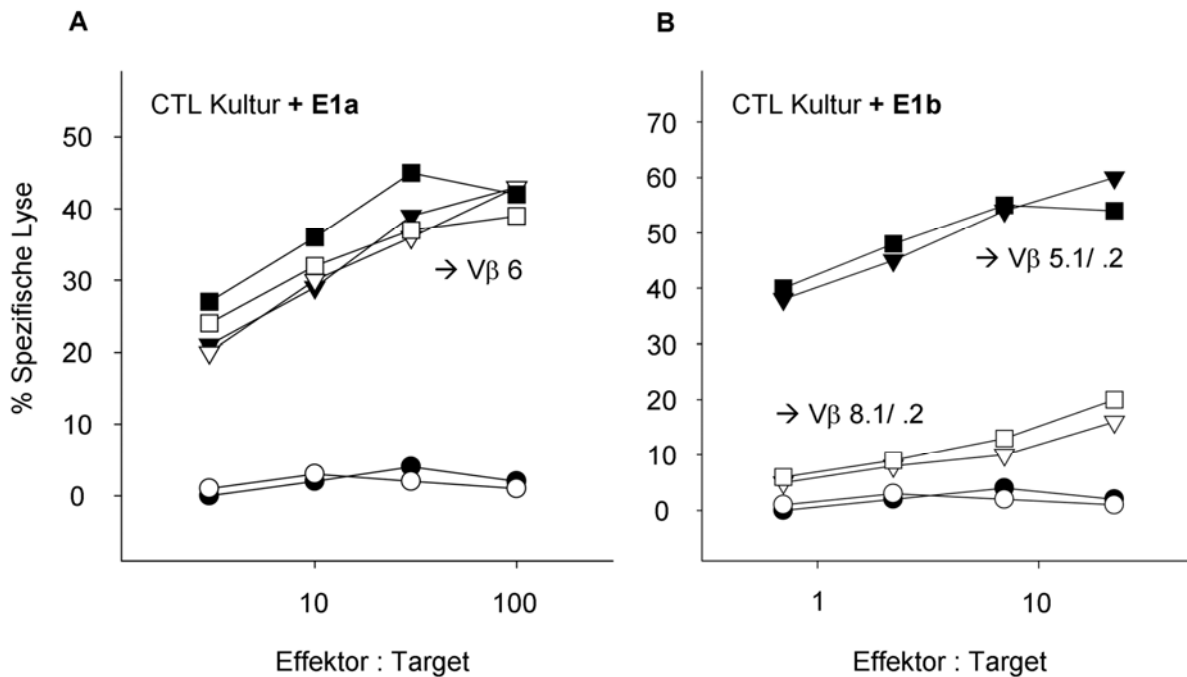


Abbildung 1. LMP7 Knock-Out Mäuse verwenden andere Vβ-Ketten für die E1b-spezifische Immunantwort als Wild-Typ Mäuse.

Immunisierung von B6 Wild-Typ Mäusen (●▲■) und LMP7 Knock-Out Mäusen (○△□) mit Adenovirus. 7 Tage später Entnahme der Milzen und Kultur mit

A) E1a oder **B)** E1b. Nach 7 und 14 Tagen Restimulation der T-Zellen und an Tag 21 Ernte für den ^{51}Cr -Freisetzungs-Assay. Parallel Färbung der CD8^+ T-Zell-Kulturen mit einem Panel von Antikörpern gegen die TCR Vβ-Ketten.

Symbole: Wild-Typ (schwarz), LMP7 Knock-Out (offen). Dreieck/ Quadrat: je 2 verschiedene Wild-Typ Mäuse (△ □) / LMP7 Knock-Out Mäuse (▲ ■) mit Peptid-beladenen Zielzellen; Kreis: Negativ-Kontrollen (● ○) mit Zielzellen ohne Peptidbeladung.

Die spannendere Beobachtung konnte jedoch gemacht werden, als auch hier die T-Zellen parallel zur ^{51}Cr -Freisetzung bzgl. der Verwendung Ihrer Vβ-Ketten untersucht wurden. In Wild-Typ CD8^+ T-Zellen wurde ausschliesslich Vβ 5.1 für den T-Zell Rezeptor verwendet, während die T-Zellen der LMP7 Knock-Out Mäuse Vβ 8.1 präferieren und Vβ 5.1 gar nicht verwenden (s. Abbildung 1 A) und 1 B)).

Die von Chen (Chen et al. 2001b) veröffentlichten Daten basierten auf Untersuchungen an LMP2 Knock-Out Mäusen im Influenza-Modell und zeigen für ein

Epitop (NP₃₆₆₋₃₇₄) ebenfalls eine T-Zell-Repertoire-Anomalie in den LMP2-defizienten Mäusen. Im Gegensatz zu Van Kaer (Van Kaer et al. 1994) konnten Chen et al. nämlich keinen Defekt in der Antigenpräsentation des Nukleoprotein-Epitops detektieren. Vielmehr wiesen sie nach, dass die Prozessierung des NP₃₆₆₋₃₇₄ aus PR 8 Nukleoprotein auf dem LMP2 Knock-Out Hintergrund prinzipiell gleich effizient erfolgt und die schlechtere T-Zell-Antwort gegen NP₃₆₆₋₃₇₄ in LMP2 Knock-Out Mäusen daher wahrscheinlich auf einen T-Zell-Repertoire-Defekt zurückzuführen ist. Diese Theorie passt insofern sehr gut in das Bild von LMP2 Knock-Out Mäusen, als dass diese ca. 20 % weniger CD8⁺ T-Zellen aufweisen (Van Kaer et al. 1994). Da funktionelle Immunoproteasomen durch Inkorporation von LMP7 und MECL-1 z.T. auch ohne LMP2 assemblieren können, liessen die Ergebnisse von Chen et al. im grossen und ganzen nur eine eher grobe Abschätzung über die Rolle von Immunoproteasomen bei der Generierung des T-Zell-Rezeptor-Repertoires zu. Aus diesen Gründen sollte in der vorliegenden Arbeit anhand von verschiedenen in vivo Modellen, in denen durch LMP7 Knock-Out die Bildung von Immunoproteasomen vollständig ausgeschlossen ist, die Frage nach dem Einfluss von Immunoproteasomen auf die T-Zell-Repertoire-Bildung eingehender beleuchtet werden.

3.2 Abhängigkeit der Cp1 α -Prozessierung von Immunoproteasomen

Da die positiv selektionierenden Peptide für den OT-1 T-Zell-Rezeptor bekannt waren (Santori et al. 2002), bot sich eine sehr elegante Möglichkeit, diese Fragestellungen mit in vivo Modellen zu untersuchen. In einem in vitro Verdau sollte deshalb anfänglich geklärt werden, ob die Prozessierung der positiv selektionierenden Peptide eventuell Immunoproteasom-abhängig ist. Wäre dies der Fall, könnte man mit einem einfachen in vivo Modell diverse Fragen bezüglich positiver Selektion und Beteiligung von Immunoproteasomen beantworten. Ein Vorläufer des Cp1 α -Peptids wurde mit aufgereinigten konstitutiven und Immunoproteasomen verdaut und die Verdauprodukte nach Auftrennung über HPLC mit Edmann-Abbau und Massenspektroskopie analysiert. Die diesbezüglich durchgeführten Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. Stefan Tenzer am Institut für Immunologie in Tübingen (Sequenz: LDPRNQISFKFDHLRKEADPQPE) mit 0,5 μ g

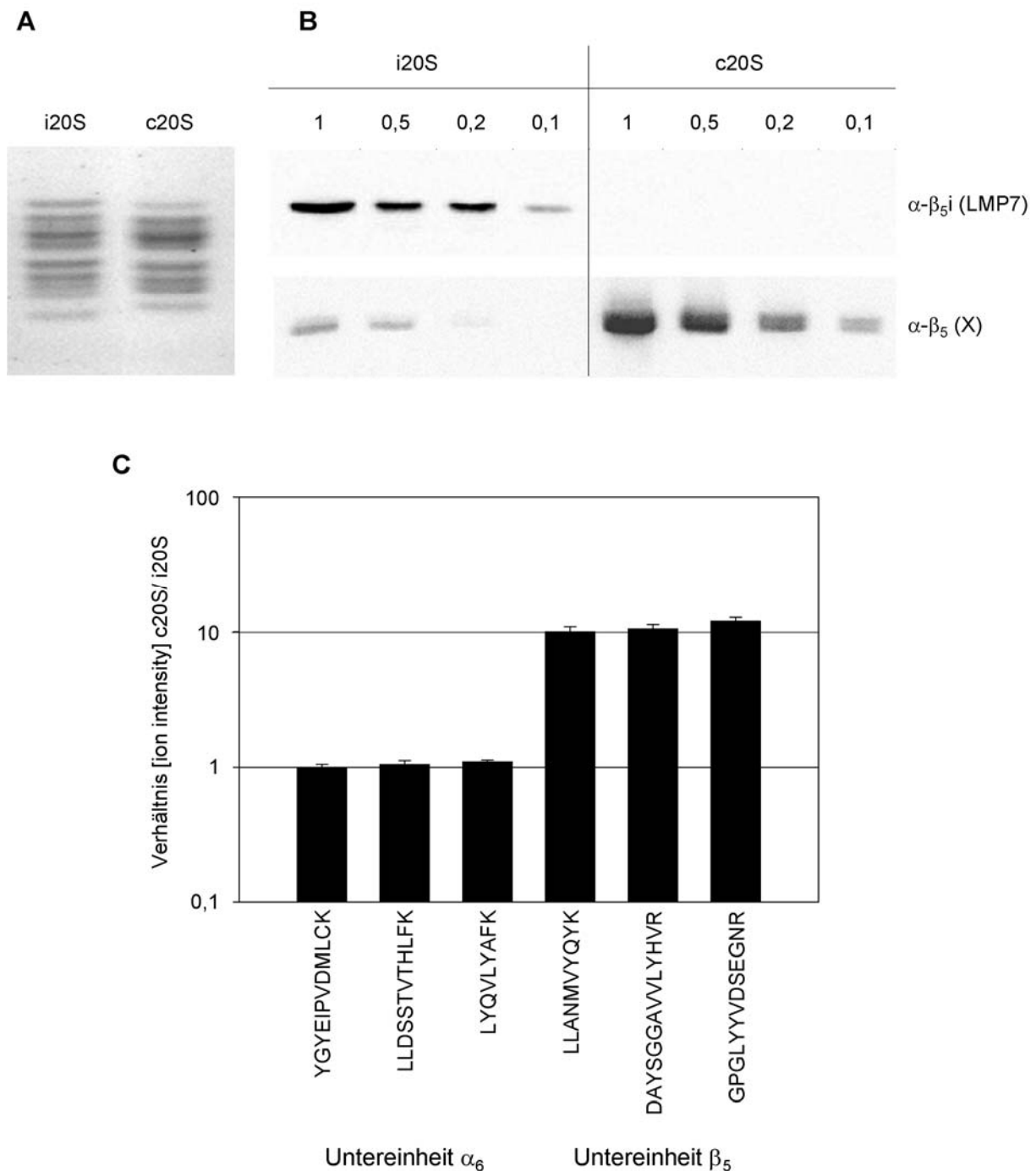


Abbildung 2. Quantifizierung der konstitutiven Proteasom-Untereinheit β_5 in Immuno- und konstitutiven Proteasomenpreparationen.

A) SDS-PAGE von 1 μ g i20S und c20S Proteasomen. **B)** Western Blot gegen die Proteasomen-Untereinheiten β_{5i} (LMP7) und β_5 (X). **C)** Quantifizierung von tryptischen Peptiden der α_6 und β_5 Untereinheiten durch LC-MS. Dargestellt sind die Verhältnisse der Ionen- Intensitäten für 3 tryptische Peptide der jeweiligen Untereinheit. Die Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

aufgereinigtem Proteasom durchgeführt. Für den Verdau wurden jeweils 10 nmol des Cp1 α -Vorläufers in Verdau puffer (20 mM HEPES-NaOH pH 7,6; 2 mM MgCl)

inkubiert. Nach 3, 6 und 18 Stunden wurde die Reaktion durch Zugabe von TFA zu einer Endkonzentration von 0,1 % (v/v) gestoppt und die Proben bis zur chromatographischen Auftrennung und weiteren Analyse mittels Reversed-Phase-HPLC bei -20°C gelagert. Die Reinheit der jeweiligen Proteasomenspezies wurde durch Western-Blots gegen jeweils eine konstitutive oder IFN- γ induzierbare Untereinheit und weitere massenspektroskopische Untersuchungen sichergestellt (Abbildung 2). Generell unterscheiden sich die konstitutiven und durch IFN- γ induzierten 20S Proteasomen eindeutig in ihren Schnittspezifitäten, wie inzwischen mehrere Veröffentlichungen zeigen konnten, die sich ausschliesslich der Aufdeckung von Schnittmotiven mit Hilfe von bis zu 25 AA langen Polypeptiden gewidmet haben (Tenzer et al. 2004a; Toes et al. 2001a). Leuzine, Isoleuzine und Phenylalanine werden vom i20S an P1 präferiert und kleine, polare Aminosäuren wie Serin und Threonin werden an P1' bevorzugt; beide Proteasomen Spezies bevorzugen Glyzin und Alanin an P1'. Vergleicht man die groben „Schnittregeln“ oder Schnittmotive, die aus den in vitro Verdaus mit den zwei verschiedenen Substraten Hefe-Enolase (Dissertation Dr. Alexander Nussbaum, Universität Tübingen 1999) und Prion-Protein (Dissertation Dr. Stefan Tenzer, Universität Tübingen 2004) abzulesen sind, wird offensichtlich, dass auch das Substrat selber einen relativen Einfluss auf die beobachteten Schnittspezifitäten haben kann, da nicht alle Schnittmotive der c20S und i20S Proteasomen für alle Substrate gleich eindeutig gelten. Ausserdem konnte beispielsweise für den Verdau den Prion-Proteins zusätzlich ein höherer Umsatz des Substrates durch Immunoproteasomen bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen beobachtet werden. Dieser Effekt kann sowohl Substratspezifisch sein als auch auf eine erhöhte katalytische Aktivität des Immunoproteasomes hindeuten.

Abbildung 2. zeigt eindeutig, dass die beiden Präparationen rein und zu weniger als 10% mit der jeweils anderen Proteasomenspezies kontaminiert waren. Die durch automatische Peakfraktionierung gewonnenen HPLC Fraktionen von maximal 500 μ l werden gesammelt und anschliessend bei Raumtemperatur in einer Speed-Vac getrocknet, in 50 % Methanol/ 1 % Ameisensäure gelöst und anschliessend mittels Edmann-Sequenzierung analysiert. Die Auswertung der Sequenzierungen ist in

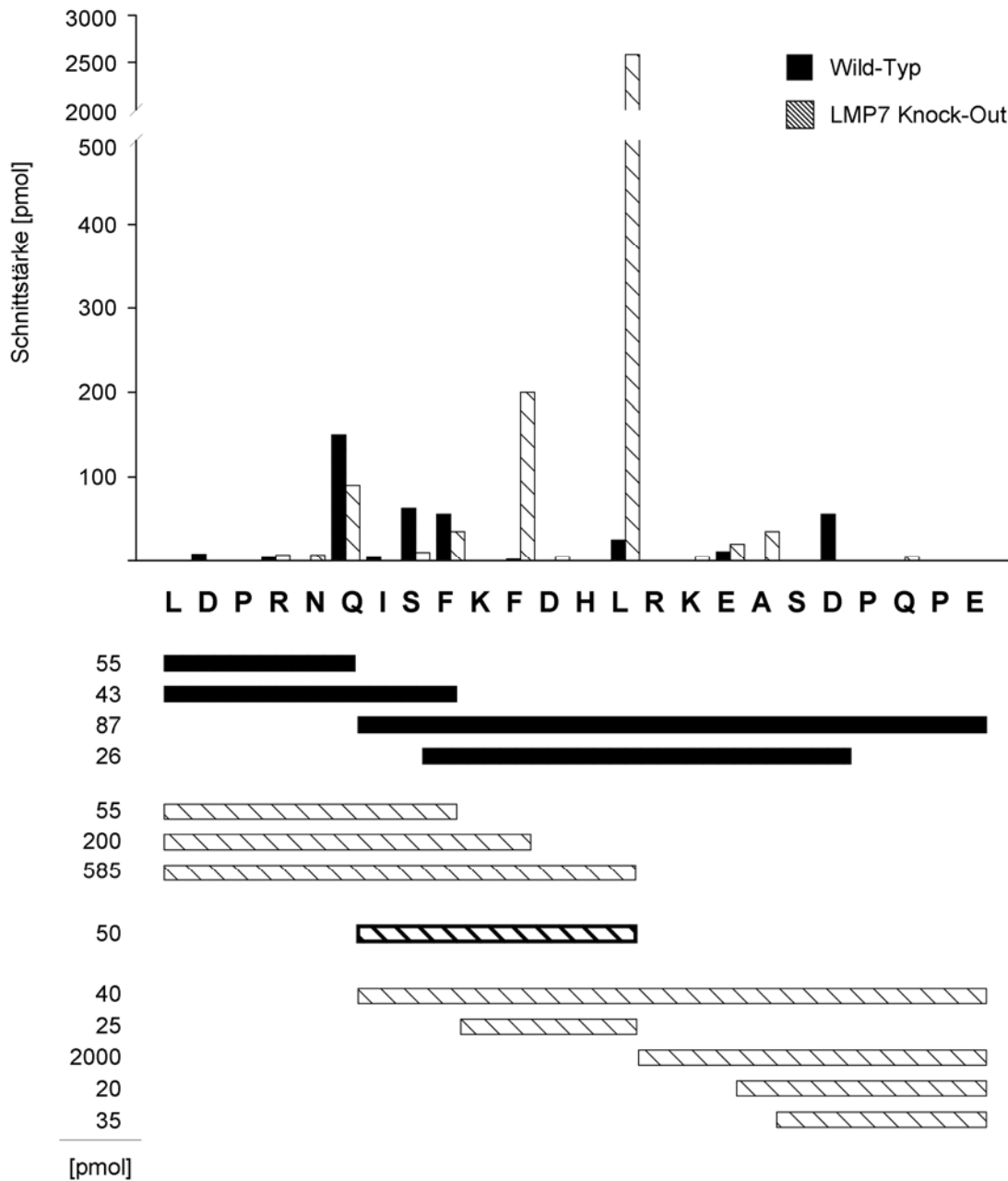


Abbildung 3. Das Peptid, das für die positive Selektion des OT-1 T-Zell-Rezeptors verantwortlich ist, kann nur durch Immunoproteasomen prozessiert werden.

Inkubation von 10 Nanomol des Cp1 α -Vorläufers (LDPRNQISFKFDHLRKEASDPQPE) für 6 Stunden mit 2 μ g aufgereinigten konstitutiven Proteasomen (schwarze Balken) bzw. Immuno-Proteasomen (gestreifte Balken). Auftrennung der Peptid-Fragmente auf einer Reversed-Phase-HPLC und Analyse der gesammelten Fraktionen mittels Edman-Abbau und MALDI-MS. Dargestellt sind detektierte und quantifizierte Fragmente > 25 Picomol beider Proteasomen-Verdaus. Das positiv selektionierende Peptid ist hervorgehoben.

Abbildung 3 graphisch dargestellt, wobei nur solche Fragmente aufgeführt sind, die mehr als 25 pmol repräsentieren. Man kann klar erkennen, dass das konstitutive Proteasom weder den relevanten C-terminalen Schnitt nach dem Leucin an Position 14 des Cp1 α -Vorläufers durchführt noch das Peptid an sich aus dem Vorläufer freisetzen kann. Im Gegensatz hierzu stellt der Schnitt nach dem Leucin an Position 14 mit 2000 pmol den stärksten Schnitt des Immunoproteasoms dar. Ausserdem konnte als direktes in vitro Verdauprodukt das Cp1 α -Peptid nachgewiesen werden (fett hinterlegt), welches für die positive Selektion des OT-1 T-Zell-Rezeptors verantwortlich ist. Diese Daten zeigen somit eindeutig, dass die Prozessierung des Peptids, zumindest in vitro, Immunoproteasom-abhängig ist. Aufgrund dieser vielversprechenden Daten wurde das geplante in vivo Modell realisiert und eine Zucht von LMP7 Knock-Out Mäusen mit OT-1 Mäusen begonnen. Ziel war es, den sehr gut charakterisierten T-Zell-Rezeptor, für den positiv selektionierende Peptide bekannt waren auf einen Hintergrund zu züchten, der Immunoproteasom-defizient ist. Wenn die in vitro Verdau Daten auch in vivo Relevanz haben, sollte in LMP7 Knock-Out Mäusen das Cp1 α -Peptid aus dem F-Actin Capping Protein (Subunit α_{192-99}) ebenfalls nicht mehr prozessiert werden können. Somit wäre es möglich, dass das Fehlen des Cp1 α -Peptids auf dem OT-1 Hintergrund eine veränderte positive Selektion nach sich zieht.

3.3 *Veränderte T-Zell-Selektion des OT-1 T-Zell-Rezeptors auf LMP7 Knock-Out Hintergrund*

Um diese Theorie zu überprüfen, wurden LMP7 Knock-Out Mäuse (129/ ola Hintergrund) mit OT-1 Mäusen (B6 Hintergrund) verpaart (Abbildung 4). Die für beide Merkmale heterozygoten Tiere der F1-Generation werden erneut verpaart und sollten laut Mendel zu einem Viertel homozygote OT-1/ LMP7 Knock-Out Mäuse ergeben. Die Transgenität bezüglich des OT-1 T-Zell-Rezeptors wird mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS) nach Antikörperbindung an CD8 und V α 2 bzw. V β 5.1 überprüft. OT-1 transgene CD8+ T-Zellen verwenden für ihren T-Zell-Rezeptor die Ketten V α 2 und V β 5.1 (Hogquist et al. 1994b) und sind über diese Marker leicht nachweisbar. Defizienz bezüglich LMP7 wird in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) getestet, in der sequenzspezifische Primer einen ca. 280 bp langen Abschnitt im Gen für die Neomycinresistenz in den LMP7 Knock-Out Mäusen amplifizieren.

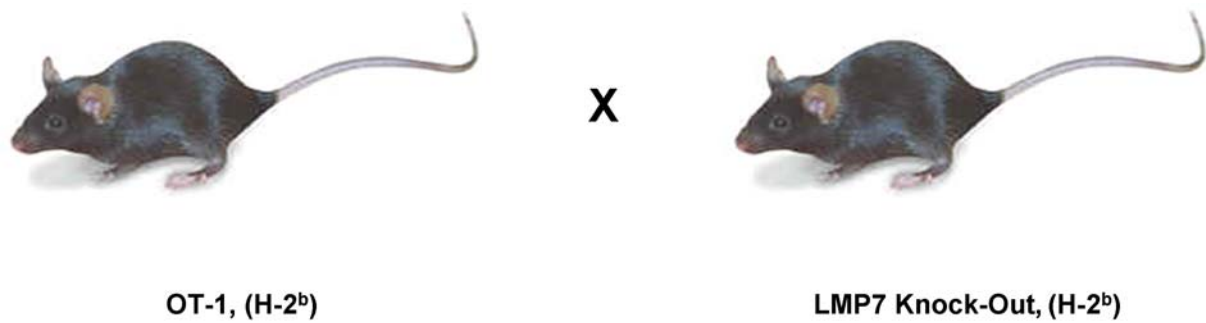


Abbildung 4. Maus-Modell für die Untersuchung der Positiven Selektion auf LMP7 Knock-Out Hintergrund. Quelle der Mausfotos: www.aceanimals.com; die Fotos stellen nur exemplarisch und zu Anschauungszwecken 2 verschiedene Mausstämme dar (sind aber identisch).

Zusätzlich werden die Mäuse mit LMP7-spezifischen Primern auf die Präsenz des LMP7 Gens getestet. Wild-Typ Mäuse sollten daher in der „WT“-PCR eine Bande zeigen (ca. 550bp), nicht aber in der „Neo“-PCR, LMP7-heterozygote Tiere sollten in beiden PCR-Ansätzen spezifische Banden zeigen, da sie ja die genetischen Informationen für sowohl LMP7 als auch die Neomycinresistenz tragen. LMP7 Knock-Out Mäuse ergeben in den beiden Ansätzen lediglich eine Bande bei der „Neo“-PCR. Das PCR-Programm zum Nachweis der beiden relevanten Erbinformationen ist ein Standardprogramm, dass aus den folgenden Elementen aufgebaut ist:

5 Minuten	95°C (Aufspaltung der DNA-Matrize)
30 Sekunden	95°C (Aufschmelzen der DNA-Stränge)
30 Sekunden	58°C (Hybridisieren der Primer an die Einzelstränge)
60 Sekunden	72°C (Verlängerung der Primer durch die Polymerase)
10 Minuten	72°C (Beenden der Kettenreaktion)

Die Zyklen 2 bis 4 werden 35 x wiederholt und die relevante DNA-Information auf diese Weise amplifiziert. Nach der PCR werden die Ansätze mit DNA-Ladepuffer versetzt, in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Produkte mittels eines DNA-Markers auf ihre Länge überprüft. Abbildung 5 zeigt exemplarisch,

welche Bandenmuster man in den jeweiligen PCR's erwarten kann. Als Kontrolle wird DNA

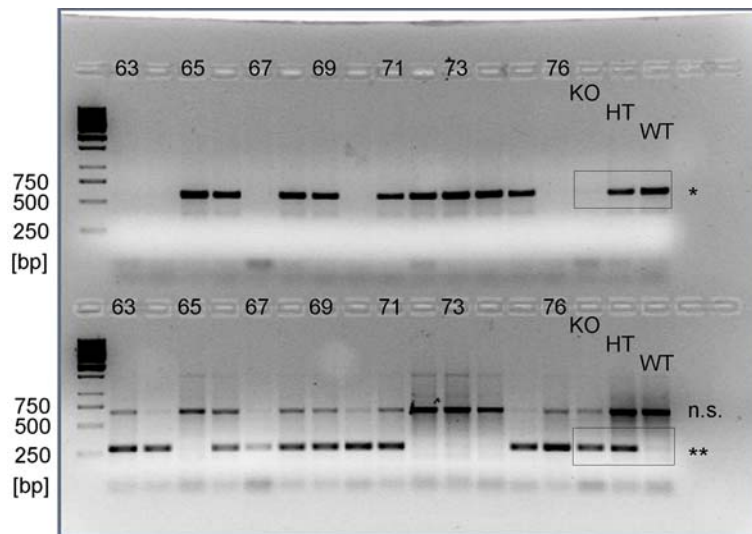


Abbildung 5. Typisierungs-PCR der OT-1 x LMP7 Knock-Out/ LMP7 Wild-Typ Zucht.

Die Nummern 63 bis 76 bezeichnen exemplarisch 14 Tiere, die typisiert wurden. „KO“, „HT“ und „WT“ sind die jeweiligen Knock-Out-, Heterozygot- und Wild-Typ-Kontrollen. In den oberen Taschen ist die PCR mit Wild-Typ-Primern für die Amplifikation der genetische Information innerhalb des LMP7 Gens aufgetragen, in den unteren Taschen die PCR mit den Primern für die Neomycin-Resistenz.

* zeigt das ca. 550 bp grosse Amplifikat innerhalb des LMP7 Gens, ** zeigt das ca. 270 bp grossen Amplifikat innerhalb der Neomycin-Resistenz, „n.s.“: unspezifische Bande.

aus Wild-Typ Mäusen, aus F1-Tieren (definiert heterozygot) und LMP7 Knock-Out Tieren eingesetzt, um den korrekten Verlauf der Amplifikation zu überprüfen. In der vorliegenden PCR-Typisierung tragen z.B. die Mäuse 63, 64, 67, 70 und 76 den LMP7 Knock-Out, da in der PCR zwar die Information innerhalb der Neomycin-Resistenz, nicht aber die des LMP7 Proteins amplifiziert werden konnte. Da die OT-1 Mäuse nicht nachprüfbar homozygot für den T-Zell-Rezeptor sind (zumindest nicht im FACS), traten selbst in späteren Generationen immer wieder Mäuse auf, die im FACS negativ für den Rezeptor waren. Es wurden also sämtliche Mäuse der Zucht immer sowohl durchflusszytometrisch auf die $V\alpha 2$ bzw. $V\beta 5.1$ Expression, als auch per PCR auf den LMP7 Genlocus untersucht. Die Gewinnung der Lymphozyten erfolgte praktischerweise nach Punktieren der Schwanzvenen aus Blut. Tabelle 1 zeigt exemplarisch die Typisierung von etwa 20 Tieren aus beiden Zuchten. Man erkennt sofort, dass in den Tieren, die den OT-1 T-Zell-Rezeptor auf dem LMP7 Knock-Out Hintergrund tragen, fast 50 % weniger transgene T-Zellen im Blut

zirkulieren. Die FACS Dot-Blots in Abbildung 6 zeigen exemplarisch die Typisierung der Zuchten. Dieselben Werte ergeben sich, wenn man die Milzen und Lymphknoten

7WT x OT-I	% CD8	% CD4	7KO x OT-I	% CD8	% CD4
598	47,6	3,2	571	28,5	2,5
602	47,7	2,5	572	28,4	1,4
609	42,8	4,9	574	27,3	0,7
611	49,1	2,9	576	26,5	2,5
612	55,4	2,7	577	32,5	1
613	34,9	3,3	578	27,2	1,2
614	56,1	2,3	579	31,6	0,8
616	43	2,3	581	20,7	2,4
619	43,4	3,3	582	18,6	1,6
631	46,5	4,2	585	21,8	1,3
632	39,2	2,9	586	17,7	3,1
634	43,9	3,3	588	27,5	1,1
635	35	1,5	589	16,2	0,7
636	35,4	1,4	590	34,9	3
637	30,7	1,4	591	22,7	1,9
638	34,4	0,5	592	16,6	1
639	41	2,8	593	19,4	1,3
640	24,5	1,4	594	22,6	2,9
641	32,5	1,8	595	28	2,6
643	32,7	1,4	621	25,5	2,9
645	32,9	2,2	622	16,7	0,7
646	33	2,3	624	28,4	0,9
Mittel (n=22)	40,1	2,5	Mittel (n=22)	24,5	1,7
Std. Abw.	8,2	1	Std. Abw.	5,5	0,9

Tabelle 1. Lymphozyten-Typisierung (Blut) der OT-1 x LMP7 Knock-Out/ LMP7 Wild-Typ Zucht.

Exemplarische Übersicht von jeweils 22 Mäusen.

der Tiere untersucht (Daten nicht gezeigt). In der Peripherie der Tiere auf LMP7 Knock-Out Hintergrund liegen also im Vergleich zu Wild-Typ Kontrollen erheblich reduzierte Zahlen von sowohl CD8⁺ T-Zellen generell und auch transgenen T-Zellen vor. Ist diese beträchtliche Abweichung in den Mäusen mit LMP7 Knock-Out Hintergrund bereits im Thymus, dem Organ der T-Zell-Reifung, nachweisbar? Die Antwort ist der Abbildung 7 zu entnehmen und lautet: eindeutig ja. Untersucht man die Thymi der beiden Mausstämme, so stellt man auch im Organ der T-Zell-

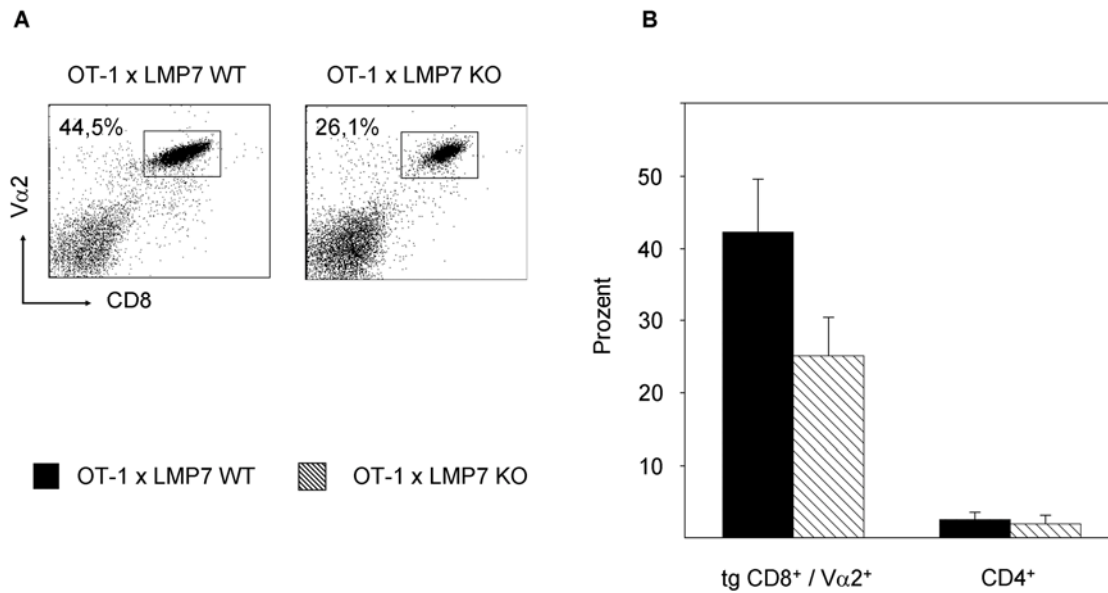


Abbildung 6. Lymphozyten-Typisierung (Blut) der OT-1 x LMP7 Knock-Out/ LMP7 Wild-Typ Zucht.

A) Exemplarischer FACS Dot-Blot der Vα2⁺ / CD8⁺ doppelt-positiven peripheren Lymphozyten (Blut). **B)** Graphische Zusammenfassung der transgenen Vα2⁺ / CD8⁺ und der CD4⁺ T-Zell-Population (Blut). Wild-Typ (schwarze Balken), LMP7 Knock-Out (schraffierte Balken).

Differenzierung in den LMP7 Knock-Out Mäusen von der Wild-Typ Kontrolle abweichende Zahlen für die CD8⁺ T-Zell-Population fest. Die FACS-Färbung gegen CD4 und CD8 ergibt etwa gleich viele CD4⁺ / CD8⁺ Doppeltpositive (Daten nicht gezeigt) aber erheblich weniger CD8⁺ Einzelpositive oder transgene CD8⁺ / Vα2⁺ T-Zellen in den LMP7 Knock-Out Thymi. Da die Einzelpositiven CD8⁺ T-Zellen diejenigen T-Zellen sind, die ihren Rezeptor fertig und konstruktiv umgelagert haben und als naive T-Zellen kurz vor dem Export in die Peripherie stehen, ist der erhebliche niedrigere Prozentsatz in den Tieren mit LMP7 Hintergrund ein starkes Indiz dafür, dass der Selektionsprozess der OT-1 T-Zellen durch die Abwesenheit von LMP7 stark verändert ist.

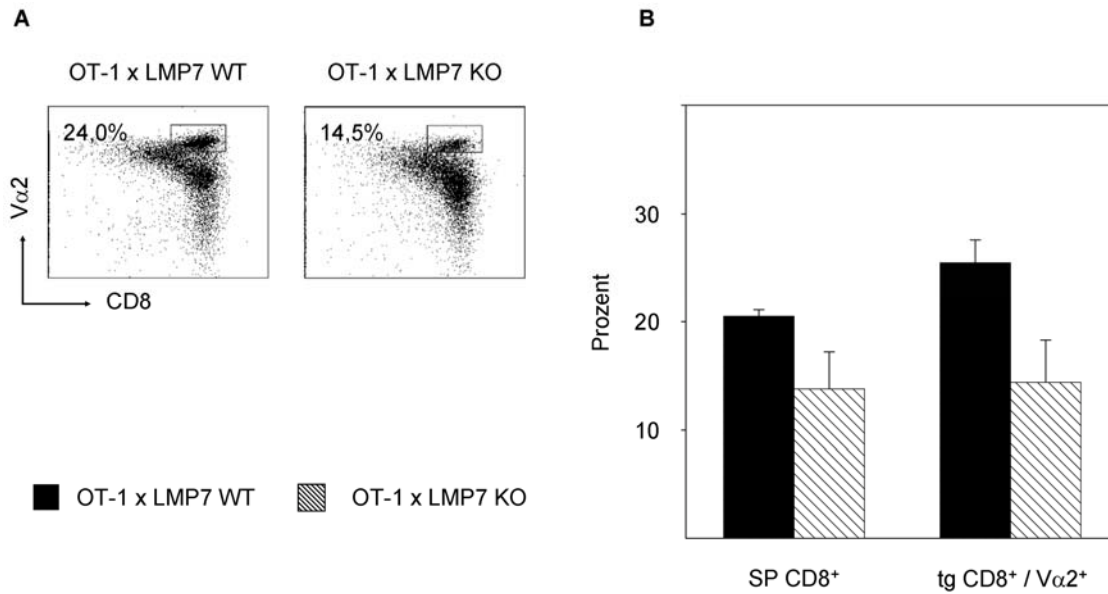


Abbildung 7. Lymphozyten-Typisierung (Thymus) der OT-1 x LMP7 Knock-Out/ LMP7 Wild-Typ Zucht.

A) Exemplarischer FACS Dot-Blot der V α 2⁺/ CD8⁺ doppelt-positiven Lymphozyten im Thymus.
B) Graphische Zusammenfassung der einzel-positiven CD8⁺ T-Zellen und der transgenen V α 2⁺/ CD8⁺ T-Zell-Population im Thymus. Wild-Typ (schwarze Balken), LMP7 Knock-Out (schraffierte Balken).

3.4 Charakterisierung der LMP7 Knock-Out/ OT-1 und LMP7 WT/ OT-1 T-Zellen

Nachdem der Prozentsatz der transgenen OT-1 T-Zellen in den LMP7 defizienten Mäusen dramatisch niedriger ist als in den Wild-Typ Kontrolltieren, sollte im folgenden geklärt werden, dass die T-Zellen auf LMP7 Knock-Out Hintergrund nicht generell eine funktionelle Abnomalie aufweisen und sich von den „normalen“ OT-1 T-Zellen unterscheiden. Hierzu wurden die Milzen und Lymphknoten von LMP7 Knock-Out/ OT1 und LMP7 Wild-Typ/ OT-1 Tieren entnommen und zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet. Mit den Milzzellen wurden im wesentlichen drei Funktionstests durchgeführt.

3.4.1 Proliferation

Erstens werden die Zellen in einem in vitro Proliferationsassay eingesetzt, der die ^3H Thymidin-Inkorporation der T-Zellen nach in vitro Stimulation mit SIINFEKL misst. Die Milzen werden mit gegen CD8 spezifischen Antikörpern versetzt, die an magnetische Beads gekoppelt sind. Nach 30 Minuten Inkubation und ausgiebigen Waschschritten werden die Beads resuspendiert und über kleine Säulchen gegeben, die in einem magnetischen Feld positioniert sind. Nach dem Auftragen der Suspension und Auffangen des Durchlaufes wird wieder ausgiebig gewaschen und schliesslich eluiert. Die CD8⁺ T-Zellen sind nun zu ca. 85 % bis 90 % rein (Daten nicht gezeigt) und können direkt für die Versuche eingesetzt werden. $2 \cdot 10^4$ angereinigte T-Zellen werden dabei in Triplikaten in die wells einer 96-Well Platte pipettiert. Als antigenpräsentierende Zellen wird der Durchlauf der MACS-Aufreinigung verwendet, der ja im wesentlichen die in der Milz vorliegenden B-Zellen beinhaltet. Der Durchlauf wird gezählt und mit unterschiedlichen SIINFEKL Konzentrationen für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit verdrängen die SIINFEKL Moleküle die endogenen MHC-Klasse I Peptide und ersetzen diese konzentrationsabhängig auf der Zelloberfläche. Nach einer Stunde wird freies Peptid durch Wasch- und Zentrifugationsschritte entfernt und die Zellen danach mit 3 Gray bestrahlt, damit sie im Proliferationsassay lediglich als APC's fungieren und durch ^3H Thymidin Inkorporation nicht das Proliferationsergebnis verfälschen. Nach dem Bestrahlen werden die „Feeder“ für den ^3H -Thymidin-Inkorporationsassay nochmals gezählt und $8 \cdot 10^4$ Zellen zu den jeweils $2 \cdot 10^4$ T-Zellen pro Well gegeben. 48 Stunden nach Ansatz der in vitro Kulturen werden die 96-Well Platten mit 0,5 μCi pro Well für 16 bis 20 Stunden versetzt und am nächsten Tag geerntet. Die Zellen und Überstände werden durch Anlegen eines Vakuums auf einen Glasfaserfilter gesogen, auf dem die fest-eingebaute Radioaktivität haften bleibt, während unverbrauchtes, lösliches ^3H -Thymidin vom Filter in den radioaktiven Abfall gewaschen wird. Nach Trocknen des Filters und Zugabe von Szintillationsflüssigkeit kann jeder Filter ausgelesen werden, da die schwach-radioaktive β -Strahlung durch den Szintillator in messbare Lichtsignale umgewandelt wird. Exemplarisch ist in Abbildung 8 die Proliferation der T-Zellen an Tag 2 von je 2 Mäusen beider Stämme gezeigt. Man sieht, dass erstens die ^3H -Thymidin Inkorporation in etwa vergleichbar ist, d.h. ähnliche Mengen des Radionuklids aufgenommen wurden und zweitens

auch die Titration des Antigens SIINFEKL von 0,01 nM nach 1 μ M zu einer sehr ähnlichen Proliferation führt. Somit unterscheiden sich die beiden Mausstämme bzgl. der ^3H -Thymidin Inkorporation nicht.

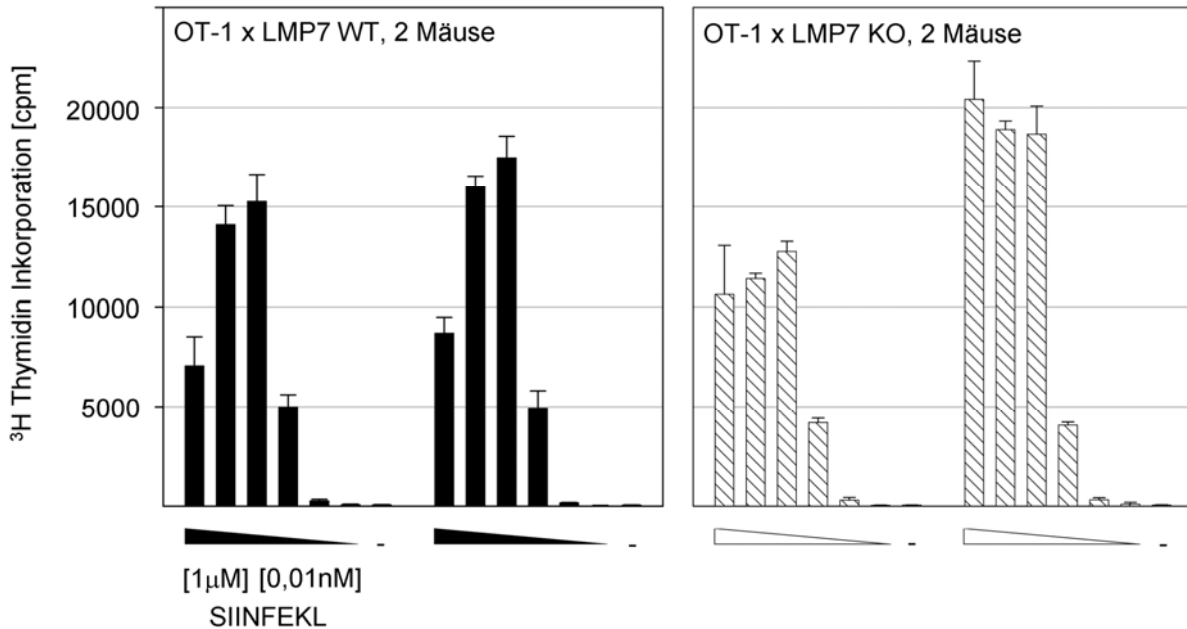


Abbildung 8. Charakterisierung der transgenen CD8^+ T-Zellen der OT-1 x LMP7 Knock-Out/ LMP7 Wild-Typ Zucht. Proliferations-Assay (^3H -Thymidin Inkorporation).

A) OT-1 T-Zellen mit LMP7 Wild-Typ Hintergrund, 2 Mäuse **B)** OT-1 T-Zellen mit LMP7 Knock-Out Hintergrund, 2 Mäuse. Kultur von $8 \cdot 10^4$ über MACS aufgereinigten T-Zellen mit $2 \cdot 10^4$ Poly I:C stimulierten BMDCs, die mit verschiedenen SIINFEKL-Konzentrationen (1 μM , 100 nM, 10 nM, 1 nM, 0,1 nM, 0,01 nM, kein Peptid) beladen wurden.

3.4.2 Spezifische Lyse von Zielzellen

Eine weitere Effektorfunktion, die zu untersuchen war, ist die spezifische Lyse von Peptidbeladenen Zielzellen in einem ^{51}Cr -Freisetzungssassay. Hierzu werden die Milzen der Tiere wieder zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet und in 24 Well Platten mit bestrahlten und SIINFEKL-beladenen Feeder-Zellen kultiviert. Nach drei Tagen (oder nach fünf Tagen, wenn die Zellen nach drei Tagen noch nicht „gut“ aussehen, Ermessen des Experimentators) werden die Zellen aus den Wells geerntet und gezählt. Die grossen, unförmigen Zellen in der Kultur sind die restimulierten T-Zellen, die nun optimal aktiviert sein sollten. Man hält in dem ^{51}Cr -Freisetzungssassay die

Anzahl der Zielzellen konstant bei $1 \cdot 10^4$ und variiert die Anzahl der hinzugegebenen spezifischen T-Zellen, die man auf ihre lytischen Eigenschaften analysieren möchte. So ergibt sich eine Titration des „E:T“, Effektor zu Target (= Zielzell) Verhältnis über einen gewissen Bereich, meist etwa zwei Logstufen. Die Zielzellen sind vor Zugabe der kultivierten T-Zellen mit 51 Natrium-Chromat inkubiert und markiert worden, wobei die eine Population der Zielzellen zusätzlich mit SIINFEKL beladen wurde, während die andere Population als Negativkontrolle nicht oder mit einem irrelevanten Peptid gepulst wurde. Peptid-spezifische T-Zellen erkennen dann ihr Antigen und lysieren die Zielzellen aufgrund ihrer vorherigen drei- bis fünftägigen Aktivierung *in vitro*. Die Perforin-vermittelte Porenbildung führt zur Freisetzung des vorher aufgenommenen 51 Chromats aus den Zielzellen und sammelt sich im Überstand abhängig vom Grad der Lyse bzw. abhängig von der Aktivität der T-Zellen an.

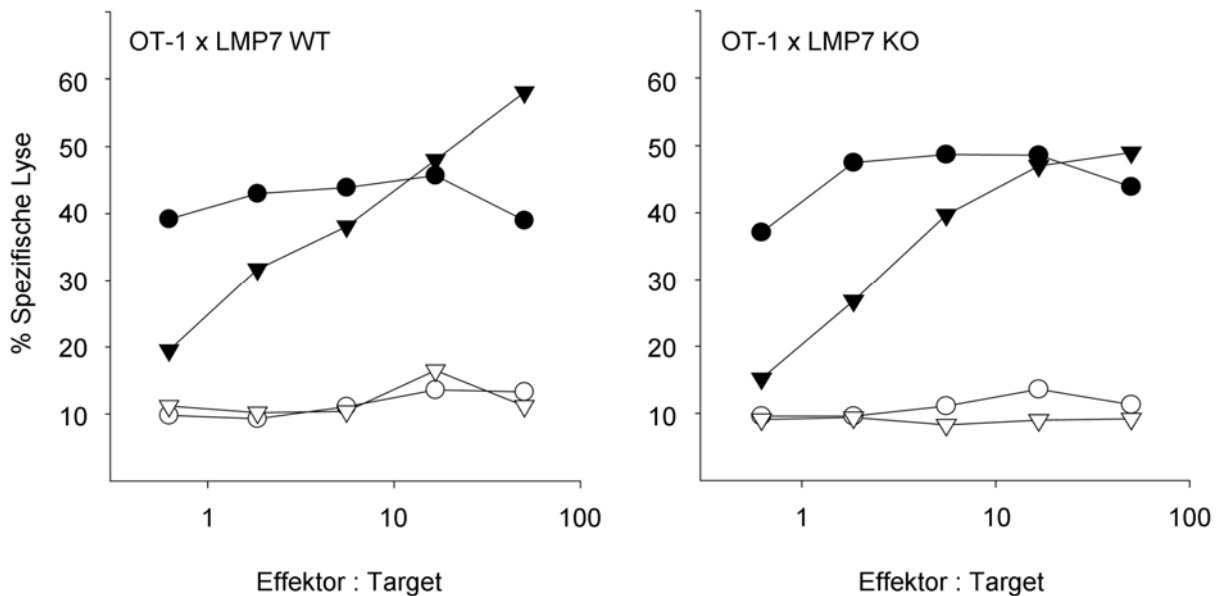


Abbildung 9. Charakterisierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen der OT-1 x LMP7 Knock-Out/ LMP7 Wild-Typ Zucht, 51 Cr-Freisetzungs-Assay.

A) OT-1 T-Zellen mit LMP7 Wild-Typ Hintergrund, 2 Mäuse **B)** OT-1 T-Zellen mit LMP7 Knock-Out Hintergrund, 2 Mäuse. Kreise und Dreiecke stellen je zwei verschiedene Mäuse pro Gruppe dar. Gefüllten Symbole: Spezifische Lyse von Zielzellen mit Peptidbeladung, offene Symbole: Kontroll-Lyse von Zielzellen ohne Peptidbeladung. Kultur der Milzen mit 50 nM SIINFEKL nach Prozessierung zu Einzelzellsuspensionen. 51 Cr-Freisetzungs-Assay an Tag 3.

Wie in Abbildung 9 exemplarisch für je zwei Mäuse pro Stamm gezeigt, verhalten sich auch hier die OT-1 T-Zellen auf beiden Hintergründen bzgl. der spezifischen

Lyse von SIINFEKL-beladenen Zielzellen gleich. Sowohl die maximale Lyse als auch die Lyse auf den einzelnen Titrationsstufen ist vergleichbar und es gibt keinerlei Anhaltspunkt, dass die T-Zellen auf LMP7 Hintergrund ihre Zielzellen schlechter lysieren können. Als Negativkontrolle sind jeweils die Spontan-Lysen von Peptid-unbeladenen Zielzellen beider Mäuse dargestellt (offene Symbole).

3.4.3 Intrazelluläre IFN- γ Produktion

Die letzte Effektorfunktion, auf die die OT-1 T-Zellen auf LMP7 Wild-Typ bzw. Knock-Out Hintergrund hin untersucht werden sollen ist die Sekretion von Interferon- γ . Dieses Zytokin ist neben Perforin und Granzym eines der zentralen löslichen Mediatoren, welches zytotoxische T-Zellen sekretieren, wenn sie aktiviert werden. IFN- γ inhibiert beispielsweise direkt die virale Replikation im Falle einer Virusinfektion und induziert ausserdem die Expression von MHC Klasse I und anderen Molekülen, die an der Prozessierung von Klasse I Liganden und der Beladung von Klasse I Molekülen beteiligt sind. Dadurch wird die Chance erhöht, dass infizierte Zellen als Ziel von CTL's erkannt werden. Ausserdem aktiviert IFN- γ Makrophagen und rekrutiert diese sowohl als Effektorzellen als auch als antigenpräsentierende Zellen an den Ort der Sekretion. Für die Untersuchung der Zellen auf Interferon- γ Sekretion werden sie genau gleich behandelt wie für einen ^{51}Cr -Freisetzungssassay, d.h. es wird in vitro eine Standard T-Zell-Kultur angesetzt und an Tag drei bis fünf geerntet. Parallel zu dem Test auf spezifische Lyse werden einige Zellen (Wells) vier bis sechs Stunden mit und ohne SIINFEKL aber in beiden Fällen in Anwesenheit von Brefeldin A restimuliert. Das Brefeldin A verhindert die Abschnürung von Vesikeln aus dem Golgi-Apparat, so dass sämtliche für die Sekretion bestimmten Proteine/ Zytokine in der Zelle zurückgehalten werden. Nach sechs Stunden Inkubation mit Brefeldin A und Peptid sind die Effektorzytokine innerhalb der Zelle so akkumuliert, dass diese mit spezifischen Antikörpern anfärbbar und im FACS nachweisbar sind. Für die FACS Färbung werden die Zellen geerntet und zuerst in FACS Puffer gewaschen. Zuerst werden die Oberflächenmoleküle CD8 sowie die Aktivierungsmarker CD25, CD44 und CD62L angefärbt. Da die T-Zellen vor der Kultur mit CFSE markiert worden sind, kann man durch Verfolgung der CFSE Verdünnung zusätzlich noch die Proliferation abschätzen. Nach Anfärbung der Oberflächenmarker wird die Zellmembran mit einem speziellen Puffer (Intracellular Staining Kit, BD) durchlöchert

und werden die Zellen im selben Arbeitsschritt fixiert. Danach werden die Zellen ausgiebig gewaschen und anschliessend mit dem Antikörper gegen (das intrazellulär vorliegende) Interferon- γ inkubiert. Dieser gelangt durch die Poren in das Innere der Zellen und kann dort spezifisch das akkumulierte IFN- γ anfärben. Als Negativkontrolle für die Färbung dient derselbe Ansatz von Zellen mit Brefeldin A, jedoch ohne die Addition von Peptid. Jegliches Interferon- γ , das in diesem Ansatz detektiert wird, wird als Hintergrund Produktion des Zytokins betrachtet. Letztendlich werden die Zellen wieder in FACS-Puffer aufgenommen und können durchflusszytometrisch untersucht werden.

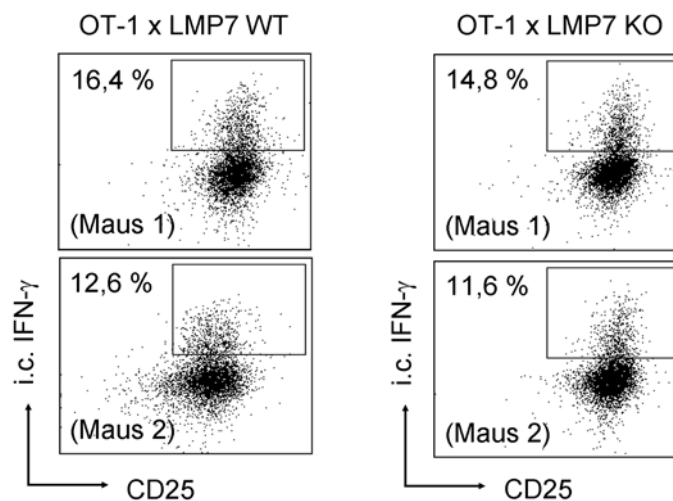


Abbildung 10. Charakterisierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen der OT-1 x LMP7 Knock-Out/ LMP7 Wild-Typ Zucht, intrazelluläre IFN- γ Färbung.

A) OT-1 T-Zellen mit LMP7 Wild-Typ Hintergrund, 2 Mäuse. **B)** OT-1 T-Zellen mit LMP7 Knock-Out Hintergrund, 2 Mäuse. Kultur der prozessierten Milzen mit 50 nM SIINFEKL. Die intrazelluläre IFN- γ Färbung erfolgt an Tag 3 parallel zum ⁵¹Cr-Freisetzungs-Assay.

In Abbildung 10 sind diejenigen Zellen gezeigt, die auf die Eigenschaften CFSE^{lo} und CD8⁺ eingegrenzt („Gate“) sind. Man erkennt wieder eindeutig, dass sich die T-Zellen aus beiden Mausstämmen gleich verhalten und in etwa gleiche Prozentsätze an IFN- γ / CD25 doppelt-positiven Zellen aufweisen. Die leichten Schwankungen, die in allen drei Untersuchungen (³H-Thymidin, ⁵¹Cr-Freisetzung, i.c. IFN- γ) innerhalb der Gruppen auftreten, sind wohl damit zu erklären, dass es sich eben letztendlich um

Zellen aus verschiedenen Mäusen handelt und diese natürlich leicht unterschiedlich in den jeweiligen Assays reagieren.

Durch die Tests konnte zusammenfassend geklärt werden, dass sich die OT-1 T-Zellen auf LMP7 Knock-Out Hintergrund in ihren Effektorfunktionen nicht von denen des LMP7 Wild-Typ Hintergrunds unterscheiden.

3.5 OT-1 Knochenmark-Transfer in bestrahlte LMP7 Knock-Out Mäuse

Um die Daten aus der Zucht in einem zweiten in vivo Modell zu bestätigen und auszuweiten, wurde nach weiteren Möglichkeiten gesucht, die Fragestellung nach der Rolle von LMP7 in der Entwicklung von OT-1 T-Zellen zu untersuchen. Als geschicktes zweites Modell wurde schliesslich ein Knochenmarkstransfer gewählt, für den syngenes OT-1 Knochenmark in lethal bestrahlte (B6) Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Tiere transferiert wird (Abbildung 11).



Abbildung 11. Modell des Knochenmark-Transfers von OT-1 Tieren in Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Rezipienten.

Durch die Bestrahlung verlieren die Empfängertiere alle strahlungssensitiven (hämatopoetischen) Zellen, während z.B. die Zellen des Kortex-Epitheliums erhalten bleiben, weil sie strahlungsresistent sind. Das intravenös-injizierte Knochenmark

repopuliert in den Wochen nach der Rekonstitution nach und nach die Empfängertiere, die dann sogenannte Knochenmark-Chimären darstellen. Die T-Zell-Vorläufer müssen natürlich auch in diesen Mäusen im Thymus heranreifen, um schliesslich als naive T-Zellen in die Peripherie zu gelangen. Die Theorie bei diesem Versuch ist, dass die OT-1 Vorläufer in den (B6) Wild-Typ Mäusen durch einen „normalen“ Thymus wandern („normal“, da das positiv selektionierende Kompartiment bestrahlungsresistent ist im Gegensatz zu den in den Thymus einwandernden Dendritischen Zellen und Makrophagen), also das den OT-1 TCR positiv selektionierende Cp1 α Peptid vorfinden sollten, während in den LMP7 Knock-Out Mäusen das Peptid nicht generiert werden sollte. Diese Defizienz sollte genau wie in den Zuchten zuvor zu einer verminderten Auswanderung der OT-1 T-Zellen aus dem Thymus und somit zu einer geringeren Frequenz der Zellen in der Peripherie von LMP7 Knock-Out Empfänger-Tieren führen. Als interne Kontrolle für die Entwicklung der T-Zellen wird den Tieren eine Mischung aus OT-1 und kongenem ST-42 Knochenmark injiziert. Die T-Zell-Vorläufer der letzteren T-Zellen haben ein anderes positiv-selektionierendes Peptid, was vermutlich nicht abhängig von der Generation durch Immunoproteasomen ist. Nach Bestrahlung der acht bis zehn Wochen alten Mäuse mit einer lethalen Dosis von 8,5 Gray (¹³²Cs-Quelle) ruhen die Tiere für etwa vier bis fünf Stunden. In dieser Zeit wird das Knochenmark aus OT-1 Mäusen präpariert und, ganz wichtig, CD8⁺ T-Zell-depletiert. Diese Depletion ist deshalb so wichtig, damit nicht später das Ergebnis durch T-Zellen verfälscht wird, die das Knochenmark kontaminiert haben. Solche T-Zellen müssten nicht mehr durch den Selektionsprozess des Thymus gehen und würden das Ergebnis sicherlich beeinflussen. Die Notwendigkeit der Depletion ist aus Abbildung 12 klar ersichtlich. Man sieht jeweils die FACS Dot-Blots vor und nach Depletion mit den magnetischen anti-CD8 DYNAL Beads, sowohl für das OT-1, als auch für das ST-42 Knochenmark. Zwischen 2 und 5 % der Knochenmark Zellen sind CD8 positiv vor der Depletion. Durch die magnetischen beads kann dieser Prozentsatz auf fast 0 % gesenkt werden. Die Zellzahl des CD8⁺ T-Zell-depletierten Knochenmarks wird bestimmt und anschliessend werden den bestrahlten Tieren je $1,5 \cdot 10^7$ Knochenmarkszellen intravenös in die Schwanzvene injiziert. Im Falle der Ko-Injektion von ST-42 Kontroll-Knochenmark werden $7,5 \cdot 10^6$ Zellen injiziert. Nach der Knochenmark Injektion wird den Tieren ca. vier Wochen Zeit gegeben, das hämatopoetische System zu rekonstituieren. Vier bis fünf Wochen nach dem

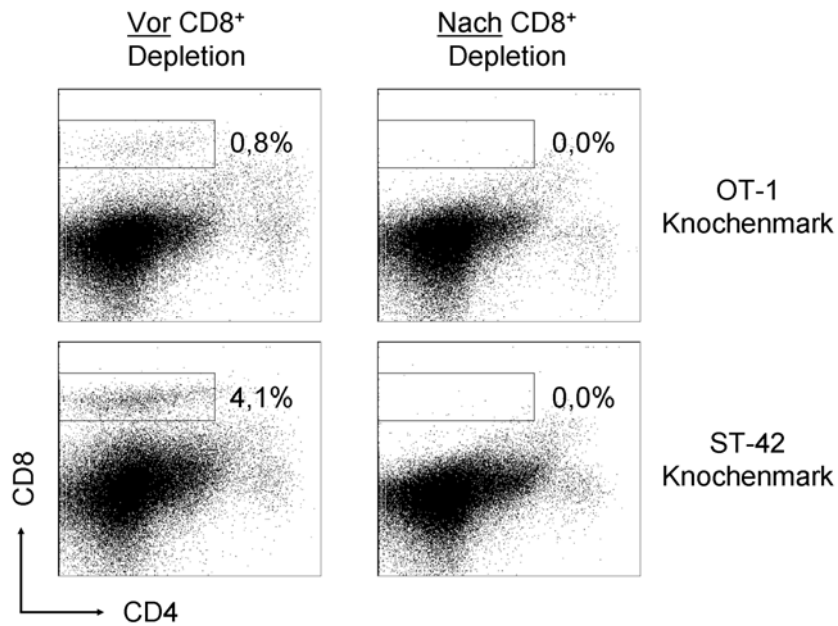


Abbildung 12. Depletion der CD8⁺ T-Zellen aus dem Knochenmark vor dem Knochenmark-Transfer.

Inkubation des Knochenmarks nach Präparation aus den Oberschenkelknochen mit α CD8 Antikörpern, die an DYNAL-beads (magnetische Partikel) gekoppelt sind. Dargestellt sind die FACS Dot-Blots von Proben vor und nach der T-Zell-Depletion.

Knochenmarkstransfer können die Mäuse das erste Mal geblutet werden, um die Repopulation zu überprüfen. Das Ergebnis ist in Abbildung 13 dargestellt. Wieder liegt in den rekonstituierten LMP7 Mäusen nur etwa die Hälfte der transgenen OT-1 T-Zellen vor, die in den Wildtyp-Kontrollen nachzuweisen sind. Während in den (B6) Wild-Typ Mäusen ca. 25 % der Blutzellen transgenen Ursprungs sind, sinkt die Zahl dieser Zellen in den LMP7 Mäusen auf lediglich 10 bis 12 %. Auch in diesem zweiten Modell konnte also der erwartete Effekt der LMP7 Defizienz nachgewiesen werden.

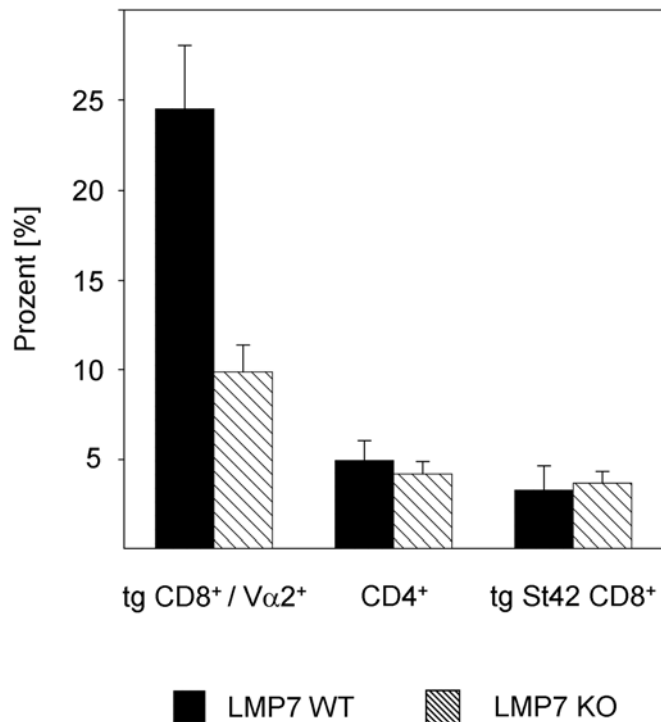


Abbildung 13. Die Selektion von transgenen OT-1 T-Zellen nach Transfer von OT-1 Knochenmark in bestrahlte LMP7 Knock-Out Rezipienten ist stark reduziert.

Blutanalyse der B6 Wild-Typ oder LMP7 Knock-Out Mäuse vier Wochen nach einer lethalen Strahlendosis von 8,5 Gray und Rekonstitution mit $1,5 \cdot 10^7$ CD8 T-Zell-depletierten OT-1 Knochenmarkszellen (+ $5 \cdot 10^6$ CD8 T-Zell-depletierten ST-42 Knochenmarkszellen als Kontrolle). FACS Analyse der transgenen CD8⁺ / Vα 2⁺ T-Zellen, der CD4⁺ T-Zellen und der transgenen CD8⁺ T-Zellen aus ST-42 Knochenmark (CD90.1) in der Peripherie.

3.6 Intravenös injiziertes Cp1α kann die positive Selektion des OT-1 TCR wiederherstellen

Um die Theorie der Abhängigkeit der OT-1 T-Zell-Entwicklung vom Vorhandensein von Cp1α als positiv selektionierendem Peptid noch weiter zu untermauern, wurde eine Manipulation an den bereits Knochenmark-transferierten Mäusen unternommen, die 2004 von Fridkis-Hareli (Fridkis-Hareli et al. 2004) detailliert beschrieben wurde. Mit Hilfe von sogenannten „APL´s“ (Altered Peptide Ligands) konnte die Gruppe um Ellis L. Reinherz die positive Selektion von Virus-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in vivo verändern bzw. manipulieren. Hierzu wurden bei CD8⁺ Determinanten (Gp₃₃₋₄₁ von Lymphozytärem Choriomeningitis Virus Glycoprotein und einem Epitop aus VSV8 von Vesikulärem Stomatitisvirus Nukleoprotein) diejenigen Aminosäurepositionen,

die mit dem jeweiligen transgenen T-Zell-Rezeptor laut Kristallstruktur am wahrscheinlichsten interagieren, verändert bzw. mutiert. Die Effekte dieser Manipulation auf die Thymozytenreifung sowie den Austritt in die Peripherie wurde dann in zwei sehr gut definierten, CD8⁺ T-Zell-transgenen in vivo Systemen untersucht. Durch den gezielten Austausch von Tyrosin durch Serin an Position 4 und Phenylalanin durch Alanin an Position 6 des Gp₃₃₋₄₁ Peptids wurde ein „veränderter“ Peptidligand („APL“) generiert, der eine stark reduzierte T-Zell-Rezeptor Affinität besitzt und intravenös injiziert in der Lage ist, in vivo die positive Selektion von P14 transgenen CD8⁺ T-Zellen zu vermitteln („Thymic Vaccination“). Es ist davon auszugehen, dass die „APL´s“ über die Blutbahn in den Thymus gelangten und dort die positive Selektion der transgenen T-Zellen erhöht haben.

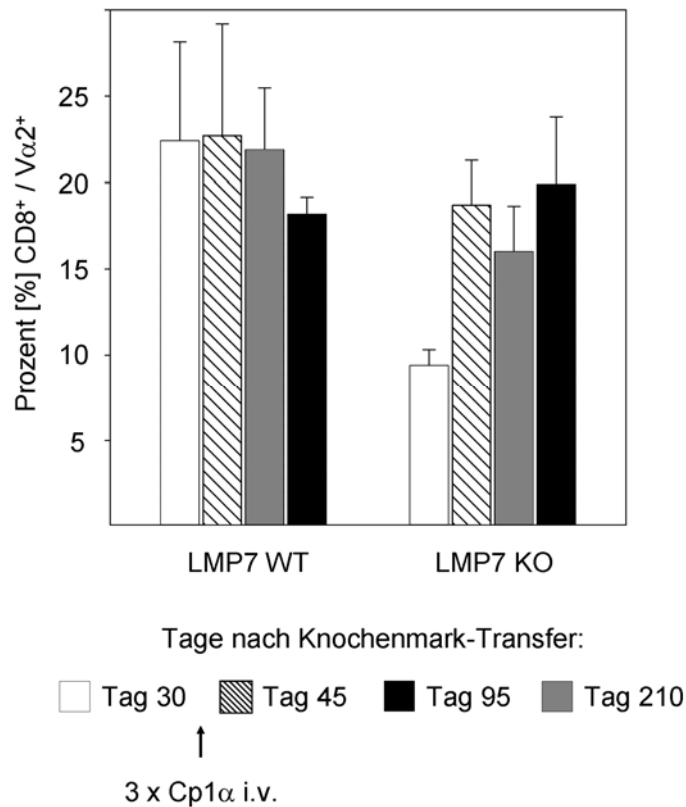


Abbildung 14. Wiederherstellung der Selektion von transgenen OT-1 T-Zellen in den OT-1 Knochenmark-rekonstituierten LMP7 Knock-Out Mäusen durch Injektion des positiv-selektionierenden Cp1α Peptids.

Dreimalige Injektion (i.v.) von 25µg Cp1α in PBS an drei aufeinanderfolgenden Tagen 30 Tage nach Rekonstitution der bestrahlten Rezipienten. Blutanalyse der Mäuse 15 Tage, 65 Tage und 180 Tage später, um den Anteil an transgenen CD8⁺/Vα 2⁺ T-Zellen in der Peripherie durchflusszytometrisch zu bestimmen.

Das Experiment der intravenösen Peptidgabe wurde auf die OT-1 Knochenmark-rekonstituierten LMP7 Knock-Out bzw. Wild-Typ Kontroll-Tiere übertragen. Die im Versuch befindlichen Tiere erhielten entweder drei Mal 25 µg Cp1α an drei aufeinander folgenden Tagen oder lediglich PBS als Injektions-Kontrolle. 15 Tage nach der letzten Peptid-Gabe werden die Tiere erneut geblutet, um den Anteil der transgenen CD8⁺ T-Zellen zu überprüfen (Abbildung 14). Das Ergebnis der Injektion von Cp1α ist klar und in seiner Eindeutigkeit sogar etwas überraschend: Wie erwartet erhöht sich der Anteil der transgenen CD8⁺ T-Zellen in der Wild-Typ Mäusen nach Cp1α-Gabe nicht weiter und blieb konstant bei ca. 25 %. Ihr Anteil in den LMP7 Mäusen stieg jedoch von lediglich 10 bis 12 % auf annähernd den Wert in den Wild-Typ Mäusen, nämlich auf durchschnittlich ca. 22 % an. Mit OT-1 Knochenmark rekonstituierte LMP7 Mäuse, die kein Cp1α Peptid erhalten hatten, wiesen nach den zwei Wochen die gleichen 10 bis 12 % transgene T-Zellen im Blut auf wie vorher (nicht gezeigt). Alle Tiere wurden erneut 65 und 180 Tage nach letzter Cp1α-Injektion untersucht und geblutet. Die Zahlen blieben dieselben und der Anteil der im Blut zirkulierenden Zellen nach Cp1α-Gabe in LMP7 Mäusen war über den Beobachtungszeitraum konstant bei ca. 20 bis 22 %. Obwohl das Ergebnis eindeutig ist, war es schon bemerkenswert, was für eine Auswirkung die dreimalige Injektion eines Peptids hat, das bisher nur in vitro als positiv-selektionierend beschrieben worden war (Hogquist et al. 1997). Anhand der vorliegenden Daten muss man auf eine Einwanderung des Cp1α-Peptids in den Thymus der LMP7 Mäuse schliessen und im weiteren darauf, dass das Peptid dort im Organ der T-Zell-Reifung die positive Selektion der OT-1 T-Zellen nachhaltig beeinflusst und deswegen mehr transgene T-Zellen im Blut nachzuweisen sind. Um eine Aussage über die Kinetik der positiven Selektion machen zu können, wurde in einem Folgeexperiment untersucht, ob sich die Angleichung der transgenen T-Zell-Population bereits kurz nach der letzten von drei Cp1α-Gaben nachweisen lässt. Hierzu wurden die Tiere identisch behandelt, wie in Abbildung 14, nur wurden die Mäuse bereits 18 Stunden nach der dritten Cp1α-Injektion getötet, um jeweils Blutproben, Milzen und Thymi zu untersuchen. Wie in Abbildung 15 zu sehen, ist der Anteil der transgenen OT-1 CD8⁺ T-Zellen bereits 18 Stunden nach der dritten Cp1α-Injektion im Blut und in der Milz um 35 % bzw. 30 % gestiegen. Das Cp1α-Peptid gelangt also über den Blutkreislauf offensichtlich sehr schnell in das Thymusepithel und ist dort in der Lage, die positive Selektion der T-Zellen zu vermitteln, die den OT-1 TCR tragen. Man erkennt aber

auch, dass dieser Effekt direkt im Thymus nicht nachweisbar ist, da sich die Werte aller interessanten Zellpopulation im Thymus nach Cp1 α -Gabe nicht verändert haben. Man kann daher nur spekulieren, dass die Anzahl der T-Zellen, die jeweils als Einzelpositive den Thymus verlassen einfach sehr gering ist und man eine Veränderung deswegen nicht oder nur sehr schwer nachweisen kann (Fridkis-Hareli and Reinherz 2004).

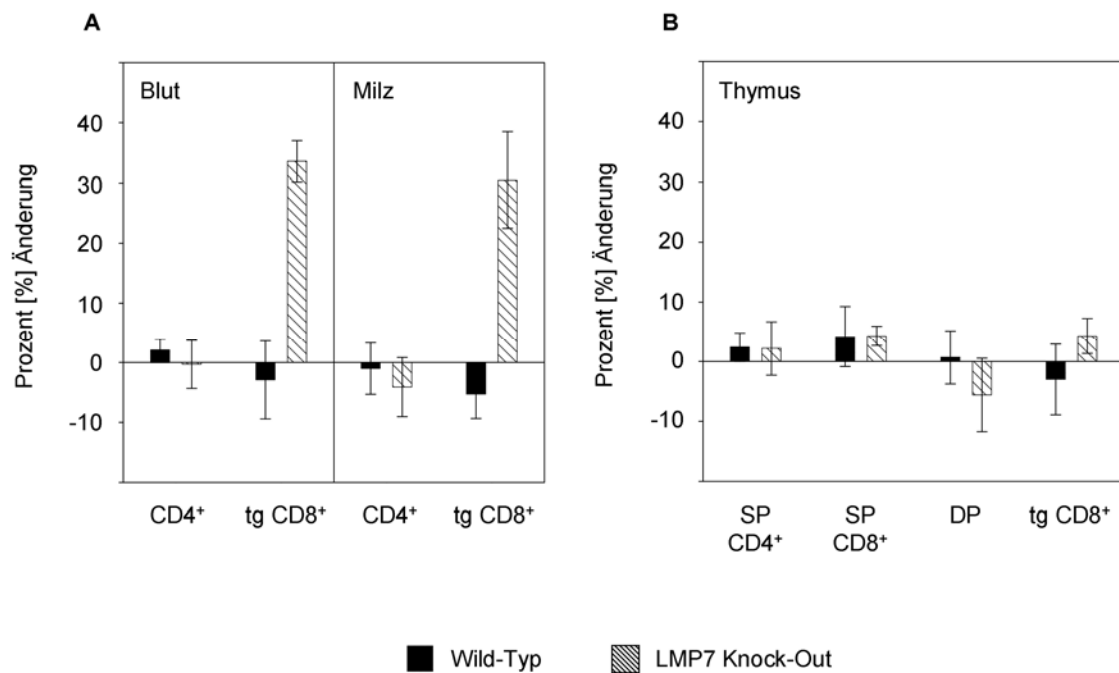


Abbildung 15. Bereits 18 Stunden nach der letzten von drei Cp1 α -Injektionen ist der Effekt des positiv selektionierenden Peptids in der Peripherie nachweisbar.

Bestrahlung der Tiere wie in Abbildung 14, Rekonstitution mit OT-1 Knochenmark und nach 30 Tagen dreimalige Injektion von Cp1 α . Dargestellt ist die Veränderung des Anteils der jeweiligen Zellpopulation in den Organen **A)** Blut, Milz und **B)** Thymus 18 Stunden nach der letzten von drei Cp1 α -Injektionen.

3.7 Cp1 α hat keinen Einfluss auf die periphere Proliferation von OT-1 T-Zellen

Dass es sich bei dem beobachteten Phänomen nicht lediglich um einen peripheren Einfluss des Cp1 α -Peptids handelt, liess sich einem Kontroll-Experiment ziemlich sicher ausschliessen. Es wäre ja zumindest möglich, dass das Cp1 α -Peptid als

derjenige Ligand, der den OT-1 T-Zell-Rezeptor selektionieren kann auch Proliferationssignale vermitteln kann. Um diese Möglichkeit auszuschliessen, wurde ein T-Zell-Transfer durchgeführt. Sublethal bestrahlte LMP7 Knock-Out Mäuse und syngene (B6) Wild-Typ Kontroll Tiere wurden mit 4,5 Gray bestrahlt, um „Platz“ für die Injektion von ca. $1 \cdot 10^6$ transgenen, mit CFSE markierten OT-1 T-Zellen zu machen. Einen Tag nach Injektion der T-Zellen wurde den Tieren entweder 3 Mal an 3 aufeinander folgenden Tagen 25 μg Cp1 α oder lediglich PBS injiziert. An Tag 6 wurden die Tiere mit CO₂ getötet und die Milzen zu Einzelzellsuspensionen verarbeitet.

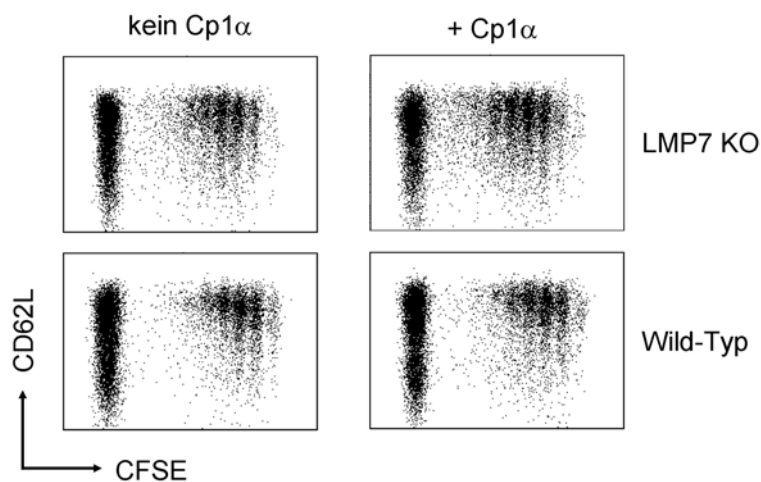


Abbildung 16. Adoptiv in Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Mäuse transferierte transgene OT-1 T-Zellen proliferieren identisch und unabhängig von der Präsenz des Cp1 α -Peptids.

Adoptiver Transfer von $1 \cdot 10^6$ über MACS-beads aufgereinigten und mit CFSE markierten CD8 positiven OT-1 T-Zellen in mit 4,5 Gray sublethal bestrahlte Wild-Typ bzw. LMP7 Knock-Out Mäuse. Direkt danach und an den zwei folgenden Tagen Injektion von 25 μg Cp1 α (insgesamt drei Mal). Dargestellt ist die homeostatische Proliferation der transferierten transgenen OT-1 T-Zellen an Tag 6 in der Milz.

Man sieht in Abbildung 16 sehr gut, dass sich die transferierten OT-1 T-Zellen sowohl in den LMP7 Knock-Out und Wild-Typ Mäusen und mit oder ohne Cp1 α -Gabe genau gleich verhalten. Die CFSE-Floureszenz hat in allen Ansätzen zu etwa gleichen Anteilen abgenommen, die T-Zellen haben sich in etwa gleich oft geteilt. Weiterhin sind die sich teilenden Zellen für alle Aktivierungsmarker FACS-negativ (nicht gezeigt: CD44, CD62L), was auf eine normale homeostatische Proliferation

hindeutet. Auch in ^3H -Thymidin-Proliferationsassays zeigten die Zellen keinerlei Inkorporation, wenn versucht wurde, sie *in vitro* mit Cp1 α zu aktivieren (Daten nicht gezeigt). Die Daten zeigen somit eindeutig dass Cp1 α nicht in der Lage ist, periphere OT-1 T-Zellen zur Proliferation anzuregen, so wie es beispielsweise die Injektion des Antigens SIINFEKL auslösen würde. Dieses Kontroll-Experiment schliesst daher einen peripheren Effekt der Cp1 α -Injektion aus und untermauert umso mehr die These, dass das fehlende Cp1 α -Peptid in den LMP7 Knock-Out Tieren für eine veränderte positive Selektion und damit für den niedrigen Wert der transgenen OT-1 Zahlen verantwortlich ist und es, intravenös verabreicht, die positive Selektion wiederherzustellen vermag.

3.8 Infektion mit OVA-transgenen Listerien

Um die in den beiden beschriebenen Modellen gemachten Beobachtungen in einem dritten System zu verifizieren, sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dirk Busch in München Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Tiere mit OVA-transgenen Listerien infiziert und die an der Immunantwort beteiligten SIINFEKL spezifischen CD8 $^+$ T-Zellen auf ihre V β -Verwendung untersucht werden. Ratio für diese Versuche waren natürlich sowohl die Daten, die anfänglich von Dr. Matthias Hofmann generiert werden konnten (s. Vorarbeiten), als auch die Ergebnisse, die mit den ersten beiden *in vivo* Modellen erzielt wurden. Die Tatsache, dass LMP7 Knock-Out Mäuse die V β 5 Kette zur Bildung ihres dominanten E1b spezifischen T-Zell-Rezeptors anscheinend nicht verwendeten und ihre E1b-spezifische T-Zellen ausschliesslich V β 8 benutzen, deutet ebenso auf einen generellen T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Unterschied hin wie die Ergebnisse der *in vivo* Modelle 1 und 2. Mit den OVA transgenen Listerien (Schiemann et al. 2003) lag ein etabliertes bakterielles *in vivo* Infektionssystem vor, in dem sich genau die Parameter untersuchen liessen, die für diese Fragestellung interessant waren. *Listeria monocytogenes (L.m.)* ist ein Gram-positives Bakterium und vermutlich eines der am besten charakterisierten humanen Pathogene. Ein grosser Vorteil des *L.m.* Modells ist die leichte Verfolgbarkeit der Infektion. Die adaptive Immunantwort ist durch eine starke CD8 $^+$ T-Zell-Antwort charakterisiert, welche etwa an Tag 7 oder 8 nach Primärinfektion ihren Höhepunkt erreicht. Bei Wild-Typ Listerien sind immunogene Epitope für MHC Klasse I lediglich für den H2 d

Hintergrund bekannt (dominant: LLO₉₁₋₉₉, subdominant: p60₂₁₇₋₂₂₅), wohingegen für via MHC Klasse II präsentierte Antigene das LLO₁₈₈₋₂₀₁ für H2^b bekannt ist. LLO spielt eine wichtige Rolle für das Verlassen des phagosomalen Kompartimentes und ist ebenfalls wichtig für die Weiterverbreitung der Bakterien in benachbarte Zellen. P60 ist eine Hydrolase und wichtig für die bakterielle Zellteilung. Die sublethale Infektion von Versuchstieren (Mäusen) mit einer Dosis von 0,1 x LD₅₀ (also einem Zehntel der Dosis, bei der 50 % der Tiere sterben) führt zu einer bakteriellen Last in der Leber, die an Tag 3 ihren Höhepunkt erreicht und im immunkompetenten Wirt danach stetig abnimmt, so dass an Tag 7 keine Pathogene mehr nachweisbar sind. Sowohl α/β als auch γ/δ CD8-positive T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort, wobei die α/β T-Zellen den wichtigeren Part übernehmen. Neutrophile sind ebenfalls an der Immunantwort beteiligt. Aufgrund der sehr effektiven Induktion einer protektiven Immun- und Gedächtnisantwort erreicht die CD8⁺ T-Zell-Antwort nach Re-Infektion („Recall“ Infektion) mit einer normalerweise lethalen Dosis von *L.m.* Bakterien (10 x LD₅₀) ihren Höhepunkt an Tag 5. Bereits drei Tage nach der Recall-Infektion sind die Pathogene nicht mehr oder nur mit sensitivsten Methoden nachweisbar. Aufgrund der beschriebenen typischen Merkmale der Immunantwort auf *L.m.* wird die Infektion mit *L.m.* auch von vielen Arbeitsgruppen verwendet, die die Verbindung und Interaktion von angeborener und adaptiver Immunität untersuchen. Die im folgenden beschriebenen Experimente wurden sämtlich in Kooperation mit dem Labor von Dirk Busch von Dr. Kathrin Linkemann in München durchgeführt. Die OVA-transgenen Listerien dienen hierbei der experimentellen Bereitstellung von Ovalbumin als Antigen im Kontext einer natürlichen Immunantwort gegen ein Pathogen. Die genetische Veränderung der Listerien resultiert in der Insertion des „full-length“ Ovalbumin-Gens in das Genom der Bakterien, die nun das artifizielle Antigen transkribieren, translatieren und somit exprimieren. Es wird wie jedes andere zelluläre Protein nach Ablauf seiner Lebensdauer in den proteasomalen Abbauweg und damit in den MHC Klasse I Präsentationsweg eingeschleust und kann als Peptid-Epitop von CD8-positiven T-Zellen erkannt werden. Durch die Insertion des Ovalbumin-Gens in die Listerien wird auch für den H2^b Hintergrund ein sehr immunogenes Epitop (SIINFEKL) bereitgestellt, mit dem man sehr einfach die CD8⁺ Antwort auf das Pathogen verfolgen kann. Die experimentelle Infektion wurde wie folgt durchgeführt: 6 ml BHI Medium wurden mit 20 μ l *L.m.* OVA Glycerol Stock inokuliert und die Bakterien bei 37°C geschüttelt, bis

die Optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) bei etwa 0,1 lag. Für die Berechnung der Bakterienanzahl pro Milliliter wurde dann folgender Bezug verwendet:

$$L.m. \text{ OVA} \quad OD_{600}: 0,1 = 8,0 * 10^7 \text{ Bakterien/ ml}$$

Für die Primärinfektionen wurden LMP7 Knock-Out Mäuse oder (B6) Wild-Typ Kontroll-Tiere mit 2×10^3 L.m. OVA Bakterien in einem Volumen von 200 μ l intravenös infiziert (0,1 x LD_{50} Dosis), während die Tiere bei der Re-Infektion nach 30 Tagen eine 100-fach höhere Dosis erhielten. Drei Tage nach Primärinfektion wurde jeweils einige Tiere beider Versuchsgruppen getötet, um die Bakterienanzahl in der Leber zu bestimmen. Hierzu wurde wie für die Milz beschrieben jeweils die Leber steril entnommen und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet. Nach Herstellung von mehreren 1/10 Verdünnungen wurden definierte Zellzahlen auf BHI-Agar Platten ausgestrichen und nach einigen Tagen die *L.m. Ova* Kolonien gezählt. Anhand der gezählten Kolonien und der Verdünnungsstufen kann der mittlere Bakterientiter pro Maus/ Leber einfach zurückberechnet werden. Abbildung 17 zeigt, dass sich LMP7 Knock-Out und (B6) Wild-Typ Mäuse in der bakteriellen Last nicht unterscheiden.

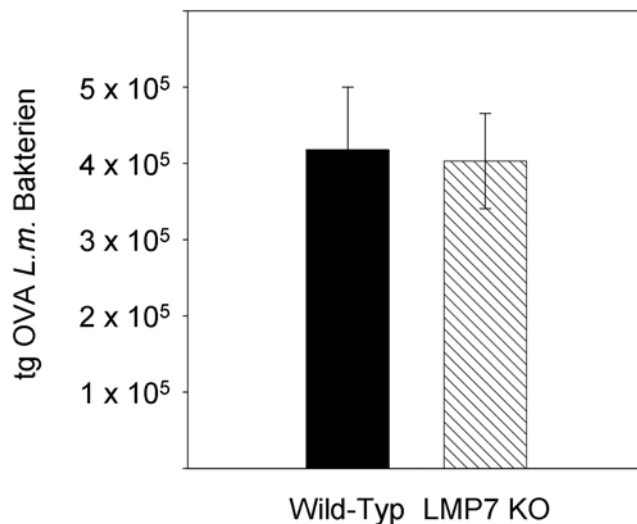


Abbildung 17. Identische bakterielle Last in der Leber 5 Tage nach Infektion von Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Mäusen mit OVA-transgenen Listerien.

Infektion von LMP7 Knock-Out Mäusen und Wild-Typ Kontrolltieren mit 2×10^3 OVA-transgenen Listerien. Nach 5 Tagen Analyse des Bakterientiters in der Leber.

Die übrigen im Versuch befindlichen Tiere wurden 30 Tage nach Primärinfektion erneut und nun mit der 100-fachen Menge der Primärdosis „Recall“-infiziert. Diese experimentelle Prozedur entspricht letztendlich einer klassischen Prime-Boost Strategie, in der zuerst eine T-Zell-Antwort mit gutem T-Zell-Gedächtnis induziert wird und dieses dann nach Abklingen der Primärantwort durch Re-Infektion mit demselben Pathogen (= Antigen) erneut aktiviert wird. Drei Tage nach Re-Infektion wurde eine zweite Gruppe von Versuchstieren getötet und die Einzelzellsuspensionen der Milzen intrazellulär auf IFN- γ und TNF- α gefärbt. Um die antigene Spezifität der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen zu gewährleisten, wurden die Zellen des CD4⁺ Färbeansatzes zuvor vier bis sechs Stunden mit LLO₁₈₈₋₂₀₁ und Brefeldin A bzw. nur mit Brefeldin A inkubiert.

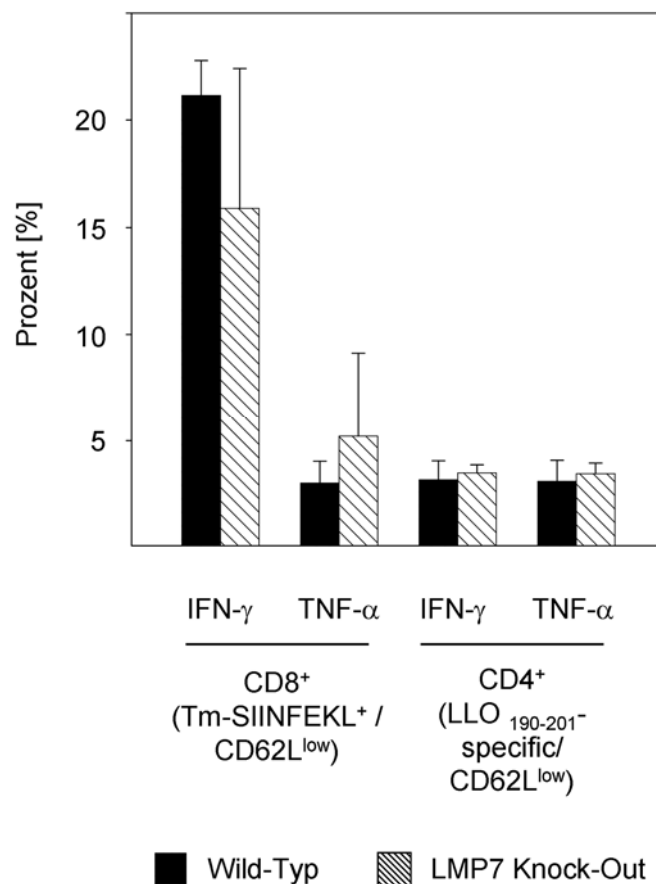


Abbildung 18. TNF- α und IFN- γ Produktion OVA-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ Recall-T-Zellen 3 Tage nach Re-Infektion von Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Mäusen.

FACS Analyse der OVA-spezifischen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen 3 Tage nach Recall-Infektion von LMP7 Knock-Out oder Wild-Typ Mäusen mit OVA-transgenen Listerien.

Auf diese Weise kann man die an der Immunantwort teilnehmenden LLO₁₈₈₋₂₀₁ spezifischen von den nicht-spezifischen CD4⁺ T-Zellen unterscheiden. Die Spezifität der CD8⁺ T-Zellen wurden durch parallele Färbung mit SIINFEKL-Tetramer sichergestellt, so dass man auch hier die Möglichkeit hat, nur die CD8⁺ T-Zellen im FACS zu analysieren, die auch tatsächlich an der Immunantwort gegen SIINFEKL beteiligt sind. Man erkennt in Abbildung 18 klar, dass sowohl die LLO₁₈₈₋₂₀₁ -spezifischen CD4⁺ als auch die SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in etwa gleich viel IFN- γ bzw. TNF- α produzieren. Aufgrund von Abbildung 17 und 18 kann man also davon ausgehen, dass die Immunantwort gegen *L.m. OVA* primär unabhängig von der Präsenz oder Abwesenheit der proteasomalen Untereinheit LMP7 ist, da beide Mausstämme die Bakterientiter gleich gut kontrollieren und auch die sezernierten Zytokine (zumindest die beiden untersuchten, IFN- γ und TNF- α) sich quantitativ in etwa ähneln.

3.9 T-Zell-Rezeptor-Repertoire-Anomalie in LMP7 Knock-Out Mäusen

Nachdem nun also sichergestellt war, dass die beiden Mausstämme immunologisch prinzipiell gleich gut auf *L.m. OVA* antworten können, galt es die viel interessantere Frage zu untersuchen, ob sich die An- oder Abwesenheit von LMP7 auf die V β -Verwendung innerhalb der SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen auch in diesem dritten., (Infektions-) in vivo Modell auswirkt. Um zunächst sicherzustellen, dass die CD8⁺ T-Zellen in Milzen und Lymphknoten von naiven, d.h. weder immunisierten noch infizierten LMP7 Knock-Out und (B6) Wild-Typ Mäusen sich nicht bereits in der Verwendung der V β -Ketten unterscheiden, wurden je fünf Tiere mit einem Panel gegen 15 verschiedene V β -Ketten untersucht. Abbildung 19 zeigt exemplarisch die durchschnittliche Verwendung der jeweiligen Ketten in den naiven CD8⁺ T-Zellen (Milz; identisch in Lymphknoten, Daten nicht gezeigt) der beiden Mausstämme. Man erkennt, dass die V β -Ketten V β 5.1/ .2 und V β 8.1/ .2 etwas öfter für naive T-Zell Rezeptoren verwendet werden als der Rest der untersuchten 15 V β -Ketten. Insgesamt ist die Verteilung jedoch identisch in den LMP7 Knock-Out und Wild-Typ Mäusen, d.h. durchschnittlich hat der LMP7 Knock-Out keinen Einfluss auf die Verwendung von bestimmten V β -Ketten. Dieses Bild gilt sowohl für CD8⁺ T-Zellen aus der Milz wie auch aus Lymphknoten (Daten nicht gezeigt). Färbt man jedoch die

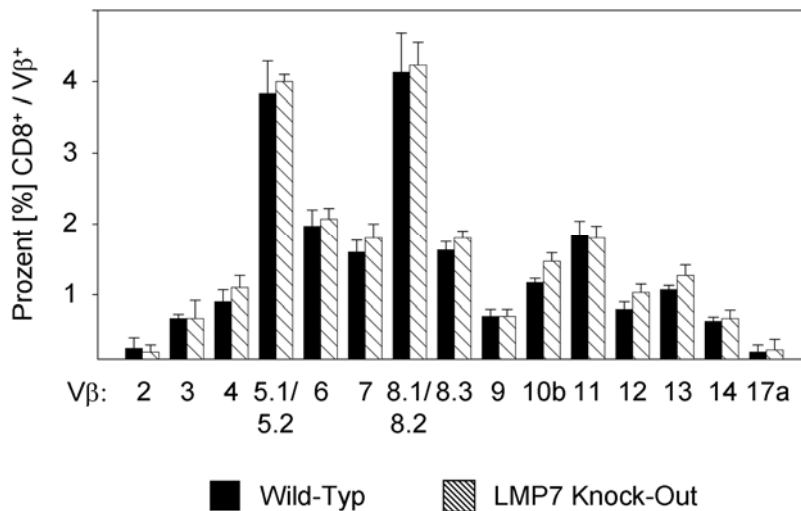


Abbildung 19. V β -TCR Screen naiver Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Mäuse (Milz).

Einzelzellsuspensionen von LMP7 Knock-Out oder Wild-Typ Milzen an, die ein zweites Mal mit *L.m.* OVA infiziert wurden, so ergibt sich ein eindeutig anderes Bild. Wie man in Abbildung 20 erkennen kann, unterscheiden sich die SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus LMP7 Knock-Out Mäusen klar von ihren Wild-Typ Kontrollen in der Verwendung ihrer V β -Ketten. Während die Verteilung der V β -Ketten in den SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den *L.m.* OVA infizierten Wild-Typ Mäusen der Verteilung in naiven CD8⁺ T-Zellen gleicht (V β 5.1/ .2 und V β 8.1/ .2 werden in etwa zu gleichen Teilen für den SIINFEKL-T-Zell-Rezeptor verwendet), ist in SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen der *L.m.* OVA infizierter LMP7 Knock-Out Mäuse die V β 5.1/ .2 Kette klar gegenüber der V β 8.1/ .2 Kette unterrepräsentiert, bzw. wird die V β 8.1/ .2 Kette bevorzugt verwendet. V β 10 ist exemplarisch für die anderen 13 V β -Ketten aufgeführt, in denen sich die beiden Mausstämme nicht unterscheiden. Untersucht man in derselben FACS-Analyse die V β -Ketten Verwendung der nicht-SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (also aller übrigen CD8⁺ T-Zellen), so ergibt sich in beider Mäusen erneut das Bild der V β -Ketten Verteilung in naiven LMP7 Knock-Out und Wild-Typ Mäusen. Es lässt sich also auch in diesem Modell der Infektion mit OVA transgenen Listerien zur experimentellen Einführung des Ovalbumin-Antigens in beide Mausstämme ein eindeutiger

Unterschied des T-Zell-Rezeptor-Repertoires feststellen, der auf die Abwesenheit der proteasomalen Untereinheit LMP7 zurückzuführen ist.

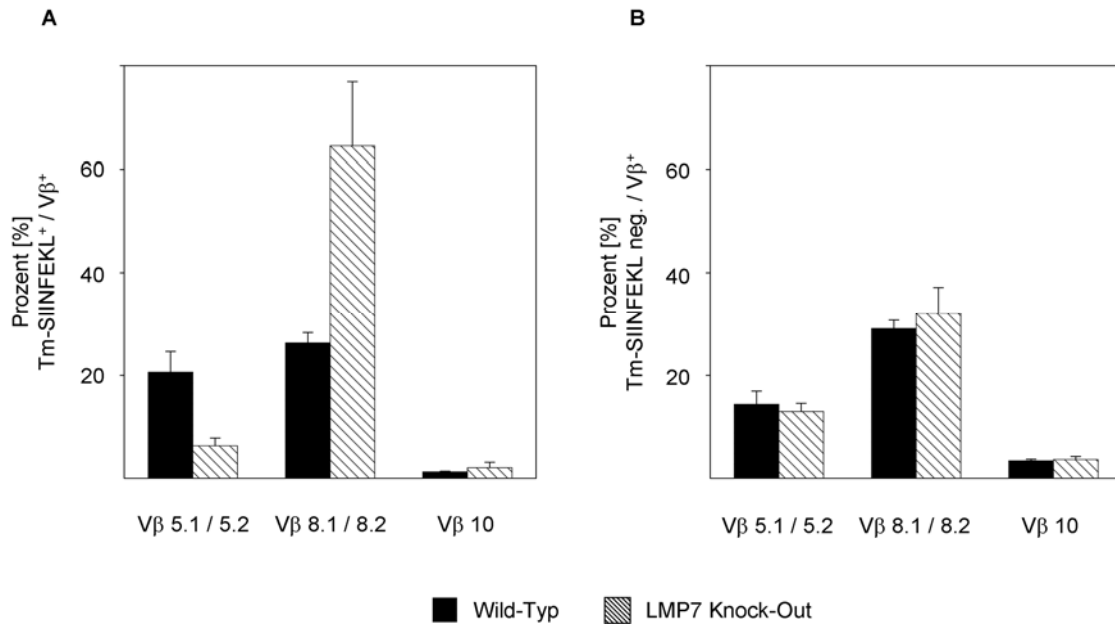


Abbildung 20. SIINFEKL spezifische CD8⁺ Recall-T-Zellen von re-infizierten Wild-Typ und LMP7 Knock-Out Mäusen verwenden unterschiedliche Vβ-Ketten für ihre SIINFEKL-spezifischen TCRs.

FACS-Färbung von Recall-infizierten LMP7 Knock-Out und Wild-Typ Mäusen. Dargestellt ist die Verwendung der TCR Vβ-Ketten 5.1/2, 8.1/2 und 10 innerhalb der **A)** SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen bzw. **B)** der SIINFEKL-negativen CD8⁺ T-Zellen.

4 Diskussion Teil I

Um den Einfluss von Immunoproteasomen auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire abzuschätzen wurde anfänglich ein Vorläufer des Peptides mit aufgereinigten konstitutiven und IFN- γ induzierten Proteasomen aus der humanen Zelllinie LCL721 *in vitro* verdaut, welches den OT-1 T-Zell-Rezeptor positiv selektionieren kann (Hogquist et al. 1997). Die Analyse der generierten Fragmente nach dem Verdau erbrachte ein eindeutiges Ergebnis: Nur Immunoproteasomen sind in der Lage sind, den korrekten C-Terminus des Cp1 α -Peptids aus einem N- und C-terminal verlängerten Vorläufer herzustellen. Ausserdem konnten nur Immunoproteasomen das tatsächlich selektionierende Peptid, also die korrekte Sequenz, direkt aus dem Vorläufer freisetzen. Um zu testen, ob diese vielversprechenden *in vitro* Befunde auch *in vivo* funktionelle Konsequenzen haben, wurden OT-1 Mäuse auf einen LMP7 defizienten Hintergrund gekreuzt bzw. wurde OT-1 Knochenmark in bestrahlte LMP7 Knock-Out Mäuse und Wild-Typ Kontroll-Tiere transferiert. In den gekreuzten bzw. Knochenmark-transferierten Tieren wurde dann die Entwicklung der transgenen CD8⁺ Population im Thymus bzw. in der Peripherie verfolgt. Es konnte eine etwa 50 prozentige Reduktion der transgenen CD8⁺ T-Zellen in den OT-1 Mäusen beobachtet werden, die genetisch LMP7 defizient sind, wobei dieser Effekt sowohl in der Peripherie als auch im Thymus, dem Organ der T-Zell-Reifung und Selektion, auftrat. Die Spezifität dieses Effekts konnte durch Ko-Transfer von ST-42 Knochenmark und die Tatsache gezeigt werden, dass die ST-42 T-Zellen, die transgen für ein adenovirales Peptid sind, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von LMP7 normal selektiert werden. Da der LMP7 Knock-Out lediglich zu einer starken Reduktion, nicht aber zu einem totalen Verlust der positiven Selektion der OT-1 T-Zellen führt, ist davon auszugehen, dass das Cp1 α ₉₂₋₉₉ wahrscheinlich nicht das einzige positiv selektionierende Peptid für diesen T-Zell-Rezeptor ist. Andere Selbstpeptide, die ebenfalls positiv selektionierend wirken, könnten z.B. unabhängig von der Prozessierung durch Immunoproteasomen sein und würden somit auch auf dem LMP7 defizienten Hintergrund den OT-1 T-Zell-Rezeptor selektionieren können. Nichtsdestotrotz ist es erstaunlich, dass die dreimalige Injektion von Cp1 α den Prozentsatz von transgenen OT-1 T-Zellen in der Peripherie der Knochenmark-transferierten LMP7 Knock-Out Mäusen sofort und dauerhaft auf das Niveau der

Wild-Typ Tiere anzuheben vermag. Wahrscheinlich ist, dass das injizierte Cp1 α -Peptid den Thymus über die Blutbahn erreicht und dann dort zu einer vermehrten positiven Selektion der transgenen T-Zellen führt. Diese Beobachtungen decken sich genau mit einer Veröffentlichung von Fridkis-Hareli et al. aus dem Jahr 2004, in der ebenfalls eine Manipulation der positiven Selektion in vivo beschrieben wird, nachdem Mäusen sogenannte „APL´s“ (altered peptide ligands) intravenös injiziert werden. Dass es sich bei den gemachten Beobachtungen nach intravenöser Peptidgabe nicht um einen generellen Defekt der T-Zell-Expansion oder -Erhaltung („T cell maintenance“) in LMP7 defizienten Mäusen handelt, konnte durch einfache T-Zell-Transferexperimente ausgeschlossen werden. Der adoptive Transfer von transgenen OT-1 T-Zellen in sublethal bestrahlte LMP7 Knock-Out oder (B6) Wild-Typ Mäuse führte in beiden Mausstämmen zu einer identischen (homeostatischen) Expansion bzw. Proliferation der transferierten CD8⁺ T-Zellen. Besonders wichtig in diesem Zusammenhang: Die Injektion von Cp1 α hatte in diesem Experiment keinerlei Einfluss auf die Expansion oder den Prozentsatz von transgenen OT-1 CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie. Da Selbstpeptide, die positiv selektionierend wirken, auch mit der Homeostase von T-Zellen in der Peripherie in Verbindung gebracht werden, tragen vermutlich andere, Immunoproteasom-unabhängige Peptide dazu bei, dass sich die OT-1 T-Zellen auch nach 180 Tagen „normal“ in der Peripherie von LMP7 defizienten Mäusen verhalten. Die von dieser Arbeit ausgehenden Schlussfolgerungen bzgl. des Einflusses von Immunoproteasomen auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire werden durch mindestens drei weitere Veröffentlichungen unterstützt. W. Chen aus dem Labor von Jonathan Yewdell veröffentlichte bereits 2001 im Journal of Experimental Medicine (Chen et al. 2001b), dass die T-Zell-Antwort gegen ein Epitop des Influenza Nukleoproteins (NP₃₆₆₋₃₇₄) in LMP2 Knock-Out Mäusen wesentlich schwächer bzw. schlechter ausfällt als in den B6 Wild-Typ-Kontrollen obwohl die Prozessierung des Epitops unabhängig von LMP2 ist. Auch die Autoren dieser Publikation kamen zu dem Schluss, dass Immunoproteasomen in diesem Fall wahrscheinlich das T-Zell-Repertoire beeinflusst haben, da die Prozessierung und Antigenpräsentation des Epitops NP₃₆₆₋₃₇₄ LMP2-unabhängig ist. Weiterhin kommt Nussbaum 2004 (Nussbaum et al. 2005) mit seinen Experimenten zu einem Ergebnis, dass mit den Daten dieser Arbeit gut vereinbar ist. Bestimmte virale Epitope bzw. die T-Zell-Antworten gegen diese Determinanten sind zwar abhängig von der immunoproteasomalen Prozessierung, LMP2 Knock-Out und (B6)

Wild-Typ Mäuse können aber prinzipiell eine LCMV Infektion gleich gut kontrollieren bzw. abwehren. Die biologische Funktion von Immunoproteasomen könnte also anderswo liegen – z.B. auch in der Einflussnahme auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire. Schliesslich wurde kürzlich aus der Arbeitsgruppe von Markus Groettrup in Konstanz veröffentlicht, dass MECL-1 defiziente Mäuse (Basler et al. 2006) 20 % weniger CD8⁺ T-Zellen in der Milz aufweisen und eine klar schlechtere Immunantwort nach LCMV Infektion gegen Gp₂₇₆₋₂₈₆ (H-2, D^b) und NP₂₀₅₋₂₁₂ (H-2, K^b) zeigen. Da die Prozessierung des Gp-Antigens unabhängig von der Präsenz des Immunoproteasoms war, kommen die Autoren zu dem Schluss, dass wahrscheinlich eine geringere Zahl an Gp₂₇₆₋₂₈₆-spezifischen T-Zell-Vorläufern für ihre Beobachtungen verantwortlich ist. Es gibt neben der vorliegenden Arbeit, die sich auf LMP7 konzentriert, also drei weitere Veröffentlichungen, die, aufgrund von Studien an LMP2- bzw. MECL-1 Knock-Out Mäusen, Immunoproteasomen mit der Selektionsprozess von CD8⁺ T-Zellen im Thymus überzeugend in Verbindung bringen.

Um weitergehend zu untersuchen, ob die Daten bezüglich der Entwicklung der transgenen OT-1 T-Zellen auch Relevanz für die Entwicklung des naiven T-Zell - Repertoires haben, wurden LMP7 defiziente und Wild-Typ Mäuse mit Ovalbumin-transgenen Listerien (*L.m. OVA*) infiziert und die Immunantwort verfolgt. Beide Mausstämme waren in der Lage, die bakterielle Infektion gleich gut zu bewältigen und eine vergleichbare Immunantwort gegen die Listerien und gegen das CTL Epitop SIINFEKL zu induzieren. Die wichtige Beobachtung ist jedoch, dass die SIINFEKL spezifischen CD8⁺ T-Zellen in LMP7 Knock-Out Mäusen fast ausschliesslich V β 8.1/ .2 Ketten für ihren T-Zell-Rezeptor verwenden während V β 5.1/ .2 stark unterrepräsentiert ist. Wild-Typ Mäuse hingegen benutzen zu etwa gleichen Teilen V β 5.1/ .2 und V β 8.1/ .2 Ketten für ihre SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Da die V β 5.1/ .2 Kette auch von den OT-1 CD8⁺ T-Zellen für den T-Zell-Rezeptor verwendet wird und die sich die Entwicklung der transgenen CD8⁺ T-Zellen auf LMP7 Knock-Out Hintergrund grundlegend von der auf Wild-Typ Hintergrund unterscheidet, liegt ein Zusammenhang zwischen unterschiedlicher Prozessierung von Peptiden, die an der positiven Selektion beteiligt sind, durch Standard- oder Immunoproteasomen, und der T-Zell-Rezeptor-Selektion durch das kortikale Thymusepithel auf der Hand. Es macht daher in unseren Augen nur Sinn, dass Immunoproteasomen die positive Selektion in der Tat (mit)beeinflussen, da ihre

Aktivität bzw. veränderte Spezifität gegenüber den Standardproteasomen die Anzahl von Selbstpeptiden, die einen gegebenen T-Zell-Rezeptor selektionieren können, erhöhen kann. Nicht ganz ins Bild hingegen passt eine kürzlich erscheinende Veröffentlichung, die Immunproteasomen in kortikalen Thymusepithelzellen nicht nachweisen konnte (Nil et al. 2004), dort also, wo laut Lehrbuch die positive Selektion stattfindet. Eine vorstellbare und mögliche Erklärung für die Diskrepanz der Daten dieser Arbeit und denen von Nil et al. ist, dass kortikale Thymusepithelien nach Infektion durchaus in der Lage sind, Immunproteasomen zu exprimieren. Dieses Szenario ist aber selbst unter SPF Bedingungen nicht auszuschließen, da die Definition „SPF“ ja lediglich bestimmte Pathogene ausschließt und eine Infektion trotzdem noch vorliegen kann. Somit können selbst in unter SPF-Bedingungen gehaltene Mäusen kleine Mengen an Immunproteasomen in kortikalen Thymusepithelzellen vorliegen, die wiederum den Zusammenhang zwischen Immunproteasomen und positiver Selektion des OT-1 T-Zell-Rezeptors erklären, der in dieser Arbeit beschrieben ist. Natürlich ist weiterhin vorstellbar, dass doch noch andere Zelltypen neben dem kortikalen Thymusepithel eine Rolle in der positiven Selektion haben (Lilic et al. 2002; Martinic et al. 2003) und dass Immunproteasomen in diesen Zellen das positiv selektionierende Cp1 α -Peptid für den OT-1 T-Zell-Rezeptor prozessieren können. Martinic et al. beschreiben in ihrer Publikation mit der Hilfe von Chimären, dass auch nichtthymische Epithelzellen in der Lage sind, ein funktionales, protektives CD8⁺ T-Zell Repertoire gegen LCMV zu induzieren. Lilic et al. schlagen vor, das zumindest im embryonalen bzw. neonatalen Thymus Fibroblasten das MHC-abhängige Signal bereitstellen können, während kortikale Thymusepithelzellen ein zweites Signal „in trans“ geben müssen. Weitere Publikationen (Hugo et al. 1993; Pawlowski et al. 1993; Zinkernagel and Althage 1999) unterstützen die Vorstellung, dass die Fähigkeit, positive Selektion zu vermitteln, nicht auf die kortikalen Epithelzellen des Thymus beschränkt ist. Zinkernagel spekuliert sogar, dass der Thymus lediglich das Organ ist, welches die TCR-Expression fördert und die Selektion von T-Zellen von MHC Molekülen auf solchen Zellen abhängt, die „bone marrow-derived“ und somit nicht epithelialen Ursprungs sind.

Das Konzept der „Thymic Vaccination“ ist somit besonders nach den hier präsentierten Daten eine interessante Vorstellung, erlaubt sie doch zumindest theoretisch die gezielte Modulierung des T-Zell-Repertoires durch zu injizierende

Peptide, die die thymische Selektion von T-Zellen beeinflussen. Eine notwendige Voraussetzung wäre selbstverständlich, dass die jeweiligen Selbstpeptide bekannt sind. Man könnte im vorliegenden Modell aber beispielsweise untersuchen, ob durch Gabe des Cp1 α -Peptids die Vorläuferzahl von SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ T-Zellen so angehoben werden kann, dass sich die z.B. Schwelle für den LD₅₀ Wert von OVA-transgenen Listerien erhöht. Auch in anderen Fällen, beispielsweise wenn die Maschinerie der Antigenpräsentation durch Immunevasionsstrategien von Pathogenen oder Tumoren ins Stocken geraten oder anderweitig verändert ist, wäre eine Anwendung der „Thymic Vaccination“ gegeben.

5 Ergebnisse Teil II

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit untersucht wesentliche T-Zell-Effektorfunktionen, die in vitro und in vivo von antigenpräsentierenden BMDCs induziert werden können, die durch einfache bzw. kombinierte Ligation von mehreren Toll-Like Rezeptoren aktiviert worden sind. Neben der antigenspezifischen Interaktion von T-Zellen und DCs via TCR und MHC-Molekülen spielt die Kostimulation auf Seiten der APCs eine entscheidende Rolle bei der Induktion einer robusten T-Zell-Immunität (Banchereau and Steinman 1998). Diese kostimulatorischen Signale werden hauptsächlich durch Dendritische Zellen vermittelt (Banchereau and Steinman 1998; Cella et al. 1996; Wilcox et al. 2002), die zu den Hauptakteuren der professionell antigenpräsentierenden Zellen gehören und beinhalten vor allem die Hochregulierung der Oberflächenmarker CD40, Ox40-Ligand, CD70, CD80 und CD86 sowie die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-12 oder Typ I Interferone. Beeinflusst wird die „Maschinerie“ der Kostimuli massgeblich durch die Ligation von Toll-Like Rezeptoren auf der Oberfläche von APCs (DCs), die bestimmte konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster („PAMPs“), z.B. mikrobiellen oder viralen Ursprungs, erkennen (Bendelac and Medzhitov 2002; Medzhitov 2001). Mittlerweile sind bis zu 11 verschiedene TLRs identifiziert worden, die allesamt unterschiedliche Strukturen erkennen und somit auch die Vielfalt von potentiell pathogenen Organismen widerspiegeln (Takeda et al. 2003). In diesem Zusammenhang fungieren die TLRs also als Bindeglied (Iwasaki and Medzhitov 2004) zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort und TLR vermittelte Signale in das Zellinnere von APCs haben grossen Einfluss auf die Induktion und Regulation der adaptiven Immunität (Schnare et al. 2001; Schwarz et al. 2003). Die intrazellulären Signalwege für die meisten der TLRs sind untersucht und gut charakterisiert und weisen in weiten Teilen Gemeinsamkeiten mit der Signaltransduktion der IL-1 und IL-18 Rezeptoren auf, die MyD88 abhängig letztendlich zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt (Adachi et al. 1998; Kawai et al. 1999; Medzhitov et al. 1998a; Wesche et al. 1997). Der einzige TLR, der gänzlich MyD88 unabhängig ist und über den Adaptor TRIF Aktivierung ins Zellinnere signalisiert ist TLR3, der Poly I:C erkennt (Yamamoto et al. 2002b). Ein weiteres Adaptor-Molekül, das z.B. bei TLR2 und TLR4 vermittelter

Aktivierung eine Rolle spielt ist TIRAP (Fitzgerald et al. 2001; Horng et al. 2001a; Horng et al. 2002; Yamamoto et al. 2002b; Yamamoto et al. 2002a).

Tobias Warger, mit dem der Grossteil der in diesem Teil präsentierten Daten zusammen generiert wurde, begann am Institut für Immunologie in Mainz daher mit der Charakterisierung der BMDC Antworten nach Aktivierung mit verschiedensten TLR Liganden. Die zentrale Frage seiner initialen Studien war, ob sich durch die gleichzeitige Ligation von MyD88-abhängigen und –unabhängigen Toll-Like Rezeptoren positive oder gar synergistische Effekte, z.B. auf Ebene der kostimulatorischen Signale, nachweisen liessen. Er testete eine ganze Reihe von TLR Liganden, von denen der Übersicht halber in dieser Arbeit nur diejenigen gezeigt werden sollen, die in den folgenden Projekten verwendet wurden. Alle TLR Liganden wurden von Tobias Warger bzgl. ihrer Fähigkeit austitriert, nach 20 Stunden als Einzelstimulus maximale IL-6 und RANTES Produktion durch Tag 6 BMDCs zu induzieren (Warger et al. 2006). Für alle nachfolgenden Studien wurden die einmal austitrierten Einzelkonzentrationen verwendet. Medium bezeichnet BMDCs, die unstimuliert blieben, Poly I:C wurde mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml eingesetzt und R-848 mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml. Variiert wurde in manchen Versuchen lediglich die Dauer der Stimulation: Sechs Stunden (6 h) als „kurzer“ Stimulus bzw. zwanzig Stunden (20 h) als „langer“ Stimulus. Die jeweilige Stimulationsdauer ist den Legenden der Abbildungen bzw. dem Text zu entnehmen. Nach den sechs oder zwanzig Stunden wurden die BMDCs für alle Ansätze ausgiebig gewaschen, um residuale TLR Liganden zu entfernen und die Versuche nicht zu verfälschen.

5.1 Überlegene immun-stimulatorische Charakteristika von BMDCs nach kombinierter Stimulation mit TLR3 und TLR7 Agonisten

Abbildung 21 zeigt in A) und B) die IL-6 bzw. RANTES Produktion nach zwanzigstündiger Inkubation der Tag 6 BMDCs mit den entsprechenden TLR Liganden und in C) bis F) die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ausgewählter Aktivierungsmarker auf der Oberfläche der BMDCs. Wie auch von Napolitani beschrieben (Napolitani et al. 2005) konnten die inflammatorischen Mediatoren IL-6 und RANTES nach TLR Ligation mit Poly I:C und R-848 detektiert werden, wobei RANTES nach Poly I:C

Stimulus produziert wurde und IL-6 eher nach R-848 Zugabe. Man erkennt aber klar den Synergismus in der Sekretion beider Mediatoren wenn die BMDCs mit beiden TLR Liganden gleichzeitig stimuliert werden. Gleiches gilt für die Sekretion von IL-12p70 und MCP-1 (Daten nicht gezeigt).

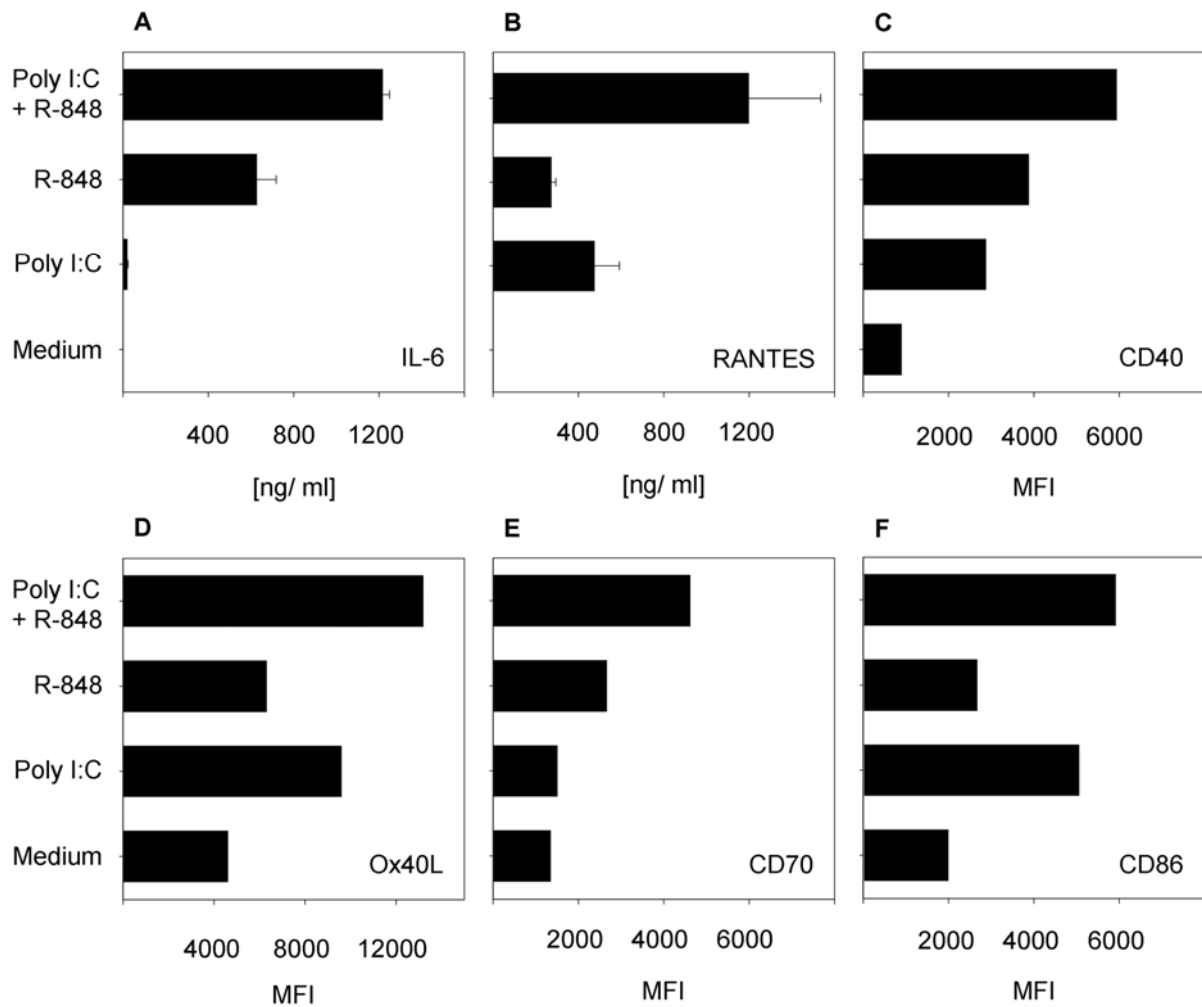


Abbildung 21. Die kombinierte Stimulation von BMDCs mit den TLR3- und TLR7- Agonisten Poly I:C und R-848 erhöht die IL-6 und RANTES Produktion und reguliert Expression von DC Aktivierungsmarkern hoch.

Präparation der BMDCs wie in „Material & Methoden“ beschrieben aus Knochenmark mit anschließender Ausreifung in GM-CSF-haltigem Medium für 6 Tage. Aktivierung der BMDCs mit den einzelnen TLR Agonisten Poly I:C (50 µg/ ml) oder R-848 (1 µg/ ml) bzw. einer Kombination von beiden an Tag 6, bzw. keine Stimulierung. Ernte der Kulturüberstände nach 18 Stunden Stimulation für die Zytokindetektion: **A)** IL-6, **B)** RANTES, bzw. nach 48 Stunden Stimulation durchflusszytometrische Analyse der CD11c positiven, PI-negativen Zellpopulation bezüglich ihrer Aktivierungsmarker **C)** CD40, **D)** Ox40L, **E)** CD70, **F)** CD86.

Die MyD88 unabhängige Ligation des TLR3 durch Poly I:C führte des Weiteren zu der bereits beschriebenen Induktion von Kostimuli auf der Zelloberfläche der BMDCs (besonders CD86, Ox40L), die jedoch ebenfalls nach R-848 Aktivierung nachweisbar war. Insgesamt ist der Synergismus nach gleichzeitiger TLR3/ TLR7 Ligation auf der Ebene der Aktivierungsmarker nicht ganz so ausgeprägt wie bei den pro-inflammatorischen Mediatoren jedoch sind die MFI's der untersuchten Marker nach dem Doppelstimulus immer eindeutig höher als nach den Einzelstimuli. Neben der beschriebenen Kombination von Poly I:C und R-848 waren noch andere Kombinationen von TLR Liganden durchaus interessant, die jedoch in den Vorversuchen allesamt nicht an den Synergismus von Poly I:C und R-848 heranreichten. Aufgrund des beobachteten Synergismus der ausgewählten Kombination wurde dieser Stimulus laborintern als „Superstimulus“ bezeichnet und soll auch im Folgenden so umschrieben werden.

5.2 Raschere Kinetik der IL-6 und RANTES Produktion nach „Superstimulation“ von BMDCs

Um im Weiteren die synergistischen Eigenschaften des „Superstimulus“ näher zu untersuchen, wurde eine Kinetik der drei Stimuli bezüglich der Induktion von IL-6 und RANTES erstellt. Zwischen 4 und 72 Stunden nach Inkubation mit den entsprechenden TLR Liganden wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Kultur-Überstände für eine ELISA/ Luminex Analyse entnommen. In Abbildung 22 ist das Ergebnis dieser Versuche zu sehen. Die BMDCs, die nach den sechs Tagen Reifung/ Differenzierung weiterhin nur in Medium kultiviert wurden, zeigen wie erwartet annähernd keine bzw. eine nur Hintergrund-Produktion von IL-6 und RANTES. In BMDC-Kulturen, die mit dem TLR3 Liganden Poly I:C alleine versetzt wurden, war IL-6 fast nicht nachweisbar, während RANTES nach acht Stunden detektiert werden konnte und die Produktion dieses Chemokins bis zum 48 Stunden Wert weiter anstieg. Wurden die BMDCs nur mit R-848 aktiviert, waren sowohl IL-6 als auch RANTES nach acht bis zwölf Stunden zu detektieren und ein Maximum wurde für beide Mediatoren nach etwa 24 Stunden erreicht. Während die RANTES Sekretion danach wieder abnahm, wurde IL-6 auch 48 später weiterhin nachweisbar produziert.

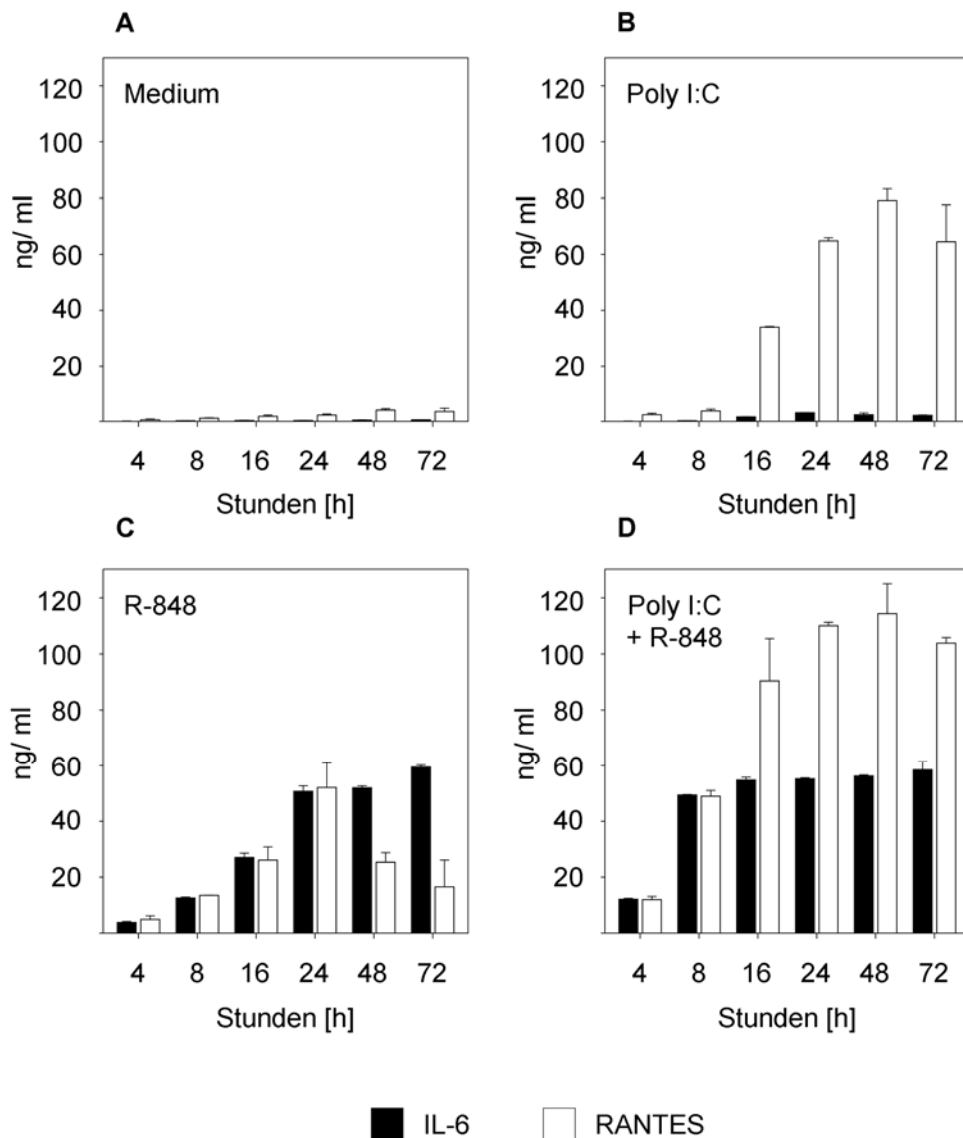


Abbildung 22. Kinetik der IL-6 bzw. RANTES Produktion nach TLR Stimulierung.

Ernte der BMDC Kulturüberstände nach 4, 8, 16, 24, 48 und 72 Stunden TLR Stimulation und Analyse der IL-6 Sekretion oder RANTES Produktion. **A)** Medium, **B)** Poly I:C, **C)** R-848, **D)** Poly I:C + R-848.

Im Gegensatz zu beiden Einzelstimuli aktivierte der kombinierte „Superstimulus“ die BMDCs so gut, dass bereits in den ersten vier bis acht Stunden der maximale Wert für die IL-6 Produktion erreicht und auf diesem Niveau 60 weitere Stunden gehalten wurde. Auch die RANTES Produktion setzte bereits früher ein und erreichte einen weitaus höheren Maximalwert als die Einzelstimuli induzieren konnten. Die beobachtete Synergie bei simultaner Aktivierung der BMDCs durch Ligation von TLR3 und TLR 7 ist also sowohl qualitativer als auch quantitativer Natur.

5.3 Stimulus-Removal

Ein weiterer interessanter Punkt, den es in diesem Zusammenhang zu beleuchten galt, bezieht sich auf eine von Yang 2004 veröffentlichte Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass für anhaltende Zytokinproduktion durch DCs eine fortwährende TLR Stimulation erforderlich ist (Yang et al. 2004). Um diese Frage im Hinblick auf die „superstimulierten“ BMDCs zu klären, wurden die BMDCs erst zwanzig Stunden mit den entsprechenden TLR Stimuli inkubiert, diese dann durch extensives Waschen entfernt und das Medium durch Medium ohne Stimuli ersetzt. Nach zwanzig weiteren Stunden wurde die IL-6 und RANTES Produktion analysiert (Abbildung 23).

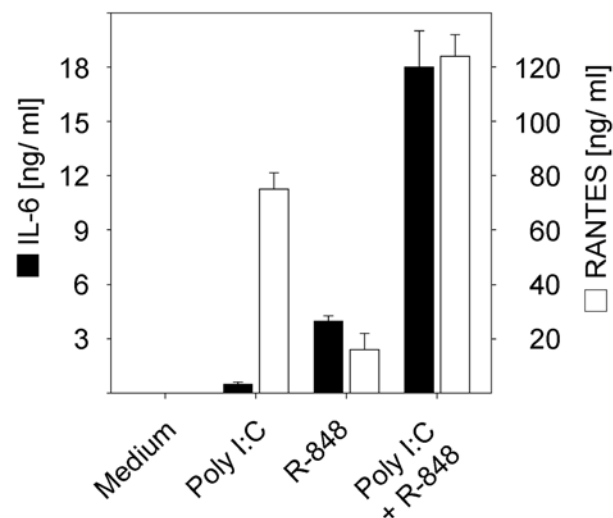


Abbildung 23. Produktion von IL-6 und RANTES nach TLR Stimulus „Removal“.

Ausreifung der BMDCs wie beschrieben und an Tag 6 Aktivierung mit den einzelnen TLR Liganden oder einer Kombination von Poly I:C und R-848. Nach 20 Stunden Stimulation und Austausch des TLR Ligand-haltigen Mediums durch frisches Medium, das keine TLR Liganden enthielt („Stimulus Removal“). Nach 20 weiteren Stunden Ernte der Überstände und Analyse der IL-6 Produktion (schwarze Balken) bzw. RANTES Sekretion (weisse Balken).

Von den Einzelstimuli war einzig Poly I:C in der Lage, trotz Entfernung des Stimulus die Sekretion grösserer Mengen von RANTES zu induzieren, die allerdings immer noch klar unter den induzierten Mengen der kombinierten Stimulierung beider TLRs lagen. IL-6 war bei beiden Einzelstimuli hingegen kaum noch detektierbar. Die

Überlegenheit des „Superstimulus“ zeigt sich hier in der Tatsache, dass die BMDCs, trotz Entfernung der beiden Stimuli zwanzig Stunden zuvor, in der Lage waren, grosse Mengen beider Mediatoren zu sezernieren. Gleiches gilt für IL-12p70 (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass die kombinierte Aktivierung von TLR3 und TLR7 die BMDCs unabhängig oder zumindest unabhängiger von der Dauer des TLR vermittelten Stimulierung.

5.4 „Superstimulierte“ BMDCs aktivieren transgene T-Zellen in vitro besser als einzeln TLR stimulierte BMDCs

Die nächsten Fragen ergaben sich nach diesen ersten hoffnungsvollen Beobachtungen nun zwangsläufig: Lassen sich die in vitro eindeutig robusteren Eigenschaften der BMDCs nach kombinierter TLR Ligation auch auf die T-Zell-Ebene und hier auf die Induktion überlegener Effektoreigenschaften übertragen? Zunächst wurden transgene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in vitro mit den unterschiedlich stimulierten BMDCs ko-kultiviert und die Proliferation durch Inkorporation von ³H-Thymidin gemessen, sowie Effektor-Zytokine bestimmt. In Abbildung 24 A ist die Proliferation von transgenen, über magnetische Säulchen aufgereinigten OT-2 CD4⁺ T-Zellen gezeigt, die in unterschiedlichen Verhältnissen mit den verschiedenen stimulierten, Peptid-beladenen (OVA₃₂₃₋₃₃₉) BMDCs kultiviert wurden. Die Kulturen wurden an Tag 3 über Nacht mit ³H-Thymidin versetzt und die Inkorporation des Radionuklids am nächsten Tag nach 18 Stunden mit einem β-Counter bestimmt. Man erkennt bei allen T-Zell zu DC Verhältnissen die höhere Proliferation der T-Zellen, die zusammen mit den „superstimulierten“ BMDCs kultiviert wurden im Vergleich zu den Ansätzen, in denen die BMDCs nur mit den jeweils einzelnen TLR Liganden stimuliert wurden. „Medium“ BMDCs sind wie erwartet nur in der Lage, Hintergrund Proliferation der T-Zellen zu induzieren. Um neben der Proferation noch eine weitere Eigenschaft der T-Zellen zu untersuchen, wurden Kultur-Überstände an Tag 3 entnommen und mittels eines ELISA die Produktion von IFN-γ bestimmt (Abbildung 24 B).

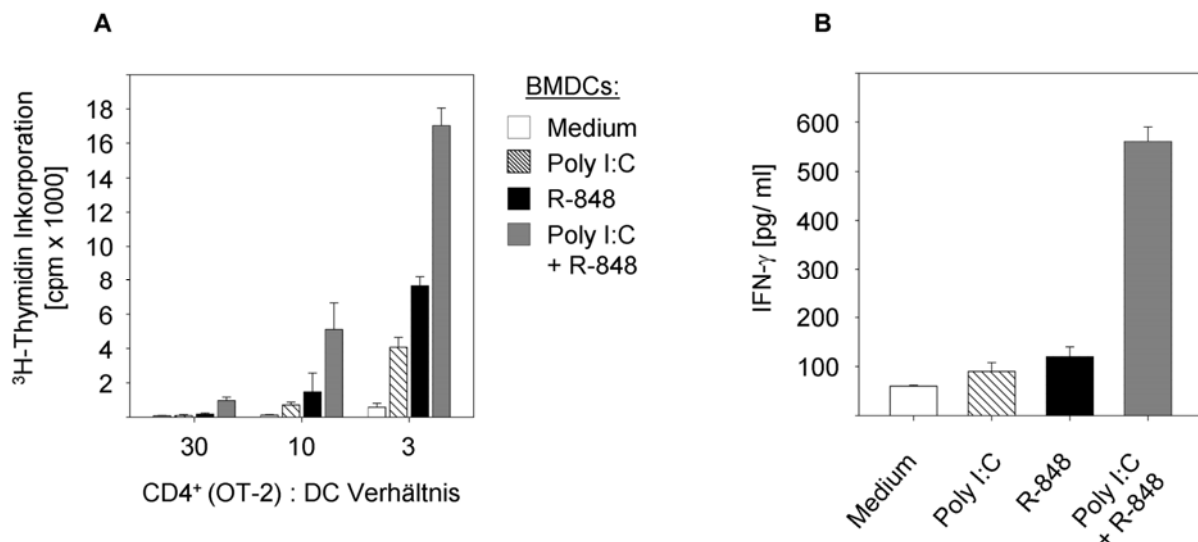


Abbildung 24. Erhöhte in vitro Proliferation und IFN- γ Produktion (ELISA) von transgenen CD4⁺ T-Zellen (OT-2) nach Aktivierung durch doppelt-stimulierte BMDCs.

A) Ko-Kultur von $7 \cdot 10^3$ über MACS aufgereinigten transgenen CD4⁺ T-Zellen aus OT-2 Mäusen mit drei verschiedenen Verhältnissen von unterschiedlich stimulierten, OVA₃₂₃₋₃₃₉ (0,3 μ M) beladenen BMDCs. An Tag 3 Markierung mit ³H-Thymidin (pro Well 0,5 μ Ci) und Analyse der Inkorporation des Radionuklids am nächsten Tag. **B)** Aufbau wie oben, Ko-Kultur von $5 \cdot 10^4$ transgenen CD4⁺ T-Zellen (OT-2) mit $3 \cdot 10^3$ OVA₃₂₃₋₃₃₉ beladenen, unterschiedlich stimulierten BMDCs und Ernte der Kulturüberstände nach 3 Tagen zur Analyse des IFN- γ Gehalts mittels ELISA.

Auch in diesem Experiment zeigt sich die Überlegenheit der „superstimulierten“ gegenüber den einzeln stimulierten BMDCs: T-Zellen, die mit Poly I:C und R-848 aktivierten, Peptid-beladenen BMDCs kultiviert wurden, sezernierten wesentlich mehr IFN- γ als die T-Zellen nach Kultur mit den einzeln stimulierten BMDCs. Dieses Ergebnis ist somit übereinstimmend mit einer Veröffentlichung, die eine T_{H1}-Polarisierung von humanen CD4⁺ T-Zellen in vitro nach Inkubation mit kombiniert-stimulierten BMDCs beschrieben hat (Napolitani et al. 2005).

In der Abbildung 25 sind die gleichen Experimente, die gerade für transgene CD4⁺ T-Zellen beschrieben wurden, mit über MACS-aufgereinigten transgenen CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Wie bei den Proliferationsansätzen mit den CD4⁺ T-Zellen werden auch die CD8⁺ T-Zellen zur stärksten Proliferation durch die doppelt TLR stimulierten BMDCs angeregt, bzw. produzieren mehr IL-2 im Vergleich zu den Ansätzen mit einzeln stimulierten BMDCs.

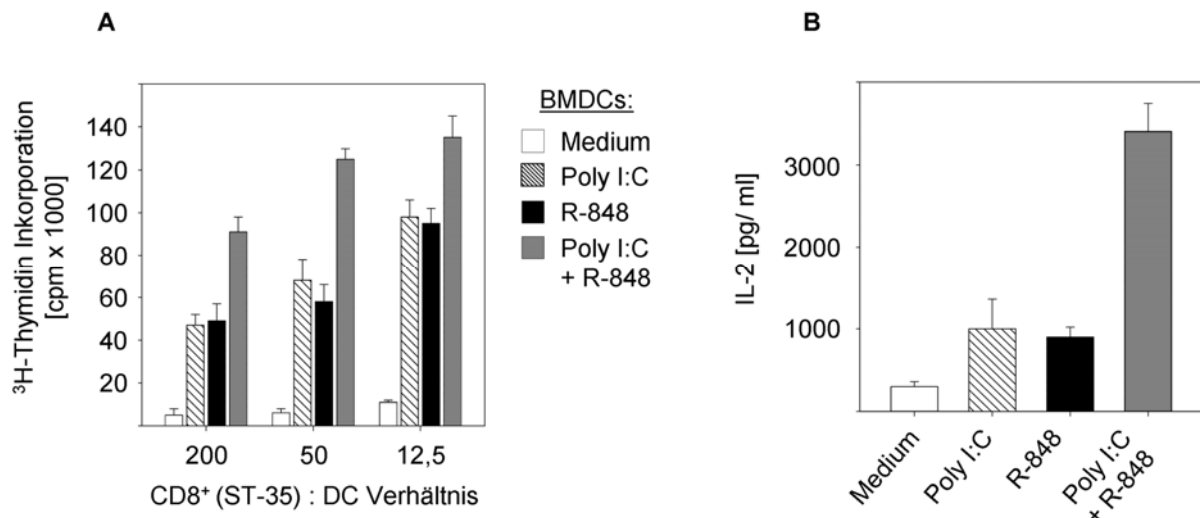


Abbildung 25. Erhöhte in vitro Proliferation und IL-2 Produktion (ELISA) von transgenen CD8⁺ T-Zellen (ST-42) nach Aktivierung durch doppelt-stimulierte BMDCs.

A) Ko-Kultur von $5 \cdot 10^4$ über MACS aufgereinigten transgenen CD8⁺ T-Zellen aus ST-42 Mäusen mit drei verschiedenen Verhältnissen von unterschiedlich stimulierten, E1a₂₃₄₋₂₄₅ (0,5 nM) beladenen BMDCs. Markierung mit ³H-Thymidin an Tag 3 (pro Well 0,5 µCi) und Analyse der Inkorporation des Radionuklids am nächsten Tag. **B)** Aufbau wie oben, Ko-Kultur von $5 \cdot 10^4$ CD8⁺ T-Zellen (ST-42) mit $1 \cdot 10^3$ E1a-beladenen, unterschiedlich stimulierten BMDCs, Abnahme der Kulturüberstände an Tag 2 und Analyse mittels ELISA auf IL-2 Produktion.

5.5 „Superstimulierte“ BMDCs aktivieren transgene T-Zellen nach adoptivem Transfer in vivo besser als einzeln TLR stimulierte BMDCs

Um die in vitro gemachten Beobachtungen der Überlegenheit auf T-Zell-Ebene auch auf ihre Relevanz in vivo zu überprüfen, wurden B6 Wild-Typ Mäuse mit OT-2 T-Zellen, die über einen kongenen Marker zu verfolgen sind, adoptiv transferiert und die Tiere danach mit Peptid-beladenen (OVA₃₂₃₋₃₃₉) BMDCs immunisiert, die zuvor sechs Stunden mit den entsprechenden TLR Liganden aktiviert worden waren. Die Dot-Blots in Abbildung 26 A) zeigen die Expansion der adoptiv transferierten CD90.1 positiven OT-2 CD4⁺ T-Zellen vier Tage nach der BMDC Immunisierung. Auch hier sind die „superstimulierten“ BMDCs am besten in der Lage, eine Expansion der transferierten transgenen CD4⁺ T-Zellen zu bewirken. Ein quasi identischer Versuchsaufbau wurde gewählt, um mit den verschieden stimulierten BMDCs auch transgene CD8⁺ T-Zellen in vivo zu aktivieren. Milzzellen von ST-35 Mäusen, deren T-Zellen transgen für ein adenovirales Epitop (E1a₂₃₄₋₂₄₅) sind und den kongenen

Marker CD45.1 tragen wurden adoptiv in B6 Wild-Typ Mäuse transferiert und am nächsten Tag mit den verschiedenen stimulierten und mit E1a-beladenen BMDCs immunisiert. Fünf Tage nach der Immunisierung wurde die Expansion und die ex vivo IFN- γ Produktion mittels Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie untersucht. Auch bei der in vivo Aktivierung der adoptiv transferierten transgenen CD8⁺ T-Zellen waren die BMDCs überlegen, die sechs Stunden mit beiden TLR Liganden gleichzeitig stimuliert worden waren. Die FACS Analyse in Abbildung 26 B) zeigt die Population der CD45.1 positiven CD8⁺ T-Zellen, also nur die transferierten ST-35 T-Zellen. Man erkennt leicht, dass der Prozentsatz an IFN- γ / CD44 positiven ST-35 T-Zellen in den Mäusen am höchsten ist, die mit den „superstimulierten“ BMDCs immunisiert worden sind.

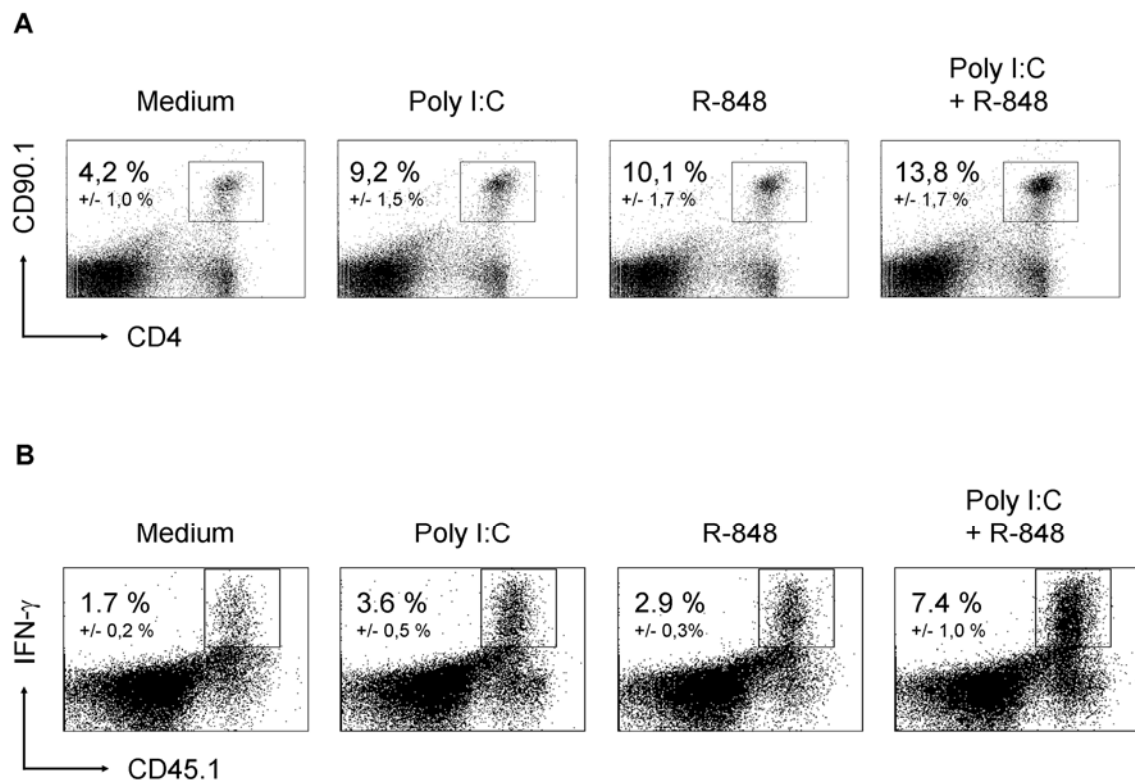


Abbildung 26. Erhöhte in vivo Proliferation von adoptiv transferierten transgenen CD4⁺ (OT-2) und CD8⁺ (ST-35) T-Zellen nach Immunisierung mit doppelt-stimulierten BMDCs.

Adoptiver Transfer von **A**) 1×10^6 Milzzellen aus OT-2 Mäusen (kongener CD90.1 Marker) bzw. **B**) 1×10^5 Milzzellen aus ST-35 Mäusen (kongener CD45.1 Marker) in B6 Rezipienten. Immunisierung (i.p.) der CD4⁺ T-Zell-transferierten Mäuse mit 3×10^5 unterschiedlich TLR-stimulierten (6h), OVA₃₂₃₋₃₃₉-beladenen BMDCs am Folgetag und Analyse der T-Zell-Expansion an Tag 4. Aktivierung der transferierten CD8⁺ T-Zellen mit 3×10^4 unterschiedlich TLR-stimulierten (6h), E1a₂₃₄₋₂₄₅-beladenen, BMDCs (i.p. injiziert) und Analyse der T-Zell-Proliferation sowie der ex vivo IFN- γ Produktion an Tag 5.

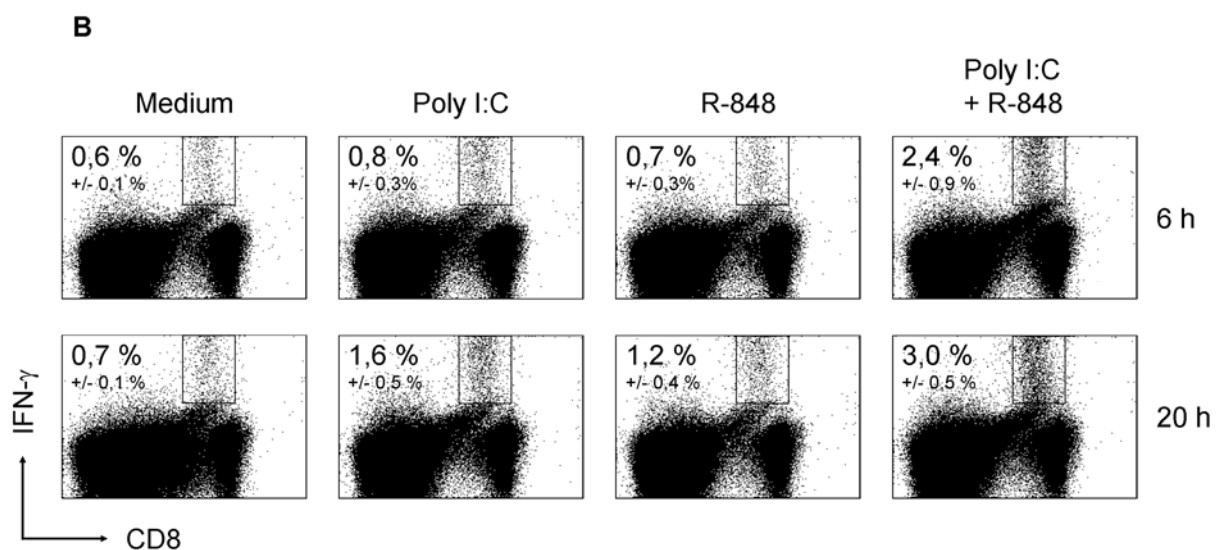
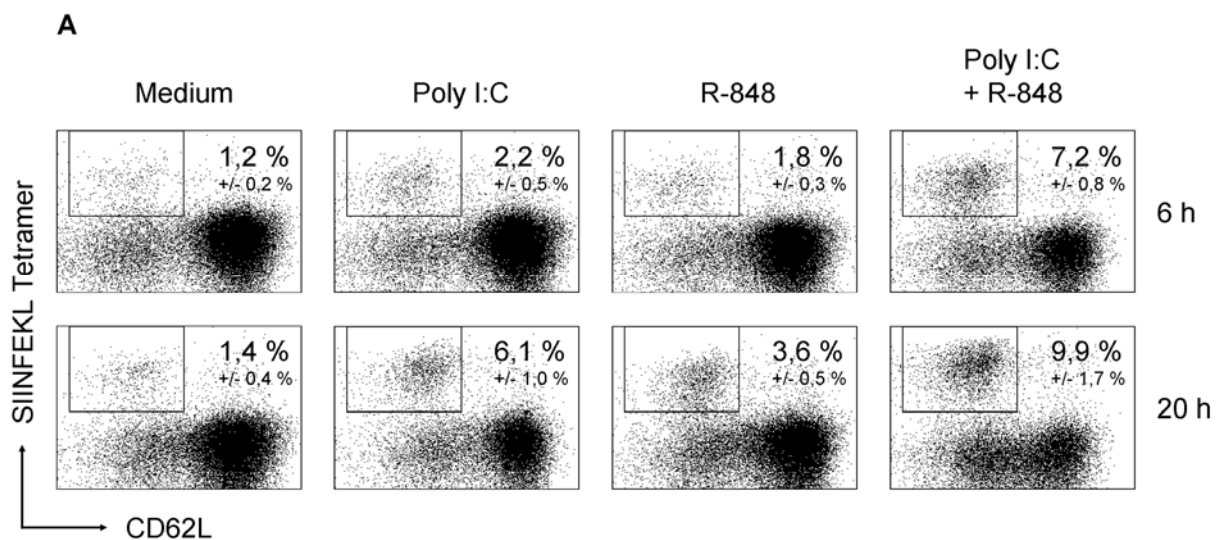
Die Ergebnisse aus den Abbildungen 24 bis 26 lassen somit den Schluss zu, dass die in vitro gemachten Beobachtungen bezüglich der „superstimulierten“ BMDCs sich erstens auch auf T-Zell-Ebene widerspiegeln und zweitens auch in transgenen in vivo Modellen reproduzieren lassen.

5.6 Überlegenes in vivo Priming von Wild-Typ CD8⁺ T-Zellen durch „superstimulierte“ BMDCs

In der nächsten Gruppe von Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob sich die in Abbildung 23 gezeigte schnellere Kinetik der Zytokinproduktion nach gleichzeitiger Stimulierung von TLR3 und TLR7 auch in besserer Induktion einer T-Zell-Antwort in vivo übertragen lässt. Hierzu sollten BMDCs für Immunisierungen verwendet werden, die unterschiedlich lange mit den jeweiligen Stimuli kultiviert worden sind. Zweitens sollte diese Fragestellung in einem Wild-Typ System, d.h. ohne vorherigen adoptiven Transfer von transgenen T-Zellen bearbeitet werden, um letztendlich die biologische Relevanz der gemachten Beobachtungen zu demonstrieren und die Bezeichnung „Superstimulus“ zu rechtfertigen. Gruppen von jeweils fünf B6 Wild-Typ Mäusen wurden also mit Peptid-beladenen (SIINFEKL) Tag 6 BMDCs immunisiert, die vorher entweder sechs Stunden oder zwanzig Stunden mit den Einzel- oder kombinierten Stimuli versetzt worden waren. 7 Tage nach Immunisierung wurden die Tiere geblutet, um mit spezifischen Tetrameren den Prozentsatz der Peptid-spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Blut zu bestimmen. Die erste Effektorfunktion, die in den jeweiligen Versuchsgruppen daneben untersucht wurde, ist die ex vivo Produktion von IFN- γ . Hierfür wurden die Tiere an Tag 7 der Immunisierung mit CO₂ getötet und die Milzen entnommen. Mit den Einzelzellsuspensionen der Milzen wurden vier- bis sechsstündige Restimulations-Kulturen angesetzt, die in je zwei Ansätze aufgeteilt wurden: Der eine Ansatz erhielt als Kulturzusatz erneut das antigene Peptid; der andere (Negativ-Kontroll-) Ansatz erhielt kein oder ein irrelevantes Peptid. Beiden Kulturen wurde jeweils Brefeldin A zugesetzt, um die Abschnürung von Vesikeln des Golgi-Apparates und somit die Sekretion von Zytokinen zu verhindern. Nach den vier bis sechs Stunden mit dem antigenen Peptid sind die Effektorzytokine (z.B. IFN- γ oder IL-2) im Zellinneren der T-Zellen derart angereichert, dass sie mit einer intrazellulären Antikörperfärbung

detektiert werden können. Die zweite Effektorfunktion, die untersucht wurde, ist die *in vivo* lytische Kompetenz der durch die Immunisierung aktivierten CD8⁺ T-Zellen. Dieser Versuch ersetzt seit einiger Zeit den klassischen ⁵¹Cr-Freisetzungssassay und bietet mehrere Vorteile gegenüber dem über lange Jahre verwendeten Verfahren, die lytischen Eigenschaften von Peptid-spezifischen T-Zellen zu untersuchen. Zu den offensichtlichen Vorteilen gehört erstens, dass keine *in vitro* Restimulation der zu analysierenden T-Zellen nötig ist, da der *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay, wie der Name bereits andeutet, direkt in den immunisierten Tieren stattfindet. Man kann zweitens in einem Tier direkt Spezifität (über Peptid-spezifische Tetramere), IFN- γ Produktion (s.o.), Aktivierungsmarker und lytische Eigenschaften korrelieren und drittens ist der Assay nicht-radioaktiv, wodurch sich potentielle Kontaminationen vermeiden lassen. Für den *in vivo* Zytotoxizitäts-Assay wird den Tieren abends an Tag 7 nach BMDC Immunisierung ein 1:1 Verhältnis zweier Populationen von CFSE markierten Milzzellen syngener Donor-Tiere intravenös injiziert. Die CFSE^{lo}-Population wurde zuvor mit dem spezifischen Peptid gepulst während die CFSE^{hi}-Population mit einem irrelevanten Peptid versetzt bzw. nicht behandelt wurde. Durch dieses Prozedere stellt man quasi „natürliche“ Zielzellen (CFSE^{lo} + Peptid) und eine intrinsische Negativkontrolle (CFSE^{hi} – Peptid bzw. + irrelevantes Peptid) für die T-Zellen bereit, die man 7 Tage zuvor durch die spezifische BMDC Immunisierung aktiviert hat. Die genaue Beschreibung dieses so genannten „*In vivo* Zytotoxizitäts-Assays“ ist dem Teil „Material & Methoden“ zu entnehmen. Die Populationen der Zielzellen und der Kontrollzellen bleiben über Nacht in den zu untersuchenden Tieren und das Verhältnis von Ziel- zu Kontrollzellen wird nach ca. 18 Stunden durch Töten der Tiere und Prozessierung der Milzen durchflusszytometrisch analysiert. Das Verhältnis der beiden Populationen zueinander ist ein direktes Mass für die Quantität und Qualität der durch die Immunisierung aktivierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen und sollte folglich zugunsten der Kontrollzellen abnehmen, wenn die Immunisierung erfolgreich war bzw. gleich bleiben, wenn wenige oder keine spezifischen T-Zellen aktiviert werden konnten. Die Abbildung 27 A) bis C) stellt die Ergebnisse dieser Wild-Typ Versuche zusammen. Die jeweils obere Reihe zeigt den Mittelwert aus einer Gruppe von fünf Tieren (mit Standardabweichung), die mit BMDCs immunisiert wurden, die nur sechs Stunden mit den TLR Liganden aktiviert worden sind. Die untere Reihe von Dot-Blots zeigt jeweils die Analyse der Mäuse, die mit BMDCs immunisiert wurden, die zuvor zwanzig Stunden mit den Stimuli kultiviert worden sind. In

Abbildung 27 A) sind die Tetramer-Daten aufgeführt, in Abbildung 27 B) zeigt die ex vivo IFN- γ Produktion und Abbildung 27 C) die Ergebnisse des in vivo Zytotoxizitäts-Assays. Man kann in Abbildung 27 A) (als „Gate“ wurden lebendige, d.h. PI-negative, CD8⁺ T-Lymphozyten gewählt) gut erkennen, dass BMDCs, die nur sechs Stunden mit Poly I:C oder R-848 stimuliert worden sind, nur unwesentlich mehr SIINFEKL-spezifische T-Zellen aktiviert haben als die Medium Kontrolle (2,2 % \pm 0,5 % und 1,8 % \pm 0,3 % bei Poly I:C und R-848 gegenüber 1,2 % \pm 0,2 % bei Medium BMDCs).



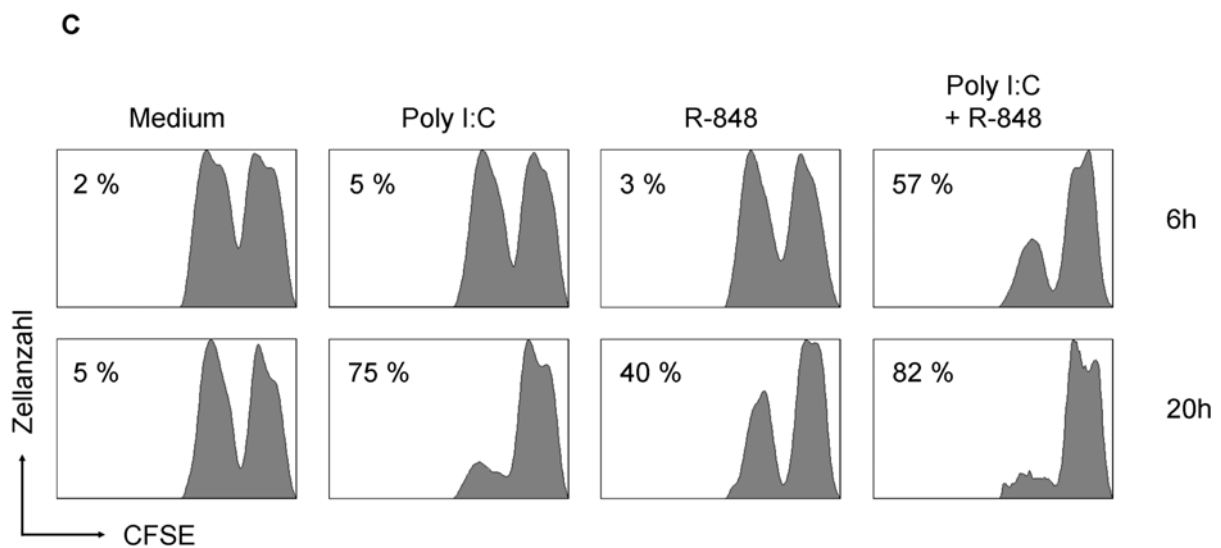


Abbildung 27. Die Immunisierung mit TLR3 und TLR7 doppelt-stimulierten, Peptid-beladenen BMDCs resultiert in einem überlegenen in vivo Priming in Wild-Typ Mäusen.

Ausreifung der BMDCs wie beschrieben und an Tag 6 Aktivierung mit den einzelnen TLR Liganden oder einer Kombination von Poly I:C und R-848 für 6 bzw. 20 Stunden bzw. keine Stimulation. Anschliessend ein-stündige Beladung mit 100nM SIINFEKL und Injektion von je $3 \cdot 10^5$ BMDCs i.p. in Wild-Typ Mäuse (B6). 7 Tage nach der Immunisierung Vergleich der induzierten CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen SIINFEKL in den verschiedenen Ansätzen. **A)** Aktivierte (CD62L^{lo}), SIINFEKL-Tetramer positive (SIINFEKL-spezifische) CD8⁺ T-Zellen **B)** Ex vivo i.c. IFN- γ Produktion der induzierten CD8⁺ T-Zellen nach sechsstündiger in vitro Restimulation. **C)** In vivo Zytotoxizität der induzierten CD8⁺ T-Zellen.

Betrachtet man hingegen den Wert der Gruppe, die mit den „superstimulierten“ BMDCs immunisiert wurde, ist auch hier die starke Überlegenheit der gleichzeitig über TLR3 und TLR7 aktivierten BMDCs sofort offensichtlich: Drei- bis vier Mal (7,2 % +/- 0,8 %) so viele CD8⁺ T-Zellen sind spezifisch für das SIINFEKL Peptid und weisen parallel einen aktivierten Phänotyp auf, erkennbar am „Shedding“ des CD62L Oberflächenmarkers. Nicht gezeigt aber erwähnt werden soll, dass die Zellen zusätzlich einen CD44^{hi} Phänotyp aufwiesen. Wurden die BMDCs vor der Immunisierung über Nacht (zwanzig Stunden) mit den jeweiligen Liganden stimuliert, so relativierten sich die Prozentzahlen für die spezifischen T-Zellen etwas, die Tendenz blieb jedoch erhalten. Fast identisch sieht das Bild aus, wenn man in Abbildung 27 B) die ex vivo IFN- γ Produktion analysiert. BMDCs, die lediglich sechs Stunden mit den Stimuli aktiviert wurden, induzieren fast genau gleich viele/ wenige CD8⁺ T-Zellen, die durchflusszytometrisch positiv für das Effektorzytokin IFN- γ sind

wie die Medium Kontrolle. Wiederum sind die Werte in der Gruppe signifikant höher, die mit „superstimulierten“ BMDCs immunisiert worden ist: Wie im Falle der Tetramer-Färbung sind es auch bei der ex vivo IFN- γ Analyse drei- bis vier Mal so viele Zellen wie bei den einzel-stimulierten BMDCs. Auch hier steigen die Werte mit der Dauer der BMDC Aktivierung an, erreichen jedoch selbst dann nicht den Wert der doppelt-stimulierten BMDCs. In Abbildung 27 C) ist die zweite untersuchte Effektoreigenschaft der durch Immunisierung aktivierten CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Die Daten für die spezifische in vivo Lyse spiegeln im Wesentlichen die eben beschriebenen Aussagen wider. Unstimulierte bzw. sechs Stunden mit Poly I:C oder R-848 einzeln-aktivierte, Peptid-beladene BMDCs können in diesem Experiment überhaupt keine in vivo Zytotoxizität induzieren, wohingegen „superstimulierte“ BMDCs einen Wert von fast 60 % erreichen. Die 20 Stunden Werte gleichen sich wie erwartet wieder etwas an, erreichen jedoch auch hier nicht ganz den Wert der doppelt-stimulierten BMDCs. Diese Daten sind zusammengefasst sehr klar und eindeutig und machen deutlich, dass sich die überlegenden BMDC Eigenschaften nach „Superstimulierung“ auch in vivo und sogar in Wild-Typ Immunisierungen in einer potenteren T-Zell-Antwort manifestieren.

5.7 „Superstimulierte“ BMDCs und ihr Einfluss auf T_{reg} -vermittelte Suppression von T-Zell-Proliferation und -Aktivierung

Nachdem die Eigenschaften von „superstimulierten“ BMDCs in vitro charakterisiert wurden und diese Beobachtungen auch auf die T-Zell-Ebene, in vitro, in vivo, in transgenen Modellen sowie in Wild-Typ Mäusen übertragen werden konnten, sollte abschliessend ein möglicher Mechanismus für die anscheinend überlegenen Charakteristika der BMDCs untersucht werden. Pasare und Medzhitov veröffentlichten hierzu bereits 2003, dass TLR-aktivierte BMDCs in der Lage sind, die Suppression von T-Zell-Aktivierung durch Regulatorische T-Zellen in einem gewissen Rahmen zu verhindern bzw. die T-Zellen sozusagen refraktär gegen eine T_{reg} -vermittelte Suppression zu machen (Pasare and Medzhitov 2003). Um in diesem Zusammenhang den Einfluss von kombinierter TLR3 und TLR7 Stimulierung zu untersuchen, wurde Tag 6 BMDCs sechs Stunden mit den jeweiligen Liganden inkubiert, diese dann durch Waschen entfernt und die BMDCs im folgenden mit

Peptid beladen. Diese BMDCs dienen dann als APCs in Ko-Kulturen von transgenen CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen mit in vitro über anti-CD3/ anti-CD28 vor-aktivierten CD4⁺ CD25⁺ Regulatorischen T-Zellen (pre-T_{regs}). An Tag 3 wurden die Proliferationskulturen über Nacht mit ³H-Thymidin versetzt und die Inkorporation des Radionuklids am nächsten Tag ausgelesen. In Abbildung 28 A) ist die Proliferation von OT-2 T-Zellen dargestellt, die mit (schwarze Balken) bzw. ohne pre-T_{regs} (weisse Balken) und den verschiedenen stimulierten BMDCs kultiviert wurden; Abbildung 28 B) zeigt das identische Experiment mit transgenen ST-42 CD8⁺ T-Zellen. Betrachtet man die Ansätze mit Medium-BMDCs, erkennt man sofort den supprimierenden Einfluss der voraktivierten T_{regs}: Gibt man sie zu Kulturen von T-Zellen und Medium BMDCs, so wird die Proliferation der T-Zellen zu 90 bis 95 % gehemmt. Im Falle der transgenen OT-2 CD4⁺ T-Zellen sind nicht einmal Poly I:C oder R-848 stimulierte BMDCs in der Lage, die Hemmung auch nur ansatzweise zu durchbrechen und die T-Zellen so zu stimulieren, dass sie nennenswert proliferieren. Für die transgenen CD8⁺ T-Zellen sieht das Bild ganz ähnlich aus, die TLR3 oder TLR7 einzeln-stimulierten BMDCs können die Suppression jedoch nur zum Teil durchbrechen. Fast komplett unbeeindruckt von der Präsenz der Regulatorischen T-Zellen zeigen sich diejenigen Ko-Kulturen, die mit „superstimulierten“ BMDCs versetzt worden sind. Die Proliferation der transgenen OT-2 CD4⁺ T-Zellen ist identisch mit dem Ansatz ohne pre-T_{regs} und die transgenen CD8⁺ T-Zellen sind ebenfalls refraktär gegenüber einer Suppression durch pre-T_{regs}, wenn sie von BMDCs aktiviert werden, die über beide TLRs stimuliert wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass mit „superstimulierten“ BMDCs aktivierten T-Zellen mehr oder weniger - zumindest eindeutig weniger - empfindlich gegenüber einer Suppression durch CD4⁺ CD25⁺ T_{regs} sind, was ebenfalls ein Hinweis auf die Überlegenheit dieser BMDCs in den in vivo Modellen sein könnte. Da die Inkorporation von ³H-Thymidin nur Auskunft über die Proliferation des gesamten Wells gibt, wurden zusätzlich Proliferations-Ansätze durchgeführt, denen nicht ³H-Thymidin zugesetzt wurde. Vielmehr wurden die Wells der Ko-Kulturen an den Tagen 1, 2 oder 3 geerntet, um die T-Zellen durchflusszytometrisch untersuchen zu können. Besonders sollte die Expression der Aktivierungsmarker und hier vor allem CD25 als Teil des IL-2 Rezeptors analysiert werden.

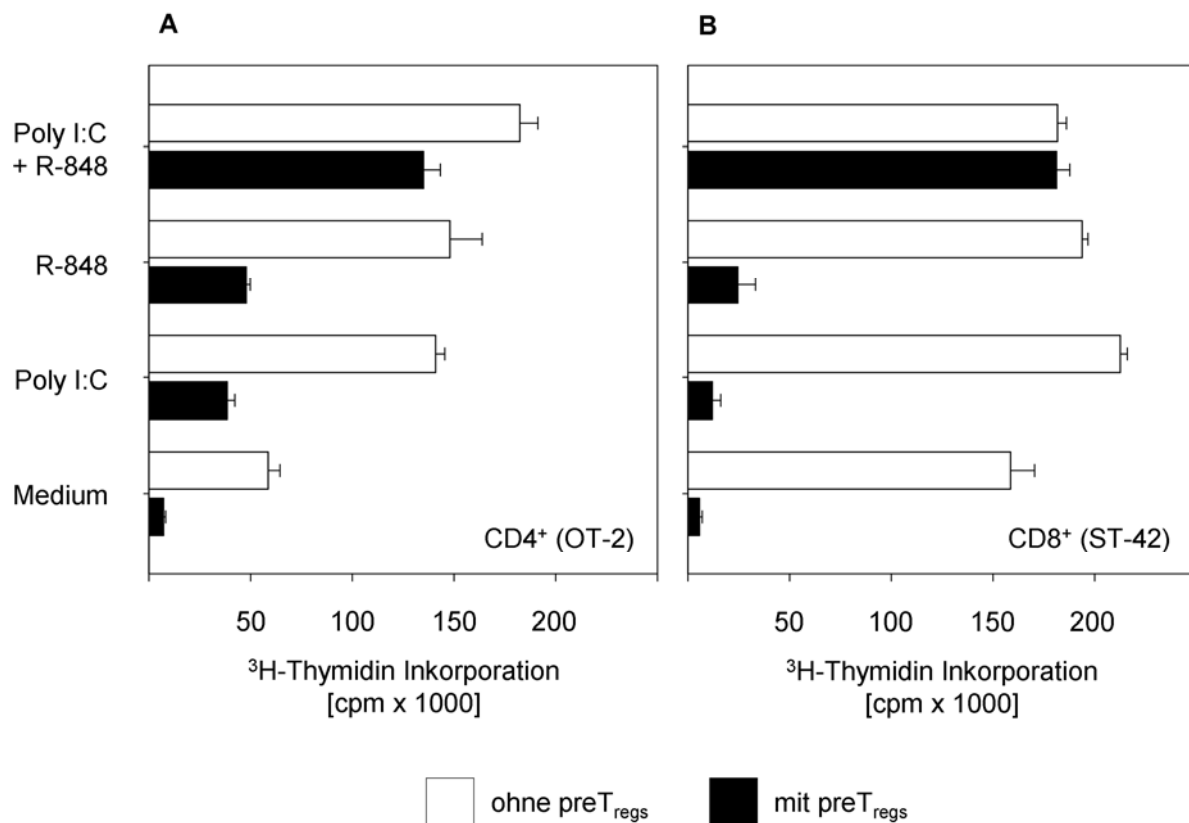


Abbildung 28. Über TLR3 und TLR7 doppelt stimulierte BMDCs können *in vitro* die von CD4⁺ CD25⁺ T_{regs}-vermittelte Suppression der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zell-Proliferation durchbrechen.

A) Ko-Kultur von $5 \cdot 10^4$ über MACS aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen mit $5 \cdot 10^4$ über MACS aufgereinigten, via anti-CD3/ anti-CD28 voraktivierten CD4⁺CD25⁺ T_{regs} und $5 \cdot 10^3$ unterschiedlich stimulierten BMDCs (6 h). Markierung des Suppressions-Ansatzes an Tag 3 mit $0,5 \mu\text{Ci}$ ³H-Thymidin pro Well und Analyse der inkorporierten Radioaktivität 18 Stunden später. **B)** Aufbau genau wie oben, mit $5 \cdot 10^4$ über MACS aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen aus transgenen ST-42 Mäusen. Beladung der BMDCs vor Zugabe zu der Kultur mit $0,5 \text{ nM}$ E1a₂₃₄₋₂₄₅. Markierung des Ansatzes an Tag 3 und Analyse wie oben beschrieben.

Man erkennt in Abbildung 29 in den Ansätzen mit pre-T_{regs} den starken Einfluss, den die Regulatorischen T-Zellen auf die Expression der Aktivierungsmarker haben. Selbst in den Wells, in denen „superstimulierte“ BMDCs vorliegen, sind nur wenig mehr Zellen positiv für CD25 bzw. negativ für CD62L als in den Wells mit einzeln-stimulierten BMDCs. Werden die Regulatorischen T-Zellen erheblich verdünnter eingesetzt, erkennt man die bekannte Tendenz in den verschiedenen Ansätzen: Die „superstimulierten“ BMDCs sind noch am ehesten in der Lage, die Aktivierungsmarker auf den T-Zellen hoch- bzw. runter zu regulieren.

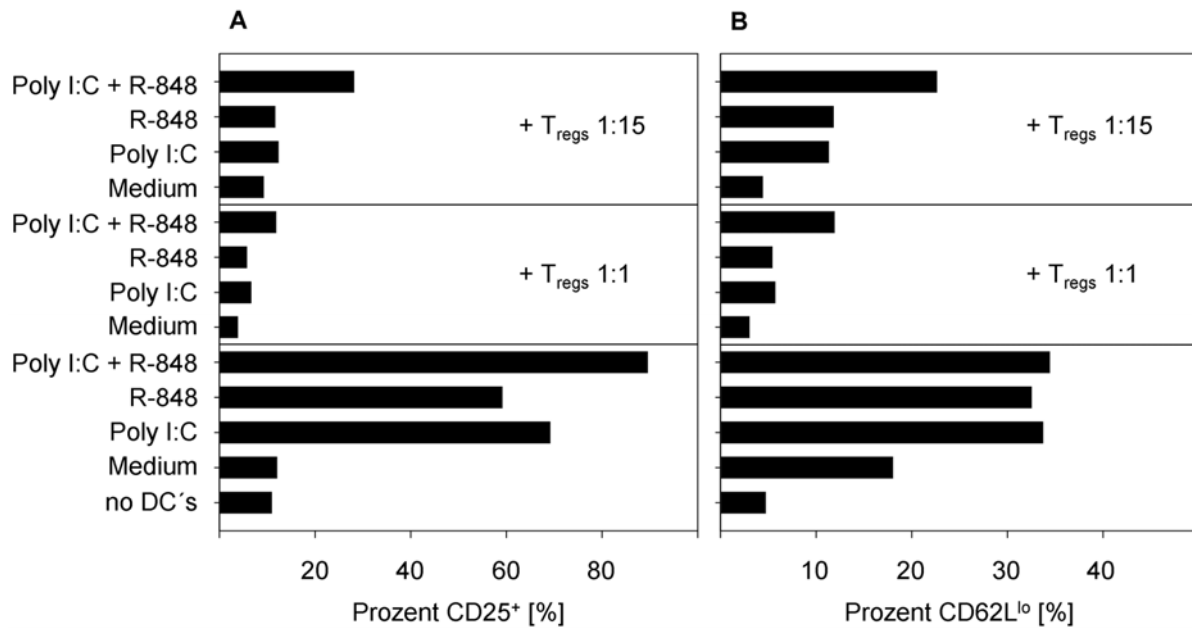


Abbildung 29. Über TLR3 und TLR7 doppelt stimulierte BMDCs können in vitro die von CD4⁺ CD25⁺ T_{regs}-vermittelte Suppression der CD4⁺ T-Zell-Aktivierung durchbrechen.

Ko-Kultur von $2 \cdot 10^4$ über MACS aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen (OT-2) mit verschiedenen Verhältnissen von über MACS-aufgereinigten, via anti-CD3/ anti-CD28-voraktivierten CD4⁺CD25⁺ pre-T_{regs} und $2 \cdot 10^3$ unterschiedlich stimulierten (6 h), mit $0,5 \mu\text{M}$ OVA₃₂₃₋₃₃₉-beladenen BMDCs. Zugabe von anti-CD3 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$) als Stimulus für die pre-T_{regs}. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker **A)** CD62L und **B)** CD25 an Tag 2 der Ko-Kultur.

Abbildung 30 zeigt eine identische Ko-Kultur mit transgenen ST-35 CD8⁺ T-Zellen. Auffällig ist hier, dass bereits ohne pre-T_{regs} die Prozentzahl der T-Zellen, die CD25 exprimieren bei den Ansätzen mit den „superstimulierten“ BMDCs deutlich höher ist, als bei den Poly I:C oder R-848 einzel-stimulierten BMDCs. Gibt man pre-T_{regs} zu den Wells bzw. titriert diese dann aus, weisen jeweils die Ansätze die am besten aktivierten T-Zellen auf, die mit den „superstimulierten“ T-Zellen kultiviert worden sind. Analog zu CD25 gilt dies auch für CD62L^{lo}. Im Falle der CD8⁺ Ko-Kulturen gelang an Tag 1 zusätzlich eine Antikörperfärbung gegen CD25 und IL-2, welches als direkt nach der T-Zell-Aktivierung produziertes Zytokin entscheidend für die Initiierung der T-Zell-Proliferation ist. Wie in Abbildung 30 C) zu sehen spiegelt sich auch in diesem Versuch die Überlegenheit der „superstimulierten“ BMDCs in einer höheren Prozentzahl von CD25/ IL-2 doppelt-positiven CD8 T-Zellen wider.

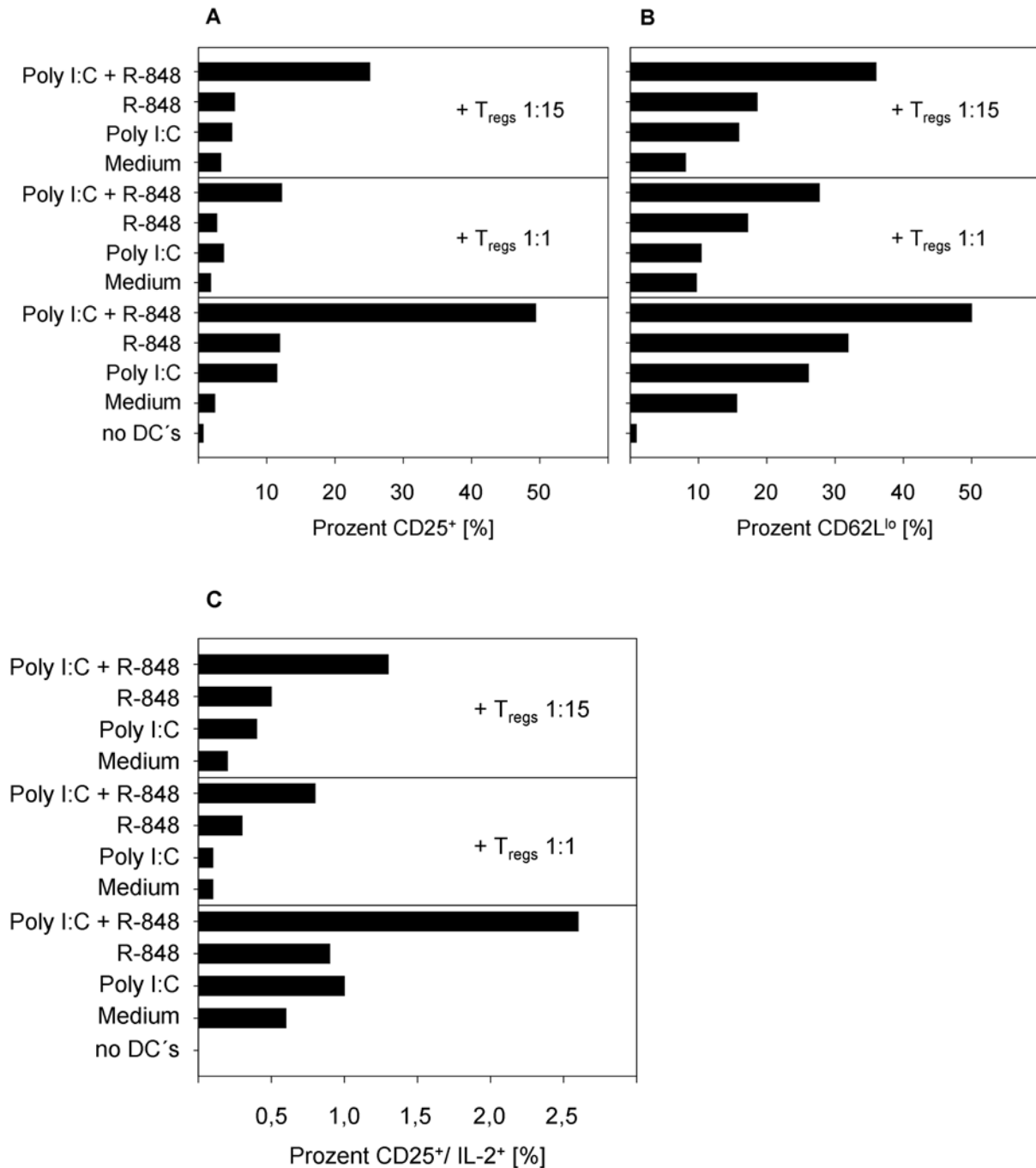


Abbildung 30. Über TLR3 und TLR7 doppelt stimulierte BMDCs können in vitro die von CD4⁺ CD25⁺ T_{regs}-vermittelte Suppression der CD8⁺ T-Zell-Aktivierung durchbrechen.

Ko-Kultur von $2 \cdot 10^4$ über MACS aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen mit verschiedenen Verhältnissen von über MACS-aufgereinigten, via anti-CD3/ anti-CD28-voraktivierten CD4⁺CD25⁺ pre-T_{regs} und $2 \cdot 10^3$ unterschiedlich stimulierten (6 h), mit 0,5 nM E1a₂₃₄₋₂₄₅-beladenen BMDCs. Zugabe von anti-CD3 (2 µg/ ml) als Stimulus für die pre-T_{regs}. Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker **A)** CD62L und **B)** CD25 an Tag 2 der Ko-Kultur, bzw. **C)** von intrazellulärem IL-2 an Tag 1 der Ko-Kultur.

Die mit Hilfe der FACS Analyse gewonnenen (qualitativen) Erkenntnisse bezüglich der Aktivierungsmarker auf den T-Zellen konnte abschliessend durch einen (quantitativen) ELISA gegen IL-2 bestätigt werden, der mit Überständen der T-Zell/ pre-T_{reg}/ BMDC Kulturen durchgeführt wurde. In Abbildung 31 ist das Ergebnis dieses ELISA gezeigt.

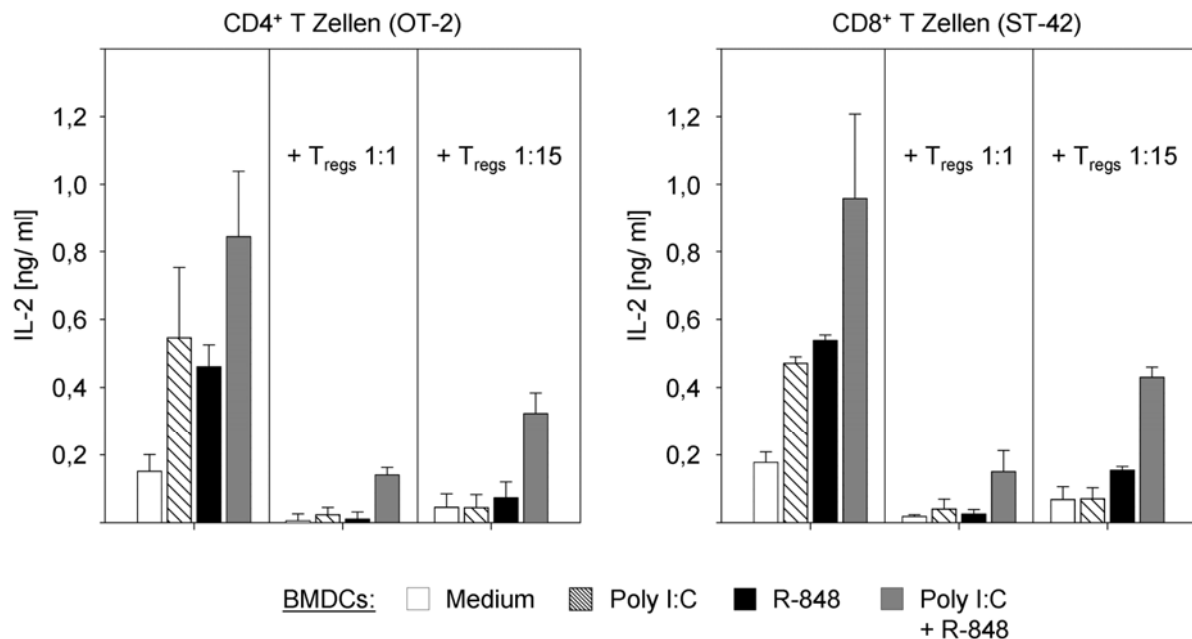


Abbildung 31. Über TLR3 und TLR7 doppelt stimulierte BMDCs können in vitro die von CD4⁺ CD25⁺ T_{regs}-vermittelte Suppression der IL-2 Produktion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen rückgängig machen.

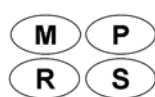
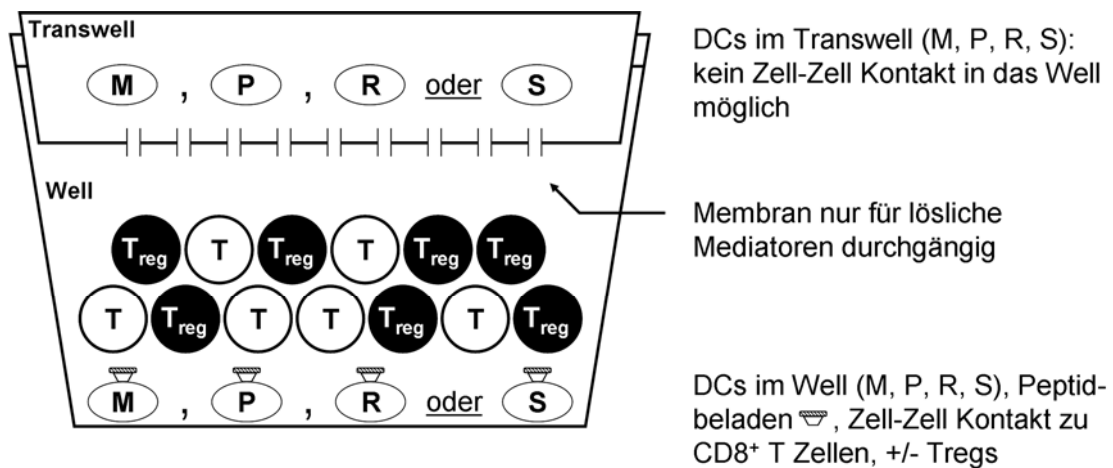
Ko-Kultur von 2×10^4 über MACS-aufgereinigten **A**) CD4⁺ T-Zellen (OT-2), bzw. **B**) CD8⁺ T-Zellen (ST-42) mit verschiedenen Verhältnissen von über MACS-aufgereinigten, via anti-CD3/ anti-CD28-voraktivierten CD4⁺CD25⁺ T_{regs} und 2×10^3 unterschiedlich stimulierten (6 h), Peptid-beladenen BMDCs. Zugabe von anti-CD3 (2 µg/ ml) als Stimulus für die pre-T_{regs}-Ernte des Kulturüberstandes und IL-2 ELISA an Tag 2 der Ko-Kultur.

Wie erwartet sind in den Ansätzen die jeweils grössten Mengen von IL-2 zu detektieren, in denen die „superstimulierten“ BMDCs anwesend waren. Dass heisst, dass sowohl qualitative (mehr IL-2 positive Zellen im FACS) als auch quantitative (mehr IL-2 im ELISA) Unterschiede zwischen den verschiedenen T-Zell/ BMDC Ansätzen detektiert werden konnten und die „superstimulierten“ BMDC den einzeln-stimulierten BMDCs überlegen waren.

5.8 Ein löslicher Faktor, sezerniert von „superstimulierten“ BMDCs, ist für die Durchbrechung der T_{reg} -vermittelten Suppression verantwortlich

Aufgrund der Publikation von Pasare und Medzhitov war bekannt, dass vermutlich IL-6 und ein noch zu identifizierender Faktor „X“ für die Eigenschaft von TLR-aktivierten BMDCs verantwortlich ist, T-Zellen gegenüber regulatorischen T-Zellen refraktär zu machen. Alternativ könnte man sich vorstellen, dass die TLR-stimulierten BMDCs ihren positiven Einfluss entweder über fortwährende Zell-Zell Kontakte zu den T-Zellen geltend machen oder aber durch Zell-Zell Kontakte auf die T_{regs} einwirken und deren hemmende Wirkung so unterbinden. Um diese Frage im Hinblick auf den „Superstimulus“ zu beantworten, wurde ein so genanntes „Transwell“ System eingesetzt, welches dem Experimentator erlaubt, Zell-Zell Kontakte zwischen bestimmten Zell-Populationen zuzulassen, während andere ausgeschlossen werden können. Es sollte geklärt werden, ob im Falle der „superstimulierten“ BMDCs ein löslicher Faktor für die Durchbrechung der Suppression durch die T_{regs} verantwortlich ist. Die Abbildung 32 erklärt schematisch den komplexen Aufbau dieses Experiments: Im Well selbst sind immer die transgenen T-Zellen präsent, deren Proliferation man untersuchen möchte, dazu kommen als antigenpräsentierende Zellen die über sechs Stunden verschieden TLR stimulierten Tag 6 BMDCs, die mit dem antigenen Peptid beladen sind und voraktivierte T_{regs} . Da sowohl die Antigenpräsentation als auch die Suppression durch T_{regs} Kontakt-abhängig ist, ist die Präsenz dieser beiden Zell-Spezies im Well vorgegeben. Bezogen wird die jeweilige T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von pre- T_{regs} auf ein Well ohne pre- T_{regs} , dargestellt in Abbildung 33 A) bis D) mit den jeweils linken Balken. Nachdem die Wells mit den drei Zellpopulationen fertig pipettiert sind (Gesamtvolumen ca. 100 – 120 μ l), wird vorsichtig das „Transwell“ auf die Mediumoberfläche der Wells gesetzt. Das „Transwell“ ist mit einer Membran ausgestattet, die Poren von etwa 4 μ m Grösse aufweist und somit lediglich lösliche Mediatoren passieren lässt. In dieses „Transwell“ werden in 50 μ l wiederum Tag 6 BMDCs pipettiert, die sechs Stunden mit den verschiedenen Stimuli aktiviert worden sind. Der Stimulus wurde vorher nach den sechs Stunden Inkubation durch ausgiebiges Waschen entfernt, um Verschleppung der aktivierenden TLR-Liganden in das Experiment zu verhindern; eine anschliessende Peptidbeladung musste nicht erfolgen, da die BMDCs ja keinen Zell-Zell Kontakt zu den T-Zellen im Well haben und nur als potentielle Quelle für

lösliche Mediatoren dienen sollen. Der komplexe Versuch ist somit grob in vier Untergruppen unterteilt, je nachdem, welche BMDC-Spezies im Well als antigenpräsentierende und damit primär T-Zell-aktivierende Zelle vorliegt (Medium-BMDC:E1a, Poly I:C-BMDC:E1a, R848:E1a, „Superstimulus“-BMDC:E1a). Ein Kontroll-Triplikat erhält zudem weder pre-T_{regs} noch BMDCs im Transwell, um die Basis-Proliferation der T-Zellen im Well mit der gegebenen BMDC-Spezies messen zu können (s.o., „Bezugs-Proliferation“). Im Folgenden werden alle anderen Wells mit preT_{regs} versetzt und in das „Transwell“ (oben) jeweils Medium-, PolyI:C-, R-848-, oder „superstimulierte“ BMDCs pipettiert.



BMDCs, unstimuliert („M“), bzw. 6 Stunden stimuliert mit Poly I:C („P“), R-848 („R“) oder Poly I:C + R-848 („Superstimulus“, „S“),
☹ Peptid-beladen



über MACS aufgereinigte CD8⁺ T Zellen (ST-42)



2 Tage in vitro via α CD3/ α CD28 voraktivierte CD4⁺/ CD25⁺ T_{reg} Zellen

Abbildung 32. Modell des Transwell-Experiments.

Auf diese Art und Weise kann man denn potentiellen Einfluss löslicher Botenstoffe aus den verschiedenen „Transwell“-BMDCs auf die Proliferation der T-Zellen bei gleichzeitiger Anwesenheit von pre-T_{regs} untersuchen.

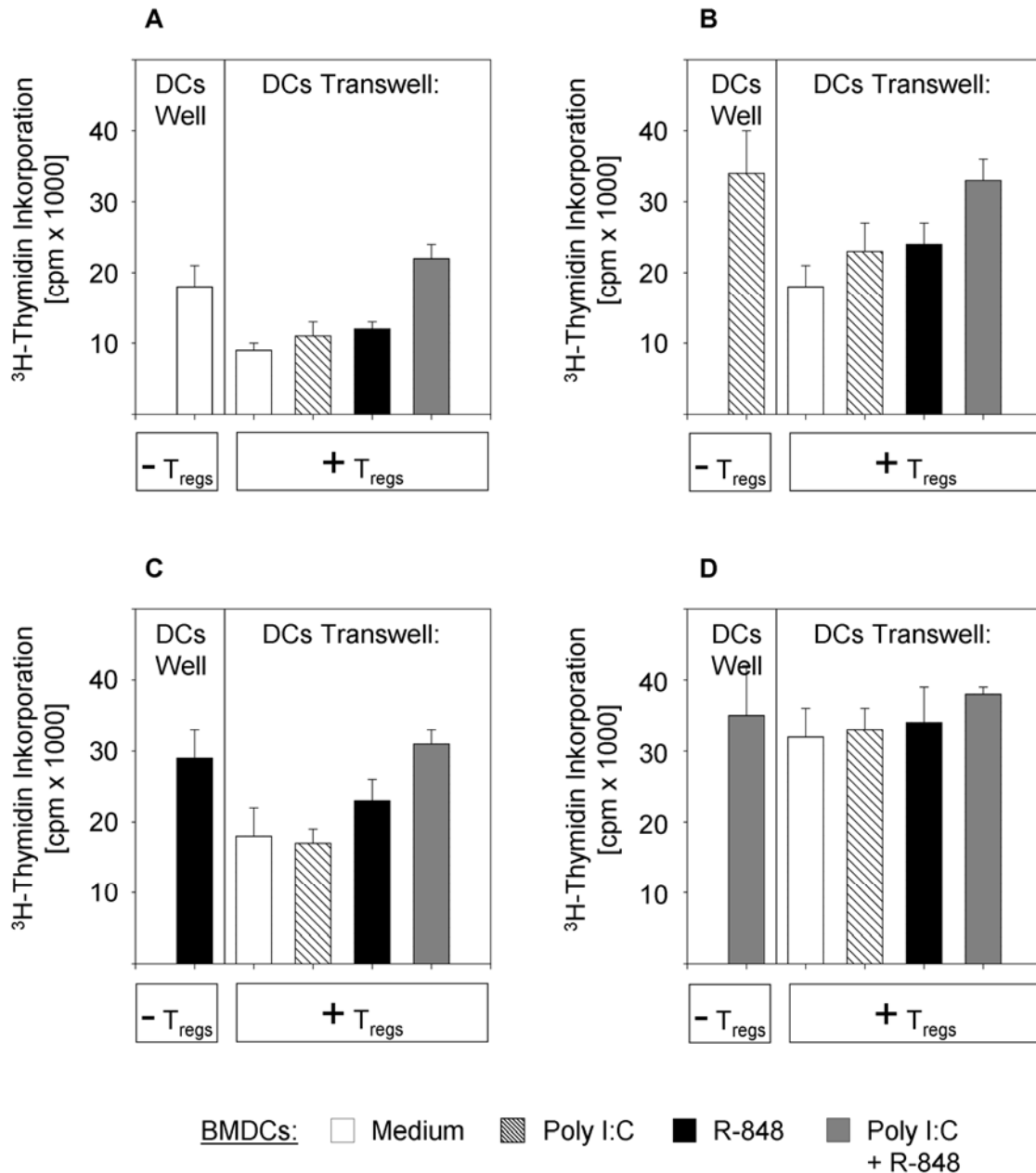


Abbildung 33. Ein löslicher Faktor, sezerniert von via TLR3 und TLR7 doppelt-stimulierten BMDCs, ist für die Durchbrechung der Suppression der T-Zell-Proliferation durch pre-T_{regs} verantwortlich.

Versuchsaufbau wie in Abbildung 12 beschrieben. Ko-Kultur von $2 \cdot 10^4$ über MACS-aufgereinigten CD8⁺ T-Zellen (ST-42) mit der gleichen Anzahl voraktivierter pre-T_{regs} und $2 \cdot 10^3$ unterschiedlich stimulierten (6 h), E1a₂₃₄₋₂₄₅ (0,5 nM) -beladenen BMDCs. Zugabe von anti-CD3 (2 µg/ml) als Stimulus für die pre-T_{regs}. Keine Peptidbeladung der $2 \cdot 10^3$ unterschiedlich stimulierten (6 h) BMDCs in den Transwells.

Abbildung 33 zeigt die Daten dieses Experiments: Die vier Graphen zeigen jeweils die vier Untergruppen mit den E1a-beladenen A) Medium-, B) Poly I:C-, C) R-848- oder D) „superstimulierten“ BMDCs. Links in den Graphen, vertikal abgegrenzt, ist die „Basis- oder Bezugs-Proliferation“ dargestellt, d.h. die T-Zell-Proliferation ohne „Transwell“- oder pre-T_{regs}-Einfluss. Die vier Balken jeweils rechts der vertikalen Trennung stellen Triplikate der unterschiedlichen BMDC-Spezies im „Transwell“ dar. Man erkennt eindeutig den hemmenden Einfluss der zugegebenen pre-T_{regs} in den Ansätzen A), B) und C), der die Proliferation auf ca. die Hälfte des Wertes ohne pre-T_{regs} sinken lässt, wenn im „Transwell“ Medium-, Poly I:C- oder R-848-BMDCs vorliegen. Im Ansatz D) sieht man diese Suppression nicht. Die antigenpräsentierenden BMDCs machen die T-Zellen aufgrund ihres Doppel-Stimulus refraktär gegenüber einer Hemmung durch T_{regs}. Betrachtet man in den Ansätzen A), B), und C) jedoch die grauen Balken, also die Triplikate, die im „Transwell“ „superstimulierte“ BMDCs vorliegen hatten, so erkennt man klar, dass die durch die pre-T_{regs} hervorgerufene Hemmung durchbrochen werden konnte und die T-Zellen ebenso gut wie in den Kontrollansätzen ohne T_{regs} proliferieren. Aufgrund der am Anfang dieses zweiten Teils beschriebenen Daten bezüglich der IL-6 Sekretion nach „Removal“ der einzelnen Stimuli, liegt eine Erklärung auf der Hand, die auch im Falle des „Superstimulus“ IL-6 ins Spiel bringt. Es ist vorstellbar, dass die lediglich sechs Stunden mit Poly I:C oder R-848 stimulierten BMDCs (im „Transwell“) nicht in der Lage sind, nach dem Stimulus „Removal“ ausreichende Mengen an IL-6 (und/ oder „Faktor-X“) über die „Transwell“-Membran in das Well zu sezernieren, während sie hierzu nach Aktivierung der TLR3 und TLR7 Signalwege sehr wohl in der Lage sind. Ob IL-6 auch im Fall des „Superstimulus“ der entscheidende Botenstoff ist, der die T-Zellen refraktär gegenüber den T_{regs} macht, ist mit diesem Experiment natürlich nicht aufzuklären. Sehr wahrscheinlich ist es jedoch ein löslicher Faktor, der die Suppression durch pre-T_{regs} rückgängig machen kann. Weitere Experimente hierzu sind notwendig und könnten beispielsweise BMDCs aus IL-6 Knock-Out Mäusen oder anti IL-6 Antikörper beinhalten.

6 Diskussion Teil II

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der kombinierten Ligation von TLR3 und TLR7, die sowohl MyD88-unabhängige als auch –abhängige Signalwege in BMDCs aktiviert und zur Folge hat, dass die BMDCs in einer synergistischen Art und Weise aktiviert werden. Der beobachtete Synergismus nach kombinierter TLR3 und TLR7 Aktivierung äussert sich einer höheren Expression der klassischen BMDC Aktivierungsmarker CD40, Ox40L, CD70 und CD86 (besonders CD70 wurde mit einer CD4⁺ T-Helferzell unabhängigen CD8⁺ Aktivierung in Verbindung gebracht) (Arens et al. 2004; Bullock and Yagita 2005) und in einer quantitativ wie qualitativ besseren Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Neben den Aktivierungsmarkern ist besonders die raschere Kinetik interessant, mit der die „superstimulierten“ BMDCs auf die kombinierte Ligation von TLR3 und TLR7 reagieren. Erstens beginnt die IL-6 bzw. RANTES Produktion zu einem früheren Zeitpunkt (bereits vier bis acht Stunden nach Zugabe des Doppel-Stimulus gegenüber 12 bis 20 Stunden nach Zugabe der Einzelstimuli) und erreicht höhere Plateauwerte nach 24 bis 72 Stunden (Abbildung 22). Zweitens produzieren die „superstimulierten“ BMDCs auch nach Entfernen der Stimuli nach zwanzig Stunden in den nächsten zwanzig Stunden bedeutend mehr inflammatorisches IL-6 und RANTES als die BMDCs, bei denen der Poly I:C und R-848 als Einzelstimulus durch Waschen entfernt wurden. Diese Beobachtung ergänzt bereits veröffentlichte Daten, nach denen fortwährende Zytokinproduktion eigentlich fortlaufende TLR-Ligation erfordert (Yang et al. 2004). Yang et al. berichten in derselben Veröffentlichung, dass ex-vivo einzel-TLR aktivierte BMDCs in T-Zell-tolerante Mäuse injiziert die Toleranz nicht umkehren können bzw. nur nach Depletion der T_{regs}. Interessant wäre daher die Frage, ob „superstimulierte“ BMDCs in der Lage wären, periphere Toleranz zu durchbrechen, da sie ja unabhängiger von fortlaufender TLR Stimulation sind. Aus den hier beschriebenen Daten lässt sich jedenfalls nicht differenzieren, ob die Unabhängigkeit von fortlaufender TLR-Ligation im Falle des „Superstimulus“ durch stärkere initiale Aktivierung der BMDCs zustande kommt, oder die Ligation beider TLRs zu einer besseren/ länger-anhaltenden Signaltransduktion in den BMDCs führt. Da jedoch Napolitani et al. eine länger-detektierbare Phosphorylierung von Jun und eine erhöhte IκBζ mRNA Synthese nach kombinierter TLR Ligation beschrieben

haben, scheint auch bei „superstimulierten“ BMDCs eher eine länger anhaltende Signaltransduktion für die beobachteten Effekte verantwortlich zu sein. Napolitani et al (Napolitani et al. 2005) berichten in derselben Veröffentlichung auch von einer in vitro T_{H1} -Polarisierung in ihren T-Zell-Experimenten nach kombinierter TLR Stimulierung der BMDCs. Es lag daher auf der Hand, dieser Frage auch im Zusammenhang mit dem „Superstimulus“ nachzugehen und diesbezügliche Experimente zu durchzuführen. Die ersten Versuche hatten die Beantwortung der Frage zum Ziel, ob sich die auf BMDC Ebene gemachten Beobachtungen überhaupt auf die T-Zell-Ebene übertragen lassen. Es wurden sowohl transgene $CD4^+$ T-Zellen aus OT-2 Mäusen als auch transgene $CD8^+$ T-Zellen aus ST-42 Mäusen verwendet und zunächst in vitro mit den unterschiedlich stimulierten BMDCs ko-kultiviert. Die Daten waren eindeutig und ermutigend zugleich, spiegelte sich doch der Synergismus auf BMDC Ebene in den T-Zell-Kulturen in verbesserter Proliferation (3H -Thymidin-Inkorporation) und erhöhter (Effektor) Zytokinproduktion der T-Zellen ($IFN-\gamma$ bei den $CD4^+$ T-Zellen und IL-2 bei den $CD8^+$ T-Zellen) wider. Der nächste Schritt war ein experimenteller Ansatz, bei dem die BMDCs in einem (zunächst artifiziellen aber gut charakterisierten) in vivo System auf ihre Eigenschaften untersucht werden konnten. In adoptiven T-Zell-Transfers wurden entweder CD90.1 positive kongene $CD4^+$ T-Zellen aus OT-2 Mäusen oder CD45.1 positive kongene $CD8^+$ T-Zellen aus ST-42 Mäusen in naive B6 Wild-Typ Tiere injiziert und die Tiere anschliessend mit Peptid-beladenen BMDCs immunisiert, die unterschiedlich aktiviert worden waren. Sowohl die Expansion der transferierten T-Zellen als auch deren Aktivierungsgrad bzw. im Falle der $CD8^+$ T-Zellen auch die Eigenschaft, $IFN-\gamma$ zu produzieren, war in den Gruppen besser, die mit den „superstimulierten“ BMDCs immunisiert worden waren. Die „superstimulierten“ BMDCs hatten also eine überlegende T-Zell-Antwort induziert als die BMDCs, die nur einzeln mit Poly I:C oder R-848 aktiviert wurden. Nachdem eine Antwort auf die Frage gefunden wurde, ob die „superstimulierten“ BMDCs überhaupt eine bessere T-Zell-Antwort einleiten können, sollte diese Überlegenheit auch in einem nicht-manipulierten in vivo Modell, d.h. ohne vorherigen adoptiven Transfer von transgenen T-Zellen, bestätigt werden. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob sich die verbesserte Kinetik der „superstimulierten“ BMDCs in der Produktion von IL-6 und RANTES in einer unterschiedlich guten T-Zell-Aktivierung nachweisen lässt. Hierzu wurden Wild-Typ Mäuse mit Peptid-beladenen BMDCs immunisiert, die vorher entweder sechs oder

zwanzig Stunden mit Poly I:C, R-848 oder einer Kombination beider Stimuli aktiviert wurden. Nach sieben Tagen wurde die Effektivität der Immunisierungen mit den verschiedenen BMDCs verglichen. Die „superstimulierten“ BMDCs induzierten in den Wild-Typ Mäusen mehr Peptid-spezifische T-Zellen (Tetramer-Daten in Abbildung 27 A) und mehr T-Zellen, die Peptid-spezifisch ex vivo IFN- γ produzierten. Ausserdem waren die durch die „superstimulierten“ BMDCs induzierten T-Zellen in vivo lytisch kompetenter als die T-Zellen, die durch einzeln-stimulierte BMDCs aktiviert worden waren. Einigermassen überraschend war die Tatsache, dass bereits eine sechsstündige Aktivierung der BMDCs mit dem „Superstimulus“ ausreichte, um 60 % der in vivo Zielzellen eines in vivo Zytotoxizitäts-Assays zu lysieren und signifikante Mengen von IFN- γ produzierenden T-Zellen zu induzieren während die sechs Stunden Poly I:C oder R-848 aktivierten BMDCs lediglich eine Basis-Lyse der Zielzellen induzieren konnten. Die Werte in allen drei überprüften Parametern relativierten sich etwas, wenn die TLRs auf den BMDCs für zwanzig Stunden ligiert wurden, die „superstimulierten“ BMDCs waren jedoch auch bei diesem Zeitwert deutlich überlegen in der Induktion von Effektoreigenschaften. Neben den überlegenen Zytokinkinetiken, könnte wie beschrieben eventuell auch die erhöhte CD70 Expression auf „superaktivierten“ BMDCs dazu beitragen, die beobachteten Effekte auf T-Zell-Ebene zu erklären, da CD70 anscheinend die CD4⁺ Hilfe von einer CD8⁺ T-Zell-Aktivierung zumindest z.T. zu entkoppeln vermag (Arens et al. 2004; Bullock and Yagita 2005).

Ein weiterer interessanter Punkt in diesem Zusammenhang ist die beobachtete Eigenschaft von „superstimulierten“ BMDCs, T-Zellen refraktär gegenüber Suppression durch regulatorische T-Zellen zu machen. Somit werden vor kurzem publizierte Erkenntnisse bezüglich TLR Stimulation von Dendritischen Zellen und Einfluss auf die Aktivität von regulatorischen T-Zellen erweitert. Die überzeugenden Daten der Abbildungen 29 - 33 ergänzen das Bild, das Pasare und Medzhitov (Pasare and Medzhitov 2003) von TLR-aktivierten BMDCs gezeichnet haben. Durch kombinierte Stimulation von TLRs, die verschiedene intrazelluläre Signalwege beschreiten, werden BMDCs auch in den hier beschriebenen Experiment in die Lage versetzt, T-Zellen derart zu aktivieren, dass sie gegenüber Suppression durch T_{regs} quasi inert werden. „Superaktivierte“ BMDCs sind befähigt, die Proliferation von sowohl transgenen CD4⁺ als auch transgenen CD8⁺ T-Zellen nach Zugabe von voraktivierten pre-T_{regs} auf dem Niveau ohne Präsenz von pre-T_{regs} „zu halten“. Sie

sind ferner in der Lage, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen qualitativ „besser“ zu aktivieren, wie durch durchflusszytometrische Untersuchung der Oberflächenmarker und intrazellulärem IL-2 gezeigt werden konnte. Ausserdem induzieren sie im Beisein von pre-T_{regs} auch quantitativ mehr, in einem ELISA nachweisbares, von CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen produziertes IL-2. Die Tatsache, dass im „Transwell“ Experiment die Proliferation nach Zugabe von pre-T_{regs} nur in den Ansätzen wieder hergestellt werden konnte, in denen sich „superstimulierte“ BMDCs in den „Transwells“ befanden, deutet auf einen löslichen Faktor analog der Veröffentlichung von Pasare und Medzhitov. IL-6 scheint ein Kandidat zu sein, um so mehr, als dass die vorliegenden Daten auch eine überlegene Qualität und Produktions-Kinetik bezüglich dieses Zytokins aufzeigen. Über den eigentlichen Mechanismus hinter den beobachteten synergistischen Effekten kann hier nur spekuliert werden. Eine attraktive Erklärung ist sicherlich die parallele Aktivierung von verschiedenen Signaltransduktionswegen, die durch die simultane Ligation von TLR3 und TLR7 ausgelöst werden. TLR3 Ligation resultiert in der MyD88-unabhängigen Rekrutierung des Adaptermoleküls TRIF und im Folgenden kommt es via IRF3 zu einer Produktion von β -Interferonen. β -Interferone und IRF3 wiederum können die Produktion von weiteren pro-inflammatorischen Zytokinen via IRF5, IRF7 und NF κ B initiieren. IRF7 ist dabei der Hauptregulator („master regulator“) von Typ I Interferon-abhängigen Immunantworten (Peng et al. 2005). Crosstalk zwischen beiden Signalwegen wird durch IFN- β und IRF7 ermöglicht, die letztendlich zu effizienterer TLR7 Signalweiterleitung führen und somit eine Synergie zwischen beiden Signalwegen ermöglichen (Gautier et al. 2005). Sehr interessant in diesem Zusammenhang ist/ wäre die Frage, ob und wie eine kombinierte TLR3 und TLR7 Ligation die Phosphorylierung von IRF7 gegenüber TLR-Einzelstimulierung verändert.

Natürlicherweise können TLR3 und TLR7 wohl vor allem dann gleichzeitig aktiviert werden, wenn z.B. während einer Virus Infektion virale RNA und/ oder Wirts-RNA von endozytierten infizierten Zellen zusammen in endosomale Kompartimente gelangen und dort simultan in direkten Kontakt mit den beiden TLRs kommen. Generell ist bekannt, dass für die Bekämpfung von einigen bakteriellen Infektionen die Kooperation von TLR2 und TLR4 notwendig ist, TLR3 und TLR9 sind beispielsweise an einer Protektion gegen MCMV beteiligt (Tabeta et al. 2004; Weiss et al. 2004). Es ist daher keine zu artifizielle Vorstellung, dass auch unter physiologischen Bedingungen parallel der MyD88-abhängige Signalweg über TLR7

und der Signalweg über TLR3, der letztendlich zur Ausschüttung von Typ I Interferonen führt, aktiviert werden kann und dies die optimale Immunantwort bei bestimmten Infektionen darstellt. Durch die TLR vermittelte Erkennung von Pathogenen wird also das Signal der nicht-klonalen Muster-Erkennung im Zusammenspiel mit den mikrobiellen Peptid-Determinanten in eine klonale und antigen-spezifische Immunantwort übersetzt. Wahrscheinlich ist die gleichzeitige und simultane Aktivierung beider Signaltransduktionswege in vivo ein starkes Signal des angeborenen Immunsystems, dass eine ernsthafte Infektion vorliegt und die Einleitung angemessener adaptiver Antworten daher dringend erforderlich ist. Einzelne vorliegende TLR Liganden resultieren in diesem Szenario nur in der limitierten und vorübergehenden Aktivierung einer inflammatorischen Antwort.

Abschliessend soll noch auf einen weiteren Zusammenhang zwischen TLRs und regulatorischen T-Zellen eingegangen werden. Erst vor kurzem veröffentlichten einige Gruppen, dass TLRs auch auf regulatorischen T-Zellen exprimiert werden (Caramalho et al. 2003) und zur Verstärkung (Crellin et al. 2005; Liu et al. 2006; Suttmüller et al. 2006) aber auch Attenuierung (Peng et al. 2005) ihrer supprimierenden Funktion stimuliert werden können. Peng et al. identifizierten TLR8 als denjenigen Toll-Like Rezeptor auf humanen regulatorischen T-Zellen, der über die Erkennung von CpG-A Motiven (Klinman 2004) und MyD88-/ IRAK-4 abhängig die Umkehr der eigentlichen Funktion der regulatorischen T-Zellen einleiten kann (Peng et al. 2005). Da viele TLRs den MyD88-/ IRAK-4 Signaltransduktionsweg verwenden, ist nicht klar, warum nur TLR8 Ligation die Umkehr der natürlichen T_{reg} - Aktivität auslösen kann. Auch über die physiologische Funktion dieser in vitro beobachteten funktionellen Regulation von regulatorischen T-Zellen durch TLR8 ist bisher nichts bekannt. Crellin et al. (Crellin et al. 2005) konnten zeigen, dass Flagellin als TLR5 Ligand die hemmenden Eigenschaften von T_{regs} durch Erhöhung der FoxP3 Expression beeinflussen kann, es T_{regs} aber nicht, wie von LPS (Caramalho et al. 2003) berichtet, zur Proliferation anregen kann. Auch TLR2 Signaltransduktion moduliert die Funktionen von T_{regs} , weil Pam3Cys die hemmenden Eigenschaften von regulatorischen T-Zellen durch Hemmung der FoxP3 Expression vorübergehend unterdrücken kann (Liu et al. 2006). Die Stimulation über TLRs hat somit ganz unterschiedliche Effekte auf die verschiedenen Mitspieler des Immunsystems. Einerseits können DCs durch TLR vermittelte Signale zur Reifung

angeregt werden und dann sehr effizient adaptive T-Zell-Antworten induzieren, andererseits können endogene regulatorische T-Zellen über TLR Ligation aktiviert oder in ihrer hemmenden Funktion gebremst und somit fein moduliert werden. Die nötigen LPS-Konzentrationen, um T_{regs} zur Proliferation anzuregen, liegen dabei aber mehrere Grössenordnungen über derjenigen Konzentration von LPS, die für eine in vitro Aktivierung von DCs nötig ist (Sakaguchi 2003). Bei einer normalen gram-negativen Bakterien-Infektion werden also ganz im Sinne der notwendigen Einleitung einer Immunantwort bevorzugt DCs aktiviert und T_{regs} nicht zur Proliferation angeregt. Sollten jedoch grosse Mengen an LPS produziert werden und systemisch zirkulieren, können endogene T_{regs} über ihren TLR4 zur Proliferation angeregt werden und einen eventuellen septischen Schock verhindern, in dem sie z.B. über IL-10 (oder TNF- α) Sekretion die Ausschüttung von grossen Mengen pro-inflammatorischer Zytokine verhindern und/ oder beispielsweise eine Aktivierung von Makrophagen unterbinden (Belkaid et al. 2002). Somit stellt das TLR System ein in der Tat sehr ausgeklügeltes Regulations-System dar, das auf den verschiedenen Zelltypen eine unterschiedliche Kontrolle der Effektorfunktionen erlaubt.

7 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob Immunoproteasomen als zentrale proteolytische Aktivität im Zytosol bereits über die Generierung von (positiv selektionierenden) Selbstpeptiden einen Einfluss auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire haben. Die Prozessierung eines der veröffentlichten positiv selektionierenden Selbstpeptide (Cp1 α) für den sehr gut charakterisierten OT-1 T-Zell-Rezeptor aus seinem Peptidvorläufer (N- und C-terminal verlängertes Cp1 α , in vitro mit aufgereinigten c20S und i20S Proteasomen verdaut) erwies sich als unbedingt abhängig von immunoproteasomalen Schnittaktivitäten. Konstitutive Proteasomen konnten den relevanten C-terminalen Schnitt nicht durchführen, während Immunoproteasomen sowohl C-terminal korrekt-prozessierte Vorläufer als auch das positiv selektionierende Peptid an sich generieren konnten. OT-1 Mäuse, die auf LMP7 Knock-Out Hintergrund gezüchtet wurden, also keine funktionellen Immunoproteasomen aufweisen, zeigten eine fast 50 prozentige Reduktion in der Anzahl der peripheren transgenen OT-1 CD8⁺ T-Zellen. Dieser Defekt wurde sowohl in den Kompartimenten Blut, Milz und Lymphknoten als auch im Thymus, dem Organ der T-Zell-Reifung festgestellt, in dem 40 % weniger transgene CD8⁺ Einzelpositive detektiert wurden. Dass die OT-1 T-Zellen auf LMP7 Knock-Out Hintergrund anscheinend lediglich weniger gut selektioniert werden, aber ansonsten funktionell den Wild-Typ OT-1 Mäusen identisch sind, ergaben Charakterisierungen der Effektorfunktionen (T-Zell-Proliferation, spezifische Lyse, IFN- γ Sekretion). In einem weiteren in vivo Modell wurden lethal bestrahlte LMP7 Knock-Out Mäuse und Wild-Typ Kontroll Tiere mit T-Zell-depletiertem OT-1 Knochenmark rekonstituiert und nach 4 Wochen analysiert. Repopulierte LMP7 Knock-Out Tiere wiesen dieselben Defekte auf wie in der Zucht zuvor, folglich liessen sich auch in den LMP7 Knock-Out x OT-1 Chimären nur etwa die Hälfte der transgenen OT-1 T-Zellen in den peripheren Organen nachweisen. Die dreimalige Injektion von Cp1 α führte bereits 18 Stunden nach der letzten Injektion zu einem deutlichen Anstieg der Prozentzahlen von transgenen CD8⁺ T-Zellen in der Peripherie und nach 2 Wochen wurden die Werte der Wild-Typ Tiere erreicht. Um auszuschliessen, dass das injizierte Cp1 α lediglich eine periphere Proliferation zur Folge hat und die Erhöhung der Prozentzahlen

darauf zurückzuführen ist, wurde adoptiv mit OT-1 T-Zellen transferierten Mäusen ebenfalls das Cp1 α -Peptid verabreicht. Da in diesem Experiment, letztlich wie erwartet für ein Selbstpeptid, keine Proliferation der transferierten T-Zellen detektiert werden konnte, muss man in den zuvor erwähnten Versuchen von einer Einwanderung des Cp1 α -Peptids in den Thymus ausgehen und im Folgenden von einer veränderten positiven Selektion der OT-1 T-Zellen („Thymic Vaccination“). In einem dritten in vivo Modell konnte zudem nachgewiesen werden, dass LMP7 Mäuse eine Infektion mit Ovalbumin-transgenen Listerien zwar prinzipiell gleich gut kontrollieren können wie Wild-Typ Kontrollen, für ihre SIINFEKL-spezifische CD8⁺ T-Zell Antwort jedoch andere V β -Ketten verwenden als Wild-Typ Kontrolltiere. Da sich naive T-Zellen von LMP7 Knock-Out und Wild-Typ Mäusen in ihrer V β -Ketten Verteilung nicht unterscheiden, ist auch hier der Einfluss von Immunproteasomen auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire offensichtlich.

Die Daten dieses ersten Teils sind somit ein starkes Indiz dafür, dass Immunproteasomen in der Lage sind, die Selektion von naiven CD8⁺ T-Zellen und damit das Repertoire von naiven T-Zellen zu beeinflussen, das an antigen-spezifischen Immunantworten beteiligt ist. Proteasomen spielen mit ihrer fein-modulierbaren proteolytischen Aktivität also nicht nur/ erst eine Rolle bei der Prozessierung von MHC Klasse I Liganden für die CD8⁺ T-Zell-Erkennung während der Einleitung einer Immunantwort sondern sind bereits an der Selektion der naiven (CD8⁺) T-Zellen im Thymus beteiligt.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde das T-Zell-Priming durch Dendritische Zellen (BMDCs) analysiert, die zuvor simultan über 2 verschiedene Toll-Like Rezeptoren (TLR3 und TLR7) aktiviert wurden, die unterschiedliche Signaltransduktionskaskaden im Zellinneren auslösen. Insbesondere sollten die Auswirkungen der kombinierten DC-Aktivierung auf die natürliche Funktion von regulatorischen T-Zellen beleuchtet werden. Die initialen in vitro Studien der BMDCs wurden von Tobias Warger in Tübingen und später in Mainz durchgeführt, so dass die Resultate dieses zweiten Teils in enger Kooperation mit Tobias Warger erzielt wurden. Auf BMDC Ebene konnte zunächst in vitro ein synergistischer Effekt bei gleichzeitiger Ligandierung von TLRs 3 und 7 festgestellt werden. Die BMDCs sind nach „Superstimulierung“ via Poly I:C und R-848 in der Lage, schneller und länger anhaltend ihre Oberflächenmarker hoch zu regulieren, pro-inflammatorische

Mediatoren (v.a. IL-6 und RANTES) zu sekretieren und sind zudem unabhängig von fortwährender TLR Aktivierung. Die qualitativ und quantitativ eindeutig besseren Ergebnisse auf BMDC-Ebene liessen sich im Folgenden eindrucksvoll auf die T-Zell-Ebene übertragen: Die „superstimulierten“ BMDCs konnten in vitro, in vivo, in transgenen Modellen und in Wild-Typ Mäusen sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen verbessert aktivieren („primen“) und bessere Effektoreigenschaften vermitteln. Eine mögliche Ursache für die exzellenten Priming-Eigenschaften der doppelt TLR-stimulierten BMDCs könnte in ihrem Einfluss auf regulatorische T-Zellen liegen, da sie wie gezeigt CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen weniger sensitiv gegenüber T_{reg} vermittelter Suppression machen. So sind T-Zellen, die mit „superstimulierten“ BMDCs und T_{regs} ko-kultiviert wurden, quasi inert gegenüber einer Hemmung durch T_{regs}. Sowohl die Proliferation also auch der Status der Oberflächenmarker und die Zytokinproduktion der T-Zellen ist nach „Superstimulation“ nicht mehr negativ durch regulatorische T-Zellen beeinflusst. In einem Transwell Experiment konnte letztlich gezeigt werden, dass sehr wahrscheinlich ein löslicher Faktor, der von den „superstimulierten“ BMDCs produziert wird, für die Durchbrechung der T_{reg}-vermittelten Hemmung verantwortlich ist. Die hier präsentierten Ergebnisse sind besonders im Hinblick auf DC-basierte Vakzine interessant, da sie einmal mehr die Verbindung von angeborener und adaptiver Immunität aufzeigen und gleichzeitig neue Mechanismen und Möglichkeiten aufzeigen, DCs für eine überlegene Induktion von T-Zell-Antworten zu modulieren.

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APCs	Antigen Presenting Cells
AT	Adoptive Transfer
BMDCs	Bone Marrow Derived Dendritic Cells
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	CTL activation associated protein 4
CTLs	Cytotoxic T Lymphocytes
DALIS	Dendritic Cell Aggresome-Like Induced Structures
DCs	Dendritic Cells
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dsRNA	doppel-strängige RNA
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Flourescent Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GM-CSF	Granulocyte/ Macrophage Colony Stimulating Factor
h	hour/ Stunde
HLA	Human Leukocyte Antigens
HRP	Horseradish Peroxidase
Hsps	Heatshockproteins
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
KMT	Knochenmarkstransfer
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major Histocompatibility Complex
ml	Milliliter
MyD88	Myeloid Differentiation Factor 88

OVA	Ovalbumin
Pam3Cys-SKKK	(S)-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-N-palmitoyl-(R)-cysteine
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBS	Phosphate Buffered Saline
poly(I:C)	Poly-inosine Poly-cytidylitic Acid
PRR	Pattern Recognition Receptor
RANTES	Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted
R-848	Imiquimod-Analagon
RNA	Ribonucleic Acid
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
ssRNA	Single-stranded RNA
TAP	Transporter Associated With Antigen Processing
TCR	T Cell Receptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α

9 Referenzen

1. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S (1998) Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function. *Immunity*. 9:143-50
2. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D (2005) The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity*. 23:227-39
3. Apasov S, Redegeld F, Sitkovsky M (1993) Cell-mediated cytotoxicity: contact and secreted factors. *Curr. Opin. Immunol.* 5:404-10
4. Arens R, Schepers K, Nolte MA, van Oosterwijk MF, van Lier RA, Schumacher TN, van Oers MH (2004) Tumor rejection induced by CD70-mediated quantitative and qualitative effects on effector CD8+ T cell formation. *J. Exp. Med.* 199:1595-605
5. Ashton-Rickardt PG, Bandeira A, Delaney JR, Van Kaer L, Pircher HP, Zinkernagel RM, Tonegawa S (1994) Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus. *Cell* 76:651-63
6. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F (1999) An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190:995-1004
7. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811
8. Banchereau J, Steinman RM (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52
9. Basler M, Moebius J, Elenich L, Groettrup M, Monaco JJ (2006) An Altered T Cell Repertoire in MECL-1-Deficient Mice. *J. Immunol.* 176:6665-72
10. Basu D, Williams CB, Allen PM (1998) In vivo antagonism of a T cell response by an endogenously expressed ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:14332-6
11. Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature* 420:502-7
12. Bendelac A, Medzhitov R (2002) Adjuvants of immunity: harnessing innate immunity to promote adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 195:F19-F23

13. Beninga J, Rock KL, Goldberg AL (1998) Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J. Biol. Chem.* 273:18734-42
14. Benvenuti F, Lagaudriere-Gesbert C, Grandjean I, Jancic C, Hivroz C, Trautmann A, Lantz O, Amigorena S (2004) Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J. Immunol.* 172:292-301
15. Bevan MJ (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J. Exp. Med.* 143:1283-8
16. Bevan MJ (2006) Cross-priming. *Nat. Immunol.* 7:363-5
17. Boes B, Hengel H, Ruppert T, Multhaup G, Koszinowski UH, Kloetzel PM (1994) Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J. Exp. Med.* 179:901-9
18. Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-9
19. Bullock TN, Yagita H (2005) Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J. Immunol.* 174:710-7
20. Caramalho I, Lopes-Carvalho T, Ostler D, Zelenay S, Haury M, Demengeot J (2003) Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 197:403-11
21. Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* 184:747-52
22. Cerundolo V, Kelly A, Elliott T, Trowsdale J, Townsend A (1995) Genes encoded in the major histocompatibility complex affecting the generation of peptides for TAP transport. *Eur. J. Immunol.* 25:554-62
23. Chapiro J, Claverol S, Piette F, Ma W, Stroobant V, Guillaume B, Gairin JE, Morel S, Burlet-Schiltz O, Monsarrat B, Boon T, Van den Eynde BJ (2006) Destructive cleavage of antigenic peptides either by the immunoproteasome or by the standard proteasome results in differential antigen presentation. *J. Immunol.* 176:1053-61
24. Chapman HA (2006) Endosomal proteases in antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 18:78-84
25. Chen P, Hochstrasser M (1996) Autocatalytic subunit processing couples active site formation in the 20S proteasome to completion of assembly. *Cell* 86:961-72

26. Chen W, Bennink JR, Yewdell JW (2001a) Quantitating presentation of MHC class I-restricted antigens. *Methods Mol. Biol.* 156:245-54
27. Chen W, Norbury CC, Cho Y, Yewdell JW, Bennink JR (2001b) Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J. Exp. Med.* 193:1319-26
28. Chu-Ping M, Vu JH, Proske RJ, Slaughter CA, DeMartino GN (1994) Identification, purification, and characterization of a high molecular weight, ATP-dependent activator (PA700) of the 20 S proteasome. *J. Biol. Chem.* 269:3539-47
29. Click EM, Anderson KS, Androlewicz MJ, Wei ML, Cresswell P (1992) Transport and expression of class I MHC glycoproteins in an antigen-processing mutant cell line. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 57:571-7
30. Cook JR, Wormstall EM, Hornell T, Russell J, Connolly JM, Hansen TH (1997) Quantitation of the cell surface level of Ld resulting in positive versus negative selection of the 2C transgenic T cell receptor in vivo. *Immunity.* 7:233-41
31. Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL, Rock KL (1997) Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J. Biol. Chem.* 272:13437-45
32. Crellin NK, Garcia RV, Hadisfar O, Allan SE, Steiner TS, Levings MK (2005) Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* 175:8051-9
33. Decker T, Stockinger S, Karaghiosoff M, Muller M, Kovarik P (2002) IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest* 109:1271-7
34. Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Muller M, Kreymborg K, Altenberend F, Brandenburg J, Kalbacher H, Brock R, Driessen C, Rammensee HG, Stevanovic S (2005) Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:7922-7
35. Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenahn M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B (2005) Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J. Exp. Med.* 202:33-45
36. Dick TP, Bangia N, Peaper DR, Cresswell P (2002) Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity.* 16:87-98
37. Dick TP, Ruppert T, Groettrup M, Kloetzel PM, Kuehn L, Koszinowski UH, Stevanovic S, Schild H, Rammensee HG (1996) Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. *Cell* 86:253-62

38. Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M (1992) Purification of an 11 S regulator of the multicatalytic protease. *J. Biol. Chem.* 267:22369-77
39. Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290-6
40. Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kuhn R, Rajewsky K, Muller U, von Boehmer H (1994) MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265:1234-7
41. Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, Jefferies CA, Mansell AS, Brady G, Brint E, Dunne A, Gray P, Harte MT, McMurray D, Smith DE, Sims JE, Bird TA, O'Neill LA (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413:78-83
42. Fitzgerald KA, Rowe DC, Barnes BJ, Caffrey DR, Visintin A, Latz E, Monks B, Pitha PM, Golenbock DT (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* 198:1043-55
43. Fontenot JD, Rudensky AY (2005) A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nat. Immunol.* 6:331-7
44. Fridkis-Hareli M, Reche PA, Reinherz EL (2004) Peptide variants of viral CTL epitopes mediate positive selection and emigration of Ag-specific thymocytes in vivo. *J. Immunol.* 173:1140-50
45. Fridkis-Hareli M, Reinherz EL (2004) New approaches to eliciting protective immunity through T cell repertoire manipulation: the concept of thymic vaccination. *Med. Immunol.* 3:2
46. Gautier G, Humbert M, Deauvieau F, Scuiller M, Hiscott J, Bates EE, Trinchieri G, Caux C, Garrone P (2005) A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J. Exp. Med.* 201:1435-46
47. Gershon RK, Kondo K (1971) Infectious immunological tolerance. *Immunology* 21:903-14
48. Glickman MH, Rubin DM, Fried VA, Finley D (1998) The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell Biol.* 18:3149-62
49. Glynn R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, Trowsdale J (1991) A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353:357-60
50. Green EA, Gorelik L, McGregor CM, Tran EH, Flavell RA (2003) CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:10878-83

51. Groll M, Ditzel L, Lowe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386:463-71
52. Groothuis TA, Neefjes J (2005) The many roads to cross-presentation. *J. Exp. Med.* 202:1313-8
53. Gunn MD, Tangemann K, Tam C, Cyster JG, Rosen SD, Williams LT (1998) A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:258-63
54. Heath WR, Carbone FR (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19:47-64
55. Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67:425-79
56. Herter S, Osterloh P, Hilf N, Rechtsteiner G, Hohfeld J, Rammensee HG, Schild H (2005) Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *J. Immunol.* 175:891-8
57. Hoffman L, Pratt G, Rechsteiner M (1992) Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J. Biol. Chem.* 267:22362-8
58. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR (1994b) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27
59. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR (1994a) T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17-27
60. Hogquist KA, Tomlinson AJ, Kieper WC, McGargill MA, Hart MC, Naylor S, Jameson SC (1997) Identification of a naturally occurring ligand for thymic positive selection. *Immunity.* 6:389-99
61. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R (2002) The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420:329-33
62. Horng T, Barton GM, Medzhitov R (2001b) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2:835-41
63. Horng T, Barton GM, Medzhitov R (2001a) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2:835-41
64. Hugo P, Kappler JW, McCormack JE, Marrack P (1993) Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:10335-9

65. Ignatowicz L, Rees W, Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kushnir E, Kappler J, Marrack P (1997) T cells can be activated by peptides that are unrelated in sequence to their selecting peptide. *Immunity*. 7:179-86
66. Iwasaki A, Medzhitov R (2004) Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5:987-95
67. Jameson SC, Hogquist KA, Bevan MJ (1994) Specificity and flexibility in thymic selection. *Nature* 369:750-2
68. Jentsch S, Schlenker S (1995) Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. *Cell* 82:881-4
69. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity*. 11:115-22
70. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Muhlradt PF, Sato S, Hoshino K, Akira S (2001) Lipopolysaccharide stimulates the MyD88-independent pathway and results in activation of IFN-regulatory factor 3 and the expression of a subset of lipopolysaccharide-inducible genes. *J. Immunol.* 167:5887-94
71. Kelly A, Powis SH, Glynn R, Radley E, Beck S, Trowsdale J (1991) Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353:667-8
72. Klein L, Khazaie K, von Boehmer H (2003) In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:8886-91
73. Klinman DM (2004) Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat. Rev. Immunol.* 4:249-58
74. Kloetzel PM (2004) Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* 5:661-9
75. Koopmann JO, Post M, Neefjes JJ, Hammerling GJ, Momburg F (1996) Translocation of long peptides by transporters associated with antigen processing (TAP). *Eur. J. Immunol.* 26:1720-8
76. Kraj P, Pacholczyk R, Ignatowicz H, Kisielow P, Jensen P, Ignatowicz L (2001) Positive selection of CD4(+) T cells is induced in vivo by agonist and inhibited by antagonist peptides. *J. Exp. Med.* 194:407-16
77. Kuehn L, Dahlmann B (1996) Reconstitution of proteasome activator PA28 from isolated subunits: optimal activity is associated with an alpha,beta-heteromultimer. *FEBS Lett.* 394:183-6
78. Lelouard H, Ferrand V, Marguet D, Bania J, Camosseto V, David A, Gatti E, Pierre P (2004) Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J. Cell Biol.* 164:667-75

79. Lelouard H, Gatti E, Cappello F, Gresser O, Camosseto V, Pierre P (2002) Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* 417:177-82
80. Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-83
81. Levy F, Burri L, Morel S, Peitrequin AL, Levy N, Bachi A, Hellman U, Van den Eynde BJ, Servis C (2002) The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J. Immunol.* 169:4161-71
82. Lilic M, Santori FR, Neilson EG, Frey AB, Vukmanovic S (2002) The role of fibroblasts in thymocyte-positive selection. *J. Immunol.* 169:4945-50
83. Linsley PS, Brady W, Grosmaire L, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA (1991) Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* 173:721-30
84. Linsley PS, Ledbetter JA (1993) The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu. Rev. Immunol.* 11:191-212
85. Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY (2006) Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:7048-53
86. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC (1992) The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 70:1035-48
87. Martinic MM, Rulicke T, Althage A, Odermatt B, Hochli M, Lamarre A, Dumrese T, Speiser DE, Kyburz D, Hengartner H, Zinkernagel RM (2003) Efficient T cell repertoire selection in tetraparental chimeric mice independent of thymic epithelial MHC. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100:1861-6
88. Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 1:135-45
89. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. (1998a) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2:253-8
90. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA, Jr. (1998b) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2:253-8
91. Minami Y, Kono T, Miyazaki T, Taniguchi T (1993) The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annu. Rev. Immunol.* 11:245-68
92. Moller G (1988) Do suppressor T cells exist? *Scand. J. Immunol.* 27:247-50

93. Momburg F, Neefjes JJ, Hammerling GJ (1994) Peptide selection by MHC-encoded TAP transporters. *Curr. Opin. Immunol.* 6:32-7
94. Monaco JJ, McDevitt HO (1986) The LMP antigens: a stable MHC-controlled multisubunit protein complex. *Hum. Immunol.* 15:416-26
95. Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, Van den Eynde BJ (2000a) Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* 12:107-17
96. Morel S, Levy F, Burlet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, Van den Eynde BJ (2000b) Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* 12:107-17
97. Nakano N, Rooke R, Benoist C, Mathis D (1997) Positive selection of T cells induced by viral delivery of neopeptides to the thymus. *Science* 275:678-83
98. Nandi D, Jiang H, Monaco JJ (1996) Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J. Immunol.* 156:2361-4
99. Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A (2005) Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.*
100. Neefjes JJ, Momburg F, Hammerling GJ (1993) Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261:769-71
101. Niedermann G, Grimm R, Geier E, Maurer M, Realini C, Gartmann C, Soll J, Omura S, Rechsteiner MC, Baumeister W, Eichmann K (1997) Potential immunocompetence of proteolytic fragments produced by proteasomes before evolution of the vertebrate immune system. *J. Exp. Med.* 186:209-20
102. Nil A, Firat E, Sobek V, Eichmann K, Niedermann G (2004) Expression of housekeeping and immunoproteasome subunit genes is differentially regulated in positively and negatively selecting thymic stroma subsets. *Eur. J. Immunol.* 34:2681-9
103. Nussbaum AK, Rodriguez-Carreno MP, Benning N, Botten J, Whitton JL (2005) Immunoproteasome-deficient mice mount largely normal CD8+ T cell responses to lymphocytic choriomeningitis virus infection and DNA vaccination. *J. Immunol.* 175:1153-60
104. Pamer E, Cresswell P (1998) Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16:323-58
105. Pasare C, Medzhitov R (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* 299:1033-6

106. Pawlowski T, Elliott JD, Loh DY, Staerz UD (1993) Positive selection of T lymphocytes on fibroblasts. *Nature*. 364:642-5
107. Pawlowski TJ, Singleton MD, Loh DY, Berg R, Staerz UD (1996) Permissive recognition during positive selection. *Eur. J. Immunol.* 26:851-7
108. Peng G, Guo Z, Kiniwa Y, Voo KS, Peng W, Fu T, Wang DY, Li Y, Wang HY, Wang RF (2005) Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science* 309:1380-4
109. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, Slot JW, Geuze HJ (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* 173:1099-109
110. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM (2002) CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.* 196:237-46
111. Pieters J (1997) MHC class II restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 9:89-96
112. Read S, Mauze S, Asseman C, Bean A, Coffman R, Powrie F (1998) CD38+ CD45RB(low) CD4+ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur. J. Immunol.* 28:3435-47
113. Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, Neefjes J (2004) A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 20:495-506
114. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998) A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:588-93
115. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994) Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-71
116. Rotzschke O, Falk K, Stevanovic S, Jung G, Walden P, Rammensee HG (1991) Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur. J. Immunol.* 21:2891-4
117. 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
118. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (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.* 155:1151-64
119. Sallusto F, Lanzavecchia A (2000) Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* 177:134-40

120. Santori FR, Kieper WC, Brown SM, Lu Y, Neubert TA, Johnson KL, Naylor S, Vukmanovic S, Hogquist KA, Jameson SC (2002) Rare, structurally homologous self-peptides promote thymocyte positive selection. *Immunity*. 17:131-42
121. Saric T, Chang SC, Hattori A, York IA, Markant S, Rock KL, Tsujimoto M, Goldberg AL (2002) An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3:1169-76
122. Sasada T, Ghendler Y, Neveu JM, Lane WS, Reinherz EL (2001) A naturally processed mitochondrial self-peptide in complex with thymic MHC molecules functions as a selecting ligand for a viral-specific T cell receptor. *J. Exp. Med.* 194:883-92
123. Saveanu L, Carroll O, Lindo V, Del Val M, Lopez D, Lepelletier Y, Greer F, Schomburg L, Fruci D, Niedermann G, van Endert PM (2005) Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 6:689-97
124. Schiemann M, Busch V, Linkemann K, Huster KM, Busch DH (2003) Differences in maintenance of CD8+ and CD4+ bacteria-specific effector-memory T cell populations. *Eur. J. Immunol.* 33:2875-85
125. Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R (2001) Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 2:947-50
126. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR (2000) Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-4
127. Schwarz K, Storni T, Manolova V, Didierlaurent A, Sirard JC, Rothlisberger P, Bachmann MF (2003) Role of Toll-like receptors in costimulating cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* 33:1465-70
128. Schwarz K, Van Den BM, Kostka S, Kraft R, Soza A, Schmidtke G, Kloetzel PM, Groettrup M (2000) Overexpression of the proteasome subunits LMP2, LMP7, and MECL-1, but not PA28 alpha/beta, enhances the presentation of an immunodominant lymphocytic choriomeningitis virus T cell epitope. *J. Immunol.* 165:768-78
129. Seifert U, Maranon C, Shmueli A, Desoutter JF, Wesoloski L, Janek K, Henklein P, Diescher S, Andrieu M, de la SH, Weinschenk T, Schild H, Laderach D, Galy A, Haas G, Kloetzel PM, Reiss Y, Hosmalin A (2003) An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* 4:375-9
130. Shevach EM (2002) CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* 2:389-400
131. Sibille C, Gould KG, Willard-Gallo K, Thomson S, Rivett AJ, Powis S, Butcher GW, De Baetselier P (1995) LMP2+ proteasomes are required for the

- presentation of specific antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Curr. Biol.* 5:923-30
132. Sijts AJ, Ruppert T, Rehmann B, Schmidt M, Koszinowski U, Kloetzel PM (2000a) Efficient generation of a hepatitis B virus cytotoxic T lymphocyte epitope requires the structural features of immunoproteasomes. *J. Exp. Med.* 191:503-14
 133. Sijts AJ, Standera S, Toes RE, Ruppert T, Beekman NJ, van Veelen PA, Ossendorp FA, Melief CJ, Kloetzel PM (2000b) MHC class I antigen processing of an adenovirus CTL epitope is linked to the levels of immunoproteasomes in infected cells. *J. Immunol.* 164:4500-6
 134. Smyth LA, Williams O, Huby RD, Norton T, Acuto O, Ley SC, Kioussis D (1998) Altered peptide ligands induce quantitatively but not qualitatively different intracellular signals in primary thymocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:8193-8
 135. Steinman RM, Cohn ZA (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-62
 136. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, Strominger JL, Wiley DC (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368:215-21
 137. Stoltze L, Schirle M, Schwarz G, Schroter C, Thompson MW, Hersh LB, Kalbacher H, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2000) Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat. Immunol.* 1:413-8
 138. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ (2006) Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J. Clin. Invest* 116:485-94
 139. Suto R, Srivastava PK (1995) A mechanism for the specific immunogenicity of heat shock protein-chaperoned peptides. *Science* 269:1585-8
 140. Tabeta K, Georgel P, Janssen E, Du X, Hoebe K, Crozat K, Mudd S, Shamel L, Sovath S, Goode J, Alexopoulou L, Flavell RA, Beutler B (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:3516-21
 141. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S (1998) Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.* 10:1969-80
 142. Takeda K, Kaisho T, Akira S (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-76
 143. Tang Q, Boden EK, Henriksen KJ, Bour-Jordan H, Bi M, Bluestone JA (2004) Distinct roles of CTLA-4 and TGF-beta in CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Eur. J. Immunol.* 34:2996-3005

144. Tenzer S, Stoltze L, Schonfisch B, Dengjel J, Muller M, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2004b) Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. *J. Immunol.* 172:1083-91
145. Tenzer S, Stoltze L, Schonfisch B, Dengjel J, Muller M, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2004a) Quantitative analysis of prion-protein degradation by constitutive and immuno-20S proteasomes indicates differences correlated with disease susceptibility. *J. Immunol.* 172:1083-91
146. Thornton AM, Donovan EE, Piccirillo CA, Shevach EM (2004) Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol.* 172:6519-23
147. Thornton AM, Shevach EM (1998) CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J. Exp. Med.* 188:287-96
148. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwiderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2001b) Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194:1-12
149. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwiderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H (2001a) Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194:1-12
150. Udvardy A (1993) Purification and characterization of a multiprotein component of the *Drosophila* 26 S (1500 kDa) proteolytic complex. *J. Biol. Chem.* 268:9055-62
151. Van den Eynde BJ, Morel S (2001) Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr. Opin. Immunol.* 13:147-53
152. van Hall T, Sijts A, Camps M, Offringa R, Melief C, Kloetzel PM, Ossendorp F (2000) Differential influence on cytotoxic T lymphocyte epitope presentation by controlled expression of either proteasome immunosubunits or PA28. *J. Exp. Med.* 192:483-94
153. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Eichelberger M, Gaczynska M, Nagashima K, Rock KL, Goldberg AL, Doherty PC, Tonegawa S (1994) Altered peptidase and viral-specific T cell response in LMP2 mutant mice. *Immunity.* 1:533-41
154. von Boehmer H (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6:338-44
155. Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B, Schmitt E, Schild H, Radsak MP (2006) Synergistic activation of dendritic cells

- by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood*
156. Watts C (2004) The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat. Immunol.* 5:685-92
 157. Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A (2004) Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J. Immunol.* 172:4463-9
 158. Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z (1997) MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 7:837-47
 159. Wilcox RA, Chapoval AI, Gorski KS, Otsuji M, Shin T, Flies DB, Tamada K, Mittler RS, Tsuchiya H, Pardoll DM, Chen L (2002) Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J. Immunol.* 168:4262-7
 160. Williams O, Tanaka Y, Bix M, Murdjeva M, Littman DR, Kioussis D (1996) Inhibition of thymocyte negative selection by T cell receptor antagonist peptides. *Eur. J. Immunol.* 26:532-8
 161. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, Takeuchi O, Sugiyama M, Okabe M, Takeda K, Akira S (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301:640-3
 162. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Sanjo H, Uematsu S, Kaisho T, Hoshino K, Takeuchi O, Kobayashi M, Fujita T, Takeda K, Akira S (2002a) Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 420:324-9
 163. Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K, Akira S (2002b) Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J. Immunol.* 169:6668-72
 164. Yang Y, Huang CT, Huang X, Pardoll DM (2004) Persistent Toll-like receptor signals are required for reversal of regulatory T cell-mediated CD8 tolerance. *Nat. Immunol.* 5:508-15
 165. Yewdell J (2002) To DRiP or not to DRiP: generating peptide ligands for MHC class I molecules from biosynthesized proteins. *Mol. Immunol.* 39:139-46
 166. Yewdell JW (2001) Not such a dismal science: the economics of protein synthesis, folding, degradation and antigen processing. *Trends Cell Biol.* 11:294-7
 167. Yewdell JW, Schubert U, Bennink JR (2001) At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* 114:845-51
 168. York IA, Chang SC, Saric T, Keys JA, Favreau JM, Goldberg AL, Rock KL (2002) The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3:1177-84

169. Zinkernagel RM, Althage A (1999) On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:8092-7
170. Zinkernagel RM, Doherty PC (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. Nature 248:701-2

10 Publikationsverzeichnis

- Warger T, Rechtsteiner G, Schmid B, **Osterloh P**, Huber C, Schmitt E, Schild H, Radsak MP. *Transcutaneous immunization with immiquimod can confer durable tumor protection.* (submitted)
- Warger T, **Osterloh P**, Rechtsteiner G, Bopp T, Rammensee HG, Radsak MP, Schild H. *Agonistic TLR superactivation of Dendritic cells affects T cell immunity.* (submitted)
- Warger T*, **Osterloh P***, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B, Schmitt E, Schild H, Radsak MP. *Blood*, März 2006, *Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo.*
*contributed equally
- **Osterloh P**, Linkemann K, Tenzer S, Rammensee HG, Radsak MP, Busch DH, Schild H. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, März 2006, *Proteasomes shape the repertoire of T cells participating in antigen-specific immune responses.*
- Herter S, **Osterloh P**, Hilf N, Rechtsteiner G, Hohfeld J, Rammensee HG, Schild H. *Journal of Immunology*, Juli 2005, *Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells.*
- Rechtsteiner G, Warger T, **Osterloh P**, Schild H, Radsak MP. *Journal of Immunology, Cutting Edge*, März 2005, *Priming of CTL by transcutaneous peptide immunization with immiquimod.*

11 Danksagung

Besonders möchte ich mich bei Prof. Hans-Georg Rammensee bedanken, der mir durch seine Persönlichkeit, sein stets interessiertes aber immer kritisches Hinterfragen und seine offene Art und Weise immer ein Vorbild war. Unter der Obhut von Hans-Georg immunologisch forschen zu können war ein grosses Privileg und hat mich sicherlich in vielerlei Hinsicht geprägt. Vielen Dank für die tolle Zeit in Tübingen!

Danken möchte ich vor allem auch Prof. Hansjörg Schild („Hajo“), der mich all die Jahre von der Diplomarbeit bis zur Doktorarbeit direkt betreut hat und immer ein offenes Ohr für alle fachlichen und nicht-fachlichen Belange hatte. Hajo hat mich genauso entscheidend in meinem wissenschaftlichen Werdegang begleitet und auch als neuer Chef in Mainz nichts von seiner lockeren Sicht der Dinge eingebüsst. Dir daher ebenfalls vielen Dank für die tollen Jahre in Tübingen und später in Mainz!

Für immer wieder konstruktive Gespräche und Anregungen bedanken möchte ich mich bei Dr. Markus Radsak, der mir u.a. den guten Tip mit der Cp1 α Injektion gegeben hat.

Vielen Dank an Dr. Stefan Tenzer, der die in vitro Peptid-Verdaus durchgeführt und so massgeblich zum Anstoss des LMP7 Projektes beigetragen hat.

Nach München zu Dr. Kathrin Linkemann und Prof. Dirk Busch geht ein grosses Lob für die sehr gute Zusammenarbeit auf dem LMP7 Projekt, die ja von tollem Erfolg gekrönt war!

Tobias Warger („Tobi“) bekommt ein dickes (fachliches) Dankeschön vor allem für sein Angebot, auf dem „Superstimulus“ Projekt mitzuarbeiten und für die sehr konstruktive und 1A Zusammenarbeit während der ganzen Zeit in Mainz. Das war das Beste, was ich an wissenschaftlichem Teamwork erlebt habe!

Im selben Atemzug zu nennen ist hier Gerd Rechtsteiner („Gördeltier“), mit dem u.a. das „Aldara“-Projekt zur vollsten Zufriedenheit bearbeitet werden konnte.

Auch abseits des Fachlichen war mit den zwei Unzertrennlichen viel anzufangen, wie diverse Abende an Mainzer Rheinstränden und verkaterte Morgen danach belegen...Aber vergesst nicht Jungs, ab und zu mal die „Chill-Pill“ einzuwerfen und euch nicht immer über alles so tierisch aufzuregen...besser wär´ das...!

Beate Pömmerl und Patricia Hrstic in Tübingen, sowie Anne Meinl, Sandra Gerech, Andrea Drescher, Alexandra Hobel und Tanja Fragge gebührt meine grosse Wertschätzung und Dankbarkeit, weil sie in ihren Funktionen als „Technische Assistenten“ so viel mehr leisten, als der schnöde Ausdruck „TA“ auszudrücken vermag. Alle Sieben waren mir oft unersetzliche Hilfen, u.a. beim Klonieren, Peptide-Synthetisieren, BMDCs-Präparieren, T_{regs}-Isolieren, Medien-Ansetzen und Mäuse-Betüddeln. Daher wirklich ein ganz besonderes Dankeschön an Euch alle!

Ebenso möchte ich Claudia Falkenburger, Franziska Löwenstein (Tübingen), sowie Barbara Krentscher und Ulla Burkart (Mainz) nicht vergessen, die sich um den

reibungslosen Ablauf in den Spülküchen kümmern und unsere Arbeit so erst ermöglichen!

Dem Rest der Tübinger und Mainzer Institutsbelegschaften danke ich für die jeweils sehr angenehme Atmosphäre, die lustigen Weihnachtsfeiern und die Hilfsbereitschaft hier und da. Ein grosser Dank geht hierbei besonders an Lynne Yakes im Tübinger Sekretariat von Prof. Rammensee und an Birgit Caspar im Mainzer Sekretariat von Prof. Schild.

Für Gemeinschaftsprojekte und andere Freundschaftsdienste bedanke ich mich darüber hinaus besonders bei Prof. Stefan Stevanovic und seinem Sequenzladen, sowie bei Dr. Niels Emmerich für die harte aber (nord-deutsch) herzliche Einführung ins praktische Lab-Business.

Meinen Eltern Sabine und Jürgen Osterloh danke ich für all die tollen Erfahrungen, die sie mir während meines Studiums ermöglicht haben. Durch die Welt mit offenen Augen und Ohren zu gehen (reisen) und auch mal links und rechts gucken und hören zu können ist für mich persönlich sicherlich mindestens ebenso wichtig gewesen, wie die Biochemie oder Immunologie...

Last but not least geht das grösste Dankeschön an meine liebe Rabea, die mir nun schon so lange eine tolle Freundin, Partnerin sowie immer ein grosser Halt ist (in Anlehnung an E. Kishon: „die beste Freundin von allen“) und die mit mir schon durch so viele Dick´s und Dünn´s gegangen ist. Dream-Team eben, auf allen Ebenen...“Wir können alles schaffen wie die tollen dressierten Affen, wir müssen nur wollen..., wir können glücklich sein und trotzdem Konzerne leiten...!“ MERCI CHERIE!!!

12 Akademische Lehrer

Biron, Bisswanger, Bohley, Duszenko, Eisele, Gauglitz, Götz, Grabmayr, Günzl, Häfelinger, Hagenmaier, Hamprecht, Hanack, Hartmann, Hendrickson, Jäger, Jung, Kaiser, Krug, Lindner, Mayer, Mecke, Nakel, Oberhammer, Pfeiffer, Pommer, Poralla, Probst, Rammensee, Reutter, Schild, Stevanovic, Stegmann, Voelter, Wegmann, Weser, Wiesinger, Wohleben.

13 Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Philipp Osterloh
Geburtstag:	28. April 1975
Geburtsort:	Hamburg
Dezember 2003 – Juli 2006	Umzug der Arbeitsgruppe von Prof. Hansjörg Schild nach Mainz, Fortsetzung der Dissertation.
Juni 2002 – November 2003	Beginn der Dissertation am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie von Prof. Hans-Georg Rammensee.
Juni 2002 – Juli 2006	Dissertation unter Anleitung von Prof. Hans-Georg Rammensee, Tübingen und Prof. Hansjörg Schild, Mainz.
Februar 2002	Erlangen des Diplom in Biochemie, Eberhard - Karls Universität Tübingen.
Mai 2001 – Januar 2002	Diplomarbeit am Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. Hansjörg Schild im Labor von Prof. Hans-Georg Rammensee.
August 1999 – Juni 2000	Auslandsstudium an der Brown - University, Providence, U.S.A.
Februar 1996 – Januar 2002	Studium der Biochemie an der Eberhard - Karls Universität Tübingen.
Oktober 1995 – Januar 1996	Studium der Chemie an der Eberhard - Karls Universität Tübingen.
August 1994 – Juli 1995	Freiwilliges Soziales Jahr in Paris, Frankreich.
Juni 1994	Abitur, Stormarngymnasium Ahrensburg.
1985 – 1994	Stormarngymnasium Ahrensburg.
1981 – 1985	Grundschule Grosshansdorf.