

**Aus der Universitätsklinik
für Allgemeine Neurologie in Tübingen
Komm. Ärztlicher Direktor: Professor Dr. A. Melms**

**Immunphänotypische Analyse autoreaktiver T-Zellen
nach endogener Reaktivierung
der EAE in der SJL-Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Michael Dürr
aus Karlsruhe

2009

Dekan: Professor Dr. I. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Melms

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. R. Klein

I	INHALTSVERZEICHNIS	Seiten
II	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
1	EINLEITUNG	
1.1.	Die Funktionen des angeborenen Immunsystems	9
1.2.	Erkennen von Antigenen durch die Präsentation durch MHC-Moleküle	10
1.3.	Antigenerkennung und Zellaktivierung im adaptiven Immunsystem	12
1.4.	T-Zellen, Funktionen und Aufgaben	13
1.4.1.	<i>Der Thymus – Ort der Reifung und Selektion von T- Zellen</i>	13
1.4.2.	<i>Aktivierung von T-Zellen durch Kostimulation</i>	14
1.4.3.	<i>T-Helferzellen und ihre Subtypen</i>	15
1.4.4.	<i>Regulatorische T-Zellen und ihre Funktion</i>	16
1.5.	B-Zellen, im Zusammenspiel mit T-Zellen	18
1.6.	Toleranz und Autoimmunität	19
1.7.	EAE (Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis) als Modell für Autoimmunität	21
1.8.	Multiple Sklerose	23
1.8.1.	<i>Grundlagen der Immunologie der Multiplen Sklerose</i>	24
1.8.2.	<i>T-Zellen und ihre Rolle bei Multipler Sklerose</i>	26
1.9.	MHC-Tetramere und ihre Bedeutung bei der Detektion von autoreaktiven T-Zellen	27
1.10.	Fragestellungen dieser Arbeit	28
2	Material und Methoden	
2.1.	Material	29
2.1.1.	<i>Tabellen der verwendeten Laborgeräte</i>	29
2.1.2.	<i>Tabellen der verwendeten Verbrauchsmaterialien</i>	30
2.1.3.	<i>Tabellen kommerziell erhältlicher Chemikalien, Medien und Enzyme</i>	31
2.1.4.	<i>Tabellen der verwendeten Antikörper</i>	34
2.1.5.	<i>Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien</i>	35
2.1.5.1.	<i>LB-Medium</i>	35
2.1.5.2.	<i>Lyse-Puffer</i>	35
2.1.5.3.	<i>Wasch-Puffer</i>	36

	Seiten
2.1.5.4. <i>Erythrozyten-Lyse-Puffer</i>	36
2.1.5.5. <i>komplettes IMDM</i>	36
2.1.5.6. <i>ZNS-Verdau-Lösung</i>	37
2.1.5.7. <i>Percollfraktionen für Dichtegradienten</i>	37
2.1.5.8. <i>FACS-Puffer</i>	37
2.1.5.9. <i>Herstellung der Peptide</i>	37
2.1.6. <i>verwendete Versuchstiere</i>	38
2.2. <i>Methoden</i>	38
2.2.1. <i>Kultur von T-Zellen zur Titration der Tetramere</i>	38
2.2.2. <i>Induktion einer EAE</i>	39
2.2.3. <i>Klassifizierung des Krankheitsgrades</i>	40
2.2.4. <i>Herstellung der PLP- und MBP-Tetramere</i>	40
2.2.5. <i>Präparation von Milz, DLN und ZNS</i>	42
2.2.6. <i>Isolierung der Lymphozyten aus DLN und Milz</i>	42
2.2.7. <i>Isolierung der Lymphozyten aus dem ZNS</i>	43
2.2.8. <i>Bestimmung der Lymphozytenzahl</i>	43
2.2.9. <i>Färbung der Lymphozyten mit MHC-Klasse-II-Tetrameren und Antikörpern</i>	44
2.2.10. <i>FACS-Messung und Auswertung der FACS-Daten</i>	45
2.2.11. <i>Statistik</i>	45
3. Ergebnisse	46
3.1. <i>Kinetik von Lymphozyten in drainierenden Lymphknoten und der Milz</i>	47
3.1.1. <i>Kinetik der CD4+ Lymphozyten im drainierenden Lymphknoten</i>	49
3.1.2. <i>Konstante Anzahl von CD8+ Lymphozyten im drainierenden Lymphknoten</i>	51
3.2. <i>Phänotypisierung von autoreaktiven CD4+ Lymphozyten</i>	52
3.2.1. <i>Zunahme der CD4CD25+, PLP spezifischen T-Zellen im Lymphknoten</i>	55
3.2.2. <i>Aktivierung autoreaktiver CD4CD69+ T-Zellen im Lymphknoten</i>	57
3.2.3. <i>Konstanter Anteil der CD4CD44+ T-Zellen im Lymphknoten</i>	59
3.2.4. <i>Hoher Anteil an CD4CD62L+ T-Zellen im Lymphknoten</i>	59

3.2.5.	<i>Anteil der apoptotischen T-Zellen im Lymphknoten</i>	61
3.3.	Die Situation im ZNS-aktivierte autoreaktive CD4 T-Zellen können im ZNS detektiert werden	62
4. Diskussion		
4.1.	Endogene Reaktivierung von autoreaktiven CD4+ T-Zellen durch den Mechanismus der erneuten Antigenpräsentation und -erkennung vor einer erneuten Invasion in das ZNS	64
4.2.	Welche Rolle spielen regulatorische T-Zellen während einer endogene Reaktivierung	65
4.3.	CD8+ T-Zellen im Kontext einer endogenen Reaktivierung	66
5. Zusammenfassung		67
6. Dank		68
7. Lebenslauf		69
III LITERATURVERZEICHNIS		70

II. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende-Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zellrezeptor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BTLA	B-und T-Lymphozyten-Attenuator
CD	Cluster of Differentiation
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvants
CTLA-4	Zytotoxisches T-Lymphozyten assoziiertes Antigen-4
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflußzytometer
FCS	forward scatter, Vorwärtsstreuung
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FOXP3	Forkhead/winged helix transcription factor 3
FSC	Forward scatter, Vorwärtsstreuung
GITR	Glukokortikoid induzierbarer TNF-Rezeptor
GM-CSF	Granulozyten and Macrophagen-Zell stimulierender Faktor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	human leukocyte antigen
HE	Hämatoxylin/Eosin
ICOS	Induzierbares kostimulatorisches Molekül
IMDM	Iscove's modifiziertes DMEM
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
li	invarinate Kette, invariant chain
MBP	Myelin Basisches Protein
MDS	Mean disease score
MHC	Major Histocompatibiliy Complex
Mio.	Million(en)
MOG	Myelin Oligodendrozyten Glykoprotein
MS	Multiple Sklerose
IFA	Inkomplettes Freund'sches Adjuvants
MHC	Major Histocompatibility Complex

Tm	Tetramer
PAMPs	Pathogen assoziiertes Molekularmuster
PBS	Phosphat Buffered Saline
PD-1	programmed death-1
PE	R-Phycoerythrin
p.i.	post immunisation
PI	Propidiumjodid
PLP	Proteolipid Protein
PS	Phosphatidylserin
PTX	Pertussis Toxin
s.c.	subkutan
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
TCR	T-Zellrezeptor
TGF- β	Transforming growth factor β
T _H	T-Helferzelle
T _{H1}	T-Helferzelle Typ 1
T _{H2}	T-Helferzelle Typ 2
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
SEM	standard error of the mean, Standardfehler
SSC	sideward scatter, Seitwärtsstreuung
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Das Immunsystem zeichnet sich durch ein Höchstmaß an Effizienz und Anpassungsfähigkeit aus. Wie kaum ein anderer Zellverband optimiert und entwickelt es seine Mechanismen im Laufe der Evolution stetig weiter, mit dem Ziel Infektionen zeitnah zu detektieren und zu unterbinden. Gegen eindringende Erreger müssen effektive Abwehrreaktionen unterhalten werden. Gleichzeitig toleriert das Immunsystem körpereigene vitale Zellen über Proteine der Zelloberfläche und stellt somit deren Integrität sicher. Wurde diese Toleranz nicht erlernt oder schlägt sie fehl, kann diese nicht weiter aufrechterhalten werden. Die Konsequenz daraus resultiert in autoimmunen Reaktionen, die sich der Kontrolle und Regulation des Immunsystems entziehen, mit der Folge chronisch entzündlicher Erkrankungen.

1.1. Die Funktionen des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem kann in zwei Arme unterteilt werden, das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem.

Das angeborene Immunsystems übernimmt mit seinen Zellbestandteilen die Aufgabe, eindringende Pathogene unter Kontrolle zu halten oder soweit dies gelingt auch zu vernichten, um beginnende oder sich im Körper ausbreitende Infektion zu verhindern.

Gewebemakrophagen, die als erste in Kontakt mit Krankheitserregern treten, sind in der Lage über Oberflächenrezeptoren fremde Zellbestandteile zu erkennen [39]. Makrophagen binden an deren Zelloberfläche und nehmen diese über Phagozytose auf. Dieser Vorgang setzt Cytokine und andere Mediatoren (Prostaglandine, Leukotriene) frei, womit durch eine lokale Entzündungsreaktion neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und

natürliche Killerzellen an den Ort der drohenden Infektion gelangen. Zudem wird das Komplementsystem aktiviert, eine Gruppe von Plasmaproteinen, die gezielt die Oberfläche von Pathogenen erkennen und diese permeabilisieren. [45, 60]. Das Komplementsystem ist eine sehr effektive und schnell aktivierbare Einheit im angeborenen Immunsystem. Neben einer direkten Zellschädigung von Pathogenen spielt sie auch eine wichtige Rolle in der Regulation der Aktivität von T Lymphozyten, einem wesentlichen Bestandteil des adaptiven Immunsystems [46]. In vielen Fällen kann durch diese Reaktionskette eine drohende Infektion bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt verhindert werden. Allerdings haben Krankheitserreger ebenfalls Strategien entwickelt, um von den Bestandteilen des angeborenen Immunsystems nicht erkannt oder von diesem nicht vernichtet zu werden. Neben der Phagozytose können auch einzelne Bestandteile, wie Proteine von Makrophagen und dendritischen Zellen über Endozytose aufgenommen und an deren Oberfläche den Zellen des adaptiven Immunsystems präsentiert werden. Hier wird die überaus wichtige Funktion des angeborenen Systems deutlich, neben der ersten Reaktion auf Krankheitserreger, Vorbereiter für das adaptive Immunsystem zu sein [12, 59]. Die Antigenpräsentation wird von spezialisierten Zellen des angeborenen und des adaptiven Immunsystems durchgeführt. All diese Zellen haben die gemeinsame Eigenschaft, über spezialisierte Glykoproteine auf ihrer Zelloberfläche, den MHC-Molekülen, Antigene so zu präsentieren, dass sie von T-Lymphozyten erkannt werden können, um damit das adaptive Immunsystem zu aktivieren. Im nächsten Abschnitt soll auf die Präsentation der Antigene im Einzelnen näher eingegangen werden.

1.2 Erkennen von Antigenen durch die Präsentation auf MHC-Molekülen

Damit Zellen des adaptiven Immunsystems auf ein Antigen reagieren können, muss dieses zuerst erkannt werden. T-Zellen verfügen über einen antigenspezifischen Rezeptor, der fremde Peptid-Antigene erkennen kann. Voraussetzung für diesen Erkennungsprozess ist die Präsentation der

Fremdpeptide auf der Oberfläche von Makrophagen, dendritischen Zellen oder anderen antigenpräsentierenden Zellen über ein spezialisiertes Protein – das MHC Molekül.

MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle oder auch Haupthistokompatibilitätskomplexe verfügen über eine Furche, die Peptide aufnehmen und binden kann, um eine T-Zellerkennung zu ermöglichen. MHC-Moleküle sind in zwei Klassen unterteilt. Zellen der MHC- Klasse I nehmen Antigene auf, die von Viren und anderen cytoplasmatischen Pathogenen abstammen. Antigene von Krankheitserregern, die sich in Endosomen und Lysosomen vermehren, werden von Zellen MHC der Klasse II prozessiert und über eine Peptidbindungsfurche gebunden und präsentiert. Auch die nicht infizierte Zelle zeigt zelleigene Peptide, die ebenfalls an MHC-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche erscheinen [12].

Alle MHC-Moleküle werden im Cytosol gebildet und reifen anschließend im ER. Während MHC-Klasse I Moleküle im ER mit cytoplasmatisch gebildeten Peptiden für die anschließende Oberflächenpräsentation beladen werden, muss bei MHC-Klasse II Molekülen eine frühzeitige Beladung im ER verhindert werden. Dies geschieht über ein spezifisches Protein, die MHC-Klasse II assoziierte invariante Kette (Ii). Die Ii bindet mit neu synthetisierten MHC-Klasse II Molekülen, indem sie die Peptidbindungsfurche belegt und eine Peptidbindung nicht stattfinden kann [57]. Weiterhin dirigiert die Ii das MHC-Klasse II Molekül aus dem ER zu einem endosomalen Kompartiment, wo eine Beladung des MHC Moleküls mit einem aufgenommenen Peptid stattfinden kann, wenn ein passendes Peptid vorhanden ist. MHC-Klasse II Moleküle, die nicht mit einem externen Peptid beladen werden, binden weiterhin an Fragmente der Ii. Dies deutet darauf hin, dass MHC Moleküle im Überschuss gebildet werden und im Falle einer Infizierung mit einem pathogenen Erreger, genügend MHC-Klasse II Moleküle für eine Antigenbeladung zur Verfügung stehen [38, 92]. Der Proteinkomplex des MHC II ist aus vier extrazellulären Domänen, bestehend aus zwei α - und β - Untereinheiten aufgebaut. Die proteinkodierenden Gensequenzen des MHC-Komplexes beim Menschen (HLA-DP/-DQ/-DR) sind auf Chromosom 6, bei der Maus (I-A und I-E) auf

Chromosom 2 angelegt. In der in diesen Experimenten eingesetzte SJL-Maus ist durch Inzucht der genetische Polymorphismus der MHC-Moleküle aufgehoben, wodurch alle Antigen-präsentierenden Zellen das identische MHC-Molekül I-A^S exprimieren. Dieses MHC-Molekül wird in den von uns eingesetzten MHC Klasse II Tetrameren verwendet [11].

1.3 Antigenerkennung und Zellaktivierung im adaptiven Immunsystem

T- Zellen benötigen die Präsentation von Peptiden über MHC-Moleküle, um ein Antigen erkennen und Effektorfunktionen einleiten zu können.

B-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche ebenfalls Antigenrezeptoren. Diese B-Zellrezeptoren sind antigenerkennende Immunglobuline, die nicht sezerniert, sondern auf der B-Zelloberfläche integriert sind. Über diese Rezeptoren sind B-Zellen in der Lage, ein Antigen direkt zu erkennen. Dies führt zur selektiven Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen zur gezielten Elimination eines Antigen/Pathogen. Plasmazellen sind ausdifferenzierte B-Zellen, die sich auf die Sekretion von Immunglobulinen spezialisiert haben. Die durch aktivierte Plasmazellen sezernierten Immunglobuline können damit auch extrazelluläre Antigene erkennen.

T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche einen Rezeptor, der in der Lage ist, bestimmte Peptidfragmente im Zusammenhang mit MHC-Molekülen zu erkennen. Der T-Zellrezeptor (TCR) selbst ist ein Komplex von Molekülen aus einem Heterodimer von entweder $\alpha\beta$ - oder $\gamma\delta$ - Ketten, die nicht-kovalent mit fünf CD3-Untereinheiten zusammengelagert auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Die Moleküle des CD3-Komplexes vermitteln die Transduktion von T-Zellaktivierungssignalen über den TCR in die Zelle. Der TCR erkennt keine nativen Proteine. Es werden nur kurze Peptidfragmente (9-13 Aminosäuren), die von Proteinantigenen stammen und über APCs aufgenommen und über MHC-Moleküle präsentiert werden, erkannt. [76]

T-Zellen sind eine nicht einheitliche Population. Sie werden in zwei große

Gruppen unterteilt. Man unterscheidet sie aufgrund ihrer vorkommenden Zellproteine CD (Cluster of Differentiation) 4 und CD8 und durch die Klassen von MHC- Molekülen, die sie durch ihren TCR erkennen können. CD8+ T-Zellen erkennen MHC-Klasse I, CD4+ T-Zellen MHC Klasse II. T-Zellen, die CD8 positiv sind, werden auch als zytotoxische T-Zellen bezeichnet. Sie sind in der Lage, infizierte Zellen zu erkennen und in diesen Zellen programmierten Zelltod (Apoptose) zu induzieren. Dadurch übernehmen sie eine direkte Effektorfunktion im adaptiven Immunsystem. T-Helferzellen sind die andere Gruppe von Zellen, die durch das Oberflächenmolekül CD4 identifiziert werden können.

1.4 T-Zellen, Funktion und Aufgaben

1.4.1 Der Thymus – Ort der Reifung und Selektion von T-Zellen

T-Zellen können im Rahmen der Immunabwehr fremde Peptidfragmente, die beispielsweise aus Hüllen von Bakterien stammen, erkennen. Damit eine spezifische Erkennung erfolgen kann, muss zuvor das fremde Peptidfragment über MHC-Moleküle den T-Zellen angeboten und präsentiert werden. Erst daraufhin kann eine Aktivierung der Zellen über Kostimulation erfolgen.

Der Thymus spielt in der Reifung von T-Zellen eine entscheidende Rolle. Hier entstehen sowohl CD4+ T-Zellen, als auch CD8+ T-Zellen. Die spezifischen und zugleich vielfältigen T-Zell-Rezeptoren, mit deren Hilfe Antigene erkannt werden, entstehen hier durch zufällige somatische Rekombination ihrer Gene.

Der Thymus ist ebenfalls dafür verantwortlich, dass die Funktion der zukünftigen T-Zellen überprüft und damit deren Integrität im Immunsystem garantiert werden kann. Eine wesentliche Funktion des Thymus liegt in der Elimination von entwickelnden Lymphozyten, die körpereigene Antigene erkennen und damit pathologische, autoimmune Reaktionen gegen körpereigenes Gewebe auslösen könnten. Das Prinzip der Peptidpräsentation

über MHC-Moleküle spielt hierbei die entscheidende Rolle.

Sich entwickelnde Lymphozyten überleben einen ersten Selektionsschritt, die positive Selektion, wenn sie einen TCR tragen, der mit körpereigenen MHC Molekülen interagieren kann. Grundlegend wird hierbei sichergestellt, dass T-Zellen Antigene über körpereigene MHC-Moleküle erkennen können. T-Zellen, die körpereigene MHC-Moleküle nicht erkennen, wären zusätzlich auch nicht in der Lage, adäquat auf ein körperfremdes Antigen zu reagieren. Somit sichert die positive Selektion die Fähigkeit, auf Antigene zu reagieren, wenn diese über MHC-Moleküle präsentiert werden [21, 43, 108].

Durch einen weiteren Selektionsschritt werden Lymphozyten entfernt, deren TCR körpereigene Antigene (Autoantigene) in Assoziation an körpereigene MHC Moleküle erkennt. Dieser auch als negative Selektion bekannte Schritt stellt sicher, dass autoreaktive Lymphozyten weitgehend eliminiert werden, noch bevor sie völlig ausgereift sind und autoimmune Reaktionen auslösen können [21, 99].

1.4.2 Aktivierung von T-Zellen durch Kostimulation

Die nun naiven T-Zellen verlassen den Thymus und gelangen zum peripheren lymphatischen Gewebe, den Lymphknoten und der Milz.

Treffen T-Zellen auf ein Antigen, das durch ihren TCR erkannt werden kann, erfolgt eine Aktivierung der Zelle, um eine suffiziente Immunantwort zu ermöglichen. Damit diese erfolgen kann, benötigt die T-Zelle weitere Signale von Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die über kostimulatorische Moleküle vermittelt werden. Dazu zählen B7-Moleküle auf APCs, die mit CD28 auf T-Zellen interagieren. Ohne diese Kostimulation kann eine T-Zelle nicht aktiviert werden [16, 81]. Neben aktivierenden kostimulatorischen Molekülen wurden auch hemmende Signale entdeckt. Dazu zählen programmed death-1 (PD-1), cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) und B and T Lymphocyte attenuator (BTLA) [52, 101]. Das induzierbare kostimulatorische

Molekül (ICOS), ein weiteres Mitglied der CD28/CTLA-4-Familie, wird nach Aktivierung von T-Zellen exprimiert und scheint bei der Unterdrückung von T-Zellantworten wichtiger Bestandteil zu sein. Ebenso konnte gezeigt werden, dass bei ICOS- Knockout – Mäusen eine höhere Anfälligkeit für die Induktion von Autoimmunerkrankungen besteht. ICOS scheint in diesem Zusammenhang eine schützende Aufgabe bei der Vermeidung von Autoimmunität einzunehmen. Bei der experimentellen Blockade von BTLA-4 und PD-1 konnte gezeigt werden, dass eine Progression und ein schwerwiegender Verlauf der Erkrankung im Tiermodell resultierte [26, 34].

1.4.3 T-Helferzellen und ihre Subtypen

Welche T-Zellantwort im Rahmen einer Immunantwort entsteht, wird durch Pathogen-assoziierte Molekularmuster (PAMPs) eines Erregers, ihre Interaktion mit APC und durch die dabei produzierten Zytokine determiniert. APC, die einen Erreger im Gewebe erkannt haben, wandern in die drainierenden Lymphknoten und aktivieren dort zytotoxische CD8⁺ T-Zellen, die infizierte Zellen direkt angreifen und zerstören können und Helfer CD4⁺ T-Zellen die weitere Immunreaktionen koordinieren.

CD4⁺ T-Helferzellen (T_H) werden in mehrere Untergruppen unterteilt:

T-Helferzellen Typ 1 (T_{H1}) können zellvermittelte Immunantworten und direkte Gewebeschädigungen hervorrufen sowie antikörpervermittelte Reaktionen, im Besonderen für Subklassen der G-Isotypen von Immunglobulinen (IgG) 1 und 3 unterhalten.

T-Helferzellen des Typs 2 (T_{H2}) spielen besonders bei antikörpervermittelten Antworten, speziell bei Allergien, die durch einen IgE- und IgG4-Isotyp hervorgerufen sind eine wichtige Rolle [17, 18, 62]. T-Zellen, die das Zytokin Interleukin 17 sezernieren, werden als T_{H17} Zellen abgegrenzt [88]. T-Zellen, die darauf spezialisiert sind, die Aktivität anderer T Zellen zu hemmen sind durch Expression des Transkriptionsfaktors FOXP3 charakterisiert und werden

als regulatorische T-Zellen (T_{reg}) bezeichnet.

Definitionsgemäß werden T_H -Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Zytokinausstattung voneinander unterschieden. Die Gruppe der T_H1 -Zellen sezernieren TNF (Tumor Nekrosefaktor) - α , β und IFN (Interferon)- γ . Durch die Gabe von IL (Interleukin) -12 können T_H1 -Zellen aus nativen T-Helferzellen ausdifferenzieren. Des Weiteren produzieren aktivierte T_H1 -Zellen IL-2, IL-3 sowie GM-CSF.

T_H2 -Zellen sind charakterisiert durch ihre Fähigkeit zur Sekretion von IL-4 und 10. Weiterhin unterstützen T_H2 -Zellen B-Zellen bei der spezifischen Ig-Produktion und reagieren auf Antigene, die hohe Antikörperspiegel zur Elimination fremder Antigene erfordern, wie beispielsweise verkapselte Bakterien oder bestimmte Parasiten.

Neben der koordinierten Elimination von unterschiedlichen Erregern spielen T_H -Zellen eine zentrale Rolle bei allergischen Reaktionen vom Sofort-Typ. Typischerweise wird dabei durch Kontakt mit einem Allergen eine überschießende Immunantwort gegen eigene Zellen und Gewebestandteile hervorgerufen, die neben Mastzellen und basophilen Granulozyten hauptsächlich durch T_H2 -Zellen initiiert wird [17, 32]. Neben schnellen allergischen Reaktionen vom Sofort-Typ nehmen T_H -Zellen bei autoimmunen Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis oder der Multiplen Sklerose eine tragende Rollen hinsichtlich direkt vermittelten Gewebeschädigungen ein [22, 24].

1.4.4 Regulatorische T-Zellen und ihre Funktion

Neben aktivierenden Effektorzellen, wie den T-Helferzellen, sind im immunologischen Zusammenspiel Zellen mit suppressiven Eigenschaften unerlässlich, die einerseits einen Schutz gegenüber Antigenen zulassen, aber andererseits selbst-gerichtete Immunreaktionen kontrollieren.

Bislang wurden unterschiedliche Typen von T-Zellen identifiziert, die eine inhibierende Funktion gegenüber anderen T-Zellen aufweisen. Regulatorische

T-Zellen reifen im Thymusgewebe und tragen die Oberflächenmoleküle CD4 und CD25. Diese Zellpopulation macht etwa fünf bis zehn Prozent der gesamten Anzahl an T-Zellen aus. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Immunantwort gegenüber Fremdartigen und bei der Entstehung und Unterhaltung von peripherer Toleranz gegenüber körpereigenen Proteinen [78, 80, 82]. Defekte bei CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen können im Tiermodell und beim Menschen autoimmune Erkrankungen begünstigen. Ein Transfer von CD4+CD25+ regulatorischen T-Zellen kann hingegen autoimmune Antworten supprimieren. Zudem können diese Zellen bei der Etablierung von Toleranz gegenüber transplantierten Organen eine tragende Rolle einnehmen [47, 78, 82].

Die Mechanismen, die CD4+CD25+ regulatorische Zellen im einzelnen anwenden, um ihre immunsuppressive Wirkung auszuspielen, sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, dass für die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen ein antigenspezifischer Prozess im Thymusgewebe und eine antigenspezifische Stimulation in der Peripherie nötig ist, damit diese Zellen ihre vollständige immunsuppressive Kapazität erlangen [94]. Interessanterweise funktioniert die Unterdrückung von Immunantworten durch regulatorische T-Zellen Antigen unspezifisch [97].

Regulatorische T-Zellen können Interleukin (IL)- 10 freisetzen und damit die IL-2-Produktion in Effektor T-Zellen unterdrücken [96]. Zusätzlich induzieren sie über die Produktion von CD95 (Fas) einen programmierten Zelltod durch Apoptose bei aktivierten T-Zellen.

Regulatorische Zellen exprimieren konstitutiv die immunsuppressiven Moleküle CTLA-4 und den glukokortikoid induzierbaren TNF-Rezeptor (GITR). Weder die Expression dieser genannten Moleküle noch die Produktion von IL-10 oder TGF- β sind jedoch ein eindeutiges Charakteristikum für regulatorische T-Zellen [82]. Ein spezifisches Merkmal für diese Zellen ist der forkhead-winged helix Transkriptionsfaktor FOXP3 [28]. Passend zu diesen Ergebnissen sind Beobachtungen, dass Mutationen im FOXP3-Gen schwere autoimmune Erkrankungen im Tiermodell und Menschen begünstigen [103].

1.5 B-Zellen, im Zusammenspiel mit T-Zellen

Neben den für die Abwehr von Antigenen bereits besprochenen Funktionen der T-Zellen, wird hier auf die Aufgaben der B-Zellen näher eingegangen.

B-Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche Immunglobulin-Moleküle, die als B-Zellrezeptoren (BCR) für Antigene dienen. Anders als T-Zellen, die gebundene und lösliche prozessierte Peptidfragmente via MHC-Moleküle erkennen, können B-Zellen vollständiges, natives Antigen erkennen [67].

Die wichtigste Funktion von B-Zellen ist die Produktion von Antikörpern. Daneben fungieren sie auch als APC und stellen eine effiziente Einheit bei der Antigenverarbeitung dar.

Die Entwicklung von B-Zellen wird in eine antigenunabhängige und eine antigenabhängige Phase unterteilt. In den primären Lymphorganen erfolgt die antigenunabhängige Reifung der B-Zelle. Zufällige Umlagerungen der Ig-Gene können die Bildung autoreaktiver Antikörper zur Folge haben. Dies kann durch den Mechanismus des „BCR-Editing“ korrigiert werden. Schlägt das Editing fehl, kann über negative Selektion bereits im Knochenmark, nach Bindung des BCR an ein Autoantigen, eine Apoptose der autoreaktiven Zellen induziert werden [9, 93].

Die antigenabhängige Phase wird durch Interaktion mit Antigenen und reifen B-Zellen gefördert, die zu Induktion von Gedächtnis-B-Zellen, Plasmazellen und Ig-Klassenänderung führt. Diese Stadien der Reifung erfolgen in sekundären Lymphorganen, wie den Lymphknoten und der Milz .

Anders als die Entwicklung des T-Zellrepertoires, das im Thymus vor einem eigentlichen Antigenkontakt entsteht, wird bei B-Zellen durch Antigen, Ig-Gene stimuliert und über den Prozess der somatischen Mutation modifiziert.

Wie bereits beschrieben, können B-Zellen über ihren BCR ein Antigen erkennen. Jedoch ist für eine effektive Antikörperproduktion mit verschiedenen Isotypen, die Hilfe von T-Zellen von unmittelbarer Wichtigkeit. Ohne diese T-Zellhilfe kann keine effektive Beseitigung von Fremdantigenen erfolgen. Diese Interaktion dient der Regulation der Antikörperproduktion und somit der Regulation der B-Zellantwort.

Damit es zu einer Antikörperproduktion kommt, muss das Antigen durch B-Zellen prozessiert und an deren Oberfläche T_H-Zellen präsentiert werden. Anschließend kann eine Bindung des TCRs an das MHC-Molekül erfolgen. Zusätzlich wird eine Bindung zwischen dem CD40-Ligand der T-Zelle und CD40 auf der Oberfläche der B-Zelle benötigt, um über diese Kostimulation die B-Zell-T-Zellinteraktion zu vervollständigen. Erst daraufhin kann ein Prozess, der als Isotypen-Switching bekannt ist, in der antigenspezifischen B-Zelle erfolgen und zusammen mit Zytokinen, wie IL-4 und TGF- β , die B-Zelle zu einer Ig-sezernierenden Zelle ausreifen lassen [6, 36, 83].

1.6 Toleranz und Autoimmunität

Eine der grundlegenden Eigenschaften unseres Immunsystems besteht in der Fähigkeit zur Diskriminierung zwischen fremden Antigenen und körpereigenen Strukturen. Ohne diese Grundlage würden eigene Zellen und Organe von Immunzellen attackiert und zerstört. Das Immunsystem muss aus diesem Grund in seiner Entwicklung lernen, welche Oberflächenmerkmale körpereigen sind. Für diese Fähigkeit wird in der Immunologie auch der Begriff der Toleranzentstehung verwendet.

Toleranz im Immunsystem beschreibt begrifflich die Abwesenheit von aktivierenden Prozessen, die autoreaktive Reaktionen zur Folge hätten. Die Initialisierung von antigenspezifischer Toleranz ist für die Erhaltung eines Gleichgewichts im gesamten Immunsystem unerlässlich. Autoreaktive Zellen können somit in Schach gehalten werden, um das Auftreten von autoimmunen Erkrankungen zu verhindern. Des Weiteren spielt Toleranz bei der Akzeptanz von Transplantaten eine unerlässliche Rolle [33].

Der Thymus stellt über seine Selektionsmechanismen bei der T-Zellreifung sicher, dass autoreaktive T-Zellen eliminiert werden und nicht in die Peripherie gelangen. Dieser Selektionsprozess ist allerdings nicht vollständig, da unter anderem nicht alle Autoantigene im Thymus repräsentiert werden. Es existieren

zusätzliche Mechanismen, die in der Peripherie die Aktivität autoreaktiver Zellen kontrollieren. Regulatorische T-Zellen spielen mit ihrer suppressiven Fähigkeit gegenüber autoreaktiven T-Zellen in diesem Zusammenhang eine wichtige Rolle [25, 78, 79, 82].

Neuere Daten zeigen, dass regulatorische T-Zellen direkt aktivierte B-Zellen abtöten können und somit das Entstehen von Autoimmunität verhindern [106]. Dendritische Zellen haben ebenfalls das Potential eine Aktivierung autoreaktiver Zellen zu unterdrücken und die Expansion von regulatorischen T-Zellen zu fördern [89-91].

B-Zellen, die autoreaktive Eigenschaften aufweisen, werden dem bereits oben beschriebenen Rezeptor-Editing unterzogen, um die Expression von autoreaktiven BCR zu supprimieren. Viele Autoimmunerkrankungen werden durch eine Auto-Antikörperbildung unterhalten, jedoch ist hierbei eine Kombination und Zusammenspiel aus autoreaktiven T- und B- Zellen für diese Erkrankungen oft die unabdingbare Grundlage.

Es existiert eine große Zahl autoimmuner Erkrankungen, die sich in der jeweiligen Organmanifestationen und den zugrunde liegenden Mechanismen unterscheiden. Aktuelle Bestrebungen versuchen Mechanismen der Entstehung von Autoimmunität weiter zu entschlüsseln und gezielte Therapien, im Bereich der Toleranzinduktion oder der Hemmung von aktivierten autoreaktiven Zellen zu entwickeln.

Im folgenden Abschnitt wird eine der Modellerkrankung für Autoimmunität, die Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) näher erklärt und im immunologischen Kontext beschrieben.

1.7 Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), eine Modell-Autoimmunerkrankung

Tiere, die mit Myelin-Bestandteilen aus dem zentralen Nervensystem (ZNS) immunisiert werden, entwickeln eine autoimmune demyelinisierende Erkrankung des ZNS [73-75]. Diese Erkrankung des ZNS wird auch Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) genannt. Sie ist das Ergebnis einer durch CD4+ T-Zellen vermittelten Antwort des Immunsystems auf spezifische Proteine des ZNS und dient als ein Krankheitsmodell der Multiplen Sklerose (MS).

Immunisiert man SJL-Mäuse, die besondere Anfälligkeit für eine EAE aufzeigen, eine Mischung aus Bestandteilen des Rückenmarks, so konnte gezeigt werden, dass sich in den erkrankten Mäusen die immunologischen Reaktionen auf ein einziges Peptid-Epitop, dem Myelin Proteolipid Protein (PLP) Peptid 139-151 konzentrieren [102]. Diese dominante Immunantwort wird durch T-Zellen vermittelt, die ein breites Repertoire an verschiedenen T-Zellrezeptoren (TCR) aufweisen [51].

Das Wissen, dass autoreaktive CD4+T-Zellen dabei eine Schlüsselrolle einnehmen, markierte einen signifikanten Fortschritt in unserem Verständnis für die Pathologie von autoimmunen Erkrankungen. Die meisten autoreaktiven T-Zellen werden bereits während der Reifung im Thymus über verschiedene Mechanismen der Selektion eliminiert. Die Selektion an autoreaktiven T-Zellen ist jedoch nicht vollständig und einige dieser Zellen entkommen in die periphere Zirkulation, wo sie über Mechanismen der Toleranzentstehung in Schach gehalten werden.

In der Peripherie, also in der Blutzirkulation und in sekundären lymphatischen Geweben können autoreaktive Zellen nicht aktiviert werden bevor sie nicht mit geeigneten Antigenen und passendem MHC-Komplex unter dem Einfluss von kostimulatorischen Molekülen zusammentreffen. In entzündlichen Erkrankungen des ZNS, wie der EAE und der MS wandern aktivierte autoreaktive T-Zellen unter Überwindung der Bluthirnschranke in das Gehirn ein und verursachen dort ihren krankheitstypischen Schaden [8]. Im ZNS müssen

autoreaktive T-Zellen durch lokale APC, die ebenfalls kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, aktiviert werden, um eine Entzündungsreaktion und Gewebsschädigung auszulösen [16]. Grundlegend wird davon ausgegangen, dass eine EAE und MS einer pathologischen Immunreaktion vom verzögerten Typ zuzuordnen ist, die durch T-Zellen vom Phänotyp Th1 unterhalten wird [104]. Obgleich myelin-antigen-spezifische Th1 Zellen nötig sind um eine Erkrankung hervorzurufen, ist die Mehrzahl der in einer EAE rekrutierten Zellen nicht spezifisch gegen ein bestimmtes ZNS-Antigen gerichtet. Die Mehrzahl dieser Zellen, die in Läsionen im ZNS gefunden wurden, bestehen aus T-Zellen, Makrophagen und zu einer geringeren Anzahl aus B-Zellen [85]. Bisher wird davon ausgegangen, dass unspezifisch rekrutierte Zellen eine Hauptrolle an der Gewebeschädigung einnehmen. Aktivierte Makrophagen lösen Myelin von den Axonen und zahlreiche Zytokine, einschliesslich IL-1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α unterhalten eine unspezifische Entzündungsreaktion. Mehrere Befunde deuten darauf hin, dass in peripheren lymphatischen Organen, wie Lymphknoten oder Milz, T-Zellen existieren, die potentiell empfänglich für Auto-Antigene sind. T-Zellen, die reaktiv auf Myelin Basisches Protein [105], Myelin Proteolipid Protein [58] und andere Auto-Antigene reagieren, können aus peripherem Blut von gesunden Menschen isoliert und in vitro kultiviert werden. Um solche autoreaktiven Zellen und deren Regulation bzw. Aktivierung in der Peripherie genauer untersuchen zu können, ist es hilfreich ein Modell zu besitzen, in dem naive T-Zellen mit hoher Eigenfrequenz vorkommen, die mit einem bekannten Auto-Antigen reagieren können. SJL-Mäuse, die das MHC-Molekül H-2^S exprimieren, bieten sich für ein solches Modell an. Es konnte bereits gezeigt werden, dass in SJL-Mäusen eine hohe Frequenz der T-Zellen gegen das Epitop Myelin Proteolipid Protein (PLP) 139-151 gerichtet sind. Für die hohe Nativfrequenz an PLP139-151-reaktiven T-Zellen (1/20000 CD4+Zellen) wird eine fehlende Selektion und Deletion im Thymus und eine zusätzliche Zellvermehrung durch kreuzreaktive Antigene in der Peripherie verantwortlich gemacht [5].

1.8 Multiple Sklerose (MS)

MS ist eine chronisch entzündliche Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Erkrankung beginnt in den meisten Fällen im jungen Erwachsenenalter und ist trotz der Fortschritte der Behandlung immer noch eine der führenden Ursachen einer Behinderung in der weißen Bevölkerung [64]. Die genaue Ätiologie der MS ist unbekannt. Viele Untersuchungen deuten jedoch auf eine zentrale Rolle des Immunsystems bei der Entstehung der Erkrankung hin. Darüber hinaus spielen eine genetische Prädisposition und Umwelteinflüsse eine Rolle. Die bestimmende Rolle der Gene in Bezug auf Anfälligkeit für MS wurde in Konkordanzstudien ermittelt. Bei monozygoten Zwillingen liegt das Erkrankungsrisiko bei bereits festgestellter MS eines Zwillings bei 30% und nur bei 3% unter Geschwistern von MS Patienten [77]. Untersuchungen des Erbgutes von Patienten zeigten im Bereich des humanen leukozyten Antigens (HLA) einen Genlocus, der mit der Erkrankung assoziiert ist. Die beiden Allele HLA-DR1501 und HLA-DQ0601, die Restriktionselemente von T-Zellen kodieren, sind mit einem 2-4fach erhöhtem Erkrankungsrisiko für MS assoziiert.

Migrationsstudien belegen, dass Immigranten, die aus ihrem Heimatland mit hoher in ein Land mit niedriger Erkrankungsprävalenz ziehen, das persönliche Risiko an einer MS zu erkranken sinkt. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Migranten aus Ländern mit niedriger Prävalenz das höhere Erkrankungsrisiko des Einwanderungslands annehmen. Dies unterstützt die Annahme, dass neben dem genetischen Profil auch unbekannte Umweltfaktoren eine wichtige Bedeutung für das Erkrankungsrisiko mit beizutragen [29].

Im Interesse aktueller Forschung steht die weitere Aufklärung immunologischer Mechanismen, die der Entstehung und Chronifizierung der MS zugrunde liegen.

1.8.1 Grundlagen der Immunologie bei Multipler Sklerose

Das ZNS ist das Organ, welches bei der MS Ziel autoreaktiver Reaktionen des Immunsystems darstellt. Jeder Schaden im Gewebe des ZNS führt zu einer Aktivierung von ortsständigen Immunzellen. Dies sind im Besonderen Zellen der Mikroglia, die über Regulation der MHC-Moleküle und kostimulatorische Faktoren, sowie über die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen die Eintrittspforte für Monozyten, Lymphozyten und dendritische Zellen in die Gewebeläsion bahnen. Die Mikroglia ist somit ein wichtiger Faktor für die Entwicklung und Unterhaltung dieser Entzündungsreaktion. Dendritische Zellen scheinen eine zentrale Rolle in der Antigenpräsentation für die eindringenden Zellen zu spielen [35, 41]. Parallel zum Eindringen der Immunzellen in die Läsionen gelangen Antigene danach in die Peripherie. Dieses Phänomen ist aus Infektionen des ZNS bereits bekannt. Die fremden Antigene, die in das ZNS eindringen, werden sehr schnell in zervikalen oder paravertebralen Lymphknoten detektiert. Es bleibt dabei unklar, ob diese Antigene in die Lymphknoten passiv drainiert oder über aktive Mechanismen transportiert werden. Dort präsentieren dendritische Zellen das Peptid-Antigen, gebunden an MHC Klasse I und II Moleküle ankommenden T-Zellen. In Gegenwart von Kostimulatorischen Molekülen, die auf Antigen präsentierenden Zellen (APC) exprimiert werden, folgt eine Aktivierung und klonale Expansion der beteiligten T-Zellen. Diese Antigen-spezifischen T-Zellen werden über chemische Botenstoffe an die Stellen der Läsion im Gehirn unter Überwindung der Blut-Hirn-Schranke geleitet. MHC Klasse II-Moleküle werden hinreichend nur auf professionellen APCs (B-Zellen, Makrophagen, dendritische Zellen) gefunden, hingegen können MHC Klasse I-Moleküle bei Entzündungen im ZNS auf allen Zellen angetroffen werden [20, 63]. In perivaskulären Bereichen und in den Hirnhäuten werden hauptsächlich CD4+ T-Zellen angetroffen, CD8+ T-Zellen scheinen in das Parenchym der entzündeten Läsionen einzudringen [30]. Nach Kontakt mit ihrem Antigen verharren die T-Zellen und beginnen lokale Effektorfunktionen einzuleiten. CD4+ T-Zellen rekrutieren Makrophagen, welche proinflammatorische Zytokine und toxische Moleküle, IL-1, IL-6 und TNF- α

ausschütten. CD8⁺-T-Zellen scheinen direkt MHC-Klasse I exprimierende Zellen, sowie Oligodentroyten und Neurone angreifen zu können.

B-Zellen wird ebenfalls in den Lymphknoten über dendritische Zellen Antigen-Peptid präsentiert. Über ihre B-Zellrezeptoren werden diese Antigene wahrgenommen und bei Anwesenheit von antigen-spezifischen T-Helferzellen erfolgt deren Aktivierung und Expansion. Diese B-Zellen gelangen wie T-Zellen in das ZNS und infiltrieren perivaskuläre Zwischenräume und die Hirnhäute. Dort sezernieren sie lösliche Immunglobuline, passend zu dem über den B-Zellrezeptor gebundenen Antigen [2]. Eine Frage bleibt jedoch weiterhin offen: Erfolgt die letztendliche Differenzierung von T-Zellen und B-Zellen am Ort der Effektwirkung, also im Gehirn, oder in peripheren lymphatischen Organen, wie den Lymphknoten. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zu dieser Fragestellung hinsichtlich Differenzierung und Dynamik autoreaktiver T-Zellen leisten.

1.8.2 T- Zellen und ihre Rolle bei Multipler Sklerose

Wegen der Schlüsselrolle, die autoreaktive T-Helferzellen in der EAE einnehmen, wird angenommen, dass es sich bei der MS ebenfalls um eine durch T-Zellen vermittelte Erkrankung handelt. Viele Studien haben die Rolle autoreaktiver, myelin-spezifischer T-Helferzellen bei der MS untersucht [86]. Ihre Rolle in der Pathogenese dieser Erkrankung ist jedoch noch lange nicht fassbar. Myelin-spezifische T-Zellen können aus dem Blut und Liquor von MS Patienten isoliert werden. Diese Zellen werden auch bei gesunden Individuen gefunden [68]. Obwohl humane myelin-spezifische T-Zellen in transgenen Tiermodellen Affinität zu enzephalitogenen Epitopen aufweisen, konnte unter Berücksichtigung des Phänotyps und der Frequenz dieser Zellen kein signifikanter Unterschied zwischen MS Patienten und gesunden Probanden gefunden werden [40, 56].

Studien ergaben, dass die in Läsionen infiltrierten T-Zellen von einer gemeinsamen Vorläuferzelle, die die selbe Spezifität für ein Antigen aufweist hervorgehen [66]. Jüngere Untersuchungen konnten dieses Phänomen, auch als TCR-Expansion bekannt bestätigen. Interessanterweise konnte dies vor allem in der CD8+Population und kaum bei CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden [7, 44]. Die nachweisbar geringe Anzahl dieser T-Zellklone im Blut lässt darauf schließen, dass diese Zellen vor allem in den Läsionen des ZNS persistieren [44, 84]. Obwohl diese Untersuchungen zeigen, dass vor allem eine durch Antigen verursachte Infiltration von CD8+-T-Zellen in Läsionen stattfindet, ist ihre funktionelle Rolle bei der MS noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.9 MHC-Tetramere und ihre Bedeutung bei der Detektion von autoreaktiven Zellen

T-Helferzellen nehmen eine zentrale Stellung in der Koordination des Immunsystems ein. Bislang war es nicht möglich, T-Zellen, die gegen ein bestimmtes Antigen gerichtet sind, direkt, das heißt ohne antigenspezifische Stimulation, innerhalb dieses heterogenen Repertoires zu untersuchen.

In den letzten Jahren wurde eine neue Technik entwickelt, bei der antigenspezifische T-Zellen direkt mit Hilfe von fluorochrommarkierten Tetrameren aus Peptid/MHC-Komplexen dargestellt werden können. Diese Reagenzien haben den Charakter einer antigenspezifischen Sonde, die nur an die peptidspezifischen T-Zell-Rezeptoren bindet. Die Verwendung von MHC Klasse I-Tetrameren, mit denen sich spezifische CD8⁺ T-Zellen darstellen lassen, hat grundlegende neue Erkenntnisse über die Dynamik dieser Zellen erbracht [3, 15, 48]. MHC Klasse II-Tetramere, zur Darstellung von CD4⁺ T-Helferzellen sind technisch schwieriger herzustellen und die Frequenz spezifischer CD4⁺T-Zellen ist in den meisten Systemen gering. [4, 14, 48, 53, 65, 71, 72].

Für die hier vorgestellte Arbeit wurden MHC Klasse II-Tetramere für murine MHC Klasse II Moleküle I-A^S verwendet, die das PLP139-151-Epitop tragen, also das dominante enzephalitogene Epitop der SJL-Maus [11]. Mit diesen Tetrameren ist es möglich, PLP-spezifische T Helferzellen innerhalb eines physiologischen T-Zell-Repertoires direkt ex vivo zu untersuchen.

1.10 Fragestellungen dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Mechanismen der Reaktivierung von autoreaktiven T-Zellen im Zeitraum von 18-32 Tagen nach erfolgter Induktion der Modellerkrankung EAE.

Dabei sollen folgende Fragen nach wissenschaftlichen Gesichtspunkten erarbeitet werden:

1. Welche Phänotypen von Lymphozyten sind bei einer klinischen Reaktivierung der Erkrankung, ohne erneute Immunisierung beteiligt?
2. Sind autoreaktive T-Helferzellen gegen das immunisierte Epitop in Organen des peripheren Immunsystems identifizierbar?
3. Wird durch periphere Aktivierung der autoreaktiven T-Zellen eine Reaktivierung der Erkrankung eingeleitet?
 - a. Sind Aktivierungs-, Adhäsion und Apoptoseparameter in diesem Kontext über den beobachteten Zeitraum messbar?
4. Können aktivierte autoreaktive T-Zellen im Zielorgan der Erkrankung, dem ZNS nachgewiesen werden?
5. Welche Rolle nimmt die Population der regulatorischen T-Zellen während einer Reaktivierung der Erkrankung ein?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Tabelle der verwendeten Laborgeräte

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

Mikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotom-Kryostat Cryo-Star HM 560	Microm International GmbH, Walldorf
Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht KG „Assistent“, Sondheim/Rhön
Pinzetten	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen
Schüttel/Mischgerät, wippend, Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
SDS Apparatur	Bio Rad, München
Sterilarbeitsbank BioGARD Hood	the Baker Company, inc., Sanford, Maine, USA
Tischzentrifuge 5414 D	Eppendorf AG, Hamburg
Transferpette® Pipetten (diverse Volumina und Ausführungen)	BrandTech Scientific, Inc., Essex, UK
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wärmebad Typ 1c	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel

2.1.2 Tabelle der verwendeten Verbrauchsmaterialien

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

FACS-Röhrchen klein, Screenmates Poly Tubes 1.4 ml	MATRIX Technologies Corp. LTD, Wilmslow, Cheshire, UK
Feather Disposable Scalpel No. 21	Produkte für die Medizin AG, Köln
Glasgut (Bechergläser und ähnliches)	Schott/Duran, Mainz
Kanülen Sterican® (diverse Größen)	Braun Melsungen AG, Melsungen
Objektträger Standard 76x26 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger SuperFrost® Plus	R. Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen (kristall, gelb, blau)	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nümbrecht
Sterilfilter Minisart® 0,2 µm	Sartorius AG, Goettingen
Stripette® 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10ml, 25 ml	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturflaschen 200 ml Costar®	Corning Incorporated, Corning, USA
Zellsieb, BD Falcon® Cell Strainer 40 µm	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix, Frankreich
Zentrikons Mikrosep 10K Omega	Pall Life Sciences

2.1.3 Tabelle kommerziell erhältlicher Chemikalien, Medien und Enzyme

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

APS	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Aqua dest.	Apotheke Universitätsklinikum, Tübingen
BCA Protein Assay Kit	Bio Rad, München
BSA Fraktion V, pH 7.0, lyophilisiert	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
CaCl ₂	Merck, Darmstadt
CFA	Difco Laboratories, Detroit, USA
CHAPS	SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Diethylether	Merck, Darmstadt
DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Eosin gelblich	Merck, Darmstadt
EUKITT® Eindeckmedium	O. Kindler GmbH & Co, Freiburg
FACS Flow	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Rinse	Becton & Dickinson, Heidelberg
FACS Safe	Becton & Dickinson, Heidelberg
FCS origin: South American	GibcoBRL®, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Glykogen	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hämatoxylin kristallin	Merck, Darmstadt
Hepes Buffer Solution 1 M	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
IMDM (1x), with 25 mM HEPES, with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich

Immersionsöl Micorcopy	Merck, Darmstadt
IPTG	Qiagen, Hilden
KAl(SO ₄) ₂ (Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat, Kalialaun)	Merck, Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kollagenase (Clostridiopeptidase A; EC 4.4.24.3)	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Mycobacterium tuberculosis desiccated H37RA	Difco®, Voigt Global Distribution LLC, Kansas City, USA
NaCl	Merck, Darmstadt
NaIO ₃ (Natriumjodat)	Merck, Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
NH ₄ Cl	SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA
Ni-NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
PBS Dulbeccos`s, w/o Calcium, w/o Magnesium, w/o Sodium bicarbonate	Gibco™, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
Percoll™ (density 1,131 g/ml)	Amersham Biosciences AB, Uppsala, Schweden
Pertussis Toxin (Islet-activating protein)	LIST Biological Laboratories, Inc., Campbell, California, USA
Propidiumjodid, 95%	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Rnasin	Promega GmbH, Mannheim
Streptomycin	Carl Roth GmbH & Co. KG,

	Karlsruhe
TEMED	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Triton X-114	SERVA, Feinbiochemica GmbH & Co. KG, Heidelberg
Tritriplex® III (EDTA)	Merck, Darmstadt
Trizol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trypanblau	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	Merck, Darmstadt
Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt

2.1.4 Tabelle der verwendeten Antikörper

Alle Antikörper wurden von BD Biosciences bezogen.

Antigen	Klon	Fluoreszenz	Isotyp	Konzentration
B220	RA3-6B2	PE	IgG2a	0,1 mg/ml
CD 4	GK1.5	FITC	IgG2b	0,5 mg/ml
CD 4	GK1.5	PE	IgG2b	0,2 mg/ml
CD 4	RM4-5	APC	IgG2a	0,2 mg/ml
CD 8a	53-6.7	PE	IgG2a	0,2 mg/ml
CD 25	7D4	FITC	IgM	0,5 mg/ml
CD 44	IM7	FITC	IgG2b	0,5 mg/ml
CD 69	H1.2F3	FITC	IgG1 λ 3	0,5 mg/ml
CD 62L	Mel-14	FITC	IgG2a	0,2 mg/ml

2.1.5 Zusammensetzung der verwendeten Puffer

2.1.5.1 LB-Medium

50g Casein-Pepton

25g Hefeextrakt

50g NaCl

Mit ddH₂O auf 5l auffüllen, pH=7,0 einstellen

2.1.5.2 Lyse-Puffer:

Urea 8,0 M 240.0 g

1M TrisCl 10 mM 5,0 ml

1M NaH₂PO₄ 0,1 M 50,0 ml

1M Imidazol 5,0 mM 2,5 ml

Add ddH₂O to 500 ml, pH=8,0

2.1.5.3 Wasch-Puffer:

Urea 8,0 M 240.0 g

1M TrisCl 10 mM 5,0 ml

1M NaH₂PO₄ 0,1 M 50,0 ml

1M Imidazol 20,0mM 10,0 ml

Add ddH₂O to 500 ml, pH=8,0

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

Urea 8,0 M 240.0 g

1M TrisCl 10 mM 5,0 ml

1M NaH₂PO₄ 0,1 M 50,0 ml

1M Imidazol 20,0mM 10,0 ml

Triton X-114	1,5 %	7,5 ml
Citrat	50mM	5,0 g
Add ddH ₂ O to 500 ml, pH=8,0		

Wasch-Puffer (CHAPS):

Urea	8,0 M	240.0 g
1M TrisCl	10 mM	5,0 ml
1M NaH ₂ PO ₄	0,1 M	50,0 ml
1M Imidazol	20,0mM	10,0 ml
CHAPS	1%	5,0 g
Add ddH ₂ O to 500 ml, pH=8,0		

2.1.5.4 Erythrozyten-Lyse-Puffer 10-fach konzentriert

45 g	NH ₄ Cl
5 g	KHCO ₃
185 mg	EDTA

Mit ddH₂O auf 500ml auffüllen und pH=7,3 einstellen

2.1.5.5 Komplettes IMDM

100 ml	IMDM
10 ml	FCS, inaktiviert
2 ml	Penicillin/Streptomycin (100x, ergibt Endonz. von 10 µg/ml)
60 µl	β-Mercaptoethanol aus einer 1:100 Verdünnung mit PBS

2.1.5.6 ZNS-Verdau-Lösung

(Mengenangaben für 4 Gehirne)

20 ml	IMDM	
200 µl	DNase I	(aus einer 3000 U/ml-Verdünnung, entspr. 30 U/ml)
20 mg	Kollagenase	(entspr. 1 mg/ml)

2.1.5.7 Percollfraktionen für Dichtegradienten

Percoll• Dichte A (1,095 g/ml) für 4 Gehirne:

10 ml	Percoll®
3,68 ml	PBS

Percoll• Dichte B (1,030 g/ml) für 4 Gehirne:

3 ml	Percoll®
10 ml	IMDM

2.1.5.8 FACS-Puffer

(Mengenangaben gelten für 200 ml Puffer)

1 g	BSA	(entspr. 0,5 %)
0,04 g	NaN ₃	(entspr. 0,02 %)
0,067 g	EDTA	(entspr. 0,9 mM)

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

2.1.5.9 Herstellung der Peptide

Die für die Versuche benötigten Peptide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. rer. nat. Hubert Kalbacher, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung wurde die γ -Fluorenylmethoxycarbonyl-Methode verwendet. Die Aufreinigung erfolgte mittels HPLC. Eine Kontrolle des Produktes erfolgte mittels Massenspektroskopie.

Folgende Peptide wurden verwendet :

MBP 84-96	VVHFFKNIVTPRTP
PLP 139-151	HCLGKWLGHDPKF

2.1.6 Verwendete Versuchstiere

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

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur von T-Zellen zur Titration der Tetramere

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

Platte, damit sich die Zellen an einer Stelle sammeln.

Mit dieser T-Zellpopulation wurden die Tetramere zur Optimierung der Färbekonzentration titriert.

2.2.2 Induktion der EAE

Zur Induktion der EAE wurden die Mäuse mit einer Wasser-in-Öl-Emulsion des Peptids PLP139-151, mit rekombinantem MOG-Protein aa1-120 oder mit dem Peptid MBP 84-96 in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) immunisiert. CFA wurde aus inkomplettem Freund'schen Adjuvans hergestellt, das mit inaktiviertem Mycobacterium tuberculosis in einer Konzentration von 4 mg / ml versetzt wurde. 1 ml dieses CFA wurde mit 1 ml PBS, in dem 1,54 mg PLP139-151-Peptid gelöst waren, in einer 2 ml Glasspritze zu einer Emulsion vermischt. Diese Emulsion wurde nach sorgfältigem Durchmischen verwendet.

Die Immunisierung wurde an mit Diethylether narkotisierten Mäusen durchgeführt. Jeder Maus wurden in beide ihrer Hinterläufe 50 µl der Wasser-in-Öl-Emulsion s. c. injiziert. Nachdem die Mäuse aus der Kurznarkose erwachten, wurden sie mit einer Infrarotwärmelampe bestrahlt, damit sich die Venen im Mausschwanz erweiterten. Mit einer feinen Nadel wurde eine Schwanzvene punktiert und 100 µl Pertussistoxinlösung injiziert. Das PTX wurde in PBS gelöst, die Menge des benötigten PTX durch Vorversuche bestimmt, da jede Charge PTX eine unterschiedliche Potenz zur EAE-Induktion hat.

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

2.2.3 Klassifizierung des Krankheitsgrades

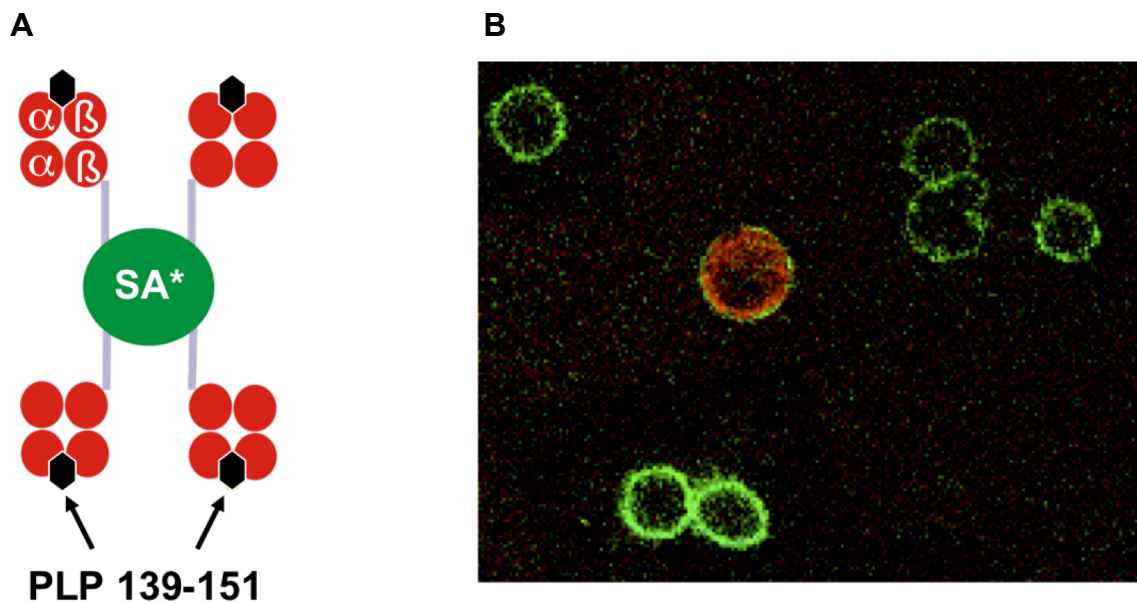
Folgende Krankheitsgrade wurden bei entsprechenden Symptomen vergeben:

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

2.2.4 Herstellung der PLP- und MBP- Tetramere

Bei der Herstellung rekombinanter Peptid/MHC-Klasse II Komplexe wird das Peptid über eine Linker-Sequenz kovalent mit der β -Kette des MHC Moleküls verbunden. Normalerweise wird eine Zusammenlagerung der α - und β -Kette durch die hydrophoben transmembranösen Abschnitte ermöglicht, was jedoch eine Sekretion der rekombinanten Proteine verhindern und die Löslichkeit der fertigen Komplexe herabsetzen würde. Aus diesem Grund wurden die hydrophoben transmembranösen Abschnitte durch Leuzin-Zipper Sequenzen ersetzt, die eine Heterodimerisierung der beiden Ketten bei erhaltener Wasserlöslichkeit ermöglichen. Zur Aufreinigung der Proteine über Nickel- oder Kobalt-Säulen wurde die α -Kette um sechs Histidine verlängert, ebenso wurde an die β -Kette eine Sequenz angehängt, die eine Biotinylierung der Komplexe durch das bakterielle Enzym BirA zulässt. Nach erfolgter Biotinylierung können nun die Komplexe über fluorochrom-markiertes Streptavidin, welches vier Bindungsplätze für Biotin zur Verfügung stellt, tetramerisiert werden. Am 5'-Ende beider Ketten befinden sich Signalsequenzen zur Sekretion der

exprimierten Proteine. Die Sequenz für das spezifische Peptid ist durch zwei Restriktionsschnittstellen flankiert, die einen einfachen Austausch des Epitops möglich machen. Die cDNA Konstrukte zur Tetramerproduktion für die beiden enzephalitogenen Epitope PLP139-151 und MBP84-96 wurden mit molekulargenetischen Methoden hergestellt und in Baculo-virustransfektoren kloniert. Rekombinante Baculoviren wurden mittels Kotransfektion und homologer Rekombination hergestellt. Nach Virusamplifikation erfolgte die Proteinexpression in Sf9 Insektenzellen. Die exprimierten Komplexe wurden aufgereinigt, mit rekombinant hergestelltem Enzym BirA biotinyliert und mit APC-markiertem Streptavidin anschließend tetramerisiert.



A Modell eines PLP139-151 MHC II-Tetramer, mit APC-markiertem Streptavidin*
 B Durch Konfokale Lasermikroskopie dargestelltes PLP139-151 MHC II-Tetramer (rot) mittels doppelfärbung mit CD4-Antikörper (grün) [11].

2.2.5 Präparation von DLN, Milz und ZNS

Die Mäuse wurden direkt vor der Präparation durch CO₂-Gas-Inhalation getötet. Die Mäuse wurden dann mit dem Rücken nach unten auf ein Korkbrett gespannt und mit 70% Alkohol besprüht. Die Haut wurde nun so eröffnet, dass Brustkorb, Bauch und Kniekehlen der Maus zugänglich waren. In der Poplitealregion konnten dann die drainierenden Lymphknoten erkannt werden, die mit zwei spitzen Pinzetten stumpf präpariert wurden. Anschließend wurde die Milz nach der Eröffnung der Bauchhöhle entnommen. Um Lymphozyten der Zirkulation aus dem ZNS zu entfernen, wurden die Mäuse vor der Präparation des ZNS blutleer gemacht. Dazu wurde die vordere Thoraxwand mit einer Schere entfernt und der linke Ventrikel des Herzens mit PBS in einer 20 ml Spritze perfundiert. Die Maus wurde nun auf den Bauch gedreht und die Haut über Schädel und Spinalkanal eröffnet. Mit einem Skalpell wurden Schädelkalotte und Spinalkanal geöffnet und das ZNS am Stück stumpf herausgeschält.

2.2.6 Isolierung der Lymphozyten aus den DLN und der Milz

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

2.2.7 Isolierung der Lymphozyten aus dem ZNS

Das intakte ZNS, inklusive der Meningen wurde zweimal mit PBS gewaschen, mit einem Skalpell in einer Glaspetrischale zerkleinert und mit 5 ml Verdauungslösung in einem 50 ml-Falcon-Tube vermischt. Das ZNS wurde dann 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad verdaut. Das verdaute ZNS wurde mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb mit 40 µm Maschenweite gepresst. Die Zellsuspension wurde dann zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen einer Erythrozyten-Lyse unterzogen. Die im Pellet verbleibenden Lymphozyten wurden aus den Massen an Hirngewebe mit einer Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. Dafür wurde die Zellsuspension in 3 ml der Fraktion B (geringere Dichte) gelöst und in ein 15 ml-Falcon-Tube übertragen. Unter diese Fraktion wurden anschließend 3 ml der dichteren Fraktion A unterlegt. Dieser Dichtegradient wurde für 30 Minuten bei 2500 rpm und abgeschalteter Zentrifugenbremse zentrifugiert.

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

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

2.2.8 Bestimmung der Lymphozytenzahl

Die absolute Anzahl der aus den jeweiligen Organen isolierten Lymphozyten wurde in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl

Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau gemischt und damit die Neubauer-Zählkammer befüllt. Es wurden unter dem Auflichtmikroskop 16 große Quadrate auszählt.

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

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

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

2.2.9 Färbung der Lymphozyten mit MHC Klasse II-Tetrameren und Antikörpern

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

2.2.10 FACS-Messung und Auswertung der FACS-Daten

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

2.2.11 Statistik

Alle relevanten Ergebnisse wurden mit dem Student-t-Test für zwei Stichproben unter Annahme gleicher Varianzen auf Signifikanz überprüft.

3. ERGEBNISSE

Die SJL-Maus erkrankt 10 Tage nach Immunisierung durch PLP 139-151 an einer EAE, welche sich die nachfolgenden Tage verstärkt und ab Tag 15 auf ein Residuum zurückbildet (Abb.1). Etwa 24 Tage nach Immunisierung beobachten wir einen weiteren Krankheitsschub, der mit einer messbaren Erhöhung der im Lymphknoten vorkommenden CD4+ Lymphozyten einhergeht.

Auf dieser Grundlage beschäftigen sich die folgenden Experimente mit der Frage, welche phänotypischen und quantitativen Veränderungen T-Lymphozyten durchlaufen, um autoimmune Mechanismen in diesem Modell zu unterhalten. Dazu wurde im Verlauf der EAE die Zahl und phänotypische Differenzierung autoreaktiver T-Lymphozyten in drainierenden Lymphknoten, Milz und ZNS bestimmt.

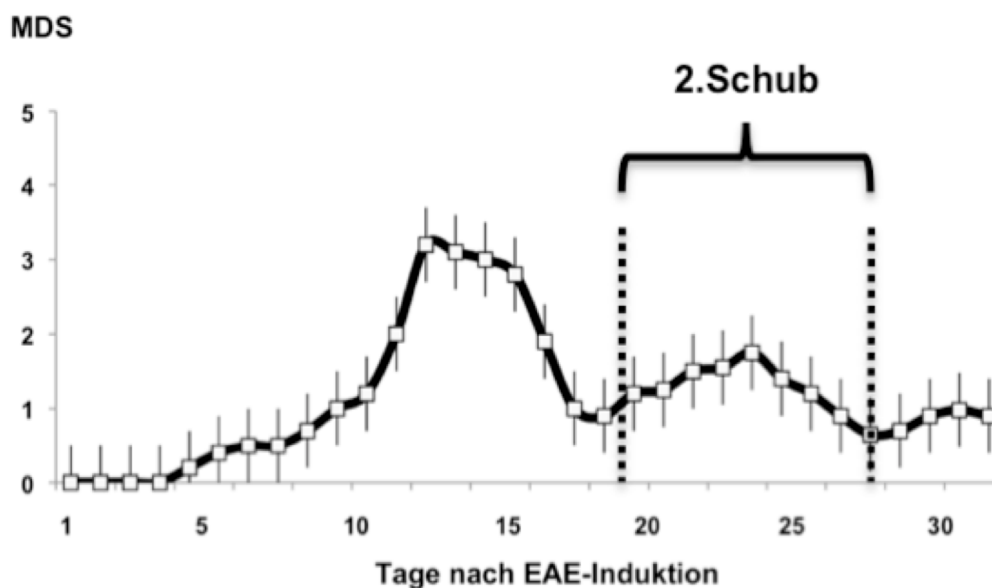


Abbildung 1:

Verlauf der Krankheitsaktivität bei Versuchstieren nach Induktion einer EAE an Tag 0. (MDS=Mean Disease Score)

Beobachteter Zeitraum nach Immunisierung von sechs SJL-Mäusen mit PLP139-151 und Pertussistoxin in CFA. Der MDS (Mean Disease Score) dient zur klinischen Stadieneinteilung der EAE und gibt die Erkrankungsschwere wieder.

Die Mäuse erkrankten zwischen Tag 10 und Tag 15 an einer EAE mit anschließender Remission. Zwischen Tag 20 und Tag 25 zeigen die Mäuse ohne sekundäre Immunisierung erneut Symptome. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder.

3.1 Kinetik von Lymphozyten im drainierenden Lymphknoten und der Milz

Um die Rolle von T- und B-Lymphozyten nach einer solchen Erkrankungsphase zu untersuchen, wurden die drainierenden Lymphknoten im Zeitraum von Tag 20-32 nach EAE-Induktion entnommen und die absolute Anzahl der Lymphozyten bestimmt.

Zusätzlich zu den Lymphknoten wurde auch die Milz an jeweils den selben Tagen aus den Versuchstieren entfernt und auf ihren Gehalt an Lymphozyten hin untersucht.

Betrachtet man die Zellzahlen in den drainierenden Lymphknoten, zeigt sich zwischen den Tagen 24 und 28 nach EAE Induktion eine starke Zunahme der Zahl an T- und B-Lymphozyten (s. Abb. 2). Die Zellzahlen stiegen von 42 Millionen auf nahezu 70 Millionen Lymphozyten in diesem Zeitraum an. In relativen Werten ausgedrückt entspricht diese Vermehrung einem Prozentsatz von 67%. Nach Tag 28 hingegen fiel die Anzahl der Lymphozyten sehr stark ab und belief sich am Tag 32 auf 30 Millionen.

Die Situation in der Milz stellte sich in ähnlicher Weise dar. Der Unterschied zu den Lymphknoten bestand jedoch darin, dass relativ gesehen eine geringere Vermehrung stattgefunden hat.

Bei der mikroskopischen Bestimmung der Zellzahlen können apoptotische Zellen oder deren Vorstufen nicht identifiziert werden. Dies war erst durch durchflußzytometrische Analyse der Zellen möglich.

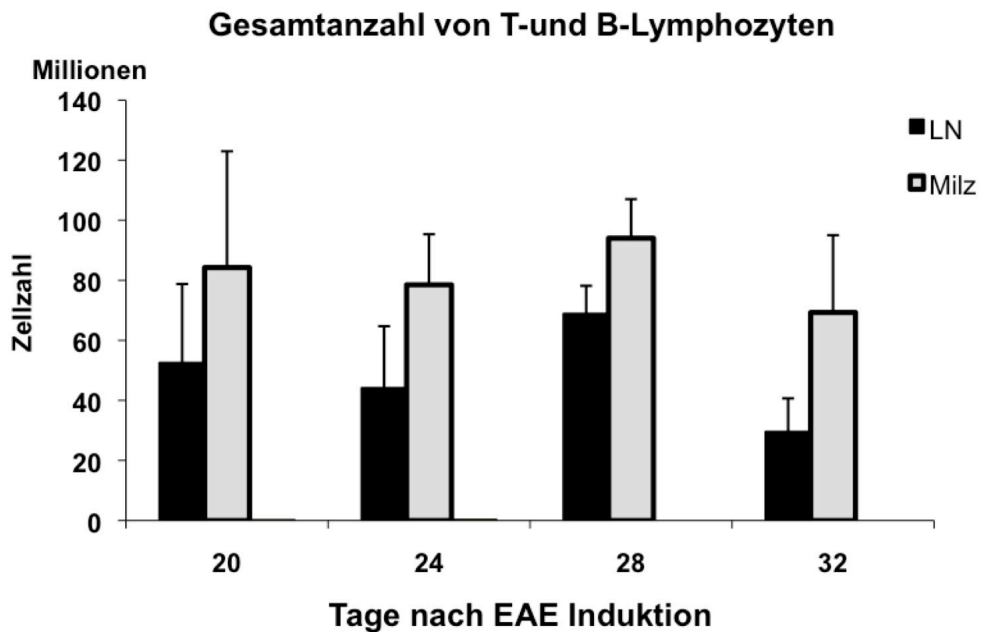


Abbildung 2:

Darstellung der Gesamtzahl an T- und B-Lymphozyten zwischen Tag 20 und 32 nach erfolgter EAE Induktion durch Immunisierung mit PLP139-151 in sechs SJL-Mäusen. Die Zellen wurden aus den DLN und der Milz an den angegebenen Zeitpunkten isoliert und mittels Neubaur-Zählkammer quantifiziert. Für die Versuche wurden sechs Versuchstiere verwendet. Schwarze Säulen geben die Situation in den drainierenden Lymphknoten, gekachelte Säulen in der Milz wieder. Die Fehlerbalken zeigen den berechneten Standardfehler an.

3.1.1 Kinetik der CD4+ T-Zellen im drainierenden Lymphknoten

Um genauere Aussagen über die Zusammensetzung der jeweiligen Populationen der Lymphozyten im Lymphknoten während dieses Zeitraums treffen zu können, wurden CD4+ T-Zellen im Folgenden eingehender untersucht. Zwischen Tag 24 und 28 zeigte sich eine Zunahme der absoluten Zahl der dieser von 13 auf 26 Millionen Zellen im drainierenden Lymphknoten (Abb. 3A). Relativ betrachtet nehmen CD4+ T-Zellen in den untersuchten Lymphknoten ziemlich konstant 38% der gesamten Zellpopulationen ein (Abb. 3B).

CD4+ T-Zellen in DLN im späten Verlauf der EAE

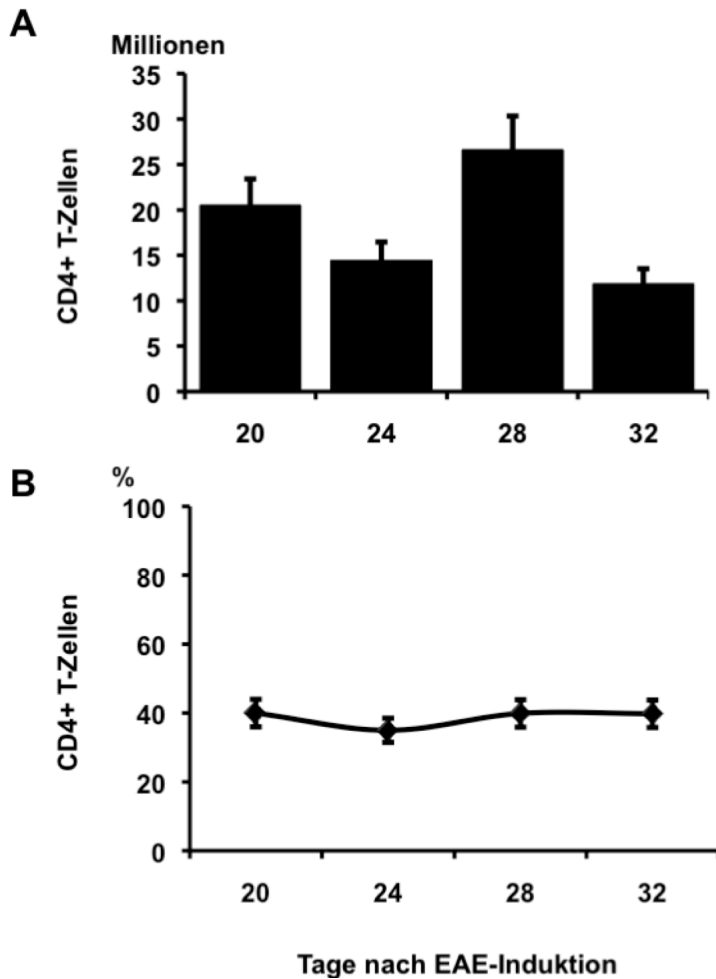


Abbildung 3:

Anteil der CD4+ T-Lymphozyten 24 bis 32 Tage nach Immunisierung durch PLP139-151 in sechs SJL-Mäusen. Die Zellen wurden aus den drainierenden Lymphknoten der Maus zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt entnommen und untersucht.

A) Die absolute Darstellung der Zellzahl über den Untersuchungszeitraum. Hier kann eine Zunahme der Zahl CD4+ T-Zellen zwischen dem 24. und 28. Tag von 13 auf 26 Mio. Zellen beobachtet werden.

B) In einer relativen Darstellung der CD4 positiven T-Zellpopulation zeigt sich ein konstanter Anteil von 40% der Gesamtheit der Lymphozyten in den untersuchten Lymphknoten.

3.1.2 Konstante absolute Anzahl von CD8+ T-Zellen im drainierenden Lymphknoten

In dieser Untersuchung wurde die Kinetik der CD8+ T-Zellen im drainierenden Lymphknoten über den selben Zeitraum (24-32 Tage nach Induktion einer EAE mit PLP139-151) in der EAE untersucht.

Relativ gesehen macht die Population der CD8+ T-Zellen etwa 12%-15% der gesamten Lymphozyten über den Zeitraum zwischen Tag 24 und 28 aus. An Tag 32 erhöht sich dieser Anteil auf maximal 22% (siehe Abb. 5A). Beobachtet man gleichzeitig die absoluten Zellzahlen über diesen Zeitraum, so bleibt diese nahezu konstant bei sechs Millionen CD8+ T-Zellen (siehe Abb. 5).

CD8⁺ Zellen in DLN im späten Verlauf der EAE

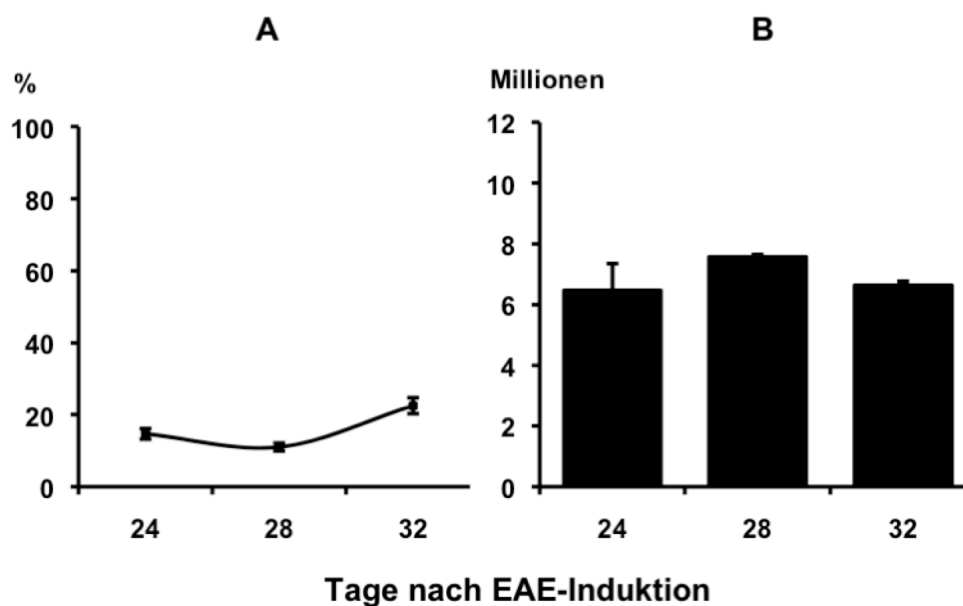


Abbildung 5:

Anteil der CD8+ T-Lymphozyten zwischen 24 bis 32 Tage nach Immunisierung durch PLP139-151 in sechs SJL-Mäusen. Die Zellen wurden aus den drainierenden Lymphknoten der Maus zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt entnommen.

(A) Die relative Darstellung der CD8+ T-Zellen. Sie nehmen über den Untersuchungszeitraum 12-15% der gesamten Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten ein.

(B) Die absolute Darstellung zeigt über den Untersuchungszeitraum eine nahezu konstante Zellzahl um 6 Millionen der CD8+ T-Zellen.

3.2 Phänotypisierung von autoreaktiven CD4+ T-Zellen

Nach der Beschreibung von absoluten und relativen Zellzahlen für CD4+ und CD8+ T-Zellen, wird in den folgenden Abschnitten auf die phänotypischen Eigenschaften der CD4 T-Helferzellen im Lymphknoten über diese Untersuchungsdauer eingegangen.

Mit Hilfe von rekombinantem MHC-Klasse II-Tetramer konnten autoreaktive CD4+ T-Zellen, spezifisch für PLP139-151 untersucht und durch Doppelfärbung mit unterschiedlichen Oberflächenantikörpern näher charakterisiert werden [11]. Besichtigt man die Zahl der autoreaktiven PLP-spezifischen CD4+ T-Zellen, so bleiben diese über den zu untersuchenden Zeitraum konstant um 0,1% der gesamten CD4+ T-Zellen (siehe Abb. 7). Setzt man diesen Wert in das Verhältnis zur gesamten Zellzahl im Rahmen des zweiten Schubs, so ist eine Zellvermehrung im Lymphknoten für diese Population festzustellen (siehe Abb. 8).

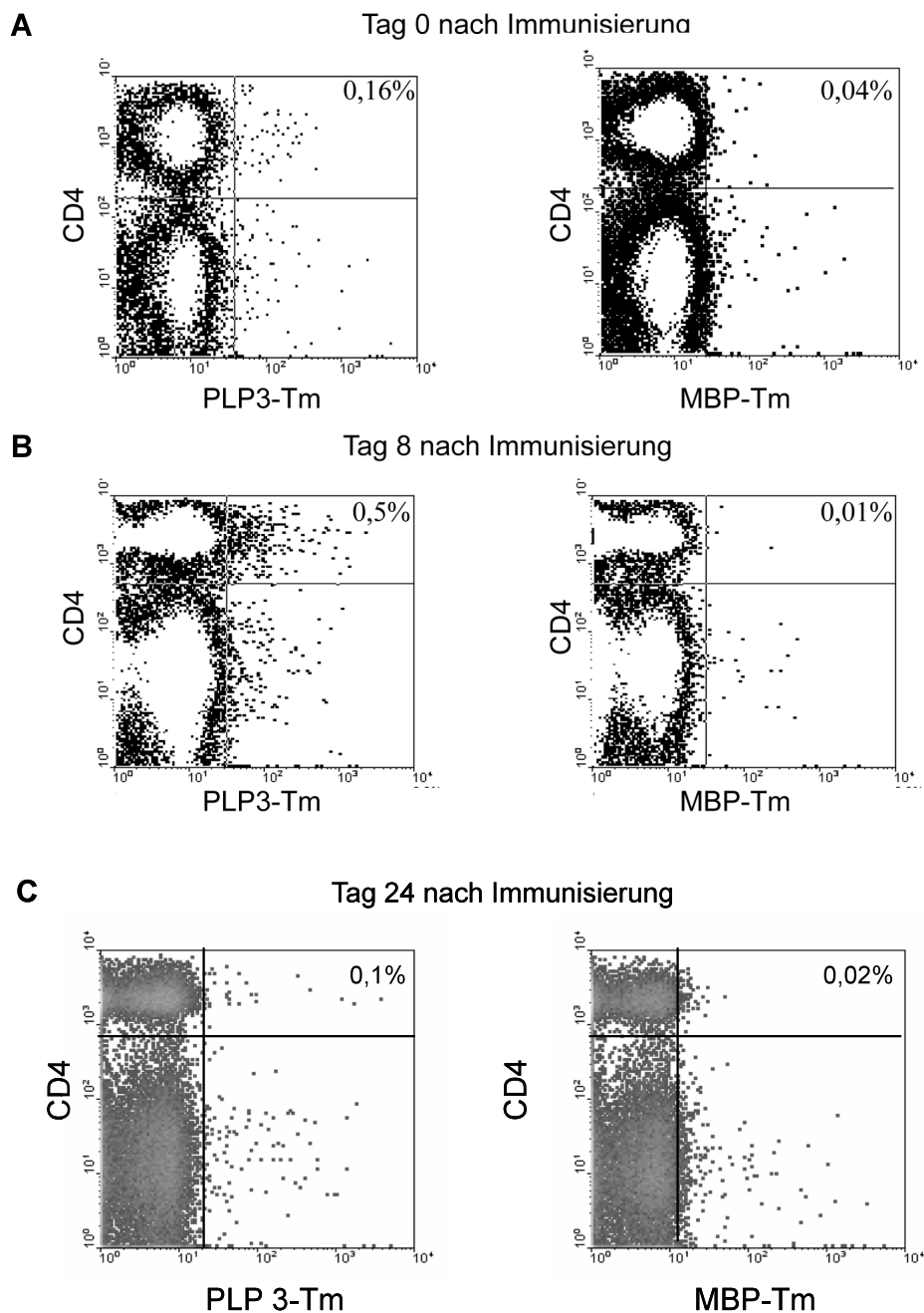


Abbildung 7:

Darstellung von PLP139-151 (PLP3-Tm) Tetramer CD4+ T-Zellen nach unterschiedlichen Krankheitstagen durch FACS-Analyse. Als Kontrolle wurde jeweils das MBP-Tetramer (MBP-Tm) verwendet. Die Lymphozyten wurden aus den DLN isoliert, mittels CD4-Antikörper und mit I-As-PLP139-151-Tetramer über FACS-Analyse untersucht.

- (A) Messung am Tag der Immunisierung.
- (B) Die Messung erfolgte acht Tage nach Immunisierung, kurz vor dem Zeitpunkt der Krankheitssymptome.
- (C) Messung 24 Tage nach Immunisierung vor dem Auftreten erneuter klinischer Symptome

CD4 Zellen(LN) Tetramer positiv

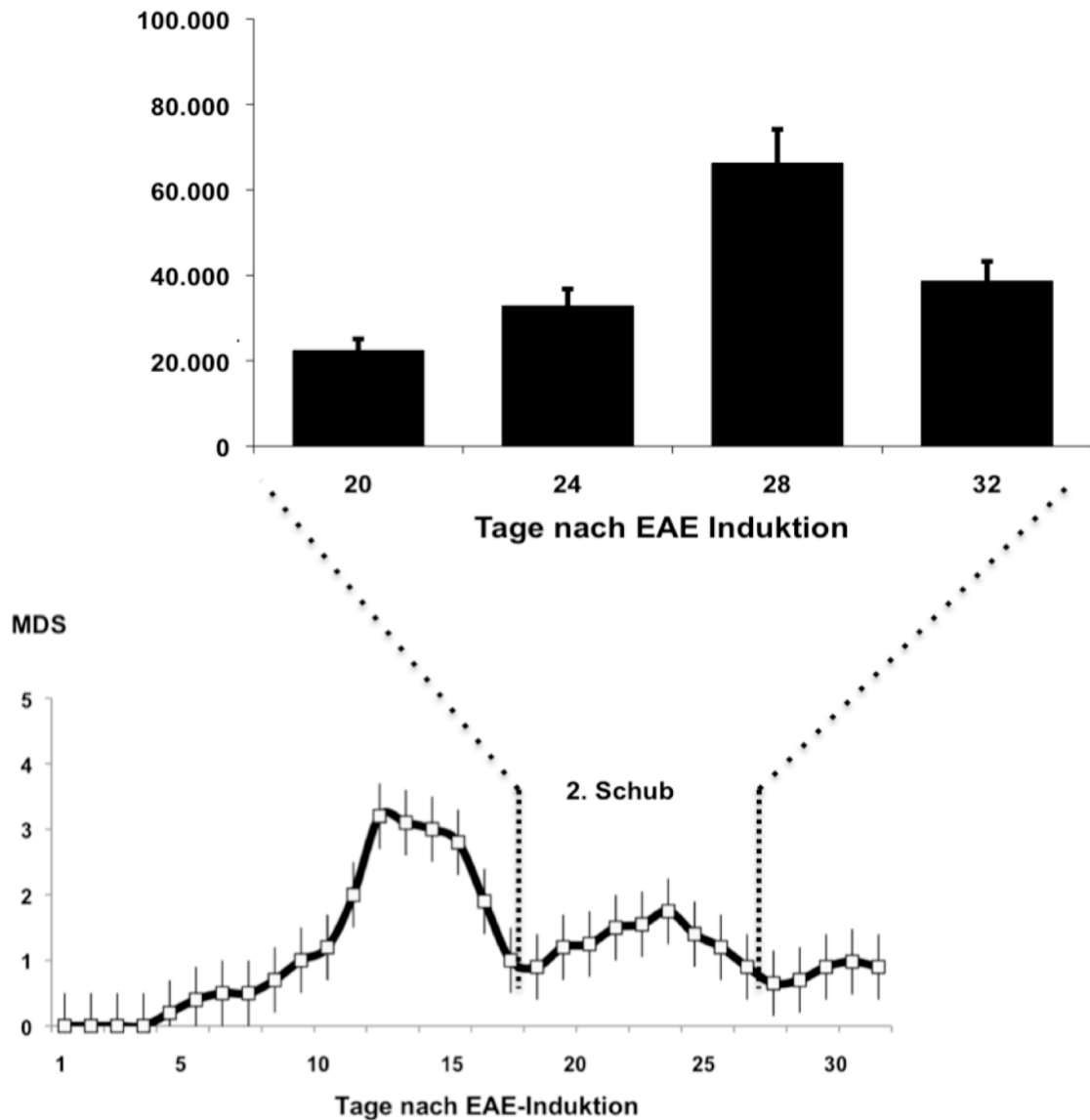


Abbildung 8:

Während des endogen ausgelösten, zweiten Schubs der EAE wurden aus den drainierenden Lymphknoten Lymphozyten isoliert und mittels MHC II Tetrameren, spezifisch für PLP 139-151 (I-A^SPLP139-151) phänotypisch charakterisiert.

Die absolute Anzahl autoreaktiver T-Helferzellen nahm zwischen Tag 24 und Tag 28 von etwa 35.000 auf 68.000 zu. Wie bei der Ersterkrankung zwischen Tag 10 und Tag 15 waren diese untersuchten T-Helferzellen spezifisch für das Epitop PLP139-151.

3.2.1 Zunahme der CD4+CD25+ - PLP spezifischen Zellen im Lymphknoten

Im Lymphknoten kam es über den untersuchten Zeitraum zu einem Anstieg der CD4+CD25+ Zellen. Besonders 24 Tage nach der Immunisierung der Versuchstiere zeigte sich neben einer Zunahme der CD25-Expression auch eine klinisch Aktivierung der Erkrankung (siehe Abb. 9A). Dies wurde ebenfalls in der Population der autoreaktiven, PLP139-151-spezifischen Tetramer positiven (Tm-pos.) CD4+CD25+ Zellen beobachtet.

Vergleichend zwischen CD4+CD25+ Tm-pos. und Tm-neg. Zellen, stellt sich besonders an Tag 24 ein Unterschied zwischen beiden Zellgruppen dar. Für diesen Zeitraum exprimierten 44% der spezifischen CD4+ Zellen CD25 auf ihrer Oberfläche. Vergleichend dazu trugen nur 20% aller unspezifischen CD4+ Zellen im Lymphknoten diesen Phänotyp (siehe Abb. 9B).

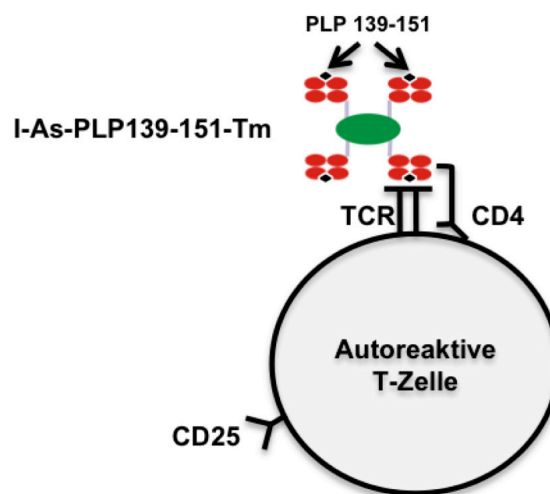


Abbildung 9: PLP139-151 spezifische CD4+CD25+ T-Zelle

CD4⁺CD25⁺

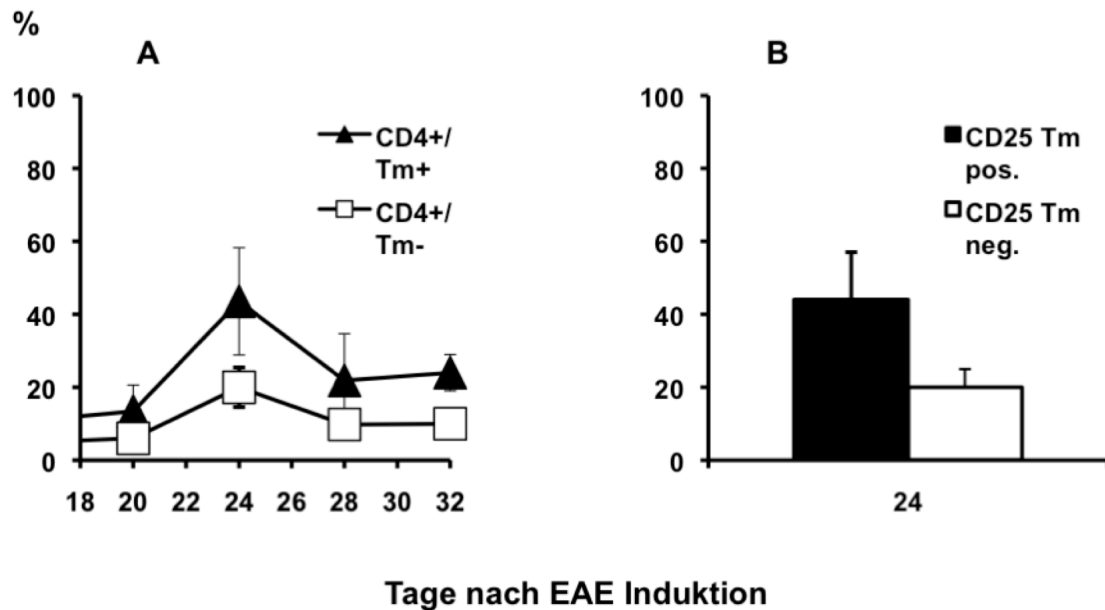


Abbildung 9 A und B:

Relative Zahl der Tetramer positiven und negativen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Lymphknoten zwischen Tag 20 bis 32 nach Immunisierung mit PLP139-151. Die Zellen wurden aus den drainierenden Lymphknoten der Maus zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt entnommen und mit Gate auf CD4⁺ T-Zellen durchflußzytometrisch untersucht (sechs Mäuse pro Zeitpunkt, Fehlerbalken zeigen den SEM).

(A) CD4⁺/I-As-PLP139-151(Tm⁺) Zellen zeigen eine Zunahme der Expression für CD25 am 24.Tag nach erfolgter EAE-Induktion gegenüber CD4⁺ T-Zellen.

Schwarze Dreiecke stehen für CD4⁺CD25⁺/I-As-PLP139-151(Tm⁺) PLP spezifische MHC Klasse II Tetramere + Zellen. Weiße Quadrate charakterisieren den Verlauf von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen, also für PLP unspezifische Zellen im Lymphknoten.

(B) Vergleichende Darstellung von PLP spezifischen (Tm pos.) CD4⁺CD25⁺ T-Zellen und CD4⁺CD25⁺ (Tm neg.) T-Zellen für Tag 24 nach Immunisierung. 44% der CD4⁺ /I-As-PLP139-151(Tm pos) Zellen exprimieren CD25 (schwarze Säule), wohingegen bei nur 20% der CD4⁺ T-Zellen CD25 nachweisbar ist (weiße Säule).

3.2.2 Aktivierung der PLP-spezifischen CD4 - Zellen im Lymphknoten

Ein früher Marker, der nach T-Zellaktivierung an der Zelloberfläche exprimiert wird, ist das CD69 Molekül. Nach seiner Expression funktioniert CD69 als kostimulatorisches Signal für die T-Zellaktivierung und -Proliferation [107]. Durch FACS-Analyse mit Gate auf CD4+ Zellen wird hier die Expression von CD69 auf Tm-positiven und -negativen Zellen untersucht. In den durchgeführten Messungen zeigte sich ein relativer Anstieg von 11% auf 38% der CD4+CD69+ Population zwischen den Tagen 20 und 24 nach Immunisierung (siehe Abb. 10A).

Bei den Tm-positiven CD4-Zellen nimmt die CD69+ Population im gleichen Zeitraum zu. An Tag 20 p.i. sind 17% CD69 positiv. Vier Tage später tragen 66% aller Tm positiven T-Zellen CD69 auf ihrer Oberfläche (siehe Abb. 10B).

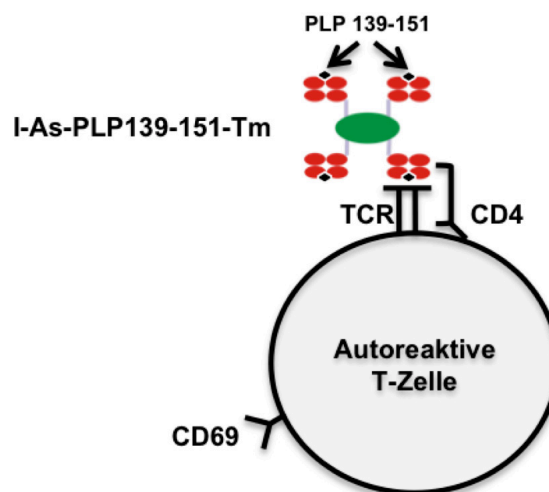


Abbildung 10: PLP139-151 spezifische CD4+CD69+ T-Zelle

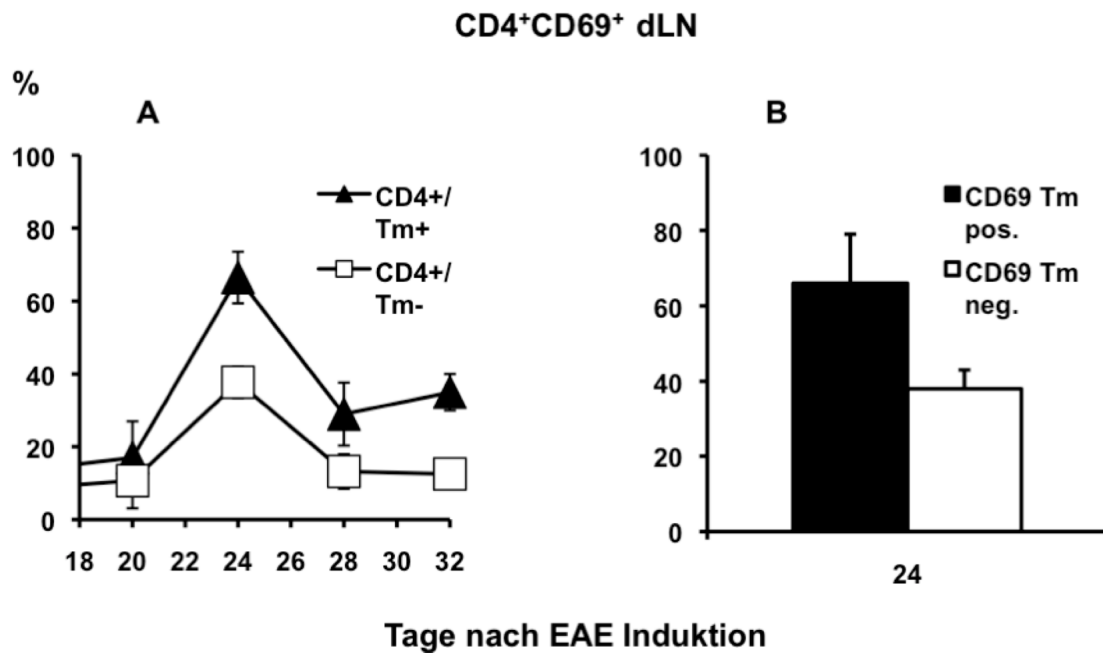


Abbildung 10A und B:

Relative Zahl der Tetramer-positiven und negativen CD4+CD69 + T-Zellen im Lymphknoten zwischen Tag 20 bis 32 nach Immunisierung mit PLP139-151 in sechs SJL-Mäusen. Die Zellen wurden aus den drainierenden Lymphknoten zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt entnommen und durch FACS-Analyse mit Gate auf CD4+ Lymphozyten untersucht.

(A) CD4+/I-As-PLP139-151(Tm pos) Tetramer positive Zellen zeigen eine Zunahme der Expression für CD69 am 24.Tag nach erfolgter EAE Induktion gegenüber Tetramer negativen (Tm neg) CD4+ T-Zellen.

Schwarze Dreiecke stehen für CD4+CD25+/I-As-PLP139-151(Tm pos) PLP spezifische MHC Klasse II Tetramere positive Zellen. Weiße Quadrate charakterisieren den Verlauf von CD4+CD25 + T-Zellen ohne Tetramer.

(B) Vergleichende Darstellung der PLP spezifischen (Tm pos) CD4+CD25 + T-Zellen (schwarzer Block) und CD4+CD25 + (Tm neg) T-Zellen an Tag 24 nach Immunisierung. 66% der CD4+ /I-As-PLP139-151(Tm pos) Zellen exprimieren CD25. In der Population der Tm neg CD4+ T-Zellen exprimieren 24 Tage nach EAE Induktion 38% CD25 an ihrer Oberfläche.

3.2.3 Konstanter Anteil der CD4+CD44+ T-Zellen im Lymphknoten

CD44 ist an einer Vielzahl an Funktionen der Endothel- Leukozytenbindung und des Leukozyten-Homing in periphere lymphatische Organe beteiligt [19]. Auf Leukozyten vermittelt das CD44 Molekül Zelladhäsion und T-Zellaktivierung [70, 87].

Im untersuchten Zeitraum exprimierten 35% bis 45% der CD4+ T- Zellen CD44. Die Tetramer positiven CD4-T-Zellen tragen zu 55%-65% CD44 auf ihrer Oberfläche. Zusammengenommen ist die Expression des CD44 Moleküls über den untersuchten Zeitraum nahezu konstant. (siehe Abb. 11A)

3.2.4 Anstieg der Expression von CD62L in der gesamten CD4 Zellpopulation

L-Selektin (CD62L) ermöglicht Lymphozyten während einer Entzündung oder Infektion am Gefäßendothels anzuhafeln, wodurch diese in periphere lymphatische Organe einwandern können [95].

In der Population der CD4CD62L tragenden Zellen zeigte sich zwischen Tag 20 und 24 p.i. eine deutliche Expressionszunahme von 20% auf 80% von CD62L, sowohl bei der für PLP-spezifischen, als auch in der dafür unspezifischen CD4 Population in den untersuchten Lymphknoten. (siehe Abb. 11B)

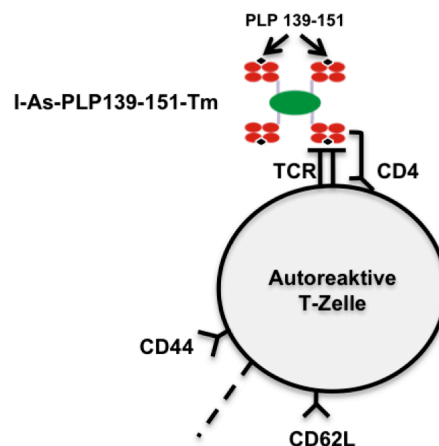


Abbildung 11: PLP139-151 spezifische CD4+CD44+ oder CD62L+ T-Zelle

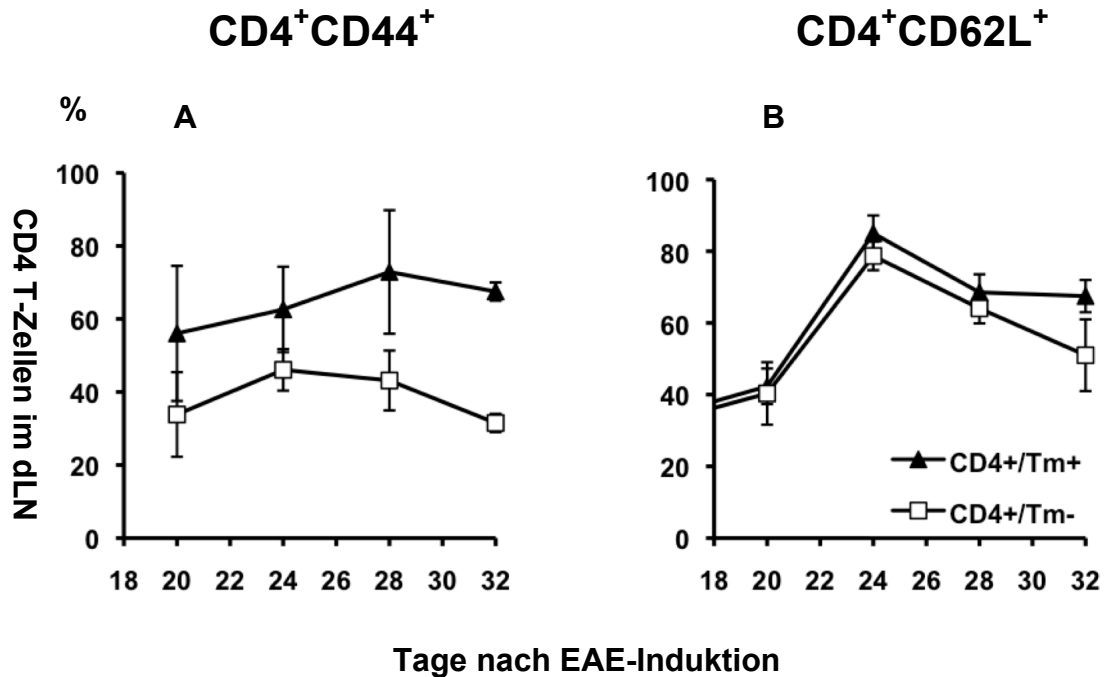


Abbildung 11A und B:

(A) Die dargestellte Abbildung zeigt den Verlauf von CD4⁺CD44⁺ T-Zellen im Lymphknoten, im späten Verlauf der EAE nach Immunisierung mit PLP139-151. Während des Untersuchungszeitraums zeigt sich eine nahezu konstante Expression von CD44 sowohl in der positiven als auch negativen CD4 Tm-Population. In der Tm positiven Population wird CD44, im Vergleich zur Tm negativen, mit einem Unterschied von 20% über den Versuchszeitraum vermehrt exprimiert.

(B) Expression von CD62L auf CD4-Tetramer positiven/negativen Zellen über den dargestellten Zeitraum. Zwischen Tag 20 und 24 kann eine Expressionzunahme von 20% auf 40% auf den CD4-Tetramer positiven, aber auch Tetramer negativen CD4⁺ T-Zellen gemessen werden. An den folgenden Versuchstagen fällt das Expressionsniveau fast auf den Ausgangswert zurück.

Schwarze Dreiecke stehen für PLP-spezifische CD4⁺ /I-As-PLP139-151 Tetramer (Tm+) positive Zellen. Weiße Quadrate zeigen den Verlauf der CD4⁺ Tetramer negativen (Tm-) T-Zellen. Die Zellen wurden aus den drainierenden Lymphknoten zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt entnommen und im FACS im Gate für Lymphozyten und entsprechender Antikörperfärbung hin untersucht. Die schwarzen Fehlerindikatoren stehen für die berechnete Standardabweichung.

3.2.5 Anteil der apoptotischen Zellen im Lymphknoten

Hier wurde der programmierte Zelltod (Apoptose) der CD4-Zellen durch simultane Färbung mit Annexin V durchflußzytometrisch bestimmt. Annexin V bindet an Phosphatidylcholin, das sich an der Oberfläche apoptotischer Zellen befindet.

Im untersuchten Zeitraum waren 20% bis 30% aller für das Tetramer unspezifischen CD4-Zellen in Apoptose.

Bei den Tetramer-positiven CD4-Zellen befinden sich hingegen mehr Zellen (45% bis 60%) in Apoptose.

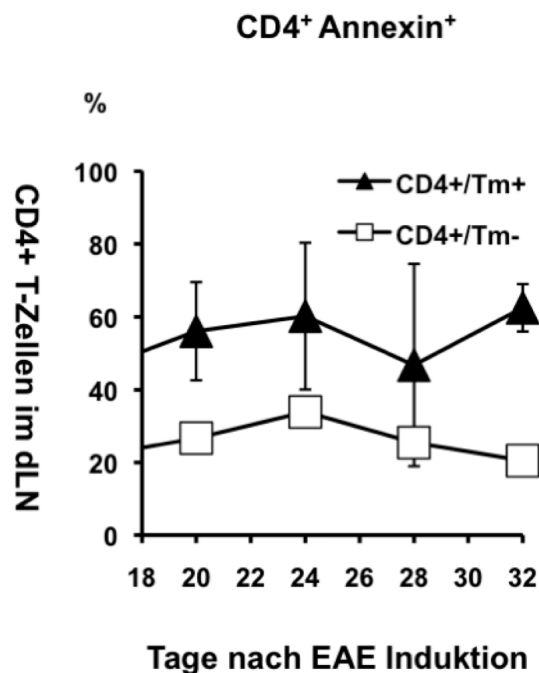


Abbildung 12:

45% bis 60% der autoreaktiven CD4+Tm-positiven T-Zellen zeigen eine Apoptoseneigung, wohingegen nur 20 bis 30% der restlichen CD4+ T-Zellen Annexin exprimieren..

Schwarze Dreiecke stehen für PLP-spezifische Tm-positive Lymphozyten. Weiße Quadrate charakterisieren den Verlauf von CD4+Tm-negativen Annexin+ - Lymphozyten, also für PLP-unspezifische Zellen. Die Zellen wurden im FACS im Gate für Lymphozyten identifiziert und anschließend auf CD4+, Annexin und I-As-PLP139-151-Tm untersucht. Schwarze Fehlerindikatoren stehen für die berechnete Standardabweichung.

3.3 Die Situation im ZNS - Aktivierte autoreaktive CD4 T- Zellen können im ZNS detektiert werden

Im ZNS konnte eine Zunahme der Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf CD4+ T-Zellen festgestellt werden. Besonders die Population der Tetramer-positiven (Tm pos) CD4+ T- Zellen zeigen vermehrte Aktivität. Obwohl an Tag 28 nach Immunisierung ein Expressionsmaximum für beide T-Zellaktivierungsmarker im ZNS erreicht wird, zeigt sich zu diesem Zeitpunkt im klinischen Verlauf der SJL-Mäuse ein gegensätzliches Bild mit geringer Erkrankungsaktivität (siehe Abb. 13).

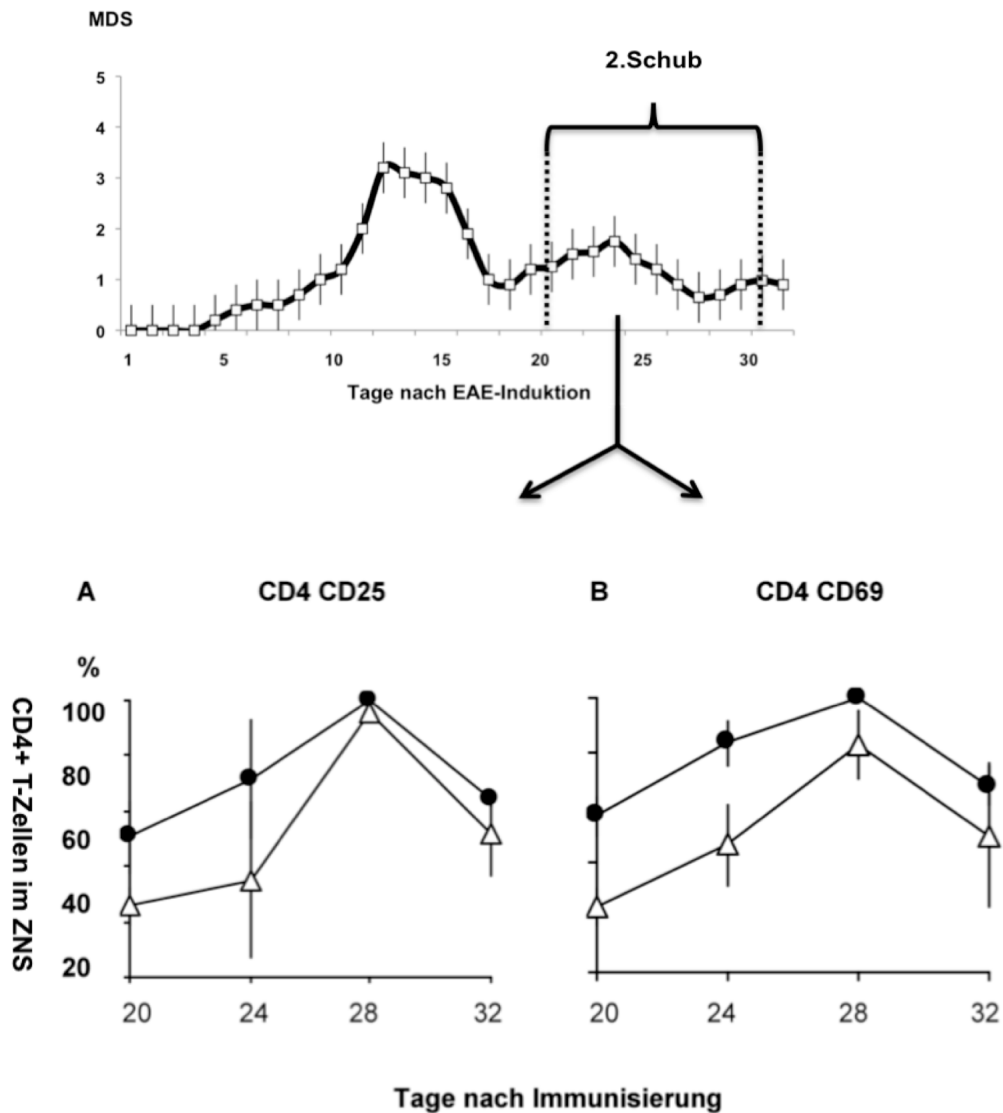


Abbildung 13:

Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf ZNS-infiltrierenden CD4-Zellen zwischen Tag 20 und Tag 32 nach EAE-Induktion.

(A) Das Expressionsniveau von CD25 nimmt für Tetramer positive Zellen, ausgehend von 60% bis auf nahezu 100% an Tag 28 p.i. zu.

(B) Anstieg der Expression bei CD69 in beiden Zellpopulation bis Tag 28 p.i. Die aus dem ZNS stammenden Zellen wurden im FACS im Lymphozyten Gate identifiziert und mit Antikörpern gegen CD4, CD25, CD69 und I-As-PLP139-151-Tetramer gefärbt und untersucht. Schwarze Kreise zeigen ZNS-Antigen-spezifische CD4+Tetramer+ Zellen, weiße Dreiecke Antigen-unspezifische CD4+Tetramer- Zellen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung

4. DISKUSSION

4.1 Endogene Reaktivierung von autoreaktiven CD4+ T-Zellen durch den Mechanismus der erneuten Antigenpräsentation und -erkennung vor einer Invasion in das ZNS

Im Modell der EAE zeigen sich zehn bis zwölf Tage nach erfolgter Immunisierung klinische Krankheitssymptome, die mit charakteristischen Veränderungen der autoreaktiven T-Zellen einhergehen.

Die vorliegenden Daten zeigen einen erneut klinisch messbaren zweiten Krankheitsschubs, mit gleichzeitiger Zunahme zellulärer Aktivierungsmarker auf T-Zellen.

Die nachweisbare Reaktivierung der Erkrankung zeigt sich unter gleichzeitiger Zunahme der gesamten Lymphozyten und CD4+ T-Zellen mit Expression von Aktivierungsmarker CD69 und CD25 in den untersuchten DLN, ohne erneute Immunisierung mit PLP139-151. An Tag 28 zeigt sich im ZNS in dieser Zellpopulation ebenfalls eine starke Aktivitätszunahme.

Auf Grundlage der vorliegenden Daten könnte als Mechanismus für diese Reaktivierung der Erkrankung eine erneute Antigenpräsentation und -erkennung von PLP139-151, mit folgender Reaktivierung von PLP139-151 spezifischen CD4+ T-Zellen in den peripheren Lymphknoten vorausgehen. Bevor im Anschluss daran, die eigentlichen Invasion dieser endogen reaktivierten autoreaktiven T-Zellen in das ZNS, im Rahmen des zweiten Schubes erfolgt. Dafür spricht die relativ schnelle Aktivierung und Rekrutierung dieser CD4+ T-Zellen im Lymphknoten zwischen Tag 22 und 24 und die damit zeitlich verbundene klinisch sichtbaren Schubsymptomatik in den Versuchstieren.

Neben der gezeigten endogenen Reaktivierung von antigenspezifischen CD4+ T-Zellen vor der ZNS-Invasion, bleibt die Frage über den Verbleib des immunisierten Autoantigens PLP139-151 in diesem Zusammenhang.

Die Gruppe um Vos et al. hat zur Aufklärung dieser Fragestellung, Versuche mit an EAE erkrankten Primaten durchgeführt. Hauptaugenmerk wurde dabei auf

den Abflussweg von Autoantigenen über die zervikalen Lymphknoten, während einer aktiven Entzündungsphase im ZNS gelegt. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zellen mit Myelin-Antigen (PLP, MBP und neutrale Lipide), in den das ZNS drainierenden Lymphknoten anzutreffen waren. Diese Zellen zeigten charakteristische Oberflächenmarker und Eigenschaften, wie sie bei professionellen APCs anzutreffen sind. Ebenfalls wurden Myelin-spezifische T-Zellen im gleichen Kompartiment angetroffen [23]. Ob in peripheren lymphatischen Organen eine erneute Präsentation von auto-Antigen über APCs, mit der Folge der dargestellten Reaktivierung von antigenspezifischen T-Zellen stattfindet, kann auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht abschließend beantwortet werden.

Eine mögliche Einschränkung der Interpretation, ist im Modell der EAE selbst begründet. Das verabreichte immunisierte Peptid wird über eine Emulsion, in Form eines Depots in den Hinterlaufen platziert. Das Problematische dabei scheint zu sein, dass das Autoantigen dort persistiert und längerfristig freigesetzt wird und damit eine ständige Präsentation über APCs unterhalten könnte.

4.2 Welche Rolle spielen regulatorische T-Zellen bei einer endogenen Reaktivierung?

In den gewonnenen Daten waren neben unspezifischen CD4⁺ T-Zellen, auch in der Gruppe der PLP139-151-spezifischen CD4⁺ CD25⁺ T-Zellen, eine Zunahme der Zellzahl in den Lymphknoten, später auch im ZNS zu verzeichnen. Die Versuchstiere zeigten klinische Zeichen einer erneuten Erkrankung, obwohl bekannt ist, dass regulatorische T-Zellen inhibierende Fähigkeiten gegenüber aktivierten T-Zellen aufweisen.

Diese Eigenschaften wurden an Autoimmunerkrankungen, wie der MS [49], Typ I Diabetes [42, 69] und der Rheumatoiden Arthritis [61] untersucht. Untersuchungen zu MS Patienten zeigen ein vermindertes Vorkommen an regulatorischen T- Zellen im Blut, jedoch im Gegensatz dazu eine Tendenz zur Zellanreicherung im Liquor cerebrospinalis. Diese regulatorischen Zellen zeigen dabei trotz ihrer quantitativen Zunahme eine nachweislich reduzierte

Suppressorfunktion [27,37,98].

Welche Ursachen könnten also dazu führen, dass die immunsuppressive Fähigkeit dieser Zellen, bei Reaktivierung einer EAE fehlschlägt oder zumindest unzureichend ist?

Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Effektor T-Zellen aktiviert werden, obwohl die Zahl der regulatorischen T-Zellen zeitgleich ebenfalls zunimmt. Hierbei könnte eine insuffiziente Unterdrückung der Immunreaktion von Seiten der regulatorischen T-Zellen eine Rolle spielen. Diese Annahme steht im Einklang mit einer Untersuchung von Korn et al., in der am Modell der EAE gezeigt wurde, dass regulatorische T-Zellen die ZNS-spezifischen Effektor T-Zellen, nicht ausreichend unterdrücken konnten [50].

Eine mögliche Erklärung für eine Reaktivierung der Erkrankung, trotz Zunahme PLP139-151-spezifischer regulatorischer T-Zellen könnte in von aktivierten Effektorzellen sezernierten, proinflammatorischen Zytokinen liegen, die eine Induktion und Funktion regulatorischer T-Zellen einschränken.

Die letztendliche Rolle, die regulatorische T-Zellen in diesem Kontext einnehmen, muss Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

4.3 CD8+ T-Zellen im Kontext einer endogenen Reaktivierung

Über den beobachteten Zeitraum bleibt der gemessene Anteil der CD8 T-Zellen im drainierenden Lymphknoten nahezu konstant. Dies könnte ein Hinweis sein, dass CD8-Zellen im Gegensatz zu den autoreaktiven CD4-Zellen nicht in den peripheren Lymphknoten aktiviert werden und dann in das ZNS einwandern.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass CD8 + T-Zellen in Gehirnläsionen von MS Patienten, perivaskulär und intraparenchymatös vorkommen. Ebenfalls konnte eine Zunahme an CD8 positiven T-Zellen in der Liquorflüssigkeit bei MS Patienten gefunden werden. Diese Daten sprechen zusammengenommen eher dafür, dass CD8-Zellen erst im ZNS und nicht wie bei CD4-Zellen zu erkennen ist, über periphere Antigen-Präsentation in den Lymphknoten aktiviert werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Erneuter klinischer Schub einer EAE durch eine endogen verursachte Reaktivierung autoreaktiver T-Zellen mittels erneuter Antigenpräsentation in peripheren Lymphknoten

Es wird angenommen, dass den Krankheitsschüben im Verlauf der Multiplen Sklerose eine Aktivierung von autoreaktiven Lymphozyten in der Peripherie vorausgeht. Die Mechanismen, die dieser Aktivierung vorausgehen, sind unbekannt und sollen hier im Tiermodell der Multiplen Sklerose, der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) untersucht werden.

Dazu wurde eine EAE in SJL-Mäusen durch subkutane Immunisierung mit dem Peptid PLP139-151 und intravenöser Injektion von Pertussis Toxin ausgelöst. Bei dieser Erkrankung kommt es zu einem ersten Krankheitsschub zwischen Tag 11 und 15 nach EAE-Induktion, mit anschließender Remission und einem zweiten endogenen Krankheitsschub ab Tag 24-27.

An den Tagen 20-27 nach EAE-Induktion zeigen die PLP139-151 spezifischen autoreaktiven T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten einen erneuten Anstieg der Aktivierungsmarker CD69 und CD25. Diese Reaktivierung ist gefolgt von einer Zellvermehrung an PLP139-151- spezifischen und ebenfalls unspezifischen T-Helferzellen im drainierenden Lymphknoten, vor deren späteren ZNS-Invasion.

Als Mechanismus der gezeigten endogenen Reaktivierung scheint die erneute Präsentation und Erkennung des Autoantigens PLP139-151 in den peripheren Lymphknoten, mit folgender Reaktivierung von autoraktiven CD4+ T-Zellen vor deren ZNS-Invasion, eine zentrale Rolle einzunehmen.

6. DANK

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern für eine mir mit viel Liebe entgegengebrachte Erziehung danken. Sie haben mir beigebracht aus eigener Überzeugung und Antrieb meine Lebenspläne und die damit verbundene Berufswahl erfolgreich zu verwirklichen. Durch diesen motivierenden Rückhalt, den ich als Grundstein für meine Arbeit ansehe, war es überhaupt erst möglich die vorliegende Schrift, mit den darin enthaltenen Daten zu erstellen und zu interpretieren. Hiermit möchte ich auch einem guten Freund danken, der meinen Lebensweg leider nur eine kurze Zeitspanne begleitet hat – Heinz Schreiber war der große Lehrer, der mich schon in frühen Jahren durch sein universelles Wissen, das mit einer überaus tiefen Menschenkenntnis und Lebensweisheit verbunden war begeisterte. Durch gemeinsame, intensive Gespräche und Diskussionen war er es, der in mir schon früh das Verlangen erzeugte, Dinge zu hinterfragen und zu diskutieren.

Der unmittelbar mit der Erstellung dieser Dissertationsschrift persönlich verbundene tiefe Dank geht an meinen Doktorvater Professor Arthur Melms, der mir auch in schwierigen Zeiten der Promotion geduldig und mir gegenüber loyal, neue Ideen zur Umsetzung und Verwirklichung dieser Arbeit bis zur erfolgreichen Fertigstellung beisteuerte.

Dr. Felix Bischof danke ich besonders für die Anleitung zur Planung und Durchführung der einzelnen Experimente. Er gab mir eine ausführliche Einführung in die Technik und Verwendung von MHC II-Tetrameren und war mir überdies hinaus sehr behilflich bei der Zusammenfassung der Daten und deren richtigen Interpretation.

Schlussendlich danke ich meinem besten Freund und Kommilitonen Christian Lange, mit dem ich zusammen eine wunderbare Studienzeit in Tübingen erleben durfte und durch regelmäßige Diskussionen die faszinierende Welt der Medizin entdecken durfte.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Dürr
Vorname: Michael
Adresse: Kolberger Str. 16
13357 Berlin

Geburtsdatum: 20. April 1980 in Karlsruhe

Schulbildung

1986 – 1990 Grundschole in Dobel
1990 – 1996 Wilhelm-Ganzhorn-Realschole, Straubenhardt
1996 – 1999 Bertha von Suttner Gymnasium, Ettlingen

April 1999 **Allgemeine Hochschulreife, Abitur**

Allgemeine Wehrpflicht:

Oktober 1999 – Juli 2000 Sanitätsdienst an der
Marineversorgungsschole List, Sylt

Hochschulstudium

Oktober 2000 – Mai 2007 Studienfach:
Humanmedizin an der
Eberhardt-Karls Universität, Tübingen

April 2007 Ärztliche Prüfung (3. Staatsexamen)
Mai 2007 **Approbation als Arzt**

Berufliche Qualifikation

Seit Juli 2007 **Assistenzarzt** Universitätsklinikum Charité, Berlin
Medizinische Klinik mit
Schwerpunkt Nephrologie

III Literaturverzeichnis

1. **Adelmann, M., et al.**, *The N-terminal domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) induces acute demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat.* **J Neuroimmunol**, 1995. 63(1): p. 17-27.
2. **Alter, A., et al.**, *Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells.* **J Immunol**, 2003. 170(9): p. 4497-505.
3. **Altman, J.D., et al.**, *Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes.* **Science**, 1996. 274(5284): p. 94-96.
4. **Amyes, E., et al.**, *Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection.* **J Exp Med**, 2003. 198(6): p. 903-11.
5. **Anderson, A.C., et al.**, *High frequency of autoreactive myelin proteolipid protein-specific T cells in the periphery of naive mice: mechanisms of selection of the self-reactive repertoire.* **J Exp Med**, 2000. 191(5): p. 761-70.
6. **Armitage, R.J., et al.**, *CD40L: a multi-functional ligand.* **Semin Immunol**, 1993. 5(6): p. 401-12.
7. **Babbe, H., et al.**, *Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction.* **J Exp Med**, 2000. 192(3): p. 393-404.
8. **Baron, J.L., et al.**, *Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma.* **J Exp Med**, 1993. 177(1): p. 57-68.
9. **Benschop, R.J. and J.C. Cambier**, *B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates.* **Curr Opin Immunol**, 1999. 11(2): p. 143-51.
10. **Bischof, F., et al.**, *A structurally available encephalitogenic epitope of myelin oligodendrocyte glycoprotein specifically induces a diversified pathogenic autoimmune response.* **J Immunol**, 2004. 173(1): p. 600-6.
11. **Bischof, F., et al.**, *Analysis of autoreactive CD4 T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis after primary and secondary challenge using MHC class II tetramers.* **J Immunol**, 2004. 172(5): p. 2878-84.
12. **Blander, J.M. and R. Medzhitov**, *On regulation of phagosome maturation and antigen presentation.* **Nat Immunol**, 2006. 7(10): p. 1029-35.

13. **Breithaupt, C., et al.**, *Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2003. 100(16): p. 9446-51.
14. **Cameron, T.O., et al.**, *Cutting edge: detection of antigen-specific CD4+ T cells by HLA-DR1 oligomers is dependent on the T cell activation state*. **J Immunol**, 2001. 166(2): p. 741-5.
15. **Champagne, P., et al.**, *Skewed maturation of memory HIV-specific CD8 T lymphocytes*. **Nature**, 2001. 410(6824): p. 106-11.
16. **Chang, T.T., et al.**, *Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis*. **J Exp Med**, 1999. 190(5): p. 733-40.
17. **Coffman, R.L. and J. Carty**, *A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma*. **J Immunol**, 1986. 136(3): p. 949-54.
18. **Coffman, R.L.**, *Origins of the T(H)1-T(H)2 model: a personal perspective*. **Nat Immunol**, 2006. 7(6): p. 539-41.
19. **Coombe, D.R. and C.C. Rider**, *Lymphocyte homing receptors cloned--a role for anionic polysaccharides in lymphocyte adhesion*. **Immunol Today**, 1989. 10(9): p. 289-91.
20. **Dandekar, A.A., et al.**, *Axonal damage is T cell mediated and occurs concomitantly with demyelination in mice infected with a neurotropic coronavirus*. **J Virol**, 2001. 75(13): p. 6115-20.
21. **Daniels, M.A., et al.**, *Thymic selection threshold defined by compartmentalization of Ras/MAPK signalling*. **Nature**, 2006. 444(7120): p. 724-9.
22. **Davidson, A. and B. Diamond**, *Autoimmune diseases*. **N Engl J Med**, 2001. 345(5): p. 340-50.
23. **de Vos, A.F., et al.**, *Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs*. **J Immunol**, 2002. 169(10): p. 5415-23.
24. **Diamond, B., J. Bluestone, and D. Wofsy**, *The immune tolerance network and rheumatic disease: immune tolerance comes to the clinic*. **Arthritis Rheum**, 2001. 44(8): p. 1730-5.
25. **DiPaolo, R.J., et al.**, *CD4+CD25+ T cells prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells*. **J Immunol**, 2005. 175(11): p. 7135-42.

26. **Dong, C., et al.**, *ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function*. **Nature**, 2001. 409(6816): p. 97-101.
27. **Feger, U., et al.**, *Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients*. **Clin Exp Immunol**, 2007. 147(3): p. 412-8.
28. **Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky**, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. **Nat Immunol**, 2003. 4(4): p. 330-6.
29. **Gale, C.R. and C.N. Martyn**, *Migrant studies in multiple sclerosis*. **Prog Neurobiol**, 1995. 47(4-5): p. 425-48.
30. **Gay, F.W., et al.**, *The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion*. **Brain**, 1997. 120 (Pt 8): p. 1461-83.
31. **Genain, C.P., et al.**, *Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis*. **Nat Med**, 1999. 5(2): p. 170-5.
32. **Gleich, G.J.**, *Eosinophils, basophils, and mast cells*. **J Allergy Clin Immunol**, 1989. 84(6 Pt 2): p. 1024-7.
33. **Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, and M. Delgado**, *Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides*. **Nat Rev Immunol**, 2007. 7(1): p. 52-63.
34. **Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe**, *The B7 family revisited*. **Annu Rev Immunol**, 2005. 23: p. 515-48.
35. **Greter, M., et al.**, *Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis*. **Nat Med**, 2005. 11(3): p. 328-34.
36. **Grewal, I.S. and R.A. Flavell**, *The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation*. **Immunol Rev**, 1996. 153: p. 85-106.
37. **Haas, J., et al.**, *Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis*. **Eur J Immunol**, 2005. 35(11): p. 3343-52.
38. **Hammer, J., T. Sturniolo, and F. Sinigaglia**, *HLA class II peptide binding specificity and autoimmunity*. **Adv Immunol**, 1997. 66: p. 67-100.
39. **Hargreaves, D.C. and R. Medzhitov**, *Innate sensors of microbial infection*. **J Clin Immunol**, 2005. 25(6): p. 503-10.

40. Hemmer, B., et al., *Cytokine phenotype of human autoreactive T cell clones specific for the immunodominant myelin basic protein peptide (83-99)*. **J Neurosci Res**, 1996. 45(6): p. 852-62.
41. Heppner, F.L., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis*. **Nat Med**, 2005. 11(2): p. 146-52.
42. Herman, A.E., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion*. **J Exp Med**, 2004. 199(11): p. 1479-89.
43. Huesmann, M., et al., *Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice*. **Cell**, 1991. 66(3): p. 533-40.
44. Jacobsen, M., et al., *Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients*. **Brain**, 2002. 125(Pt 3): p. 538-50.
45. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. **Annu Rev Immunol**, 2002. 20: p. 197-216.
46. Kemper, C. and J.P. Atkinson, *T-cell regulation: with complements from innate immunity*. **Nat Rev Immunol**, 2007. 7(1): p. 9-18.
47. Kim, J.M., J.P. Rasmussen, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. **Nat Immunol**, 2007. 8(2): p. 191-7.
48. Klenerman, P., V. Cerundolo, and P.R. Dunbar, *Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools*. **Nat Rev Immunol**, 2002. 2(4): p. 263-72.
49. Kohm, A.P., et al., *Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis*. **J Immunol**, 2002. 169(9): p. 4712-6.
50. Korn, T., et al., *Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation*. **Nat Med**, 2007. 13(4): p. 423-31.
51. Kuchroo, V.K., et al., *Experimental allergic encephalomyelitis mediated by cloned T cells specific for a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. Fine specificity and T cell receptor V beta usage*. **J Immunol**, 1992. 148(12): p. 3776-82.

52. **Latchman, Y.E., et al.**, *PD-L1-deficient mice show that PD-L1 on T cells, antigen-presenting cells, and host tissues negatively regulates T cells.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2004. 101(29): p. 10691-6.
53. **Liu, C.P., et al.**, *Detection of glutamic acid decarboxylase-activated T cells with I-Ag7 tetramers.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000. 97(26): p. 14596-601.
54. **Lyons, J.A., et al.**, *B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide.* **Eur J Immunol**, 1999. 29(11): p. 3432-9.
55. **Lyons, J.A., M.J. Ramsbottom, and A.H. Cross**, *Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein.* **Eur J Immunol**, 2002. 32(7): p. 1905-13.
56. **Madsen, L.S., et al.**, *A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor.* **Nat Genet**, 1999. 23(3): p. 343-7.
57. **Malcherek, G., et al.**, *Supermotifs enable natural invariant chain-derived peptides to interact with many major histocompatibility complex-class II molecules.* **J Exp Med**, 1995. 181(2): p. 527-36.
58. **Markovic-Plese, S., et al.**, *T cell recognition of immunodominant and cryptic proteolipid protein epitopes in humans.* **J Immunol**, 1995. 155(2): p. 982-92.
59. **Medzhitov, R. and C.A. Janeway, Jr.**, *Innate immune recognition and control of adaptive immune responses.* **Semin Immunol**, 1998. 10(5): p. 351-3.
60. **Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr.**, *Innate immunity.* **N Engl J Med**, 2000. 343(5): p. 338-44.
61. **Morgan, M.E., et al.**, *CD25+ cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis.* **Arthritis Rheum**, 2003. 48(5): p. 1452-60.
62. **Mosmann, T.R., et al.**, *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* **J Immunol**, 1986. 136(7): p. 2348-57.
63. **Neumann, H., et al.**, *Induction of MHC class I genes in neurons.* **Science**, 1995. 269(5223): p. 549-52.
64. **Noseworthy, J.H., et al.**, *Multiple sclerosis.* **N Engl J Med**, 2000. 343(13): p. 938-52.

65. **Novak, E.J., et al.**, *MHC class II tetramers identify peptide-specific human CD4(+) T cells proliferating in response to influenza A antigen.* **J Clin Invest**, 1999. 104(12): p. R63-7.
66. **Oksenberg, J.R., et al.**, *Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients.* **Nature**, 1990. 345(6273): p. 344-6.
67. **Ollila, J. and M. Vihinen**, *B cells.* **Int J Biochem Cell Biol**, 2005. 37(3): p. 518-23.
68. **Pette, M., et al.**, *Myelin basic protein-specific T lymphocyte lines from MS patients and healthy individuals.* **Neurology**, 1990. 40(11): p. 1770-6.
69. **Piccirillo, C.A., et al.**, *Control of type 1 autoimmune diabetes by naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T lymphocytes in neonatal NOD mice.* **Ann N Y Acad Sci**, 2005. 1051: p. 72-87.
70. **Picker, L.J., M. Nakache, and E.C. Butcher**, *Monoclonal antibodies to human lymphocyte homing receptors define a novel class of adhesion molecules on diverse cell types.* **J Cell Biol**, 1989. 109(2): p. 927-37.
71. **Reddy, J., et al.**, *Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2004. 101(43): p. 15434-9.
72. **Reijonen, H., et al.**, *Detection of GAD65-specific T-cells by major histocompatibility complex class II tetramers in type 1 diabetic patients and at-risk subjects.* **Diabetes**, 2002. 51(5): p. 1375-82.
73. **Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry**, *Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys.* **Journal of Experimental Medicine**, 1933. 58(1): p. 39-U58.
74. **Rivers, T.M. and F.F. Schwentker**, *Vaccination of monkeys and laboratory workers against psittacosis.* **Journal of Experimental Medicine**, 1934. 60(2): p. 211-238.
75. **Rivers, T.M. and F.F. Schwentker**, *Encephalomyelitis accompanied by myelin destruction experimentally produced in monkeys.* **Journal of Experimental Medicine**, 1935. 61(5): p. 689-U12.
76. **Rudolph, M.G., R.L. Stanfield, and I.A. Wilson**, *How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors.* **Annu Rev Immunol**, 2006. 24: p. 419-66.
77. **Sadovnick, A.D., et al.**, *Evidence for genetic basis of multiple sclerosis. The Canadian Collaborative Study Group.* **Lancet**, 1996. 347(9017): p. 1728-30.

78. **Sakaguchi, S.**, *Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance.* **Cell**, 2000. 101(5): p. 455-8.
79. **Sakaguchi, S.**, *Regulatory T cells: mediating compromises between host and parasite.* **Nat Immunol**, 2003. 4(1): p. 10-1.
80. **Sakaguchi, S.**, *Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.* **Nat Immunol**, 2005. 6(4): p. 345-52.
81. **Salomon, B. and J.A. Bluestone**, *Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation.* **Annu Rev Immunol**, 2001. 19: p. 225-52.
82. **Shevach, E.M.**, *Regulatory T cells in autoimmunity*.* **Annu Rev Immunol**, 2000. 18: p. 423-49.
83. **Singer, A. and R.J. Hodes**, *Mechanisms of T cell-B cell interaction.* **Annu Rev Immunol**, 1983. 1: p. 211-41.
84. **Skulina, C., et al.**, *Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2004. 101(8): p. 2428-33.
85. **Sobel, R.A. and V.K. Kuchroo**, *The immunopathology of acute experimental allergic encephalomyelitis induced with myelin proteolipid protein. T cell receptors in inflammatory lesions.* **J Immunol**, 1992. 149(4): p. 1444-51.
86. **Sospedra, M. and R. Martin**, *Antigen-specific therapies in multiple sclerosis.* **Int Rev Immunol**, 2005. 24(5-6): p. 393-413.
87. **St John, T., et al.**, *Expression of CD44 confers a new adhesive phenotype on transfected cells.* **Cell**, 1990. 60(1): p. 45-52.
88. **Steinman, L.**, *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage.* **Nat Med**, 2007. 13(2): p. 139-45.
89. **Steinman, R.M. and M.C. Nussenzweig**, *Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.* **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2002. 99(1): p. 351-8.
90. **Steinman, R.M., et al.**, *Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance.* **Ann N Y Acad Sci**, 2003. 987: p. 15-25.
91. **Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig**, *Tolerogenic dendritic cells.* **Annu Rev Immunol**, 2003. 21: p. 685-711.

92. **Stern, L.J. and D.C. Wiley**, *Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins*. **Behring Inst Mitt**, 1994(94): p. 1-10.
93. **Strasser, A. and P. Bouillet**, *The control of apoptosis in lymphocyte selection*. **Immunol Rev**, 2003. 193: p. 82-92.
94. **Takahashi, T., et al.**, *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. **Int Immunol**, 1998. 10(12): p. 1969-80.
95. **Tedder, T.F., et al.**, *The selectins: vascular adhesion molecules*. **FASEB J**, 1995. 9(10): p. 866-73.
96. **Thornton, A.M. and E.M. Shevach**, *CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production*. **J Exp Med**, 1998. 188(2): p. 287-96.
97. **Thornton, A.M. and E.M. Shevach**, *Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific*. **J Immunol**, 2000. 164(1): p. 183-90.
98. **Viglietta, V., et al.**, *Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis*. **J Exp Med**, 2004. 199(7): p. 971-9.
99. **von Boehmer, H. and P. Kieselow**, *Negative selection of the T-cell repertoire: where and when does it occur?* **Immunol Rev**, 2006. 209: p. 284-9.
100. **von Budingen, H.C., et al.**, *Molecular characterization of antibody specificities against myelin/oligodendrocyte glycoprotein in autoimmune demyelination*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2002. 99(12): p. 8207-12.
101. **Watanabe, N., et al.**, *BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1*. **Nat Immunol**, 2003. 4(7): p. 670-9.
102. **Whitham, R.H., et al.**, *Lymphocytes from SJL/J mice immunized with spinal cord respond selectively to a peptide of proteolipid protein and transfer relapsing demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis*. **J Immunol**, 1991. 146(1): p. 101-7.
103. **Wildin, R.S., et al.**, *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. **Nat Genet**, 2001. 27(1): p. 18-20.
104. **Williams, K.C., E. Ulvestad, and W.F. Hickey**, *Immunology of multiple sclerosis*. **Clin Neurosci**, 1994. 2(3-4): p. 229-45.

105. **Zhang, J., et al.**, *Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis.* **J Exp Med**, 1994. 179(3): p. 973-84.
106. **Zhao, D.M., et al.**, Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. **Blood**, 2006. 107(10): p. 3925-32.
107. **Ziegler, S.F.**, F. Ramsdell, and M.R. Alderson, The activation antigen CD69. **Stem Cells**, 1994. 12(5): p. 456-65.
108. **Ziegler, S.F. and Y.J. Liu**, Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. **Nat Immunol**, 2006. 7(7): p. 709-14.

