

**Aus dem Zentrum für Neurologie der Universität Tübingen
Abteilung Allgemeine Neurologie
Stellv. Ärztlicher Direktor: Professor A. Melms**

**Die Regulationsdynamik auf Niveau der T-Zell-
Signaltransduktion bei Multipler Sklerose als ein
möglicher Mechanismus der Entstehung von
Autoimmunität**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

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

**vorgelegt von
Markus Bruno Renninger
aus
Pforzheim
2009**

Dekan:

Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. A. Melms

2. Berichterstatter:

Professor Dr. R. Klein

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS	I
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
III	HAUPTARBEIT	7
1.	EINLEITUNG	7
1.1.	Multiple Sklerose	7
1.1.1.	Epidemiologie	7
1.1.2.	Klinik	8
1.1.3.	Immunpathogenese.....	9
1.1.4.	Therapie und Aussicht.....	12
1.2.	Immunologie und Autoimmunität	16
1.2.1.	Allgemeines	16
1.2.2.	Das unspezifische Immunsystem	16
1.2.3.	Antigenspezifisches, erworbenes Immunsystem.....	17
1.3.	T-Zellabhängige Immunantwort	18
1.3.1.	T-Zell-Rezeptor.....	20
1.3.2.	T-Zell-Aktivierung	21
1.3.3.	T-Zell Signaltransduktion.....	22
1.3.3.1.	Rolle der Adapterproteine in der Signaltransduktion.....	24
1.3.3.2.	Aktivierung der Transkriptionsfaktoren.....	29
1.3.4.	Die Kostimulation.....	30
1.3.5.	Beendigung des TCR-Signals	31
1.3.6.	T-Zell-vermittelte Immuntoleranz und Autoimmunität.....	35
1.3.7.	Signaltransduktionsmoleküle und Autoimmunität.....	35
1.4.	Modelle zellulärer Immunität	36
1.5.	Fragestellung	39

2. MATERIAL UND METHODEN	41
2.1. Material	41
2.1.1. Antikörper und Chemikalien	41
2.1.2. Puffer und Reagenzien	42
2.1.3. Tabelle der verwendeten Laborgeräte.....	42
2.2. Methoden	42
2.2.1. Puffer und Medien	42
2.2.2. Zellkultur	44
2.2.3. Gefrierkonservieren und Auftauen der Zellen.....	44
2.2.4. Isolierung von Mausmilz- Zellen zur ex vivo Analyse	45
2.2.5. Stimulation der T-Zellen	45
2.2.6. Isolation von peripheren Blutmonozyten	46
2.2.7. Das Myelin-basische Protein und Glycoprotein-Antigen zur Stimulation der PBMCs	46
2.2.8. Stimulation der PBMCs	47
2.2.9. FACS –Analysen	47
2.2.9.1. Puffer.....	47
2.2.9.2. FACS: Versuchsansatz und Durchführung	47
2.2.10. Molekularbiologie.....	48
2.2.10.1. Die totale RNA-Extraktion	48
2.2.10.2. Bestimmung der RNA-Konzentration	48
2.2.10.3. Transkription der RNA-Proben in cDNA.....	48
2.2.10.4. Design der Oligonucleotidprimer	49
2.2.10.5. Konventionelle PCR-Analyse	51
2.2.10.6. Relative Quantifizierung der Genexpression durch die rt-PCR-Analyse	52
2.2.10.7. Schmelzkurvenanalyse	53
2.2.10.8. Agarose Gel-Elektrophorese	53
2.2.11. Statistische Methoden	54
3. ERGEBNISSE	55
3.1. Interspezifisches Primerdesign	55
3.1.1. Darstellung des interspezifischen Primerdesigns.....	56
3.1.1.1. Das LAT-Primerpaar	56
3.1.1.2. Das Crk-Primerpaar	57
3.1.1.3. Das c-Cbl-Primerpaar.....	58
3.1.1.4. Das Nck-Primerpaar	59
3.1.1.5. Das Grb2-Primerpaar	60

3.1.2. Validierung der Primer mittels konventioneller PCR-Analyse.....	61
3.2. Vergleichende Expressionsanalysen humaner PBMCs von MS-Patienten und gesunder Kontrollgruppe	62
3.2.1. Vergleich der Expressionsniveaus von Adaptermolekülen in unstimulierten PBMCs	62
3.2.2. Einzelbetrachtung der Expressionsniveaus von Adaptermolekülen unstimulierter PBMCs	64
3.2.3. Vergleich der Regulation von Adaptermolekülen der Signaltransduktion unter verschiedenen Stimulationsbedingungen	66
3.2.3.1. Die c-Cbl-Expression nach Stimulation	68
3.2.3.2. Die Crk-Expression nach Stimulation	70
3.2.3.3. Grb2-Expression nach Stimulation	72
3.2.3.4. Die LAT-Expression nach Stimulation	74
3.2.3.5. Die Nck-Expression nach Stimulation	76
3.2.4. Vergleich der Hochregulation von Signaltransduktionsmolekülen innerhalb der MS-Gruppe:	78
3.2.5. Vergleich der Hochregulation von Signaltransduktionsmolekülen innerhalb der Kontroll-Gruppe:.....	80
3.3. Vergleichende Expressionsanalysen der murinen Modellzellen	81
3.3.1. Vergleich der basalen Expressionsniveaus von Signaltransduktions-molekülen in unstimulierten Modellzellen und humanen PBMCs	81
3.3.1.1. Die basale LAT-Expression im Vergleich	83
3.3.1.2. Die basale Nck-Expression im Vergleich	84
3.3.1.3. Die basale Grb2-Expression im Vergleich.....	85
3.3.1.4. Die basale Crk-Expression im Vergleich	86
3.3.1.5. Die basale c-Cbl-Expression im Vergleich	87
3.3.2. Kinetische Analysen von Signaltransduktionsmolekülen in murinen Modellzellen und murinen Splenozyten	88
3.3.2.1. Kinetik der LAT-Expression nach Stimulation	89
3.3.2.2. Kinetik der Nck-Expression nach Stimulation.....	91
3.3.2.3. Kinetik der Grb2-Expression nach Stimulation	92
3.3.2.4. Kinetik der Crk-Expression nach Stimulation	93
3.3.2.5. Kinetik der c-Cbl-Expression nach Stimulation	93

4. DISKUSSION	95
4.1. Vergleichende Expressionsanalysen von Signaltransduktionsmolekülen humaner T-Zellen.....	95
4.1.1. Vergleich der unstimulierten PBMCs	95
4.1.2. Vergleich der stimulierten Zellen	99
4.2. Vergleichende Expressionsanalysen von Signaltransduktionsmolekülen in Modellen zellulärer Immunität und Zellen aus dem humanen T-Zellsystem	103
5. ZUSAMMENFASSUNG	108
6. LITERATURVERZEICHNIS	110
7. ANHANG	116
VI DANKSAGUNG.....	128
VII CURRICULUM VITAE.....	129

II Abkürzungsverzeichnis

Abl	Proto-oncogene tyrosine-protein Kinase ABL1
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle
AP1	heterodimerer Transkriptionsfaktor AP1
AS	Aminosäure
BBC	Modellzelle, murine Thymomzelle transfiziert mit einem MBP-spezifischen humanen TCR
BCR	B-Zellrezeptor
Bcr-Abl	onkogene Proteintyrosinkinase als Fusionsprotein aus dem Breakpoint cluster region Protein und dem Abelson murine leukemia viral oncogene homolog
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
B7.1	T-lymphocyte activation Antigen; CD80
B7.2	T-lymphocyte activation Antigen; CD86
Cbl-b	SH3-binding protein Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene b (RING finger protein 56)
c-Cbl	SH3-binding protein Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene c (RING finger protein 55)
CD	Cluster of Differentiation
Cop	Copolymer
Crk	SH2 -/ SH3-containing Adapter Protein, Cysteine-rich receptor-like Protein Kinase, Serine/threonine-Protein Kinase
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4; CD152
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonucleotid-triposphat
dsDNA	Doppelsträngige Desoxyribonucleinsäure
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Abkürzungsverzeichnis

EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELK1	ETS domain-containing protein Elk-4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular signal-regulated kinase 1
fc	final concentration
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FcR	Fc-Receptor
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
Fos	Proto-oncogene Protein Fos; G0/G1 switch regulatory protein 7
FSC	Forward scatter, Vorrwärtsstreuung
Fyn	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase
Gads	Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc adaptor protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanosin exchange factor
GEMs	Glycosphingo enriched microdomaines
GLAT	Glatiramer-Azetat
GRAP	GRB2-related adaptor protein
Grb2	growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
h	human
HD	Healthy donor
HLA	Human leukocyte antigen
HPK1	Hemopoetic progenitor Kinase 1
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
ICOS	inducible T-cell co-stimulator
IMDM	Iscove's modifiziertes DMEM
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB	NFκB-Inhibitor
IL	Interleukin

Abkürzungsverzeichnis

IP ₃	Inositol1,4,5-triphosphat
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
Itk	Inducible T-cell kinase
i.v.	intravenös
IVIg	(hochdosierte) intravenöse Immunglobuline
JNK	c-Jun-Kinase
JNKK	c-Jun N-terminal kinase kinase 1
KOP	Kopolymer 1
LAT	Linker for activation of T-cells
Lck	Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	Lipopolysacharid
m	murin
mab	Monoklonaler Antikörper
MAG	Myelin assoziiertes Glykoprotein
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MBP	Myelin basisches Protein
MEKK1	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1
MHC	Major Histocompatibiliy Complex
Mio.	Million(en)
min	Minuten
MOBP	Myelin oligodendrogliales basisches Protein
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Multiple Sklerose
MSTKG	Multiple Sklerose Therapie Konsensus Gruppe
Nck 1/2	SH2/SH3 Adapter Protein NCK-alpha/-beta
NFAT	Nuclear factor for activated T-cells
NFκB	Nuclear factor-κB
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen

Abkürzungsverzeichnis

NO	Stickstoffmonoxid
NTC	No template control
OSP	Oligodendrozytenspezifisches Protein
OKB	Oligoklonale Banden
PAG	Transmembranes Adapterprotein PAG, Phosphoprotein assoziiert mit den glycosphingolipid-enriched Microdomains, Csk-bindendes Protein Cbp
PBMC	Peripheral blood monocytes
PBS	Phosphat buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PDGF	Platlet derived growth factor
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PH	pleckstrin-homology Region
PI(3,4,5)P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PI3k	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C
PLC γ	Phospholipase C gamma
PLP	Phospholipoprotein
PMA	Phorbolmyristateacetate
PP-MS	Primär progressive Multiple Sklerose
PPT	Phosphoproteinphosphatase
PTEN	Inositollipid-Phosphatase
PTK	Protentyrösinkinase
Raf	proto-oncogene serine/threonine-protein kinase
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR-MS	Relapsing remitting Multiple Sklerose
rt-PCR	Real time Polymerase-Kettenreaktion
RT-Reaktion	Reverse Transkriptase Reaktion
Ser	Serin
SH2/3	Src homology 2/3-Region

Abkürzungsverzeichnis

Shc	Src homology 2 domain containing transforming protein 1
SHP1	Src homology 2 (SH2) domain-containing inositol 5'-phosphatase
SHIP	SH2-containing inositol phosphate 5-phosphatase
SLP76	SH2-containing leukocyte protein 76
Sos	Son of sevenless-guanosine Austauschfaktor
SP-MS	Sekundär progressive Multiple Sklerose
Src	Proto-oncogene tyrosine-protein Kinase
SSC	sideward scatter, Seitwärtsstreuung
SSC	Modellzelle: murine Thymomzelle transfiziert mit einem MBP-spezifischen humanen TCR
Syk	Spleen tyrosine kinase
Syp	Tyrosine-protein phosphatase
TCR	T-Tellrezeptor
Tec	Tyrosine-protein Kinase
TH	T-Helfer-Zelle
Thr	Threonin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Transmembranes Adapterprotein
Vav	Guanine nucleotide exchange Faktor für Rho-Familie-GTPasen
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	Very late Antigen-4
ZAP-70	Zeta Associated Proteintyrosinkinase-70
ZNS	Zentrales Nervensystem



III Hauptarbeit

1. Einleitung

1.1. Multiple Sklerose

1.1.1. Epidemiologie

Die MS ist die häufigste chronische Erkrankung des ZNS und zugleich die häufigste Erkrankung, die auch schon im jungen Erwachsenenalter zu einer progressiven Behinderung führt. Die genaue Ursache, die zur Entstehung der Multiplen Sklerose (MS) führt ist noch unbekannt. Sowohl genetische als auch umweltbedingte Faktoren können zur Krankheitsentstehung beitragen und den individuellen Krankheitsverlauf beeinflussen. Sie tritt mit einer weltweiten Prävalenz zwischen 1 und 300 Erkrankungen pro 100000 Einwohnern auf und die Diagnose betrifft damit weltweit ca. 2,5 Mio. Menschen (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000; Steinman 2001). Die Inzidenz der MS liegt in Nordeuropa und Nordamerika bei 4-8 diagnostizierten Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner und Jahr, ihre dortige Prävalenz liegt zwischen 60 und 1000 pro 100.000 Einwohnern (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000). Das Lebenszeitrisko, an MS zu erkranken, ist liegt bei 1 zu 400. Frauen sind dabei 1,5 bis 2 mal häufiger betroffen als Männer. Auch lassen sich geographische Unterschiede erheben; so gehören Nordeuropa, die nördlichen USA, Kanada und Australien zu den Regionen erhöhten Erkrankungsrisikos. Auf beiden Hemisphären nimmt die Inzidenz polwärts zu (Kurtzke 1980). Zudem bestehen erhebliche Unterschiede in der Prävalenz innerhalb der jeweiligen Breitengraden hinsichtlich der ethnischen Gruppen, so haben Kaukasier eine deutlich höhere Prävalenz als z.B. Asiaten. Dass aber auch Umweltfaktoren während der Jugend und Pubertät die Erkrankungssuszeptibilität beeinflussen, konnte durch Migrationstudien gezeigt werden. So gleicht sich die Prävalenz bei Individuen nach Migration und Auswanderung vor dem 15. Lebensjahr der Prävalenz der Zielregion an und umgekehrt. Die genaueren sozioökonomischen Hintergründe, die zur Entstehung der MS beitragen, sind dabei noch ungeklärt. Auch die höhere Lebenserwartung und verbesserte Diagnostik tragen

wahrscheinlich dazu bei, dass die Prävalenz in den letzten Jahrzehnten ansteigt. Genetische Faktoren konnten durch Populations-, Familien und Zwillingsstudien nachgewiesen werden. Auch in dieser Hinsicht scheint ein monokausaler Zusammenhang weniger wahrscheinlich. Besonderes Augenmerk ist allerdings auf die Assoziation mit dem humanem Leukozyten Antigen (HLA) DR2 a und b zu lenken, welches in der weiteren Betrachtung dieser Arbeit ebenfalls entscheidend sein wird. (Ebers, Sadovnick et al. 1995; Haines, Ter-Minassian et al. 1996) (Kuokkanen, Gschwend et al. 1997) (Sawcer, Jones et al. 1996). Das Risiko für die Nachkommen, an MS zu erkranken, ist in diesem Falle um das 10- bis 20- Fache erhöht. Weitere genetische Faktoren, welche die MS-Suszeptibilität erhöhen, konnten bei den meisten der im Immungeschehen beteiligten Komponenten (T-Zellrezeptor-, Myelin-, Zytokin-, Chemokin-, Immunglobulin- und Komplementgene) beschrieben werden.

1.1.2. Klinik

Als Erkrankung des jungen Erwachsenenalters manifestiert sich die MS meist zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr (Median 28 Jahre). Der klinische Verlauf ist sehr variabel. Nach dem zeitlichen Verlauf der neurologischen Symptome und nach der Möglichkeit ihrer vollständigen, teilweisen oder ausbleibenden Rückbildung lassen sich nach Lublin und Reingold (Lublin and Reingold 1996) verschiedene Verlaufsformen unterscheiden, wobei die meisten Patienten einen schubförmig remittierenden Erkrankungsverlauf (RR-MS) erleiden (Weinshenker, Bass et al. 1989). Das phasenweise Auftreten oder die Verstärkung neurologischer Symptome (Relaps) hält für wenige Tage bis Wochen an. Daran schließt sich eine Periode vollständiger oder teilweiser Besserung neurologischer Symptome (Remission) an, welche für Monate oder gar Jahre bestehen bleibt, bis sich ein erneuter Relaps ereignet (Lublin and Reingold 1996). Anfängliche Symptome sind bei Patienten jüngeren Erkrankungsalters Sehstörungen (Optikusneuritis, 36% der Patienten) und Parästhesien (33% der Patienten). Sensomotorische Defizite sowie Koordinationsstörungen findet man eher bei Patienten höheren

Erkrankungsalters. Die einzelnen Symptome entwickeln sich über Stunden bis Tage in unterschiedlicher zeitlicher Intensität. Ein Schub dauert durchschnittlich zwischen 1 – 3 Wochen mit anfänglichen Frequenzen von 0,5 – 1,3 pro Jahr. Triggernde Faktoren können dabei virale Infekte sein (Sibley, Bamford et al. 1985), symptomatisch signifikante Verschlechterung kann durch Koinzidenz von bakteriellen Infekten (z.B. Harnwegsinfekten) resultieren. Je länger ein Schub anhält, desto schlechter ist die Rückbildungstendenz neurologischer Symptome. Zu Erkrankungsbeginn bilden sich Symptome wie die Optikusneuritis, Doppelbilder oder Parästhesien noch gut zurück, Paresen, zerebelläre oder autonome neurologische Defizite dagegen eher schlechter.

30% der Patienten mit einem RR-MS Verlauf entwickeln gerade in späteren Erkrankungsphasen (durchschnittlich in etwa 10 Jahren) jedoch zunehmende neurologische Defizite ohne vollständige Rückbildung. Diese Verlaufsform wird sekundär progressive MS (SP-MS) genannt. In 10-20% aller Krankheitsfälle kommt es nicht zu Remissionen, sondern die Reihe der neurologischen Defizite nimmt chronisch zu, sodass das Risiko der progredienten Behinderung stetig zunimmt. Diese Verlaufsform bezeichnet man als primär progressive MS (PP-MS). Diese Patienten haben die schlechteste Prognose und das Risiko für eine schneller fortschreitende Behinderung ist am größten. Ein Drittel der Patienten erleidet lebenslang keine wesentliche Behinderung, ein weiteres Drittel der Patienten erleidet Behinderungen, welche beeinträchtigen, aber ein relativ normales Leben noch ermöglichen, und der prognostisch ungünstigste Anteil der Patienten erleidet Behinderungen, welche kumulativ zum Verlust der Gehfähigkeit, der Berufsunfähigkeit bis hin zur Vollpflege führen (Weinshenker 1994).

1.1.3. Immunpathogenese

Die grundlegende morphologische Veränderung bei der MS ist die Ausbildung charakteristischer Plaques, in welchen es zur Demyelinisierung der Axone kommt. Diese sind vornehmlich in der weißen Substanz des ZNS lokalisiert, insbesondere im Bereich der Kleinhirnstiele, der Sehnerven, im periventrikulären Bereich oder im Bereich des verlängerten Markes / Rückenmarkes.

Hohe Konzentrationen an intrathekal produzierten IgG1 und IgG3 Antikörpern können darüber hinaus im Liquor von MS Patienten nachgewiesen werden, was man sich in der diagnostischen Routine in dem Nachweis der OKB und des IgG-Index zu Nutze macht. Der zugrunde liegende Pathomechanismus ist die Autoimmunerkrankung (Martin, McFarland et al. 1992). Innerhalb dieser entzündlichen Plaques kommt es zur Zerstörung der Myelinscheide und / oder der Oligodendroglia, wobei die Axone der Neurone zunächst erhalten bleiben und erst im Verlauf ein Narbengewebe entsteht (Lassmann 1998). In den entzündlichen Plaques finden sich typischerweise Lymphozyten und Makrophagen. Unterschiedliche Zusammensetzung der zellulärer und nicht-zellulärer Komponenten einer solchen Entzündungsreaktion (T Lymphozyten, Makrophagen, Antikörper- und Komplementablagerungen), das Schädigungsmuster der Oligodendroglia und das des Myelins lassen unterschiedliche histologische Subtypen der MS Erkrankung erkennen (Lucchinetti, Bruck et al. 1996). Ein einheitliches Schädigungsmuster ist schwer ersichtlich, und es muss angenommen werden, dass verschiedene immunologische und toxische Abläufe zu unterschiedlichen pathomorphologischen Korrelaten der MS führen. Während in der ersten Phase in der Entstehung eines entzündlichen Plaques die Inflammation überwiegt und die Gabe immunmodulatorischer Substanzen wirksam sind, kommt es in einer zweiten Phase zur Neurodegeneration bei verminderter regenerativer Kapazität und damit zu einem schlechteren Ansprechen auf immunsupprimierende Medikamente. Kommt es vor allem zu wiederholten Schüben solcher Entzündungen, entstehen Narben irreversibler Axonschädigung und damit progrediente neurologische Ausfälle. Diese Läsionen können radiologisch am besten durch die Magnetresonanztomographie (MRT) dargestellt werden. Diese stellt fokale Ödeme als hyperintense Läsion infolge einer lokalen Störung der Blut-Hirnschranke dar (Brex, Ciccarelli et al. 2002).

Betrachtet man das Entzündungsgeschehen innerhalb der Plaques genauer, zeigt sich eine charakteristische Auflockerung der Myelinscheiden (Lassmann 2002). Es lassen sich Infiltrate von T- und B- Lymphozyten, Makrophagen und aktivierte Mikroglia nachweisen, in welchen intrazytoplasmatische Einschlüsse

abzubauen Myelinbestandteile nachgewiesen werden können (Steinman 2001). Des Weiteren werden in den Plaques erhöhte Konzentrationen TH1-spezifischer Zytokine (IL2, IFN- γ und TNF- α) und erhöhte Mengen TH1-spezifischer Zytokinrezeptoren gemessen (Martinez-Caceres, Espejo et al. 2002). Dies unterstützt die Hypothese einer TH1-zellvermittelten Autoreaktivität gegen die Oberflächenantigene der Myelinscheiden. Darüber hinaus zeigen MS Patienten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe erhöhte Werte von TH1-spezifischen Zytokinen auch im peripheren Blut (Merrill 1992; Lucchinetti, Bruck et al. 2001).

Die Ausbildung einer MS-Plaques ist somit ein mehrphasiger Prozess (Lucchinetti, Bruck et al. 2000), bei welchem zunächst die zirkulierenden Effektorzellen des Immunsystems die Blutgefäße verlassen müssen, um in den Entzündungsbereich zu gelangen. Nachfolgend wird der Entzündungsprozess aufrechterhalten durch auto- und parakrine Chemokine, welche weiterhin autoreaktive Zellklone zur Proliferation anregen und Makrophagen / Mikroglia anlocken, um so die optimalen Bedingungen für den Ablauf einer vollständigen Immunreaktion zu generieren. Normalerweise wird die Blut-Hirnschranke durch Tight Junctions zwischen den Endothelzellen aufgebaut. Während einer Entzündungsreaktion exprimieren die Endothelzellen Adhäsionsfaktoren wie das Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM) und aktivierte T-Zellen können an Integrine wie das Very Late Antigen-4 (VLA-4) binden (Steinman 2001). Nach dem Passieren der Endothelbarriere vermittelt durch die Adhäsionsmoleküle und chemotaktisch angezogen durch sezernierte Chemokine, bereiten sich die T-Zellen ihren Weg durch das perivaskuläre Typ IV-Kollagen, indem sie spaltende Matrixmetalloproteasen sezernieren. (Kivisakk, Trebst et al. 2001) (Zipp, Weil et al. 1999; Hartung and Kieseier 2000). So migrieren die aktivierten T-Zellen in die weiße Substanz des ZNS und fachen eine weitere Kaskade der Immunreaktion an. In dem Plaques selbst zeigen sich folglich erhöhte Werte der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α , - β , und IFN- γ , sowie Stickstoffradikale (NO), monoklonalen Antikörpern (mab) und Komponenten des Komplementsystems. Folge dieser Immunantwort ist die antikörper- und zellvermittelte Zytolyse, welche letztendlich zur Destruktion der

Myelinscheiden mit Phagozytose von Myelinbestandteilen durch aktivierte Makrophagen / Mikroglia führt.

Als mögliche Zielantigene dieser autoimmunen T-Zell und auch B-Zell vermittelten Reaktion kommen Myelinproteine wie MBP, MOG, PLP, MAG, MOBP und OSP, sowie nicht myelin-assoziierte Antigene wie die CNPase, 2', 3'-zyklische Nukleotide, 3'-Phosphodiesterase, Transaldolase, S100 β , α B-Crystallin und Hitzeschockproteine in Frage. Mit Hilfe der myelinassoziierten Autoantigene läßt sich im Tiermodell eine autoreaktive Enzephalitis (EAE) generieren. Die Immunkolokalisation des enzephalitogenen MBP (85-99) in Bezug zum präsentierenden MCH Klasse II Molekül (HLA-DR2b) konnte auf Antigen-präsentierenden Zellen des ZNS (v.a. Mikroglia und Makrophagen) bei der MS nachgewiesen werden (Krogsgaard, Wucherpfennig et al. 2000). Dieser wichtige Bezug von MBP (85-99) und dem MCH Klasse II Molekül (HLA-DR2b) spielt auch im experimentellen Aufbau und bei der Untersuchung der Immunreaktion der Modellzellen in dieser Arbeit eine entscheidende Rolle. Die wichtigsten enzephalitogenen, zellulären Komponenten in der Konzentrierung der Immunantwort sind sie CD4⁺ Helfer T-Zellen, das Milieu der Mediatoren in den Plaques weist auf eine TH1-vermittelte Immunantwort hin.

Die richtige Balance zwischen T-Zell-Aktivierung und Inhibition ist der Schlüsselprozess in der Entstehung einer autoimmunologischen Erkrankung wie der MS. So scheint nicht nur die Untersuchung aktivierender Faktoren lohnend in der Beschreibung der Immunpathogenese der MS und ihrer möglichen therapeutischen Ansätzen. Anergie und Apoptose induzierende Prozesse, wie veränderte Peptidliganden, können als mögliches Therapeutikum eingesetzt werden (Bielekova, Goodwin et al. 2000) - mögliche entscheidende Moleküle intrazellulärer Signalwege in der Induktion von Anergie einer T-Zelle sollen deshalb auch im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

1.1.4. Therapie und Aussicht

Von allgemein immunsuppressiven Substanzen bis hin zur spezifischen Unterbrechung von T-Zellrezeptor–Peptid–MHC-Kontakten steht mit dem wachsendem Wissen um die molekulare Immunpathologie der MS eine immer größer werdende Zahl von möglichen Therapeutika zur Verfügung. Zur

Therapie eines akuten Schubes werden hochdosiert Kortikosteroide eingesetzt, sowie weitere allgemeine Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclophosphamid, Methotrexat, Ciclosporin A) bei der Therapie von rapid progressiven Verläufen im Rahmen einer Eskalationstherapie bis hin zur Plasmaapherese zur Reduktion der Konzentration der Autoantikörper im Blut. Bei der Prophylaxe kommen IFN- β , Cop und Azathioprin zum Einsatz. Weiterhin von Bedeutung sind Zytostatika wie z.B. Mitoxantron. Begleitend dazu werden in der symptomatischen Therapie Spasmolytika und Physiotherapie eingesetzt.

Beachtet man die multiplen Aspekte der Immunpathogenese der MS, so ergeben sich auch neue therapeutische Ansätze, welche letztendlich die Zerstörung des Myelins aufhalten oder die Remyelinisierung fördern sollen (Noseworthy 1999; Wingerchuk, Lucchinetti et al. 2001). Vorrangige Punkte sind: die Modulation der Adhäsionsmoleküle, die Inhibition der Matrix-Metalloproteinasen, die Reduzierung der T-Zellaktivierung durch Anti-Chemokine, Integrine, Peptid-Immuntherapie, T-Zellvakzinierung und/oder Anti-B7-Antikörper, die Förderung der antiinflammatorischen TH2-Zellen sowie Anti-TH1-Zytokine, die Inhibition der humoralen Antwort durch Anti-Autoantikörper und Komplementinhibitoren, die Anregung der Oligodendrozytenvorläuferzellen durch Wachstumshormone, sowie der Einsatz neuroprotektiver Agenzien.

Die bisherigen therapeutischen Strategien lassen sich im Zusammenhang mit den einzelnen Aspekten der Immunpathogenese der MS wie folgt darstellen.

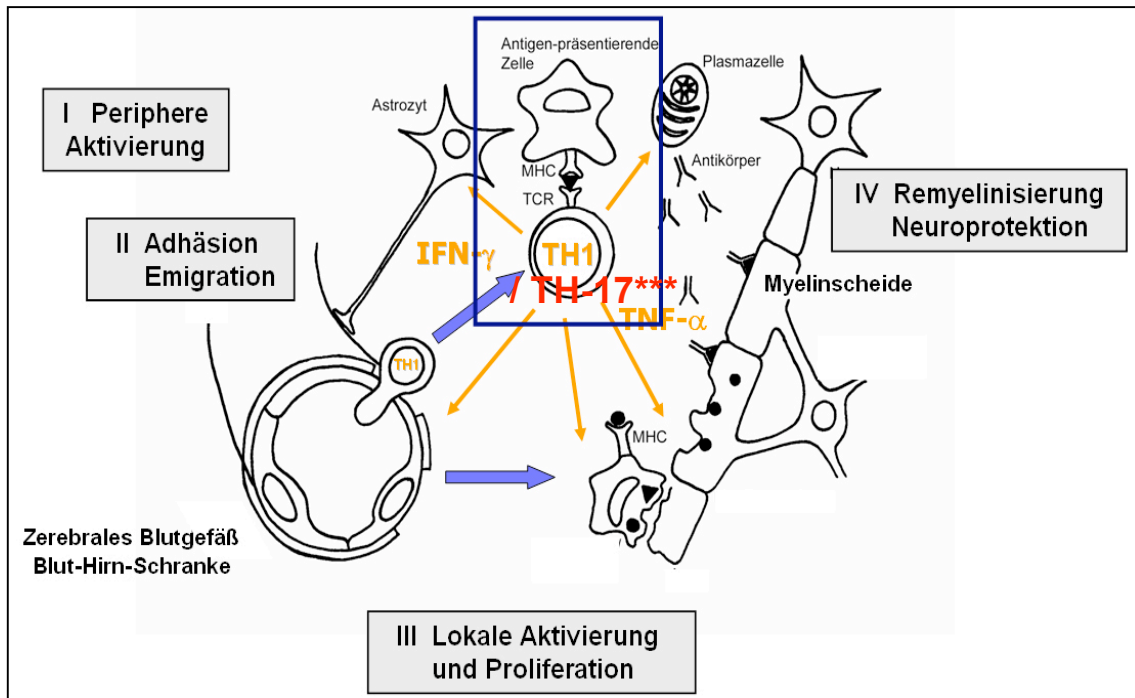
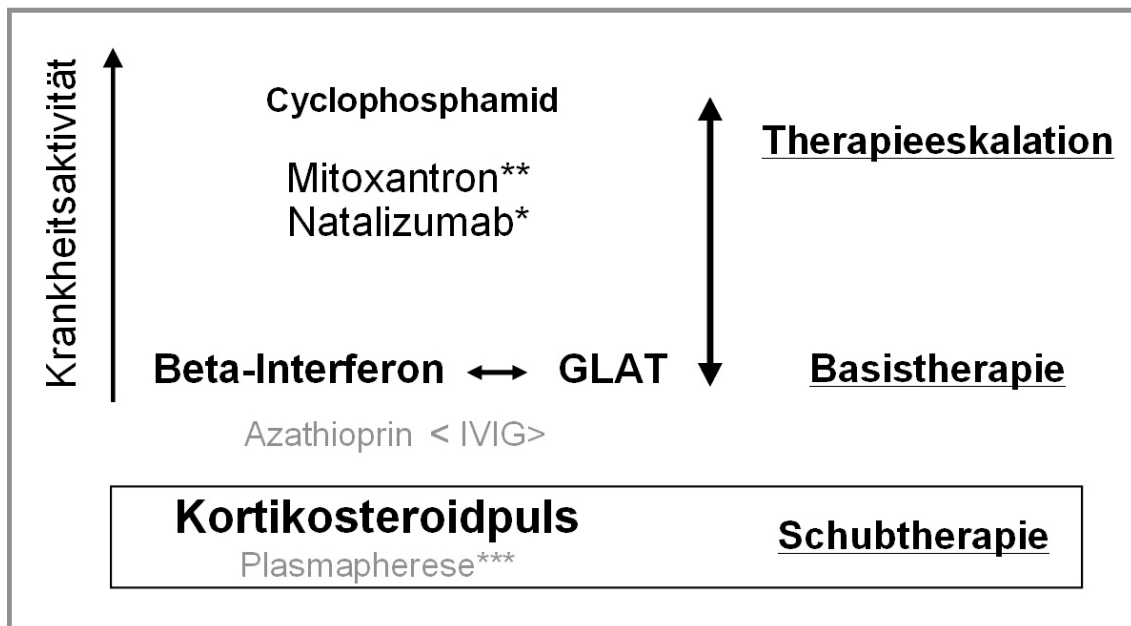


Abbildung 1 (I) In der Peripherie außerhalb des ZNS werden bereits existierende Vorläufer T-Zellen aktiviert. Nach Permeation (II) der Blut-Hirnschranke werden diese Zellen durch Präsentation ihres jeweiligen spezifischen Antigens im ZNS reaktiviert (III). Nachfolgend werden Zytokine sezerniert, welche wiederum Mikroglia, Astrozyten und weitere Effektorzellen des Immunsystems rekrutieren sowie die Antikörperproduktion durch die Plasmazellen anregen. Antikörpervermittelte zytotoxische Effekte und die Abräumprozesse durch die Mikroglia führen letztendlich zur Demyelinisierung (IV). Diese einzelnen Schritte der Immunkaskade und Pathogenese der MS lassen sich durch verschiedene therapeutischen Prinzipien, welche genau an diesen Punkten eingreifen, wesentlich beeinflussen; *modifiziert nach (Hohlfeld 1997)*.

*** Neuere Erkenntnisse aus Tiermodellen und aus Patienten mit MS geben einen starken Hinweis dafür, dass T-Lymphozyten mit TH-17 Phänotyp, eine entscheidende Rolle in der Immunpathogenese der MS spielen und verdrängen zunehmend die gängige Lehrmeinung, dass die TH1 Subgruppe im Zentrum des immunmodulatorischen Geschehens der MS steht (McFarland & Martin 2007). Die TH-17 Lymphozyten unterscheiden sich von den TH1 und TH2 Lymphozyten und notwendig für ihre Entwicklung ist die Anwesenheit von IL23, IL6 und TGF- β . IL23-defiziente Mäuse entwickeln im Tiermodell keine EAE, wohingegen in IL12-defizienten Mäusen diese sehr wohl generiert werden kann.

Abhängig vom aktuellen klinischen Stadium des Patienten sowie von der Entwicklung des weiteren Krankheitsverlaufes der schubförmigen MS lassen sich nach MSTKG Neuerung von 2006 (Rieckmann 2006) verschiedene Szenarien der immunmodulatorischen Stufentherapie skizzieren:



- * Bei ≥ 2 schweren Schüben pro Jahr auch als Primärtherapie möglich
- ** Therapiewechsel auf dieser Eskalationsstufe noch nicht erprobt
- *** Option bei schweren, Steroid-resistenten Schüben

Abbildung 2: Schema der MSTKG-2006 zur immunmodulatorischen Stufen- und Eskalationstherapie der MS, (Rieckmann 2006).

Durch ein immer detaillierteres Verständnis der einzelnen ineinander greifenden molekularen und immunologischen Abläufe wird ein immer gezielteres und individuelleres therapeutisches Handeln ermöglicht.

Ziel dieser Arbeit soll es u.a sein, durch Identifikation quantitativ auffälliger Moleküle der TCR-Signaltransduktion neue Möglichkeiten eines gezielten molekularen Eingreifens in diese auffälligen Strukturen der T-Zellaktivierung aufzuzeigen.

1.2. Immunologie und Autoimmunität

1.2.1. Allgemeines

Die zentrale Aufgabe des Immunsystems ist der Schutz des Organismus vor Krankheitserregern. Des Weiteren braucht der menschliche Organismus das Immunsystem, um transformierte, körpereigene Zellen, das heißt gealterte, viral infizierte oder neoplastische Zellen, selektiv zu erkennen und zu eliminieren. Grundlegend dafür ist die Fähigkeit, gegen ein extrinsisches Agens oder intrinsisch alterniertes Agens eine kontrollierte Immunantwort generieren zu können (Immunität), aber auch eine Immunantwort nach vollständiger Eliminierung des extrinsischen oder intrinsischen Agens wieder terminieren zu können (Immuntoleranz).

1.2.2. Das unspezifische Immunsystem

Azelluläre Bestandteile sind chemische und mechanische Abwehrfaktoren auf Haut und Schleimhaut. Zelluläre Bestandteile sind die ontogenetisch ältere Zellart der Makrophagen, Monozyten, Mastzellen und Granulozyten. Eine weitere Zellart sind die natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), die sich aus der lymphozytären Zelllinie entwickeln, jedoch keinen Antigen-spezifischen Rezeptor tragen. Sie sind in der Lage Tumorzellen und Virus-infizierte Zellen zu erkennen und zu vernichten.

Als humorale Faktoren des Immunsystems sind das alternative Komplement-System, die Akut-Phase-Proteine und die Zytokine zu nennen. Das Komplement-System besteht aus einer Gruppe von Proteinen, die in enzymatischen Kaskaden aktiviert werden mit dem Ziel der Opsonisierung (z.B. von Bakterien), der Bindung von Antigen-Antikörper-Komplexen, der Aktivierung und Chemotaxis von Phagozyten und NK-Zellen sowie der osmotischen Lyse der Zielzellen.

Zytokine hingegen sind eine heterogene Gruppe von Glykoproteinen, welche in einer großen Diversität von den Zellen des Immunsystems gebildet und sezerniert werden. Diese aktivieren ihre Zielzellen, welche daraufhin

differenzieren und ihre jeweiligen spezifischen zellulären Funktionen erfüllen, um eine umfassende Immunantwort zu generieren.

1.2.3. Antigenspezifisches, erworbenes Immunsystem

Das antigenspezifische Immunsystem übernimmt die Hauptfunktion in der Diskrimination zwischen Immunkompetenz und Immuntoleranz. Dieses lässt sich ebenfalls unterteilen in eine zelluläre und eine humorale Komponente. Zum zellulären System gehören die B-Lymphozyten, welche nach Aktivierung als humorale Komponente die Antikörperproduktion (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM) übernehmen, sowie die T-Lymphozyten, die als humorale Komponente die Zytokine produzieren. Das zelluläre System dient zur Abwehr von viralen, mykobakteriellen, intrazellulären Erregern sowie zum Schutz vor Pilzinfektionen. Die humoralen Abwehrmechanismen stehen dagegen bei der Abwehr von bakteriellen Erregern im Vordergrund. Die Aktivierung der antigenspezifischen Immunabwehr geht von den antigenpräsentierenden Zellen (APC) aus. Dazu zählen die B-Lymphozyten und das Monozyten-Makrophagensystem (Blutmonozyten, Makrophagen, die Langerhanszellen der Haut, Kupfer-Zellen der Leber, sowie die dendritischen Zellen des lymphatischen Gewebes) welche alle das MHC-Molekül der Klasse II (major histocompatibility complex - auch als human leukocyte antigen (HLA) bezeichnet) auf ihrer Zelloberfläche tragen. Daneben spielt die Klasse I der MHC-Moleküle eine ebenfalls entscheidende Rolle im Immunsystem. Diese MHC-Klasse I Moleküle werden mit Ausnahme der kernlosen Erythrozyten auf jeder kernhaltigen Zelle des Organismus exprimiert. Die auf ihnen präsentierten Proteinfragmente dienen dazu, körperfremd von körpereigenen zu unterscheiden, d. h. eine Immuntoleranz zu gewährleisten. Eine CD8-positive zytotoxische T-Zelle erkennt mit ihrem T-Zellrezeptor selektiv diese MHC-Klasse I Moleküle und erfüllt nach Aktivierung ihre Effektorfunktion, die Zytolyse z.B. nicht körpereigener Zellen oder virusinfizierter Zellen. MHC-Klasse II Moleküle besitzen ebenso wie die MHC-Klasse I Moleküle eine dimere Struktur; ihre variable Antigenbindungsstelle wird aber durch Anteile der α - und der β -Kette gebildet. Diese MHC-Klasse II Moleküle werden nur auf den oben beschriebenen APCs und auf Zellen des Thymusgewebes (zur T-Zellreifung

und Selektion) exprimiert. Über die Präsentation aller unspezifisch phagozytierter, nicht körpereigener Fragmente von Bakterien, Pilzen oder Viren, welche zuvor durch spezifische Proteasen intrazellulär prozessiert wurden, können diese MHC-Klasse II Moleküle eine spezifische antigengerichtete Immunantwort initiieren.

1.3. T-Zellabhängige Immunantwort

Im Mittelpunkt der Pathogenese der MS und somit im Fokus dieser Arbeit steht die Funktion der T-Lymphozyten und sie soll daher näher beleuchtet werden. Die T-Zellen interagieren über ihren T-Zellrezeptor selektiv mit den MHC-Molekülen. Vorläufer dieser Zellen wandern zur Zelldifferenzierung aus dem Knochenmark in den Thymus ein, um dort Immuntoleranz und Immunabwehr zu erlernen. Zellen, die gegen körpereigene Antigene gerichtet sind, werden dort eliminiert. Charakteristisch für die T-Zelle ist der T-Zellrezeptorkomplex auf ihrer Zelloberfläche, um darüber den Zell-Zell-Kontakt herzustellen und entsprechend auf MHC-Klasse II Molekülen präsentierte Antigene zu erkennen und somit nach ihrer Aktivierung eine spezifische Immunantwort zu generieren. Der wichtigste Bestandteil in diesem Komplex ist der T-Zellrezeptor, der als heterodimeres Molekül aus einer α - und einer β -Kette (seltener aus einer γ - und δ -Kette) besteht. Der variable Anteil dieses Rezeptors bildet die antigenerkennende Region. Daneben finden sich Rezeptordomänen, welche das Molekül in der Zellmembran verankern. Als Korezeptor exprimiert ein Teil der T-Zellen das CD4-Molekül; diese werden gemäss ihrer Funktion T-Helfer-Zellen genannt. Eine andere Gruppe exprimiert den CD8-Korezeptor. Diese Zellen werden analog als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Vermittelt durch die Funktion ihrer Korezeptoren erkennen die CD4-tragenden T-Helfer-Zellen die MCH-Klasse II Moleküle, wohingegen zytotoxische T-Zellen mit ihrem Korezeptor CD8 die durch MHC-Klasse I Moleküle präsentierten körpereigenen Antigene erkennen.

Die CD8- und T-Killerzellen vermitteln ihre Effektorfunktion durch verschiedene zytotoxische Instrumente, wie das Molekül CD95-Ligand, die Zytotoxine, wie beispielsweise die Perforine und Granzyme, sowie verschiedene Zytokine (IFN-

γ , TNF- α und TNF- β) (Lublin and Reingold 1996).

Die Gruppe der CD4-tragenden T-Helfer-Zellen (TH-Zellen) lässt sich in weitere Subpopulationen unterteilen. Stimuliert durch IL12 in einem Milieu während der Generierung einer Immunantwort, differenzieren die T-Helfer-Zellen zur Gruppe der TH1-Zellen. Diese Zellpopulation ist charakterisiert durch die Sekretion von IL2 und TNF- β zur Aktivierung von Makrophagen und CD8-Zellen (zelluläre Immunantwort) (Janeway, Travers et al. 2001; Kuchroo, Anderson et al. 2002; Monney, Sabatos et al. 2002). Stimuliert durch IL4 differenzieren sie zu TH2-Zellen. Diese wiederum sezernieren hauptsächlich IL4, IL5, IL9, IL10 und IL13 zur Aktivierung von B-Zellen, Mastzellen und Eosinophilen entsprechend einer humoralen oder allergischen Immunantwort (Janeway, Travers et al. 2001; Kuchroo, Anderson et al. 2002; Monney, Sabatos et al. 2002), wobei die Entwicklung einer TH1-Antwort unterdrückt wird.

Das Hauptsignal zur Aktivierung einer T-Zelle erfolgt über den T-Zellrezeptorkomplex durch das spezifisch MHC-II-präsentierte Antigen. Weitere Interaktionen kostimulatorischer Moleküle sind notwendig:

- von B7.1/B7.2 (CD80/CD86) auf APCs mit CD28 oder CTLA-4 (CD152) auf T-Zellen
- ICOS-Ligand (APC) und ICOS (T-Zelle)

Erst beide Signale zusammen führen zu einer vollständigen Aktivierung einer T-Zelle. Ein TCR-Signal oder ein kostimulatorisches Signal alleine hat keinen aktivierenden Effekt auf die T-Zelle, sondern die Zelle geht zur Vermeidung einer falschen Immunantwort in die Anergie (Janeway, Travers et al. 2001) und soll so eine Immuntoleranz erzeugen (Schwartz 2003).

Werden beide notwendigen Signale vermittelt, so ist der erste Schritt zur Aufrechterhaltung einer suffizienten Immunantwort die Sekretion von IL2. Es kommt nachfolgend zur Stimulation der T-Zelle selbst sowie aller spezifisch stimulierten T-Zellen der Umgebung mit dem Ziel der nachfolgenden klonalen Proliferation und Differenzierung. Dabei wird die unter IL2 Stimulus proliferierende Zelle als unreife Effektor-T-Zelle (TH0) bezeichnet. Die Differenzierung in TH1- sowie TH2-Subpopulationen erfolgt wie oben beschrieben.

Nach Beendigung einer erfolgreich generierten Immunantwort haben T-Lymphozyten und B-Lymphozyten die Fähigkeit, bei einem zweiten Kontakt mit demselben Antigen stärker und schneller eine Immunabwehr zu generieren. Verantwortlich hierfür sind die T-Gedächtniszellen. Diese exprimieren verstärkt CD44 und LFA-1 [11], sowie geringere Mengen an L-Selektin, ein auch als CD62 Ligand bezeichnetes Adhäsionsmolekül.

1.3.1. T-Zell-Rezeptor

Auf den T-Zelloberflächen wurde der TCR-Komplex in zwei verschiedenen Isoformen beschrieben. Er besteht aus zwei heterodimeren Glykoproteinen, einer α - und einer β -Kette, die miteinander durch eine Disulfidbrücke verbunden sind (Abb. 2). Als Variante dazu exprimieren manche T-Zellpopulationen Rezeptoren bestehend aus einer γ - und einer δ -Kette (1-5%). Der TCR ähnelt als membrangebundenes Molekül seiner Form nach einem Immunglobulin-Fab-Fragment. Jedoch kann er Antigene nur monovalent, im Gegensatz zu den bivalenten Immunglobulinen, binden. Er wird aktiviert durch seinen Liganden, das MHC-Klasse II Molekül. Die α -Kette besteht aus dem V- (variable), dem J- (joining) und dem C- (constant) Segment. Die β -Kette verfügt zusätzlich über ein D- (diversity) Segment.

Der TCR-Aufbau lässt sich mit jeweils drei Domänen hinsichtlich seiner Lokalisation zur Zellmembran einteilen in einen extrazellulären, einen transmembranen und einen zytoplasmatischen Anteil. Der V-Bereich stellt die membrandistale Domäne des TCR-Moleküls dar, während sich der C-Bereich in den membranproximalen, den transmembranären und den zytoplasmatischen Anteil gliedert. Extrazellulär bestehen die Domänen aus Peptiden, die sich aus J-, bzw. D- und J-Gensequenzen zusammensetzen. Diese Ketten sind klonal variabel und dienen der Antigenerkennung. Durch unterschiedliche Kombinationen und Permutationen der vielen VJ- bzw. VJD-Segmente wird die Variabilität des TCR erst ermöglicht und weiter gesteigert durch molekulare Mechanismen bei der Rekombination (Janeway, Travers et al. 1997). Der C-Bereich der α : β -Heterodimere dient zur Verankerung des Rezeptors in der Zellmembran. Innerhalb dieses Abschnittes sind die Heterodimere untereinander unspezifisch über die positive / negativ geladenen Seitenketten

assoziiert, sowie zusätzlich mit einem Komplex von vier weiteren Proteinketten (zwei ϵ - eine γ - und eine δ -Kette). Jeweils eine dieser ϵ -Ketten ist hierbei assoziiert mit einer γ oder δ -Kette und bildet zusammen mit dieser den CD3 Korezeptor. Dieser wird benötigt, um das α : β -Heterodimer an der Oberfläche zu präsentieren und das TCR-Signal aufrecht zu erhalten. Im Zellinneren befindet sich, ebenfalls membranständig an das α : β -Heterodimer assoziiert, das $\zeta\zeta$ -Homodimer. Diese invarianten Hilfsketten dienen der Signaltransduktion nach intrazellulär. Alle Untereinheiten des TCR-Komplexes zusammen enthalten in ihren zytoplasmatischen Domänen zehn so genannte ITAMs (immuno-receptor tyrosine-based activation motifs), welche jeweils aus zwei Tyrosinresten bestehen, die 9-12 Aminosäuren voneinander entfernt liegen. Der TCR-Komplex ist über diese in der intrazellulären Region mit Proteinen für die Signaltransduktion assoziiert. Diese aktivierenden Bindungsstellen übertragen das TCR-Signal nach intrazellulär über die Interaktion von aktivierenden / inhibierenden Proteintyrosinkinasen ITAMs (Wange and Samelson 1996).

1.3.2. T-Zell-Aktivierung

Die Antigenbindung am TCR führt zur Gruppierung desselben mit invarianten Ketten und Korezeptoren (Clustering), v. a. in den GEMs (glycosphingolipid-enriched microdomains), auch lipid rafts genannt. Der CD3-Korezeptorkomplex ermöglicht dabei u. a. die Übertragung des Signals in das Zellinnere (Abb. 2). Hierbei führt das Clustering zur Aktivierung der intrazellulären Proteintyrosinkinasen der Src-Familie (entdeckt bei Rous Sarcomaviren in Hühnern als Oncogen), Fyn und Lck (p59 und p56), welche bei ruhendem Rezeptor nur niedrig-affin an die ITAMs der zytoplasmatischen Rezeptorketten gebunden sind und bei Clustering den Signaltransduktionsprozess initiieren. Dabei ist die Src-Kinase Lck an CD4 / CD8 und Fyn an die ITAMs von CD3 assoziiert. Gelangen infolge der Rezeptoraktivierung zwei Fyn-Kinasen in den lipid rafts in räumliche Beziehung, so kommt es zu Transphosphorylierung an einem proximalen Tyrosinrest und damit zur Transaktivierung. Fyn wird auch durch die

Phosphoproteinphosphataseaktivität des CD45-Korezeptors dephosphoryliert und damit ebenfalls aktiviert, was u. a. eine beschleunigte Aktivierung der T-Gedächtniszellen nach erneutem Antigenkontakt ermöglicht (immunologisches Gedächtnis). Dabei wird das CD45 Molekül allerdings nicht in die lipid rafts eingeschlossen. Die Tyrosinkinase phosphorylieren Schlüssel-Tyrosinreste in den ITAMs der zytoplasmatischen Rezeptorketten (Dustin and Chan 2000). Diese phosphorylierten ITAMs rekrutieren nun weitere Proteintyrosinkinase wie Lck oder Zap-70 (zeta associated protein) durch ihre SH2-Domäne an die Zytoplasmamembran in der Umgebung des TCR. Diese ITAMs dienen zur Amplifizierung des Signals, zur Interaktion mit ZAP-70, PLC γ und der PI3-Kinase, sowie zur Assoziation mit dem Zytoskelett und Adapterproteinen zur vollständigen Ausbildung einer funktionell gestärkten immunologischen Synapse (Bunnell, Hong et al. 2002). Adapterproteine (Linkerproteine) werden hier benötigt, um Protein-Protein-Interaktionen zu erleichtern, wobei die Kontakte über die SH2- / SH3-Domänen ermöglicht werden. SH3-Domänen binden bevorzugt an die „proline-enriched-microdomains“ der Linkerproteine. Hierüber wird die Signaltransduktionskaskade initiiert und im Weiteren die eng miteinander verzweigten Signaltransduktionswege beschrieben.

1.3.3. T-Zell Signaltransduktion

Die Signaltransduktionskaskade führt letztendlich zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche in den Zellkern translozieren und dort die quantitative Transkription verschiedener Moleküle starten. Diese führen in der Ausübung ihrer vollen zellbiologischen Aktivität zur Generierung einer vollständigen zellulären Immunantwort über die Steuerung einer klonalen Proliferation, die Differenzierung und Ausbildung von Effektorfunktionen, wie z.B. die Translation und Sekretion von Zytokinen oder die komplexe Reorganisation des Zytoskeletts zur Aufrechterhaltung der immunologischen Synapse oder Zellmigration. Dies führt wiederum zur Stabilisierung des TCR-Komplexes und Rekrutierung weiterer Kinasen des Signaltransduktionsweges an den Rezeptor, um das TCR-Signal weiter zu verstärken. Das Signal wird auf dem Weg zum Kern nicht nur aufrechterhalten, sondern auch amplifiziert. Hauptsächlich drei Signaltransduktionswege (van Leeuwen and Samelson

1999), die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen, werden dabei besprochen. Sie arbeiten bei der Regulation der Effektorfunktionen eng zusammen (Lopez-Rodriguez, Aramburu et al. 2001; Macian, Lopez-Rodriguez et al. 2001), (siehe Abbildung 3):

- Der Weg über die PLC γ führt durch Ca²⁺-Freisetzung und über Calcineurin zur Aktivierung der Transkriptionsfaktor-Familie NFATc1-c4 (Okamura and Rao 2001).
- Der Weg der MAP-Kinasen führt zu einer Aktivierung von c-Jun und Fos und diese bilden wiederum den heterodimeren Transkriptionsfaktorkomplex AP1 (u. a. ELK1) welcher den Hauptweg der Signaltransduktion nach TCR-Stimulation darstellt. Nach Kostimulation werden auch andere MAP-Kinasen wie MEKK1, JNKK1 und JNK1 aktiviert, welche hauptsächlich den Transkriptionsfaktor Jun aktivieren (s. u.).
- Der Weg über DAG (Diacylglycerin) und PKC (Proteinkinase C) aktiviert den Transkriptionsfaktor NF κ B (Sun, Arendt et al. 2000) sowie den AP1-Komplex (Baier-Bitterlich, Uberall et al. 1996).

Nach der Initiation des Signaltransduktionsprozesses durch die Proteintyrosinkinassen (PTKs) Fyn und Lck liegen nun die ITAMs der zytoplasmatischen Rezeptorketten phosphoryliert vor, wobei die so generierten Bindungsstellen weitere PTKs über ihre SH2-Domänen an den TCR rekrutieren. So wird ZAP-70 eine wichtige Tyrosinkinase der Syk-Familie (Syk-Kinasen in den B-Zellen), nach Bindung mittels Tandem-SH2-Domänen an die ζ -Ketten des TCR über die an CD4 assoziierte PTK Lck phosphoryliert und damit aktiviert. Die PTKs formen Bindungsstellen für weitere Zielproteine über Interaktionen von SH2-Domänen und phosphorylierten Tyrosin-Resten (Tabelle 3). Es bilden sich über diese molekularen Strukturen der Affinität Cluster aus wichtigen Signaltransduktionsmolekülen, die für die nötige Konzentration aller beteiligten Elemente auf zytoplasmatischer Seite unterhalb des TCR sorgen und auf diese Weise erst die Weitergabe eines Signals ermöglichen (Mustelin, Abraham et al. 2002).

1.3.3.1. Rolle der Adapterproteine in der Signaltransduktion

Adapterproteine spielen in der weiteren Signaltransduktionskaskade eine wichtige Rolle, um die notwendige räumliche Beziehung aller an ihr beteiligten Moleküle herzustellen (*Kliche, Lindquist et al. 2004*). Sie erfüllen eine übergeordnete, konzertierende und regulierende Funktion in der oft hervorgehobenen Rolle der PTKs in Bezug auf das Zellüberleben und die Tumorentstehung (*Leo, Wienands et al. 2002*), indem sie allosterisch Einfluss darauf nehmen, wo und wann bestimmte aktivierende oder inhibierende Enzyme wie die PTKs oder die PPT aktiv werden (*Koretzky and Myung 2001*). Die Adapterproteine haben selbst keine enzymatische Funktion, aber sie stellen die räumliche Beziehung der Signaltransduktionsmoleküle zueinander her (*Pawson and Scott 1997*). Sie stellen somit ein integrales Organisationselement zur Ausbildung subzellulärer Multiproteinkomplexe der Signaltransduktion dar. Je höher ihre Konzentration an der zytoplasmatischen Seite des TCRs ist, desto wahrscheinlicher das Zustandekommen eines starken und wohl abgestimmten TCR-Signals, welches nachfolgend aufrecht erhalten und weiter moduliert werden kann. Nur bestimmte Signaltransduktionsmoleküle können jeweils mit einem Adapter spezifisch interagieren, somit das TCR-Signal spezifisch dirigieren und durch den anschließend hohen Phosphorylierungsumsatz der Kinasen amplifizieren. Die Funktion der meisten Adapterproteine (*Vav, Nck*) ist eng verbunden mit der Reorganisation der Zellmembran und des Zytoskeletts (*Dustin and Chan 2000*) über PH-Domänen und Myristoyl-Modifikationen. Aber übergeordnet organisieren sie die Tyrosin- und Serin-Phosphorylierungsaktivitäten über PTB- oder SH2-Domänen. Zwei gut beschriebene Adapter sind *Grb2* und *Crk*. Beide besitzen hauptsächlich SH2- und SH3-Domänen, enzymatische Aktivität kann jedoch nicht beobachtet werden (*Feller, Ren et al. 1994*). Sie haben damit die Möglichkeit, Proteine in räumliche Beziehung zueinander zu bringen, welche Phosphotyrosinreste und Prolin-angereicherte Sequenzen besitzen. Das *Grb2*-Molekül (*Growth factor receptor binding protein*) wurde identifiziert als eine essentielle Komponente der Signaltransduktion von Growth-Factor Rezeptoren, des TCR und der Ras-Signaltransduktionswege. An die SH2-Domäne von *Grb2* binden: *Shc*

(Adapter), EGF-Rezeptor, PDGF-Rezeptor und die Syp-Phosphatase. Zusätzlich bindet es über seine SH3-Domäne die Prolin-angereicherte Region des GTP-GDP-Austauschfaktors Sos (Son of sevenless) des Ras-Proteins. Der Crk-Adapter wurde erstmals beschrieben als ein transformierender Faktor der Retroviren CT10 und ASV1. Die Abl-Tyrosinkinase soll u. a. ein Bindungspartner seiner SH3-Domäne sein (Feller, Ren et al. 1994).

Der intrazellulär bei der Signaltransduktion entstehende Membran-assoziierte Ca^{2+} -Initiationskomplex (Leo, Wienands et al. 2002) ist zunächst essentiell für die intrazelluläre, aktivierende Ca^{2+} -Freisetzung, bildet aber auch das Gerüst für zahlreiche weitere Signaltransduktionsvorgänge (Abb. 3). Er besteht aus:

- LAT, welches ein transmembranes Adapterprotein (TRAP) darstellt und als solches konstitutiv mit den lipid rafts der Zytoplasmamembran assoziiert ist. Es bindet als Ankerprotein nach Phosphorylierung seiner Tyrosinreste durch ZAP-70 die SH2-Domänen weiterer Effektor- und Adaptermoleküle (Zhang, Triple et al. 1998) wie GRB2, GRAP, PI3K, $\text{PLC}\gamma$, ITK und indirekt SLP76, VAV und c-Cbl (Koretzky and Myung 2001) (siehe Abbildung 3). LAT ist das zentrale und entscheidende Protein für die TCR-induzierte Phosphorylierung der $\text{PLC}\gamma$ mit konsekutivem Second-Messenger-Prozeß via DAG, PIP3 und Ca^{2+} -Influx, was letztendlich zur Aktivierung von ERK führt. Es gibt Hinweise dafür, dass LAT in endozytotischen Vesikeln auf zytosolischer Seite an die lipid rafts assoziiert ist und nach TCR-Signal sofort in diese aufgenommen werden kann. Dabei ist die Wiederaufnahme von LAT in diese Speichervesikel gestört bei Defekten im c-Cbl-Molekül (Balagopalan, Barr et al. 2007).
- GRAP, ebenfalls ein Adapterprotein, bindet an LAT und ermöglicht die Translokation von SLP76 an die GEMs. Dasselbe gilt für Gads und SLP-76, zwei zytosolische Adapterproteine, die für die optimale Aktivierung des Ras-Signaltransduktionsweges und auch für die Ca^{2+} -Freisetzung verantwortlich sind (van Leeuwen and Samelson 1999). Es stellt somit ein weiteres multifunktionales Gerüstprotein dar.

- Den Proteintyrosinkinasen der Tec-Familie: Itk, Tec, Rlk/Txk. Sie besitzen eine Pleckstin-Homologie- (PH-) Region, um an phosphorylierte Lipide der Plasmamembran anzudocken und SH2-Domänen, um Kontakt zum Adapter LAT und SLP76 aufzunehmen. Diese sind zusammen mit ZAP-70 für die Phosphorylierung und Aktivierung der PLC γ 1 zuständig (Lewis, Broussard et al. 2001).
- Der PLC γ , die zwei SH2-Domänen besitzt, über welche sie an die Phosphotyrosinreste der ITAMs bindet. Sie wird selbst aktiviert durch Tyrosinphosphorylierung durch die ZAP-70-Kinase. Wird sie aktiviert, so hydrolysiert sie Phosphatidylinositol-bisphosphat (PIP $_2$) in die sekundären Botenstoffe Inositol (1,4,5)-triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) (Putney and Ribeiro 2000). Diese sind wiederum verantwortlich für die Ca $^{2+}$ -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum, was zum Ca $^{2+}$ -abhängigen Einstrom von Ca $^{2+}$ über die Plasmamembran führt. Daraus folgt die Aktivierung von Calmodulin und Calcineurin. Diese aktivieren den Transkriptionsfaktor NFAT (nuclear factor of activation in T-cells). DAG und Calmodulin wirken synergetisch aktivierend auf die Proteinkinasen C α/β , welche den Transkriptionsfaktor NF κ B aktivieren. Somit ist wieder eine Verzweigungsstelle in der Signaltransduktion gegeben.
- Vav, einem multifunktionellen Guanin-Nukleotid-Austausch-Faktor für Rac, der sowohl für die Calcium-Freisetzung wichtig ist, als auch für die Aktivierung des Ras-Weges (Cantrell 1998). Er wird durch Fyn und ZAP-70 aktiviert und aktiviert seinerseits mittels GTP das kleine G-Protein Rac. Dies führt weiterhin zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Jun und Fos.
Vav $^{-/-}$ -Zellen zeigen Signaldefekte im Ca $^{2+}$ -Weg (Appleby, Gross et al. 1992) und im Signaltransduktionsweg von ERK, JNK und NF κ B und liefern somit einen Hinweis auf eine weitere Schnittstelle über dieses Molekül für verschiedene Transduktionswege.
- Dem Grb2-Adaptermolekül bzw. dem Grb2-Homolog Gads, welches nach LAT-Phosphorylierung SLP76 sowie die HPK1 an dieses rekrutiert

(Liu, Smith et al. 2000). Grb2 bindet SLP76, LAT, SHC und BCR-ABL. Es kann den GEF Sos komplexieren und die p21-ras-Aktivierung mittels GTP vermitteln (Schaeffer and Schwartzberg 2000). Es ist ein wichtiger Regulator in der Steuerung der Zellproliferation vermittelt über den Ras-Weg (Buday, Wunderlich et al. 2002). Gads bindet ebenfalls SLP76. Es konnte gezeigt werden, dass die Affinität seiner C-terminalen SH3-Domäne entscheidend ist, um mit SLP76 an seiner RxxK-Region in Kontakt zu treten. Das selektive Binden dieser molekularen Regionen ist entscheidend für die Integrität des TCR-Signals (Seet, Berry et al. 2007). Grb2 vermittelt neben seiner Positivregulation über RAS/ERK ebenfalls negative Regulation über seine Rekrutierung von Cbl (Casitas B lineage lymphoma) (Sun, Pedersen et al. 2007).

Weitere Adaptermoleküle, die im TCR-Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle spielen, sind:

- SLP76. Der zytosolische Adapter wird nach TCR-Stimulation von ZAP-70 phosphoryliert, worauf er Nck und Vav rekrutiert. Dies impliziert die Mitregulation in der Reorganisation des Aktinzytoskeletts. Es bindet Grb2 und Gads über seine Prolin-angereicherte Region und reguliert somit die PLC γ mit konsekutivem Ca²⁺-Einstrom und Aktivierung der ERK (Koretzky and Myung 2001).
- Cbl-b und c-Cbl sind weitere zytosolische Signaltransduktionsmoleküle. Sie fungieren als negativ regulierende Ubiquitin-Ligasen und organisieren den Abbau der Signaltransduktionsmoleküle v. a. von p85a, ZAP-70, LCK, PLC γ und Vav im Proteasom (Bachmaier, Krawczyk et al. 2000; Chiang, Kole et al. 2000; Koretzky and Myung 2001). Hierdurch spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Induktion von T-Zelltoleranz und Tumormunität (Loeser and Penninger 2007). Nach TCR-Aktivierung wird c-Cbl als Substrat der PTKs phosphoryliert und bindet an SH2/SH3-tragende Crk-Adapterproteine. Beide Moleküle spielen darüber hinaus auch im Ras-Signalweg eine Rolle (Sawasdikosol, Chang et al. 1996). Zudem sind

diese Moleküle von zentraler Bedeutung für Signaltransduktionskaskaden, welche die Zellproliferation beeinflussen, wie z. B. die des EGF-Rezeptors (Pennock and Wang 2008). Die Rolle als wichtiger Negativregulator des TCR-Signals wird dadurch gestützt, daß c-Cbl und Cbl-b^{-/-} Mäuse eine erhöhte T-Zellaktivierbarkeit und eine CD28-unabhängige IL2-Produktion zeigen sowie eine höhere Konzentration an phosphoryliertem Vav, Akt und ERK auf der zytosolischen Rezeptorseite. Die Familie der Nck-Adapterproteine sind dabei wichtige Regulatoren der Zytoskelettorganisation und damit bedeutend in der Ausbildung einer Zellpolarität und Zellmigration. Sie beinhalten SH2/SH3-Domänen und üben damit wichtige Kontrollfunktion über den Signalweg der Proteintyrosinkinase aus (Buday, Wunderlich et al. 2002). Des Weiteren bindet Nck an phosphoryliertes SLP76 sowie an das negativ regulierende c-Cbl (Wunderlich, Farago et al. 1999). Die Aktivität des protoonkogenen Produktes c-Cbl (c-Casitas B lineage lymphoma) bedeutet in der chronischen lymphatischen Leukämie entscheidende Proliferationsvorteile des autonomen Zellklons (Mankai, Eveillard et al. 2007).

Zusammenfassend kann folgender weiterer Ablauf in der Signaltransduktion skizziert werden:

ZAP-70 rekrutiert und phosphoryliert gemeinsam mit Itk die PLC γ . Des Weiteren rekrutiert sie Vav und phosphoryliert LAT und SLP-76 (van Leeuwen and Samelson 1999). Phosphoryliertes LAT rekrutiert wiederum die beiden Adapterproteine Gads und SLP-76, welche eine Bindungsstelle für Itk tragen (Abbildung 3). Die Aktivierung von Itk führt über die PTKs der Src-Familie zur Generierung von PIP₃ durch die PI3K (Lewis, Broussard et al. 2001). Grb2, Sos und PLC γ 1 binden ebenfalls an LAT, wobei diese durch ZAP-70 und Itk phosphoryliert und damit aktiviert werden (Wange 2000). Vav wird über Produkte der PI3K (Cantrell 1998) und die PTKs wie Lck, Fyn und ZAP-70 aktiviert (Turner and Billadeau 2002), es hat GEF-Aktivität im Ras-Weg (s.o.). Der Komplex aus SLP-76 / LAT / Grb2 / Vav ist somit für eine optimale Ca²⁺-

Mobilisierung und Aktivierung des Ras-Weges nötig (van Leeuwen and Samelson 1999) (Abbildung 3).

1.3.3.2. Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

IP3 bewirkt als sekundärer Botenstoff der PLC γ die Ca²⁺-Mobilisierung aus dem Intra- und Extrazellulärraum wie oben beschrieben (Lewis, Broussard et al. 2001) (siehe Abbildung 3). Ca²⁺ führt über Calmodulin und Calcineurin zur Dephosphorylierung von NFATc; dieser Transkriptionsfaktor wird in den Zellkern transloziert und kann aktiv werden. Calcineurin wird durch die Proteinphosphatasen und Immunsuppressiva Cyclosporin A und FK506 gehemmt. DAG aktiviert PKC, welche NF κ B phosphoryliert und die inhibitorischen I κ B abspaltet (Sun, Arendt et al. 2000). Des Weiteren aktiviert DAG den p21-ras-Signaltransduktionsweg (Roose and Weiss 2000). Der GEF Sos initiiert den Ras-Weg. Nachfolgend werden Raf1 (Ser/Thr-MAPKKK), Mek (MAPKK) und Erk (MAPK) aktiviert (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999). Dabei zeigte sich in den PBMCs von an systemischem Lupus Erythematoses erkrankten Patienten eine fehlerhafte Aktivität der mitogen aktivierenden Proteinkinase ERK (Cedeno, Cifarelli et al. 2003).

Als letzter Schritt transloziert das Fos Molekül in den Zellkern und bildet zusammen mit c-Jun den heterodimeren Transkriptionsfaktor AP1. Es ist dabei gleichzeitig Auslöser für die Translokation von c-Jun in den Zellkern über den PI3K/Vav/Rac-Weg durch die Aktivierung der Ser/Thr-MAP-Kinasen MEKK, JNKK und JNK.

Die PI3Ks sind in ihrer regulatorischen Untereinheit an die phosphorylierte ITAMs der zytoplasmatischen Rezeptorketten gebunden. Sie werden direkt oder indirekt durch Ras aktiviert (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999). PI3K phosphoryliert PI(4,5)P₂ (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) und produziert PI(3,4,5)P₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat) (Ward and Cantrell 2001). Dies vermittelt über PH-Domänen die Assoziation von Tec-PTKs, Vav und PDK1 an den TCR, welche dort aktiviert werden können (Rameh and Cantley 1999). Die Akt-Kinase (PKB) wird durch PI3K ebenfalls rekrutiert und von PDK1

(Phosphoinositide-dependent protein kinase 1) aktiviert. Durch Phosphorylierung deaktiviert sie den NFAT-Inhibitor GSK3 und den NFκB-Inhibitor IκB (Frauwirth and Thompson 2002). Diese können so anschließend in den Zellkern translozieren.

NFκB ist dabei ein essentieller Regulator in der Steuerung der Zellproliferation innerhalb der T-Zelle, er ist zentraler Koordinator in der Aktivierung einer adaptiven Immunantwort mit Ausbildung der T-Zell-Effektorfunktionen und aberrante NFκB-Aktivierung führt zur Autoimmunität und lymphoproliferativen Erkrankungen (Ruland and Mak 2003)

Zusammenfassend sind die Signaltransduktionswege auf den unterschiedlichen Ebenen eng miteinander verknüpft (Feske, Giltnane et al. 2001) und führen zur optimalen T-Zellaktivierung oder Deaktivierung / Anergie.

1.3.4. Die Kostimulation

Wird eine T-Zelle nicht ausreichend aktiviert, so induziert sie nicht ihre Effektorfunktionen, sondern geht in ein Stadium der Anergie. Die reaktive Potenz und damit die Empfindlichkeit der T-Zellen für ein Antigen erhöht sich bei Kostimulation um etwa das Hundertfache. Erforderlich für eine anhaltende TCR-Aktivierung ist die gleichzeitige Stimulation von Korezeptoren, beispielsweise des CD4- bzw. CD8-Korezeptor. Die Aktivierung dieser Korezeptoren erfolgt allerdings über die Bindung an das präsentierende MHC II Molekül selbst. Weitere Kostimuli werden über CD28 nach Bindung von B7.1 oder B7.2 und über ICOS nach Bindung von ICOSL vermittelt (Frauwirth and Thompson 2002; Sharpe and Freeman 2002). Diese Signale müssen durch die gleiche Ag-präsentierende Zelle erfolgen. Besonders diese Kostimulation über den B7-CD28/CTLA4 Signalweg, wobei CTLA-4 die Funktion eines Negativregulators der T-Zellsignaltransduktion erfüllt, soll bei der Entstehung der MS / EAE eine wichtige Rolle spielen (Racke, Ratts et al. 2000) - so waren in dieser Studie die MBP-reaktiven T-Zellen von MS-Patienten weniger abhängig von der Kostimulation als die der Kontrollgruppe. CD28-Aktivierung führt zur Hochregulation des autokrinen Wachstumsfaktors IL2 sowie der Effektorzytokine IFN-γ im Falle der TH1-Zellen und IL4 im Falle der TH2-Zellen. Der ICOS-Signalweg führt im Gegensatz zum CD28-Signalweg weniger zu

einer Alteration in der Induktion von IL2 (Yoshinaga, Whoriskey et al. 1999; Riley, Blair et al. 2001), sondern moduliert vielmehr die Produktion von IL4, IL5, IL10, IL13 und IFN- γ (Hutloff, Dittrich et al. 1999; Beier, Hutloff et al. 2000; Coyle, Lehar et al. 2000; Mages, Hutloff et al. 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass über den CD28-Kostimulationsweg, d.h. über die Aktivierung der PI3K und Einbinden der Adapter Vav und SLP76 eine IL2-Transkription ermöglicht werden kann, auch in Abwesenheit von einem TCR-Signal im Sinne einer in-trans-Aktivierung (Rudd and Raab 2003).

1.3.5. Beendigung des TCR-Signals

Cbl reguliert den Ubiquitinylierungsgrad der Src-Kinasen wie Fyn aber auch ZAP-70 und Vav negativ (Koretzky and Myung 2001) und damit deren Abbau im Proteasom. Es fungiert über seine Ring-Finger-Domäne E2 als Adapter zwischen der Ubiquitin-Ligase und der Src-Kinase. Der Adapter wird ebenfalls als Effekt der TCR-Aktivierung phosphoryliert und damit eine Off-switch-Kaskade getriggert. Cbl-b soll das TCR-Signal zwar negativ regulieren und die IFN- γ Produktion reduzieren, gleichzeitig aber die funktionelle Avidität der T-Zelle nicht negativ beeinflussen (Shamim, Nanjappa et al. 2007). Auch die B-Zell-vermittelte Immuntoleranz soll wesentlich von den Ubiquitin-Ligasen c-Cbl und Cbl-b abhängen durch Mitwirkung im Prozeß der Anergieinduktion (Kitaura, Jang et al. 2007).

Csk ist als C-terminale Src-Kinase ein Gegenspieler von CD45 und führt dazu, dass sich der C-terminale phosphorylierte Tyrosinrest auf eine proximale SH2-Domäne zurückfaltet und Fyn dadurch inaktiviert. Die Balance zwischen CD45 und Csk bedingt den Aktivierungsgrad der Src-Kinasen. Rezeptorassoziierte ITIMs (immuno-receptor tyrosine-based inhibitory motifs) setzen die Schwelle der TCR-Aktivierung durch die Bindung von inhibitorischen Proteinphosphatasen SHP1/2 herab. SHP1 trägt eine SH2-Domäne, über welche sie an die phosphorylierte ZAP-70 Kinase binden kann, um diese über eine Dephosphorylierung zu inaktivieren, was zu einem Abschalten des TCR-Signales nach intrazellulär führt. Des Weiteren reguliert CTLA4 die T-Zellaktivierung negativ. CTLA4 bindet wie CD28 den Liganden B7 und rekrutiert intrazellulär die Phosphatase SHP2. CTLA4 ist dabei zu Beginn der

Immunantwort auf der T-Zelloberfläche nicht zu detektieren. Man misst allerdings eine maximale mRNA-Konzentration dieses Moleküls 24-48 Stunden nach TCR-Stimulation, was als zeitlich verzögertes Abschaltsignal der intrazellulären Signaltransduktionskaskade zu werten ist. Die Inositollipid-Phosphatase PTEN baut PIP_3 zu PIP_2 ab und reguliert somit den Signalweg der P3K negativ (Maehama and Dixon 1999; Rohrschneider, Fuller et al. 2000).

Auch der neuerlich beschriebene Notch-Signaltransduktionsweg gibt Hinweise darauf, dass über die Aktivierung des Jagged-1 Moleküls, eine neue Form der T-Zellhyporeagibilität erzeugt wird, welche sich von der Anergie unterscheidet. Dabei sind Zellproliferation und Zytokinsekretion inhibiert, während nach Kostimulation zwar die T-Zell Effektorfunktion, nicht aber die klonale Proliferation ermöglicht wird (Kostianovsky, Maier et al. 2007).

T-Zellrezeptorsignaltransduktion

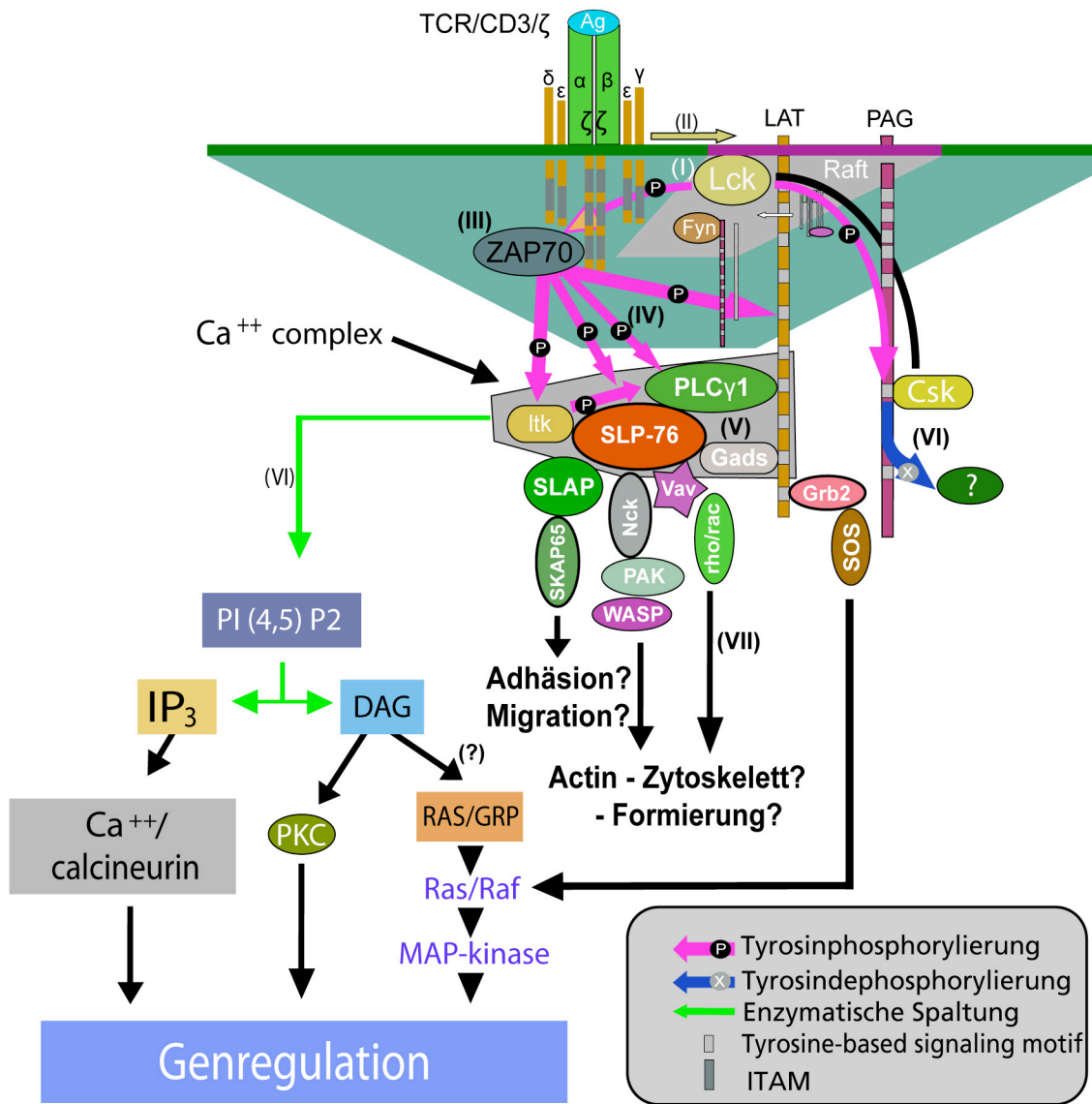


Abbildung 3: Schematische Darstellung der proximalen Signaltransduktionsereignisse downstream des TCRs. (I) Die Aktivierung der lipid raft assoziierten Src-Proteintyrosinkinase nach Ag-Bindung des TCRs. (II) Rekrutierung des TCRs nach Ag-Bindung zu den lipid rafts der Zytoplasmamembran. (III) Rekrutierung der Syk-Protintyrosinkinase zu den 2-fach phosphorylierten ITAMs des TCRs und (IV) Phosphorylierung der Signaltransduktionsproteine des Ca²⁺-Initiationskomplexes. (V) Phosphorylierungsabhängige Versammlung und weitere Signaltransduktion nach Initiation des Ca²⁺-Initiationskomplexes. (VI) Generierung der sekundären Botenstoffe DAG und IP₃ nach enzymatischer Spaltung von PIP₂ durch die aktivierte PLCγ. (VII) Signal zur Zytoskeltreorganisation und Regulation der Zellmigration und

Einleitung

Adhäsion durch die SLP-76/SLP-65-assoziierte Adapter- und Effektormoleküle. Negativregulation der Src-Proteintyrosinkinase durch das TRAP PAG und die Src-Proteinkinaseinhibitor Csk, nach B. Schraven (Leo, Wienands et al. 2002).

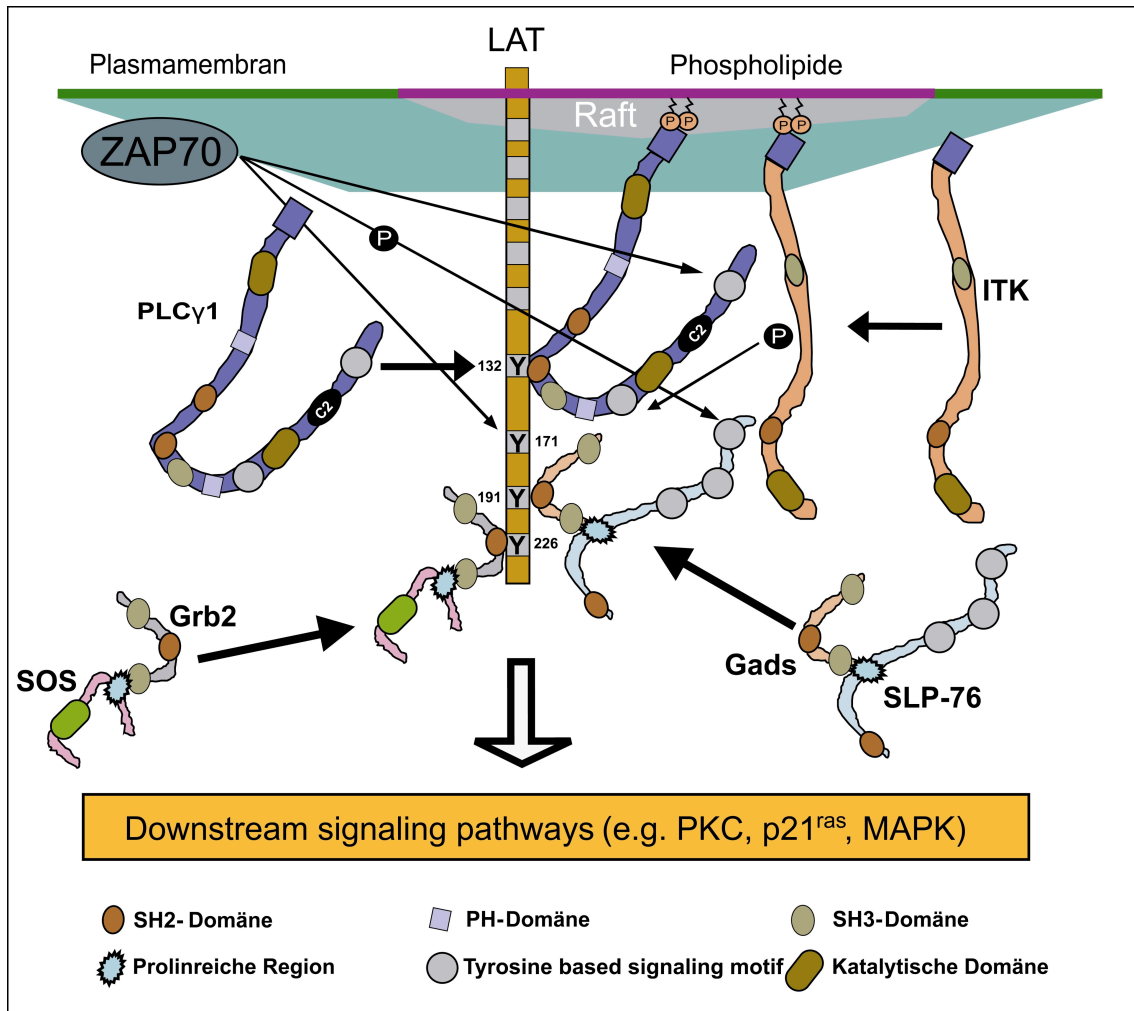


Abbildung 4: Detaillierte Darstellung des Ca²⁺-Initiationskomplexes der T-Zelle. Die zentrale Regulationseinheit ist das TRAP LAT, welches den Gads/SLP76-Komplex und die PLC_γ an die lipid rafts der Zytoplasmamembran nach Phosphorylierung durch die ZAP-70 Kinase rekrutiert. Die Proteintyrosinkinase Itk bindet mit ihren SH2-Domänen an das phosphorylierte SLP76-Protein und wird so ebenfalls in die Nachbarschaft von PLC_γ gebracht. Dieses wiederum hydrolysiert PIP₂ zu den sekundären Botenstoffen DAG und PIP₃. Dabei interagieren Gads und SLP-76 miteinander über SH3-Domänen von Gads und Prolin-reiche Regionen von SLP76, nach B. Schraven (Leo, Wienands et al. 2002).

1.3.6. T-Zell-vermittelte Immuntoleranz und Autoimmunität

Bei Störungen im Ablauf der T-Zellregulation kommt es u. a. zum Verlust der Immuntoleranz und körpereigene Strukturen werden angegriffen. Folge davon sind Erkrankungen, die als Autoimmunerkrankungen bezeichnet werden (Nossal 2001). Direkte Schädigungen werden durch Autoantikörper oder autoreaktive T-Lymphozyten hervorgerufen. Hierbei spielen beide Arme des Immunsystems in der Pathogenese eine Rolle. Die T-Lymphozyten regulieren die Antikörperproduktion und die B-Lymphozyten präsentieren dabei den T-Zellen die entsprechenden Antigene. Bei vielen Autoimmunerkrankungen ist einer der beiden Arme dominierend.

Die genetische Disposition (vor allem im Hinblick auf MHC II Moleküle) scheint bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen genauso eine zentrale Rolle zu spielen wie Umweltfaktoren, Tumore, Medikamente, Nahrungsstoffe oder Infektionen (Wiendl, Melms et al. 2003). Grundlage für die Entwicklung von Therapieansätzen ist zum einen, entscheidende Autoantigene zu isolieren, aber zum anderen die Aktivierung und die dabei beteiligten regulatorischen Mechanismen von autoimmunen Zellen zu verstehen, um kontrollierend und möglichst zielgerichtet, molekülspezifisch eingreifen zu können.

1.3.7. Signaltransduktionsmoleküle und Autoimmunität

Untersuchungen an Cbl-b^{-/-} Mäusen ergaben, dass sie eine erhöhte Anfälligkeit gegen eine EAE haben. Dies unterstreicht die Rolle von Cbl-b in der Modulation der Signaltransduktion und damit in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen wie der MS. Chiang et al. sowie Bachmaier et al. (Bachmaier, Krawczyk et al. 2000; Chiang, Kole et al. 2000) konnten als erste zeigen, dass das Cbl-b Molekül eine bedeutende negativ-regulatorische Funktion in der T-Zellregulation und in der Entstehung von Autoimmunität einnimmt. Des Weiteren konnten Parson et al. (Parsons, Jones et al. 2001) erstmalig zeigen, dass durch die PI3K und PI3P die Aktivität wichtiger TCR-Downstreamsignale gesteuert werden, und damit die PKB mitverantwortlich ist für das phänotypische Erscheinungsbild einer pathologisch veränderten

Lymphozytenhomöostase. Diese kann wiederum durch den veränderten Zellzyklus der T-Lymphozyten, die B-Zellhomöostase im Sinne einer Überfunktion beeinflussen.

Es konnte gezeigt werden, dass defiziente Expression von Zellzyklus kontrollierenden Molekülen wie Adapterproteinen, Ubiquitin-Ligasen, Transkriptionsfaktoren, PI3-Kinasen und Komponenten des Ras-Signalweges für die Entwicklung einer lupusartigen Autoimmunität in Mäusen verantwortlich ist (King 2004). Mäuse mit sowohl verringerter als auch erhöhter Aktivität von PI3K zeigen lymphoproliferative oder autoimmune Phänomene (Oak and Fruman 2007).

1.4. Modelle zellulärer Immunität

Ein mögliches therapeutisches Prinzip bei der MS ist die selektive Manipulation der Signaltransduktion in der Aktivierungsphase einer autoreaktiven T-Zelle. Um die relevanten elementaren Prozesse aufzuklären und therapeutische Strategien *in vitro* zu testen, ist der Einsatz einer möglichst einfach zu kultivierenden Modellzelle und ein umfassendes Verständnis ihrer Molekularbiologie unerlässlich.

Die Modellzellen sollen möglichst naturgetreu die MHC-TCR-Interaktionen *in vitro* reproduzieren können und nachfolgend eine möglichst naturgetreue und reproduzierbare Signaltransduktionskaskade durchlaufen, um die entscheidenden Effektorfunktionen der relevanten autoreaktiven T-Zellen *in vivo* zu erfüllen. Dabei soll gleichzeitig eine Differenzierung zwischen den Beiträgen des TCR und der kostimulatorischen Moleküle in der Signaltransduktion gewährleistet sein.

Diese hier genannten Kriterien kann die BW58 $\alpha\beta^-$ -Modellzelle (murines T-Zellhybridom / Thymom) und deren Transfektanten erfüllen. Die murine BW58 $\alpha\beta^-$ -Zelllinie besitzt per se keinen TCR, ist aber transfiziert mit dem Gen der humanen CD4-Rezeptorkette (Letourneur and Malissen 1989). Zusätzlich konnte TCR α - und TCR β -cDNA von einem CD4 positiven T-Zellklon eines MS-Patienten isoliert, in den RSV5-Vektor kloniert und die BW58 $\alpha\beta^-$ -Zelle damit transfiziert werden (siehe Abbildung 5) (Wiendl, Malotka et al. 2002). Die TCR-

assoziierte Expression von murinem CD3 kann dadurch wieder hergestellt werden, was durch die simultane Antikörperbindung gegen die murine CD3-Kette und die V β 9-Kette des TCR belegt werden kann (siehe Abbildung 6-A). Die Effektorfunktion einer im ELISA nachgewiesenen IL2-Produktion infolge einer anti-CD3-Stimulation zeigt einen funktionalen Ablauf der TCR-Signaltransduktion und damit eine T-Zellaktivierung nach Rezeptorbindung (siehe Abbildung 6-B).

Interferierende Effekte auf die Signaltransduktion durch Kostimulation über den humanen CD28-Korezeptor können in der BBC-CD28-Modellzelle untersucht werden, welche mit diesem Rezeptor kotransfiziert ist. Die transfizierten humanen TCR-Ketten binden selektiv die Epitope der mutmaßlichen MS-Antigene MBP 139-151 (in HLA-DR1 im Falle der BBC-Modellzelle) und MBP 80-99 (in HLA-DR2a im Falle der SS8-Modellzelle). Dieser CD28-Korezeptor ist physiologisch über Fibroblastenzellen (DR1 bzw. 2a) stimulierbar. Die BBC- und SS8-Zellen können so ein *in vitro*-Modellsystem für zelluläre Autoimmunität darstellen und sollen in dieser Arbeit näher charakterisiert werden. Ein weiterer Vergleich wird mit der Jurkat-Modellzelle angestellt. Diese stellt ebenfalls eine immortalisierte T-Zelllinie dar und fand bereits Verwendung in Studien zur Molekularbiologie der akuten T-Zellleukämie und der TCR-Signaltransduktion, wofür sie durch ihre Eigenschaft der IL2-Produktion prädestiniert ist. Die Jurkat-Zelllinie wurde bereits in den 1970er Jahren aus dem Peripherblut eines an T-Zellleukämie erkrankten 14-jährigen Knaben isoliert und etabliert. Verschiedene T-Zellklone stehen für Untersuchungen zur Verfügung, welche sich vom ursprünglichen Klon in der Mutation oder Deletion einiger Gene unterscheiden. Somit kann anhand von Alterationen der TCR-Signaltransduktion innerhalb der verschiedenen Klone bestens auf den Beitrag dieser mutierten oder deletierten Gene geschlossen werden (Abraham and Weiss 2004).

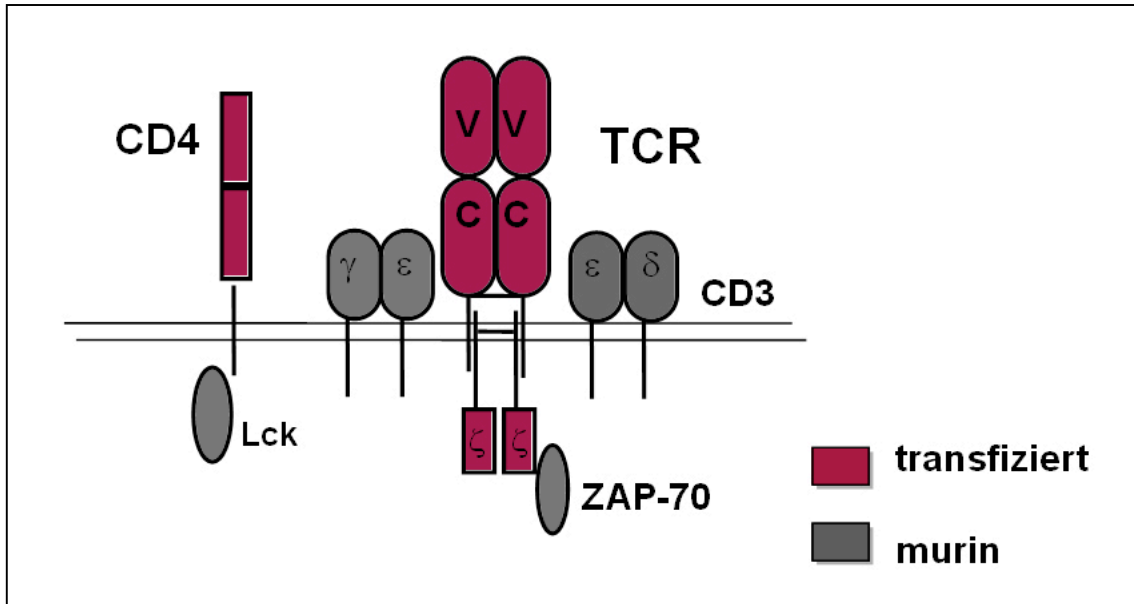


Abbildung 5: Schematische Darstellung des T-Zellrezeptorkomplexes der transfizierten BW58αβ⁻-Modellzelllinie. Die Zelle ist stabil transfiziert mit den rot dargestellten humanen Rezeptorketten aus einem autoreaktiven T-Zellklon eines MS-Patienten; die grau dargestellten Rezeptorketten stammen aus dem Genom der BW58αβ⁻-Zelle selbst und sind daher murinen Ursprunges (nach H. Wiendl).

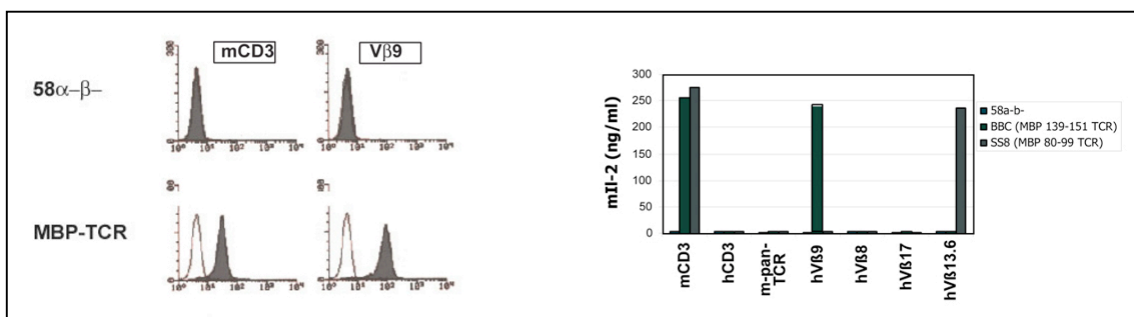


Abbildung 6: Die stabile und funktionelle Oberflächenexpression der MBP-spezifischen T-Zellrezeptorketten aus einem autoreaktiven, DR1/Dr2a restringierten T-Zellklon eines MS-Patienten auf der transfizierten BW58αβ⁻-Zelllinie: A) Die stabile Oberflächenexpression kann gezeigt werden durch wiederholte anti-CD3, anti-Vβ9 und anti-TCR-Färbung in der FACS-Analyse des Modellzellklons vor jedem weiteren experimentellen Gebrauch der Zellen in dieser Arbeit. B) Die funktionelle Oberflächenexpression kann gezeigt werden durch die Mengen an de novo synthetisiertem und sezerniertem murinem IL2 der Modellzellpopulation nach Antikörperstimulation der jeweiligen Ketten des TCR-Komplexes; murines IL2 wurde im ELISA gemessen (nach H. Wiendl).

1.5. Fragestellung

Vornehmlich sollen intrazelluläre Signaltransduktionsprozesse im Ablauf der Aktivierung einer autoreaktiven T-Zelle untersucht und Schlüsselereignisse in ihrer Signaltransduktion quantitativ beschreiben werden, um auf der Basis quantitativer Unterschiede im Expressionsmuster von T-Zell-Signaltransduktionsmolekülen einen möglichen Fokus für das Zustandekommen einer Autoreaktivität im Falle der MS zu entdecken. Quantitative Unterschiede im Expressionsniveau relevanter Elemente der Signaltransduktionskaskade sollen Möglichkeiten für die Entwicklung neuartiger zielgerichteter Therapieansätze aufzeigen. Ergänzend sollen die in 1.4 beschriebenen Modellzellen im Ablauf ihrer Signaltransduktion downstream des TCR vergleichend analysiert werden, um sie als murin-humane chimäre Zelle näher zu charakterisieren und damit ihre Verwendung in der weiteren Erforschung der T-Zell-Signaltransduktion und in der Entwicklung therapeutischer Strategien bei der MS zu etablieren.

Die physiologisch korrekte Aktivierung einer ruhenden T-Zelle ist bedeutsam für das Zustandekommen einer balancierten adaptiven Immunantwort. Das TCR-Signal muß dafür korrekt nach intrazellulär übersetzt und weitergeleitet werden. Hierfür ist das korrekte und konzertierte Zusammenwirken aller Signaltransduktionsmoleküle entscheidend, um eine vollständige Aktivierung der T-Zelle zu erreichen (*Cronin and Penninger 2007*). Wichtige Weichenstellungen im Beschreiten weiterer Signalwege ereignen sich dabei proximal um den TCR-Signalprozeß. Ein besonderes Augenmerk in unseren Untersuchungen soll daher auf die Adapterproteine unmittelbar downstream des TCR gelegt werden (siehe 1.3.7; (*Koretzky and Myung 2001*), da in zahlreichen Arbeiten bestimmte T-Zell-Signaltransduktionsmechanismen mit der Entstehung von Immundefekten und Autoimmunität in Zusammenhang gebracht wurden (*Salojin, Zhang et al. 1997; Grunebaum and Roifman 2001; Ohashi 2002*). So ist das Expressionsniveau von Signaltransduktionsproteinen ein wichtiger Faktor bei der T-Zellaktivierung (*Slifka and Whitton 2001; Riley, Mao et al. 2002*). Im Gegensatz zu B-Zellen, wo eine somatische Hypermutation des BCR eine selektiv verbesserte klonale Expansion der Zelle

mit der höchsten Rezeptoraffinität ermöglicht, gibt es diesen Mechanismus bei der T-Zelle nicht. Bei der Feinabstimmung der T-Zell-vermittelten Immunität werden keine Änderungen an der Rezeptorstruktur vorgenommen, sondern die klonale Selektion von spezifischen Zellen wird auf Höhe der TCR-Signaltransduktion erreicht. Dieser Prozeß wird „Functional Avidity Maturation“ genannt (Slifka and Whitton 2001). So wurde u. a. gezeigt, dass T-Zellen nach viraler Infektion eine deutlich höhere intrazelluläre Konzentration von Lck aufwiesen als vergleichbare native T-Zellen.

Um vor diesem Hintergrund Unterschiede in den Expressionsniveaus intrazellulärer Signaltransduktionsmoleküle zu erheben, sollten nun humane native T-Zellen von Gesunden und an Multipler Sklerose Erkrankten verglichen werden. Um einen analogen Vergleich zum murinen Modellsystem vor und nach TCR-Stimulation zu ermöglichen, wurden interspeziesspezifische Primer für die Signaltransduktionsproteine generiert. Damit sollen die Modellzellen in ihrer Signaltransduktion näher charakterisiert werden, um sie z. B. auch für die Erprobung neuer, zielgerichteter Inhibitoren („target molecules“ oder „smart drugs“) nutzbar zu machen. Eine möglichst naturgetreue T-Zellaktivierung soll dabei über eine MHC-TCR-Interaktion zustande kommen, um die *in vitro* Vorgänge so weit wie möglich den pathophysiologischen Prozessen *in vivo* angleichen zu können. Gleichzeitig soll auch der Einfluss kostimulatorischer Moleküle analysiert werden. Die Modellzellen sind rezeptortypisch wie unter 1.4 beschrieben ausgestattet und können als Zeichen ihrer Aktivierung IL2 produzieren. Die Ergebnisse aus dem Humanbereich sollen mit denen aus dem chimären Modellsystem verglichen werden, um zu zeigen, dass dieses, neben dem Charakteristikum eines humanen TCRs, auch über eine quantitativ vergleichbare Signaltransduktionskaskade mit ähnlicher Avidität verfügt.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antikörper und Chemikalien

Zielmolekül	Färbung	Isotyp	Hersteller	Verdünnung
hCD3κ	FITC	mlgG1κ	BD Pharmingen, Heidelberg	0,5mg/ml
mCD3κ	FITC	mlgG1κ	BD Pharmingen, Heidelberg	0,5mg/ml
hCD28	FITC	mlgG1κ	BD Pharmingen, Heidelberg	0,1mg/ml
hVβ9	purified	mlgG1κ	Immunotech	0,1mg/ml
hVβ13	FITC	mlgG1κ	Tcell diagn. INC.	0,1mg/ml
Goat-α-mlgG	PE		BD Pharmingen, Heidelberg	0,1mg/ml
mlgG1κ	purified		Sigma, Deisenhofen	0,5mg/ml
DR1	PE	mlgG1κ	BD Pharmingen, Heidelberg	0,1g/ml

Tabelle 1: Zur FACS-Färbung und in Stimulationsassays verwendete Antikörper mit Spezifikation und Hersteller

Chemikalien / Enzyme	Hersteller
Acutase	GibcoBRL, Eggenstein
Ficoll	Seromed, Berlin
MLV Reverse Transcriptase (200 u/μl)	Promega, USA
peqGOLD Trifast	peqLab, Erlangen, Germany
RNasin (40 u/μl)	Promega, USA
Sterile PBS DULBECCO'S Gibco,	Invitrogen Corp
Taq- Polymerase	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau (Vitalfärbereagenz)	Sigma, Deisenhofen
5x M- MLV RT- Puffer	Promega, USA
100 bp Leiter	Gibco BRL, Eggenstein

Tabelle 2: Chemikalien und Enzyme mit Hersteller

Zur weiteren Optimierung der Kulturbedingungen wurden diesen folgende Adjuvantien zugeführt:

- 10% FCS (Fötales Kälberserum) GIBCO, Invitrogen Corporation
- 1% L-Glutamin Life Technologies
- 100IU/ml Penicillin
- 100µg/ml Streptomycin

Wasch-Puffer:

Sterile PBS DULBECCO'S GIBCO, Invitrogen Corp.

Zur Aufrechterhaltung der selektiven Kulturbedingungen der Modellzelllinien nach Transfektion wurden folgende Antibiotika eingesetzt:

- 1,5mg/ml G418 (Geneticin, Na-Salz) GibcoBRL, Eggenstein
- 300µg/ml Hygromycin B Sigma, Deisenhofen
- 10µg/ml Puromycin Sigma, Deisenhofen

Die nachfolgende Tabelle zeigt die hier verwendeten nativen Zellen, Modellzelllinien und die von ihnen abgeleiteten Transfektanten.

Zellenlinien	Eigenschaften	Medien
BW58 alpha-beta-	murines T-Zell-Hybridom /Thymom	RPMI-1640 + FCS
BBC	BW58 + transfizierter alpha/beta-T-Zellrezeptor; erkennt als Epitop die AS139-151 des MBP, prozessiert und präsentiert von HLA-DR1/DR2a-Zellen)	RPMI-1640 + FCS + PSG + G418 + Hygromycin
SS8	BW58 + transfizierter alpha/beta-T-Zellrezeptor; erkennt als Epitop die AS80-99 des MBP, prozessiert und präsentiert von HLA-DR2a-Zellen)	RPMI-1640 + FCS + PSG + G418 + Hygromycin
BBC-CD28	BW58 + transfizierter alpha/beta-T-Zellrezeptor; erkennt als Epitop die AS139-151 des MBP, prozessiert und präsentiert von HLA-DR1/DR2a-Zellen), zusätzlich transfiziert ist der humane CD28-Korezeptor	RPMI-1640 + FCS + PSG + G418 + Hygromycin + Puromycin
DR1	murine Fibroblasten mit HLA-DR1 zur Präsentation des Epitops MBP 139-151	IMDM + FCS + PSG + G418
murine Milzzellen	SJL-Maus	RPMI-1640 + FCS
humane PBMCs	HD und MS-erkrankte Spender	RPMI-1640

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien mit Eigenschaften und Kulturbedingungen

2.2.2. Zellkultur

Alle Arbeiten zur Zellkultur wurden unter Sterilbänken mit laminarem Luftstrom durchgeführt. Das eingesetzte Zellkulturmaterial war γ -sterilisiert. Es wurden dabei alle Pipettenspitzen vor Gebrauch selbst sterilisiert.

Die Zelllinien, welche unter suspendierten Bedingungen (SS8 und BBC) kultiviert wurden, wurden stets bei einer durchschnittlichen Zelldichte von 10^5 /ml bis 10^6 /ml gehalten. Bei dem Passagieren der Suspensionszellen wurden die Zellen alle zwei Tage im Verhältnis 1:10 verdünnt.

Bei den adhärennten Zellen wurde alle zwei Tage das Medium abgenommen, mit PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen vom Untergrund in einer 20ml Kulturflasche mit einem ml Acutase im Brutschrank für fünf Minuten inkubiert. Die Enzymaktivität wurde mit FCS gestoppt, die Zellsuspension abzentrifugiert, resuspendiert und zum Unterhalten der Zellkultur etwa ein Zehntel in eine neue bereits mit Medium vorbereitete Kulturflasche transferiert.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂, und in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert.

2.2.3. Gefrierkonservieren und Auftauen der Zellen

Das Einfriermedium wurde unter sterilen Kautelen aus 40% Zellkulturmedium (RPMI 1640), 40% FCS und 20% Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt.

Die einzufrierenden Zellen wurden in der Wachstumsphase abzentrifugiert, in dem Einfriermedium resuspendiert und eine aliquotierte Menge von je 500µl mit einer Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml in Einfriertubes auf Eis pipettiert. Anschließend wurden 500µl des Einfriermediums hinzu pipettiert und die Einfriertubes für zwei Tage bei -80°C tiefgefroren. Die Daueraufbewahrung erfolgte anschließend in Flüssigstickstoffbehältern.

Vor dem Auftauen wurden 5 ml Zellkulturmedium in eine 25 cm²- Zellkultur-flasche und 3ml in ein 5ml- Röhrchen vorgelegt und auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden zügig durch tropfenweise Hinzugabe des warmen Mediums aufgetaut und in das 5ml- Röhrchen überführt. Nach Abzentrifugieren wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet mit 2ml Medium in eine Zellkulturflasche transferiert.

2.2.4. Isolierung von Mausmilz- Zellen zur ex vivo Analyse

Die SJL- Mäuse wurden von Dr. Felix Bischoff zur Verfügung gestellt. Die Milz wurde nach Tötung durch Genickbruch entnommen. Zur Vereinzelnung der Zellen wurden diese durch ein steriles Teesieb gedrückt. Nach Zentrifugation (1800 rpm, 2 Minuten) wurden die Zellen zur Lyse von Erythrozyten in 5 ml ACK- Puffer für 8 Minuten resuspendiert. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (1300 rpm, 5 Minuten) und in RPMI- 1640 aufgenommen.

2.2.5. Stimulation der T-Zellen

Bevor die jeweiligen T-Zellklone in den jeweiligen Stimulationsversuchen eingesetzt wurden, wurden die relevanten Rezeptormoleküle zum Nachweis ihrer Oberflächenexpression in einer FACS-Analyse nachgewiesen sowie direkt zuvor zum Ausschluß der avitalen Zellen eine Trypanblaufärbung durchgeführt.

Eine 96-well-Platte wurde über Nacht mit den entsprechenden Antikörpern (siehe Tabelle 1) bei 4°C inkubiert. Die zu stimulierenden Zellen wurden danach in einer Suspensionskonzentration von $10^6/\text{ml}$ (100 µl/well) auf der beschichteten Versuchsplatte verteilt und nach der jeweiligen Inkubationszeit abpipettiert, für die RNA- Isolation in 500µl Trifast aufgenommen und bei -80° eingefroren.

Für die physiologische Stimulation der BBC- Zellen wurde eine 96-well-Platte über Nacht im Brutschrank zunächst mit den DR1- Zellen inkubiert - optimiert auf 35.000 Zellen/well, um eine zytotoxische Kokultivierung unter Stimulationsbedingungen zu vermeiden. Danach wurden 10 µl MBP 139- 151 (1 mg/ml) pro well in den Zellüberstand dazupipettiert. Der Überstand wurde nach 6 Stunden Inkubation im

Brutschrank, ausreichend Zeit zur Phagocytose und Antigenpräsentation, wieder abgenommen. Dann wurden die BBC- Zellen in einer Konzentration von 10^6 /ml (100 μ l/well) auf die Versuchsplatte gegeben. Nach entsprechender Inkubationszeit wurden die BBC- Zellen vorsichtig abpipettiert, um die adhärennten Zellen nicht abzulösen. Das Zellmaterial wurde anschließend in 500 μ l Trifast aufgenommen und ebenfalls bei -80 °C eingefroren.

2.2.6. Isolation von peripheren Blutmonozyten

Von aufgeklärten und einverständenen gesunden Probanden (n=10), sowie von Probanden, welche an Multipler Sklerose (in Stadium der Remision) erkrankt sind (n=10), wurde durch sterile Venenpunktion Blut (100ml) gewonnen. Die Krankheitsdiagnose wurde nach etablierten Kriterien nach Poser et al. (Poser, Paty et al. 1983) gestellt.

Periphere Blutmonozyten (PBMCs) wurden isoliert nach den Lymphogradienten (Nycomed, Oslo, Norwegen). Das Blut wurde anschließend 1:1 mit PBS verdünnt. 35ml dieser Verdünnung wurden über 15ml Ficoll in einem 50ml Falcon-Tube geschichtet. Zur Herstellung des Gradienten wurden diese bei 2000 U/min für 20 Minuten zentrifugiert. Die mit PBMCs angereicherte Phase wurde abpipettiert und mit PBS-Puffer gewaschen und erneut mit 1500 U/min für 6 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden resuspendiert und in das Zellkulturmedium überführt. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.2.7. Das Myelin-basische Protein und Glycoprotein-Antigen zur Stimulation der PBMCs

Zur Stimulation der PBMCs wurde humanes rekombinantes Myelin-basisches Protein (hrMBP₈₄₋₉₉ und hrMBP₁₃₉₋₁₅₁ / fc = 10 μ g/ml) freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Dr. Stevanovic, Abt. Immunologie, Universität Tübingen.

Glatirameracetat, auch als KOP bezeichnet, wurde als standardisierte Mischung aus zufällig zusammengesetzten, synthetischen Polypeptiden aus: L-Glutamat, L-Lysin, L-Alanin und L-Tyrosin in einem definierten molekularen Gewichtsverhältnis (von TEVA Pharmaceutical Industries, Petah Tiqva, Israel / fc = 50 μ g/ml) ebenfalls zur Stimulation der PBMCs eingesetzt.

2.2.8. Stimulation der PBMCs

Zur Stimulation der PBMCs wurden die Peptidkonzentrationen wie unter 2.2.7 beschrieben eingesetzt.

Die hierzu eingesetzte Zellenzahl wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und dabei nicht lebende Zellen in einer Trypanblaufärbung ausgeschlossen. $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit 0,5ml Zellmedium und Peptid in einer 24-Flachboden-Microtiterplatte ausgesät und anschließend bei 37°C und 5% CO₂ und 95% Luft kultiviert. Für weitere Analysen der quantitativen Genexpression wurden die Zellen zu den gegebenen Zeitpunkten abpipettiert.

2.2.9. FACS –Analysen

2.2.9.1. Puffer

Fluorescence-activated cell Sorting (FACS-) Puffer:

0,1% BSA (Bovines Serum Albumin, SIGMA)

0,1% Na-Azide (Natrium-Azide, SIGMA)

PBS

2.2.9.2. FACS: Versuchsansatz und Durchführung

Vor den Stimulationsversuchen wurden die transfizierten Modellzellen (BBC und SS8) auf ihre zu stimulierenden Oberflächenmoleküle, den Rezeptor CD3, CD28 und TCR, in der Durchflusszytometrie getestet. Dazu wurden die Zellen aus der laufenden Kultur entnommen, abzentrifugiert und in 3ml Fluorescence-activated cell Sorting (FACS-) Puffer gewaschen, bei 1200U/min und fünf min erneut abzentrifugiert und in 90µl FACS-Puffer resuspendiert. Um die Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Zellen zu blockieren, wurden die Zellen 10 min auf Eis mit 10µg/ml Mouse-IgG inkubiert, anschließend mit 3ml FACS-Puffer gewaschen und in 90ml FACS-Puffer resuspendiert. 10µl des Primärantikörpers in der für die FACS-Analyse titrierten Konzentration wurden hinzugegeben und für 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit 3ml FACS-Puffer gewaschen, resuspendiert und in 90µl FACS-Puffer mit 10µl des zweiten Antikörpers für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und in 400µl FACS-Puffer aufgenommen.

Die Durchflusszytometrie wurde am FACSCalibur® (Becton Dickinson) durchgeführt und zur Datenausgabe die Software CellQuest® der Firma verwendet.

2.2.10. Molekularbiologie

2.2.10.1. Die totale RNA-Extraktion

Die stimulierten Zellen wurden zu den gegebenen Zeitpunkten von den 96 well Mikrotiterplatten bei der antikörpervermittelten Stimulation und bei der Stimulation durch APC durch vorsichtiges Spülen mit der Pipette, um die APC nicht vom Wellboden abzulösen, abpipettiert und anschließend von dem Zellkulturüberstand bei 1200U/min für 5min abzentrifugiert und in 1ml Trizol überführt. Es wurde 5µL Glykogen als Trägersubstanz für die mRNA hinzu gegeben, um die RNA-Ausbeute nach Zentrifugation zu erhöhen. Nach 15s Schütteln und Inkubation bei Raumtemperatur für drei min wurden die Proben bei 13000 U/min bei 5°C für 15 min zentrifugiert. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde von der DNA- und proteinhaltigen Phenol-Chloroform-Phase abgenommen. Um die Reinheit der RNA zu erhöhen, wurde die Probe ein weiteres Mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Die RNA-Phase wurde mit 500µl Isopropanol gefällt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 13000 U/min bei 5°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet mit 1ml 75%-igem Ethanol gewaschen, gevortext und bei 10000 U/min bei 5°C für 5 min abzentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanolüberstandes wurde das RNA-Pellet luftgetrocknet und in 22,5µl DEPC-Wasser gelöst. Nach Inkubation für 10min bei 55°C wurden die RNA-Proben bei -80°C gelagert.

2.2.10.2. Bestimmung der RNA-Konzentration

Die bei -80°C gelagerte RNA wurde auf Eis aufgetaut. 100µl einer 1:50 Verdünnung der RNA-Lösung wurde hergestellt und die RNA-Konzentration im Photometer bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt, wobei eine Extinktion bei 260nm von 1,0 einer RNA-Konzentration von 40µg/ml entspricht.

2.2.10.3. Transkription der RNA-Proben in cDNA

Für die reverse Transkription wurden 2,5µg RNA eingesetzt und eine Lösung in DEPC-Wasser mit einer Endkonzentration von 2,5µg/21,5µl hergestellt.

Diese Lösung wurde mit 2 μ l einer Randomhexamerlösung (200ng/ml) versetzt, für 10min bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

- 5x M-MLV RT-Puffer 10,0 μ l
- dNTPs (jeweils 10mM) 10,0 μ l
- RNase Inhibitor 0,25 μ l
- M-MLV RT 1,0 μ l
- DEPC-Wasser 5,25 μ l

Die 21,5 μ l RT-Reaktionsansatz wurden zur RNA/Random-Hexamer Lösung hinzugefügt, geschüttelt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 50 min bei 42°C inkubiert und dann die reverse Transkriptase denaturiert, indem für 15 min bei 70°C inkubiert wurde. Die so erhaltene cDNA-Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.10.4. Design der Oligonucleotidprimer

Um den Einsatz der Oligonukleotidprimer gemäß der Fragestellung sowohl für die Spezies Maus als auch für die Spezies Mensch einsetzen zu können, mussten im jeweiligen Molekül des Interesses zunächst Genomabschnitte beider Systeme selektiert werden, welche in ihrer Sequenz übereinstimmten und damit während der Evolution des Immunsystems der Maus und des Menschen hochgradig konserviert wurden. Dies wurde erreicht, indem die publizierten Genomsequenzen als Einzelstrang in der gleicher Ausrichtung in das Alignmentprogramm LALIGN ([http://www.ch.emgnet.org/cgi-bin/LALIGN in der Version 2.0u66](http://www.ch.emgnet.org/cgi-bin/LALIGN_in_der_Version_2.0u66) vom September 1998) hochgeladen wurden und dort die gesamten Ziel-Sequenzen verglichen und identische Sequenzen aneinander gelegt wurden (Huang and Miller 1991). Die so identifizierten interspezies-identischen Sequenzen wurden für das weitere Primerdesign in das HUSAR Genius Software Packet (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>, DKFZ, Heidelberg, Germany) hochgeladen und die folgenden Variablen determiniert.

Für die Lokalisation der Primerpaare wichtig war die Lage im Bereich von Exon-Exon-Bindungsstellen, um eine Amplifikation und damit Detektion von verunreinigender DNA zu vermeiden. Kriterien für die korrekte Auswahl eines Einzelstrangprimers waren die Schmelztemperatur (T_M), die optimale Länge (18-22 Basen), Guanosin/Cytosin-Gehalt ca. 40-60% und eine relativ kurze Produktlänge

von 100-150 Basenpaaren, um eine möglichst effiziente rtPCR-Amplifikation zur ermöglichen. Zudem sollte die Wahrscheinlichkeit eines zu unspezifischen Annealings der Primer durch einen G/C-Gehalt von maximal ein oder zwei dieser Basen unter den letzten 5 Basen des 3'-Endes der Primer möglichst gering gehalten werden.

Um weiterhin unspezifische Bindungen der so designten Primer im gesamten Genom zu vermeiden, wurden die Primersequenzen gegen die gesamte Nucleotidsequenz des Genoms des Menschen und der Maus mit der Datenbank Nucleotide Blast verglichen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> und HUSAR BlastN). Wurden weitere unspezifische Bindungsstellen entdeckt, so war dies ein Ausschlusskriterium für die weitere Verwendung der Primer.

Nachfolgend verzeichnet sind die Sequenzen und die spezifischen Merkmale der verwendeten Primersequenzen.

Genname	Oligonukleotidprimer				Amplikon
	Primernamen	Sequenz 5' → 3'	Länge	TM [°C]	Länge [bp]
mIL2	mIL2 Taq F224-245	GAGCAGGATGGAGAATTACAGG	22	60,1	
	mIL2 Taq R349-330	CGCAGAGGTCCAAGTTCATC	20	60,8	126
mIL4	mIL4 Taq F254-273	TCACAGCAACGAAGAACACC	20	59,9	
	mIL4 Taq F405-386	TCGAAAAGCCCCGAAAGAGTC	20	61,7	152
mIL10	mIL10 Taq F447-465	GCGCTGTCATCGATTCTC	19	59,5	
	mIL10 Taq R532-553	CATTTCATGGCCTTGTAGACAC	21	58,1	107
	mIL10 Taq F514-535	AATAAGCTCCAAGACCAAGGTG	22	59,7	
	mIL10 Taq R621-642	CCAGCAGACTCAATACACACTG	22	58,5	129
mIFN γ	mIFN γ Taq F236-255	ACTGGCAAAGGATGGTGAC	20	60	
	mIFN γ Taq R330-351	AATGACGCTTATGTTGTTGCTG	22	60,2	116
mTNFa	mTNFa Taq F335-355	GGGATGAGAAGTCCCAAATG	21	60,7	
	mTNFa Taq R428-446	GCTACGACGTGGGCTACAG	19	59,5	112
	mTNFa Taq F379-396	GCCAGACCCTCACACTC	18	59,1	
	mTNFa Taq R428-446	TCCTCCACTTGGTGGTTTG	19	59,5	86
	mTNFa Taq R454-471	CAGCTGCTCCTCCACTTG	18	58,1	93
	mTNFa Taq F440-459	TCGTAGCAAACCACCAAGTG	20	59,8	
	mTNFa Taq R561-582	GAGAACCTGGGAGTAGACAAGG	22	59,3	143
Crk	hmCrk Taq F859-876	GCTTTGGAGGTCGGTGAG	18	59,3	
	hmCrk Taq R950-969	CAGACGGACATGTGTGAATG	20	59,1	111
Grb2	hmGrb2 Taq F160-179	GAAATGAAACCACATCCGTG	20	58,8	
	hmGrb2 Taq R272-290	AGGGAGAAGTCCCCAGGAG	19	60,6	131
Nck1	hmNck1 Taq F968-989	ACATTAGGCCTTCACTCACTGG	22	60,5	
	hmNck1 Taq R1096-1116	GAAATCATTTGGCGAAGATTC	21	58,6	149
Gads	hmGads Taq F525-546	GACTTCTCCATCTCTGTCAGGC	22	60,4	
	hmGads Taq R-661-680	CTGCTTCTGTTGGAGATGG	20	58,4	156
SLP76	hmSLP76 Taq F10-31	TATGAGTCCCCTAATGAGGAGG	22	59,4	
	hmSLP76 Taq R116-135	GGTGTGTGGAAAGAGTTGG	20	58	126
C-Cbl	hmC-Cbl Taq F3-20	AAACTGCCACCTGGGGAG	18	61,1	
	hmC-Cbl Taq R117-136	TCACATGCTCGTGAACCTCTG	20	58,5	134
LAT	hmLAT Taq F226-243	CCAGACCTGCTCCCCATC	18	61,6	
	hmLAT Taq R317-336	GTTCTCGTAGCTCGCCACAC	20	61	111

Tabelle 5: Liste der neu etablierten Oligonukleotidprimer zur Amplifikation der murinen Zytokine (im Namen mit m- gekennzeichnet) sowie humanen und murinen Signaltransduktionsproteine (im Namen mit hm- gekennzeichnet). Als Housekeeping-Gene wurde das 18s-Gen verwendet. Das dazugehörige Primerpaar war bereits etabliert (forward primer: CGG CTA CCA CAT CCA AGG AA; reverse primer: GCT GGA ATT ACC GCG GCT) und sein Einsatz in unserem Labor Standard.

2.2.10.5. Konventionelle PCR-Analyse

Zur qualitativen Prüfung der nach rt-PCR Bedingungen kreierten Oligonukleotidprimern erfolgte deren Einsatz zunächst in der konventionellen PCR um unspezifische Bandenbildung auszuschließen. Zeichnete sich bei der Positivprobe in der anschließenden Gelelektrophorese eine distinkte

Bandenzeichnung ab, wurden die Oligonucleoidprimer bei den rt-PCR-Analysen eingesetzt.

Zu 1 μ l der nach 2.2.10.3 synthetisierten cDNA wurden 0,2 μ l einer Hot Start Taq DNA Polymerase sowie 1 μ l einer Forward- und 1 μ l Reverse-Primer-Lösung hinzugefügt.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

- 2x dest. H₂O 13,2 μ l
- 10x PCR-Puffer 2,0 μ l
- dNTPs 1,6 μ l
- Forward-Primer (5 μ M) 1,0 μ l
- Reverse-Primer (5 μ M) 1,0 μ l
- Hot Start Taq-Polymerase 0,2 μ l

Die Prozeduren des Thermocycler PCR-Gerätes wurden für 40 Zyklen wie folgt programmiert: 95°C für 1min zur Denaturierung, 50°C für 1min zur Hybridisierung, 70°C für zwei min zur Amplifizierung.

2.2.10.6. Relative Quantifizierung der Genexpression durch die rt-PCR-Analyse

Die Menge der jeweiligen mRNA-Expression in den zu untersuchenden stimulierten Modellzellen und PBMCs aus MS-erkrankten und gesunden Probanden wurde bestimmt, indem eine Zwei-Schritt-rt-PCR durchgeführt wurde. Zuvor aus der mRNA hergestellte cDNA wurde als Template benutzt. Für die Amplifizierung und Detektion eingesetzt wurde der SYBR Green Master Mix® von Applied Biosystems.

Reaktionsansatz: (15 μ l)

- 5 μ l cDNA-Lösung
- 7,5 μ l Master Mix®
- jeweils 0,9 μ l des gelösten Forward- und Reverseprimers
- 0,7 μ l DEPC-Wasser

Die Analysen wurden in einem ABI PRISM 770SDS von Perkin Elmer, USA, und die Polymerase-Kettenreaktion gemäß den nachfolgend festgelegten Schritten durchgeführt: zwei Minuten bei 50°C, 10 Minuten bei 95°C, anschließend wurden 40 Amplifizierungszyklen mit jeweils 15 Sekunden bei 95°C für die Denaturierung und 1 Minute bei 60°C für die Hybridisierung und Amplifizierung inkubiert. Bindet der Syber-Green-Farbstoff bei der hier angewandten Detektionsmethode an de novo amplifizierte doppelsträngige DNA, so resultiert ein Fluoreszenzsignal, in einer Intensität proportional zur gerade synthetisierten DNA-Menge als PCR-Produkt im

jeweiligen Reaktionsansatz. Dieses Fluoreszenzsignal wird detektiert und für jeden Amplifikationszyklus gespeichert. So kann jedem Zyklus der laufenden rt-PCR die entstandene Menge des spezifisch amplifizierten Ziel-DNA-Moleküls zugeordnet werden. Die Zyklusnummer (C_T), an welcher der Schwellenwert des Fluoreszenzsignals erreicht wurde, wurde dann bestimmt. Der jeweilige Schwellenwert des Fluoreszenzsignals wurde an den exponentiellen Teil der rt-PCR-Kurve / des Fluoreszenzsignalverlaufes gelegt, um die C_T -Werte für die nachfolgenden relativen rt-PCR-Analysen als reproduzierbar festlegen zu können. Für die nachfolgenden relativen rt-PCR-Analysen wurde die vergleichende C_T -Methode angewandt (PE-Applied Biosystems, User Bulletin No. 2, pages 11-15, 11.12.97), nachdem sich die Effizienzen der einzelnen rt-PCR-Analysen glichen. Die einzelnen Reaktionsansätze der nachfolgenden rt-PCR-Analysen wurden doppelt pipettiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert aus beiden Reaktionsansätzen für die nachfolgenden statistischen Auswertungen angegeben. Lag die Differenz der Werte allerdings deutlich über 0,5, so wurden Nachmessungen durchgeführt. Die erhaltenen Werte wurden auf die Werte der 18s RNA, eines endogenen Haushaltsgens bezogen, um in dieser relativierten Darstellung der variierenden totalen Konzentration der RNA in der ursprünglich zu untersuchenden Probe gerecht zu werden.

In der nachfolgenden relativen Betrachtungsweise der Ergebnisse der rt-PCR als Expressionsanalyse der Signaltransduktionsmoleküle nach Stimulation der jeweiligen Zellart, wurden sie als Relativwert im Verhältnis zu den Expressionswerten der unstimulierten Zellen (Faktor der Hochregulation) in die nachfolgende statistische Auswertung übertragen.

2.2.10.7. Schmelzkurvenanalyse

Ausschluß von mitamplifizierten Nebenprodukten konnte mittels Schmelzkurvenanalyse erbracht werden.

2.2.10.8. Agarose Gel-Elektrophorese

Um die PCR-Produkte der konventionellen und der rt-PCR ihrer Größe nach darzustellen und Primerdimere sowie unspezifische DNA-Synthese auszuschließen, wurde eine Agarose Gel-Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die PCR-Produkte auf ein 2%-iges Agarosegel aus TAE-Puffer und Ethidiumbromid (1 μ g/ml) aufgetragen. Die Proben wurden 4:1 mit DNA-Ladepuffer verdünnt und bei 65mA

elektrophoretisch aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden im ultravioletten Licht bei 320nm Wellenlänge dargestellt. Um die Größe der PCR-Produkte einschätzen zu können, wurde die 100bp-Leiter von GIBCO® parallel dazu aufgetragen und aufgetrennt.

2.2.11. Statistische Methoden

Zur statistischen Analyse der Daten der PBMCs von MS-Patienten (n=10) mit den PBMCs von freiwilligen, gesunden Spendern (n=10) nach 24 stündiger Stimulation mit antiCD3 oder KOP (Kopolymer 1, Glatirameracetat) wurden die relativen Genexpressionen in Bezug auf den Ausgangswert (nicht stimuliert; t_0) gesetzt und als relative Hochregulation der Adaptermolekül-mRNA nach 24 Stunden angegeben. Die Daten wurden zur statistischen Analyse in das Statistikprogramm JUMP 4.0 übertragen und der Tukey-Kramer-Test zur Detektion statistisch auffälliger, miteinander verknüpfter Datenpaare angewandt. Die statistische Signifikanz ermittelte der nachgeschaltete Wilcoxon / Kruskal-Wallis Test (Rang-Summen-Test) bzw. die Chi-quadrat-Näherung. Die p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Damit ausreißende Werte in der weiteren Betrachtung nicht so stark ins Gewicht fallen, werden für alle weiteren Vergleiche die Median-Werte angegeben.

Die Effekte der Stimulationsversuche (6h, 12h, 24h, mit antiCD3, AntiCD28 und MBP) wurden durch die Differenzen der Werte und des Basiswertes ($t=0$) relativ zueinander in Beziehung gesetzt und dem weiteren statistischen Vergleich zugeführt. Zur Berechnung der Unterschiede unter den jeweiligen Stimulationsbedingungen wurde ebenfalls Wilcoxon / Kruskal-Wallis-Test (Rangsummentest) durchgeführt bzw. die Chi-quadrat-Näherung. Die p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

Die Auswertungen erfolgten mit dem Statistikprogramm JUMP 4.0 und wurden in Anlehnung an die Beratung des Institutes für Medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Interspezifisches Primerdesign

Adapterproteine der TCR-Signaltransduktion, welche nach den Ausführungen der Einleitung (Salojin, Zhang et al. 1997; Grunebaum and Roifman 2001; Ohashi 2002) für den molekularen Pathomechanismus der MS u. a. Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielen können, wurden selektiert und in den stimulierten humanen PBMCs MS-erkrankter Individuen und einer gesunden Kontrollgruppe mittels real-time PCR quantitativ analysiert (Tabelle 4). Um mit denselben Primern ebenfalls die Signaltransduktion der murinen Modellzellen quantitativ untersuchen zu können wurden die Primer für Sequenzen des humanen und murinen Genoms designt, welche sich nach Alignment in Deckung bringen ließen und somit über die Evolution hoch konservierten Genomabschnitten entsprachen (siehe 2.2.10.4).

Der gleiche Versuchsansatz erbrachte für das Primerdesign für die Analyse von Transkriptionsfaktoren der T-Zellsignaltransduktion im murinen und humanem System ebenfalls homologe Sequenzen, aber die vielen homologen und damit evolutionär konservierten Sequenzen verwandter Moleküle beider Systeme machte ein spezifisches Primerdesign, welche beide Arten berücksichtigte, nahezu unmöglich.

(Diese Daten sind nicht gezeigt, weil ihre Präsentation und Diskussion über den relevanten Rahmen dieser Arbeit hinausginge.)

3.1.1. Darstellung des interspezifischen Primerdesigns

3.1.1.1. Das LAT-Primerpaar

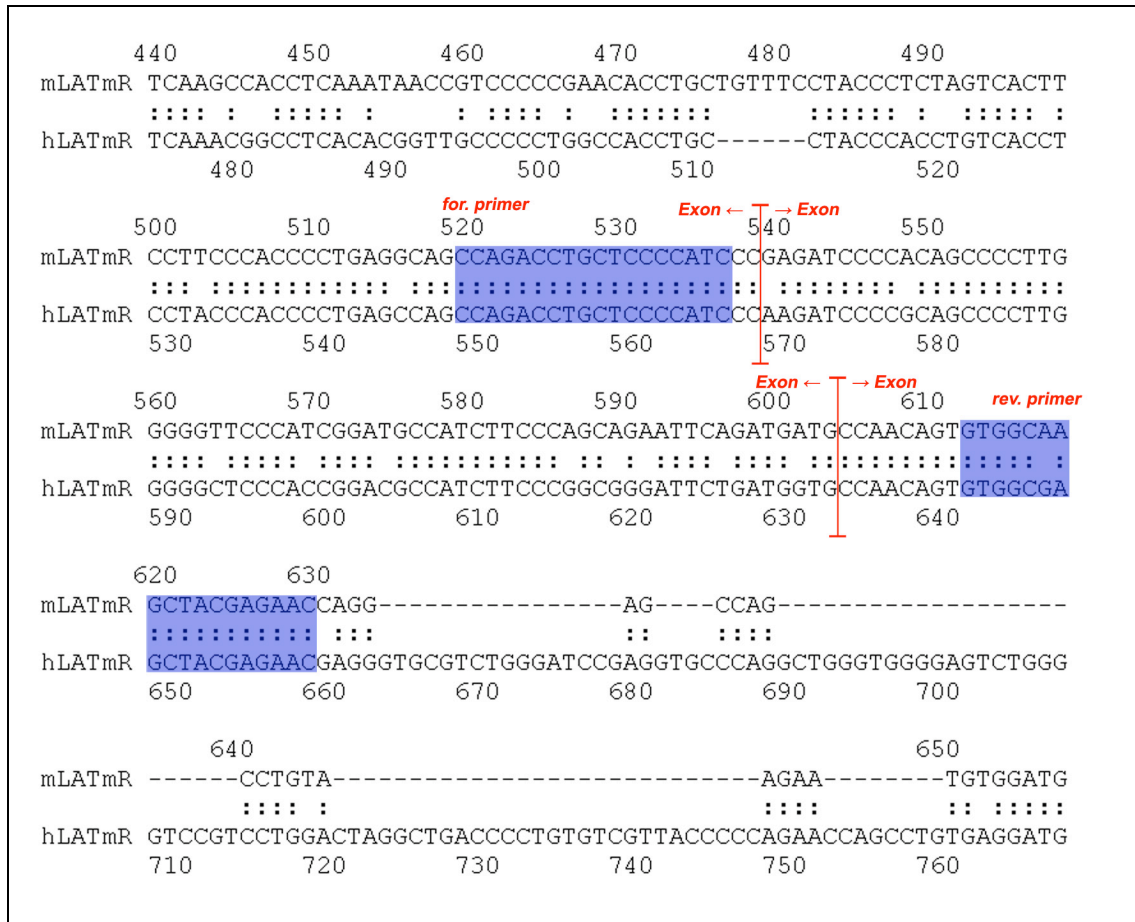


Abbildung 7: Interspezifisches Design der LAT-Primer unter Berücksichtigung der Exon-Exon-Boundaries nach Alignment der murinen und der humanen mRNA-Sequenz in LALIGN von <http://www.ch.emgnet.org>.

Ergebnisse

3.1.1.3. Das c-Cbl-Primerpaar

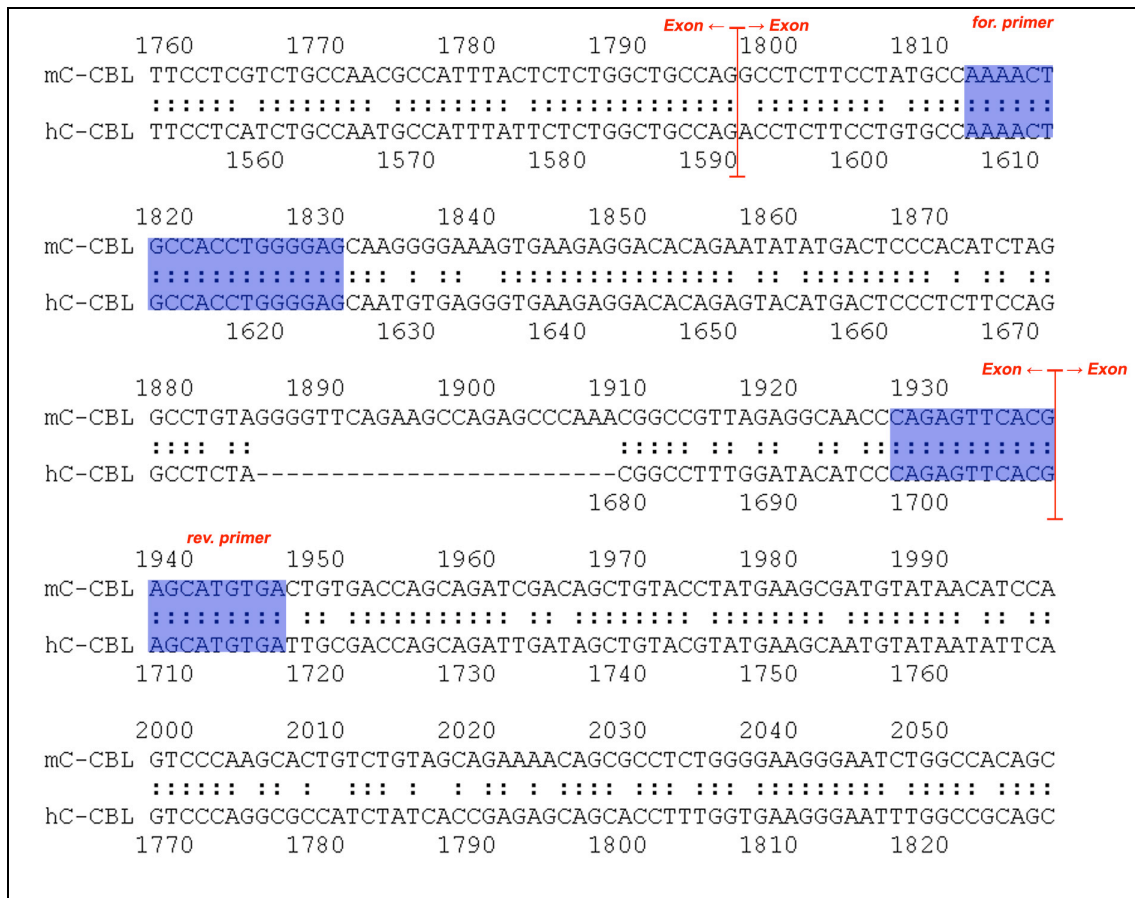


Abbildung 9: Interspezifisches Design der c-Cbl-Primer unter Berücksichtigung der Exon-Exon-Boundaries nach Alignment der murinen und der humanen mRNA-Sequenz in LALIGN von <http://www.ch.emgnet.org>.

3.1.2. Validierung der Primer mittels konventioneller PCR-Analyse

Bevor die Oligonukleotidprimer in der real-time PCR eingesetzt werden konnten, wurden sie in Probeläufen einer konventionellen PCR unterzogen, um zu zeigen, dass sie im murinen und im humanem System spezifisch die gewünschten Sequenzen amplifizierten; mRNA aller Adaptermoleküle waren in der konventionellen PCR spezifisch nachweisbar. Die richtige Produktlänge wurde approximativ durch die mitaufgetragene Basenpaarleiter angezeigt.

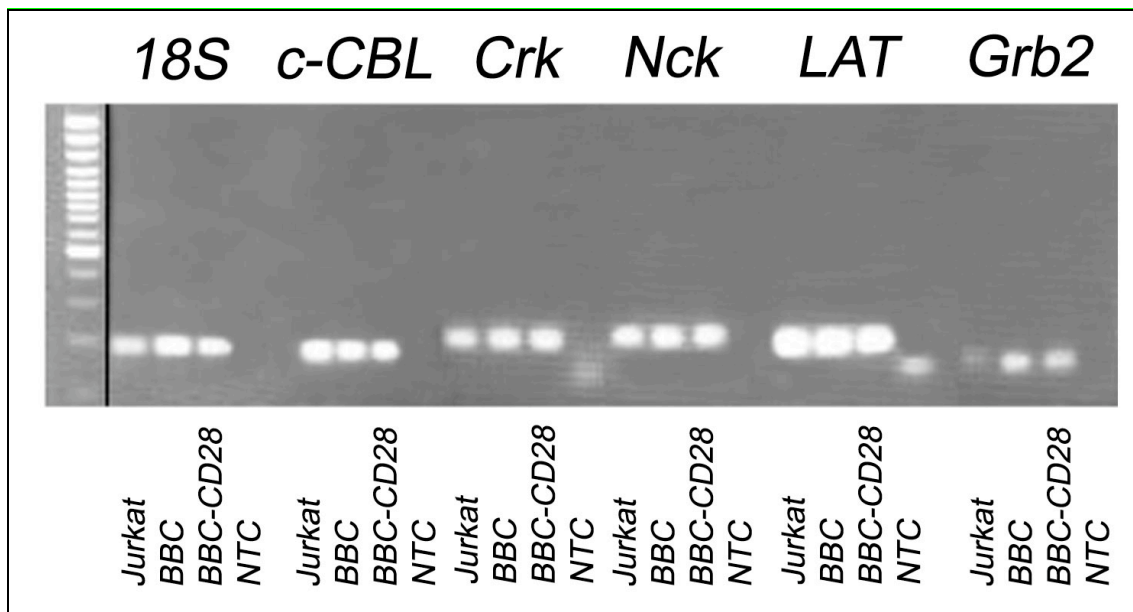


Abbildung 12: Gelelektrophorese der interspeziesspezifischen Primer der Adaptermoleküle.

3.2. Vergleichende Expressionsanalysen humaner PBMCs von MS-Patienten und gesunder Kontrollgruppe

3.2.1. Vergleich der Expressionsniveaus von Adaptermolekülen in unstimulierten PBMCs

Unterschiede in den Expressionsniveaus von Adaptermolekülen der TCR-Signaltransduktion in frisch isolierten PBMCs von MS-Patienten (N=10) und von gesunden Spendern (n=10) wurden mittels rt-PCR-Analysen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Schaubild der statistischen Auswertung aufgeführt.

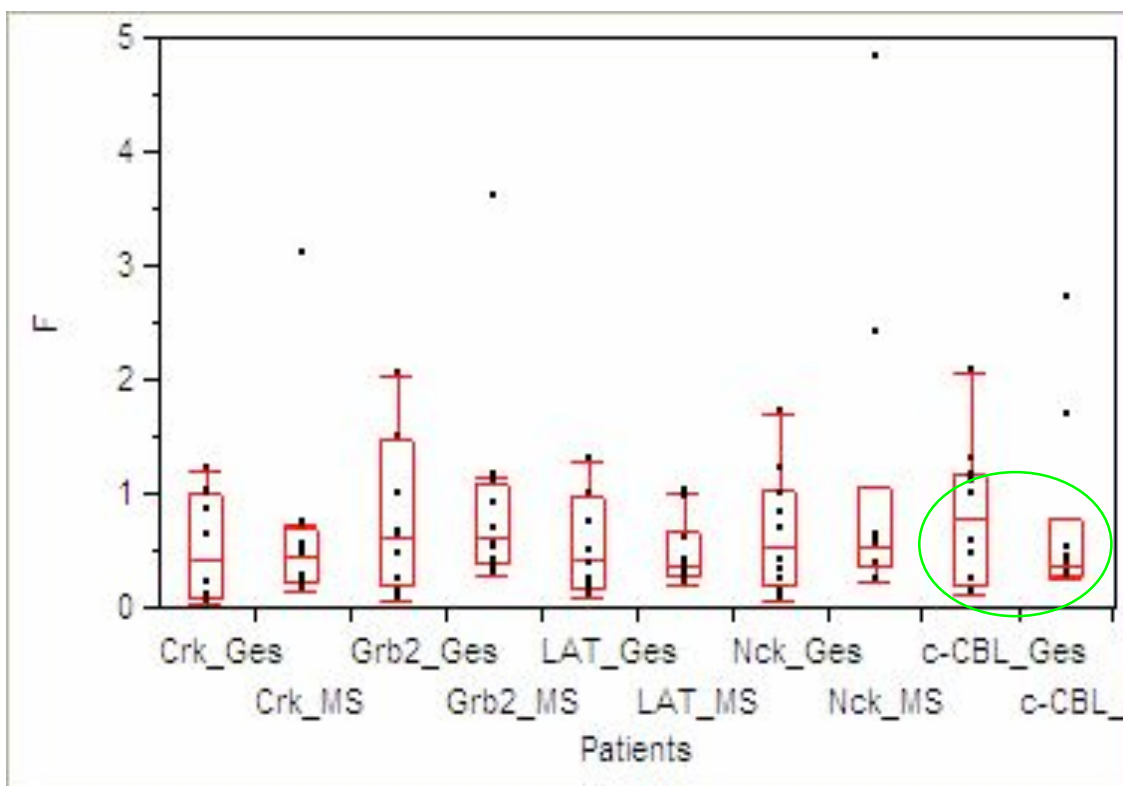


Abbildung 13: Oneway Analyse: Vergleich der Expressionshöhen von TCR-Signaltransduktionsmolekülen in unstimulierten PBMCs von MS-Patienten (n=10) und einer gesunden Kontrollgruppe (n=10). Die Expressionshöhen liegen in etwa gleichem Verhältnis, wobei das Wertepaar für c-Cbl deutlich abweicht und in der Gruppe der MS-Patienten (Median = 0,3855) eine auffallende Unterexpression gegenüber der Kontrollgruppe (Median = 0,788) zeigt.

Der direkte Vergleich der nativen, nicht stimulierten PBMCs der MS-Patienten vs. der Kontrollgruppe zeigt eine durchschnittliche Expressionshöhe der Adaptermoleküle beider Gruppen im etwa gleichen Bereich. Abweichend davon zeigt sich bei der Untersuchung des c-Cbl-Moleküls eine geringere Expression in der Gruppe der MS-Patienten (Median = 0,3855) gegenüber der Kontrollgruppe (Median = 0,788). Der Unterschied in den Medianwerten ist im direkten Paarvergleich mit den Expressionshöhen der anderen untersuchten Moleküle auffallend, aber statistisch nicht signifikant, der Tukey-Kramer Test ist negativ und die Chi-Quadratnäherung zeigt einen p-Wert $> 8,221$. Dennoch lässt sich in diesem deutlichen Unterschied der Expressionshöhe von c-Cbl im Sinne seiner biologischen Funktion als Ubiquitin-Ligase eine Unterexpression in der MS-Patientengruppe messen, was im Zusammenhang mit einer zeitlich verzögerten Degradation der Signaltransduktionsmoleküle stehen kann. Dies bedeutet, dass die gemessenen Expressionsniveaus anderer Signaltransduktionsmoleküle, hier als Momentaufnahme, nicht absolut erhöht sein müssen, um eine dynamische Überrepräsentation von Signaltransduktionsmolekülen auf der zytosolischen Seite des TCRs mit der Folge einer Rezeptorüberfunktion bzw. Überstimulation auf Signaltransduktionniveau zu erhalten. Die Unterexpression von c-Cbl kann einen möglichen molekularbiologischen Pathomechanismus für die Entstehung einer MS-Erkrankung implizieren.

3.2.2. Einzelbetrachtung der Expressionsniveaus von Adaptermolekülen unstimulierter PBMCs

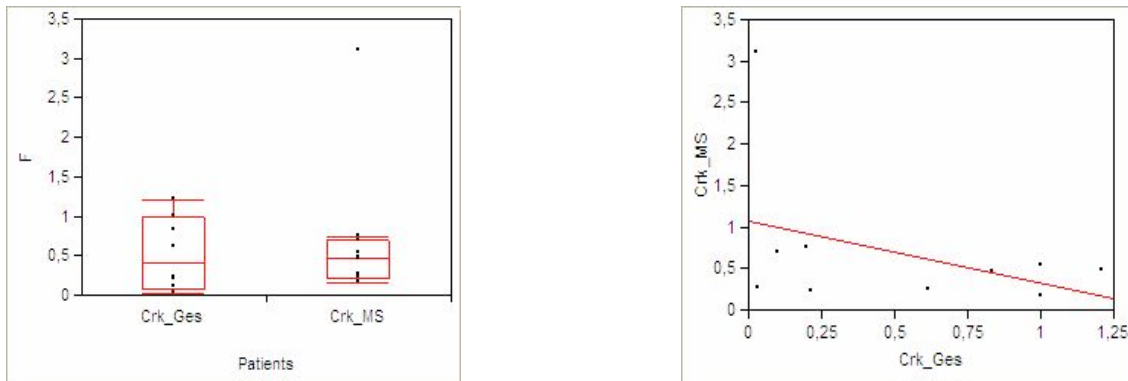


Abbildung 14: Oneway Analyse und lineare Regression des Expressionsniveaus von Crk in unstimulierten PBMCs von MS-Patienten (n=10) und Kontrollgruppe (n=10).

Crk zeigt ähnliche Expressionsniveaus im Vergleich der MS-Patienten (Median = 0,472) versus der Kontrollgruppe (Median = 0,417). Der p-Wert der Chi-Quadratnäherung ist $>0,7913$. Die lineare Regressionsanalyse zeigt die gleiche Tendenz im Verhalten der Werte wie bei den Expressionslevel der stimulierten Zellen.

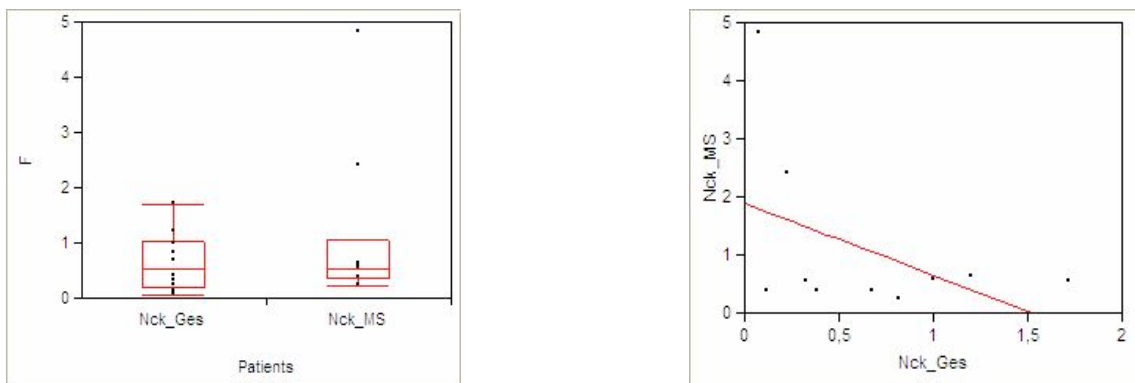


Abbildung 15: Oneway Analyse und lineare Regression des Expressionsniveaus von Nck in unstimulierten PBMCs von MS-Patienten (n=10) und Kontrollgruppe (n=10).

Das Adaptermolekül Nck zeigt ähnliche Expressionsniveaus im Vergleich der MS-Patienten (Median = 0,549) versus der Kontrollgruppe (Median = 0,536). Der p-Wert der Chi-Quadratnäherung ist $>0,7337$. Die lineare Regressionsanalyse zeigt gleiche Tendenz im Verhalten der Werte wie bei den Expressionslevel der stimulierten Zellen.

Ergebnisse

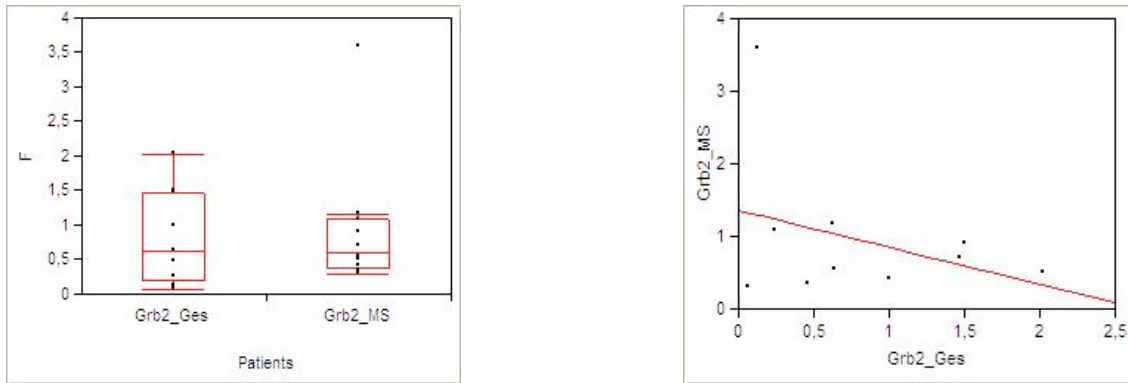


Abbildung 16: Oneway Analyse und lineare Regression des Expressionsniveaus von Grb2 in unstimulierten PBMCs von MS-Patienten (n=10) und Kontrollgruppe (n=10).

Grb2 zeigt ähnliche Expressionsniveaus im Vergleich der MS-Patienten (Median = 0,621) versus der Kontrollgruppe (Median = 0,0,633). Der p-Wert der Chi-Quadratnäherung ist $>0,8501$. Die lineare Regressionsanalyse zeigt gleiche Tendenz im Verhalten der Werte wie bei den Expressionslevel der stimulierten Zellen.

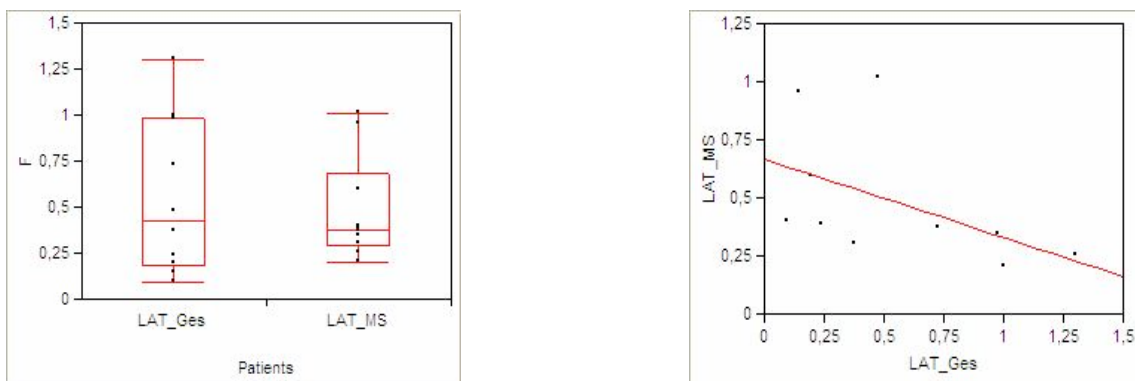


Abbildung 17: Oneway Analyse und lineare Regression des Expressionsniveaus von LAT in unstimulierten PBMCs von MS-Patienten (n=10) und Kontrollgruppe (n=10).

Das integrale Membranmolekül und Adapterprotein LAT zeigt ähnliche Expressionsniveaus im Vergleich der MS-Patienten (Median = 0,377) versus der Kontrollgruppe (Median = 0,628). Der p-Wert der Chi-Quadratnäherung ist $>0,9397$. Die lineare Regressionsanalyse zeigt gleiche Tendenz im Verhalten der Werte wie bei den Expressionslevel der stimulierten Zellen.

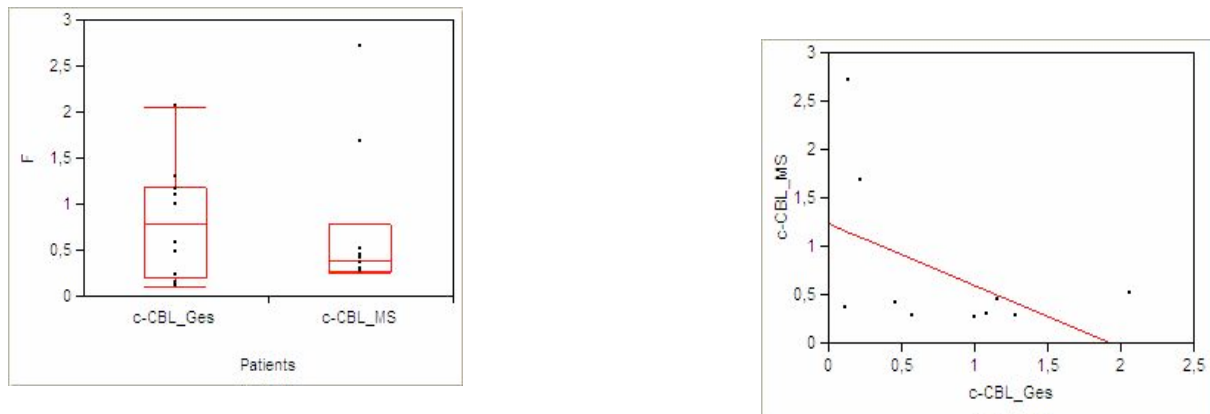


Abbildung 18: Oneway Analyse und lineare Regression des Expressionsniveaus von c-Cbl in unstimulierten PBMCs von MS-Patienten (n=10) und Kontrollgruppe (n=10).

Die Ubiquitin-Ligase c-Cbl zeigt deutlich unterschiedliche Expressionsniveaus im Vergleich der MS-Patienten (Median = 0,3855) versus der Kontrollgruppe (Median = 0,788). Der p-Wert der Chi-Quadratnäherung ist $>0,6501$. Die lineare Regressionsanalyse zeigt gleiche Tendenz im Verhalten der Werte wie bei den Expressionslevel der stimulierten Zellen.

3.2.3. Vergleich der Regulation von Adaptermolekülen der Signaltransduktion unter verschiedenen Stimulationsbedingungen

Zugrunde liegende Arbeitshypothese ist, dass Änderungen auf dem Niveau der Expression verschiedener Signaltransduktionsmoleküle in T-Zellen über ihren Aktivierungsgrad und daraus resultierend ihren Effektorstatus entscheiden und dabei bei der Entstehung von ungehemmter autoimmuner T-Zellaktivierung und Proliferation eine Rolle spielen könnten (Slifka and Whitton 2001; Riley, Mao et al. 2002).

Zu dieser Untersuchung wurden die PBMCs von MS-Patienten (n=10) mit den PBMCs von freiwilligen, gesunden Spendern nach Stimulation mit OKT3 (=anti-CD3) oder KOP (Kopolymer 1, Glatirameracetat) für jeweils 24 Stunden verglichen. Die relative Genexpression wurde mittels rt-PCR ermittelt und in Bezug auf den Ausgangswert (nicht stimuliert; t_0) als relative Hochregulation der Adaptermolekül-mRNA nach 24 Stunden angegeben. Die Daten wurden zur statistischen Analyse in das Statistikprogramm JUMP 4.0 übertragen und der Tukey-Kramer-Test zur Detektion statistisch auffälliger, miteinander verknüpfter Datenpaare angewandt. Die statistische Signifikanz ermittelte der nachgeschaltete Wilcoxon / Krustal-Wallis Tests

(Rang-Summen-Test) bzw. die Chi-quadrat-Näherung. Damit ausreissende Werte in der weiteren Betrachtung nicht so stark ins Gewicht fallen, werden für alle weiteren Vergleiche die Median-Werte angegeben.

3.2.3.1. Die c-Cbl-Expression nach Stimulation

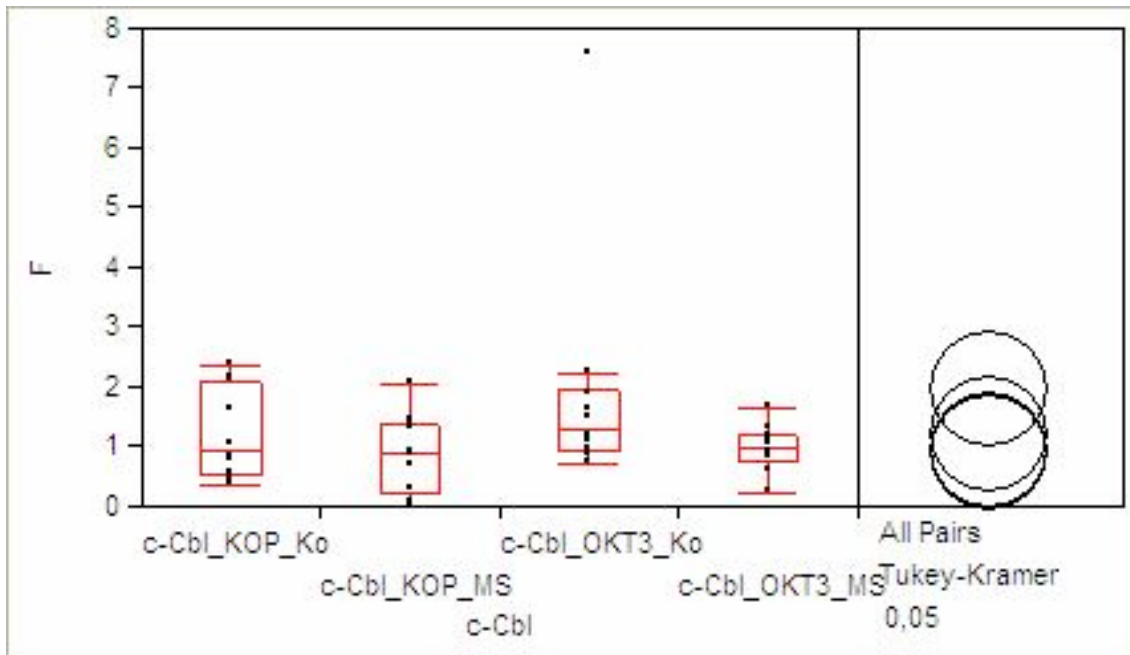


Abbildung 19: Oneway-Analyse des Hochregulationsfaktors der Expression des c-Cbl Signaltransduktionsmolekül nach 24-stündiger Stimulation in humanen PBMCs.

Level	Minimum	Median	Maximum	Mean	Std Dev	Std Err Mean
c-Cbl_KOP_Ko	0,391	0,952	2,395	1,24040	0,76259	0,24115
c-Cbl_KOP_MS	0,027	0,9015	2,063	0,90730	0,66499	0,21029
c-Cbl_OKT3_Ko	0,714	1,3255	7,558	1,96550	2,02356	0,63991
c-Cbl_OKT3_MS	0,228	0,9885	1,67	0,97290	0,39257	0,12414

Tabelle 6: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung der c-Cbl Expression.

Das c-Cbl Signaltransduktionsmolekül ist nach OKT-Stimulation bei der gesunden Kontrollgruppe (Median = 1,3255) am höchsten und bei der OKT-Stimulation der MS-Patienten (Median = 0,988) am zweithöchsten hochreguliert. Der Faktor der Hochregulation nach KOP-Stimulation ist im gesamten Niveau geringer, wobei ebenfalls die gesunde Kontrollgruppe (Median = 0,952) eine höhere Expression aufweist als die MS-Patienten (Median = 0,9015). Der Tukey-Kramer-Test ist negativ und die Chi-Quadrat-Näherung des Wilcoxon-Test zeigt keine Signifikanz (p-Wert > 0,2429).

Ergebnisse

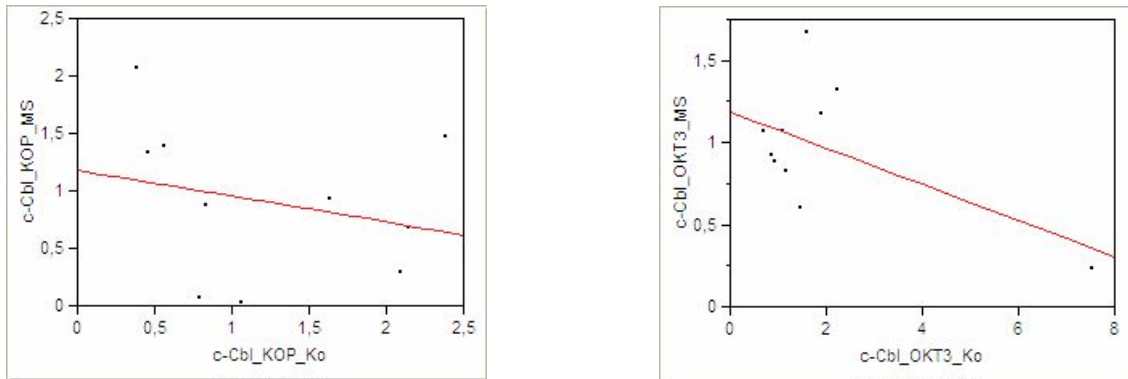


Abbildung 20: Die linearen Regressionsanalysen für die KOP- und für die OKT3-Stimulation zeigen eine umgekehrte Abhängigkeit der MS-Gruppe von der Kontrollgruppe; d.h. je stärker die Kontrollgruppe eine Steigerung der Expression von c-Cbl zeigt, zeigt die MS-Gruppe eine verminderte Genexpression. Dies steht im wichtigen Zusammenhang mit der biologischen Funktion von c-Cbl als Ubiquitin-Ligase, welche eine Negativregulation des TCR-Signals downstream bewirkt und hier bei der MS-Gruppe nicht so stark gegeben scheint als bei der Kontrollgruppe.

3.2.3.2. Die Crk-Expression nach Stimulation

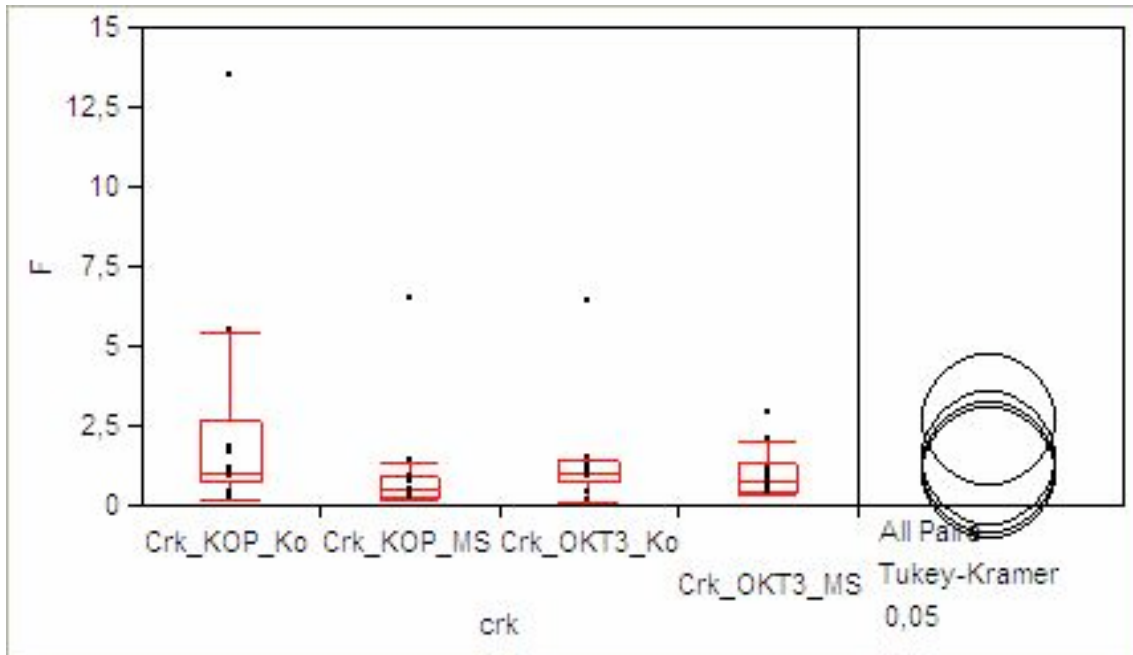


Abbildung 21: Oneway-Analyse des Hochregulationsfaktors der Expression des Crk Signaltransduktionsmolekül nach 24-stündiger Stimulation in humanen PBMCs.

Level	Minimum	Median	Maximum	Mean	Std Dev	Std Err Mean
Crk_KOP_Ko	0,198	1,0595	13,454	2,68130	4,06602	1,2858
Crk_KOP_MS	0,215	0,5765	6,498	1,18650	1,89719	0,5999
Crk_OKT3_Ko	0,099	1,076	6,409	1,50110	1,77874	0,5625
Crk_OKT3_MS	0,34	0,8285	2,908	1,05740	0,81849	0,2588

Tabelle 7: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung der Crk Expression.

Das Crk Signaltransduktionsmolekül ist nach der KOP-Stimulation bei der gesunden Kontrollgruppe (Median = 1,0595) am zweitstärksten und bei der OKT-Stimulation der Kontrollgruppe (Median = 1,076) am stärksten hochreguliert. Die Gruppe der MS-Patienten zeigt sowohl nach KOP- (Median = 0,5765), als auch nach OKT3-Stimulation (Median = 0,8285) eine verminderte Genexpression auf. Der Tukey-Kramer-Test ist negativ und der Chi-Quadrat-Näherung des Wilcoxon-Test zeigt keine Signifikanz (p-Wert > 0,2921).

Ergebnisse

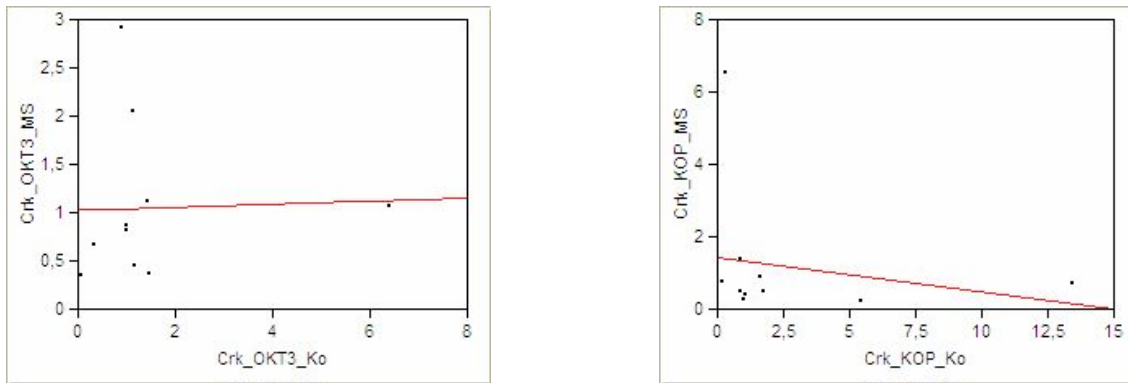


Abbildung 22: Die linearen Regressionsanalysen für die KOP- und für die OKT3-Stimulation zeigen eine umgekehrte Abhängigkeit der MS-Gruppe von der Kontrollgruppe in der KOP-Stimulation; d.h. wo die Kontrollgruppe eine Steigerung der Expression von Crk zeigt, zeigt die MS-Gruppe eine verminderte Genexpression. Bei der Werteverteilung unter der OKT3 Stimulation scheint sich kein deutliches Abhängigkeitsverhältnis beider Gruppen zu ergeben.

3.2.3.3. Grb2-Expression nach Stimulation

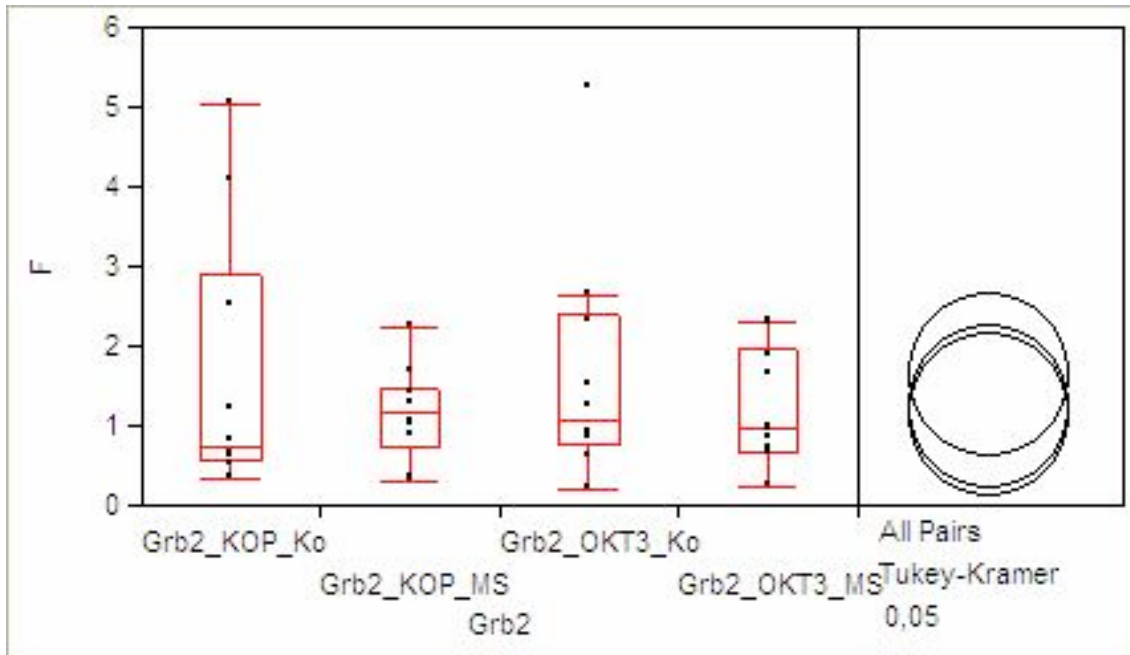


Abbildung 23: Oneway-Analyse des Hochregulationsfaktors der Expression des Grb2 Signaltransduktionsmolekül nach 24-stündiger Stimulation in humanen PBMCs.

Level	Minimum	Median	Maximum	Mean	Std Dev	Std Err Mean
Grb2_KOP_Ko	0,358	0,7385	5,063	1,65050	1,67620	0,53006
Grb2_KOP_MS	0,33	1,167	2,235	1,15640	0,57360	0,18139
Grb2_OKT3_Ko	0,218	1,0835	5,242	1,64860	1,46748	0,46406
Grb2_OKT3_MS	0,239	0,968	2,33	1,25280	0,72624	0,22966

Tabelle 8: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung der Grb2 Expression.

Das Grb2 Signaltransduktionsmolekül ist nach KOP-Stimulation bei der MS-Gruppe (Median = 1,167) am stärksten, bzw. höher als bei der Kontrollgruppe (Median = 0,738) hochreguliert. Bei der OKT-Stimulation verhält sich der Faktor der Hochregulation sonst wie bei den zuvor beschriebenen Molekülen: die gesunde Kontrollgruppe (Median = 1,0835) weist erneut eine höhere Expression auf, als die MS-Patienten (Median = 0,968). Der Tukey-Kramer-Test ist negativ und der Chi-Quadrat-Näherung des Wilcoxon-Test zeigt keine Signifikanz (p-Wert = 0,922).

Ergebnisse

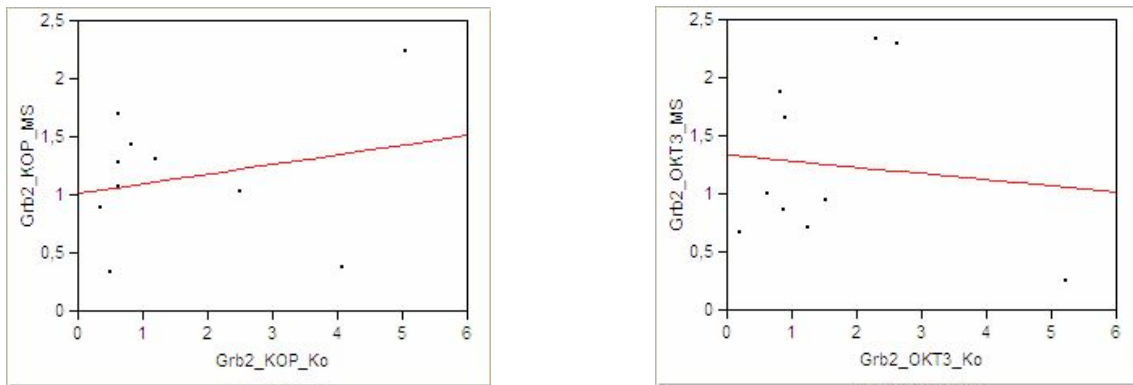


Abbildung 24: Die linearen Regressionsanalysen für die KOP- und für die OKT3-Stimulation zeigen eine direkte Abhängigkeit der Werte der MS-Gruppe von der Kontrollgruppe in der KOP-Stimulation, bei der OKT3-Stimulation ist das Verhältnis umgekehrt.

3.2.3.4. Die LAT-Expression nach Stimulation

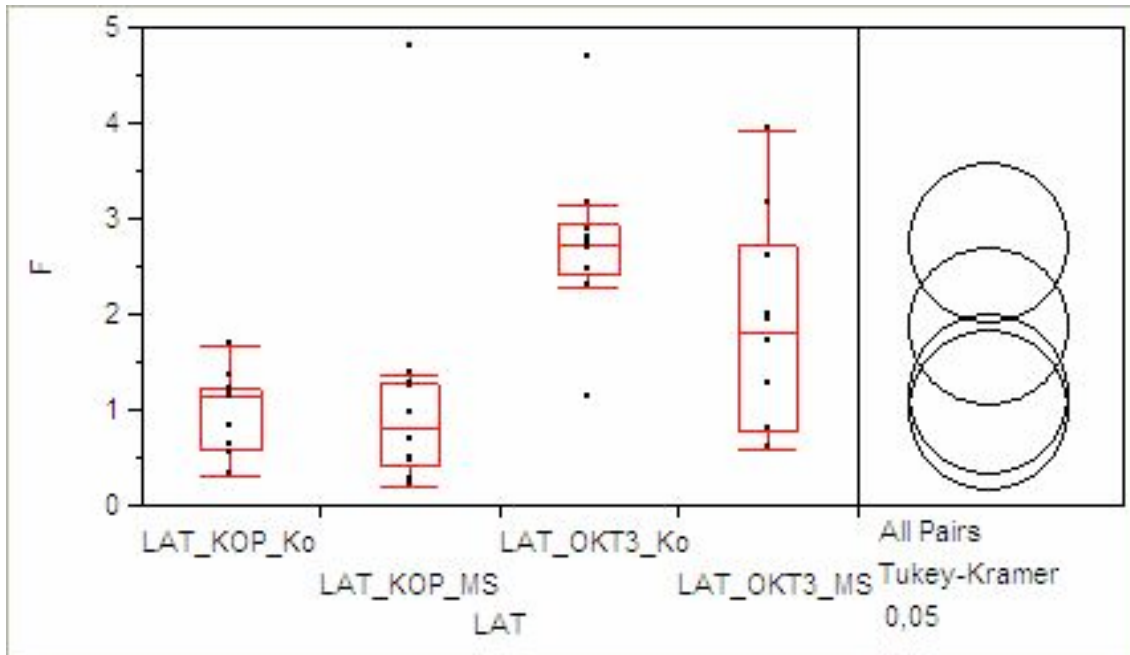


Abbildung 25: Oneway-Analyse des Hochregulationsfaktors der Expression des LAT Signaltransduktionsmolekül nach 24-stündiger Stimulation in humanen PBMCs.

Level	Minimum	Median	Maximum	Mean	Std Dev	Std Err Mean
LAT_KOP_Ko	0,333	1,155	1,67	1,00540	0,41253	0,13045
LAT_KOP_MS	0,216	0,817	4,79	1,17100	1,33911	0,42347
LAT_OKT3_Ko	1,125	2,737	4,675	2,75460	0,87078	0,27537
LAT_OKT3_MS	0,607	1,8215	3,931	1,87720	1,09179	0,34526

Tabelle 9: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung der LAT Expression.

Das LAT Signaltransduktionsmolekül ist nach OKT-Stimulation bei der gesunden Kontrollgruppe (Median = 2,737) am stärksten und bei der OKT-Stimulation der MS-Patienten (Median = 1,8215) am zweitstärksten hochreguliert. Insgesamt zeigt es den größten Faktor der Hochregulation nach Stimulation unter den hier analysierten Adaptermolekülen. Die Expressionshöhe nach KOP-Stimulation ist im gesamten Niveau geringer, wobei ebenfalls die gesunde Kontrollgruppe (Median = 1,155) eine stärkere Hochregulation aufweist als die MS-Patienten (Median = 0,817). Der Tukey-Kramer-Test ist positiv für den Vergleich der Wertepaare zwischen den Stimulationsmodi und der Chi-Quadrat-Näherung des Wilcoxon-Test zeigt eine Signifikanz (p-Wert = 0,0016). Analoges gilt allerdings nicht für den Paarvergleich MS- versus Kontrollgruppe. Der Tukey-Kramer-Test ist negativ für den Vergleich dieser Wertepaare und somit nicht statistisch auffällig.

Ergebnisse

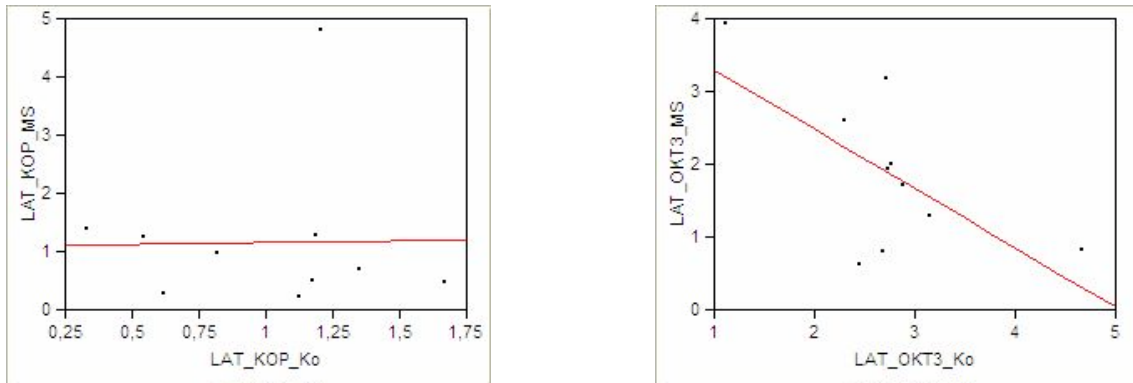


Abbildung 26: Die linearen Regressionsanalysen für die KOP- und für die OKT3-Stimulation zeigen eine umgekehrte Abhängigkeit der MS-Gruppe von der Kontrollgruppe in der OKT3-Stimulation; d.h. wo die Kontrollgruppe eine Steigerung der Expression von LAT zeigt, zeigt die MS-Gruppe eine erminderte Genexpression. Bei der Werteverteilung unter der KOP Stimulation scheint sich kein Abhängigkeitsverhältnis beider Gruppen zu ergeben.

3.2.3.5. Die Nck-Expression nach Stimulation

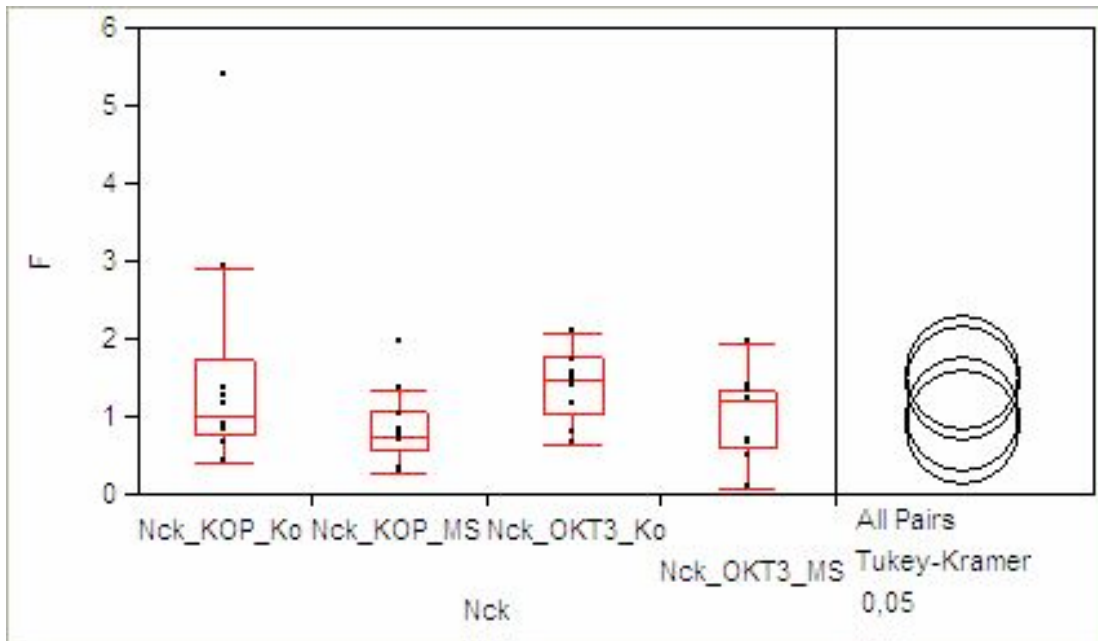


Abbildung 27: Oneway-Analyse des Hochregulationsfaktors der Expression des Nck Signaltransduktionsmolekül nach 24-stündiger Stimulation in humanen PBMCs.

Level	Minimum	Median	Maximum	Mean	Std Dev	Std Err Mean
Nck_KOP_Ko	0,415	1,0175	5,389	1,56870	1,50704	0,47657
Nck_KOP_MS	0,282	0,754	1,952	0,85990	0,49450	0,15638
Nck_OKT3_Ko	0,662	1,4925	2,078	1,43690	0,47223	0,14933
Nck_OKT3_MS	0,078	1,208	1,96	1,03400	0,54454	0,17220

Tabelle 10: Mittelwerte, Mediane und Standardabweichung der Nck Expression.

Das Nck Signaltransduktionsmolekül ist nach OKT-Stimulation bei der gesunden Kontrollgruppe (Median = 1,4925) am stärksten und bei der OKT-Stimulation der MS-Patienten (Median = 1,208) am zweitstärksten hochreguliert. Der Faktor der Hochregulation von Nck ist nach KOP-Stimulation im gesamten Niveau geringer, wobei ebenfalls die gesunde Kontrollgruppe (Median = 1,0175) eine höhere Expression aufweist als die MS-Patienten (Median = 0,754). Der Tukey-Kramer-Test ist negativ für den Vergleich dieser Wertepaare, der Chi-Quadrat-Näherung des Wilcoxon-Test zeigt keine Signifikanz, aber einen p-Wert von 0,0864.

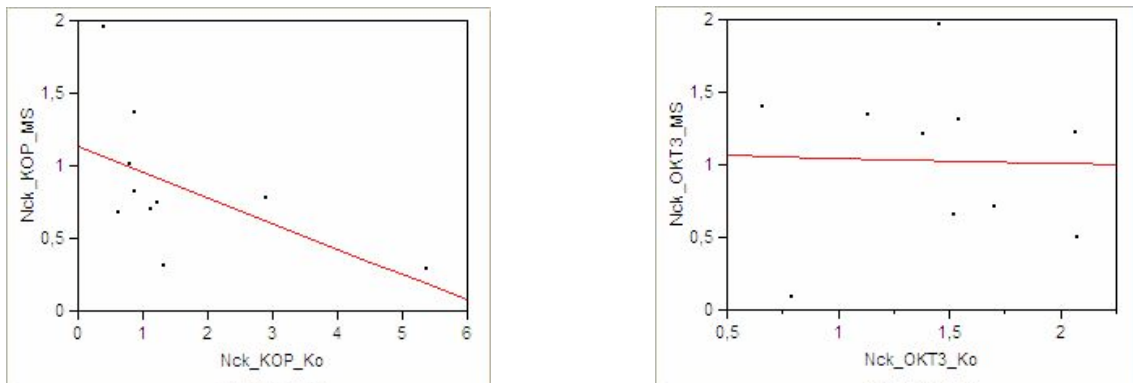


Abbildung 28: Die linearen Regressionsanalysen für die KOP- und für die OKT3-Stimulation zeigen eine umgekehrte Abhängigkeit der Werte der MS-Gruppe von denen der Kontrollgruppe besonders für die KOP-Stimulation; d.h. je stärker die Hochregulation in der Kontrollgruppe von LAT ist, desto eher finden wir eine Runterregulation in der MS-Gruppe. Bei der Werteverteilung unter der OKT3-Stimulation ergibt sich nur eine geringe Abhängigkeit der Werte beider Gruppen.

Betrachtet man zusammenfassend die Faktoren der Hochregulation aller hier analysierten Signaltransduktionsmoleküle, wird die deutlichste Hochregulation durch die OKT3-Stimulation der PBMCs der gesunden Kontrollgruppe erreicht. Erhöhte Expressionsniveaus lassen sich auch für die Signaltransduktionsmoleküle in den PBMCs der gesunden Kontrollgruppe nach KOP-Stimulation zeigen, während in den PBMCs der MS-Patienten auf Stimulation sowohl mit OKT3 als auch mit KOP nur eine geringere Hochregulation oder sogar eine verminderte Genexpression nachzuweisen ist.

3.2.4. Vergleich der Hochregulation von Signaltransduktionsmolekülen innerhalb der MS-Gruppe:

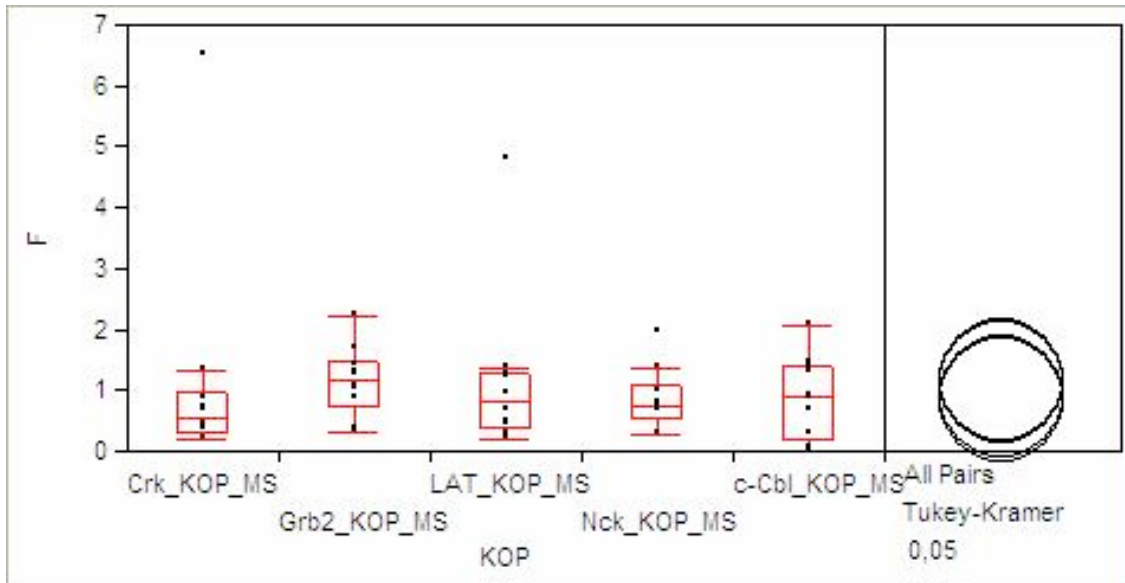


Abbildung 29: PBMCs der MS-Patienten unter KOP-Stimulation.

Nach KOP-Stimulation am meisten hochreguliert ist das Grb2 Adaptermolekül (Median = 1,167). Der Tukey-Kramer-Test ist allerdings negativ und damit nicht auffällig und die Chi-Quadrat-Näherung ergibt einen p-Wert von 0,46. Der Unterschied gilt daher als nicht signifikant.

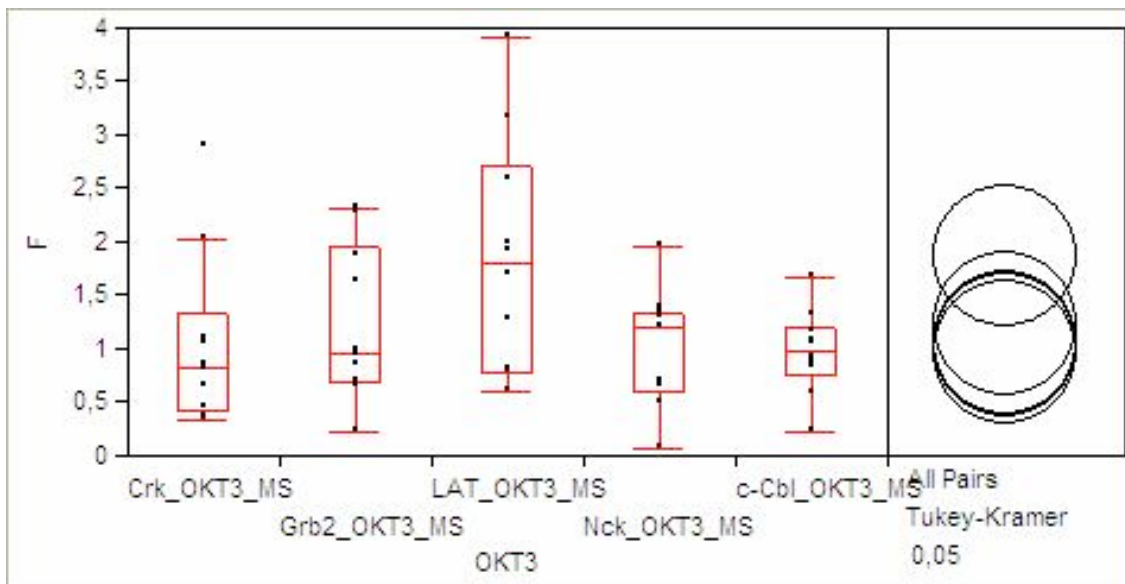


Abbildung 30: PBMCs der MS-Patienten unter OKT3-Stimulation.

Nach OKT3-Stimulation der PBMCs der MS-Patienten ist LAT mit einem Medianwert des Hochregulationsfaktors von 1,8215 das am stärksten hochregulierte der hier

untersuchten Adaptermoleküle, was die herausragende Bedeutung dieses integralen Adaptermoleküls innerhalb der Signaltransduktionskaskade unterstreicht. Der p-Wert hierfür liegt bei 0,264 und ist somit nicht signifikant.

3.2.5. Vergleich der Hochregulation von Signaltransduktionsmolekülen innerhalb der Kontroll-Gruppe:

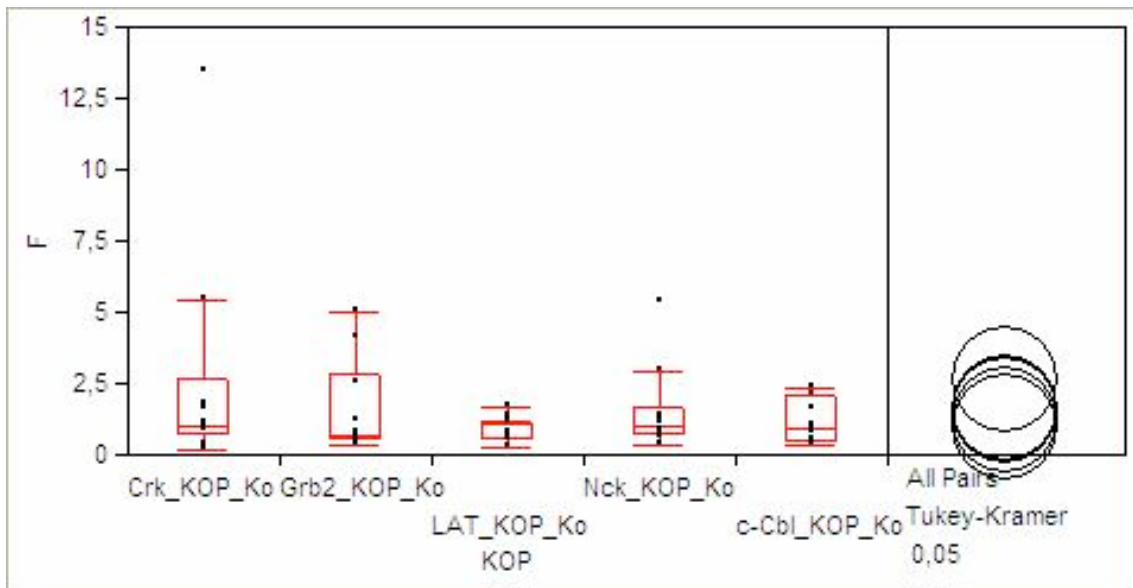


Abbildung 31: PBMCs der Kontrollgruppe unter KOP-Stimulation.

LAT ist mit einem Medianwert des Hochregulationsfaktors von 1,155 das am stärksten hochregulierte der hier untersuchten Adaptermoleküle unter der KOP-Stimulation auch in der Kontroll-Gruppe, was die zellbiologische Bedeutung des Moleküls innerhalb der Signaltransduktionskaskade unterstreicht und nicht krankheitabhängig zu sein scheint. Der p-Wert hierfür liegt bei 0,9524 und ist somit nicht signifikant.

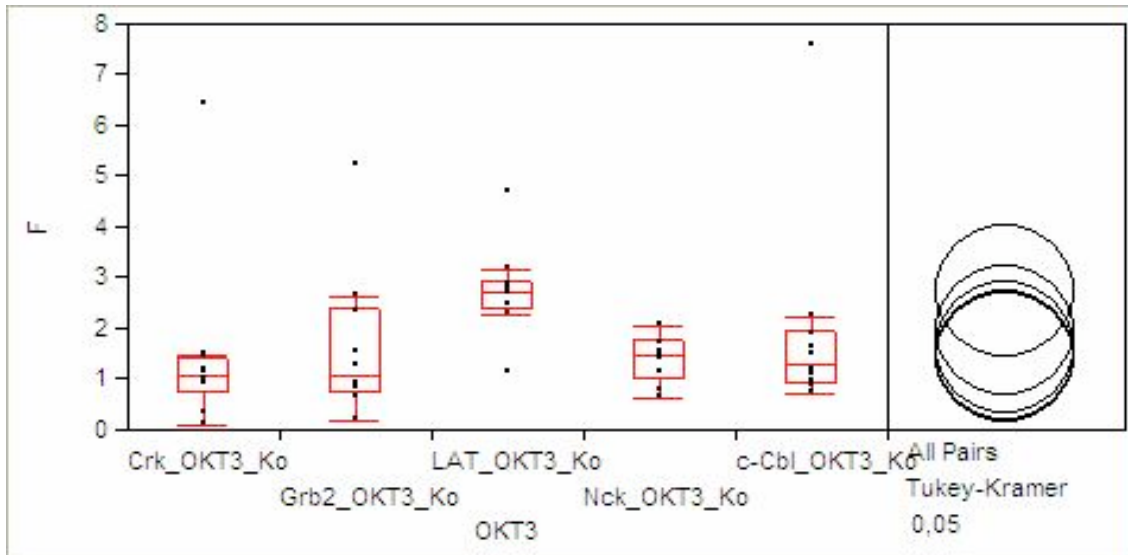


Abbildung 32: PBMCs der Kontrollgruppe unter OKT3-Stimulation.

Insgesamt zeigen alle Adaptermoleküle nach OKT3-Stimulation in den PBMCs der Kontrollgruppe eine Hochregulation. Noch deutlicher als unter der KOP-Stimulation zeigt sich in der OKT3-Stimulation, dass LAT ist mit einem Medianwert des Hochregulationsfaktors von 2,737 das am stärksten hochregulierte der hier untersuchten Adaptermoleküle ist. Am zweitstärksten hochreguliert ist das Nck Adaptermolekül (Median = 1,4925) dicht gefolgt von der c-Cbl Ubiquitin-Ligase (Median = 1,3255; Mean = 1,9655). Der p-Wert hierfür liegt als Näherung im Falle LAT bei 0,0088 und ist somit signifikant.

3.3. Vergleichende Expressionsanalysen der murinen Modellzellen

3.3.1. Vergleich der basalen Expressionsniveaus von Signaltransduktionsmolekülen in unstimulierten Modellzellen und humanen PBMCs

Zur weiteren Etablierung und Validierung eines murinen autoimmunen Modellzellsystems (siehe 1.4) sollten die hier bereits im humanen System zur Untersuchung gekommenen Adaptermoleküle bzw. Moleküle der frühen T-Zellaktivierung quantitativ mittels rt-PCR untersucht werden. Je ähnlicher sich die Expressionsniveaus dieser Moleküle der Modellzelle mit denen der humanen Probanden verhalten, desto geeigneter ist dabei das Modellzellsystem im Einsatz zur Untersuchung möglicher autoimmuner zellproliferativer Effekte auf Niveau der Signaltransduktion sowie im Einsatz zur Erprobung zielgerichteter Moleküle zur Inhibition derselben. Des Weiteren wird ein Vergleich zur Jurkat-Zelle, einer bereits

etablierten Modellzelle für diese Fragestellungen angestellt. Die Ergebnisse sind im Folgenden in Balkendiagrammen dargestellt und sollen deskriptiv die unterschiedlichen Expressionsniveaus in den einzelnen Zellarten unter unstimulierten Bedingungen beleuchten. Aus allen in der rt-PCR erhobenen relativen Werten wurde der Mittelwert gebildet, wobei die Gruppe der humanen Zellen jeweils aus n=10 Probanden besteht und die Gruppe aller übrigen Zellen jeweils drei verschiedene Populationen untersuchter Zellen aus drei unterschiedlichen Passagen der Zellkultur beinhaltet. Vor Einsatz der Modellzellen zu weiteren Analysen und auch späteren Stimulationsversuchen wurden die avitalen Zellen mittels Trypanblaufärbung zahlenmäßig ausgeschlossen und die relevanten Oberflächenrezeptoren TCR, CD3 und CD28 mittels FACS-Analyse nachgewiesen.

3.3.1.1. Die basale LAT-Expression im Vergleich

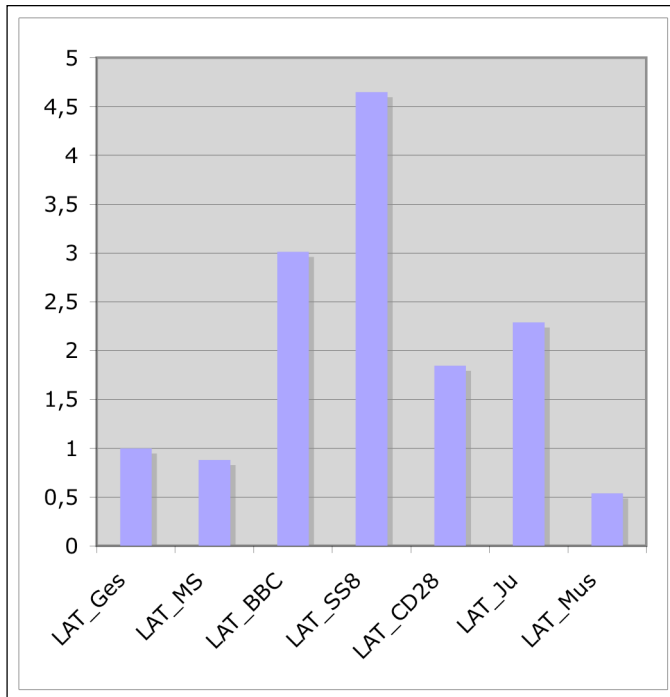


Abbildung 33: Im Schaubild dargestellt ist die rt-PCR-Analyse der relativen Expressionsniveaus von LAT im humanen und murinen System. Vergleichend sind alle Expressionsniveaus von LAT in Relation zum Expressionsniveau in der PBMC-Population der gesunden Kontrollgruppe (LAT_Ges; n=10; Wert=1) aufgetragen.

Die relativen rt-PCR-Analysen von LAT unter unstimulierten Bedingungen zeigten in Relation zu der gesunden Kontrollgruppe (LAT_Ges) ein geringeres Expressionsniveau in der Gruppe der MS-erkrankten Probanden (LAT_MS) und der murinen Splenozyten (LAT_Mus), aber eine deutliche Überexpression in allen untersuchten Modellzellen (LAT_BBC, LAT_SS8, LAT_CD28, LAT_Ju).

3.3.1.2. Die basale Nck-Expression im Vergleich

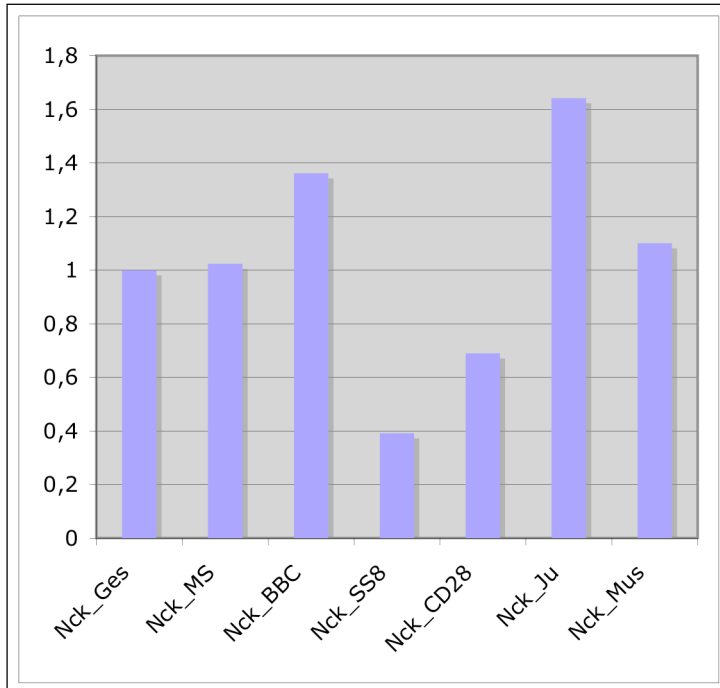


Abbildung 34: Im Schaubild dargestellt ist die rt-PCR-Analyse der relativen Expressionsniveaus von Nck im humanen und murinen System. Vergleichend sind alle Expressionsniveaus von Nck in Relation zum Expressionsniveau in der PBMC-Population der gesunden Kontrollgruppe (Nck_Ges; n=10; Wert=1) aufgetragen.

Die relativen rt-PCR-Analysen von Nck unter unstimulierten Bedingungen zeigten in Relation zu der gesunden Kontrollgruppe (Nck_Ges) ein nahezu identisches Expressionsmuster in allen Nichtmodellzellen (Nck_Ges, LAT_MS, LAT_Mus), aber eine deutliche Überexpression in den BBC- und Jurkat- Modellzellen (LAT_BBC, LAT_Ju). Dazu nicht konform verhielten sich die Messungen in den SS8- und BBC-CD28-Modellzellen (LAT_SS8, LAT_CD28).

3.3.1.3. Die basale Grb2-Expression im Vergleich

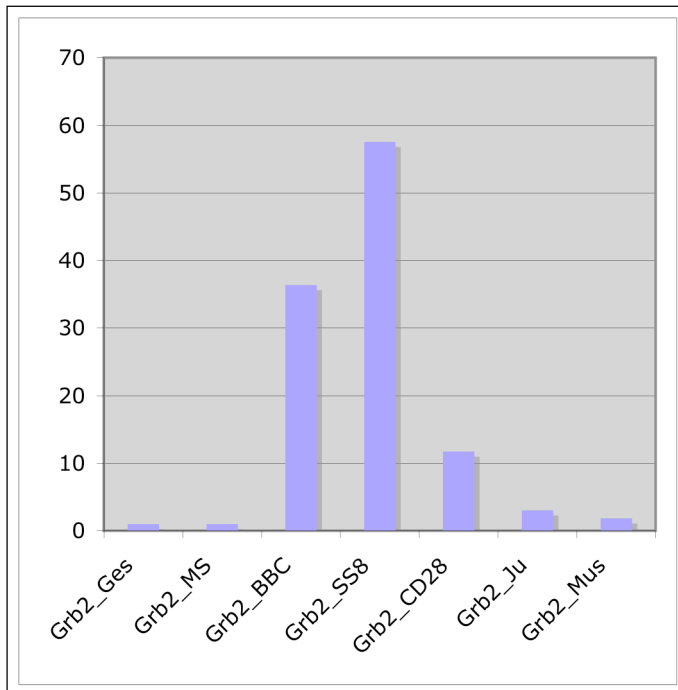


Abbildung 35: Im Schaubild dargestellt ist die rt-PCR-Analyse der relativen Expressionsniveaus von Grb2 im humanen und murinen System. Vergleichend sind alle Expressionsniveaus von Grb2 in Relation zum Expressionsniveau in der PBMC-Population der gesunden Kontrollgruppe (Grb2_Ges; n=10; Wert=1) aufgetragen.

Die relativen rt-PCR-Analysen von Grb2 unter unstimulierten Bedingungen zeigten in Relation zu der gesunden Kontrollgruppe (Grb2_Ges) ein sehr ähnliches Expressionsmuster aller Nichtmodellzellen (Grb2_MS und Grb2_Mus), aber eine deutliche Überexpression in allen untersuchten Modellzellen (Grb2_BBC, Grb2_SS8, Grb2_CD28, Grb2_Ju).

3.3.1.4. Die basale Crk-Expression im Vergleich

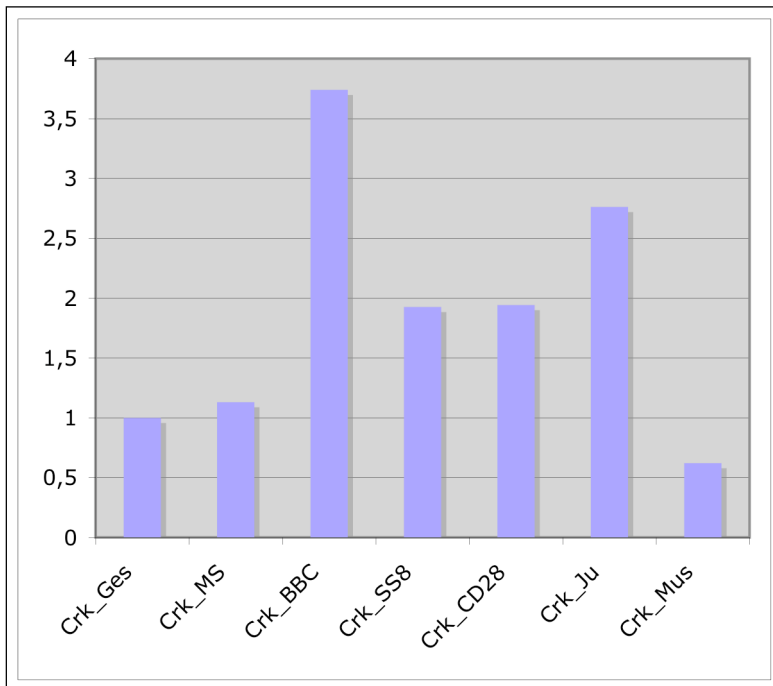


Abbildung 36: Im Schaubild dargestellt ist die rt-PCR-Analyse der relativen Expressionsniveaus von Crk im humanen und murinen System. Vergleichend sind alle Expressionsniveaus von Crk in Relation zum Expressionsniveau in der PBMC-Population der gesunden Kontrollgruppe (Crk_Ges; n=10; Wert=1) aufgetragen.

Die relativen rt-PCR-Analysen von Crk unter unstimulierten Bedingungen zeigten in Relation zu der gesunden Kontrollgruppe (Crk_Ges) ein sehr ähnliches Expressionsmuster in allen Nichtmodellzellen (Crk_MS und Crk_Mus), aber eine deutliche Überexpression in allen untersuchten Modellzellen (Crk_BBC, Crk_SS8, Crk_CD28, Crk_Ju).

3.3.1.5. Die basale c-Cbl-Expression im Vergleich

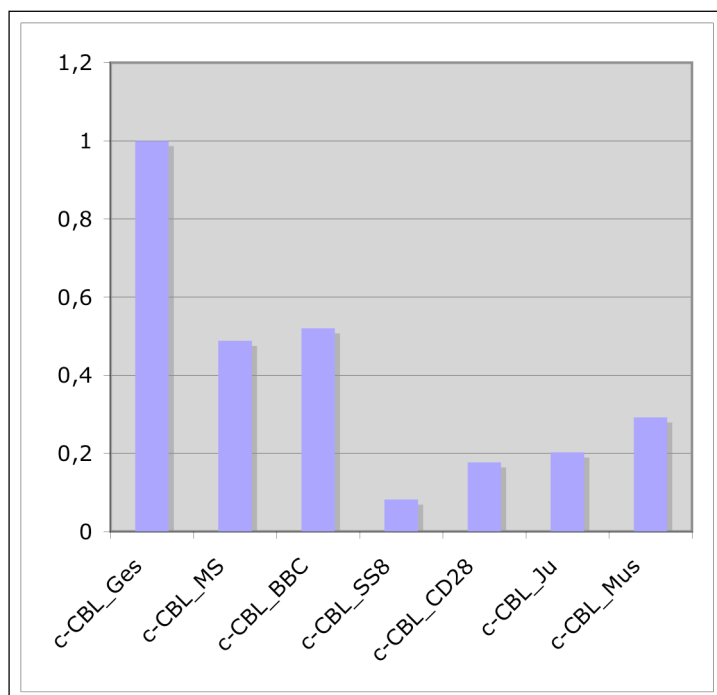


Abbildung 37: Im Schaubild dargestellt ist die rt-PCR-Analyse der relativen Expressionsniveaus von c-Cbl im humanen und murinen System. Vergleichend sind alle Expressionsniveaus von c-Cbl in Relation zum Expressionsniveau in der PBMC-Population der gesunden Kontrollgruppe (c-Cbl _Ges; n=10; Wert=1) aufgetragen.

Die relativen rt-PCR-Analysen von c-Cbl unter unstimulierten Bedingungen zeigten in Relation zu der gesunden Kontrollgruppe (c-Cbl _Ges) ein verhältnismäßig deutlich niedriges Expressionsniveau in den PBMCs der MS-erkrankten Spender sowie in allen untersuchten Modellzellen (c-Cbl _BBC, c-Cbl _SS8, c-Cbl _CD28, c-Cbl _Ju), was ihren Charakter als Modellzellen in diesem Kriterium stützen könnte. Die niedrigen Werte von c-Cbl in allen hier untersuchten spontan proliferierenden Modellzellen und den PBMCs der MS-Kranken unterstreicht die onkogene / proliferationsfördernde Potenz dieses regulierenden Moleküls. Nicht konform mit dieser Überlegung verhält sich die Messung in den murinen Splenozyten (c-Cbl_Mus), wo ebenfalls eine geringere c-Cbl Expression gemessen wurde.

Im human – murinem Vergleich bzw. Vergleich zwischen dem humanen System und dem System der Modellzellen ergibt sich für das Expressionsniveau der TCR-Signaltransduktionsmoleküle ein relativ ähnliches Expressionsniveau in den PBMCs der Kontrollgruppe, der MS-Patienten und den nativen murinen Splenozyten. Des Weiteren ist insgesamt eine verhältnismäßige Überexpression der Signaltransduktionsmoleküle in den autonom proliferierenden Modellzellen zu beobachten. Diese verhältnismäßig höhere basale Expressionsrate der Signaltransduktionsmoleküle der frühen T-Zellaktivierung in den Modellzellen hängt

möglicherweise mit einer grundlegenden Eigenschaft autonom proliferierender Zellen zusammen, Regulatorproteine des Zellzyklus im Sinne der Proliferation überzuexprimieren. Eine Ausnahme bildet das c-Cbl-Molekül. Es zeigt umgekehrt eine höhere Expression in den nativen PBMCs der Kontrollgruppe und ein verhältnismäßig dazu geringeres Expressionsniveau in den PBMCs der MS-Patienten und zugleich der Modellzellen; d.h. die PBMCs der MS-Patienten verhalten sich bezüglich c-Cbl ähnlich dem autonom proliferierenden T-Modellzellklon und stützten damit in diesem Kriterium die postulierte Ähnlichkeit zur Modellzelle.

3.3.2. Kinetische Analysen von Signaltransduktionsmolekülen in murinen Modellzellen und murinen Splenozyten

Die kinetische Analyse des Expressionsniveaus wird im Folgenden für jedes untersuchte Signaltransduktionsmolekül im Einzelnen deskriptiv dargestellt. Die aufgetragenen Expressionswerte nach Stimulation verstehen sich als Faktor der Hochregulation, also als Verhältniswert zum Expressionslevel in den unstimulierten Zellen. Als physiologisches Referenzsystem für die Modellzellen gilt die Population der murinen Splenozyten.

3.3.2.1. Kinetik der LAT-Expression nach Stimulation

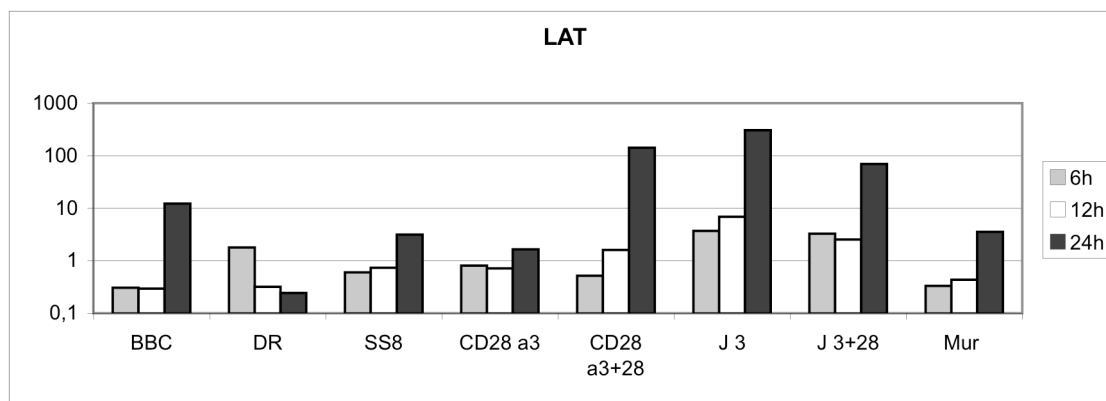


Abbildung 38: Deskriptive Darstellung der Expressionskinetik von LAT nach Stimulation als Faktor der Hochregulation.

Sechs Stunden nach Stimulation *in vitro* mit anti-CD3 repetitive mit anti-CD3 und anti-CD28 wird zunächst eine verminderte Expression von LAT im Vergleich zum Ausgangswert in den Modellzellsystemen der BBC-, BBC-CD28-, SS8- und der murinen Splenozyten gemessen. Betrachtet man dies im Zusammenhang mit den physiologischen intrazellulären Vorgängen nach TCR-Stimulierung, so versteht sich diese verminderte Expression in den ersten Stunden mit der Tatsache, dass die aktivierte T-Zelle in dieser Zeit zur Effektorzelle wird und zunächst mit der Transkription und Translation von primären Effektormolekülen beschäftigt ist wie z.B. die Zytokine oder die Proteinsynthesemaschinerie selbst.

Die Jurkat-Modellzelle bot darin eine Ausnahme, dass sich bereits nach sechs Stunden eine Hochregulation zeigte. Eine Doppelstimulation mit antiCD3+28 ergab für die BBC-CD28-Zellen nach sechs Stunden noch eine zusätzliche verminderte Expression von LAT, als Ausdruck einer Zunahme der primären intrazellulären Effektorfunktionen. Bei der Doppelstimulation der Jurkat-Zellen bestätigte sich dies, nur weniger stark ausgeprägt und nicht im Sinne einer Runterregulation, sondern im Sinne einer weniger starken Hochregulation.

Zwölf Stunden nach Stimulation kam es wieder zu einer Hochregulation von LAT im physiologischen Referenzsystem der murinen Splenozyten, wobei das basale Expressionsniveau noch nicht erreicht wurde. Konkordant zu diesem Merkmal verhielten sich die SS8- und Jurkat Modellzellen. Die BBC- und BBC-CD28 zeigten 12 Stunden nach Einfachstimulation eine weitere Runterregulation. Die Werte bei den Doppelstimulationen verhielten sich uneinheitlich, so exprimierte die BBC-CD28-

Zelle wieder zunehmend LAT, während bei der Jurkat-Zelle LAT nach 12 Stunden noch nicht wieder hochreguliert wurde.

24 Stunden nach Stimulation wurde LAT einheitlich in allen Fällen über sein basales mRNA-Expressionslevel wieder hochreguliert, sowohl bei Modellzellen als auch in den Splenozyten bei weitem. Die Doppelstimulation ergab dabei wieder Unterschiede zwischen der Jurkat- und der BBC-CD28-Modellzelle. Die Zusatzstimulation ergab bei den BBC-CD28-Zellen eine weitere Hochregulation, hatte also einen zusätzlichen positiven Effekt, während dieser bei den Jurkat-Zellen nicht ausgeprägt war.

Im Gegensatz zur Modellstimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 erbrachte die physiologische Modellstimulation mit den MBP-präsentierenden DR-Zellen nach 6 Stunden eine Hochregulation von LAT im Vergleich zum basalen Ausgangswert. Der weitere kinetische Verlauf zeigte sich ebenfalls gegenläufig mit einer weiteren Runterregulation von LAT über 12 bzw. 24 Stunden auf einen Bruchteil des basalen Ausgangswertes. Das aus der Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 bekannte Verhalten konnte hier nicht gezeigt werden. Korrelierend zu einer unter *in vitro* Bedingungen sehr viel schwächer ausgeprägten oder sogar fehlenden Stimulation durch die MBP-präsentierenden DR-Zellen, ergaben sich hier auch viel geringere Werte von sezerniertem IL2 im Überstand im Vergleich mit der antikörpervermittelten Stimulation (Zytokinwerte wurden bestimmt mittels IL2-ELISA; Daten hier nicht gezeigt). Folge einer schwächeren Stimulation ist nach der Arbeitshypothese der „functional avidity maturation“ die hier beobachtete Hochregulation eines integralen Proteins der TCR-Signaltransduktion und frühen Regulators der T-Zellaktivierung als Versuch der über den TCR spezifisch stimulierten T-Zelle das TCR-Signal auf Ebene der TCR-Signaltransduktion selektiv zu verstärken. Gelingt die vollständige Aktivierung dieser T-Zelle nicht, erhält sie nicht den vollen T-Zelleffektorstatus und sie geht in das Stadium der Anergie. Die in diesem Falle beobachtete Runterregulation von LAT im weiteren zeitlichen Verlauf über 12 und 24 Stunden auf einen Bruchteil der basalen LAT-Expressionsrate kann ein starker Hinweis hierfür sein. Die Zelle erfährt durch das quantitative LAT-Defizit eine schwächer ausgebildete Signaltransduktionskaskade und damit eine schwächere Signalübermittlung in den Zellkern und ihre Reizschwelle steigt.

3.3.2.2. Kinetik der Nck-Expression nach Stimulation

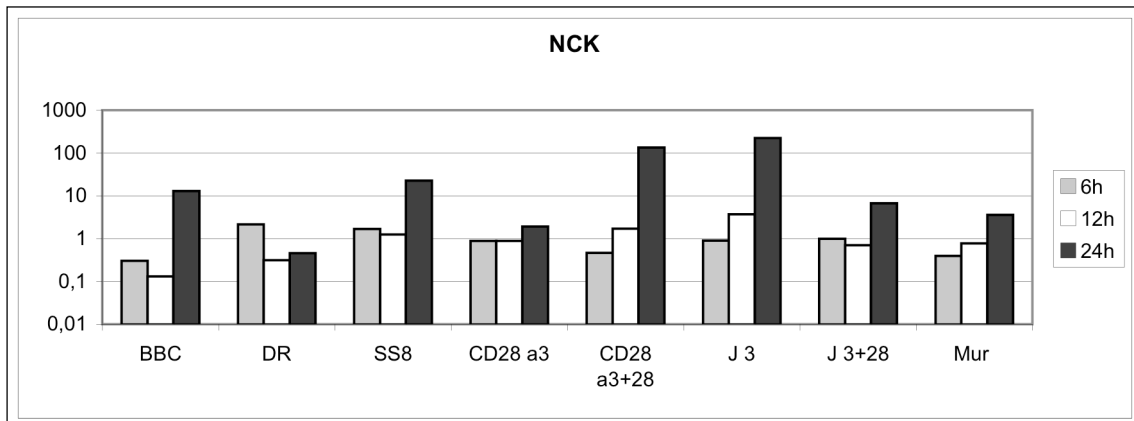


Abbildung 39: Deskriptive Darstellung der Expressionskinetik von Nck nach Stimulation als Faktor der Hochregulation.

Ähnlich zu den Ausführungen zur Expressionskinetik von LAT (unter 3.3.2.1) verhält sich die von Nck. Nennenswerter Unterschied ist, dass sich die Jurkat-Zellen hier nach 6 Stunden analog zu den anderen Modellzellen Nck nicht hoch, sondern, wenn auch nur gering, ebenfalls vermindert exprimiert.

3.3.2.3. Kinetik der Grb2-Expression nach Stimulation

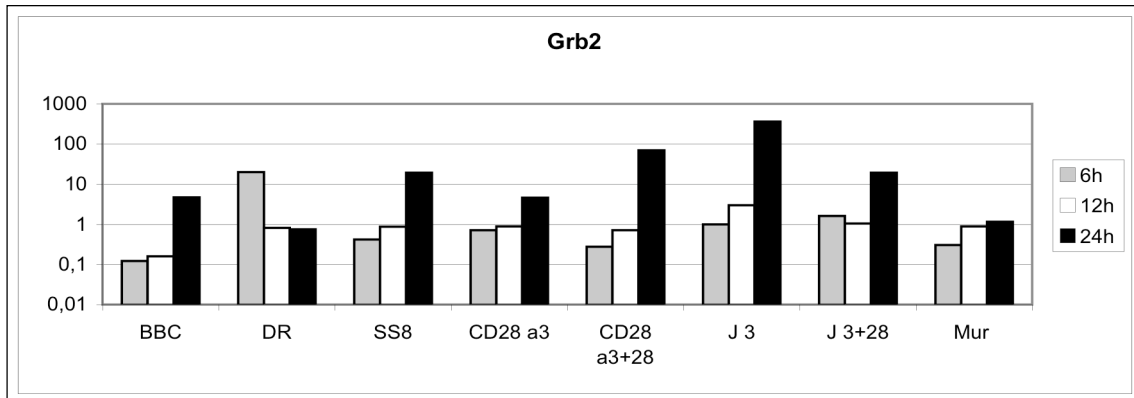


Abbildung 40: Deskriptive Darstellung der Expressionskinetik von Grb2 nach Stimulation als Faktor der Hochregulation.

Im Vergleich zur Expressionskinetik von LAT (beschrieben unter 3.3.2.1) ergeben sich für Grb2 keine nennenswerten Unterschiede.

3.3.2.4. Kinetik der Crk-Expression nach Stimulation

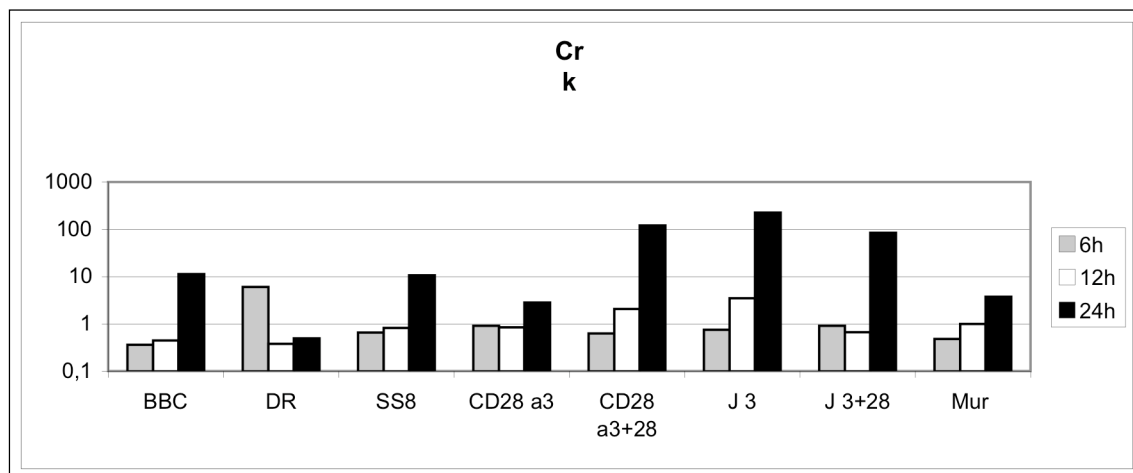


Abbildung 41: Deskriptive Darstellung der Expressionskinetik von Crk nach Stimulation als Faktor der Hochregulation.

Die Expressionskinetik von Crk verhält sich wie bei den Ausführungen zur Expressionskinetik von LAT unter 3.3.2.1 beschrieben. Nennenswerter Unterschied ist, dass sich die Jurkat-Zellen hier nach 6 Stunden, analog zu den anderen Modellzellen, Crk nicht hoch, sondern, wenn auch nur gering, runterregulieren.

3.3.2.5. Kinetik der c-Cbl-Expression nach Stimulation

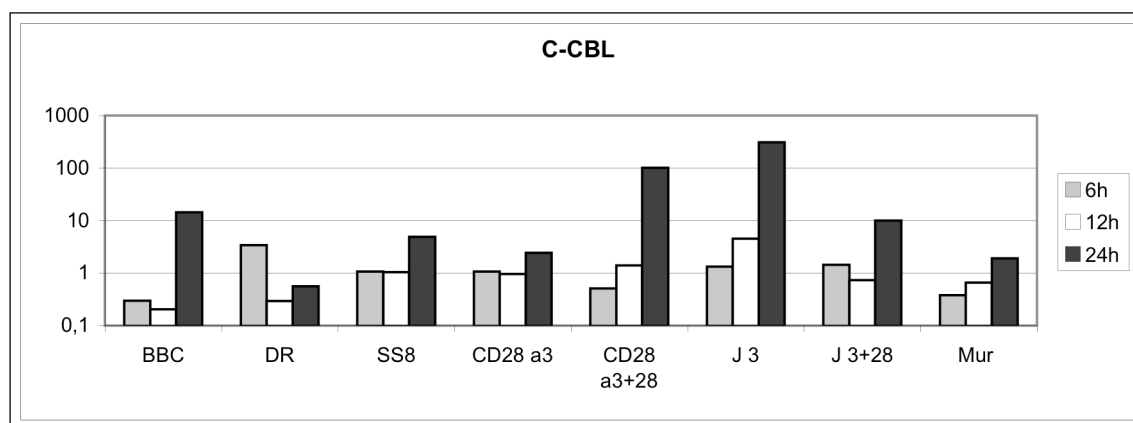


Abbildung 42: Deskriptive Darstellung der Expressionskinetik von c-Cbl nach Stimulation als Faktor der Hochregulation.

Analog zu den Ausführungen zur Expressionskinetik von LAT (unter 3.3.2.1 beschrieben) verhält sich die Expressionskinetik von c-Cbl. Es unterscheidet sich die Kinetik der einzelnen Zellpopulationen lediglich darin, dass die SS8- und BBC-CD28-Zellen nach 6 Stunden bereits den basalen c-Cbl Expressionslevel, wenn auch nur

knapp, wieder überschritten haben. Bemerkenswert ist, dass auch im Falle der schwächer ausfallenden Stimulation mit den DR-Zellen c-Cbl als Negativregulator nach 24 Stunden nicht aktiv hoch, was einer Erhöhung der Reizschwelle bei Anergie entspräche, sondern runterreguliert ist.

4. Diskussion

4.1. Vergleichende Expressionsanalysen von Signaltransduktionsmolekülen humaner T-Zellen

4.1.1. Vergleich der unstimulierten PBMCs

Als molekularen Pathomechanismus für die Entstehung von Autoimmunität wird in einigen Vorarbeiten die funktionelle Beteiligung bestimmter Signaltransduktionsproteine des T-Zellrezeptorsignalweges (Salojin, Zhang et al. 1997; Grunebaum and Roifman 2001; Ohashi 2002) diskutiert. Um analoge Erkenntnisse auf dem Gebiet der T-Zellregulation bei der Entstehung von Multipler Sklerose zu erhalten, wurden zur Analyse entscheidende Proteine der T-Zell-Signaltransduktionskaskade ausgewählt, welche bedeutende positiv oder negativ regulatorische Funktion in der T-Zellaktivierung übernehmen und an entscheidender Position in der Kreuzung intrazellulärer Signalwege der T-Zelle stehen. Solche Faktoren könnten in möglichem Zusammenhang mit der Entwicklung von Autoimmunität stehen, im Sinne einer Dysregulation in der Amplifizierung des TCR-Downstreamsignals mit einer daraus resultierenden gestörten T-Zellhomöostase (Cantrell 1998; Lewis, Broussard et al. 2001; Leo, Wienands et al. 2002). So wurde in humanen T-Zellen gesunder und MS-erkrankter Spender die Expression der Adapterproteine und Negativregulatoren der T-Zellsignaltransduktion LAT, Grb2, Nck, Crk und c-Cbl vor und nach Stimulation mittels rt-PCR analysiert. Die Expressionsniveaus derselben Signaltransduktionsmoleküle in murinen Modellzellsystemen, wie unter 4.2 diskutiert, sollten mit diesen Ergebnissen aus dem Humanbereich verglichen werden. Dazu wurden nach Sequenz-Alignment interspezifische Primer für homologe Sequenzen beider Spezies für die Analysen verwendet (siehe 3.1).

Im direkten Vergleich der Medianwerte der Expressionsniveaus von Signaltransduktionsproteinen nativer, unstimulierter PBMCs von Gesunden und MS-Erkrankten (siehe 3.2.1) zeigte sich mit einer Ausnahme durchschnittlich eine Expressionshöhe der Adaptermoleküle im gleichen Bereich. Die Ausnahme zeigte in den vorliegenden Untersuchungen das c-Cbl-Molekül: es wurde eine geringere Expression dieses Moleküls in der Gruppe der MS-Patienten (Median = 0,3855) gegenüber der Kontrollgruppe (Median = 0,788) gemessen. Die Differenz der

Medianwerte ist deutlich auffallend, aber bei der Untersuchung von nur jeweils 10 Probanden statistisch nicht signifikant (p -Wert $> 0,05$). Der Unterschied in der Expressionshöhe von c-Cbl zwischen Gesunden und MS-Kranken kann in seiner biologischen Funktion als Ubiquitin-Ligase erklärt werden. Als solche leitet c-Cbl den Abbauprozess der Signaltransduktionsmoleküle im Proteasom ein. Eine Unterexpression in der Gruppe der MS-Patienten würde bedeuten, dass ein generell verzögerter Abbau von aktivierenden TCR-Signaltransduktionsmolekülen bestünde. Dies hätte somit eine Überrepräsentation eben dieser Moleküle downstream des TCRs auf Proteinebene zur Folge, auch ohne dass eine Überexpression dieser übrigen Signaltransduktionsmoleküle auf mRNA-Basis mittels rt-PCR-Analysen, wie hier angestrebt, detektierbar wäre. Somit könnte für eine intrazelluläre Amplifizierung des TCR-Signals in der Gruppe der MS-Patienten die zu geringe Expression eines Negativregulators alleine genügen und müsste sich damit nicht zwingend in einer Alteration der mRNA-Expression weiterer Signaltransduktionsproteine bemerkbar machen. Damit konform hat die vorliegende Analyse der übrigen Signaltransduktionsmoleküle auf mRNA-Ebene diesbezüglich auch keine weiteren Unterschiede in den Expressionsniveaus ergeben. Somit kann mit der Unterexpression von c-Cbl ein entscheidender molekularer Pathomechanismus für die Entstehung von Autoimmunität und Multipler Sklerose gesehen werden. Eine Unterexpression von c-Cbl auf mRNA-Ebene bedeutet eine Überrepräsentation von Signaltransduktionsproteinen (bei unauffälligen mRNA-Level) auf zytosolischer Seite des TCRs resultierend in einer pathologischen Amplifizierung des TCR-Signals und damit einer Überstimulation der T-Zelle. Ein möglicher molekularer Pathomechanismus für die Entstehung von MS lässt sich hieraus ableiten.

Konkordant zu dieser Schlussfolgerung konnte auch die Arbeitsgruppe um Naramura M. (Naramura et al. 2002) zeigen, dass die T-Zellen von c-Cbl / Cbl-b Doppel-knock-out-Mäusen infolge einer anti-CD3 Stimulation überreagieren, obwohl der übrige Signalweg des TCRs, wie z.B die Proteinphosphorylierung durch die Thyrosinkinase, dabei nicht allein verstärkt besprochen werden muß. Ihren Beobachtungen zu Folge wird das TCR-Signal hauptsächlich dadurch verstärkt, dass der TCR länger auf der Oberfläche exprimiert wird. Der Abbauvorgang im Lysosom bliebe dabei unverändert.

Ausserdem muß beim Vergleich dieser Ergebnisse mit anderer Literatur zu quantitativen Untersuchungen von regulatorischen Signaltransduktionsmolekülen

immer die molekulare Bezugsebene betrachtet werden. So kann auch argumentiert werden, dass z.B. eine geringe konstitutive mRNA-Expression eines Moleküls (Defizienz der Lck-Expression in T-Lymphozyten von Typ I- Diabetikern, (Nervi, Atlan-Gepner et al. 2000); (Romagnoli et al. 2001) geringere Lck-Expression in MBP-autoreaktiven T-Zellen, (Singh, Wang et al. 1999) bei einer funktionellen Betrachtung auf Proteinebene nicht unbedingt eine reduzierte biologische Funktion bedeuten muss, wenn gleichzeitig ein weiterer negativ regulierender Prozeß auf Proteinebene (krankhaft) zu gering ausgeprägt ist. Die Halbwertszeit eben dieser Signaltransduktionsproteine wäre somit verlängert. Das Reaktionsgleichgewicht in der Sequenz der Transkription und Translation würde sich nach links verlagern. Im Sinne eines solchen Gleichgewichts – keine Stimulationsbedingung des betrachteten Systems vorausgesetzt – hätte dies eine konsekutiv geringere de novo-Synthese der mRNA bei einer zusätzlich nur sehr kurzen intrazellulären Halbwertszeit von mRNA zur Folge. Man würde schlichtweg geringere mRNA Werte bei den o.g. Molekülen messen. Dies konnte auch im Falle des Lck-Moleküls in den PCR-Analysen in der Arbeit von A. Igney (Igney 2007) gezeigt werden. So waren dort die Lck-Expressionsniveaus von MS-Kranken geringer als bei gesunden Probanden. Lck wird aber von c-Cbl – hier im Vergleich derselben untersuchten Individuen ebenfalls vermindert exprimiert – auf Proteinebene negativ reguliert. Dies bedeutet, dass die T-Zelle als Folge eines ausbleibenden Abbaus des Lck-Proteins (c-Cbl-Unterfunktion) auch eine konstitutiv geringere intrazelluläre mRNA-Konzentration zur Leistung der biologischen Funktion benötigt.

Auch wurde eine hohe ZAP-70 Expression in Zusammenhang mit Autoimmunität und MS beobachtet, was eine Reifung von Th1-Zellen bei MBP-autoreaktiven T-Zellen begünstigen soll (Singh, Wang et al. 1999). In der hier zitierten Arbeit konnte dies allerdings nur auf Proteinebene nachgewiesen werden. Da c-Cbl auch dieses Molekül auf Proteinebene negativ reguliert, kann durch eine zu geringe c-Cbl-Expression auch eine erhöhte zytosolische ZAP-70-Proteinkonzentration erklärt werden. Die hier gezeigten Ergebnisse für das c-Cbl-Molekül fügen sich, unter Berücksichtigung des jeweiligen molekularen Bezugssystems, nicht nur in die Reihe der Ergebnisse der hier zitierten zentralen Vorarbeiten zu diesem Thema ein, sondern diese lassen sich auch durch die biologischen Funktion von c-Cbl als Ubiquitin-Ligase und Negativregulator der T-Zellsignaltransduktion direkt erklären, was dieses Molekül für die Zusammenhänge der molekularen Mechanismen um die

Entstehung von Autoimmunität um so interessanter macht.

Um über die biologische Wertigkeit solcher Aussagen zu urteilen, müssen also immer mehrere Ebenen der Regulation miteinander verglichen werden. Ein Minus von zellregulatorischen Elementen auf mRNA-Ebene muss nicht ein Minus auf funktioneller Proteinebene bedeuten, sondern dies kann auch Folge eines interkurrierend ausbleibenden negativ regulierenden Prozesses auf Proteinebene sein. Um dies in dem vorliegenden Falle genauer beleuchten zu können, müssten ergänzende Untersuchungen auf Proteinebene, z.B. durch die Westernblotanalyse angestellt werden.

In der selben Weise müssen in quantifizierenden Vergleichen von positiv und negativ zellregulatorischen Molekülen auch weitere Ebenen der Genregulation, wie z.B. in neueren Ansätzen epigenetische Effekte wie die DNA-Methylierung und das Gene-Silencing ins Zentrum des Interesses gerückt werden, um in ihrer Quantität auch gültige Aussagen im übergeordneten Zusammenhang ihrer biologischen Bedeutungen aufrecht halten zu können. Die Bedeutung der zuletzt genannten epigenetischen Effekte für die Entstehung von Autoimmunität konnte in neueren Arbeiten ebenfalls gezeigt werden (Pruijn 2006). So wird das Gen-Silencing in wichtigem Zusammenhang mit der Vermeidung einer exzessiven Typ I Immunantwort gesehen (Hutchins, Artis et al. 2005). Es wird in der Regulation des adaptiven Immunsystems unter Vermeidung der Entstehung von Autoimmunität diskutiert (Bergstrom and Antia 2006). Die Entstehung von Autoimmunität kann auch durch Dysregulation einer Auswahl von Genen zustande kommen, bei deren Regulation die Familie der RUNX-Transkriptionfaktoren durch ihren Einfluß auf das Chromatingerüst und Gen-Silencing eine zentrale Rolle einnehmen (Bowcock 2005). Epigenetische Mechanismen können ein aggressives Verhalten von Immunzellen beeinflussen und zur Unterbindung peripherer Immuntoleranz führen, was für den molekularen Pathomechanismus der rheumatoiden Arthritis von Bedeutung sein soll (Sanchez-Pernaute, Ospelt et al. 2008).

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass in der Unterexpression von c-Cbl, wie bei der hier vorliegenden Untersuchung eindeutig gemessen – bei n=10 allerdings nicht signifikant – sich weitere wichtige quantitative Unterschiede bei Untersuchungen der TCR-Signaltransduktion erklären lassen. C-Cbl sollte somit als ein möglicherweise bedeutsames Molekül im molekularen Pathomechanismus der MS in weiteren quantitativen Untersuchungen bei einer größeren Fallzahl von MS-

erkrankten und gesunden Probanden im Zentrum des Interesses stehen. Weitere molekulare Bezugsebenen sollten dabei immer gleichzeitig mit berücksichtigt werden.

4.1.2. Vergleich der stimulierten Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Änderungen im Expressionsniveau von entscheidenden Signaltransduktionsproteinen wichtig sind bei der Modulation von T-Zellaktivitäten, insbesondere bei der Ausbildung der immunologischen Synapse und somit bei der Aufrechterhaltung einer Signaltransduktionskaskade, bei der Ausbildung des Effektorstatus einer Immunzelle, bei der Ausbildung eines Anergiestadiums, oder einer Gedächtniszelle. T-Zellen können durch Expressionsveränderungen nach einem Mechanismus, welcher als „functional avidity maturation“ beschrieben wurde, reifen und dadurch eine verstärkte T-Zell-Effektorfunktion generieren (Slifka and Whitton 2001; Whitton and Fujinami 2001; Riley, Mao et al. 2002). Um vergleichende Analysen durchzuführen und die Ergebnisse vor dem Hintergrund des Pathomechanismus der MS zu beleuchten, wurde die mRNA-Expression von Signaltransduktionsmolekülen von PBMCs gesunder und an MS erkrankter Spender unter verschiedenen Stimulationsbedingungen untersucht.

In Zusammenschau der Faktoren der Hochregulation aller hier analysierten Signaltransduktionsmoleküle wurde die deutlichste Hochregulation bei der OKT3-Stimulation der PBMCs der gesunden Kontrollgruppe erreicht. Am zweitbesten schienen die Expressionsniveaus der Signaltransduktionsmoleküle in der gesunden Kontrollgruppe unter KOP-Stimulation hochreguliert zu sein, während die PBMCs der MS-Patienten auf Stimulation nur eine geringere Hoch- oder gar eine Runterregulation zeigten. Insgesamt führte die schwächere *in vitro* Stimulationsmodalität durch KOP zu einer meist geringeren Hochregulation bzw. zur stärksten Runterregulation.

Die anti-CD3-Stimulation zeigte somit *in vitro* einen größeren Effekt als die KOP-Stimulation und die Stimulierbarkeit der PBMCs war bei den Patienten durchweg geringer. Diese Ergebnisse decken sich mit den Werten der quantitativen Untersuchungen derselben Population von A. Igney (Igney, 2007), wo ebenfalls alle Adaptermoleküle bei den MS-Kranken weniger hochregulierbar waren, bzw. eine Runterregulation auf Stimulation (nach 24h) zeigten. Die KOP-Stimulation fiel im Vergleich der beiden Modi dort ebenfalls geringer aus.

Betrachtet man die Veränderung der Expressionsniveaus der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle nach Stimulation im Einzelnen, so lässt sich folgendes diskutieren:

Bei der Untersuchung der Regulationsdynamik des c-Cbl-Moleküls zeigten die linearen Regressionsanalysen für die KOP- und für die OKT3-Stimulation eine umgekehrte Abhängigkeit der Hochregulation in der MS-Gruppe von der Kontrollgruppe; d.h. wo die Kontrollgruppe eine Steigerung der Expression von c-Cbl zeigte, zeigte die MS-Gruppe eine deutliche Runterregulation. Dies unterstreicht den wichtigen Zusammenhang mit der unter 4.1.1 diskutierten biologischen Funktion von c-Cbl als Ubiquitin-Ligase, welche eine Negativregulation des TCR-Signals downstream bewirkt und hier bei der MS-Gruppe anstatt einer Hochregulation nach Stimulation eine Runterregulation erfährt. Eine solche Abhängigkeit der Werte für c-Cbl konnte sonst nur für die Expressionsanalyse von LAT gezeigt werden, welches allerdings eine zentrale hauptsächlich aktivierende Position in der TCR-Signaltransduktionskaskade einnimmt. Crk verhält sich konkordant zu diesen Ergebnissen mit geringer Hochregulation in der Kontrollgruppe und Runterregulation in der MS-Gruppe.

Das LAT-Signaltransduktionsmolekül ist unter allen hier untersuchten Signaltransduktionsmolekülen nach OKT-Stimulation bei der gesunden Kontrollgruppe (Median = 2,737) signifikant am stärksten hochreguliert. Die Expressionshöhe nach KOP-Stimulation ist im gesamten Niveau der untersuchten Moleküle geringer, wobei auch in diesem Fall die gesunde Kontrollgruppe (Median = 1,155) ein höheres Expressionsniveau aufweist, als die Gruppe der MS-Patienten (Median = 0,817). Der Tukey-Kramer-Test ist positiv für den Vergleich dieser Wertepaare zwischen den Stimulationsmodi und die Chi-Quadrat-Näherung des Wilcoxon-Test zeigt eine Signifikanz (p-Wert = 0,0016). Analoges gilt allerdings nicht für den Paarvergleich MS- versus Kontrollgruppe. Der Tukey-Kramer-Test ist negativ für den Vergleich dieser Wertepaare und somit nicht statistisch auffällig. Dieses Ergebnis spiegelt die zentrale Bedeutung dieses wichtigen regulatorischen, lipid raft assoziierten, membranständigen Signaltransduktionsmoleküls in der frühen Phase der T-Zellaktivierung wieder. Eine Hochregulation gerade dieses frühen integralen Signaltransduktionsmoleküls ist für die Ausbildung einer stabilen T-Zelleffektorfunktion auch funktionell am sinnvollsten. Da von allen der hier untersuchten Signaltransduktionsmolekülen das raft-assoziierte LAT am

unmittelbarsten in den frühen Signalprozessen gleich nach Ag-Bindung am TCR integriert ist, kann in einer Hochregulation gerade dieses Moleküls auch eine der stärksten Amplifizierungen des TCR-Signals erreicht werden, unabhängig davon, ob im weiteren Ca^{2+} -abhängige oder Ca^{2+} -unabhängige Signalwege vermehrt beschritten werden. Aber auch in der Zytoskelettorganisation der aktivierten Effektorzelle mit konsekutiver Ausbildung einer Polärität, um die Aufrechterhaltung einer stabilen und spezifischen immunologischen Synapse zu gewährleisten, ist dieses Molekül als eines der proximalsten Signal- und Adaptermoleküle von zentraler, regulatorischer Bedeutung (Wonerow and Watson 2001).

LAT bindet als unmittelbar nachgeschalteten Schritt in der TCR-Signaltransduktion Grb2 und $\text{PLC}\gamma$ (Zhang, Triple et al. 2000), wobei Grb2 das am stärksten hochregulierte Adaptermolekül in der hier untersuchten MS-Gruppe (Abbildung 29) ist, und die $\text{PLC}\gamma$ in den Untersuchungen von A. Igney 2007 (Igney, 2007) ebenfalls das am stärksten hochregulierte Signaltransduktionsmolekül in der MS-Gruppe war. Dies war besonders auffällig, weil alle anderen untersuchten Moleküle eine verminderte Expression zeigen.

Zusammenfassend legen diese Ergebnisse nahe, dass eine quantitative Amplifizierung der Signaltransduktionskaskade auf Höhe gerade der frühen „Downstream-Events“ (LAT, Grb2, $\text{PLC}\gamma$) wohl eine der effizientesten Möglichkeiten darstellt, das TCR-Signal zu verstärken und eine immunologische Synapse funktionell zu stärken. Unsere Ergebnisse bestätigen die zugrunde liegende Arbeitshypothese einer „Functional Avidity Maturation“ (Slifka and Whitton 2001) der aktivierten T-Zelle. Eine weitere Auffälligkeit in den Messungen erhärtet einen weiteren Teilaspekt dieser Hypothese: so wurden die stärksten Hochregulationen nach T-Zellstimulation unter der *in vitro* starken anti-CD3-Stimulation erzielt, während es bei der schwächeren KOP-Stimulation *in vitro* zur Runterregulation der Signaltransduktionsmoleküle kommt. Führt also die Stimulation einer T-Zelle nicht zur vollständigen Aktivierung (d.h. auch Hochregulation der Signaltransduktionsmoleküle), hat dies in der Runterregulation der Signaltransduktionsmoleküle ein intrazelluläres Abschwächen des TCR-Signals und damit die Induktion eines Anergiestadiums der Effektorzelle zur Folge. Das Prinzip der „Functional Avidity Maturation“ in der T-Zellaktivierung zeigt sich in den vorliegenden Ergebnissen somit ebenfalls bestätigt. Ergänzend und korrelierend mit diesen Daten, zeigten Zytokinreadouts mittels IL2-ELISA unter den verschiedenen

Stimulationsbedingungen, dass die KOP-Stimulation *in vitro* schwächer ausfällt als die anti-CD3-Stimulation (Daten nicht gezeigt).

Ebenfalls diskutiert werden muß, ob die Hochregulation bei der MS-Patientengruppe insgesamt deshalb weniger stark ausgeprägt ist, weil die Signaltransduktionskaskade einer frisch isolierten T-Zelle eines MS-erkrankten Spenders bereits hochreguliert ist und die Signalproteine deshalb keiner weiteren Transkription bedürfen, oder ob eben diese autoreaktiven T-Zellen sich zwischen einem MS-Krankheitsschub in einem Stadium der Anergie befinden und deshalb auf Stimulation ihre Signaltransduktionskaskade runterregulieren. Eine weitere wichtige Erklärungsmöglichkeit wäre die Behandlung der MS-kranken Spender mit Immunsuppressiva, welche in den T-Zellen eine Hochregulation der Signaltransduktionsmoleküle verhindern.

Grundsätzlich differente Pathomechanismen bei der Entstehung von MS machen die kleine Gruppe an untersuchten Spendern inhomogen und erklären ggf. die fehlende Signifikanz und komplizieren diesen Vergleich zusätzlich (Lucchinetti, Bruck et al. 2000).

Die Wahl der geeigneten Methode, der real-time RT-PCR, zur Untersuchung von autoreaktiven humanen T-Zellen gemäß der Fragestellung, ist ebenfalls zu diskutieren. Die Vorteile liegen in der hohen Sensitivität dieser Methode und einer niedrigen Variationsbreite innerhalb eines Versuchs; Genexpressionsprofile können aus einem Minimum an Zellen bestimmt werden und die Spezifität der Produkte kann durch Analyse der Schmelzkurven gewährleistet werden. Aber ob die Anzahl potentiell vorhandener autoreaktiver T-Zellen MS-kranker Spender im Peripherblut, ggf. sogar zwischen zwei Krankheitsschüben, ausreicht, solche Untersuchungen anzustellen bleibt fraglich. Untersuchungen weiterer Spezimen, z.B. frisch punktierter Liquorproben im aktiven Krankheitsschub, sind zur Klärung dieser Frage anzustellen.

4.2. Vergleichende Expressionsanalysen von Signaltransduktionsmolekülen in Modellen zellulärer Immunität und Zellen aus dem humanen T-Zellsystem

Um geeignete *in vitro* Versuche zur T-Zellsignaltransduktion und Inhibition derselben mit dem Ziel der Entwicklung zielgerichteter therapierelevanter Moleküle reproduzierbar, möglichst zeitlich unabhängig und unabhängig von der Verfügbarkeit verschiedener Populationen humaner Spenderzellen (MS-Erkrankte mit oder ohne Krankheitsschub, differente zugrunde liegende Pathomechanismen) durchführen zu können, werden Modelle zellulärer Autoimmunität benötigt, welche diese genannten Vorteile in sich vereinen. Für eine möglichst naturgetreue Abbildung der T-Zellaktivierung muß eine natürliche MHC-TCR- Interaktion gewährleistet sein. Die Modellzelle muß die relevanten kostimulatorischen Moleküle aufweisen, um eine Differenzierung zwischen den Beiträgen des TCR und der kostimulatorischen Signalwege in der T-Zellaktivierung zu ermöglichen. Dabei soll sie alle dafür benötigten Oberflächenrezeptoren über möglichst viele Passagezyklen *in vitro* stabil exprimieren. Die murine BBC-Modellzelle (CD4⁺, im Falle der BBC-Zellen ist der TCR spezifisch für MBP139-51, im Falle der SS8-Zellen MBP 80-99 spezifisch) sowie die zusätzlich mit einem humanen CD28-Korezeptor transfizierte BBC-CD28-Zelle dienten in den Untersuchungen dieser Arbeit als neues Modellsystem für zelluläre Autoimmunität. Ihr Signaltransduktionsverhalten sollte näher charakterisiert und Ähnlichkeiten in ihrer Aktivierung zum humanen T-Zellsystem aufgezeigt werden. Dabei wurde die Regulationsdynamik der in den humanen T-Zellen bereits untersuchten Signaltransduktionsproteinen nach T-Zellaktivierung auf Basis ihrer mRNA-Expression mittels rt-PCR-Analysen und interspezifischem Primerdesign kinetisch untersucht. Sollte sich diese wie von (Slifka and Whitton 2001) und unter 4.1.2 beschriebenen Charakteristika auch für die Modellzellen ergeben, so spräche dies für eine entsprechend physiologisch ablaufende Regulation der Signaltransduktion und damit für ihren gerechtfertigten Einsatz in weiteren Untersuchungen, trotz der notwendigen Interaktion von humanen und murinen Signaltransduktionsmolekülen. Für den quantitativen Vergleich der ausgewählten Signaltransduktionsproteine wurde deshalb die Genexpression in unstimulierten Modellzellen mit der etablierten Modellzelle Jurkat verglichen.

Im Vergleich zwischen humanem System und dem System der murinen Modellzellen ergibt sich ein vergleichbares Niveau für die mRNA-Expression der hier untersuchten TCR-Signaltransduktionsmoleküle in den PBMCs der Kontrollgruppe, der MS-Patienten und der nativen murinen Splenozyten. Des Weiteren ist eine verhältnismäßige Überexpression der Signaltransduktionsmoleküle in den Modellzellen zu beobachten. Eine Ausnahme bildet das c-Cbl-Molekül. Dies zeigt umgekehrt eine höhere Expression in den nativen PBMCs der Kontrollgruppe und ein verhältnismäßig dazu geringeres Expressionsniveau in den PBMCs der MS-Patienten und zugleich der Modellzellen; d.h. die PBMCs der MS-Patienten verhalten sich bezüglich c-Cbl ähnlich dem autonom proliferierenden T-Zell Modell. Die Übereinstimmung in diesem Kriterium stützt die postulierte Ähnlichkeit der Modellzelle zur autoreaktiven humanen T-Zelle.

Insgesamt fällt beim Vergleich der Modellzellen mit den humanen T-Zellen auf, dass bei den Modellen die basalen Expressionsraten aller hier untersuchten Signaltransduktionsmoleküle mit Ausnahme von c-Cbl deutlich erhöht sind. Die Überexpression der übrigen Signaltransduktionsproteine und die gleichzeitige Unterexpression des Onkoproteins und Negativregulator der T-Zellsignaltransduktion, c-Cbl, spiegelt die Abstammung der Modellzellen aus einem autonom proliferierenden murinen Thymomklon wieder. Vor diesem Hintergrund lässt sich verstehen, dass für diese Modellzellen die Eigenschaft der Überexpression von Proteinen, welche proliferationsfördernd in den Zellzyklus eingreifen, charakteristisch ist. Alle intrazellulären Moleküle, welche auf die Zellproliferation einen positiven Einfluß nehmen – inklusive die TCR-Signaltransduktionsmoleküle – zeigen sich in erhöhten Werten exprimiert, sodass für den Vergleich der Zelle für ihren Nutzen als Modellsystem hierin eine erhöhte Reagibilität bezüglich ihrer Effektorfunktionen abgeleitet werden kann. Darin besteht ein Vorteil für ihren Einsatz in weiteren Versuchen zur Untersuchung der Signaltransduktion als autoreaktive Modellzelle. V.a. von Interesse sind weitere Versuche mit selektiven molekularen Inhibitoren und deren Einfluß auf die Zellaktivierung.

Die T-Zellaktivierung funktioniert über die anti-CD3-Stimulation, über die TCR-Stimulation und über die Kostimulation von kotransfiziertem hCD28, welche ebenfalls additiven Effekt auf die TCR-Signaltransduktion zeigt. Dies bestätigte sich in einer erhöhten IL2-Sekretion in quantitativen Zytokinbestimmungen aus den Überständen

(diese Ergebnisse hier nicht gezeigt) und in der unter 3.3.2 gezeigten Alteration des kinetischen Verlaufes der Expression von Signaltransduktionsmolekülen.

Im Falle der physiologischen Modellstimulation mit den MBP₁₃₉₋₁₅₁-präsentierenden DR-Zellen ergab sich bereits nach 6 Stunden eine Hochregulation der Signaltransduktionsmoleküle, wie unter 3.3.2 beschrieben, im Vergleich zum basalen Ausgangswert. Der weitere kinetische Verlauf zeigte sich ebenfalls gegenläufig mit einer weiteren Runterregulation von LAT über 12 und 24 Stunden auf einen Bruchteil des basalen Ausgangswertes. Möglicherweise verantwortlich für dieses schwächere TCR-Signal ist, dass die zytosolischen humanen TCR-Rezeptorketten tatsächlich nicht optimal mit den intrazellulären murinen Molekülen der Signaltransduktion interagieren, da beispielsweise die aktivierenden Kinasen mit ihren Adaptermolekülen über entsprechende homologe Regionen binden und darüber erst transphosphorylieren und damit aktiviert werden können. Die human-murine Chimäre wäre damit nicht funktionell in der Signaltransduktion über die ζ -Ketten des TCR nach intrazellulär. Um dies *in situ* genauer nachzuvollziehen, müsste der eindeutige Nachweis der Kolo-kalisation der humanen ζ -Ketten des TCR mit dem murinen ZAP-70 Molekül über immunhistochemische Untersuchungen erbracht werden. Ausserdem entbehrt dieser Stimulationsmodus einer suffizienten Kostimulation, sodass nicht auszuschließen ist, dass die Modellzelle über den einen oder über den anderen Mechanismus (TCR oder Kostimulation) in ein Stadium der in Anergie geht, d.h. wie hier gezeigt, die Signaltransduktionsmoleküle 24 Stunden nach Antigenexposition runterreguliert.

Bei den Stimulationsversuchen mit anti-CD3 und anti-CD28 zeigten die Modellzellen (ausgenommen die SS8-Zellen bei Nck und c-Cbl) zu den Stimulationszeitpunkten 6 bzw. 12 Stunden eine geringere Expression von Signaltransduktionsmolekülen als vor der Stimulation. Dies wird auch in der Literatur bei humanen T-Zellen beschrieben (Diehn, Alizadeh et al. 2002). Dieses Merkmal kann durch den zeitlichen Ablauf der unterschiedlichen Effektorfunktionen einer regulatorischen T-Zelle bedingt sein. Ihre Hauptaufgabe ist u.a. die Produktion von Zytokinen, sodass nach erfolgreicher Aktivierung alle intrazellulären Proteinsynthesekapazitäten eben darauf ausgelegt sein sollten, um keine Zeit gegenüber einem schädlichen Agens zu verlieren. Erst im weiteren Verlauf und nach anhaltender Stimulation wird auch wichtig, die Signaltransduktionskaskade weiter auszubauen und sie vielleicht sogar

zu modifizieren, um sie feiner auf die jeweiligen Bedürfnisse abzustimmen und sekundäre Effektorfunktionen (Reorganisation des Zytoskeletts, Zellpolarität, Migration, Gedächtnisfunktion) zu erfüllen. Ausnahme in diesem Merkmal bilden die Jurkat-Zellen. Möglicherweise besitzen diese eine höhere Sensitivität bezüglich der anti-CD3-vermittelten Signaltransduktion als humane T- Zellen und als die BBC-Modellzellen. Dies wird auch in anderen Arbeiten beschrieben (Shan, Ledbetter et al. 2000).

Zahlreiche Studien belegen die Schlüsselrolle des Korezeptors CD28 bei der Aktivierung und Regulation von T-Zell-Aktivitäten und Expressionsveränderungen (Frauwirth and Thompson 2002). Es konnte gezeigt werden, dass für das Durchbrechen der Selbsttoleranz und Entstehung von Autoimmunität eine optimale Kostimulation erforderlich ist (Pollard, Arnush et al. 2004). So zeigte sich bei dem neuen Modellsystem der BBC-CD28 Zellen deutlicher als bei den bereits etablierten Jurkat-Modellzellen eine höhere Genexpressionen der Signaltransduktionsmoleküle nach 24 Stunden unter der antiCD3-/antiCD28-Doppelstimulation. Verantwortlich hierfür könnten andere Affinitäten zwischen den Signaltransduktionsmolekülen in dem neuen chimären Modellsystem sein als in der Jurkat-Zelle. Dagegen zeigte sich (Riley, Mao et al. 2002) die anti-CD28-Stimulation nur diskret expressionserhöhend. Bei der Interpretation der Daten aus dem chimären Modellzellensystem müssen diese Probleme stets mit berücksichtigt werden.

Dass die Modellzellen einer suffizienten Kostimulation bedürfen, zeigten am deutlichsten die Versuche der physiologischen Stimulation der BBC-Zellen mit den MBP-beladenen DR-Zellen. Die alleinige Stimulation führte nach kurzzeitiger Hochregulation und Verstärkung des TCR-Signals, nach 12 bzw. 24 Stunden zur Herunterregulation der Expression der untersuchten Signaltransduktionsmoleküle. Ein anergieartiger Zustand der Zellen ist aufgrund dieser intrazellulären Reizschwellerhöhung für weitere Stimulationen über den TCR anzunehmen.

Berücksichtigt man die anzunehmenden Schwierigkeiten in der Molekülinteraktion zwischen den zytosolischen, humanen TCR-Ketten, Adaptermolekülen und Proteinkinasen der intrazellulären murinen Signaltransduktionskaskade können die BBC-, SS8-, und BBC-CD28-Zellen also als Modell für die Signaltransduktion von autoreaktiven T-Zellen dienen. Um die Ähnlichkeit der Stimulationsbedingungen der Modellzellen *in vitro* gegenüber einer physiologischen Stimulation zu optimieren, könnten zusätzliche humane Kostimulationsmoleküle transfiziert werden.

Noch bleibt ungeklärt, inwiefern Signaltransduktionsmoleküle zur Entwicklung von Autoimmunität prädisponieren. Ein möglicher Hinweis, welcher sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergibt, könnten weitere Untersuchungen zum LAT-Molekül und v. a. zum c-Cbl-Molekül ergeben. Ersteres, weil hier gezeigt werden konnte, dass die quantitativen Veränderungen bezüglich dieses Moleküls nach anti-CD3-Stimulation sowohl bei Gesunden sowie MS-Kranken besonders hoch und damit dieses Molekül ein entscheidender Regulator der TCR-Signaltransduktion sein kann und letzteres, weil bezüglich dieses Negativregulators der TCR-Signaltransduktion eine Unterexpression in der Gruppe der MS-Kranken gezeigt werden konnte. Ließe sich dieselbe Erniedrigung des c-Cbl-Expressionslevels in einer größeren Anzahl von MS-Kranken nachweisen, könnten sich daraus mögliche prognostische Faktoren ergeben, oder es könnte sich ein wesentliches therapierrelevantes Zielmolekül daraus ableiten lassen.

5. Zusammenfassung

In der Immunmodulation der T-Zelle spielen die Moleküle der T-Zell-Signaltransduktion eine zentrale Rolle. Kommt es zu Störungen auf diesem Niveau kann dies die Entstehung von Autoimmunität begünstigen. Diesbezüglich wurden hier mittels rt-PCR-Analysen und interspezifischem Primerdesign die Genexpression von frühen, zentralen Komponenten der T-Zell-Signaltransduktion untersucht. Die mRNA-Expressionsniveaus von LAT, Nck, Grb2, Crk und c-Cbl wurden in CD4⁺ T-Lymphozyten von Patienten, welche an Multipler Sklerose Erkrankten (n=10), mit denen einer gesunden Kontrollgruppe (n=10) vor und nach Stimulation verglichen.

Im Vergleich beider Gruppen ergibt sich, mit Ausnahme von c-Cbl, eine durchschnittlich ähnliche basale Genexpression der Signaltransduktionsmoleküle. Im Falle von c-Cbl lässt sich eine auffallend geringere Expression dieses Moleküls in der Gruppe der MS-Patienten beobachten.

Nach Stimulation zeigt die vergleichende Genexpressionsanalyse der Signaltransduktionsmoleküle in den PBMCs der MS-Patienten eine geringere Hoch- bzw. Runterregulation, worin sich ein mögliches Stadium der Anergie in den untersuchten Zellpopulationen zwischen den Schüben einer MS ableiten lassen kann. Bei der Untersuchung der Regulationsdynamik im Einzelnen zeigt LAT die stärkste Hochregulation, was die zentrale regulatorische Funktion dieses Adapters in der frühen TCR-Signaltransduktion unterstreicht.

Zwei Transfektanten (58 $\alpha\beta$ -T-Lymphomzellen aus der Maus), die einen transgenen humanen TCR aus T-Zellklonen von MS Patienten bekannter Spezifität (MBP80-99 bzw. MBP139-151) exprimieren, ermöglichen weitere stimulationsabhängige Signaltransduktionsanalysen. Diese Modellzellen zeigen eine vergleichbare basale Transkriptionsaktivität wie humane T-Zell-Lymphom-Zellen (Jurkat-Zellen), weisen aber eine deutlich erhöhte basale Expression im Vergleich zur humanen Kontrollgruppe oder murinen Splenozyten auf. Auffallende Ähnlichkeit in ihrer verhältnismäßigen Unterexpression von c-Cbl zeigen die Modellzellen mit den PBMCs der MS-Patienten. Nach antikörpervermittelter Stimulation (anti-CD3 +/- anti-CD28) zeigen sie in der Effektorphase zunächst eine Runterregulation und bei der Ausbildung einer „Functional Avidity Maturation“ bzw. einer Gedächtnisfunktion eine deutliche Hochregulation der Signaltransduktionsmoleküle. Die anti-CD28-Stimulation ergibt dabei einen additiven Effekt und unterstreicht die Wichtigkeit einer

Kostimulation in diesem Prozess. Die Stimulation mittels MBP-Präsentation ohne Kostimulation ergibt eine dazu gegenläufige Kinetik, nämlich den Versuch, ein schwaches Rezeptorsignal mittels Hochregulation zunächst quantitativ zu verstärken, um nach Ausbleiben einer suffizienten immunologischen Synapse durch die Runterregulation der Signaltransduktionsmoleküle in Anergie zu gehen.

Physiologische Aspekte, aber auch modellzellbedingte Besonderheiten können gezeigt werden, und die besondere Rolle zweier zukünftig klinisch interessanter Moleküle der T-Zellsignaltransduktion, LAT und c-Cbl, werden dadurch unterstrichen.

6. Literaturverzeichnis

- Abraham, R. T. and A. Weiss (2004). "Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm." Nat Rev Immunol **4**(4): 301-8.
- Appleby, M. W., J. A. Gross, et al. (1992). "Defective T cell receptor signaling in mice lacking the thymic isoform of p59fyn." Cell **70**(5): 751-63.
- Bachmaier, K., C. Krawczyk, et al. (2000). "Negative regulation of lymphocyte activation and autoimmunity by the molecular adaptor Cbl-b." Nature **403**(6766): 211-6.
- Baier-Bitterlich, G., F. Uberall, et al. (1996). "Protein kinase C-theta isoenzyme selective stimulation of the transcription factor complex AP-1 in T lymphocytes." Mol Cell Biol **16**(4): 1842-50.
- Balagopalan, L., V. A. Barr, et al. (2007). "c-Cbl-mediated regulation of LAT-nucleated signaling complexes." Mol Cell Biol **27**(24): 8622-36.
- Beier, K. C., A. Hutloff, et al. (2000). "Induction, binding specificity and function of human ICOS." Eur J Immunol **30**(12): 3707-17.
- Bergstrom, C. T. and R. Antia (2006). "How do adaptive immune systems control pathogens while avoiding autoimmunity?" Trends Ecol Evol **21**(1): 22-8.
- Bielekova, B., B. Goodwin, et al. (2000). "Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand." Nat Med **6**(10): 1167-75.
- Bowcock, A. M. (2005). "The genetics of psoriasis and autoimmunity." Annu Rev Genomics Hum Genet **6**: 93-122.
- Brex, P. A., O. Ciccarelli, et al. (2002). "A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis." N Engl J Med **346**(3): 158-64.
- Buday, L., L. Wunderlich, et al. (2002). "The Nck family of adapter proteins: regulators of actin cytoskeleton." Cell Signal **14**(9): 723-31.
- Bunnell, S. C., D. I. Hong, et al. (2002). "T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies." J Cell Biol **158**(7): 1263-75.
- Cantrell, D. (1998). "Lymphocyte signalling: a coordinating role for Vav?" Curr Biol **8**(15): R535-8.
- Cedeno, S., D. F. Cifarelli, et al. (2003). "Defective activity of ERK-1 and ERK-2 mitogen-activated protein kinases in peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus: potential role of altered coupling of Ras guanine nucleotide exchange factor hSos to adapter protein Grb2 in lupus T cells." Clin Immunol **106**(1): 41-9.
- Chiang, Y. J., H. K. Kole, et al. (2000). "Cbl-b regulates the CD28 dependence of T-cell activation." Nature **403**(6766): 216-20.
- Coyle, A. J., S. Lehar, et al. (2000). "The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses." Immunity **13**(1): 95-105.
- Cronin, S. J. and J. M. Penninger (2007). "From T-cell activation signals to signaling control of anti-cancer immunity." Immunol Rev **220**: 151-68.
- Diehn, M., A. A. Alizadeh, et al. (2002). "Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11796-801.
- Dustin, M. L. and A. C. Chan (2000). "Signaling takes shape in the immune system." Cell **103**(2): 283-94.

- Ebers, G. C., A. D. Sadovnick, et al. (1995). "A genetic basis for familial aggregation in multiple sclerosis. Canadian Collaborative Study Group." Nature **377**(6545): 150-1.
- Feller, S. M., R. Ren, et al. (1994). "SH2 and SH3 domains as molecular adhesives: the interactions of Crk and Abl." Trends Biochem Sci **19**(11): 453-8.
- Feske, S., J. Giltzane, et al. (2001). "Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes." Nat Immunol **2**(4): 316-24.
- Frauwirth, K. A. and C. B. Thompson (2002). "Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation." J Clin Invest **109**(3): 295-9.
- Grunebaum, E. and C. M. Roifman (2001). "Signal-transduction defects in T cells." Clin Rev Allergy Immunol **20**(1): 27-42.
- Haines, J. L., M. Ter-Minassian, et al. (1996). "A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group." Nat Genet **13**(4): 469-71.
- Hartung, H. P. and B. C. Kieseier (2000). "The role of matrix metalloproteinases in autoimmune damage to the central and peripheral nervous system." J Neuroimmunol **107**(2): 140-7.
- Hohlfeld, R. (1997). "Biotechnological agents for the immunotherapy of multiple sclerosis. Principles, problems and perspectives." Brain **120 (Pt 5)**: 865-916.
- Huang, X. and W. Miller (1991). "A time-efficient linear-space local similarity algorithm Source." Advances in Applied Mathematics **12**(3): 337-357.
- Hutchins, A. S., D. Artis, et al. (2005). "Cutting edge: a critical role for gene silencing in preventing excessive type 1 immunity." J Immunol **175**(9): 5606-10.
- Hutloff, A., A. M. Dittrich, et al. (1999). "ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28." Nature **397**(6716): 263-6.
- Igney, A (2007). Calcium-abhängige T-Zelle-Signaltransduktion und Multiple Sklerose: Vergleichende Analysen in humanen T-Zellen und Modellen für zelluläre Immunität, Promotionsarbeit
- Janeway, C. A., P. Travers, et al. (1997). Immunologie. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
- Janeway, C. A., P. Travers, et al. (2001). Immunobiology. The immune system in health and disease. London, Garland Publishing Inc.
- King, P. D. (2004). "Lupus-like autoimmunity caused by defects in T-cell signal transduction." Curr Opin Investig Drugs **5**(5): 517-23.
- Kitaura, Y., I. K. Jang, et al. (2007). "Control of the B cell-intrinsic tolerance programs by ubiquitin ligases Cbl and Cbl-b." Immunity **26**(5): 567-78.
- Kivisakk, P., C. Trebst, et al. (2001). "Chemokine-based therapies for MS: how do we get there from here?" Trends Immunol **22**(11): 591-3.
- Kliche, S., J. A. Lindquist, et al. (2004). "Transmembrane adapters: structure, biochemistry and biology." Semin Immunol **16**(6): 367-77.
- Koretzky, G. A. and P. S. Myung (2001). "Positive and negative regulation of T-cell activation by adaptor proteins." Nat Rev Immunol **1**(2): 95-107.
- Kostianovsky, A. M., L. M. Maier, et al. (2007). "Up-regulation of gene related to anergy in lymphocytes is associated with Notch-mediated human T cell suppression." J Immunol **178**(10): 6158-63.
- Krogsgaard, M., K. W. Wucherpfennig, et al. (2000). "Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex." J Exp Med **191**(8): 1395-412.
- Kuchroo, V. K., A. C. Anderson, et al. (2002). "T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens

- in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire." Annu Rev Immunol **20**: 101-23.
- Kuokkanen, S., M. Gschwend, et al. (1997). "Genomewide scan of multiple sclerosis in Finnish multiplex families." Am J Hum Genet **61**(6): 1379-87.
- Kurtzke, J. F. (1980). "Epidemiologic contributions to multiple sclerosis: an overview." Neurology **30**(7 Pt 2): 61-79.
- Lassmann, H. (1998). Pathology of Multiple Sclerosis. Multiple Sclerosis. McAlpin. London, Churchurch Livinstone: 323-358.
- Lassmann, H. (2002). "Mechanisms of demyelination and tissue destruction in multiple sclerosis." Clin Neurol Neurosurg **104**(3): 168-71.
- Leo, A., J. Wienands, et al. (2002). "Adapters in lymphocyte signaling." J Clin Invest **109**(3): 301-9.
- Letourneur, F. and B. Malissen (1989). "Derivation of a T cell hybridoma variant deprived of functional T cell receptor alpha and beta chain transcripts reveals a nonfunctional alpha-mRNA of BW5147 origin." Eur J Immunol **19**(12): 2269-74.
- Lewis, C. M., C. Broussard, et al. (2001). "Tec kinases: modulators of lymphocyte signaling and development." Curr Opin Immunol **13**(3): 317-25.
- Liu, S. K., C. A. Smith, et al. (2000). "The adaptor protein Gads (Grb2-related adaptor downstream of Shc) is implicated in coupling hemopoietic progenitor kinase-1 to the activated TCR." J Immunol **165**(3): 1417-26.
- Loeser, S. and J. M. Penninger (2007). "The ubiquitin E3 ligase Cbl-b in T cells tolerance and tumor immunity." Cell Cycle **6**(20): 2478-85.
- Lopez-Rodriguez, C., J. Aramburu, et al. (2001). "Bridging the NFAT and NF-kappaB families: NFAT5 dimerization regulates cytokine gene transcription in response to osmotic stress." Immunity **15**(1): 47-58.
- Lublin, F. D. and S. C. Reingold (1996). "Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis." Neurology **46**(4): 907-11.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (2001). "Multiple sclerosis: recent developments in neuropathology, pathogenesis, magnetic resonance imaging studies and treatment." Curr Opin Neurol **14**(3): 259-69.
- Lucchinetti, C., W. Bruck, et al. (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-17.
- Lucchinetti, C. F., W. Bruck, et al. (1996). "Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis." Brain Pathol **6**(3): 259-74.
- Macian, F., C. Lopez-Rodriguez, et al. (2001). "Partners in transcription: NFAT and AP-1." Oncogene **20**(19): 2476-89.
- Maehama, T. and J. E. Dixon (1999). "PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase." Trends Cell Biol **9**(4): 125-8.
- Mages, H. W., A. Hutloff, et al. (2000). "Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand." Eur J Immunol **30**(4): 1040-7.
- Mankai, A., J. R. Eveillard, et al. (2007). "Is the c-Cbl proto-oncogene involved in chronic lymphocytic leukemia?" Ann N Y Acad Sci **1107**: 193-205.
- Martin, R., H. F. McFarland, et al. (1992). "Immunological aspects of demyelinating diseases." Annu Rev Immunol **10**: 153-87.
- Martin, R., H. F. McFarland (2007). "Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity." Nat Immunol **8**: 913-19.

- Martinez-Caceres, E. M., C. Espejo, et al. (2002). "Expression of chemokine receptors in the different clinical forms of multiple sclerosis." Mult Scler **8**(5): 390-5.
- Merrill, J. E. (1992). "Proinflammatory and antiinflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome." J Immunother (1991) **12**(3): 167-70.
- Monney, L., C. A. Sabatos, et al. (2002). "Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease." Nature **415**(6871): 536-41.
- Mustelin, T., R. T. Abraham, et al. (2002). "Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling." Front Biosci **7**: d918-69.
- Narmura, M., I. K. Jang (2002). "c-Cbl and cbl-b regulate T cell responsiveness by promoting ligand-induced TCR down-modulation." Nat Immunol **3**(12): 1192-9.
- Nervi, S., C. Atlan-Gepner, et al. (2000). "Specific deficiency of p56lck expression in T lymphocytes from type 1 diabetic patients." J Immunol **165**(10): 5874-83.
- Noseworthy, J. H. (1999). "Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis." Nature **399**(6738 Suppl): A40-7.
- Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, et al. (2000). "Multiple sclerosis." N Engl J Med **343**(13): 938-52.
- Nossal, G. J. (2001). "A purgative mastery." Nature **412**(6848): 685-6.
- Oak, J. S. and D. A. Fruman (2007). "Role of phosphoinositide 3-kinase signaling in autoimmunity." Autoimmunity **40**(6): 433-41.
- Ohashi, P. S. (2002). "T-cell signalling and autoimmunity: molecular mechanisms of disease." Nat Rev Immunol **2**(6): 427-38.
- Okamura, H. and A. Rao (2001). "Transcriptional regulation in lymphocytes." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 239-43.
- Parsons, M. J., R. G. Jones, et al. (2001). "Expression of active protein kinase B in T cells perturbs both T and B cell homeostasis and promotes inflammation." J Immunol **167**(1): 42-8.
- Pawson, T. and J. D. Scott (1997). "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." Science **278**(5346): 2075-80.
- Pennock, S. and Z. Wang (2008). "A tale of two Cbls: interplay of c-Cbl and Cbl-b in epidermal growth factor receptor downregulation." Mol Cell Biol **28**(9): 3020-37.
- Pollard, K. M., M. Arnush, et al. (2004). "Costimulation requirements of induced murine systemic autoimmune disease." J Immunol **173**(9): 5880-7.
- Poser, C. M., D. W. Paty, et al. (1983). "New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols." Ann Neurol **13**(3): 227-31.
- Pruijn, G. J. (2006). "The RNA interference pathway: a new target for autoimmunity." Arthritis Res Ther **8**(4): 110.
- Putney, J. W., Jr. and C. M. Ribeiro (2000). "Signaling pathways between the plasma membrane and endoplasmic reticulum calcium stores." Cell Mol Life Sci **57**(8-9): 1272-86.
- Racke, M. K., R. B. Ratts, et al. (2000). "The role of costimulation in autoimmune demyelination." J Neuroimmunol **107**(2): 205-15.
- Rameh, L. E. and L. C. Cantley (1999). "The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function." J Biol Chem **274**(13): 8347-50.
- Rieckmann, P. (2006). "[Escalating immunomodulatory therapy of multiple sclerosis. Update (September 2006)]." Nervenarzt **77**(12): 1506-18.

- Riley, J. L., P. J. Blair, et al. (2001). "ICOS costimulation requires IL-2 and can be prevented by CTLA-4 engagement." J Immunol **166**(8): 4943-8.
- Riley, J. L., M. Mao, et al. (2002). "Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11790-5.
- Rohrschneider, L. R., J. F. Fuller, et al. (2000). "Structure, function, and biology of SHIP proteins." Genes Dev **14**(5): 505-20.
- Romagnoli, P. et al. (2001). "A potential role for proteine tyrosine kinase p56(lck) in rheumatoid arthritis synovial fluid T lymphocyte hyporesponsiveness". Int Immunol **13** (3): 305-12.
- Roose, J. and A. Weiss (2000). "T cells: getting a GRP on Ras." Nat Immunol **1**(4): 275-6.
- Rudd, C. E. and M. Raab (2003). "Independent CD28 signaling via VAV and SLP-76: a model for in trans costimulation." Immunol Rev **192**: 32-41.
- Ruland, J. and T. W. Mak (2003). "From antigen to activation: specific signal transduction pathways linking antigen receptors to NF-kappaB." Semin Immunol **15**(3): 177-83.
- Salojin, K., J. Zhang, et al. (1997). "Impaired plasma membrane targeting of Grb2-murine son of sevenless (mSOS) complex and differential activation of the Fyn-T cell receptor (TCR)-zeta-Cbl pathway mediate T cell hyporesponsiveness in autoimmune nonobese diabetic mice." J Exp Med **186**(6): 887-97.
- Sanchez-Pernaute, O., C. Ospelt, et al. (2008). "Epigenetic clues to rheumatoid arthritis." J Autoimmun **30**(1-2): 12-20.
- Sawasdikosol, S., J. H. Chang, et al. (1996). "Tyrosine-phosphorylated Cbl binds to Crk after T cell activation." J Immunol **157**(1): 110-6.
- Sawcer, S., H. B. Jones, et al. (1996). "A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22." Nat Genet **13**(4): 464-8.
- Schaeffer, E. M. and P. L. Schwartzberg (2000). "Tec family kinases in lymphocyte signaling and function." Curr Opin Immunol **12**(3): 282-8.
- Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." Annu Rev Immunol **21**: 305-34.
- Seet, B. T., D. M. Berry, et al. (2007). "Efficient T-cell receptor signaling requires a high-affinity interaction between the Gads C-SH3 domain and the SLP-76 RxxK motif." Embo J **26**(3): 678-89.
- Shamim, M., S. G. Nanjappa, et al. (2007). "Cbl-b regulates antigen-induced TCR down-regulation and IFN-gamma production by effector CD8 T cells without affecting functional avidity." J Immunol **179**(11): 7233-43.
- Shan, D., J. A. Ledbetter, et al. (2000). "Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells." Cancer Immunol Immunother **48**(12): 673-83.
- Sharpe, A. H. and G. J. Freeman (2002). "The B7-CD28 superfamily." Nat Rev Immunol **2**(2): 116-26.
- Sibley, W. A., C. R. Bamford, et al. (1985). "Clinical viral infections and multiple sclerosis." Lancet **1**(8441): 1313-5.
- Singh, R., B. Wang, et al. (1999). "The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation." J Clin Invest **103**(11): 1561-70.
- Slifka, M. K. and J. L. Whitton (2001). "Functional avidity maturation of CD8(+) T cells without selection of higher affinity TCR." Nat Immunol **2**(8): 711-7.
- Steinman, L. (2001). "Multiple sclerosis: a two-stage disease." Nat Immunol **2**(9): 762-4.

- Sun, J., M. Pedersen, et al. (2007). "Grb2 mediates negative regulation of stem cell factor receptor/c-Kit signaling by recruitment of Cbl." Exp Cell Res **313**(18): 3935-42.
- Sun, Z., C. W. Arendt, et al. (2000). "PKC-theta is required for TCR-induced NF-kappaB activation in mature but not immature T lymphocytes." Nature **404**(6776): 402-7.
- Turner, M. and D. D. Billadeau (2002). "VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors." Nat Rev Immunol **2**(7): 476-86.
- van Leeuwen, J. E. and L. E. Samelson (1999). "T cell antigen-receptor signal transduction." Curr Opin Immunol **11**(3): 242-8.
- Vanhaesebroeck, B. and M. D. Waterfield (1999). "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." Exp Cell Res **253**(1): 239-54.
- Wange, R. L. (2000). "LAT, the linker for activation of T cells: a bridge between T cell-specific and general signaling pathways." Sci STKE **2000**(63): RE1.
- Wange, R. L. and L. E. Samelson (1996). "Complex complexes: signaling at the TCR." Immunity **5**(3): 197-205.
- Ward, S. G. and D. A. Cantrell (2001). "Phosphoinositide 3-kinases in T lymphocyte activation." Curr Opin Immunol **13**(3): 332-8.
- Weinshenker, B. G. (1994). "Natural history of multiple sclerosis." Ann Neurol **36** **Suppl**: S6-11.
- Weinshenker, B. G., B. Bass, et al. (1989). "The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability." Brain **112** (Pt 1): 133-46.
- Whitton, J. L. and R. S. Fujinami (2001). "DNA immunization and central nervous system viral infection." Adv Virus Res **56**: 243-73.
- Wiendl, H., J. Malotka, et al. (2002). "An autoreactive gamma delta TCR derived from a polymyositis lesion." J Immunol **169**(1): 515-21.
- Wiendl, H., A. Melms, et al. (2003). Kapitel E11: Multiple Sklerose. Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen. Kohlhammer Verlag.
- Wingerchuk, D. M., C. F. Lucchinetti, et al. (2001). "Multiple sclerosis: current pathophysiological concepts." Lab Invest **81**(3): 263-81.
- Wonerow, P. and S. P. Watson (2001). "The transmembrane adapter LAT plays a central role in immune receptor signalling." Oncogene **20**(44): 6273-83.
- Wunderlich, L., A. Farago, et al. (1999). "Association of Nck with tyrosine-phosphorylated SLP-76 in activated T lymphocytes." Eur J Immunol **29**(4): 1068-75.
- Yoshinaga, S. K., J. S. Whoriskey, et al. (1999). "T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS." Nature **402**(6763): 827-32.
- Zhang, W., R. P. Tribble, et al. (1998). "LAT palmitoylation: its essential role in membrane microdomain targeting and tyrosine phosphorylation during T cell activation." Immunity **9**(2): 239-46.
- Zhang, W., R. P. Tribble, et al. (2000). "Association of Grb2, Gads, and phospholipase C-gamma 1 with phosphorylated LAT tyrosine residues. Effect of LAT tyrosine mutations on T cell antigen receptor-mediated signaling." J Biol Chem **275**(30): 23355-61.
- Zipp, F., J. G. Weil, et al. (1999). "No increase in demyelinating diseases after hepatitis B vaccination." Nat Med **5**(9): 964-5.

7. Anhang

Tabelle 11: Aufgeführt werden die Rohdaten (C_T -Werte) als Doppelbestimmungen aus der rt-PCR-Analyse von ausgewählten Signaltransduktionsmolekülen und des 18s-Haushaltsgens in unstimulierten und stimulierten PBMCs von MS-erkrankten Probanden (n=10) und einer gesunden Kontrollgruppe (n=10).

Pat 1				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	14,3	14,28	26,11	26,06
OKT3	14,45	14,37	25,56	25,3
KOP	14,23	14,24	25,8	25,6
Pat 2				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	15,45	15,26	27,45	27,35
OKT3	15,04	15,26	25,27	25,17
KOP	16,97	16,05	28,04	28,15
Pat 3				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,86	16,91	28,35	28,62
OKT3	16,76	16,76	27,02	26,96
KOP	16,05	15,82	28,72	28,5
Pat 4				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	15,94	15,77	27,37	27,26
OKT3	15,77	16,29	27,25	27,04
KOP	16,05	16,53	28,66	29,05
Pat 5				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	14,15	14,31	25,93	25,54
OKT3	14,88	14,75	25,26	25,48
KOP	14,72	15,21	26,43	25,93
Pat 6				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,04	15,54	27,06	27,34
OKT3	14,66	14,59	25,08	25,01
KOP	14,45	14,46	26,34	26,54
Pat 7				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,83	16,94	27,9	27,52
OKT3	17,56	17,24	29,36	27,72
KOP	16,6	16,6	25,23	25,1
Pat 8				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	18,61	18,38	28,82	28,46
OKT3	19,07	18,8	29,34	29,51
KOP	17,22	17,4	29,35	29,98
Pat 9				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	15,58	15,76	25,51	25,94
OKT3	14,56	14,53	25,28	25,36
KOP	14,98	15,09	26,78	27,1

Anhang

Pat_10				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,21	15,82	28,29	28,46
OKT3	16,62	16,51	27,28	27,25
KOP	15,96	16,3	28,29	28,8

Pat_1				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	27,78	27,39	29,4	30
OKT3	28,24	28,2	29,47	30,36
KOP	27,89	28,31	29,16	29,38

Pat_2				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,07	28,23	28,79	29,31
OKT3	27,46	27,47	29,29	28,84
KOP	28,45	28,23	29,32	30,06

Pat_3				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	29,34	29,63	31,06	31,59
OKT3	28,43	28,35	30,18	30,41
KOP	29,39	28,75	29,97	30,6

Pat_4				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,72	28,56	29,92	29,94
OKT3	29,46	29,4	30,61	30,78
KOP	30,84	30,73	31,91	32,02

Pat_5				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	27,93	28,4	28,7	29,31
OKT3	28,29	28,45	30,28	29,91
KOP	28,5	28,4	29,35	29,44

Pat_6				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	29,25	29,04	31,49	31,4
OKT3	27,45	27,67	28,95	29,17
KOP	28,4	28,1	30,11	30,07

Pat_7				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	27,57	27,52	30,75	30,6
OKT3	27,72	27,84	30,23	29,77
KOP	27,49	27,78	29,23	29,23

Pat_8				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,08	28,23	30,45	30,67
OKT3	33,06	31,48	33,14	32,99
KOP	28,8	28,79	30,92	30,73

Pat_9				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,94	29,13	30,25	30,88
OKT3	27,55	27,74	28,53	28,92
KOP	28,66	28,12	28,62	29,74

Pat_10				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,72	28,78	30,95	31,49
OKT3	29,09	29,67	31,56	31,98
KOP	29,19	29,13	31,32	31,73

Anhang

Pat 1				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	25,66	25,87	26,44	26,78
OKT3	27,03	27,07	27,6	27,34
KOP	26,06	28,27	26,67	36,89
Pat 2				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	27,28	27,14	27,52	27,58
OKT3	25,45	25,48	27,25	27,25
KOP	25,76	25,57	27,65	27,67
Pat 3				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	27,34	27,03	28,76	29,01
OKT3	27,02	27,56	28,99	28,9
KOP	27,52	27,22	28,8	29,03
Pat 4				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	27,08	26,97	28,64	28,77
OKT3	27,03	27,22	29	29,01
KOP	28,12	28,23	29,24	29,25
Pat 5				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	25,63	25,53	27,23	27,09
OKT3	26,07	26,23	27,91	28,14
KOP	25,62	26,13	27,49	27,5
Pat 6				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	24,78	26,14	28,25	28,3
OKT3	25,7	25,79	27,09	26,68
KOP	26,2	26,26	27,34	27,69
Pat 7				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	26,54	26,79	27,21	27,08
OKT3	26,07	26,23	27	26,84
KOP	26,85	26,31	26,22	26,41
Pat 8				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	25,96	26,28	28,15	28,01
OKT3	27,92	28,31	30,64	30,67
KOP	27,15	27,15	28,7	28,69
Pat 9				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	25,8	26,3	28,5	28,39
OKT3	25,31	25,75	26,9	27,57
KOP	25,4	26,38	27,34	27,34
Pat 10				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	25,85	26,46	29,2	28,71
OKT3	26,49	27,55	29,24	28,98
KOP	27,15	27,61	29,38	29,15

Anhang

Kontrolle_1				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	14,31	14,38	25,76	25,91
OKT3	14,4	14,48	24,5	24,3
KOP	14,72	14,6	26,01	25,78
Kontrolle_2				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	17,21	17,49	27,51	26,58
OKT3	16,31	17,08	25,98	26,46
KOP	15,96	15,82	27,17	27,17
Kontrolle_3				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	18,37	18,4	28,43	28,55
OKT3	17,44	17,03	26,12	26,15
KOP	17,61	18,59	28,15	27,78
Kontrolle_4				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	15,36	15,47	27,49	27,63
OKT3	15,62	15,82	26,07	26,34
KOP	16,79	16,62	27,99	28,23
Kontrolle_5				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,3	16,27	26,82	26,82
OKT3	16,68	16,3	25,63	25,51
KOP	16,26	16,35	27,71	27,72
Kontrolle_6				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	15,26	15,48	28,81	28,83
OKT3	15,72	15,93	27,78	27,82
KOP	15,4	15,33	28,42	28,34
Kontrolle_7				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	14,73	14,68	27,23	27,19
OKT3	14,23	14,23	24,48	24,54
KOP	14,89	14,45	26,83	26,97
Kontrolle_8				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,81	16,75	29,85	29,35
OKT3	19,35	19,17	30,87	30,44
KOP	16,13	16,01	28,19	29,24
Kontrolle_9				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,29	16,26	27,51	27,3
OKT3	16,01	16,25	25,79	26,14
KOP	17,49	17,54	29,47	29,2
Kontrolle_10				
Pat/Adapter	18s.1	18s.2	LAT.1	LAT.2
-KO	16,28	16,29	26,35	26,37
OKT3	16,85	16,6	25,44	25,26
KOP	17,27	16,95	27,41	27,53

Anhang

Kontrolle_1				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	27,69	27,56	29,2	29,51
OKT3	27,01	26,89	28,73	28,95
KOP	29,02	28,16	29,33	29,44
Kontrolle_2				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,68	28,31	31,93	31,93
OKT3	28,46	28,41	31,18	31,7
KOP	28,46	28,15	30,43	31,05
Kontrolle_3				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	30,05	30,04	31,53	31,93
OKT3	28,24	28,46	30,05	31,61
KOP	29,43	29,72	32,28	31,91
Kontrolle_4				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,69	29,17	27,81	29,67
OKT3	28,63	28,64	30,83	31,65
KOP	30,59	28,99	30,75	31,23
Kontrolle_5				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,47	28,51	30,85	30,82
OKT3	27,88	28,25	30,7	30,73
KOP	28,78	28,55	31,58	31,38
Kontrolle_6				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	31,21	29,51	33,41	32,89
OKT3	30,51	30,75	32,46	32,32
KOP	29,82	30,25	31,97	31,66
Kontrolle_7				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,48	29,09	30,6	30,69
OKT3	27,28	27,24	28,86	28,67
KOP	27,15	27,26	28,34	28,2
Kontrolle_8				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	32,65	32,25	34,13	33,22
OKT3	34,8	35,71	34,13	33,4
KOP	29,13	29,49	30,27	31,59
Kontrolle_9				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,62	28,89	29,12	29,21
OKT3	28,08	28,2	28,87	29,43
KOP	30,23	30,34	30,91	31,25
Kontrolle_10				
Pat/Adapter	Nck.1	Nck.2	Grb2.1	Grb2.2
-KO	28,08	28,34	30	30,39
OKT3	27,21	27,98	30,88	31,72
KOP	29,64	28,8	31,87	33,13

Anhang

Kontrolle_1				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	26,08	25,51	26,37	26,56
OKT3	26,01	25,31	26	26,01
KOP	26,02	25,92	26,82	26,56
Kontrolle_2				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	26,72	26,48	28,14	28,18
OKT3	26,22	25,97	28,36	27,62
KOP	26,19	26,96	28	28,11
Kontrolle_3				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	27,07	27,66	28,41	28,32
OKT3	26,37	26,06	27,51	27,03
KOP	26,49	26,05	28,21	28,62
Kontrolle_4				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	27,36	28,81	27,22	27,25
OKT3	25,58	25,84	27,65	27,8
KOP	25,28	25,97	27,78	27,84
Kontrolle_5				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	26,12	26,36	27,17	26,72
OKT3	25,83	26	26,91	26,91
KOP	25,83	27,02	28,22	27,93
Kontrolle_6				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	27,01	26,88	29,53	29,48
OKT3	26,86	26,8	29,06	29
KOP	26,82	27,01	28,34	28,45
Kontrolle_7				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	27,03	27,51	27,89	27,84
OKT3	26,55	26,64	26,78	26,62
KOP	26,36	26,7	26,49	26,65
Kontrolle_8				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	30,56	31,7	30,4	30,92
OKT3	36,95	36,95	26,9	26,9
KOP	27,32	28,62	29,16	28,6
Kontrolle_9				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	25,59	25,99	27,1	27,25
OKT3	27,03	27,3	26,98	26,83
KOP	29,93	28,81	29,03	29,44
Kontrolle_10				
Pat/Adapter	Crk.1	Crk.2	c-Cbl.1	c-Cbl.2
-KO	25,5	25,58	26,88	27,74
OKT3	26,2	25,75	26,68	26,46
KOP	26,26	26,67	28,67	28,1

Anhang

Tabelle 12: Aufgeführt werden die Rohdaten (C_T -Werte) als Doppelbestimmungen aus den rt-PCR-Analysen von ausgewählten Signaltransduktionsmolekülen und des 18s-Haushaltsgens in unstimulierten und stimulierten (6, 12 und 24 Stunden, anti-CD3, anti-CD3+28, MBP+DR_Fibroblasten) Modellzellen (BBC, SS8, BBC-CD28, Jurkat) und murinen Splenozyten in jeweils drei Versuchsreihen.

	18S 1	18S 2	LAT.1	LAT.2
NTC				
BBC 0St.1	11,22	11,28	22,14	22,18
BBC 0St.2	10,34	10,11	21,86	21,95
BBC 0St.3	8,67	8,37	21,86	21,95
BBC 6h a3 1	6,15	6,16	20,84	20,79
BBC 6h a3 2	7,84	8,01	21,99	22,02
BBC 6h a3 3	8,49	8,25	22,31	22,41
BBC 12h a3 1	8,03	8,32	22,22	22,38
BBC 12h a3 2	7,68	7,99	22,41	22,57
BBC 12h a3 3	7,35	7,57	21,53	21,44
BBC 24h a3 1	17,79	17,42	23,4	23,32
BBC 24h a3 2	9,56	9,52	22,37	22,51
BBC 24h a3 3	8,76	8,67	22,37	22,51
BBC-DR 0St.1	13,74	12,51	22,06	22,22
BBC-DR 0St.2	11,13	11,56	22,23	22,13
BBC-DR 0St.3	9,63	9,92	22,09	22,07
BBC-DR 6h 1	10,34	10,56	24,4	24,26
BBC-DR 6h 2	10,47	9,75	24,15	24,43
BBC-DR 6h 3	14,4	14,56	24,24	24,58
BBC-DR 12h 1	9,65	10,44	21,02	20,93
BBC-DR 12h 2	8,4	8,55	21,07	21
BBC-DR 12h 3	8,4	8,6	22,21	22,16
BBC-DR 24h 1	8,52	8,42	22,19	22,23
BBC-DR 24h 2	8,69	8,24	21,89	22,02
BBC-DR 24h 3	9,11	9,89	23	22,94
SS8 0 St. 1	13,69	14,17	23,49	23,65
SS8 0 St. 2	7,2	7,44	20,48	20,54
SS8 0 St. 3	6,55	6,39	20,61	20,65
SS8 6h a3 1	7,1	6,9	21,06	21,09
SS8 6h a3 2	6,94	6,65	21,21	21,31
SS8 6h a3 3	8,04	7,8	21,67	21,63
SS8 12h a3 1	8,19	8,57	21,6	21,68
SS8 12h a3 2	9,49	9,38	22,65	22,72
SS8 12h a3 3	8,29	8,31	22,28	22,22
SS8 24h a3 1	15,65	16	23,28	23,27
SS8 24h a3 2	13,75	13,79	26,64	26,59
SS8 24h a3 3	14,21	13,78	26,31	26,3
CD28 0St. 1	11,08	10,85	22,71	22,56
CD28 0St. 2	8,78	9,25	21,59	21,49
CD28 0St. 3	7,89	8,15	21,59	21,49
CD28 6h a3 1	7,71	7,38	21,49	21,61
CD28 6h a3 2	7,92	8,37	22,39	22,36
CD28 6h a3 3	11,15	10,23	23,28	23,29

Anhang

CD28 12h a3 1	7,89	7,47	21,48	21,64
CD28 12h a3 2	9,41	9,18	22,83	22,77
CD28 12h a3 3	9,69	8,99	22,39	22,3
CD28 24h a3 1	10,12	10,07	23,49	23,46
CD28 24h a3 2	11,71	11,68	23,45	23,47
CD28 24h a3 3	11,52	11,63	23,49	23,62
CD28 6h a3+28 1	8,66	9,01	22,55	22,99
CD28 6h a3+28 2	8,61	9,03	22,62	22,55
CD28 6h a3+28 3	8,02	7,96	21,73	21,53
CD28 12h a3+28 1	10,17	9,75	21,56	21,66
CD28 12h a3+28 2	10,35	10,52	22,1	22,07
CD28 12h a3+28 3	9,57	8,72	21,67	21,76
CD28 24h a3+28 1	19,79	19,92	22,89	22,73
CD28 24h a3+28 2	9,7	9,29	24,31	24,16
CD28 24h a3+28 3	13,5	13,6	24,31	24,16
J 0St. 1	10,17	10,29	27,45	27,07
J 0St. 2	12,54	12,64	23,43	23,33
J 0St. 3	10,33	10,47	23,43	23,33
J 6h a3 1	9,1	9,05	22,72	22,78
J 6h a3 2 ?	8,01	8,14	23,48	23,56
J 6h a3 3	10,42	10,59	23,56	23,81
J 12h a3 1	9,69	10,37	22,95	23,14
J 12h a3 2	14,72	15,11	26,16	26,09
J 12h a3 3	13,02	12,3	23,99	23,58
J 24h a3 1	17,38	18,06	24,92	24,9
J 24h a3 2	8,28	8,04	24,42	24,84
J 24h a3 3	13,79	13,05	24,42	24,84
J 6h a3+28 1	9,46	8,93	23,1	23,12
J 6h a3+28 2?	10,71	11,56	22,78	22,61
J 6h a3+28 3	9,11	9,14	22,94	22,69
J 12h a3+28 1	9,04	8,64	23,11	23,04
J 12h a3+28 2	10,21	10,34	23,29	23,14
J 12h a3+28 3	8,95	9,05	23,07	23,08
J 24h a3+28 1	18,56	17,54	27,49	27,36
J 24h a3+28 2	18,46	18,86	27,48	28,42
J 24h a3+28 3	17,92	16,63	29,15	28,24
Murin 0St. 1	8,81	9,39	23,68	23,62
Murin 0St. 2	8,1	7,87	24,6	24,7
Murin 0St. 3	9,81	10,58	23,31	23,28
Murin 6h a3 1	7,24	7,08	24,12	24,11
Murin 6h a3 2	8,12	7,86	24,94	25,09
Murin 6h a3 3	8,03	7,83	26,15	25,85
Murin 12h a3 1	8,93	8,75	25,42	25,41
Murin 12h a3 2	8,79	8,05	25,26	25,26
Murin 12h a3 3	9,53	8,61	24,88	24,59
Murin 24h a3 1	10,68	11,87	26,5	26,39
Murin 24h a3 2	13,27	13,78	26,79	27,34
Murin 24h a3 3	14,01	13,88	26,93	26,59

Anhang

	c-Cbl.1	c-Cbl.2	Nck.1	Nck.2
NTC				
BBC 0St.1	23,38	23,52	25,08	25,1
BBC 0St.2	23,6	23,62	24,98	25,21
BBC 0St.3	23,6	23,62	24,98	25,21
BBC 6h a3 1	22,94	22,96	24,23	24,15
BBC 6h a3 2	24,2	24,24	25,58	25,53
BBC 6h a3 3	23,86	24	25,44	25,48
BBC 12h a3 1	24,12	24,07	25,1	25,31
BBC 12h a3 2	24,08	24,1	25,44	25,27
BBC 12h a3 3	23,83	23,93	24,99	29,08
BBC 24h a3 1	24,47	24,4	26,19	26,26
BBC 24h a3 2	23,8	23,82	25,16	25,3
BBC 24h a3 3	23,8	23,82	25,16	25,3
BBC-DR 0St.1	23,92	23,92	25,18	24,13
BBC-DR 0St.2	23,96	24,01	25,06	25,05
BBC-DR 0St.3	24	23,98	25,12	25,01
BBC-DR 6h 1	24,27	24,3	25,79	25,73
BBC-DR 6h 2	25,29	25,26	27,32	27,05
BBC-DR 6h 3	25,3	25,46	26,92	27,32
BBC-DR 12h 1	23,18	23,1	23,75	23,56
BBC-DR 12h 2	23,16	23,18	23,61	23,81
BBC-DR 12h 3	23,93	23,89	25,21	25,41
BBC-DR 24h 1	22,9	22,93	23,54	23,86
BBC-DR 24h 2	23,03	23,01	24,03	24,59
BBC-DR 24h 3	23,35	23,25	24,61	24,81
SS8 0 St. 1	29,05	29,23	29,49	29,2
SS8 0 St. 2	23,25	23,15	24,63	24,6
SS8 0 St. 3	23,2	23,22	24,46	24,5
SS8 6h a3 1	23,47	23,48	24,71	26,83
SS8 6h a3 2	23,76	23,69	25,11	25,24
SS8 6h a3 3	23,51	23,4	23,81	23,75
SS8 12h a3 1	24,09	24,05	25,08	25,23
SS8 12h a3 2	25,02	25,13	26,03	25,82
SS8 12h a3 3	24,79	24,74	25,57	25,65
SS8 24h a3 1	27,83	27,79	27,3	27,27
SS8 24h a3 2	29,94	30,33	30,9	30,4
SS8 24h a3 3	30,08	26,93	28,74	23,95
CD28 0St. 1	25,1	24,91	25,9	25,96
CD28 0St. 2	23,71	23,67	24,98	24,84
CD28 0St. 3	23,71	23,67	24,98	24,84
CD28 6h a3 1	23,42	23,44	24,65	24,72
CD28 6h a3 2	23,27	24,4	25,42	25,61
CD28 6h a3 3	24,99	25,15	26,72	26,33
CD28 12h a3 1	23,4	22,98	24,28	23,64
CD28 12h a3 2	24,51	24,7	26,12	26,01
CD28 12h a3 3	24,13	24,09	25,54	25,41
CD28 24h a3 1	24,96	25,19	26,52	26,59
CD28 24h a3 2	25,04	25,11	26,52	26,73
CD28 24h a3 3	25,11	25,13	26,72	26,65
CD28 6h a3+28 1	24,63	24,79	26,49	26,46

Anhang

CD28 6h a3+28 2	24,61	24,6	26,43	26,55
CD28 6h a3+28 3	23,79	24,24	25,03	24,89
CD28 12h a3+28 1	23,98	23,95	24,84	25,1
CD28 12h a3+28 2	24,23	24,94	25,17	25,17
CD28 12h a3+28 3	23,99	24,04	25,11	25,04
CD28 24h a3+28 1	25,5	25,81	26,19	26,19
CD28 24h a3+28 2	27,78	27,63	29,03	28,01
CD28 24h a3+28 3	27,78	27,63	29,03	28,01
J 0St. 1	27,12	27,31	26,37	26,8
J 0St. 2	25,86	25,86	25,77	26,01
J 0St. 3	25,86	25,86	25,77	26,01
J 6h a3 1	25,1	25,1	25,25	25,05
J 6h a3 2 ?	25,5	25,41	25,35	25,6
J 6h a3 3	25,31	24,65	25,51	25,45
J 12h a3 1	24,29	24,29	25,33	25,93
J 12h a3 2	27,26	27,38	26,84	27,17
J 12h a3 3	25,86	25,65	25,35	25,29
J 24h a3 1	24,84	24,87	24,67	24,74
J 24h a3 2	26,21	26,52	26,12	26,34
J 24h a3 3	26,21	26,52	26,12	26,34
J 6h a3+28 1	25,22	24,93	25,76	25,17
J 6h a3+28 2?	24,41	24,21	24,95	25,01
J 6h a3+28 3	24,5	24,46	24,38	24,23
J 12h a3+28 1	25,35	25,34	24,89	25,13
J 12h a3+28 2	25,63	25,59	25,43	25,74
J 12h a3+28 3	25,21	25,39	24,92	25,07
J 24h a3+28 1	30,2	31	30,07	31,11
J 24h a3+28 2	30,16	30,16	30,39	30,36
J 24h a3+28 3	30,68	30,22	31,51	30,85
Murin 0St. 1	23,35	23,27	24,37	24,45
Murin 0St. 2	23,93	24,07	25,55	25,49
Murin 0St. 3	23,23	23,26	24,28	24,18
Murin 6h a3 1	23,74	23,81	24,91	25,14
Murin 6h a3 2	24,29	24,11	25,7	25,5
Murin 6h a3 3	24,71	25,01	26,17	25,78
Murin 12h a3 1	24,1	24,36	25,21	25,46
Murin 12h a3 2	24,11	24,14	25,23	25,33
Murin 12h a3 3	23,9	23,93	25,03	24,97
Murin 24h a3 1	27,85	28,03	27,63	28,09
Murin 24h a3 2	27,31	27,31	27,65	28,12
Murin 24h a3 3	27,01	27,47	27,73	27,42

Anhang

	Grb2.1	Grb2.2	Crk.1	Crk.2
NTC				
BBC 0St.1	23,83	23,89	24,61	24,88
BBC 0St.2	24,17	24,24	25,11	25,19
BBC 0St.3	24,17	24,24	25,11	25,19
BBC 6h a3 1	23,37	23,84	23,02	22,97
BBC 6h a3 2	26,31	26,5	24,52	24,61
BBC 6h a3 3	25,62	26,12	25,33	25,82
BBC 12h a3 1	24,91	24,69	24,56	24,6
BBC 12h a3 2	25,02	24,75	24,68	24,95
BBC 12h a3 3	24,78	25,03	24,2	24,09
BBC 24h a3 1	26,65	26,55	26,36	25,95
BBC 24h a3 2	24,29	24,27	24,39	24,36
BBC 24h a3 3	24,29	24,27	24,39	24,36
BBC-DR 0St.1	27,37	27,73	25,22	25,49
BBC-DR 0St.2	25,79	26,32	25,24	25,29
BBC-DR 0St.3	26,39	26,19	25,07	25,04
BBC-DR 6h 1	28,27	28,47	25,86	26,17
BBC-DR 6h 2	25,02	25,13	25,97	25,71
BBC-DR 6h 3	25,08	25,14	25,65	25,6
BBC-DR 12h 1	24,15	24,05	23,58	23,33
BBC-DR 12h 2	24,17	24,2	23,47	23,44
BBC-DR 12h 3	25,64	25,56	24,91	27,24
BBC-DR 24h 1	25,04	25,09	23,41	23,81
BBC-DR 24h 2	25,4	24,44	24,19	24,44
BBC-DR 24h 3	25,35	25,08	24,62	24,71
SS8 0 St. 1	24,97	25,38	28,17	28,12
SS8 0 St. 2	24,39	24,29	24,14	24,17
SS8 0 St. 3	24,06	24,18	24,14	24,21
SS8 6h a3 1	24,39	24,41	24,1	24,04
SS8 6h a3 2	25,26	25,34	24,72	24,94
SS8 6h a3 3	25,66	25,84	25,06	25,25
SS8 12h a3 1	24,12	24,12	24,68	24,77
SS8 12h a3 2	25,91	25,88	25,88	26,25
SS8 12h a3 3	25,73	25,96	25,87	25,96
SS8 24h a3 1	23,61	23,66	25,73	25,85
SS8 24h a3 2	26,62	26,9	28,7	28,91
SS8 24h a3 3	26,55	26,89	28,31	28,63
CD28 0St. 1	25,22	25,02	26,09	25,65
CD28 0St. 2	24,67	24,41	24,5	24,41
CD28 0St. 3	24,67	24,41	24,5	24,41
CD28 6h a3 1	25,35	25,42	23,7	23,67
CD28 6h a3 2	25,32	25,32	25,48	25,32
CD28 6h a3 3	26,32	26,52	26,19	26,05
CD28 12h a3 1	25,31	25,86	23,67	23,9
CD28 12h a3 2	26,45	26,2	25,79	25,74
CD28 12h a3 3	24,75	24,69	25,27	24,93
CD28 24h a3 1	24,98	24,92	25,79	25,63
CD28 24h a3 2	24,87	24,7	25,58	25,72
CD28 24h a3 3	25,06	25,25	25,66	25,71
CD28 6h a3+28 1	26,14	26,68	25,85	26,12

Anhang

CD28 6h a3+28 2	25,96	25,84	25,75	25,89
CD28 6h a3+28 3	25,74	26,02	24,02	24,01
CD28 12h a3+28 1	25,45	25,69	24,28	24,28
CD28 12h a3+28 2	25,87	26,04	24,76	24,68
CD28 12h a3+28 3	25,92	26,13	24,21	24,35
CD28 24h a3+28 1	26,14	26,58	26,16	26,38
CD28 24h a3+28 2	27,42	27,09	28,95	27,89
CD28 24h a3+28 3	27,42	27,09	28,95	27,89
J 0St. 1	28,51	29,9	27,22	27,31
J 0St. 2	28,43	28,48	26,41	26,32
J 0St. 3	28,43	28,48	26,41	26,32
J 6h a3 1	27,4	27,36	25,92	25,99
J 6h a3 2 ?	28,17	28,16	26,29	26,19
J 6h a3 3	28,04	28,27	26,26	26,48
J 12h a3 1	27,27	27,27	25,63	26,2
J 12h a3 2	30,63	30,79	27,5	27,52
J 12h a3 3	28,61	28,42	26,08	26,05
J 24h a3 1	26,51	26,71	25,42	25,36
J 24h a3 2	29,15	29,23	25,55	25,46
J 24h a3 3	29,15	29,23	25,55	25,46
J 6h a3+28 1	27,52	27,95	26,02	25,97
J 6h a3+28 2?	27,07	27,67	26,29	26,26
J 6h a3+28 3	25,85	25,63	24,64	25,1
J 12h a3+28 1	27,1	26,66	25,7	25,63
J 12h a3+28 2	27,52	27,61	25,87	26,06
J 12h a3+28 3	26,96	27,65	25,59	25,96
J 24h a3+28 1	35,28	33,49	27,59	27,58
J 24h a3+28 2	31,92	25,97	27,45	27,68
J 24h a3+28 3	33,55	33,42	28,32	27,41
Murin 0St. 1	24,58	24,6	24,36	24,13
Murin 0St. 2	25,55	25,88	25,26	25,24
Murin 0St. 3	24,84	24,71	24,18	24,21
Murin 6h a3 1	25,07	25,28	24,24	24,33
Murin 6h a3 2	26,37	26,36	25,08	25,19
Murin 6h a3 3	26,08	25,72	25,6	24,92
Murin 12h a3 1	25,08	25,33	24,6	24,75
Murin 12h a3 2	25,31	25,39	24,77	24,71
Murin 12h a3 3	25,02	25,02	24,28	24,42
Murin 24h a3 1	29,07	29,19	27,63	27,75
Murin 24h a3 2	29,75	30,64	27,19	27,92
Murin 24h a3 3	28,29	28,33	27,37	27,49

VI Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern, Marliese und Jürgen Renninger, danken, die mich die gesamte Studienzeit sowohl durch Motivation und Beistand, als auch durch finanzielle Hilfe unterstützt haben, des weiteren meiner Schwester Sabine, welche mich in vielen Gesprächen über die gegenseitige Arbeitsbeziehung von Biologen und Medizinern moralisch unterstützt hat.

Ich danke meiner zukünftigen Ehefrau Caroline für Stunden des Entbehrens, ebenso wie für die stets geleistete Motivation und Aufmerksamkeit in Gesprächen auch ohne weitere Fachkenntnis zu diesem Thema.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. A. Melms möchte ich neben der Überlassung dieses interessanten Themas zur Promotion für weiterführende, wissenschaftliche Gespräche und die Möglichkeit zur Teilnahme am Journal-Club danken, sowie natürlich auch für die mühevollen Stunden des kritischen Lesens und der Korrektur dieser Arbeit. Meinem Betreuer Prof. Dr. Heinz Wiedl bin ich für die fachliche und inhaltliche Betreuung, sowie für grundlegende Vorarbeiten dankbar.

Speziell meiner Mitdoktorandin Stella und auch Simone aus dem Team von Eva Tolosa danke ich für die labortechnische Einarbeitung und Unterstützung.

Meiner Freundin, Kommilitonin und Mitdoktorandin Annette danke ich für unzählige, unvergessliche Stunden der Arbeiten im Labor sowie der wissenschaftlichen und privaten Diskussionen in allen Lebenslagen - ohne die gemeinsamen Gespräche wäre sicherlich so manche auch enttäuschende Episoden dieser Arbeit nicht überwunden worden.

Abschließend möchte ich all denjenigen danken, die ich in der oben stehenden Ausführung nicht speziell genannt habe, allen Freunden und Kollegen, die durch Unterstützung in vielen technischen Fragestellungen zur Fertigstellung dieser Arbeit ihre treue Hilfe angeboten haben.

Tübingen, 28.09.2009

Markus Renninger

VII Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name Markus Bruno Renninger
Geboren am 16. August 1978 in Pforzheim
Familienstand ledig
Nationalität deutsch

Schule

1985 – 1989 Grundschule: Heynlinsschule Stein
1989 – 1998 Lise-Meitner Gymnasium: Königsbach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

1998 – 1999 OP-technischer Assistent am Klinikum für Urologie,
St.Trudpert in Pforzheim, *Ärztlicher Direktor Prof. Dr.
med. D. Völter*

Studium

Ab 10/1999 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls
Universität, Tübingen:
06.09.2001 Ärztliche Vorprüfung
29.08.2002 Erstes Staatsexamen
07.09.2004 Zweites Staatsexamen

Famulaturen:

17.02.03-19.03.03: Pneumologie bei Dres. Dettweiler & Weible, Reutlingen
20.03.03-23.04.03: Anästhesie und Intensivmedizin am Klinikum, Reutlingen
28.07.03-31.08.03: Neurologie am Universitätsklinikum Innsbruck
08.09.03-12.10.03: Urologie am Klinikum St.Trudpert, Pforzheim

Promotion

Seit 02/2005 an der Neurologischen Universitätsklinik und
Interfakultären Institut für Zellbiologie sowie am Hertie-
Institut für Klinische Hirnforschung der Universität
Tübingen, Abt.: Experimentelle Neuroimmunologie bei
Prof. Dr. med. A. Melms zum Thema: „Die
Regulationsdynamik auf Niveau der T-Zell-
Signaltransduktion bei Multipler Sklerose als ein möglicher
Mechanismus der Entstehung von Autoimmunität“.

Praktisches Jahr

Ab 10/2004 am Diakonie-Klinikum, Stuttgart:
25.10.04 – 13.02.05 im Fach Chirurgie
14.02.05 – 05.06.05 im Fach Anästhesie
06.06.05 – 23.09.05 Praktisches Jahr am *CHU Montpellier, Frankreich:*
Nephrologie, Transplantation und Intensivmedizin
30.11.2005 Drittes Staatsexamen der Humanmedizin am Diakonie-
Klinikum, Stuttgart

Ärztliche Tätigkeit

Seit 03.2006

Wissenschaftlicher Angestellter und Arzt in Weiterbildung zum Facharzt für Urologie in der Urologischen Universitätsklinik, Tübingen, *Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. A. Stenzl.*

Wiss. Schwerpunkt: „Biologie der adulten spermatogonalen Stammzelle, Hodentumorstammzelle und Regenerative Medizin.“